

Dreidimensional gedruckte, zellbeladene Konstrukte aus Spinnenseide**

Kristin Schacht, Tomasz Jüngst, Matthias Schweinlin, Andrea Ewald, Jürgen Groll* und Thomas Scheibel*

Abstract: Biofabrikation ist ein aufstrebendes Forschungsgebiet, in dem additive Fertigungsverfahren eingesetzt werden. Dabei werden hierarchische, gewebeähnliche Strukturen durch Kombination von Zellen, Material und Druckprozess hergestellt. Materialien, die druckbar und zugleich zytokompatibel sind (Biotinten) stellen derzeit den größten Engpass dar. Da rekombinante Spinnenseidenproteine zytokompatibel und nicht immunogen sind sowie physikalisch vernetzt werden können, wurde hier ihr Potenzial als neues Biotintensystem analysiert. Zellbeladene Konstrukte aus Spinnenseide können durch robotergesteuerte Dosierung, ohne zusätzliche Vernetzer oder Verdicker, gedruckt werden. Fibroblasten können mindestens eine Woche in diesen Konstrukten überleben, adhären und proliferieren. Die Einführung von Zelladhäsionsdomänen in die Spinnenseidenproteine ermöglicht die zusätzliche Steuerung von Zell-Material-Interaktionen. Hydrogele aus Spinnenseide sind damit eine vielversprechende neue Biotinte für die Biofabrikation.

In der Gewebezüchtung werden traditionell dreidimensionale (3D-)Konstrukte hergestellt, bei denen die Zellen in den

porösen Gerüsten kultiviert werden. Durch additive Herstellungsverfahren und den Einsatz von bioabbaubaren Materialien mit optimierten Gerüstporositäten wurden bereits vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich Reparatur und/oder Regeneration von Geweben erzielt.^[1] Ein derzeitiger Forschungsschwerpunkt ist die Kultivierung verschiedener Zelllinien in einer 3D-Umgebung, die der natürlichen extrazellulären Matrix (EZM) ähnelt.^[2] Die Gerüste müssen dabei Adhäsion, Wachstum, Proliferation, Migration und – in Bezug auf Vorläuferzellen – Differenzierung fördern.^[3] Die Zahl an Studien, die darüber hinaus die Herstellung von zellbeladenen, gewebeähnlichen hierarchischen Strukturen untersuchen, hat in den letzten Jahren enorm zugenommen.^[4] Um ein geeignetes Gerüstmaterial zu finden, ist es wichtig, einen Werkstoff mit definierten Eigenschaften und Funktionen zu wählen, sodass das zu reparierende Gewebe auf makroskopischer Ebene imitiert werden kann.^[5] Derartige Gewebe können allerdings nicht durch die Kultivierung von Zellen auf vorgefertigten Gerüsten erreicht werden, sondern nur durch die Kombination von Zellen und Material in einem 3D-Druckprozess.

Zusätzlich zu der Zytokompatibilität muss das zu druckende Material (die so genannte „Biotinte“) verschiedene physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen. Beispielsweise sollte es viskoses Verhalten im Druckkopf zeigen, sich allerdings direkt nach dem Herausdrücken verfestigen. Im Unterschied zu anderen additiven Herstellungsverfahren ist mit der robotergesteuerten Dosierung das Drucken von klinisch relevanten Gerüsten mit biologisch aktiven Substanzen und sogar Zellen möglich. Außerdem können mit dieser Technik gleichzeitig verschiedene Materialien gedruckt werden, sodass ein komplexes Gewebe aus verschiedenen Schichten nachgebildet werden kann.^[6] Allerdings wurden bis jetzt nur wenige Materialien entwickelt, die diese Eigenschaften hinreichend erfüllen, wobei die Verwendung von Hydrogelen den vielversprechendsten Ansatz darstellt.^[7] Für die Geweberegeneration sind Hydrogele mittlerweile etabliert.^[8] Sie werden entweder aus synthetischen Polymeren, z. B. Polyacrylsäure (PAS), Polyethylenglycol (PEG) und Polyethylenoxid (PEO), oder aus natürlichen Polymeren, wie Agarose, Alginat, Chitosan, Kollagen oder Seide, hergestellt.^[8a,9]

Die Seide (Fibroin) des Seidenspinners *Bombyx mori* wurde bereits in früheren Arbeiten in einem Tintenstrahl-druckprozess eingesetzt, um zellbeladene mikroskopische Matrices für zukünftige Biosensoren zu entwickeln.^[10] Wie die Seide von *B. mori* ist Spinnenseide besonders interessant für biomedizinische Anwendungen, da sie nicht toxisch ist, langsam abgebaut wird und keine Immunantwort auslöst.^[11]


[*] K. Schacht,^[†] Prof. Dr. T. Scheibel
Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth
Universitätsstraße 30, 95447 Bayreuth (Deutschland)
E-Mail: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

T. Jüngst,^[†] Dr. A. Ewald, Prof. Dr. J. Groll
Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg
Pleicherwall 2, 97070 Würzburg (Deutschland)
E-Mail: juergen.groll@fmz.uni-wuerzburg.de

M. Schweinlin
Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
Universitätsklinikum Würzburg
Röntgenring 11, 97070 Würzburg (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken A. Schmidt für die Fermentation und Reinigung der Proteine sowie M. Humenik, K. Hahn, S. Werner, F. Gisdon und J. Scheler für experimentelle Hilfe. Außerdem danken wir S. Wohlrab, E. DeSimone, K. Pawar, M. Elsner und M. Humenik für das Korrekturlesen und die Diskussionen sowie J. Bauer für die Diskussionen und technische Unterstützung bei der Erstellung der Abbildungen. Diese Arbeit wurde von der DFG (DFG SCHE 603/9-1) und dem siebten Forschungsrahmenprogramm der EU (FP7/2007-2013) unter der Fördernummer 309962 (Projekt HydroZonen) unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (FTIR-Messungen, rheologische Messungen, Diffusionstests sowie zusätzliche stereomikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409846> zu finden.

Hydrogele aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen sind durch β -Faltblattstrukturen, hydrophobe Interaktionen und Verschlaufungen physikalisch (nicht kovalent) vernetzt. Die Morphologie, die mechanischen Eigenschaften und die Porengröße der Hydrogele aus Spinnenseide hängen unter anderem von der Proteinkonzentration ab und können zusätzlich durch die Funktionalisierung des Proteins beeinflusst werden.^[12]

In dieser Studie wurden Hydrogele aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen als neue Biotinte eingesetzt, um 3D-Konstrukte mit Zellen herzustellen. Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) und dessen RGD-modifizierte Variante wurden zunächst in Bezug auf deren Druckbarkeit getestet. Anschließend wurden die Verkapselung von Zellen und letztlich die Herstellung von 3D-Konstrukten mit Zellen, die zuvor in Spinnenseiden-Lösungen suspendiert wurden, bewertet.^[13]

Wie viele konzentrierte Polymerlösungen zeigen Hydrogele aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen viskoelastisches Verhalten. Die Schubspannung in einem Rheometer veränderte sich proportional zur linear ansteigenden Deformation (Abbildung S1 (S für Hintergrundinformationen)).^[14] Der Elastizitätsmodul von eADF4(C16)-Hydrogelen (3 % w/v) betrug ca. 0.02 kPa, während sich derjenige von eADF4(C16)-RGD-Hydrogelen auf etwa 0.2 kPa belief. Damit liegen die mechanischen Eigenschaften beider Proteinhydrogele im Bereich weicher menschlicher Gewebe und Organe.^[11] Das scherverdünnende Verhalten der Hydrogele wurde mithilfe oszillierender rheologischer Messungen mit einer konstanten Schubspannung von 10 Pa untersucht (Abbildung S2). Der Speichermodul (G') ist über die gesamte Kreisfrequenz größer als der Verlustmodul (G''). In den Hydrogelen dominiert das elastische gegenüber dem viskosen Verhalten mit einer niedrigen Viskosität, sie sind gleichzeitig allerdings formstabil. Zusätzlich zeigen die eADF4-Hydrogele ein scherverdünnendes Verhalten (nicht-Newtonsche Flüssigkeit) durch eine höhere Viskosität bei niedrigen Kreisfrequenzen und eine Viskositätsabnahme bei höheren Frequenzen (Abbildung S2B).

Beim Einsatz von Hydrogelen als Zellgerüst muss eine hinreichende Diffusion von Nährstoffen, Sauerstoff und Abfallprodukten während der Zellkultivierung gewährleistet sein. 5(6)-Carboxyfluorescein und Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextrane wurden als Modellschubstanzen im Diffusionstest eingesetzt. Anhand der Modellschubstanzen konnte gezeigt werden, dass der Transport von Nährstoffen und Abfallprodukten sowohl durch eADF4(C16)- als auch durch eADF4(C16)-RGD-Hydrogele garantiert ist. Selbst FITC-Dextrane mit einem großen Molekulargewicht (500 kDa) können diffundieren, wenngleich der Prozess verlangsamt ist (Abbildung S2C,D).

Um die allgemeine Zytokompatibilität der Hydrogele zu testen, wurde die Zelladhäsion von BALB/3T3-Mausfibroblasten auf eADF4(C16)- und eADF4(C16)-RGD-Hydrogelen untersucht. Die Mausfibroblasten zeigen eine runde Zellmorphologie und bilden Zellaggregate auf eADF4(C16)-Hydrogelen, was auf eine schwache Adhäsion hindeutet (Abbildung 1A,B,E). Wegen der fehlenden Zelladhäsionsdomänen in eADF4(C16) wird die Adhäsion hauptsächlich

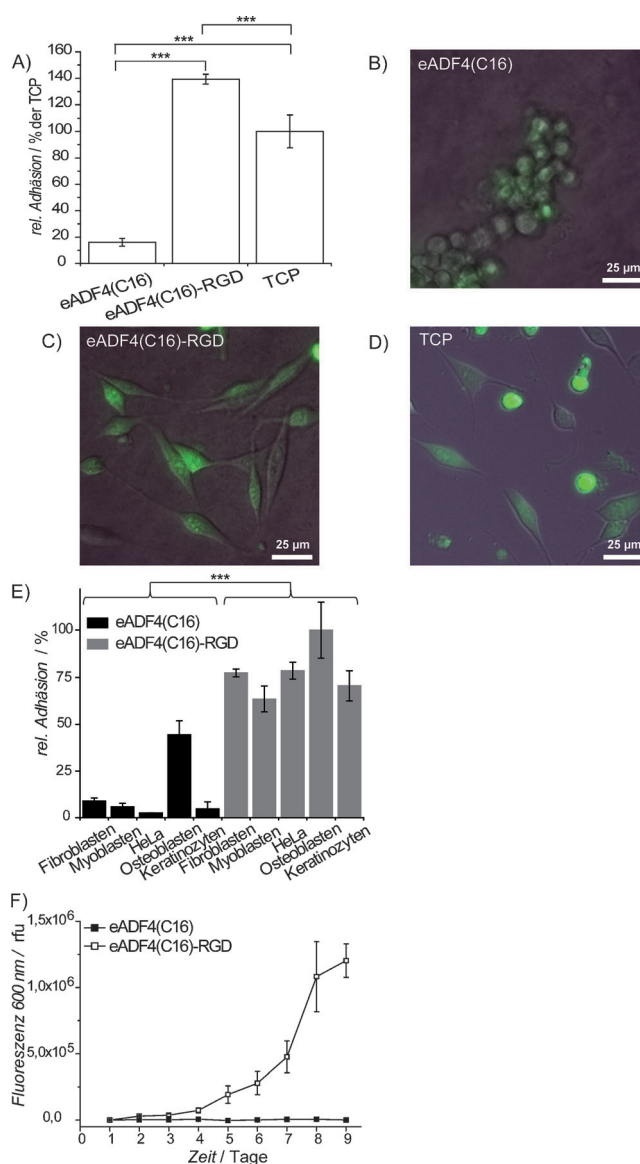


Abbildung 1. Kultivierung verschiedener Zelllinien auf 3 % eADF4-(C16)- und 3 % eADF4(C16)-RGD-Hydrogelen. A) Adhäsion von BALB/3T3-Fibroblasten, quantifiziert durch den CellTiter-Blue-Zellviabilitäts-Assay. Normiert durch Setzen der Adhäsion auf der behandelten Zellkulturplatte (TCP) auf 100 %. Die Adhäsion der Fibroblasten war signifikant ($***p < 0.001$) erhöht auf eADF4(C16)-RGD-Hydrogelen gegenüber den eADF4(C16)-Hydrogelen und der TCP. B–D) Lebendzell-Mikroskopie von BALB/3T3-Fibroblasten, kultiviert auf eADF4(C16)-Hydrogelen (B), eADF4(C16)-RGD-Hydrogelen (C) und der behandelten Zellkulturplatte (D) nach 24 h Inkubation. Die Zellen wurden mit dem Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit angefärbt. Maßstab: 50 μ m. E) Adhäsion verschiedener Zelllinien auf den jeweiligen Hydrogelen. Die Adhäsion der Osteoblasten auf eADF4(C16)-RGD-Hydrogelen wurde auf 100 % gesetzt. Die Adhäsion aller getesteten Zelllinien war auf eADF4-(C16)-RGD-Hydrogelen signifikant ($***p < 0.001$) gegenüber der auf eADF4(C16)-Hydrogelen erhöht. F) Die Proliferation der Fibroblasten wurde mithilfe des CellTiter-Blue-Zellviabilitäts-Assays quantifiziert.

durch die Oberflächenladung, Hydrophobie und Topographie des Gerüsts beeinflusst.^[13c,15] Auf den eADF4(C16)-RGD-Hydrogelen hingegen zeigen die Mausfibroblasten eine langgestreckte Zellmorphologie und Filopodien. Dies wurde bereits für Mausfibroblasten, die auf Filmen und Vliesen aus

eADF4(C16)-RGD-kultiviert wurden, beobachtet (Abbildung 1 C).^[13c,15a] Bei allen getesteten Zelllinien (Fibroblasten, Myoblasten, HeLa, Osteoblasten und Keratinozyten) konnte eine signifikant verbesserte Adhäsion auf eADF4(C16)-RGD-Hydrogelen im Vergleich zu nicht modifizierten eADF4(C16)-Hydrogelen beobachtet werden (Abbildung 1).

Die Adhäsion der Osteoblasten auf eADF4(C16)-Hydrogelen ist deutlich besser als die der anderen Zelllinien. Dieses Osteoblasten-spezifische Phänomen ist derzeit nicht komplett verstanden. Zusätzlich zur verbesserten Adhäsion auf eADF4(C16)-RGD-Hydrogelen ist die Proliferation gegenüber der auf eADF4(C16)-Hydrogelen verbessert. Auf Grundlage dieser Untersuchungen wurden eADF4-Hydrogele mithilfe robotergesteuerter Dosierung gedruckt (Abbildung 2 A). In ersten Versuchen wurde ein Dosierdruckkopf

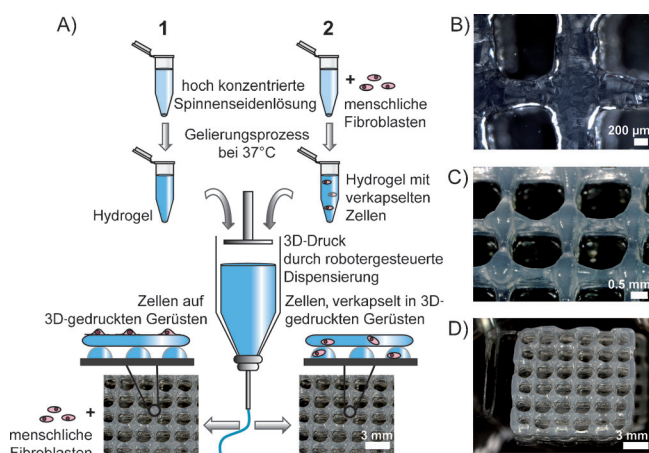


Abbildung 2. 3D-Drucken der Konstrukte aus Spinnenseide durch robotergesteuerte Dosierung. A) Schematische Darstellung des 3D-Druckens. Die Zellen wurden entweder auf den 3D-Konstrukten (1) kultiviert oder während des Herstellungsprozesses in die Spinnenseidenlösung eingekapselt (2). Stereomikroskopische und digitale Aufnahmen von zweilagigen eADF4(C16)- (B) und achtlagigen eADF4(C16)-Konstrukten (C,D).

verwendet, der auf einem Zeit-Druck-Prinzip beruhte. Wegen der Inkonsistenz der Strangdurchmesser wurde letztlich ein Druckkopf mit einem elektromagnetischen Ventil in Kombination mit einer 0,3 mm dicken Nadel verwendet. Dabei konnten Konstrukte mit Strangabständen von 2 mm gedruckt werden. Mithilfe dieses Druckkopfs konnten Hydrogele mit einer hohen Formgenauigkeit hergestellt werden, was auf die β -Faltblattbildung während der Gelierung und das scher verdünnende Verhalten zurückzuführen ist (Tabelle S1, Abbildung S2A,B). Die Strukturfestigkeit wurde ebenfalls analysiert. Dabei war es möglich, bis zu 16 Lagen mit einer Konstrukttiefe von ca. 3 mm aufeinander zu drucken, ohne dass die Struktur zusammenfiel (Abbildung 2 B–D und Abbildung S3).

Zunächst wurden menschliche Fibroblasten direkt nach dem Drucken auf die Gerüste gesät. Die Fibroblasten adhärten nach 24-stündiger Inkubation schwach auf der Oberfläche der gedruckten eADF4(C16)-Hydrogele, während die Zellen auf den Gerüsten aus eADF4(C16)-RGD eine aus-

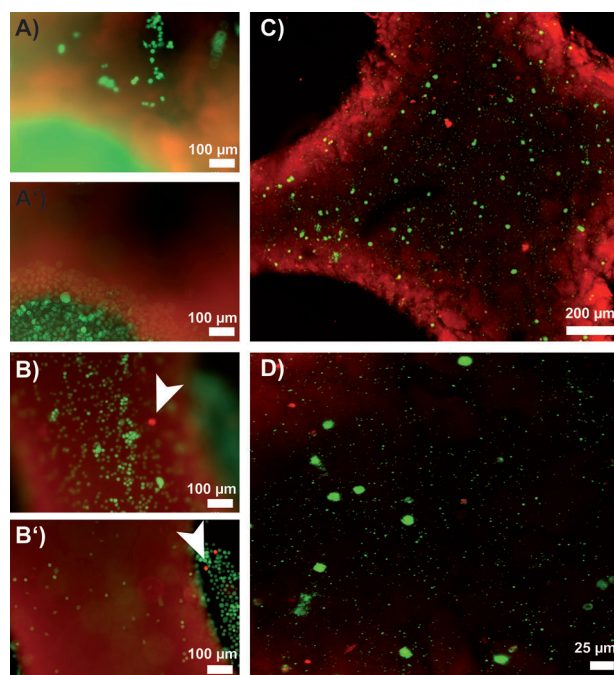


Abbildung 3. Menschliche Fibroblasten auf einem zweilagigen eADF4-(C16)- (A) und eADF(C16)-RGD-Hydrogel (B) nach 24-stündiger Inkubation. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen, die zuvor mit Calcein-AM (lebende Zellen: grün) und Ethidium-Homodimer 1 (tote Zellen: rot) angefärbt wurden. Ethidium-Homodimer 1 färbt zusätzlich das Seidenkonstrukt. A,B) Auf das Hydrogel fokussiert, A',B') auf die Zellkulturplatte fokussiert. Weißer Pfeil: tote Zellen (dazugehörige Aufnahmen mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie siehe Abbildung S4A,B). C,D) Aufnahmen der Fibroblasten nach 48 h Inkubation, eingekapselt in einem gedruckten zweilagigen eADF4-(C16)-Hydrogel, mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (dazugehörige Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen siehe Abbildung S4C–F).

gestreckte Morphologie aufwiesen (Abbildung 3 und Abbildung S4A,B). Diese Befunde stimmen mit den zuvor gezeigten Ergebnissen mit Mausfibroblasten überein, bei denen die Hydrogele herkömmlich hergestellt wurden. Dies lässt darauf schließen, dass die robotergesteuerte Dosierung keinen negativen Einfluss auf die Zell-Material-Interaktion hat. Während des Druckens ändert sich die Struktur nicht, und die Scherkräfte während des Prozesses beeinflussen nicht das Zellverhalten (Tabelle S1).

Auf Grundlage dieser Befunde wurden menschliche Fibroblasten direkt mit der hochkonzentrierten (3% w/v) eADF4(C16)-Lösung vor der Gelbildung bei 37°C gemischt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe der Zellen zur Biotinte nicht die Druckbarkeit des Materials beeinflusst. Die Parameter während des Druckens mussten gegenüber denen der zellfreien Biotinte nur minimal verändert werden: Der Druck wurde von 1,0 auf 1,1 bar erhöht, und die Öffnungszeit des Ventils betrug 900 statt 700 µs. Bei den anderen Parametern mussten keine Änderungen vorgenommen werden.

Die Zellviabilität wurde nach 24, 48 und 72 h sowie sieben Tagen nach dem Druckprozess mittels Lebend/Tot-Färbung untersucht. Es wurde bestätigt, dass die menschlichen Fibroblasten, wenn sie in eADF4(C16)-Hydrogele eingekapselt wurden, den Druckprozess überleben und zusätzlich min-

destens sieben Tage in situ lebensfähig sind, selbst wenn keine Zelladhäsionsdomänen vorhanden sind (Abbildung 3C,D und Abbildung S4C–F). Die Quantifizierung der Lebensfähigkeit erfolgte anhand der Lebend/Tot-Färbung und betrug nach 48 h Inkubation (70.1 ± 7.6 %). Es ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass die Überlebensraten in den Referenzproben (Zellen in ungedruckten Hydrogelen aus Spinnenseide) identisch sind. Aus diesem Grund betrug die relative Überlebensrate der Zellen in den gedruckten Hydrogelen 97 %. Die Zellen waren im Konstrukt homogen verteilt, was darauf hindeutet, dass sich die Zellen während der Gelbildung nicht abgesetzt hatten. Die Zellen zeigten eine runde Zellmorphologie, da die Zellbewegung möglicherweise wegen des dichten nanofibrillären Netzwerkes behindert war. Die Zellbeweglichkeit kann von der jeweiligen Umgebung, wie Morphologie, Struktur und Festigkeit des Substrates sowie Hydrophobie, abhängig sein.^[17] Die runde Zellmorphologie wurde ebenfalls für primäre Fibroblasten in Alginat- oder Fibrin-Hydrogelen beobachtet.^[18] Auch wenn die Zellviabilität in etablierten Biotinten wie Alginat (ca. 90 %) und Gelatine (ca. 98 %) höher ist, konnte gezeigt werden, dass im Fall der Spinnenseide der Druckprozess die Zellviabilität nicht beeinflusst.^[16] Im Unterschied zu den etablierten Systemen bietet Spinnenseide zusätzlich die Möglichkeit, durch die biotechnologische Herstellung die biochemischen Eigenschaften der Hydrogele zu verändern. In zukünftigen Experimenten soll dies angewendet werden, um sowohl den Druckprozess als auch die Zellviabilität zu optimieren. Deshalb, und wegen der konstanten Materialqualität sowie der hohen Reproduzierbarkeit des Druckens, sind wir zuversichtlich, dass rekombinante Spinnenseide als neues Biotintensystem in der Biofabrikation etabliert werden kann.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass rekombinante Spinnenseidenproteine als Biotinte für das 3D-Drucken ohne zusätzliche Komponenten oder Nachbehandlung genutzt werden können. Im Unterschied zu Spinnenseide zeigt Alginat, das derzeit am häufigsten als Biotinte zum 3D-Drucken eingesetzt wird, ein geringes scherverdünnendes Verhalten. Deshalb müssen die Konstrukte aus Alginat mit einem Vernetzer (Calciumionen) nachbehandelt werden, um eine strukturelle Festigkeit zu gewährleisten. Hydrogele aus rekombinanter Spinnenseide hingegen können ohne eine zusätzliche Vernetzung verdichtet werden.^[19] Bei den Konstrukten aus rekombinanter Spinnenseide können die Zellen direkt in die zu druckende Lösung gegeben werden, sodass 3D-gedruckte, zellbeladene Konstrukte mit einer hohen Zellviabilität über mindestens sieben Tagen entstehen. Zusätzlich führt die Einführung von Zelladhäsionsdomänen in das rekombinante Spinnenseidenprotein zu einer kontrollierten Steuerung von Zell-Material-Interaktionen. Dies demonstriert die Einsetzbarkeit von Spinnenseidenproteinen als neue Biotinte für die Biofabrikation.

Experimentelles

Hydrogelherstellung: Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) besteht aus einem sich 16-mal wiederholenden C-Modul (Sequenz: GSSAAAAAASGPGGYG PEN-QGPSGPGGYGPGGP), das auf der repetitiven Kernsequenz der

Dragline-Seide *Araneus-dialematus*-Fibroin 4 (ADF4) der Europäischen Gartenkreuzspinne basiert.^[13a,b] eADF4(C16) ($M_w = 47\,698 \text{ g mol}^{-1}$) und eADF4(C16)-RGD ($M_w = 48\,583 \text{ g mol}^{-1}$) wurden wie zuvor beschrieben hergestellt und gereinigt.^[13a,c] 30 mg mL^{-1} (3 % w/v) eADF4(C16)- und eADF4(C16)-RGD-Lösungen wurden wie zuvor beschrieben hergestellt;^[12c] weitere Details siehe Hintergrundinformationen. Die Gelbildung erfolgte über Nacht bei 37 °C und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.^[12c] Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) und seine Varianten können unter Good-Manufacturing-Practice(GMP)-Bedingungen hergestellt werden. Das 3D-Drucken erfolgte unter einer Sterilwerkbank bei sterilen Bedingungen mit sterilen Medien und Lösungen. Für die in dieser Studie gezeigten In-vitro-Experimente wurden keine weiteren Sterilisierungsmethoden angewendet, allerdings konnten keine Kontaminationen festgestellt werden. Dennoch wurden bereits verschiedene Sterilisierungsmethoden (z. B. Autoklavieren, Sterilfiltration oder Gammastrahlung) für rekombinante Spinnenseide für zukünftige Langzeitstudien und In-vivo-Experimente etabliert.^[20]

Zellkulturexperimente: Weitere Details bezüglich der Zelllinien, deren Kultivierung und Vorbereitung für die Experimente finden sich in den Hintergrundinformationen. Bei allen Zellkulturexperimenten wurden die Hydrogele zuvor zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen, bevor die Zellen auf ihnen ausgesät wurden. Für die zellmorphologischen Untersuchungen wurden die BALB/3T3-Mausfibroblasten mit einer Zellzahl von 47 000 Zellen cm^{-2} auf den eADF4(C16)- und eADF4(C16)-RGD-Hydrogelen ausgesät. Als Positivkontrolle fungierten behandelte Zellkulturplatten (Nunc; TCP). Die Zellen wurden mit Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Life Technologies GmbH)) angefärbt. Die Inkubation erfolgte für 24 h, bevor die Zellen unter dem Lebendzellmikroskop (Leica) betrachtet wurden. Für die Zelladhäsionstests wurden die eADF4(C16)- (3 % w/v) und eADF4(C16)-RGD-Lösungen (3 % w/v) in Millicell-Inserts (Porenmembrandurchmesser: 8 μm) pipettiert, bevor die Gelbildung bei 37 °C über Nacht erfolgte. Am nächsten Tag wurden 75 000 Zellen cm^{-2} auf den Hydrogelen ausgesät. Nach 2,5-stündiger Inkubation wurden die Hydrogele zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; Sigma Aldrich) gewaschen, um nicht adhären und tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurde frisches Zellkulturmedium hinzugegeben. Nach vierstündiger Inkubation mit 10 % v/v des CellTiter-Blue-Reagens (Promega) wurde die Zelladhäsion durch die Fluoreszenzintensität von Resorufin ($\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) mittels Mikrotiterplatten-Photometer (Mithras LB 940, Berthold) quantifiziert. Alle Adhäsionstests wurden dreimal in einer Dreifachbestimmung wiederholt. Die statistischen Analysen erfolgten mithilfe der Software STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc.). Ein unabhängiger Student-t-Test (Zweistichproben-t-Test) wurde bei den absoluten Werten der Adhäsionstests angewendet. Vor dem t-Test wurde die Varianzhomogenität mithilfe eines Levene-Tests bestimmt. Die Probenvarianzen wurden als gleich angesehen, wenn der *p*-Wert des Levene-Tests > 0.05 war. Für die Proliferationstests wurden 5000 Zellen cm^{-2} neun Tage auf den eADF4(C16)- und eADF4(C16)-RGD-Hydrogelen kultiviert. Alle 24 h wurden die Proben mit PBS gewaschen und die Zellen wie zuvor beschrieben mittels CellTiter-Blue-Zellviabilitäts-Assay quantifiziert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit Medium gewaschen und in frischem Medium unter kontrollierter Atmosphäre bis zur nächsten Messung inkubiert. Die Proliferationstests wurden zweimal jeweils in einer Dreifachbestimmung wiederholt. Für die Untersuchung der gedruckten zweilagigen eADF4(C16)- und eADF4(C16)-RGD-Gerüste wurden menschliche Fibroblasten mit einer Zellzahl von 75 000 Zellen cm^{-2} auf den Gerüsten unterschiedlich lange kultiviert. Anschließend wurden die Zellen und die Gerüste mit Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) und Ethidium-Homodimer 1 (Invitrogen) angefärbt (weitere Details siehe Hintergrundinformationen). Die lebenden und toten Zellen sowie die Konstrukte wurden mittels Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Axio Observer.Z1) und konfokalem Laser-Scanning-Mikro-

skop (Leica TCS SP8 STED) analysiert. Die Aufnahmen der eingekapselten menschlichen Fibroblasten in gedruckten zweilagigen eADF4(C16)-Hydrogelen (Zellzahl: $1200000 \text{ Zellen mL}^{-1}$) mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie erfolgten nach 48 h.

3D-Drucken durch robotergesteuerte Dosierung: Die robotergesteuerte Dosierung wurde mit einem Bioplotter (regenHU) unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Der Druckkopf (CF-300N/H, zellfreundlicher Druckkopf für Kontaktdosierung) arbeitete in y-z-Richtung, während die Kollektorplatte in x-Achse agierte. Vor dem Druck erfolgte die Gelbildung der Spinnenseidenlösung über Nacht bei 37°C und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit (Abbildung 2A).^[12c] Während des Druckens befand sich das Material in einer unter Druck stehenden 3cc-Spritze (Nordson EFD). Die Dosierung erfolgte durch ein elektromagnetisches Ventil mit einem Innendurchmesser von 0.3 mm bei Raumtemperatur. Die gedruckten Konstrukte wiesen eine Strangbreite von $(629 \pm 8) \mu\text{m}$ auf. Die Öffnungszeiten des Ventils betrugen zwischen 700 und 900 μs , und der Materialfluss wurde über den Druck (1.0–1.1 bar) reguliert. Die gedruckten Konstrukte wurden mittels Stereomikroskop (Carl Zeiss SteREO Discovery.V20) untersucht.

Eingegangen am 7. Oktober 2014,
veränderte Fassung am 21. November 2014
Online veröffentlicht am 13. Januar 2015

Stichwörter: Biofabrikation · Faserproteine · Fibroblasten · Hydrogele · Zelladhäsion

- [1] S. J. Hollister, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 518–524.
- [2] a) X. Q. Jia, K. L. Kiick, *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 140–156; b) V. A. Schulte, K. Hahn, A. Dhanasingh, K. H. Heffels, J. Groll, *Biofabrication* **2014**, *6*, 024106.
- [3] a) M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 47–55; b) A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell* **2006**, *126*, 677–689; c) A. J. Engler, P. O. Humbert, B. Wehrle-Haller, V. M. Weaver, *Science* **2009**, *324*, 208–212; d) P. J. Reddig, R. L. Juliano, *Cancer Metastasis Rev.* **2005**, *24*, 425–439.
- [4] B. Derby, *Science* **2012**, *338*, 921–926.
- [5] a) J. H. Shim, S. E. Kim, J. Y. Park, J. Kundu, S. W. Kim, S. S. Kang, D. W. Cho, *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20*, 1980–1992; b) B. Duan, L. A. Hockaday, K. H. Kang, J. T. Butcher, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2012**, *101*, 1255–1264; c) F. P. W. Melchels, W. J. A. Dhert, D. W. Huttmacher, J. Malda, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 2282–2289.
- [6] a) W. Schuurman, P. A. Levett, M. W. Pot, P. R. van Weeren, W. J. A. Dhert, D. W. Huttmacher, F. P. W. Melchels, T. J. Klein, J. Malda, *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 551–561; b) P. Bajaj, R. M. Schweller, A. Khademhosseini, J. L. West, R. Bashir, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2014**, *16*, 247–276; c) W. Schuurman, V. Khristov, M. W. Pot, P. R. van Weeren, W. J. A. Dhert, J. Malda, *Biofabrication* **2011**, *3*, 021001.
- [7] J. Malda, J. Visser, F. P. Melchels, T. Jungst, W. E. Hennink, W. J. A. Dhert, J. Groll, D. W. Huttmacher, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5011–5028.
- [8] a) J. L. Drury, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337–4351; b) M. W. Tibbitt, K. S. Anseth, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103*, 655–663; c) O. Wichterle, D. Lim, *Nature* **1960**, *185*, 117–118; d) K. R. Kamath, K. Park, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1993**, *11*, 59–84.
- [9] a) I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J. M. Kenny, *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95*, 2126–2146; b) K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1869–1879.
- [10] R. Suntivich, I. Drachuk, R. Calabrese, D. L. Kaplan, V. V. Tsukruk, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1428–1435.
- [11] A. Leal-Egaña, T. Scheibel, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2010**, *55*, 155–167.
- [12] a) S. Rammensee, D. Huemmerich, K. D. Hermanson, T. Scheibel, A. R. Bausch, *Appl. Phys. A* **2006**, *82*, 261–264; b) U. J. Kim, J. Y. Park, C. M. Li, H. J. Jin, R. Valluzzi, D. L. Kaplan, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 786–792; c) A. Matsumoto, J. Chen, A. L. Collette, U. J. Kim, G. H. Altman, P. Cebe, D. L. Kaplan, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 21630–21638; d) X. Q. Wang, J. A. Kluge, G. G. Leisk, D. L. Kaplan, *Biomaterials* **2008**, *29*, 1054–1064; e) K. Schacht, T. Scheibel, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2488–2495.
- [13] a) D. Huemmerich, C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph, T. Scheibel, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13604–13612; b) C. Vendrely, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 401–409; c) S. Wohlrab, S. Muller, A. Schmidt, S. Neubauer, H. Kessler, A. Leal-Egaña, T. Scheibel, *Biomaterials* **2012**, *33*, 6650–6659.
- [14] F. C. Mackintosh, J. Kas, P. A. Janmey, *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *75*, 4425–4428.
- [15] a) A. Leal-Egaña, G. Lang, C. Mauerer, J. Wickinghoff, M. Weber, S. Geimer, T. Scheibel, *Adv. Eng. Mater.* **2012**, *14*, B67–B75; b) F. Bauer, S. Wohlrab, T. Scheibel, *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 1244–1249.
- [16] a) J. Jia, D. J. Richards, S. Pollard, Y. Tan, J. Rodriguez, R. P. Visconti, T. C. Trusk, M. J. Yost, H. Yao, R. R. Markwald, Y. Mei, *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 4323–4331; b) T. Billiet, E. Gevaert, T. De Schryver, M. Cornelissen, P. Dubruiel, *Biomaterials* **2014**, *35*, 49–62.
- [17] a) L. Moroni, L. P. Lee, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *88A*, 644–653; b) B. M. Gillette, J. A. Jensen, B. X. Tang, G. J. Yang, A. Bazargan-Lari, M. Zhong, S. K. Sia, *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 636–640; c) T. Yeung, P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Y. Ming, V. Weaver, P. A. Janmey, *Cell Motil. Cytoskeleton* **2005**, *60*, 24–34; d) J. C. M. Teo, R. R. G. Ng, C. P. Ng, A. W. H. Lin, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2060–2069.
- [18] C. M. Hwang, B. Ay, D. L. Kaplan, J. P. Rubin, K. G. Marra, A. Atala, J. J. Yoo, S. J. Lee, *Biomed. Mater.* **2013**, *8*, 014105.
- [19] S. Wüst, M. E. Godla, R. Muller, S. Hofmann, *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 630–640.
- [20] a) D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yucel, X. Q. Wang, M. L. Lovett, D. L. Kaplan, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1612–1631; b) E. S. Gil, S. H. Park, X. Hu, P. Cebe, D. L. Kaplan, *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 257–269.