

Entwicklung von Biomaterial- und Biotinten basierend auf rekombinanten Spinnenseidenproteinen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften der
Universität Bayreuth (BayNAT)

vorgelegt von

Annika Lechner

aus Bayreuth

2021

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2017 bis Dezember 2021 in Bayreuth am Lehrstuhl Biomaterialien unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheibel angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

| | |
|--------------------------------------|------------|
| Dissertation eingereicht am: | 17.12.2021 |
| Zulassung durch das Leitungsgremium: | 18.01.2022 |
| Wissenschaftliches Kolloquium: | 21.09.2022 |

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Hans Keppler

Prüfungsausschuss:

| | |
|-------------------------------|-------------|
| Prof. Dr. Thomas Scheibel | (Gutachter) |
| Prof. Dr. Hans-Werner Schmidt | (Gutachter) |
| Prof. Dr. Andreas Möglich | (Vorsitz) |
| Prof. Dr. Leonid Ionov | |

Für meine Eltern

| | |
|---|------------|
| Zusammenfassung | 1 |
| Summary | 3 |
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 <i>Biofabrikation</i> | 5 |
| 1.1.1 <i>Entwicklungen und Methoden der Gewebezüchtung</i> | 5 |
| 1.1.2 <i>Biodrucktechnologien</i> | 9 |
| 1.1.3 <i>Pneumatischer Extrusionsdruck und Biotinten</i> | 11 |
| 1.2 <i>Wirkstofffreisetzungssysteme</i> | 15 |
| 1.2.1 <i>Wirkstoffdepots und Wirkstofftransporter</i> | 15 |
| 1.2.2 <i>Trägermaterialien und Mechanismen der Wirkstofffreisetzung</i> | 18 |
| 1.2.3 <i>Wirkstoffsysteme in der Gewebezüchtung</i> | 20 |
| 1.3 <i>Spinnenseide</i> | 22 |
| 1.3.1 <i>Natürliche Spinnenseide</i> | 22 |
| 1.3.2 <i>Rekombinante Spinnenseidenproduktion</i> | 24 |
| 1.4 <i>Anwendung rekombinanter Spinnenseide in Biomaterialien</i> | 27 |
| 1.4.1 <i>Filme als Beschichtungen</i> | 27 |
| 1.4.2 <i>Partikel als Wirkstoffträger</i> | 29 |
| 1.4.3 <i>Hydrogele für Biotinten</i> | 31 |
| 2. Zielsetzung | 33 |
| 3. Synopsis | 35 |
| 3.1 <i>Optimierung und Analyse der Druckbarkeit von Hydrogelen aus eADF4(C16)</i> | 35 |
| 3.2 <i>Rheologie und Druckbarkeit von Biotinten mit erhöhter Zelldichte</i> | 39 |
| 3.3 <i>Extrusionsdruck von eADF4(C16)-Gelen aus wässrig-organischer Mischphase</i> | 43 |
| 3.4 <i>Gele aus wässrig-organischer Mischphase als Wirkstoffdepots</i> | 44 |
| 3.5 <i>Etablierung kovalenter Wirkstofffreisetzungssysteme mit potentieller Anwendung in der Biofabrikation</i> | 46 |
| 4. Literaturverzeichnis | 51 |
| 5. Publikationsliste | 60 |
| 6. Darstellung des Eigenanteils und Teilarbeiten | 61 |
| 6.1 <i>Teilarbeit I</i> | 61 |
| 6.2 <i>Teilarbeit II</i> | 92 |
| 6.3 <i>Teilarbeit III</i> | 106 |
| 6.4 <i>Teilarbeit IV</i> | 118 |
| 7. Danksagung | 131 |
| (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen | 132 |

Zusammenfassung

Für die Gewebezüchtung sind multidisziplinäre Ansätze zur Erzeugung artifizierlicher Organe nötig, um zukünftig auf den Einsatz von Spenderorganen und tierischen Materials verzichten zu können. Neben der Forschung an Zellen und Stammzellen, müssen kompatible Materialien entwickelt werden. Ein funktionales Gewebe kann durch Kombination der entsprechend lebenden Komponente mit einem passenden formgebenden Material entstehen. Dieses sollte im besten Fall mit der Zeit vollständig von den Zellen besiedelt und ab-, beziehungsweise zu zelleigenem Material umgebaut werden. Mit dem Begriff Biofabrikation wird eine Vielzahl an Technologien beschrieben, welche es ermöglichen, Material und Zellen gemeinsam und gleichzeitig zu verarbeiten. Meist werden dafür additive Fertigungstechniken verwendet, die einen heterogenen und hierarchischen Aufbau der Strukturen, wie im natürlichen Vorbild, ermöglichen. Eine Methode der Biofabrikation ist der Biodruck, bei dem aus Zellen und Material bestehende Biotinten in genau definierte dreidimensionale Strukturen extrudiert werden. Neben der technischen Herausforderung ist die Biomaterialkomponente entscheidend für den Erfolg dieser Methoden. Das Material, meist ein Hydrogel, bestimmt die generelle Druckbarkeit der Biotinte und die Viabilität der Zellen. Die im darauffolgenden stattfindende zelluläre Entwicklung und Reifung des Konstruktes muss in vielen Fällen zusätzlich gesteuert werden. Hierfür bietet sich die Stimulation bestimmter zellulärer Prozesse durch die Gabe von Hormonen, Wachstumsfaktoren und anderer Signalmoleküle an. Besonders die Kontrolle über Zeitpunkt und Dauer ist für deren exakte Wirkung wichtig.

Um dem Ziel der Biofabrikation näher zu kommen, wurden in der vorliegenden Dissertation verschiedene Ansätze verfolgt. Grundlage hierfür war der 3D-Biodruck von Hydrogelen und Biotinten aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) und weiteren davon abgeleiteten Proteinvarianten mit speziellen Funktionen. Der erste Fokus der Arbeit lag auf der Optimierung deren Druckbarkeit, der Entwicklung und Charakterisierung neuer Biotinten mit erhöhter Zelldichte für zukünftige funktionale Konstrukte und der Etablierung von Wirkstoffsystemen zur Erweiterung der Biofabrikationsmöglichkeiten. Dazu wurde der Extrusionsdruck von azellulären Hydrogelen, sogenannten Biomaterialtinten, aus eADF4(C16) betrachtet. Neue Erkenntnisse zur temperaturabhängigen Rheologie sowie dem Einfluss verschiedener Spitzen am Druckkopf führten zur Verbesserung der Druckbarkeit. Es konnte gezeigt werden, dass das rein physikalisch quervernetzte Hydrogel in komplexe Strukturen gedruckt werden kann. Es wurde demonstriert, dass Abstände von mehreren Millimetern verlässlich von einem Filamentstrang in der Luft überbrückt werden können. Dieser Erfolg wurde zusätzlich durch den Druck des Hydrogels in die Form und Größe einer humanen Aortenklappe, reproduzierbar mit zwei verschiedenen Extrusions-druckern, gezeigt. Die gewonnenen Erkenntnisse konnten ebenfalls auf ein neu entwickeltes eADF4(C16)-Gel aus

wässrig organischer Mischphase übertragen werden. Zunächst konnte die generelle Druckbarkeit dieser Gele in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Außerdem wurde das azelluläre Material ebenfalls zuverlässig durch Extrusion in eine Struktur im Zentimeterbereich und mit überhängenden Abschnitten gebracht.

Ein zweiter Fokus der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung neu entwickelter Biotinten. Basierend auf verschiedenen eADF4(C16) Varianten mit einer Zelldichte von bis zu zehn Millionen Zellen pro Milliliter wurden deren Rheologie, Druckbarkeit und Viabilität untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich sowohl das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) als auch dessen Variante eADF4(C16)-RGD dazu eignen, mit hohen Zelldichten verdrückt zu werden. Auch mit diesen Biotinten konnten Abstände bis zu 16 mm in der Luft überbrückt werden. Die mit dem Integrin-Bindepeptid RGD ausgestattete Variante zeigte zusätzlich einen Vorteil während der darauffolgenden Reifung der Konstrukte.

Der dritte Fokus der vorliegenden Arbeit lag in der Entwicklung neuer Wirkstofffreisetzungssysteme. Zunächst konnten die aus wässrig-organischer Phase gebildeten eADF4(C16)-Gele erfolgreich mit dem wasserunlöslichen Wirkstoff 6-Mercaptopurin nicht-kovalent beladen und dessen anschließende Freisetzung gezeigt werden. In Kombination mit der ebenfalls in dieser Arbeit demonstrierten Druckbarkeit der Biomaterialtinte ergeben sich für diese neuartigen Gele beispielsweise Anwendungen als injizierbare Wirkstoffdepots.

Der vierte Fokus lag in der Kontrolle der Freisetzung von Substanzen. Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurden Wirkstoffsysteme durch kovalente Bindung an rekombinante Spinnenseidenproteine etabliert. Dafür wurde sowohl ein redox- als auch ein pH-sensitives System durch genetische und chemische Modifikation auf verschiedene eADF4(C16)-Varianten übertragen. Es konnten Modellwirkstoffe und die in der Chemotherapie relevanten Zytostatika 6-Mercaptopurin und Doxorubicin reversibel an Partikel und Filme aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen gekoppelt werden. Beide Systeme zeigten Stabilität unter physiologischen Bedingungen mit der Möglichkeit zur kontrolliert auslösbaren Freisetzung der Substanzen. Diese Modifikationen erlauben es in Zukunft, Biomaterial- oder Biotinten aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen entweder direkt oder durch zusätzliches Einkapseln beladener Partikel zu funktionalisieren. Dadurch können zelluläre Prozesse während der Reifung der gedruckten Konstrukte gezielt gesteuert werden.

Summary

Tissue engineering relies on multidisciplinary approaches to generate artificial organs. The goal is to reduce the usage of donor tissue and animal-sourced material. The research requires knowledge about cells and stem cells and biocompatible materials have to be developed. Functional tissues can be generated by combining the appropriate living component and suitable structural parts. In the optimal case, the scaffold is degraded and reorganized by the cells. During this maturation, the cells build up their own extracellular matrix. Biofabrication describes various technologies that enable the simultaneous processing of cells and materials. With the aim to simulate the hierarchical and heterogeneous nature of tissues and organs, mostly additive manufacturing techniques are employed. Bioprinting, for example, is used to deposit so-called bioinks, containing cells and material, in defined three-dimensional structures. In addition to the technical challenges, the success of these methods relies on the material components, which are mostly hydrogels. Their properties decide the printability of the bioinks and the viability of the encapsulated cells. After printing, the constructs have to undergo maturation. This process can and needs to be guided additionally. Cellular development can be stimulation with specific hormones, growth factors, and other signaling molecules. For the desired effect, the exact time and duration of their action have to be controlled.

To work towards the goal of biofabrication, different strategies were employed within this dissertation. The bioprinting of hydrogels and bioinks made of the recombinant spider silk protein eADF4(C16) and variants derived thereof were the foundation this thesis was built on. The first focus lay on optimizing their printability, characterizing new bioinks with increased cell densities, and establishing new drug delivery systems on recombinant spider silk proteins to create additional possibilities for biofabrication applications. Therefore, the extrusion printing of acellular eADF4(C16) hydrogels, so-called biomaterial inks, was investigated. New insights into temperature-dependent rheological behavior and the effect of different printing nozzles enabled the optimization of the printing outcome. Within this work, printing the physically cross-linked hydrogel into complex structures was demonstrated. Distances of multiple millimeters could be bridged without additional support. This success was verified by creating the shape and size of a human aortic heart valve, reproducible on two different extrusion based bioprinters. The knowledge gained during this part was applied to print a newly developed eADF4(C16)-gel formed in aqueous organic solvents. In this work, the general printability of these gels was demonstrated. Additionally, it was shown that this acellular biomaterial ink can be printed into a complex structure as well.

The second focus of this dissertation dealt with the characterization of newly developed bioinks. Based on the recombinant spider silk proteins, bioinks with cell densities of up to ten million cells per milliliter were generated and their rheological behavior, printability, and cell viability examined. This work showed that both eADF4(C16) and its integrin-binding peptide RGD containing variant eADF4(C16)-RGD are suitable for processing with high cell content and to be extrusion printed. As demonstrated for the acellular biomaterial inks before, these bioinks were able to bridge gaps up to 16 millimeters without any support. Regarding the cellular development during maturation of printed construct, the RGD-containing variant showed an advantage over eADF4(C16).

The third focus of this dissertation dealt with the development of new drug depots and delivery release systems. Firstly, the eADF4(C16)-gel formed in an aqueous organic solvent was successfully loaded with the water-insoluble drug 6-mercaptopurine. The subsequent release from the gel was demonstrated as well. In combination with the before achieved printability, new possibilities were enabled for this material. For example, the gels could find applications as injectable drug depots.

The fourth focus lay in controlling the release of drugs and substances. Therefore, two covalent systems were established on recombinant spider silk proteins. Using genetic as well as chemical modifications, redox- and pH-sensitive coupling was achieved on different eADF4(C16)-variants. In this work, model substances, as well as the therapeutically relevant drugs 6-mercaptopurine and doxorubicin were reversibly coupled on particles and films made of recombinant spider silk proteins. Both systems showed stability under physiological conditions with the option to controllably release the substance upon applying a specific trigger. These modifications allow for future functionalization of biomaterial- and bioinks, either via a direct coupling or via encapsulation of drug-loaded particles within the material. This will enable to navigate the cellular development during the maturation of biofabricated constructs.

1. Einleitung

1.1 Biofabrikation

1.1.1 *Entwicklungen und Methoden der Gewebezüchtung*

Mit dem Ziel Ersatzgewebe zu entwickeln um verlorene biologische Funktionen wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern wurde die Gewebezüchtung (*tissue engineering*) im Jahr 1993 an den Schnittstellen zwischen Ingenieur- und Biowissenschaften definiert.^{1,2} Der ursprüngliche Ansatz zur Gewebetherapie basierte auf der Vermehrung organspezifischer Zellen. Diese wurden dem Patienten entnommen, unter Laborbedingungen vermehrt und schließlich wieder eingebracht. Je nach Grad der Schädigung bzw. des Organverlustes, ist diese Zuführung von funktionalen Zellen allerdings keine ausreichende Therapie. Um ganze Gewebe oder Teile davon zu ersetzen, werden zusätzlich Trägermaterialien benötigt. Sie sollen von Zellen besiedelt werden und zu funktionalen Geweben reifen. Hierfür wurden zunächst native patienteneigene Gewebe, wie zum Beispiel Fett- oder Hautgewebe, homologe patientenfremde Donorgewebe oder heterologe Gewebe, zum Beispiel aus Rindern, verwendet.^{3,4} Aufgrund des Mangels an Donorgewebe und Komplikationen durch Abstoßungsreaktionen gegenüber patientenfremden Materialien, liegt die Zukunft der Gewebezüchtung allerdings in der Verwendung künstlicher Matrices. Der sich ständig weiterentwickelnde Bereich der Zellbiologie wird ergänzt durch neue Materialien und eine Vielzahl an Fabrikations- und Prozessierungstechniken.⁵ Aufgrund der Vermeidung von Material tierischen Ursprunges ergibt sich außerdem das Potential für die Entwicklung biologisch relevanter 3D-Modelle, die für die Forschung an neuen Medikamenten und Therapien herangezogen werden können.^{6,7} Entscheidend für die biologische Funktion von *in vitro* hergestelltem Gewebe sind dabei die verwendeten Zellen. Mit Fortschritten in der Stammzellforschung wird die Notwendigkeit von patienteneigenen organspezifischen Zellen durch die Möglichkeit der Verwendung und Differenzierung von Stammzellen ergänzt.^{8,9} Die Materialien, die als Matrix bzw. Gerüst eingesetzt werden, sind form- und strukturgebend für die dreidimensionalen Konstrukte und können die zelluläre Entwicklung unterstützen.^{10,11}

Die klassischen und älteren Verfahren zur künstlichen Gewebezüchtung werden als „von-oben-nach-unten“ (*top-down*) Herangehensweisen bezeichnet (Abbildung 1A). Hier wird zunächst ein bioabbaubares poröses Gerüst hergestellt, danach kommt es zur Besiedelung mit Zellen. Während der darauffolgenden Kultivierung sollen die Zellen das Gerüst umgestalten bzw. durch Abbau und Ablage eigener extrazellulärer Matrix ersetzen. Dieser Prozess kann durch mechanische und biologische Stimulation unterstützt werden.¹²

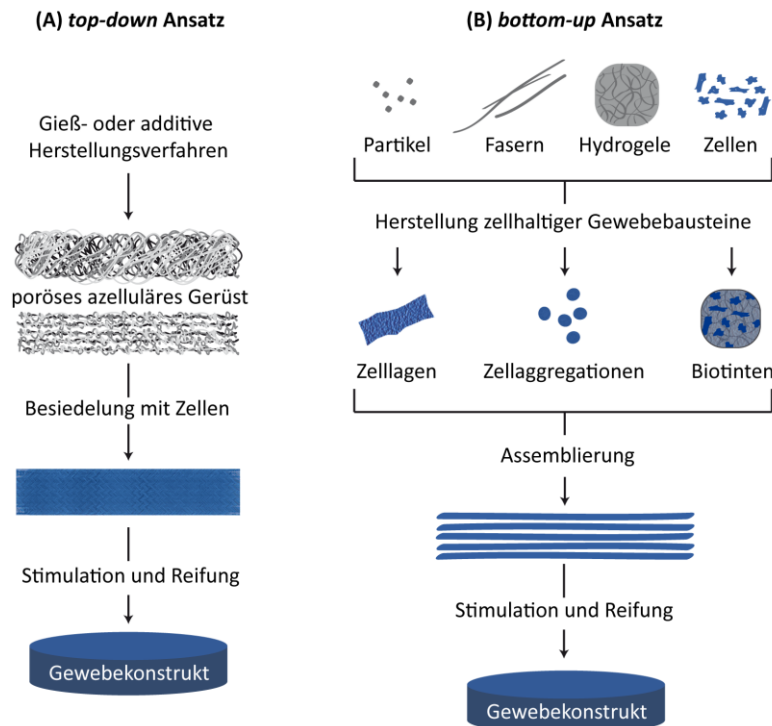


Abbildung 1. Unterschiedliche Ansätze der Gewebezüchtung. A) Bei der „von-oben-nach-unten“ (*top-down*) Herangehensweise wird zuerst die oberste Hierarchieebene, das Material ohne Zellen, in gewünschter Form hergestellt und anschließend die Poren/Oberflächen mit Zellen besiedelt. B) Der „von-unten-nach-oben“ (*bottom-up*) Ansatz beginnt auf der kleinsten Ebene, mit dem Vereinen von Zellen und Material zu Gewebebausteinen, welche danach durch Selbstassemblierung oder gerichtet in makroskopische Konstrukte gebracht werden. In beiden Fällen ist die anschließende Reifung zum Gewebekonstrukt essentiell.

Traditionell werden die dreidimensionalen Gerüste hierfür mittels Gefriertrocknung, Auswaschung von Partikeln oder Salz, Schäumen oder thermisch induzierter Phasenseparation hergestellt. Dadurch können die Dimensionen gut kontrolliert werden. Die Mikroarchitektur, wie zum Beispiel die Größe, Geometrie und Verbindung der Poren, lassen sich nur bedingt steuern.¹³⁻¹⁶ Mit Aufkommen der additiven Produktionstechnik wurden auch neue Methoden zur Gerüsterstellung für die Gewebezüchtung ermöglicht. Eine Vielzahl von natürlichen und synthetischen Polymeren, Keramiken und sogar Metallen können zum Beispiel mittels Stereolithografie, selektiver Lasersinterung oder Schmelzschichtung prozessiert werden. Das bei diesen Methoden verwendete Verfahren der Substratschichtung (*layer-by-layer*) ermöglicht verbesserte Auflösung und Genauigkeit der Gerüste.¹⁷ Durch die computergestützte Konstruktion, auf der die additive Manufaktur beruht, können aufwändigere und auch patientenspezifische Konstrukte realisiert werden. Außerdem ergibt sich eine gute Reproduzierbarkeit der makroskopischen Strukturen. Die Mikroanordnung und Heterogenität natürlichen Gewebes sowie die hierarchische Anordnung verschiedener Zellen und Materialien können allerdings auch mit fortschrittlichen Methoden der klassischen Gewebezüchtung nicht erreicht werden.^{12,17,18}

In den letzten Jahren wurden die sogenannten „von-unten-nach-oben“ (*bottom-up*) Ansätze etabliert (Abbildung 1B). Im Gegensatz zu vorangegangenen Verfahren werden hier die Zellen von Beginn an, alleine oder zusammen mit dem Material, in einer Art Modulbauweise verwendet, um Gewebe zu züchten. Biokompatible Materialien können in unterschiedlichsten Morphologien, wie zum Beispiel als Partikel, als eindimensionale Fasern und Filme oder als dreidimensionale Hydrogele mit Zellen in der Nano- und Mikroebene kombiniert werden. Diese Bausteine können dann durch Selbstassemblierung oder gerichtet durch entsprechende Verarbeitungstechnologien zu makroskopischen Gewebekonstrukten vereint werden.^{18,19} Mit dem frühen Einbringen der Zellen ergibt sich ein höherer Anspruch an die Verarbeitungstechnologien. Diese müssen nun nicht mehr nur geeignet für die entsprechenden Materialien, sondern auch kompatibel mit den meist weitaus empfindlicheren Zellen sein. Die Kombination von Material und Zellen zu Beginn mit anschließender Verarbeitung eröffnet allerdings neue Möglichkeiten zur Erzeugung heterogener und hierarchischer Konstrukte. Zum Beispiel können adhäsive und/oder funktionalisierte Oberflächen verwendet werden um Zellrasen zu züchten. Nach dem Ablösen entstehen durch Stapeln, Rollen oder Falten dreidimensionale Konstrukte.^{20,21} Ebenso können dreidimensionale Zellverbände, sogenannte Zell Sphäroide, als Bausteine verwendet werden.²² Hierbei handelt es sich um selbstassemblierte Zellaggregationen, die von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen getrieben sind. Verglichen mit der Verwendung einzelner Zellen, ermöglichen diese Zellverbände durch die starke Vernetzung ein deutlich verbessertes Verhalten, welches dem von natürlichem Gewebe nahekommt.^{22,23} Biokompatible Materialien können zusätzlich als Schichten zwischen Zelllagen oder als Fasern und Partikel in Zellverbände eingebracht werden.^{24,25}

Mit der Entwicklung fortschrittlicher Technologien zur gerichteten Assemblierung der Material- und Zellbausteine wurde die Biofabrikation als eigenständiger Bereich der *bottom-up* Gewebezüchtung etabliert. Hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, werden additive Verfahren eingesetzt, um Zell-Biomaterial-Konstrukte zu generieren. Von Bioassemblierung wird gesprochen, wenn zellhaltige Gewebebausteine, zum Beispiel durch gerichtete Fusion von Sphäroiden, verarbeitet werden.²⁶ Mittels Biodruck werden neben bereits fabrizierten Bausteinen auch kleinere Einheiten, zum Beispiel nur Zellen, Proteine oder Signalmoleküle verwendet, um gewebeäquivalente hierarchische Konstrukte herzustellen.^{27,28} Die Entwicklung geeigneter 3D-Druck-Technologien ermöglicht dabei, durch direkte Platzierung, mehr Kontrolle über zelluläre Verteilung und Heterogenität.²⁶ Neben der Positionierung von Sphäroiden gibt es noch zahlreiche weitere Möglichkeiten, Zellen und Materialien computergesteuert zu organisieren. Unabhängig von den verwendeten Technologien wird dabei zwischen der Verarbeitung von Biomaterial- und der von Biotinten unterschieden. Biotinten bestehen während der Prozessierung mindestens aus Zellen, welche optional mit

Materialien kombiniert werden können. Bei Biomaterialtinten handelt es sich um reines, natürliches oder synthetisches, Material, welches zum Zeitpunkt der Verarbeitung keine lebende Komponente enthält. Nach Bioassemblierung oder Biodruck können die aus Biomaterialtinten erschaffenen Konstrukte ebenfalls mit Zellen in Kontakt gebracht werden.²⁹ Einzelne Zellen oder Sphäroide werden zum Beispiel als Suspension verarbeitet. Zusätzlich können Partikel oder Fasern, als Träger von Wirkstoffen oder zur Veränderung der mechanischen Eigenschaften, Teile von Biotinten sein. Häufige Basis von Biotinten sind Hydrogele oder Vorstufen solcher. Ganz allgemein handelt es sich dabei um feste, gel-artige Materialien, im Bereich zwischen weich und schwach bis fest und zäh. Das Hydrogel besteht aus dreidimensional vernetzten flexiblen Polymerketten. Das Netzwerk kann eine große Menge an Wasser aufnehmen und quellen.^{30,31} Hydrogele können ebenfalls die Grundlage für Biomaterialtinten sein. Da hier Zellen nicht Bestandteil der Formulierung sind, ergibt sich darüber hinaus eine größere Auswahl an Materialien und Verarbeitungstechnologien. Es können zusätzlich zu Polymergelen auch Metalle, Keramiken, Zemente und Silikone entweder als temporäre oder dauerhafte Stützstruktur in mittels Biotinten generierte Konstrukte eingebracht oder als Matrix für die anschließende Besiedelung mit Zellen verarbeitet werden.³⁰

Bei allen Ansätzen der Gewebezüchtung, unabhängig davon ob ein zellfreies Gerüst nach Herstellung besiedelt werden soll oder ob z.B. ein zellhaltiges Hydrogel mittels 3D-Druck verarbeitet wird (siehe Abschnitt 1.1.2), unterliegen die Materialien strengen Anforderungen. Für die medizinische Anwendung kommen nur biokompatible Materialien in Frage. Dadurch werden toxische Stoffe und solche, die eine Immunantwort erzeugen, ausgeschlossen. Außerdem sollen die Materialien für die gewünschte biologische Funktion geeignet sein, diese unterstützen und dabei keinen negativen Einfluss auf benachbartes Gewebe haben.³² Für die gewünschte zelluläre Entwicklung sollten die Matrices möglichst ähnlich zur natürlichen extrazellulären Matrix sein. Der gewollte Abbau der künstlichen Matrix und der Aufbau einer natürlichen zelleigenen Proteinumgebung sollte dabei an die Werkzeuge und an die Geschwindigkeit des ebenfalls im natürlichen Gewebe ständig stattfindenden Umbaus der Matrix angepasst sein.³³ Die Auswahl an geeigneten Materialien wird weiterhin durch die für die jeweilige Verarbeitungstechnik notwendigen chemischen und mechanischen Eigenschaften bedingt und eingeschränkt. Das verwendete Material und dessen Funktionalisierung, zum Beispiel durch Peptide oder Enzyme ermöglicht neben der strukturellen Unterstützung des Konstruktes auch das Steuern der Selbstassemblierung der Gewebebausteine und das Stimulieren der Zellen.^{21,34}

1.1.2 Biodrucktechnologien

Bevor im nächsten Abschnitt aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit genauer auf den pneumatischen Extrusionsdruck eingegangen wird, sollen zunächst alle in der Biofabrikation zum Einsatz kommenden Biodrucktechnologien zur Verarbeitung von Biomaterial- und Biotinten basierend auf Hydrogelen vorgestellt werden.

Zunächst kann zwischen der Extrusion eines kontinuierlichen Filamentstranges und der Generation mit anschließender Positionierung individueller Tröpfchen unterschieden werden.³⁵ Grundsätzlich besteht der Aufbau eines Biodruckers aus einer mit Bio- oder Biomaterialtinte gefüllten Kartusche mit einer Düse, durch welche das Material auf einem Druckbett platziert wird. Hierfür werden die Kartusche und das Druckbett gegeneinander, zunächst in Richtung der x- und y-Achse bewegt und anschließend der Abstand in z-Ebene vergrößert, um das Konstrukt Schicht-für-Schicht aufzubauen (siehe Abschnitt 1.1.3). Die Extrusion eines Filaments erfolgt dabei entweder pneumatisch oder durch mittels Kolben oder Schrauben erzeugter mechanischer Kräfte (Abbildung 2A).³⁶ Mit dieser Technologie können niedrig bis hochviskose Biotinten verarbeitet werden. Der vergleichsweise einfache technische Aufbau kann durch eine Temperaturkontrolleinheit, ein UV-System zur Nachbehandlung oder die Verwendung mehrerer austauschbarer Kartuschen nebeneinander erweitert werden. Limitierungen des Extrusionsdruckes zeigen sich bei der Druckgeschwindigkeit und der Auflösung. Außerdem kann durch die Platzierung von Hydrogelsträngen mit Durchmessern im Mikrometerbereich keine heterogene Anordnung von Zellen oder Materialien auf Nanoebene erzielt werden.³⁵

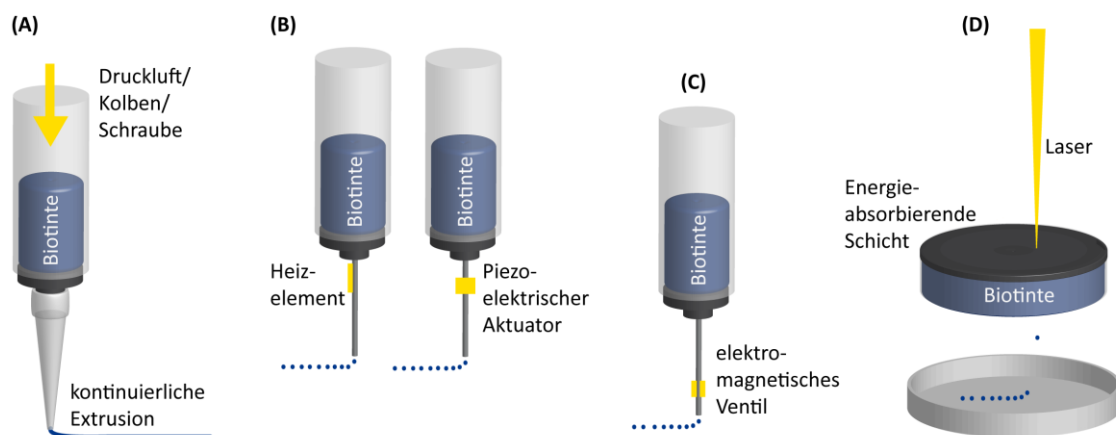


Abbildung 2. Übersicht verschiedener Biodrucktechnologien. A) Beim Extrusionsdruck wird durch einen nach unten gerichteten mechanischen Druck die Biotinte durch eine Düse extrudiert und dabei ein kontinuierlicher Filamentstrang erzeugt. B) Durch ein Heizelement oder einen piezoelektrischen Aktuator, sowie C) durch ein elektromagnetisches Ventil können Tröpfchen am Ende der Düse erzeugt und platziert werden. D) Mittels Laser können direkt, ohne Düse, Tröpfchen erzeugt werden.

Für die Erzeugung kleinster Tröpfchen werden zum einen Technologien des Tintenstrahldruckers verwendet. Diese Drucker bestehen ebenfalls aus einer mit Biotinte befüllten Kartusche innerhalb eines in drei Achsen bewegbaren robotischen Systems. Die Düse ist mit spannungsgetriebenen thermalen, piezoelektrischen oder elektrostatischen Systemen zur Tröpfchengenerierung ausgestattet (Abbildung 2B). Durch diese Techniken können Tröpfchen in Größen zwischen 10 und 100 μm entweder kontinuierlich erzeugt und platziert oder einzeln gesteuert werden.³⁷ Im thermischen System wird die Düse computergesteuert aufgeheizt. Die plötzliche Erwärmung verursacht eine Volumenzunahme, wodurch es zur Ausstoßung der Biotinte und Bildung eines Tröpfchens kommt. Ist die Düse mit einem piezoelektrischen Material umgeben, kommt es durch mechanische Deformation, bzw. Kontraktion der Düse als Reaktion auf ein elektrisches Feld ebenfalls zur Materialausstoßung. Elektrostatisch getriebene Systeme sind weitaus seltener, da hierfür leitfähige Biotinten benötigt werden.³⁸ Diese Methoden zeichnen sich durch eine erhöhte Auflösung aus, welche nur durch die Tröpfchengröße limitiert ist. Es ergeben sich allerdings mehr Anforderungen an die Biotinten, so können zum Beispiel nur weniger viskose Materialien verdruckt werden. Außerdem sind die Zellen während des Druckprozesses einem höheren mechanischen Stress ausgesetzt, was sich negativ auf deren Viabilität auswirken kann.^{35,37}

Neben diesen Tintenstrahltechnologien können kleinste Einheiten von Biotinten oder sogar einzelne Zellen durch Mikroventile (Abbildung 2C) oder laserbasiert (Abbildung 2D) exakt im dreidimensionalen Raum platziert werden. Elektromagnetische Ventile an der Düse können für ein Minimum von 0.1 ms geöffnet werden. In Kombination mit pneumatischem Druck kommt es bei Überschreiten der Oberflächenspannung und Viskosität der Biotinte zur Ausstoßung des Materials. Auch hier limitiert die kleine Düsenöffnung (bis 250 μm) die maximale Viskosität und die Menge an Zellen, die in der Biotinte verteilt sind. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei dem laserbasierten Druck um eine Technologie, welche komplett ohne Düse auskommt. Der Aufbau besteht aus einer Donor- und einer Kollektorschicht. Die Donorschicht ist aus einer energie-absorbierenden Schicht und einer Schicht aus Substrat, zum Beispiel einem Hydrogel mit Zellen, aufgebaut. Ein pulsierender Laser gibt gezielt Energie auf die oberste Schicht ab, welche diese absorbiert, wodurch Druck auf die darunterliegende Substratschicht ausgeübt wird. Dieser Druck bewirkt die Abgabe eines Tröpfchens auf die mit einem Abstand von 350 - 500 μm darunterliegende Kollektorplatte, wo das gedruckte Konstrukt entsteht. Nachteile dieser Methode zeigen sich in der geringen Durchsatzrate und in möglichen negativen Effekten der energie-absorbierenden Schicht, welche in direktem Kontakt zur Substratschicht liegen muss. Die Düsen-freie Technik erlaubt jedoch die Verwendung von Biotinten mit hoher Zelldichte und hoher Viskosität.^{35,39}

1.1.3 Pneumatischer Extrusionsdruck und Biotinten

Der gesamte Prozess des Biodruckes, in diesem Abschnitt am Beispiel des Extrusionsdruckes aufgezeigt, beginnt mit der Entwicklung und Herstellung der Bio- oder Biomaterialtinte und des rechnerunterstützten Entwurfs des zu druckenden Konstruktes. Die Bewegungen und Operationen des Druckers werden anschließend durch den sogenannten G-Code beschrieben. Bei diesem handelt es sich um die generelle Kommandosprache für CNC-Maschinen (*Computerized Numerical Control*).⁴⁰ Während und unmittelbar nach dem Druck muss die korrekte Ausbildung eines Filamentstranges und dessen Formtreue evaluiert werden. Bei Verwendung von Biotinten folgt die Reifung und Kultivierung der Zellen mit anschließender Analyse des Konstruktes. Während dieser ist eine optimale Umgebung für zelluläre Prozesse notwendig (Abbildung 3). Besonderes Augenmerk während des gesamten Vorganges liegt auf den rheologischen Eigenschaften (Fließverhalten) der Biotinte in den einzelnen Schritten, sowie der Viabilität der eingesetzten Zellen. Dabei muss vor allem das Zusammenspiel funktionieren. Während die Zellen die Materialeigenschaften deutlich beeinflussen können, wirkt sich die Materialkomponente einer Biotinte maßgeblich auf das Überleben und die Entwicklung der Zellen aus.^{41,42}

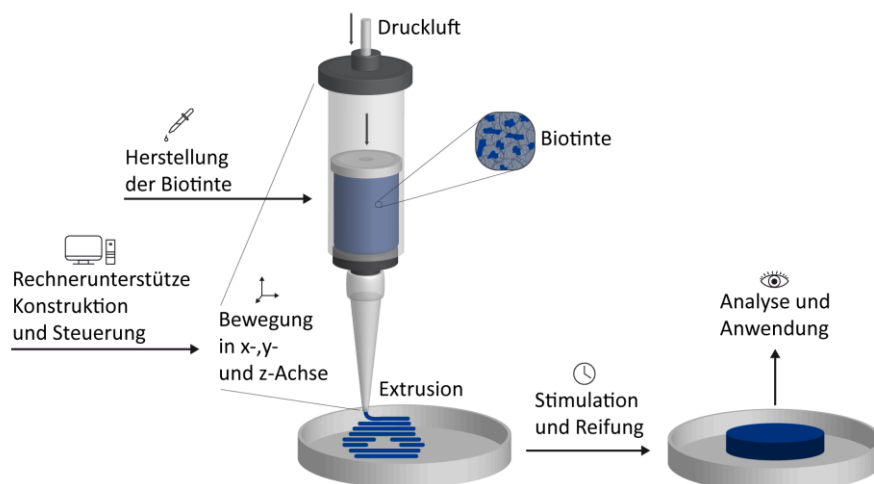


Abbildung 3. Darstellung des Extrusionsdruckes von Biotinten in der Biofabrikation. Zu Beginn des Prozesses steht die Rechnerunterstützte Entwicklung des Modells sowie die Herstellung der Biotinte. Durch Anlegen von Druckluft kommt es am Ende der Druckkopfspitze zur Extrusion des Biotinten-Filamentes; dabei wird der Druckkopf softwaregesteuert in x- und y-Richtung, und nach Vervollständigung jeder Schicht auch in der z-Achse bewegt. An den Druckprozess schließt sich die Kultivierung der im Konstrukt vorhandenen Zellen an, wobei es zur Reifung des Konstruktes kommt. Anschließend kann das Gewebekonstrukt auf Vitalität und Funktionalität untersucht werden.

Die Grundlage von Bio- und Biomaterialtinten sind meist Hydrogele aus natürlichen oder synthetischen Polymeren. Natürliche Materialien, darunter Agarose, Alginate, Zellulose, Chitosan, Kollagen, Dextran, Fibrin, Gelatine und Seide, überzeugen durch ihre Ähnlichkeit mit der im natürlichen Gewebe vorkommenden extrazellulären Matrix, ihrer Abbaubarkeit und

der vorwiegend einfachen Verarbeitung.⁴³ Synthetische Materialien hingegen sind zwar meist weniger biokompatibel, besitzen aber deutlich geeignetere mechanische Eigenschaften, welche durch Modifikationen, die genaue Kompositionen und die Art der Polymerisierungsreaktionen einstellbar sind. Als Monomere in der Hydrogelsynthese werden zum Beispiel Acrylsäuren, Acrylamide, Methacrylate, Glykole und Vinyls verwendet.^{30,44} Um die Eigenschaften der verschiedenen Materialien zu vereinen und zu variieren, werden Materialien unterschiedlichsten Ursprunges miteinander kombiniert. So entstehen zum Beispiel Hydrogele aus den natürlichen Polymeren Chitosan und Gelatine, sowie dem synthetischen Polymer Polyvinylalkohol, welches die Stabilität verbessert.^{45,46} Außer anhand der Materialklassen, können Hydrogele auch nach der Vernetzungsart der einzelnen Polymerketten klassifiziert werden. Zum einen gibt es physikalisch quervernetzte Hydrogele, die häufig in der Natur vorkommen. Hierbei handelt es sich um Verwickelungen der Ketten, zusätzlich stabilisiert durch nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen. Diese Art der Quervernetzung ist meist nur temporär und reversibel. Polymere können außerdem chemisch quervernetzt werden. Hierbei handelt es sich um kovalente Verknüpfungen der Ketten. Mit dem Grad der Vernetzung können die mechanischen Eigenschaften und das Schwellverhalten der Hydrogele beeinflusst werden.⁴⁷

Die Druckbarkeit der Tinte steht in direktem Zusammenhang mit den rheologischen Eigenschaften. Für den Druckprozess entscheidend ist scherverdünnendes Verhalten. Dieses beschreibt den Zusammenhang zwischen Viskosität einer Lösung oder eines Hydrogels mit dem darauf wirkenden Scherstress. Mit zunehmendem Stress verringert sich bei einem scherverdünnenden Material die Viskosität (Abbildung 4A). Während des Extrusionsdruckes kommt es bei konstantem Druck durch die Verjüngung im Übergang zwischen Kartusche und Düse zu vermehrtem Scherdruck. Nur im Falle einer damit verbundenen verringerten Viskosität kann es zur Extrusion kommen. Dieser Effekt ist auf die Unterbrechung der Interaktionen und die Entwirrung der Ketten zurückzuführen. Im besten Fall erholt sich die Viskosität nach Abfall des Scherstress, um die Stabilität des gedruckten Stranges zu garantieren.⁴⁸⁻⁵⁰ Um während des Druckprozesses zu hohe Scherraten und eine mögliche dauerhafte Beeinträchtigung des Netzwerkes zu vermeiden, können zum Beispiel niederviskose Gele gedruckt und nach Extrusion chemisch oder durch UV-Nachbehandlung quervernetzt werden.^{51,52} Neben dem scherverdünnenden Verhalten sind die Viskoelastizität und die Fließgrenze entscheidend für die Druckbarkeit der Tinte. Diese beiden Größen können durch oszillatorische Messungen der Rheologie bestimmt werden. Wichtige Messgrößen sind das Speicher- und das Verlustmodul. Das Speichermodul (G') beschreibt den elastischen Anteil des Materials. Gemessen wird die Energie, die bei Verformung im Material gespeichert wird und nach Entspannung zur Rückformung in den Ausgangszustand verwendet werden kann. Beim Verlustmodul (G'') handelt es sich um Energie, welche während der Deformation,

zum Beispiel in Form von Wärme, verloren geht. Es beschreibt somit den viskosen Anteil des Materials. Im Ruhezustand besitzt ein Hydrogel ein größeres Speicher- als Verlustmodul. Die dominierende Eigenschaft ist die Elastizität. Durch Einwirken steigender Scherkraft während der rheologischen Messung kommt es zu einem Übergang, der sogenannten Fließgrenze (Abbildung 4B). Das Verlustmodul liegt nun über dem Speichermodul, das Material wird flüssig. Die Lage der Fließgrenze steht im direkten Zusammenhang mit der Anzahl an chemischen und physikalischen Quervernetzungen der Polymerketten. Der sich während des Druckprozesses erhöhende Stress auf das Material sollte in keinem Fall zur irreversiblen Überschreitung der Fließgrenze führen. Für die Stabilität des gedruckten Konstruktes ist die Erholung des Speichermoduls und damit des elastischen Anteils entscheidend.^{50,53,54}

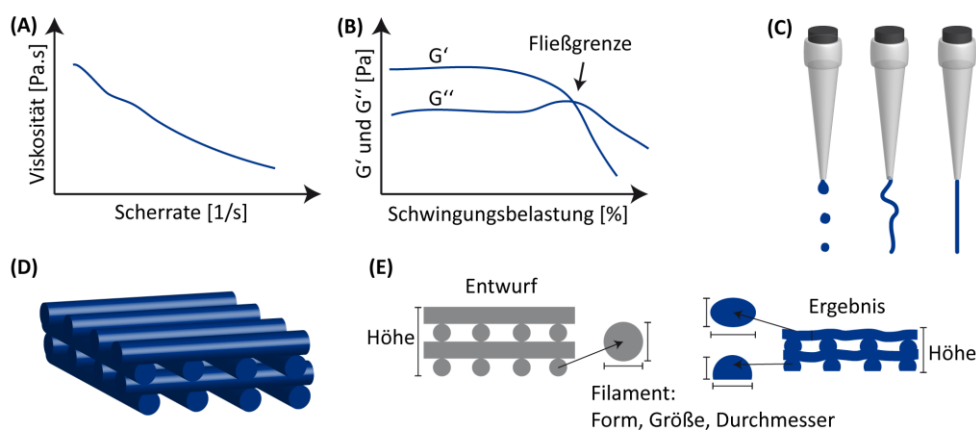


Abbildung 4 Druckbarkeit von Hydrogelen. Für die Extrusion muss das Material A) scherverdünnendes und B) viskoelastisches Verhalten zeigen. C) Es darf weder zur Tröpfchenbildung an der Düse, noch zur unkontrollierbaren Extrusion kommen; das Filament muss gerade und homogen extrudieren. D) Mehrlagige Gitterstrukturen dienen zur qualitativen Evaluation. E) Formtreue der Filamente und des gesamten gedruckten Konstruktes wird durch den Vergleich mit dem Entwurf analysiert.

Nach Charakterisierung des rheologischen Verhaltens der Tinte erfolgt die qualitative Evaluation des Druckes. Neben dem Fließverhalten haben weitere Parameter Einfluss auf die Druckbarkeit der Tinte. Die Temperatur des Materials kann zum Beispiel dessen Viskosität verändern.⁵⁵ Außerdem wirkt sich die Geometrie der Düse, hier gibt es hauptsächlich konisch geformte Spitzen aus Kunststoff und zylindrisch geformte Nadeln aus Stahl, auf die sich während des Prozesses entwickelnden Scherkräfte, und damit auf das Druckergebnis aus.⁵⁶ Das Filament kann bereits während der Extrusion optisch auf seine Form kontrolliert werden. Von einer guten Extrusion wird gesprochen, wenn der entstehende Hydrogelstrang homogen, weder nicht durchgängig in Tröpfchenform, noch durchgängig aber mit nicht kontrollierbarer Geschwindigkeit die Düse verlässt (Abbildung 4C).⁵⁷ Für die Ablage eines geraden, gleichmäßigen Stranges muss die Extrusionsgeschwindigkeit anhand des Luftdruckes

passend zur Bewegungsgeschwindigkeit des Druckkopfes eingestellt werden. Die Formtreue des gedruckten Stranges bzw. Konstruktes ist ein weiteres wichtiges Kriterium (Abbildung 4D). Hier wird die genaue Form und Verformung des Filaments analysiert. Dies beinhaltet zum Beispiel, in welchem Maße sich der bei senkrechtem Austritt aus der Düse kreisförmige Querschnitt des Filaments, nach waagerechter Ablage auf dem Substrat, hin zu einem Oval verformt. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Formtreue ist die Fähigkeit eines Filamentstranges die strukturelle Integrität durch Auflage auf nur einigen wenigen Punkten aufrecht zu erhalten.⁵⁸ Diese Eigenschaft ist meist ab dem Druck der zweiten Schicht notwendig. Üblicherweise werden die parallel orientierten Stränge schichtweise um 90°-rotiert abgelegt, welche dann nicht mehr komplett auf einer Oberfläche, sondern nur noch auf den darunter befindlichen Strängen liegen. Die Formtreue sollte das Gewicht des Materials über die kurzen Abstände zwischen den Strängen der unteren Schicht tragen können (Abbildung 4E). Diese Fähigkeit wird noch wichtiger, wenn nicht nur einfache Gitterstrukturen, sondern komplexere Formen gedruckt werden sollen, bei denen zum Beispiel ein Hohlraum im Inneren der Struktur durch die obersten Schichten verschlossen werden muss. Außerdem sind die exakten Maße der Filamente, verglichen mit dem durch dem G-Code vorgegebenen Größen entscheidend für die Formtreue. Zur Evaluation können sowohl der extrudierte und platzierte Strang vermessen, als auch die Dimensionen und das Gewicht des gesamten Konstruktes mit dem am Computer erstellten Entwurf verglichen werden.^{36,53,54,59}

Mit Beginn der Biofabrikation standen Entwicklungen der Biodrucktechnologien und der Materialien im Vordergrund. Biotinten wurden zunächst mit Fokus auf deren Druckbarkeit entwickelt. Das Augenmerk bei den zellulären Komponenten lag hauptsächlich auf dem erfolgreichen Einbringen der Zellen, deren Überlebensrate während des Druckprozesses und der strukturellen Integrität der Biotinte.^{60,61} Beispielsweise zeigten Kollagen-basierte Biotinten mit steigender Konzentration an Knorpelzellen erhöhte Speichermodule und erhöhte Viskositäten vor Gelierung, und verminderte Speichermodule nach Gelierung. Die Auflösung des Biodruckes konnte durch höhere Zellzahlen verbessert werden.⁶² In einer weiteren Studie wurden Biotinten basierend auf Gelatine und humanen Endothelzellen untersucht. Hier führten höhere Zelldichten zu steigenden Speicher- und Verlustmodulen, sowie zu einer verminderten Fließgrenze. Die rheologischen Veränderungen hatten in diesem Fall keinen Einfluss auf die Druckbarkeit der Biotinte.⁶³ Neben den sich ständig entwickelnden Technologien der Biofabrikation wird es für deren Erfolg zukünftig stetig wichtiger, die Langzeitentwicklung der gedruckten Konstrukte und nicht nur die Viabilität, sondern auch die Funktionalität der Zellen zu beobachten und zu optimieren.⁶⁴ Um die Entwicklung der Zellen während und nach dem Biodruck zu steuern, werden vermehrt Wirkstoffsysteme in der Gewebezüchtung eingesetzt (siehe Abschnitt 1.2.3).

1.2 Wirkstofffreisetzungssysteme

1.2.1 Wirkstoffdepots und Wirkstofftransporter

Das Ziel von Wirkstofffreisetzungssystemen ist es, die therapeutische Effizienz durch Transport und Freisetzung (passiv oder aktiv) eines Wirkstoffes am Zielort im Patienten zu maximieren und dabei die Akkumulation in nicht-Zielgeweben zu minimieren.⁶⁵ Dies wird verfolgt, indem die Pharmakokinetik des Wirkstoffes optimiert wird. Dabei handelt es sich um alle Prozesse, die der Wirkstoff im Körper des Patienten durchläuft. Angefangen von der Absorption (Aufnahme) und Verteilung, über die Verstoffwechslung, bis hin zur Exkretion (Ausscheidung).⁶⁶ Eines der einfachsten und ältesten Wirkstoffsysteme besteht aus dem Einkapseln aktiver Substanzen, welche oral aufgenommen, aber nicht bereits im Magen, sondern erst im Darm wirken sollen. Hierfür werden Hüllen aus magensaftresistenten Polymeren verwendet, welche bei saurem pH (Magen) stabil sind, und in weniger saurem Milieu (Dünndarm) abgebaut werden.⁶⁷⁻⁶⁹

Mit der Entwicklung neuer Wirkstoffarten ergeben sich mehr Möglichkeiten, aber auch Anforderungen an Wirkstofffreisetzungssysteme. Neben kleinen Molekülen werden heutzutage ganze Proteine (zum Beispiel Insulin), Antikörper und Nukleinsäuren verabreicht.⁷⁰⁻⁷² Aktuell können die Methoden, welche die Wirksamkeit von Wirkstoffen verbessern sollen, in drei Klassen eingeteilt werden.⁶⁵ Direkte Modifikationen an den aktiven Substanzen verbessern hauptsächlich deren Stabilität, Löslichkeit und biologische Halbwertszeit (Abbildung 5A). Zum Beispiel können Proteine durch Konjugation mit Polyethylen Glykol (PEG) von proteolytisch aktiven Enzymen geschützt werden, wodurch sich die Zirkulierungsdauer erhöht.^{73,74} Zur zweiten Klasse gehören Strategien, die den Wirkort, also das direkte Umfeld des Wirkstoffes, zu dessen Gunsten modifizieren (Abbildung 5B). Hier werden meistens Kombinationstherapien angewandt. Die Dispersion oder Zellaufnahme werden zum Beispiel durch die Gabe von Additiven, die diese Prozesse unterstützen, verbessert.⁶⁵ Durch die Zugabe von pH-Modulatoren kann außerdem die Auflösung von Wirkstoffformulierungen mit pH-abhängiger Löslichkeit gesteigert werden.⁷⁵ Ein weiterer wichtiger Faktor zur Verbesserung von Therapien ist die Lokalisierung, also das gezielte Einbringen der Wirkstoffe. Bei erfolgreicher Anreicherung am Zielort, beziehungsweise im Zielgewebe, kann die Menge des zu verabreichenden Wirkstoffes verringert und damit Nebenwirkungen auf nicht-Zielgewebe vermindert werden. Beispielsweise müssen bei der Behandlung von Tumoren bislang durch systemische Verabreichung von toxischen Substanzen erhebliche Nebenwirkungen auf sämtliche Organe und Gewebe des Patienten in Kauf genommen werden, um die Wirkstoffkonzentration am Tumor ausreichend hoch zu erhalten.⁷⁶ Die gesteuerte Lokalisierung und Freisetzung von Wirkstoffen wird durch Wirkstoffdepots (Abbildung 5C) und Wirkstofftransporter (Abbildung 5D) ermöglicht. Dabei

werden die aktiven Substanzen an Träger verschiedener Morphologien und Materialien gebunden, assoziiert oder verkapselt. Zum einen kann dadurch ebenfalls die Löslichkeit und Abbaubarkeit der Wirkstoffe beeinflusst verbessert werden.⁷⁷ Durch die Verbindung mit einem Wirkstoffträger können die Wirkstoffe außerdem kontrolliert freigesetzt werden (Abbildung 5E, siehe auch Abschnitt 1.2.2).

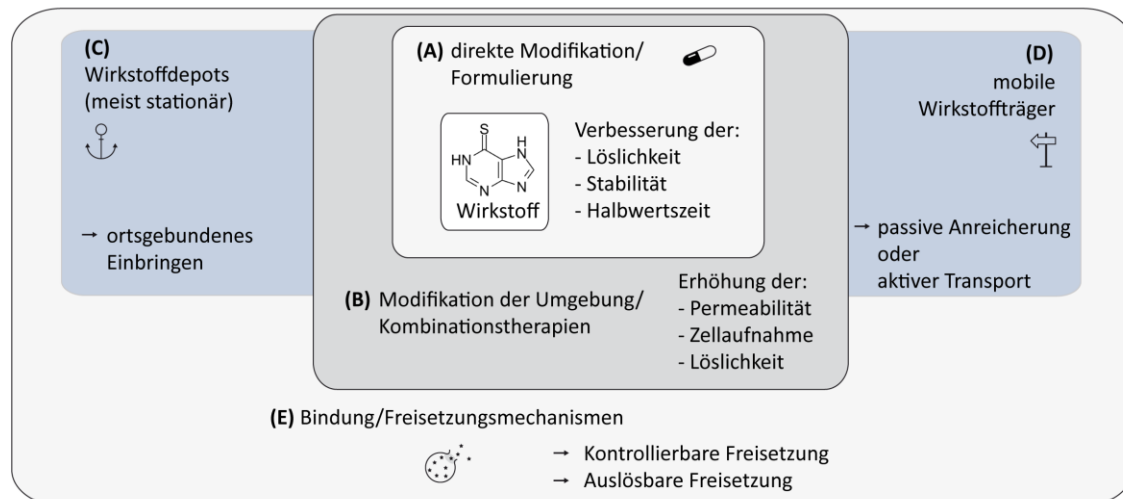


Abbildung 5. Wirkstoffsysteme. A) Zu einfachen Wirkstoffsystemen gehören die Modifikationen und Formulierung von Wirkstoffen (hier beispielhaft 6-Mercaptopurin) in Arzneimitteln zur verbesserten Aufnahme, zur Behebung von Löslichkeitsproblemen und zur Verlängerung der biologischen Halbwertszeit. B) Durch die Anwendung von Kombinationstherapien kann die direkte Umgebung des Wirkstoffes optimiert werden. Werden die Wirkstoffe an Trägermaterialien gebunden, können sie entweder C) ortsgebunden oder D) mobil im Patienten freigesetzt werden. E) Durch die Art der Bindung an das Trägermaterial können verschiedene Mechanismen genutzt werden, um die Freisetzung zu kontrollieren.

Als Wirkstoffdepots wurden ursprünglich stationäre Konstrukte bezeichnet, welche an einem Ort aktive Substanzen freisetzen. Hierzu zählen beispielsweise Kontaktlinsen, die mit einem Wirkstoff gegen Grauen Star beladen sind. So kann die regelmäßige Gabe von Augentropfen durch permanente Abgabe einer konstanten Menge des Wirkstoffes ersetzt werden.⁷⁸ Ein weiteres Beispiel für stationäre Depots sind transdermale Pflaster, meistens basierend auf Hydrogelen, welche zur Behandlung von akuten oder chronischen Hauterkrankungen eingesetzt werden. Diese können Wirkstoffe zur Unterstützung der Wundheilung oder zur Therapie spezieller Beschwerden enthalten und an die betroffene Stelle abgeben. Solche Wirkstoffdepots sollen ebenfalls die Notwendigkeit regelmäßiger Anwendungen von Cremes ersetzen und zugleich eine optimale Umgebung zur Heilung schaffen.⁷⁹ Großes Potential von Wirkstoffdepots liegt beispielsweise auch in der Behandlung von Typ 1 Diabetes. Hierfür werden subkutane Implantate entwickelt, welche als Reaktion auf externe Stimuli Insulin freigeben. In der Zukunft sind hier Mechanismen denkbar, die auf interne Veränderungen, bevorzugt den Blutzuckerabfall, reagieren. Somit wären keine regelmäßigen Eingriffe mehr notwendig.⁸⁰⁻⁸² Neben Hydrogelen und Filmen können auch Nanopartikel als Wirkstoffdepot

verwendet werden. Im Falle der Behandlung von Diabetes wird zum Beispiel an mit Insulin beladenen Partikeln gearbeitet. Diese sollen mobil im Blutkreislauf oder oral aufgenommen werden und anhaltend Insulin freigegeben oder auf Stimuli reagieren.⁸³ Obwohl es sich hierbei um keine stationären, sondern mobile Systeme handelt, wird in diesem Falle weiterhin von Wirkstoffdepots gesprochen. Entscheidend für diese Einordnung sind ebenfalls die geplante langanhaltende Freisetzung und die Abwesenheit von Funktionen zum aktiven Transport, wobei die Grenzen der Begrifflichkeiten hier nicht genau definiert sind.

Aufgrund ihrer Mobilität werden Nanopartikel jedoch deutlich häufiger als Wirkstofftransporter beschrieben. Die aktuelle Forschung in diesem Bereich ist stark auf die Entwicklung von verbesserten Therapien zur Behandlung von Krebserkrankungen fokussiert. Der gerichtete Transport von Anti-Tumor-Medikamenten zum betroffenen Gewebe verspricht bessere Heilungschancen bei verminderten Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe.^{84,85} Auch hier können zunächst die physikalischen Eigenschaften der entsprechenden Wirkstoffe durch Bindung an einen mobilen Träger verbessert werden. Substanzen, die schlecht in wässrigen Systemen löslich sind und im Körper zu schnell abgebaut werden, können durch Wirkstofftransporter erst die Möglichkeit zur Anwendung finden.⁸⁶ Die erwünschte Selektivität kann zusätzlich durch passive Anreicherung oder aktiven Transport zum Tumorgewebe erreicht werden. Durch die Assoziation des entsprechenden Wirkstoffes, meist kleine organische zelltoxische Moleküle, mit einem Nanopartikel werden die Größe und das Molekulargewicht der sich bewegenden Einheit im Patienten deutlich erhöht. Im Vergleich zu kleinen Molekülen werden Nanopartikel nicht sofort durch die Niere aus dem intravenösen System des Patienten gefiltert. Der Wirkstoff zirkuliert aufgrund des Trägers länger im Blutkreislauf. Die Größe der Nanopartikel kann außerdem das Eindringen durch die gesunde, normal gewachsene Endothelschicht aus der Blutbahn in Gewebe erschweren. Im Unterschied dazu weisen Tumorgewebe und dessen Anbindung an den Blutkreislauf häufig Morphologien auf, welche die Penetration der Nanopartikel erleichtern. Unkontrolliertes und schnelles Wachstum resultiert in lockerem Gewebe, ungleichmäßiger Vaskularisierung und schlechterer Ausleitung von Metaboliten und Abfallprodukten. Die verlängerte Zirkulation der Nanopartikel, verbunden mit der Tendenz zu Tumorgeweben, kann auf Dauer dort zu einer passiven Anreicherung führen. Dieser sogenannte EPR-Effekt (erhöhte Permeabilität und Retention) ist stark abhängig von der genauen Biologie des Tumorgewebes und der Größe und Form der Nanopartikel. Im optimalen Fall von kugelförmigen 40 – 400 nm Durchmessern konnte eine 70-fache Akkumulation im Tumorgewebe und dessen Umgebung erreicht werden.⁸⁷⁻⁸⁹ Aufgrund stark variierender Erfolgsberichte wird die tatsächliche Nutzbarkeit des beschriebenen Effektes in der Krebstherapie jedoch angezweifelt und die ursprüngliche Begrifflichkeit des passiven Transportes mit der Formulierung der passiven Anreicherung ersetzt.^{90,91} Weitaus vielversprechender ist der aktive Transport der mit Substanzen beladenen

Nanopartikel, welche hierfür mit zusätzlichen Funktionen ausgestattet werden. Tumore besitzen nicht nur eine generell abnormale Architektur des Gewebes, sondern überexprimieren spezielle Moleküle auf der Zelloberfläche. Darunter befinden sich Neurotransmitter, Hormone, Zell-Adhäsionsmoleküle, Nährstoffe und Zytokine. Jeder Tumor weist dabei eine einzigartige Kombination und Anordnung dieser aktiven Oberflächenmoleküle auf.⁹² Diese Eigenschaft kann ausgenutzt werden, um eine Selektivität für das erkrankte Gewebe zu erreichen. Dazu werden die Wirkstoffträger, meist Nanopartikel, mit den jeweilig passenden Gegenstücken zu den spezifischen Rezeptoren ausgestattet.⁹³ Einige Tumorzellen nehmen beispielsweise vermehrt Folsäure auf, weshalb sie übermäßig Folsäurerezeptoren auf der Zelloberfläche präsentieren. Um dies als Ziel für die Wirkstoffträger zu nutzen, können die Nanopartikel mit dem Liganden, also der Folsäure, ausgestattet werden. Nach Bindung an den Rezeptor kommt es dann im Idealfall zur Aufnahme des gesamten Transporters inklusive des Wirkstoffes.^{92,94-96} Das große Potential der aktiven Zielführung von Wirkstofftransportern in der Krebstherapie hat sich allerdings bislang noch kaum über die Forschung hinaus in klinische Studien entwickeln können.⁹⁷

1.2.2 Trägermaterialien und Mechanismen der Wirkstofffreisetzung

Für die Auswahl an geeigneten Materialien als Wirkstoffträger ist zunächst, wie für alle Biomaterialien, die Biokompatibilität entscheidend. Das Material muss die angedachte Funktion erfüllen, ohne dabei nachteilig auf den Organismus zu wirken. Im Falle der Wirkstoffträger beinhaltet dies beispielsweise neben der Abwesenheit von Toxizität und Immunaktivität auch die korrekte Abgabe der Substanzen in beabsichtigter Konzentration und am Zielort. Die Abbaubarkeit der Materialien spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Nicht-abbaubare Materialien sind für Langzeitanwendungen von Vorteil. Hier muss die vollständige Ausscheidung oder die operative Entfernung nach Behandlung sichergestellt werden. Abbaubare Materialien können, je nach Kinetik des Abbaus, für die Freisetzung der Wirkstoffe genutzt werden (*Abbildung 6*). Neben Metallen und Keramiken sind Polymere die am meisten genutzte Materialklasse für Wirkstoffsysteme. Natürliche und synthetische Polymere können durch eine Vielzahl an Technologien in unterschiedliche Morphologien prozessiert werden. Dabei können chemische Modifikationen vorgenommen und die Eigenschaften, wie zum Beispiel die Abbaubarkeit, eingestellt werden.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Natürliche Polymere basieren entweder auf Polysacchariden, darunter Chitosan, Hyaluronsäure und Agarose, oder auf Proteinen, wie Gelatine, Kollagen und Seide. Zu den synthetischen Polymeren gehören unter anderem Polyester, Polyamide, Polyanhydride und Silikone.¹⁰¹ Für stationäre Wirkstoffträger kommen Morphologien ähnlich wie für die Anwendung in der Gewebezüchtung in Frage (*siehe Abschnitt 1.1.1*). Es werden Hydrogele, Filme als Beschichtungen, Schäume und additiv

hergestellte Materialkonstrukte mit Wirkstoffen beladen.^{102,103} Da hier, anders als bei der Biofabrikation, der Kontakt mit einem biologischen System erst nach vollständiger Prozessierung stattfindet, sind die Methoden zur Herstellung der Wirkstoffträger weniger eingeschränkt. Beispielsweise können synthetische Polymere, wie Polyvinylalkohol, Polymilchsäure, Polycaprolacton und Polyethylenglykol mittels Schmelzschtichtung unter hohen Temperaturen, bis über 200°C, 3D-gedruckt werden.^{104,105} Bei mobilen Wirkstoffträgern werden meist Nanopartikel eingesetzt. Bei diesen handelt es sich per Definition um sphärische Partikel mit einem Durchmesserbereich von 10 – 1000 nm.¹⁰⁶ Partikuläre Nanoträger können allerdings noch weiter unterteilt werden. Bestehen die Partikel nicht aus Polymeren, sondern Lipiden, wird von Liposomen gesprochen, amphiphile Materialien bilden Mizellen und stark verzweigte Polymere können Dendrimere ausbilden.^{99,107}

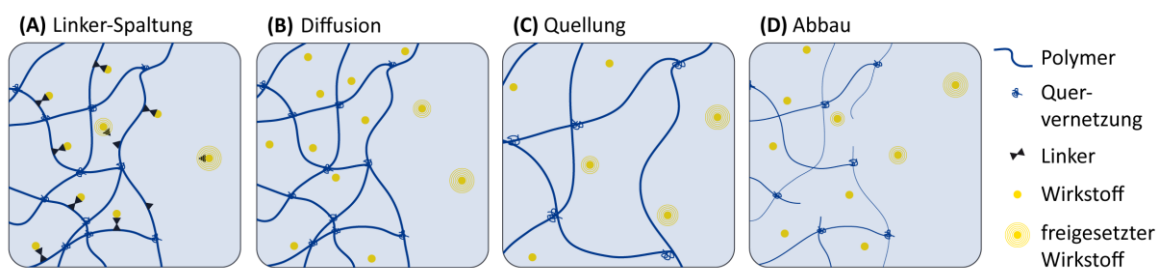


Abbildung 6. Mechanismen der Wirkstofffreisetzung aus Polymeren. A) Wirkstoffe können reversibel kovalent an die Matrix gebunden und kontrolliert freigesetzt werden. B) Bei nicht-kovalenter Assoziation oder Einkapselung kommt es zur diffusionsgesteuerten Freisetzung. Durch C) Quellung oder D) Abbau der Matrix als Reaktion auf die Umgebung können Wirkstoffe ebenfalls abgegeben werden.

Das Material und die Art der Wirkstoffbindung beziehungsweise –assoziation entscheidet letztendlich über Freisetzung und deren Kinetik. Morphologie-übergreifend gibt es vier grundsätzliche Methoden, polymere Materialien mit Substanzen zu be- und entladen. Die Wirkstoffbindung kann dabei während der Prozessierung, also beispielsweise zusammen mit der Partikelbildung, oder im Nachhinein erfolgen. Die Substanzen können nicht-kovalent, eingekapselt oder aufgrund von elektrostatischen oder hydrophoben Wechselwirkungen eingebracht werden.¹⁰⁸ Der Wirkstoff kann ebenfalls kovalent über funktionelle Gruppen an das Trägermaterial gekoppelt werden.¹⁰⁷ In diesem Fall kommt es erst beim Lösen der chemischen Verknüpfung zur Freisetzung des Wirkstoffes (Abbildung 6A). Die Art des Linkers bestimmt dabei die Geschwindigkeit und den Ort der Freisetzung. pH-sensible Linker, beispielsweise Hydrazon-Linker, sind stabil unter basischen und neutralen Bedingungen, und öffnen sich erst bei saurem pH-Wert. Diese Chemie wird häufig für die reversible Kopplung und kontrollierte Freisetzung von Zytostatika für die Entwicklung von Krebstherapien verwendet. Neben der Anreicherung oder dem gezielten Transport von Nanopartikeln zu

Tumorgewebe soll dabei ausgenutzt werden, dass Krebszellen durch ihr schnelles Wachstum häufig ein saures Milieu umgibt. Die kovalente Bindung verhindert eine frühzeitige Freisetzung während des Transportes unter physiologischen Bedingungen.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Eine weitere reversible Kopplung kann über Disulfidbrücken erfolgen. Diese Bindungen sind im oxidierten Zustand stabil und öffnen sich bei Reduktion.¹¹²⁻¹¹⁴ Die Stabilität der Verbindungen bis zum Erreichen des Auslösers (pH-Senkung/ Reduktion) zur Freisetzung ist ein großer Vorteil dieser kovalenten Systeme. Ist der Wirkstoff nicht kovalent mit dem Träger assoziiert, verlässt er diesen weniger kontrolliert durch Diffusion (Abbildung 6B). Die Geschwindigkeit der Freisetzung kann durch das Milieu zwar beeinflusst, aber nicht verhindert beziehungsweise ausgelöst werden. Die Erhöhung der Salzkonzentration oder die Veränderung des pH-Wertes der Umgebung können die Freisetzung beispielsweise durch Abschwächen der elektrostatischen Kräfte beschleunigen.^{115,116} Außerdem gibt es Materialien, welche selbst auf Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren und dabei nicht-kovalent gebunden Wirkstoffe freisetzen. Zum Beispiel können Polymere pH-abhängig quellen, wodurch sich die Poren des Materials vergrößern und zuvor eingekapselte Wirkstoffe austreten können (Abbildung 6C).^{102,117} Durch den Abbau der Polymermatrix können Wirkstoffe ebenfalls freigesetzt werden (Abbildung 6D). Beispielsweise sind natürliche Polymere anfällig für Hydrolyse oder enzymatischen Abbau.^{99,118,119} Aufgrund der unumgänglichen und durchaus gewünschten Abbaubarkeit der meisten Materialien in Wirkstoffsystemen ergibt sich oft eine Kombination aus dem gewählten Mechanismus zur Freisetzung und der durch Abbau der Matrix.

1.2.3 Wirkstoffsysteme in der Gewebezüchtung

Die Forschungsbereiche der Wirkstofffreisetzungssysteme und der Gewebezüchtung überschneiden sich und können voneinander profitieren. Grundlegend gibt es zunächst vergleichbare Anforderungen an Materialien und Prozessierungstechniken. Beispielsweise werden Hydrogele und deren Verarbeitung sowohl für Gerüste in der Biofabrikation als auch für die Anwendung als Wirkstoffdepots entwickelt.^{120,121} Mit Fortschritten der dreidimensionalen Zellkultur in der Gewebezüchtung ergeben sich biologische relevante Modelle, welche in der Testung von Wirkstofffreisetzungssystemen Anwendung finden.¹²²⁻¹²⁴ Im Gegenzug ist auch das Einbringen von Wirkstoffen während der Gewebezüchtung essentiell. Anders als in der Therapieentwicklung werden hier hauptsächlich aktive Substanzen mit positiver Wirkung auf die Zellen verwendet. Im natürlichen Gewebe werden zahlreiche Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle durch unterschiedliche Zellarten und Prozesse freigesetzt. Die Grundversorgung der Zellen im Labor wird durch das Zellkulturmedium, in dem sich Rinderblut Serum mit zahlreichen Faktoren befindet, gedeckt.¹²⁵ Durch das zusätzliche Einbringen spezieller Komponenten während der Gewebezüchtung *in*

in vitro können außerdem bestimmte zelluläre Prozesse angesteuert, verstärkt oder unterdrückt werden. So lässt sich zum Beispiel vaskuläre Entwicklung durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) unterstützen.^{126,127}

Die Beeinflussung einzelner zellulärer Prozesse während der Gewebezüchtung verlangt neben den speziellen Signalmolekülen oft auch die genauen Lokalisierungen und Zeitpunkte sowie die Dauer der Wirkstofffreisetzung. Beispielsweise müssen während der *in vitro* Differenzierung von humanen Stammzellen zu Kardiomyozyten mehrere Signalmoleküle nacheinander wirken.¹²⁸ Der Einsatz von Wirkstoffsystemen kann zum einen die Stabilität und Löslichkeit der Substanzen verbessern und soll zum anderen vor allem mehr Kontrolle über deren Freisetzung ermöglichen. Dazu können die bereits aufgeführten Morphologien und Systeme zur Bindung und Freisetzung verwendet werden (Abschnitt 1.2.2). Hydrogele eignen sich beispielsweise für die Kombination aus Grundlage einer Biomaterial- oder Biotinte und integrierter Wirkstofffreisetzung (Abbildung 7). Je nach Material und Anwendung können die Wirkstoffe entweder direkt an das Hydrogel oder an zusätzlich eingebrachte Partikel oder Fasern assoziiert werden.¹²⁹⁻¹³¹

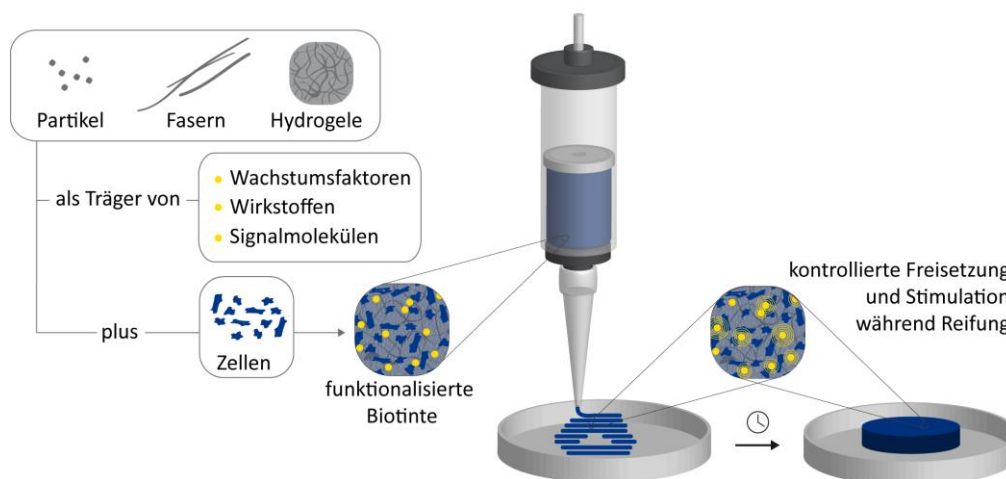


Abbildung 7. Funktionalisierte Biotinte als Beispiel eines Wirkstoffsystemes in der Biofabrikation. Über Partikel, Fasern oder das Hydrogel selbst können neben den Zellen aktive Substanzen in eine Biotinte eingebracht werden. Abhängig von Art der Substanz und Art der Assoziation mit dem Träger kommt es nach (kontrollierter) Freisetzung zur Beeinflussung der Zellen während des an den Druck anschließenden Reifungsprozesses.

1.3 Spinnenseide

1.3.1 Natürliche Spinnenseide

Der Begriff Seide umfasst weit mehr als das in der Textilindustrie genutzte Material aus Kokons der Seidenraupe *Bombyx mori*. Seide wird unter anderem von Tausendfüßern, Spinnentieren und Insekten produziert. Dazu zählen neben den erwähnten Raupen beispielsweise Glühwürmchen, Wasserflöhe, Silberfische, Wespen und Bienen, Libellen, Schmetterlinge und Netzspinnen.¹³²

Seide basiert auf fibrillären Proteinen mit hochrepetitiven Aminosäuresequenzen, die als Flüssigkeit hochkonzentriert in spezialisierten Drüsen innerhalb der Tiere gespeichert werden und während des Exkretionsprozesses Fasern ausbilden.¹³³ Die Seiden der verschiedenen Tiere haben sich während der Evolution unabhängig voneinander entwickelt. Trotz gewisser Diversitäten, wie zum Beispiel verschiedener nicht-homologer Spinnröhren, zeigen alle Seiden Gemeinsamkeiten. Die Proteine sind jeweils reich an den Aminosäuren Alanin, Serin und/oder Glycin, weisen eine Faltung in einer dominanten Sekundärstruktur auf und bilden Fasern mit hoher mechanischer Festigkeit und/oder Zähigkeit.¹³² Während viele der Tiere lediglich eine Seidenart für die Beutepräservierung oder Entwicklung (Kokon) nutzen, produzieren weibliche Radnetzspinnen bis zu sieben Arten von Seide. Für jede besitzen sie eigene Speicher- und Spinnorgane. Für das Netz werden davon fünf Seiden verwendet. Die Speichen und der stabile Rahmen bestehen aus *Major Ampullate* Seide (Abbildung 8A). Die Fangspirale wird aus der *Flagelliform* Seide gebildet, die sich durch hohe Dehnbarkeit auszeichnet (Abbildung 8B). Zum Fangen der Beute wird die Spirale zusätzlich mit der klebrigen *Aggregate* Seide beschichtet (Abbildung 8C). Die *Minor Ampullate* Seide dient außerdem zur Verstärkung des Netzes in Form einer Hilfsspirale (Abbildung 8D). Die *Pyriform* Seide besitzt ebenfalls eine Klebefunktion und wird zur Befestigung der Netzankerpunkte auf verschiedenen Substraten verwendet (Abbildung 8E). Die nahezu wasserunlösliche *Cylindriciform* Seide wird von der Spinne als Material für die äußere Schale des Eikokons verwendet (Abbildung 8F). Weniger widerstandsfähig ist die *Aciniform* Seide, welche als innere Kokonhülle und zur Umhüllung und Präservierung der Beute dient (Abbildung 8G).¹³⁴

Seidenfäden von Spinnen bestehen überwiegend aus Faserproteinen, den sogenannten Spidroinen. Diese sind aus einer Kerndomäne aus repetitiven Einheiten, flankiert von nicht-repetitiven Modulen aufgebaut. Die bis zu 100-fach wiederholten Einheiten im Kern bestehen aus je 40-200 Aminosäuren und beinhalten, je nach Funktion der Seide, verschiedene Strukturmodule. Die terminalen, nicht-repetitiven globulären Domänen werden von 100-150 Aminosäuren gebildet und sind für die Speicherung im Körper der Spinne und bei Exkretion und Faserbildung wichtig.¹³⁵ Neben der Funktion im Netz dient die *Major Ampullate* Seide der Spinne als Abseilfaden und Rettungsleine (Abbildung 8A). Diese sogenannte *Dragline* Seide

ist eine der am meisten wissenschaftlich untersuchten Spinnenseiden. Die Struktur dieser Seidenfäden weist drei hierarchische Ebenen auf. Auf makroskopischer Ebene ist die Faser aus einem Kern und einer Hülle aufgebaut (Abbildung 8). Der verhältnismäßig dünne Mantel besteht aus Lipiden, Glykoproteinen und *Minor Ampullate* Seide und dient zum Schutz vor Austrocknung und Bakterien. Der Kern besteht hauptsächlich aus zwei *Major Ampullate* Spidroinen (MaSp1 und MaSp2), die auf mesoskopischer Ebene aus einzelnen Fibrillen Faserbündel bilden. Diese beiden Proteinklassen variieren vor allem bezüglich ihrer Hydrophobizitäten und ihrem Gehalt an Prolin. Auf molekularem Level befinden sich kristalline β -Faltblatt-reiche Regionen, eingebettet in eine amorphe Matrix aus locker gepackten helikalen Strukturen. In diesem Zwei-Phasen-Modell spiegelt sich die außerordentliche Zähigkeit der *Dragline* Seide wider. Die kristallinen Regionen sorgen für die hohe Zugfestigkeit der Faser, während die amorphen Bereiche deren Dehnbarkeit ermöglichen.^{136,137} Die Kombination aus Festigkeit und überdurchschnittlicher Elastizität ergibt eine Zähigkeit, höher als die von Kevlar, Nylon, Karbonfasern oder Stahl.¹³⁸

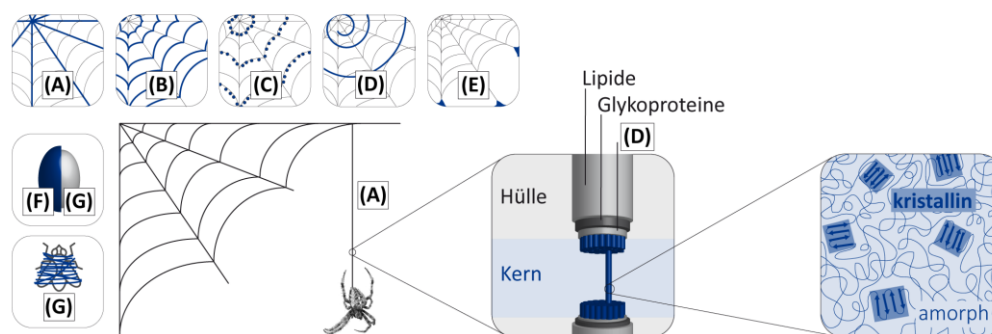


Abbildung 8. Seidenarten weiblicher Radnetzspinnen und schematischer Aufbau des Abseilfadens. A) Der Rahmen des Netzes, die Speichen und der Abseilfaden werden aus *Major Ampullate* Seide gebildet. B) Die *Flagelliform* Seide bildet die Fangspirale welche mit C) der klebrigen *Aggregate* Seide beschichtet ist. D) Das Netz wird durch eine Hilfsspirale aus *Minor Ampullate* Seide verstärkt. E) Zur Befestigung dient die *Pyriiform* Seide. G) Die *Aciniform* Seide fungiert als innere Kokonhülle und zur Umhüllung und Präservierung der Beute. F) Die äußere Kokonhülle besteht aus *Cylindriform* Seide. Im Kern des Abseilfadens befinden sich Bündel aus Nano- und Mikrofibrillen, welche aus kristallinen Bereichen eingebettet in eine amorphe Matrix bestehen. Die Schutzhülle besteht aus mehreren Schichten (*Minor Ampullate* Seide, Glykoproteine und Lipide).

Neben den besonderen mechanischen Eigenschaften weist die Spinnenseide hohe Bioverträglichkeit und geringe Stimulation des menschlichen Immunsystems auf. Bereits weit vor der modernen medizinischen Forschung machte sich der Mensch diese Eigenschaften zunutze. Beispielsweise wurde Spinnenseide als Nahtmaterial zum Wundverschluss verwendet.¹³⁹ Im Gegensatz zur Raupe *Bombyx mori*, können die meisten Spinnen jedoch aufgrund ihres kannibalistischen Verhaltens und des Umwelteinflusses auf die genaue Zusammensetzung der Seide nicht im großen Ansatz gezüchtet und zur Seidengewinnung gemolken werden.^{140,141}

1.3.2 Rekombinante Spinnenseidenproduktion

Biotechnologie ermöglicht die Herstellung von Metaboliten, Vitaminen, Antibiotika oder Proteinen tierischen oder pflanzlichen Ursprunges mit Hilfe eines fremden Wirtsorganismus im großen Maßstab. Der ursprüngliche Prozess der Fermentation, bei dem Hefe oder Pilze zur Gewinnung von beispielsweise Antibiotika oder Gärungsprodukten verwendet werden, wird heutzutage durch die DNA-Technologie erweitert. Mit dem Einbringen artifizierender DNA in vorwiegend Mikroorganismen, können diese zur Produktion fremder Moleküle, Proteine und Antikörper gebracht werden.¹⁴² So konnte zum Beispiel die Isolation von Insulin aus Rinder Pankreas durch die Produktion von humanem Insulin in Bakterien abgelöst werden.¹⁴³

Die *Dragline* Seide der Europäischen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* diene als Vorlage zur rekombinanten Produktion von Spinnenseidenproteinen. Die beiden in der *Major Ampullate* Seide hauptsächlich vorkommenden Proteine, ADF-3 und ADF-4 (*Araneus diadematus* Fibroin-3 und -4) unterscheiden sich in deren Löslichkeit und Assemblierungsverhalten. Beide weisen unter anderem elastische β -Spiralen aus prolinhaltigen Sequenzen (GPGXX, X= Q, G, Y) und kristalline β -Faltblätter aus alanin-reichen Sequenzen ((A)_n, n = 4-12), sowie helikale N- und C-terminale Domänen auf.^{144,145} Sowohl die repetitiven Kerndomänen als auch die Termini und Kombinationen daraus können rekombinant hergestellt werden. Dadurch konnten beispielsweise Informationen zur genauen Rolle der unterschiedlichen Elemente während des Spinnprozesses gewonnen werden.^{144,146} Aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit soll im Folgenden auf die Etablierung und Produktion des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) und Varianten davon eingegangen werden. Grundlage hierfür war die repetitive Sequenz des Proteins ADF-4 (Abbildung 9A). Aus dieser wurde eine Konsensus Sequenz, bestehend aus 35 Aminosäuren, darunter Poly-Alanine, GPG-Motive und die negativ geladene Aminosäure Glutamat (E), entworfen. Diese Aminosäuresequenz, das sogenannte C-Modul (GSSAAAAAASGPGGYGPENQGPS GPGGYGPGGP), wurde anschließend durch reverse Translation in eine Nukleotidsequenz überführt. Dabei wurden nicht die für die Spinne typischen Codons, sondern die für den zukünftigen Wirtsorganismus *Escherichia coli* optimierten, verwendet. Durch Multimerisierung entstand schließlich die Nukleotidsequenz eines repetitiven Proteins, welches aus 16 Einheiten besteht. Nach Transformation der Bakterien kann das polyanionische Protein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa mittels Fermentation und anschließender Reinigung produziert werden.¹⁴⁴ Wie das natürliche Vorbild, sind Materialien aus eADF4(C16) nicht toxisch, rufen keine Immunantwort hervor und sind langsam bioabbaubar.¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ Die biotechnologische Herstellung von Protein gleichbleibender Qualität und dessen Biokompatibilität machen das rekombinante Spinnenseidenprotein zu einem vielversprechenden Biopolymer (siehe Abschnitt 1.4).

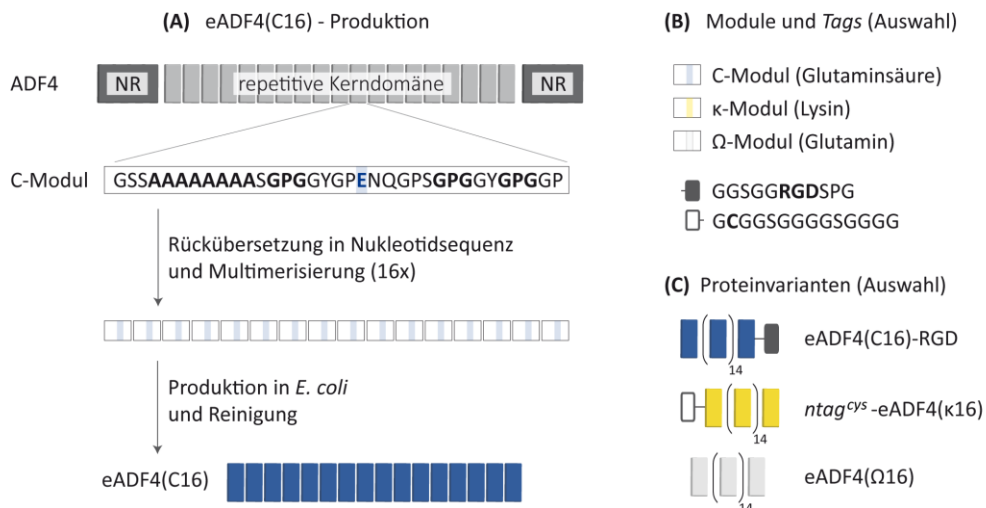


Abbildung 9. Übersicht der Produktion von auf ADF-4 basierenden Proteinvarianten. A) eADF4(C16) basiert auf einer Konsensus-Sequenz (C-Modul) aus der repetitiven Kerndomäne des *Araneus diadematus* Fibroin 4. Nach reverser Translation und Multimerisierung entsteht die Nukleotidsequenz des Proteins mit 16 sich wiederholenden Einheiten, welches durch Fermentation in *E. coli* und anschließender Reinigung produziert werden kann. B) Durch Austausch der Aminosäure Glutaminsäure mit Lysin oder Glutamin entstehen neben der anionischen eine kationische und eine neutrale Variante. Mithilfe von terminalen *tags* können weitere Funktionen, wie beispielsweise Zelladhäsion (RGD-*tag*) und Thiol-gruppen (Cystein-*tag*), eingebracht werden. C) Kombination der einzelnen Bausteine ergibt Proteine mit unterschiedlicher Nettoladung und Funktionalität.

Mit potentiellen Anwendungen im Blick wurden zusätzliche Varianten des rekombinanten Spinnenseidenproteins entworfen und produziert. Dafür wurden Molekularbiologisch weitere Module und *tags* kloniert und anschließend zu Proteinen mit neuen Eigenschaften kombiniert (Abbildung 9B und C).

Durch Austausch der unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Aminosäure Glutamat mit entweder Lysin oder Glutamin wurden das κ -Modul (positive Nettoladung) und das Ω -Modul (keine Nettoladung) erzeugt.^{151,152} Für weitere Funktionalisierung wurden terminale *tags* bestehend aus wenigen Aminosäuren eingeführt. Ein terminaler Cystein-Rest ermöglicht durch dessen Thiol-Gruppe chemische Modifikationen am rekombinanten Spinnenseidenprotein während und nach der Prozessierung.¹⁵³ Die vergleichsweise geringe Interaktion von eADF4(C16) mit humanen Zellen wurde durch C-terminales Anbringen des Adhäsionspeptides RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) erhöht.¹⁵⁴ Im Gegensatz zu diesem Effekt, welcher sich gegen einen Großteil unterschiedlicher Zellen richtet, können auch spezifischere Funktionen eingebaut werden. Beispielsweise wurde die Affinität des rekombinanten Spinnenseidenproteins gegenüber Prä-Osteoblasten durch Anbringen eines Kollagen-Binde-Motivs erhöht.¹⁵⁵ Außerdem wurde das Protein auf molekularer Ebene mit den Sequenzen anderer Proteine kombiniert. So konnten Fusionsproteine zwischen eADF4(C16) und dem Enzym Esterase oder dem grün fluoreszierenden Protein GFP erzeugt werden. Mit

diesen Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die Funktion jeweils beider Proteine, also das Assemblierungsverhalten des rekombinanten Spinnenseidenproteins sowie die enzymatische Aktivität oder Fluoreszenz des jeweils anderen Proteins, durch die Fusion erhalten bleiben.¹⁵⁶

Mittels Nass- und Elektrospinnverfahren kann das rekombinante Spinnenseidenprotein in Fasern prozessiert werden. Für technische Anwendungen wird das Protein hochkonzentriert aus organischem Lösemittel gesponnen. Beim Nassspinnverfahren wird die Proteinlösung in ein Fällbad extrudiert, wo es zur Ausbildung von Fasern mit Durchmessern im Mikrometerbereich kommt. Während dieses Prozesses können sich die Proteine gut entlang der Spin-Achse ausrichten, wodurch eine hierarchische Struktur mit außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften erreicht werden kann. Das Elektrospinnen erzeugt Fasern ohne Fällbad. Hier wird die Proteinlösung in ein elektrostatisches Feld extrudiert. Es kommt zur Eruption eines dünnen Strahles, welcher geordnet oder ungeordnet auf eine Kollektorplatte trifft und dort ein Vlies bildet.¹⁴¹ Diese finden beispielsweise in der Filtertechnik Anwendung.^{157,158} Mit der Möglichkeit zur Einbindung biologisch aktiver Moleküle wurde ebenso ein auf wässrigen Systemen basierender Elektrospinnprozess entwickelt.¹⁵⁹ Neben dem Verspinnen zu Fasern können die rekombinanten Spinnenseidenproteine, anders als von der Spinne in der Natur, in zahlreiche weitere Morphologien, darunter Filme, Partikel und Hydrogele, prozessiert werden.¹³⁵

1.4 Anwendung rekombinanter Spinnenseide in Biomaterialien

1.4.1 Filme als Beschichtungen

Filme aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) können aus Hexafluorisopropanol (HFIP) gegossen werden. Im Vergleich zum ungefalteten Protein in wässriger Lösung, weist es in organischem Lösungsmittel einen erhöhten Anteil an α -helikalen Strukturen auf. Nach schneller Verdampfung des HFIP entstehen, abhängig von der Proteinkonzentration, Filme mit einer Dicke im niedrigen μm -Bereich. Um den Anteil an β -Faltblättern in der Struktur der Filme und damit deren Stabilität im wässrigen System zu erhöhen, müssen diese anschließend mit primärem Alkohol (100% Methanol/ 70% Ethanol) oder Kaliumphosphat (1M) nachbehandelt werden.^{160,161} Wird das Protein in Ameisensäure gelöst, zeigt es in Lösung und nach Gießen bereits einen höheren Anteil an β -Faltblättern. Zudem kann eine zusätzliche Nachbehandlung diesen weiter steigern. Beide organische Lösungsmittel können einen Anteil von β -Faltblättern in den Seidenfilmen von ca. 40% erreichen. Ebenfalls können Filme aus wässriger Lösung gegossen werden, welche allerdings weniger stabil sind.¹⁶² Für die Anwendung als Biomaterial sind die Oberflächenstruktur und die Benetzbarkeit der Filme entscheidend. Abhängig vom Lösungsmittel und der Oberfläche, auf die der Film gegossen wurde, ergeben sich verschiedene Hydrophobizitäten. Auf Polystyrol, dem Material aus dem Zellkulturgefäße normalerweise hergestellt sind, zeigen sich aus HFIP gegossene Filme hydrophiler als aus Ameisensäure und wässrigem Puffer gegossene. Auch auf Glas und Teflon war dieser Trend zu sehen.¹⁶³ Trotz unterschiedlicher Werte sind alle Filme tendenziell eher hydrophil, was diese zu einem guten Substrat für Zellen macht. Mikroskopische Analysen zeigten außerdem hauptsächlich glatte, homogene Oberflächen der Filme. Das Einbringen zusätzlicher Topographien kann die Adhäsion und Proliferation von Zellen erhöhen.¹⁶⁴

Filme sind geeignet, um Proteine auf deren Interaktion mit Zellen zu selektieren, um zukünftig weitere Morphologien wie Schäume und Hydrogele/Biotinten aus präferierten Varianten herzustellen. So konnte beispielsweise die gesteigerte zelluläre Adhäsion auf eADF4(C16)-RGD gegenüber nicht modifiziertem eADF4(C16) gezeigt werden (siehe auch Abschnitt 1.3.2). Nach Aussähen auf einem eADF4(C16) Film interagieren Fibroblasten (Maus, Balb-3T3) zunächst stark miteinander, was ein Zeichen geringer Möglichkeiten für Adhäsion auf der Oberfläche ist. Nach Kultivierung von sechs Tagen sind deutlich weniger Zellen auf dem Film zu finden. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen bereits von Beginn an gespreizte Morphologien auf Filmen aus eADF4(C16)-RGD. Über die Dauer der Kultivierung vermehren sich die Zellen stark bis ein Zellrasen erreicht ist (Abbildung 10A).¹⁵³ In weiteren Studien konnten Präferenzen von neonatalen Rattenzellen, sowie zu Kardiomyozyten induzierte humane pluripotente Stammzellen gegenüber verschiedener Varianten des rekombinanten

Spinnenseidenproteins gezeigt werden. Neben Assays zur Funktionalität der Zellen, also deren Schlagverhalten und Antwort auf bestimmte Stimuli, wurde ebenfalls die Adhäsion betrachtet. Während humane induzierte Kardiomyozyten kaum auf dem negativ geladenen eADF4(C16) und dem neutralen eADF4(Q16) anhafteten, konnten drei Tage nach Aussähen Zellrasen sowohl auf Filmen aus dem positiv geladenen eADF4(κ 16) als auch auf allen mit RGD-modifizierten Proteinen nachgewiesen werden (Abbildung 10B).¹⁶⁵⁻¹⁶⁷

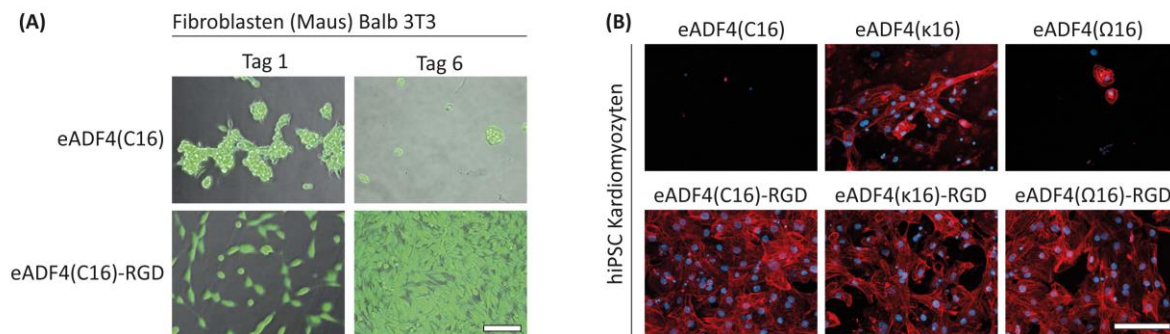


Abbildung 10. Analyse des Zellverhaltens auf Filmen aus Varianten des rekombinanten Spinnenseidenproteins. A) Maus Fibroblasten (grün, gefärbt mit Calcein) zeigen schlechte Adhäsion und Proliferation auf eADF4(C16)-Filmen und gute Interaktion mit eADF4(C16)-RGD-Filmen. Maßstabsbalken: 100 μ m. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Wohlrab, S. *et al.*, Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials* (2012), 6650-6659. Copyright (2021) Elsevier. B) Kardiomyozyten aus induzierten humanen pluripotenten Stammzellen (rot: Sarkomere, mit α -Aktinin gefärbt; blau: Zellkerne, mit HOECHST gefärbt) zeigen nach drei Tagen in Kultur Selektivität zwischen eADF4(C16), eADF4(Q), eADF4(κ 16) und den RGD-modifizierten Varianten. Maßstabsbalken: 100 μ m. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Esser, T.U. *et al.*, Designing of spider silk proteins for human induced pluripotent stem cell-based cardiac tissue engineering. *Materials Today Bio* (2021), 100114. Copyright (2021) Elsevier.

Die geringe Interaktion zwischen Fibroblasten und eADF4(C16) kann für die Beschichtung von medizinischen Produkten genutzt werden. Silikonimplantate, welche mit einer Schicht aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein (1 μ m) beschichtet wurden, zeigten nach Implantation in Ratten den positiven Effekt verminderter Kapselbildung und Kollagenablagerungen.^{147,149} In einer weiteren Studie konnte keine Zelladhäsion oder Proliferation verschiedenster Zelllinien auf mit eADF4(C16) beschichteten Kathetern nachgewiesen werden.¹⁶⁸ Zusätzlich zur geringen Interaktion mit Zellen tierischen Ursprungs konnte ebenfalls die Abweisung von Bakterien auf mit eADF4(C16) beschichtetem Silikon nachgewiesen werden.^{152,169} Neben diesen positiven Eigenschaften als Biomaterial können Filme aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein ebenfalls mit Wirkstoffen beladen werden. Für die entsprechende Studie wurden 100 μ m dicke Filme aus HFIP auf Teflon gegossen und mit Methanol nachbehandelt. Die Filme aus dem anionischen eADF4(C16) wurden anschließend mit zwei kationischen Modellwirkstoffen (Methylviolett und Ethacridinlactat) über elektrostatische Interaktion nicht-kovalent beladen und die Freisetzung gemessen. Die Geschwindigkeit der über mehrere Tage anhaltenden Freisetzung konnte durch die genaue Zusammensetzung des Puffers und die Zugabe von Proteasen beeinflusst werden.¹⁷⁰

1.4.2 Partikel als Wirkstoffträger

Für Anwendungen in Wirkstofffreisetzungssystemen können das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) und Varianten davon in Partikel prozessiert werden. Am einfachsten wird das Protein dafür aus wässrigem Puffer mit Kaliumphosphat (1M) ausgesalzen. Abhängig von der Proteinkonzentration und Mischintensität ergeben sich Durchmesser zwischen etwa 200 nm und 5 μm (Abbildung 11A).¹⁷¹ Die Partikel weisen einen hohen Anteil an β -Faltblättern auf (64%) und nehmen beim reversiblen Übergang zwischen trockenem und hydriertem Zustand eine signifikante Menge an Wasser auf, was zu einer Volumenverdopplung führt.^{172,173} Auch bei Partikeln zeigen sich zwischen den verschiedenen Proteinvarianten Unterschiede im Verhalten mit Zellen. So konnte qualitativ durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, sowie quantitativ mittels Durchflusszytometrie eine deutlich gesteigerte Aufnahme von eADF4(C16)-RGD und eADF4(κ 16)- gegenüber eADF4(C16)-Partikeln in humane Zellen (Hela Zelllinie) gezeigt werden (Abbildung 11B).^{154,174} Bisher wurde ebenfalls die nicht-kovalente Beladung der Partikel mit Modellsubstanzen und deren Freisetzung untersucht. Aus eADF4(C16) gebildete anionische Partikel konnten erfolgreich mit den Farbstoffen Rhodamin, Methylviolett und Ethacridinlactat beladen und diese anschließend freigesetzt werden. Vergleichbar zur diffusionsgetriebenen Freisetzung aus Filmen (siehe Abschnitt 1.4.1), konnte die Geschwindigkeit der Freisetzung durch Pufferbedingungen beeinflusst werden. Beispielsweise kann die Freisetzung von Ethacridinlactat mit Senkung des pH-Wertes beschleunigt werden (Abbildung 11C). Die vermehrten Protonen in der Trägermatrix führen in diesem Fall zu einer Verdrängung der Substanz. Im Falle von kationischen Partikeln aus eADF4(κ 16) konnte ebenfalls eine Beladung und Freisetzung von negativ geladener DNA und der Modellsubstanz Carboxyfluoreszein gezeigt werden.¹⁵¹ Auch hier kommt es in jeder gewählten Bedingung (Salzkonzentration, pH) zu einer kontinuierlichen Freisetzung. Diese kann zwar beeinflusst, nicht aber für einen bestimmten Zeitpunkt komplett verhindert und anschließend ausgelöst werden.^{175,176}

Neben diesen Studien zur nicht-kovalenten Beladung von rekombinanten Spinnenseidenpartikeln mit Substanzen wurde ebenso eine Möglichkeit der direkten Funktionalisierung der Partikel entwickelt. Durch molekularbiologische Fusion der Sequenz des eADF4(C16)-Proteins mit der des Modell-Antigens des Proteins Ovalbumin wurde ein Hybridprotein mit dazwischenliegender Cathepsin-Schnittstelle erzeugt. Nach subkutaner Injektion in Mäuse akkumulierten Partikel aus diesem Hybridprotein durch Transport in dendritischen Zellen in den Lymphknoten. Es kam außerdem durch Abspaltung und Präsentation des Antigens zur spezifischen Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, was einen essentiellen Prozess während der Entwicklung einer Immunantwort darstellt. Partikel aus reinem eADF4(C16) zeigten als Kontrolle keine derartige Reaktion des Immunsystems. Die auf das Immunsystem stimulierend

wirkenden funktionalisierten Partikel könnten in Kombination mit der Beladung eines Vakzins eine neue effiziente proteinbasierte Impfstrategie ermöglichen.¹⁴⁸

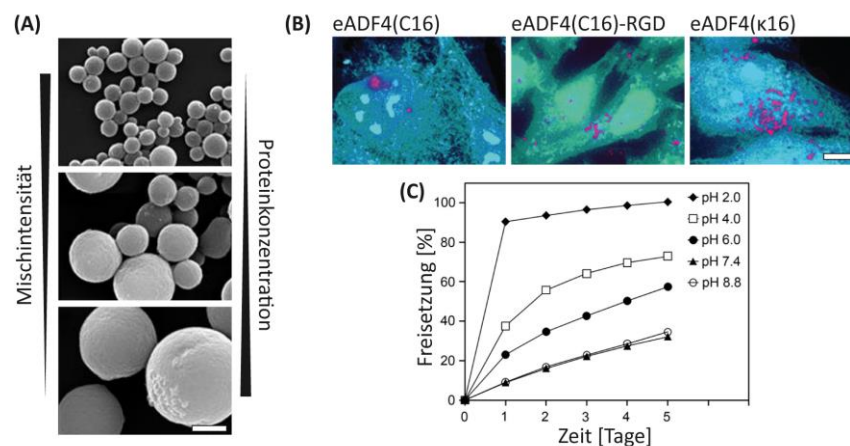


Abbildung 11. eADF4(C16)-Partikel als Wirkstoffträger. A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen den Einfluss von Mischintensität und Proteinkonzentration während der Fällung auf die Größe der Partikel. Maßstabsbalken: 2 μ m. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Lammel, A., *et al.*, Processing Conditions for the Formation of Spider Silk Microspheres. *ChemSusChem* (2008), 413-416. Copyright (2021) John Wiley and Sons. B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen unterschiedliche Aufnahme von eADF4(C16), eADF4(C16)-RGD und eADF4(κ 16) Partikeln (rot, gefärbt mit Rhodamin) in Hela Zellen (blau, gefärbt mit HCS Cell Mask™). Maßstabsbalken: 10 μ m. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Elsner, M.B., *et al.*, Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles. *Biomaterial Science*. (2015), 543-551. The Royal Society of Chemistry. C) Die Modellsubstanz Ethacridinlactat kann nach nicht-kovalenter Beladung pH-abhängig aus eADF4(C16)-Partikeln vollständig freigesetzt werden. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Lammel, A., *et al.*, Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials* (2011), 2233-2240. Copyright (2021) Elsevier.

Die Morphologie der Partikel sowie von Filmen wurde ebenfalls verwendet, um die Interaktion der rekombinanten Spinnenseidenvarianten mit den Bestandteilen menschlichen Blutes zu analysieren. Dabei zeigte sich, dass negativ geladene Varianten, wie eADF4(C16), vermehrt Proteine des Komplementsystems und Immunglobuline anreichern. An der Oberfläche von positiv geladenen Varianten, wie eADF4(κ 16), kommt es hauptsächlich zur Adsorption von Fibrinogen-basierten Proteinen, was nachteilige Fibrinablagerungen und Blutgerinnungen zur Folge hat.¹⁷⁷ Diese Ergebnisse bedeuten, dass eADF4(κ 16) nur eingeschränkt als Biomaterial geeignet ist. Denkbar sind weiterhin Anwendungen im Bereich des Wundverschlusses, wo eine schnelle Blutgerinnung von Vorteil ist.

1.4.3 Hydrogele für Biotinten

Rekombinante Spinnenseidenproteine bilden physikalische Hydrogele, welche sich als Grundlage für Wirkstoffsysteme oder für Biomaterial- und Biotinten in der Biofabrikation eignen. Das in wässriger Lösung ungefaltete Protein bildet unter bestimmten Bedingungen Nano-Fibrillen. Dies geschieht durch Zugabe von Kaliumphosphat (< 300 mM) oder Methanol (10% v/v) sowie ohne Additive ab einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml. Während dieses Prozesses bildet sich zunächst ein Nukleationskeim, an welchen sich weitere Moleküle anlagern. Die so entstehenden verzweigten Nanofibrillen arrangieren sich während der anschließenden Gelierung durch hydrophobe Interaktionen und Verstrickungen in physikalisch quervernetzte β -Faltblatt-Strukturen. Diese visko-elastischen Hydrogele sind über Wochen stabil und zeigen, abhängig von der Proteinkonzentration, Elastizitätsmodule im niedrigen kPa-Bereich (20 mg/ml eADF4(C16)-Hydrogel: E-Modul = 1 kPa).¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Bei einer Belastung von etwa 90% erreichen die Hydrogele die Fließgrenze. Es kommt zur irreversiblen Zerstörung der Struktur. Die Stabilität kann durch Nachbehandlung mit APS (Ammonium-peroxodisulfat) und Rubpy (Tris(bipyridin)-Ruthenium Chlorid) erhöht werden, was allerdings die Verwendung als Biomaterial aufgrund der Toxizität der Chemikalien ausschließt.^{178,180}

Hydrogele aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) konnten bereits erfolgreich als Wirkstoffdepots getestet werden. Dabei wurden die wasserlöslichen Modellproteine Rinderserumalbumin (BSA), Meerrettichperoxidase (HRP) und Lysozym entweder bereits vor der Gelierung mit der Proteinlösung vermischt oder per Diffusion in bereits gelierte Hydrogele eingebracht. Die beiden neutral/negativ geladenen Proteine BSA und HRP wurden anschließend, nur wenig beeinflusst von unterschiedlichen Puffern, zügig aus den Hydrogelen freigesetzt. Im Fall des positiv geladenen Lysozyms konnte die Geschwindigkeit der Freisetzung durch den Salzgehalt des Puffers signifikant beeinflusst werden. Eine weitere Möglichkeit die Freisetzung zu steuern, stellt die Einstellung unterschiedlicher Porengrößen im Hydrogel dar. Mit steigender Proteinkonzentration ergeben sich kleinere Poren. Gezeigt wurde dies durch Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen von 3%, 4% und 5% (w/v) Hydrogelen (Abbildung 12A). Kleinere Poren führen zu einer langsameren und unvollständigen Freisetzung der Modellproteine im statischen Messsystem (Abbildung 12B). Im Anschluss konnte außerdem die intakte Funktionalität der freigesetzten Proteine nachgewiesen werden.¹⁸¹

Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) und aufgrund der erhöhten Zellinteraktion auch eADF4(C16)-RGD sind ebenfalls als Materialkomponente in Biotinten etabliert. Die ohne Zellbestandteil rheologisch charakterisierten, scherverdünnenden Hydrogele können mittels pneumatischem Extrusionsdruck, ohne und mit elektromagnetischem Ventil, in mehrlagige Gitterstrukturen gedruckt werden (Abbildung

12C).^{181,182} Biotinten können durch simultanes Einkapseln von Zellen während des schonenden Gelierungsprozesses erzeugt und ebenfalls verdruckt werden. Humane Fibroblasten wurden mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in eADF4(C16) eingekapselt und zeigten 48 Stunden nach Druck sowie in der nicht gedruckten Kontrolle 70% vitale Zellen (Abbildung 12D).¹⁸² Bei Verwendung von eADF4(C16)-RGD basierten Hydrogelen wurde auch Proliferation von murinen Fibroblasten (ebenfalls $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) beobachtet. Ein optimiertes Protokoll zur Einkapselung der Zellen sowie die Zugabe von Gelatine als Additiv führten zur erhöhter Zellüberlebensrate und im Fall von eADF4(C16) auch zu verbesserter Druckbarkeit.¹⁸³

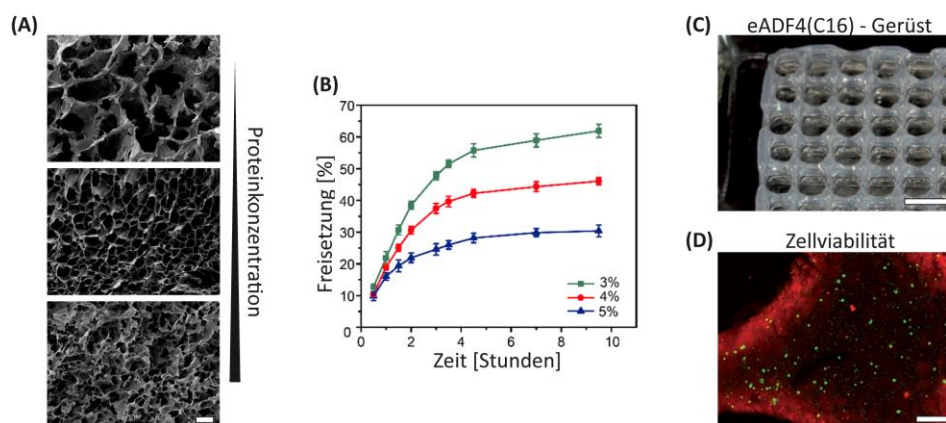


Abbildung 12. eADF4(C16)-Hydrogele als Wirkstoffdepot und Biotinte. A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen mit steigender Proteinkonzentration (30, 40 und 50 mg/ml) zunehmend kleinere Poren in Hydrogelen aus eADF4(C16). Maßstabsbalken: 10 μ m. B) Die Porengröße beeinflusst die Geschwindigkeit der Freisetzung von Modellproteinen; hier am Beispiel von Lysozym. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Kumari, S., *et al.*, Recombinant Spider Silk Hydrogels for Sustained Release of Biologicals. *ACS Biomaterials Science & Engineering* (2018), 1750-1759. Copyright (2021) American Chemical Society. C) eADF4(C16) Hydrogele (30 mg/ml) können mittels pneumatischer Extrusion in mehrlagige Gitterstrukturen gedruckt werden. Maßstabsbalken: 3 mm. D) Nach 70% Viabilität während der Gelierung, zeigen humane Fibroblasten eine 97% Überlebensrate während des Druckprozesses (lebende Zellen: grün, gefärbt mit Calcein; tote Zellen: rot, gefärbt mit Ethidium Homodimer). Maßstabsbalken: 200 μ m. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Schacht, K., *et al.*, Biofabrication of Cell-Loaded 3D Spider Silk Constructs. *Angewandte Chemie International Edition* (2015), 2816-2820. Copyright (2021) John Wiley and Sons.

Obwohl bislang der Einfluss von Zellen auf die Rheologie und Druckbarkeit von Tinten aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen nicht untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass alleine die Zugabe von Zellkulturmedium die Gelierung und die mechanischen Eigenschaften dieser verändert. Die Gele zeigen weiterhin unveränderte Sekundärstrukturen und werden auf der Basis von Nano-Fibrillen gebildet. Durch den gesteigerten Salzgehalt kommt es allerdings zu schnelleren Gelierungen und insgesamt steiferen Gelen.¹⁸⁴

2. Zielsetzung

Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) und Varianten davon sind aufgrund geeigneter Materialeigenschaften und Prozessierungsmöglichkeiten als vielversprechendes Biomaterial etabliert. Auf Basis der unter [Abschnitt 1.4](#) vorgestellten Studien im Bereich der Wirkstofffreisetzungssysteme und der Biofabrikation sollten diese in der vorliegenden Arbeit weiterentwickelt werden. Im Zentrum der Arbeit stand dabei die Herstellung und Charakterisierung neuer Biotinten und die Entwicklung von Wirkstofffreisetzungssystemen, welche allein für sich stehen, zusätzlich aber auch in der Biofabrikation Anwendung finden können ([Abbildung 13](#)).

Mit Aufkommen der Biofabrikation und des 3D-Druckes von Hydrogelen und Biotinten mussten zunächst die Technologien, Materialien und Zellen miteinander kombiniert werden. Auch für Hydrogele aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen war es notwendig das Einkapseln und Überleben von Zellen sowie die generelle Druckbarkeit zu zeigen. Um in den zukünftigen Entwicklungen des Feldes weiterhin als relevantes Material zu bestehen, sollten nun im Rahmen dieser Dissertation die nächsten Schritte in Richtung Funktionalität der gedruckten Konstrukte unternommen werden. Dazu sollte in dieser Arbeit zunächst der Druck zellulärer Biomaterialtinten genau analysiert und optimiert werden. Einen wichtigen Punkt stellte hier beispielsweise der Einfluss der Temperatur auf die Rheologie und die während des Druckes verwendeten Düse dar. In diesem Zusammenhang sollte das Potential eines rein physikalisch quervernetzten Hydrogels gezeigt werden, per Extrusion in Strukturen gedruckt werden zu können, welche über die bereits etablierten Gitterkonstrukte hinausgehen. Damit biofabrizierte Konstrukte in dem an den Druck anschließenden Reifungsprozess eine Funktionalität zeigen, müssen die Zellen in ausreichendem Kontakt zueinanderstehen. Hierfür ist es essentiell, dass der Zellgehalt der auf rekombinanten Spinnenseidenproteinen basierenden Biotinten hinreichend hoch ist. In der vorliegenden Arbeit sollte zum ersten Mal der Einfluss von Zellen überhaupt, und auch deren unterschiedliche Konzentrationen, auf die Gelierung, rheologischen Eigenschaften und Druckbarkeit von Biotinten untersucht werden. Es sollte gezeigt werden, dass die zuvor optimierte Druckbarkeit von Biomaterialtinten auch auf Biotinten mit hohem Zellgehalt übertragbar ist. Außerdem sollte durch die Verwendung verschiedener Varianten des rekombinanten Spinnenseidenproteins ebenfalls eine mögliche Interaktion des Integrin-Bindemotivs RGD mit den Zellen untersucht werden.

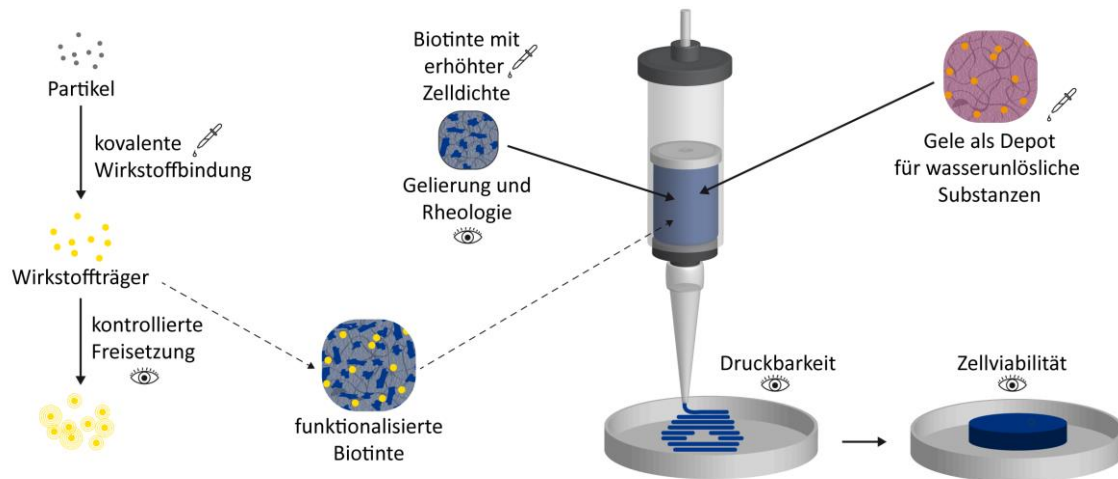


Abbildung 13. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung neuer Biotinten mit hohen Zelldichten, der Analyse von deren Rheologie und Druckbarkeit sowie die Etablierung neuer Wirkstofffreisetzungssysteme mit Potential für die Biofabrikation.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Möglichkeiten unterschiedlicher Morphologien rekombinanter Spinnenseidenproteine als Wirkstoffträger zu fungieren weiter ausgebaut werden. Hierfür sollte ermöglicht werden, schlecht wasserlösliche Substanzen nicht-kovalent in Gele einzubringen und daraus wieder freizusetzen. Im Gegensatz zu bereits etablierten Hydrogelen aus wässrigem System, sollte dafür ein wässrig-organisches System betrachtet werden. Mit zukünftigen Anwendungen als injizierbares Wirkstoffdepot sollte die Druckbarkeit des neuartigen Geles gezeigt werden. Außerdem sollte die Funktionalität als Wirkstoffdepot untersucht werden. Dieses sowie alle zuvor vorgestellten Systeme zur Beladung und Freisetzung beruhen auf nicht-kovalenten Interaktionen und können dementsprechend nur bedingt gesteuert werden. Um mehr Kontrolle über die Freisetzung von Wirkstoffen zu erhalten, sollten in einem dritten Teilaspekt im Rahmen dieser Arbeit rekombinante Spinnenseidenproteine als kovalente, auslösbare Wirkstoffträger etabliert werden. Diese können direkt Anwendung in zukünftigen Wirkstofffreisetzungssystemen finden. Außerdem stellen sie eine Möglichkeit dar, Wirkstoffe während der Herstellung von Biotinten in diese einzubringen und zu einem späteren Zeitpunkt freizusetzen. Um die entsprechenden Systeme zu entwickeln, sollten Wirkstoffe an Partikel und Filme aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen gekoppelt werden und deren Stabilität mit anschließend ausgelöster Freisetzung gezeigt werden.

3. Synopsis

Die vorliegende Arbeit umfasst vier Publikationen, welche in [Abschnitt 5](#) aufgelistet sind. Ein Übersichtsartikel ([Teilarbeit I](#)), der als Erstautorin verfasst wurde, beschäftigt sich mit dem aktuellen Stand der Gewebezüchtung und der Verwendung von seidenbasierten Materialien mit Fokus auf der Regeneration von mineralisiertem Gewebe. Des Weiteren beinhaltet diese Arbeit zwei Daten-Publikationen zum Thema Wirkstofffreisetzungssysteme basierend auf rekombinanten Spinnenseidenproteinen als Partikel, Filme und Hydrogele ([Teilarbeit III](#) und [Teilarbeit IV](#)), wovon letztere als Erstautorin verfasst wurde. Ein weiteres Manuskript ([Teilarbeit II](#)), ebenfalls als Erstautorin verfasst, akzeptiert und zur Veröffentlichung vorbereitet beschäftigt sich mit Rheologie und 3D-Druck von Hydrogelen und Biotinten aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen.

Nachfolgend werden wichtige von mir erzielte Ergebnisse der einzelnen Teilarbeiten dargestellt, diskutiert und in Verbindung zueinander gebracht. Die Publikationen und das Manuskript sowie die jeweiligen Eigenanteile sind in [Abschnitt 6](#) aufgeführt.

3.1 Optimierung und Analyse der Druckbarkeit von Hydrogelen aus eADF4(C16)

Hydrogele basierend auf den rekombinanten Spinnenseidenproteinen eADF4(C16) und eADF4(C16)-RGD zeigen scherverdünnendes und viskoelastisches Verhalten und wurden in vorangegangenen Publikationen bereits erfolgreich durch Extrusion, mit und ohne elektromagnetischem Ventil, in einfache Gitterstrukturen gedruckt.^{181,182}

Zur Optimierung des Druckes von 3% (w/v) Hydrogelen aus eADF4(C16) wurden in [Teilarbeit II](#) die Einflüsse verschiedener Druckparameter auf dessen Qualität untersucht. Experimentelle Beobachtungen während der Datengenerierung zeigten zunächst, dass durch die Verwendung von konischen Spitzen, anstelle der zuvor verwendeten zylindrischen Nadeln, generell ein besseres Druckergebnis erreicht werden konnte. Unabhängig vom Durchmesser der Spitze kommt es am abrupten Übergang zwischen Kartusche und Nadel während des Druckens zur Entwicklung höherer mechanischer Kräfte auf das Material, als während der graduellen Verengung innerhalb einer konischen Spitze.¹⁸⁵ Damit verbunden ist ein signifikant höherer notwendiger Luftdruck, um eine Extrusion des Materials zu erreichen. Für den Druck desselben Materials, durch unterschiedliche Geometrien mit gleichem Innendurchmesser der Spitze, kann so der benötigte Druck mehr als verdoppelt beziehungsweise halbiert werden (nicht veröffentlichte Daten). Dies erklärt, warum es bei der Verwendung von Stahlnadeln vermehrt zum Auftreten von Phasenseparation des Hydrogels und allgemein ungleichmäßiger Materialeextrusion kommt. Die höhere mechanische Belastung auf das Material führt zu teilweise irreversibler Zerstörung des nicht chemisch quervernetzten Polymernetzwerkes.

Im Zusammenhang damit wurde außerdem der Einfluss der Temperatur auf die rheologischen Eigenschaften und damit auch auf das Druckergebnis untersucht. Dafür wurden drei für die Praxis relevanten Temperaturen verwendet. Die Standardausführungen der meisten kommerziellen Drucker beinhalten keine heiz- oder kühlbaren Druckköpfe. Soweit die Materialeigenschaften dies zulassen, wird also hauptsächlich bei Raumtemperatur (25°C) gedruckt. Zusätzlich wurde das Material bei 37°C und 4°C vermessen, um die rheologischen Eigenschaften während beziehungsweise direkt nach Gelierung oder Lagerung im Kühlschrank zu betrachten. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigenden Temperaturen auch die von der Scherrate abhängigen Viskositäten, vor allem im niedrigen Bereich, steigen (Abbildung 14A). Normalerweise verringert sich die Viskosität einer Probe mit Erhöhen der Temperatur. Im Fall von Materialien welche temperaturabhängig aushärten, zu denen Hydrogele aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen gehören, kann dieser Effekt allerdings auch entgegengesetzt sein.⁵⁰ Ebenfalls zeigten sich steigende Fließpunkte der Hydrogele bei Erwärmung (Abbildung 14B). Höhere Viskositäten und Fließpunkte werden normalerweise mit einem besseren Druckergebnis, vor allem hinsichtlich der Ausbildung des Filaments und dessen Formtreue, in Verbindung gebracht. Sie führen allerdings auch zu erhöhtem Druck und dadurch vermehrten Scherkräften während der Extrusion.⁵³

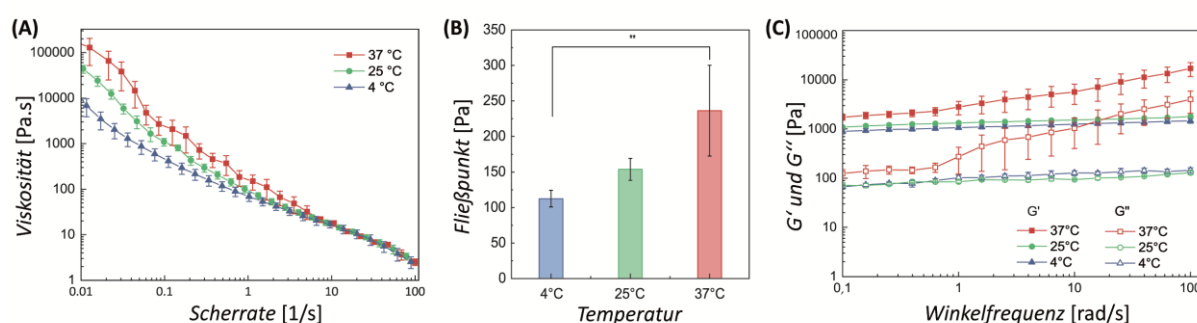


Abbildung 14. Temperaturabhängige Rheologie von 3% (w/v) eADF4(C16)-Hydrogelen.

Messungen wurden bei 4°C, 25°C und 37°C durchgeführt. A) Viskositäten wurden über einen Anstieg der Scherraten gemessen. B) Fließpunkte stellen den Übergang zwischen Speicher- und Verlustmodul während steigender Belastung (0,01% bis 1000,0%) bei konstanter oszillierender Scherrate (10,0 Rad/s) dar (**P≤0,05). C) Stabilität der Module wurde außerdem während konstanter Belastung (1,0%) mit steigender oszillierender Frequenz (0,1 bis 100,0 Rad/s) betrachtet. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Lechner, A., et al., Impact of Cell Loading of Recombinant Spider Silk Based Bioinks on Gelation and Printability. *Macromolecular Bioscience* (2022), 22, 2100390. Copyright (2022) John Wiley and Sons.

Bei dem verwendeten Material führten diese rheologischen Änderungen, wie bereits während Betrachtung der unterschiedlichen Spitzen-Geometrien, zu einer Verminderung der Druckqualität. Grundsätzlich lässt sich aus den erhaltenen Daten empfehlen, dass die Parameter (Spitze und Temperatur) für die Extrusion von Hydrogelen aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen so gewählt werden sollten, dass der notwendige Druck möglichst gering ist. Dies bedeutet, dass durch niedrige Temperaturen und konische Spitzen ein

optimales Druckergebnis erzielt werden kann. Frequenzabhängige oszillatorische Messungen zeigten außerdem die Instabilität der Speicher- und Verlustmodule bei 37°C gegenüber stabilen Werten bei 4°C und 25°C auf (Abbildung 14C), weshalb das Drucken bei 37°C in jedem Fall vermieden werden sollte.

Mithilfe des erlangten Wissens zur Optimierung des Druckes konnte in *Teilarbeit II* ebenfalls das Potential von Hydrogelen aus eADF4(C16) bezüglich deren Druckbarkeit und Formtreue gezeigt werden. Es war möglich, aus 3% (w/v) Hydrogelen die Form einer humanen Aortenklappe reproduzierbar mit zwei unterschiedlichen Extrusionsdruckern zu erzeugen. Dazu wurden eine konische Spitze mit einem Innendurchmesser von 200 µm (27G) sowie die Drucker *Bioplotter* von RegenHU und *BioX* von Cellink mit manuell justiertem Druck im Bereich zwischen 400 und 420 mbar verwendet. Die Konstrukte mit einer Dimension von etwa 25 x 25 x 15 mm (Länge x Breite x Höhe) zeigten hohe Formstabilität, kein Kollabieren der Hohlräume im Inneren durch obere Schichten und nahezu identische Form und Größe (Abbildung 15A). Die Oberflächenstruktur wiesen jedoch optische Unterschiede auf. Während im Ergebnis des Bioplotters die einzelnen Schichten sichtbar waren, waren die Poren im Inneren der vom BioX gedruckten Struktur erkennbar. Diese Abweichungen sind aufgetreten, obwohl alle Verbrauchsmaterialien, wie Kartusche und Spitze, als auch alle Einstellungen, wie Schichthöhe und genaue Menge und Geometrie der Füllstruktur, identisch waren. Diese Ergebnisse zeigten zum einen die gute Reproduzierbarkeit des Extrusionsdruckes bestimmter Formen, allerdings auch den Einfluss von automatisch und separat generierten G-Codes auf Details innerhalb der jeweiligen gedruckten Konstrukte.

Besonders hervorzuheben ist die Fähigkeit des Materials, Strecken im Bereich von mehreren Millimetern ohne Probleme in der Luft zu überbrücken. Diese Eigenschaft wird beim Drucken von Strukturen mit überhängenden Bereichen und Hohlräumen, welche durch obere Schichten geschlossen werden müssen, wichtig. Der sogenannte *Filament Collapse Test* wurde 2019 von Ribeiro *et al.* entwickelt, um diese Fähigkeit anhand eines einzelnen Stranges und unterschiedlichen Streckenlängen zu evaluieren.⁵⁸ Dieser wurde ebenfalls mit einem 3% (w/v) Hydrogel aus eADF4(C16), einer konischen Spitze mit 410 µm (22G) Innendurchmesser und dem *Bioplotter* von RegenHU durchgeführt. Die aus der Literatur⁵⁸ stammende Säulenstruktur wurde leicht für eine einfachere Anwendung am *Bioplotter* modifiziert und per FDM-Technologie (Schmelzschichtung) aus PLA (Polymilchsäure) gedruckt. Die Dimensionen der einzelnen Säulen sowie deren zunehmende Abstände zueinander (1, 2, 4, 8 und 16 mm) blieben erhalten. Für eine realistische Repräsentation wurde das Ergebnis von 12 dieser Tests betrachtet (Abbildung 15B). Es konnte deutlich gemacht werden, dass 3% (w/v) eADF4(C16) Hydrogele durch pneumatischen Extrusionsdruck mit einer konischen Spitze Strecken bis zu 8 mm verlässlich überbrücken können. Abstände von 16 mm konnten ebenfalls erfolgreich gedruckt werden. Hier kommt es allerdings, vermutlich durch kleinere Inhomogenitäten im

Material, vermehrt zum Abreißen des Filaments. Außerdem wurde der Winkel der sich teilweise durchbiegenden Stränge bestimmt (Teilarbeit II Figure 1D). Dieser sollte für ein formtreues Druckergebnis möglichst gering sein. Der Grad an Verformung wird hauptsächlich von den rheologischen Eigenschaften des Materials bestimmt. Dies wurde bereits beispielsweise für synthetische Hydrogele aus unterschiedlichen Mischungen von Poloxamer 407 und Polyethylen Glykol gezeigt. Auch hier wurde wieder der allgemeine Trend gezeigt, dass höhere Viskositäten und Fließpunkte zu einem besseren Druckergebnis führen.^{53,58} Aus eADF4(C16) gedruckte Hydrogele können sich gut in die publizierten Ergebnisse einreihen. Mit dem Fließpunkt bei 150 Pa (siehe Abbildung 14B), zeigte das Hydrogel aus 3% (w/v) eADF4(C16) gleiche Verformung (zwischen 0.1 und 0.4 rad) wie die Polymermischungen mit vergleichbaren Fließpunkten.⁵⁸

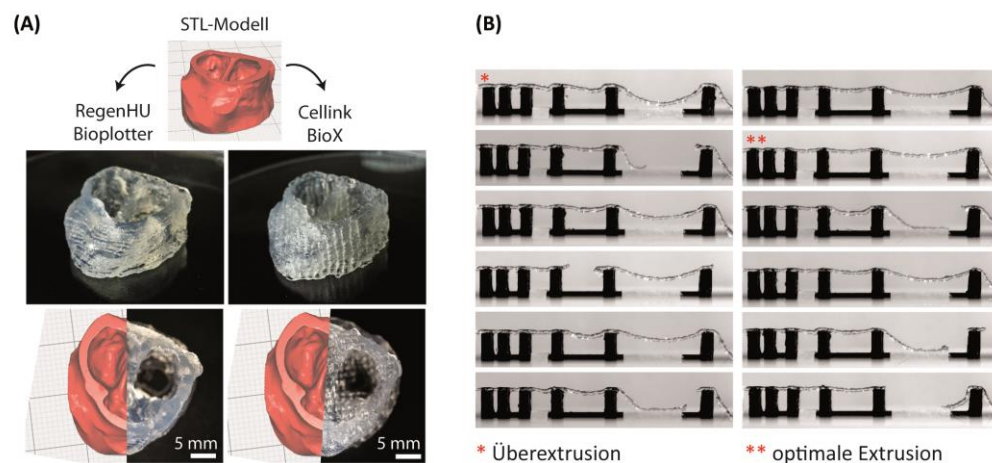


Abbildung 15. Formtreue von gedruckten Hydrogelen aus 3% (w/v) eADF4(C16). A) Die Form einer humanen Aortenklappe wurde mit einer 27G konischen Spitze und zwei unterschiedlichen 3D-Druckern (RegenHUs *Bioplotter* und Cellinks *BioX*) identisch gedruckt. B) Die Fähigkeit des Materials, Strecken in der Luft zu überbrücken (1, 2, 4, 8, 16 mm), wurde mittels 12-facher Ausführung des *Filament Collapse Testes* gezeigt. Hervorgehoben sind je ein Beispiel zu starker Extrusion, was zu Verformung des Filaments führt (*) und ein Beispiel optimaler Extrusion (**). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Lechner, A., et al., Impact of Cell Loading of Recombinant Spider Silk Based Bioinks on Gelation and Printability. *Macromolecular Bioscience* (2022), 22, 2100390. Copyright (2022) John Wiley and Sons.

Die hier gezeigten Daten machen außerdem deutlich, wie wichtig eine exakte Einstellung des Luftdruckes ist. Wird zu schnell (Abbildung 15B*) oder zu langsam extrudiert, fehlt die optimale Abstimmung mit der Bewegungsgeschwindigkeit des Druckkopfes, was automatisch zu Verformungen oder Abreißen des Stranges führt. Diese Erkenntnis führt zur Empfehlung, den *Filament Collapse Test* nicht nur zur Evaluation der Druckqualität, sondern auch als Werkzeug zur standardmäßigen Einstellung des Luftdruckes vor jedem Druck zu verwenden. Verglichen mit dem Einstellen des Druckes anhand der senkrechten Extrusion in Luft oder der Ablage auf einer Oberfläche, können durch diesen Test Unstimmigkeiten zwischen Extrusions- und Bewegungsgeschwindigkeit besser erkannt und korrigiert werden.

3.2 Rheologie und Druckbarkeit von Biotinten mit erhöhter Zelldichte

Funktionale Konstrukte können durch die Verarbeitung von azellulären Biomaterialtinten mit anschließender Besiedelung von Zellen generiert werden. Weit relevanter für die Biofabrikation ist allerdings der simultane Druck von Zellen und Biomaterial in Biotinten. In *Teilarbeit II* der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Biotinten mit hoher Zelldichte erzeugt und charakterisiert. In vorangegangenen Studien wurde bereits der Einfluss von Zellkulturmedium auf die Gelierung und Rheologie von Hydrogelen aus den rekombinanten Spinnenseidenproteinen eADF4(C16) und dessen Variante eADF4(C16)-RGD mit erhöhter Zellinteraktion untersucht.^{183,184} Logischerweise können Zellen, vor allem wenn sie aktiv mit der Materialkomponente interagieren, ebenfalls die mechanischen Eigenschaften von Biotinten beeinflussen. Die Literatur zeigt die Individualität verschiedener Material- und Zell-Kombinationen. Die Ergebnisse reichen von kaum veränderten rheologischen Daten und Druckverhalten bis hin zu signifikanten Effekten von Zellen auf Biotinten.^{62,63,186}

Für Hydrogele aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen ist bereits bekannt, dass der RGD-*tag* sowohl zu schnellerer Gelierung als auch zu steiferen Hydrogelen bei gleicher Proteinkonzentration führt.^{182,183} Bei der Betrachtung von Biotinten in der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund eine weitere Proteinvariante, eADF4(C16)-RGE, aufgenommen. Der Austausch des Asparaginsäurerestes (D) mit einem Glutaminsäurerestes (E) im *tag* ergibt eine Proteinvariante mit zu eADF4(C16)-RGD vergleichbaren physikochemischen Eigenschaften, darunter die Nettoladung und Ladungsverteilung, und mit zu eADF4(C16) vergleichbarer geringer Zellinteraktion.¹⁵³ Messungen der Gelierungskinetik zeigten beschleunigte Ausbildung von Fibrillen und Hydrogelen im Falle der beiden mit *tags* modifizierten Proteine eADF4(C16)-RGD und eADF4(C16)-RGE. Außerdem konnten unterschiedliche Effekte von Zellen auf die Proteinvarianten gezeigt und erklärt werden. Im Falle von eADF4(C16) und eADF4(C16)-RGE bewirkt die Präsenz von Zellen eine Beschleunigung der zunächst stattfindenden Ausbildung der Fibrillisationskeime. Eine Störung des Netzwerkes durch die Zellen führte allerdings ebenfalls zu insgesamt verlangsamten Gelierungen. Dieser Effekt wurde bei Biotinten aus eADF4(C16)-RGD nicht beobachtet, was vermuten lässt, dass hier die Zellen durch Interaktion mit dem RGD-*tag* ihrem destruktivem Effekt entgegenwirken (*Teilarbeit II Figure 3A*). Für bessere Vergleichbarkeit der rheologischen Eigenschaften der Tinten aus den verschiedenen Proteinen wurde für die im nächsten Teil durchgeführten Messungen die Konzentration der von Grund auf weniger steifen eADF4(C16)-Hydrogele auf 40 mg/ml erhöht, während eADF4(C16)-RGD und eADF4(C16)-RGE mit einer Konzentration von 30 mg/ml eingesetzt wurden. Alle Proteinvarianten wurden sowohl als azelluläre Hydrogele ohne und mit Zellkulturmedium, als auch als Biotinte mit Zellkulturmedium und steigenden Mengen an humanen Zellen vermessen. Dafür wurde die aus einem Pankreas-Adenokarzinom isolierte Zelllinie BxPC-3 verwendet.¹⁸⁷ Es konnte ein Einfluss der Zellen,

abhängig von der Proteinvariante, auf die Viskosität und Fließpunkte gezeigt werden (Abbildung 16A). Zunächst bewirkt die Zugabe von Zellkulturmedium vor Gelierung eine Zunahme der Viskositäten der drei Hydrogele, wodurch zuvor publizierte Ergebnisse für eADF4(C16) und eADF4(C16)-RGD bestätigt und mit Daten für eADF4(C16)-RGE ergänzt werden konnten.¹⁸⁴

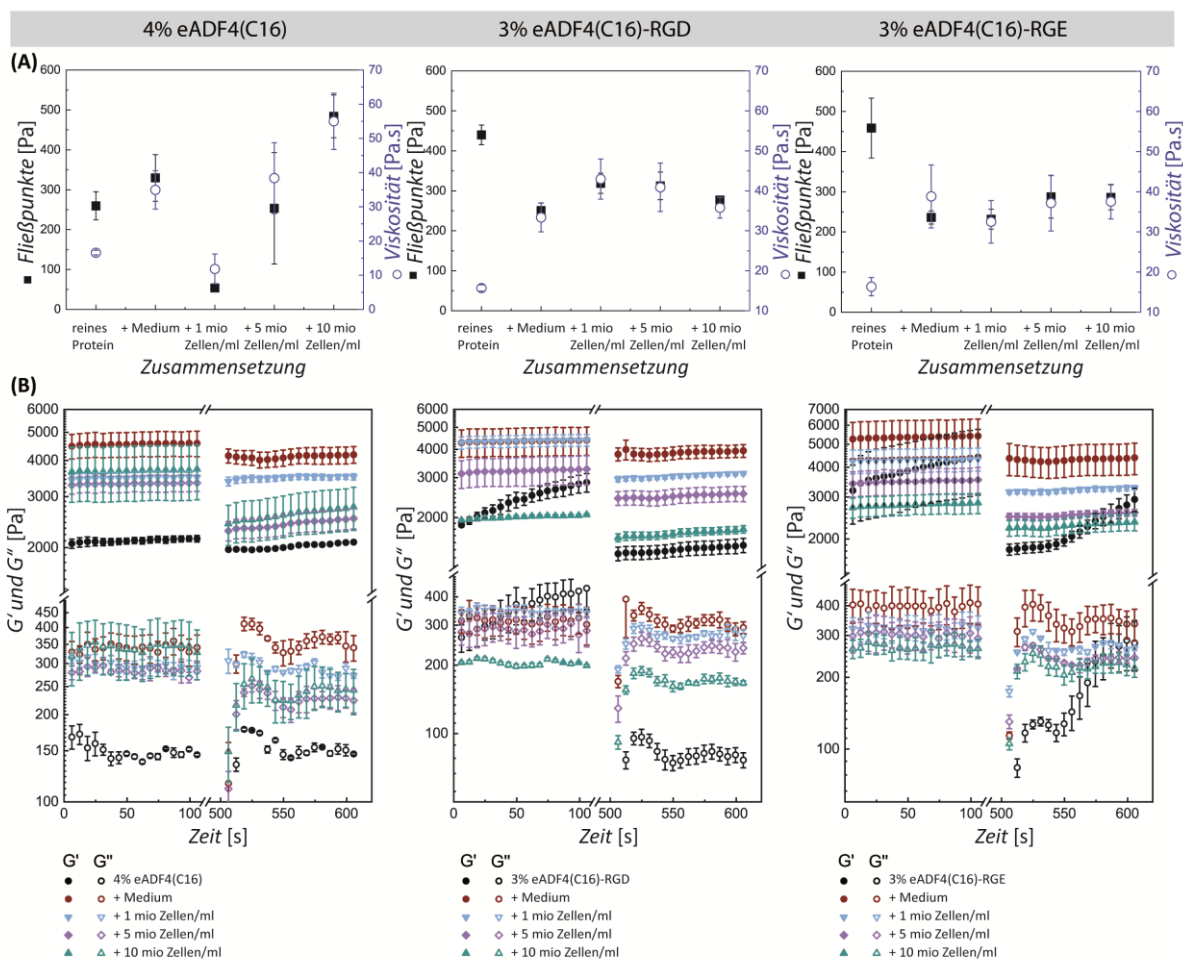


Abbildung 16. Rheologie von auf rekombinanten Spinnenseidenproteinen basierenden Hydrogelen und Biotinten. Hydrogele und Biotinten aus 4% (w/v) eADF4(C16), 3% (w/v) eADF4(C16)-RGD und 3% (w/v) eADF4(C16)-RGE wurden ohne und mit eingekapselten BxPC-3 Zellen unterschiedlicher Mengen (nur Protein, Protein plus 15% (v/v) Zellkulturmedium, Protein plus 1 Million Zellen/ml, Protein plus 5 Million Zellen/ml, und Protein plus 10 Millionen Zellen/ml in jeweils 15% (v/v) Zellkulturmedium) rheologisch vermessen. A) Fließpunkte wurden als Übergang zwischen Speicher- (G') und Verlustmodul (G''), gemessen bei konstanter oszillierender Scherrate (10,0 Rad/s) während steigender Belastung (0,01% bis 1000,0%), bestimmt. Viskosität wurde bei einer Scherrate von 10 s^{-1} gemessen. B) Stabilität des Speicher- (G') und Verlustmoduls (G'') wurde bei konstanter Belastung (0,1%) für 100 Sekunden gemessen. Erneute Messung nach kurzzeitiger Erhöhung der oszillierenden Scherrate auf bis 100 s^{-1} (Daten nicht dargestellt) zeigt die Erholung von G' und G'' . Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Lechner, A., et al., Impact of Cell Loading of Recombinant Spider Silk Based Bioinks on Gelation and Printability. *Macromolecular Bioscience* (2022), 22, 2100390. Copyright (2022) John Wiley and Sons.

Trotz Anpassung der Proteinkonzentration unterschieden sich die reinen Hydrogele weiterhin deutlich in ihrem Fließpunkt. Durch eine höhere Konzentration des unmodifizierten eADF4(C16) konnte der Fließpunkt hier von zuvor 150 Pascal (Abbildung 14B) auf 250 Pascal erhöht werden. Hydrogele aus den beiden mit *tag* ausgestatteten Varianten zeigten allerdings beide einen Fließpunkt um 450 Pascal (Abbildung 16A). Während der vergleichsweise niedrige Fließpunkt des Hydrogels aus eADF4(C16) durch die Zugabe von Zellkulturmedium anstieg, nahmen die Werte für die Hydrogele aus beiden *tag*-Varianten deutlich ab. Im weiteren Verlauf der verschiedenen Zusammensetzungen der Biotinten mit steigender Zelldichte verhielten sich die Viskositäten und Fließpunkte der jeweiligen Proteinvariante im gleichen Trend. Beide Werte der auf eADF4(C16) basierenden Biotinten fielen mit Zugabe von Zellen deutlich ab, stiegen allerdings mit steigender Menge an Zellen über die ursprünglich gemessenen Werte der azellulären Hydrogele hinaus an. Hier konnte erneut gezeigt werden, dass Zellen zunächst die Struktur des Hydrogelnetzwerkes stören. In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal Biotinten mit Zelldichten über 1 Million Zellen/ml hergestellt und charakterisiert. Dass dies im Fall von eADF4(C16) basierenden Biotinten zu steiferem Material führte, könnte durch eine Interaktion der Zellen untereinander erklärt werden. Ebenfalls belegen die Zellen andernfalls freies Volumen, wodurch sich effektiv die Proteinkonzentration erhöht, was auch zu steiferen Hydrogelen führt. Dieser Effekt der Zellen wurde für Biotinten aus eADF4(C16)-RGD und eADF4(C16)-RGE nicht in gleichem Ausmaß beobachtet. Lediglich im Falle der eADF4(C16)-RGD Biotinte wurde, bereits mit der niedrigsten Zelldichte, ein Anstieg gemessen. Alle weiteren Viskositäten und Fließpunkte für die RGD- und die RGE-Variante des rekombinanten Spinnenseidenproteins blieben auch mit steigenden Zellmengen im gleichen Bereich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass hier die physikalischen Eigenschaften der Proteine und Hydrogele alleine stärkeren Einfluss auf die Rheologie haben, als die eingekapselten Zellen. Die Netzwerke beider Proteine werden durch die Zellen weder signifikant geschwächt noch gestärkt (Abbildung 16A). Für den Prozess des Extrusionsdruckes entscheidend ist die Fähigkeit der Biotinte, deren rheologische Eigenschaften nach hoher Scherbelastung in der Verengung der Druckkopfspitze größtenteils wiederherzustellen. Für Biotinten aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen wurde dies mittels Messung der Stabilität des Speicher- (G') und Verlustmoduls (G'') bei konstanter Belastung vor und nach Anlegen einer hohen Scherrate dargestellt (Abbildung 16B). Die gemessenen Kurven der einzelnen Materialzusammensetzungen zeigen einen zur Entwicklung der Fließpunkte vergleichbaren Trend. Im Fall von eADF4(C16) basierenden Zusammensetzungen konnte die beste Regeneration der Module für die Probe aus reinem Protein und für die Probe mit niedrigster Zelldichte gezeigt werden. Für Hydrogele und Biotinten aus eADF4(C16)-RGD und eADF4(C16)-RGE konnte die Wiederherstellung durch Zugabe von Medium alleine und mit Zellen signifikant verbessert werden. Diese direkte Korrelation zwischen hohen Fließpunkten

und schlechterer Wiederherstellung der rheologischen Eigenschaften bestätigt die in dieser Arbeit bereits zuvor gemachte Beobachtung. In Abschnitt 3.1 wurden erhöhte Fließpunkte durch steigende Temperatur ebenfalls mit verminderter Qualität der Filamentausbildung während der Extrusion in Verbindung gebracht.

Nach rheologischer Charakterisierung der Hydrogele und Biotinten konnte in Teilarbeit II zusätzlich die Druckbarkeit der auf eADF4(C16) und eADF4(C16)-RGD basierenden Tinten gezeigt werden. Dazu wurde wieder der *Filament Collapse Test* ausgeführt (Abbildung 17A). Rheologische Unterschiede konnten durch Anpassung des angelegten Druckes kompensiert werden. Alle Hydrogele und Biotinten konnten erfolgreich Abstände bis 16 mm überbrücken. Die gemessenen Winkel der Filamente waren dabei jeweils im Bereich zwischen 0 und 0.4 rad, wie ebenfalls für 3% eADF4(C16) unter Abschnitt 3.1 bestimmt. Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, homogene Filamente aus eADF4(C16)-RGE basierenden Tinten zu extrudieren. Hier konnte die Geschwindigkeit der Extrusion nicht mit der Bewegungsgeschwindigkeit des Druckkopfes synchronisiert werden. Der für die Extrusion benötigte Luftdruck führte hier zu unkontrollierbarer, schneller Ausbildung eines Filaments. Die maximale Geschwindigkeit des Druckers von 20 mm/s war für die Ablage eines homogenen Stranges nicht ausreichend.

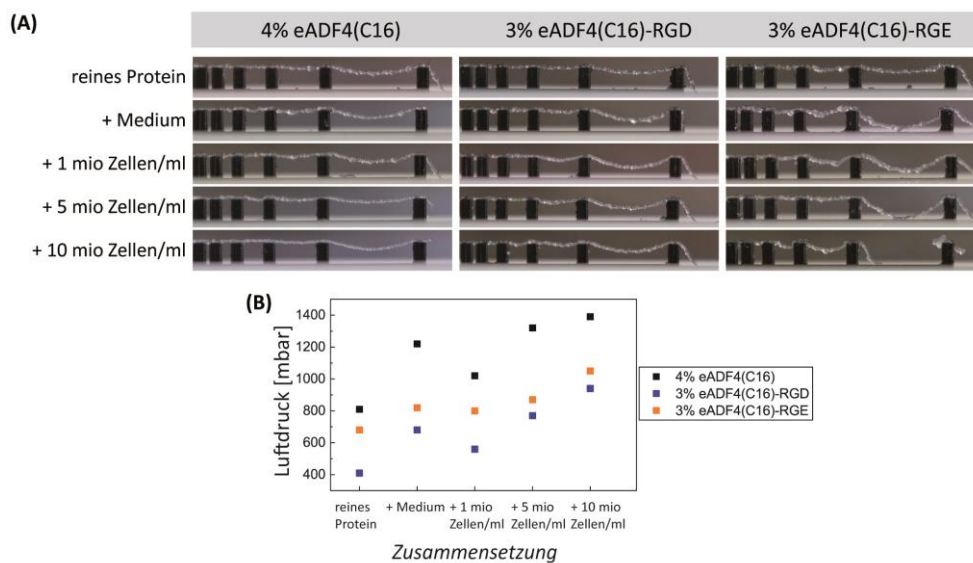


Abbildung 17. Vergleich der Druckbarkeit von Hydrogelen und Biotinten basierend auf rekombinanten Spinnenseidenproteinen mit unterschiedlichen Zellbeladungen. A) Ausführung des *Filament Collapse Testes* mit verschiedenen Zusammensetzungen aus eADF4(C16), eADF4(C16)-RGD und eADF4(C16)-RGE ohne und mit BxPC-3 Zellen. Einzelne Filamentstränge wurden mit einer 22G konischen Spitze über mit wachsendem Abstand (1, 2, 4, 8, 16 mm) platzierte Säulen extrudiert. B) Der Luftdruck wurde manuell für ein optimales Druckergebnis eingestellt. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Lechner, A., et al., Impact of Cell Loading of Recombinant Spider Silk Based Bioinks on Gelation and Printability. *Macromolecular Bioscience* (2022), 22, 2100390. Copyright (2022) John Wiley and Sons.

Der für die Durchführung des *Filament Collapse Testes* manuell angepasste Luftdruck zur Extrusion der verschiedenen Hydrogele und Biotinten wurde im Bereich zwischen 400 mbar und 1400 mbar variiert. Interessanterweise zeigte sich allerdings das gleiche Muster für alle drei Proteine mit unterschiedlichen Zellbeladungen (Abbildung 17B). Hydrogele, welche in der Anwesenheit von Zellkulturmedium geliert waren, brauchten mehr Druck als reine Hydrogele. Durch die Zugabe von Zellen sank zunächst der benötigte Druck, stieg dann mit steigender Zellmenge in allen drei Fällen deutlich an.

Neben der Druckbarkeit von Biotinten muss der Fokus natürlich auf den Zellen und deren Überleben sowie Entwicklung liegen. In *Teilarbeit II* wurde deshalb ebenfalls gezeigt, dass die eingekapselten und extrudierten Zellen direkt nach dem Druckprozess sehr hohe Viabilität aufweisen. Betrachtungen nach sieben und 14 Tagen zeigten eine Zunahme der Zellzahl und Viabilität in Biotinten mit eADF4(C16)-RGD und Abnahmen in den Biotinten mit eADF4(C16) und eADF4(C16)-RGE (*Teilarbeit II Figure 5 und Figure S2*). Diese Ergebnisse bestätigten erneut den positiven Effekt des mit einem Integrin-Bindepeptid RGD modifizierten Spinnenseidenproteins. In Kombination mit der in dieser Arbeit erzielten verlässlichen und reproduzierbaren Druckbarkeit können in Zukunft funktionale Konstrukte mit komplexeren Geometrien durch pneumatischen Extrusionsdruck erzeugt werden.

3.3 Extrusionsdruck von eADF4(C16)-Gelen aus wässrig-organischer Mischphase

Neben der Druckbarkeit von Hydrogelen aus eADF4(C16) wurde diese auch für in *Teilarbeit III* neu entwickelten Gele aus wässrig-organischen Mischphasen gezeigt. Inhalt der Publikation waren Gele basierend auf eADF4(C16) (negativ geladen), eADF4(κ 16) (positiv geladen) und eADF4(Ω 16) (neutral geladen) und deren Charakterisierung. Die neuartige Assemblierung fand dabei entweder in einer Mischphase aus 66% (v/v) wässrigem Anteil und 33% (v/v) organischem Anteil (DMSO (Dimethylsulfoxid) oder DMF (Dimethylformamid)) oder nach Dialyse gegen DMSO in rein organischer Phase statt. Es wurden die Ausbildung der Fibrillen und Assemblierung in Gele, sowie deren Morphologie und Rheologie betrachtet und mit Gelen aus rein wässrigem System verglichen (*Teilarbeit III Figure 1 und 2*). Teil der vorliegenden Arbeit war es, die Druckbarkeit der aus eADF4(C16) gebildeten neuen Gele zu zeigen (Abbildung 18). Wässrig-organische Gele konnten zunächst sowohl mit konischer Spitze, als auch mit zylindrischer Stahlnadel mittels des *Bioplotters* von RegenHU in einfache Gitterstrukturen gedruckt werden.

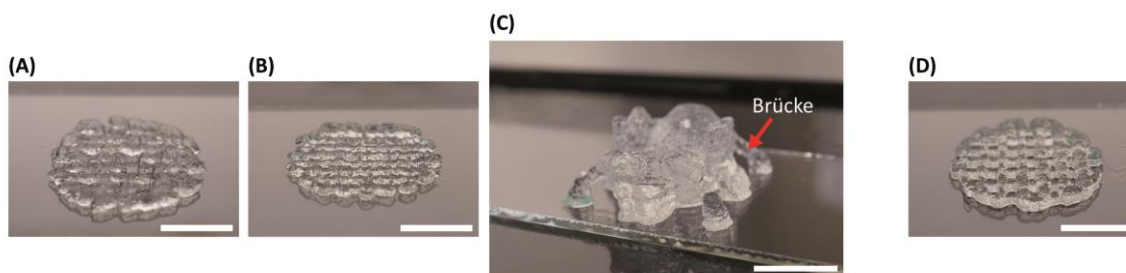


Abbildung 18. Extrusionsdruck von eADF4(C16) Gelen aus wässrig-organischer Mischphase und rein organischer Lösung. Aus wässrig-DMSO Mischungen konnten Gitterstrukturen sowohl aus A) konischen Spitzen, sowie aus B) zylindrischen Nadeln gedruckt werden. C) Die aus konischen Spitzen gedruckte Form einer Tarantula zeigt die Fähigkeit des Materials, Strecken in der Luft zu überbrücken (siehe Pfeil). D) In reinem DMSO gebildete Gele konnten ebenfalls in Gitterstrukturen gedruckt werden. Maßstabsbalken: etwa 10 mm. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Neubauer, J.V., Trossmann, V.T., Jacobi, S., Döbl, A., und Scheibel, T., Recombinant Spider Silk Gels Derived From Aqueous-Organic Solvents as Depots for Drugs. *Angewandte Chemie International Edition* (2021), 11847-11851. Copyright (2021) John Wiley and Sons.

Außerdem konnte ebenfalls, wie bereits für eADF4(C16)-Hydrogele, der 3D-Druck in aufwändigere Strukturen gezeigt werden. In diesem Fall wurde dafür die Form einer Tarantula gewählt. Diese Struktur weist vergleichbare Dimensionen zur zuvor gedruckten Aortenklappe (Abschnitt 3.1) auf, besitzt allerdings keine Hohlräume im Inneren der Struktur. Anhand der Beine des Tieres konnte hier die Möglichkeit zum Drucken von überhängenden Bereichen beziehungsweise zum Ausbilden von Brücken demonstriert werden (Abbildung 18C). Gleiche Ergebnisse konnten ebenfalls für eADF4(C16) aus reinem organischem Lösemittel (DMSO) erzielt werden. Das Material wurde sowohl in Gitterstrukturen (Abbildung 18D) als auch in die Form der Tarantula (nicht gezeigt) gedruckt.

3.4 Gele aus wässrig-organischer Mischphase als Wirkstoffdepots

Die unter Abschnitt 3.3 aus Teilarbeit III beschriebenen Gele wurden mit der Möglichkeit zur Einkapselung und Freisetzung von in Wasser schlecht bis gar nicht löslichen Wirkstoffen entwickelt. Die Überlegenheit eines Geles aus Wasser/DMSO Mischphase konnte in der vorliegenden Arbeit mit dem klinisch relevanten Wirkstoff 6-Mercaptopurin gezeigt werden. Die Substanz konnte nicht-kovalent während des Gelierungsprozesses homogen in das Gel eingeschlossen werden. Im rein wässrigen Hydrogel als Kontrolle kam es zum Ausfall des Wirkstoffes, wodurch dieser nicht gleichmäßig verteilt werden konnte und stellenweise zu Boden sank. Dieser Unterschied zwischen den beiden verschieden hergestellten Gelen konnte durch Messung der Freisetzungskurven gezeigt werden (Abbildung 19A). Die homogenere Verteilung des Wirkstoffes im wässrig-organischen Gel führte zu mehr Freisetzung als aus dem Kontrollgel. Strukturelle Unterschiede der Gele konnten durch Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie festgestellt werden. Auffällig hier war vor allem eine starke

Verflechtung der einzelnen Fibrillen in Anwesenheit von DMSO (Teilarbeit III Figure 2). Im Vergleich zum Hydrogel, welches die typische Porenstruktur aufwies (Abbildung 19B) zeigte das gefriergetrocknete wässrig-organische Gel eine von Fibrillen geprägte Struktur (Abbildung 19C).

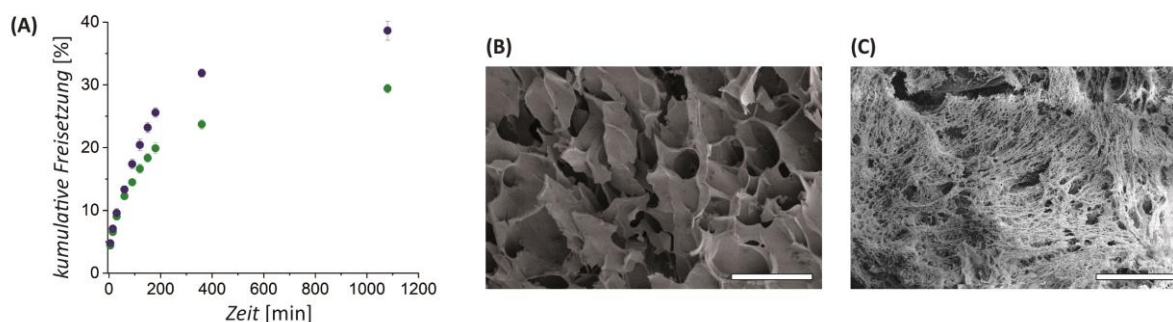


Abbildung 19. Kumulative Freisetzung von 6-Mercaptopurin aus wässrig organischem eADF4(C16)-Gel (blau) und rein wässrigem eADF4(C16)-Hydrogel (grün). A) Der in DMSO gelöste Wirkstoff wurde vor Gelierung zu den Gelen gemischt. Zur Freisetzung wurden die Gele für definierte Zeitintervalle in 1:1 Mischungen aus Wasser:DMSO inkubiert und die Menge an Wirkstoff durch UV-spektroskopische Messungen quantifiziert. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines B) eADF4(C16)- Hydrogels und eines C) Mischgels aus eADF4(C16) aus wässrig-organischer Phase. Maßstabsbalken: 20 μm . Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Neubauer, J.V., Trossmann, V.T., Jacobi, S., Döbl, A., und Scheibel, T., Recombinant Spider Silk Gels Derived From Aqueous-Organic Solvents as Depots for Drugs. *Angewandte Chemie International Edition* (2021), 11847-11851. Copyright (2021) John Wiley and Sons.

Diese neu entwickelten Gele versprechen, durch ihre Kombination aus Druckbarkeit und der Möglichkeit zum Einkapseln von wasserunlöslichen Substanzen, Anwendungen in der Biofabrikation als Biomaterialtinte oder in der Medizin als injizierbares Wirkstoffdepot. DMSO ist eine durch die FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) zugelassene aktive pharmazeutische Substanz, die unter anderem bereits Anwendung als Co-Lösemittel, zur Erhöhung der transdermalen Penetration von Wirkstoffen und zur Kryokonservierung findet.¹⁸⁸ Für spezifische Anwendungen können zukünftig die Interaktionen zwischen Wirkstoff und Material weiter angepasst werden. Im auf elektrostatischen Interaktionen beruhenden System wäre die Verwendung von Spinnenseidenproteinen mit unterschiedlichen Nettoladungen denkbar. Für mehr Kontrolle über die Freisetzung benötigt es allerdings ein kovalentes Wirkstoffsystem (siehe Abschnitt 3.5).

3.5 Etablierung kovalenter Wirkstofffreisetzungssysteme mit potentieller

Anwendung in der Biofabrikation

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Möglichkeiten für Materialien aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen als Wirkstoffträger erweitert. Dafür wurden in Teilarbeit IV zwei Systeme zur kovalenten Bindung und dadurch kontrollierten Freisetzung von Substanzen an genetisch und chemisch modifizierte Spinnenseidenproteine etabliert. Zum einen wurden die Varianten *ntag^{cys}-eADF4(C16)* und *ntag^{cys}-eADF4(κ 16)* verwendet, welche beide einen Cystein-Rest und damit eine Sulfhydrylgruppe in der Sequenz enthalten. An diese funktionale Gruppe konnte im reduzierten Zustand die Modellsubstanz „Ellman-Reagenz“ (DTNB, 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure), beziehungsweise jeweils ein halbes Molekül davon (TNB, 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure), über Disulfidbrücken gebunden werden. Durch anschließende Zugabe des Reduktionsmittels Glutathion (GSH) konnte TNB⁻ (2-nitro-5-Thiobenzoat) freigesetzt werden, welches anschließend im neutralen und basischen Milieu zum Dianion deprotoniert. Für das pH-sensitive System wurden die Carboxylgruppen des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) durch Reaktion mit Hydrazin mit Hydrazon-Linkern ausgestattet. An diesen konnte in der vorliegenden Arbeit der Modellwirkstoff „Ehrlichs Reagenz“ (DMAB, *p*-Dimethylaminobenzaldehyd) über dessen Aldehydgruppe reversibel kovalent gebunden werden. Senkung des pH-Wertes führte zur Freisetzung der Substanz (Teilarbeit IV Scheme 1).

Zur Etablierung der Systeme wurden zunächst Partikel und Filme aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen gewählt. Die Effizienz der Kopplungen wurde jeweils sowohl für beide Morphologien als auch für die Proteine im ungefalteten Zustand in Lösung mit anschließender Prozessierung ermittelt. Im Falle des redox-sensitiven Systems konnte die theoretisch maximale Menge von einem Molekül Modellwirkstoff pro einem Proteinmolekül am besten durch Kopplung in Lösung angenähert werden ($0,717 \pm 0,028$ Mol/Mol *ntag^{cys}-eADF4(C16)* und $0,693 \pm 0,033$ Mol/Mol *ntag^{cys}-eADF4(κ 16)*). Für das pH-sensitive System trägt eADF4(C16) theoretisch 17 Carboxylgruppen zur Modifikation mit Hydrazon-Linkern und Kopplung des Modellwirkstoffes. In der vorliegenden Arbeit konnte im besten Fall durch Kopplung an bereits gefällte Partikel eine Menge von $2,026 \pm 0,051$ Mol/Mol eADF4(C16) erreicht werden. Obwohl verglichen mit dem redox-sensitiven System mehr Moleküle des Modellwirkstoffes gebunden werden konnten, besteht in diesem System die Option zur Optimierung der Funktionalisierung und Wirkstoffbindung, um die absolute Menge an Wirkstoffbeladung zu erhöhen. Zur Kontrolle der spezifischen Kopplung wurde jeweils auch nicht mit Hydrazin funktionalisiertes Protein in den unterschiedlichen Morphologien zur Kopplung angesetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass es weder an Protein in Lösung ($0,077 \pm 0,014$ Mol/Mol eADF4(C16)) noch an Partikeln ($0,067 \pm 0,019$ Mol/Mol eADF4(C16)) zu

signifikanter unspezifischer Bindung/Assoziation kommt. Auffällig war die deutlich höhere unspezifische Bindung an Filmen ($0,367 \pm 0,049$ Mol/Mol eADF4(C16)), verglichen mit der Menge gemessen nach Reaktion mit aus Hydrazin funktionalisiertem Protein bestehenden Filmen ($1,482 \pm 0,115$ Mol/Mol eADF4(C16)).

Für das redox-sensitive System konnte in [Teilarbeit IV](#) die vollständige Freisetzung des Modellwirkstoffes von Partikeln und Filmen durch geeignete Bedingungen (5 mM GSH) innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden gezeigt werden. Zusätzlich zu dieser intrazellulären Konzentration des Reduktionsmittels wurden die extrazelluläre Konzentration (5 μ M) und nicht-reduzierende Bedingungen (0 M) getestet. Während es unter extrazellulären Bedingungen zu einer geringen Freisetzung kam, war die Bindung in Abwesenheit des Reduktionsmittels für den gemessenen Zeitraum stabil. Die Freisetzung konnte in beiden Fällen für beide Proteinvarianten und Morphologien durch spätere Zugabe von Glutathion ausgelöst werden ([Teilarbeit IV Figure 2](#)).

Im Gegensatz zur zügigen Freisetzung im redox-sensitiven System konnte für das pH-sensitive System in der vorliegenden Arbeit eine länger anhaltende Freisetzung des Modellwirkstoffes DMAB gezeigt werden ([Abbildung 20](#)). Bei dem hier verwendeten statischen System zur Messung der Freisetzung wird das Material für bestimmte Zeitspannen in jeweils neuen Puffern inkubiert. Dabei stellt sich jedes Mal ein Gleichgewicht zwischen am Material gebundener Substanz und freier Substanz im Überstand ein. Durch die gewählten Zeitabschnitte und das Verhältnis zwischen Material und Puffervolumen können dementsprechend die Geschwindigkeit der Freisetzung beziehungsweise der Kurvenverlauf beeinflusst werden. Um diesen Einfluss möglichst gering zu halten, wurde zunächst der Zeitrahmen der Gleichgewichtseinstellung ohne Austausch des Puffers betrachtet. Für das gewählte System dauerte die Freisetzung von Filmen in den ersten acht Stunden an und stieg danach nicht weiter. Von Partikeln wurde innerhalb von 24 Stunden stetig mehr Modellwirkstoff in den Puffer freigesetzt ([Abbildung 20A](#)). Um möglichst ein dynamisches System zu simulieren, wurden für die anschließenden Messungen der Freisetzung gemeinsame Intervalle von vier Stunden gewählt. Wie bereits für nicht-kovalente Wirkstofffreisetzungssysteme gezeigt, konnte auch hier die Geschwindigkeit der Freisetzung durch den gewählten Puffer beeinflusst werden. Mit sinkendem pH-Wert kam es zur schnelleren Freisetzung. Beim niedrigsten pH-Wert (pH 4) kam es zur höchsten Freisetzung während der gesamten Messung. Obwohl nach 48 Stunden lediglich 50 % der ursprünglich gebundenen Menge an Substanz im Überstand quantifiziert wurde, erreichte die Kurve hier die Sättigung. Anschließende Bestimmung des am Träger zurückbleibenden Wirkstoffes (1% der zu beginnt gekoppelten Menge) bestätigte die vollständige Freisetzung ([Teilarbeit IV Table S1](#)). Der teilweise Verlust des Wirkstoffes ist in diesem Fall auf Verlust von Partikeln während der Durchführung des Experimentes zurückzuführen. Durch das kovalente System konnte in

dieser Arbeit zum ersten Mal eine stabile, anhaltende Wirkstoffbindung an eADF4(C16) gezeigt werden. Unter physiologischen Bedingungen bei pH 7,4 kam es innerhalb von 36 Stunden zu keiner Freisetzung des Modellwirkstoffes. Die Stabilität konnte durch Auslösen der Freisetzung durch Austausch des Puffers (von pH 7,4 zu pH 4) zu diesem späten Zeitpunkt bestätigt werden (Abbildung 20B). Auch von Filmen konnte vergleichbar pH-abhängig der Modellwirkstoff freigesetzt werden. Im Gegensatz zur Betrachtung der Partikel erreichte hier die Kurve nach 48 Stunden noch nicht die Sättigung. Nach Beenden der Messung konnte noch 10% gebundene Substanz am Träger aus rekombinanter Spinnenseide nachgewiesen werden (Teilarbeit IV Table S1). Die zwar geringe, jedoch stetige Freisetzung vom Kontrollfilm aus nicht mit Hydrazin funktionalisiertem Protein, bestätigte den zuvor angesprochenen Anteil an nicht spezifisch gebundenem Modellwirkstoff (Abbildung 20C).

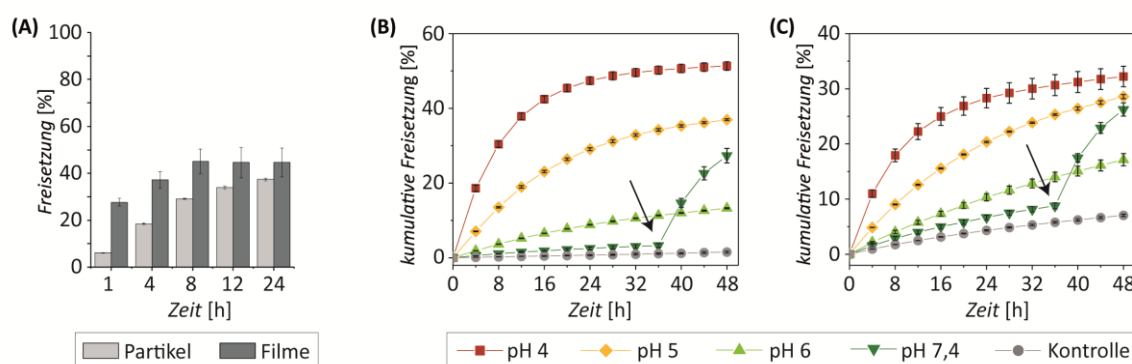


Abbildung 20. pH-sensitive Freisetzung des Modellwirkstoffes DMAB (*p*-Dimethylamino-benzaldehyd) nach kovalenter Bindung an Partikel und Filme aus eADF4(C16). A) Die Dauer der Gleichgewichtseinstellung zwischen gebundenem und freigesetztem DMAB wurde im gewählten System (1 mg Partikel in 1 ml Freisetzungspuffer) über 24 Stunden gemessen. Freisetzung von B) Partikeln und C) Filmen bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 7,4, pH 6, pH 5 und pH 4) wurde über 48 Stunden gemessen. Proben, welche zuvor bei pH 7,4 inkubiert waren, wurden nach 36 Stunden und zu den darauffolgenden Zeitpunkten in pH 4 inkubiert (durch Pfeile gekennzeichnet). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Herold, H., Döbl, A., Wohlrab, S., Humenik, M., und Scheibel T., Designed Spider Silk-Based Drug Carrier for Redox- or pH-Triggered Drug Release, *Biomacromolecules* (2020) 21 (12), 4904-4912. Copyright (2021) American Chemical Society.

Beide mit Modellwirkstoffen charakterisierte und etablierte Systeme (redox- und pH-sensitiv) konnten in der vorliegenden Arbeit anschließend auf zytostatisch aktive, für die Krebstherapie relevante Wirkstoffe übertragen werden. Dafür wurde 6-Mercaptopurin über dessen Sulfhydrylgruppe durch Disulfidbrücken reversible an Partikel aus *ntag^{cys}*-eADF4(κ 16) und Doxorubicin über dessen Ketogruppe an Partikel aus mit Hydrazin funktionalisiertem eADF4(C16) gebunden. In beiden Fällen konnte die Funktionalität der Systeme, also die Stabilität der Bindungen bei physiologischen Bedingungen mit kontrollierter Auslösung der Freisetzung durch Pufferwechsel, bestätigt werden (Abbildung 21). Für diese Experimente wurden beide Kopplungen an bereits gefällten Partikeln vorgenommen, was die vergleichsweise geringe Freisetzung von 6-Mercaptopurin aus *ntag^{cys}*-eADF4(κ 16)-Partikeln

erklärt. Die Menge an gekoppeltem Wirkstoff könnte durch Optimierung, wie zuvor für die Modellschubstanz gezeigt, durch Reaktion in Lösung erhöht werden.

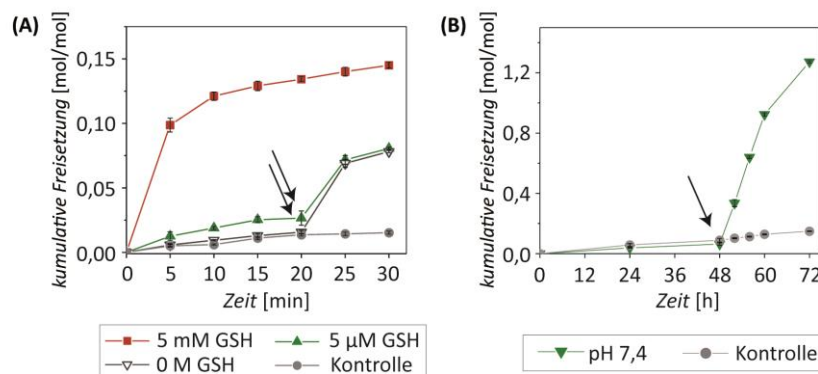


Abbildung 21. Kontrollierte Freisetzung von zytostatischen Wirkstoffen aus Partikeln aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen. A) 6-Mercaptopurin wurde kovalent und redox-sensitiv an *ntag^{cys}*-eADF4(κ 16)-Partikel gekoppelt und durch Reduktion freigesetzt. B) Doxorubicin wurde kovalent und pH-sensitiv an Partikel aus mit Hydrazin-funktionalisiertem eADF4(C16) gekoppelt und durch Erniedrigung des pH-Wertes freigesetzt. Pufferwechsel von physiologischen zu freisetzenden Bedingungen zeigen die Funktionalität der Systeme (durch Pfeile gekennzeichnet). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Herold, H., Döbl, A., Wohlrab, S., Humenik, M., und Scheibel T., Designed Spider Silk-Based Drug Carrier for Redox- or pH-Triggered Drug Release, *Biomacromolecules* (2020) 21 (12), 4904-4912. Copyright (2021) American Chemical Society.

In Teilarbeit IV wurde außerdem die Anwendbarkeit der an rekombinanter Spinnenseide neu etablierten Systeme in Kontakt mit Zellen gezeigt. Für die aus eADF4(C16) bestehenden Partikel musste dafür zunächst ausreichende Interaktion mit den Zellen sichergestellt werden. Für eADF4(κ 16)-Partikel wurde bereits eine aufgrund der positiven Ladung ausreichende Zellaufnahme publiziert.¹⁵⁴ Um dies ebenfalls für Partikel aus dem negativ geladenem eADF4(C16) zu erreichen, wurden diese in der vorliegenden Arbeit mit der Variante eADF4(C16)-RGD beschichtet. Diese Methode wurde zuvor bereits verwendet, um Partikel mit Schichten aus unterschiedlich geladenen Proteinen für Wirkstoffsysteme zu generieren.¹⁵¹ Die Aufnahme dieser so hergestellten Partikel in humane Zellen (HeLa Zelllinie) konnte durch zusätzliche dauerhafte Fluoreszenzmarkierung über einen NHS-Ester (N-Hydroxysuccinimid-Ester) mit Fluorescein gezeigt werden. Nach 24 Stunden gemeinsamer Inkubation mit anschließender Fixierung und Fluoreszenzmarkierung der Zellen konnten Partikel sowohl außerhalb als auch innerhalb der Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 22A). Um das pH-sensitive Wirkstoffsystem zu testen, wurden Partikel aus eADF4(C16) zur Detektion permanent mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin markiert (NHS-Ester). Über den zuvor am Protein angebrachten Hydrazon-Linker wurde außerdem das grün fluoreszierende Molekül 6-Carboxyfluorescein als Modelwirkstoff reversibel gekoppelt. Nach Beschichtung der Partikel mit eADF4(C16)-RGD wurden diese zusammen mit HeLa Zellen inkubiert und in Echtzeit mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Abbildung 22B). Zunächst ergab sich für

die Partikel aufgrund der Überlagerung beider Farbstoffe ein gelbes Fluoreszenzsignal. Nach 16 Stunden in Kultur konnte gezeigt werden, dass sich das Signal der in Zellen aufgenommenen Partikel deutlich hin zu roter Färbung ändert. Dies zeigte die Freisetzung des grün fluoreszierenden Modellwirkstoffes innerhalb der Zellen. Partikel, die nicht aufgenommen wurden, behielten ihre ursprüngliche Färbung, womit die Stabilität der pH-sensitiven Bindung außerhalb der Zellen gezeigt werden konnte. In einem parallelen Experiment mit redox-sensitiven Partikeln konnte deren Funktionalität ebenfalls gezeigt werden (Teilarbeit IV Figure 4).

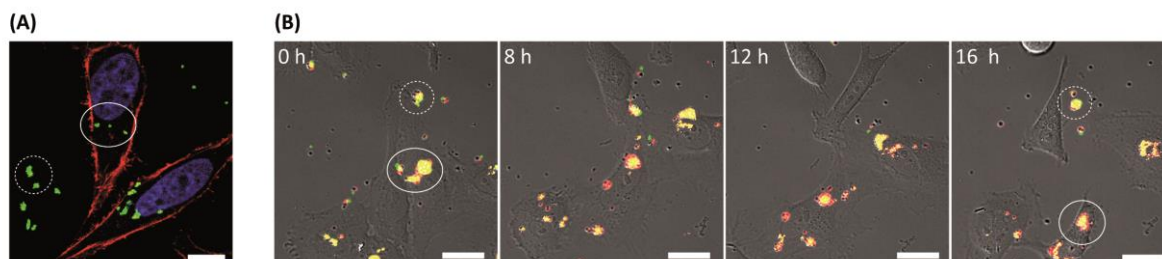


Abbildung 22. Intrazelluläre pH-sensitive Freisetzung von 6-Carboxyfluorescein nach Aufnahme von Partikeln in HeLa Zellen. A) Durch Beschichtung von eADF4(C16)-Partikeln mit eADF4(C16)-RGD wurde deren Zellaufnahme induziert (rot: Aktinfilamente der Zellen, mit Phalloidin-Rhodamine gefärbt; blau: Zellkerne, mit DAPI gefärbt; grün, eADF4(C16)-Partikel, mit NHS-Fluorescein gefärbt). B) Freisetzung von über den Hydrazon-Linker gekoppeltem 6-Carboxyfluorescein (grün) aus mit NHS-Rhodamine dauerhaft markierten (rot) eADF4(C16)-Partikeln nach Aufnahme in HeLa Zellen über 16 Stunden. Gekennzeichnet ist jeweils ein Beispiel für intrazelluläre (durchgezogene Linie) und extrazelluläre (unterbrochene Linie) Partikel. Maßstabsbalken: 25 μm . Nachdruck mit freundlicher Genehmigung des Verlags. Modifiziert nach Herold, H., Döbl, A., Wohlrab, S., Humenik, M., und Scheibel T., Designed Spider Silk-Based Drug Carrier for Redox- or pH-Triggered Drug Release, *Biomacromolecules* (2020) 21 (12), 4904-4912. Copyright (2021) American Chemical Society.

Die in Teilarbeit IV etablierten kovalenten Wirkstoffsysteme bilden die Grundlage für eine Vielzahl an Anwendungen. Speziell das pH-sensitive System, welches sich durch lange Stabilität der Bindung und langsamer, anhaltender Freisetzung auszeichnet, stellt einen Vorteil gegenüber nicht-kovalenten Systemen dar. Filme aus entsprechend funktionalisiertem rekombinanten Spinnenseidenprotein könnten als Beschichtungen, beispielsweise von Medizinprodukten, Anwendung finden. Partikel könnten zusätzlich durch genetische Modifikation an eADF4(C16) mit Liganden zum gezielten Transport in bestimmte Gewebe/Zellen ausgestattet werden und so zum Beispiel in der Chemotherapie eingesetzt werden. Neben der Anwendung als Wirkstoffsysteme in der therapeutischen Medizin ergeben sich auch Möglichkeiten für den Einsatz in der regenerativen Forschung. Wirkstoffe und Signalmoleküle könnten mittels Filmen oder Partikel während der Biofabrikation zur Unterstützung und Steuerung von zellulären Prozessen eingebracht werden. Im Fall von Biotinten könnten beispielsweise nicht nur Zellen, sondern auch beladene Partikel in Hydrogele aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen eingebracht werden. Außerdem könnten die Wirkstoffe direkt an das Protein, welches das Hydrogel bildet, gekoppelt werden.

4. Literaturverzeichnis

- 1 Langer, R., and Vacanti, J., Tissue engineering, *Science* **1993** (260), p: 920-926
- 2 Hoffman, T., Khademhosseini, A., and Langer, R., Chasing the paradigm: clinical translation of 25 years of tissue engineering, *Tissue Eng. Part A* **2019** (25), p: 679-687
- 3 Atala, A., Tissue engineering of artificial organs, *J. Endourol.* **2000** (14), p: 49-57
- 4 Cima, L., Vacanti, J., Vacanti, C., Ingber, D., Mooney, D., and Langer, R., Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates, *J Biomech Eng.* **1991** (113), p: 143-151
- 5 Eltom, A., Zhong, G., and Muhammad, A., Scaffold techniques and designs in tissue engineering functions and purposes: a review, *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2019** (2019), p: 3429527
- 6 Jensen, G., Morrill, C., and Huang, Y., 3D tissue engineering, an emerging technique for pharmaceutical research, *Acta Pharm. Sin. B.* **2018** (8), p: 756-766
- 7 Caddeo, S., Boffito, M., and Sartori, S., Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological in vitro tissue models, *Front. Bioeng. Biotechnol* **2017** (5), p: 40
- 8 Polak, J. M., and Bishop, A. E., Stem cells and tissue engineering: past, present, and future, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006** (1068), p: 352-366
- 9 Bianco, P., and Robey, P. G., Stem cells in tissue engineering, *Nature* **2001** (414), p: 118-121
- 10 Mao, A. S., and Mooney, D. J., Regenerative medicine: Current therapies and future directions, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015** (112), p: 14452-14459
- 11 Ramos, T., and Moroni, L., Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2019: The Role of Biofabrication—A Year in Review, *Tissue Eng. Part C Methods* **2020** (26), p: 91-106
- 12 Nichol, J. W., and Khademhosseini, A., Modular tissue engineering: engineering biological tissues from the bottom up, *Soft Matter* **2009** (5), p: 1312-1319
- 13 Chen, P., Zhou, Z., Liu, W., Zhao, Y., Huang, T., Li, X., Duan, J., and Fang, J., Preparation and Characterization of Poly(L-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone) Scaffolds by Thermally Induced Phase Separation, *J Macromol Sci Phys* **2020** (59), p: 427-439
- 14 Januariyasa, I. K., and Yusuf, Y., Porous carbonated hydroxyapatite-based scaffold using simple gas foaming method, *J. Asian Ceram. Soc.* **2020** (8), p: 1-8
- 15 Judawisastra, H., Nugraha, F. R., and Wibowo, U. A., Porous Architecture Evaluation of Silk Fibroin Scaffold from Direct Dissolution Salt Leaching Method, *Macromol. Symp.* **2020** (391), p: 1900187
- 16 Khoramgah, M. S., Ranjbari, J., Abbaszadeh, H.-A., Tabatabaei Mirakabad, F. S., Hatami, S., Hosseinzadeh, S., and Ghanbarian, H., Freeze-dried multiscale porous nanofibrous three dimensional scaffolds for bone regenerations, *Bioimpacts* **2020** (10), p: 73-85
- 17 Moreno Madrid, A. P., Vrech, S. M., Sanchez, M. A., and Rodriguez, A. P., Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C* **2019** (100), p: 631-644
- 18 Gaspar, V. M., Lavrador, P., Borges, J., Oliveira, M. B., and Mano, J. F., Advanced Bottom-Up Engineering of Living Architectures, *Adv. Mater.* **2020** (32), p: 1903975
- 19 Elbert, D. L., Bottom-up tissue engineering, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011** (22), p: 674-680
- 20 Chuah, Y. J., Tan, J. R., Wu, Y., Lim, C. S., Hee, H. T., Kang, Y., and Wang, D.-A., Scaffold-Free tissue engineering with aligned bone marrow stromal cell sheets to recapitulate the microstructural and biochemical composition of annulus fibrosus, *Acta Biomater.* **2020** (107), p: 129-137
- 21 Silva, A. S., Santos, L. F., Mendes, M. C., and Mano, J. F., Multi-layer pre-vascularized magnetic cell sheets for bone regeneration, *Biomaterials* **2020** (231), p: 119664

- 22 Decarli, M. C., do Amaral, R. L. F., Dos Santos, D. P., Tofani, L. B., Katayama, E., Rezende, R. A., da Silva, J. V. L., Swiech, K., Suazo, C. A. T., and Mota, C., Cell spheroids as a versatile research platform: formation mechanisms, high throughput production, characterization and applications, *Biofabrication* **2021** (13), p: 032002
- 23 Shao, C., Chi, J., Zhang, H., Fan, Q., Zhao, Y., and Ye, F., Development of cell spheroids by advanced technologies, *Adv. Mater. Technol.* **2020** (5), p: 2000183
- 24 Visser, J., Peters, B., Burger, T. J., Boomstra, J., Dhert, W. J., Melchels, F. P., and Malda, J., Biofabrication of multi-material anatomically shaped tissue constructs, *Biofabrication* **2013** (5), p: 035007
- 25 Ahmad, T., Shin, H. J., Lee, J., Shin, Y. M., Perikamana, S. K. M., Park, S. Y., Jung, H. S., and Shin, H., Fabrication of in vitro 3D mineralized tissue by fusion of composite spheroids incorporating biomineral-coated nanofibers and human adipose-derived stem cells, *Acta Biomater.* **2018** (74), p: 464-477
- 26 Kim, S. j., Kim, E. M., Yamamoto, M., Park, H., and Shin, H., Engineering multi-cellular spheroids for tissue engineering and regenerative medicine, *Adv. Healthc. Mater.* **2020** (9), p: 2000608
- 27 Groll, J., Boland, T., Blunk, T., Burdick, J. A., Cho, D.-W., Dalton, P. D., Derby, B., Forgacs, G., Li, Q., Mironov, V. A., Moroni, L., Nakamura, M., Shu, W., Takeuchi, S., Vozzi, G., Woodfield, T. B. F., Xu, T., Yoo, J. J., and Malda, J., Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field, *Biofabrication* **2016** (8), p: 013001
- 28 Moroni, L., Boland, T., Burdick, J. A., De Maria, C., Derby, B., Forgacs, G., Groll, J., Li, Q., Malda, J., Mironov, V. A., Mota, C., Nakamura, M., Shu, W., Takeuchi, S., Woodfield, T. B. F., Xu, T., Yoo, J. J., and Vozzi, G., Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology, *Trends Biotechnol.* **2018** (36), p: 384-402
- 29 Groll, J., Burdick, J. A., Cho, D.-W., Derby, B., Gelinsky, M., Heilshorn, S. C., Juengst, T., Malda, J., Mironov, V. A., and Nakayama, K., A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks, *Biofabrication* **2018** (11), p: 013001
- 30 Li, J., Wu, C., Chu, P. K., and Gelinsky, M., 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2020** (140), p: 100543
- 31 Jungst, T., Smolan, W., Schacht, K., Scheibel, T., and Groll, J., Strategies and molecular design criteria for 3D printable hydrogels, *Chem. Rev.* **2016** (116), p: 1496-1539
- 32 dos Santos, V., Brandalise, R. N., and Savaris, M. in *Engineering of Biomaterials* 5-15 (Springer, 2017).
- 33 Salmerón-Sánchez, M., and Altankov, G. in *Tissue Eng.* 077-103 (InTech, 2010).
- 34 Qu, M., Jiang, X., Zhou, X., Wang, C., Wu, Q., Ren, L., Zhu, J., Zhu, S., Tebon, P., Sun, W., and Khademhosseini, A., Stimuli-Responsive Delivery of Growth Factors for Tissue Engineering, *Adv. Healthc. Mater.* **2020** (9), p: 1901714
- 35 Harley, W. S., Li, C. C., Toombs, J., O'Connell, C. D., Taylor, H. K., Heath, D. E., and Collins, D. J., Advances in biofabrication techniques towards functional bioprinted heterogeneous engineered tissues: A comprehensive review, *Bioprinting* **2021** p: e00147
- 36 Fu, Z., Naghieh, S., Xu, C., Wang, C., Sun, W., and Chen, X., Printability in extrusion bioprinting, *Biofabrication* **2021** (13), p: 033001
- 37 Li, X., Liu, B., Pei, B., Chen, J., Zhou, D., Peng, J., Zhang, X., Jia, W., and Xu, T., Inkjet bioprinting of biomaterials, *Chem. Rev.* **2020** (120), p: 10793-10833
- 38 Kumar, P., Ebbens, S., and Zhao, X., Inkjet printing of mammalian cells—Theory and applications, *Bioprinting* **2021** p: e00157
- 39 Ng, W. L., Lee, J. M., Yeong, W. Y., and Naing, M. W., Microvalve-based bioprinting—process, bio-inks and applications, *Biomater. Sci.* **2017** (5), p: 632-647
- 40 Song, Y., Yang, Z., Liu, Y., and Deng, J., Function representation based slicer for 3D printing, *Computer Aided Geometric Design* **2018** (62), p: 276-293
- 41 Sun, W., Starly, B., Daly, A. C., Burdick, J. A., Groll, J., Skeldon, G., Shu, W., Sakai, Y., Shinohara, M., and Nishikawa, M., The bioprinting roadmap, *Biofabrication* **2020** (12), p: 022002

- 42 Hölzl, K., Lin, S., Tytgat, L., Van Vlierberghe, S., Gu, L., and Ovsianikov, A., Bioink properties before, during and after 3D bioprinting, *Biofabrication* **2016** (8), p: 032002
- 43 Benwood, C., Chrenek, J., Kirsch, R. L., Masri, N. Z., Richards, H., Teetzen, K., and Willerth, S. M., Natural Biomaterials and Their Use as Bioinks for Printing Tissues, *Bioeng.* **2021** (8), p: 27
- 44 Madduma-Bandarage, U. S., and Madihally, S. V., Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications, *J. Appl. Polym. Sci.* **2021** (138), p: 50376
- 45 Liu, F., Li, W., Liu, H., Yuan, T., Yang, Y., Zhou, W., Hu, Y., and Yang, Z., Preparation of 3D Printed Chitosan/Polyvinyl Alcohol Double Network Hydrogel Scaffolds, *Macromol. Biosci.* **2021** (21), p: 2000398
- 46 Shamloo, A., Aghababaie, Z., Afjoul, H., Jami, M., Bidgoli, M. R., Vossoughi, M., Ramazani, A., and Kamyabhesari, K., Fabrication and evaluation of chitosan/gelatin/PVA hydrogel incorporating honey for wound healing applications: An in vitro, in vivo study, *Int. J. Pharm.* **2021** (592), p: 120068
- 47 Kaith, B. S., Singh, A., Sharma, A. K., and Sud, D., Hydrogels: Synthesis, Classification, Properties and Potential Applications—A Brief Review, *J. Polym. Environ.* **2021** p: 1-15
- 48 Gopinathan, J., and Noh, I., Recent trends in bioinks for 3D printing, *Biomater. Res.* **2018** (22), p: 1-15
- 49 Zhang, Z., Jin, Y., Yin, J., Xu, C., Xiong, R., Christensen, K., Ringeisen, B. R., Chrisey, D. B., and Huang, Y., Evaluation of bioink printability for bioprinting applications, *Appl. Phys. Rev.* **2018** (5), p: 041304
- 50 Mezger, T. G. The Rheology Handbook. 4th edn, (*Vincentz Network*, **2014**)
- 51 Hazur, J., Detsch, R., Karakaya, E., Kaschta, J., Teßmar, J., Schneidereit, D., Friedrich, O., Schubert, D. W., and Boccaccini, A. R., Improving alginate printability for biofabrication: Establishment of a universal and homogeneous pre-crosslinking technique, *Biofabrication* **2020** (12), p: 045004
- 52 Ouyang, L., Highley, C. B., Sun, W., and Burdick, J. A., A generalizable strategy for the 3D bioprinting of hydrogels from nonviscous photo-crosslinkable inks, *Adv. Mater.* **2017** (29), p: 1604983
- 53 Schwab, A., Levato, R., D'Este, M., Piluso, S., Eglin, D., and Malda, J., Printability and shape fidelity of bioinks in 3D bioprinting, *Chem. Rev.* **2020** (120), p: 11028-11055
- 54 Cooke, M. E., and Rosenzweig, D. H., The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting, *APL Bioeng.* **2021** (5), p: 011502
- 55 Gómez-Blanco, J. C., Mancha-Sánchez, E., Marcos, A. C., Matamoros, M., Díaz-Parralejo, A., and Pagador, J. B., Bioink temperature influence on shear stress, pressure and velocity using computational simulation, *Processes* **2020** (8), p: 865
- 56 Li, M., Tian, X., Schreyer, D. J., and Chen, X., Effect of needle geometry on flow rate and cell damage in the dispensing-based biofabrication process, *Biotechnol. Prog.* **2011** (27), p: 1777-1784
- 57 Paxton, N., Smolan, W., Böck, T., Melchels, F., Groll, J., and Jungst, T., Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability, *Biofabrication* **2017** (9), p: 044107
- 58 Ribeiro, A., Blokzijl, M. M., Levato, R., Visser, C. W., Castilho, M., Hennink, W. E., Vermonden, T., and Malda, J., Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting, *Biofabrication* **2017** (10), p: 014102
- 59 Lee, S. C., Gillispie, G., Prim, P., and Lee, S. J., Physical and chemical factors influencing the printability of hydrogel-based extrusion bioinks, *Chem. Rev.* **2020** (120), p: 10834-10886
- 60 Lucas, L., Aravind, A., Emma, P., Christophe, M., and Edwin-Joffrey, C., Rheology, simulation and data analysis toward bioprinting cell viability awareness, *Bioprinting* **2021** (21), p: e00119
- 61 Ouyang, L., Yao, R., Zhao, Y., and Sun, W., Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells, *Biofabrication* **2016** (8), p: 035020

- 62 Diamantides, N., Dugopolski, C., Blahut, E., Kennedy, S., and Bonassar, L. J., High density cell seeding affects the rheology and printability of collagen bioinks, *Biofabrication* **2019** (11), p: 045016
- 63 Gillispie, G. J., Han, A., Uzun-Per, M., Fisher, J., Mikos, A. G., Niazi, M. K. K., Yoo, J. J., Lee, S. J., and Atala, A., The Influence of Printing Parameters and Cell Density on Bioink Printing Outcomes, *Tissue Eng. Part A* **2020** (26), p: 1349-1358
- 64 Levato, R., Jungst, T., Scheuring, R. G., Blunk, T., Groll, J., and Malda, J., From Shape to Function: The Next Step in Bioprinting, *Adv. Mater.* **2020** (32), p: 1906423
- 65 Vargason, A. M., Anselmo, A. C., and Mitragotri, S., The evolution of commercial drug delivery technologies, *Nat. Biomed. Eng.* **2021** p: 1-17
- 66 Ruiz-Garcia, A., Bermejo, M., Moss, A., and Casabo, V. G., Pharmacokinetics in drug discovery, *J. Pharm. Sci.* **2008** (97), p: 654-690
- 67 Hussan, S. D., Santanu, R., Verma, P., and Bhandari, V., A review on recent advances of enteric coating, *IOSR J. Pharm.* **2012** (2), p: 05-11
- 68 Cole, E. T., Scott, R. A., Connor, A. L., Wilding, I. R., Petereit, H.-U., Schminke, C., Beckert, T., and Cadé, D., Enteric coated HPMC capsules designed to achieve intestinal targeting, *Int. J. Pharm.* **2002** (231), p: 83-95
- 69 Narayani, R., and Panduranga Rao, K., Polymer-coated gelatin capsules as oral delivery devices and their gastrointestinal tract behaviour in humans, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1996** (7), p: 39-48
- 70 Leader, B., Baca, Q. J., and Golan, D. E., Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008** (7), p: 21-39
- 71 Carter, P. J., Potent antibody therapeutics by design, *Nat. Rev. Immunol.* **2006** (6), p: 343-357
- 72 Opalinska, J. B., and Gewirtz, A. M., Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002** (1), p: 503-514
- 73 Harris, J. M., and Chess, R. B., Effect of pegylation on pharmaceuticals, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003** (2), p: 214-221
- 74 Yadav, D., and Dewangan, H. K., PEGYLATION: an important approach for novel drug delivery system, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2021** (32), p: 266-280
- 75 Taniguchi, C., Kawabata, Y., Wada, K., Yamada, S., and Onoue, S., Microenvironmental pH-modification to improve dissolution behavior and oral absorption for drugs with pH-dependent solubility, *Expert Opin Drug Deliv* **2014** (11), p: 505-516
- 76 Lu, Z.-R., and Qiao, P., Drug delivery in cancer therapy, quo vadis?, *Mol. Pharm.* **2018** (15), p: 3603-3616
- 77 Li, C., Wang, J., Wang, Y., Gao, H., Wei, G., Huang, Y., Yu, H., Gan, Y., Wang, Y., and Mei, L., Recent progress in drug delivery, *Acta Pharm. Sin. B.* **2019** (9), p: 1145-1162
- 78 Sartini, F., Menchini, M., Posarelli, C., Casini, G., and Figus, M., In Vivo Efficacy of Contact Lens Drug-Delivery Systems in Glaucoma Management. A Systematic Review, *Appl. Sci.* **2021** (11), p: 724
- 79 Ahsan, A., Tian, W.-X., Farooq, M. A., and Khan, D. H., An overview of hydrogels and their role in transdermal drug delivery, *Int. J. Polym. Mater.* **2021** (70), p: 574-584
- 80 Jayakrishnapillai, P., Nair, S. V., and Kamalasanan, K., Current trend in drug delivery considerations for subcutaneous insulin depots to treat diabetes, *Colloids Surf. B* **2017** (153), p: 123-131
- 81 Brudno, Y., and Mooney, D. J., On-demand drug delivery from local depots, *J Control Release* **2015** (219), p: 8-17
- 82 Jain, P. K., Karunakaran, D., and Friedman, S. H., Construction of a photoactivated insulin depot, *Angew. Chem.* **2013** (125), p: 1444-1449
- 83 Su, V., and Wei, L. in *AIP Conf Proc.* 020032 (AIP Publishing LLC).
- 84 Vasir, J. K., and Labhasetwar, V., Targeted drug delivery in cancer therapy, *Technol. Cancer Res. Treat.* **2005** (4), p: 363-374
- 85 Kumari, P., Ghosh, B., and Biswas, S., Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery, *J. Drug Target.* **2016** (24), p: 179-191

- 86 Anselmo, A. C., and Mitragotri, S., Nanoparticles in the clinic: An update, *Bioeng. Transl. Med.* **2019** (4), p: e10143
- 87 Subhan, M. A., Yalamarty, S. S. K., Filipczak, N., Parveen, F., and Torchilin, V. P., Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment, *J. Pers. Med.* **2021** (11), p: 571
- 88 Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., and Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J Control Release* **2000** (65), p: 271-284
- 89 Maeda, H., Sawa, T., and Konno, T., Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS, *J Control Release* **2001** (74), p: 47-61
- 90 Maeda, H., The 35th Anniversary of the Discovery of EPR Effect: A New Wave of Nanomedicines for Tumor-Targeted Drug Delivery—Personal Remarks and Future Prospects, *J. Pers. Med.* **2021** (11), p: 229
- 91 Reineke, J., Terminology matters: there is no targeting, but retention, *J Control Release* **2018** (273), p: 180-183
- 92 Kunjiappan, S., Pavadai, P., Vellaichamy, S., Ram Kumar Pandian, S., Ravishankar, V., Palanisamy, P., Govindaraj, S., Srinivasan, G., Premanand, A., and Sankaranarayanan, M., Surface receptor-mediated targeted drug delivery systems for enhanced cancer treatment: A state-of-the-art review, *Drug Dev. Res.* **2021** (82), p: 309-340
- 93 Raj, S., Khurana, S., Choudhari, R., Kesari, K. K., Kamal, M. A., Garg, N., Ruokolainen, J., Das, B. C., and Kumar, D. in *Seminars in cancer biology*. 166-177 (Elsevier).
- 94 Siwowska, K., Schmid, R. M., Cohrs, S., Schibli, R., and Müller, C., Folate receptor-positive gynecological cancer cells: In vitro and in vivo characterization, *Pharmaceuticals* **2017** (10), p: 72
- 95 Ehsanimehr, S., Moghadam, P. N., Dehaen, W., and Shafiei-Irannejad, V., Synthesis of pH-sensitive nanocarriers based on polyacrylamide grafted nanocrystalline cellulose for targeted drug delivery to folate receptor in breast cancer cells, *Eur. Polym. J.* **2021** (150), p: 110398
- 96 Unnikrishnan, B., Sen, A., Preethi, G., Joseph, M. M., Maya, S., Shiji, R., Anusree, K., and Sreelekha, T., Folic acid-appended galactoxyloglucan-capped iron oxide nanoparticles as a biocompatible nanotheranostic agent for tumor-targeted delivery of doxorubicin, *Int. J. Biol. Macromol.* **2021** (168), p: 130-142
- 97 Manzari, M. T., Shamay, Y., Kiguchi, H., Rosen, N., Scaltriti, M., and Heller, D. A., Targeted drug delivery strategies for precision medicines, *Nat. Rev. Mater.* **2021** (6), p: 351-370
- 98 Su, C., Liu, Y., Li, R., Wu, W., Fawcett, J. P., and Gu, J., Absorption, distribution, metabolism and excretion of the biomaterials used in Nanocarrier drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019** (143), p: 97-114
- 99 Benoit, D. S., Overby, C. T., Sims Jr, K. R., and Ackun-Farmmer, M. A. in *Biomater. Sci.* 1237-1266 (Elsevier, 2020).
- 100 Bhatt, P., Trehan, S., Inamdar, N., Mourya, V. K., and Misra, A. in *Applications of Polymers in Drug Delivery* 1-42 (Elsevier, 2021).
- 101 Prajapati, S. K., Jain, A., Jain, A., and Jain, S., Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery, *Eur. Polym. J.* **2019** (120), p: 109191
- 102 Fenton, O. S., Olafson, K. N., Pillai, P. S., Mitchell, M. J., and Langer, R., Advances in biomaterials for drug delivery, *Adv. Mater.* **2018** (30), p: 1705328
- 103 Hoc, D., and Haznar-Garbacz, D., Foams as unique drug delivery systems, *Eur J Pharm Biopharm* **2021** (167), p: 73-82
- 104 Reddy, R. D. P., and Sharma, V., Additive manufacturing in drug delivery applications: A review, *Int. J. Pharm.* **2020** (589), p: 119820
- 105 Borandeh, S., van Bochove, B., Teotia, A., and Seppälä, J., Polymeric drug delivery systems by additive manufacturing, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021** (173), p: 349-373
- 106 Mohanraj, V., and Chen, Y., Nanoparticles-a review, *Trop. J. Pharm. Res.* **2006** (5), p: 561-573

- 107 Venditti, I., Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review, *J. King Saud Univ. Sci.* **2019** (31), p: 398-411
- 108 Tong, X., Pan, W., Su, T., Zhang, M., Dong, W., and Qi, X., Recent advances in natural polymer-based drug delivery systems, *React. Funct. Polym.* **2020** (148), p: 104501
- 109 Mane, S. R., Advances of Hydrazone linker in polymeric drug delivery, *Crit. Rev.* **2019** (6), p: 1-4
- 110 Xu, C., Xu, L., Han, R., Zhu, Y., and Zhang, J., Blood circulation stable doxorubicin prodrug nanoparticles containing hydrazone and thioketal moieties for antitumor chemotherapy, *Colloids Surf. B* **2021** (201), p: 111632
- 111 Sonawane, S. J., Kalhapure, R. S., and Govender, T., Hydrazone linkages in pH responsive drug delivery systems, *Eur J Pharm Sci* **2017** (99), p: 45-65
- 112 West, K. R., and Otto, S., Reversible covalent chemistry in drug delivery, *Curr. Drug Discov. Technol.* **2005** (2), p: 123-160
- 113 Xu, X., Duan, J., Lan, Q., Kuang, Y., Liao, T., Liu, Y., Xu, Z., Chen, J., Jiang, B., and Li, C., A dual-sensitive poly (amino acid)/hollow mesoporous silica nanoparticle-based anticancer drug delivery system with a rapid charge-reversal property, *J Drug Deliv Sci Technol* **2021** p: 102817
- 114 Monteiro, P. F., Travanut, A., Conte, C., and Alexander, C., Reduction-responsive polymers for drug delivery in cancer therapy—Is there anything new to discover?, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2021** (13), p: e1678
- 115 Mauri, E., Chincarini, G. M., Rigamonti, R., Magagnin, L., Sacchetti, A., and Rossi, F., Modulation of electrostatic interactions to improve controlled drug delivery from nanogels, *Mater. Sci. Eng. C* **2017** (72), p: 308-315
- 116 Nazaruk, E., Górecka, E., Osornio, Y. M., Landau, E. M., and Bilewicz, R., Charged additives modify drug release rates from lipidic cubic phase carriers by modulating electrostatic interactions, *J. Electroanal. Chem.* **2018** (819), p: 269-274
- 117 Rizwan, M., Yahya, R., Hassan, A., Yar, M., Azzahari, A. D., Selvanathan, V., Sonsudin, F., and Abouloula, C. N., pH sensitive hydrogels in drug delivery: Brief history, properties, swelling, and release mechanism, material selection and applications, *Polymers* **2017** (9), p: 137
- 118 Engineer, C., Parikh, J., and Raval, A., Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system, *Trends Biomater Artif Organs* **2011** (25), p: 79-85
- 119 Vroman, I., and Tighzert, L., Biodegradable polymers, *Materials* **2009** (2), p: 307-344
- 120 Jacob, S., Nair, A. B., Shah, J., Sreeharsha, N., Gupta, S., and Shinu, P., Emerging role of hydrogels in drug delivery systems, tissue engineering and wound management, *Pharmaceutics* **2021** (13), p: 357
- 121 Sun, Y., Nan, D., Jin, H., and Qu, X., Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications, *Polym. Test.* **2020** (81), p: 106283
- 122 Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., and Xu, X., Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery, *Oncol. Lett.* **2017** (14), p: 6999-7010
- 123 Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., and Noisa, P., Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling, *World J. Stem Cells* **2019** (11), p: 1065
- 124 Shi, W., Weng, D., and Niu, W., Nanoparticle drug delivery systems and three-dimensional cell cultures in cancer treatments and research, *Cancer Transl. Med.* **2016** (2), p: 154
- 125 Yao, T., and Asayama, Y., Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues, *Reprod. Med. Biol.* **2017** (16), p: 99-117
- 126 Ahrendt, G., Chickering, D. E., and Ranieri, J. P., Angiogenic growth factors: a review for tissue engineering, *Tissue Eng.* **1998** (4), p: 117-130
- 127 Bai, Y., Yin, G., Huang, Z., Liao, X., Chen, X., Yao, Y., and Pu, X., Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering, *Int. Immunopharmacol.* **2013** (16), p: 214-223

- 128 Roshanbinfar, K., Esser, T. U., and Engel, F. B., Stem cells and their cardiac derivatives for cardiac tissue engineering and regenerative medicine, *Antioxid Redox Signal* **2021** (35), p: 143-162
- 129 Biondi, M., Ungaro, F., Quaglia, F., and Netti, P. A., Controlled drug delivery in tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008** (60), p: 229-242
- 130 Oliveira, É. R., Nie, L., Podstawczyk, D., Allahbakhsh, A., Ratnayake, J., Brasil, D. L., and Shavandi, A., Advances in Growth Factor Delivery for Bone Tissue Engineering, *Int. J. Mol. Sci.* **2021** (22), p: 903
- 131 Nie, L., Chang, P., Sun, M., Huo, H., Zhang, C., Ji, C., Wei, X., Zhou, Q., Guo, P., and Yuan, H., Composite hydrogels with the simultaneous release of VEGF and MCP-1 for enhancing angiogenesis for bone tissue engineering applications, *Appl. Sci.* **2018** (8), p: 2438
- 132 Sutherland, T. D., Young, J. H., Weisman, S., Hayashi, C. Y., and Merritt, D. J., Insect silk: one name, many materials, *Annu. Rev. Entomol.* **2010** (55), p: 171-188
- 133 Craig, C. L., Evolution of arthropod silks, *Annu. Rev. Entomol.* **1997** (42), p: 231-267
- 134 Lewis, R. V., Spider silk: ancient ideas for new biomaterials, *Chem. Rev.* **2006** (106), p: 3762-3774
- 135 Römer, L., and Scheibel, T., The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high performance fiber, *Prion* **2008** (2), p: 154-161
- 136 Spohner, A., Vater, W., Monajembashi, S., Unger, E., Grosse, F., and Weisshart, K., Composition and hierarchical organisation of a spider silk, *PloS one* **2007** (2), p: e998
- 137 Eisoldt, L., Smith, A., and Scheibel, T., Decoding the secrets of spider silk, *Mater. Today* **2011** (14), p: 80-86
- 138 Lintz, E. S., and Scheibel, T. R., Dragline, egg stalk and byssus: a comparison of outstanding protein fibers and their potential for developing new materials, *Adv. Funct. Mater.* **2013** (23), p: 4467-4482
- 139 Hardy, J. G., Römer, L. M., and Scheibel, T. R., Polymeric materials based on silk proteins, *Polymer* **2008** (49), p: 4309-4327
- 140 Vendrely, C., and Scheibel, T., Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications, *Macromol. Biosci.* **2007** (7), p: 401-409
- 141 Doblhofer, E., Heidebrecht, A., and Scheibel, T., To spin or not to spin: spider silk fibers and more, *Appl. Microbiol* **2015** (99), p: 9361-9380
- 142 Demain, A. L., REVIEWS: The business of biotechnology, *Ind. Biotechnol.* **2007** (3), p: 269-283
- 143 Ladisch, M. R., and Kohlmann, K. L., Recombinant human insulin, *Biotechnol. Prog.* **1992** (8), p: 469-478
- 144 Scheibel, T., Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins, *Microb. Cell Factories* **2004** (3), p: 1-10
- 145 Huemmerich, D., Helsen, C. W., Quedzuweit, S., Oschmann, J., Rudolph, R., and Scheibel, T., Primary Structure Elements of Spider Dragline Silks and Their Contribution to Protein Solubility, *Biochemistry* **2004** (43), p: 13604-13612
- 146 Huemmerich, D., Scheibel, T., Vollrath, F., Cohen, S., Gat, U., and Ittah, S., Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins, *Curr. Biol.* **2004** (14), p: 2070-2074
- 147 Zeplin, P. H., Maksimovikj, N. C., Jordan, M. C., Nickel, J., Lang, G., Leimer, A. H., Römer, L., and Scheibel, T., Spider silk coatings as a bioshield to reduce periprosthetic fibrous capsule formation, *Adv. Funct. Mater.* **2014** (24), p: 2658-2666
- 148 Lucke, M., Mottas, I., Herbst, T., Hotz, C., Römer, L., Schierling, M., Herold, H. M., Slotta, U., Spinetti, T., and Scheibel, T., Engineered hybrid spider silk particles as delivery system for peptide vaccines, *Biomaterials* **2018** (172), p: 105-115
- 149 Zeplin, P., Berninger, A., Maksimovikj, N., Van Gelder, P., Scheibel, T., and Walles, H., Improving the biocompatibility of silicone implants using spider silk coatings: immunohistochemical analysis of capsule formation, *Handchirurgie, Mikrochirurgie, Plastische Chirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe: Organ der V.* **2014** (46), p: 336-341

- 150 Müller-Herrmann, S., and Scheibel, T., Enzymatic degradation of films, particles, and nonwoven meshes made of a recombinant spider silk protein, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015** (1), p: 247-259
- 151 Doblhofer, E., Scheibel, T., Engineering of Recombinant Spider Silk Proteins Allows Defined Uptake and Release of Substances, *J. Pharm. Sci.* **2014** (104), p: 988-994
- 152 Kumari, S., Lang, G., DeSimone, E., Spengler, C., Trossmann, V. T., Lücker, S., Hudel, M., Jacobs, K., Krämer, N., and Scheibel, T., Engineered spider silk-based 2D and 3D materials prevent microbial infestation, *Mater. Today* **2020** (41), p: 21-33
- 153 Wohlrab, S., Müller, S., Schmidt, A., Neubauer, S., Kessler, H., Leal-Egaña, A., and Scheibel, T., Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins, *Biomaterials* **2012** (33), p: 6650-6659
- 154 Elsner, M. B., Herold, H. M., Müller-Herrmann, S., Bargel, H., and Scheibel, T., Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles, *Biomater. Sci.* **2015** (3), p: 543-551
- 155 Neubauer, V. J., Scheibel, T., and Engineering, Spider Silk Fusion Proteins for Controlled Collagen Binding and Biomineralization, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020** (6), p: 5599-5608
- 156 Humenik, M., Mohrand, M., and Scheibel, T., Self-assembly of spider silk-fusion proteins comprising enzymatic and fluorescence activity, *Bioconjug. Chem.* **2018** (29), p: 898-904
- 157 Lang, G., Jokisch, S., and Scheibel, T., Air filter devices including nonwoven meshes of electrospun recombinant spider silk proteins, *J. Vis. Exp.* **2013** p: 50492
- 158 Jokisch, S., Neuenfeldt, M., and Scheibel, T., Silk-based fine dust filters for air filtration, *Adv. Sustain. Syst.* **2017** (1), p: 1700079
- 159 DeSimone, E., Aigner, T. B., Humenik, M., Lang, G., and Scheibel, T., Aqueous electrospinning of recombinant spider silk proteins, *Mater. Sci. Eng. C* **2020** (106), p: 110145
- 160 Huemmerich, D., Slotta, U., and Scheibel, T., Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins, *Appl. Phys. A* **2006** (82), p: 219-222
- 161 Slotta, U., Tammer, M., Kremer, F., Koelsch, P., and Scheibel, T., Structural analysis of spider silk films, *Supramol. Chem.* **2006** (18), p: 465-471
- 162 Spiess, K., Ene, R., Keenan, C. D., Senker, J., Kremer, F., and Scheibel, T., Impact of initial solvent on thermal stability and mechanical properties of recombinant spider silk films, *J. Mater. Chem.* **2011** (21), p: 13594-13604
- 163 Wohlrab, S., Spieß, K., and Scheibel, T., Varying surface hydrophobicities of coatings made of recombinant spider silk proteins, *J. Mater. Chem.* **2012** (22), p: 22050-22054
- 164 Aigner, T. B., DeSimone, E., and Scheibel, T., Biomedical applications of recombinant silk-based materials, *Adv. Mater.* **2018** (30), p: 1704636
- 165 Petzold, J., Aigner, T. B., Touska, F., Zimmermann, K., Scheibel, T., and Engel, F. B., Surface features of recombinant spider silk protein eADF4 (κ 16)-made materials are well-suited for cardiac tissue engineering, *Adv. Funct. Mater.* **2017** (27), p: 1701427
- 166 Kramer, J. P., Aigner, T. B., Petzold, J., Roshanbinfar, K., Scheibel, T., and Engel, F. B., Recombinant spider silk protein eADF4 (C16)-RGD coatings are suitable for cardiac tissue engineering, *Sci. Rep.* **2020** (10), p: 1-12
- 167 Esser, T. U., Troßmann, V. T., Lentz, S., Engel, F. B., and Scheibel, T., Designing of spider silk proteins for human induced pluripotent stem cell-based cardiac tissue engineering, *Mater. Today Bio* **2021** (11), p: 100114
- 168 Borkner, C. B., Wohlrab, S., Möller, E., Lang, G., and Scheibel, T., Surface modification of polymeric biomaterials using recombinant spider silk proteins, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017** (3), p: 767-775
- 169 Sommer, C., Bargel, H., Raßmann, N., and Scheibel, T., Microbial repellence properties of engineered spider silk coatings prevent biofilm formation of opportunistic bacterial strains, *MRS Commun.* **2021** p: 1-7
- 170 Hardy, J. G., Leal-Egaña, A., and Scheibel, T. R., Engineered Spider Silk Protein-Based Composites for Drug Delivery, *Macromol. Biosci.* **2013** (13), p: 1431-1437

- 171 Lammel, A., Schwab, M., Slotta, U., Winter, G., and Scheibel, T., Processing Conditions for the Formation of Spider Silk Microspheres, *ChemSusChem* **2008** (1), p: 413-416
- 172 Neubauer, M. P., Blüm, C., Agostini, E., Engert, J., Scheibel, T., and Fery, A., Micromechanical characterization of spider silk particles, *Biomater. Sci.* **2013** (1), p: 1160-1165
- 173 Helfricht, N., Klug, M., Mark, A., Kuznetsov, V., Blüm, C., Scheibel, T., and Papastavrou, G., Surface properties of spider silk particles in solution, *Biomater. Sci.* **2013** (1), p: 1166-1171
- 174 Schierling, M. B., Doblhofer, E., Scheibel, T., Cellular uptake of drug loaded spider silk particles, *Biomater. Sci.* **2016** (4), p: 1515-1523
- 175 Lammel, A., Schwab, M., Hofer, M., Winter, G., and Scheibel, T., Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles, *Biomaterials* **2011** (32), p: 2233-2240
- 176 Blüm, C., and Scheibel, T., Control of drug loading and release properties of spider silk sub-microparticles, *Bionanoscience* **2012** (2), p: 67-74
- 177 Weiss, A. C., Herold, H. M., Lentz, S., Faria, M., Besford, Q. A., Ang, C.-S., Caruso, F., and Scheibel, T., Surface modification of spider silk particles to direct biomolecular corona formation, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020** (12), p: 24635-24643
- 178 Rammensee, S., Huemmerich, D., Hermanson, K. D., Scheibel, T., and Bausch, A. R., Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk, *J. Appl. Phys.* **2006** (82), p: 261-264
- 179 Slotta, U. K., Rammensee, S., Gorb, S., and Scheibel, T., An engineered spider silk protein forms microspheres, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008** (47), p: 4592-4594
- 180 Schacht, K., and Scheibel, T., Controlled Hydrogel Formation of a Recombinant Spider Silk Protein, *Biomacromolecules* **2011** (12), p: 2488-2495
- 181 Kumari, S., Bargel, H., Anby, M. U., Lafargue, D., and Scheibel, T., Recombinant spider silk hydrogels for sustained release of biologicals, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018** (4), p: 1750-1759
- 182 Schacht, K., Jüngst, T., Schweinlin, M., Ewald, A., Groll, J., and Scheibel, T., Biofabrication of Cell-Loaded 3D Spider Silk Constructs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015** (54), p: 2816-2820
- 183 DeSimone, E., Schacht, K., Pellert, A., and Scheibel, T., Recombinant spider silk-based bioinks, *Biofabrication* **2017** (9), p: 044104
- 184 DeSimone, E., Schacht, K., and Scheibel, T., Cations influence the cross-linking of hydrogels made of recombinant, polyanionic spider silk proteins, *ACS Mater. Lett.* **2016** (183), p: 101-104
- 185 Adhikari, J., Roy, A., Das, A., Ghosh, M., Thomas, S., Sinha, A., Kim, J., and Saha, P., Effects of processing parameters of 3D bioprinting on the cellular activity of bioinks, *Macromol. Biosci.* **2021** (21), p: 2000179
- 186 Jain, T., Baker, H. B., Gipsov, A., Fisher, J. P., Joy, A., Kaplan, D. S., and Isayeva, I., Impact of cell density on the bioprinting of gelatin methacrylate (GelMA) bioinks, *Bioprinting* **2021** (22), p: e00131
- 187 Tan, M. H., Nowak, N. J., Loor, R., Ochi, H., Sandberg, A. A., Lopez, C., Pickren, J. W., Berjian, R., Douglass, H. O., and Chu, T. M., Characterization of a new primary human pancreatic tumor line, *Cancer Invest.* **1986** (4), p: 15-23
- 188 McKim, A., and Strub, R. J. P. T., Dimethyl sulfoxide USP, PhEur in approved pharmaceutical products and medical devices, *Pharmaceutical Technology* **2008** (32), p: 74

5. Publikationsliste

* gleichberechtigte Co-Autorenschaft

- I. Vanessa J. Neubauer*, **Annika Döbl***, and Thomas Scheibel. Silk-Based Materials for Hard Tissue Engineering. *Materials* (2021), 14, 674.
<https://doi.org/10.3390/ma14030674>
- II. **Annika Lechner***, Vanessa T. Trossmann*, and Thomas Scheibel. Impact of Cell Loading of Recombinant Spider Silk Based Bioinks on Gelation and Printability. *Macromolecular Bioscience* (2022), 22, 2100390.
<https://doi.org/10.1002/mabi.202100390>
- III. Vanessa J. Neubauer, Vanessa T. Trossmann, Sofia Jacobi, **Annika Döbl**, and Thomas Scheibel. Aqueous-Organic Solvent Derived Recombinant Spider Silk Gels as Depots for Drugs. *Angewandte Chemie International Edition* (2021), 60, 11847-11851.
<https://doi.org/10.1002/anie.202103147>

Deutsche Version:
Vanessa J. Neubauer, Vanessa T. Trossmann, Sofia Jacobi, **Annika Döbl**, and Thomas Scheibel. Rekombinante Spinnenseidengele aus wässrig-organischen Mischphasen als Wirkstoffdepots. *Angewandte Chemie* (2021), 60, 11847-11851
<https://doi.org/10.1002/ange.202103147>
- IV. Heike M. Herold*, **Annika Döbl***, Stefanie Wohlrab, Martin Humenik, and Thomas Scheibel. Designed Spider Silk-Based Drug Carrier for Redox- or pH-Triggered Drug Release. *Biomacromolecules* (2020) 21 (12), 4904-4912.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01138>

6. Darstellung des Eigenanteils und Teilarbeiten

6.1 Teilarbeit I

Silk-Based Materials for Hard Tissue Engineering

Autoren:

Vanessa J. Neubauer*, **Annika Döbl***, und Thomas Scheibel

* Gleichberechtigte Co-Autorenschaft

Der Übersichtsartikel wurde von Thomas Scheibel und Vanessa Neubauer konzipiert. Vanessa Neubauer und ich führten Literaturrecherchen durch und gestalteten Abbildungen. Die Passagen zu Seide und Gewebezüchtung wurden von mir erstellt. Vanessa Neubauer fokussierte sich auf die Passagen zu hartem Gewebeersatz und erstellte die Abbildungen. Das Manuskript wurde von allen Autoren editiert und durch Vanessa Neubauer und Thomas Scheibel finalisiert.

Der Artikel wurde am 01. Februar 2021 im Journal *Materials* veröffentlicht.

Nachdruck unter freundlicher Genehmigung des Verlags. Vanessa J. Neubauer, Annika Döbl, and Thomas Scheibel. Silk-Based Materials for Hard Tissue Engineering. *Materials* (2021), 14, 674. Copyright (2021) John Wiley and Sons.

Review

Silk-Based Materials for Hard Tissue Engineering

 Vanessa J. Neubauer ^{1,†} , Annika Döbl ^{1,†} and Thomas Scheibel ^{1,2,3,4,5,*} 

- ¹ Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Bayreuth, Prof.-Rüdiger-Bormann-Straße 1, 95447 Bayreuth, Germany; Vanessa.Neubauer@bm.uni-bayreuth.de (V.J.N.); Annika.Doebl@bm.uni-bayreuth.de (A.D.)
- ² Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG), Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany
- ³ Bayerisches Polymerinstitut (BPI), Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany
- ⁴ Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB), Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany
- ⁵ Bayreuther Materialzentrum (BayMAT), Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany
- * Correspondence: Thomas.Scheibel@bm.uni-bayreuth.de
- † These authors contributed equally.

Abstract: Hard tissues, e.g., bone, are mechanically stiff and, most typically, mineralized. To design scaffolds for hard tissue regeneration, mechanical, physico-chemical and biological cues must align with those found in the natural tissue. Combining these aspects poses challenges for material and construct design. Silk-based materials are promising for bone tissue regeneration as they fulfill several of such necessary requirements, and they are non-toxic and biodegradable. They can be processed into a variety of morphologies such as hydrogels, particles and fibers and can be mineralized. Therefore, silk-based materials are versatile candidates for biomedical applications in the field of hard tissue engineering. This review summarizes silk-based approaches for mineralized tissue replacements, and how to find the balance between sufficient material stiffness upon mineralization and cell survival upon attachment as well as nutrient supply.

Keywords: silk fibroin; silk spidroin; biomineralization; composite materials; bone; teeth; cartilage; tendon



Citation: Neubauer, V.J.; Döbl, A.; Scheibel, T. Silk-Based Materials for Hard Tissue Engineering. *Materials* **2021**, *14*, 674. <https://doi.org/10.3390/ma14030674>

Academic Editor: Francesco Baino
 Received: 7 December 2020
 Accepted: 26 January 2021
 Published: 1 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The development of hard tissue in the human body is a process of mineral formation by cellular metabolism, named biomineralization, yielding support structures of the skeleton and neighboring tissues such as tendon and cartilage or functional tissues such as teeth [1]. There are several different mineralization pathways, but they are not yet fully explored [2]. Generally, mineral formation in tissues needs to be highly controlled to prevent local over-mineralization, which could be pathogenic [2]. The high process control of biomineralization is provided by tissue-specific cells and biopolymers such as proteins, which are templating and nucleating mineral formation [3]. Therefore, biogenic crystals often exhibit a different morphology than their geogenic counterpart [4].

Tissue-specific cells are taking a crucial role in biomineralization as they trigger mineral nucleation and growth upon secretion of so-called non-collagenous proteins [2,5]. The main proteinous material (90 wt.%) of hard tissues is collagen type I as flexible filler in this composite material, while the non-collagenous proteins cover the remaining 10 wt.% [2]. Collagen is not mineralized on its own, but collagen fibrils can interact with non-collagenous proteins, which induce mineralization from saturated media at the gap regions of the stacked triple-helical collagen fibrils [2,5]. The phosphorylated, non-collagenous proteins of the so-called SIBLING family (Small Integrin-Binding Ligand, N-Linked Glycoprotein) include bone sialoprotein and osteopontin in bone-related tissues,

whereas in teeth dentin and cementum, dentin matrix protein 1 and dentin phosphoryn are present. These proteins provide two functions, as on the one hand, they can bind at specific locations to the structural collagen scaffold and on the other hand, they can bind ions due to their, in most cases, highly charged nature with repetitive motifs of glutamic or aspartic acid residues [5]. This local charge density allows to accumulate mineral ions and, thereby, to initiate crystal nucleation, when the ion density reaches a critical concentration, which then triggers the further mineralization processes in mineralized tissues, such as bone, teeth, cartilage and tendon [5].

Further, mineralization is driven by tissue-related osteoblasts (in bone and tendon), odontoblasts (in teeth) and chondrocytes (in cartilage) upon the accumulation of ions from the surrounding environment in mostly separated membrane vesicles [6]. With ongoing mineralization, the extracellular matrix around these cells densifies, and nutrients and oxygen are increasingly provided only passively by diffusion until easy nutrient supply is finally prevented. In the case of bone and neighboring tissue, osteoblasts differentiate into osteocytes [1]. Osteoclasts, on the other hand, are constantly remodeling fully mineralized tissue to guarantee healthy and reconstructed bone [7].

For traditional and engineering approaches to reconstruct hard tissues, natural processes have to be understood. Further, as bone represents the most abundant fully mineralized tissue, a majority of tissue engineering approaches focus on respective reconstructive solutions. Bone defects such as fractures easily occur, for example due to critical non-physiologically high loads. Shortly after fracture, inflammatory responses are initiated at the defect site, followed by a cell-induced regeneration cascade for initial callus formation, which is then remodeled to form new bone. With progressing age, bones become increasingly brittle due to changes in the cellular metabolism of osteoblast cells, which is indicated by 10–40 times lower strain rates until breakage. One possible reason might be remodeling cycles, which affect the mineral phase and allow more micro-cracking, finally leading to bone failure [8]. Once fractured, bone defects can be detected by X-raying of the defect site. New techniques such as ultrasonography for detecting bone fractures are more sensitive than classical radiographs, which are typically used to trace fractures of long bones. Sonographic methods provide the advantage of no radiation exposure, lower cost and wider availability in non-hospitals. A study among German general practitioners showed that most articulated sono-methods are inferior to classical X-ray [9]. In clinical procedures, the defect site is often bridged and stabilized with bone platelets or screws to stabilize material in place during the regeneration process [10]. In order to further support bone healing or large defects with bone loss, hard tissue engineering methods are increasingly used. In contrast to the self-regenerating ability of bone tissue, other mineralized tissues rely more on artificial replacement than supportive healing.

In the following, approaches for hard tissue engineering, with the focus on bone, and some examples including teeth, cartilage and tendon, based on silk scaffolds are discussed in detail.

2. Tissue Engineering Approaches

Defined in 1993, tissue engineering is the combination of principles of engineering and life sciences with the goal of developing biological substitutes that are able to restore, maintain or improve biological tissue function or a whole organ [11,12]. While one part of this interdisciplinary field deals with the generation of 3D models for the development of therapies, its main potential lies in regenerative medicine. With the goal of replacing tissues and organs damaged by trauma, disease or age, the ever-extending field of TERM (tissue engineering and regenerative medicine) includes basic and advanced cell and stem cell biology, scaffold material research and various fabrication and processing techniques [13,14]. The classical TERM approach to overcome drawbacks of autografts or allografts consists of scaffold-based top-down strategies (Figure 1). Such engineered tissues are typically created by manufacturing biodegradable polymeric scaffolds on which cells are seeded. During cultivation, and in some cases stimulated by perfusion, growth factors or mechanical

cues, cells dynamically remodel and replace the scaffold through degradation and new extracellular matrix (ECM) deposition [15]. Traditionally, three-dimensional scaffolds are manufactured by employing techniques such as freeze-drying, leaching of particles or salt, chemical or gas foaming and thermally induced phase separation [16–19]. While these processes allow partial control over the scaffold properties, there are severe restrictions to generate precise micro-architectures, including pore size, geometry and connectivity.

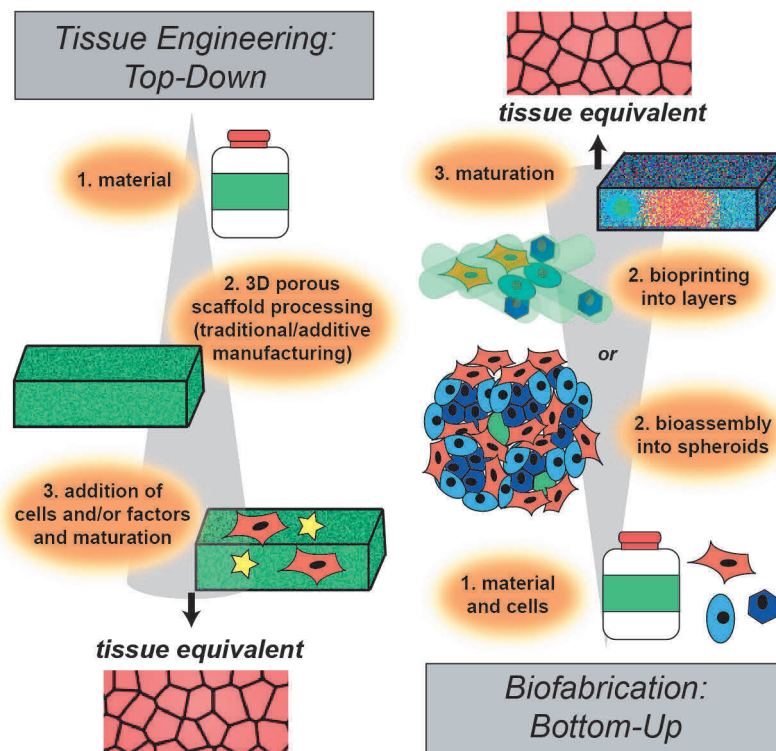


Figure 1. Schematic illustration of engineering approaches to fabricate tissue. In top-down strategies, a scaffold is produced, followed by cell seeding and/or addition of factors for cellular stimulation. This technique is called tissue engineering. Bottom-up approaches use cells and raw materials simultaneously to build larger constructs, which are then matured. This technique is called biofabrication.

With the rise of additive manufacturing, more techniques are available to create scaffolds for tissue engineering, overcoming previous restrictions. With an emphasis on the regeneration of bone tissue, four major layer-by-layer methods have been reviewed recently by Madrid et al. [20]. A variety of natural and synthetic polymers, as well as ceramics and bioceramics and even metals can be processed using stereolithography (SLA), selective laser sintering (SLS), fused deposition modeling (FDM) and three-dimensional printing (3DP). These techniques generally allow for more accurate scaffolds with better resolution. The specific processes, including laser and heat treatment, nevertheless tremendously restrict the choice of material [20]. Since additive manufacturing is based on computer-aided-design, structures that are more sophisticated can be created, including patient-specific scaffolds with the help of computer tomography. While these top-down approaches allow for good reproduction of the macroscopic structures of desired tissues and organs, the complexity, micro-arrangement and heterogeneity of natural tissues, including different cell types and materials, is far beyond what is found in such artificial acellular scaffolds [15,21].

To overcome this limitation, a multitude of bottom-up approaches has been developed in recent years. In contrast to traditional top-down approaches, where first the scaffold is

produced, followed by seeding with cells, in bottom-up approaches, cells are used from the very beginning in combination with materials to build up tissue constructs step-by-step (i.e., bottom-up) (Figure 1). Biocompatible materials in various morphologies, like particles, one-dimensional fibers, two-dimensional films and three-dimensional hydrogels, have been used, alongside cells, as building blocks to generate assemblies at the nano- or micro-scale. Further self- or directed-assembly leads to engineered macroscopic three-dimensional tissue constructs. A comprehensive review examining these advanced bottom-up approaches has recently been published by Gaspar et al. [21,22].

Benefits of these strategies include the involvement of cells in the development of the tissue right from the beginning, as well as the possibility to generate constructs made from different types of assemblies, leading to various cell types and materials organized hierarchically within the resulting construct. Different assemblies can be divided into two main categories, mostly scaffold-free cell-rich and cell-biomaterial assemblies. Adhesive surfaces, possibly in combination with functionalized and/or non-adhesive surfaces, are used to generate monolayer cell sheets by cultivation and subsequent detachment of the grown layer. Stacking, rolling and folding of these monolayer sheets is the basis to create combined three-dimensional assemblies, including multicellular and pre-vascularized constructs [23,24]. By using cellular spheroids, often made of mesenchymal stem cells, as scaffold-free building blocks, processes like cell-cell and cell-ECM interactions, differentiation and fusion are recapitulated [25,26]. In addition, genetic or chemical engineering of the cell surface allows control over cellular behavior and assembly into higher-order structures [27,28]. Inclusion of biological materials is a crucial part of bottom-up tissue engineering strategies, such as the addition of biocompatible layers within cellular sheets, functionalized with nucleic acids, viruses, enzymes and structural proteins, as well as peptides and polymers. To increase structural assembly within cellular spheroids or hydrogels, fibers and particles can be incorporated. These materials can add structural support and guidance, promote and/or control the assembly of building blocks and stimulate cellular behavior in general [21,29,30]. For example, a silk fibroin derived hydrogel was used as a scaffold for articular cartilage tissue engineering, and integrated poly(lactid-co-glycolid) nanoparticles were used to simultaneously deliver two growth factors, resulting in beneficial effects on proliferation and differentiation of dental pulp stem cells [31]. On the way to tissue or organ replacement, such multicellular and multimaterial assemblies are used to generate vascularized multicomponent constructs or spatially organized multiblock hydrogels [21].

In the context of advanced bottom-up tissue engineering approaches, a new field called biofabrication has been reviewed recently by Groll et al. [32]. Biofabrication mainly, but not solely, uses additive manufacturing techniques to process bottom-up building blocks into hierarchically structured cell-biomaterial constructs. Biofabrication describes the automated generation of biologically functional constructs through bioprinting, meaning the direct spatial arrangement of cells, materials and/or factors, and through the automated assembly of cell-containing building blocks, so-called bioassembly. In both cases, *in vitro* maturation and or fusion of the products is a crucial step before obtaining a tissue equivalent for implantation or pharmaceutical screening [32]. Relevant technologies within biofabrication have been recently reviewed by Moroni et al. [33]. With the possibility of simultaneous deposition of cells and material in an additive manufacturing process, bioplotting, ink-jet bioprinting and valve-jet bioprinting are major biofabrication tools for bottom-up tissue engineering and regenerative medicine. Formulations of materials, cells and biological molecules, so-called bioinks, are processed using these technologies. Bioplotting, also called robotic dispensing or extrusion bioprinting, dispenses continuous filaments of hydrogel materials or bioinks through a nozzle (piston-, screw-, or pneumatic-driven). Droplets are ejected over a nozzle head, controlled either by piezo- and thermal-actuators (ink-jet) or by solenoid micro-valves (valve-jet) [32,33].

All approaches, whether they include manufacturing a scaffold followed by cell-seeding or bioprinting/bioassembly, have strict requirements on the used material. Phys-

ical and mechanical properties need to be suitable for processing using the respective technology on the one hand and ensure cellular survival and proliferation on the other. The material also plays an important role in guiding specific cellular development and maturation, for example, by surface functionalization, the inclusion of biological molecules or the tuning of degradation behavior. With the goal of implantation of constructs, biocompatibility, meaning the performance of intended purpose without evoking an immune response, is absolutely required and can be enhanced e.g., upon introduction of nanoparticles [34–36]. Due to their inherent biological and chemical similarities to native tissue, natural polymers, natural polymer-based composites and bioceramics are of great interest for tissue engineering applications. Due to the high load-bearing requirement, hard tissue engineering approaches so far mainly focus on top-down strategies using porous scaffolds for cell seeding [37,38].

3. Hard Tissue Engineering

3.1. State of the Art

After diagnosis of a bone defect, the respective site is commonly deprived from extensive movement as both bone sides need to reconnect during regeneration in a correct manner, otherwise malfunction might be the result of improper healing. The origin of the cells, which are taking part in bone repair, were found to influence the healing progress. The cells present in bone encompass, for example, stem cells during bone healing or endothelial cells building vasculature, but also pre-osteoblasts, which differentiate into osteocytes during bone formation and maturation as described above. Osteoclasts are undertaking the function of degradation, which is a continuously ongoing process to maintain healthy bone and allow for expansion of the skeleton during the development of children [39]. When artificially delivered into bone defects, neural crest-derived frontal bone and mesoderm-derived parietal bone cells from newborn rats were found to exhibit both similar bone regeneration ability, although the mesodermal cells showed a potentially higher bone regeneration efficiency *in vitro* [40]. MC3T3 E1 pre-osteoblast cells were posed in hydroxyapatite microcracks similar to bone fractures and found to underlie initial apoptosis at a region of 200 nm around the cracks [41]. Besides fixation, flexoelectricity, meaning the ability to generate electricity under pressure, was found crucial for bone healing [41]. Exposed to strain such as physical activity during bone healing, bone regeneration was increased, and so rehabilitation measures actively contributed to tissue regeneration [42]. With near-infrared fluorescent probes [43], bone repair could be imaged concerning *in vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts. A cyclic peptide coupled with a fluorophore was used to bind to $\alpha 5\beta 1$ integrin as an osteoblast-specific marker. A second probe was coupled with the drug pamidronate to a fluorescent gold nanocluster, where the drug bound specifically to hydroxyapatite and allowed for monitoring osteogenesis [43].

Loss of bone material due to cancer or other pathogenic relations such as osteoporosis is often not recovered spontaneously and needs tissue replacement. Autologous bone grafts are still considered as the gold standard transplant due to facilitated integration at the defect site. As concerns about donor availability, healing and disease transmission arise, artificial bone substitutes become increasingly attractive to overcome these obstacles [39]. Therefore, titanium implants are state of the art as they are biologically inert materials, which offer high load transmission. Unfortunately, these foreign body materials are rarely fully integrated into the surrounding tissue and might become loose; therefore, surgical rearrangement might be necessary. One major reason for this issue is a bacterial infection, especially concerning dental implants with extensive biofilm formation [34]. To improve integration, for example titanium alloy (Ti6Al4V) implants with TiO₂ nanotubes were coated with silk fibroin, which was found to enhance osteoconductive and osteogenic properties in case of bone implant performance [44]. Bone, cell and implant interaction was found to be enhanced for MG63 bone cells and human mesenchymal stem cells, which is beneficial for implant applicability. Biomimetic minerals for hard tissue engineering, which enhance

osseointegration, can rely on biosimilars such as calcium sulfate or phosphate ceramics as synthetic and hydroxyapatite as a naturally occurring form of bone mineral [39]. Building scaffolds out of these materials can be realized upon melting and fusing individual ceramic particles using laser sintering at temperatures above 1000 °C [45–47]. Utilizing this rapid prototyping technique, also polymeric carrier materials can be fused at lower temperatures (about 70–200 °C) whilst molding and binding ceramic particles into bionanocomposites and simultaneously removing the binder [48,49]. With such polymeric binders, 3D extrusion and additional sintering of the composite materials is possible, yielding solely the remaining solid ceramic structures (Figure 2) [50,51].

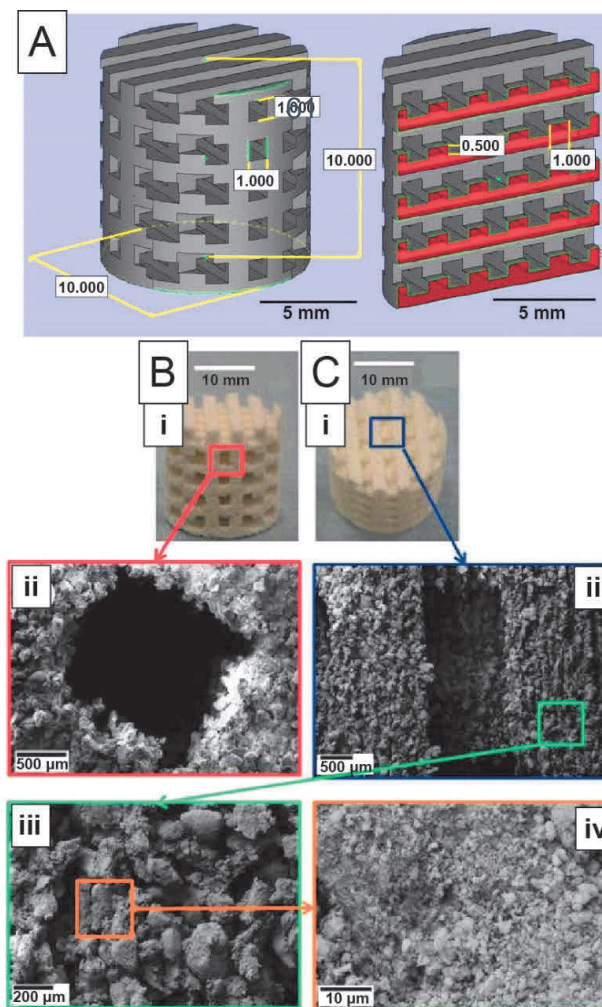


Figure 2. Scaffolds containing 50 wt.% hydroxyapatite nanoparticles suspended in poly(vinyl alcohol) as matrix material. (A) CAD design of a layered scaffold showing porous structures in the cylinder. Extrusion printed scaffolds after drying and thermal curing in side-view (B(i)) with higher magnification of a channel pore (B(ii)), and in top view (C(i)) with higher magnification of a channel (C(ii)), showing individual hydroxyapatite particle agglomerates (C(iii),C(iv)). Reprinted and adopted with permission from ref. [50]. Copyright 2015 Elsevier.

Further, injectable calcium phosphate cements including ceramics and a curing agent were invented by Brown and Cho in the 1980ies to fill dental cavities in the first place [52]. As state of the art, synthetic polymeric materials are widely used as matrix materials in

hard tissue engineering, however, they often cannot complement features of biomaterials such as non-toxic degradation products and bioactive surfaces for cell adhesion [53].

3.2. Design Criteria and Challenges

It is important that various design criteria and factors have to be taken into account in tissue engineering approaches to fulfill the requirements of a successful tissue engineering construct (Figure 3). In the case of hard tissues, besides biological and physico-chemical cues, also the appropriate mechanics play an important role. In the following, these aspects are discussed in more detail and illuminated why they can be challenging during scaffold preparation.

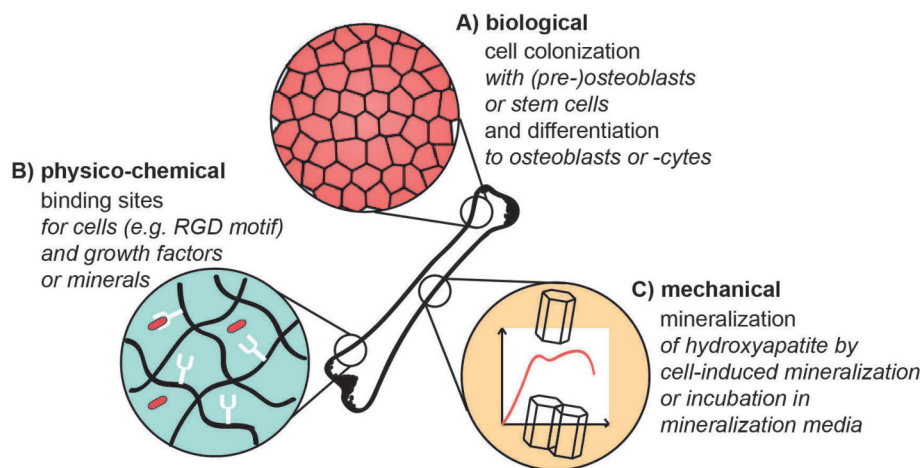


Figure 3. Illustration of biological, mechanical and physico-chemical factors of scaffold materials relevant for hard tissue engineering. (A) Media, growth factors, etc. are needed for tissue-specific cell colonization and differentiation on artificial scaffolds. (B) Materials/scaffolds have to provide binding sites for cells, factors and minerals. (C) Biom mineralization is necessary to gain composite materials with adopted mechanical properties (such as stiffness, etc.).

Concerning the mechanical design, it has to be taken into account that mature bone has compressive strengths in the order of up to 20 GPa [54], whereas they are far lower for immature bone, as the mineralization process is still ongoing [55,56]. However, not only high strength but also flexibility must be provided. Therefore, mostly brittle materials are not suitable for bone regeneration applications, as the risk of failure is high [8]. It can be challenging to combine high load-bearing materials with high flexibility, but these mechanical requirements can be fulfilled in biomaterial matrices applying reinforcing filler materials such as ceramic particles into composite materials. To gain homogenous mineralization, it is important that filler and matrix material interact well with each other to avoid phase separation, which is an additional criterion. Practical hints can be found when taking a closer look at the natural blueprint: Bone is a composite material [57] with collagen fibrils (20–30 wt.%) and ceramic particles made of hydroxyapatite (60–70 wt.%) [2]. Besides composite materials, biomineralization of protein precursor materials can be triggered in vitro upon immersion in mineralization agents forming calcium phosphate species. These can for example be single aqueous salt solutions, which are subsequently applied to the materials [58–60]. More complex mineralization is provided by Simulated Body Fluid, a model solution at pH 7.4, which was designed to simulate mineralization processes found during bone formation. Its ion composition and concentration are proximately close to human blood plasma [61].

Tailoring mechanical properties upon controlled mineralization is highly interconnected with the scaffold's biological function and vice versa. During mineralization of tissue, cells play an important role as they secrete non-collagenous proteins with highly lo-

cated charge [2]. Especially SIBLING proteins [5] are to be mentioned among others, as they coordinate nucleation, growth and inhibition phase during mineral formation as they accumulate ions from the surrounding intestinal fluids [62]. Further, hydroxyapatite precursor phases can be accumulated in cell membrane-bound vesicles and released at mineralization sites [6]. As a result, tissue-specific cell colonization is an additional design cue to mimic natural tissue in engineered constructs. Its respective challenge is posed not only by cell adhesion to the surface or in the construct but also to trigger osteoblast lineage in osteoblast precursor cells or stem cells. Biomineralization and osteogenic differentiation were found to be highly dependent on matrix stiffness [63]. 2D surfaces of different controllable substrate stiffness showed the best results for medium stiffness (50–100 kPa), as mineralization was completed after three weeks. Osteoblast differentiation was directly related to the formed mineral layer and only indirectly regulated by matrix stiffness [63]. The release of ions from the material, which is sensed by cells, can also lead to differentiation responses. One example for such materials is 45S5 Bioglass embedded in silk fibroin/gelatine scaffolds [64]. The bioglass composition comprises SiO_2 , CaO , Na_2O and P_2O_5 , and the ion release profile triggers osteogenic cell differentiation [65]. For this functionalization, it is important to control the osmotic balance of the media for cell survival.

Moreover, not only mechanical but also physico-chemical properties of the scaffold can lead to desired cell differentiation. The design of such cues can be related to binding sites for cells, growth factors or minerals. Besides cell-specific binding motifs [66], the integrin binding peptide motif arginyl glycyl aspartic acid (RGD) [67] is universally applied. The incorporation of this motif can be a challenge when it is not intrinsically provided by the biomaterial. This can be solved upon genetic engineering of proteins used in the material or chemical coupling of the motif to the material [68]. Related to the natural tissue, growth factors such as the most important one, the Transforming Growth Factor beta (TGF-beta), as well as bone morphogenetic proteins are agreed to have a beneficial impact on the success of hard tissue engineering scaffolds [69]. The factors can be delivered via the construct and trigger stem cells towards osteo-differentiation [70]. As a challenge, their concentration must be maintained [69] at levels confirmed to be active (nM) during cell cultivation by specific binding, otherwise, scaffolds become depleted fast by diffusion. Binding sites for ions were discussed above to be provided by non-collagenous proteins with located charges. Mimics of these proteins can be designed and incorporated into the scaffold. However, the preparation of hybrid proteins from silk and non-collagenous proteins can be challenging to gain functional mineral binding sites [71,72].

Taking all these complex requirements into regard, scaffolds must comply not only with mechanical but also physico-chemical and biological demands to build a successful hard tissue engineering construct. One crucial role plays the material choice. The named requirements can be met, for example, with synthetic or natural materials [14]. However, synthetic materials pose the risk of toxic degradation products during tissue regeneration, and their biocompatibility is limited [73]. Naturally derived materials avoid these obstacles. Further, they naturally can provide biological and/or mineral binding sites. However, disease transmission from donor animal sources and material heterogeneity must be avoided. Collagen and gelatin are common materials due to their native occurrence in bone and the presence of biomineralization nucleation sites. Moreover, bone takes a long time to develop, and the collagen will often degrade before it can be remodeled. Among artificial natural biomaterials, silk appears to be an attractive material, as it provides non-toxicity and biodegradability. Further, silk proteins can be produced biotechnologically, modified and processed into a variety of morphologies [73]. The upcoming sections will shed light on how silk materials can be used, for example, as matrix materials for bone tissue engineering.

4. Silk

4.1. Naturally Derived Silk

Silks are a class of protein fibers spun by arthropods such as fleas, mites, spiders and silkworms, amongst others. They are based on fibrous proteins containing highly repetitive amino acid sequences stored in the animal as liquid and transformed into fibers once shear stress is applied during spinning [74].

Fibers produced by the silkworm *Bombyx mori* consist of two silk fibroins (SF) and glue-like (non-silk) proteins named sericins. The fibroin heavy chain consists of a highly repetitive (12 times) glycine and alanine-rich region and two hydrophilic N- and C-terminal domains. The fibroin light chain is an arginine- and lysine-rich non-repetitive protein [75]. Upon secretion, both fibroins and a third small glycoprotein, p25, assemble into twin filaments that represent the inner part of the core-shell structure typical for *B. mori* silk. Sericins coat and stick these fibroin filaments together. The structure is completed by an additional coating with various proteins for the protection of the cocoon [76].

The most commonly studied spider silk is dragline silk made of proteins secreted from the major ampullate gland, and it consists of multiple proteins, called spidroins. The overall layout and amino acid composition of these major ampullate spidroins (MaSps) are similar to the architecture of the fibroin heavy chain. The primary structure (i.e., amino acid composition) of the core domains, however, is quite different. One spidroin filament is coated with a thin shell containing other silk proteins, lipids and glycoproteins constituting a core-shell-structure [77]. While most silk fibers have a high toughness compared to man-made fibers, spider silk outperforms the others concerning its mechanical properties [75].

Natural spider silk fibers, mostly from female adult *Nephila* spiders, have been used as suture threads or processed into scaffolds for neuron guidance, skin repair and bladder reconstruction [78]. While most spiders exhibit cannibalistic behavior, silkworms can easily be farmed to harvest their silk in large quantities [79]. Consequently, silk from the domesticated silkworm *B. mori* has been extensively characterized and is the main silk material used in biomedical applications, for example, as sutures and in tissue engineering and regenerative medicine approaches [38]. To extract fibroin from the harvested cocoons, a thermochemical treatment is applied, called *degumming*. This step is particularly important since it also removes the sericin component from the fibroin fibers, which has been shown to be problematic by causing immune reactions [80].

4.2. Bioengineered Silk

Advanced tissue engineering approaches cannot only take the physical properties of the fabricated scaffold into account. Apart from biocompatibility, the degradation rate of specific scaffolds is highly important. In the best case, the degradation should be identical to the rate at which new tissue is formed by the cells. When working with *B. mori* silk fibroin materials, the degradation behavior can be tuned by the choice of fabrication strategy, for example, the use of different solvents during processing, or by the incorporation of enzyme-sensitive peptides or degradation-promoting supplements [81]. To mimic the complexity of natural tissue, engineering approaches are destined to use multiple materials, fabricated in various morphology, together with cells and biologicals to carry out specific functions. Genetic engineering is further used to extend the availability and functionality of different silks for tissue engineering applications. Nagano et al. added a poly(glutamic acid) domain to the repetitive amino acid sequence of *B. mori* fibroin to incorporate calcium-binding sites for mineralization [82]. In another study, Saotome et al. improved revascularization by introducing the vascular endothelial growth factor and the RGD-cell adhesion motif into the silk fibroin heavy chain of transgenic *B. mori* silkworms [83].

The majority of recombinant spider silk proteins for biomedical applications is produced in the heterologous expression system *Escherichia coli*. Therefore, the natural silk sequence is determined first and then engineered to be produced in the host organism. After transformation and production, protein purification yields recombinant spider silk proteins [78]. Most recombinant sequences are based on proteins of the major ampullate

silks from either *Nephila clavipes* or *Araneus diadematus* spiders [84]. For example, a chimeric protein was genetically engineered containing a consensus sequence from *N. clavipes*' dragline silk fused to the carboxyl-terminal domain of the dentin matrix protein 1 [85]. In another work, Gomes et al. created a fusion protein by combining a consensus sequence from *N. clavipes*' dragline silk with the complete sequence of bone sialoprotein for improved cell attachment and deposition of calcium phosphate [71]. Cellular adhesion and proliferation were enhanced on materials made of an *A. diadematus* derived recombinant spider silk protein fused with the cell adhesion motif RGD [68]. Alternatively, mineral- and collagen-binding motifs were introduced to this protein for materials applications at the tendon-bone interface [72].

4.3. Silk-Based Morphologies

Naturally derived or bioengineered silk proteins can be processed into various morphologies. *B. mori* fibroin films are obtained by dissolving the proteins in aqueous lithium bromide solutions and dialysis against water, followed by film casting. To obtain insoluble films, they can be treated with a mixture of water and methanol [86,87]. Similarly, recombinant spider silk proteins are processed into films by dissolving them in the organic solvent hexafluoroisopropanol (HFIP), followed by casting and post-treatment with isopropanol or methanol [88,89].

To imitate the natural fibrous ECM more closely for tissue engineering applications, non-woven mats containing fibroin or spider silk fibers have been produced using electrospinning. The technique constantly evolved to gain more control over the process and outcome. Traditionally, *B. mori* fibroin is dissolved in organic solvents like HFIP, hexafluoroacetone (HFA) or formic acid and spun by applying voltages between 2 kV to 30 kV. Non-woven mats containing fibers with diameters in the low nanometer range up to one micrometer were generated with this set-up [90,91]. In a recent work by Keirouz et al. [92], composite fibers were spun using nozzle-free electrospinning. DeSimone et al. [93] developed an all aqueous electrospinning process for recombinant spider silk proteins. The elimination of harsh processing conditions led to the conformational stability of biological components throughout spinning and posttreatment, promising the inclusion of sensitive biological components for tissue engineering applications [93]. Upon blending poly(caprolactone) (PCL) with poly(glycerol sebacate) and silk fibroin, also the hydrophilicity of the non-woven mats could be increased, which is beneficial for tissue engineering applications [94].

Nano- and microparticles are used in tissue engineering within three-dimensional scaffolds, e.g., to introduce biologically or chemically active factors in constructs or to increase the mechanical stability. Silk particles can be produced by salting-out with potassium phosphate. Tuning protein concentration and mixing intensity, particles in the size range between 150 nm and 10 μm can be fabricated [95,96]. Fibroin particles with a diameter of around 6 μm can also be produced by chopping and wet-milling *B. mori* fibers, while even smaller particles, down to 200 nm, were produced using ethanol precipitation and freezing [97,98]. Through well-suited loading and release properties for various substances, silk particles can be applied as drug carriers. For example, a human recombinant bone morphogenic protein has been successfully encapsulated in silk fibroin particles allowing sustained delivery thereof in bone tissue engineering approaches [69]. Furthermore, the recombinant nature of spider silk proteins allowed genetic modification for covalent, triggerable substance delivery systems [99].

For top-down tissue engineering approaches, porous three-dimensional structures offer adherence points and mechanical stability for cells, and pores facilitate nutrient, oxygen and waste transport. Foaming of silk fibroin solutions with varying nitrous oxide pressure and protein concentration led to scaffolds with pore sizes in the range between 100 and 400 μm [100]. Pore sizes below 100 μm were generated by increasing the protein concentration from 5 wt.% up to 12 wt.%, followed by freeze-drying and immersion in methanol [101]. Recombinant spider silk proteins have been processed into scaffolds with

pores sizes of around 100 μm by dissolving the protein in HFIP and using different sized salt crystals as porogens [102].

Hydrogels are hydrophilic polymer networks, physically or chemically cross-linked, that can absorb water up to thousands of times their dry weight [103]. Recombinant spider silk proteins form hydrogels through chain entanglement, which can be printed using dispense plotting at room temperature while supporting encapsulated cells [104]. Due to unfavorable physical properties, like low viscosity, hydrogels made of *B. mori* silk fibroin are less suitable for bioprinting applications without additives. Here, strategies to blend the material with other (bio)polymers to enhance printability have been applied. For example, Chameettachal et al. successfully bioprinted fibroin-gelatin-blends using dispense plotting at room temperature [105].

5. Silk-Based Hard Tissue Engineering

The following chapter summarizes recent approaches in silk-based hard tissue engineering, and in Table 1, various examples are listed. Upon providing multiple examples for hard tissue engineering approaches based on silk, the adaptability and compatibility of silk materials are shown.

Table 1. Overview of silk-based hard tissue engineering approaches.

| Mineralization | Silk Source | Filler Materials/Additives | Morphology/Fabrication Technique | Cell Types | Biocompatibility Study | Target Tissue |
|---------------------------|--|--|---|---|---|---------------------------|
| non-mineralized | <i>Bombyx mori</i> silk fibroin [106] | glycerol, PEG | 2D film casting | human dermal fibroblasts | in vitro | bone |
| – | <i>Bombyx mori</i> silk fibroin [107] | – | 3D porous scaffold/lyophilization | human adipose mesenchymal stem cells | in vitro and in vivo in rat calvarial bone model | bone |
| – | <i>Bombyx mori</i> silk fibroin [108] | bacterial nanocellulose; photo-crosslinker | 3D hydrogels/3D printing | mouse lung fibroblasts | in vitro | bone |
| – | <i>Bombyx mori</i> silk fibroin [109] | collagen I | 3D scaffold with aligned or knitted fibers/lyophilization | rabbit bone marrow stem cells | in vitro and in vivo in rotator cuff rabbit model | tendon-to-bone transition |
| biomineralized | recombinant spider silk [72] | – | 2D film casting | mouse pre-osteoblasts | in vitro | tendon-to-bone transition |
| – | <i>Cupiennius salei</i> spider silk fibers [110] | – | 2.5D fibers/naturally harvested | – | – | bone |
| pre-mineralized materials | <i>Bombyx mori</i> silk fibroin [111] | alumina nanoparticles | 3D porous scaffold/lyophilization | rabbit adipose-derived stem cells | in vitro | bone |
| – | <i>Bombyx mori</i> silk fibroin, soy protein [112] | graphene oxide, β -tricalcium phosphate | 3D porous scaffold/lyophilization | rat bone marrow stem cells | in vitro | bone |
| – | <i>Bombyx mori</i> silk fibroin [113] | graphene oxide, nano-hydroxyapatite | 3D porous scaffold/lyophilization | bone marrow stem cells, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) | in vitro | bone, vasculature |
| – | <i>Bombyx mori</i> silk fibroin [114] | doped β -tricalcium phosphate, crosslinker | 3D porous scaffold/lyophilization | human osteoblasts, human articular chondrocytes | in vitro | bone, cartilage |
| – | <i>Bombyx mori</i> silk fibroin [115] | – | 3D porous sponges/salt leaching | stem cells from human exfoliated deciduous teeth | in vitro | teeth |

5.1. Bone Tissue Engineering

Among the recent approaches in hard tissue engineering for various tissue types (bone, tendon, cartilage), three types of scaffold materials are used. On the one hand, there are studies based on non-mineralized scaffolds, which were examined concerning

their biocompatibility and properties for bone repair without pre-mineralization. Others were mineralized upon incubation with cells or mineralization agents. In the third set-up, inorganic components such as bioceramics or minerals were directly added to the fabrication process to yield composite scaffolds. The following section is describing these three types in more detail, as well as the morphology of the underlying silk scaffolds.

5.1.1. Non-Mineralized Scaffolds

Scaffolds can be fabricated in different dimensions, from 1D fibers, to 2D films to 3D printed scaffolds. Different processing methods have been used to influence the mechanical properties of the silk scaffolds to be more bone-like and to adopt its performance in cell culture. Silk fibroin films as 2D structures were blended with glycerol and poly(ethylene glycol) (PEG) to improve ductility and porosity, beneficial for cell adhesion. Different film properties were obtained upon adjusting the casting temperature. For example, the ultimate tensile strength was increased when films were cast at 60 °C in comparison to 4 °C, indicating higher crystallinity in the films. Moreover, pore sizes decreased in the same manner when film casting was conducted at elevated temperatures. Further, double blends with PEG and glycerol showed the best results, as both additives might interact, yielding stable constructs [106].

Hard tissue repair has high demands regarding the form of the construct, as defect sites are individual and often complex and, therefore, 3D structures such as foams, sponges, injectable or printable hydrogels are of most interest. Silk scaffolds with no chemical crosslinker were fabricated using a solvent exchange method. Silk fibroin as well as spider silk proteins were dissolved in formic acid or HFIP and blended with sodium chloride crystals as porogens to control pore sizes between 200–300 µm. The obtained structures showed high content of β -sheet structures resulting in stable constructs [116]. 3D spongy silk/sericin scaffolds were fabricated using freeze-drying in order to investigate the influence of sericin addition to the material. Structural, biological and immunological properties were investigated with different weight ratios of sericin (0–4.7 wt.%). Further, scaffolds were chemically crosslinked using glutaraldehyde vapor. Structural transition towards β -sheets was induced upon immersion in ethanol. These highly porous structures with more than 90% porosity showed a decrease in pore size in the presence of increasing amounts of sericin. Similar trends were observed for mechanical properties, which were significantly higher upon increasing sericin content. As a result, cell culture studies with human osteoblast MG63 cells revealed no enhanced cytotoxic effect of the sericin present in the scaffolds. Further, macrophage adhesion was not highly pronounced, and inflammatory marker genes were not upregulated with increasing sericin content [117]. Another scaffold was fabricated using lyophilization to investigate the effect of pre-seeding of human adipose-derived mesenchymal stem cells for bone regeneration *in vitro* and *in vivo* [107]. Harsh crosslinking agents could be avoided, and constructs were solely post-treated in ethanol. In cell studies, cytocompatibility was confirmed, and a mineralized matrix formation was found after two weeks as a sign of osteogenic differentiation [107]. Rat calvaria models served to evaluate the *in vivo* performance of cell-seeded scaffolds in comparison to that of non-seeded silk scaffolds. Micro-CT showed no significant impact on the amount of regenerated bone after 12 weeks [107]. However, looking deeper into the composition of the newly formed tissue, new bone with a higher amount of collagen and vasculature was formed in pre-seeded scaffolds [107].

When using hydrogels for hard tissue engineering, mechanical properties must be investigated and adapted. Different crosslinking methods were used in the following three approaches: Long et al. [118] mixed silk fibroin and elastin to assemble hybrid hydrogels using a physical heat crosslinking method for higher β -sheet content in the silk material and chemical crosslinking with glutaraldehyde between silk and elastin. In this case, silk was used due to its easy processing into different morphologies and elastin to add biochemical cues to the material. Hydrogels exhibited 4–70 kPa in compressive modulus and shear compressive moduli up to 40 kPa. A proliferation assay using L929

lung fibroblasts showed no negative effects of the chemical crosslinking. Wu et al. [119] also combined two crosslinking methods for silk fibroin hydrogels, but in this case, ethanol for physical and γ -ray for chemical crosslinking of the solutions were applied. Crosslinking through irradiation occurred with the assumed mechanism of radical formation as a result of high energy transfer to silk fibroin molecules. Such treated hydrogels could cover several orders of magnitude in elastic moduli from the Pa range up to hard hydrogels in the MPa range upon different irradiation times (Figure 4). Reflecting the possible variation of mechanical properties, irradiation did also alter pore structure, resulting in denser gels with smaller pores upon increasing crosslinking. Interestingly, biodegradation in the presence of protease XIV was not influenced upon irradiation but upon ethanol physical crosslinking, as the latter is related to silk crystallinity. Cell toxicity of rat bone marrow mesenchymal stem cells was studied using supernatants from scaffolds, as irradiation might cause toxic radicals in solution, but no significant changes compared to the control group were observed.

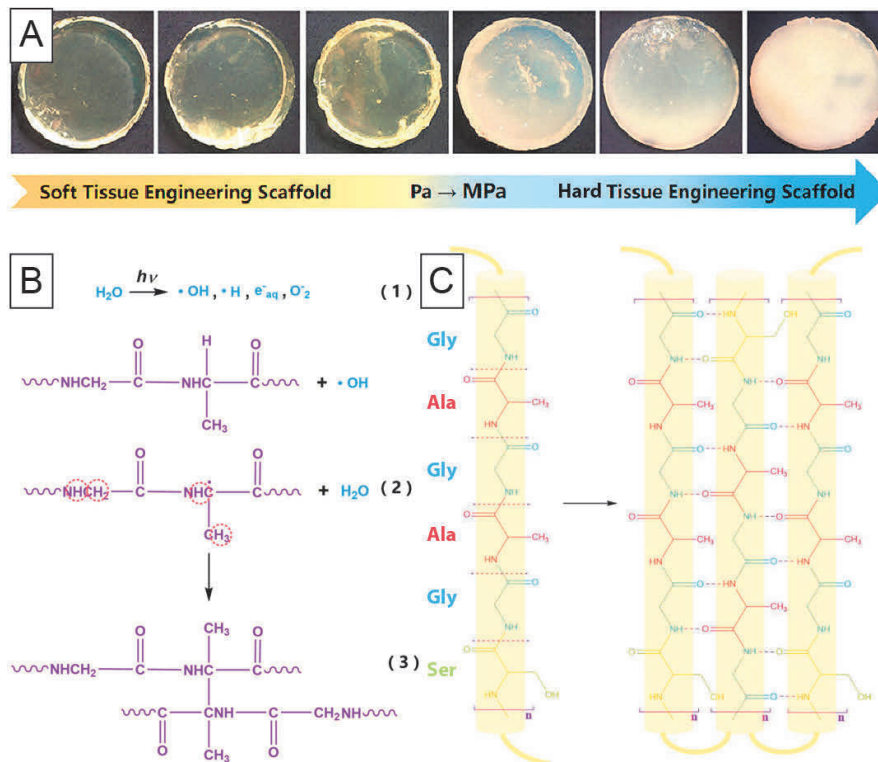


Figure 4. (A) Photographs of *Bombyx mori* silk fibroin hydrogels with a controlled degree of crosslinking using γ -radiation (yellow) and ethanol treatment (blue) to cover six orders of magnitude of material stiffness. Crosslinking mechanism upon (B) γ -radiation, triggering radical water splitting and the evolution of free radicals, leading to combinational events between polymer chains and (C) ethanol treatment, inducing hydrogen bonding and intermolecular interaction. Reprinted and adopted with permission from ref. [119]. Copyright 2020 American Chemical Society.

Laomeephol et al. [120] used a phospholipid (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) sodium salt) as a gelling additive to accelerate hydrogel formation of silk fibroin solutions. Changing the concentration of the lipid resulted in different gelation rates, and, thereby, gelation could be controlled. The mechanism is based on the amphiphilic nature of the lipid, which forms electrostatic and hydrophobic interactions with silk fibroin. Cytocompatibility was confirmed using ISO 109931:2009 cell tests and cell lines such as L929 lung fibroblast and NIH/3T3 fibroblasts [120]. While proliferation was found in the

gels using these cell lines, cancer-derived cells such as SaOS-2 did not proliferate after 21 days and stayed in round shape. In this case, the described constructs seemed to be rather unfavorable substrates while showing inhibition of growth of cancer-derived cell lines [120].

To use silk hydrogels in 3D printing applications, one blend was examined using silk fibroin and alginate [121]. Since bioinks further contain cells for 3D printing applications, they must be cytocompatible and printable to enable cell survival and, in the best case, proliferation. As shear forces are acting on the material during printing, cells have to be protected from damaging shear stress. In this study, 1 wt.% sodium alginate with 2 wt.% silk fibroin underwent rapid gelation upon addition of calcium chloride, which crosslinks alginate [121]. The addition of 1 wt.% rather than 0.5 wt.% alginate resulted in higher strand fidelity during printing. Encapsulated osteosarcoma cells were loaded into the hydrogel blends and manually printed from syringes, which represents a first printability evaluation of a material. Extruded strands were cultured, and cell viability was evaluated in live/dead staining after print-induced shearing. Besides few dead cells in one sample, cells survived the process. Cell viability was confirmed using the metabolic PrestoBlue assay. However, it was found that at higher amounts of silk fibroin, less signal could be detected, although viable cells were found. This led to the assumption that the dye, but also nutrients and waste products can only hardly travel through the construct upon increasing silk fibroin content.

For the adjustment of mechanical properties and printability, filler materials such as nanocellulose can be added to silk fibroin hydrogels [108]. Bacterial nanocellulose was added, yielding composite hydrogels for 3D printing. Photo-crosslinking using tris(bipyridine)ruthenium(II) chloride as crosslinker generated scaffolds, which differed in their characteristics depending on the morphology of the nanocellulose used either as a solution, fibers or whiskers. Structural information was related to β -sheet content and silk fibroin nanocellulose interaction, which is defined by inter-domain distance in the silk fibroin determined using small-angle neutron scattering techniques. Scanning electron microscopy images (SEM) showed that cellulose as an additive influenced pore sizes, yielding especially dense structures in the presence of whiskers. Best rheological, tensile and compression behavior was found in the presence of fiber fillers. Printability evaluated by strand-width after printing was similarly high for fiber and whisker additives. However, as a small drawback, these two morphologies were not reported to be cell friendly whilst causing cytotoxicity upon oxidative stress or inflammatory response. Culturing L929 lung fibroblasts on hydrogels, all blends showed proliferation and high viability tested after 1, 3 and 5 days.

In another approach, tyrosinase-crosslinked silk fibroin/gelatine hydrogel blends were cell loaded and 3D printed to gain functional constructs [122]. Silk was functionalized with gelatine and calcium chloride for sustained release of calcium ions from the scaffold, similar to the extracellular release of calcium by osteoclasts during bone modeling (Figure 5). Several aims were followed in this study: First, the material was optimized for 3D printing concerning long-term stability for cell culture, and, therefore, rheological properties were adjusted. It was found that at low shear rates, blend hydrogels showed shear thickening behavior, presumably related to crystallization or entanglement between both components. At higher shear rates, a sudden transition to shear thinning behavior was assumed as a result of compound release. Further, the addition of calcium chloride increased the viscosity in such hydrogel blends up to 100-fold due to faster gelation times and ionic interactions with silk fibroin. Second, the osteogenic profile of the constructs was investigated upon release of calcium ions. Ion release was found for 3 weeks, but the release was not complete at that time point.

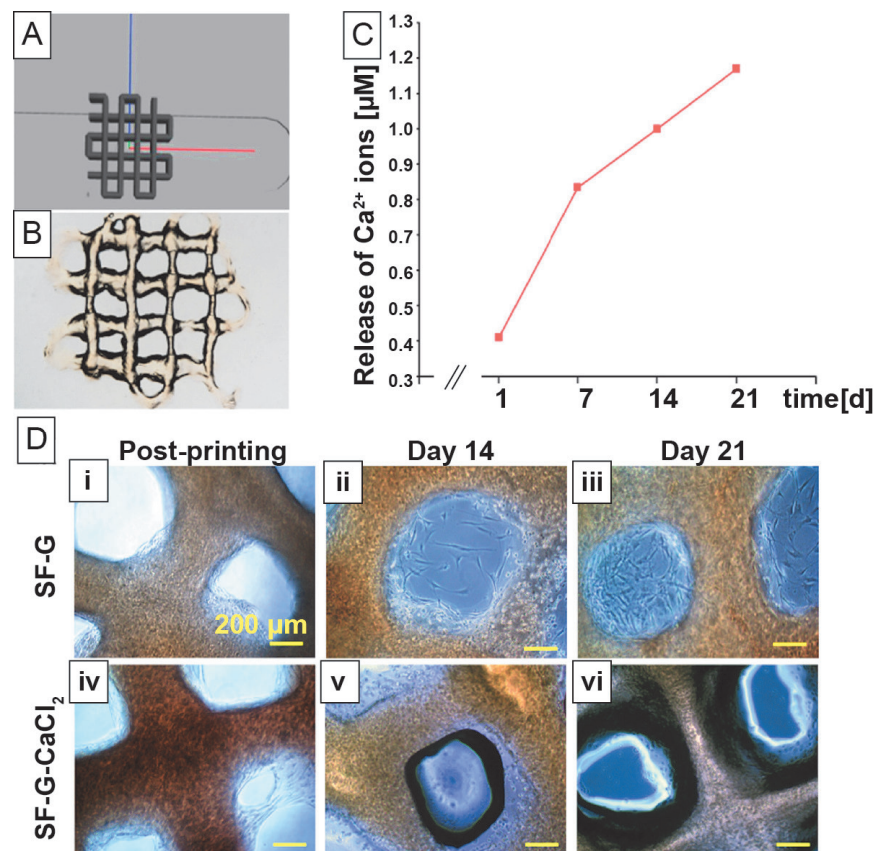


Figure 5. (A) CAD sketch of a *Bombyx mori* silk fibroin/gelatine construct and (B) its 3D dispense plotted result. (C) Release profile of calcium ions from *Bombyx mori* silk fibroin/gelatine hydrogels, loaded with calcium chloride. (D) Light microscopy images of unloaded (i–iii) and loaded (iv–vi) silk/gelatine hydrogels with human mesenchymal stem cells post-printing (i,iv), after 14 (ii,v) and 21 days (iii,vi). Unloaded scaffolds showed cells present in both the construct and in pores, whereas, in the loaded construct, cells remained in the strands. SF = silk fibroin, G = gelatine. Reprinted and adopted with permission from ref. [122]. Copyright 2019 American Chemical Society.

Third, the signaling pathway, which regulates osteogenic differentiation in human bone marrow derived progenitor cells, was analyzed with regard to the influence of calcium ions. The gene expression profile of parts of the canonical Wnt pathway with specific expression of β -catenin, BMP2 and BMP4 was investigated, and their concentration was highest on day 21. It can be therefore assumed that BMP plays an important role in osteogenic differentiation of human bone marrow derived progenitor cells.

The recombinant spider silk protein eADF4(C16), which is based on the consensus sequence of one component of the *A. diadematus* dragline silk [123], was found to form hydrogels in a controlled manner forming a physical fibrillar network [124,125], enabling its processing via 3D printing for tissue engineering [126]. Further, this recombinant spider silk protein could be modified to comprise the well-known RGD cell-binding motif [126]. Modifications of the processing technique, such as creating blends [127,128], incorporation of silica particles [129] or the release of biologicals from hydrogels [130], were investigated and successfully yielded stable gels.

Silk fibroin hybrid materials with two different silk morphologies were studied, for example, by Ding et al. [131] β -sheet rich silk fibroin nanofibers were encapsulated in an amorphous silk matrix. Upon electric field exposition of 50 V for 30 min, nanofibers traveled through the amorphous matrix and aligned. Scaffolds were crosslinked using

horseradish peroxidase and yielded anisotropic scaffolds with up to 120 kPa in stiffness. In *in vitro* studies, bone marrow mesenchymal stem cells showed osteogenic behavior, and an ectopic *in vivo* bone model was used to investigate osteogenic properties in rat femurs. Between week 8 to 12, newly formed bone was found in the case of the stiffest hydrogel samples, whereas the aligned fiber structure also led to alignment in the new tissue. The fabrication method with two silk fibroin morphologies and electric field alignment was then used by the same group to fabricate gradient hydrogels [132]. In further detail, horseradish crosslinking times and resulting gradient mechanical properties were investigated. The distribution of β -sheet rich silk fibroin nanofibers in the scaffolds also led not only to changed material stiffness but also to gradient pore structures resembling that of native tissue. In cell culture studies, the construct's properties translated into tissue-specific differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, whereas the soft part induced chondro-related genes, gradually triggering bone formation towards the stiffer end of the scaffold, which was also confirmed in *in vivo* studies.

In another double silk approach, Liu et al. [133] used silk fibroin solutions, which were first autoclaved to induce nanoparticle formation (in the range of 50–300 nm), then embedded in silk fibroin solutions, followed by freeze-drying to form 3D sponges. To stabilize structures in an aqueous environment, low-molecular weight PEG solutions were used to induce β -sheet formation. Nanoparticles could be extracted, yielding cavities and pores in the scaffold. This generated pore structure introduced permeability and flexibility compared to silk sponges without particle loading. After methanol annealing, better cell adhesion, distribution and growth on scaffolds were observed. In general, particle-loaded constructs, especially with bioceramics, have the potential to support bone tissue engineering due to their pre-mineralization, which is discussed in detail in the section below.

5.1.2. Microcarriers for Bone Tissue Engineering

Microcarriers based on silk fibroin and gelatine were fabricated in a top-down approach for bone tissue engineering as injectable units or building blocks for scaffolds (Figure 6) [134]. With a microfluidic asymmetric flow-focusing device, carriers of about 100–350 μm were produced depending on the flow rate ratio of the aqueous and separation oil phase also containing methanol. The material blend was tested as 2D films and 3D microcarriers in rat mesenchymal stem cell culture. With increasing proportion of gelation from 25 to 50 to 75 wt.%, increasing cell adhesion was found. This trend was similarly confirmed for the carrier's mechanical properties, as both higher blend situations were in the range of 183 kPa and 139 kPa, respectively, values which are also described for the osteoid region, where pre-osteoblast differentiation takes place.

5.1.3. Biomineralized Scaffolds Using Specific Mineralization Tags

As a template for biomineralization, natural spider silk fibers were collected from adult females of *Cupiennius salei*. Biomineralization of dragline silk fibers took place upon subsequent incubation in calcium hydroxide containing solution, followed by incubation in diluted phosphoric acid. The procedure was also used the other way round as reversed biomineralization, and further, both solutions were incubated on the fibers simultaneously (Figure 7). Biomimetic hybrid materials were yielded with controlled hydroxyapatite deposition, forming a homogenous coating on the fibers. The best mineralization results were obtained upon initial incubation in calcium-containing solutions, as silk fibers were assumed to interact with the cations and induce higher mineralization with less calcium-deficient hydroxyapatite. Mechanical characterization of the mineralized fibers showed similar strength, toughness and Young's Modulus in comparison to the natural supercontracted fibers [110].

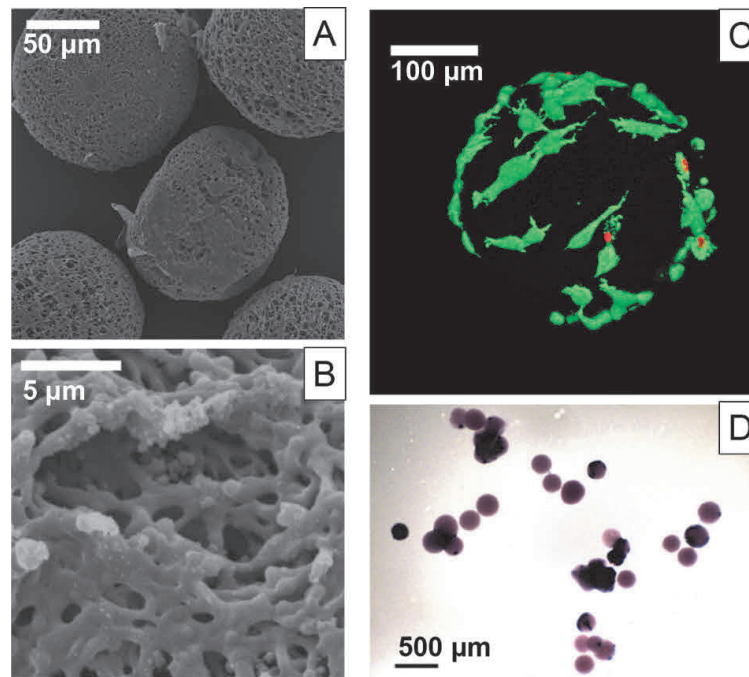


Figure 6. (A) Scanning electron microscopy images of blend hydrogel microcarriers using *Bombyx mori* silk fibroin and porcine gelatine at a 3:1 ratio and asymmetric flow focusing in a microfluidic preparation method and (B) surface micro-topography at higher magnification. (C) Rat mesenchymal stem cells on hydrogel microcarriers visualized using confocal microscopy after 96 h in live/dead staining (dead cells in red, living cells in green) and (D) after 28 days. Purple coloring indicates alkaline phosphatase activity of differentiated osteoblasts. Reprinted and adopted with permission from ref. [134]. Copyright 2020 Elsevier.

Smaller fibers in the sub-micron range were produced using electrospinning of *B. mori* silk fibroin out of formic acid and HFIP mixtures into an ethanol bath for instant crosslinking by β -sheet formation. Freeze-drying of the multilayer yielded a 3D fibrous scaffold, and biomineralization was induced upon incubation in two-fold Simulated Body Fluid for up to 28 days. Imaging of the interconnected pores and the increase in fiber diameter allowed an estimation of the ongoing mineral deposition. The effect of the mineralized layers was investigated in vitro using bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) and in vivo in rat cranial defect models. More migrated cells next to the newly formed bone and capillaries confirmed bone regeneration ability of these biomimetic scaffolds [135]. Strong, ductile and lightweight materials were gained upon self-assembly of silk fibroin nanofibers from an aqueous solution. In further processing steps, biomineralization was initiated out of calcium chloride and sodium dihydrogen phosphate solutions before chitin nanofibers were introduced in a hierarchical assembly. Mechanical characterization of the scaffolds revealed a very lightweight material like aerogels but with high compressive strength of up to more than 400 MPa [136].

Further, biomineralization was directed through silk components. Therefore, silk extracted sericin was added to dense collagen hydrogels. Due to the sericin's negative charge resulting from amino acid residues such as aspartic and glutamic acid, hydroxyapatite formation could be induced. This acellular mineralization process in Simulated Body Fluid yielded minerals after 3 days, with an ongoing process until 14 days resulting in 90 wt.% mineral phase. SEM, energy-dispersive X-ray spectroscopy and X-ray diffraction studies showed distinct spherulite particles. Mesenchymal stem cells were seeded on mineralized

sericin-containing collagen hydrogels, and an osteogenic upregulation was observed in metabolic activity [137].

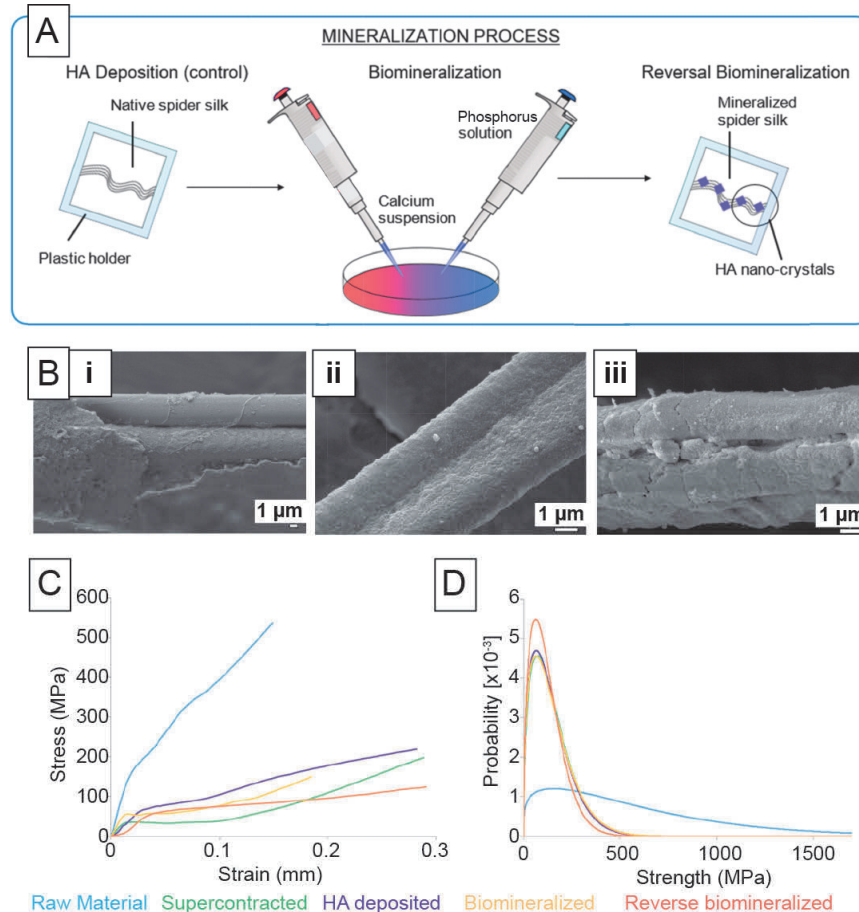


Figure 7. (A) Schematic illustration of the mineralization process of natural *Cupiennius salei* spider silk fibers. (B) Scanning electron microscopy images of mineralized silk fibers after (i) 1 day of biom mineralization and day 3 (ii) and 7 (iii) of reversal biom mineralization. Mechanical characterization of fibers in (C) stress-strain plots and (D) Weibull probability distribution as parameter for homogenous fracture behavior. HA = hydroxyapatite. Reprinted and adopted with permission from ref. [110]. Copyright 2020 John Wiley and Sons.

However, biotechnology allows for tailoring recombinant peptides and proteins, and silk proteins were combined with explicit peptide tags on the DNA level to trigger mineralization processes. Engineered sequences from *N. clavipes* dragline silk MaSp1 were C- or/and N-terminally hybridized with the hydroxyapatite binding peptide VTKHLNQLSQSY, which was identified via phage display. Films processed out of these proteins were immersed in calcium chloride and sodium phosphate solutions. Mineral formation, as well as human mesenchymal stem cell differentiation, were especially enhanced in the case of double functionalized constructs [60]. The same silk consensus sequence was functionalized with a bone sialoprotein motif to introduce non-collagenous moieties. In this case, silk films were mineralized in female mice in vivo. At first, a mild inflammatory response could be observed using flow cytometry and also histology, but after 6 weeks, inflammation markers decreased. Finally, no capsule formation was observed [71].

In another approach, recombinant spider silk fusion proteins were engineered with different mineralization and collagen-binding motifs from non-collagenous proteins in

bone. Proteins with N- and C-terminal peptide tags were compared concerning their mineralization ability in Simulated Body Fluid and their interaction with MC3T3 E1 mouse pre-osteoblasts. The variants showed mineralization tendency to a different extent but confirmed the formation of calcium and phosphate-containing species. Studying cell adhesion on materials of the protein variants separately, no significant favor of one variant over the other could be observed. However, when processing two materials into a gradient, cell adhesion towards the collagen-binding motif was clearly favored over the mineralization variant and could be maintained for 21 days. Therefore, these materials are also suitable candidates for applications at the tendon-bone-interface [72].

5.1.4. Biomineralization of Scaffolds Using Pre-Mineralization

In one example, 1–10 wt.% alumina nanoparticles were added to 4 wt.% silk solutions, and this emulsion was then lyophilized [111]. Additional mineralization was achieved upon incubation of the scaffolds in Simulated Body Fluid [61] for 28 days, forming an apatite layer in all constructs. The cell attachment of rabbit adipose-derived stem cells was not significantly changed with varying alumina content as this material was already reported to be bioinert, leading to the assumption that mechanical and structural cues were affected by the particles. Osteogenic upregulation in an initial stage was found starting at day 7 using alkaline phosphatase activity and Alizarin red staining of the cultures.

Another lyophilized scaffold comprised silk fibroin titanium dioxide and fluoridated titanium dioxide nanoparticles [138]. Particles acted as bioceramic reinforcement for compressive load. As the compressive modulus is often related to particle content, calculations and experimental data were collected. Both approaches were in good agreement with each other and showed open honeycomb structures in the constructs with a compressive modulus of up to 1.297 ± 0.175 MPa in the presence of 20 wt.% TiO₂.

Magnesium oxide nanoparticle-containing scaffolds at 15/20/25 wt.% were fabricated upon electrospinning of silk fibroin and PCL at a 4:1 *w/w* ratio [139]. Increasing amounts of nanoparticles lead to higher fiber diameters, respectively 651 nm/1055 nm/1251 nm, with visibly entrapped particles. At higher amounts of inorganic fillers, water contact angles decreased (below 30°), turning the materials more hydrophilic and favorable for cells. In comparison, no significant differences between particle-loaded fiber meshes were found concerning cytotoxicity for MC3T3 E1 mouse pre-osteoblast cells. The cumulative release of Mg²⁺ from the meshes reached a plateau after about 15 days. The ion release is often related to osteogenic differentiation and was confirmed with extracts from fiber mats after 21 days using both Alizarin Red and alkaline phosphatase staining. In vivo studies in rat calvarial defects revealed a significant enhancement of bone regeneration using nanofibrous membranes loaded with magnesium oxide particles in the twelfth week post-surgery.

As actuation and dynamic cultures are improving bone regeneration, magnetic particles were incorporated inside silk fibroin scaffolds [140]. Scaffolds were soaked in biomineralization solutions, and Ca/P containing species were obtained. Vibrating Sample Magnetometry was used to characterize magnetic properties, especially for further evaluation of proliferation of MC3T3 E1 cells upon stimulation using a magnetic field. In general, cells grew randomly in the absence and clustered in the presence of a magnetic influence.

Graphene oxide has also been added to silk fibroin solutions, followed by lyophilization. In one study, 3D porous silk fibroin/graphene oxide constructs were freeze-dried from solution, and the graphene oxide induced wrinkled surface nanotopographies [141]. Further, its incorporation into scaffolds decreased the diameter of the interconnected pores from 25–60 nm to 10–30 nm. The compressive modulus was independent of the graphene oxide concentration and ranged between 1.5–2 MPa for 3–10 wt.%. Water uptake is a critical factor for cell compatibility and was found to be related to graphene oxide content. Further, water uptake was also crucial for in vitro biomineralization in Simulated Body Fluid. Although mineralization commenced from day 7 to 14, the crystal morphology in the pores changed towards larger and smoother crystals. In a second approach, the synergistic

or individual effect of graphene oxide with β -tricalcium phosphate in a lyophilized silk fibroin/soy protein blend scaffold was studied concerning osteoconductivity [112]. Both particle types influenced mechanical properties in the range of 1 MPa. In vitro biomineralization was induced in Simulated Body Fluid for 14 days, and rather small crystals were found covering the whole construct's surface. Both scaffolds with particles exhibited more minerals than protein blend scaffolds on their own, however, nanocrystal deposition was increased in the presence of graphene oxide only. Alkaline phosphatase activity of rat bone marrow mesenchymal stem cells was highest at day 5, whereas RUNX2 expression as osteogenesis-related gene marker increased until day 14. Osteocalcin expression, as a marker of late osteoblastic differentiation, also increased up to day 14, indicating that the material was suitable for long-term bone regeneration processes. A third filler material was achieved using silk fibroin freeze-dried scaffolds and particles made of nanohydroxyapatite and graphene oxide [113]. Scaffolds with both particle types showed oriented pore structure, similar to lamellae or channels, which was not observed in the other studies. Channel structures were fabricated using a directional temperature field freezing technology, where only one side of the scaffold was exposed to a cold surface and gradually frozen until the fixed structure was freeze-dried. Both oriented and unoriented double-filled materials were fabricated (Figure 8). Mechanical properties were in the kPa range and, therefore, lower than in the two aforementioned studies. Regarding biomineralization, enzyme-directed mineralization was analyzed using alkaline phosphatase activity from bone marrow mesenchymal stem cells. Interestingly, the highest cell viability, and proliferation was found in the case of oriented double-loaded constructs, whereas unoriented constructs showed even lower signals than silk fibroin scaffolds with nanohydroxyapatite only. Besides osteogenic differentiation, the ability was studied to provide structures for vascularization. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) seeded on the 3D scaffolds migrated preferentially into the aligned channel-like structures as they might sense orientation similar to blood vessels.

For all studies, no phase separation between fillers and silk was observed, indicating good compatibility between the material types. Only at very high filler content, particle aggregates were observed.

5.2. Teeth and Mandible Tissue Engineering

State of the art for the regeneration of hard tissue in the mouth is placing implants at the defect location, which need to integrate well at the implantation site. However, it is important to remain the tooth socket for implants, which is rather relating to bone regeneration than teeth themselves. First approaches into this field of application were realized using *B. mori* silk fibroin based scaffolds, prepared via freeze-drying and studied to preserve the jaw ridge [142]: An appropriate rate of material resorption was found for silk fibroin scaffolds with pore sizes around 200 nm and nano-hydroxyapatite reinforcements, which were additionally mineralized in vitro. These scaffolds showed osteogenic differentiation in pre-osteoblast MC3T3 E1 cells after 21 days. Further, the interaction with human bone marrow stromal cells showed good biocompatibility [142].

Another study focused on culturing stem cells from human exfoliated deciduous teeth on silkworm sponges prepared from cocoon cuts. Cell proliferation could be confirmed, but scaffolds for endodontic repair, which can simulate dynamic dental pulp repair, are still at the beginning to commence the field [115].

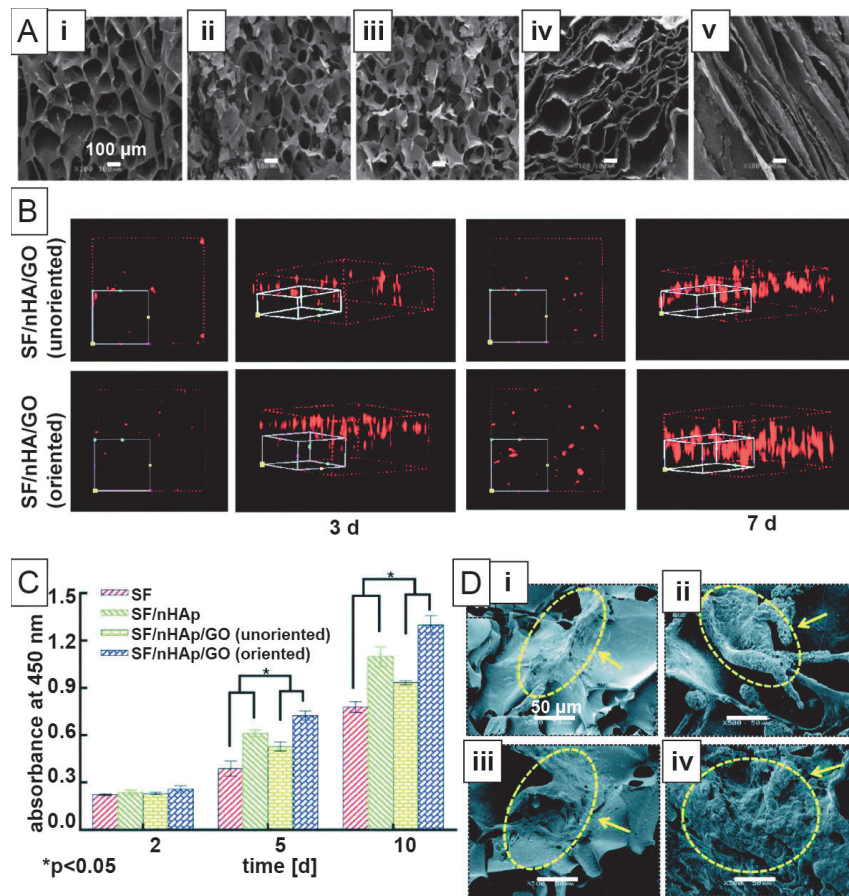


Figure 8. (A) Scanning electron microscopy images of lyophilized foam-like scaffolds with different orientation made of plain *Bombyx mori* silk fibroin (i), foams loaded with hydroxyapatite nanoparticles (ii), foams loaded with hydroxyapatite and graphene oxide nanoparticles in unoriented structures (iii), with directional structuring in cross-section (iv) and in longitudinal ones (v). (B) 3D Confocal microscopy images of HUVEC cells in unoriented and oriented foams loaded with hydroxyapatite nanoparticles and graphene oxide nanoparticles after 3 and 7 days. Scale bar not indicated. (C) Cell viability assay for bone mesenchymal stem cells after 2, 5 and 10 days. (D) Scanning electron microscopy images of bone mesenchymal stem cells in lyophilized foam-like scaffolds after 10 days for (i) silk fibroin, (ii) foams loaded with hydroxyapatite nanoparticles loaded with hydroxyapatite and graphene oxide nanoparticles without (iii) and with (iv) directional structuring. SF = silk fibroin, nHA = hydroxyapatite nanoparticles, GO = graphene oxide. Reprinted and adopted with permission from ref. [113]. Copyright 2020 Royal Society of Chemistry.

5.3. Tissue Engineering of Bone Neighbouring Hard Tissues

Osteochondral defects can be caused by trauma, tumor resection or osteoporosis and can lead to bone loss, osteoarthritis and even full tissue dysfunction when not treated. Scaffolds used for osteochondral defects often show hierarchical arrangement of chondral and bone bilayers. One example of scaffolds are blends of bacterial cellulose with silk fibroin in an interpenetrating hydrogel to create artificial cartilage [143]. Bacterial cellulose spongy cubes were prepared, squeezed to dry, and silk solutions were soaked in. MC3T3 cell cultures showed the best proliferation on plain silk fibroin, followed by the blended scaffold and finally the cellulose sponge.

Ribeiro et al. [114] crosslinked silk fibroin with horseradish peroxidase as subchondro-layer and a tricalcium phosphate bone-like layer in a bilayered structure. The scaffolds showed homogenous porosity with macro- and micropore sizes (500 and 10 μm) for the

regions with denser structures when mineralized with tricalcium phosphate. Human osteoblasts from femoral bone tissue and human articular chondrocytes were seeded on the scaffolds, and tissue distinct expression patterns were found on the bilayered regions in case of the flexible subchondral and supportive bone region.

In a trilayered scaffold, a cartilage layer, a calcified transition layer and a bony layer were generated upon the addition of nanohydroxyapatite and paraffin-spheres [144]. First, hydroxyapatite in silk solution with paraffin was cast and frozen. Then, on top of the construct, the silk solution was applied and exposed to a cold cylinder using a temperature gradient-guided thermal-induced phase separation technique. After leaching of the paraffin spheres, a lamellar structure in the chondral part, round cavities in the bony part, and an intermediate layer were formed (Figure 9). Adipose-derived stromal cells were seeded on the scaffolds, and both sides had cell favorable structures with lamellae, round pores or cavities. Upon induction of differentiation using respective chondral and bone factors, glycosaminoglycans and collagen type II were found in oriented structures indicating chondrogenic differentiation. In the same manner, bone-related matrix content was found, such as calcium and collagen type I in bone pore structures.

Having confirmed to be able to control differentiation towards the desired tissues based on structural cues, these scaffolds were then applied for rabbit bone repair in the knee, with and without pre-cell seeding [145]. Defect evaluation took place 4, 8 and 12 weeks after implantation. At all points of evaluation, surface roughness and integrity, bone smoothness and genetic upregulation were higher when cells were already present in the scaffold. However, neither bone strength nor quality was affected thereby.

Neighboring tissues towards bone such as tendon or cartilage can also exhibit mineralized regions in a gradual manner. This gradual change in composition and mechanical properties hinders crack propagation and allows a uniform transmission of loads. Qian et al. [109] fabricated structures from collagen type I and silk fibroin with increasingly aligned structures, generated using unidirectional freezing for application at the tendon-to-bone interface. Aligned collagen structures with knitted silk fibers exhibited the highest order. Implantation into rats showed that rather unoriented structures were favored for bone repair, whereas aligned structures triggered tendon regeneration. Therefore, the optimum structural combination still has to be found, as complex processes are interacting at the joint between two tissues.

Bradner et al. [146] fabricated microfibers out of silk fibroin hydrogels with additional functionalization using bovine serumalbumin and a bio-silica precursor peptide. Biom mineralization is required at the tendon-to-bone insertion to transmit loads on mineralized fibrils. Silk at 5 wt.% and BSA at 0.2 wt.% resembled the natural ratio of collagen-to-elastin in the tendon. Fibers were extruded and enzymatically crosslinked using horseradish peroxidase, followed by thermal post-treatment. Fibers were braided or twisted by hand. Fiber toughness was increased up to $125.4 \pm 3.50 \text{ Jm}^{-2}$ upon the addition of BSA. An explanation for this behavior could be the presence of additional sacrificial bonds, which break before the structure collapses. Pre- and post-strained silk-BSA samples showed a hierarchy-enabling microstructural rearrangement.

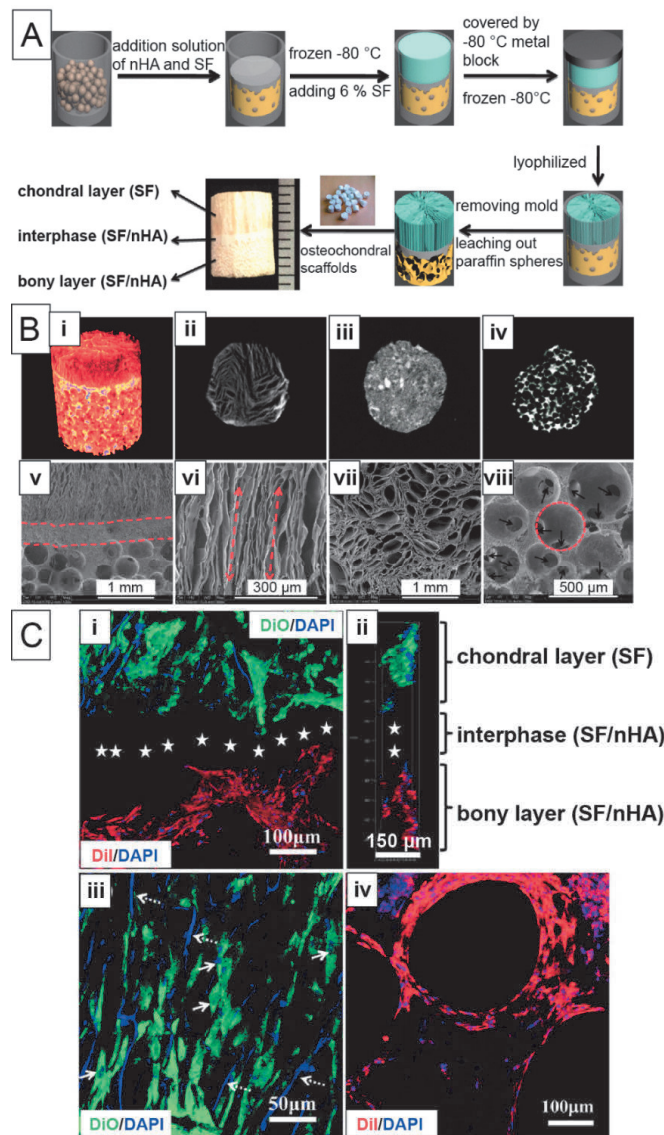


Figure 9. (A) Illustration of a trilayer (e.g., chondral, interphase and bony layer) scaffold preparation process using *Bombyx mori* silk. (B) Micro-CT (μ CT) and scanning electron microscopy (SEM) images of the individual layers in the scaffold: (i) μ CT of the full construct, (ii) μ CT of the chondral layer (top), (iii) interphase, (iv) bony layer (bottom), and (v) SEM of a longitudinal section of the full construct (red lines indicate interphases), (vi) of a longitudinal section of the chondral layer (red arrows indicate orientation), (vii) of cross-sections of the chondral layer, (viii) of cross-sections of the bony layer (red circle indicate a macropore and black arrows connections between pores). (C) Confocal microscopy images of trilayer scaffolds of rabbit adipose-derived stroma cells after 3 d in (i) longitudinal section and (ii) profile view with magnifications of (iii) the chondral layer and (iv) the bony layer. Blue staining indicates cell nuclei (DAPI), green and red staining cell membranes (DiO, DiI) confirming the interphase as an isolation layer. White solid arrows indicate stained cell nuclei, white dashed arrows indicate unspecific staining, white stars indicate the cell-free intermediate layer. SF = silk fibroin, nHA = hydroxyapatite nanoparticles. Reprinted and adopted with permission from ref. [144]. Copyright 2014 American Chemical Society.

6. Outlook

Major biomaterials in the current global orthopedic market are collagen, hydroxyapatite, calcium phosphates, calcium sulfate and hyaluronic acids [147]. While there are no silk-based products in the field of hard tissue engineering available up until now, recent strategies have shown the eligibility of such materials for hard tissue engineering. Tailor-made solutions for patients will enable personalized medicine, and therein individual requirements for defect solutions can be met. However, top-down strategies rely on construct fabrication, and various complex prerequisites need to be approached concerning the choice of material. Biodegradability is thereby of high importance with respect to non-toxic metabolites and material break down along with tissue regeneration. Hence, biomaterials such as silk-based ones are increasingly in the focus of interest for tissue engineering approaches as they are biocompatible, non-toxic and do not evoke a strong immune reaction by the recipient. Additionally, recombinant silks can be genetically fine-tuned and produced biotechnologically in a large scale. The processing of raw silk proteins into a wide range of morphologies such as particles, fibers, foams and hydrogels allows the coverage of scaffold complexity on various hierarchical levels. In hard tissue engineering, construct design relies to a high degree on the fulfillment of biological and mechanical prerequisites, some of which are based on proper mineralization. Biomimetic mineralization of silk scaffolds can be conveyed upon the introduction of binding sites to accumulate ions from the surrounding media. To our knowledge, currently no clinical studies containing silk-based materials are under way for hard tissue engineering. The available tools to modify and process these materials, as well as the presented promising research results, however, are key further developments. For example, silk screws (*B. mori*) applied as orthopedic fixtures, already successful in animal testing, show high potential for clinical trials [148,149]. Especially with the rise of additive manufacturing techniques and the need, as well as the possibility, for personalized scaffolds within hard tissue engineering, silk-based materials might soon take the next step towards an application.

Funding: This work was funded by Oberfrankenstiftung Project 05266 and DFG TRR 225 project number 326998133-TRR225 (funded subproject: C01 TS).

Acknowledgments: V.J.N. acknowledges the support of the Elite Network of Bavaria. The authors thank Elise Liensdorf for proof-reading of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Palmer, L.C.; Newcomb, C.J.; Kaltz, S.R.; Spoerke, E.D.; Stupp, S.I. Biomimetic Systems for Hydroxyapatite Mineralization Inspired by Bone and Enamel. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4754–4783. [[CrossRef](#)]
2. Beniash, E. Biominerals—hierarchical nanocomposites: The example of bone. *WIREs Nanomed. Nanobi.* **2011**, *3*, 47–69. [[CrossRef](#)]
3. Gower, L.B. Biomimetic Model Systems for Investigating the Amorphous Precursor Pathway and Its Role in Biomineralization. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4551–4627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Weiner, S.; Addadi, L. Crystallization Pathways in Biomineralization. In *Annual Review of Materials Research*; Clarke, D.R., Fratzl, P., Eds.; Annual Reviews: Palo Alto, CA, USA, 2011; Volume 41, pp. 21–40.
5. George, A.; Veis, A. Phosphorylated Proteins and Control over Apatite Nucleation, Crystal Growth, and Inhibition. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4670–4693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Anderson, H.C. Matrix vesicles and calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* **2003**, *5*, 222–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhang, T.; Lin, S.; Shao, X.; Zhang, Q.; Xue, C.; Zhang, S.; Lin, Y.; Zhu, B.; Cai, X. Effect of matrix stiffness on osteoblast functionalization. *Cell Prolif.* **2017**, *50*, e12338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Zioupos, P.; Kirchner, H.O.; Peterlik, H. Ageing bone fractures: The case of a ductile to brittle transition that shifts with age. *Bone* **2020**, *131*, 115176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Schmid, G.L.; Kühnast, B.; Heise, M.; Deutsch, T.; Frese, T. Ultrasonography in assessing suspected bone fractures: A cross-sectional survey amongst German general practitioners. *BMC Fam. Pract.* **2020**, *21*, 1–7. [[CrossRef](#)]
10. Li, J.; Qin, L.; Yang, K.; Ma, Z.; Wang, Y.; Cheng, L.; Zhao, D.W. Materials evolution of bone plates for internal fixation of bone fractures: A review. *J. Mater. Sci. Technol.* **2020**, *36*, 190–208. [[CrossRef](#)]
11. Langer, R.; Vacanti, J. Tissue engineering. *Science* **1993**, *260*, 920–926. [[CrossRef](#)]

12. Hoffman, T.; Khademhosseini, A.; Langer, R. Chasing the Paradigm: Clinical Translation of 25 Years of Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part A* **2019**, *25*, 679–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Mao, A.S.; Mooney, D.J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 14452–14459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ramos, T.; Moroni, L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2019: The Role of Biofabrication—A Year in Review. *Tissue Eng. Part C Methods* **2019**, *26*, 91–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Nichol, J.W.; Khademhosseini, A. Modular tissue engineering: Engineering biological tissues from the bottom up. *Soft Matter* **2009**, *5*, 1312–1319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Chen, P.; Zhou, Z.; Liu, W.; Zhao, Y.; Huang, T.; Li, X.; Duan, J.; Fang, J. Preparation and Characterization of Poly(L-lactide-co-glycolide-co- ϵ -caprolactone) Scaffolds by Thermally Induced Phase Separation. *J. Macromol. Sci. Part B* **2020**, *59*, 427–439. [[CrossRef](#)]
17. Januariyasa, I.K.; Yusuf, Y. Porous carbonated hydroxyapatite-based scaffold using simple gas foaming method. *J. Asian Ceram. Soc.* **2020**, *8*, 634–641. [[CrossRef](#)]
18. Judawisastra, H.; Nugraha, F.R.; Wibowo, U.A. Porous Architecture Evaluation of Silk Fibroin Scaffold from Direct Dissolution Salt Leaching Method. *Macromol. Symp.* **2020**, *391*, 1900187. [[CrossRef](#)]
19. Khoramgah, M.S.; Ranjbari, J.; Abbaszadeh, H.-A.; Mirakabad, F.S.T.; Hatami, S.; Hosseinzadeh, S.; Ghanbarian, H. Freeze-dried multiscale porous nanofibrous three dimensional scaffolds for bone regenerations. *BioImpacts* **2020**, *10*, 73–85. [[CrossRef](#)]
20. Madrid, A.P.M.; Vrech, S.M.; Sanchez, M.A.; Rodriguez, A.P. Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *100*, 631–644. [[CrossRef](#)]
21. Gaspar, V.M.; Lavrador, P.; Borges, J.; Oliveira, M.B.; Mano, J.F. Advanced Bottom-Up Engineering of Living Architectures. *Adv. Mater.* **2020**, *32*, e1903975. [[CrossRef](#)]
22. Elbert, D.L. Bottom-up tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 674–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Silva, A.S.; Santos, L.F.; Mendes, M.C.; Mano, J.F. Multi-layer pre-vascularized magnetic cell sheets for bone regeneration. *Biomaterials* **2020**, *231*, 119664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chuah, Y.J.; Tan, J.R.; Wu, Y.; Lim, C.S.; Hee, H.T.; Kang, Y.; Wang, D.-A. Scaffold-Free tissue engineering with aligned bone marrow stromal cell sheets to recapitulate the microstructural and biochemical composition of annulus fibrosus. *Acta Biomater.* **2020**, *107*, 129–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ahmad, T.; Byun, H.; Lee, J.; Perikamana, S.K.M.; Shin, Y.M.; Kim, E.M.; Shin, H. Stem cell spheroids incorporating fibers coated with adenosine and polydopamine as a modular building blocks for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2020**, *230*, 119652. [[CrossRef](#)]
26. Kronemberger, G.S.; Matsui, R.A.M.; Miranda, G.D.A.S.D.C.E.; Granjeiro, J.M.; Baptista, L.S. Cartilage and bone tissue engineering using adipose stromal/stem cells spheroids as building blocks. *World J. Stem Cells* **2020**, *12*, 110–122. [[CrossRef](#)]
27. Toda, S.; Frankel, N.W.; Lim, W.A. Engineering cell–cell communication networks: Programming multicellular behaviors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *52*, 31–38. [[CrossRef](#)]
28. Amaral, A.J.; Pasparakis, G. Cell membrane engineering with synthetic materials: Applications in cell spheroids, cellular glues and microtissue formation. *Acta Biomater.* **2019**, *90*, 21–36. [[CrossRef](#)]
29. Qu, M.; Jiang, X.; Zhou, X.; Wang, C.; Wu, Q.; Ren, L.; Zhu, J.; Zhu, S.; Tebon, P.; Sun, W.; et al. Stimuli-Responsive Delivery of Growth Factors for Tissue Engineering. *Adv. Health Mater.* **2020**, *9*, e1901714. [[CrossRef](#)]
30. Tang, J.D.; Mura, C.; Lampe, K.J. Stimuli-Responsive, Pentapeptide, Nanofiber Hydrogel for Tissue Engineering. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4886–4899. [[CrossRef](#)]
31. Fathi-Achachelouei, M.; Keskin, D.; Bat, E.; Vrana, N.E.; Tezcaner, A. Dual growth factor delivery using PLGA nanoparticles in silk fibroin/PEGDMA hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2019**, *108*, 2041–2062. [[CrossRef](#)]
32. Groll, J.; Boland, T.; Blunk, T.; Burdick, J.A.; Kim, Y.K.; Dalton, P.D.; Derby, B.; Forgacs, G.; Li, Q.; Mironov, V.A.; et al. Biofabrication: Reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication* **2016**, *8*, 013001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Moroni, L.; Boland, T.; Burdick, J.A.; De Maria, C.; Derby, B.; Forgacs, G.; Groll, J.; Li, Q.; Malda, J.; Mironov, V.A.; et al. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol.* **2018**, *36*, 384–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Divakar, D.D.; Jastaniyah, N.T.; Altamimi, H.G.; Alnakhli, Y.O.; Alkheraif, A.A.; Haleem, S. Enhanced antimicrobial activity of naturally derived bioactive molecule chitosan conjugated silver nanoparticle against dental implant pathogens. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *108*, 790–797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Nguyen, M.A.; Camci-Unal, G. Unconventional Tissue Engineering Materials in Disguise. *Trends Biotechnol.* **2020**, *38*, 178–190. [[CrossRef](#)]
36. Levato, R.; Jungst, T.; Scheuring, R.G.; Blunk, T.; Groll, J.; Malda, J. From Shape to Function: The Next Step in Bioprinting. *Adv. Mater.* **2020**, *32*, e1906423. [[CrossRef](#)]
37. Ghassemi, T.; Shahroodi, A.; Ebrahimzadeh, M.H.; Mousavian, A.; Movaffagh, J.; Moradi, A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *Arch. Bone Jt. Surg.* **2018**, *6*, 90–99.
38. Raquel Maia, F.; Correlo, V.M.; Oliveira, J.M.; Reis, R.L. Chapter 32—Natural Origin Materials for Bone Tissue Engineering: Properties, Processing, and Performance. In *Principles of Regenerative Medicine*, 3rd ed.; Atala, A., Lanza, R., Mikos, A.G., Nerem, R., Eds.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2019; pp. 535–558.

39. Wang, W.; Yeung, K.W. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact. Mater.* **2017**, *2*, 224–247. [[CrossRef](#)]
40. Souza, A.T.P.; Lopes, H.B.; Freitas, G.P.; Ferraz, E.P.; Oliveira, F.S.; Almeida, A.L.G.; Weffort, D.; Beloti, M.M.; Rosa, A.L. Role of embryonic origin on osteogenic potential and bone repair capacity of rat calvarial osteoblasts. *J. Bone Miner. Metab.* **2020**, *38*, 481–490. [[CrossRef](#)]
41. Vasquez-Sancho, F.; Abdollahi, A.; Damjanovic, D.; Catalan, G. Flexoelectricity in Bones. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1705316. [[CrossRef](#)]
42. Núñez-Toldrà, R.; Vasquez-Sancho, F.; Barroca, N.; Catalan, G. Investigation of The Cellular Response to Bone Fractures: Evidence for Flexoelectricity. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–10. [[CrossRef](#)]
43. Lin, C.-C.; Chang, W.H.-S.; Cheng, T.-M.; Chiu, L.-H.; Wang, Y.-H.; Lin, C.-A.J.; Ho, Y.-S.; Zuo, C.S.; Wang, Y.-M.; Lai, W.-F.T. Two new, near-infrared, fluorescent probes as potential tools for imaging bone repair. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Saha, S.; Pramanik, K.; Biswas, A. Silk fibroin coated TiO₂ nanotubes for improved osteogenic property of Ti6Al4V bone implants. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *105*, 109982. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Qin, T.; Li, X.; Long, H.; Bin, S.; Xu, Y. Bioactive Tetracalcium Phosphate Scaffolds Fabricated by Selective Laser Sintering for Bone Regeneration Applications. *Materials* **2020**, *13*, 2268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhou, J.; Gao, C.; Feng, P.; Xiao, T.; Shuai, C.; Peng, S. Calcium sulfate bone scaffolds with controllable porous structure by selective laser sintering. *J. Porous Mater.* **2015**, *22*, 1171–1178. [[CrossRef](#)]
47. Shuai, C.; Gao, C.; Nie, Y.; Hu, H.; Zhou, Y.; Peng, S. Structure and properties of nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering with a selective laser sintering system. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 285703. [[CrossRef](#)]
48. Duan, B.; Wang, M.; Zhou, W.Y.; Cheung, W.L.; Li, Z.Y.; Lu, W.W. Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 4495–4505. [[CrossRef](#)]
49. Simpson, R.L.; Wiria, F.E.; Amis, A.A.; Chua, C.K.; Leong, K.F.; Hansen, U.N.; Chandrasekaran, M.; Lee, M.W. Development of a 95/5 poly(L-lactide-co-glycolide)/hydroxylapatite and β -tricalcium phosphate scaffold as bone replacement material via selective laser sintering. *J. Biomed. Mater. Res. B* **2008**, *84B*, 17–25. [[CrossRef](#)]
50. Cox, S.C.; Thornby, J.A.; Gibbons, G.J.; Williams, M.A.; Mallick, K.K. 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *47*, 237–247. [[CrossRef](#)]
51. Ahn, M.-K.; Moon, Y.-W.; Maeng, W.-Y.; Koh, Y.-H.; Kim, H.-E. Design and Production of Continuously Gradient Macro/Microporous Calcium Phosphate (CaP) Scaffolds Using Ceramic/Camphene-Based 3D Extrusion. *Materials* **2017**, *10*, 719. [[CrossRef](#)]
52. Chow, L.C.; Takagi, S. A natural bone cement—A laboratory novelty led to the development of revolutionary new biomaterials. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **2001**, *106*, 1029–1033. [[CrossRef](#)]
53. Kretlow, J.D.; Mikos, A.G. Review: Mineralization of Synthetic Polymer Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 927–938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rho, J.; Kuhn-Spearing, L.; Zioupos, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med. Eng. Phys.* **1998**, *20*, 92–102. [[CrossRef](#)]
55. Currey, J.; Butler, G. The mechanical properties of bone tissue in children. *JBJS* **1975**, *57*, 810–814. [[CrossRef](#)]
56. Vogel, H.G. Influence of Maturation and Aging on Mechanical and Biochemical Parameters of Rat Bone. *Gerontology* **1979**, *25*, 16–23. [[CrossRef](#)]
57. Dunlop, J.W.C.; Fratzl, P. Biological Composites. In *Annual Review of Materials Research*; Clarke, D.R., Ruhle, M., Zok, F., Eds.; Annual Reviews: Palo Alto, CA, USA, 2010; Volume 40, pp. 1–24.
58. Hardy, J.G.; Torres-Rendon, J.G.; Leal-Egaña, A.; Walther, A.; Schlaad, H.; Cölfen, H.; Scheibel, T. Biomineralization of Engineered Spider Silk Protein-Based Composite Materials for Bone Tissue Engineering. *Materials* **2016**, *9*, 560. [[CrossRef](#)]
59. Lee, J.Y.; Choo, J.E.; Choi, Y.S.; Park, J.B.; Min, D.S.; Lee, S.J.; Rhyu, H.K.; Jo, I.H.; Chung, C.P.; Park, Y.J. Assembly of collagen-binding peptide with collagen as a bioactive scaffold for osteogenesis in vitro and in vivo. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4257–4267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Dinjaski, N.; Plowright, R.; Zhou, S.; Belton, D.J.; Perry, C.C.; Kaplan, D.L. Osteoinductive recombinant silk fusion proteins for bone regeneration. *Acta Biomater.* **2017**, *49*, 127–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Kokubo, T.; Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907–2915. [[CrossRef](#)]
62. Giachelli, C.M.; Steitz, S. Osteopontin: A versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol.* **2000**, *19*, 615–622. [[CrossRef](#)]
63. Jin, R.; Wang, Y.; Liu, Y.; Ding, C.; Xie, J.; Li, J. Biomineralization and osteogenic differentiation modulated by substrate stiffness. *Eur. Polym. J.* **2020**, *122*, 109395. [[CrossRef](#)]
64. Midha, S.; Kumar, S.; Sharma, A.; Kaur, K.; Shi, X.; Naruphontjirakul, P.; Jones, J.R.; Ghosh, S. Silk fibroin-bioactive glass based advanced biomaterials: Towards patient-specific bone grafts. *Biomed. Mater.* **2018**, *13*, 055012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Hench, L.L. The story of Bioglass[®]. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2006**, *17*, 967–978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Mertgen, A.-S.; Trossmann, V.T.; Guex, A.G.; Maniura-Weber, K.; Scheibel, T.; Rottmar, M. Multifunctional Biomaterials: Combining Material Modification Strategies for Engineering of Cell-Contacting Surfaces. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 21342–21367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Le Saux, G.; Magenau, A.; Böcking, T.; Gaus, K.; Gooding, J.J. The Relative Importance of Topography and RGD Ligand Density for Endothelial Cell Adhesion. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

68. Wohlrab, S.; Müller, S.; Schmidt, A.; Neubauer, S.; Kessler, H.; Leal-Egaña, A.; Scheibel, T. Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6650–6659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Bessa, P.C.; Balmayor, E.R.; Azevedo, H.S.; Nürnberger, S.; Casal, M.; Van Griensven, M.; Reis, R.L.; Redl, H. Silk fibroin microparticles as carriers for delivery of human recombinant BMPs. Physical characterization and drug release. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2010**, *4*, 349–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Bessa, P.C.; Casal, M.; Reis, R.L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: The road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2008**, *2*, 81–96. [[CrossRef](#)]
71. Gomes, S.; Gallego-Llamas, J.; Leonor, I.B.; Mano, J.F.; Reis, R.L.; Kaplan, D.L. In Vivo Biological Responses to Silk Proteins Functionalized with Bone Sialoprotein. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 444–454. [[CrossRef](#)]
72. Neubauer, V.J.; Scheibel, T. Spider Silk Fusion Proteins for Controlled Collagen Binding and Biomineralization. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 5599–5608. [[CrossRef](#)]
73. Yousaf, S.S.; Houacine, C.; Khan, I.; Ahmed, W.; Jackson, M.J. Chapter 11—Importance of biomaterials in biomedical engineering. In *Advances in Medical and Surgical Engineering*; Ahmed, W., Phoenix, D.A., Jackson, M.J., Charalambous, C.P., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 149–176.
74. Craig, C.L. Evolution of Arthropods Silks. *Annu. Rev. Entomol.* **1997**, *42*, 231–267. [[CrossRef](#)]
75. Andersson, M.; Johansson, J.; Rising, A. Silk Spinning in Silkworms and Spiders. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Hardy, J.G.; Scheibel, T.R. Production and processing of spider silk proteins. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2009**, *47*, 3957–3963. [[CrossRef](#)]
77. Eisoldt, L.; Smith, A.; Scheibel, T. Decoding the secrets of spider silk. *Mater. Today* **2011**, *14*, 80–86. [[CrossRef](#)]
78. Salehi, S.; Koeck, K.; Scheibel, T. Spider Silk for Tissue Engineering Applications. *Molecules* **2020**, *25*, 737. [[CrossRef](#)]
79. Pollini, M.; Paladini, F. Bioinspired Materials for Wound Healing Application: The Potential of Silk Fibroin. *Materials* **2020**, *13*, 3361. [[CrossRef](#)]
80. Melke, J.J.; Midha, S.; Ghosh, S.; Ito, K.; Hofmann, S. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* **2016**, *31*, 1–16. [[CrossRef](#)]
81. Umuhoza, D.; Yang, F.; Long, D.; Hao, Z.; Dai, J.; Zhao, A. Strategies for Tuning the Biodegradation of Silk Fibroin-Based Materials for Tissue Engineering Applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 1290–1310. [[CrossRef](#)]
82. Nagano, A.; Tanioka, Y.; Sakurai, N.; Sezutsu, H.; Kuboyama, N.; Kiba, H.; Tanimoto, Y.; Ma, S.; Asakura, T. Regeneration of the femoral epicondyle on calcium-binding silk scaffolds developed using transgenic silk fibroin produced by transgenic silkworm. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1192–1201. [[CrossRef](#)]
83. Saotome, T.; Hayashi, H.; Tanaka, R.; Kinugasa, A.; Uesugi, S.; Tatematsu, K.-I.; Sezutsu, H.; Kuwabara, N.; Asakura, T. Introduction of VEGF or RGD sequences improves revascularization properties of Bombyx mori silk fibroin produced by transgenic silkworm. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 7109–7116. [[CrossRef](#)]
84. Gomes, S.C.; Leonor, I.B.; Mano, J.F.; Reis, R.; Kaplan, D.L. Natural and genetically engineered proteins for tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 1–17. [[CrossRef](#)]
85. Huang, J.; Wong, C.; George, A.; Kaplan, D.L. The effect of genetically engineered spider silk-dentin matrix protein 1 chimeric protein on hydroxyapatite nucleation. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2358–2367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Mo, C.; Wu, P.; Chen, X.; Zheng, G. The effect of water on the conformation transition of Bombyx mori silk fibroin. *Vib. Spectrosc.* **2009**, *51*, 105–109. [[CrossRef](#)]
87. Arai, T.; Freddi, G.; Innocenti, R.; Tsukada, M. Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *91*, 2383–2390. [[CrossRef](#)]
88. Tucker, C.L.; Jones, J.A.; Bringhurst, H.N.; Copeland, C.G.; Addison, J.B.; Weber, W.S.; Mou, Q.; Yarger, J.L.; Lewis, R.V. Mechanical and Physical Properties of Recombinant Spider Silk Films Using Organic and Aqueous Solvents. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3158–3170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Spieß, K.; Wohlrab, S.; Scheibel, T. Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter* **2010**, *6*, 4168–4174. [[CrossRef](#)]
90. Ohgo, K.; Zhao, C.; Kobayashi, M.; Asakura, T. Preparation of non-woven nanofibers of Bombyx mori silk, Samia cynthia ricini silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method. *Polymer* **2003**, *44*, 841–846. [[CrossRef](#)]
91. Sukigara, S.; Gandhi, M.; Ayutsede, J.; Micklus, M.; Ko, F. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning—part 1: Processing parameters and geometric properties. *Polymer* **2003**, *44*, 5721–5727. [[CrossRef](#)]
92. Keirouz, A.; Fortunato, G.; Zhang, M.; Callanan, A.; Radacsi, N. Nozzle-free electrospinning of Polyvinylpyrrolidone/Poly(glycerol sebacate) fibrous scaffolds for skin tissue engineering applications. *Med. Eng. Phys.* **2019**, *71*, 56–67. [[CrossRef](#)]
93. DeSimone, E.; Aigner, T.B.; Humenik, M.; Lang, G.; Scheibel, T. Aqueous electrospinning of recombinant spider silk proteins. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *106*, 110145. [[CrossRef](#)]
94. Keirouz, A.; Zakharova, M.; Kwon, J.; Robert, C.; Koutsos, V.; Callanan, A.; Chen, X.; Fortunato, G.; Radacsi, N. High-throughput production of silk fibroin-based electrospun fibers as biomaterial for skin tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *112*, 110939. [[CrossRef](#)]

95. Lammel, A.; Schwab, M.; Slotta, U.; Winter, G.; Scheibel, T. Processing Conditions for the Formation of Spider Silk Microspheres. *ChemSusChem* **2008**, *1*, 413–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Jastrzebska, K.; Felcyn, E.; Kozak, M.; Szybowski, M.; Buchwald, T.; Pietralik, Z.; Jesionowski, T.; Mackiewicz, A.; Dams-Kozłowska, H. The method of purifying bioengineered spider silk determines the silk sphere properties. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Rajkhowa, R.; Hu, X.; Tsuzuki, T.; Kaplan, D.L.; Wang, X. Structure and Biodegradation Mechanism of Milled Bombyx mori Silk Particles. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2503–2512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Cao, Z.; Chen, X.; Yao, J.; Huang, L.; Shao, Z. The preparation of regenerated silk fibroin microspheres. *Soft Matter* **2007**, *3*, 910–915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Herold, H.M.; Döbl, A.; Wohlrab, S.; Humenik, M.; Scheibel, T. Designed Spider Silk-Based Drug Carrier for Redox- or pH-Triggered Drug Release. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 4904–4912. [[CrossRef](#)]
100. Maniglio, D.; Bonani, W.; Migliaresi, C.; Motta, A. Silk fibroin porous scaffolds by N₂O foaming. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2018**, *29*, 491–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Lv, Q.; Feng, Q. Preparation of 3-D regenerated fibroin scaffolds with freeze drying method and freeze drying/foaming technique. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **2006**, *17*, 1349–1356. [[CrossRef](#)]
102. Schacht, K.; Vogt, J.; Scheibel, T. Foams Made of Engineered Recombinant Spider Silk Proteins as 3D Scaffolds for Cell Growth. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 517–525. [[CrossRef](#)]
103. Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 18–23. [[CrossRef](#)]
104. Schacht, K.; Jungst, T.; Schweinlin, M.; Ewald, A.; Groll, J.; Scheibel, T. Biofabrication of Cell-Loaded 3D Spider Silk Constructs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2816–2820. [[CrossRef](#)]
105. Chameettachal, S.; Midha, S.; Ghosh, S. Regulation of Chondrogenesis and Hypertrophy in Silk Fibroin-Gelatin-Based 3D Bioprinted Constructs. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 1450–1463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Wang, Y.; Zheng, Z.; Cheng, Q.; Kaplan, D.L.; Li, G.; Wang, X. Ductility and Porosity of Silk Fibroin Films by Blending with Glycerol/Polyethylene Glycol and Adjusting the Drying Temperature. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *6*, 1176–1185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Sartika, D.; Hsin, W.C.; Wang, D.-H.; Cherng, J.-H.; Chang, S.-J.; Fan, G.-Y.; Wang, Y.-W.; Lee, C.-H.; Hong, P.-D.; Wang, C. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells-Incorporated Silk Fibroin as a Potential Bio-Scaffold in Guiding Bone Regeneration. *Polymers* **2020**, *12*, 853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Dorishetty, P.; Balu, R.; Athukoralalage, S.S.; Greaves, T.L.; Mata, J.; De Campo, L.; Saha, N.; Zannettino, A.C.W.; Dutta, N.K.; Choudhury, N.R. Tunable Biomimetic Hydrogels from Silk Fibroin and Nanocellulose. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 2375–2389. [[CrossRef](#)]
109. Qian, S.; Wang, Z.; Zheng, Z.; Ran, J.; Zhu, J.; Chen, W. A Collagen and Silk Scaffold for Improved Healing of the Tendon and Bone Interface in a Rabbit Model. *Med. Sci. Monit.* **2019**, *25*, 269–278. [[CrossRef](#)]
110. Dellaquila, A.; Greco, G.; Campodoni, E.; Mazzocchi, M.; Mazzolai, B.; Tampieri, A.; Pugno, N.M.; Sandri, M. Optimized production of a high-performance hybrid biomaterial: Biomineralized spider silk for bone tissue engineering. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *137*, 48739. [[CrossRef](#)]
111. Zafar, B.; Mottaghitalab, F.; Shahosseini, Z.; Negahdari, B.; Farokhi, M. Silk fibroin/alumina nanoparticle scaffold using for osteogenic differentiation of rabbit adipose-derived stem cells. *Materials* **2020**, *9*, 100518. [[CrossRef](#)]
112. Liu, F.; Liu, C.; Zheng, B.; He, J.; Liu, J.; Chen, C.; Lee, I.-S.; Wang, X.; Liu, Y. Synergistic Effects on Incorporation of β -Tricalcium Phosphate and Graphene Oxide Nanoparticles to Silk Fibroin/Soy Protein Isolate Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Polymer* **2020**, *12*, 69. [[CrossRef](#)]
113. Wang, L.; Fang, M.; Xia, Y.; Hou, J.; Nan, X.; Zhao, B.; Wang, X. Preparation and biological properties of silk fibroin/nano-hydroxyapatite/graphene oxide scaffolds with an oriented channel-like structure. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 10118–10128. [[CrossRef](#)]
114. Ribeiro, V.P.; Pina, S.; Costa, J.B.; Cengiz, I.F.; García-Fernández, L.; Fernández-Gutiérrez, M.d.M.; Paiva, O.C.; Oliveira, A.L.; San-Román, J.; Oliveira, J.M.; et al. Enzymatically Cross-Linked Silk Fibroin-Based Hierarchical Scaffolds for Osteochondral Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 3781–3799. [[CrossRef](#)]
115. Collado-González, M.; Pecci-Lloret, M.P.; García-Bernal, D.; Aznar-Cervantes, S.D.; Oñate-Sánchez, R.E.; Moraleta, J.M.; Cenis, J.L.; Rodríguez-Lozano, F.J. Biological effects of silk fibroin 3D scaffolds on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs). *Odontology* **2018**, *106*, 125–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Wang, Q.-S.; Han, G.-C.; Yan, S.-Q.; You, R.-C.; Zhang, Q. Facile Preparation of Silk Fibroin Scaffold Via Direct Solvent Exchange. *J. Fiber Bioeng. Inform.* **2020**, *13*, 13–21.
117. Siavashani, A.Z.; Mohammadi, J.; Rottmar, M.; Senturk, B.; Nourmohammadi, J.; Sadeghi, B.; Huber, L.; Maniura-Weber, K. Silk fibroin/sericin 3D sponges: The effect of sericin on structural and biological properties of fibroin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *153*, 317–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Xingtong, L.; Zhentao, W.; Tingting, D.; Hongbo, G.; Juan, G. Hydrogels from silk fibroin and multiarmed hydrolyzed elastin peptide. *Surf. Innov.* **2020**, *8*, 216–223.
119. Wu, N.; Yu, H.; Sun, M.; Li, Z.; Zhao, F.; Ao, Y.; Chen, H. Investigation on the Structure and Mechanical Properties of Highly Tunable Elastomeric Silk Fibroin Hydrogels Cross-Linked by γ -Ray Radiation. *ACS Appl. Biomater.* **2019**, *3*, 721–734. [[CrossRef](#)]

120. Laomeephol, C.; Guedes, M.; Ferreira, H.; Reis, R.L.; Kanokpanont, S.; Laomeephol, C.; Neves, N.M. Phospholipid-induced silk fibroin hydrogels and their potential as cell carriers for tissue regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2020**, *14*, 160–172. [[CrossRef](#)]
121. Nguyen, T.T.; Ratanavaraporn, J.; Yodmuang, S. Alginate-silk fibroin Bioink: A printable hydrogel for tissue engineering. In Proceedings of the 2019 12th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON), Ubon Ratchathani, Thailand, 19–22 November 2019; pp. 1–4.
122. Sharma, A.; Desando, G.; Petretta, M.; Chawla, S.; Bartolotti, I.; Manferdini, C.; Paoletta, F.; Gabusi, E.; Trucco, D.; Ghosh, S.; et al. Investigating the Role of Sustained Calcium Release in Silk-Gelatin-Based Three-Dimensional Bioprinted Constructs for Enhancing the Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5*, 1518–1533. [[CrossRef](#)]
123. Huemmerich, D.; Helsen, C.W.; Quedzuweit, S.; Oschmann, J.; Rudolph, A.R.; Scheibel, T. Primary Structure Elements of Spider Dragline Silks and Their Contribution to Protein Solubility. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13604–13612. [[CrossRef](#)]
124. Schacht, K.; Scheibel, T. Controlled Hydrogel Formation of a Recombinant Spider Silk Protein. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2488–2495. [[CrossRef](#)]
125. DeSimone, E.; Schacht, K.; Scheibel, T. Cations influence the cross-linking of hydrogels made of recombinant, polyanionic spider silk proteins. *Mater. Lett.* **2016**, *183*, 101–104. [[CrossRef](#)]
126. DeSimone, E.; Schacht, K.; Jungst, T.; Groll, J.; Scheibel, T. Biofabrication of 3D constructs: Fabrication technologies and spider silk proteins as bioinks. *Pure Appl. Chem.* **2015**, *87*, 737–749. [[CrossRef](#)]
127. DeSimone, E.; Schacht, K.; Pellert, A.; Scheibel, T. Recombinant spider silk-based bioinks. *Biofabrication* **2017**, *9*, 044104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Thamm, C.; DeSimone, E.; Scheibel, T. Characterization of Hydrogels Made of a Novel Spider Silk Protein eMaSp1s and Evaluation for 3D Printing. *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Kumari, S.; Bargel, H.; Scheibel, T. Recombinant Spider Silk-Silica Hybrid Scaffolds with Drug-Releasing Properties for Tissue Engineering Applications. *Macromol. Rapid Commun.* **2019**, *41*, e1900426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Kumari, S.; Bargel, H.; Anby, M.U.; LaFargue, D.; Scheibel, T.; LaFargue, D. Recombinant Spider Silk Hydrogels for Sustained Release of Biologicals. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 1750–1759. [[CrossRef](#)]
131. Ding, Z.; Lu, G.; Cheng, W.; Xu, G.; Zuo, B.; Lu, Q.; Kaplan, D.L. Tough Anisotropic Silk Nanofiber Hydrogels with Osteoinductive Capacity. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 2357–2367. [[CrossRef](#)]
132. Xu, G.; Ding, Z.; Lu, Q.; Zhang, X.; Zhou, X.; Xiao, L.; Lv, G.; Kaplan, D.L. Electric field-driven building blocks for introducing multiple gradients to hydrogels. *Protein Cell* **2020**, *11*, 267–285. [[CrossRef](#)]
133. Liu, J.; Chen, H.; Wang, Y.; Li, G.; Zheng, Z.; Kaplan, D.L.; Wang, X. Flexible Water-Absorbing Silk-Fibroin Biomaterial Sponges with Unique Pore Structure for Tissue Engineering. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 1641–1649. [[CrossRef](#)]
134. Luetchford, K.A.; Chaudhuri, J.B.; De Bank, P.A. Silk fibroin/gelatin microcarriers as scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *106*, 110116. [[CrossRef](#)]
135. Li, Z.; Chu, D.; Gao, Y.; Jin, L.; Zhang, X.; Cui, W.; Li, J. Biomimicry, biomineralization, and bioregeneration of bone using advanced three-dimensional fibrous hydroxyapatite scaffold. *Mater. Today Adv.* **2019**, *3*, 100014. [[CrossRef](#)]
136. Zhang, W.; Zheng, K.; Ren, J.; Fan, Y.; Ling, S. Strong, ductile and lightweight bionanocomposites constructed by bioinspired hierarchical assembly. *Compos. Commun.* **2020**, *17*, 97–103. [[CrossRef](#)]
137. Griffanti, G.; Jiang, W.; Nazhat, S.N. Bioinspired mineralization of a functionalized injectable dense collagen hydrogel through silk sericin incorporation. *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 1064–1077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Johari, N.; Hosseini, H.R.M.; Samadikuchaksaraei, A. Mechanical modeling of silk fibroin/TiO₂ and silk fibroin/fluoridated TiO₂ nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Iran. Polym. J.* **2020**, *29*, 219–224. [[CrossRef](#)]
139. Xing, X.; Cheng, G.; Yin, C.; Cheng, X.; Cheng, Y.; Ni, Y.; Zhou, X.; Deng, H.; Li, Z. Magnesium-containing silk fibroin/polycaprolactone electrospun nanofibrous scaffolds for accelerating bone regeneration. *Arab. J. Chem.* **2020**, *13*, 5526–5538. [[CrossRef](#)]
140. Tanasa, E.; Zaharia, C.; Hudita, A.; Radu, I.-C.; Costache, M.; Galateanu, B. Impact of the magnetic field on 3T3-E1 preosteoblasts inside SMART silk fibroin-based scaffolds decorated with magnetic nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *110*, 110714. [[CrossRef](#)]
141. Narimani, M.; Teimouri, A.; Shahbazarab, Z. Synthesis, characterization and biocompatible properties of novel silk fibroin/graphene oxide nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering application. *Polym. Bull.* **2019**, *76*, 725–745. [[CrossRef](#)]
142. Nie, L.; Zhang, H.; Ren, A.; Li, Y.; Fu, G.; Cannon, R.D.; Ji, P.; Wu, X.-H.; Yang, S. Nano-hydroxyapatite mineralized silk fibroin porous scaffold for tooth extraction site preservation. *Dent. Mater.* **2019**, *35*, 1397–1407. [[CrossRef](#)]
143. Wang, K.; Ma, Q.; Zhang, Y.; Han, G.-T.; Qu, C.-X.; Wang, S. Preparation of bacterial cellulose/silk fibroin double-network hydrogel with high mechanical strength and biocompatibility for artificial cartilage. *Cellulose* **2020**, *27*, 1845–1852. [[CrossRef](#)]
144. Ding, X.; Zhu, M.; Xu, B.; Zhang, J.; Zhao, Y.; Ji, S.; Wang, L.; Wang, L.; Li, X.; Kong, D.; et al. Integrated Trilayered Silk Fibroin Scaffold for Osteochondral Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 16696–16705. [[CrossRef](#)]

145. Zhao, Y.; Ding, X.; Dong, Y.; Sun, X.; Wang, L.; Ma, X.; Zhu, M.; Xu, B.; Yang, Q. Role of the Calcified Cartilage Layer of an Integrated Trilayered Silk Fibroin Scaffold Used to Regenerate Osteochondral Defects in Rabbit Knees. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *6*, 1208–1216. [[CrossRef](#)]
146. Bradner, S.A.; McGill, M.; Golding, A.; Grudt, R.; Kaplan, D.L. Silk Hydrogel Microfibers for Biomimetic Fibrous Material Design. *Macromol. Mater. Eng.* **2019**, *304*, 1900045. [[CrossRef](#)]
147. The Business Research Company. *Orthopedic Biomaterials Market Global Report 2020-30: Covid 19 Growth and Challenges*; The Business Research Company: London, UK, 2020. Available online: <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/orthopedic-biomaterials-market-global-report-2020-30-covid-19-growth-and-change> (accessed on 31 January 2021).
148. Perrone, G.S.; Leisk, G.G.; Lo, T.J.; Moreau, J.E.; Haas, D.S.; Papenburg, B.J.; Golden, E.B.; Partlow, B.P.; Fox, S.E.; Ibrahim, A.M.S.; et al. The use of silk-based devices for fracture fixation. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Li, C.; Guo, C.; Fitzpatrick, V.; Ibrahim, A.; Zwierstra, M.J.; Hanna, P.; Lechtig, A.; Nazarian, A.; Lin, S.J.; Kaplan, D. Design of biodegradable, implantable devices towards clinical translation. *Nat. Rev. Mater.* **2019**, *5*, 61–81. [[CrossRef](#)]

6.2 Teilarbeit II

Impact of Cell Loading of Recombinant Spider Silk Based Bioinks on Gelation and Printability

Autoren:

Annika Lechner*, Vanessa T. Trossmann*, und Thomas Scheibel

* Gleichberechtigte Co-Autorenschaft

Die Konzeptionierung sowie alle Experimente dieser Teilarbeit wurden zu gleichen Teilen von mir und Vanessa Trossmann durchgeführt. Dabei wurden die Messungen und Auswertung der Rheologie von mir vorgenommen, sowie die Druckergebnisse erzielt und dokumentiert. Daten zur Gelierung der Hydrogele und Biotinten, sowie Viabilität der Zellen wurden von Vanessa Trossmann erhoben. Das Manuskript wurde zusammen mit Vanessa Trossmann verfasst, alle Abbildungen wurden von mir erstellt. Thomas Scheibel war an der Konzeptionierung, wissenschaftlichen Diskussionen und der Fertigstellung des Manuskripts beteiligt.

Der Artikel wurde am 09. Dezember 2021 im Journal *Macromolecular Bioscience* veröffentlicht.

Nachdruck unter freundlicher Genehmigung des Verlags. Annika Lechner, Vanessa T. Trossmann, and Thomas Scheibel. Impact of Cell Loading of Recombinant Spider Silk Based Bioinks on Gelation and Printability. *Macromolecular Bioscience* (2022), 22, 2100390. Copyright (2022) John Wiley and Sons.

Impact of Cell Loading of Recombinant Spider Silk Based Bioinks on Gelation and Printability

Annika Lechner, Vanessa T. Trossmann, and Thomas Scheibel*

Printability of bioinks encompasses considerations concerning rheology and extrudability, characterization of filament formation, shape fidelity, cell viability, and post-printing cellular development. Recombinant spider silk based hydrogels might be a suitable material to be used in bioinks, that is, a formulation of cells and materials to be used for bioprinting. Here, the high shape fidelity of spider silk ink is shown by bioprinting the shape and size of a human aortic valve. Further the influence of the encapsulation of cells has been evaluated on spider silk hydrogel formation, hydrogel mechanics, and shape fidelity upon extrusion based bioprinting. It is shown that the presence of cells impacts the gelation of spider silk proteins differently, depending on the used silk variant. RGD-modified spider silk hydrogels are physically crosslinked by the cells, while there is no active interaction between cells and un-tagged spider silk proteins. Strikingly, even at cell densities up to ten million cells per milliliter, cell viability is high after extrusion-based printing, which is a significant prerequisite for future applications. Shape fidelity of the printed constructs is demonstrated using a filament collapse test in the absence and presence of human cells.

1. Introduction

Extrusion based bioprinting is one of several advanced bottom-up tissue engineering techniques in the evolving field of biofabrication.^[1] Typically, continuous strands of a hydrogel (acellular biomaterial ink) or bioink are dispensed through a nozzle in a layer-by-layer fashion.^[2] Bioinks contain one or more material components functioning as mimetic scaffolds as well as cells as the living element.^[3] Biofabrication enables the simultaneous deposition of cells, materials, and factors into hierarchically structured and personalized constructs.^[4] Each application and processing technique requires individually optimized bioinks. On the one hand, the chosen material has to provide appropriate rheological properties, including viscosity, viscoelastic shear moduli, shear stress, and elastic recovery, suitable for the desired processing technique.^[5] On the other hand, it

has to support cellular survival, proliferation, and maturation before, during, and after the printing process.^[6] For bioink formulations, natural polymers are often favored over synthetic materials, as the latter can cause limitations due to toxicity, low biocompatibility and/or the lack of biological binding sites.^[7] The choice of cell type dictates maturation from printed constructs to functional tissues or tissue models. However, given the nature of living cells, the interplay with the surrounding material based on, for example, porosity and stiffness or presented biological cues, significantly influences cellular development.^[8] Further, mechanics and printability of the bioink are affected by interactions between the materials and the cells and potential structural disruption based thereon.^[9] Evaluation of the performance of a bioink includes consideration of rheological parameters, extrudability, and filament characterization including shape fidelity during and after printing.^[5] For successful bioprinting, bioinks have to display shear-thinning behavior, with the viscosity decreasing with increasing shear stress during extrusion and rising with the drop of shear stress after printing, and viscoelasticity, which can be described by the storage (G') and loss (G'') modulus during oscillatory measurements. Ideally, bioinks should show a reversible, fast gel-solid transition, meaning easy flow through the nozzle during extrusion followed by rapid elastic shape retention after dispersion.^[5,10] Studies looking at the effect of cells on different aspects of bioink printability elucidate the complexity of the underlying factors. For example, collagen based bioinks showed increased storage moduli and viscosities before

A. Lechner, V. T. Trossmann, T. Scheibel
 Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth
 Prof.-Rüdiger-Bormann Straße 1, 95447 Bayreuth, Germany
 E-mail: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

T. Scheibel
 Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG)
 Universität Bayreuth
 Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

T. Scheibel
 Bayerisches Polymerinstitut (BPI)
 Universität Bayreuth
 Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

T. Scheibel
 Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB)
 Universität Bayreuth
 Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

T. Scheibel
 Bayreuther Materialzentrum (BayMAT)
 Universität Bayreuth
 Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/mabi.202100390>

© 2021 The Authors. Macromolecular Bioscience published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

DOI: 10.1002/mabi.202100390

gelation and decreased storage moduli after gelation with increasing chondrocyte densities. Notably, the printing resolution was increased at higher cell densities.^[11] Another study looked into bioinks based on gelatin methacrylate, gelatin gum, and human endothelial cells. While higher cell densities led to increased storage and loss moduli as well as decreased flow points (stress at the $G' G''$ crossover point), they had no influence on the reported outcome of the printing.^[12]

Amongst other natural polymers, silk based materials are employed as matrix and bioink components within biofabrication applications. They offer non-toxicity, biocompatibility, and biodegradability and can be processed into various morphologies.^[7] For example, a silk fibroin solution, prepared after extraction from *Bombyx mori* cocoons, was successfully 3D printed using extrusion bioprinters and by including sacrificial particles and several post-treatment steps, hierarchical structures with tunable pore sizes were generated.^[13] A cell-friendly gelation process could be achieved through the addition of the synthetic polymer polyethylene glycol (PEG) which induced β -sheet formation, leading to physical cross-linking without the need for post-treatment.^[14] In other studies, gelatin was added to ink formulations, to enhance the rather poor mechanical properties and to tune the degradation profile of silk fibroin hydrogels.^[15,16]

Hydrogels made of recombinantly produced spider silk proteins have recently been shown to be suitable as the material component of printable bioinks without the need of additives. Based on the repetitive core sequence of the European garden spider *Araneus diadematus* dragline silk fibroin 4, the protein eADF4(C16) and its integrin-binding-motif-containing variant eADF4(C16)-RGD form physically cross-linked hydrogel networks at aqueous conditions without the need for additional crosslinking.^[17–19] Recombinant eADF4(C16)-based spider silk proteins self-assemble from an intrinsically disordered monomeric protein in solution into tightly packed cross- β nanofibrils with a high β -sheet content via intra- and intermolecular physical interactions.^[18,20,21] During fibril self-assembly, the poly-alanine stretches (Ala)₈ of each C-module form strong, crystalline, antiparallel β -sheets via hydrogen bonding, while the glycine/proline rich sequence repeats (e.g. GPGXY) remain unstructured or fold into helices or turns forming an amorphous, flexible part embedding the β -sheet crystallites.^[18,21–23] At higher protein concentrations (above 2% (w/v)) eADF4(C16)-based spider silk proteins self-assemble into stable β -sheet rich hydrogels with a nanofibrillar network stabilized by intra- and intermolecular physical interactions including hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and physical entanglement.^[18,24–26] Without crosslinking, hydrogels made of recombinant spider silk proteins are stable, while displaying rather soft mechanical properties. The elastic moduli of 3% (w/v) eADF4(C16) hydrogels were determined to be in the lower kilopascal range (≤ 1 kPa). This means, that hydrogels made of recombinant spider silk proteins, without additional modifications, are well suited for but also limited to the biofabrication of soft tissues. Mechanical properties can, however, be increased to reach the range of muscle, skin, and cartilage tissue,^[27] using chemical crosslinking and increasing the protein concentration, which is feasible up to 7% (w/v) in aqueous solution, to strengthen the hydrogel to elastic moduli up to 110 kPa.^[18] The presence of salts, by adding cell culture media to the protein solutions, resulted

in faster gelation and stiffer hydrogels.^[25] Studies on different variants of the recombinant spider silk protein showed a clear influence of the RGD-tag, which has been genetically engineered into the protein, on the stiffness of hydrogels. Measured at the same protein concentration, eADF4(C16)-RGD hydrogels displayed elastic moduli of ≈ 0.2 kPa, compared to ≈ 0.02 kPa for hydrogels made eADF4(C16).^[28] Consequently, the elastic moduli could be adjusted to be similar by applying different protein concentrations.^[26]

The gentle gelation process allows us to simultaneously encapsulate cells within the shear-thinning, viscoelastic hydrogels for 3D bioprinting. The suitability of spider silk based bioinks to print straight-forward and cell-friendly grid structures using micro-valve printing has been previously shown.^[24,26] In this study, we further assessed and improved the printability of recombinant spider silk based bioinks. To obtain optimal printing conditions, the influence of temperature on the rheological properties of eADF4(C16) hydrogels was evaluated. It was demonstrated that these hydrogels can be successfully extrusion-printed with high shape-fidelity into the shape of a human aortic heart valve without the need of any additives or chemical crosslinkers. Successful fabrication of biologically active constructs strongly relies on the ability of an ink to encapsulate high amounts of cells, while facilitating printability, cellular survival, and proliferation. Building on previous studies dealing with recombinant spider silk based bioinks, here, cell densities were increased from one million up to ten million cells per milliliter. For the first time, characterization of gelation kinetics as well as rheological evaluation was performed on cell-containing bioinks based on recombinant spider silk proteins. This study shows the ability of recombinant spider silk protein based materials to be used as high cell-content containing bioinks that are printable to yield advanced structures.

2. Results and Discussion

2.1. Printability of Recombinant Spider Silk Inks

To evaluate the previously shown potential of extrusion printing using recombinant spider silk inks^[24,26,29] in terms of geometry as well as durability of the gained structures in detail, the shape of a human aortic valve (model source: Cellink) was printed (Figure 1A), as well as the filament collapse test was performed (Figure 1B–D)^[30] using acellular 3% (w/v) eADF4(C16) hydrogels. Tapered needles, instead of cylindrical ones, improved the printing results for both set-ups. This might be due to reduced pressure and shear stress applied to the material in the tapered geometry,^[31] preventing phase separation, which was seen during printing with cylindrical steel needles. Interestingly, the shape-fidelity of the printed human aortic valve could be confirmed using two different extrusion bioprinters, RegenHU's 3D Discovery and Cellink's BioX (Figure 1A). The size and shape of both constructs, as well as the amount of material needed for both prints (3 mL) were almost identical. Most apparent difference were the closed layers on the 3D Discovery's printed structure versus the open pores on the BioX's print. These varieties occurred even though all consumables, like cartridge and nozzle and basic setting, including layer height and infill pattern and density, were identical. This result demonstrated in principle the good

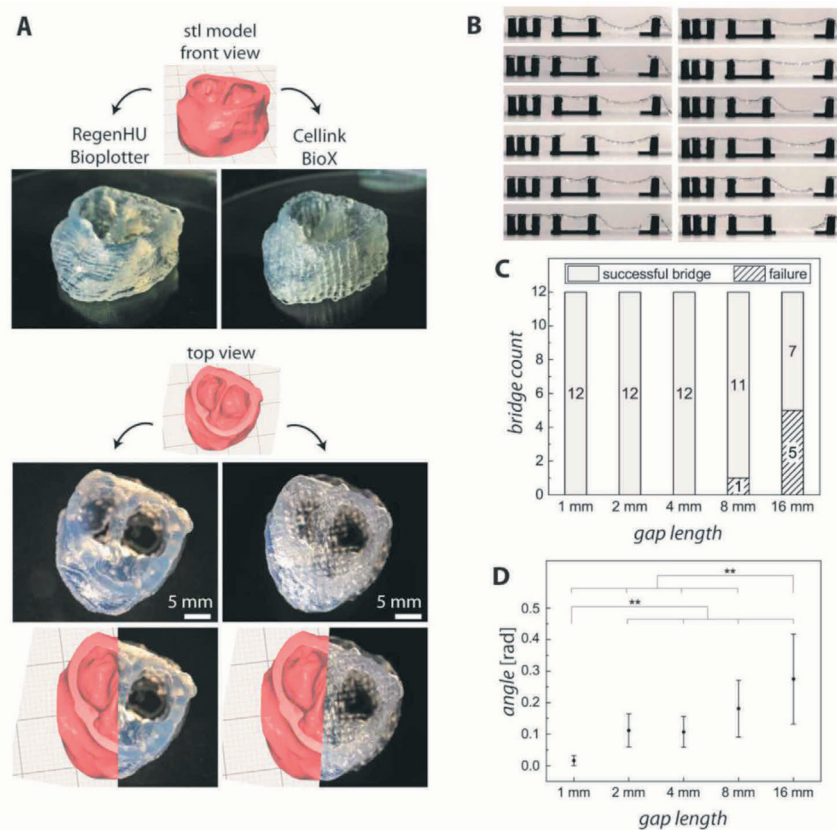


Figure 1. Shape fidelity of extrusion-printed spider silk hydrogels. A) As an example of printed complex scaffold structures, the shape of a human aortic valve (stl-file source: Cellink) was printed with 3% eADF4(C16) hydrogels on two different bioplotters, namely RegenHU's 3D Discovery and Cellinks's BioX. B) Using a 22G tapered tip, one strand of hydrogel filament was printed over a pillar structure, and this process was repeated twelve times. Pictures were taken immediately after printing. C) The failure of the hydrogel to bridge each gap increased with increasing distance. D) Angle of deflection determined graphically from images of filament strands successfully extruded over increasingly spaced pillars (** $p \leq 0.05$).

reproducibility when printing distinct shapes on different printers, but also showed the variation of separately acquired codes, meaning the printer's exact instructions, regarding details within the printed shape. Advanced features in these printed structures included overhanging walls and cavities on the inside bridged by upper layers. To quantify the durability of the printed spider silk strands, a filament collapse test was performed. One strand of hydrogel was placed over several pillars with increasing gaps in between (Figure 1B). For a realistic representation, 12 tests, including failed bridges (Figure 1C) are displayed.

The results showed that bridging with the spider silk hydrogels is reliable up to 8 mm without failing. Further, the largest gap with a length of 16 mm was bridged successfully seven out of twelve times. Strand collapses possibly occurred due to small inhomogeneities within the physically cross-linked hydrogel. The angle of deflection was determined as a measure of shape fidelity and the strands ability to hold its own weight against gravity (Figure 1D). With increasing gap size, the angle, and its deviation increased. There was no significant difference between the angles determined for 2, 4, and 8 mm gap lengths. The smallest (1 mm) and largest (16 mm) distance however, resulted in signif-

icant smaller or larger angles of deflection compared to all other distances.

eADF4(C16) hydrogels show shear thinning and viscoelastic behavior required for extrusion bioprinting independent of the used silk concentration.^[18,24–26] However, during printing of the heart valve and during the filament collapse test, it became apparent that temperature has a severe impact on printability. Therefore, rheology was measured at 25 °C as previously published, but additionally at 4 and at 37 °C. With increasing temperature, higher shear-rate-dependent viscosities (Figure 2A), flow points at higher stresses (Figure 2B) and longer linear viscoelastic regions (Figure 2C) were identified. Normally, the viscosity of a sample decreases with increasing temperature. However, if a sample shows temperature dependent hardening, like the recombinant spider silk hydrogels, this effect can be reversed.^[10] Generally, higher viscosities and higher yield stresses are linked to better printability, especially regarding filament formation and stiffness after printing, but are also accompanied by an increased pressure and shear stress during printing.^[5] This consequence resulting from the rheological changes explained the observation made with recombinant spider silk inks. As already men-

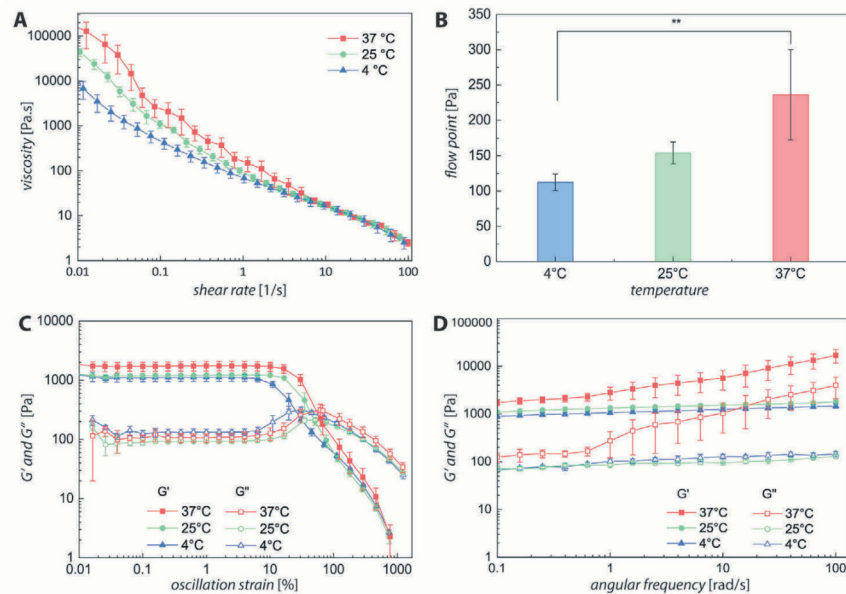


Figure 2. Temperature-dependent rheology of 3% eADF4(C16) hydrogels. Rheological measurements of the spider silk hydrogels were performed at 4, 25, and 37 °C. A) Viscosity was measured while increasing rotational shear rates from 0.01 to 100 s⁻¹. B) Flow points were determined as the crossover of G' (storage modulus) and G'' (loss modulus) at constant angular frequency (10.0 rad s⁻¹) over increase in strain from 0.01% to 1000.0% using TRIOS software (***p* ≤ 0.05). C) G' and G'' at constant angular frequency (10.0 rad s⁻¹) over an increase in strain from 0.01% to 1000.0% and D) at constant strain (1.0%) over an increase in oscillatory frequencies from 0.1 to 100 rad s⁻¹.

tioned above, higher printing pressure led to decreased material homogeneity, occasionally causing inconstant filament extrusion. It turned out that the printing should be done, if compatible with the encapsulated cells, at room temperature. Oscillatory frequency-dependent measurements confirmed that finding (Figure 2D). While at 4 °C and at 25 °C the samples showed stability over the entire range of frequencies applied, at 37 °C a clear instability of storage and loss modulus could be detected over varying angular frequencies.

2.2. Gelation of Spider Silk Based Bioinks

The spider silk hydrogel variants eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGD were compared to hydrogels made of eADF4(C16)-RGE in terms of usability in bioinks. eADF4(C16)-RGD and eADF4(C16)-RGE are identical in most physico-chemical properties and differ only in one amino acid: in eADF4(C16)-RGE, the glutamic acid (E) replaces the aspartic acid (D) of the eADF4(C16)-RGD variant. This change has a severe impact on cell binding, since the RGE peptide does not properly fit into the binding pocket of integrins yielding significantly lower binding affinities.^[32] However, the total net charge as well as charge distribution remain the same. Not surprisingly, eADF4(C16)-RGE 2D films showed a similar low adhesion and proliferation of Balb 3T3 fibroblasts as eADF4(C16).^[19]

In previous studies, we have already shown that eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGD hydrogels are suitable matrix materials for cell encapsulation. Further, it has been shown that chang-

ing the protein concentration upon gelation allowed us to adjust the mechanical properties of the hydrogels.^[18,24,26] Here, gelation of all three spider silk variants was investigated in the presence of RPMI media as well as, for the first time, in presence of the mammalian cell line BxPC-3 (pancreatic adenocarcinoma cell line) to analyze the respective influence on nano-fibril formation and gelation kinetics. Since gelation strongly depends on the silk variant itself, but also on the protein concentration used, it was decided to leave the protein concentrations the same (3% (w/v)) in order to focus on the influence of the silk variant on kinetics in the absence and presence of cells. To reveal the cellular impact on hydrogel formation, cells were added either directly at the beginning of the gelation process or at the end of the lag phase (i.e., nucleus formation for fibril growth followed by hydrogel formation) of spider silk assembly.^[33]

Both, eADF4(C16)-RGD and eADF4(C16)-RGE displayed an accelerated fibril formation and gelation in comparison to eADF4(C16) in presence of RPMI media (Figure 3A, red curves). Interestingly, eADF4(C16)-RGE showed an increase in turbidity shortly after adding the media with a short lag-phase (≈40 min), while eADF4(C16)-RGD displayed a lag-phase of ≈100 min before exponential fibrillization started. In contrast, eADF4(C16) had the longest lag-phase of 500 min. During the lag-phase (nucleation phase) soluble, intrinsically disordered, mostly unstructured spider silk proteins (monomers) transformed into thermodynamically meta-stable β -sheet rich assemblies (oligomers) by physical interactions. These oligomers acted as nuclei for exponential fibril growth by interaction with further soluble silk monomers (fibril elongation phase) resulting in tightly packed

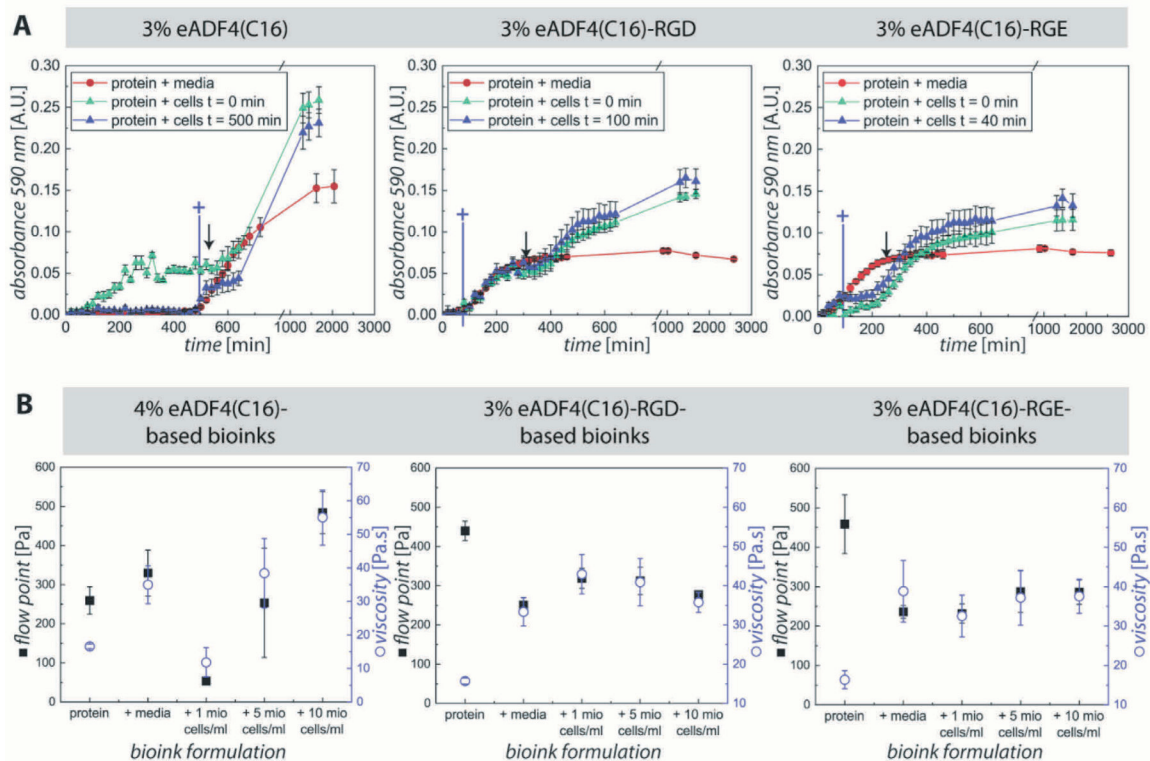


Figure 3. Spider silk gelation in the presence of mammalian cells. A) Protein solutions were mixed with either only media or media plus BxPC-3 cells at finally 1 million cells per milliliter. For each spider silk variant, cells were added either at the beginning of the incubation ($t = 0$ min) or at the end of the lag phase (nucleation)/beginning of the exponential growth phase of nanofibrils ($t = 500$ min in case of eADF4(C16), $t = 100$ min in case of eADF4(C16)-RGD, or $t = 40$ min in case of eADF4(C16)-RGE; marked with blue crosses). Fibrillization/gelation was quantified measuring the change in turbidity at 570 nm and 37 °C. Appropriate blank values were subtracted and first data points were normalized to zero for better comparability of the curves. Black arrows indicate the intermediate plateau of samples with cells. B) Rheological properties of 4% eADF4(C16), 3% eADF4(C16)-RGD, and 3% eADF4(C16)-RGE hydrogels were analyzed in the absence or presence of BxPC-3 cells (only silk protein, silk protein + 15% (v/v) media, silk protein + 1 mio cells per milliliter, 5 mio cells per milliliter or 10 mio cells per milliliter in 15% (v/v) media). Flow points were determined as crossover of storage (G') and loss modulus (G'') measured at constant angular frequency (10.0 rad s^{-1}) over increase in strain from 0.01% to 1000.0%. Viscosity was determined at a shear rate of 10 s^{-1} .

thermodynamically stable cross- β nanofibrils with a high β -sheet content.^[21] The stationary phase upon completion of fibril formation and gelation was seen after 300 min for both modified variants and after 1500 min for eADF4(C16). These results indicated that both peptide tags accelerated nucleation, fibril formation, and gelation. The acceleration of gelation of eADF4(C16)-RGD and eADF4(C16)-RGE could be resulting from the additional charged amino acid residues ensuring for example ionic bonding with ions from cell culture media.^[25]

The addition of BxPC-3 cells before fibrillization (Figure 3A, green curves) affected the nucleation-dependent gelation in different ways: while the initial nucleation of eADF4(C16) was apparently accelerated (shorter lag-phase), in the case of eADF4(C16)-RGE a deceleration was seen (longer lag-phase). Thus, the formation of thermodynamically meta-stable oligomers by intra- and maybe also intermolecular protein interactions was faster in the case of soluble eADF4(C16), but slower in case of eADF4(C16)-RGE. In contrast, initial fibril formation of eADF4(C16)-RGD was not influenced in the presence of cells

(identical lag-phase) indicating a similar formation of nuclei independent of cells. Interestingly, for all spider silk variants a similar course of the following exponential fibril growth phase could be detected: after a first increase in turbidity yielding an intermediate plateau (Figure 3A, black arrows), a second turbidity increase was seen until finally the stationary phase was reached. These curves indicated that soluble silk proteins docked on the pre-formed silk nuclei leading to fibril growth (first increase in turbidity). During the intermediate plateau interval, no notable fibrillization took place, and a first hydrogel network was already formed at this intermediate plateau. The second increase in turbidity could be a rearrangement of silk fibrils caused by the present cells leading to the formation of a denser packed, twisted, cell-interconnected network of silk fibrils compared to pure hydrogels without cells. This fibril-cell network would also explain the higher turbidity values of the stationary phase at the end, where gelation was completed. Looking at the single proteins, it could be seen that the exponential fibril growth of eADF4(C16)-RGD was apparently not influenced by present cells, as both

curves (with and without cells), overlapped until the intermediate plateau was reached. For eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGE the cells caused an acceleration of fibrillization. One reason could be that the present cells minimize the free space in the solution (i.e., a virtually higher protein concentration) forcing the soluble silk proteins to interact with the already present silk nuclei (while not showing protein–cell interactions), leading to an accelerated fibril growth. However, the cells could always interact with the cell-adhesive RGD peptide, regardless of whether the protein is soluble or assembled in nuclei or fibrils. In the case of eADF4(C16)-RGD, such a cell–protein interaction could compensate the acceleration of fibril elongation.

To further analyze the cellular impact on exponential fibril growth behavior of different spider silk variants, BxPC-3 cells were added at the end of the appropriate lag-phases, where first silk nuclei were already formed (Figure 3A, blue curves, plus-sign). In this set-up, the curves overlapped with the curves where only media was contained. Interestingly, the curves after cell addition were similar to the curves where the cells were already included from the beginning. Thus, these results supported the hypothesis of cellular impact on fibril elongation and gelation given above. Nevertheless, compared to the sample without cells, it must be mentioned that in the case of eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGE the addition of cells initially slowed down the fibril elongation (gelation), while it remained the same for eADF4(C16)-RGD. One assumption is that the addition of cells at the beginning of the exponential fibril growth phase initially effects a destruction of the already formed network of silk nuclei and fibrils. This event in turn effects a short-term deceleration of fibril elongation due to the reduced interaction of silk nuclei and soluble protein, which could be detected for eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGE. In the case of eADF4(C16)-RGD, one assumption is that this destructive effect could be compensated by an interaction of the cells with the RGD peptide independent of whether the protein is soluble or assembled in fibrils, as it is mainly driven by an integrin–RGD interaction.

2.3. Rheological Properties of Spider Silk Based Bioinks

For the following analysis of the silk bioinks regarding rheological behavior, printability, and cell viability, the focus was on the composition of the bioinks, that is, the influence of medium and different cell densities on bioink performance. Therefore, in contrast to the kinetics analysis, here the mechanical properties of the spider silk matrix should be similar. As it was known from previous studies that eADF4(C16)-RGD forms stiffer hydrogels compared to eADF4(C16) at the same protein weight to volume ratio,^[24] it was decided to use a concentration of 4% (w/v) for eADF4(C16) and 3% (w/v) for eADF4(C16)-RGD and eADF4(C16)-RGE to focus on the influence of the silk variant in combination with the amounts of cells introduced. Based on these concentrations, flow points and viscosities were determined (Figure 3B). Each hydrogel was analyzed upon addition of cell culture media and further upon increasing cell density (1, 5, and 10 million cells per milliliter). All three silk variant hydrogels showed an increase in viscosity upon the addition of media. While the comparable low flow point of eADF4(C16) hydrogels increased as well, the higher flow points of eADF4(C16)-RGD

and eADF4(C16)-RGE ones dropped upon the addition of media. Both, viscosity and flow point of eADF4(C16) inks dropped significantly upon the addition of cells and increased again with increasing cell densities to values higher than initially measured for the acellular hydrogels. The effect of increasing amounts of cells was lower on the flow point and viscosity of inks made of the other two variant hydrogels. While there was an initial increase in both values for eADF4(C16)-RGD inks upon addition of the lowest cell density, the values stayed in the same regime with increasing cell densities (Figure 3B). Recovery experiments focused on stabilities of storage and loss modulus at low shear rate before and after high rotational shear stress (Appendix, Figure S1, Supporting Information). The trend to recover its properties of each ink/bioink was similar to the trend seen for the flow points (with better recovery at lower flow points). For eADF4(C16), the inks without additives, as well as the sample containing one million cells per milliliter showed good recovery. Bioinks with increasing cell densities displayed decreasing ability to recover both, storage and loss moduli. In the case of eADF4(C16)-RGD and eADF4(C16)-RGE, the recovery was significantly improved upon addition of media and cells compared to samples without additives (Appendix, Figure S1, Supporting Information). This direct correlation of higher flow points and lower recovery of inks confirmed the previous observation of unfavorable filament formation related to growing flow points, in the previous case due to temperature increase (see Figure 2B).

2.4. Extrusion Bioprinting of Spider Silk Based Bioinks

Printability of all bioinks was assessed using the filament collapse test (Figure 4A). In the case of all eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGD based bioinks, rheological differences could be compensated by pressure adjustments. Each of these bioinks were able to bridge all gaps (up to 16 mm) with angles of deflection in the range of 0–0.4 rad, like that determined for 3% eADF4(C16) (Figure 1D). In contrast, for eADF4(C16)-RGE based bioinks, pressure adjustments were not sufficient, since the pressure needed for continuous filament printing resulted in faster extrusion, which could not be counteracted by the maximum speed rate (20 mm s⁻¹) of the used printer (RegenHU's 3D Discovery). Stereo microscopy images of single bridging filament strands showed the optical differences between printed hydrogels and hydrogels containing cell culture media (Figure 4B). While clear and smooth-looking filaments were printed using the hydrogels without additives, strands containing media, especially eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGE based ones, appeared opaque, scratchy, and larger in diameter. However, these optical changes did not affect the performance during the filament collapse test (Figure 4A). During printing, the pressure was individually adjusted for optimal outcome and noted afterwards (Figure 4C). Interestingly, the applied pressure differed a lot (400–1400 mbar), but showed the same trend for bioinks made of all three protein variants.

2.5. Cell Viability after Extrusion Bioprinting

For biofabrication, cell survival during encapsulation, after the 3D bioprinting process, and during subsequent cultivation and

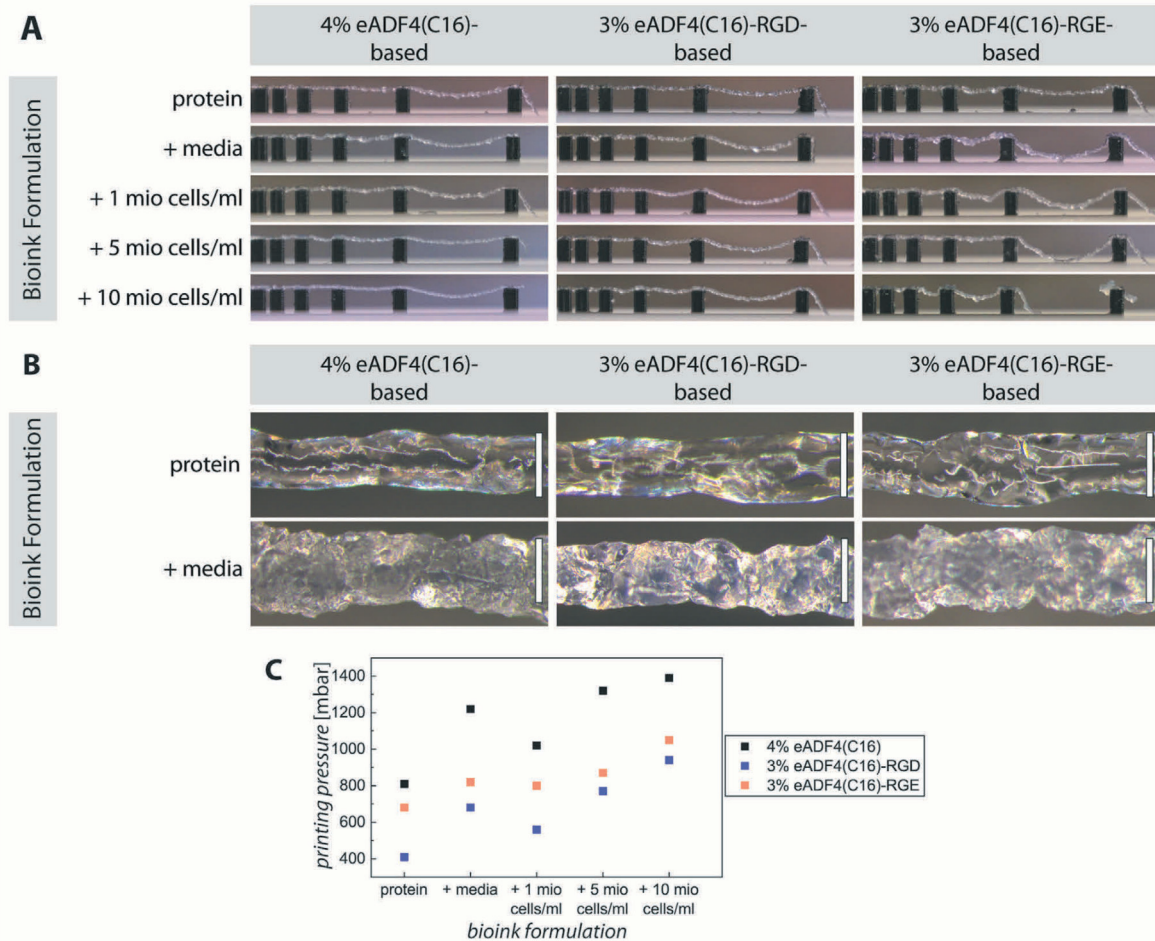


Figure 4. Shape fidelity of extrusion-printed spider silk bioinks. A) Using a 22G tapered tip, one strand of each bioink was printed (RegenHU's 3D Discovery) over a pillar structure; pictures were taken immediately after printing. B) Stereo microscopy images showed hanging strands between two pillars of plain spider silk hydrogels or hydrogels + media (scale bars: 200 μ m). C) The printing pressure was manually adjusted for optimal filament extrusion.

maturation is essential. Therefore, live/dead staining directly after printing and after a cultivation time of 7 and 14 days was conducted for all bioinks (Figure 5 and Figure S2, Supporting Information). Previous studies already showed that eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGD hydrogels strongly interact with EthD-I resulting in a red-stained background signal, which is also visible in the here presented images.^[24,26] The high cell survival on day 1 directly after 3D bioprinting using tapered needles (viability values for 10 mio cells per milliliter bioinks: $85\% \pm 1\%$ for eADF4(C16), $83\% \pm 4\%$ for eADF4(C16)-RGD, and $75\% \pm 4\%$ for eADF4(C16)-RGE), indicated that the BxPC-3 cells survived on the one hand the encapsulation process using spider silk hydrogels and on the other hand the 3D bioprinting process. Furthermore, the cells were homogeneously distributed in all printed scaffolds without big cell clustering or aggregation. These results are highly important, as previous studies using a micro-valve printhead equipped

with a steel needle (inner diameter 0.33 mm) showed cell death rates of up to $\approx 30\%$, mainly during the cell encapsulation process, leading to the development of an adopted encapsulation protocol (using more media [15%]) ensuring cell survival.^[24,26] Here, the combination of the adjusted and improved encapsulation protocol with cell-friendly pneumatic extrusion using tapered needles was the basis for high cell survival.

Independent of the initial encapsulated cell number, BxPC-3 cells also displayed high cell viability on day 7, however, without increase in cell number. Particularly, the smaller size of viable cells in eADF4(C16)-RGE compared to that in eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGD scaffolds should be mentioned. Moreover, BxPC-3 cells already began to die in eADF4(C16) and especially in eADF4(C16)-RGE scaffolds after 7 days as indicated by the enhanced numbers of dead cells. This trend continued to day 14, as a higher number of viable and larger BxPC-3 cells could be

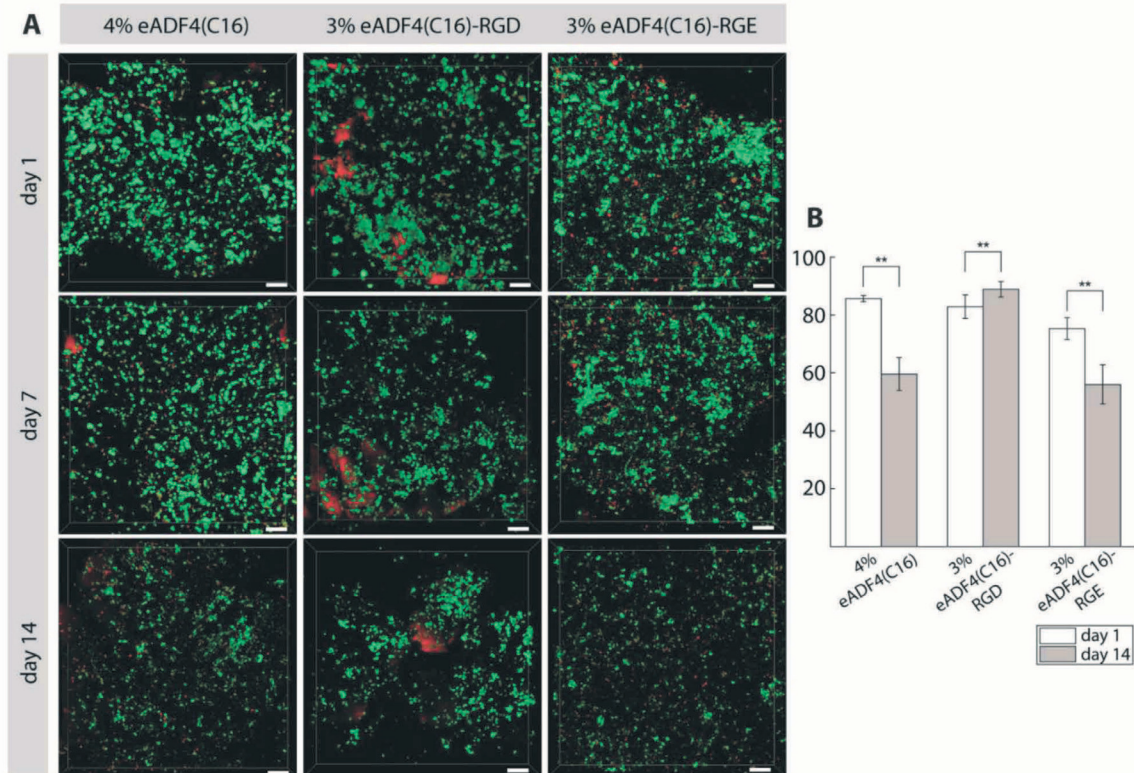


Figure 5. Viability of BxPC-3 cells (10 mio cells per milliliter) in printed constructs comprising 4% eADF4(C16), 3% eADF4(C16)-RGD, or 3% eADF4(C16)-RGE. Spider silk bioinks were printed using a RegenHU Bioplotter with a 22G tapered tip at room temperature and cultivated for up to 14 days at 5% CO₂, 95% relative humidity, and 37 °C. A) For CLSM imaging, live cells were stained with Calcein A/M (green) and dead cells with EthD-1 (red). Background staining occurs due to interaction of hydrogels with EthD-1 (scale bars: 100 μm). B) Quantification of viable cells on day 1 and day 14 (***p* ≤ 0.05).

visualized in eADF4(C16)-RGD (viability: 89% ± 3%) scaffolds compared to eADF4(C16) (viability: 60% ± 6%) and eADF4(C16)-RGE (viability: 56% ± 7%) ones, although cell proliferation could yet not be determined. The lack of cell proliferation inside 3D bioprinted spider silk scaffolds was already shown by DeSimone et al.^[26] Factors could be the slow biodegradation of the recombinant spider silk matrix or changed mechanical properties after the printing process coming from structural rearrangement during shear stress.^[34–38] Additionally, by using 10 million cells per milliliter, it should be analyzed whether high cell densities have a positive effect on cell survival inside the bioinks. However, the present study showed that the used silk variant had a higher impact on the cell survivability than the initial number of encapsulated cells. As the amino acid sequence of eADF4(C16) lacks any cell binding motifs,^[39] the decrease in cell viability over time is not surprising. In contrast, the high cell viability of BxPC-3 cells in eADF4(C16)-RGD scaffolds could be explained by the modification with the integrin binding peptide RGD, which was recognized by cell surface receptors triggering further cellular responses. A recent *in vivo* silk vascularization study showed that surgically induced angiogenesis, indicated by the formation and sprouting of new blood vessels from an arteriovenous loop, was

clearly enhanced in implanted eADF4(C16)-RGD hydrogels compared to eADF4(C16) ones.^[40] Thus, the RGD integrin binding tag is highly beneficial and necessary for successful tissue formation and growth. Nevertheless, an inadequate peptide tag, which could not interact with cell surface receptors due to steric hindrance, such as RGE, was counterproductive and led to a decreased cell interaction within the scaffold and finally cell death. It is known that RGD-resembling peptides, such as RGE, showed two to four magnitudes lower affinity to cell receptors.^[32]

3. Conclusion

Extrusion based printing of recombinant spider silk bioinks, using tapered tips, reduces the shear stress on cells, resulting in increased cell viabilities. Our results showed that eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGD proteins are suitable for the generation of hydrogel based bioinks with high cell densities that can be used in advanced extrusion bioprinting. Even though we saw an influence of different cell densities on rheological properties of the bioinks, we were able to adjust the procedures to accomplish reliable printing results for eADF4(C16) and eADF4(C16)-RGD based inks. For future studies, the application of different types of

cells and the examination of biological functions of printed constructs have to be studied. Even though each new bioink composition is expected to require new adjustments, valuable general insights into gelation and the interplay between cell densities, used nozzle, and applied pressure to optimize printing outcome have been gained in this study. In summary, spider silk hydrogels in bioinks show high potential for biofabrication by combining the high biocompatibility of the hydrogels with their ability for gentle cell encapsulation and reliable extrusion printing of advanced structures without the need of additives or crosslinking procedures.

4. Experimental Section

Spider Silk Hydrogel Preparation: The recombinant spider silk protein eADF4(C16) (MW: 47.7 kDa) comprises 16 repeats of a so-called C-module (sequence: GSSAAAAAAA SGPGGYGPENQGGPSGPG-GYGGPGP) originating from the dragline silk of the European garden spider *A. diadematus*.^[41] The modified variants eADF4(C16)-RGD (MW: 48.6 kDa) and eADF4(C16) RGE (MW: 48.6 kDa) were generated using genetic engineering.^[19] While eADF4(C16)-RGD contains the integrin binding RGD sequence, the eADF4(C16)-RGE spider silk variant served as negative control. The recombinant spider silk proteins were generated as described previously.^[19,41] For preparing hydrogels, the lyophilized spider silk proteins were solved in 6 M guanidinium thiocyanate (Roth, Germany) for 1 h at RT, sterile filtered (0.2 μm , Sartorius, Germany) and dialyzed against 10 mM Tris/HCl (Roth, Germany) using dialysis membranes with a molecular weight cutoff of 6–8 kDa (Spectra/Por, Fisher Scientific GmbH, Germany) as described previously.^[18,24,26] A subsequent dialysis against 25% w/v poly-ethylene glycol (MW: 20000 g mol⁻¹, Roth, Germany) was conducted to increase protein concentrations using dialysis membranes with a molecular weight cutoff of 6–8 kDa. For subsequent experiments, protein concentrations between 30 and 50 mg mL⁻¹ were achieved. In general, hydrogels self-assembled at 37 °C overnight.^[18]

Cell Culture: The human BxPC-3 epithelial pancreas cell line (ATCC CRL-1687), derived from an adenocarcinoma, was cultivated in RPMI-1640 medium (Sigma, Germany) supplemented with 10% v/v fetal calf serum (FCS, Biosell, Germany), 1% v/v GlutaMAX (Gibco, USA), and 0.1% v/v gentamycin sulfate (Sigma-Aldrich, Germany) at 37 °C in a humidified incubator (95% relative humidity, 5% CO₂, Heracell, Germany). BxPC-3 cells were split using 0.25% trypsin/EDTA (Gibco, USA). Cell number and viability were determined using trypan blue (Sigma-Aldrich, Germany) and an automated cell counter (BioRad, Germany).

Preparation of Spider Silk Bioinks: To analyze the effect of cell culture medium as well as different cell densities, acellular hydrogel samples, and bioinks were generated at 40 (4% w/v) eADF4(C16) and 30 mg mL⁻¹ (3% w/v) eADF4(C16)-RGD or eADF4(C16)-RGE. Therefore, either 47 (4.7% w/v) eADF4(C16) or 35 mg mL⁻¹ (3.5% w/v) eADF4(C16)-RGD/eADF4(C16)-RGE solutions were diluted either with 15% v/v water or RPMI medium to obtain acellular hydrogels or with 15% v/v RPMI containing BxPC-3 cells to generate respective bioinks. The solutions were filled in 3cc cartridges with appropriate pistons (both Drifton, Denmark) and sealed using a luer-lock syringe plug (Braun, Germany). For gel formation, the cartridges were fixed on an overhead shaker (Intelli-Mixer RM-2, Germany) and incubated at 37 °C overnight while rotating at 3 rpm to ensure homogenous cell distribution and to prevent sedimentation.

Analysis of Gelation Kinetics: Hydrogel gelation kinetics of the different spider silk proteins were analyzed in the absence and presence of cells upon turbidity changes during nanofibril self-assembly at 570 nm. Therefore, 35 mg mL⁻¹ (3.5% w/v) eADF4(C16), eADF4(C16)-RGD, and eADF4(C16)-RGE spider silk solutions were prepared using PEG dialysis as described above. For samples without cells, 15% v/v RPMI medium were added to reach a final protein concentration of 30 mg mL⁻¹ (3% w/v). 100 μL triplicates of hydrogel solution were filled in transparent 96 well plates (Nunc, Germany) and incubated at 37 °C under a humidified atmo-

sphere in a cell culture incubator (Heracell, Germany). The increase in turbidity indicating fibril formation was monitored at a wavelength of 570 nm using a microplate reader (Berthold, Germany) in absorbance mode. Furthermore, the impact of BxPC-3 cells, added either directly at the beginning of the gelation process or at the end of the protein-dependent lag phase, was analyzed. Therefore, BxPC-3 cells in 15% v/v RPMI were added with a concentration of one million cells per milliliter at measurement timepoint $t = 0$ min, and $t = 500$ min for eADF4(C16), $t = 100$ min for eADF4(C16)-RGD, or $t = 40$ min for eADF4(C16)-RGE.

Rheology of Spider Silk Bioinks: Rheological measurements were performed on a Discovery HR-2 rheometer (TA instruments, New Castle, DE, USA). Measurements were performed at 4, 25, or 37 °C as triplicates using a 25 mm plate-plate geometry with a gap of 200 μm . Viscosity was measured either at a constant shear rate of 10 s⁻¹ or shear rate dependent from 0.01 to 100 s⁻¹. Storage (G') and loss (G'') moduli were measured at a constant strain of 1.0% at increasing oscillatory frequencies from 0.1 to 100 rad s⁻¹ or at a constant angular frequency of 10.0 rad s⁻¹, while increasing the strain from 0.01% to 1000.0%. Flow points were determined as the crossover of G' and G'' using TRIOS software. Additionally, the samples were treated twice with a constant oscillatory strain of 0.1% for 100 s each. For 400 s in between, a steady increase of rotational shear rate up to 100 s⁻¹ was applied. Recovery was recorded as stability of G' and G'' at low strain before and after the higher shear rate.

4.0.0.1. 3D Printing the Shape of Human Aortic Valves: To demonstrate the printability of recombinant spider silk hydrogels, 3% w/v eADF4(C16) gels were printed in the size and shape of a human aortic valve (CAD-model from Cellink, Sweden). In this context, reproducibility was shown using two different models of extrusion bioprinters, BioX (Cellink, Sweden) and 3D Discovery Bioplotter (RegenHU, Villaz-Saint-Pierre, Switzerland). The stl-file was processed according to the printer's demands. For BioX, the respective G-code was generated on the device, while the 3D Discovery required an iso-file (RegenHU's G-code analogous), which was generated using the software MM Converter. For both printed constructs, the infill was set to 25% and the printing speed to 10 mm s⁻¹. Pneumatic printheads were equipped with a 3cc cartridge, pistons (both Drifton, Denmark), and a 27G (0.2 mm inner diameter) tapered tip (Cellink, Sweden). The printing pressure was set to exactly 400 mbar on the BioX and adjusted manually for optimal printing results on the 3D Discovery (400–420 mbar). In both cases, the constructs were printed on polystyrene surfaces (Sarstaedt, Germany) and imaged using a mirrorless camera and appropriate lenses (Sony Alpha 6000, SELP1650 and SEL30M35).

Filament Collapse Test: The ability of a hydrogel to bridge a certain distance and its degree of collapse can be assessed using the so-called filament collapse test, where a single strand of filament was extruded over a row of pillars with defined gaps in between. The angle of deformation caused by the weight of the filament can be used for quantification.^[30] The template was slightly adjusted for more convenient handling. While pillar height, size, and distance remained the same (gaps in millimeter: 1, 2, 4, 8, and 16) as published previously,^[30] features were added allowing for precise positioning at the origin of the print bed, like a base plate fitting tightly on the print plate. The pillar structure was printed using an Ultimaker S5 FDM (fused-deposition-modelling) and standard PLA (poly lactic acid) filaments (Ultimaker, Netherlands). During execution of each test, one single strand of spider silk hydrogel or bioink was extruded onto individual pillar constructs (printing speed 10 mm s⁻¹) using the 3D Discovery Bioplotter (RegenHU, Villaz-Saint-Pierre, Switzerland) equipped with a pneumatic printhead and a 22G tapered tip (Drifton, Denmark). Images of extruded strands on pillars were taken directly after printing using a mirrorless camera (Sony Alpha 6000, SELP1650) and a Leica M205C stereomicroscope, equipped with a 0.93 \times objective and a polarization lens in darkfield mode (Leica, Wetzlar, Germany). The angles of deflection were determined using the taken images and adobe illustrator software.

Live/Dead Staining: To visualize the viability of BxPC-3 cells inside the printed bioinks directly after printing (day 1) and after 7 and 14 days of cultivation, the 3D-printed spider silk scaffolds were stained using calcein acetoxyethyl ester (Calcein A/M) and ethidium homodimer 1 (EthD-1) (both Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Germany), respectively. Therefore, the printed constructs were incubated in 1 \times PBS containing final con-

concentrations of 2 μM Calcein A/M and 4 μM EthD-I for 45–60 min at 37 °C in a humidified incubator containing 5% CO₂ (Heracell, Germany). For subsequent imaging using confocal microscopy, the staining solution was exchanged with fresh 1x PBS. Z-stacks were recorded using a DMI 8 confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with lasers using excitation wavelengths of 488 (Calcein A/M) and 552 nm (EthD-I). The viability rates of ten million cells per milliliter bioinks on day 1 and 14 were determined by quantifying live and dead cells from confocal images.

Statistical Analysis: To determine significance between generated data, one-way ANOVA with significance level of $p \leq 0.05$ were performed.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

A.L. and V.T.T. contributed equally to this work. The authors acknowledge the funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)-project number 326998133-TRR225 (funded subproject: C01 TS) and SCHE603/24-1. Support from the Elite Network of Bavaria is also acknowledged.

Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Conflict of Interest

The authors declare the following competing financial interest: T.S. is co-founder and shareholder of AMSilk GmbH.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords

biofabrication, bioprinting, gelation kinetics, physical crosslinking, rheology

Received: September 27, 2021

Revised: November 19, 2021

Published online: December 19, 2021

- [1] W. Sun, B. Starly, A. C. Daly, J. A. Burdick, J. Groll, G. Skeldon, W. Shu, Y. Sakai, M. Shinohara, M. Nishikawa, J. Jang, D.-W. Cho, M. Nie, S. Takeuchi, S. Ostrovidov, A. Khademhosseini, R. D. Kamm, V. Mironov, L. Moroni, I. T. Ozbolat, *Biofabrication* **2020**, 12, 022002.
- [2] L. Moroni, T. Boland, J. A. Burdick, C. De Maria, B. Derby, G. Forgacs, J. Groll, Q. Li, J. Malda, V. A. Mironov, C. Mota, M. Nakamura, W. Shu, S. Takeuchi, T. B. F. Woodfield, T. Xu, J. J. Yoo, G. Vozzi, *Trends Biotechnol.* **2018**, 36, 384.
- [3] J. Groll, T. Boland, T. Blunk, J. A. Burdick, D.-W. Cho, P. D. Dalton, B. Derby, G. Forgacs, Q. Li, V. A. Mironov, L. Moroni, M. Nakamura, W. Shu, S. Takeuchi, G. Vozzi, T. B. F. Woodfield, T. Xu, J. J. Yoo, J. Malda, *Biofabrication* **2016**, 8, 013001.
- [4] L. Moroni, J. A. Burdick, C. Highley, S. J. Lee, Y. Morimoto, S. Takeuchi, J. J. Yoo, *Nat. Rev. Mater.* **2018**, 3, 21.
- [5] A. Schwab, R. Levato, M. D'Este, S. Piluso, D. Eglin, J. Malda, *Chem. Rev.* **2020**, 120, 11028.
- [6] R. Levato, T. Jungst, R. G. Scheuring, T. Blunk, J. Groll, J. Malda, *Adv. Mater.* **2020**, 32, 1906423.
- [7] V. J. Neubauer, A. Döbl, T. Scheibel, *Materials* **2021**, 14, 674.
- [8] J. Li, C. Wu, P. K. Chu, M. Gelinsky, *Mater. Sci. Eng., R* **2020**, 140, 100543.
- [9] K. Hölzl, S. Lin, L. Tytgat, S. Van Vlierberghe, L. Gu, A. Ovsianikov, *Biofabrication* **2016**, 8, 032002.
- [10] T. G. Mezger, *The Rheology Handbook*, 4th ed., Vincentz Network, Hannover **2014**.
- [11] N. Diamantides, C. Dugopolski, E. Blahut, S. Kennedy, L. J. Bonassar, *Biofabrication* **2019**, 11, 045016.
- [12] G. J. Gillispie, A. Han, M. Uzun-Per, J. Fisher, A. G. Mikos, M. K. K. Niazi, J. J. Yoo, S. J. Lee, A. Atala, *Tissue Eng., Part A* **2020**, 26, 1349.
- [13] M. R. Sommer, M. Schaffner, D. Carnelli, A. R. Studart, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 34677.
- [14] Z. Zheng, J. Wu, M. Liu, H. Wang, C. Li, M. J. Rodriguez, G. Li, X. Wang, D. L. Kaplan, *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, 7, 1701026.
- [15] W. Shi, M. Sun, X. Hu, B. Ren, J. Cheng, C. Li, X. Duan, X. Fu, J. Zhang, H. Chen, Y. Ao, *Adv. Mater.* **2017**, 29, 1701089.
- [16] S. Das, F. Pati, Y.-J. Choi, G. Rijal, J.-H. Shim, S. W. Kim, A. R. Ray, D.-W. Cho, S. Ghosh, *Acta Biomater.* **2015**, 11, 233.
- [17] S. Rammensee, D. Huemmerich, K. D. Hermanson, T. Scheibel, A. R. Bausch, *Appl. Phys. A* **2006**, 82, 261.
- [18] K. Schacht, T. Scheibel, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 2488.
- [19] S. Wohlrab, S. Müller, A. Schmidt, S. Neubauer, H. Kessler, A. Leal-Egaña, T. Scheibel, *Biomaterials* **2012**, 33, 6650.
- [20] U. Slotta, S. Hess, K. Spieß, T. Stromer, L. Serpell, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.* **2007**, 7, 183.
- [21] M. Humenik, M. Magdeburg, T. Scheibel, *J. Struct. Biol.* **2014**, 186, 431.
- [22] K. Spieß, S. Wohlrab, T. Scheibel, *Soft Matter* **2010**, 6, 4168.
- [23] C. B. Borkner, S. Lentz, M. Müller, A. Fery, T. Scheibel, *ACS Appl. Polym. Mater.* **2019**, 1, 3366.
- [24] K. Schacht, T. Jüngst, M. Schweinlin, A. Ewald, J. Groll, T. Scheibel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, 54, 2816.
- [25] E. DeSimone, K. Schacht, T. Scheibel, *Mater. Lett.* **2016**, 183, 101.
- [26] E. DeSimone, K. Schacht, A. Pellert, T. Scheibel, *Biofabrication* **2017**, 9, 044104.
- [27] N. R. Raia, M. McGill, T. Marcet, S. E. V. Yucha, D. L. Kaplan, 2.6.8 – *Soft Tissue Engineering in Biomaterials Science (Fourth Edition)* (Eds: W. R. Wagner, S. Sakiyama-Elbert, G. Zhang, M. Yaszemski), Academic Press, Cambridge **2020**, pp. 1399–1414.
- [28] K. Schacht, T. Jüngst, M. Schweinlin, A. Ewald, J. Groll, T. Scheibel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, 54, 2816.
- [29] S. Kumari, H. Bargel, M. U. Anby, D. Lafargue, T. Scheibel, *ACS Bio-mater. Sci. Eng.* **2018**, 4, 1750.
- [30] A. Ribeiro, M. M. Blokzijl, R. Levato, C. W. Visser, M. Castilho, W. E. Hennink, T. Vermonden, J. Malda, *Biofabrication* **2017**, 10, 014102.
- [31] M. Li, X. Tian, D. J. Schreyer, X. Chen, *Biotechnol. Prog.* **2011**, 27, 1777.
- [32] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, 24, 4385.
- [33] M. Humenik, M. Drechsler, T. Scheibel, *Nano Lett.* **2014**, 14, 3999.
- [34] S. Müller-Herrmann, T. Scheibel, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, 1, 247.
- [35] T. B. Aigner, E. DeSimone, T. Scheibel, *Adv. Mater.* **2018**, 30, 1704636.
- [36] S. Salehi, K. Koeck, T. Scheibel, *Molecules* **2020**, 25, 737.
- [37] D. Steiner, G. Lang, L. Fischer, S. Winkler, T. Fey, P. Greil, T. Scheibel, R. E. Horch, A. Arkudas, *Tissue Eng., Part A* **2019**, 25, 1504.
- [38] D. Pasqui, M. De Cagna, R. Barbucci, *Polymers* **2012**, 4, 1517.
- [39] A. Leal-Egaña, G. Lang, C. Mauerer, J. Wickinghoff, M. Weber, S. Geimer, T. Scheibel, *Adv. Eng. Mater.* **2012**, 14, B67.
- [40] D. Steiner, S. Winkler, S. Heltmann-Meyer, V. Trossmann, T. Fey, T. Scheibel, R. E. Horch, A. Arkudas, *Biofabrication* **2021**, 13, 045003.
- [41] D. Huemmerich, C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph, T. Scheibel, *Biochemistry* **2004**, 43, 13604.



Supporting Information

for *Macromol. Biosci.*, DOI 10.1002/mabi.202100390

Impact of Cell Loading of Recombinant Spider Silk Based Bioinks on Gelation and Printability

*Annika Lechner, Vanessa T. Trossmann and Thomas Scheibel**

Supporting Information

Impact of Cell Loading of Spider Silk Based Bioinks on Gelation and Printability

Annika Lechner, Vanessa T. Trossmann, and Thomas Scheibel*

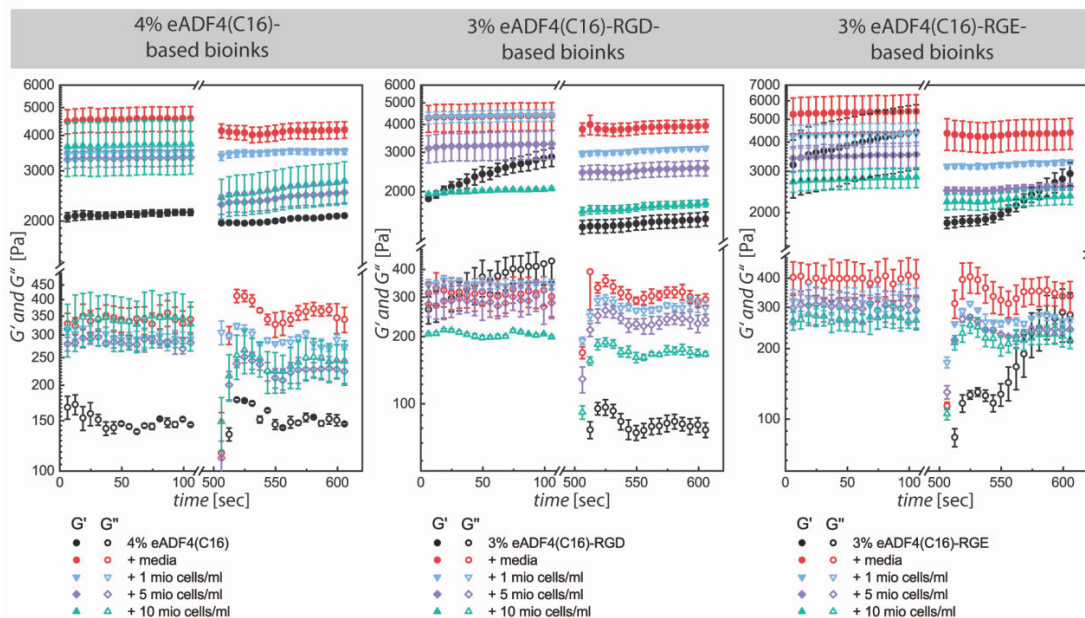


Figure S1. Storage (G') and loss (G'') moduli recovery of recombinant spider silk-based bioinks. Different bioink formulations of 4 % eADF4(C16), 3 % eADF4(C16)-RGD and 3 % eADF4(C16)-RGE + BxPC-3 cells (only protein, protein + 15 % (v/v) media, protein + 1 mio cells/ml, 5 mio cells/ml or 10 mio cells/ml in 15 % (v/v) media) were rheologically analyzed. Samples were treated twice with a constant oscillatory strain of 0.1% for 100 seconds each. For 400 seconds in between, a steady increase of rotational shear rate up to 100 s⁻¹ was applied (data not shown). Recovery was recorded as stability of G' and G'' at low strain before and after high shear rates.

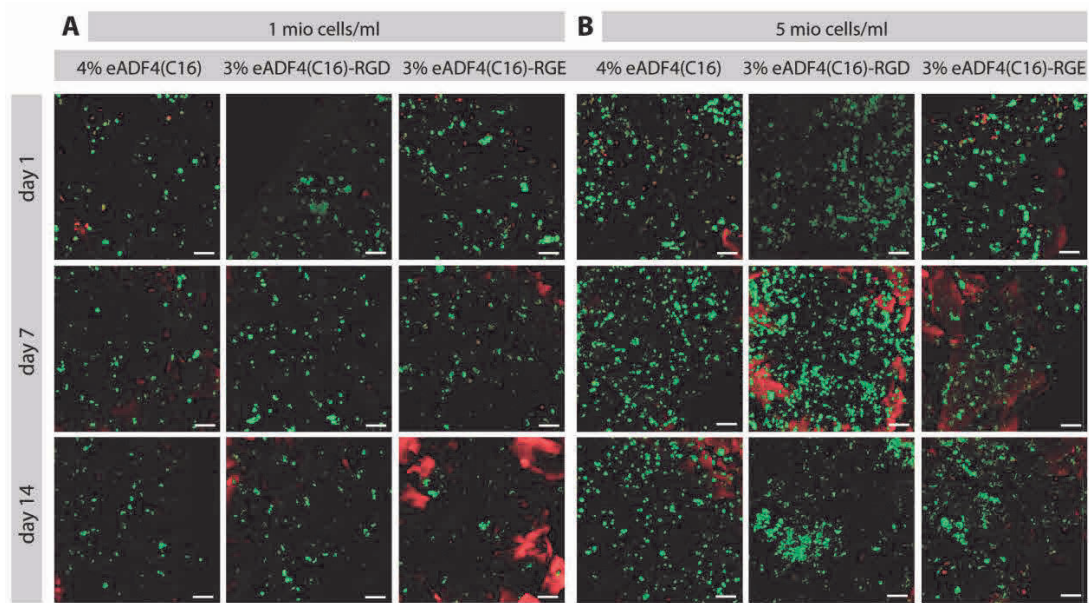


Figure S2. Viability of A) 1 mio cells/ml and B) 5 mio cells/ml BxPC-3 cells in printed constructs made of 4 % eADF4(C16), 3 % eADF4(C16)-RGD or 3 % eADF4(C16)-RGE. Bioinks were printed using a RegenHU Bioplotter with a 22G tapered tip at room temperature and cultivated for up to 14 days at 5 % CO₂, 95 % relative humidity and 37 °C. For CLSM imaging, live cells were stained with Calcein A/M (green) and dead cells with EthD-I (red). Background staining occurs due to interaction of hydrogels with EthD-I (scale bars: 100 μ m).

6.3 Teilarbeit III

Recombinant Spider Silk Gels Derived from Aqueous-Organic Solvents as Depots for Drugs

Autoren:

Vanessa J. Neubauer, Vanessa T. Trossmann, Sofia Jacobi, **Annika Döbl**, und Thomas Scheibel

Das Konzept der Publikation entstand während der durch Vanessa Neubauer und Thomas Scheibel betreuten Masterarbeit von Sofia Jacobi. Die Forschungsstudentin unterstützte bei den rheologischen Messungen und der Erstellung des Freisetzungsprofils des Modellwirkstoffes. Rheologische Charakterisierung sowie ATR-FTIR Messungen zur Sekundärstrukturbestimmung und das Konzept der Organo-Dialyse stammen von Vanessa Neubauer. Die Assemblierungskinetik mit mikroskopischen Aufnahmen wurden von Vanessa Trossmann durchgeführt. Sie fermentierte und reinigte ebenfalls das Protein eADF4(Q16). Vanessa Trossmann und ich waren an wissenschaftlichen Diskussionen beteiligt und lieferten die Druckergebnisse. Das Experiment zur Wirkstoffbeladung und –freisetzung wurde von mir geplant und durchgeführt. Das Manuskript wurde von Vanessa Neubauer verfasst. Vanessa Trossmann und ich trugen zur Vervollständigung der Arbeit bei. Thomas Scheibel war an Konzeptionierung der Studie, wissenschaftlichen Diskussionen und Fertigstellung des Manuskriptes beteiligt.

Der Artikel wurde am 17. Mai 2021 im Journal *Angewandte Chemie International Edition* veröffentlicht.

Nachdruck unter freundlicher Genehmigung des Verlags. Neubauer, J.V., Trossmann, V.T., Jacobi, S., Döbl, A., und Scheibel, T., Recombinant Spider Silk Gels Derived From Aqueous-Organic Solvents as Depots for Drugs. *Angewandte Chemie International Edition* (2021), 11847-11851. Copyright (2021) John Wiley and Sons.

Hydrogels

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 11847–11851

International Edition: doi.org/10.1002/anie.202103147

German Edition: doi.org/10.1002/ange.202103147

Recombinant Spider Silk Gels Derived from Aqueous–Organic Solvents as Depots for Drugs

Vanessa J. Neubauer, Vanessa T. Trossmann, Sofia Jacobi, Annika Döbl, and Thomas Scheibel*

Abstract: Hydrogels are widely used in various biomedical applications, as they cannot only serve as materials for biofabrication but also as depots for the administration of drugs. However, the possibilities of formulation of water-insoluble drugs in hydrogels are rather limited. Herein, we assembled recombinant spider silk gels using a new processing route with aqueous–organic co-solvents, and the properties of these gels could be controlled by the choice of the co-solvent. The presence of the organic co-solvent further enabled the incorporation of hydrophobic drugs as exemplarily shown for 6-mercaptopurine. The developed gels showed shear-thinning behaviour and could be easily injected to serve, for example, as drug depots, and they could even be 3D printed to serve as scaffolds for biofabrication. With this new processing route, the formulation of water-insoluble drugs in spider silk-based depots is possible, circumventing common pharmaceutical solubility issues.

Hydrogels are used for biomedical applications such as tissue engineering, drug delivery, and recently also biofabrication.^[1] Besides polysaccharides, such as alginate^[2] or chitosan,^[3] proteins such as *Bombyx mori* silkworm silk^[4] or gelatine^[5] have been processed into hydrogels using various

methods. Also, hydrogel formation of the recombinant spider silk protein eADF4(C16), which is engineered based on the repetitive core domain of one of the *Araneus diadematus* dragline silk proteins,^[6] has been investigated thoroughly.^[7] Spider silk hydrogels exhibit shear-thinning behaviour,^[7a] which is a crucial requirement for 3D printing and biofabrication^[8] or the administration as drug depots.^[9] Modifications during processing allowed incorporating water-soluble biologicals in eADF4(C16) hydrogels and their sustained release.^[9] However, several pharmaceutical active agents show only poor water solubility or stability and cannot be delivered using hydrogels. Therefore, the aim of this study was to provide drug depots based on gels with the possibility to formulate both water-soluble and water-insoluble drugs.

Ions such as potassium or phosphate effect folding^[10] of spider silk proteins,^[11] and this kosmotropic ion-triggered structure formation is part of the natural assembly process of spider silk.^[12] However, protein folding effects can be also achieved using non-physiological organic co-solvents when they are fully miscible in water.^[13] The presence of organic co-solvents with varying polarity can change the solvation conditions, often leading to protein conformational changes.^[13] The assumption that especially hydrophobic interactions and hydrogen bonds are driving forces of protein folding is commonly agreed with.^[14] Besides intramolecular folding, also intermolecular structure formation can be obtained in aqueous–organic solvents yielding protein assembly and fibrillation.^[15]

Therefore, we investigated a novel gelation route of recombinant spider silk proteins upon fibril assembly in aqueous–organic micro-heterogeneous phases, including the underlying assembly mechanism, and we provide evidence for the use of gels made therewith as drug depots as well as their 3D printability.

Recombinant spider silk proteins have previously been reported to assemble into fibrils and/or particles upon addition of potassium phosphate, and the gained morphology depends on the concentration of the kosmotropic salt.^[6,11,16] Here, we investigated assembly in the presence of co-solvents and -solutes such as DMSO and potassium phosphate and obtained characteristic fibrillation-based sigmoidal turbidity curves^[7a] (Figure 1A). In order to gain more mechanistic insights into this behaviour, three spider silk protein variants differing in their net charge but with otherwise identical amino acid compositions were analysed (see Experimental Section). Potassium phosphate induced fibrillation of the negatively charged eADF4(C16),^[6] which was used as positive control, and its mechanism of fibrillation has been reported previously.^[11] The positively charged eADF4(κ 16)^[17] showed accelerated protein aggregation and phase separation in the

[*] V. J. Neubauer, V. T. Trossmann, S. Jacobi, A. Döbl, Prof. T. Scheibel
Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth
Prof.-Rüdiger-Bormann Strasse 1, 95447 Bayreuth (Germany)

Prof. T. Scheibel
Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG)
Universität Bayreuth
Universitätsstrasse 30, 95440 Bayreuth (Germany),
and
Bayerisches Polymerinstitut (BPI)
Universität Bayreuth
Universitätsstrasse 30, 95440 Bayreuth (Germany),
and
Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB)
Universität Bayreuth
Universitätsstrasse 30, 95440 Bayreuth (Germany),
and
Bayreuther Materialzentrum (BayMAT)
Universität Bayreuth
Universitätsstrasse 30, 95440 Bayreuth (Germany)
E-mail: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:
https://doi.org/10.1002/anie.202103147.

© 2021 The Authors. Angewandte Chemie International Edition published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

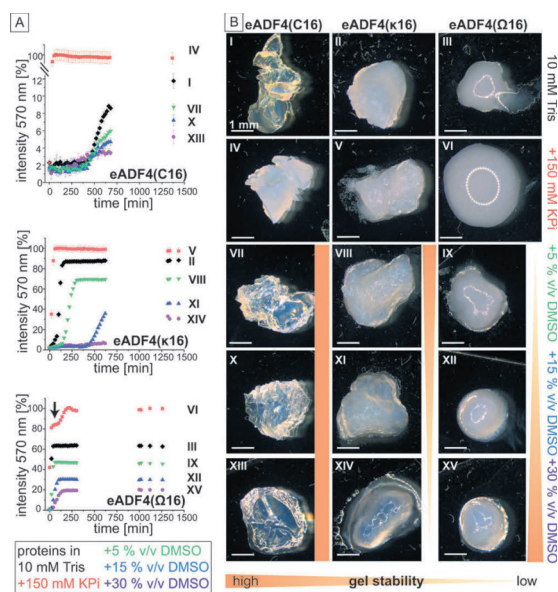


Figure 1. Assembly of three eADF4 variants in presence of different Tris/DMSO volume ratios in comparison to that in presence of 150 mM potassium phosphate (KPi). I–III in 10 mM Tris pH 7.5, IV–VI in presence of 150 mM KPi, VII–IX in presence of 5% (v/v) DMSO, X–XII in presence of 15% (v/v) DMSO, and XIII–XV in presence of 30% (v/v) DMSO. A) Turbidity measurements of eADF4(C16), eADF4(k16), and eADF4(O16) as indicated during fibril formation. Fibril assembly is normalised to KPi samples. The arrow indicates particle formation in case of eADF4(O16). B) Stereomicroscopic images of gels at conditions as indicated; scale bars 1 mm. Image VI shows reflections of the light source appearing as a ring. Qualitative gel stabilities are indicated by stability bars.

presence of potassium phosphate, and the uncharged eADF4(O16)^[18] showed particle formation, indicating a shift towards lower critical potassium phosphate concentrations for particle formation for this variant. The impact of DMSO was analysed in aqueous–organic binary mixtures^[19] with different volumes. Like in potassium phosphate, in DMSO the uncharged variant showed the fastest nucleation and fibril growth based on its low electrostatic repulsion, which was least controllable. The positively charged variant showed a fast turbidity increase assuming an aggregation-driven process, yielding gelly morphologies, but no stable gels. The negative variant exhibited the longest lag-phase and yielded well-controllable gels. As this protein is based on the naturally occurring spider silk consensus sequence, the best-controlled assembly behaviour was expected. It has to be mentioned that the addition of DMSO yielded decreased turbidity for all variants and additionally slowed down fibrillation for eADF4(O16) and extended the lag-phase for eADF4(k16).

Interestingly, gel stability was dependent on both the net charge of the eADF4 variant, as already mentioned above, and the organic additive (Figure 1B), indicating charge-dependent intra- and intermolecular structure formation, as the variants differed in only one amino acid per module in the repetitive sequence. Hydrogen bonds between DMSO and

glutamic acid residues within eADF4(C16) were likely the reason for higher gel stability but were independent of the DMSO concentration. In contrast, DMSO seemed to stabilise eADF4(O16) gels with increasing concentration, based on hydrogen bonds with glutamine residues. The stability of eADF4(k16) gelly morphologies decreased with increasing concentration of DMSO, which forms fewer hydrogen bonds with lysine residues.

To investigate the influence of solvent polarity, 3% (w/v) eADF4(C16) solutions, as the best controllable ones, were used in water, and in blends with less polar DMF and with least polar DMSO. Additionally, to gradually increase the concentration of DMSO, 3% (w/v) eADF4(C16) solutions were dialysed against this solvent. The organo-dialysis step allowed a fast solvent exchange and simultaneously lead to highly transparent gels. The effect on protein structure formation was analysed using ATR-FTIR spectroscopy. Secondary structures in gels were derived from the peaks of the amide I and II bands at 1720–1490 cm^{-1} (Figure 2A) and were quantified using Fourier self-deconvolution.

The highest β -sheet content ($39 \pm 1\%$) was found in case of Tris-hydrogels as well as gels made in DMSO blends. Tris/DMSO-gels from organo-dialysis showed a lower β -sheet content of $28 \pm 5\%$, which might be caused by faster gelation.

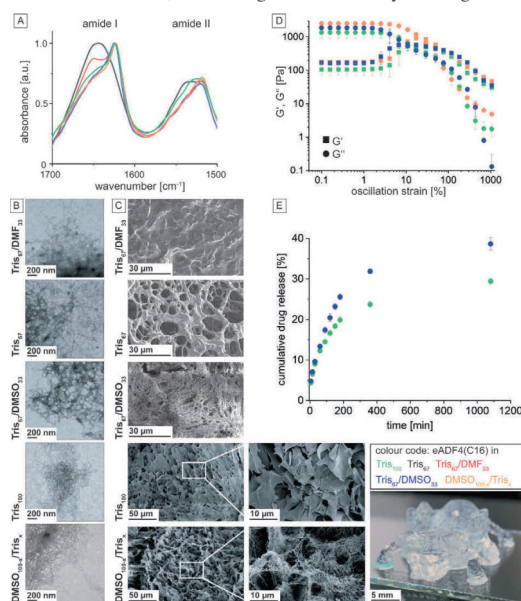


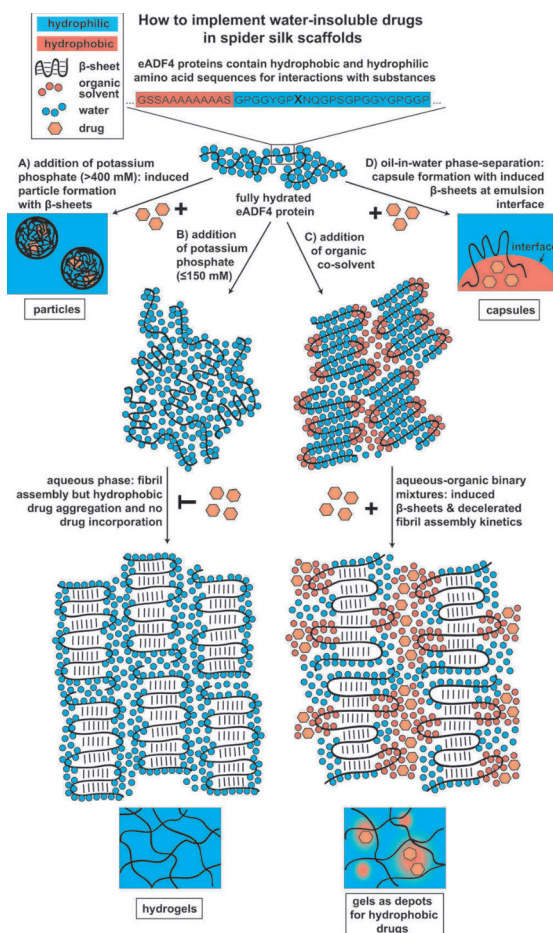
Figure 2. Impact of organic additives on spider silk gels: Comparison of gels from initial 3% (w/v) eADF4(C16) silk solutions in 10 mM Tris pH 7.5 (Tris₁₀₀) diluted with one third volume ratio of the co-solvents water (Tris₆₇), DMF (Tris₆₇/DMF₃₃), or DMSO (Tris₆₇/DMSO₃₃), and gels made upon dialysis against DMSO (DMSO_{100-x}/Tris_x). A) Mean ATR-FTIR spectra of the co-solvent gels. B) TEM images of silk fibrils in the co-solvent gels. C) SEM images of the respective co-solvent gels after freeze-drying. D) Mean amplitude sweep rheological measurements of co-solvent gels. E) Normalised cumulative release of 6-mercaptopurine from 2% (w/v) eADF4(C16) Tris₁₀₀ gel (green data points) and from 2% (w/v) eADF4(C16) Tris₆₇/DMSO₃₃ gel (blue data points) at 37 °C. F) Photo of a 3D printed tarantula from DMSO blend gels (Tris₆₇/DMSO₃₃). Scale bar as indicated.

Far fewer β -sheets were found in the presence of water ($24 \pm 5\%$) or in case of blends with DMF ($22 \pm 4\%$). The formation of fibrillar networks was pronounced in the presence of DMSO, indicated by intertwined fibrils as found in TEM images (Figure 2B). In presence of DMF or water, significantly shorter fibrils were formed. SEM imaging showed a sheet-like structure for lyophilised co-solvent gels with DMF. Fused pore structures were found upon water addition. Strikingly, a highly fibrillary and porous structure was present in case of DMSO-triggered gelation. At higher magnification, pore walls showed fibrillar sub-structures in Tris/DMSO-gels after organo-dialysis (Figure 2C). Sharp pore structures were found in Tris-gels with smooth, sheet-like pores as reported previously.^[7a] Fibrils in Tris-hydrogels might have collapsed into these sheet structures upon freeze-drying. Rheological characterisation (Figure 2D) showed slightly higher storage and loss moduli for 2% (w/v) eADF4(C16) Tris/DMSO-gels in comparison to 3% (w/v) eADF4(C16) Tris-hydrogels. Nonetheless, for Tris/DMSO-gels and Tris-hydrogels, moduli were in the same range, and similar yield points were detected, indicating comparable visco-elastic properties. 3% (w/v) eADF4(C16) Tris/DMSO-gels from organo-dialysis showed the highest storage modulus and a slight shift in the yield point towards higher oscillation strain, indicating higher resistance of the material until break.

Nonetheless, the new gels showed typical spider silk hydrogel shear-thinning behaviour and stability (Figure S1A,B). Accordingly, using a RegenHU bioplotter, multi-layer scaffolds with high shape stability could be 3D printed using the DMSO blend gels (Figure 2F, Figure S3, and Video S4).

To test the application of such gels as drug depots, fluorescein (FITC) was loaded as a first model substance into Tris/DMSO-gels, and a comparison was made to Tris-hydrogels regarding loading and release at 37 °C. Both gel types showed the same release profile (Figure S2), indicating the possibility of generating injectable or transdermal drug-loaded gel depots. Further, the poorly water-soluble 6-mercaptopurine, as clinically relevant cytostatic drug, was loaded into the DMSO-phase of 2% (w/v) eADF4(C16) blend gels. The drug was incorporated by non-covalent interactions, but in case a reversible coupling is intended, a recently published system with a different spider silk variant can be used.^[20] Upon non-covalent introduction in Tris-hydrogels, the water-insoluble drug aggregated during the gelation process and accumulated at the bottom of the gel. In the DMSO blend gel, however, loading and release could be accomplished. These results confirmed the suitability of co-solvent-produced spider silk gels with clinically relevant substances as injectable and even 3D printable drug depots.

Finally, we wanted to unravel the driving force of spider silk assembly in presence of co-solvents. The herein reported route towards spider silk gel formation in aqueous-organic binary mixtures is driven in part by structure formation at organic-water interfaces (Scheme 1). eADF4(C16) was found to form water-insoluble β -sheet structures in microcapsules^[21] with barrier function^[22] upon adsorption at aqueous-organic interfaces. In case of aqueous-organic binary mixtures, micro-



Scheme 1. Illustration of routes towards drug depots made of recombinant spider silk proteins. A) Potassium phosphate-induced co-precipitation of microparticles and any type of drugs. B) Hydrogels cannot incorporate hydrophobic but only hydrophilic drugs during gelation. C) New route of gel formation, allowing the incorporation of hydrophilic as well as hydrophobic drugs. D) Microcapsules can incorporate hydrophilic, hydrophobic, and amphiphilic (at the aqueous-organic interface) drugs. Aqueous-organic binary mixtures as seen in (C) represent intermediate conditions between hydrogel formation in one homogenous (aqueous) phase (B) and phase-separation-induced β -sheet formation at the water-oil interface (D). X = selected amino acids of the silk variants, that is, glutamic acid, glutamine, or lysine.

emulsions can form in presence of organic co-solvents such as DMSO^[23] or DMF,^[13] which are miscible in water.

The formed interphases are micro-heterogeneous^[24] and are based on the interaction of hydrogen bond^[25] forming molecules. These interphases can be described by a side-by-side arrangement of both solvents in molecular clusters.^[25] DMSO and DMF are amphiphilic molecules, which can form hydrogen bonds, for example, with water but also enable hydrophobic interactions among them or with other molecules such as proteins. Similarly, eADF4 exhibits amphiphilic properties due to its amino acid sequence^[26] and can therefore

interact with hydrophobic as well as hydrophilic drugs/molecules. Charged amino acid residues can form hydrogen bonds with DMSO to a varying degree, and negatively charged molecules are favoured over uncharged or positively charged ones.^[27]

Spider silk gels made out of aqueous–organic co-solvents enlarge the range of applications of spider silk-based materials since material properties can be controlled by the choice of the co-solvent and of the used spider silk variant. DMSO is FDA approved^[28] in topical formulations at concentrations at approximately 30% (v/v). Based on our results it can be applied in spider silk gels in pharmaceutical formulations, e.g. for transdermal applications. These gels allow formulation of water-insoluble drugs along with adjustable organic content to yield biocompatible, biodegradable, non-toxic, non-inflammatory, transdermal, injectable, and even 3D printable drug depots. Depending on the application, the drug–silk interaction can be further controlled, for example, by reversible covalent bonds.^[20]

Experimental Section

The engineered spider silk protein eADF4(C16) comprises 16 repeats of the consensus sequence GSSAAAAAASGPGGYG-PENOGSPGPGGYGPGGP (named C-module). The C-module is based on the consensus sequence of the repetitive core domain of the MaSp2 dragline silk fibroin 4 of the European garden spider *Araneus diadematus*.^[6] eADF4(C16) was purchased from AMSilk GmbH (Planegg, Germany). In variant eADF4(κ 16),^[17] all glutamic acid residues are substituted with lysine and in eADF4(Ω 16)^[18a] with glutamine ones. Both proteins were produced and purified as reported earlier.^[6,17,18] Spider silk proteins were dissolved in 6 M guanidinium thiocyanate (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and dialysed against 10 mM Tris buffer, pH 7.5 for several hours, whereas the dialysis of eADF4(Ω 16) was done at 4 °C. Concentration adjustment was conducted, if necessary, by follow-up dialysis in 20% (w/v) poly(ethylene glycol) (PEG, 20 kDa, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) as reported previously^[7a] or using a high vacuum concentrator (Speedvac, Eppendorf). For biphasic gels, co-solvents or co-solute buffers were blended with 3% (w/v) silk solutions and gelled at 37 °C. For organo-dialysis gels, 3% (w/v) silk solutions were dialysed against small volumes (1:100 volume ratio) of DMSO (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) at RT for 4 h without further thermal treatment.

For analysis of the gelation kinetics of recombinant spider silk proteins, turbidity changes were monitored at 570 nm using a microplate reader (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Germany). Triplicates of 100 μ L aliquots were prepared for all solutions (3% (w/v) eADF4(C16), 2% (w/v) eADF4(κ 16), and 1% (w/v) eADF4(Ω 16)). Spider silk solutions were diluted by addition of different volumes of DMSO to reach final concentrations of 5, 15, and 30% (v/v) DMSO in the blend. As a control, 150 mM potassium phosphate was used as fibrillation trigger, and data were normalised to this sample's endpoint.

Gel samples were transferred on glass slides for image collection using a Leica M205C stereomicroscope (Wetzlar, Germany) with Leica LAS software and light reflection from dark field mode. The microscope was equipped with a polarisation lens and a 0.63 \times objective. For scanning electron microscopy (SEM), lyophilised gel samples were investigated after platinum sputtering (2 nm). Images were recorded using a Thermo Scientific (FEI) Apreo VS with a Field Emission Gun at 2 kV and a SE2-detector. Transmission electron microscopy (TEM) images of stained (2% uranyl acetate) spider silk fibrils immobilised on Pioloform-coated 100-mesh copper grids (Plano GmbH, Germany) were recorded using a JEM-2100 TEM

(JEOL, Japan), operated at 80 kV, and imaging was carried out using a 4000 \times 4000 charge-coupled device camera (UltraScan 4000, Gatan, USA) and Gatan Digital Micrograph software (version 1.83.842).

Rheological behaviour was investigated using a Discovery Hybrid Rheometer 3 (TA, USA) with a plate–plate geometry (diameter 25 mm) at 25 °C. To prevent drying effects on the gels, a wet sponge adapter was used. Amplitude sweeps ($n=3$) were recorded as triplicates at 31.4 rads^{-1} and a strain of 0.1–1000%.

Attenuated total reflectance-Fourier transformation infrared spectroscopy (ATR-FTIR) was conducted with lyophilised gel samples. Spectra ($n=3$) were recorded using a Bruker Tensor 27 (Ettlingen, Germany) with a germanium crystal at a spectral resolution of 2 cm^{-1} with 100 scans. Atmospheric compensation algorithm was applied in OPUS 8.0 software to correct water vapour and carbon dioxide fluctuations during the measurement. Fourier self-deconvolution was carried out as reported previously^[29] with band assignment for partial secondary structure determination.^[30]

To study the release of 6-mercaptopurine (Sigma, USA) from 2% (w/v) Tris₁₀₀ and 2% (w/v) Tris₆₇/DMSO₃₃ eADF4(C16) gels, the drug was dissolved in 20 μ L DMSO and added to the spider silk solutions or the DMSO-phase. Triplicate release measurements were conducted in 1:1 blends of MilliQ water:DMSO. UV absorbance was monitored using a UV spectrometer (Genesys 10S UV/Vis, Thermo Scientific). Spectra were recorded between 200 and 600 nm, and peak maxima at 328 nm were used to determine cumulative release curves. 3D dispense plotting was carried out using a RegenHU 3D Discovery Gen1 (Switzerland) biplotter with cartridges size 3cc and according pistons. The printing speed was pre-set to 10 mms^{-1} . 2% (w/v) Tris₆₇/DMSO₃₃ eADF4(C16) gels were printed with Luer lock plastic needles with an inner diameter of 0.41 mm and an applied pressure of 0.3 bar.

Acknowledgements

The authors acknowledge the funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—project number 326998133-TRR225 (funded subproject: C01 TS) and SCHE603/24-1. The authors thank Anika Winkler for transmission electron microscopy and Hendrik Bargel for scanning electron microscopy. Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Conflict of interest

TS is founder and share-holder of AMSilk GmbH.

Keywords: binary mixtures · co-solvent · hydrophobic effect · micro-heterogeneity · self-assembly

- [1] J. L. Drury, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337–4351.
- [2] a) W.-H. Tan, S. Takeuchi, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 2696–2701; b) A. G. Tabriz, M. A. Hermida, N. R. Leslie, W. Shu, *Biofabrication* **2015**, *7*, 045012.
- [3] a) N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010**, *62*, 83–99; b) Y. Hong, H. Song, Y. Gong, Z. Mao, C. Gao, J. Shen, *Acta Biomater.* **2007**, *3*, 23–31.
- [4] N. Wu, H. Yu, M. Sun, Z. Li, F. Zhao, Y. Ao, H. Chen, *ACS Appl. Biol. Mater.* **2020**, *3*, 721–734.
- [5] T. Zehnder, B. Sarker, A. R. Boccaccini, R. Detsch, *Biofabrication* **2015**, *7*, 025001.
- [6] D. Huemmerich, C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph, T. Scheibel, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13604–13612.

- [7] a) K. Schacht, T. Scheibel, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2488–2495; b) E. DeSimone, K. Schacht, T. Scheibel, *Mater. Lett.* **2016**, *183*, 101–104; c) E. DeSimone, K. Schacht, T. Jüngst, J. Groll, T. Scheibel, *Pure Appl. Chem.* **2015**, *87*, 737–749.
- [8] a) K. Schacht, T. Juengst, M. Schweinlin, A. Ewald, J. Groll, T. Scheibel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2816–2820; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 2858–2862; b) E. DeSimone, K. Schacht, A. Pellert, T. Scheibel, *Biofabrication* **2017**, *9*, 044104.
- [9] S. Kumari, H. Bargel, M. U. Anby, D. Lafargue, T. Scheibel, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 1750–1759.
- [10] F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1888**, *24*, 247–260.
- [11] U. K. Slotta, S. Rammensee, S. Gorb, T. Scheibel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4592–4594; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4668–4670.
- [12] a) L. Eisoldt, A. Smith, T. Scheibel, *Mater. Today* **2011**, *14*, 80–86; b) E. Doblhofer, A. Heidebrecht, T. Scheibel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 9361–9380; c) M. Heim, D. Keerl, T. Scheibel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3584–3596; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3638–3650.
- [13] D. R. Canchi, A. E. García, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, *64*, 273–293.
- [14] C. N. Pace, S. Treviño, E. Prabhakaran, J. M. Scholtz, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2004**, *359*, 1225–1235.
- [15] N. Javid, K. Vogtt, C. Krywka, M. Tolan, R. Winter, *ChemPhys-Chem* **2007**, *8*, 679–689.
- [16] A. Lammel, M. Schwab, U. Slotta, G. Winter, T. Scheibel, *ChemSusChem* **2008**, *1*, 413–416.
- [17] E. Doblhofer, T. Scheibel, *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 988–994.
- [18] a) S. Kumari, G. Lang, E. DeSimone, C. Spengler, V. T. Trossmann, S. Lücker, M. Hudel, K. Jacobs, N. Krämer, T. Scheibel, *Data Brief* **2020**, *32*, 106305; b) S. Kumari, G. Lang, E. DeSimone, C. Spengler, V. T. Trossmann, S. Lücker, M. Hudel, K. Jacobs, N. Krämer, T. Scheibel, *Mater. Today* **2020**, *41*, 21–33.
- [19] M. R. Harpham, N. E. Levinger, B. M. Ladanyi, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 283–293.
- [20] H. M. Herold, A. Döbl, S. Wohlrab, M. Humenik, T. Scheibel, *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 4904–4912.
- [21] K. D. Hermanson, D. Huemmerich, T. Scheibel, A. R. Bausch, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1810–1815.
- [22] K. D. Hermanson, M. B. Harasim, T. Scheibel, A. R. Bausch, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 6442–6446.
- [23] J. Hansen, F. Platten, D. Wagner, S. U. Egelhaaf, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 10270–10280.
- [24] D. N. Shin, J. W. Wijnen, J. B. F. N. Engberts, A. Wakisaka, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 6014–6020.
- [25] a) S. Roy, S. Banerjee, N. Biyani, B. Jana, B. Bagchi, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 685–692; b) A. Wakisaka, H. Abdoul-Carime, Y. Yamamoto, Y. Kiyozumi, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, *94*, 369–374; c) A. Wakisaka, T. Ohki, *Faraday Discuss.* **2005**, *129*, 231–245; d) D. B. Wong, K. P. Sokolowsky, M. I. El-Barghouthi, E. E. Fenn, C. H. Giammanco, A. L. Sturlaugson, M. D. Fayer, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 5479–5490.
- [26] C. B. Borkner, S. Lentz, M. Müller, A. Fery, T. Scheibel, *ACS Appl. Polym. Mater.* **2019**, *1*, 3366–3374.
- [27] K. L. Shaw, G. R. Grimsley, G. I. Yakovlev, A. A. Makarov, C. N. Pace, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1206–1215.
- [28] K. Capriotti, J. A. Capriotti, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2012**, *5*, 24–26.
- [29] J. Petzold, T. B. Aigner, F. Touska, K. Zimmermann, T. Scheibel, F. B. Engel, *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 1701427.
- [30] X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, *Macromolecules* **2006**, *39*, 6161–6170.

Manuscript received: March 3, 2021

Accepted manuscript online: March 26, 2021

Version of record online: May 1, 2021



Supporting Information

Recombinant Spider Silk Gels Derived from Aqueous–Organic Solvents as Depots for Drugs

*Vanessa J. Neubauer, Vanessa T. Trossmann, Sofia Jacobi, Annika Döbl, and Thomas Scheibel**

anie_202103147_sm_miscellaneous_information.pdf

anie_202103147_sm_Video.mp4

Experimental section

Rheological characterization of the co-solvent spider silk gels

Rheological behaviour was investigated using a Discovery Hybrid Rheometer 3 (TA, USA) with a plate-plate geometry (diameter 25 mm) at 25 °C. To prevent drying effects, a wet sponge adapter was used. Frequency sweep experiments (n=3) were recorded at angular frequencies between 0.1-100 rad/s and 100-0.1 rad/s for recovery at 50 % strain. Time sweep experiments (n=3) were recorded at angular frequencies of 31.4 rad/s and 0.5 % strain for 120 s.

Release studies of FITC as model substance from co-solvent spider silk gels

To study the release of 5(6)-Carboxy-fluorescein (FITC, Thermo Scientific, Germany) from 2 % w/v Tris- and 2 % w/v Tris₆₇/DMSO₃₃ eADF4(C16) gels, FITC was dissolved in 20 µL DMSO and added to the spider silk solutions. Samples without FITC loading served as reference. Triplicate release measurements were done in 1:1 blends of MilliQ water:DMSO. Fluorescence detection was conducted using a fluorescence spectrometer FP-6300 (JASCO, Germany) at an excitation wavelength of 495 nm. Spectra were recorded between 500 and 600 nm, and peak maxima at 517 nm were used to determine release curves. Error bars were calculated according to the law of error propagation.

3D dispense plotting of co-solvent spider silk gels

For 3D dispense plotting, the printing speed of the RegenHu Bioplotter was pre-set to 20 mm/s. 2 % w/v Tris₆₇/DMSO₃₃ eADF4(C16) gels were printed with Luer lock plastic and blunt steel needles with an inner diameter of 0.41 mm and an applied pressure of 0.3 - 0.5 bar. 3 % w/v Tris/DMSO-gels after organo-dialysis were printed using Luer lock steel blunt needles with 0.51 mm inner diameter and an applied pressure of 1.06 bar.

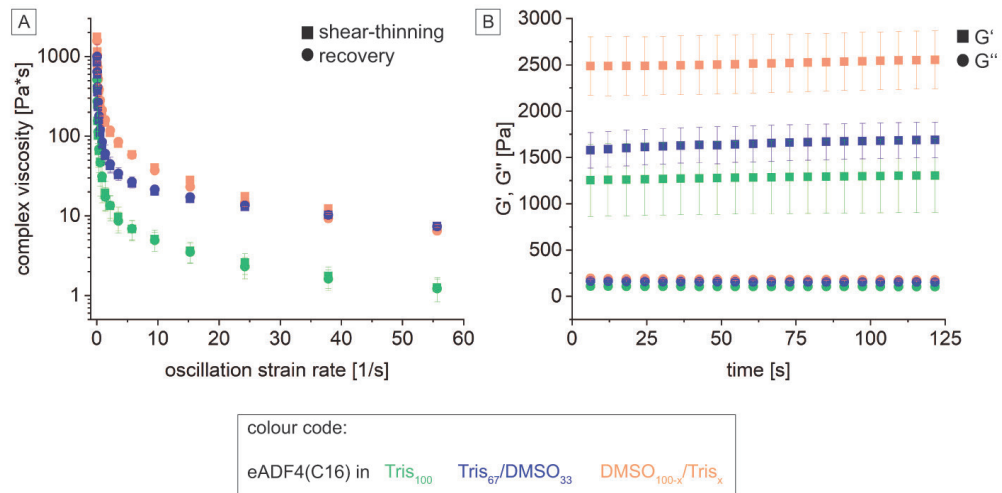


Figure S1: Gels from initial 3 % w/v eADF4(C16) silk solutions in 10 mM Tris pH 7.5 (Tris₁₀₀, green), diluted with 33% v/v of the co-solvent DMSO (Tris₆₇/DMSO₃₃, blue), and gels made upon dialysis against DMSO (DMSO_{100-x}/Tris_x, orange) were tested concerning the impact of organic additives. A) Mean frequency sweep rheological measurements of co-solvent gels showed shear-thinning behaviour and recovery properties of the gels. B) Mean time sweep rheological measurements of co-solvent gels showed gel stability over time.

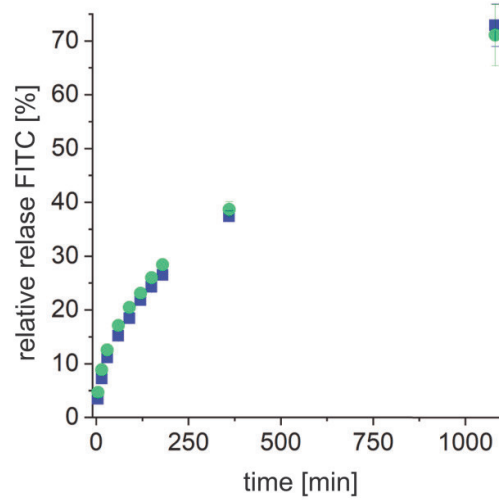


Figure S2: Normalized release of the model drug 5(6)-Carboxy-fluorescein (FITC) from gels at 37 °C: Gels from 2 % w/v eADF4(C16) silk solutions in 10 mM Tris pH 7.5 (Tris₁₀₀, green) and in presence of the co-solvent DMSO (Tris₆₇/DMSO₃₃, blue).

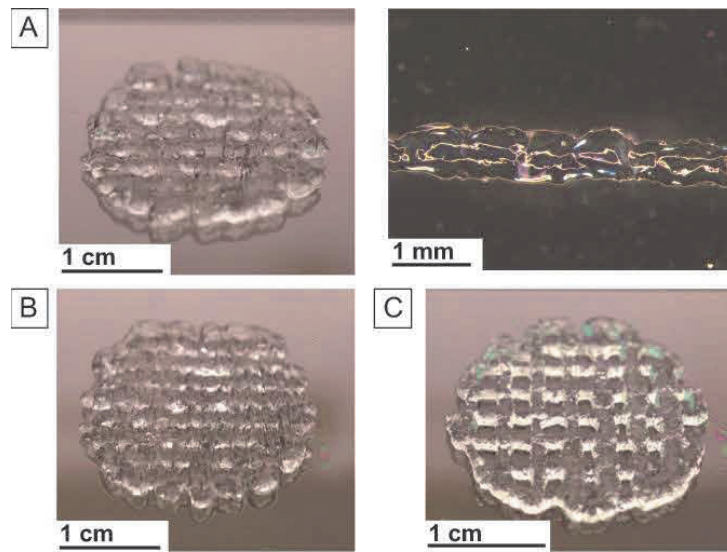


Figure S3: Images of 3D printed scaffolds of A) 2 % w/v Tris₆₇/DMSO₃₃ eADF4(C16) gels printed using a conical needle (0.41 mm diameter) on a RegenHU Bioplotter (left) and stereomicroscopic image of one single strand (right); B) 2 % w/v Tris₆₇/DMSO₃₃ eADF4(C16) gels printed using a steel needle (0.41 mm diameter); C) 3 % w/v Tris/DMSO-gels from organo-dialysis printed using a steel needle (0.51 mm diameter) and larger line spacing. Scale bars as indicated.

A Video of 3D dispense plotting of a tarantula scaffold is available as Supporting Information Video S4.

6.4 Teilarbeit IV

Designed Spider Silk-Based Drug Carriers for Redox- or pH-Triggered Drug Release

Autoren:

Heike M. Herold*, **Annika Döbl***, Stefanie Wohlrab, Martin Humenik, und Thomas Scheibel

* Gleichberechtigte Co-Autorenschaft

Die Publikation entstand durch Zusammenarbeit von Heike Herold und mir in gleichen Teilen. Alle Autoren waren an Konzeptionierung der Studie beteiligt. Heike Herold führte die Experimente des redox-sensitiven Systems mit dem Modellwirkstoff DTNB durch. Von mir stammen die Daten zum pH-sensitiven System mit dem Modellwirkstoff DMAB. Beide Experimente zur Kopplung und Freisetzung der Wirkstoffe 6-Mercaptopurin und Doxorubicin, sowie die Konfokal Mikroskopie zur Partikelaufnahme wurden von mir durchgeführt. Heike Herold und ich verfassten zusammen das Manuskript und erstellten die Abbildungen. Alle Autoren waren an wissenschaftlichen Diskussionen und der Fertigstellung des Manuskriptes beteiligt.

Der Artikel wurde am 28. November 2020 im Journal *Biomacromolecules* veröffentlicht.

Nachdruck unter freundlicher Genehmigung des Verlags. Herold, H., Döbl, A., Wohlrab, S., Humenik, M., und Scheibel T., Designed Spider Silk-Based Drug Carrier for Redox- or pH-Triggered Drug Release, *Biomacromolecules* (2020) 21 (12), 4904-4912. Copyright (2021) American Chemical Society.



pubs.acs.org/Biomac

Article

Designed Spider Silk-Based Drug Carrier for Redox- or pH-Triggered Drug Release

Heike M. Herold,[◆] Annika Döbl,[◆] Stefanie Wohlrab, Martin Humenik, and Thomas Scheibel*[◆]



Cite This: *Biomacromolecules* 2020, 21, 4904–4912



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

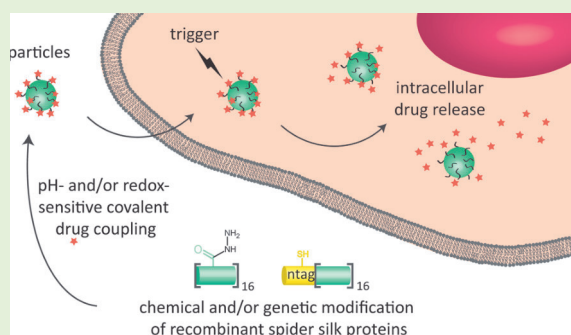


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Targeted drug delivery and controlled drug release can be obtained using specifically designed polymers as carriers. Due to their biocompatibility and biodegradability and especially the lack of an immune response, materials made of spider silk proteins are promising candidates for use in such applications. Particles made of recombinant spider silk proteins have previously been shown to be suitable drug and gene carriers as they could readily be loaded with various drug substances or biologicals, and subsequent release was observed over a defined period of time. However, the respective substances were bound non-covalently via hydrophobic or charge–charge interactions, and hence, the release of loaded substances could not be spatio-temporally controlled. Here, we present a setup of chemically modified recombinant spider silk protein eADF4 and variants thereof, combining their well-established biocompatible properties with covalent drug binding and triggered release upon changes in the pH or redox state, respectively. The usefulness of the spider silk platform technology was shown with model substances and cytostatic drugs bound to spider silk particles or films via a pH-labile hydrazine linker as one option, and the drugs could be released from the spider silk carriers upon acidification of the environment as seen, e.g., in tumorous tissues or endo/lysosomes. Sulfhydryl-bearing spider silk variants allowed model substance release if exposed to intracellular GSH (glutathione) levels as a second coupling option. The combination of non-immunogenic, nontoxic spider silk materials as drug carriers with precisely triggerable release chemistry presents a platform technology for a wide range of applications.



INTRODUCTION

The development of drug delivery carriers is important for the preparation, administration, site-specific targeting, pharmacokinetics, and diminishing toxicity of active agents.^{1,2} In conventional therapies, drugs are mainly administered intravenously without carrier in the hope of reaching and effecting the desired cells, even though drugs do not recognize diseased tissue/cells. Even in cases where the highest dose of drug with no life threatening consequences is given, restrictions of the patient's quality of life might occur caused by systemic side effects.^{3,4} Association of otherwise stand-alone drug molecules to particulate carriers made of lipids or polymers offers the possibility to control their biodistribution and release profile. In addition, pharmacological properties like solubility and circulating half-life of the drug can be improved by using drug delivery vehicles.^{5,6} By choosing different materials as well as modifications thereof, vehicles can be targeted to specific cells or tissues, and the drugs can be released in a sustained and/or in a triggered manner.^{7–10}

Nanoparticles are often used as a matrix for coupling or adhesion of drug molecules as well as for encapsulation.¹¹ The applied material must meet general requirements for biomedical applications such as high biocompatibility, non-

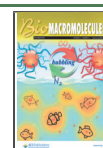
immunogenicity, nontoxicity, and biodegradability.¹² While synthetic polymers offer well-defined structures and fine-tunable degradation behavior, they often require harsh processing conditions limiting the range of drugs and/or biologicals to be loaded. In contrast, some natural polymers can be processed under mild conditions such as in aqueous buffers. Adding to that, they carry functional groups on the surface for modifications and can be loaded with drugs by various mechanisms like electrostatic and hydrophobic interactions as well as covalent bonding.¹³ However, natural polymers are often associated with an explicit immune response of the human body.^{14–17}

Amongst non-immunogenic natural materials, those made of silk proteins have been investigated extensively for their use as drug delivery vehicles in the past, as summarized in recently

Received: July 30, 2020

Revised: November 13, 2020

Published: November 28, 2020



ACS Publications

© 2020 American Chemical Society

4904

<https://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01138>
Biomacromolecules 2020, 21, 4904–4912

published reviews.^{18,19} For example, particles made of *Bombyx mori* silk have been loaded with the cytostatic compound gemcitabine and used to treat lung tumor-induced mice.²⁰ It was shown that small molecules like dyes showed charge-dependent release rates,²¹ in the case of natural compounds like resveratrol, solubility could be increased.²² *B. mori* silk derived particles have also been reported for the delivery of proteins, genes, and vaccines.¹⁹ Studies using particles made of *B. mori* silk make up the vast majority of data on drug delivery using silk nano- and microparticles. A few studies, however, employ engineered spider silk. For example, particles made of proteins derived from *Nephila clavipes* have been loaded with the chemotherapeutic doxorubicin showing tunable release profiles.²³ The advantage of using spider silk instead of *B. mori* silk is the absence of sericin, a sometimes problematic component of silkworm silk.^{24,25} Recombinant production of spider silk proteins enables genetic modifications and ensures homogeneity and constant quality of the material.²⁶ All these studies used non-covalent loading or encapsulation processes, leading to only a partial control of the release. While release rates could be influenced, the diffusion driven processes could not be completely stopped and/or triggered.

eADF4(C16) is a recombinant spider silk protein based on one protein of the dragline silk of the European garden spider *Araneus diatematus*. The engineered polyanionic protein consists of 16 repeats of the consensus sequence of the core domain of *A. diatematus* fibroin 4 (ADF4) called C-module (GSSAAAASAGPGGYGPENQGPSGG-GYGPGGP).^{27,28} Particles are produced by salting out using potassium phosphate, and particle sizes depend on protein concentration and mixing intensity. Thereby, (sub)-microspheres can be produced in the range between 200 nm and 2 μm .²⁹ After loading eADF4(C16) particles with small positively charged molecules by diffusion, constant release rates at physiological conditions and accelerated rates within acidic environments have been realized *in vitro*, but only for a few hours.³⁰ Genetic engineering allowed further adjustment of the protein's amino acid sequence for specific applications. A polycationic variant of the protein, eADF4(κ 16), has been generated by exchanging all glutamic acid residues with lysine ones. Particles made thereof showed enhanced uptake in HeLa cells, as analyzed using flow cytometry.³¹ Based on electrostatic interactions, these particles could be loaded with negatively charged low molecular weight substances and nucleic acids.³² In a different setup to enhance the cellular uptake of eADF4(C16) particles, the cell adhesion sequence RGD was genetically added, resulting in the protein eADF4(C16)-RGD.³¹ Further genetic engineering enabled the incorporation of one individual cysteine residue in *ntag^{Cys}*-eADF4(C16) for site-specific chemical modifications.²⁶ Fusion of an antigenic peptide from ovalbumin to the recombinant spider silk protein eADF4(C16) led to uptake by dendritic cells and effective priming of cytotoxic T cells necessary for successful vaccination. *In vivo* experiments during this study confirmed that the recombinant spider silk protein alone does not induce pro-inflammatory or unspecific immune responses in mice.³³

Here, (sub)micron-particles made of variants of eADF4(C16) were covalently bonded with drugs for stimulus-responsive release. By coupling the model substance DTNB (*S,S'*-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) to cysteine-containing variants of the recombinant spider silk protein via disulfide bonds, a carrier setup was established for redox-responsive release. Chemical modification of the proteins' carboxyl groups

with a hydrazone linker and coupling of the model substance DMAB (*para*-dimethylaminobenzaldehyde) led to a pH-responsive carrier system. For possible applications as stationary drug depots, we also investigated spider silk films with the identical chemical entities. Further, controlled release of cytostatics (i.e., 6-mercaptopurine and doxorubicin) from recombinant spider silk particles was studied.

MATERIALS AND METHODS

Protein Production and Purification. The polyanionic recombinant spider silk protein eADF4(C16), the polycationic variant eADF4(κ 16) as well as the cysteine-bearing variants of both proteins, *ntag^{Cys}*-eADF4(C16) and *ntag^{Cys}*-eADF4(κ 16) were produced and purified as described previously.^{27,32,34,35} Briefly, the proteins were recombinantly produced in *E. coli* BL21 gold (DE3), purified using a heat step in which they stayed soluble followed by precipitation using ammonium sulfate and subsequent lyophilization of the protein pellet.

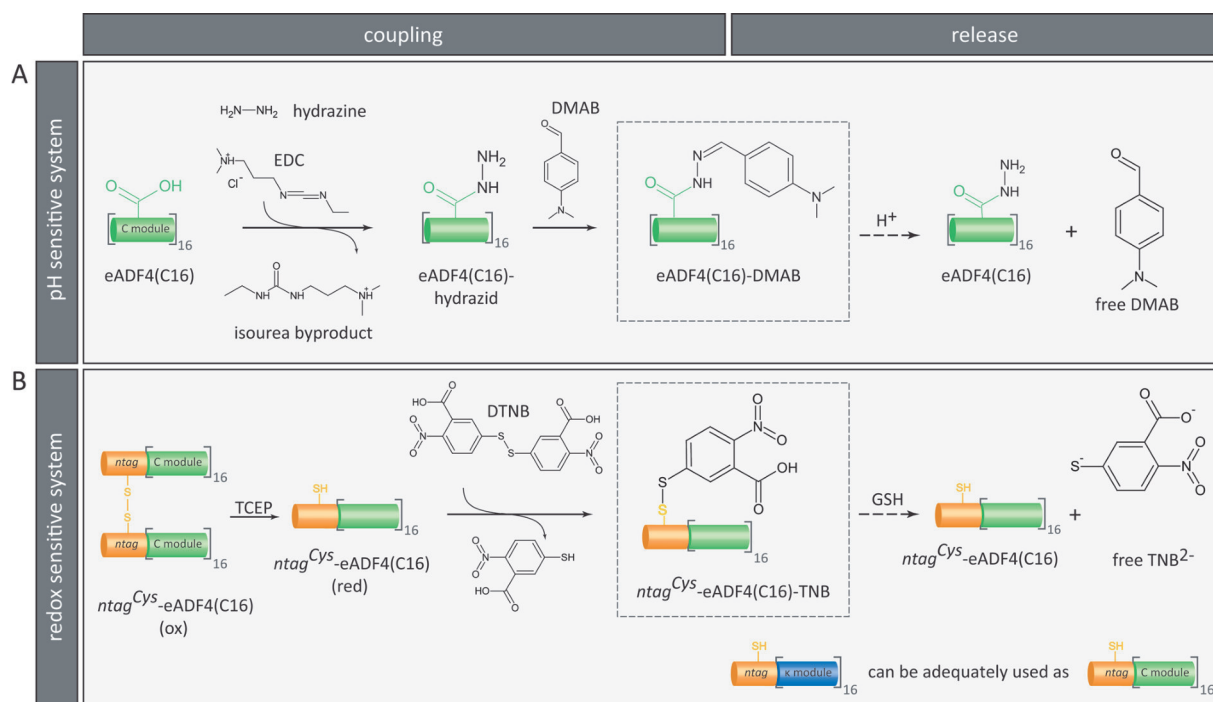
Film Casting. The proteins were dissolved in hexafluoroisopropanol (HFIP) at 1 wt % and cast on polystyrene surfaces (12-well cell culture plates, Nunc, Langensfeld, Germany) for drug release studies or Petri dishes for contact angle measurements. After evaporation of the organic solvent, the remaining spider silk films were post-treated with ethanol to create water-insoluble films.³⁶ For contact angle measurements, spider silk films were cast at 0.25 mg/cm². To investigate substance coupling and release from films, 20 nmol spider silk were applied to every single well (3.7 cm²), and the solvent was evaporated resulting in films with \sim 0.25 mg/cm².

Particle Production. First, spider silk proteins were dissolved in 6 M guanidinium thiocyanate (GdmSCN) and dialyzed against aqueous buffer (25 mM Tris, pH 7.5) using a dialysis membrane with a molecular weight cutoff of 6–8 kDa (Spectrum Laboratories, Irving, Texas). For the preparation of the pH-sensitive system, 25 mM HEPES-Na, pH 8 was used for dialysis. For particle production, the dialyzed spider silk solution was diluted to 0.5 mg/mL and mixed by inverting three times with an equivalent volume of 2 M potassium phosphate (pH 7.5) inducing precipitation. After three washing steps, the particles were lyophilized and stored at -20 °C.

Substance Coupling. Redox-Sensitive System. To bind TNB (*S*-thio-2-nitrobenzoic acid) or 6-mercaptopurine via a disulfide bond to the recombinant spider silk proteins, the latter were reduced by addition of a 10-fold molar excess of TCEP (tris(2-carboxyethyl)-phosphine) for 2 h. After removal of the reductive agent using dialysis (soluble protein), centrifugation (particles), or exchange of supernatant (films), a 25-fold molar excess of Ellman's reagent or 6-mercaptopurine (100 mM in DMSO) was added for 1 h. Thorough washing of both films and particles in PBS enabled removing of non-covalently bound substances. This process was monitored by checking the supernatants after each washing step concerning UV/vis absorbance of the bound substance.

pH-Sensitive System. To reversibly bind DMAB or doxorubicin to eADF4(C16) in a pH-sensitive manner, the protein was functionalized with hydrazine. Therefore, the carboxylic groups of eADF4(C16) were activated upon addition of 15-fold molar excess of EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), while at the same time a 30-fold excess of hydrazine was added to the spider silk films or particles to generate hydrazide groups. After shaking for 3 h at room temperature, three washing steps followed. Addition of a 10-fold molar excess of DMAB or doxorubicin for 24 h yielded the corresponding hydrazone. Washing steps allowed removal of excess/unbound substances. To weaken electrostatic attraction between doxorubicin and the recombinant spider silk protein eADF4(C16), washing steps after coupling were performed with the addition of 200 mM NaCl.

Coupling Efficiency. The degree of model substance coupling was assessed after re-solubilization of the modified particles or films in 6 M GdmSCN at 50 mg/mL and subsequent dilution with buffer to 1 mg/mL, optionally adding TCEP as a reducing agent. The amount of a coupled model substance per spider silk molecule was calculated

Scheme 1. Model Substance Coupling and Release Using a pH (A) and a Redox (B) Sensitive Drug Release System Based on Recombinant Spider Silk Protein (eADF4) Variants^a

^a(A) For pH-sensitive binding of *para*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB), the carboxylic groups of eADF4(C16) were activated using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) to bind hydrazine, which reacts with the aldehyde moiety of DMAB. At acidic conditions, the covalent bond hydrolyses and the bound substance is released. (B) For the redox-sensitive system, *ntag*^{Cys} versions of two recombinant spider silk proteins (negatively charged *ntag*^{Cys}-eADF4(C16) and positively charged *ntag*^{Cys}-eADF4(κ16)) containing a single cysteine residue were employed. Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) was added to reduce the sulfhydryl groups before applying 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to couple a TNB moiety to the respective spider silk protein. At reducing conditions, the 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB²⁻) is released, followed by ionization yielding the 2-nitro-5-thiobenzoate anion (TNB²⁻).

upon measuring UV/vis absorbance and correlating the protein peak at 280 nm to the respective model substance peak of DMAB at 350 nm or TNB²⁻ in the reduced state at 412 nm, (number of repeats, *n* = 3).

Zeta Potential. To characterize the spider silk particles' surface charge, their electrophoretic mobility was measured (number of repeats, *n* = 3) in 1/111 PBS at 25 °C using a ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), as described previously.³⁷ The respective zeta potential was calculated according to the theory of Smoluchowski.³⁸

Contact Angle. The hydrophobicity of the spider silk films coupled with a model substance was analyzed by measuring the static contact angle of a water droplet on the spider silk film surface. The contact angles were determined (number of repeats, *n* = 3) immediately after placement of the droplets using an OCA contact angle system (Dataphysics Instruments GmbH, Germany) with SCA20 software (Dataphysics Instruments GmbH, Germany) and a Young–Laplace fit.³⁹

One Pot Steady State Substance Release. Steady state substance release for both particles and films was determined by investigating the materials containing 20 nmol of the modified spider silk protein within 1 mL of release buffer (5 mM GSH for release of TNB²⁻ or 10 mM citrate, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl at pH 4 for release of DMAB) at different time points within the solution, i.e., without renewing the release buffer (number of repeats, *n* = 3).

Cumulative Substance Release. Aliquots of particles corresponding to 20 nmol of spider silk protein were resuspended in 1 mL release buffer (redox-sensitive release: PBS at pH 7.4 or PBS plus reducing agent; pH-sensitive release: PBS at pH 7.4 or 10 mM citrate,

137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl at pH 6, pH 5, or pH 4) and incubated for 5 min or 4 h (adjusted to 24, 4, and 12 h for doxorubicin release) while shaking at 37 °C (Thermomixer compact; Eppendorf, Germany) followed by centrifugation at 17000 × *g* for 2 or 5 min (redox system or pH system, respectively). The pellets were resuspended in fresh release buffer, while the supernatants were centrifuged again to remove possibly remaining particles before UV–vis spectroscopic detection of the respective model substance or drug in the supernatant (number of repeats, *n* = 3).

Films consisting of 20 nmol spider silk protein were submerged in 1 mL of the respective release buffer and shaken for 15 min or 4 h at 37 °C (Unimax 1010 shaker; Heidolph, Germany). Supernatants were directly measured via UV–vis spectroscopy to determine the amount of the model substance. The released amounts of model drug during each release cycle were added up to depict the cumulative release of the model substance from the respective carrier system.

Cell Culture Experiments. HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Merck, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (Biochrom, Berlin, Germany), 1.0% v/v GlutaMAX (Gibco, Grand Island, USA), and 0.1% v/v gentamycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in an incubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) at 5% CO₂ and 95% relative humidity at 37 °C. Cells were seeded on μ-slides (8-well; ibidi GmbH, Martinsried, Germany) at a cell density of 10–20,000 cells/cm². After 4 h, particles were added to adherent cells at a concentration of 9.6 ng/μL. For particle uptake, eADF4(κ16) and eADF4(C16) particles were permanently labeled with fluorescein using NHS chemistry (NHS-Fluorescein; Thermo Scientific, Waltham, USA). To enhance cellular uptake of eADF4(C16) particles,

Table 1. Coupling Amount (Given in Mol Model Substance/Mol Silk) of DMAB and TNB to Particles, Films, and Soluble Spider Silk Variants (Highest Values of Each System Are Highlighted)

| samples | DMAB to eADF4(C16) [mol model substance/mol silk] | TNB to <i>ntag</i> ^{Cys} -eADF4(C16) [mol model substance/mol silk] | TNB to <i>ntag</i> ^{Cys} -eADF4(κ 16) [mol model substance/mol silk] | TNB to eADF4(C16) [mol model substance/mol silk] | TNB to eADF4(κ 16) [mol model substance/mol silk] |
|-----------------------|--|---|--|---|--|
| in solution | 0.148 ± 0.005 | 0.717 ± 0.028 | 0.693 ± 0.033 | | |
| particles | 2.026 ± 0.051 | 0.197 ± 0.020 | 0.542 ± 0.060 | | |
| films | 1.482 ± 0.115 | 0.143 ± 0.013 | 0.384 ± 0.015 | | |
| controls ^a | | | | | |
| solution | 0.077 ± 0.014 | | | 0.004 ± 0.001 | 0.017 ± 0.001 |
| particles | 0.067 ± 0.019 | | | 0.023 ± 0.000 | 0.071 ± 0.001 |
| films | 0.367 ± 0.049 | | | 0.004 ± 0.000 | 0.005 ± 0.000 |

^aDMAB binding to unmodified eADF4(C16) and TNB binding to eADF4(C16/ κ 16) without the cysteine-bearing *ntag*^{Cys} served as controls to analyze nonspecific binding.

Table 2. Physico-Chemical Characterization of Spider Silk Particles and Films upon Model Substance Coupling

| spider silk particles and films | zeta potential of particles [mV] | | | water contact angle on films [°] | | |
|---|----------------------------------|--------------------------|----------------|----------------------------------|--------------------------|----------------|
| | before coupling | hydrazine functionalized | after coupling | before coupling | hydrazine functionalized | after coupling |
| eADF4(C16)-DMAB | -23.5 ± 1.5 | -16.7 ± 1.1 | -15.0 ± 1.2 | 51.9 ± 2.4 | 61.3 ± 0.9 | 67.3 ± 2.3 |
| <i>ntag</i> ^{Cys} -eADF4(C16)-TNB | -28.2 ± 1.4 | | -27.9 ± 1.4 | 57.0 ± 7.5 | | 50.2 ± 2.2 |
| <i>ntag</i> ^{Cys} -eADF4(κ 16)-TNB | +13.2 ± 0.3 | | +13.5 ± 0.7 | 57.1 ± 4.1 | – | 62.9 ± 3.2 |

they were coated with eADF4(C16)-RGD.^{31,32} Therefore, the particles were incubated for 15 min in a 1 mg/mL eADF4(C16)-RGD solution in 25 mM TrisHCl pH 7.5 buffer prior to cell culture experiments. After cultivation for 24 h, cells were fixed with 3.7% w/v para-formaldehyde for 30 min, washed with PBS buffer, and permeabilized for 20 min with 0.1% v/v Triton X. Nuclei and actin filaments were stained at a final concentration of 100 nM DAPI and 100 nM rhodamine-phalloidin for 30 min at room temperature. Imaging was performed using a confocal laser scanning microscope (DMi8; Leica, Wetzlar, Germany). For intracellular release experiments, particles were permanently labeled with rhodamine, again using NHS chemistry (NHS-Rhodamine; Thermo Scientific, Waltham, USA). Trigger-sensitive green fluorescent dyes, i.e., 5(6)-carboxyfluorescein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) coupled to hydrazine-modified eADF4(C16) particles using a pH-sensitive bond and MTS-CF488A (Biotium, Fremont, USA) coupled to *ntag*^{Cys}-eADF4(C16/ κ 16) using a redox-sensitive disulfide bond, were additionally bound for release studies, as described above. Cells were analyzed for 48 h in a LifeCell microscope (DMI6000; Leica, Wetzlar, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

It has been shown previously that small molecules as well as proteins can be loaded onto recombinant spider silk particles based on the sequence of ADF4 and subsequently released over minutes to hours in a diffusion-driven way.^{30,32,40,41} Here, model substances were bound covalently, but reversibly to materials made of variants of eADF4. The model substances could be released in response to changes in pH or redox potential, respectively (Scheme 1). For the pH sensitive system, eADF4(C16) was modified with hydrazine to react with aldehyde or ketone groups. The eADF4(C16)-hydrazide was incubated in a DMAB solution to generate the corresponding hydrazone. For the redox sensitive system, the cysteine-containing silk proteins *ntag*^{Cys}-eADF4(C16) or *ntag*^{Cys}-eADF4(κ 16), after the reduction of the sulphydryl groups, were incubated in Ellman's solution (DTNB) to bind a TNB moiety. DMAB was tested as a model for the aldehyde or ketone group containing drugs like doxorubicin⁴² and nabumeton,⁴³ while DTNB served as a model substance for the sulphydryl group containing drugs like 6-mercaptopurine.⁴⁴

Coupling Efficiency. First, the coupling efficiencies of DMAB to hydrazine-modified eADF4(C16) as well as the coupling of TNB to the cysteine-containing variants *ntag*^{Cys}-eADF4(C16) and *ntag*^{Cys}-eADF4(κ 16) were investigated in solution, for particles (~1 μ m) as well as for films (~0.25 mg/cm²) (Table 1).

In the case of DMAB, coupling to particles showed the best coupling efficiency. For each spider silk proteins molecule, approximately two out of 17 potential binding sites could be occupied with DMAB, which equals to a coupling efficiency of ~12%. The fact that coupling to films yielded a slightly lower coupling efficiency, may be attributed to the lower surface-to-volume ratio of films and respectively available coupling sites. Coupling of DMAB to soluble spider silk protein was decreased by a factor of ~10 in comparison to that to the particles. The accessibility of carboxylic groups should be improved in the soluble state, since the proteins are intrinsically unstructured and fully extended. However, the low coupling efficiency was caused most probably by concomitant inter- and intramolecular crosslinking reactions between the hydrazide groups and EDC-activated carboxylic groups, thereby eliminating potential coupling sites.³⁶ Control samples of unmodified eADF4(C16) revealed that DMAB barely bound non-covalently to eADF4(C16); however, for eADF4(C16) films, a distinct amount of DMAB was present in the sample even after several washing steps, which may be caused by unspecific non-covalent hydrophobic interactions between the substance molecules and the spider silk film.

In contrast, the best TNB coupling efficiency was achieved if coupling was performed with soluble protein, since there is no cross-coupling between the proteins. Both *ntag*^{Cys}-eADF4 variants offer one thiol group per spider silk molecule and were modified with an efficiency of ~70% (Table 1). Strikingly, no significant difference was observed between TNB coupling to the negatively charged *ntag*^{Cys}-eADF4(C16) and the positively charged *ntag*^{Cys}-eADF4(κ 16). In the case of the substance coupling to particles and films, the cysteine groups were less accessible. In particles and films, the amount of coupled drug was further decreased due to charge–charge repulsion with DNTB. As with the pH responsive system,

coupling to particles yielded a higher coupling efficiency than to films.

Zeta Potential of Particles and Contact Angle of Films. The influence of the model substance coupling on the physicochemical properties of the spider silk surfaces was analyzed regarding spider silk film surface hydrophobicity and particle surface charge (Table 2). Concerning the surface charge of particles, as expected, hydrazine modification of eADF4(C16) rendered them less negatively charged. Since the zeta potential values were still negative (pKa 8), the hydrazine functionalization was obviously incomplete explaining the low coupling efficiencies with DMAB. Coupling of the neutral DMAB molecule did not significantly alter zeta potential values. The films' hydrophobicity increased upon hydrazine functionalization as well as upon subsequent DMAB coupling. In contrast, TNB coupling had only minor effects on the zeta potential, since modifications took place at the cysteine residue, which does not contribute to the net charge of polyanionic *ntag*^{Cys}-eADF4(C16) or polycationic *ntag*^{Cys}-eADF4(κ 16). Likewise, the hydrophobicity, as evaluated by water contact angle measurements, remained similar, independent of coupling of TNB. Since only one molecule per protein could be bound, the degree of contribution was negligible.

One Pot Substance Release. To determine the release of the two model substances from spider silk particles and films at release conditions, the amount of substance was quantified in the supernatant at different time points and related to the totally coupled amount of substance (Figure S1). pH-sensitive hydrazone bond breakage was accompanied by subsequent DMAB release, which was detectable over hours for both particles as well as films. While the released DMAB was stable at acidic pH, the absorption peak used for quantification changed at neutral pH after 24 h and split up into two peaks, and hence, could not be used for quantification. Therefore, a shorter time period, i.e., 4 h, was chosen for subsequent release studies. While the pH-sensitive DMAB-based system showed sustained release over several hours, immediate release was observed for the redox-sensitive system. A steady-state was reached approximately after 1 min. Under the applied conditions, the influence of electrostatic repulsion of TNB²⁻ from *ntag*^{Cys}-eADF4(C16) was less pronounced, and no substantial differences could be detected between the release kinetics from *ntag*^{Cys}-eADF4(C16) or *ntag*^{Cys}-eADF4(κ 16). For practical reasons, a release time of 5 min was chosen for the subsequent release studies.

Cumulative Substance Release. For cumulative release studies, drug-loaded particles and films were incubated at 37 °C using the indicated release buffers. The supernatants were removed for quantification and replaced with a fresh release medium. At acidic conditions, as they occur for particles after cellular uptake by endocytosis or in the extracellular space of tumorous tissues, DMAB was released from particles or films, whereas only a minor extent of release took place at neutral pH mimicking e.g., blood conditions (Figure 1). Within 24 h, almost 50% of DMAB could be released from eADF4(C16) particles at pH 4 (Figure 1A), whereas films showed release of almost 30% (Figure 1B) within the same time. Yet, films showed a weak nonspecific DMAB release at nonrelease conditions at pH 7.4, reflecting the release of loaded DMAB without covalent cross-linking, as depicted above. Therefore, the amount observed in the control sample was subtracted from all curves to determine the amount

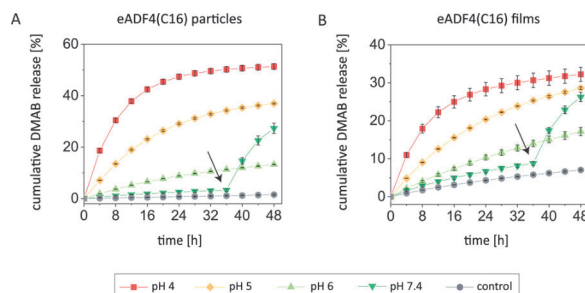


Figure 1. Cumulative DMAB release from eADF4(C16) particles (A) and films (B) at various pH values. Particles and films were incubated in release media at different pH values. DMAB release was quantified by UV–vis spectroscopy. The spider silk samples were incubated in a fresh release medium after each measurement. The total amount of model substance coupled to particles or films was set to 100% (Table 1). The plots show the accumulated released model substance. As a control (gray dots), DMAB release from non-hydrazine-functionalized eADF4(C16) was measured. To confirm the ability to trigger drug release, the pH of the release medium was changed from pH 7.4 to 4 after 36 h, as indicated by arrows. All experiments were carried out at 37 °C.

of covalently bound and released DMAB. Nevertheless, with increasing acidity of the release medium, more pH-labile bonds were hydrolyzed and more DMAB was released. The release could be triggered after 36 h upon changing the neutral medium to an acidic one (pH 4), confirming the good stability of the pH-labile bond at neutral pH. During the measurements, some loss of particles occurred due to preparation issues, and thus, the release curves did not reach up to 100%, and slightly less release was seen if triggered after 36 h compared to instant release.

For the redox-sensitive system, cumulative release of TNB²⁻ from particles and films was assessed at intra and extracellular GSH levels, i.e., at 5 mM and 5 μ M, respectively, in PBS and at nonrelease conditions (0 M GSH) for comparison (Figure 2). For particles, a very fast release was observed, and approximately 80% of the loaded model substance could be released within 15 min at conditions, mimicking an intracellular redox environment (Figure 2A,C). For films, the release kinetics were slightly slower resulting in 80% release within 30 min (Figure 2B,D). While intracellular GSH levels induced fast release, exposure of the samples to lower reducing potential of the extracellular environment, or incubation in PBS lead to only little TNB²⁻ release. Importantly, release could again be triggered upon changing the redox potential to 5 mM GSH after this incubation.

To investigate the completeness of the release, spider silk carriers were dissolved in a chaotropic salt solution (6 M guanidinium thiocyanate) subsequent to the release studies and analyzed using UV–vis spectroscopy for the presence of model substances (Table S1). These measurements were performed as described before for the determination of coupling efficiencies.

For TNB²⁻, the release was almost complete (Figure 2), which was confirmed by the little amount of detectable substance in spider silk samples after denaturation. Although there was only a release of up to 50% of DMAB detectable upon release (Figure 1), the subsequent analysis revealed that for particles nearly no further model substances were bound to the carriers. This observation can be explained by loss of

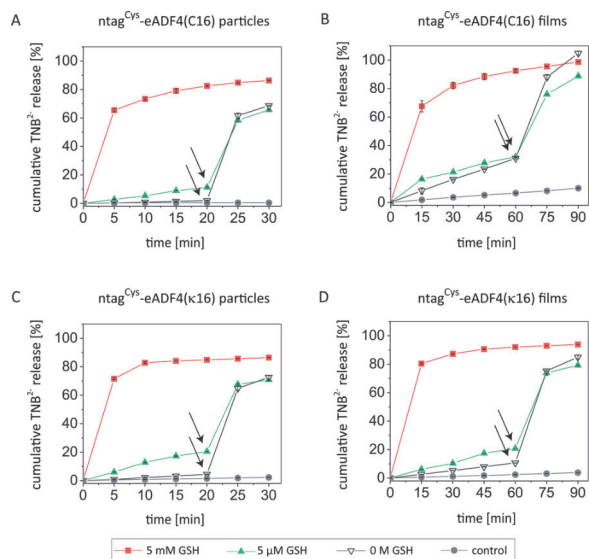


Figure 2. Cumulative TNB²⁻ release from ntag^{Cys}-eADF4(C16) and ntag^{Cys}-eADF4(k16) particles (A, C) and films (B, D). Free TNB²⁻ in the supernatant was detected using UV-vis spectroscopy. After each measurement, fresh release medium was added to the samples, and the cumulative released TNB²⁻ amount was plotted against time. The total amount of model substance coupled to particles or films was set to 100% (Table 1). As a control, nonspecific TNB²⁻ release was measured for eADF4(C16) or eADF4(k16) not containing a cysteine residue. To confirm the ability to trigger drug release, the release medium of all measurements was changed to 5 mM GSH after 20 min (particles) or 60 min (films), as indicated by arrows. All experiments were carried out at 37 °C.

particles during the preparation of samples while measuring the release. In the case of films, a significant DMAB amount was still bound to the spider silk scaffold, indicating the release would have been continued over a time period even longer than the evaluated time frame.

Coupling and Release of Cytostatic Drugs. To demonstrate the versatility of the spider silk based carrier systems, the cytostatic compounds 6-mercaptopurine and doxorubicin were coupled as established for the model substances. Release kinetics of 6-mercaptopurine from ntag^{Cys}-eADF4(k16) particles (Figure 3A) and doxorubicin from eADF4(C16) particles (Figure 3B) were indistinguishable to that of the model substances. Intracellular reducing conditions (5 mM) led to quick release of 6-mercaptopurine within the redox-sensitive system while nonreducing (0 M) and extracellular conditions (5 μM) caused very little drug release. For both these samples, a release could be triggered upon changing the reduction potential after 20 min (Figure 3A). For the pH-sensitive system, doxorubicin release was investigated upon a pH-trigger, since the most important feature of the pH-sensitive system is the long-term stability of the reversible hydrazone bond at neutral conditions (pH 7.4), followed by prolonged release after application of the trigger (pH 4). With the coupling and release of doxorubicin, these characteristics of the pH-sensitive system could be confirmed (Figure 3B).

The focus for this proof of the principal study was to demonstrate the functionality and transferability of the

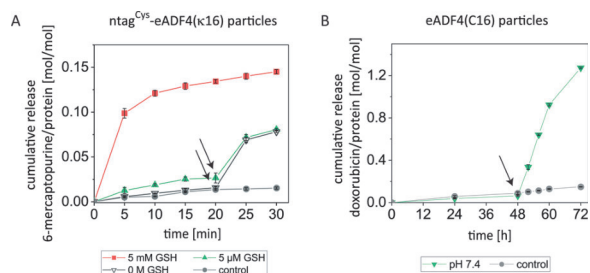


Figure 3. Cumulative redox-sensitive 6-mercaptopurine release from ntag^{Cys}-eADF4(k16) particles (A) and cumulative pH-sensitive doxorubicin release from hydrazine-functionalized eADF4(C16) particles (B). Free drug in the supernatant was detected using UV-vis spectroscopy. After each measurement, fresh release medium was added to the samples, and the cumulative released drug amount in relation to the total amount of protein in each sample plotted against time. As a control, nonspecific release of 6-mercaptopurine from eADF4(k16), lacking the cysteine residue and of doxorubicin from non-hydrazone-functionalized eADF4(C16) was measured (gray dots). To confirm the ability to trigger drug release, the medium was changed to that providing release conditions after 20 min for the redox-sensitive system (to 5 mM GSH) (A) or after 48 h for the pH-sensitive system (to pH 4) (B), as indicated by arrows. All experiments were carried out at 37 °C.

systems. These results confirm the applicability of the spider silk platform for respective drugs or other substances.

Intracellular Model Substance Release in HeLa Cells.

To confirm the cellular uptake of eADF4(k16) and eADF4(C16) particles (coated with eADF4(C16)-RGD), confocal laser scanning microscope images of HeLa cells incubated with fluorescein-labeled particles were acquired. The pictures clearly showed accumulation of both particle variants within cells near the nuclei (Figure 4C,D). To demonstrate the applicability of the drug carrier systems, cell culture experiments were performed to qualitatively study intracellular release of green fluorescent dyes and to reveal the effectiveness of the release. In addition to pH- and redox-sensitive coupling of green dyes to spider silk particles, they were permanently labeled with rhodamine (red fluorescence) using NHS chemistry to enable detection. HeLa cells were incubated with particles for up to 2 days. Using live cell microscopy, fluorescence images were taken every hour, confirming the release of the green dyes within cells, as the particles' color overlay changed from green to more orange/red over time, indicating a reduced colocalization of the green fluorescence dyes with the permanent red fluorescence of the particles (Figure 4A,B). It is important to note that the signals for the green fluorescence of the released dyes were very weak, since they did not accumulate in the cells.

pH-sensitive particles uptaken by cells underwent a change in color during the first 16 h of incubation, while extracellular particles kept their initial color within the same period, indicating release only inside of the HeLa cells. The timely manner of the release was in accordance with the results obtained *in vitro* (Figure 1).

Redox-sensitive particles showed a release far more persistent than measured *in vitro*. While the model substance TNB²⁻ was released within minutes upon application of the trigger (Figure 2), a visible color change indicating release of the fluorescent dye started after 8 h of incubation and continued for both intra- and extracellular particles (Figure 4).

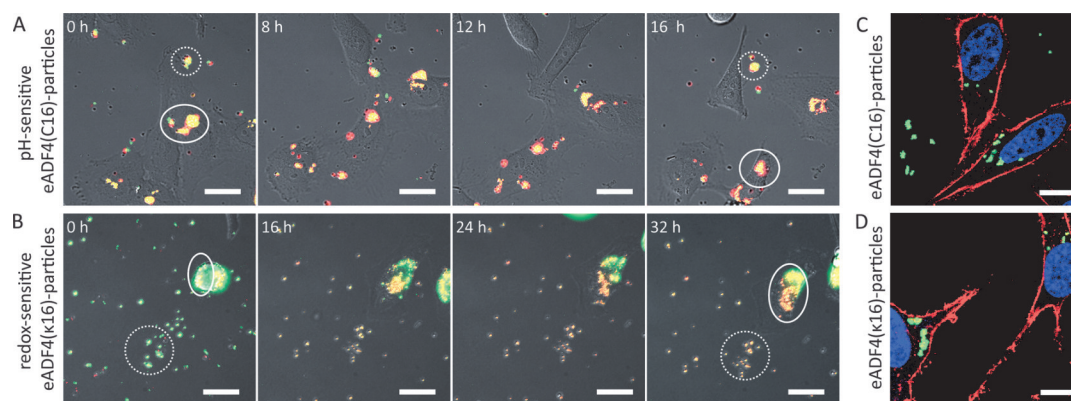


Figure 4. Intracellular pH- (A) and redox- (B) sensitive release of green fluorescent dyes (5(6)-carboxyfluorescein and MTS-CF488A). HeLa cells were incubated with permanently rhodamine-labeled recombinant spider silk particles (red fluorescence) to analyze the uptake of such particles at 5% CO₂, 95% humidity, and 37 °C. Additionally, the identical eADF4(C16) particles were functionalized with hydrazine and coupled with 5(6)-carboxyfluorescein to analyze pH-sensitive release (A), and *ntag*^{Cys}-eADF4(κ16) particles were coupled with MTS-CF488A to analyze redox-sensitive release (B). Representation of intra (continuous lines) and extracellular (dotted lines) particles are selected for each release system. Confocal laser scanning images of HeLa cells incubated with fluorescein-labeled eADF4(C16) particles coated with eADF4(C16)-RGD (C) and eADF4(κ16) particles (D) after 24 h of cultivation. Cells were seeded at a density of 10,000 cells/cm² and particles added at a final concentration of 9.6 ng/μl. Cells were fixed, permeabilized and stained with DAPI and phalloidin-rhodamine prior to imaging. To enhance cellular uptake, particles made of eADF4(C16) were coated with eADF4(C16)-RGD. Scale bars: 25 μm.

Like the pH-sensitive particles, these particles did not show a release in the control sample without cells (Figure S2), suggesting reducing conditions as a trigger in the cell culture media caused by the cells. Responsible for the prolonged release of the fluorescent dye might be an altered non-covalent interaction between drug and carrier or weaker reducing conditions within the cells than estimated.

CONCLUSIONS

Spider silk particles have been previously established as biocompatible drug carrier systems.^{23,30,32,40,41,45,46} However, the drug loading and release properties mainly relied on non-covalent interactions, and hence, obstructed precise spatio-temporally controlled drug release within target cells or tissues, as the release would start instantaneously upon contact with body fluids such as blood. Here, a versatile system is presented to specifically and covalently bind drugs to spider silk carriers allowing trigger-controlled drug release. Cysteine modifications of the underlying spider silk protein allowed the development of redox-sensitive carriers. Upon exposure to intracellular GSH levels, TNB²⁻ as a model substance or 6-mercaptopurine as a cytostatic drug was released with fast kinetics. While there are reports of such fast kinetics using disulfide bonds as a redox sensitive release system,⁴⁷ the majority of results show a slightly slower release system, comparable to our findings from cell culture experiments, which take place within hours up to 1 day.^{48–50} In contrast, coupling of DMAB as a model substance or doxorubicin as a cytostatic drug to hydrazine-modified spider silk proteins enabled pH-responsive drug release. Acidification of the carriers' environment lead to a slow, sustained release of drugs from the respective carriers. While comparable release kinetics, meaning ongoing release for hours up to multiple days, has been published for other systems using a pH-sensitive hydrazone linker,^{51–53} our material additionally combines biocompatibility with an easy, nontoxic, all aqueous production, and the possibility for genetic and chemical modification. In contrast to other natural and synthetic polymers, recombinant spider silk particles do not evoke

unspecific immune responses and are not pro-inflammatory.³³ Altogether, the presented platform technology constitutes a highly versatile basis for future pharmaceutical applications, such as for treatment of cancer or other acute or chronic diseases. The data allows the development of safe and efficacious remedies for a whole plethora of applications.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.0c01138>.

Time frame evaluation of drug release, drug bound to carriers after release measurement, and cell culture control samples (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Thomas Scheibel – Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG), Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB), and Bayreuther Materialzentrum (BayMAT), Universität Bayreuth, Bayreuth 95447, Germany; Bayerisches Polymerinstitut (BPI), Bayreuth 95440, Germany; orcid.org/0000-0002-0457-2423; Phone: +49 (0) 921 55 6700; Email: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

Authors

Heike M. Herold – Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Bayreuth, Bayreuth 95447, Germany

Annika Döbl – Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Bayreuth, Bayreuth 95447, Germany

Stefanie Wohlrab – Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Bayreuth, Bayreuth 95447, Germany

Martin Humenik – Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Bayreuth, Bayreuth 95447, Germany; orcid.org/0000-0002-2097-8941

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.biomac.0c01138>

Author Contributions

◆H.M.H. and A.D. contributed equally to this work. H.M.H., A.D., S.W., M.H., and T.S. designed the study. H.M.H. and A.D. performed the experiments. All authors discussed the results and provided critical feedback. H.M.H. and A.D. took the lead in writing the manuscript. M.H., S.W., and T.S. reviewed and edited the manuscript. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare the following competing financial interest(s): TS is co-founder and shareholder of AMSilk GmbH.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), project no. 326998133, TRR 225 (Subproject C01). The authors would like to thank Andreas Schmidt and Johannes Diehl for fermentation and protein purification, Tamara Aigner for critical comments on the manuscript, and Adrian Golser for helpful advice concerning cell culture experiments.

REFERENCES

- Allen, T. M.; Cullis, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* **2004**, *303*, 1818–1822.
- Duncan, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 347.
- Urruticoechea, A.; Alemany, R.; Balart, J.; Villanueva, A.; Vinals, F.; Capella, G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 3–10.
- Kerbel, R. S.; Kamen, B. A. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 423.
- Shi, J.; Votruba, A. R.; Farokhzad, O. C.; Langer, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3223–3230.
- Zhang, L.; Gu, F.; Chan, J. M.; Wang, A. Z.; Langer, R. S.; Farokhzad, O. C. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *83*, 761–769.
- Bertrand, N.; Wu, J.; Xu, X.; Kamaly, N.; Farokhzad, O. C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2014**, *66*, 2–25.
- Ding, C.; Li, Z. A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *76*, 1440–1453.
- Indermun, S.; Govender, M.; Kumar, P.; Choonara, Y. E.; Pillay, V. Stimuli-responsive polymers as smart drug delivery systems: Classifications based on carrier type and triggered-release mechanism. In *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications*; Makhlof, A. S. H., Abu-Thabit, N. Y., Eds.; Woodhead Publishing: 2018; Vol. 1, pp. 43–58.
- Nehoff, H.; Parayath, N. N.; Domanovitch, L.; Taurin, S.; Greish, K. Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 2539–2555.
- Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 631–651.
- Grund, S.; Bauer, M.; Fischer, D. Polymers in Drug Delivery—State of the Art and Future Trends. *Adv. Eng. Mater.* **2011**, *13*, B61–B87.

- Nitta, S. K.; Numata, K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 1629–1654.
- Dang, J. M.; Leong, K. W. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 487–499.
- Leal-Egaña, A.; Scheibel, T. Silk-based materials for biomedical applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *55*, 155–167.
- Modulevsky, D. J.; Cuerrier, C. M.; Pelling, A. E. Biocompatibility of subcutaneously implanted plant-derived cellulose biomaterials. *PLoS One* **2016**, *11*, No. e0157894.
- Gorgieva, S.; Kokol, V. Collagen-vs. gelatine-based biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives. In *Biomaterials: Applications for Nanomedicine*; 2011; *2*, 17–52.
- Pandey, V.; Haider, T.; Jain, P.; Gupta, P. N.; Soni, V. Silk as a leading-edge biological macromolecule for improved drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *55*, 101294.
- Pham, D. T.; Tiyafoonchai, W. Fibroin nanoparticles: a promising drug delivery system. *Drug Delivery* **2020**, *27*, 431–448.
- Mottaghitalab, F.; Kiani, M.; Farokhi, M.; Kundu, S. C.; Reis, R. L.; Gholami, M.; Bardania, H.; Dinarvand, R.; Geramifar, P.; Beiki, D.; Atyabi, F. Targeted Delivery System Based on Gemcitabine-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Lung Cancer Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 31600–31611.
- Lammel, A. S.; Hu, X.; Park, S.-H.; Kaplan, D. L.; Scheibel, T. R. Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials* **2010**, *31*, 4583–4591.
- Lozano-Pérez, A. A.; Rodríguez-Nogales, A.; Ortiz-Cullera, V.; Algeri, F.; Garrido-Mesa, J.; Zorrilla, P.; Rodríguez-Cabezas, M. E.; Garrido-Mesa, N.; Utrilla, M. P.; De Matteis, L.; de la Fuente, J. M.; Cenis, J. L.; Gálvez, J. Silk fibroin nanoparticles constitute a vector for controlled release of resveratrol in an experimental model of inflammatory bowel disease in rats. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 4507–4520.
- Jastrzebska, K.; Florczak, A.; Kucharczyk, K.; Lin, Y.; Wang, Q.; Mackiewicz, A.; Kaplan, D. L.; Dams-Kozłowska, H. Delivery of chemotherapeutics using spheres made of bioengineered spider silks derived from MaSp1 and MaSp2 proteins. *Nanomedicine* **2018**, *13*, 439–454.
- DeLee, J. C.; Smith, M. T.; Green, D. P. The reaction of nerve tissue to various suture materials: A study in rabbits. *J. Hand Surg.* **1977**, *2*, 38–43.
- Schacht, K.; Scheibel, T. Processing of recombinant spider silk proteins into tailor-made materials for biomaterials applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *29*, 62–69.
- Wohlrab, S.; Müller, S.; Schmidt, A.; Neubauer, S.; Kessler, H.; Leal-Egaña, A.; Scheibel, T. Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6650–6659.
- Huemmerich, D.; Helsen, C. W.; Quedzuweit, S.; Oschmann, J.; Rudolph, R.; Scheibel, T. Primary Structure Elements of Spider Dragline Silks and Their Contribution to Protein Solubility. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13604–13612.
- Scheibel, T. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb. Cell Factories* **2004**, *3*, 14.
- Lammel, A.; Schwab, M.; Slotta, U.; Winter, G.; Scheibel, T. Processing Conditions for the Formation of Spider Silk Microspheres. *ChemSusChem* **2008**, *1*, 413–416.
- Lammel, A.; Schwab, M.; Hofer, M.; Winter, G.; Scheibel, T. Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2233–2240.
- Elsner, M. B.; Herold, H. M.; Müller-Herrmann, S.; Bargel, H.; Scheibel, T. Enhanced cellular uptake of engineered spider silk particles. *Biomater. Sci.* **2015**, *3*, 543–551.
- Doblhofer, E.; Scheibel, T. Engineering of Recombinant Spider Silk Proteins Allows Defined Uptake and Release of Substances. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *104*, 988–994.
- Lucke, M.; Mottas, I.; Herbst, T.; Hotz, C.; Römer, L.; Schierling, M.; Herold, H. M.; Slotta, U.; Spinetti, T.; Scheibel, T.;

Winter, G.; Bourquin, C.; Engert, J. Engineered hybrid spider silk particles as delivery system for peptide vaccines. *Biomaterials* **2018**, *172*, 105–115.

(34) Spieß, K.; Wohlrab, S.; Scheibel, T. Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter* **2010**, *6*, 4168–4174.

(35) Herold, H. M.; Aigner, T. B.; Grill, C. E.; Krüger, S.; Taubert, A.; Scheibel, T. SpiderMAEn: recombinant spider silk-based hybrid materials for advanced energy technology. *Bioinspired, Biomimetic Nanobiomater.* **2019**, *8*, 1–108.

(36) Huemmerich, D.; Slotta, U.; Scheibel, T. Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins. *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* **2006**, *82*, 219–222.

(37) Schierling, M. B.; Doblhofer, E.; Scheibel, T. Cellular uptake of drug loaded spider silk particles. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 1515–1523.

(38) Sze, A.; Erickson, D.; Ren, L.; Li, D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *261*, 402–410.

(39) Huhtamäki, T.; Tian, X.; Korhonen, J. T.; Ras, R. H. A. Surface-wetting characterization using contact-angle measurements. *Nat. Protoc.* **2018**, *13*, 1521–1538.

(40) Hofer, M.; Winter, G.; Myschik, J. Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1554–1562.

(41) Blüm, C.; Scheibel, T. Control of drug loading and release properties of spider silk sub-microparticles. *J. Bionanosci.* **2012**, *2*, 67–74.

(42) Sun, T.-M.; Wang, Y.-C.; Wang, F.; Du, J.-Z.; Mao, C.-Q.; Sun, C.-Y.; Tang, R.-Z.; Liu, Y.; Zhu, J.; Zhu, Y.-H.; Yang, X.-Z.; Wang, J. Cancer stem cell therapy using doxorubicin conjugated to gold nanoparticles via hydrazone bonds. *Biomaterials* **2014**, *35*, 836–845.

(43) Matson, J. B.; Stupp, S. I. Drug release from hydrazone-containing peptide amphiphiles. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7962–7964.

(44) Dubler, E.; Gyr, E. New metal complexes of the antitumor drug 6-mercaptapurine. Syntheses and x-ray structural characterizations of dichloro (6-mercaptapurinium) copper (I), dichlorotetrakis (6-mercaptapurine) cadmium (II), and bis (6-mercaptapurinato) cadmium (II) dihydrate. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 1466–1473.

(45) Kucharczyk, K.; Rybka, J. D.; Hilgendorff, M.; Krupinski, M.; Slachcinski, M.; Mackiewicz, A.; Giersig, M.; Dams-Kozłowska, H. Composite spheres made of bioengineered spider silk and iron oxide nanoparticles for theranostics applications. *PLoS One* **2019**, *14*, e0219790.

(46) Kucharczyk, K.; Weiss, M.; Jastrzebska, K.; Luczak, M.; Ptak, A.; Kozak, M.; Mackiewicz, A.; Dams-Kozłowska, H. Bioengineering the spider silk sequence to modify its affinity for drugs. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 4247–4261.

(47) Ma, X.; Nguyen, K. T.; Borah, P.; Ang, C. Y.; Zhao, Y. Functional Silica Nanoparticles for Redox-Triggered Drug/ssDNA Co-delivery. *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, *1*, 690–697.

(48) Zhong, P.; Qiu, M.; Zhang, J.; Sun, H.; Cheng, R.; Deng, C.; Meng, F.; Zhong, Z. cRGD-installed docetaxel-loaded mertansine prodrug micelles: redox-triggered ratiometric dual drug release and targeted synergistic treatment of B16F10 melanoma. *Nanotechnology* **2017**, *28*, 295103.

(49) Yang, Y.; Lin, Y.; Di, D.; Zhang, X.; Wang, D.; Zhao, Q.; Wang, S. Gold nanoparticle-gated mesoporous silica as redox-triggered drug delivery for chemo-photothermal synergistic therapy. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *508*, 323–331.

(50) Xiong, D.; Yao, N.; Gu, H.; Wang, J.; Zhang, L. Stimuli-responsive shell cross-linked micelles from amphiphilic four-arm star copolymers as potential nanocarriers for “pH/redox-triggered” anticancer drug release. *Polymer* **2017**, *114*, 161–172.

(51) Lee, C.-H.; Cheng, S.-H.; Huang, L.-P.; Souris, J. S.; Yang, C.-S.; Mou, C.-Y.; Lo, L.-W. Intracellular pH-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticles for the Controlled Release of Anticancer Chemotherapeutics. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *122*, 8390–8395.

(52) Hu, X.; Wang, R.; Yue, J.; Liu, S.; Xie, Z.; Jing, X. Targeting and anti-tumor effect of folic acid-labeled polymer Doxorubicin conjugates with pH-sensitive hydrazone linker. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 13303–13310.

(53) Guo, X.; Shi, C.; Wang, J.; Di, S.; Zhou, S. pH-triggered intracellular release from actively targeting polymer micelles. *Biomaterials* **2013**, *34*, 4544–4554.

Supporting Information

Designed Spider Silk-Based Drug Carrier for Redox- or pH-Triggered Drug Release

Heike M. Herold, ^{♦,†} Annika Döbl, ^{♦,†} Stefanie Wohlrab, ^{†,‡} Martin Humenik, [†] Thomas

Scheibel^{†,‡,◊,⊥,§,}*

[†] Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Bayreuth, Prof.-
Rüdiger-Bormann-Str. 1, 95447 Bayreuth, Germany

[‡] Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG), Universität Bayreuth,
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

[◊] Bayerisches Polymerinstitut (BPI), Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

[⊥] Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB), Universität Bayreuth,
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

[§] Bayreuther Materialzentrum (BayMAT), Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440
Bayreuth, Germany

[♦] contributed equally to this work

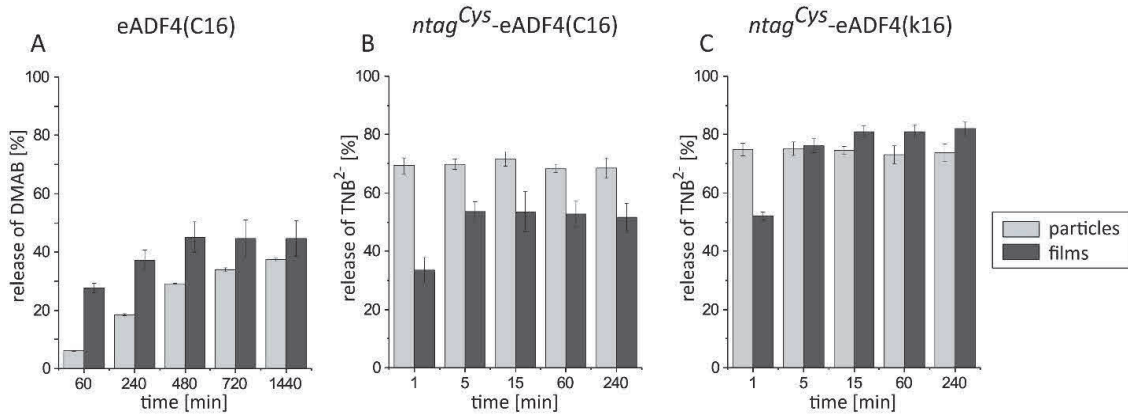


Figure S1. Time-dependent evaluation of substance release from spider silk particles and films. The required release time for model substance release was analyzed using UV-Vis spectroscopy. The steady-state model substance amount was detected in the release medium at different time points (without changing the release medium). DMAB release from eADF4(C16) (A) was measured at pH 4, TNB²⁻ release from *ntag^{Cys}-eADF4(C16)* (B) and *ntag^{Cys}-eADF4(κ16)* (C) in PBS containing 5 mM GSH. Amounts are given in relation to the total amount of coupled model substances.

Table S1. DMAB and TNB amount bound to the spider silk carriers after release. Measurements were performed on samples treated with highest release conditions, i. e. incubation at pH 4 for 48 hours in the case of DMAB and incubation in the presence of 5 mM GSH for 30 minutes in the case of TNB²⁻. (percentage is shown in relation to the amount initially coupled).

| | DMAB to eADF4(C16) | | TNB to <i>ntag^{Cys}-eADF4(C16)</i> | | TNB to <i>ntag^{Cys}-eADF4(κ16)</i> | |
|-----------|-----------------------------------|------|--|-----|--|-----|
| | [mol model substance/mol silk] | [%] | [mol model substance/mol silk] | [%] | [mol model substance/mol silk] | [%] |
| solution | - | - | 0.028 ± 0.010 | 3.9 | 0.024 ± 0.002 | 3.4 |
| particles | 0.018 ± 0.002 | 0.9 | 0.017 ± 0.003 | 8.6 | 0.015 ± 0.005 | 2.8 |
| films | 0.152 ± 0.005 | 10.3 | 0.006 ± 0.003 | 4.2 | 0.013 ± 0.004 | 3.4 |

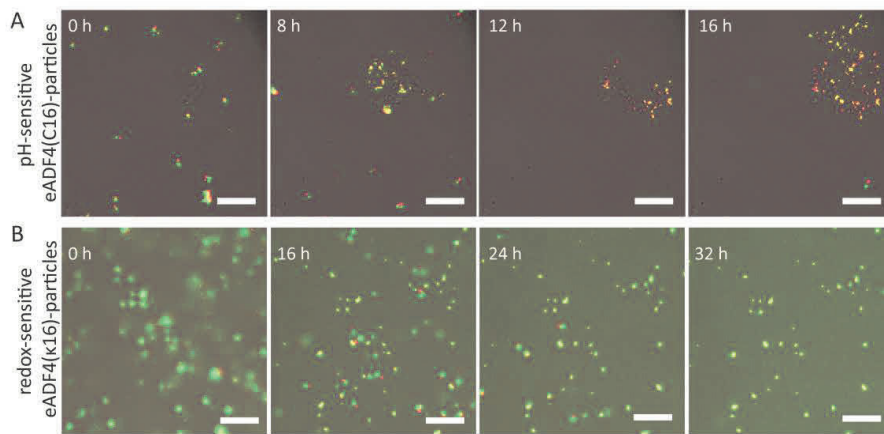


Figure S2. Control samples for spider silk particle stability. Permanently rhodamine-labelled (red fluorescence) spider silk particles were incubated in cell culture media to analyze the stability of the fluorescent signal in absence of cells at 5% CO₂, 95% humidity and 37°C. Additionally, eADF4(C16)-particles were functionalized with hydrazine and coupled with 5(6)-carboxyfluorescein (A), and *ntag*^{Cys}-eADF4(κ16) particles were coupled with MTS-CF488A and analyzed, respectively (B). Scale bars: 25 μm.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bin bei all jenen bedanken, die mich auf dem Weg meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Scheibel. Ich möchte mich für die Möglichkeit bedanken, am Lehrstuhl Biomaterialien auf diesem vielseitigen und spannenden Thema promovieren zu können. Währenddessen konnte ich mich stets auf seinen Rat und seine Unterstützung verlassen. Das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheiten prägten meine wissenschaftliche und persönliche Entwicklung.

Dankbar bin ich außerdem für die zahlreiche Unterstützung und Hilfestellungen unserer TAs Andreas Schmidt, Johannes Diel, Alexandra Pellert, Claudia Stemmann und Nicole Pittel im Laboralltag. Ebenso möchte ich mich bei Sabrina Schwägerl und Andrea Bodner für das Übernehmen aller organisatorischen Dinge bedanken.

Das gesamte *Fiberlab* hat die letzten Jahre für mich wirklich zu einer besonderen, positiven Zeit gemacht. Ich bin sehr dankbar, vor vier Jahren in einer Gruppe aus Doktoranden und Doktorandinnen aufgenommen worden zu sein, die sich durch große Kollegialität, Zusammenhalt und Freude an der Gemeinschaft auszeichnet. Ich habe mich, sowohl mit wissenschaftlichen Fragestellungen als auch mit persönlichen Belangen, stets willkommen und wohl gefühlt.

Hier möchte ich mich besonders bei Vanessa Trossmann, Merisa Saric, Sarah Lentz, Vanessa Neubauer und Anika Winkler bedanken. Uns vereinen nicht nur die gemeinsame Promotion und geteilte Büros. Unter dem Namen „*Jungle Office & Friends*“ sind in den letzten Jahren Freundschaften entstanden. Unser Zusammenhalt, euer Verständnis und eure Unterstützung werden mich immer mit Freude an die letzten Jahre zurückblicken lassen.

Zuletzt möchte ich mich voller Liebe bei meiner Familie bedanken. Meine Eltern Sabine und Benno sind mir große Vorbilder und eine unendliche Unterstützung. Zusammen mit meinen Schwestern Leonie und Svenja verbindet uns ein einzigartiges Band, welches mir immer und überall endlos Kraft und Freude gibt. Auch meine Schwiegereltern Antje und Hans, mit Luna und Lauser, haben mich in den letzten Jahren begleitet und sind zu meiner Familie geworden. Meinem Ehemann gilt besonderer Dank. Mit Micha an meiner Seite ist keine Herausforderung zu groß. Ich danke ihm von Herzen für seine tägliche, liebevolle Unterstützung. Ich kann mir keinen besseren Begleiter vorstellen.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. –vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....

Ort, Datum und Unterschrift