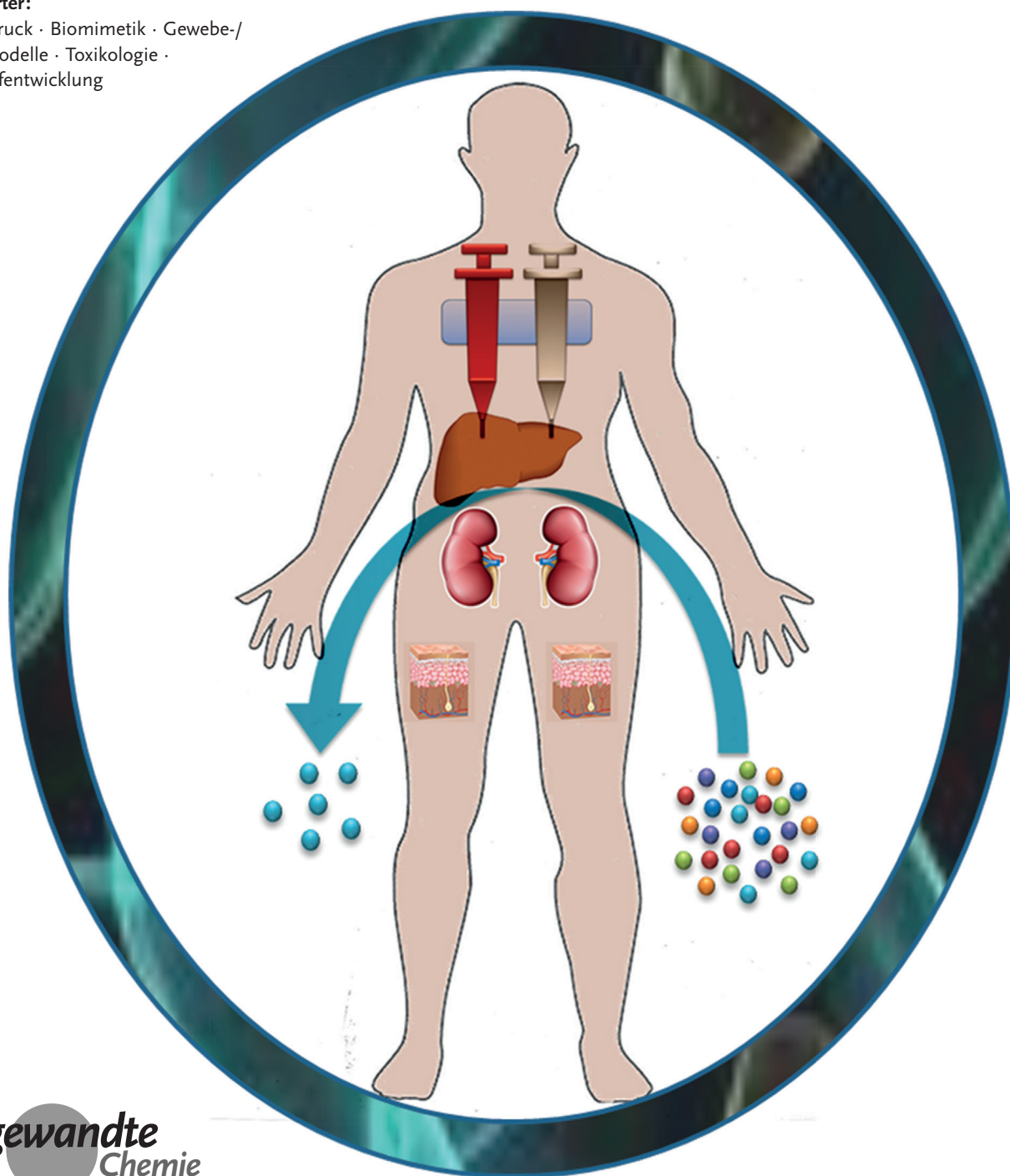


3D-Biodruck von Gewebe- und Organmodellen

Falguni Pati, Jesper Gantelius und Helene Andersson Svahn*

Stichwörter:

3D-Biodruck · Biomimetik · Gewebe-/Organmodelle · Toxikologie · Wirkstoffentwicklung



Gewebe- oder Organmodelle können als nützliche In-vitro-Plattformen systematische und quantitative Untersuchungen von Wirkstoffen und Chemikalien erleichtern. Oberstes Ziel bei ihrer Entwicklung ist die Nachbildung der wichtigen physiologischen Funktionen, was üblicherweise komplexe Kultursysteme erforderlich macht. Biodrucktechniken bieten interessante Perspektiven für den Aufbau von Gewebe- und Organmodellen, da sie eine reproduzierbare, automatisierte Produktion komplexer lebender Gewebe ermöglichen. Auf diese Weise erhaltene Modelle haben Potenzial für das Screening neuer Verbindungen oder für die Vorhersage von Toxizitäten, da in ihnen die räumliche und chemische Komplexität von nativen Geweben oder Organen nachgebildet werden kann. Hier zeigen wir, wie Gewebe- und Organmodelle durch 3D-Biodruck in vitro hergestellt werden können, wie sich ihre Vergleichbarkeit mit dem nativen Gewebe charakterisieren lässt, und wie sie bei der Auswahl von Leitstrukturen, bei Toxizitätstests und als Krankheits- oder Tumormodelle von Nutzen sein können.

1. Einleitung

Unser Wissen über Bildung, Funktion und Pathologie von Geweben und Organen stützt sich oft auf Erkenntnisse aus Studien an zweidimensionalen (2D) Zellkulturen oder an Tiermodellen. Ein Nachteil der Studien an 2D-Zellkulturen ist aber, dass Zellen, die in solchen Kultursubstraten gezogen wurden, substanziell bezüglich Morphologie, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen und Differenzierung von Zellen abweichen können, die in dreidimensionalen (3D), den physiologischen Bedingungen eher entsprechenden Umgebungen gezogen wurden.^[1-4] Während Tiermodelle häufig die Bedeutung spezifischer Moleküle und Prozesse definitiv bestätigen, gab es Inkonsistenzen bei Rückschlüssen aus Genablations- und Chemogenomikstudien.^[5] Das schwerwiegendste Problem von Tiermodellen in der Wirkstoffsuche ist ihre mangelnde Vorhersagbarkeit.^[6] So können sich 50 % der Wirkstoffe, die präklinische Tests erfolgreich absolvieren, als toxisch für Menschen erweisen, während andere Wirkstoffe, trotz negativer Ergebnisse in Tierversuchen, faktisch ungiftig für Menschen sind.^[7] Dadurch werden möglicherweise wichtige Wirkstoffe schon vor Erreichen der klinischen Phase verworfen. Zudem geben Tiermodelle häufig Eigenschaften von menschlichem Gewebe nicht befriedigend wieder, z. B. bei Tumoren, Autoimmunerkrankungen und bezüglich der therapeutischen/toxischen Wirkung von Arzneimitteln.^[8,9] Der wichtigste Grund dafür sind wohl evolutionäre Unterschiede zweier komplexer Systeme (z. B. Maus und Mensch), die dafür sorgen, dass Einflüsse durch Krankheiten und Wirkstoffe deutlich verschiedene klinische und physiologische Konsequenzen haben können.^[10,11]

3D-Gewebemodelle bieten eine ausgezeichnete Alternative zu herkömmlichen 2D-Zellkulturen und Tierversuchen.^[3,12] Diese In-vitro-Modelle eignen sich für vereinfachende Ansätze zur Aufklärung molekularer In-vivo-Mechanismen.^[13] Überdies können sie auf die leistungsstarken

Methoden der Zell- und Molekularbiologie zurückgreifen. Ein zunehmender Einsatz von 3D-Modellen für spezielle Gewebe könnte unser Wissen über die Gewebemorphogenese bereichern und Wirkstoff-Screenings erleichtern. 3D-Gewebemodelle geben die räumliche und chemische Komplexität lebender Gewebe in vitro besser wieder als entsprechende 2D-Modelle.^[14] Ferner sind sie nützlich für Untersuchungen über die molekularen Grundlagen von Gewebefunktionen, und sie stellen Signalwege und die Adressierbarkeit durch Wirkstoffe besser nach als 2D-Kulturen.^[15-17]

Was den meisten 3D-Gewebemodellen allerdings fehlt, sind eine Architektur über mehrere Größenordnungen und Grenzflächen zu anderen Geweben, wie sie etwa zwischen Endothel und umgebendem Bindegewebe und Parenchymzellen vorliegen.^[18] Diese Grenzflächen bestimmen die Funktion fast aller Organe entscheidend mit. Überdies werden die Zellen in den meisten aktuellen Modellen keinen Strömungseinflüssen (wie Scherung, Zug und Druck) ausgesetzt, die die Entwicklung eines Organs und seine Funktion im gesunden und kranken Zustand entscheidend beeinflussen.^[18-20] Diese Einschränkungen könnten mithilfe von Organmodellen auf Mikrofluidikchips überwunden werden, die kontinuierlich durchströmte Kammern bereitstellen, in denen lebende Zellen Teile der Gewebe- oder Organfunktionen simulieren.^[18] Aber auch diese Modelle sind, infolge ihrer

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4729
2. Jüngere In-vitro-Modelle für Gewebe und Organe	4730
3. Gewebe- und Organkonstrukte durch 3D-Biodruck	4731
4. Charakterisierung von In-vitro-Gewebemodellen und -Organmodellen	4737
5. Gewebe- und Organmodelle für Wirkstoffentwicklung und Toxikologie	4738
6. In-vitro-Modelle für Krankheiten und Tumore	4739
7. Ausblick	4739
8. Schlussfolgerungen	4740

[*] Dr. F. Pati, Dr. J. Gantelius, Prof. H. A. Svahn
Division of Proteomics and Nanobiotechnology
Science for Life Laboratory
KTH – Royal Institute of Technology, Stockholm (Schweden)
E-Mail: helene.andersson.svahn@scilifelab.se

planaren Anordnung, nicht in der Lage, die komplexen Architekturen wiederzugeben, und sie konzentrieren sich weitgehend darauf, grundlegende Funktionen der entsprechenden Gewebe nachzuahmen.

3D-Biodruck ist ein Ansatz, der milli- bis zentimetergroße biologische Konstrukte aus verschiedenen Zellarten, Biomolekülen und -materialien auf einmal aufbaut.^[21] Diese Technik liefert realistische 3D-Modelle, in denen die tatsächliche Anordnung der Zellen im entsprechenden Gewebe oder Organ imitiert wird.^[22] Die Zellen werden im gesamten Konstrukt sehr genau platziert, selbst wenn verschiedenartige Zellen direkt nebeneinander arrangiert werden müssen.^[22]

Der Aufbau von 3D-Gewebemodellen aus menschlichen Zellen, die das In-vivo-Verhalten getreu wiedergeben, kann zu genaueren Vorhersagen von therapeutischen und toxischen Effekten führen und die Kosten der Wirkstoffsuche senken. Konstrukte mit kranken oder dysfunktionalen menschlichen Zellen können als In-vitro-Modelle für (Krebs)Erkrankungen aufgebaut werden, um die Gewebepathologie zu analysieren oder neue Wirkstoffe zu testen.^[23]

Dieser Aufsatz konzentriert sich auf allgemeine Prinzipien und Methoden im Zusammenhang mit der Erzeugung realistischer 3D-Gewebemodelle durch Anwendung von Biodrucktechniken. Wir stellen die wichtigsten Konzepte anhand ausgewählter jüngerer Beispiele vor, und wir diskutieren die Perspektiven des 3D-Biodrucks für weitere Grundlagenstudien und die Übertragung auf realistische Gewebe- und Krebsmodelle sowie physiologische und toxikologische Studien.

2. Jüngere In-vitro-Modelle für Gewebe und Organe

In den vergangenen zehn Jahren wurden In-vitro-3D-Modelle zunehmend eingesetzt. Die Gründe dafür sind technologische Entwicklungen und eine strengere Reglementierung von Tierversuchen für wissenschaftliche Experimente.^[24–28] Durch jüngste Fortschritte des Bioingenieurwesens ergeben sich vielversprechende Perspektiven für neue 3D-Gewebemodelle hinsichtlich präklinischer Wirkstofftests sowie physiologischer und toxikologischer Studien.

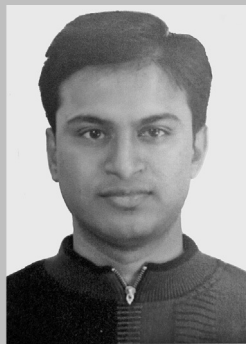
Über die Jahre wurde verschiedene Kultursysteme für die In-vitro-Bewertung von Wirkstoffen und Chemikalien entwickelt: von der 2D-Kultur über die Kultur auf Hydrogel-

membranen und die Sandwich-Kultur bis hin zur 3D-Kultur (Abbildung 1). So wurden Kulturen von Primärzellen wie Hepatozyten auf 2D-Platten lange Zeit routinemäßig in Wirkstoff-Screenings eingesetzt.^[29,30] Die Primärzellen unterliegen bei der Kultur auf flachen Oberflächen allerdings Veränderungen bezüglich Morphologie, Struktur, Polarität und Genexpression, und sie verlieren ihre gewebespezifischen Funktionen.^[31] Dieser Prozess der Entdifferenzierung, durch den differenzierte Zellen ihre spezialisierte Funktion einbüßen, ist ein biologisches Phänomen,^[32] er bewirkt, dass solche Kulturen nur für begrenzte Zeit verwendet werden können.

Um die Wechselwirkung zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix (ECM) nachzuahmen, wurden Brustepithelzellen auf Kollagenmembranen kultiviert,^[33] was zur Produktion von Milcheiweiß führte.^[34,35] Es ist schwierig, menschliche Brustkrebs-Primärzellen auf 2D-Oberflächen zu kultivieren, aber eine rekonstituierte Grundmembran („basement membrane“, BM) kann für die Kultur aller normalen menschlichen Brustepithelzellen und einiger Brustkrebszellen genutzt werden.^[36] In solchen 3D-Kulturen lassen sich maligne und normale Brustepithelzellen (MECs) unterscheiden, da normale Zellen in BM einen strukturell und funktional differenzierten Phänotyp aufbauen.^[36]

Um die gewebespezifischen Funktionen über längere Kulturzeiträume aufrechtzuerhalten, wurden Sandwich-Kulturen erprobt, in denen Primärzellen wie Hepatozyten zwischen zwei Matrixschichten (üblicherweise Collagen oder Matrigel) platziert werden.^[37] Diese Sandwich-Technik hat einige Vorteile, doch ließ die Genexpression, auf der viele leberspezifische Funktionen beruhen, mit der Zeit (über 90 h) nach.^[38]

Einige 3D-Kulturmodelle wurden entwickelt, in denen Zellen organisiert und polarisiert werden und mit Nachbarzellen wechselwirken können.^[39,40] Diese Modelle haben ein großes Potenzial für mechanistische Studien zur (Patho)Physiologie von Geweben und Organen. Sie eignen sich auch für die Untersuchung biologischer Phänomene, die auf der Mikroarchitektur von Geweben beruhen und in der Regel eine 3D-Struktur erfordern.^[40] Solche 3D-Modelle können viele Formen haben, etwa zufällig in einer Matrix verteilte Zellen oder Zellcluster in selbstorganisierten Mikrostrukturen, den so genannten Organoiden.^[16,17,41] Auch ein Hydrogel mit invertierter Kolloidkristallstruktur wurde als



Dr. Falguni Pati studierte an der Jadavpur University (Indien) und promovierte am IIT Kharagpur (Indien) in Bioingenieurwesen. Er war von 2011 bis 2014 Postdoktorand im Intelligent Manufacturing Systems Lab (POSTECH, Südkorea). Zurzeit entwickelt er als Postdoktorand in der Nanobiotechnologie-Abteilung des Royal Institute of Technology (KTH) in Stockholm den 3D-Biodruck von Gewebe- und Organmodellen für biomedizinische und pharmakologische Anwendungen.



Helene Andersson Svahn studierte molekulare Biotechnologie an der Universität Uppsala und promovierte 2001 am KTH in Elektrotechnik. Von 2002 bis 2005 arbeitete sie bei Silex Microsystems, und von 2005 bis 2008 hatte sie eine Professur für angewandte BIOMEMS am MESA+ Research Institute in Holland inne. Zurzeit leitet sie die Nanobiotechnologie-Abteilung des KTH in Stockholm (Schweden). Sie ist Mitglied der Königlich Schwedischen Akademie der Wissenschaften und des Redaktionsbeirats von *Lab on a Chip*, die erste Präsidentin der Young Academy of Sweden und wissenschaftliche Direktorin der Science for Life Laboratories.

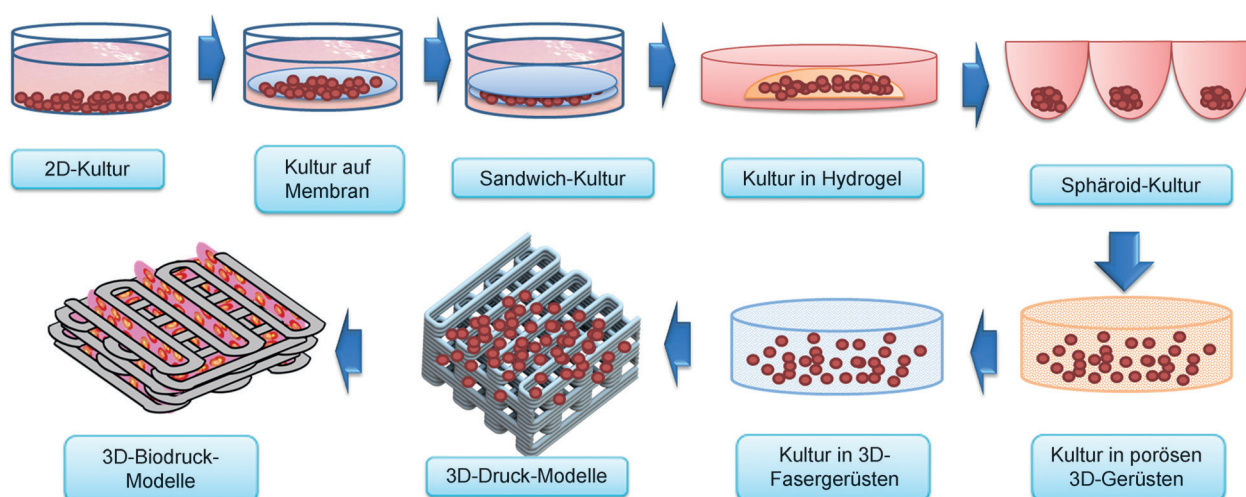


Abbildung 1. Entwicklung der Zellkulturmodelle: 2D-Zellkulturen sind seit vielen Jahren in Gebrauch, immer noch für einfache zellbasierte Assays. Später wurden Membran- und Sandwich-Kulturen entwickelt. Bei der 3D-Zellkultur werden die Zellen oft in Hydrogelen verkapselt. Sphäroidkulturen sind gerüstfreie Kulturen, in denen Zell-Zell-Wechselwirkungen vorherrschen. Alternativ können gelaugte oder faserige 3D-Gerüste nach verschiedenen Verfahren erzeugt und mit Zellen beimpft werden. Durch frühe 3D-Druckverfahren konnten komplexe Strukturen mit bestimmter Architektur kontrolliert und reproduzierbar hergestellt werden, die Zellen wurden aber immer noch nach Aufbau der Gerüste aufgeimpft. Beim 3D-Biodruck werden schließlich die Zellen selbst gedruckt. So erhält man mit Zellen beladene Konstrukte, wobei sich die Mikroumgebung der Zellen beeinflussen lässt. Bisher ist der 3D-Biodruck die leistungsfähigste Herstellungstechnik für Gewebe- und Organkonstrukte. Wiedergabe einiger Bilder mit Genehmigung nach Lit. [106, 111].

Gerüst für die Kultur gewebeartiger 3D-Strukturen eingesetzt.^[42] In Kokulturen mit Stützzellen sind Lebensfähigkeit und Funktionalität von Primärzellen *in vitro* verbessert. In diesem Sinne wurden Hepatozyten erfolgreich mit Fibroblasten und Endothelzellen kombiniert.^[43–47] Defizite bei Architektur über mehrere Größenordnungen, hierarchischer Struktur, Durchströmung und Langzeit-Kulturbedingungen sind die wichtigsten Nachteile dieser Modelle. Aktuelle Entwicklungen auf dem Gebiet der *In-vitro*-3D-Modelle sind in Lit. [40] und [48] zusammengefasst.

Nachteile von Gewebe- und Organmodellen

- Mehrstufige Herstellung
- Lebens- und Funktionsfähigkeit der Zellen eingeschränkt
- Komplexe hierarchische Gewebestruktur fehlt
- Spezifische extrazelluläre Matrix fehlt
- 3D-Struktur fehlt bei Biochips
- Stark variierende Resultate in Tierversuchen
- Tiermodelle können Merkmale von menschlichen Geweben und Organen nicht wiedergeben
- Nicht vorhersagbare und falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse in Tierversuchen
- Strikte Auflagen für Tierversuche in wissenschaftlichen Experimenten

Mikrofluidik-Biochips haben sich zu einem beliebten Hilfsmittel für *In-vitro*-Gewebe-Modelle entwickelt, denn die Mikrofabrikation ist bezüglich der erreichbaren Präzision allen anderen Techniken überlegen.^[49–52] Jüngere Entwicklungen sind in Lit. [18] und [53] zusammengefasst. Solche Biochips beschränken sich aber zumeist auf Strukturen auf Zellebene, sodass nur ein Teil der Gewebestruktur nachgebildet wird, aber keine ganzen Gewebe oder Organe. So

enthalten Lebern-auf-dem-Chip typischerweise Azinus-artige Strukturen, um Konzentrationsgradienten zu erzeugen,^[54] eine 3D-Mikroleber mit Zoneneinteilung könnte aber eine bessere Vorhersage von zonenabhängiger Toxizität gestatten. Derartige 3D-Mikrolebern sind allerdings mit Fabrikationstechniken für planare Mikrofluidikchips schwer aufzubauen; realistische Gewebe- und Organmodelle erfordern eine Übertragung der maßgeschneiderten Mikroumgebungen in die dritte Dimension.^[55]

3. Gewebe- und Organkonstrukte durch 3D-Biodruck

3.1. Strategien und Verfahren

Das Konzept des Biodrucks ist im Grunde eine Erweiterung additiver Herstellungstechniken, die beim schichtweisen Aufbau komplexer Gewebe zum Einsatz kommen.^[55] Der Prozess sieht drei Grundschrte vor:^[56, 57] A) Herstellung der Biotinte und computerunterstützte Erzeugung einer Blaupause; B) den eigentlichen Druckschritt; C) Nachbehandlung durch Kultur in einem Bioreaktor, um die gedruckte 3D-Struktur zu einem funktionierenden Gewebe reifen zu lassen.

Verschiedene Gruppen haben die Voraussetzungen für die künstliche Herstellung biologischer Gewebe und Organe zusammengefasst,^[57–62] es herrscht aber keine Einigkeit über die erforderliche Auflösung und Organisation auf der Mikrometerebene. Einige Forscher sind der Ansicht, dass biologische Gewebe mit der höchstmöglichen Auflösung erzeugt werden sollten, um die Funktionen und das Verhalten von Zellen in der *In-vitro*-Umgebung möglichst genau nachzustellen und die 3D-Architektur und innere Zusammensetzung

zung vorzugeben,^[58] andere gehen davon aus, dass es ausreicht, Zellaggregate zu drucken, da die Zellen kraft ihrer Organisationsfähigkeit selbsttätig Gewebe aufbauen können; unter optimalen Rahmenbedingungen bilden Endothelzellen (ECs) beispielsweise Röhrenstrukturen.^[63]

Die drei Verfahren des 3D-Biodrucks^[64–66] sind Tintenstrahl-, Laser- und Extrusionsbiodruck (Abbildung 2).

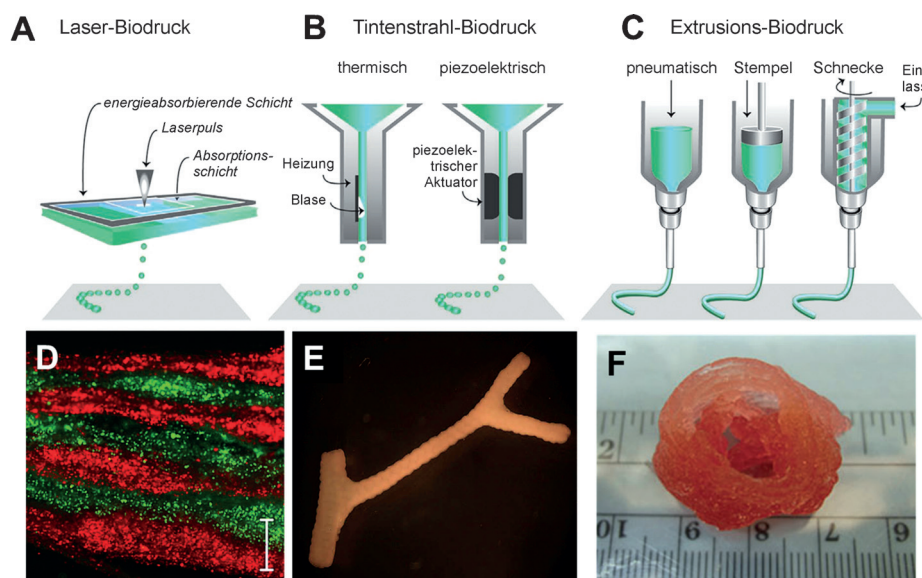


Abbildung 2. Die drei Ansätze des Biodrucks: A) Laser-, B) Tintenstrahl- und C) Extrusionsdruck. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [86]. Durch Biodruck erzeugte Gewebe: D) Haut durch Laserdruck von Zellen (sieben Schichten, abwechselnd aus roten und grünen Keratinozyten, wobei jede Schicht wiederum aus vier Unterschichten besteht; Maßstab 500 μm), E) verzweigte Gefäße durch Tintenstrahlruck und F) Aortenklappen durch Extrusionsbiodruck. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [70].

3.1.1. Laser-Biodruck

Laser-Biodruck („laser-assisted bioprinting“, LaB) nutzt eine Laserpulsquelle, eine Absorptionsschicht und ein Substrat, um mehrere Zellen und biologische Komponenten auf eine frei gewählte Oberfläche aufzubringen und lebende Gewebe oder Organe zu drucken (Abbildung 2A).^[67] Vor der Bestrahlung wird die Absorptionsschicht, die für die Laserwellenlänge durchlässig ist, mit biologischem Material (Biotinte) beschichtet, das die lebenden Zellen und/oder Proteine einschließt. Ein fokussierter Laserstrahl wird dann auf die Absorptionsschicht gelenkt, um Wärme zu übertragen und die Zellsuspension in Richtung des Substrats zu schleudern.^[55] Die Absorptionsschicht ist wichtig, da sie eine direkte Wechselwirkung zwischen dem Laser und den biologischen Materialien überflüssig macht. Mithilfe von LaB können Zellsuspensionen in kleinen Volumina mit hoher Auflösung gedruckt werden.^[68] Das Tröpfchenvolumen lässt sich über Viskosität und Dicke der Biotintenschicht zwischen 10 und 7000 pL variieren. Auch hohe Zelldichten und hoch viskose Hydrogele werden mit LaB möglich, was mit Tintenstrahlruck schwierig ist.^[69]

Vor kurzem sind mit LaB verschiedene Gewebekonstrukte erzeugt worden.^[67,70,71] Mit dem Ziel der Knochenwiederherstellung wurden menschliche Osteoblasten gemeinsam mit Nanohydroxyapatit, einer anorganischen Knochenkomponente, gedruckt.^[67] Zur Haut-Wiederherstellung wurden Keratinozyten und Fibroblasten in Collagen eingeschlossen und der nativen Zellanordnung der Haut getreu gedruckt.^[70] Die Möglichkeiten von LaB bei der Adipogenese wurden durch den Druck nichtdifferenzierter Fettgewebstammzellen belegt, die sich in adipogene Zelllinien differenzierten.^[71] Die begrenzte Verfügbarkeit lichthärtbarer Materialien und die Zytotoxizität der UV-Strahlung bereiten allerdings Probleme.^[22]

3.1.2. Tintenstrahl-Biodruck

Der Tintenstrahl-Biodruck ist ein vielversprechender Ansatz.^[72] Bei dieser kontaktfreien Technik werden biologische 3D-Konstrukte durch Aufbringen von Tintentropfen in aufeinanderfolgenden Schichten aufgebaut (Abbildung 2B). Die Methode ist nützlich, um mehrere Zellen^[73,74] oder Proteine^[75–77] in kleinen Tröpfchen gezielt an einer Position abzusetzen. Diese Vorgehensweise ist billig, reproduzierbar, für Hochdurchsatzverfahren geeignet, und sie kann hohe Auflösungen erzielen.^[78] Außerdem lassen sich handelsübliche Tintenstrahldrucker

leicht für den Druck von Zellen und Biomolekülen umrüsten.^[79–81] Boland et al. druckten Ovarialzellen des chinesischen Hamsters und embryonische Motorneuronzellen mithilfe eines modifizierten Hewlett-Packard-Druckers auf verschiedene Hydrogelsubstrate.^[79] Nakamura et al. nutzten den Tintenstrahlruck, um einfache Stützgerüste für Zellen in Form von Fasern, Blättern (mit einer oder mehreren Schichten) und 3D-Röhren aufzubauen.^[82] Forscher am Wake Forest Institute for Regenerative Medicine modifizierten das Tintenstrahlverfahren, um verschiedene Gewebe- und Organprototypen durch die hochgenaue Anordnung mehrerer Zellarten und anderer Gewebekomponenten zu erhalten.^[83] Überdies wurden die Auswirkungen der Druckbedingungen, einschließlich Substratsteifigkeit,^[84] Tensidkonzentration und Durchmischen, auf die gedruckten Zellen untersucht.^[85] Dabei zeigte sich, dass das Substrat, auf das ein Zelltröpfchen abgelegt wird, weich genug sein sollte, um die kinetische Energie des Tröpfchens aufzufangen und den Aufprall der Zellen zu dämpfen.^[84] Ferner wird die Tröpfchenbildung durch den Zusatz eines Tensids zuverlässiger, und leichtes Durchmischen verhindert das Absetzen und die Aggregation von Zellen im Vorrat.^[85]

3.1.3. Extrusionsbiodruck

Mit Extrusionsbiodruck können lebende Zellen, verkapselt in einem Hydrogel, gezielt positioniert werden. Extrusionstechniken, die auf einer Kombination aus einer Spritze, einer Düse und einem Drucksystem beruhen, sind heute der vielversprechendste Ansatz, um durch 3D-Biodruck Gewebe- oder Organkonstrukte mit klinisch relevanter Größe und Form aufzubauen (Abbildung 2 C).^[55] Vor dem eigentlichen Druckschritt werden Zellen oder Proteine in einem Hydrogel verkapselt und in sterilisierte Spritzen mit einer Mikrodüse gefüllt. Zellbeladenes Hydrogel oder Zellsphäroide werden dann mithilfe von Luftdruck oder durch einen motorbetriebenen Kolben in vorgegebener Weise auf das Substrat übertragen. Viele Berichte beschreiben verschiedene Extrusionssysteme für den 3D-Druck von Geweben, z. B. den Novogen MMX Bioprinter (Organovo, Inc., San Diego, CA, USA),^[87] den Bioplotter (Envision TEC GmbH, Gladbeck, Deutschland),^[21, 88, 89] einen 3D-Drucker (Fab@Home, Cornell University, Ithaca, NY, USA),^[90] ein direktes Schreibsystem für Zellen (Arbeitskreis Prof. Sun, Drexel University, Philadelphia, PA, USA)^[91] und ein Mehrkopfsystem zum Aufbau von Geweben und Organen (MtoBS; Arbeitskreis Prof. Cho, POSTECH, Pohang, Korea).^[92] Mit diesen 3D-Biodrucksystemen wurde versucht, verschiedenartige Gewebekonstrukte zu erzeugen.^[21, 92, 93]

3.2. Zentrale Merkmale

Drei Charakteristika sind essenziell für den Aufbau realistischer Gewebemodelle durch 3D-Biodruckverfahren: Biomimetik, Zellfluss in Geweben und modulare Bausteine.

3.2.1. Biomimetik

Mit 3D-Biodruck versucht man, die zellulären und extrazellulären Komponenten eines Gewebes oder Organs nachzubilden.^[94] Dies gelingt durch den Nachbau spezifischer funktioneller Gewebekomponenten, z. B. durch Nachahmen der Leberläppchen-Struktur, oder durch Erzeugen physiologisch exakter Biomaterialien und Gradienten. Für den erfolgreichen Nachbau biologischer Gewebe auf der Mikrometerebene muss man über Kenntnisse der Mikroumgebung verfügen, einschließlich der spezifischen Organisation von funktionellen Zellen und Stützzellen, Gradienten löslicher oder unlöslicher Faktoren, der Zusammensetzung der ECM und biologischer Einflüsse.^[58] Die Schaffung dieser Wissensgrundlage entscheidet über den Erfolg des Ansatzes. Dabei kann man auf Forschungsergebnisse aus Gebieten wie Biomaterialien, Zellbiologie, Biophysik, Bildgebung und Medizin zurückgreifen.

3.2.2. Zellfluss in Geweben

Zellen verfügen über organisatorische Fähigkeiten, die es ihnen ermöglichen, nach dem Druck von Zellaggregaten selbsttätig Gewebe zu bilden. Die Organentwicklung im Embryo dient oft als Anhaltspunkt für die Nachbildung bio-

logischer Gewebe durch 3D-Biodruck. Diesem Ansatz folgend wurde der 3D-Druck selbstorganisierender Zellsphäroide untersucht, die sich zusammenlagern und durch Organisation ihrer Zellen sich entwickelnde Gewebe nachahmen. So können Epithelzellen (ECs) unter optimalen Bedingungen röhrenförmige Strukturen bilden.^[56] Für eine autonome Organisation, wie sie über die gesamte embryonische Entwicklung hin erfolgt, muss die Zelle selbst die wichtigste Triebkraft der Histogenese sein und Struktur, Zusammensetzung, Lokalisierung, Funktion und Eigenschaften eines Gewebes vorgeben.^[22]

3.2.3. Modulare Bausteine

Organe und Gewebe setzen sich aus kleineren funktionellen Bausteinen zusammen,^[63] beispielsweise aus Leberläppchen. Die Bausteine können vorgefertigt werden und sich rational gesteuert, selbstorganisiert oder nach einem kombinierten Ansatz modular zu größeren Konstrukten vereinigen.^[95] 3D-Biodruckverfahren können diese Module erstellen und lebende 3D-Strukturen liefern; beispielsweise wurden Zellsphäroide mithilfe von ECM nachahmenden Hydrogelen angeordnet.^[96, 97]

3.3. Materialien für den 3D-Biodruck

Beim Biodruck von Gewebekonstrukten nutzt man häufig Materialien mit definierten Eigenschaften als Vehikel für Zellen. Diese Materialien können maßgeschneidert werden, um die Zell-Biomaterial-Wechselwirkungen zu modulieren, zusätzlich können sie aber auch ein Gerüst für das entstehende Gewebe bereitstellen.^[98, 99] Aus diesem Grund werden üblicherweise zwei Materialklassen für den 3D-Biodruck verwendet. Die erste Klasse sind härtbare Polymere, die thermisch extrudiert werden können und häufig als Gerüste dienen.^[92, 100–103] Die Gerüste werden nach dem Druckschritt mit Zellen beimpft, sodass Zellen in das Gerüst hinein wachsen und künstliche Gewebe entstehen können, oder sie werden direkt implantiert (Abbildung 3).^[104] Die zweite Klasse sind Materialien, die große Wassermengen einlagern (bis > 99 %) und den Zellen eine günstige Umgebung bieten können.^[55] In diese Klasse fallen Hydrogele, die zur Verkapselung lebender Zellen verwendet werden. Mit Zellen beladene Hydrogele, die außerdem noch andere Komponenten wie Wirkstoffe^[105] oder Biomoleküle enthalten können,^[106] sind typische „Biotinten“. Hydrogele, die sich thermisch, photochemisch, durch Ionen oder chemisch vernetzen lassen, eignen sich zur Herstellung von Biotinten.^[89, 107–115] Konzentration, Molekulargewicht, Viskosität, Gelierungskinetik und Steifigkeit sind weitere wichtige Parameter. Lit. [55] und [86] informieren umfassend über diese Eigenschaften von Hydrogelen im Zusammenhang mit dem 3D-Biodruck.

Üblicherweise ist ein Überschuss an Hydrogel in Bezug auf die Zellen erforderlich, um den Biodruck-Konstrukten eine stabile Struktur zu verleihen. Die Konzentration der Zellen in der Biotinte beeinflusst aber das Ausmaß der Zell-Zell-Wechselwirkungen in der resultierenden 3D-Struktur; hier ist eine höhere Zelldichte vonnöten (10^7 – 10^8 Zel-

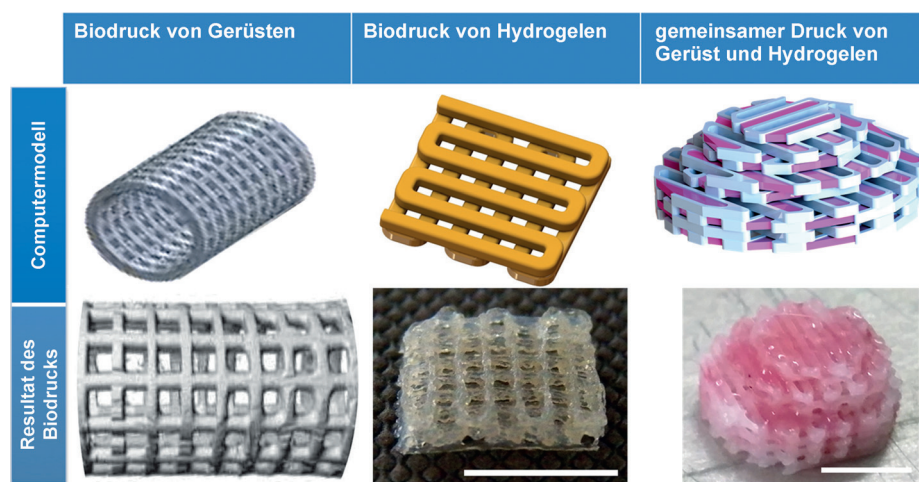


Abbildung 3. Biodruck von Gerüsten und Hydrogelen sowie gemeinsamer Druck von Gerüst und Hydrogel. Computermodelle und entsprechende gedruckte Strukturen von Poly(propylenfumarat)-Gerüsten (linke Spalte), Seidenfibroin-Gelatine-Hydrogelkonstrukten (mittlere Spalte) und Konstrukten aus Polycaprolacton und dezellularisierter extrazellulärer Matrix (rechte Spalte). Maßstab 5 mm. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [104, 115, 126].

len mL^{-1}).^[116] Häufig muss daher ein Kompromiss zwischen Hydrogelkonzentration und Zelldichte gefunden werden.^[55] Außerdem produzieren die Zellen die ECM des Gewebes – ein Prozess, der oft von der Mikroumgebung der Zelle abhängt.^[117] Die Zusammensetzung einer Biotinte kann die Bildung einer gewebespezifischen ECM entscheidend beeinflussen. Selbstorganisierende Zellsphäroide können die ECM aufbauen, die für ihr Funktionieren am günstigsten ist.^[63] Der Biodruck von Zellsphäroiden ist aber eine Herausforderung, da über den Prozess hinweg ihre Lebens- und Biosynthesefähigkeit sowie ihre Nahrungsversorgung aufrechterhalten werden müssen.^[62] Härtbare feste Materialien (z.B. Thermoplaste wie PCL, PLA und PLGA) und mit Zellen beladene Hydrogele wurden auch gemeinsam verarbeitet. Dadurch wurden vorteilhafte mechanische Eigenschaften mit der gezielten Positionierung von Zellen durch den Biodruck und einer hohen Zelldichte kombiniert (Abbildung 3).^[118]

Oft wurden den Matrixmaterialien biologisch aktive Komponenten zugesetzt, um die Zelladhäsion zu verbessern oder die Zellproliferation und -differenzierung anzutreiben.^[119, 120] So binden ECM-Proteine an lösliche Wachstumsfaktoren und steuern deren Verteilung, Aktivierung und Präsentation gegenüber Zellen.^[121] Die räumliche Verteilung von Proteinen führt zu biochemischen Signalen für den organisierten Gewebeaufbau.^[122] Für eine gezielte Gewebeschneidung ist es notwendig, solche Signale von außen im geeigneten räumlichen und zeitlichen Kontext zu geben.^[121]

Beim 3D-Biodruck kann eine gewebespezifische ECM genutzt werden, um die Bildung des gewünschten Gewebes sicherzustellen.^[110] Zell-ECM-Wechselwirkungen sind naturgemäß extrem komplex, und daher kann nur ein gewebespezifischer Ansatz die native Umgebung für Stammzellen bieten. Dies wurde kürzlich in Studien bestätigt, in denen spezifische ECM-Gerüste verbesserte Funktionen^[123] und die Bildung komplexer Gewebe ermöglichten.^[124, 125] Jüngst wurde dezellularisierte ECM (dECM) aus verschiedenen

Geweben in Biotinten für den 3D-Biodruck genutzt.^[110] Stammzell-differenzierung und Gewebeschneidung wurde durch dECM aus Fettgewebe zugunsten einer adipogenen Zelllinie und durch Knorpel-dECM zugunsten einer chondrogenen Zelllinie gelenkt. An Konstrukten, die mit Herzgewebe-dECM hergestellt wurden, kam es überdies zu einer verstärkten strukturellen Reifung von Myoblasten.^[110]

3.4. 3D-Biodruck von Gewebe- und Organmodellen

Durch 3D-Biodruck mit einer Reihe von Zellarten und Materialien wurden verschiedene Gewebe und Organe nachgebildet (Tabelle 1). Während oft nur die Mach-

barkeit bewiesen wurde, konnten einige wenige Studien das Potenzial der Technik für die Entwicklung von Gewebemodellen aufzeigen.

3.4.1. Haut

Mithilfe von Tintenstrahl-3D-Biodruck unter Verwendung von Keratinozyten und Fibroblasten als Konstituenten der Epidermis bzw. Dermis sowie Kollagen als Ersatz für die Hautmatrix konnte Hautgewebe künstlich erzeugt werden.^[127] Histologische und Immunfluoreszenz-Analysen bescheinigten diesem Hautgewebe eine morphologische und biologische Ähnlichkeit zu menschlicher Haut. In einer weiteren Studie lieferte eine Laser-Biodrucktechnik einen vollständig zellulisierten Hautersatz. Dabei wurden Fibroblasten und Keratinozyten auf einer stabilisierenden Matrix (Matriderm) abgesetzt.^[128] Die Keratinozyten begannen in Kultur an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche mit der Differenzierung und bildeten eine mehrschichtige Epidermis und ein Stratum corneum. Einige der aufgedruckten Fibroblasten verblieben direkt auf dem Matriderm-Substrat, wo sie Kollagen produzierten, während der Rest in das Substrat einwanderte. Mithilfe eines laserinduzierten Transfers („laser-induced forward transfer“, LIFT) wurden Hautzelllinien (Fibroblasten/Keratinozyten) und humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) zum Aufbau eines Modells für menschliche Haut gedruckt, wobei die Zellen nicht beschädigt wurden.^[129]

3.4.2. Blutgefäße

Der Druck von Blutgefäßen wurde besonders eingehend untersucht, da diese die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung von Gewebekonstrukten sicherstellen und den Abtransport von Metaboliten gewährleisten. Dadurch könnten sie den Aufbau größerer und komplexer Gewebe und Organe er-

Tabelle 1: Beispiele für Gewebe- und Organmodelle, die durch 3D-Biodruck erhalten wurden.

Gewebeart	Materialien	Vernetzungs- verfahren	Zellen	Biodruck-Technik	Ausgeführte Experimente	Wichtige Ergebnisse	Lit.
Haut	Typ-I-Kollagen für die Zellverkapselung, Matriderm als stabilisierende Matrix	thermisch	Fibroblasten und Keratinozyten	Laserdruck	Einbringen von Konstrukten in Hautwunden von Nacktmäusen, Charakterisierung mit Histologie und Immunfluoreszenz	Hautgewebe, hauptsächlich Epidermis, und Blutgefäße von der Wunde in Richtung der gedruckten Zellen werden gebildet	[121]
Gehirn-mikrogefäße	Typ-I-Kollagen	thermisch	Maushirn-Endothelzellen (bEnd.3)	Extrusionsdruck für den Rahmen	Durchdringen des Endothels und Störung der Barrierefunktion mit Mannitol, Immunfluoreszenzfärbung	Gehirn-Mikrogefäße mit Schrankenfunktion	[172]
Leber	–	–	Primäre Hepatozyten, Endothel- und Kupfer-Zellen	Tintenstrahl Druck	Biochemische Studien: Cytochrom-P450-Aktivität, Proteinexpression	Leberkonstrukte mit mehreren Zellarten und leberspezifischer Funktion über 135 h	[130]
Knochen und Knorpel	Acrylierte Peptide und acryliertes Polyethylenglykol (PEG)	UV-induziert	Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) aus Knochenmark	Tintenstrahl Druck	Zelllebensfähigkeit und biochemische Analyse der abgeschiedenen mineralischen Bestandteile und der Matrix	Abscheidung von mineralischer und Knorpelmatrix bestimmt mechanische Eigenschaften	[132]
Herzgewebe	Alginate	ionisch	Kardiomyozyten-Vorläuferzellen (hCMPCs)	Extrusionsdruck	Zelllebensfähigkeit und Expression herzspezifischer Gene	Gedruckte Zellen wandern aus der Alginatematrix in die Matrigelschicht	[135]
Hornhaut	Rekombinantes humanes Typ-III-Kollagen und 2-Methacryloyloxyethylphosphorylcholin (RHCIII-MPC) und Fibronectin als Tinte	Chemische Vernetzung von RHCIII-MPC	Humane corneale Epithelzellen (HCECs)	Transfer von Zellen auf RHCIII-MPC durch Mikrokontakt Druck	Zelllebensfähigkeit und -vermehrung, Immunhistochemie	Bildung eines vernetzten Hydrogels mithilfe eines Femtosekundenlasers und Mikrokontakt Druck lebensfähiger HCECs nach vorgegebenem Muster	[137]
Ohr	Alginate	ionisch	Chondrozyten aus Gelenkknorpel	Extrusionsdruck	Zelllebensfähigkeit, biomechanische und elektrische Charakterisierung	Bionisches Ohr mit leitfähigem Polymer zeigt biologische und nanoelektronische Funktion	[138]
Fettgewebe	Dezellularisierte Fettgewebematrix	thermisch	Humane Fettgewebestammzellen	Extrusionsdruck	Zelllebensfähigkeit, Genexpression, Immunfärbung, In-vivo-Untersuchung der Fettgeweberegeneration an einem Mausmodell	Konstrukte stabilisieren die Regeneration von vaskularisiertem Fettgewebe	[142]

möglichen.^[130] Extrusionsbiodruck unter Verwendung mit Zellen beladener Gele lieferte Gefäßkonstrukte.^[131] Später wurden zwei verschiedene Gel-basierte Zellsuspensionen und ein entfernbares Gel nacheinander in eine Kammer gedruckt, die anschließend mit einem GelMA-Gel aufgefüllt wurde.^[132] Nach Vernetzen des GelMA durch Ultraviolettbestrahlung wurde die Umgebungstemperatur gesenkt, um das entfernbare Gel zu verflüssigen und auszutreiben. Die dadurch entstehenden Kanäle in der Gelstruktur wurden mit Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen („human umbilical vein endothelial cells“, HUVECs) durchspült, die sich an den Kanalwänden anlagerten und das Konstrukt vaskularisierten. Gewebekonstrukte mit Kanälen waren schon früher auf ähnliche Weise erzeugt worden, indem ein zellhaltiges Gel über eine gedruckte 3D-Kohlenhydrat-Glasstruktur gegossen

wurde.^[133] Nach dem Vernetzen des Gels wurde die Kohlenhydratstruktur herausgelöst, und es verblieb ein Kanalsystem, an dessen Wände HUVECs angelagert werden konnten. Zum Druck von Blutgefäßen wurden Sphäroide aus Glattmuskelzellen und Fibroblasten direkt in einem stützenden Agarosegel dispergiert.^[93]

3.4.3. Leber

Der 3D-Biodruck funktionaler durchströmbarer Leberkonstrukte steht noch am Anfang, entsprechende Konstrukte mit eingeschränkter Funktion konnten aber bereits erhalten werden.^[134,135] Mit dem NovoGen MMX Bioprinter (Organovo Holdings, Inc., San Diego, CA, USA) wurden stoffwechselaktive 3D-Lebergewebe gedruckt,^[136] die im Ver-

gleich zu entsprechenden 2D-Zellkulturen verstärkte leberspezifische Funktion zeigten (bis 135 h lang). Ferner wurde eine kompartimentspezifische Organisation für Hepatozyten, Kupffer-Zellen und Endothelzellen nachgewiesen. Durch Extrusionsbiodruck wurden Alginat-verkapselte HepG2-Zellen, Wachstumsfaktoren und Gerüstmaterialien in einer 3D-Architektur organisiert.^[137] Diese Mikrolebern wurden in Stoffwechselstudien dynamisch durchströmt, um In-vivo-Bedingungen nachzuahmen. Das System diene auch als Modell in Strahlenschutz-Untersuchungen für Leberzellen.^[23]

3.4.4. Knochen und Knorpel

Tintenstrahl-Biodruck kann Knochen-Konstrukte liefern, wenn acylierte Peptide und acyliertes Polyethylenglykol gemeinsam mit mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) aus menschlichem Knochenmark gedruckt werden.^[138] Auf diese Weise erzeugtes und differenziertes Knochen- und Knorpelgewebe eignete sich ausgezeichnet für die Abscheidung von mineralischer und Knorpelmatrix und verfügte über deutlich verbesserte mechanische Eigenschaften. Die Steifigkeit und Struktur gedruckter 3D-Hydrogele lenken die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu adipogenen und osteogenen Zelllinien.^[139] Nach dem 3D-Druck von dispergierten Knochenmark-Stammzellen (BMSCs) mit verschiedenen Hydrogelen (z.B. Alginat, Agarose, Matrigel und Lutrol F127)^[21] zu Knochengewebe erwiesen sich die BMSCs als lebensfähig in den gedruckten Konstrukten. Ein 3D-Biodruck-Konstrukt mit zwei verschiedenen Knochen- und Knorpel-Zellarten wurde ebenfalls hergestellt,^[100] in dem ein Gerüst aus thermoplastischem Polycaprolacton (PCL) die mechanische Stabilität verstärkte. Alginat-Lösungen mit entweder Osteoblasten oder Chondrozyten wurden in ein zuvor erzeugtes PCL-Gerüst geleitet. Der Druck von Knorpel- und Knochengewebe gelang mit MtoBS,^[100] das sich als vielversprechend für den 3D-Druck heterogener Gewebe aus mehreren Zellarten herausstellte. Vor kurzem wurde Schweineknorpel-Gewebematrix als Biotinte für den Druck von Knorpelgewebekonstrukten verwendet.^[110] Mit einer Biotinte aus dezellularisierter extrazellulärer Knorpelmatrix erhaltene 3D-Konstrukte unterstützten die chondrogene Differenzierung und Reifung verkapselter Stammzellen und die Bildung von neuem Knorpelgewebe.

3.4.5. Herzgewebe

3D-Biodruck mit anschließender photochemischer Vernetzung lieferte komplexe heterogene Aortenklappen-Gerüste mit nativer anatomischer und achsensymmetrischer Aortenklappengeometrie und 12–22 mm Innendurchmesser.^[140] Mit interstitiellen Zellen von Schweine-Aortenklappen („porcine aortic valve interstitial cells“, PAVIC) beimpfte Gerüste, die bis zu 21 Tage lang kultiviert wurden, zeigten Elastizitätsmoduln in einem breiten Bereich von 5.3 ± 0.9 bis 74.6 ± 1.5 kPa. In einer weiteren Studie wurde ein mit Kardiomyozyten-Vorläuferzellen aus menschlichen Herzen („human cardiac-derived cardiomyocyte progenitor cells“, hCMPCs) beladenes Alginat-Gel genutzt, um in vitro einen Herzflicken mit 92% überlebenden Zellen zu erzeugen.^[141]

Die gedruckten hCMPCs bildeten Herzzellen und exprimierten die frühen kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5, Gata-4 und Mef-2c sowie das Sarkomerprotein Troponin T.

3.4.6. Auge

Mithilfe von computergestütztem Design wurde ein Modell entworfen, das die optische Leistung des menschlichen Auges gut wiedergibt.^[142] Das durch 3D-Druck hergestellte Modell kam in Augengrund-Studien zum Einsatz. Bei einem Versuch, die Hornhaut des menschlichen Auges im Labor nachzubauen, wurden Kollagen und Phospholipide in robuste Hydrogele gedruckt, die durch Laserbehandlung gemustert worden waren und als künstlicher Ersatz für Spender-Hornhaut dienten.^[143]

3.4.7. Ohr

Ein bionisches Ohr in anatomischer Geometrie wurde durch 3D-Biodruck einer zellbeimpften Hydrogelmatrix erzeugt, wobei die Infusion von Silbernanopartikeln für Leitfähigkeit sorgte.^[144] Bei dieser Studie wurde das Knorpelgewebe in vitro um eine Spulenantenne im Inneren des Ohrs herum kultiviert, die es anschließend ermöglichte, induktiv gekoppelte Signale von Hörschnecken-förmigen Elektroden zu verfolgen. Das gedruckte Ohr hatte eine verstärkte Wahrnehmungsfähigkeit für Radiofrequenzen, und komplementäre linke und rechte Ohren empfingen Musik in Stereo. In einer weiteren Untersuchung wurden ohrförmige Konstrukte mit Ohrenknorpel und -fettgewebe durch 3D-Biodruck mit einer Opferschicht erhalten.^[145,146] Chondrozyten und Adipozyten, die aus Fettgewebstammzellen differenziert waren, wurden in separaten Hydrogelen verkapselt und anschließend für die Regeneration von Knorpel- bzw. Fettgewebe in speziellen Bereichen abgesetzt.

3.4.8. Fettgewebe

Bei einem frühen Versuch, künstliches Fettgewebe zu erzeugen, wurden Fettgewebstammzellen (ASCs) und ein Gelatine/Alginat-Hydrogel in die Form von Würfeln ($10 \times 10 \times 10$ mm³) gedruckt.^[147] Die ASCs wuchsen, vermehrten sich und differenzierten in diesen Konstrukten. Wurde basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) zugesetzt, so differenzierten die Zellen an den Wänden des Gerüsts in Endothel-artige Zellen, die Zellen im Inneren des Hydrogels hingegen in Fettgewebe-artige Zellen. Die Konstrukte blieben über 60 Tage intakt. Vor kurzem wurde menschliche Fettgewebematrix als Biotinte genutzt.^[110] Konstrukte aus entsprechender dECM zeigten eine adipogene Differenzierung und Reifung verkapselter Stammzellen und die Bildung von Fettgewebe.^[126]

Die hier beschriebenen Studien könnten die Entwicklung pharmakologischer oder toxikologischer Modelle anregen, um (patho)physiologische Aspekte spezieller Gewebe und Organe zu untersuchen.

4. Charakterisierung von In-vitro-Gewebemodellen und -Organmodellen

Gewebe- und Organmodelle, die durch 3D-Biodruck erhalten wurden, müssen charakterisiert werden, um ihre Entwicklung und Funktion zu bewerten. Unter den zahlreichen angewendeten Techniken sind Untersuchungen der Zelllebensfähigkeit und der Morphologie sowie biochemische und biomechanische Analysen.

4.1. Lebensfähigkeit und Morphologie

Die Zelllebensfähigkeit ist von entscheidender Bedeutung bei der Entwicklung von Gewebemodellen (Abbildung 4A). Übliche Bestimmungsmethoden umfassen die Messung der Mitochondrien-Aktivität mithilfe des MTT-Assays oder einer seiner Varianten.^[148] Diese Assays werden zwar oft verwendet, um die Zellvermehrung in Monoschichten zu untersuchen, sie eignen sich aber besser für die Bestimmung der Lebensfähigkeit von Zellen in ruhendem oder gealtertem Zustand oder unter widrigen Bedingungen.^[149] Andere Methoden nutzen Konzentrationsmessungen mithilfe von Calcein AM, das durch Esterasen in lebenden Zellen in

ein fluoreszierendes Derivat umgewandelt wird, oder die Identifizierung von Zellen in einem frühen apoptotischen Zustand mithilfe einer Kombination von Annexin V und Propidiumiodid.^[150] Zuverlässige Lebensfähigkeitsassays für 3D-Umgebungen fehlen allerdings noch.^[151,152]

Morphologische Analysen durch Biodruck erzeugter und gereifter Gewebekonstrukte beruhen im Allgemeinen auf Histologie und Immunhistochemie.^[153] Beide Ansätze bedürfen einer Probenbehandlung durch Schritte wie Gewebefixierung, Trocknung, Dünnschnitt und Anfärben. Verschiedene Anfärbetechniken, etwa mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) oder die Masson-Trichrom-Färbung, werden routinemäßig für histologische Analysen verwendet. Die spezifischere Immunhistochemie (IHC) nutzt Antikörper gegen bestimmte Epitope, um gesuchte Merkmale zu identifizieren und ihre Verteilung im Gewebeschnitt festzustellen.^[154] IHC ist auch in der molekularbiologischen Ära eine wichtige Komponente von Labortests.^[154]

Das Proteom des menschlichen Gewebes mit Lokalisierung von Proteinen auf der Ebene einzelner Zellen wurde vor kurzem durch quantitative Transkriptomik in Kombination mit IHC-Protein-Profilierung erfasst und im „Human Protein Atlas“ (HPA) zusammengetragen.^[155] Mit über 13 Millionen IHC-Bildern, jeweils mit Anmerkungen von Pathologen, ist

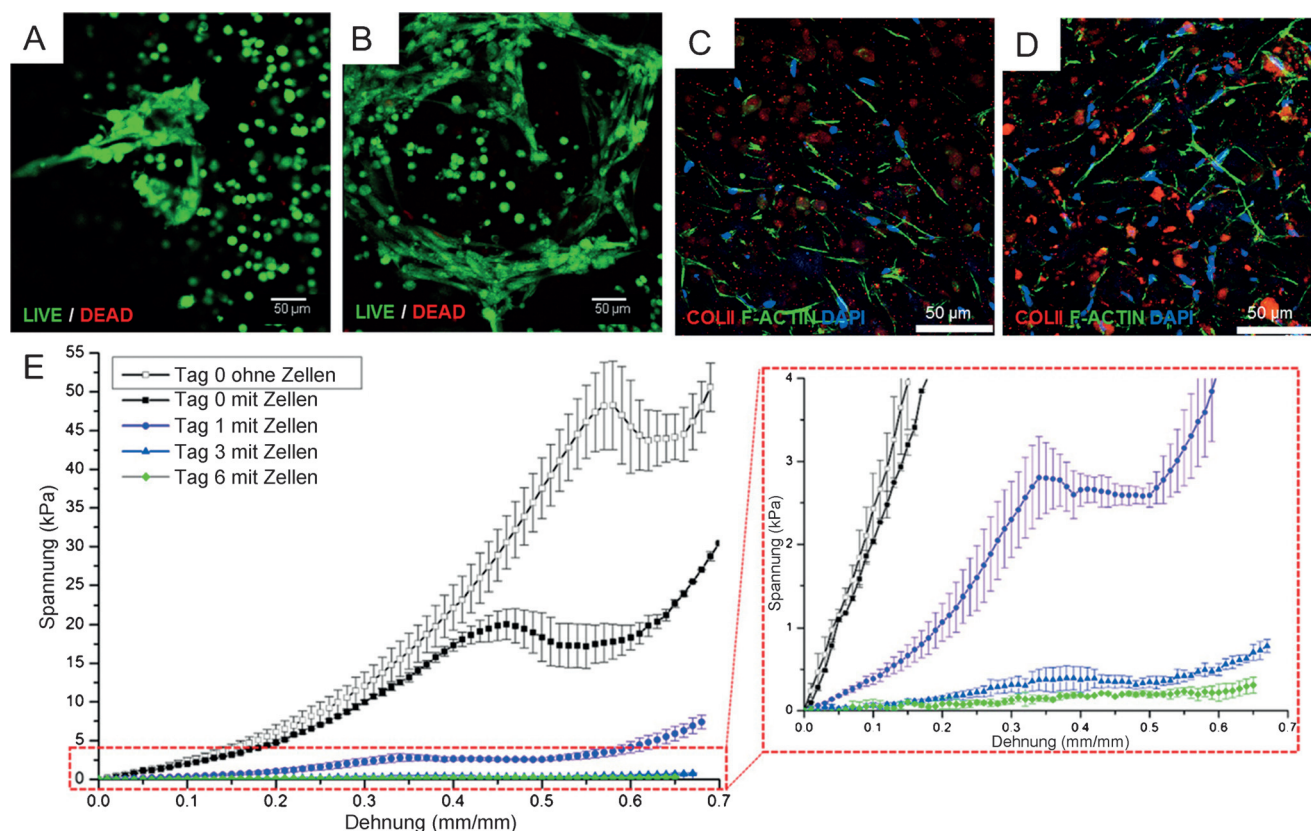


Abbildung 4. Repräsentative Charakterisierungstechniken für Biodruck-Gewebekonstrukte. Bestimmung der Lebensfähigkeit gedruckter humaner Kardiomyozyten-Vorläuferzellen (hCMPCs) in einem RGD-modifizierten Alginategerüst nach Kultur über eine (A) und zwei Wochen (B). Auswertung der Chondrogenese in Biodruck-Knorpelkonstrukten mit C) Kollagen und D) Biotinte aus extrazellulärer Matrix aus Knorpelgewebe durch Immunfluoreszenz-Anfärbung: Typ-II-Kollagen (COLII, rot), Zellkerne (DAPI, blau) und F-Aktin (grün). E) Spannungs-Dehnungs-Diagramm von zellfreien Biodruck-Konstrukten (Tag 0) und Weichgewebemodellen nach verschiedenen Kulturzeiträumen. Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [110, 141, 159].

diese Datensammlung höchst nützlich für die Evaluierung und Validierung von Gewebe- und Organmodellen, auch hinsichtlich von Reifungsprozessen.

Die Laser-Mikrodissektion (LMD) wurde entwickelt, um gewünschte Zellen schnell und effizient aus einer Gewebeprobe zu isolieren.^[156] Durch den zusätzlichen Einsatz von Echtzeit-PCR- und RT-PCR-Verfahren ist es nun möglich, genetische Veränderungen, Genexpression und Proteine in definierten Zellpopulationen aus komplexen gesunden und kranken Geweben zu analysieren.^[157] Fortschritte bei der automatisierten Gewbeanalyse haben die reproduzierbare phänotypische Charakterisierung histologischer Proben ermöglicht, und es konnten quantitative Gewebedaten erhoben werden, die zuvor nur durch visuelle Histopathologie zugänglich waren. Solche Datensätze können mithilfe von Bioinformatik gesammelt und statistisch korreliert werden. Dieser kombinierte Ansatz könnte ein systemumfassendes Bild liefern und die Entwicklung einer personalisierten Computerdiagnose vorantreiben.^[158]

4.2. Biochemische Analysen

Eine Reihe von biochemischen Analysen wird routinemäßig an Biodruck-Gewebemodellen ausgeführt. Genom- und Proteomanalysen bieten etwa die Möglichkeit, aufschlussreiche Ergebnisse zu erhalten.^[160] Bei Genomanalysen wird die genetische Information (DNA oder RNA) eines Gewebes oder Organs untersucht, während es das Ziel der Proteomik ist, die Proteinexpression in einem Gewebe oder Organ zu erschließen.^[161,162] Durch Genom- und Proteomforschung wurden jüngst viele aussichtsreiche Biomarker identifiziert, eine unabhängige Validierung steht jedoch noch aus, und die Reproduzierbarkeit bereitet Probleme. Genom- und Proteom-Screeningmethoden können oft Gen- bzw. Proteinklassen identifizieren, die in verschiedenen Reifungsstadien eines Gewebe- oder Organmodells oder im Verlauf eines In-vitro-Krankheitsmodells unterschiedlich exprimiert werden.^[105,110,141,143,163] Auch die Differenzierung von Stammzellen in bestimmte Zelllinien wurde in Genom- und Proteomanalysen untersucht.^[110,115]

Ob ein Gewebemodell funktionsfähig ist, kann auch anhand von Zielproteinen ausgewertet werden (Abbildung 4B). In einem Lebermodell aus Hepatozyten und ECs in schichtförmiger Kokultur wurden Sekretion und Aufnahme eines fluoreszierenden Gallensäure-Analogons bestimmt und das Funktionieren der Hepatozyten bestätigt.^[164] In einem Nierenmodell wurden Enzyme wie Cathepsin und Alkalische Phosphatase anhand von Messungen zu Metaboliten und Zytokinen untersucht, um zu prüfen, ob das Modell eine mögliche Wirkstofftoxizität erkennen kann.^[165]

Die Funktion von Gewebekonstrukten sollte durch weitere biochemische Analysen bewertet werden. So werden Harnstoff, Albumin, Bilirubin und Transaminasen routinemäßig für In-vitro-Lebergewebe gemessen.^[166] Biochemische Analysen erfordern generell höhere Zelldichten, und oft sind zusätzliche Schritte notwendig, um die Zellen von der Matrix zu trennen.^[167]

4.3. Biomechanische Analysen

Die biomechanische Charakterisierung von Gewebe- und Organmodellen ist wichtig, da Struktur und Steifigkeit der gedruckten Matrices die geometrische Anordnung der Zellen beeinflussen, die sich ihrerseits auf ihre Differenzierung und Reifung auswirkt.^[168–170] Die mechanischen Eigenschaften von Biodruckmodellen lassen sich durch Kompressionstests nach verschiedenen Kulturzeiträumen analysieren (Abbildung 4E), und die so erhaltenen Daten können mit mathematischen Modellen, z. B. mit dem Ogden-Modell, angepasst werden.^[159] Mechanische und physikochemische Merkmale der gewählten 3D-Hydrogelstruktur wirken sich auf das Zellverhalten aus und sollten bei der Herstellung funktionseller Gewebe berücksichtigt werden.^[139] Die Hinweise häufen sich, dass mechanischer Stress neben anderen physikalischen Faktoren die Biosyntheseaktivität von Zellen in künstlichen Matrizen deutlich erhöhen kann.^[171]

Jüngere Studien belegen auch die Bedeutung der Matrixdichte als Auslösersignal für die Stammzelldifferenzierung.^[170] Demzufolge sollten sich Gewebe- oder Organmodelle bezüglich ihrer mechanischen Eigenschaften an den nachgebildeten Geweben orientieren.^[172] Interessanterweise wurde eine osteogene Differenzierung bevorzugt in anisotropen weichen Kollagen-reichen Substraten beobachtet, eine adipogene Differenzierung dagegen zumeist in isotropen steifen Agarose-reichen Matrices.^[139]

Die Zellsteifigkeit kann ein nützlicher Indikator für das Metastasierungspotenzial von Krebszellen sein. Ein Modell hat gezeigt, dass metastatische Eierstock-Krebszellen weniger steif sind als normale Zellen, was auf eine höhere Flexibilität und Invasivität hindeutet.^[173] Biomechanische Analysen von Gewebe- und Organmodellen könnten somit Einblicke in die Bedeutung der Mechanobiologie für die Gewebe- und Organentwicklung geben.

Darüber hinaus werden aber neue Charakterisierungstechniken für 3D-Gewebemodelle und -Organmodelle benötigt, ebenso wie Standardprotokolle und quantitative Analysemethoden, unter anderem geeignete Bildgebungsverfahren.

5. Gewebe- und Organmodelle für Wirkstoffentwicklung und Toxikologie

3D-Matrices mit definierter Mikroarchitektur und gewebeähnlicher Zellverteilung sollten Zell-Zell- und Zell-ECM-Wechselwirkungen ermöglichen^[14] und folglich ähnlich auf Wirkstoffe reagieren wie natives Gewebe. Der 3D-Biodruck kann mittlerweile schnell Strukturen bereitstellen, die spezifische Gewebeeigenschaften und -morphologien nachahmen. Diese gedruckten Gewebe verfügen über einige Merkmale des nativen Gewebes, einschließlich einer gewebeähnlichen Zelldichte, des Vorliegens mehrerer Zellarten nebeneinander sowie wichtiger architektonischer und funktioneller Aspekte. Gedruckte menschliche 3D-Gewebe können deshalb die Wirkstoffentwicklung im Stadium der Leitstrukturauswahl und -optimierung beschleunigen.^[3,174,175]

Vorteile des 3D-Biodrucks von Gewebe- und Organmodellen

- Automatisierte und reproduzierbare Herstellung von Gewebekonstrukten
- Erzeugung einer zellspezifischen Mikroumgebung
- Aufbau der gewebespezifischen Architektur
- Evaluierung von Wirkstoffen/Chemikalien an menschen-spezifischen Modellen
- Kombination von Mikrofluidik und 3D-Struktur
- Herstellung vaskularisierter Gewebekonstrukte
- Zelllebensfähigkeit und -funktion über längere Zeiträume
- Zugang zu Grenzflächen zwischen Geweben

Mithilfe von 3D-Biodruck wurde ein physiologisch relevantes pharmakokinetisches Modell erzeugt.^[176] Dazu wurden 3D-Gewebekonstrukte durch Biodruck eines Hydrogels mit verkapselten Zellen aufgebaut und direkt mit einem Mikrofluidiksystem verbunden, um sie kontinuierlich mit einem Wirkstoff zu durchströmen. Eine Charakterisierung der 3D-Gewebekonstrukte ergab die erwarteten Resultate hinsichtlich Zelllebensfähigkeit und -vermehrung und belegte eine verbesserte Funktion gegenüber herkömmlichen Kulturmethoden. Organovo Holdings, ein Biotechnologieunternehmen aus San Diego, arbeitet zurzeit am 3D-Druck von menschlichem Gewebe für pharmakologische und toxikologische Screenings. Vor kurzem gelang ihnen mit der Präsentation ihres ersten 3D-Lebergewebes für Experimente ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Kommerzialisierung.^[177] Ein 3D-Modell für Gehirnmikrogefäße wurde durch Anordnen von Mikrokanälen aus Kollagen I mithilfe von Mikronadeln in einem durch 3D-Druck erzeugten Rahmen erhalten.^[178] Maushirn-Endothelzellen (bEnd.3) wurden an der Innenwand der zylindrischen Kollagen-Mikrokanäle kultiviert, um Gehirnmikrogefäße mit rundem Querschnitt in vitro zu rekonstruieren. Dieses Modell für die Blut-Hirn-Schranke könnte sich für (patho)physiologische und pharmakologische Studien eignen.

Die Physiologie des Menschen ist durch das Zusammenspiel von Gehirn, Verdauung, Muskeln, Leber und Fettgewebe geregelt. Dieses komplexe Kontrollsystem muss bei präklinischen Wirkstofftests unbedingt berücksichtigt werden. So sind Herz und Leber über den Stoffwechsel gekoppelt, was sich bei familiärer hypertropher Kardiomyopathie auswirkt.^[179] Eine Rückkopplung zwischen Fettgewebe und Leber über Adiponectin ist gut untersucht.^[180] Aber Beziehungen zwischen beispielsweise der Leber und der Muskulatur wurden kaum erforscht. Solche Studien werden zurzeit an einer Reihe von Mausmodellen vorgenommen.^[180] Der 3D-Biodruck könnte eine Alternative bieten, indem mehrere miteinander verbundene Organe erzeugt werden. Dieser Ansatz wäre besonders nützlich für die Untersuchung der Auswirkungen von Lebererkrankungen wie Fettleber und die Entwicklung entsprechender Therapien.

6. In-vitro-Modelle für Krankheiten und Tumore

Der effektivste Weg, um Tumore zu untersuchen und antineoplastische Wirkstoffe zu testen, sind klinische Studien,

dieser Ansatz ist allerdings aus ethischer Sicht bedenklich. Deshalb werden Modelle entwickelt, die Tumore in ihrer physiologischen Umgebung für präklinische Test nachstellen.^[163,181,182] 3D-Tumormodelle aus menschlichen Krebszellen könnten die charakteristischen Merkmale von Krebsgewebe im Mensch in vitro getreu wiedergeben.^[163,183] Zellsphäroide, mit Zellen beimpfte 3D-Gerüste, die Einbettung in Hydrogele, Mikrofluidikchips und die Bildung von Zellmustern wurden genutzt, um 3D-Tumormodelle in vitro aufzubauen,^[163] die komplexe physiologische Mikroumgebung von Tumoren lässt sich mit diesen Techniken aber nur schwer nachbilden. Durch Fortschritte beim 3D-Druck sind nun biologische Strukturen zugänglich, die pathophysiologische Mikroumgebungen nachahmen und Krankheits- und Tumormodelle für In-vitro-Pathogenesestudien bereitstellen.^[184] Zwar liegen erst wenige Berichte zum 3D-Druck von Tumormodellen vor, die nachfolgend beschriebene Studie von Zhao et al. belegt aber das Potenzial des Verfahrens.

Gebärmutterhalskrebs-Tumormodelle wurden durch 3D-Druck von HeLa-Zellen in Gelatine/Alginat/Fibrinogen-Hydrogele erhalten. Im Vergleich zu herkömmlichen ebenen Kulturmodellen vermehrten sich die HeLa-Zellen in den gedruckten 3D-Modellen stärker, und sie bildeten Zellsphäroide anstelle der einlagigen Zellschichten in 2D-Kulturen. HeLa-Zellen in gedruckten 3D-Modellen exprimierten auch mehr Matrix-Metalloprotease, und sie waren chemisch widerstandsfähiger als in 2D-Kulturen.^[185] Die 3D-Zelldrucktechniken und die neuen biologischen Charakteristika der entsprechenden Tumormodelle werden die Krebsforschung in Zukunft signifikant beeinflussen.

7. Ausblick

Der 3D-Biodruck von Gewebe- und Organmodellen ist ein lebhaftes Forschungsfeld, das in den vergangenen Jahren bahnbrechende Fortschritte verzeichnen konnte. Seine verschiedenen Techniken können die Entwicklung realistischer Gewebe- und Organmodelle voranbringen. Der Tintenstrahldruck wurde für zellbasierte Gentherapien verwendet; Zellen konnten mit Genen transfiziert werden, und die modifizierten Zellen wurden an einem definierten Zielpunkt abgelegt.^[186] In den nächsten Jahren sollte der 3D-Biodruck die Anforderungen spezifischer Anwendungen wie pharmakologischer und toxikologischer Screenings erfüllen. Der Biodruck kann neue Wege für Wirkstofftests öffnen und dadurch Kosten und Dauer des Entwicklungsprozesses verringern, weil Wirkstoffkandidaten und für menschliche Gewebe toxische Substanzen schneller identifiziert werden.

Die meisten Veröffentlichungen beschreiben Ergebnisse aus frühen Entwicklungsphasen der Gewebe- und Organmodelle. Nur in wenigen Studien wurden die Prozessparameter systematisch untersucht, um Vorhersagen zu treffen oder Optimierungsstrategien zu entwerfen. Für die erfolgreiche Anwendung von In-vitro-Gewebe- oder Organmodellen ist eine Standardisierung und Optimierung des Druckprozesses vonnöten, bei der auch die Qualitätsrichtlinien der Produktion („good manufacturing practice“, GMP) zu berücksichtigen sind. Daher ist es wichtig, den Zusam-

menhang zwischen Struktur und Funktion der gedruckten Konstrukte und den Prozessparametern aufzuklären. Moderne Herstellungsprozeduren werden zudem mithilfe von mathematischer Modellierung und Computersimulationen optimiert.^[184,187] Die Leistungsfähigkeit von Gewebekonstrukten kann vor dem Druckprozess mithilfe von Computersimulationen vorhergesagt, und dadurch auch verbessert werden. Dieser Ansatz muss für 3D-Gewebe- und -Organmodelle aber noch angepasst werden.

Stammzellen fällt beim Aufbau von 3D-Gewebemodellen eine große Bedeutung zu, da mit ihnen komplexe Konstrukte erhalten werden, wie von verschiedenen Gruppen nachgewiesen.^[95,184,188] Vor dem Einsatz von Stammzellen im 3D-Biodruck muss aber die Mikroumgebung der Zellen optimiert werden, um die Vorteile der In-vivo-Umgebung hinsichtlich mechanischer Stabilität, Zellanlagerung und -stimulation bestmöglich nachzustellen.^[189]

8. Schlussfolgerungen

Die Erforschung neuer Ansätze zur Erzeugung realistischer Gewebe- und Organmodelle durch 3D-Biodruck ist ein aktives Forschungsgebiet. Die beschriebenen Techniken stehen zwar noch am Anfang, sie haben aber ein großes Potenzial, um die vielen Herausforderungen zu meistern, und sie könnten nach und nach die aktuellen pharmakologischen und toxikologischen Assays ablösen, die oft ungenau, zeitaufwendig und personalabhängig sind und echte Gewebe oder Tiere benötigen. Vorher müssen aber Forscher aus verschiedenen Gebieten gemeinsam die Hindernisse überwinden, die der allgemeinen Akzeptanz der Technologie noch im Wege stehen.

Danksagung

Die vorgestellten Arbeiten wurden vom Europäischen Forschungsrat im Zuge des Siebten Rahmenprogramms der Europäischen Union (FP/2007-2013; ERC Grant Agreement No. 615458) unterstützt, sowie vom Swedish Research Council und dem KTH Center for Applied Proteomics (finanziert durch die Erling-Persson Family Foundation).

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 4650–4665
Angew. Chem. **2016**, 128, 4728–4743

- [1] A. Birgersdotter, R. Sandberg, I. Ernberg, *Semin. Cancer Biol.* **2005**, 15, 405–412.
- [2] E. Cukierman, R. Pankov, K. M. Yamada, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, 14, 633–640.
- [3] L. G. Griffith, M. A. Swartz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 211–224.
- [4] C. M. Nelson, M. J. Bissell, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**, 22, 287–309.
- [5] Z. A. Knight, K. M. Shokat, *Cell* **2007**, 128, 425–430.
- [6] T. Gura, *Science* **1997**, 278, 1041–1042.
- [7] „U.S. to develop chip that tests if a drug is toxic“: Reuters, 6. Oktober **2011**, <http://www.msnbc.msn.com/id/44554007/ns/health-health-care/-To5AMnPaix>.
- [8] J. Roix, S. Saha, *BMC Nephrol.* **2013**, 14, 233.
- [9] F. J. van der Staay, S. Arndt, R. Nordquist, *Behav. Brain Funct.* **2009**, 5, 11.
- [10] K. Kiebert, C. W. Olanow, *Mt. Sinai J. Med.* **2007**, 74, 7–14.
- [11] Z. Liu, K. Maas, T. M. Aune, *Clin. Immunol.* **2004**, 112, 225–230.
- [12] A. Rangarajan, S. J. Hong, A. Gifford, R. A. Weinberg, *Cancer Cell* **2004**, 6, 171–183.
- [13] M. H. V. V. Regenmortel, *EMBO Rep.* **2004**, 5, 1016–1020.
- [14] F. Pampaloni, E. G. Reynaud, E. H. K. Stelzer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 839–845.
- [15] R. Mroue, M. Bissell, in *Epithelial Cell Culture Protocols*, Vol. 945 (Hrsg.: S. H. Randell, M. L. Fulcher), Humana Press, Totowa, NJ, **2013**, S. 221–250.
- [16] T. Sato, H. Clevers, *Science* **2013**, 340, 1190–1194.
- [17] M. A. Lancaster, M. Renner, C.-A. Martin, D. Wenzel, L. S. Bicknell, M. E. Hurles, T. Homfray, J. M. Penninger, A. P. Jackson, J. A. Knoblich, *Nature* **2013**, 501, 373–379.
- [18] S. N. Bhatia, D. E. Ingber, *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 760–772.
- [19] T. Mammoto, A. Mammoto, D. E. Ingber, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2013**, 29, 27–61.
- [20] D. Ingber, *Ann. Med.* **2003**, 35, 564–577.
- [21] N. E. Fedorovich, J. R. De Wijn, A. J. Verbout, J. Alblas, W. J. Dhert, *Tissue Eng. Part A* **2008**, 14, 127–133.
- [22] B. Derby, *Science* **2012**, 338, 921–926.
- [23] J. E. Snyder, Q. Hamid, C. Wang, R. Chang, K. Emami, H. Wu, W. Sun, *Biofabrication* **2011**, 3, 034112.
- [24] T. M. Keenan, A. Folch, *Lab Chip* **2008**, 8, 34–57.
- [25] S. M. Kim, S. H. Lee, K. Y. Suh, *Lab Chip* **2008**, 8, 1015–1023.
- [26] I. Meyvantsson, J. W. Warrick, S. Hayes, A. Skoien, D. J. Beebe, *Lab Chip* **2008**, 8, 717–724.
- [27] H. Park, C. Cannizzaro, G. Vunjak-Novakovic, R. Langer, C. A. Vacanti, O. C. Farokhzad, *Tissue Eng.* **2007**, 13, 1867–1877.
- [28] W. Sun, P. Lal, *Comput. Methods Programs Biomed.* **2002**, 67, 85–103.
- [29] E. L. LeCluyse, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, 13, 343–368.
- [30] A. Sivaraman, J. K. Leach, S. Townsend, T. Iida, B. J. Hogan, D. B. Stolz, R. Fry, L. D. Samson, S. R. Tannenbaum, L. G. Griffith, *Curr. Drug Metab.* **2005**, 6, 569–591.
- [31] E. L. LeCluyse, P. L. Bullock, A. Parkinson, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, 22, 133–186.
- [32] S. Cai, X. Fu, Z. Sheng, *BioScience* **2007**, 57, 655–662.
- [33] J. T. Emerman, S. J. Burwen, D. R. Pitelka, *Tissue Cell* **1979**, 11, 109–119.
- [34] E. Y. Lee, W. H. Lee, C. S. Kaetzel, G. Parry, M. J. Bissell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 1419–1423.
- [35] C. H. Streuli, M. J. Bissell, *J. Cell Biol.* **1990**, 110, 1405–1415.
- [36] O. W. Petersen, L. Rønnow-Jessen, A. R. Howlett, M. J. Bissell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 9064–9068.
- [37] J. C. Dunn, M. L. Yarmush, H. G. Koebe, R. G. Tompkins, *FASEB J.* **1989**, 3, 174–177.
- [38] K. Mathijs, A. S. Kienhuis, K. J. J. Brauers, D. G. J. Jennen, A. Lahoz, J. C. S. Kleinjans, J. H. M. van Delft, *Drug Metab. Dispos.* **2009**, 37, 1305–1311.
- [39] L. G. Griffith, B. E. N. Wu, M. J. Cima, M. J. Powers, B. Chaignaud, J. P. Vacanti, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1997**, 831, 382–397.
- [40] L. Kimlin, J. Kassis, V. Virador, *Expert Opin. Drug Discovery* **2013**, 8, 1455–1466.
- [41] P. M. Baptista, M. M. Siddiqui, G. Lozier, S. R. Rodriguez, A. Atala, S. Soker, *Hepatology* **2011**, 53, 604–617.
- [42] J. Lee, G. D. Lilly, R. C. Doty, P. Podsiadlo, N. A. Kotov, *Small* **2009**, 5, 1213–1221.
- [43] C. Guguen-Guillouzo, A. Guillouzo, in *Hepatocytes*, Vol. 640 (Hrsg.: P. Maurel), Humana Press, Totowa, NJ, **2010**, S. 1–40.
- [44] S. Kaihara, S. Kim, B.-S. Kim, D. J. Mooney, K. Tanaka, J. P. Vacanti, *J. Pediatr. Surg.* **2000**, 35, 1287–1290.

- [45] A. J. Hwa, R. C. Fry, A. Sivaraman, P. T. So, L. D. Samson, D. B. Stolz, L. G. Griffith, *FASEB J.* **2007**, *21*, 2564–2579.
- [46] K. Domansky, W. Inman, J. Serdy, A. Dash, M. H. M. Lim, L. G. Griffith, *Lab Chip* **2010**, *10*, 51–58.
- [47] A. Dash, W. Inman, K. Hoffmaster, S. Sevidal, J. Kelly, R. S. Obach, L. G. Griffith, S. R. Tannenbaum, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2009**, *5*, 1159–1174.
- [48] N. T. Elliott, F. Yuan, *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 59–74.
- [49] A. Y. Hsiao, Y.-s. Torisawa, Y.-C. Tung, S. Sud, R. S. Taichman, K. J. Pienta, S. Takayama, *Biomaterials* **2009**, *30*, 3020–3027.
- [50] A. P. Wong, R. Perez-Castillejos, J. Christopher Love, G. M. Whitesides, *Biomaterials* **2008**, *29*, 1853–1861.
- [51] P. J. Lee, T. A. Gaige, N. Ghorashian, P. J. Hung, *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 946–951.
- [52] A. Tourovskaia, X. Figueroa-Masot, A. Folch, *Lab Chip* **2005**, *5*, 14–19.
- [53] E. W. Esch, A. Bahinski, D. Huh, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14*, 248–260.
- [54] M.-C. Shih, S.-H. Tseng, Y.-S. Weng, I. M. Chu, C.-H. Liu, *Biomed. Microdevices* **2013**, *15*, 767–780.
- [55] F. P. W. Melchels, M. A. N. Domingos, T. J. Klein, J. Malda, P. J. Bartolo, D. W. Huttmacher, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 1079–1104.
- [56] V. Mironov, G. Prestwich, G. Forgacs, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2054–2060.
- [57] V. Mironov, N. Reis, B. Derby, *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 631–634.
- [58] M. Nakamura, S. Iwanaga, C. Henmi, K. Arai, Y. Nishiyama, *Biofabrication* **2010**, *2*, 014110.
- [59] V. Mironov, R. R. Markwald, G. Forgacs, *Sci. Med.* **2003**, *9*, 69–71.
- [60] M. G. Li, X. Y. Tian, X. B. Chen, *Biofabrication* **2009**, *1*, 032001.
- [61] X. Wang, Y. Yan, R. Zhang, *Tissue Eng. Part B* **2010**, *16*, 189–197.
- [62] S. V. Murphy, A. Atala, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 773–785.
- [63] V. Mironov, R. P. Visconti, V. Kasyanov, G. Forgacs, C. J. Drake, R. R. Markwald, *Biomaterials* **2009**, *30*, 2164–2174.
- [64] T. S. Little, V. Mironov, A. Nagy Mehesz, R. Markwald, Y. Sugi, S. M. Lessner, M. A. Sutton, X. Liu, Q. Wang, X. Yang, J. O. Blancette, M. Skiles, *Biofabrication* **2011**, *3*, 030202.
- [65] V. Mironov, V. Kasyanov, R. R. Markwald, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 667–673.
- [66] N. E. Fedorovich, J. Alblas, W. E. Hennink, F. C. Oner, W. J. Dhert, *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 601–606.
- [67] S. Catros, J. C. Fricain, B. Guillotin, B. Pippenger, R. Bareille, M. Remy, E. Lebraud, B. Desbat, J. Amedee, F. Guillemot, *Biofabrication* **2011**, *3*, 025001.
- [68] M. Gruene, C. Unger, L. Koch, A. Deiwick, B. Chichkov, *Biomed. Eng. Online* **2011**, *10*, 19.
- [69] B. Guillotin, A. Souquet, S. Catros, M. Duocastella, B. Pippenger, S. Bellance, R. Bareille, M. Remy, L. Bordenave, J. Amedee, F. Guillemot, *Biomaterials* **2010**, *31*, 7250–7256.
- [70] L. Koch, A. Deiwick, S. Schlie, S. Michael, M. Gruene, V. Coger, D. Zychlinski, A. Schambach, K. Reimers, P. M. Vogt, B. Chichkov, *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 1855–1863.
- [71] M. Gruene, M. Pflaum, A. Deiwick, L. Koch, S. Schlie, C. Unger, M. Wilhelm, A. Haverich, B. N. Chichkov, *Biofabrication* **2011**, *3*, 015005.
- [72] T. Boland, T. Xu, B. Damon, X. Cui, *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 910–917.
- [73] B. R. Ringeisen, C. M. Othon, J. A. Barron, D. Young, B. J. Spargo, *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 930–948.
- [74] Q. Zheng, J. Lu, H. Chen, L. Huang, J. Cai, Z. Xu, *Anal. Biochem.* **2011**, *410*, 171–176.
- [75] E. D. Miller, J. A. Phillippi, G. W. Fisher, P. G. Campbell, L. M. Walker, L. E. Weiss, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2009**, *12*, 604–618.
- [76] S. Ilkhanizadeh, A. I. Teixeira, O. Hermanson, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3936–3943.
- [77] E. D. Miller, G. W. Fisher, L. E. Weiss, L. M. Walker, P. G. Campbell, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2213–2221.
- [78] E. A. Roth, T. Xu, M. Das, C. Gregory, J. J. Hickman, T. Boland, *Biomaterials* **2004**, *25*, 3707–3715.
- [79] T. Xu, J. Jin, C. Gregory, J. J. Hickman, T. Boland, *Biomaterials* **2005**, *26*, 93–99.
- [80] M. E. Pepper, C. A. Parzel, T. Burg, T. Boland, K. J. Burg, R. E. Groff, *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, **2009**, 6001–6005.
- [81] M. E. Pepper, C. A. Cass, J. P. Mattimore, T. Burg, B. W. Booth, K. J. Burg, R. E. Groff, *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, **2010**, 259–262.
- [82] Y. Nishiyama, M. Nakamura, C. Henmi, K. Yamaguchi, S. Mochizuki, H. Nakagawa, K. Takiura, *J. Biomech. Eng.* **2009**, *131*, 035001.
- [83] K. W. Binder, W. Zhao, T. Aboushwareb, D. Dice, A. Atala, J. J. Yoo, *J. Am. Coll. Surg.*, **2010**, *211*, S76.
- [84] A. Tirella, F. Vozzi, C. De Maria, G. Vozzi, T. Sandri, D. Sassano, L. Cognolato, A. Ahluwalia, *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *112*, 79–85.
- [85] S. Parsa, M. Gupta, F. Loizeau, K. C. Cheung, *Biofabrication* **2010**, *2*, 025003.
- [86] J. Malda, J. Visser, F. P. Melchels, T. Jüngst, W. E. Hennink, W. J. A. Dhert, J. Groll, D. W. Huttmacher, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5011–5028.
- [87] K. Jakab, C. Norotte, F. Marga, K. Murphy, G. Vunjak-Novakovic, G. Forgacs, *Biofabrication* **2010**, *2*, 022001.
- [88] N. E. Fedorovich, I. Swennen, J. Girones, L. Moroni, C. A. van Blitterswijk, E. Schacht, J. Alblas, W. J. A. Dhert, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1689–1696.
- [89] L. Pescosolido, W. Schuurman, J. Malda, P. Matricardi, F. Alhaque, T. Coviello, P. R. van Weeren, W. J. A. Dhert, W. E. Hennink, T. Vermonden, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1831–1838.
- [90] A. Skardal, J. Zhang, L. McCoard, X. Xu, S. Oottamasathien, G. D. Prestwich, *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 2675–2685.
- [91] K. Buyukhatipoglu, W. Jo, W. Sun, A. M. Clyne, *Biofabrication* **2009**, *1*, 035003.
- [92] J. H. Shim, J. Y. Kim, M. Park, J. Park, D. W. Cho, *Biofabrication* **2011**, *3*, 034102.
- [93] C. Norotte, F. S. Marga, L. E. Niklason, G. Forgacs, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5910–5917.
- [94] D. E. Ingber, V. C. Mow, D. Butler, L. Niklason, J. Huard, J. Mao, I. Yannas, D. Kaplan, G. Vunjak-Novakovic, *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 3265.
- [95] J. W. Nichol, A. Khademhosseini, *Soft Matter* **2009**, *5*, 1312–1319.
- [96] V. Mironov, T. Boland, T. Trusk, G. Forgacs, R. R. Markwald, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 157–161.
- [97] N. E. Fedorovich, J. Alblas, J. R. d. Wijn, W. E. Hennink, A. J. Verbout, W. J. A. Dhert, *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 1905–1925.
- [98] P. X. Ma, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 184–198.
- [99] F. Rosso, A. Giordano, M. Barbarisi, A. Barbarisi, *J. Cell. Physiol.* **2004**, *199*, 174–180.
- [100] J.-H. Shim, J.-S. Lee, J. Y. Kim, D.-W. Cho, *J. Micromech. Microeng.* **2012**, *22*, 085014.
- [101] J.-H. Shim, J.-B. Huh, J. Y. Park, Y.-C. Jeon, S. S. Kang, J. Y. Kim, J.-W. Rhie, D.-W. Cho, *Tissue Eng. Part A* **2013**, *19*, 317–327.
- [102] L. Shor, S. Güçeri, R. Chang, J. Gordon, Q. Kang, L. Hartsock, Y. An, W. Sun, *Biofabrication* **2009**, *1*, 015003.
- [103] M. Domingos, F. Intrantuovo, A. Gloria, R. Gristina, L. Ambrosio, P. J. Bártolo, P. Favia, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5997–6005.

- [104] M. O. Wang, C. E. Vorwald, M. L. Dreher, E. J. Mott, M.-H. Cheng, A. Cinar, H. Mehdizadeh, S. Somo, D. Dean, E. M. Brey, J. P. Fisher, *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 138–144.
- [105] D. Kaigler, E. Silva, D. Mooney, *J. Periodontol.* **2013**, *84*, 230–238.
- [106] S. Wüst, M. E. Godla, R. Müller, S. Hofmann, *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 630–640.
- [107] N. E. Fedorovich, E. Kuipers, D. Gawlitta, W. J. A. Dhert, J. Alblas, *Tissue Eng. A* **2011**, *17*, 2473–2486.
- [108] N. E. Fedorovich, W. Schuurman, H. M. Wijnberg, H. J. Prins, P. R. van Weeren, J. Malda, J. Alblas, W. J. Dhert, *Tissue Eng. Part C* **2012**, *18*, 33–44.
- [109] J. W. Nichol, S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar, A. Khademhosseini, *Biomaterials* **2010**, *31*, 5536–5544.
- [110] F. Pati, J. Jang, D.-H. Ha, S. W. Kim, J.-W. Rhie, J.-H. Shim, D.-H. Kim, D.-W. Cho, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3935.
- [111] X. Wang, Y. Yan, Y. Pan, Z. Xiong, H. Liu, J. Cheng, F. Liu, F. Lin, R. Wu, R. Zhang, Q. Lu, *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 83–90.
- [112] R. Chang, J. Nam, W. Sun, *Tissue Eng. Part A* **2008**, *14*, 41–48.
- [113] Y. Yan, X. Wang, Z. Xiong, H. Liu, F. Liu, F. Lin, R. Wu, R. Zhang, Q. Lu, *J. Bioact. Compat. Polym.* **2005**, *20*, 259–269.
- [114] W. Xu, X. Wang, Y. Yan, W. Zheng, Z. Xiong, F. Lin, R. Wu, R. Zhang, *J. Bioact. Compat. Polym.* **2007**, *22*, 363–377.
- [115] 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*, 233–246.
- [116] R. Devillard, E. Pagès, M. M. Correa, V. Kériquel, M. Rémy, J. Kalisky, M. Ali, B. Guilletot, F. Guillemot in *Methods in Cell Biology*, Vol. 119 (Hrsg.: P. Matthieu, T. Manuel), Academic Press, **2014**, S. 159–174.
- [117] P. Zorlutuna, J. H. Jeong, H. Kong, R. Bashir, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 3597–3597.
- [118] B. Derby, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 5717–5721.
- [119] S. C. Owen, M. S. Shoichet, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, *94*, 1321–1331.
- [120] S. Liao, C. K. Chan, S. Ramakrishna, *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, *28*, 1189–1202.
- [121] K. Lee, E. A. Silva, D. J. Mooney, *J. R. Soc. Interface* **2011**, *8*, 153–170.
- [122] M. A. Swartz, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 547–550.
- [123] T. L. Sellaro, A. Ranade, D. M. Faulk, G. P. McCabe, K. Dorko, S. F. Badylak, S. C. Strom, *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16*, 1075–1082.
- [124] T. H. Petersen, E. A. Calle, L. Zhao, E. J. Lee, L. Gui, M. B. Raredon, K. Gavrilov, T. Yi, Z. W. Zhuang, C. Breuer, E. Herzog, L. E. Niklason, *Science* **2010**, *329*, 538–541.
- [125] B. E. Uygün, A. Soto-Gutierrez, H. Yagi, M.-L. Izamis, M. A. Guzzardi, C. Shulman, J. Milwid, N. Kobayashi, A. Tilles, F. Berthiaume, M. Hertl, Y. Nahmias, M. L. Yarmush, K. Uygün, *Nat. Med.* **2010**, *16*, 814–821.
- [126] F. Pati, D.-H. Ha, J. Jang, H. H. Han, J.-W. Rhie, D.-W. Cho, *Biomaterials* **2015**, *62*, 164–175.
- [127] L. Vivian, S. Gurte, T. J. P. B. Chris, X. Xiawei, T. T. Nga, Y. Seung-Schik, D. Guohao, K. Pankaj, *Tissue Eng. Part C* **2014**, *20*, 473–484.
- [128] S. Michael, H. Sorg, C.-T. Peck, L. Koch, A. Deiwick, B. Chichkov, P. M. Vogt, K. Reimers, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57741.
- [129] L. Koch, S. Kuhn, H. Sorg, M. Gruene, S. Schlie, R. Gaebel, B. Polchow, K. Reimers, S. Stoelting, N. Ma, P. M. Vogt, G. Steinhoff, B. Chichkov, *Tissue Eng. Part C* **2010**, *16*, 847–854.
- [130] K. Schmidt-Nielsen, *J. Exp. Zoo.* **1975**, *194*, 287–307.
- [131] A. Skardal, J. Zhang, G. D. Prestwich, *Biomaterials* **2010**, *31*, 6173–6181.
- [132] D. B. Kolesky, R. L. Truby, A. S. Gladman, T. A. Busbee, K. A. Homan, J. A. Lewis, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3124–3130.
- [133] J. S. Miller, K. R. Stevens, M. T. Yang, B. M. Baker, D.-H. T. Nguyen, D. M. Cohen, E. Toro, A. A. Chen, P. A. Galie, X. Yu, R. Chaturvedi, S. N. Bhatia, C. S. Chen, *Nat. Mater.* **2012**, *11*, 768–774.
- [134] X. Cui, T. Boland, *Biomaterials* **2009**, *30*, 6221–6227.
- [135] C. Khatiwala, R. Law, B. Shepherd, S. Dorfman, M. Csete, *Gene Ther. Regul.* **2012**, *07*, 1230004.
- [136] J. B. Robbins, V. Gorgen, P. Min, B. R. Shepherd, S. C. Presnell, *FASEB J.* **2013**, *27*, 872.12.
- [137] R. Chang, K. Emami, H. Wu, W. Sun, *Biofabrication* **2010**, *2*, 045004.
- [138] G. Gao, T. Yonezawa, K. Hubbell, G. Dai, X. Cui, *Biotechnol. J.* **2015**, *10*, 1568–1577.
- [139] D. F. Duarte Campos, A. Blaesser, A. Korsten, S. Neuss, J. Jäkel, M. Vogt, H. Fischer, *Tissue Eng. Part A* **2015**, *21*, 740–756.
- [140] L. A. Hockaday, K. H. Kang, N. W. Colangelo, P. Y. C. Cheung, B. Duan, E. Malone, J. Wu, L. N. Girardi, L. J. Bonassar, H. Lipson, C. C. Chu, J. T. Butcher, *Biofabrication* **2012**, *4*, 035005.
- [141] R. Gaetani, P. A. Doevendans, C. H. G. Metz, J. Alblas, E. Messina, A. Giacomello, J. P. G. Sluijter, *Biomaterials* **2012**, *33*, 1782–1790.
- [142] P. Xie, Z. Hu, X. Zhang, X. Li, Z. Gao, D. Yuan, Q. Liu, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109373.
- [143] M. Mirazul Islam, V. Cèpla, C. He, J. Edin, T. Rakickas, K. Kobuch, Ž. Ruželč, W. Bruce Jackson, M. Rafat, C. P. Lohmann, R. Valiokas, M. Griffiths, *Acta Biomater.* **2015**, *12*, 70–80.
- [144] M. S. Mannoor, Z. Jiang, T. James, Y. L. Kong, K. A. Malatesta, W. O. Soboyejo, N. Verma, D. H. Gracias, M. C. McAlpine, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 2634–2639.
- [145] J.-S. Lee, J. M. Hong, J. W. Jung, J.-H. Shim, J.-H. Oh, D.-W. Cho, *Biofabrication* **2014**, *6*, 024103.
- [146] F. Pati, J.-H. Shim, J.-S. Lee, D.-W. Cho, *Manuf. Lett.* **2013**, *1*, 49–53.
- [147] Y. Rui, Z. Renji, Y. Yongnian, W. Xiaohong, *J. Bioact. Compat. Polym.* **2009**, *24*, 5–24.
- [148] M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan, in *Biotechnology Annual Review*, Vol. 11 (Hrsg.: M. R. El-Gewely), Elsevier, Amsterdam, **2005**, S. 127–152.
- [149] L. Crigler, A. Kazhanie, T.-J. Yoon, J. Zakhari, J. Anders, B. Taylor, V. M. Virador, *FASEB J.* **2007**, *21*, 2050–2063.
- [150] A. Astashkina, B. Mann, D. W. Grainger, *Pharmacol. Ther.* **2012**, *134*, 82–106.
- [151] N. Arya, V. Sardana, M. Saxena, A. Rangarajan, D. S. Katti, *J. R. Soc. Interface* **2012**, *9*, 3288–3302.
- [152] L. Huyck, C. Ampe, M. Van Troys, *Assay Drug Dev. Technol.* **2012**, *10*, 382–392.
- [153] H. Fatakdawala, L. G. Griffiths, S. Humphrey, L. Marcu, *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19*, 080503.
- [154] C. Idleburg, E. DeLassus, D. Novack, in *Osteoporosis and Osteoarthritis*, Vol. 1226 (Hrsg.: J. J. Westendorf, A. J. van Wijnen), Springer, New York, **2015**, S. 87–95.
- [155] M. Uhlén, L. Fagerberg, B. M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A.-K. Szegedy, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, F. Pontén, *Science* **2015**, *347*, 394.
- [156] V. Gautam, A. Sarkar, *Mol. Biotechnol.* **2015**, *57*, 299–308.
- [157] P. Pinzani, C. Orlando, M. Pazzagli, *Mol. Aspects Med.* **2006**, *27*, 140–159.
- [158] A. Kriete, K. Boyce, *Methods Inf. Med.* **2005**, *44*, 32–37.
- [159] Z. Ting, Y. Karen Chang, O. Liliang, S. Wei, *Biofabrication* **2013**, *5*, 045010.
- [160] R. Hannivoort, V. Hernandez-Gea, S. Friedman, *Fibrog. Tissue Repair* **2012**, *5*, 1.

- [161] G. Chen, T. G. Gharib, C.-C. Huang, J. M. G. Taylor, D. E. Misek, S. L. R. Kardina, T. J. Giordano, M. D. Iannetoni, M. B. Orringer, S. M. Hanash, D. G. Beer, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 304–313.
- [162] Q. Tian, S. B. Stepaniants, M. Mao, L. Weng, M. C. Feetham, M. J. Doyle, E. C. Yi, H. Dai, V. Thorsson, J. Eng, D. Goodlett, J. P. Berger, B. Gunter, P. S. Linseley, R. B. Stoughton, R. Aebersold, S. J. Collins, W. A. Hanlon, L. E. Hood, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 960–969.
- [163] J. B. Kim, *Semin. Cancer Biol.* **2005**, *15*, 365–377.
- [164] K. Kim, K. Ohashi, R. Utoh, K. Kano, T. Okano, *Biomaterials* **2012**, *33*, 1406–1413.
- [165] A. I. Astashkina, B. K. Mann, G. D. Prestwich, D. W. Grainger, *Biomaterials* **2012**, *33*, 4700–4711.
- [166] V. Y. Soldatow, E. L. LeCluyse, L. G. Griffith, I. Rusyn, *Toxicol. Res.* **2013**, *2*, 23–39.
- [167] L. E. O'Brien, W. Yu, K. Tang, T. S. Jou, M. M. P. Zegers, K. E. Mostov, in *Methods in Enzymology*, Vol. 406 (Hrsg.: W. Balch, C. Der, A. Hall), Academic Press, San Diego, **2006**, S. 676–691.
- [168] E. Hadjipanayi, V. Mudera, R. A. Brown, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2009**, *3*, 77–84.
- [169] A. J. Engler, H. L. Sweeney, D. E. Discher, J. E. Schwarzbauer, *J. Musculoskeletal Neuronal Interact.* **2007**, *7*, 335.
- [170] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell* **2006**, *126*, 677–689.
- [171] D. L. Butler, S. A. Goldstein, F. Guilak, *J. Biomech. Eng.* **2000**, *122*, 570–575.
- [172] B. L. Seal, T. C. Otero, A. Panitch, *Mater. Sci. Eng. R* **2001**, *34*, 147–230.
- [173] W. Xu, R. Mezenzev, B. Kim, L. Wang, J. McDonald, T. Sulchek, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46609.
- [174] K. M. Yamada, E. Cukierman, *Cell* **2007**, *130*, 601–610.
- [175] R. S. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Biomaterials* **1999**, *20*, 2363–2376.
- [176] R. Chang, J. Nam, W. Sun, *Tissue Eng. Part C* **2008**, *14*, 157–166.
- [177] Organovo, **2014**.
- [178] J. A. Kim, H. N. Kim, S.-K. Im, S. Chung, J. Y. Kang, N. Choi, *Biomicrofluidics* **2015**, *9*, 024115.
- [179] J. A. Magida, L. A. Leinwand, *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 482–495.
- [180] J. Thundyil, D. Pavlovski, C. G. Sobey, T. V. Arumugam, *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 313–327.
- [181] M. A. Jordan, R. J. Toso, D. Thrower, L. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9552–9556.
- [182] C. Ellingsen, I. Natvig, J.-V. Gaustad, K. Gulliksrud, T. M. Egeland, E. Rofstad, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2009**, *135*, 1177–1184.
- [183] M. J. Bissell, D. Radisky, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 46–54.
- [184] V. Mironov, T. Trusk, V. Kasyanov, S. Little, R. Swaja, R. Markwald, *Biofabrication* **2009**, *1*, 022001.
- [185] Y. Zhao, R. Yao, L. Ouyang, H. Ding, T. Zhang, K. Zhang, S. Cheng, W. Sun, *Biofabrication* **2014**, *6*, 035001.
- [186] T. Xu, J. Rohozinski, W. Zhao, E. C. Moorefield, A. Atala, J. J. Yoo, *Tissue Eng. Part A* **2009**, *15*, 95–101.
- [187] F. Guillemot, V. Mironov, M. Nakamura, *Biofabrication* **2010**, *2*, 010201.
- [188] F. Marga, K. Jakab, C. Khatiwala, B. Shepherd, S. Dorfman, B. Hubbard, S. Colbert, G. Forgacs, *Biofabrication* **2012**, *4*, 022001.
- [189] S. Wüst, R. Müller, S. Hofmann, *J. Funct. Biomater.* **2011**, *2*, 119–154.

Eingegangen am 3. Juni 2015

Online veröffentlicht am 19. Februar 2016

Übersetzt von Dr. Volker Jacob, Hirschberg an der Bergstraße