

---

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und  
Wiederherstellungschirurgie (Chirurgische Klinik II)

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. R. Meffert

**Tissue Engineering von Fettgewebe:  
Immunohistochemische und histologische Analyse  
der Entwicklung der Extrazellulärmatrix und der Adipogenese  
in 3D Gewebekonstrukten *in vivo***

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Zahnmedizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Tanja Veronika Stebani

aus Kaufbeuren

Würzburg, Dezember 2019

---

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Marco Metzger

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.09.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Tissue Engineering und Regenerative Medizin	1
1.2	Fettgewebe als Weichgewebeersatz	2
1.2.1	Indikationen für die Nutzung von Weichgewebe in der Geweberekonstruktion	2
1.2.2	Heutige Behandlungsmethoden zur Behebung von Weichteildefekten	3
1.2.3	Einsatz von Methoden des Tissue Engineerings für die Züchtung von Fettgewebe	4
1.2.4	Entstehung und Struktur des Fettgewebes	7
1.2.5	Entwicklung der extrazellulären Matrix bei der Adipogenese	9
1.2.6	Relevanz einer geeigneten Vorkultivierung für eine erfolgreiche Zellvermehrung und Gewebezüchtung, Beschreibung der Vorarbeiten	11
1.3	Zielsetzung der Arbeit	12
<b>2.</b>	<b>Geräte, Instrumente, Materialien und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Geräte, Instrumente und Materialien	14
2.1.1	Geräte und Instrumente	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.3	Chemikalien und Pufferlösungen	15
2.1.4	Antikörper und Enzyme	15

2.1.5	Software und Bearbeitungsprogramme	16
2.1.6	Verwendete Gewebeproben	16
2.1.6.1	Herkunft der Proben	16
2.1.6.2	Vorkultivierung der Proben	17
2.2	Methoden	19
2.2.1	Histologische Untersuchung der Proben	19
2.2.1.1	Hämalaun-Eosin (HE) Färbung auf Paraffinschnitten	19
2.2.2	Immunohistochemische Auswertung wichtiger Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM)	21
2.2.2.1	EZM-Antikörperfärbung auf Paraffinschnitten mit Pepsin-Verdau	21
2.2.2.2	Fluoreszenz-Mikroskopie	23
2.2.3	Mikroskopische Untersuchung der HE-gefärbten Paraffinschnitte	24
2.2.4	Histomorphometrie	25
2.2.5	Statistische Auswertung	28
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Ergebnisse der Hämalaun-Eosin (HE) Anfärbung	30
3.2	Histomorphometrie der Gewebeproben, Analyse der Bildung von reifen Adipozyten	34
3.3	Immunohistochemische Analyse der entstandenen Bestandteile der extrazellulären Matrix EZM bei der Adipogenese	40
3.3.1	Ausbildung von Kollagen I	40
3.3.2	Ausbildung von Kollagen IV	41
3.3.3	Ausbildung von Kollagen VI	43

3.3.4	Ausbildung von Laminin	45
3.4	Darstellung der Fettgewebeentwicklung exemplarisch an Gruppe 4	46
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse für Woche 24 der Gruppen 1-4	49
<b>4.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>55</b>
4.1	Diskussion der Methodik	56
4.2	Diskussion der Ergebnisse der HE-Anfärbungen	57
4.3	Diskussion der Resultate der histomorphometrischen Analyse	58
4.4	Diskussion der Ergebnisse der immunohistochemischen Untersuchungen	60
4.5	Übergreifende Diskussion der Resultate für die Gruppen 1-4	65
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung, Fazit und Ausblick</b>	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>88</b>

**Danksagung**

**Curriculum Vitae**

## Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
3T3-L1	Adipozyten Zell-Linie der Maus 86052701
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance
ASC	Adipose derived Stem Cells
BMSC	Bone Marrow derived Stem Cells
BSA	Bovine Serum Albumin
ca.	Circa
Col	Collagen
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert
ECM	Extracellular matrix
EZM	Extrazelluläre Matrix
HE	Hämalaun Eosin
MIA	Multiple Image Alignment
min	Minute/n
MIT	Massachusetts Institute of Technology
ms	Millisekunden
PBS	Phosphate Buffer Saline

## Abkürzungsverzeichnis

---

PLGA	Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)
PLA	Poly(Lactic Acid)
Tab.	Tabelle
TE	Tissue Engineering
TRITC	Tetramethylrhodamine isothiocyanate
W	Woche

# 1. Einleitung

## 1.1. Tissue Engineering und Regenerative Medizin

Das sogenannte „Tissue Engineering“, also die gezielte Konstruktion und Züchtung eines natürlichen biologischen Gewebes durch geeignete Methoden der Zellentnahme und Vermehrung, ist ein interdisziplinäres Feld, das die Methoden und Prinzipien von Ingenieurwissenschaften, Naturwissenschaften und Medizin kombiniert, um menschliches Gewebe in Form und Funktion wiederherstellen zu können [1, 2, 3, 4]. Dieses Fachgebiet wurde u. a. durch die Arbeiten von Robert Langer, eines Chemie-Ingenieurs am Massachusetts Institute of Technology (MIT) und Dr. Joseph Vacanti vom Boston's Children Hospital bekannt [5, 6]. Im Wesentlichen geht es bei dieser Methodik um die Erzeugung von biologisch aktivem Gewebe, indem aus einer Patientenbiopsie autologe Zellen isoliert, kultiviert, die vermehrten Zellen dann gegebenenfalls unter Einsatz eines Zellträgers („Scaffold“) in eine dreidimensionale Form gebracht werden und mittels Wachstumsfaktoren und mechanischer Reize letztlich ein klinisch nutzbares Implantat resultiert (Abb. 1).

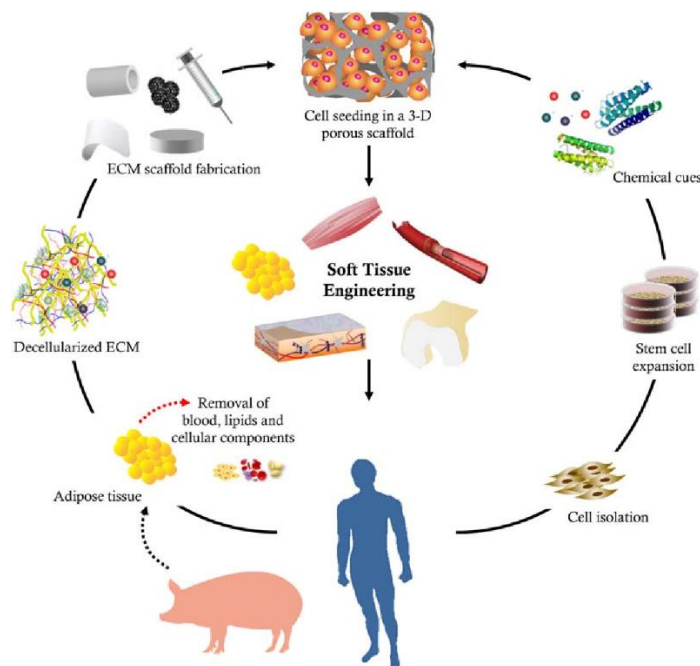


Abb. 1: Prozessablauf des Tissue Engineerings [7], Erlaubnis für Bildnutzung von Verlag Springer Nature erteilt



Das Arbeitsfeld des Tissue Engineerings gelangte insbesondere in das Bewusstsein der breiten Öffentlichkeit durch das Bild einer Maus mit einem implantierten „menschlichen Ohr“ auf ihrem Rücken („Vacanti-Maus, [8]). Wegen ihres Potenzials zur Erzeugung von menschlichem Gewebe zur Heilung von Gewebedefekten ist diese neue Fachdisziplin wohl eine der aussichtsreichsten medizinischen Technologien des 21. Jahrhunderts.

Dies ist möglich geworden, da in vielen Fachrichtungen innovative Verfahren und Prozesse, wie neue bildgebende Technologien [9], Mikrochirurgie oder Nanotechnologie [10, 11] oder auch Methoden des 3D Druckens [12, 13, 14, 15] entwickelt und eingesetzt werden. Der Einsatz derartiger neuer Technologien in der Geweberegeneration kann diesem Gebiet einen erheblichen Innovationsschub geben und bisherige Probleme beim Gewebeersatz in der wiederherstellenden Chirurgie vermeiden.

Diese Fachdisziplin in der Medizin, bei der es um die Rekonstruktion von verlorenem Gewebe geht, auch Regenerative Medizin genannt, ist weniger exakt definiert als das Tissue Engineering. Meist wird unter diesem Begriff der Einsatz von Stammzellen zur Züchtung von neuem Gewebe verstanden [17]. In einer statistischen Auswertung der wissenschaftlichen Veröffentlichungen zu den Gebieten Tissue Engineering und Regenerative Medizin nach klinischer Anwendung und verwendeter Gewebetypen zeigt sich das stark steigende Interesse in der Wissenschaft an diesen Fachdisziplinen [18].

## **1.2. Fettgewebe als Weichgewebeersatz**

### **1.2.1. Indikationen für die Nutzung von Weichgewebe in der Gewebe-Rekonstruktion**

Eine ganze Reihe von erworbenen oder angeborenen Gewebedefekten gehen einher mit dem Verlust oder Fehlen von „Füllstrukturen“ an Weichgewebe, wie beispielsweise bei Tumor-Operationen [16]. Aber nicht nur in Tumor-Resektionen, sondern auch im Falle von Brust-Rekonstruktionen, bei komplexen Unfallverletzungen und traumatischen Wunden, beispielsweise nach Verbrennungen, oder zur Behandlung von chronischen Wunden und zur

Behebung von angeborenen Fehlbildungen, besteht ein zunehmender Bedarf an körpereigenem Weichteilersatz [20].

### **1.2.2. Heutige Behandlungsmethoden zur Behebung von Weichteildefekten**

Bereits in frühen Arbeiten der neuzeitlichen Chirurgie wurden Versuche zur Heilung von Gewebedefekten beschrieben. Erste Versuche Weichteilgewebe (körpereigenes Fettgewebe) zu verpflanzen wurden bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts unternommen. 1893 stellte Neuber bei dem Versuch der Transplantation von Fettgewebe fest, dass die Überlebensrate des Transplantats von dessen Größe abhängt [21]. Nur kleine Transplantate überlebten die Verpflanzung. Insgesamt zeigten auch spätere Versuche, dass die Gewebe meist abgebaut und durch fibröses Gewebe ersetzt wurden, da die Fettzellen an der neuen Position nicht ausreichend versorgt werden konnten [22].

Aktuelle Therapien zur Heilung von Weichteildefekten sowie das Auffüllen von Gewebevolumen zur Behebung von funktionellen oder ästhetischen äußeren Defiziten basieren meist auf körpereigenen Transplantationen von Fettgewebe um Abstoßungs- oder Immunreaktionen zu minimieren [23]. Die verwendeten Gewebe sind meist lokale, freie Lappenplastiken, dermales Fettgewebe oder freie adipöse Gewebetransplantate [24].

Die Möglichkeiten der Entnahme von patienteneigenem Fettgewebe und der Transplantation an die Defektstelle sind allerdings auch heute noch nur eingeschränkt möglich. Dies ist einerseits begründet in den mit der Gewebeentnahme oft verbundenen Hebedefekten, wobei an der Entnahmestelle funktionelle Defizite resultieren können, die dann zu Folgeoperationen führen können [25]. Bei der Verwendung autogener Lappenplastiken besteht stets das Risiko einer Komplikation an der Gefäßanastomose, von Hämatomen oder Infektionen und in der Folge dann eben von weiteren Operationen und von ästhetischen Beeinträchtigungen [20].

Eine weitere Methode unter Einsatz von autogenem Gewebe ist die Fettgewebsaugmentation, bei der das Gewebe durch Fettabsaugung gewonnen wird. Auch hier zeigt sich in klinischen Studien, dass die mechanische Schädigung der Zellen bei der Entnahme danach in der Folge einen Verlust von Gewebemasse nach sich zieht [26], so dass in der Konsequenz wiederholte Injektionen notwendig werden können, um zufriedenstellende Resultate zu ermöglichen [22, 27]. Die Komplikationen verstärken sich zudem, wenn größere Gewebedefekte durch autologes Material gefüllt werden müssen, da durch die ungenügende Re-Vaskularisierung des neuen Gewebes im Laufe der Zeit eine Gewebe-Resorption stattfindet [28, 26]. Daher nutzen moderne Methoden Fettgewebe mit mikrochirurgisch angebundenen Blutgefäßen. Insgesamt sind allerdings alle bislang eingesetzten Verfahren zur Heilung von Gewebedefekten aufwändig und somit kostspielig [29, 30, 31]. Insgesamt besteht daher ein bedeutender klinischer Bedarf hinsichtlich verbesserter chirurgischer Möglichkeiten Weichteilgewebe ersetzen zu können [32, 33, 34].

### **1.2.3. Einsatz von Methoden des Tissue Engineerings für die Züchtung von Fettgewebe**

Die vielfältigen Nachteile, die ein Einsatz von autologem Gewebe zur Heilung von Weichgewebedefekten mit sich bringt, könnten vermieden werden, wenn mit den Methoden des Tissue Engineerings neue klinisch einsetzbare Konstrukte erzeugt werden könnten [35]. Analog des oben beschriebenen Prozesses der Gewebezüchtung aus Patientenzellen werden auch bei der Erzeugung von Fettgewebe Spenderzellen aus einer Biopsie isoliert, auf einem Scaffold vermehrt und schließlich als fertiges 3D Konstrukt in den Patienten implantiert [36, 37, 38, 39, 40, 41].

Während in der medizinischen Forschung zur Entwicklung der Prozessabläufe und Trägermaterialien [42] Adipozyten aus Zelllinien von Mäusen eingesetzt werden [43, 44], werden für den klinischen Einsatz vorzugsweise autologe Zellen in ausreichender Anzahl benötigt [45, 46].

Basis dieser Züchtung von Gewebe-Konstrukten zum Einsatz in der Medizin sind neben ausdifferenzierten Zelltypen meist adulte mesenchymale Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen, sich nach Vermehrung *in vitro* in unterschiedliche Zelltypen differenzieren zu können [19] (Abb. 2).

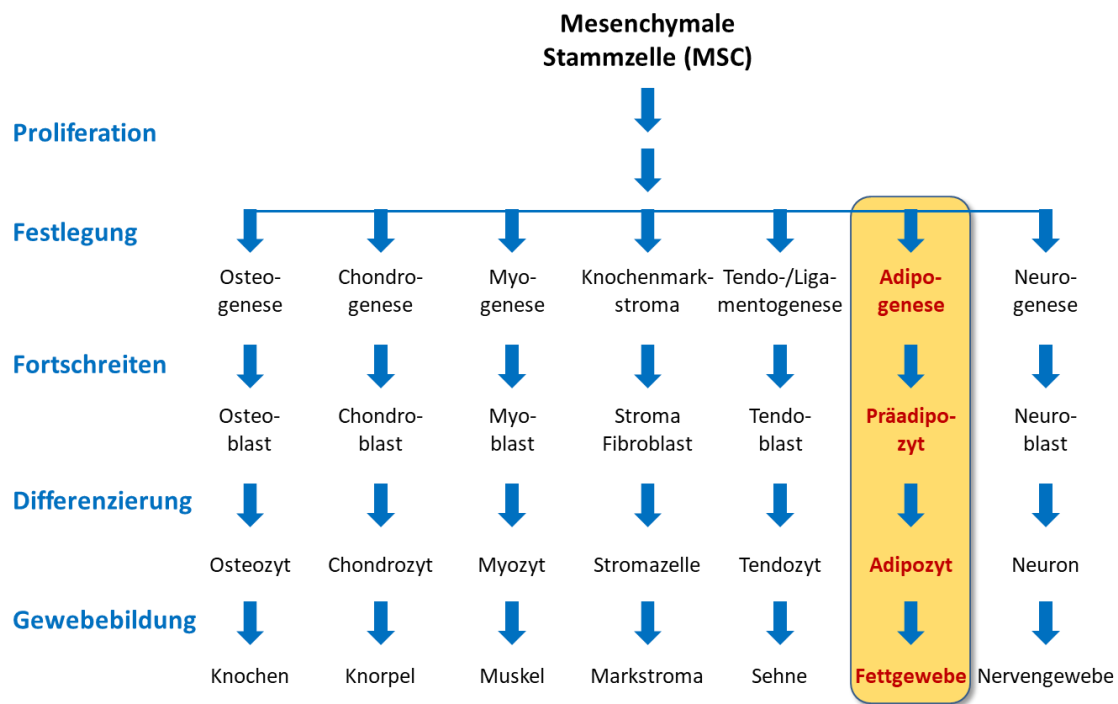


Abb. 2: Möglichkeiten der Ausdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen, vereinfachte tabellarische Darstellung nach [19], Erlaubnis zur Bildnutzung von Verlag Elsevier erteilt

Sie können dem Patienten aus verschiedenen Geweben entnommen werden, wie beispielsweise dem Knochenmark [47, 48] aus dem Fettgewebe [49], aus dem Muskelgewebe [50], oder der Haut [51]. Für die Erzeugung von Fettgewebe haben sich mittlerweile adulte Stammzellen, gewonnen aus dem Fettgewebe von Patienten, als sehr nützliche Quelle erwiesen [52, 53]. Sie zeigen ein ähnliches Differenzierungspotenzial wie Stammzellen aus dem Knochenmark [54], können aber in einer besseren Anzahl gewonnen werden [55]. In den meisten Fällen sind kosmetische Operationen wie Fettabsaugungen oder Brust-Verkleinerungen eine gute Quelle für Stammzellen aus dem Fettgewebe, bei denen die Zellen durch enzymatischen Abbau, beispielsweise

mittels Collagenasen, isoliert werden können [56]. In neueren Untersuchungen zeigt sich, dass die genaue Herkunft der Zellen den späteren Behandlungserfolg entscheidend beeinflussen kann [57].

Zur Erzeugung eines klinisch einsetzbaren Gewebes werden die gewonnenen Zellen entsprechend des in Abb. 1 beschriebenen Prozessablaufs des Tissue Engineerings auf eine dreidimensionale Trägermatrix, dem sogenannten „Scaffold“, aufgebracht und vermehrt [58], wobei die Matrix sowohl die Zellvermehrung als auch die Entwicklung einer dreidimensionalen Gewebestruktur fördert [59, 60]. Bei der Auswahl geeigneter Scaffolds wird dabei darauf geachtet, dass die eingesetzten Materialien eine ausreichende mechanische Stabilität aufweisen, biokompatibel und bioabbaubar sind, ohne dass die Materialien zu einer Immunreaktion im Gewebe führen, und die Zellen gut an der Oberfläche anhaften und sich vermehren können [61, 62, 63, 64, 65]. Dabei ist es von Vorteil, wenn die eingesetzten Trägermaterialien Poren mit einer angepassten Porengröße aufweisen, wobei eine offenporige Struktur zur Diffusion von Nährstoffen und Metaboliten zu bevorzugen ist [66, 67]. Daher werden insbesondere offenporig geschäumte Scaffolds und neuerdings auch gezielt dreidimensional hergestellte Trägermaterialien aus Biopolymeren durch Verfahren des 3D Drucks oder mittels Elektro-Spinning eingesetzt [68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78].

Neben biologischen Materialien, wie beispielsweise Kollagen oder Chitosan [79, 80], gewinnen vermehrt auch synthetisch erzeugte polymere Substrate an Bedeutung, da deren Eigenschaften spezifisch an die erforderlichen Eigenschaftsprofile am Implantationsort eingestellt werden können [82]. Neben Materialien auf Basis von Copolymeren (PLGA, Poly(glycolic lactic acid) der Polyglycolsäure mit Polymilchsäure/Polylactid [83,84], finden mechanisch gut an das Zielgewebe anpassbare Materialien eine steigende Bedeutung. Ein solches polymeres Substrat ist Polyurethan [85, 86, 87, 88], das durch die Reaktion von Polyolen mit multifunktionellen Isocyanaten entsteht. Durch die Wahl geeigneter Ausgangskomponenten können die Eigenschaften der resultierenden Polyurethane gezielt modifiziert werden. Diese Trägermatrix wurde bereits in mehreren Arbeiten mit Erfolg verwendet [95, 96, 97].

#### **1.2.4. Entstehung und Struktur des Fettgewebes**

Fettgewebe ist im menschlichen Organismus an unterschiedlichen Stellen zu finden, wie beispielsweise subkutan oder intra-abdominal [98, 99, 100, 101] und erfüllt dabei verschiedene Aufgaben, wie z. B. den mechanischen Schutz innerer Organe oder auch der Temperaturregulierung [102]. Im menschlichen Gewebe kommen dabei zwei unterschiedliche Typen an Fettgewebe vor. Es wird unterschieden zwischen dem braunen Fettgewebe, das in erster Linie bei der Geburt vorhanden ist und seine Funktion primär in der Thermoregulation des Körpers hat, und dem weißen Fettgewebe, das vor allem eine Energiespeicherfunktion sowie eine Isolationswirkung besitzt [20], aber mittlerweile auch als ein wichtiges Organ des Organismus in der Endokrinologie eingeschätzt wird [81].

Bei der Bildung von Fettgewebe im Organismus ist die erste Zelldifferenzierung zur Bildung von Adipozyten aus mesenchymalen Stammzellen die Entstehung von Adipoblasten. Adipoblasten beinhalten noch keine Fettvakuolen. Diese entstehen erst auf der Stufe der Präadipozyten und entwickeln sich bei der Bildung der Adipozyten dann vollständig aus [20]. Um Fettgewebe aufzubauen sind neben den Adipozyten aber noch eine Reihe weiterer Faktoren notwendig, um eine funktionale, biologisch suffiziente Struktur bilden zu können.

Neben den Blutgefäßen zur Versorgung der Zellen mit Nährstoffen bildet die extrazelluläre Matrix EZM das wesentliche Merkmal zur Ausbildung einer funktionalen Stützstruktur für das entstehende Gewebe. In der EZM sorgen eine ganze Reihe von Makromolekülen für die Funktionalität des Gewebes, wie beispielsweise Mucopolysaccharide und Proteoglykane für den notwendigen Wasserhaushalt, oder Kollagene für die Formgebung und die Elastizität dieses Gewebes [103]. In der EZM eingebettet befinden sich im Fettgewebe die Adipozyten mit Zellkern, ebenso wie die Präadipozyten und die das Gewebe versorgenden Blutgefäße. Sowohl die Basalmembranen der Adipozyten als auch der benachbarten Blutgefäße bestehen im Wesentlichen aus fibrillären

und faserartigen Kollagen-Einheiten [104], insbesondere den Kollagenen I, IV und VI, sowie aus Laminin, das mit der Epithelzellmembran vernetzt ist.

Nachfolgende Grafik (Abb. 3) zeigt schematisch den Aufbau eines Fettgewebes [eigene Grafik].

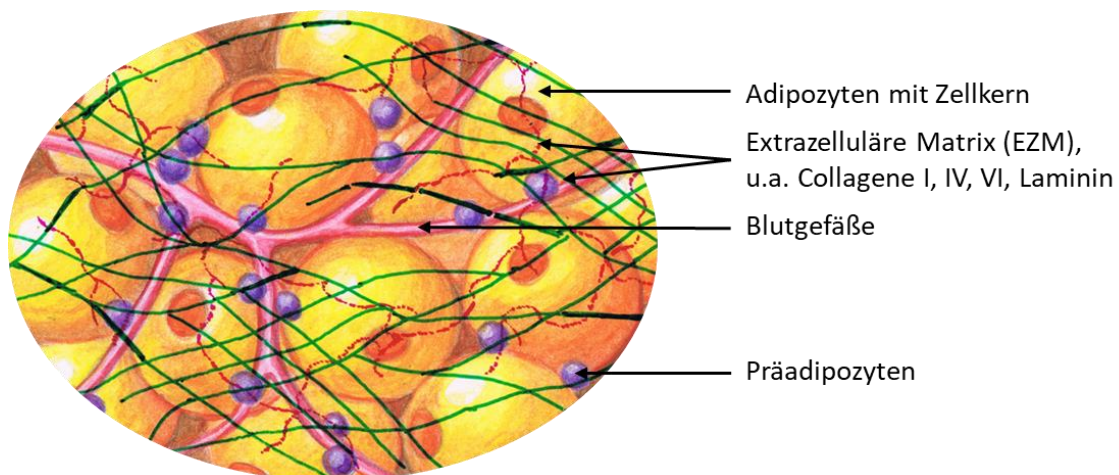


Abb. 3: schematischer Aufbau des Fettgewebes [eigene Grafik] aus Adipozyten, Prädipozyten sowie der extrazellulären Matrix (EZM), bestehend u.a. aus Kollagenen und Laminin

Die Adipogenese *in vivo* oder *in vitro* startet mit der Differenzierung von Adipozyten aus Prädipozyten. In Studien verschiedener Prädipozyten Zell-Linien konnte gezeigt werden, dass der Aufbau von Proteinen und auch der nachfolgende Abbau einem bestimmten Muster folgt [82]. Relevant sind dabei unter anderem das Kollagen I, das fibrilläre Strukturen bildet, das Kollagen IV, das ein Netzwerk ausbildet und das Kollagen VI, das Perlenschnur-förmige Filamente formt [89]. Ein weiteres in der Ausbildung der extrazellulären Matrix relevantes Protein ist das Laminin. Dieses Glycoprotein besteht aus einem Komplex aus drei kreuzförmig angeordneten Peptidketten. Das Laminin verfügt über mehrere, funktionell unterschiedliche Domänen, wobei eine dieser Domänen selektiv an das Kollagen IV binden kann [90, 91, 92, 93, 94].

### **1.2.5. Entwicklung der extrazellulären Matrix bei der Adipogenese**

Eine ganze Zeit lang war vermutet worden, dass die extrazelluläre Matrix lediglich eine Gerüstfunktion beim Aufbau von Gewebe- und Organstrukturen besitzt. Erst in jüngerer Zeit wurde erkannt, dass über die Gerüstfunktion hinaus die EZM eine funktionale Rolle z.B. bei der Zellvermehrung, der Zelldifferenzierung und auch beim Gewebeaufbau besitzt. [112, 113]. Während der Ausbildung der EZM und des Aufbaus von neuem Gewebe bringen die Zellen sehr viel Energie auf, um die EZM auszubilden und umzubauen [108, 114, 118].

Hauptbestandteil der EZM sind Kollagene. Diese Proteinfamilie umfasst nach heutiger Kenntnis 27 verschiedene Typen, die im Körper an unterschiedlichen Stellen zu finden sind und unterschiedliche Funktionen ausführen [116]. Das häufigste Kollagen ist der Typ I, ein fibrilläres Kollagen, das in der Haut, in Sehnen, Faszien, Knochen, Gefäßen, inneren Organen und im Dentin zu finden ist [103]. Kollagen II bildet als Strukturprotein hyalinen und elastischen Knorpel, während Kollagen III u.a. in Gefäßwänden, Haut und Hornhaut zu finden ist. Die Kollagene IV und V sind Bestandteile der Basalmembran, beispielsweise von Blutgefäßen oder Adipozyten, ebenso wie Laminin, Entactin und dem Proteoglykan Perlecan [116].

In neueren Arbeiten wird intensiv die Rolle der EZM-Ausbildung bei der Adipozyten-Differenzierung untersucht [106]. Mittels Massenspektrometrie wurden im Einzelnen die Bildung und der anschließend wieder erfolgende Abbau unter anderem von Proteinen der extrazellulären Matrix qualitativ untersucht. Danach konnte gezeigt werden, dass während der Adipogenese von den Zellen unterschiedliche Proteine zum Aufbau der EZM gebildet werden. Zu Beginn lassen sich zunächst zunehmend fibrilläre Kollagene des Typs I und III nachweisen, deren Sekretionslevel dann während fortschreitender Adipogenese wieder abnimmt, während danach die netzartige Strukturen ausbildenden Kollagene der Typen IV, V und das perlenschnurartige Kollagen VI sowie Laminin gebildet werden. Anschließend setzt die verstärkte Bildung von Adipokinen ein [106].



Auch in anderen Arbeiten wird beschrieben, dass die Adipozyten eine stabilisierende extrazelluläre Matrix ausbilden, wobei in der direkt die Zellen umgebenden Schichten der Basalmembran insbesondere Kollagen IV als Hauptkomponente zu finden ist [107]. Die Ausbildung einer EZM ist analog der bei Zellen in Knochen und Knorpeln, die aus den gleichen mesenchymalen Stammzellen gebildet werden können [107]. Im Vergleich dazu ist Kollagen VI deutlich spezifischer der EZM von Adipozyten zuzuordnen [122] und bindet stark an das Kollagen IV. Diese letzteren beiden Kollagene bilden die netzartigen Strukturen, die die Basalmembran an die Zellen verankert [108, 119]. Es wurde zudem gezeigt, dass das Kollagen IV nicht nur eine wichtige Funktion als netzbildendes Strukturprotein spielt, sondern auch den Prozess der adipogenen Differenzierung direkt beeinflusst. Damit bewirkt die Bildung von Kollagen IV nicht nur eine mechanische Stabilisierung der EZM zur Ausbildung von Fettgewebe, sondern es wäre sogar einer der auslösenden Faktoren zur Adipogenese [110, 111]. Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Übersicht der verschiedenen, bekannten Kollagene.

Tab. 1: Die verschiedenen fibrillären und nicht-fibrillären Kollagene [115, 116, 121]

<b>Fibrilläre Kollagene</b>	<b>Nicht-fibrilläre Kollagene</b>
Fibrillen ausbildende Kollagene: I, II, III, V, XI, XXIV, XXXVII	Netzwerk-formende Kollagene IV, VI, VIII, X
Verankernde Fibrillen ausbildende Kollagene: VII	Fibrillen-assoziiierende Kollagene IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI
	Membran-übergreifende Kollagene XIII, XVII, XXIII, XXV
	Endostatin-Vorläufer Kollagene XV, XVIII

Neben den Kollagenen spielen weitere Gerüst-bildende Proteine im Aufbau und der Stabilisierung des Zellverbundes eine wichtige Rolle. Eine dieser Komponenten ist Laminin, an das die Adipozyten u.a. mittels ihrer Integrin-Rezeptoren binden und das damit ebenfalls den Zellverbund mechanisch fixiert [109, 120].

Die Fachliteratur beschreibt ausführlich die Adipogenese von Fettzellen, bisher wenig betrachtet ist dagegen die Entwicklung der EZM in Tissue Engineering Konstrukten, ausgehend von Vorläuferzellen der Adipozyten. Unbekannt war zudem bislang, inwieweit die Sekretion von Bestandteilen der EZM in Tissue Engineering Konstrukten durch geeignete Methoden der Vorkultivierung der Präadipozyten *in vitro* bereits vor der Implantation gezielt beeinflusst werden kann und dann eine Adipogenese *in vivo* fördert. Hierfür müssen Gewebeproben nach unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen *in vitro* und nach der Adipogenese *in vivo* sowohl hinsichtlich des Status der Bildung der einzelnen charakteristischen Bestandteile der EZM im Detail immunohistochemisch und histologisch untersucht als auch die Güte des entstandenen Fettgewebes anhand einer histomorphometrischen Untersuchung der beobachtbaren Zellzahlen sowie der resultierenden Zellgrößen geprüft werden.

#### **1.2.6. Relevanz einer geeigneten Vorkultivierung für eine erfolgreiche Zellvermehrung und Gewebezüchtung, Beschreibung der Vorarbeiten**

In einer Vorgängerarbeit von H. Mayer [105] wurden humane Präadipozyten aus dem Fettgewebe der Brust und aus dem Abdomen von Patienten isoliert, mit Einwilligung der Patientinnen vermehrt, und in eine polymere Matrix, einem Polyurethan, eingebracht. Anschließend wurden die erhaltenen hybriden Konstrukte, bestehend aus Präadipozyten und dem Polymer, unterschiedlich vorkultiviert und danach in athymische Nacktmäuse (Deletion im FOXP1 Gen) der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) subkutan implantiert (Genehmigung des Tierversuchs durch die Regierung von Oberbayern, Gz.: 55.2-1-54-2532-130-11). Nach einem Zeitraum von 1, 5, 12 und 24 Wochen

wurden die Implantate dann wieder explantiert und Dünnschnitte der neugebildeten Gewebe in Paraffin erstellt.

Der entscheidende Unterschied in der Vorbehandlung der Konstrukte bestand sowohl in der Art als auch der Zeitdauer der Vorkultivierung. Während die Konstrukte der Gruppe 1 vor der Implantierung 2 Tage *in vitro* im Brutschrank bei 37°C zur Zellvermehrung vorkultiviert wurden, wurde bei den Konstrukten aus Gruppe 2 eine Induktion zum Stopp der Proliferation und zur Einleitung der Reifung der Präadipozyten zu Adipozyten durchgeführt und danach diese Konstrukte zwei weitere Tage im Brutschrank inkubiert. Die Konstrukte der Gruppe 3 verblieben nach einer analogen Vorbehandlung wie in Gruppe 2 noch weitere sieben Tage *in vitro* im Brutschrank bei 37°C und die Konstrukte der Gruppe 4, statt diese sieben Tage, 33 Tage, jeweils um die Adipogenese der Präadipozyten anzuregen.

In der Vorgängerarbeit wurde insgesamt festgestellt [105], dass eine längerdauernde Vorkultivierung und insbesondere der *in vitro* Stimulans der Präadipozyten durch die Differenzierungsmedien zu einer deutlich verbesserten Adipogenese führt. Nach insgesamt 24 Wochen *in vivo* konnte bei den Implantaten aus Gruppe 4 die höchste Adipozytenzahl registriert werden.

Was nach den bis dato vorliegenden Ergebnissen der Adipogenese in den Gewebeproben allerdings nicht untersucht wurde, war die Qualität des entstandenen Fettgewebes, einerseits im Hinblick auf die Größenverteilung der resultierenden Adipozyten, sowie parallel hierzu die Verfolgung der Ausbildung einer extrazellulären Matrix (EZM) anhand der Untersuchung entstandener Proteinmoleküle, wie beispielsweise der typisch im Fettgewebe vorkommenden Kollagen-Typen, sowie Laminin. Die Ausbildung einer EZM sowie einer genügenden Anzahl an reifen Adipozyten ist aber entscheidend für die spätere klinische Nutzbarkeit von Weichgewebs-Implantaten.

### **1.3. Zielsetzung der Arbeit**

Basis der vorliegenden Arbeit waren die 1.2.6 beschriebenen Gewebekonstrukte der Vorgängerarbeit von Frau H. Mayer [105], bei der die

Adipogenese in einem Mausmodell in Scaffolds aus Polyurethan untersucht wurde. Hauptfokus war dort die Entwicklung der Adipozyten und die Klärung, ob die gefundenen Adipozyten humanen oder murinen Ursprungs waren. Dabei wurde weder die Genese der extrazellulären Matrix an sich betrachtet, noch die Bildung von Fettgewebe anhand unterschiedlicher Differenzierungsstadien der Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Gewebeprobe histologisch und immunohistochemisch analysiert. Dabei war es nun das Ziel, eine detaillierte, histomorphometrische Analyse hinsichtlich der Größe und der Anzahl der entstandenen Adipozyten sowie eine immunohistochemische Analyse spezifischer Bestandteile der EZM in den explantierten 3D Gewebe-Konstrukten durchzuführen, um retrospektiv den Verlauf der Fettgewebeentwicklung in solchen Konstrukten *in vivo* besser beurteilen zu können.

Im Einzelnen waren die Ziele der vorliegenden, weiterführenden Arbeit daher:

- Die histomorphometrische Analyse hinsichtlich der Größe und Anzahl der entstandenen Adipozyten in den 3D Fettgewebe-Konstrukten über die Zeit *in vivo* zur Beurteilung der Fettgewebeentwicklung
- Eine umfangreiche immunohistochemische Analyse der Bildung von Kollagen I, IV und VI, sowie Laminin in den 3D Fettgewebe-Konstrukten *in vivo* über die Zeit zur qualitativen Beurteilung der Art und des Umfangs der entstandenen extrazellulären Matrix während der Fettgewebe-Entwicklung.

## 2. Geräte, Instrumente, Materialien und Methoden

### 2.1. Geräte, Instrumente und Materialien

Die für diese Arbeit verwendeten Apparate und Materialien sind im folgenden Teil tabellarisch zusammengestellt

#### 2.1.1. Geräte und Instrumente

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Geräte und Instrumente

Kühlschrank	5°C	Liebherr, Biberach, D
Gefrierschrank	-20°C	Liebherr, Biberach, D
Vortexer	IKA MS 3 basic	Hartenstein
Mikroskop	BX51	Olympus, Hamburg, D
Mikroskop-Kamera	DP71	Olympus, Hamburg, D
Inkubator		IBS integra biosciences, Fernwald, D
Fluoreszenzlampe (Burner)	U-RFL-T	Olympus, Hamburg, D

#### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen		Gilson Eppendorf
Pipetten	01-10µl; 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Mikroskopdeck		
Eppendorf Tubes	Microtubes 2ml	Sarstedt Nümbrecht

### 2.1.3. Chemikalien und Pufferlösungen

Tab. 4: Übersicht der eingesetzten Chemikalien und Pufferlösungen

Ethanol		Sigma-Aldrich, München, D
Destilliertes Wasser	Aqua ad iniectabilia	Braun, D
Antibody Diluent	Dako REAL™	Dako
Xylol		Sigma-Aldrich, München, D
DAPI	ImmunoSelect® antifading mounting medium	Dianova
BSA	Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS Tabletten	Phosphate buffered saline (Dulbecco A)	Oxoid
Eosinlösung mit Phloxin	Eosin	Sigma-Aldrich, St. Louis
Hämalaun	Mayers Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis

### 2.1.4. Antikörper und Enzyme

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Antikörper zur Fluoreszenz-Markierung spezifischer Komponenten der EZM

Anti-collagen I	Polyclonal IgG rabbit	Abcam 34710
Anti-collagen IV	Polyclonal IgG rabbit	Abcam 6586
Anti-collagen VI	Polyclonal IgG rabbit	Abcam 6588
Anti-Laminin	Polyclonal IgG rabbit	Abcam 11575

## 2.1.5. Software und Bearbeitungsprogramme

Tab. 6: eingesetzte Software und Bearbeitungsprogramme

	cellSens Dimension	Olympus, Hamburg, D
	Microscope imaging software	Olympus, Hamburg, D
Auswertung, grafische Darstellung, Texte	Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA

## 2.1.6. Verwendete Gewebeproben

### 2.1.6.1. Herkunft der Proben

Die zur histologischen, histomorphometrischen und immunohistochemischen Auswertung verwendeten Proben stammten aus Tierversuchen (Gz.: 55.2-1-54-2532-130-11), die an der Hals-Nasen-Ohren Klinik und Poliklinik des Klinikums „Rechts-der-Isar“ der Technischen Universität München im Rahmen der Dissertation von Frau Judith Helena Mayer [105] durchgeführt wurden. Das zugrunde liegende Fettgewebe entstammte aus Mamma-Reduktionsplastiken weiblicher Patienten im Alter zwischen 20 und 32 Jahren. Die entnommenen Gewebeproben wurden nach vorheriger Einwilligung der Patientinnen in mehreren Stufen aufgearbeitet und schließlich die in den Geweben enthaltenen Präadipozyten isoliert.

Nach Einbringung der Zellen in eine Polyurethan-Matrix als Trägergerüst wurden die resultierenden Konstrukte in verschiedene Gruppen eingeteilt und jede Gruppe einer unterschiedlichen Vorkultivierung unterzogen, bevor sie in die Versuchstiere implantiert wurden. Als Versuchstiere wurden athymische Nacktmäuse (Deletion im FOXP1 Gen) der Firma Charles River aus Sulzfeld verwendet. Da diese immunsupprimierten Tiere keine Immunreaktion gegen humanes Gewebe zeigen, ist eine Abstoßungsreaktion der Mäuse gegen allogenes Gewebe somit unterdrückt. Über einen gelegten Gefäßanschluss wurden die Konstrukte *in vivo* versorgt, so dass eine Gewebe-Neubildung gewährleistet werden konnte.

Die Proben wurden in die Nacktmäuse implantiert und nach einem Zeitraum von 1, 5, 12 und 24 Wochen diese Implantate aus den jeweils vier Gruppen a´ 3 Mäusen gebildeten Populationen wieder explantiert und Dünnschnitte der neugebildeten Gewebe in Paraffin erstellt. Hierfür wurden die frisch explantierten Konstrukte in Formalin konserviert und nach Entwässerung in Paraffin eingebettet. Die Probenpräparation erfolgte mittels Mikrotom in 7 µm dicken Schnitten auf einen Objektträger mit nachfolgender Trocknung und Aufbewahrung der Proben bei Raumtemperatur.

Zur weiteren histologischen und immunohistochemischen Untersuchung wurden aus den 4 Gruppen mit jeweils 3 Mausmodellen xy-Slides mit darauf befindlichen Schnitten genutzt. Von den Mikrotom-Schnitten der Gewebeproben wurden zur Auswertung die mittleren Segmente verwendet, um eventuelle „Randeffekte“, also Verfälschungen und Fehlinterpretationen durch die Gewebezusammensetzung aus den Rändern der Gewebeproben, die in Kontakt mit Mausgewebe standen, ausschließen zu können.

### 2.1.6.2. Vorkultivierung der Proben

Charakteristisch für das Versuchsdesign des *in vivo* Versuchs in den Nacktmäusen aus der Dissertation von Frau Mayer [105] war die unterschiedliche Vorkultivierung der Konstrukte. Die mit den ASC besiedelten Konstrukte wurden in Gruppen aufgeteilt und jeweils nach dem folgenden Schema vor der Implantation behandelt:

Tab. 7: Auflistung der verschieden vorkultivierten Konstrukte der Gruppe 1 - 4

Gruppe	2 Tage Inkubation <sup>1</sup>	Induktion <sup>2</sup> 2 Tage	Induktion 2Tage + 7 Tage <sup>3</sup>	Induktion 2Tage + 33 Tage <sup>4</sup>
1	X			
2	X	X		
3	X	X	X	
4	X	X		X



1: zweitägige Zellvermehrung der besiedelten Konstrukte im Brutschrank bei 37°C *in vitro*

2: Induktion der besiedelten Konstrukte zum Stopp der Proliferation und Einleitung der Reifung zu Adipozyten durch Verbleib zweier Tage im Brutschrank

3: Induktion der besiedelten Konstrukte zum Stopp der Proliferation und Einleitung der Reifung zu Adipozyten für zwei Tage, Verbleib zusätzlicher sieben weiterer Tage in Differenzierungsmedium im Brutschrank zur Anregung der Adipogenese

4: Induktion der besiedelten Konstrukte zum Stopp der Proliferation und Einleitung der Reifung zu Adipozyten für zwei Tage, Verbleib zusätzlicher 33 weiterer Tage im Brutschrank in Differenzierungsmedium zur Anregung der Adipogenese.

Die Induktion der Zellen zum Stopp der Proliferation erfolgte in der Vorgängerarbeit [105] mittels eines Induktionsmediums bestehend aus 500 ml  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium Eagle), 5% FKS (Fetales Kälber-Serum), 12 ml AA (Antibiotic/Antimykotic), 500  $\mu$ l Insulin, 10,75 mg Indomethacin, 55,58 mg IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) und 0,02 mg Hydrocortison. Das Differenzierungsmedium zur Anregung der Adipogenese bestand aus 500 ml  $\alpha$ -MEM, 5% FKS, 12 ml AA und 500  $\mu$ l Insulin.

Im Anschluss an die Implantierung und Kultivierung *in vivo* wurden die Konstrukte nach 1, 5, 12 und 24 Wochen aus den Mäusen explantiert und in der vorliegenden Arbeit nun histomorphometrisch und immunohistochemisch analysiert.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Histologische Untersuchung der Proben

#### 2.2.1.1. Hämalaun-Eosin (HE) Färbung auf Paraffinschnitten

Die Hämalaun-Eosin Färbung wird analytisch verwendet, um verschiedene Gewebestrukturen einer Probe im mikroskopischen Bild durch zwei unterschiedlich selektiv wirkende Farbstoffe darstellen zu können. Während „Hämalaun“ alle basisch zugänglichen Strukturen anfärbt, wie z.B. Zellkerne mit den darin enthaltenden Desoxyribonukleinsäuren, bindet das Eosin vorzugsweise an sauer zugängliche Zellkomponenten, wie z.B. den Kollagenen [117].

Bei dieser Färbung wurden die bereits aus der Vorgängerarbeit [105] vorliegenden xy-Slides verwendet. Die gefärbten Gewebe-Dünnschnitte dienten anschließend als Basis für eine quantitative Auswertung mittels Histomorphometrie der Proben hinsichtlich der Adipogenese in den Konstrukten nach den verschiedenen Arten der Vorkultivierung und den jeweiligen Zeiträumen *in vivo*.

Die für die Hämalaun-Eosin-Färbung verwendeten Schnitte stammten aus der Probenmitte des jeweiligen von einer Maus entnommenen Gewebes um bessere Ergebnisse zu erhalten und Verfälschungen durch Randschnitte möglichst gering zu halten. So wurde beispielsweise von der Gruppe 3 aus Woche 24 der von 1-20 nummerierten Objektträgern mit Gewebeproben der Maus 1 eine in der Mitte befindliche Probe (Nummer 14) für die HE-Färbung verwendet.

Da die Gewebeproben nach der Explantation zur Konservierung in Paraffin eingebettet wurden, musste dieses zunächst durch ein „Entparaffinisierungs-Protokoll“ entfernt werden. Dabei wurde das Paraffin durch ein organisches Lösungsmittel gelöst und anschließend in einer absteigenden Ethanol-Konzentration in Wasser die Probe wieder hydrophil eingestellt, um sie der späteren Einfärbeprozedur zugänglich zu machen:

Tab. 8: Protokoll zur Entparaffinisierung mittels absteigender Alkoholreihe:

Schritt	Flüssigkeit	Konzentration (%)	Einwirkzeit
1	Xylol	100	10 min
2	EtOH	100	3 min
3	EtOH/H <sub>2</sub> O	80/20	3 min
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	70/30	3 min
5	EtOH/H <sub>2</sub> O	50/50	3 min
6	Wasser (aqua ad infectabilia)	100	3 min

Nach dieser Probenvorbereitung erfolgte die zweistufige Gewebefärbung mit Hämalaun und Eosin. Diese Färbung wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Tab. 9: Protokoll zur zweistufigen HE-Anfärbung

Schritt		Flüssigkeit	Einwirkzeit
1	Färbung Zellkerne	Hämalaun	3-5 min
2	Bläuen der Zellstrukturen	Kaltes Wasser	10 min
3	Färbung Zellkomponenten	Eosin	2 min
4	Entfernen Farblösung	Dest. Wasser	1 min

Nach dem Einfärben wurden die Proben zur weiteren Untersuchung wieder „entwässert“, indem in einer aufsteigenden Alkoholkonzentration und darauffolgender Spülung mit Xylol die Probe hydrophobisiert und anschließend abgedeckt wurde, um eine Konservierung zu erreichen.

Zum Entwässern und Konservieren wurden die Proben nach dem folgenden Protokoll behandelt:

Tab. 10: Protokoll zur Entwässerung und zum Konservieren der Proben

Schritt	Flüssigkeit	Konzentration (%)	Einwirkzeit
1	EtOH/H <sub>2</sub> O	50/50	3 min
2	EtOH/H <sub>2</sub> O	70/30	3 min
3	EtOH/H <sub>2</sub> O	80/20	3 min
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	100	3 min
5	Xylol	100	15 min
6	Entellan/Deckglas		

Die Dünnschnitte wurden zum Ende des Protokolls kurz getrocknet und daraufhin im letzten Schritt (6) mit Entellan und einem Deckglas eingedeckt.

## 2.2.2 Immunohistochemische Auswertung wichtiger Bestandteile der extrazellulären Matrix

### 2.2.2.1 EZM-Antikörperfärbung auf Paraffinschnitten mit Pepsin-Verdau

Mittels der verwendeten Antikörperfärbung können spezifisch die zu untersuchenden Zellbestandteile sichtbar gemacht werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper binden jeweils an die unterschiedlichen Kollagen-Typen I, IV und VI der extrazellulären Matrix sowie an Laminin an. Somit kann der unterschiedliche Gehalt dieser Zellkomponenten in den verschiedenen Konstrukten optisch sichtbar gemacht werden.

Die Proben auf den xy-Slides pro Maus einer bestimmten Gruppe und den entsprechenden Wochen *in vivo* bestanden zumeist aus 6 Einzeldünnschnitten des explantierten Gewebes. Diese Proben wurden dann zur immunohistochemischen Anfärbung in zwei Hälften aufgeteilt, so dass jeweils 3 Schnitte eines Slides spezifisch mit dem jeweiligen Antikörper behandelt wurden, somit z.B. die linke Seite auf Laminin und die rechte Seite auf Kollagen IV markiert wurden. Um eine möglichst wenig durch Vorüberlegungen beeinflusste Vorgehensweise und Auswertung gewährleisten zu können,

wurden die Slides in einer völlig zufälligen Reihenfolge der Mäuse, jeweiligen Gruppe und *in vivo* Zeiten genommen und mit der jeweiligen Antikörperlösung behandelt. In der Abfolge der Slides einer spezifischen Maus wurden, nachdem zunächst auf Kollagen IV und Laminin getestet wurde, die unmittelbar darauffolgenden, nummerierten Objektträger dann links auf Kollagen VI und rechts auf Kollagen I getestet, so dass die Resultate immer aus dem jeweils gleichen Gewebeabschnitt ermittelt werden konnten.

Zur immunohistochemischen Analyse der Extrazellulär-Matrix mittels spezifischer Färbung unter Einsatz von Antikörpern wurde nach dem Protokoll der Hämalaun-Färbung (Tab. 8) in mehreren Prozessschritten gefärbt (Prozess 1). Der Prozess 2 ist das Antigen-Retrieval mit Pepsin-Verdau. Dazu wurden die Schnitte (jeweils 3 Schnitte pro Slide) mit einem Fettstift umrandet, damit während des Bearbeitungs- bzw. Färbeprozesses die exakte, applizierte Menge der jeweiligen Lösung auf der Probe konzentriert blieb.

Zunächst wurde jeweils 500µl Digest All 3 auf jeden Dünnschnitt pipettiert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation der Slides in einer Klimakammer unter Luftfeuchte bei 37°C. Anschließend wurden die Proben zweimal für jeweils 3 min mit PBS gewaschen. Zur Antikörperfärbung erfolgte zunächst ein 20-minütiges Blockieren der Schnitte in einer 1%igen BSA-PBS Lösung, welche zuvor frisch aus PBS und dem exakt abgemessenen, bovinen Albumin-Pulver hergestellt wurde. Dann wurde der Primärantikörper, entweder Anti-Kollagen I, Anti-Kollagen IV, Anti-Kollagen VI oder Anti-Laminin, welcher vorher mit Antibody Diluent angesetzt und verdünnt wurde, auf die Proben aufgebracht. Insgesamt wurde jeder Probenschnitt mit 100µl der Antikörperlösung benetzt. Das Mischungsverhältnis der Antikörper-Lösung im Verhältnis des jeweiligen Antikörpertyp. Dabei lag die Verdünnung der Antikörperlösung mit Antibody Diluent bei Kollagen IV sowie Laminin bei 1:400. Das Mischungsverhältnis der Antikörperlösung mit Antibody Diluent entsprach bei Kollagen I 1:800 und bei Kollagen VI 1:1250. Danach erfolgte die Inkubation der Schnitte über Nacht in einer Klimakammer unter Luftfeuchte bei Raumtemperatur.

Am darauffolgenden Tag wurden die Slides dann jeweils zunächst dreimal für je 2 Minuten in PBS gewaschen. Daraufhin fand die Benetzung mit jeweils 200µl der zuvor hergestellten Sekundär-Antikörperlösung mit Sekundär-Antikörper Typ Cy3 pro Probenschnitt statt. Der Sekundär-Antikörper wurde dabei, wie zuvor die Primär-Antikörper, mit Antibody Diluent in einem Mischungsverhältnis 1:400 verdünnt. Dann wurden die Proben für etwa 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Bevor die Schnitte mit der fluoreszierenden Substanz „DAPI Mounting Medium“ eingedeckt werden konnten, mussten diese noch in einem abgedunkelten Gefäß dreimal für je 2 Minuten in PBS gewaschen werden. Nach dem Aufbringen des DAPI auf die Objektträger wurden diese im direkten Anschluss unter Lichtausschluss unter dem Mikroskop begutachtet und zur weiteren histologischen Auswertung fotografiert.

#### **2.2.2.2. Fluoreszenz-Mikroskopie**

Zur Analyse und der Dokumentation wurde ein Olympus Typ BX51 Lichtmikroskop und eine daran angeschlossene DP71 Digitalkamera (Olympus, Hamburg) zur fotografischen Darstellung verwendet. Für die fluoreszierende Darstellung musste zusätzlich noch eine Fluoreszenzlampe, der sogenannte „Brenner“ vom Typ Olympus U-RFL-T, eine Xenon-Quecksilber Dampflampe, zugeschaltet werden.

Die Belichtungszeit wurde dabei möglichst niedrig gehalten. Mit einem geeigneten Bilddarstellungs- und Bildbearbeitungsprogramm, der „cellSens Dimension Software“, wurden bei 10- und 20-facher Vergrößerung mit einem selektiven Fluoreszenzfilter für DAPI die gefärbten Schnitte untersucht. Die Bildaufnahme erfolgte in 2 Kanälen, wovon der erste Kanal das DAPI mit einer Emissionswellenlänge von 455nm und die zweite Ebene (TRITC) den Sekundär-Antikörper Cy3 bei einer Emissionswellenlänge von 580nm darstellt. Zum Abfotografieren der Proben wurde bei 10-facher Vergrößerung die Belichtungszeit im ersten Kanal auf 50ms und im zweiten Kanal auf 800,4ms

eingestellt. Bei 20-facher Vergrößerung fand die Analyse im Kanal 1 bei 100ms und im Kanal 2 wieder bei 800,4ms statt.

Damit die Darstellung der untersuchten extrazellulären Bestandteile des gebildeten Fettgewebes durch am Probenrand befindliches Mausfettgewebe möglichst unverfälscht blieb, wurde beim Fotografieren und Abspeichern der Bilder, das Konstrukt in vier Bereiche geteilt, wovon jeder Bereich mit einer 1 als „Randbereich“ und mit einer 2 als „Konstrukt-Mitte“ nummeriert wurde. So konnte eine relativ exakte Zuordnung der fluoreszierenden Gebiete im Schnittgewebe gewährleistet werden.

### **2.2.3. Mikroskopische Untersuchung der HE-gefärbten Probenschnitte**

Zur Zelldarstellung und Zelldokumentation wurde wieder die cellSens Software und das BX51 Lichtmikroskop, sowie die am Mikroskop angeschlossene Digitalkamera DP71 verwendet. Fotografiert wurde dabei in 4-,10- und 20-facher Vergrößerung nach dem gleichen Einteilungsschema wie zuvor bei den Fluoreszenzaufnahmen.

Des Weiteren wurden zur übersichtlicheren Darstellung sogenannte „MIAs“ erstellt. MIA steht für „Multiple Image Alignment“, das dazu dient, einzelne Bildausschnitte einer Mikroskop-Aufnahme zu einer „Panorama“-Aufnahme zusammenzufügen und auswerten zu können. In dieser Arbeit wurde durch Fotografieren und anschließender Zusammensetzung von Einzelbildern bei 4-facher Vergrößerung das gesamte Konstrukt dargestellt. Die erhaltenen Bilder wurden im Anschluss noch mit einem speziellen Programm in Kontrast und Helligkeit bearbeitet. Im sogenannten „Makromanager“ wurden dabei die Helligkeit auf 45 und der Kontrast auf 55 eingestellt.

Die zuvor in 4- und 10-facher Vergrößerung aufgenommenen Einzelbilder wurden ebenfalls mit derselben Software bearbeitet, wobei die Helligkeit bei beiden Vergrößerungen auf 45 gestellt wurde, der Kontrast allerdings bei 10-facher Vergrößerung auf 65 und bei 4-facher Vergrößerung auf 55 festgelegt wurde. In dieser Weise wurden alle Fotografien identisch bearbeitet. Insgesamt

wurde für alle Bilder zum Schluss noch eine Schärfe von 25 eingestellt und diese dann zur Verwendung in einer png-Datei abgespeichert.

#### **2.2.4. Histomorphometrie**

In der Vorgängerarbeit von Frau H. Mayer [105] erfolgte eine quantitative Auswertung der Adipogenese in den verschiedenen Gruppen und nach den unterschiedlichen Zeitpunkten der Explantation aus dem Mausmodell. Zur Differenzierung der sich bildenden bzw. der gebildeten Adipozyten nach reifen und unreifen Zellen wurde daher nun in dieser Arbeit die Größe der vorhandenen Adipozyten analysiert und das Verhältnis zwischen den größeren, reifen und den kleineren, unreifen Zellen in den verschiedenen Gruppen nach den jeweiligen Verbleibszeiten in den Mäusen untersucht, da die unreifen Adipozyten in der Vorgängerarbeit nicht erfasst wurden. Dazu wurde der Größenunterschied zwischen den sich erst entwickelnden, noch unreifen Adipozyten (Durchmesser  $< 20\mu\text{m}$ ) und den reifen Adipozyten (Durchmesser  $> 20\mu\text{m}$ ) zur Analyse genutzt, um die jeweilige Zahl an Zellen pro Fläche bestimmen zu können.

Um eine statistische Auswertung der gezählten Adipozyten im Verhältnis zur Konstrukt-Fläche erstellen zu können, musste zunächst die Probengröße ermittelt und berechnet werden. Die Messung erfolgte wieder mit der cellSens Software und einem sogenannten Polygon-Tool. Dabei wurde mit den zuvor angefertigten MIA-Aufnahmen der HE-gefärbten Proben die auszuwertende Fläche unter dem Mikroskop mittels einer umgebenden Linien-Kontur des Polygon-Tools so exakt wie möglich eingegrenzt. In der nachfolgenden Abb. 4 wird exemplarisch für einen Gewebe-Dünnschnitt die Vorgehensweise gezeigt. Es ist außen die dünne, braune Umrandung der Probe zu erkennen, die mit dem Polygon-Tool erzeugt wurde, um die betrachtete Fläche festlegen zu können.



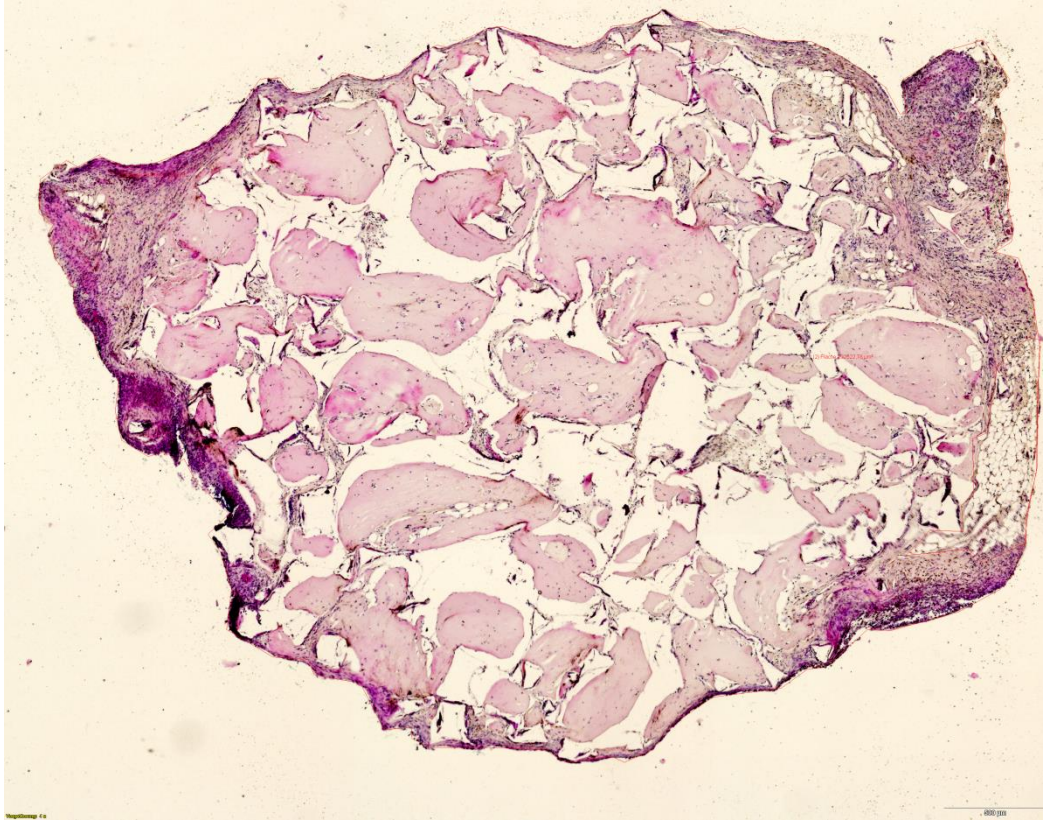


Abb. 4: Exemplarische Darstellung der Ermittlung der Probenfläche unter Nutzung des Polygon-Tools. Die Gesamtfläche resultiert nach Eingrenzung der Probe mittels aneinander gefügter Linien

Damit die tatsächliche Zahl der Adipozyten ermittelt und so eine Verfälschung durch am Rand der Probenschnitte befindliches Fettgewebe, das aus eingewanderten Fettzellen der Versuchstiere bestehen könnte, ausgeschlossen werden konnte, wurde das Konstrukt entlang des deutlich zu erkennenden Polyurethan-Gerüsts begrenzt und randständiges Fettgewebe händisch aus der Auswertung ausgeschlossen. Abb. 5 zeigt in Vergrößerung exemplarisch das Resultat der Vorgehensweise, bei der randständige Adipozyten entsprechend der markierten Fläche aus der Auswertung ausgeschlossen wurden.

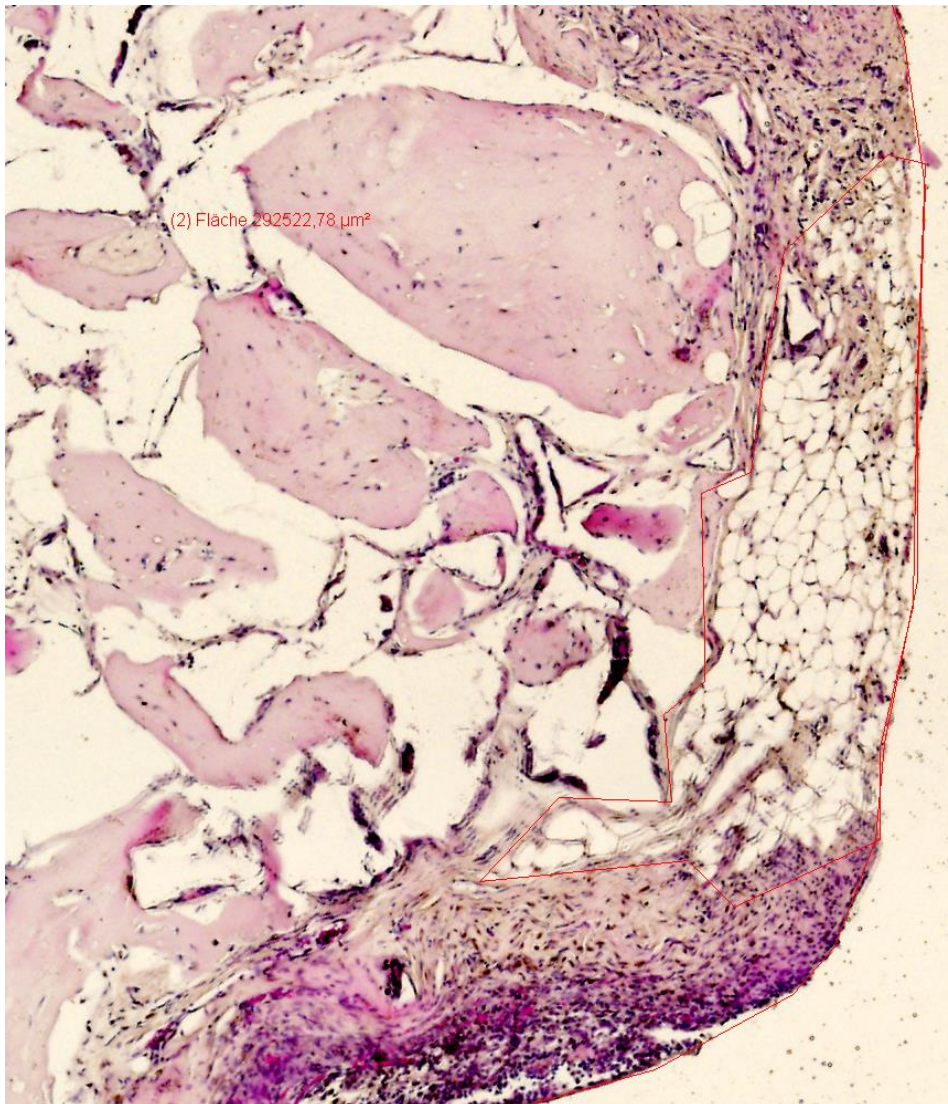


Abb. 5: Ausschluss von randständigem Fettgewebe (rechter Bildrand) aus der Auswertung zur Vermeidung einer Ergebnisverfälschung durch Fettzellen der Versuchstiere außerhalb der betrachteten Gewebeprobe

Für jedes MIA ergab sich somit eine durch das Programm berechnete Pixelfläche, die dann noch in Bezug zum Maßstab in eine  $\text{mm}^2$  Fläche umgerechnet werden musste. So ergab sich, dass  $100\mu\text{m}$  158pixel entsprachen ( $0,4\text{mm}^2 = 1.000.000\text{p}$ ). Im nächsten Schritt wurden dann die einzelnen Adipozyten im Konstrukt ermittelt.

Dazu wurden für jedes Konstrukt zunächst in einem Rasterschema in 10-facher Vergrößerung einzelne HE-Bilder aufgenommen. Mit einem speziellen Programm, dem sogenannten „Image J“, wurden dann alle Bilder geöffnet und

alle sichtbaren Adipozyten markiert, gezählt sowie ihr Durchmesser bestimmt. Hierzu wurde eine Gerade durch den größten Durchmesser der jeweiligen Zelle gezogen und über ein „measure“-Tool im Programm die zugehörige Pixelzahl ermittelt. Zunächst wurde dabei für jede Gruppe und jede Woche die gesamte detektierbare Zahl an Zellen ermittelt, wobei sowohl unreife als auch reife Adipozyten mit einbezogen wurden, um einen gesamten Überblick zu erhalten. Des Weiteren wurde dann eine Größe in Pixel ermittelt, die nur die „reifen Adipozyten“, welche größer als  $20\mu\text{m}$  definiert wurden, erfasste. Damit wurden dann „unreife Adipozyten“ ( $<20\mu\text{m}$ ) nicht mehr berücksichtigt. Aus den ermittelten Zellzahlen der beiden verschiedenen Größenklassen kleiner und größer  $20\mu\text{m}$  sowie der hierzu herangezogenen Fläche konnten die Zellzahlen pro Fläche für die beiden Zellgrößen ermittelt werden.

#### **2.2.5. Statistische Auswertung**

Alle quantitativen Resultate sind in den Grafiken als Mittelwerte mit den errechneten Standardabweichungen aus den jeweiligen Einzelwerten dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels statistischer Analyse (two-way ANOVA, analysis of variance) untersucht, gefolgt von einem Bonferroni-Test zur Ermittlung der statistischen Aussagekraft der Messreihen untereinander.

Mittels eines definierten Signifikanz-Niveaus  $p$  wurde analysiert, ob der ermittelte Unterschied statistisch signifikant ist oder nicht. Das statistische Signifikanzniveau wurde in der Auswertung auf einen Wert  $p < 0,05$  festgelegt. Die statistische Analyse erfolgte unter Nutzung der GraphPad Prism 6 Statistik Software, die im Internet als Freeware Programm genutzt werden kann.

### 3. Ergebnisse

Die Analyse und Auswertung der zur Verfügung stehenden Paraffin-Dünnschnitte erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurde mittels einer Hämalaun-Eosin Färbung eine bildgebende Darstellung des sich entwickelnden Fettgewebes erzeugt und unter dem Mikroskop der zeitliche Verlauf der zunehmenden Bildung von reifen Adipozyten aus den unreifen Adipozyten untersucht. Auf Basis der Resultate konnten in Schritt zwei durch Histomorphometrie an den Gewebeproben die jeweiligen Zellzahlen extrahiert und quantitativ erfasst werden, wobei mittels Größendifferenzierung nach Zellen mit Durchmessern kleiner 20µm und Zellen mit größeren Durchmessern zwischen unreifen und reifenden bzw. ausgereiften Adipozyten unterschieden wurde.

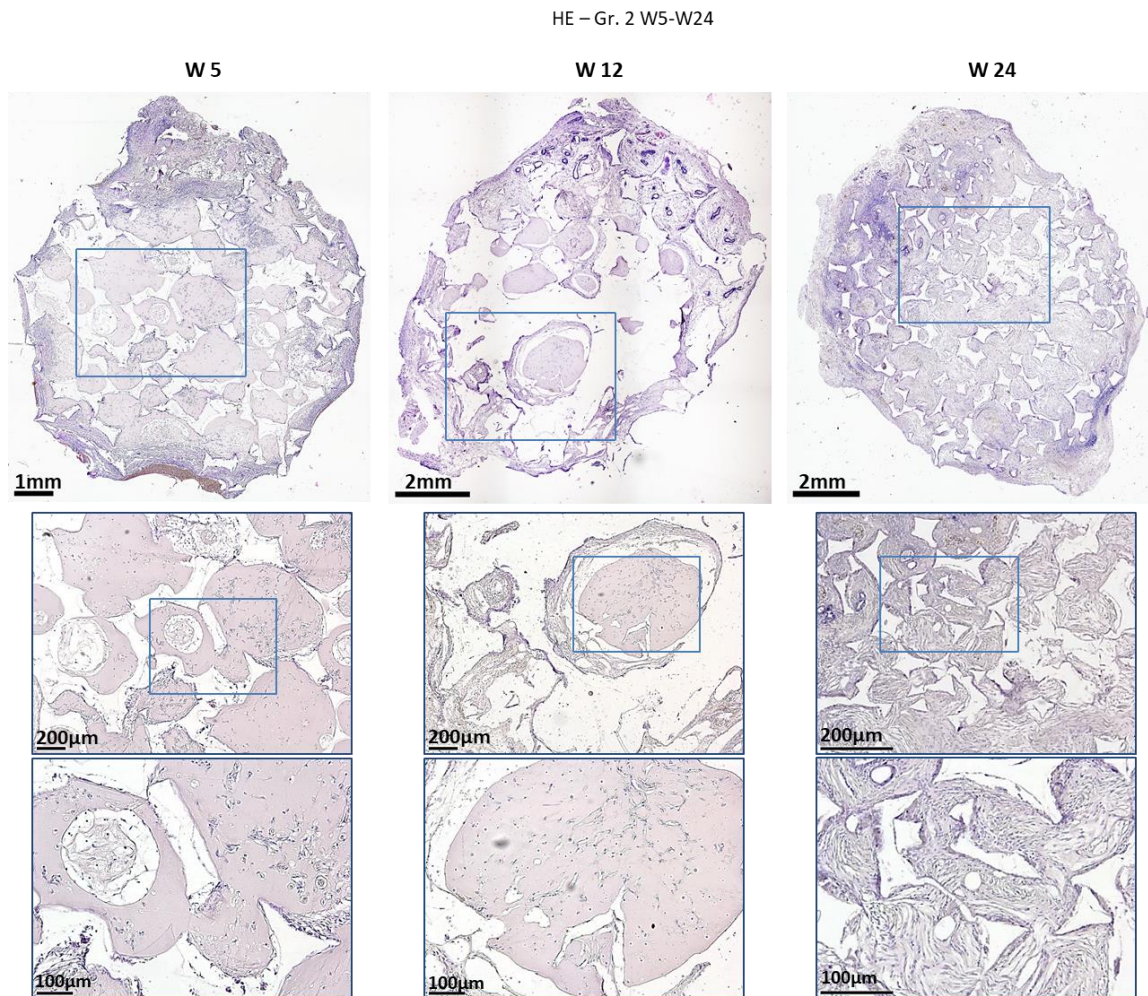
Die Auswertung erfolgte durch Darstellung der Zellzahlen der jeweiligen Spezies in Anzahl an Zellen pro Fläche sowohl als Gesamtzellzahl als auch spezifisch für die jeweiligen Zellgrößen pro Gruppe nach den unterschiedlichen Reifungszeiten *in vivo*. In Schritt drei wurde durch eine immunohistochemische Analyse mittels Fluoreszenzmarkierung die Expressierung von verschiedenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix untersucht. Die dabei eingesetzten Antikörper mit Fluoreszenzmarker waren spezifisch zur Markierung von Kollagen I, Kollagen IV, Kollagen VI und Laminin ausgewählt worden. Dadurch sollte die Entwicklung der Extrazellulärmatrix in den sich entwickelnden Geweben dargestellt und dabei untersucht werden, inwieweit sich die Ausbildung fettspezifischer Komponenten der EZM mit der Entwicklung reifer Adipozyten korrelieren lässt.

### **3.1. Ergebnisse der Hämalun-Eosin (HE) Färbung**

Die Entwicklung des Fettgewebes stellte sich dabei in einer unterschiedlichen Intensität dar, je nachdem welche Vorkultivierung die auf einer Trägermatrix aus Polyurethan (PU) aufgetragenen Präadipozyten vor ihrer Implantation in das Mausmodell erfahren hatten. Dazu dienten die von Frau H. Mayer in ihrer Dissertation hergestellten Gewebeproben [105] auf den Objektträgern.

Auf den nach dem Standard-Protokoll gefärbten HE-Bildern stellen sich folgende Strukturen typischerweise dar. Angeschnittene Gefäßstrukturen, wie beispielsweise die im Mausmodell zwischen den mit Präadipozyten beimpften PU-Konstrukten angeschlossene V. oder A. femoralis, lassen sich deutlich durch die größeren Strukturen und den im großen Lumen befindlichen Erythrozyten erkennen, die in der Mikroskop-Aufnahme rötlich und ohne blau gefärbte Zellkerne erscheinen. Daneben sieht man insbesondere in den gefärbten Proben aus Woche 12 bzw. Woche 24 ein faserartig ausgebildetes Bindegewebe, welches sich zwischen den anderen Gewebsstrukturen gebildet hat. Ebenso lassen sich kleinere durch Neoangiogenese neugebildete Gefäßstrukturen unterscheiden. Wichtig war es, in den verschiedenen Gruppen entsprechend ihrer Vorkultivierung und den zu unterschiedlichen Wochen aus den Mäusen explantierten Proben, die Entwicklung und Lokalisation der reifen Adipozyten anhand von HE-Bildern festzustellen.

Unreife lassen sich von reifen Adipozyten dabei durch ein weitaus kleineres Lumen sowie einer eher kugelförmigen Struktur mit einem in der Mitte befindlichen und durch die Eosin-Behandlung blaugefärbten Zellkern unterscheiden, während Fettgewebe aus reifen Adipozyten vor allem durch die typische, Vakuolen-reiche Struktur erkennbar ist. Durch das lipidreiche Zytoplasma, welches nicht an die farbgebenden Moleküle bindet, erscheinen die Fettzellen wie eine große leere Vakuole siegelringförmig, mit einem typisch an die Zellmembranseite gedrückten, bläulichen Zellkern.



**Abb. 6:** HE-Anfärbungen von Gewebe-Dünnschnitten exemplarisch anhand von Konstrukten der Gruppe 2 nach 5, 12 und 24 Wochen. Es ist auch in der Vergrößerung vorwiegend faser- und netzartiges Bindegewebe zu erkennen. Dagegen liegen wenige, vereinzelte Adipozyten vor. Für eine erfolgreiche Adipogenese ist allerdings kein Anhaltspunkt vorhanden.

Auf den Bildern in Abb. 6 wurden exemplarisch in verschiedenen Bild-Vergrößerungen die Entwicklung von Bindegewebe durch Neovaskularisation vor allem im zentralen Teil des Konstrukts, hier beispielhaft anhand der Gruppe 2 in Woche 5, 12 sowie 24, dargestellt, um eine eventuelle Adipogenese sichtbar zu machen. In Woche 5 ist vor allem noch ein Großteil der Polyurethan-Struktur sowie die in Fibrin eingebetteten Zellen zu erkennen. In Woche 12 hat sich vor allem in den Randbezirken Endothel- und Fibroblasten-reiches Bindegewebe entwickelt. Im mittleren Bereich erkennt man immer mehr eine Umwandlung bzw. eine Reduktion der Fibrinkleber-Strukturen hin zu einem

Umbau in faserreiches Bindegewebe. Eine deutlich detektierbare Entwicklung von unreifen hin zu reifen Adipozyten ist dagegen kaum vorhanden. In Woche 24 hat im zentralen Bereich des Scaffolds vereinzelt eine Entwicklung von unreifen zu reifen Adipozyten stattgefunden. Eine großflächig verteilte Struktur eines durch Adipogenese entstandenen Fettgewebes ist jedoch eher an Randstellen zu sehen und kommt daher sehr wahrscheinlich vom Versuchstier. Analoge mikroskopische Ergebnisse zeigten sich in dieser Art auch in Gruppe 1 und Gruppe 3.

Abb. 7 zeigt nun im Unterschied Gruppe 4 nach 1, 5, 12 und 24 Wochen. In dieser Gruppe fand vor Implantation der Konstrukte in die jeweiligen Nacktmäuse zur Vorkultivierung, neben einer zweitägigen Inkubation und Induktion, noch eine anschließende 33-tägige Differenzierung der Proben statt.

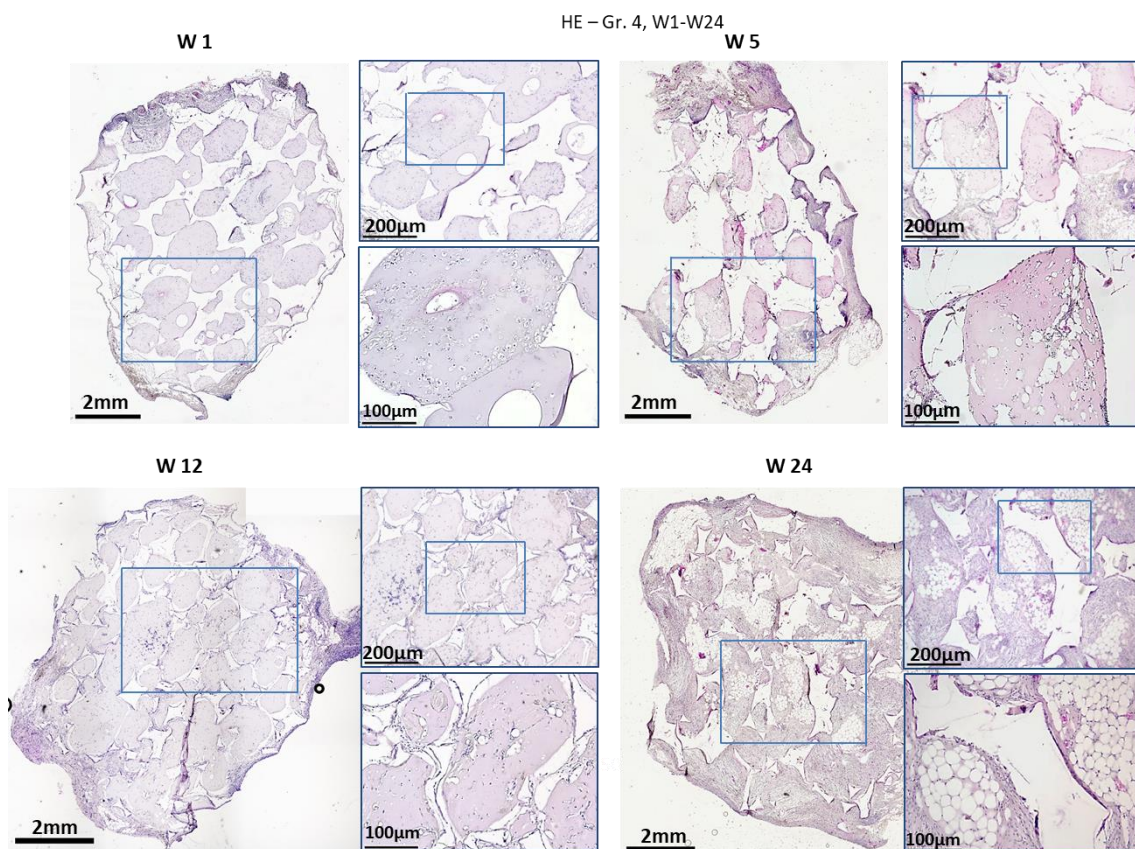
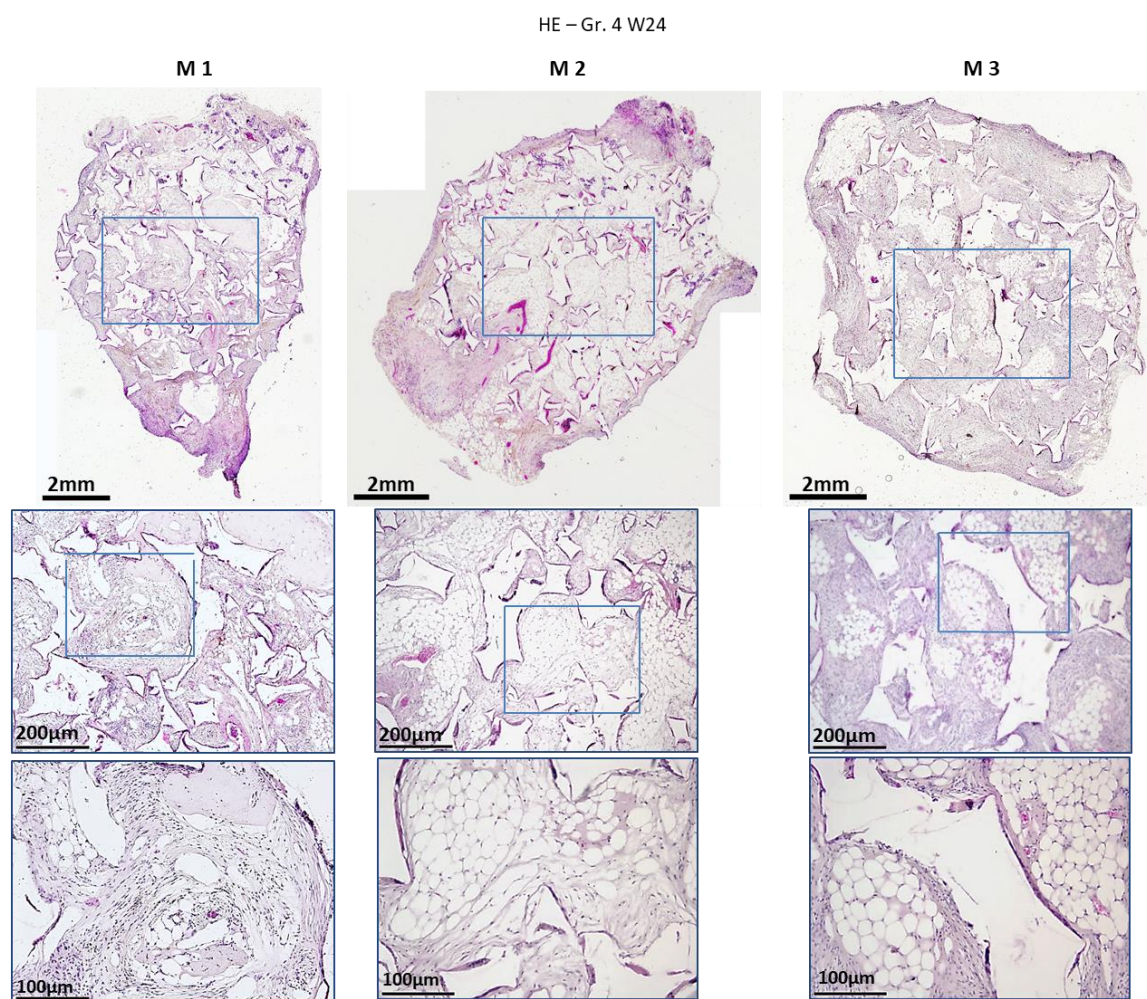


Abb. 7: HE-Anfärbungen von Gewebe-Dünnschnitten aus Gruppe 4 nach 1, 5, 12 und 24 Wochen. Während in den ersten Wochen noch kaum eine Reifung der unreifen zu reifen Adipozyten erkennbar ist, ist nach 24 Wochen eine deutliche Adipogenese in den Proben sichtbar

Anhand Abb. 7 ist in Woche 5, ähnlich wie in den Gruppen 1 bis 3, ein allmählicher Umbau des Konstrukts zu erkennen. In Woche 12 nimmt dieser noch deutlich hinsichtlich der Bildung von Bindegewebe und einer Angiogenese zu. Auch lassen sich bereits einzelne Adipozyten in zentralen Teilen des Schnittes feststellen. In Woche 24 kann nun eine deutliche Adipogenese beobachtet werden, welche sich homogen im gesamten Konstrukt verteilt. Dabei zeigen sich, wie in Abb. 8 dargestellt, sowohl in der von Maus 1, als auch der von Maus 2 und Maus 3 entnommenen Probe vergleichbare Ergebnisse, womit sich dieses Resultat als charakteristisch für Gruppe 4 darstellt.



**Abb. 8:** Gewebe-Dünnschnitte nach HE-Anfärbung aus den verschiedenen Mäusen mit Konstrukten der Gruppe 4 nach einer Reifung *in vivo* nach 24 Wochen. Es ist in allen Proben, insbesondere aber in denen aus Maus 2 und 3, eine deutliche Adipogenese unter Bildung von reifen Adipozyten sichtbar



Dies konnte reproduzierbar in allen für die Färbeprozesse herangezogenen Paraffin-Dünnschnitte der Gewebeproben aus Gruppe 4 nach einem Verbleib von 24 Wochen ermittelt werden.

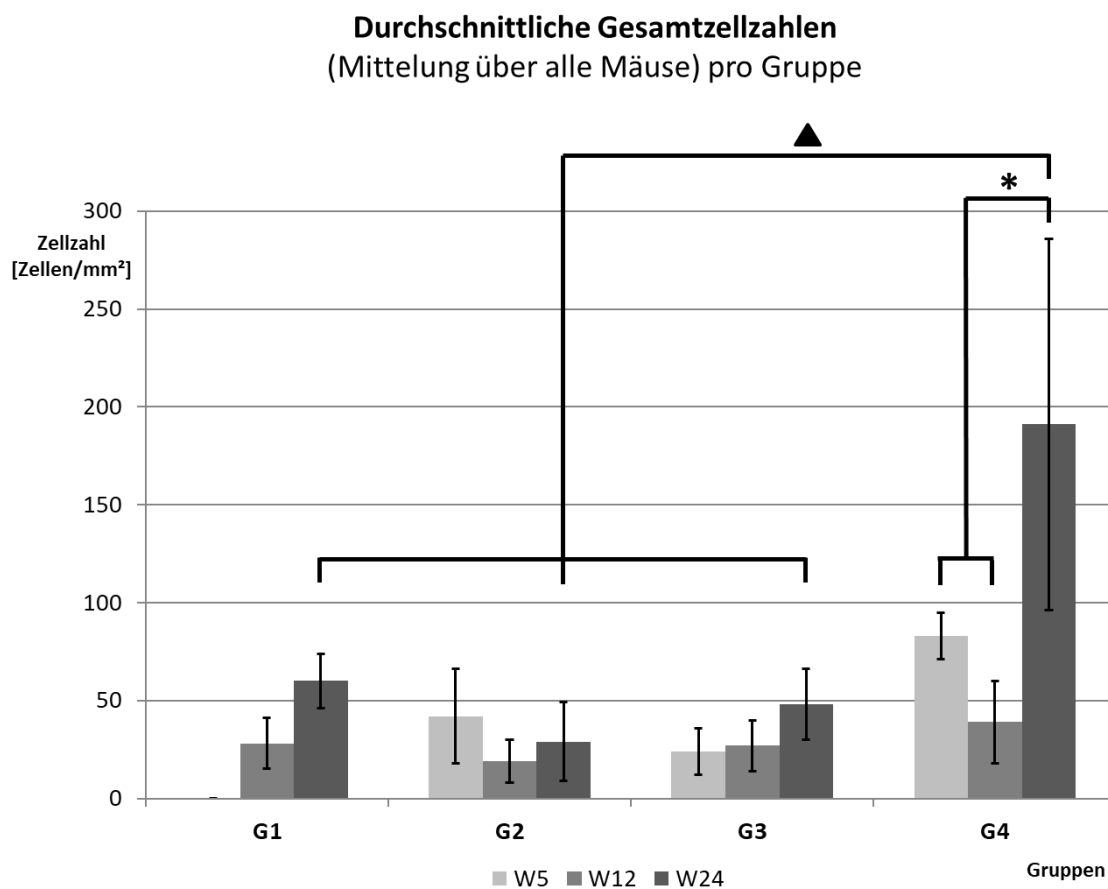
### **3.2. Histomorphometrie der Gewebeproben, Analyse der Bildung von Adipozyten**

Ein Ziel dieser Arbeit war mit den gewählten Methoden und Auswertungen quantitativ zu ermitteln, inwieweit sich die Zellen innerhalb der verschiedenen Gruppen nach den verschiedenen Zeiträumen der Kultivierung *in vivo* entwickelt haben. Anders als in der Vorgängerarbeit von Frau H. Mayer [105] wurden hier nun alle adipogenen Zellen in die Auswertung mit einbezogen. Demnach lag ein Hauptaugenmerk darauf, ob und wie sich auch unreife Adipozyten in den unterschiedlichen Konstrukten in ihrer Anzahl entwickelt haben und ob sich demzufolge eine Tendenz hinsichtlich der Bildung von Fettgewebe bzw. reifer Adipozyten für die Gruppen 1-3 zu einem noch späteren Zeitpunkt als in Woche 24 erwarten lässt.

Dazu wurden für die quantitative Auswertung jeweils die einzelnen HE-gefärbten Bilder herangezogen. Es wurden dabei neben den typischen reifen Adipozyten, die sich durch den an den Rand gedrängten Zellkern gut erkennen ließen, auch die unreifen Adipozyten mit einem in der Mitte befindlichen, violett gefärbten Zellkern gezählt. Dadurch konnte eine durchschnittliche Zellzahl an Adipozyten aller 4 Gruppen nach den entsprechenden Wochen *in vivo* ermittelt und grafisch dargestellt werden. Daneben war aber auch zu analysieren, wie viel Anteil an dieser Gesamtzellzahl die schon reifen Adipozyten haben und wie das Verhältnis zu unreifen Adipozyten ist. Demzufolge ergaben sich zwei weitere Grafiken, welche einerseits die durchschnittliche Zellzahl der Zellen kleiner 20µm und andererseits größer 20µm für die jeweiligen Gruppen in den Wochen 5, 12 und 24 abbilden.

Aus den Gewebeproben der Mäuse nach der Kultivierung in einer Zeitdauer von 5, 12 und 24 Wochen lassen sich mit den zugehörigen Flächenmaßen die Zellzahlen der jeweiligen Zellgrößen pro Fläche berechnen. Aus den

resultierenden Zellzahlen der einzelnen Mäuse einer Gruppe nach der Kultivierungszeit ergibt sich jeweils ein Mittelwert sowie die zugehörige Standardabweichung. Diese Werte wurden dann in der Folge zur Erstellung der Diagramme für die Zellzahlen pro Zellgröße sowie der gesamten Zellzahl herangezogen und die Standardabweichungen als Fehlerbalken in die Balkendiagramme eingefügt. Dazu wurden im Diagramm auch die Resultate der statistischen Auswertung angegeben.

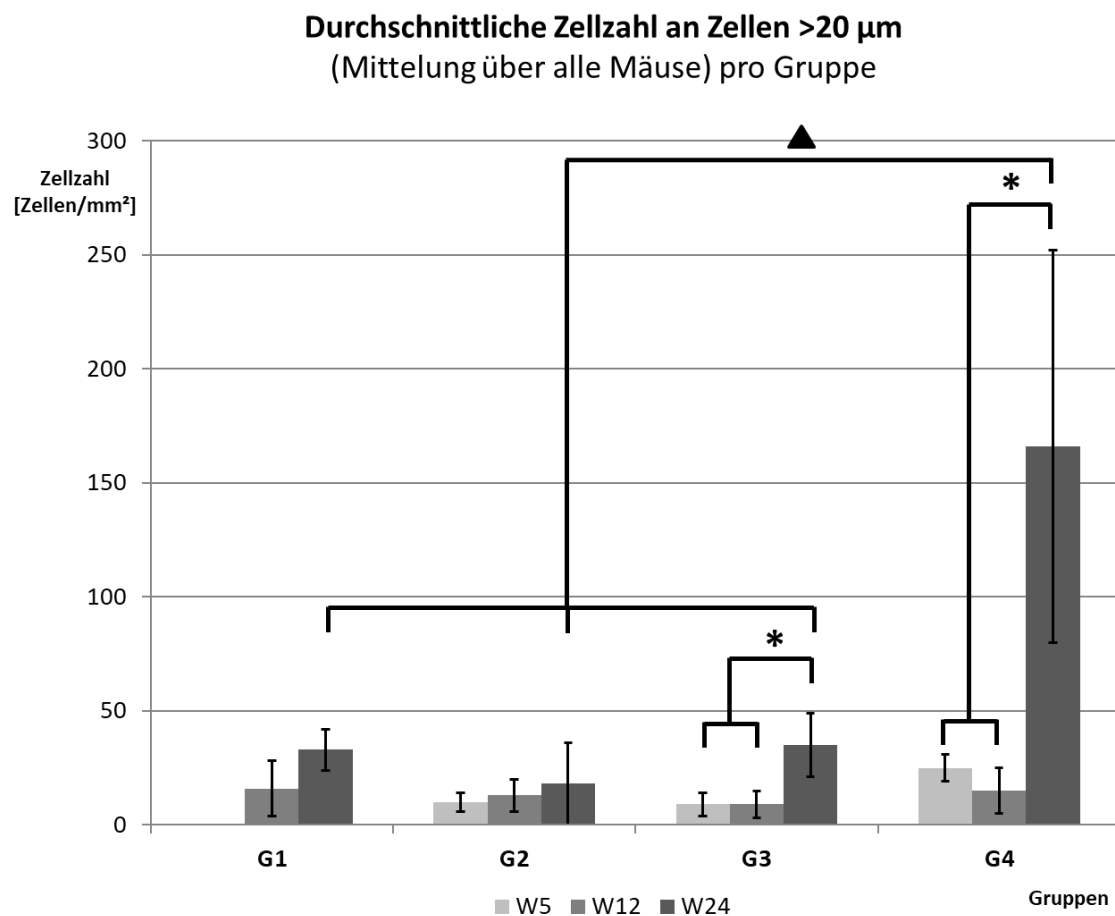


**Abb. 9:** Darstellung der durchschnittlichen Gesamtzahl an Adipozyten pro Gruppe, gemittelt über alle Gewebeproben der jeweiligen Mäuse nach den verschiedenen Kultivierungszeiten *in vivo*. Die absolut höchste Zellzahl für die jeweilige Anzahl an Wochen haben die Proben aus Gruppe 4. \* Statistisch signifikanter Unterschied aus der unterschiedlichen Verbleibszeit *in vivo* (Woche 5 bis 24) der Konstrukte für G4 ( $p < 0,05$ ). ▲ statistisch signifikanter Unterschied für Woche 24 aus der unterschiedlichen Vorkultivierung der Proben für G4 im Vergleich zu den anderen Gruppen ( $p < 0,05$ ).

Betrachtet man zunächst die Darstellung aller gezählten, adipogenen Zellen, so fällt der Verlauf vor allem für Gruppe 4 auf. Bereits in Woche 5 zeigt sich die relativ höchste Zellzahl im Vergleich zu den anderen Proben aus den Gruppen 1 – 3. Die absolut höchste Zellzahl in der Gruppe 4 ist nach 24 Wochen zu erkennen. Während in den Gruppen 2 und 3 die Zellzahl insgesamt stagniert, steigt sie in Gruppe 1 etwas an, wobei in Woche 24 die höchste Zellzahl resultiert. In Gruppe 1 lag für die Woche 5 leider kein Gewebestück vor, weswegen hier kein Wert angegeben werden konnte. Die Zellzahl in Woche 24 ist für Gruppe 1 aber absolut betrachtet deutlich kleiner als die von Gruppe 4 nach 24 Wochen.

In der Varianzanalyse (two-way ANOVA) ergibt sich, dass die Verbleibszeit (Wochen 5, 12, 24) für G4 einen signifikanten Unterschied zeigt ( $p < 0,05$ ). Der Bonferroni-Test ergibt, dass bei einem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  nur die Ergebnisse für Woche 24 der Gruppe 4 im Vergleich zu den anderen Gruppen statistisch signifikant sind.

Bei der Quantifizierung der Zellzahl an Adipozyten ist es wichtig, zwischen den Zellgrößen zu unterscheiden, da so die Analyse dann differenziert nach den deutlich kleineren unreifen Adipozyten (Zelldurchmesser  $< 20\mu\text{m}$ ) und den größeren reifen Adipozyten (Zelldurchmesser  $> 20\mu\text{m}$ ) vorgenommen werden kann. In der Folge wird zunächst die Zellzahl resultierend aus Zellen mit Durchmessern  $> 20\mu\text{m}$  (reife Adipozyten) und dann die Zellzahl bestehend aus Zellen mit Durchmessern  $< 20\mu\text{m}$  (unreife Adipozyten) dargestellt.



**Abb. 10:** Darstellung der durchschnittlichen Zellzahlen an Adipozyten der Gruppen 1 – 4 nach 5, 12 und 24 Wochen resultierend aus Zellen mit Größen > 20µm, gemittelt über alle Mäuse pro Gruppe. Während in Gruppe 2 die Zellzahl stagniert und in den Gruppen 1 und 3 eventuell ein leichter Anstieg der Anzahl an großen Zellen zu erkennen ist, steigt die Zellzahl in Gruppe 4 in der Woche 24 deutlich an und erreicht relativ zu allen Proben die absolut höchste Zellzahl. \* statistisch signifikanter Unterschied aus der unterschiedlichen Verbleibszeit *in vivo* der Konstrukte ( $p < 0,05$ ) für die Gruppen G3 und G4. ▲ statistisch signifikanter Unterschied aus der unterschiedlichen Vorkultivierung der Proben in Woche 24 für G4 im Vergleich zu den anderen Gruppen ( $p < 0,05$ ).

In Abbildung 10 wird deutlich erkennbar, dass der große Balken von W24 für Gruppe 4 der in Abbildung 9 ermittelten Gesamtzellzahl an Adipozyten hauptsächlich aus den reifen Adipozyten resultiert. Hier ist der Unterschied im Vergleich zu den anderen Gruppen für Woche 24 sehr auffällig. Die Zahl der Zellen größer als 20µm steigt im Laufe der Wochen auch bei Gruppe 3 etwas an. Gruppe 4 verzeichnet anfänglich in den Wochen 5 und 12 eine vergleichsweise geringe Anzahl ausdifferenzierter Adipozyten, was sich dann

allerdings in Woche 24 deutlich sichtbar ändert. Dabei ist auch die Differenz von Woche 12 zur 24. Woche vergleichsweise zu den übrigen Gruppen am größten.

Die statistische Analyse (two-way ANOVA, Signifikanz-Niveau  $p < 0,05$ , Tabelle im Anhang) ergibt, dass es für die Gruppen 3 und 4 Unterschiede durch die Verbleibszeit (Wochen 5, 12, 24) der Konstrukte *in vivo* gibt. Diese Unterschiede sind statistisch signifikant, da die resultierenden Werte unter dem definierten Signifikanz-Niveau liegen. Dagegen zeigt der Bonferroni-Test, ebenfalls mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ , dass auch hier nur beim Vergleich der Resultate für Woche 24 von Gruppe 4 mit jeweils den anderen Gruppen das gesetzte Signifikanz-Niveau erreicht wird.

In der dritten grafischen Darstellung, welche die Resultate für die Zellzahlen kleiner  $20\mu\text{m}$  zeigt, fällt optisch zunächst auf, dass in den Gruppen 2 und 4 - Gruppe 1 ist wie erwähnt ausgeschlossen, da in der Vorgängerarbeit die Proben der Woche 5 fehlten - der Anteil adipogener Zellen in Woche 5 relativ am höchsten ist und dann zurückgeht.

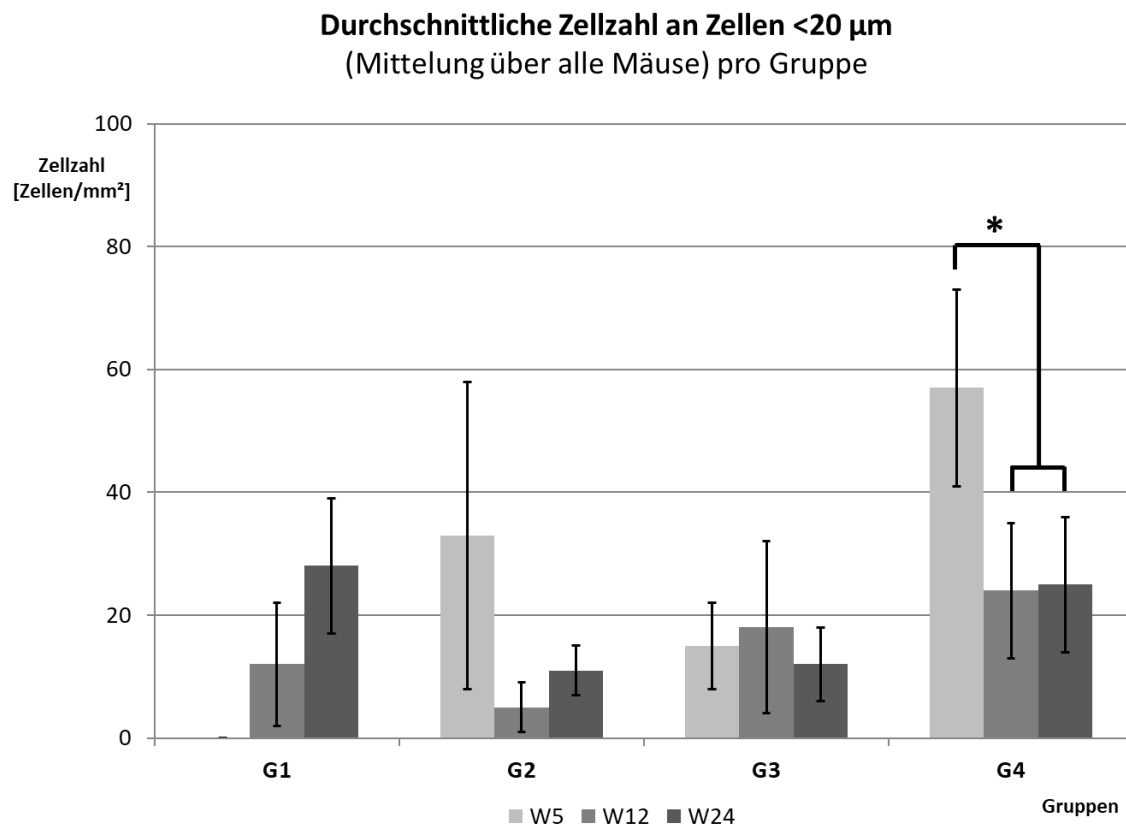


Abb. 11: Darstellung der durchschnittlichen Zellzahl an Adipozyten resultierend aus Zellen der Größe <20 $\mu\text{m}$  und damit von noch nicht ausgereiften Adipozyten. Für Gruppe 1 lag für Woche 5 keine Probe vor. In den Gruppen 2 und 4 ist in Woche 5 eine vergleichsweise eine hohe Anzahl an unreifen Adipozyten erkennbar, während diese Zahl in Gruppe 3 über den Betrachtungszeitraum in etwa gleichbleibt. \* statistisch signifikanter Unterschied nur aus der unterschiedlichen Verbleibszeit (Woche 5 gegenüber Woche 12 und 24) der Proben für G4 ( $p < 0,05$ ).

Die statistische Analyse (two-way ANOVA, Signifikanz-Niveau  $p < 0,05$ ) zeigt hier allerdings, dass für die Zahl der unreifen Adipozyten der Vergleich der Gruppen nach den jeweiligen Wochen das Signifikanz-Niveau nicht erreicht. Nur für die Proben aus G4 resultiert für die Verbleibszeiten (Woche 5 gegenüber den Wochen 12 und 24) *in vivo* ein Signifikanz-Niveau von  $p < 0,05$ .

### **3.3. Immunohistochemische Analyse der entstandenen Bestandteile der extrazellulären Matrix EZM bei der Adipogenese**

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die qualitative immunohistochemische Analyse von typisch im Zuge der Adipogenese vorkommenden EZM-Proteinen, welche eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung der Vorläuferzellen und Bildung von Fettgewebe spielen. Untersucht wurde hierbei der zeitliche und qualitative Verlauf der in der EZM vorkommenden Kollagene I, IV, VI sowie von Laminin in den einzelnen Gruppen 1-4.

Der immunofluoreszierende Stoff DAPI bindet selektiv an die DNA-Strukturen im Zellkern, die dann im Mikroskop und in den Aufnahmen blau erscheinen. Es wurde jeweils wieder für alle Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten (Woche 1, Woche 5, Woche 12 und Woche 24) die Antikörper gegen die jeweiligen zu untersuchenden Marker (entweder Anti-Col I, Anti-Col VI, Anti-Col IV oder Laminin) benutzt, um eine immunfluoreszierende Rotfärbung der in den Strukturen befindlichen Proteine des jeweiligen Typs zu erzielen.

#### **3.3.1. Ausbildung von Kollagen I**

Da Kollagen I als Strukturprotein ein wichtiger Bestandteil der EZM u.a. von Fettgewebe ist, war die Aufgabe den zeitlichen sowie qualitativen Verlauf dessen Konzentration in den Gewebeschnitten zu untersuchen.

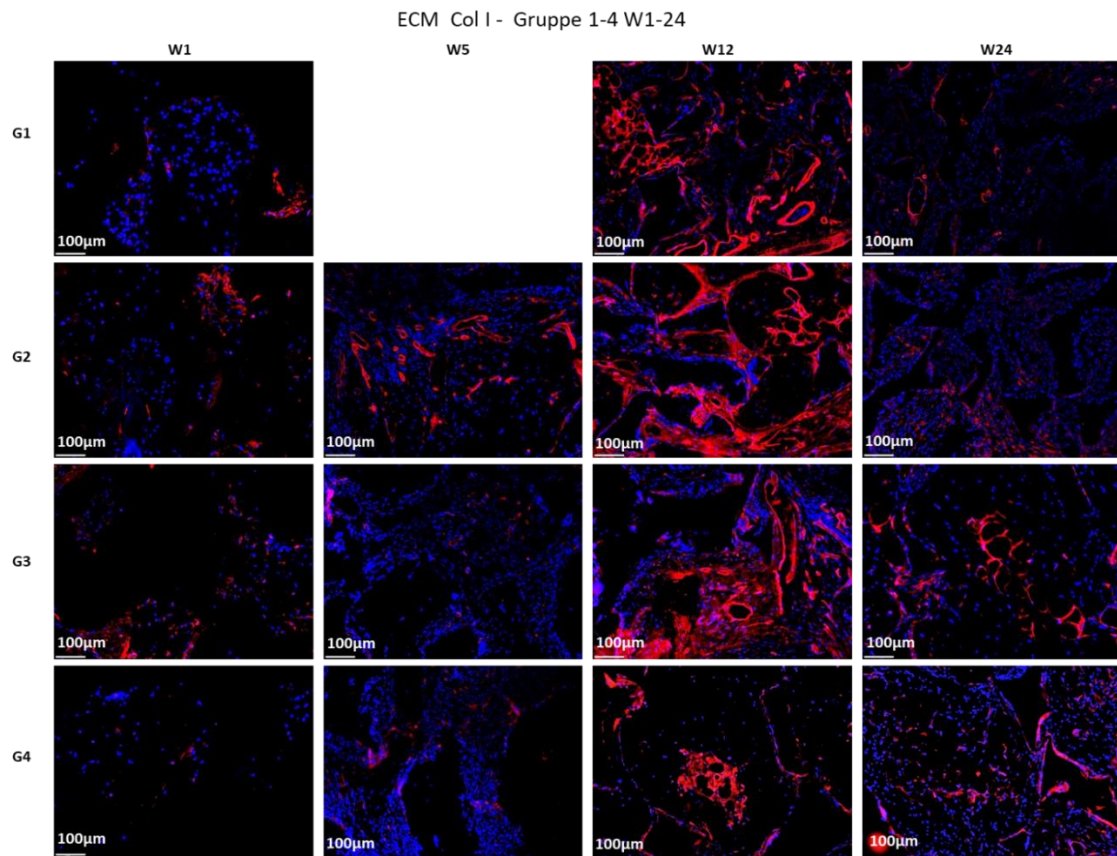


Abb. 12: Immunohistochemische Darstellung der Kollagen I spezifisch angefärbten Gewebeproben der verschiedenen Gruppen nach den unterschiedlichen Kultivierungszeiten *in vivo*. Deutlich ist in allen Gruppen anhand der Fluoreszenz der Anstieg an gebildetem Kollagen I bis zur Woche 12 zu erkennen, bevor die Konzentration in den Proben bis Woche 24 wieder etwas zurückgeht. Für Woche 5, Gruppe 1 lag keine Probe vor.

Anders als bei den Proteinen, welche vornehmlich in der Basalmembran des Fettgewebes zu finden sind, kann bei Col I schon in Woche 1 eine erste rote Immunofluoreszenz detektiert werden, obwohl keine eindeutige Struktur zu erkennen ist, sondern es sich lediglich um diffus verteilte, einzelne punktförmige Signale handelt. In Woche 5 steigt die Fluoreszenz weiter an. Die gefärbten Abbildungen aus der nach 12 Wochen explantierten Proben zeigen dann einen signifikanten Zuwachs der Kollagen I spezifischen Fluoreszenz, so dass nun in allen 4 Gruppen ein Anstieg der Konzentration von Kollagen I sichtbar wird, da die Konstrukte jetzt intensiv rotgefärbt sind.

Die Signalstärke ist dabei in allen Gruppen ähnlich, wobei vorwiegend faserartige Strukturen zu erkennen sind. Die immunohistochemisch gefärbten



Bilder der 24. Woche zeigen dann wieder einen leichten Abfall des Signals. Auffällig ist die hohe Zelldichte in den Konstrukten, die anhand der DAPI-gefärbten Zellkerne zu erkennen ist. Adipogene Strukturen lassen sich dabei lediglich aufgrund der Anordnung der blau gefärbten Zellkerne erahnen. (z.B. Abb. Gr. 4, Woche 24).

### 3.3.2. Ausbildung von Kollagen IV

Nach der ersten Woche ist in allen gefärbten Schnitten lediglich eine immunfluoreszierende Blaufärbung anhand von Zellkernen durch die mit einem Fibrinkleber-Zellgemisch besiedelten Proben zu erkennen.

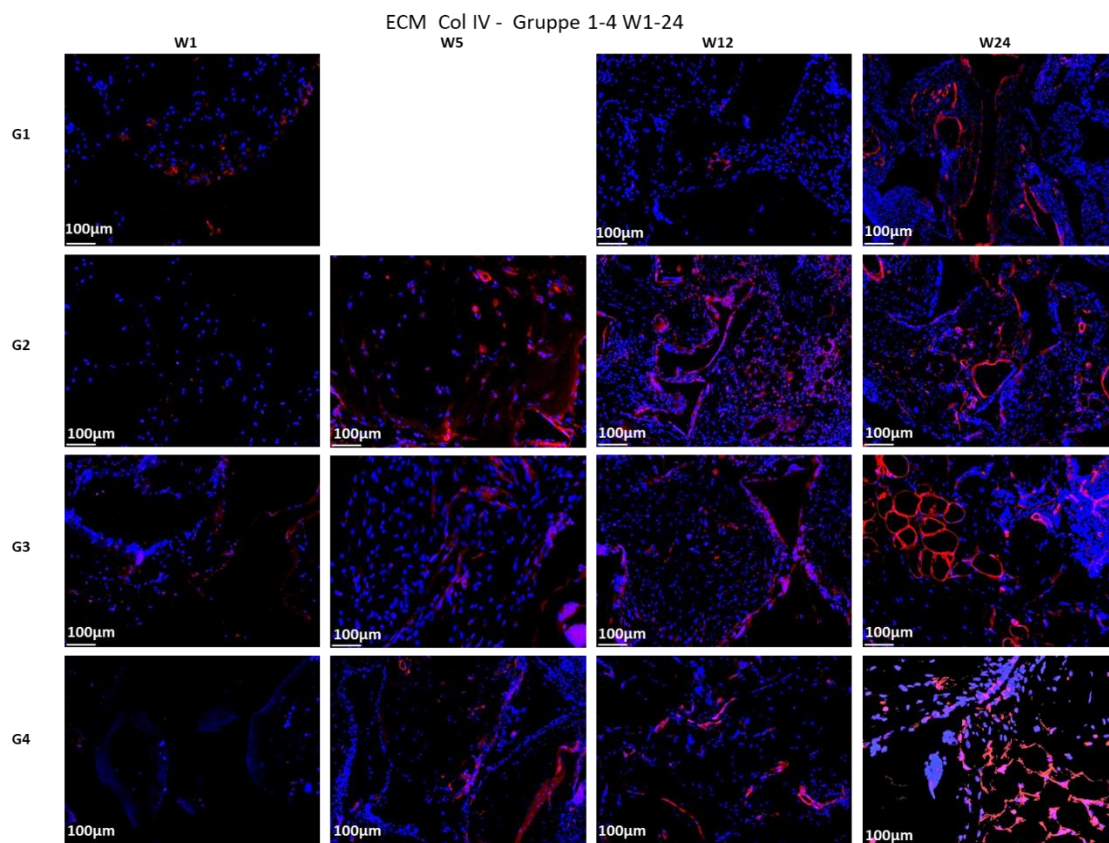


Abb. 13: Immunohistochemische Darstellung der Kollagen IV spezifisch angefärbten Gewebeproben der verschiedenen Gruppen nach den unterschiedlichen Kultivierungszeiten *in vivo*. Es ist eine langsame Zunahme der Fluoreszenz in den Gruppen bis zur Woche 24 zu erkennen. In Woche 24 liegen dann insbesondere für G3 und G4 netzartige Strukturen vor. Für Woche 5, Gruppe 1 lag keine Probe vor.

In Abb. 13 (Col IV) erscheinen die zum Zeitpunkt der Woche 1 und 5 histologisch untersuchten Proben allgemein in allen 4 Gruppen ähnlich signalschwach. Zwar kann man in Gruppe 2 im Vergleich zu den anderen Gruppen (wobei wie erwähnt die Analyse der Gruppe 1 aufgrund fehlender Proben aus Woche 5 ausgeschlossen werden musste) eine tendenziell stärkere Rotfärbung einzelner Strukturen verzeichnen, jedoch lässt sich insgesamt, verglichen mit den immunfluoreszierenden Darstellungen aus Woche 1, kein eindeutiger Signalzuwachs ermitteln. Auch Woche 12 ist hinsichtlich einer Zunahme der Signalstärke oder homogenen Verteilung einer Rotfärbung unauffällig.

Erst in Woche 24 ist in den 4 Gruppen eine Zunahme des Signals erkennbar. Die Rotfärbung lässt zum Teil (Gruppe 3 und Gruppe 4) den strukturell typischen, netzartigen Aufbau für gebildetes Fettgewebe erkennen. Hervorzuheben sind hier eindeutig in der Abbildung Gruppe 3 und 4, welche durch die intensive rotleuchtende Färbung auffallen. In diesen Gruppen ist der zeitliche Verlauf ausgehend von Woche 1 bis hin zu Woche 24 optisch am deutlichsten hinsichtlich der Ausbildung einer netzartig strukturierten Verteilung von Kollagen IV.

### **3.3.3. Ausbildung von Kollagen VI**

Bereits auf den gefärbten Abbildungen der nach einer Woche explantierten Konstrukten kann man ein vereinzelt Vorhandensein von Kollagen VI erkennen, da sich erste diffus verteilte, rote Strukturen abzeichnen.

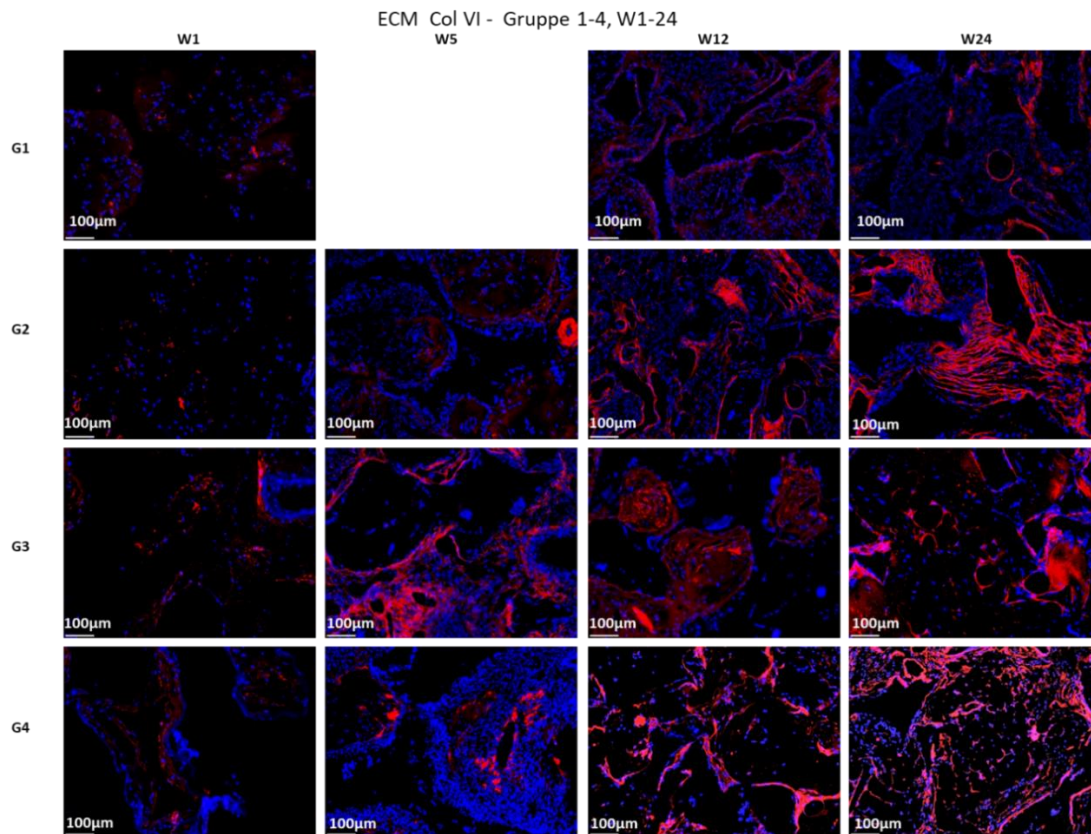


Abb. 14: Immunohistochemische Darstellung der Kollagen VI spezifisch angefärbten Gewebeproben der verschiedenen Gruppen nach den unterschiedlichen Kultivierungszeiten *in vivo*. Es ist deutlich ein zunehmender Anstieg der rot gefärbten Kollagen VI Einheiten zu erkennen. Während in Gruppe 2 eher faserartige Strukturen in Woche 24 sichtbar werden, sind insbesondere in den Gruppen 3 und 4 die Kollagen-Signale erkennbar netzartig verteilt. Für Woche 5, Gruppe 1 lag keine Probe vor.

In Woche 5 wird die Verteilung dagegen homogener und deutlicher. Einzelne Bereiche erscheinen intensiv-rotleuchtend. Besonders in Gruppe 2 und 3 kann man clusterartige Strukturen beobachten, also Anhäufungen von faserartigen Proteinen der EZM, an denen die Antikörper anbinden. Diese dichten Gebilde zeigen die Poren des Polyurethan-Scaffolds. Die Fotografien aus Woche 12 zeigen (bis auf Gruppe 1) eine ähnliche, homogen verteilte Anordnung solcher Cluster. Allen voran sind die Gruppen 2 und 3 auffällig. Die Cluster wirken diesmal allerdings nicht mehr vereinzelt wie noch in Woche 5, sondern erscheinen faseriger bzw. feiner strukturiert. In Woche 24 fällt nochmals eine Steigerung der Immunofluoreszenz auf und es zeichnet sich auf den Bildern

eine Struktur der Adipozyten-Areale insbesondere für Gruppe 4, aber auch für Gruppe 3 ab. Zusammengefasst kann man also sagen, dass ab Woche 5 deutlich ein erstes Vorkommen von Kollagen VI zu erkennen ist, welches über die weiteren Zeiträume stetig zunimmt.

### 3.3.4. Bildung von Laminin

Ein weiterer, zu untersuchender Bestandteil der Extrazellulärmatrix ist Laminin. Durch den Einsatz des Antikörpers „Anti-Laminin“, welcher speziell an Laminin bindet und dieses markiert, konnte durch eine immunfluoreszierende Rotfärbung die Ausbildung dieses Proteins während der Adipogenese unter dem Mikroskop detektiert und analysiert werden.

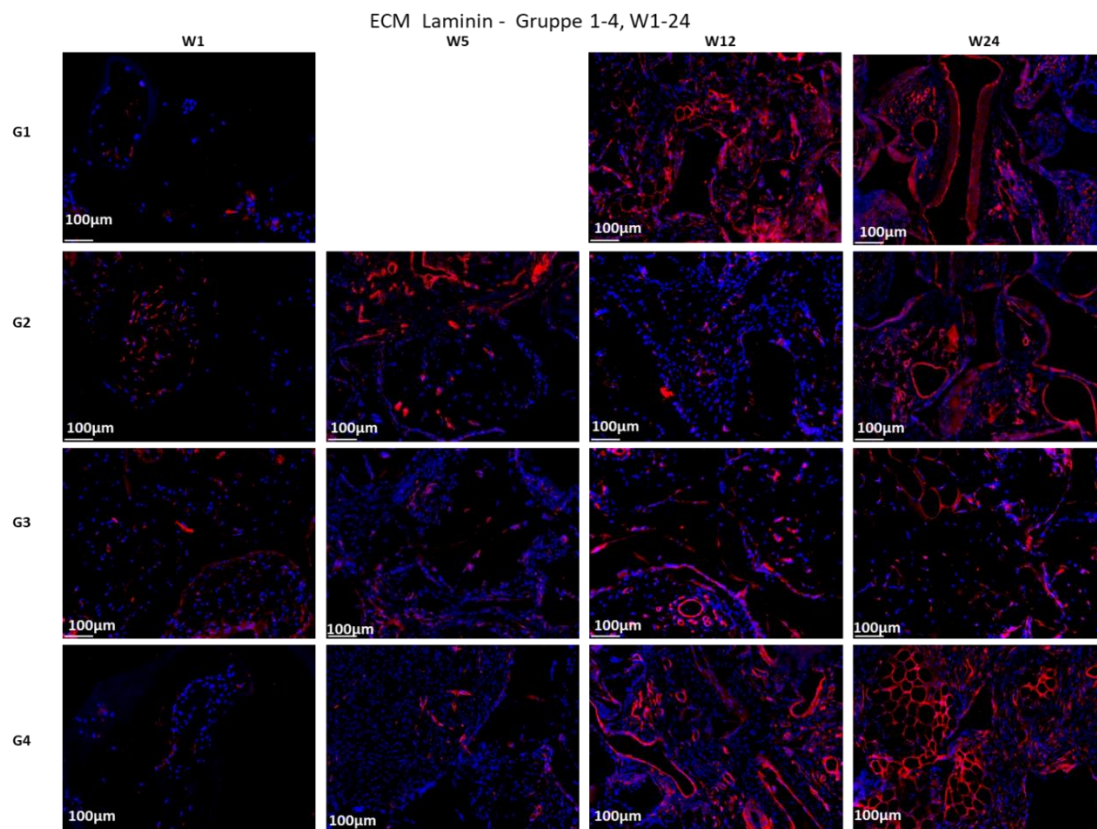


Abb. 15: Immunohistochemische Darstellung der Laminin spezifisch angefärbten Gewebeproben der verschiedenen Gruppen nach den unterschiedlichen Kultivierungszeiten *in vivo*. Deutlich zu erkennen ist der Signalanstieg im Verlauf der Wochen 1 – 24 bei allen Gruppen. Während in Gruppe 4 und eingeschränkt in Gruppe 3 in Woche 24 eine deutlich ausgeprägte netzartige Struktur sichtbar wird, ist in den Gruppen 1 und 2 möglicherweise

vorzugsweise eine Anfärbung von Gefäß- oder Bindegewebsoberflächen erkennbar. Für Woche 5, Gruppe 1 lag keine Probe vor.

In allen 4 Gruppen sind in Abb. 15 die aufgenommenen Bilder aus Woche 1 signalunauffällig. Man kann vereinzelt rote Punkte erkennen, die allerdings auch als zufällige Artefakte erscheinen könnten. Durch die Blaufärbung der Zellkerne, muss ein Gemisch an Zellen in allen Gruppen vorhanden sein. Ein leichter Anstieg der Immunofluoreszenz von Laminin kann in Woche 5 beobachtet werden. Allen voran ist dabei das Ergebnis aus Gruppe 2 am stärksten. Einen noch höheren Signalzuwachs verzeichnen die aus Woche 12 gefärbten Bilder. In allen 4 Gruppen ist eine deutliche Rotfärbung der Strukturen zu sehen. Hier sticht besonders Gruppe 1 hervor, wo Laminin als Bestandteil der EZM eindeutig sichtbar wird. Da Laminin als Bestandteil der Basalmembran sowohl von Adipozyten aber auch der von Blutgefäßen vorkommt, sind die gefundenen Anfärbungen allerdings nur schwer einem dieser beiden Zelltypen fundiert zuzuordnen.

Die Aufnahmen aller Gruppen aus Woche 24 zeigen, verglichen zur Woche 12, nochmals einen Anstieg der Immunofluoreszenz. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich daher erklären, dass sich nach 24 Wochen, Bindegewebe und, wenn auch bis auf Gruppe 4 nur in vereinzelt Bereichen des jeweiligen Konstrukts der Gruppen, sich reife Adipozyten entwickelt und somit Fettgewebsareale entstanden sind. Somit ist insgesamt mehr extrazelluläre Matrix mit ihren Proteinen vorhanden. Besonders Gruppe 4 ragt hier mit seinem im Konstrukt homogen verteilten, adipogenen Gewebe stark hervor. Durch die leuchtende Rotfärbung wird die runde, siegelringförmige Struktur der Adipozyten gut dargestellt.

### **3.4. Darstellung der Fettgewebeentwicklung exemplarisch an Gruppe 4**

Vergleicht man alle Ergebnisse der immunohistochemischen Untersuchungen hinsichtlich des Vorkommens von Kollagen I, VI, IV sowie Laminin als zentrale Bestandteile der EZM für Gruppe 4 in Abhängigkeit von der Entwicklung der

Zellzahlen bezogen auf unreife ( $<20\mu\text{m}$ ) und reife Adipozyten ( $>20\mu\text{m}$ ), so können einige Resultate spezifisch für diese Gruppe herausgearbeitet werden.

In Gruppe 4 war in der histomorphometrischen Auswertung eine Verringerung der Zellzahl der Zellen kleiner  $20\mu\text{m}$  in der Zeit der Kultivierung *in vivo* festzustellen, sowie ein starker Anstieg der Zellzahl resultierend aus reifen Adipozyten (Zellgröße  $>20\mu\text{m}$ ) in Woche 24.

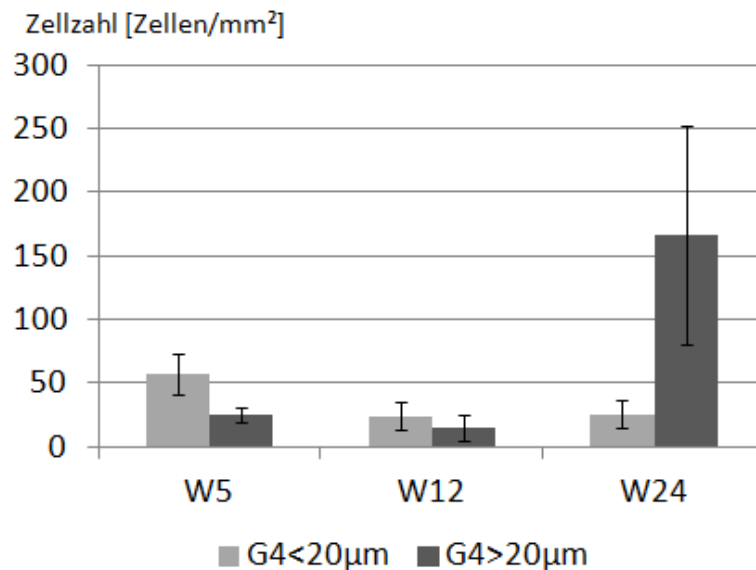


Abb. 16: Entwicklung der Zellzahlen in den Größenkategorien  $<20\mu\text{m}$  (unreife Adipozyten) und  $>20\mu\text{m}$  (reife Adipozyten) für Gruppe 4 nach verschiedenen Zeiträumen der Kultivierung *in vivo*. Während die Anzahl an unreifen Adipozyten im Laufe der Kultivierung *in vivo* kontinuierlich abnimmt, erreicht die Zahl der reifen Adipozyten, nach einem Minimum in Woche 12, ein absolutes Maximum in Woche 24

Aus der histomorphometrischen Analyse der Entwicklung der Zellzahlen an Adipozyten für die Gruppe 4 ist zu erkennen, dass über den gesamten Betrachtungszeitraum *in vivo* eine abnehmende Anzahl an unreifen Adipozyten gefunden wird. Die Anzahl der gefundenen reifen Adipozyten ist in den Wochen 5 und 12 zunächst noch niedrig, erreicht aber in Woche 24 einen sehr hohen Wert. Die Anzahl der gefundenen reifen Adipozyten in Woche 24 ist die höchste aller untersuchten Proben und bestätigt die Ergebnisse der Vorgängerarbeit von Frau H. Mayer [105].

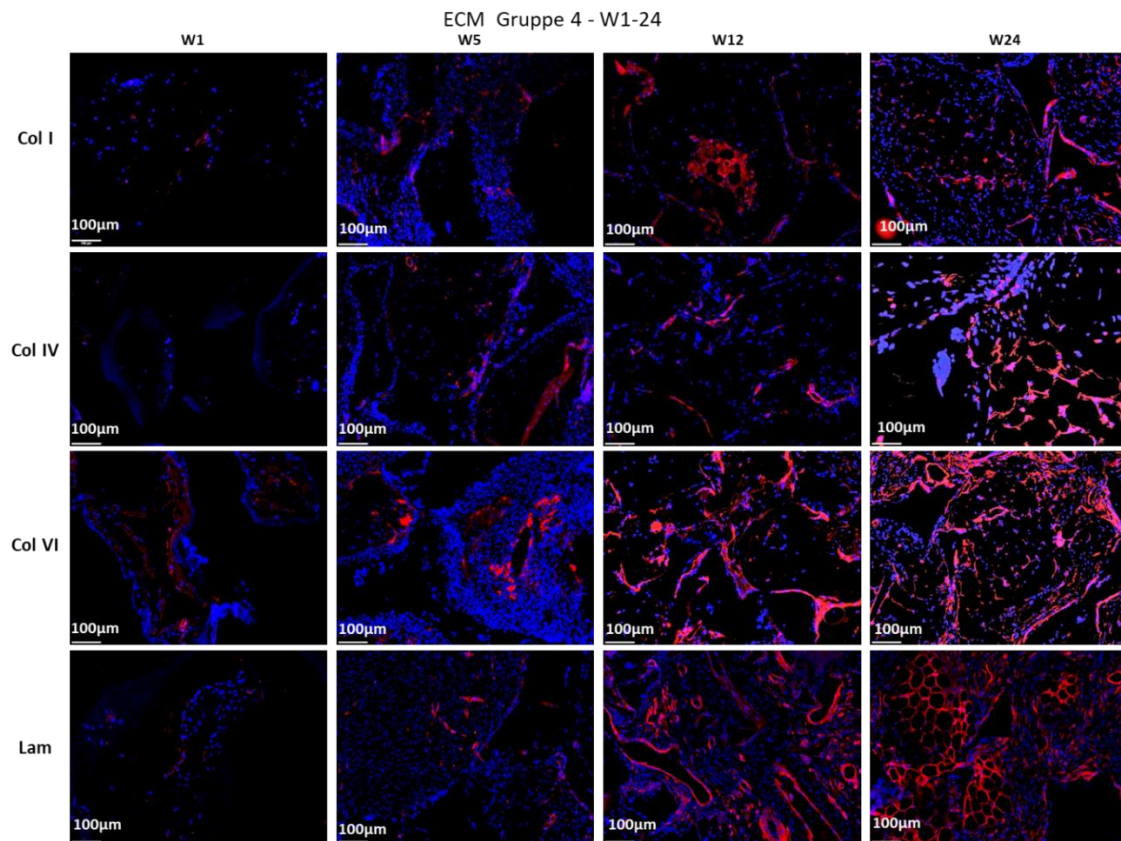


Abb. 17: Darstellung der zeitlichen Entwicklung der Komponenten der EZM (Col I, IV, VI und Laminin) für Gruppe 4. Zu erkennen ist hier eine Zunahme an Col I mit einem maximalen Fluoreszenzsignal in W12 und einem nachfolgenden Rückgang sowie eine Zunahme der Signale für Col VI und insbesondere von Laminin bis zur Woche 24. Die netzartigen Strukturen im Falle von Laminin und für Col IV sind besonders auffällig in Woche 24

Aus der immunohistochemischen Analyse der Entwicklung von Komponenten der EZM über die Zeit der Kultivierung *in vivo* nimmt auch für Gruppe 4 das Faserprotein Col I zu, mit einem Maximum in Woche 12, bevor die Signalintensität in Woche 24 wieder zurückgeht. Charakteristisch für Gruppe 4 ist die deutliche Ausprägung von netzartigen Strukturen im Falle des Laminins in Woche 24. Auch für die Kollagene IV und VI werden diese Strukturen sichtbar. Die starke Zunahme an reifen Adipozyten in Woche 24 scheint bei dieser Gruppe besonders in der Zunahme und der Struktur des sichtbar gemachten Laminin-Netzwerks seinen Ausdruck zu finden.

### 3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse für Woche 24 der Gruppen 1 - 4

Die untersuchten Tissue Engineering Konstrukte aus der Vorgängerarbeit [105] verblieben maximal 24 Wochen in den Versuchstieren. Nachdem in den bislang dargestellten Ergebnissen der Vergleich nach den jeweiligen Verbleibszeiten in den Versuchstieren sowie der Gruppen untereinander dargestellt wurde, wird im Folgenden der Fokus auf die Situation am Ende der Kultivierung *in vivo* gelegt. In der Gegenüberstellung der Resultate aus der HE-Färbung und der immunohistochemischen Analyse lassen sich gegebenenfalls Rückschlüsse ziehen, die eine Prognose über einen weiteren Verlauf der Adipogenese in den Versuchstieren nach 24 Wochen ableiten lassen. Demzufolge werden die Ergebnisse der jeweiligen Gruppen nun gegenübergestellt.

Die spezifischen Unterschiede in der Kultivierung der mit Präadipozyten in Fibrinkleber beimpften Konstrukte in der Vorgängerarbeit von Frau H. Mayer [105] bestanden in der Vorbehandlung der Konstrukte von Implantierung und Kultivierung *in vivo*. Die Präparate der Gruppe 1 wurden vor der Implantierung lediglich zwei Tage im Brutschrank kultiviert.

Tab. 11: Vorbehandlung der Konstrukte aus Gruppe 1

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeit
Gruppe 1	2 Tage	-	-	24 Wochen



## ECM Gruppe 1 - W24

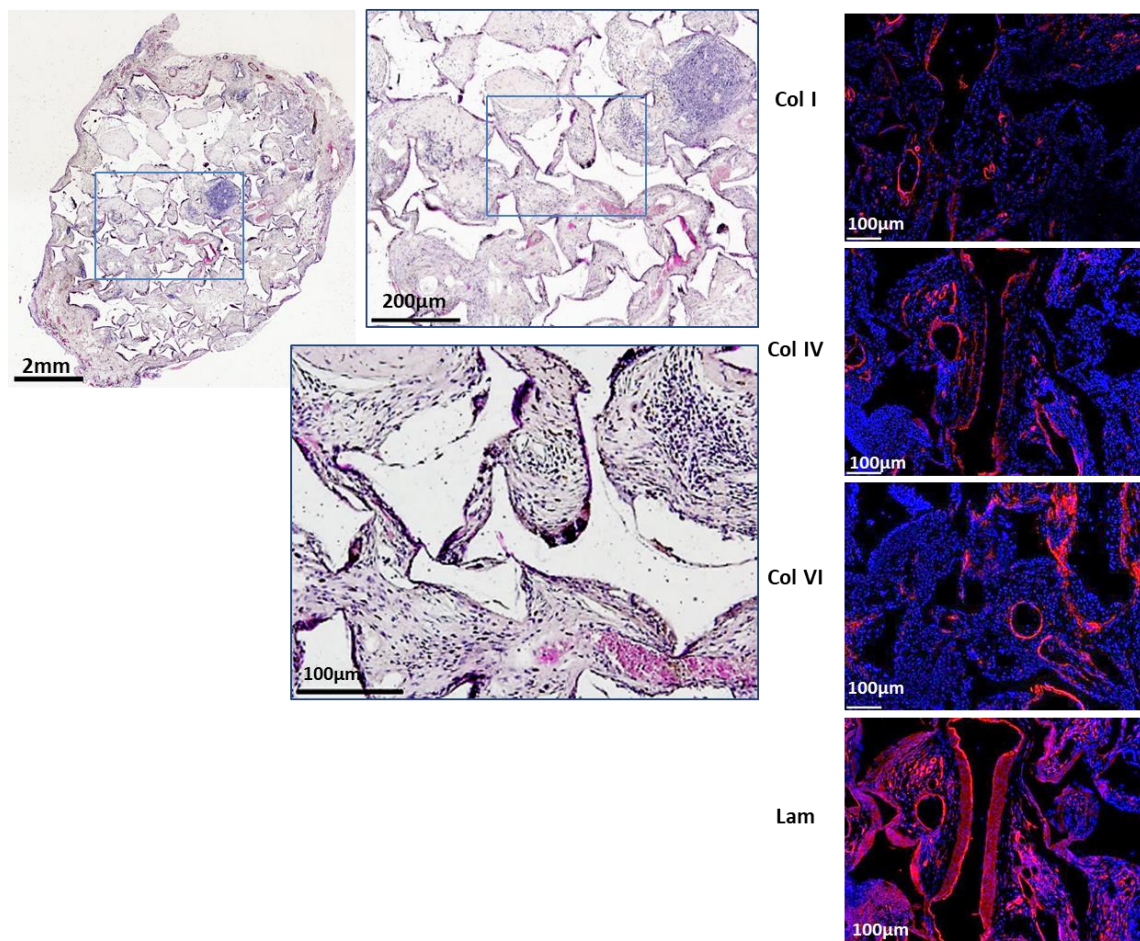


Abb. 18: Übersichtsdarstellung der Resultate der HE-Anfärbung und der immunohistochemischen Analyse der Komponenten der EZM (Col I, IV, VI und Laminin) für Gruppe 1 nach 24 Wochen Kultivierung *in vivo*.

In der Darstellung der Situation nach 24 Wochen der Gewebeproben aus Gruppe 1 lässt sich gut erkennen, dass im Wesentlichen faserartiges Bindegewebe entstanden ist, durchsetzt mit wenigen und einzelnen Adipozyten. Auch die immunohistochemische Analyse der EZM aus den Komponenten Kollagen I, IV, VI und aus Laminin zeigt eher faserartige Einheiten, bzw. Strukturen, die vermutlich aus gefärbten Oberflächen von nicht-adipogenem Gewebe resultieren.

Die Konstrukte aus Gruppe 2 wurden nach ihrer Beimpfung zunächst zwei Tage im Brutschrank *in vitro* kultiviert, bevor eine Induktion erfolgte und die Proben

zum Start der Ausdifferenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten dann vor Implantierung noch zwei Tage im Brutschrank verblieben.

Tab. 12: Vorbehandlung der Konstrukte aus Gruppe 2

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeit
Gruppe 2	2 Tage	2 Tage	-	24 Wochen

ECM Gruppe 2 - W24

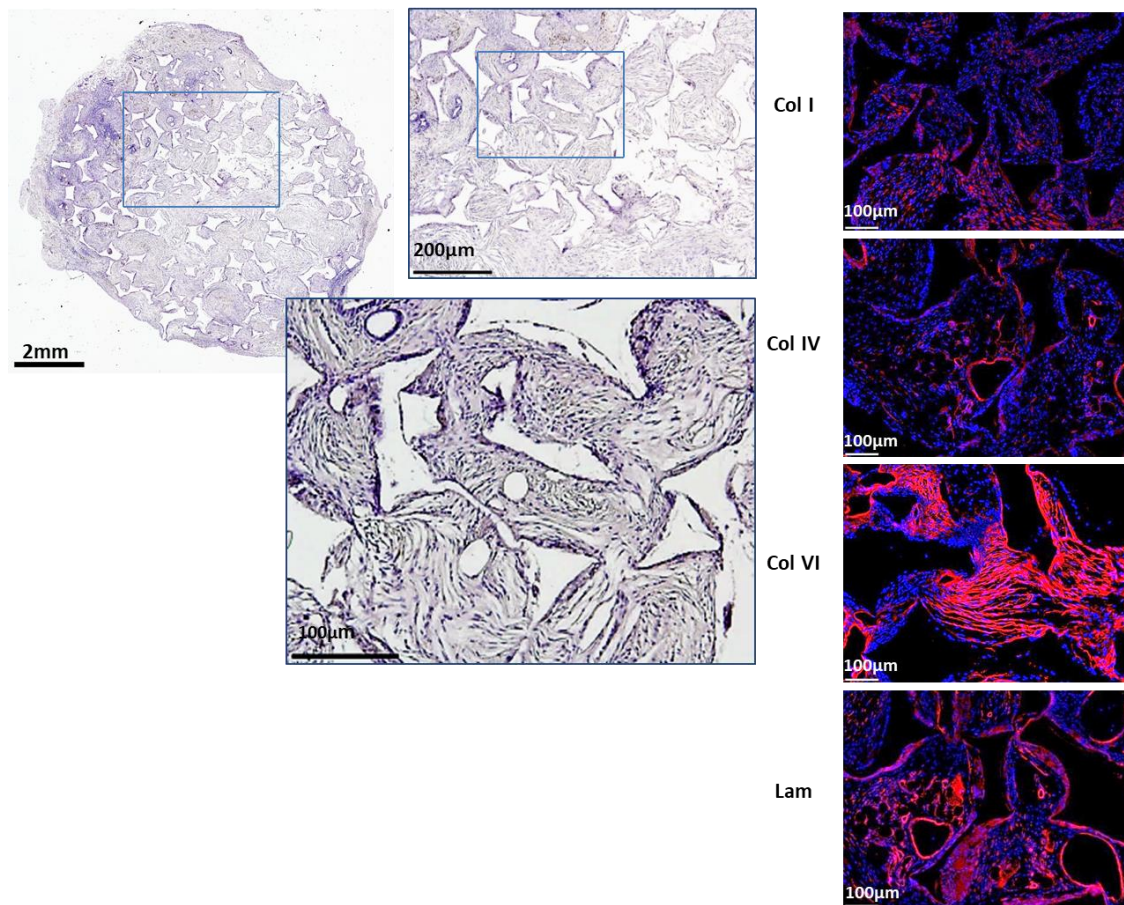


Abb. 19: Übersichtsdarstellung der Resultate der HE-Anfärbung und der immunohistochemischen Analyse der Komponenten der EZM (Col I, IV, VI und Laminin) für Gruppe 2 nach 24 Wochen Kultivierung *in vivo*.

Auch im Falle von Gruppe 2 stellt sich in Woche 24 keine wesentliche Adipogenese dar. Die Strukturen sowohl der HE-Anfärbung als auch die Resultate der immunohistochemischen Analyse weisen beide auf das Vorliegen von im Wesentlichen faserartigem Bindegewebe hin. Hervorzuheben ist die starke Signalausprägung für Col VI, das ein Bestandteil von stromalem,

faserartigem Bindegewebe ist, und das in der Aufnahme besonders gut dargestellt wird.

Die Konstrukte von Gruppe 3 wurden zunächst für zwei Tage inkubiert, dann erfolgte die Induktion und anschließend ließ man den Zellen noch sieben Tage Zeit für den Beginn einer Differenzierung in Richtung Adipogenese, bevor die Konstrukte in die Mäuse implantiert wurden.

Tab. 13: Vorbehandlung der Konstrukte aus Gruppe 3

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeit
Gruppe 3	2 Tage	2 Tage	7 Tage	24 Wochen

ECM Gruppe 3 - W24

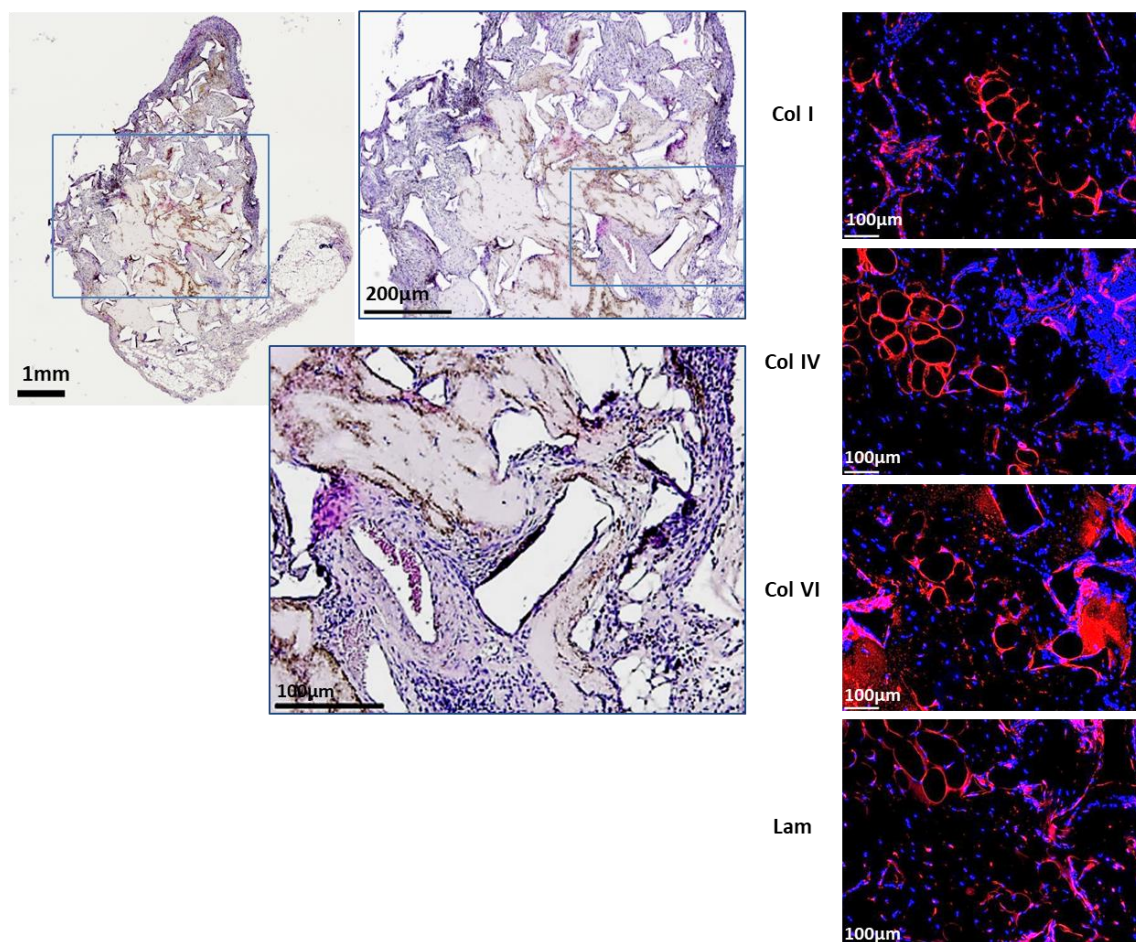


Abb. 20: Übersichtsdarstellung der Resultate der HE-Anfärbung und der immunohistochemischen Analyse der Komponenten der EZM (Col I, IV, VI und Laminin) für Gruppe 3 nach 24 Wochen Kultivierung *in vivo*.

In der HE-Anfärbung zeigen sich bei diesen Proben im zentralen Bereich der Konstrukte vorwiegend bindegewebsartige Strukturen. In einigen Bereichen sind allerdings nach 24 Wochen auch reife Adipozyten zu erkennen. Unterschiede zu den Gruppen 1 und 2 zeigt die immunohistochemische Analyse der Gewebeproben.

Während bei den Gruppen 1 und 2 vorwiegend faserartige Strukturen erkennbar waren, zeigen die Fluoreszenzaufnahmen von Gruppe 3 netzartige Gebilde, insbesondere für die Kollagene IV und VI sowie für Laminin, aber auch für das Kollagen I. Hier scheint die andersartige Vorkultivierung der Präadipozyten bereits zu einer deutlich besseren Ausbildung einer Struktur der EZM kennzeichnend für reife Adipozyten zu führen. Nicht nur dass die Konzentration dieser charakteristischen Proteine höher ist als im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2, ihre räumliche Strukturausprägung unterscheidet sich dazu sichtbar.

Im Vergleich zu Gruppe 3 wurden die Konstrukte der Gruppe 4 nach Inkubation, Induktion und Auslösung einer Differenzierung eine noch längere Zeit *in vitro* kultiviert, nämlich 33 Tage, bevor sie in die Mäuse implantiert wurden.

Tab. 14: Vorbehandlung der Konstrukte aus Gruppe 4

	Inkubation	Induktion	Differenzierung	<i>In vivo</i> Zeit
Gruppe 4	2 Tage	2 Tage	33 Tage	24 Wochen

## ECM Gruppe 4 - W24

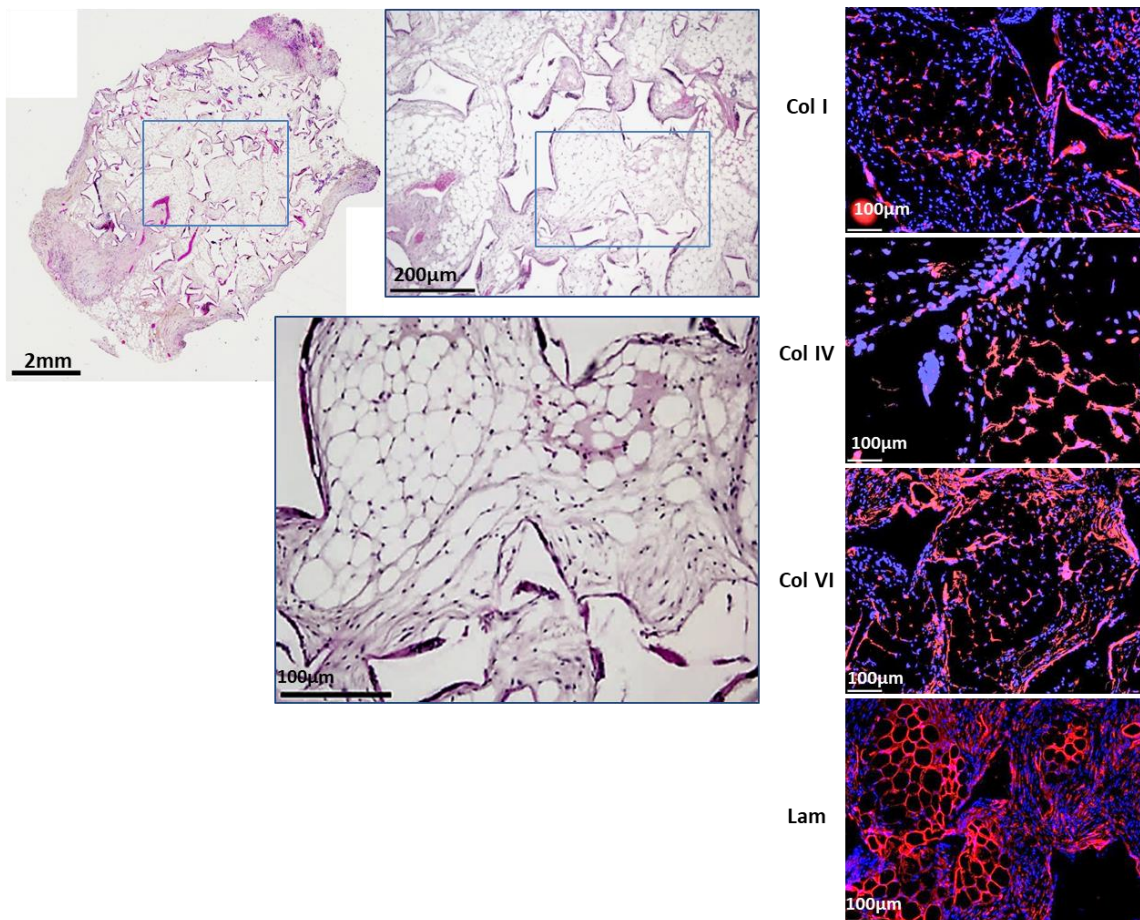


Abb. 21: Übersichtsdarstellung der Resultate der HE-Anfärbung und der immunohistochemischen Analyse der Komponenten der EZM (Col I, IV, VI und Laminin) für Gruppe 4 nach 24 Wochen Kultivierung *in vivo*.

Der Trend, der bereits für Gruppe 3 im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2 erkennbar war, verstärkt sich im Falle von Gruppe 4 weiter. Nach 24 Wochen lassen sich in der HE-Färbung zahlreiche reife Adipozyten im gesamten Gewebe erkennen. Die Ausbildung einer Adipogenese zeigt sich auch in der immunohistochemischen Analyse mittels Fluoreszenzsignal der Kollagene I, IV und VI sowie von Laminin. Neben den starken blau-Signalen der Zellkerne erscheinen rot erkennbare netzartige Strukturen für die Kollagene IV (etwas kontrast-schwächer) und VI sowie eindeutige Netzstrukturen für das Laminin. Durch die Vorkultivierung konnte die Entstehung von Fettgewebe-Arealen gefördert werden, so dass sich eine fettspezifische EZM ausbilden konnte.

## 4. Diskussion der Ergebnisse

Die Herstellung von klinisch zur rekonstruktiven Chirurgie nutzbarem Fettgewebe, beispielsweise aus autologen, mesenchymalen Spenderzellen, ist ein Gebiet an dem aktuell eine Reihe wissenschaftlicher Arbeiten ansetzen. Die Heilung von Weichteildefekten, bzw. die Angleichung von Körperkonturen, kann durch Methoden des Tissue Engineerings, also der Erzeugung von klinisch nutzbaren Gewebesegmenten, einen deutlichen Schub erhalten. Bausteine zur Herstellung von solchen Konstrukten sind Gerüststrukturen, sogenannte Scaffolds, die den Zellen die später notwendige Gewebekontur vorgeben, sowie Zellen, bzw. Vorläuferzellen, aus denen das jeweils gewünschte Gewebe gebildet wird.

In einer Vorgängerarbeit von Frau H. Mayer [105] wurde *in vivo* die Bildung von Fettgewebe in mit ASC besiedelten Polyurethan-Scaffolds in einem Mausmodell untersucht. Zur Verbesserung der Adipogenese wurden die Zellen nach dem Aufbringen auf die Trägermatrix aus Polyurethan unterschiedlich vorkultiviert. Die Unterschiede in der Vorkultivierung der mit Präadipozyten beimpften Konstrukte lagen in der Induktion der Zellen, um die Proliferation der Präadipozyten zu beenden und damit die Reifung zu Adipozyten einzuleiten, sowie in der unterschiedlichen Zeitdauer der Differenzierung *in vitro* vor der Implantation in die Versuchstiere.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun zu untersuchen, inwieweit die Vorkultivierungsbedingungen *in vitro* die spätere Adipogenese *in vivo* und die Entwicklungsstadien der sich bildenden Adipozyten beeinflussen und wie sich der Verlauf der Bildung der EZM in den Konstrukten über die Inkubationszeit darstellt. Bei der Adipogenese ist dabei relevant, dass das sich bildende Gewebe und damit die das Gewebe aufbauenden Zellen vaskulär integriert und somit mit Nährstoffen versorgt werden. Dies wurde durch eine Implantation der mit Präadipozyten beimpften Polyurethan-Scaffolds um einen freipräparierten Gefäßstiel der A. und V. femoralis von athymischen Nacktmäusen realisiert.

In der Vorgängerarbeit [105] konnte gezeigt werden, dass die Gruppe 4 der Konstrukte, die sowohl eine Induktion und eine lange Differenzierung *in vitro* (33 Tage) erfahren hatten, die vergleichsweise höchste Zelldichte an reifen Adipozyten vorweisen konnten. In dieser Arbeit lag nun das Augenmerk auf der detaillierten Analyse der gebildeten Gewebe mit Erfassung der Zahlen sowohl der reifen als auch der unreifen Adipozyten, um den Verlauf der Adipogenese in derartigen Konstrukten *in vivo* besser beurteilen zu können. Außerdem sollte in der vorliegenden Arbeit durch immunohistochemische Analysen die Entwicklung der extrazellulären Matrix in den Konstrukten während der Gewebeentwicklung *in vivo* untersucht werden.

#### **4.1. Diskussion der Methodik**

Die Untersuchung der gestellten Aufgaben im Rahmen der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit erfolgte in drei Schritten. Zunächst sollten an den aus der Vorgängerarbeit [105] zur Verfügung gestellten Gewebeproben durch die Methode der Zellfärbungen mittels Hämalaun-Eosin die Art und die Anzahl der gebildeten Zellen untersucht werden.

Die vorliegenden Gewebeproben wurden zunächst mit einer Hämalaun-Eosin Färbung gefärbt, um die entstandene Gewebestruktur darzustellen. Die Adipozyten lassen sich dabei durch ihre charakteristische Struktur von den anderen Zellen unterscheiden, wobei die größeren reifen Adipozyten eine Fettvakuole mit randständigem Zellkern aufweisen, während unreife Adipozyten noch eine runde Struktur mit mittig liegendem Zellkern aufweisen und deutlich kleiner sind, was als Unterscheidungskriterium herangezogen wurde. Anschließend wurde dann im zweiten Schritt eine histomorphometrische Analyse hinsichtlich der Zellzahl der entstandenen reifen und unreifen Adipozyten durchgeführt.

Die Unterscheidung nach unreifen und bereits reifen Adipozyten erfolgte wie beschrieben durch Zuordnung anhand ihrer Größe. Die deutlich kleineren unreifen Adipozyten weisen noch keine Lipidvakuole auf und wurden durch die Zuordnung zu einer Zellgröße kleiner als 20µm Durchmesser erfasst, während

die ausgebildeten reifen Adipozyten mit Lipidvakuole deutlich größer sind und über die Zählung von Zellen mit einem Durchmesser größer als 20 µm ermittelt wurden. Durch die Festlegung der betrachteten Fläche der jeweiligen Konstrukte wurde eine Zellzahl an Adipozyten pro Gewebeprobe errechnet und zur Auswertung genutzt. Aus den Daten konnten sowohl die resultierende Gesamtzellzahl an Adipozyten, als auch die Zellzahlen für Adipozyten mit Durchmessern kleiner und größer 20µm erfasst und ausgewertet werden. Die erhaltenen Daten wurden mittels statistischer Analyse hinsichtlich ihrer Relevanz geprüft, um fundierte Aussagen über die Adipogenese nach den unterschiedlichen Bedingungen der Vorkultivierung und den Verbleibszeiten *in vivo* treffen zu können.

Neben dieser quantitativen, Zellzahl-bezogenen Untersuchung der Adipogenese wurde im dritten Schritt untersucht, wie die Ausbildung der extrazellulären Matrix EZM in den verschiedenen Gruppen in Abhängigkeit von der Vorkultivierung der jeweiligen Konstrukte verläuft. Hierfür wurden immunohistochemische Methoden durch spezifisches Anfärben der unterschiedlichen Matrixproteine mit Antikörpern und nachfolgender qualitativer Detektion der Fluoreszenz der markierten Antikörper eingesetzt. Als Zielproteine wurden die Kollagene I, IV und VI sowie Laminin ausgewählt. Hierdurch konnten die Unterschiede im Aufbau der EZM nach den jeweils unterschiedlichen Bedingungen der Vorkultivierung der Präadipozyten erfasst und zur Ermittlung der Ausbildung einer Fettgewebe-spezifischen EZM genutzt werden.

#### **4.2. Diskussion der Ergebnisse der HE-Anfärbungen**

In den betrachteten Konstrukten konnten für die Gruppen 1, 2 und 3 keine oder nur vereinzelte reife Adipozyten gefunden werden. In den mikroskopischen Vergrößerungen lässt sich in diesen Gewebeschnitten primär faserartiges Bindegewebe feststellen. Dagegen konnte in den untersuchten Proben der Gruppe vier zwar in den ersten Wochen (1, 5 und 12) ebenfalls nur wenige reife



Adipozyten gefunden werden, aber nach 24 Wochen sind eindeutig reife Adipozyten in großer Anzahl zu sehen.

Der Unterschied der Gruppen 1, 2, 3 und vier lag in der jeweils verschiedenen Vorkultivierung der mit Zellen beimpften Konstrukte. Während in Gruppe 1 die Konstrukte nach Beimpfung mit humanen Präadipozyten zwei Tage *in vitro* im Brutschrank verblieben und dann ohne zweitägige Induktion zum Stoppen der Präadipozyten und Einleitung der Adipogenese in die Versuchstiere implantiert wurden, wurde diese Induktion bei allen anderen Gruppen durchgeführt. Die besiedelten Scaffolds der Gruppe 2 wurden allerdings sofort nach der zweitägigen Induktionsperiode in die Tiere implantiert, während die Scaffolds aus den Gruppen 3 und 4 noch 7 bzw. 33 Tage *in vitro* im Brutschrank zur weiteren Differenzierung gelagert wurden. In der Vorgängerarbeit [105] wurden die gefundenen Unterschiede in der Adipogenese in den Gewebeproben dieser unterschiedlichen Vorbehandlung zugeordnet.

#### **4.3. Diskussion der Resultate der histomorphometrischen Analyse**

Bei der histomorphometrischen Analyse der Gewebeproben aus den Gruppen 1 bis 4 war es das Ziel, die entstandenen unreifen und reifen Adipozyten quantitativ hinsichtlich Größe und Anzahl zu erfassen, um eine Beurteilung des Verlaufs der Fettgewebeentwicklung *in vivo* über die Zeit darstellen zu können. Aus der jeweiligen Anzahl an unreifen und reifen Adipozyten kann abgeleitet werden, inwieweit sowohl die Vorbehandlung der mit Zellen beimpften Konstrukte als auch die nachfolgenden Kultivierungsbedingungen die Adipogenese beeinflusst. Es könnte ja vermutet werden, dass die Ergebnisse der Fettgewebebildung nicht primär durch die Vorkultivierung resultieren, sondern vor allem aus der Zeitdauer *in vivo*, also dass sich mit einer genügend langen Zeit im Versuchstier die unterschiedlichen „Startbedingungen“ durch die jeweils andere Vorbehandlung der Konstrukte dann letztlich wieder nivellieren würden.

Die quantitative Analyse der Adipogenese in den Konstrukten erfolgte anhand erhaltener Zellzahlen, jeweils gemittelt über die Versuchstiere einer Gruppe

nach den verschiedenen Zeiten *in vivo*. Hierfür wurden mittels Software-gestützter Zellzählung von Zellen der Größenskala „kleiner 20µm“, charakteristisch für die deutlich kleineren, unreifen Adipozyten, und „größer 20µm“, charakteristisch für die deutlich größeren, reifen Adipozyten, die jeweiligen Zellzahlen ermittelt. Nach Festlegung der betrachteten Gewebefläche, bei der eine Korrektur mittels Ausschlusses von randständigem Fettgewebe erfolgte, um eine Verfälschung durch Fettgewebe der Versuchstiere außerhalb der Konstrukte möglichst vermeiden zu können, konnten die erhaltenen Daten in die jeweiligen Zellzahlen umgerechnet werden. Auf Basis dieser Werte erfolgte dann der Vergleich der Resultate unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Vorkultivierungsbedingungen *in vitro*.

Aus den Daten der gefundenen Entwicklung der Gesamtzellzahlen lässt sich erkennen, dass eindeutig die Konstrukte der Gruppe 4 die höchsten Werte aufweisen. Interessant in dieser Gruppe ist, dass der Wert der Gesamtzellzahlen nach 12 Wochen unter dem Startwert nach 5 Wochen liegt, und dann aber nach 24 Wochen ein eindeutiges Maximum einnimmt. Betrachtet man die Zellzahlen aus den Resultaten für Zellgrößen > 20 µm, so ist bei allen Proben der Gruppen 1 bis 4 ein maximaler Wert nach 24 Wochen erreicht, allerdings liegt auch hier das Resultat für Gruppe 4 weit höher als für die Gruppen 1, 2 und 3. Beim Vergleich dieses Ergebnisses für die reifen Adipozyten (> 20µm) mit den Resultaten für die Zellen mit Größen kleiner als 20µm (unreife Adipozyten) zeigt sich, dass das Bild für letztere wesentlich weniger deutlich ausgeprägt ist. Es scheint sogar so zu sein, dass die Werte nach 5 Wochen tendenziell höher liegen, als die Werte nach 12 oder 24 Wochen, z.B. für die Gruppen 2 und 4.

Somit resultiert als Kernaussage aus den Untersuchungen, dass neben den Zellzahlen für die reifen Adipozyten auch die Anzahl der unreifen Zellen in den Gruppen 1, 2, und 3 gering ist, während in Gruppe 4 zumindest nach 5 Wochen eine relativ hohe Zahl an unreifen Adipozyten gefunden wurde. Aufgrund dieser geringen Anzahl an Adipozyten insbesondere in den Gruppen 1, 2 über den gesamten Betrachtungszeitraum hinweg ist daher eher nicht zu erwarten, dass

diese Konstrukte zu einem späteren Zeitpunkt einen Verlauf der Bildung reifer Adipozyten hätten nehmen können wie in Gruppe 4.

Die Analyse der statistischen Relevanz (ANOVA) der gefundenen Daten zeigt, dass der beschriebene Unterschied für die Art Vorkultivierung und für die Dauer des Verbleibs der Gewebeproben in den Versuchstieren für die Gesamtzellzahlen sowie die Zahl der Zellen mit Größen über 20µm statistisch signifikant ist, für die Zellen mit der Größenskala kleiner als 20µm aber nur die Art der Vorkultivierung Bedeutung hat. Außerdem zeigt der statistische Test der Daten (Bonferroni-Test), dass der Unterschied zwischen Gruppe 4 und den anderen Gruppen eindeutig statistisch relevant ist, während zwischen den Gruppen 1, 2 und 3 keine eindeutige Signifikanz der Entwicklung der Zellzahlen in Abhängigkeit von Vorkultivierung und Verbleib *in vivo* gefunden werden kann.

Aus der quantitativen Analyse der Zellzahlen der beiden Größenklassen für unreife und reife Adipozyten für die verschiedenen Vorkultivierungsbedingungen der Gruppen nach den jeweiligen Zeiten *in vivo* kann somit abgeleitet werden, dass Gruppe 4 mit einer Differenzierungsperiode von 33 Tagen nach erfolgter Induktion die besten Resultate hinsichtlich der Adipogenese *in vivo* aufweist.

#### **4.4. Diskussion der Ergebnisse der immunohistochemischen Untersuchungen**

Während des Fortschreitens der Adipogenese wandeln sich die spindelförmigen Präadipozyten in kugelförmige Adipozyten um. Die extrazelluläre Matrix wird dabei mehrfach verändert und wechselt von einer eher fibrillären zu einer flächigen Struktur [108]. Bei diesem Umbau spielen etliche Gerüstproteine eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit wurden die Kollagene I, IV und VI sowie Laminin als Marker für die Veränderung ausgewählt, die die extrazelluläre Matrix während der Adipogenese durchläuft. Diese EZM-Bestandteile spielen eine wesentliche Rolle, sowohl für die mechanische Stabilisierung der entstehenden Gewebsstrukturen als auch für das Fortschreiten der Adipogenese an sich [108].

Die Bildung verschiedener Kollagene während der Adipogenese *in vivo* wurde bereits frühzeitig untersucht [123]. Viele Untersuchungen beziehen sich dabei auf die immortalisierte Mauszelllinie 3T3-L1. So wurde berichtet, dass während der Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten in Adipozyten die Bildung fibrillärer Kollagene wie Kollagen I abnimmt [124], wohingegen die Ausbildung von Kollagenen der Basalmembran, wie z. B. Kollagen IV, zunimmt [120, 124].

Dieser Trend der Zunahme von Kollagen IV wurde auch in anderen Studien bestätigt [125], wobei hier die Ergebnisse betreffend die fibrillären Kollagene I und III etwas anders beobachtet wurden. Nach einem temporären Rückgang der Ausbildung von Kollagen I und III stieg nämlich die Neubildung im späteren Verlauf der Adipogenese wieder an, während nach einem temporären Anstieg der Bildung von Kollagen IV dessen Neubildung im Laufe der Adipogenese wieder abfiel. Kollagen VI hingegen nahm während der Reifung der unreifen zu reifen Adipozyten stetig zu [125, 127]. Letzteres Ergebnis wurde auch in Untersuchungen anderer Gruppen bestätigt [126]. Während der Adipogenese wandelt das Kollagen VI nach einer Studie [122] allerdings seine makroskopische Struktur von einem feinen, fibrillären Netzwerk in ein wesentlich kompakteres Netzwerk um.

Derartige Veränderungen in der Netzwerkstruktur der Kollagene und der extrazellulären Matrix wurden auch mittels rasterelektronenmikroskopischer Untersuchung verfolgt, nach der sich das Kollagen-Netzwerk aus den Typen I, III, V und VI während der Adipogenese von Fettgewebe der Maus ausbildet und stabil bleibt, während Kollagen IV wieder abgebaut wird [119]. In einer neueren Arbeit wurde die zeitliche Ausbildung verschiedener Gerüstproteine wie beispielsweise Kollagen I, III, IV, V, VI sowie von Laminin mittels Massenspektrometrie untersucht und der Verlauf der Bildung und des Abbaus der Komponenten der EZM qualitativ dargestellt [106].

Demnach bilden die Zellen während der frühen Phase der Differenzierung der Adipozyten zunächst fibrilläre Kollagene des Typs I und III in Verbindung mit Kollagen-assoziierten Proteinen, wie beispielsweise Prokollagen C-Endopeptidase und Metallopeptidase-Inhibitoren. Die Komponenten der

Basalmembran, wie Perlecan, Nidogen und Laminin, aber auch Kollagene des Typs IV erreichen ihr Maximum während der Adipogenese *in vivo*, ebenso wie mikro-fibrilläre Kollagene des Typs V und VI. Während der späteren Phase der Adipogenese bilden die 3T3-L1 Zellen eher Proteine aus dem Bereich der Adipokine, Adiponektine und Adipsin, als dass sie weiter extrazelluläre Matrix aufbauen. Der Anstieg der Gerüstproteine während der Adipogenese und des Aufbaus der EZM, insbesondere von Kollagen IV und Laminin, wird analog auch in anderen Arbeiten bereits beschrieben [109, 128]. Diese beiden Studien unterscheiden sich im Vergleich zu den oben beschriebenen Untersuchungen allerdings dadurch, dass hier die Analyse der Ausbildung von Proteinen während der Adipogenese mit primären Zellen (BMSC, „bone marrow derived stem cells“) durchgeführt wurde und die Differenzierung *in vitro* erfolgte.

Für ASC und insbesondere für die Entwicklung der EZM und der darin enthaltenen charakteristischen Gerüstproteine in Tissue Engineering Konstrukten gibt es nach unseren Erkenntnissen bis zur Durchführung der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bis dato noch keine entsprechenden Analysen. In dieser Arbeit erfolgte die Beobachtung der Entwicklung der EZM in TE-Konstrukten *in vivo*, anders als in den zitierten Literaturbeispielen.

In dieser Arbeit wurde der Verlauf der Konzentration an Kollagen I, IV und VI sowie von Laminin während der Adipogenese *in vivo* von humanen Präadipozyten jeweils in einem Polyurethan-Scaffold in Mäusen in Abhängigkeit von der Vorkultivierung der Konstrukte *in vitro* untersucht. Die Unterschiede in der Vorkultivierung bestanden dabei in der Induktion der Präadipozyten, die einen Stopp der Proliferation und eine Einleitung der Differenzierung zu reifen Adipozyten bewirkt, sowie in der Dauer des Verbleibs der Konstrukte nach der Induktion im Brutschrank zur Anregung der Adipogenese *in vitro*.

An den resultierenden Gewebeproben aus den Tissue Engineering Konstrukten sollte nun die Ausbildung einer extrazellulären Matrix während der Adipogenese *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden die Gewebeproben mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die spezifisch an die zu untersuchenden Komponenten der EZM anbinden, versetzt, die resultierenden Aufnahmen der markierten

Proben analysiert und der Verlauf der Bildung der Gerüstproteine während der Adipogenese qualitativ beobachtet.

Im Falle des fibrillären Gerüstproteins Kollagen I zeigt sich bei allen Proben eine Zunahme des Fluoreszenz-Signals während des Verbleibs der Konstrukte *in vivo* für die Wochen 1, 5 und 12. Das ausgeprägteste Signal wird tendenziell bei allen Gruppen nach 12 Wochen *in vivo* beobachtet, danach fällt die Intensität für Woche 24 wieder ab. Dies deckt sich gut mit Ergebnissen aus der Literatur [106], nach denen die Konzentration von Kollagen I während der Adipogenese zunächst ansteigt und danach im Verlauf wieder abfällt. Da in den Gruppen 1-3 keine oder nur eine geringe Adipogenese gefunden wurde, lässt sich die Signalzunahme eher einer Entstehung eines faserartigen Gewebes zuordnen. Beim Vergleich der verschiedenen Intensitäten über die Gruppen hinweg fällt dabei auf, dass die Gruppen 1, 2 und 3 in den Proben die höchsten Fluoreszenzsignale aufweisen, während Gruppe 4, bei der eine Adipogenese erfolgte, zwar qualitativ denselben Verlauf des Anstiegs von Kollagen I und des nachfolgenden Rückgangs zeigt, der aber im direkten Vergleich zu den anderen Gruppen schwächer ausgeprägt ist.

Die Zeitreihe der Fluoreszenz-Aufnahmen für das Kollagen IV der Gruppen 1 bis 4 zeigt einen etwas anderen Verlauf. Nach den Wochen 1, 5 und 12 des Verbleibs *in vivo* nimmt das Fluoreszenz-Signal langsam zu, bevor es für alle Gruppen in Woche 24 ein relatives Maximum erreicht. Der im Vergleich zu Kollagen I in der Literatur [106] beschriebene langsamere Aufbau von Kollagen IV kann somit qualitativ auch für die Adipogenese der in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte bestätigt werden. Der stärkste Aufbau ist in den Gruppen 3 und 4 zu beobachten. Da die beiden Gruppen nach der Induktion noch 33 Tage *in vitro* im Brutschrank ausdifferenzieren konnte, hatten die Adipozyten im Vergleich zu den anderen Gruppen mehr Zeit, die den Aufbau einer fettspezifischen EZM zu starten.

Für den Verlauf der Fluoreszenz resultierend aus dem markierten Kollagen VI zeigt sich eine stetige Zunahme der Intensität. Besonders für die Gruppen 2, 3 und 4 ist das beobachtete Signal in den Aufnahmen sehr ausgeprägt. Während

für Gruppe 2 optisch aber eher fibrilläre Strukturen in Woche 24 zu erkennen sind, werden für Gruppe 3 und 4 netzartige Strukturen sichtbar.

Im Falle des Laminins bestätigt sich das Bild bezogen auf die Resultate für Gruppe 4. Zunächst kann auch für Laminin aus den Fluoreszenzaufnahmen festgestellt werden, dass die Konzentration im Laufe der Adipogenese stetig für alle Gruppen zunimmt. Während sich aber für die Gruppen 1 und 2 nach 24 Wochen *in vivo* keine klar definierten Strukturen zuordnen lassen, zeigt die Analyse für die Gruppen 3 und 4 Signale einerseits für Blutgefäße, andererseits aber auch für gebildete Adipozyten. Für Laminin zeigt zudem die Probe aus Gruppe 4 das vergleichsweise stärkste Signal. In der Aufnahme für Gruppe 4 sind nach 24 Wochen feine netzartige Gebilde über den gesamten Ausschnitt hinweg zu erkennen, die in ihrer Ausprägung den typischen Strukturen für Fettgewebe entsprechen. Es zeigt sich bei der Laminin-Anfärbung ein erheblicher Unterschied von Gruppe 4 zu den Proben aus den Gruppen 1 und 2 und auch ein erkennbarer Unterschied zu Gruppe 3. Die längere Inkubationszeit der Konstrukte *in vitro* bewirkte offensichtlich einen Unterschied in der Ausbildung von Laminin, der davon herrührt, dass dort wo Adipozyten, bzw. Areale von Fettgewebe entstanden sind, auch eine fettspezifische Matrix resultiert mit einer Basalmembran der Adipozyten, die in der Anfärbung das Erscheinungsbild der charakteristischen Netzstruktur für die Gerüstproteine (hier Laminin) ergibt.

Die Art Vorkultivierung der mit Präadipozyten beimpften Polyurethan-Scaffolds beeinflusst somit in der Folge die Adipogenese und somit die Ausbildung der Menge und der räumlichen Struktur der untersuchten Gerüstproteine. Während die Kollagene I und IV relativ gesehen ihr Maximum an Konzentration nach Woche 12 *in vivo* zeigen, nehmen die Komponenten Kollagen VI und Laminin weiter zu. Diese zeigen außerdem für die Gruppen 3 und 4 nach 24 Wochen die Ausbildung einer netzartigen Struktur in den Gewebeproben und damit die Ausbildung von Fettgewebe-Arealen. Die qualitative Beobachtung der zeitlichen Entwicklung der Konzentration der Gerüstproteine deckt sich sehr gut mit entsprechenden Untersuchungen aus der Literatur [106].

#### 4.5. Übergreifende Diskussion der Resultate für die Gruppen 1 bis 4

In der Betrachtung der Resultate für Gruppe 1, sowohl aus der histomorphometrischen und der immunohistochemischen Untersuchung des Verlaufs des Adipogenese nach 1, 5, 12 und 24 Wochen des Verbleibs *in vivo* im Versuchstier zeigt sich, dass nur geringe Zellzahlen an Adipozyten in den Proben gefunden wurden. Die Fluoreszenzmarkierungen der EZM lassen zwar ein Maximum der Signale nach 24 Wochen erkennen, doch erscheinen die Strukturen eher fibrillär. Dies deckt sich mit den mikroskopischen Ergebnissen aus der HE-Anfärbung, in der lediglich Bindegewebs-artige Strukturen zu erkennen sind. Offensichtlich ist die für diese Gruppe gewählte Vorkultivierung nicht geeignet, um eine ausreichende Adipogenese auslösen zu können. Es werden zwar Gerüstproteine der extrazellulären Matrix gebildet, aber diese stammen vermutlich nicht aus Adipozyten, sondern aus Bindegewebszellen.

Ein ähnliches Bild ergibt sich in der Betrachtung der Resultate für Gruppe 2. Im Rahmen der Messgenauigkeit der Auswertungen der Zellzahlen sowohl für die kleineren unreifen Adipozyten als auch für größere, reife Adipozyten lässt sich keine Zunahme der Zellzahlen erkennen, lediglich eventuell eine Abnahme der unreifen Adipozyten. Die Konstrukte dieser Gruppe wurden nach der Induktion noch 2 Tage im Brutschrank *in vitro* gelagert, um die Ausdifferenzierung zu starten und dann aber in die Versuchstiere implantiert. In der HE-Anfärbung für diese Gruppe lassen sich, ähnlich wie für die Proben aus Gruppe 1, praktisch nur bindegewebsartige, faserige Strukturen erkennen. Die immunohistochemische Analyse zeigt zwar eine Signalzunahme für die jeweils untersuchten Kollagene, aber auch im Falle von Gruppe 2 resultierten diese vermutlich nicht aus der EZM eines entstandenen Fettgewebes, sondern aus der von faserartigem Bindegewebe. Offensichtlich reicht die kurze Lagerung *in vitro* nach erfolgter Induktion der Präadipozyten nicht aus, um danach eine erfolgreiche Adipogenese *in vivo* starten zu können.

Für Gruppe 3 erscheinen die gefundenen Resultate etwas differenzierter. Zwar lassen sich bei der histomorphometrischen Analyse nur eine Stagnation der Zellzahlen der unreifen Adipozyten und eine geringe Zunahme der Zellzahlen



für die reifen Adipozyten erkennen. Möglicherweise liegt dies aber darin begründet, dass durch die Vorbehandlung der Konstrukte dieser Gruppe, mit einer siebentägigen Vorkultivierung *in vitro* im Brutschrank nach der Induktion, die Präadipozyten bereits im Sinne einer Adipogenese in ihrer Anzahl deutlich weniger geworden sind. In der HE-Anfärbung werden einzelne reife Adipozyten sichtbar, wenn auch ihre Anzahl vergleichsweise gering ist. In der immunohistochemischen Analyse zeigen sich für alle analysierten Gerüstproteine netzartige Strukturen, die je nach Komponente unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Die untersuchten Gerüstproteine sind im Falle von Kollagen IV und von Laminin charakteristische Bestandteile der Basallamina von Adipozyten, d.h. sie umgeben die einzelnen Fettzellen in der EZM und führen so zu einer Ausbildung netzartiger Muster. Offensichtlich führte im Falle von Gruppe 3 die Vorkultivierung im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2 zu einer etwas verbesserten Adipogenese und damit zur deutlicheren Ausprägung der für Fettzellen charakteristischen EZM. Die in den Gruppen 1 und 2 praktisch ausnahmsweise sichtbaren faserartigen Strukturen, charakteristisch für Bindegewebe, sind hier weniger ausgeprägt, dagegen finden sich die beschriebenen netzartigen Gebilde.

In der Analyse der Resultate für Gruppe 4 lässt sich der für Gruppe 3 gefundene Trend fortschreiben. Die Konstrukte aus Gruppe 4 wurden nach Induktion noch weitere 33 Tage zur Ausdifferenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten *in vitro* im Brutschrank belassen, bevor sie in die Versuchstiere implantiert wurden. In der histomorphometrischen Untersuchung ist, nach einem Rückgang der Zellzahlen für die unreifen Adipozyten im gesamten Versuchszeitraum, ein deutlicher Anstieg der Zellzahlen für die reifen Adipozyten in Woche 24 erkennbar. Dies deckt sich mit den Resultaten aus der HE-Anfärbung, in der für Woche 24 eine Vielzahl von Adipozyten in der mikroskopischen Untersuchung der Gewebeproben erkennbar ist. In der immunohistochemischen Analyse zeigen sich, ähnlich wie für Gruppe 3, charakteristische, netzartige Strukturen für Woche 24, besonders ausgeprägt im Falle von Kollagen IV und VI sowie des Laminins. Auch hier wird die

Entstehung einer Adipozyten-spezifischen EZM mit deren Bestandteilen der Basallamina sichtbar.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit durch die Abfolge aus HE-Anfärbung zur Hervorhebung von unreifen und reifen Adipozyten, der nachfolgenden quantitativen histomorphometrischen Auswertung des diesen beiden Typen zuzuschreibenden Anteils an den Zellzahlen in den Konstrukten und der dann anschließenden immunohistochemischen Analyse der gebildeten Komponenten der EZM die Relevanz einer geeigneten Vorkultivierung eindeutig belegt werden. Während bei einer zu geringen Zeit *in vitro* die resultierenden Strukturen der Konstrukte nach Explantation praktisch ausschließlich aus Bindegewebe bestehen, startet erfolgreich eine Adipogenese, wenn vor der Implantation die Konstrukte nach erfolgter Induktion noch eine genügend lange Zeit *in vitro* gelagert werden, um die Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten zu beginnen. Durch die Analyse der Bildung unterschiedlicher Gerüstproteine konnte während der Adipogenese in Tissue Engineering Konstrukten erstmals die Ausbildung einer EZM in den verschiedenen Konstrukten qualitativ verfolgt werden.

## 5. Zusammenfassung, Fazit, Ausblick

Die Erzeugung von klinisch in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie nutzbarem Fettgewebe stellt einen sehr wichtigen Aspekt in aktuellen Arbeiten des Tissue Engineerings, also der Erzeugung von spezifischem Gewebe aus Spenderzellen dar. Sollte es gelingen, aus patienteneigenen Zellen wieder neues Gewebe zu züchten, so würden daraus eine Fülle neuer Behandlungsmöglichkeiten für Gewebedefekte resultieren. In einer Vorgängerarbeit von Frau H. Mayer [105] zu der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Adipogenese *in vivo* von Fettgewebe aus Vorläuferzellen, den Präadipozyten, durch geeignete Methoden der Vorkultivierung *in vitro* beeinflusst werden kann. Dazu wurden auf einen Träger aufgebrachte humane Präadipozyten vor der Implantation in athymische Nacktmäuse unterschiedlich vorbehandelt und anschließend nach verschiedenen Zeiten *in vivo* aus den Versuchstieren explantiert.

Die Unterschiede in der Vorbehandlung lagen in einer Induktion der Differenzierung der Präadipozyten bei gleichzeitigem Stopp der Proliferation und einer anschließenden verschieden langen Ausdifferenzierungsphase der Zellen *in vitro* im Brutschrank. Die resultierenden Konstrukte wurden in jeweils drei Mäuse in vier Gruppen implantiert und nach 1, 5, 12 und 24 Wochen entnommen und untersucht. Während die Präadipozyten von Gruppe 1 keine Induktion erfuhren, erfolgte diese bei den anderen drei Gruppen. Die Konstrukte der Gruppe 2 wurden dann bereits nach 2 Tagen der Induktion der Präadipozyten implantiert, die Konstrukte der Gruppe 3 blieben zur Differenzierung noch 7 Tage, die der Gruppe 4 noch 33 Tage im Brutschrank, bevor sie in die Versuchstiere eingebracht wurden. In der Vorgängerarbeit [105] wurde die Adipogenese nach den verschiedenen Wochen für die jeweiligen Gruppen untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, an den Gewebekonstrukten der Vorgängerarbeit eine histomorphometrische Analyse der resultierenden Adipozyten *in vivo* über die Zeit durchzuführen, um eine detaillierte Beurteilung

des Verlaufs der Fettgewebeentwicklung anhand resultierender Zellzahlen darzustellen. Hierfür wurden die Gewebedünnschnitte der Mäuse nach einer HE-Anfärbung mikroskopisch untersucht und die Zellzahlen resultierend jeweils aus unreifen und reifen Adipozyten histomorphometrisch quantifiziert. Die Unterscheidung erfolgte mittels einer Größenzuordnung, wobei Zellen kleiner 20 µm Durchmesser den unreifen und Zellen größer 20 µm Durchmesser den reifen Adipozyten zugeordnet wurden.

Aus der quantitativen Analyse mittels Histomorphometrie ergab sich, dass in allen Konstrukten die Zahlen an Zellen der den unreifen Adipozyten zugeordneten Größenordnung von kleiner als 20µm tendenziell während der gesamten Zeit *in vivo* klein bleibt. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen der ermittelten Zellzahlen lässt sich kein klarer Trend erkennen. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen der Resultate und der statistischen Analyse der Ergebnisse ist für Gruppe 4 ein Rückgang der Anzahl an unreifen Adipozyten nachzuweisen. Die Zellzahlen resultierend aus großen Zellen mit einem Durchmesser mehr als 20µm, die den reifen Adipozyten zugeordnet wurden, steigen dagegen in allen Proben leicht an, wobei die Konstrukte der Gruppe 4 den absolut höchsten Wert aufwiesen. Statistisch signifikant ist dieser Anstieg allerdings nur für die Proben aus den Gruppen 3 und 4, wobei für Gruppe 4 dieser Anstieg besonders auffällig ist. In der HE-Anfärbung ist demgemäß in Gruppe 4 eine Vielzahl reifer Adipozyten zu erkennen. Unter Berücksichtigung der konstant sehr geringen Anzahl an Adipozyten in den Proben für die Gruppen 1 bis 3 im betrachteten Untersuchungszeitraum ist nach den vorliegenden Daten davon auszugehen, dass in diesen Gruppen auch bei weiterem Verbleib der Implantate *in vivo* vermutlich kein Verlauf einer Adipogenese zu erwarten gewesen wäre, wie in Gruppe 4 gefunden wurde.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war es, durch Anfärbung charakteristischer Proteine der extrazellulären Matrix mittels markierter Antikörper und einer anschließenden immunohistochemischen Analyse des Verlaufs der Signalintensität dieser markierten Komponenten in der EZM die Adipogenese mittels Analyse der entstehenden Gerüstproteine zu verfolgen. Hierfür wurde

durch eine umfangreiche immunohistochemische Analyse die Bildung der Kollagene I, IV und VI sowie von Laminin als Bestandteile der EZM analysiert und damit die Art und der Umfang der entstandenen extrazellulären Matrix während der Adipogenese qualitativ beurteilt. Die Fluoreszenz-Bilder der Proben nach den jeweiligen Gruppen und Wochen *in vivo* zeigen einen deutlichen Hinweis im Sinne der Bildung von Fettgewebe in den Gewebe-Konstrukten der Gruppe 4. Während in den Gruppen 1 und 2 fast durchweg faserartige Bindegewebsstrukturen, verbunden mit den entsprechenden eher fibrillärem Aussehen der Signale für die untersuchten Kollagene I, IV, VI und für Laminin gefunden werden konnten, zeigen die Konstrukte der Gruppe 3 und insbesondere von Gruppe 4 in den Fluoreszenz-Abbildungen deutlich ausgeprägtere, netzartig ausgebildete Strukturen. Hier zeigt sich anhand der für die EZM von Adipozyten charakteristischen Proteine die Entstehung von Fettgewebe, offensichtlich gefördert durch die für die Gruppen 3 und 4 längere Zeit der Vorkultivierung.

Aus den Resultaten der vorliegenden Arbeit kann demnach geschlossen werden, dass die Art der Vorkultivierung eine spätere Adipogenese eindeutig beeinflussen kann. Eine längere Inkubationszeit nach erfolgter Induktion der Präadipozyten zur Förderung der Reifung zu Adipozyten vor der Implantation fördert die Bildung einer höheren Anzahl von Adipozyten und die Ausbildung einer charakteristischen EZM. Die Proben der Gruppe 4, die die insgesamt längsten Zeiten des Verbleibs im Brutschrank aufwiesen, zeigten nach 24 Wochen in den Versuchstieren die höchsten Zahlen an reifen Adipozyten. Die Gewebe-Konstrukte der Gruppen 1 und 2, die nach erfolgter Induktion nur noch zwei Tage im Brutschrank blieben und danach sofort in die Versuchstiere implantiert wurden, zeigen dagegen praktisch keine oder nur sehr geringe Zahlen an Adipozyten sowie primär die Ausbildung von faserartigem Bindegewebe. Diese Erkenntnisse eröffnen für zukünftige Arbeiten die Möglichkeit, durch die weitere Optimierung der Vorkultivierung, verbunden mit einer eventuell noch besseren Überlebensrate der ursprünglich eingebrachten Zellen, die Herstellung von klinisch geeigneten Konstrukten aus Fettgewebe weiter voranzutreiben.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Sterodimas A., De Faria J. Correa WE., Ptanguy I., Tissue engineering in plastic surgery: an up-to-date review of the current literature, *Ann. Plast. Surg.*, 2009, 62 (1), 97f.
- 2 D'Amico RA., Rubin JP., Regenerative medicine and the future of plastic surgery, *Plast. Reconstr. Surg.*, 2014, 133 (6), 1511f.
- 3 Skalak R., Fox CF., Tissue engineering, *Ann. Biomed. Eng.*, 1991, 19, 529f.
- 4 Walgenbach KJ., Voigt M., Riabikhin AW., Andree C., Schaefer DJ., Galla TJ., Stark GB., Tissue engineering in plastic reconstructive surgery, *Anat. Rec.*, 2001, 263, 372f.
- 5 Langer R., Vacanti JP., Tissue Engineering, *Science* 1993, 260, 920f.
- 6 Langer R., Vacanti JP., Artificial organs, *Sci. Am.*, 1995, 273 (3), 130 f.
- 7 Choi JS., Choi YC., Kim JD., et al., Adipose tissue: A valuable resource of biomaterials for soft tissue engineering, *Macromol. Res.*, 2014, 22, 932f.
- 8 Cao Y., Vacanti JP., Paige KT., Upton J., Vacanti CA., Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear, *Plast. Reconstr. Surg.*, 1997, 100 (2), 297f.
- 9 Pratt GF., Rozen WM., Chubb D., Ashton MW., Alonso-Burgos A., Whitaker IS., Preoperative imaging for perforator flaps in reconstructive surgery: a systematic review of evidence for current techniques, *Ann. Plast. Surg.*, 2012, 69 (1), 3f.

- 10 Taylor GI., Daniel RK., The free flap: composite tissue transfer by vascular anastomosis, Aust. NZ J. Surg., 1973, 43 (1), 1f.
- 11 Nodzo SR., Hohman DW., Chakravarthy K., Nanotechnology: why should we care? Am. J. Orthop., 2015, 44 (3), 87f.
- 12 Murphy SV., Atala A., 3D printing of tissues and organs, Nat. Biotechnol., 2014, 32 (8), 773f.
- 13 Gerstle TL., Ibrahim AM., Kim PS., Lee BT., Lin SJ., A plastic surgery application in evolution: three-dimensional printing, Plast. Reconstr. Surg., 2014, 133(2), 446f.
- 14 Chae MP., Rozen WM., McMenemy PG., Findlay MW., Szychal RT., Hunter-Smith DJ., Emerging applications of bedside 3D printing in plastic surgery, Front. Surg., 2015, 2, 25f.
- 15 Kamali P., Dean D., Skoracki R., Koolen PG., Paul MA., Ibrahim AM., The current role of three-dimensional (3D) printing in plastic surgery, Plast. Reconstr. Surg., 2016, 137 (3), 1045f.
- 16 Statistics of the American Society of Plastic Surgeons (ASPS), 2013, available from: [www.plasticsurgery.org](http://www.plasticsurgery.org), Zugriff 17. Nov. 2017
- 17 Meyer U., Meyer Th., Handschel J., Wiesmann H.P., (Eds.), Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2009, XXVI; Springer-Verlag
- 18 Meyer U., Handschel J., Gerges Ch., Wiesmann H.-P., Tissue engineering und regenerative Medizin, Zahnmedizin, 2012, 12
- 19 Caplan A., Bruder S., Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century, Trends Mol. Med., 2001, 7 (6), 259f.

- 20** Dolderer J., Medved F., Haas R., Siegel-Axel D., Schiller S., Schaller H.-E., Angiogenese und Vaskularisation beim Tissue Engineering von Fettgewebe, *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir.* 2013, 45, 99f.
- 21** Neuber G., Fetttransplantation, *Verh. Dtsch. Ges. Chir.* 1893, 22, 66f.
- 22** Beahm EK., Walton RI., Patrick CW. Jr., Progress in adipose tissue construct development, *Clin. Plast. Surg.* 2003, 30, 547f.
- 23** Weiser B., Neubauer M., Goepferich A., Blunk T., in: Bowlin GL., Wnek GE. (Eds.), *Tissue Engineering, Fat*, 2<sup>nd</sup> Ed., *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Vol. 4, Marcel Dekker Inc., New York, 2005, 2725f.
- 24** Patrick CW., Tissue engineering strategies for adipose tissue repair, *Anat. Rec.*, 2001, 263 (4), 361f.
- 25** Henriksen TF., Holmich LR., Fryzek JP., et al., Incidence and severity of short-term complications after breast augmentation: results from a nationwide breast implant registry, *Ann. Plast. Surg.*, 2003, 51, 531f.
- 26** Tanzi MC., Fare S., Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches, *Expert Rev. Med. Devices*, 2009, 6(5), 533f.
- 27** Huss FR., Kratz G., Adipose tissue processed for lipo-injection shows increased cellular survival in vitro when tissue engineering principles are applied, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.*, 2002, 36, 166f.
- 28** Patrick CW., Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection, *Sem. Surg. Oncol.*, 2000, 19(3), 302f.
- 29** Tachi M., Yamada A., Choice of flaps for breast reconstruction, *J. Clin. Oncol.*, 2005, 10, 289f.



- 30** Garvey PB., Buchel EW., Pockaj BA., Casey WJ., Gray RJ., Hernandez JL., Samson TD., DIEP and pedicled TRAM flaps: a comparison of outcomes, *Plast. Reconstr. Surg.*, 2006, 117, 1711f.
- 31** Flynn L., Woodhouse KA., Adipose tissue engineering with cells in engineered matrices, *Organogenesis*, 2008, 4 (4), 228f.
- 32** Choi JH., Gimble JM., Lee K., Marra KG., Rubin JP., Yoo JJ., Vunjak-Novakovic G., Kaplan DL., Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration, *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2010, 16, 413f.
- 33** Salibian AA., Widgerow AD., Abrouk M., Evan GRD., Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications, *Arch. Plast. Surg.*, 2013, 40, 666f.
- 34** Mooney DJ., Mikos AG., Growing new organs, *Sci. Am.*, 1999, 280, 60f.
- 35** Karagoz H., Zor F., Goktas E., Gorantla VS., Adipogenesis for soft tissue reconstruction, *Curr. Opin. Organ Transplant.*, 2019, 7
- 36** Stock UA., Vacanti JP., Tissue engineering: current state and prospects, *Ann. Rev. Med.*, 2001, 52, 443f.
- 37** Yang S., Leong KF., Du Z., Chua CK., The design of scaffolds for use in tissue engineering, Part I traditional factors, *Tissue Eng.*, 2001, 7, 679f.
- 38** Evans C., Palmer GD., Pascher A., Porter R., Kwong FN., Gouze E., Gouze JN., Liu F., Steinert A., Betz O., Betz V., Vrahas M., Ghivizzani SC., Facilitated endogenous repair: making tissue engineering simple, practical and economical, *Tissue Eng.*, 2007, 13, 1987f.
- 39** Giatsidis G., Succar J., Haddad A., Lago G., Schaffer C., Wang X., Schilling B., Chnari E., Matsumine H., Orgill DP., Preclinical optimization of a shelf-ready, injectable, human-derived, decellularized allograft adipose matrix, *Tissue Eng. Part A.*, 2019, 25 (3-4), 271f.

- 40** Kokai LE., Schilling BK., Chnari E., Huang YC., Imming EA., Karunamurthy A., Khouri RK., D'Amico RA., Coleman SR., Marra KG., Rubin JP., Injectable allograft adipose matrix supports adipogenic tissue remodeling in the nude mouse and human, *Plast. Reconstr. Surg.*, 2019, 143 (2), 299f.
- 41** Giatsidis G., Succar J., Waters TD., Liu W., Rhodius P., Wang C., Nilsen TJ., Chnari E., Orgill DP., Tissue engineered soft tissue reconstruction using non-invasive mechanical preconditioning and a shelf-ready allograft adipose matrix, *Plast. Reconstr. Surg.*, 2019, Jul 3 (e-Pub.)
- 42** Weiser B., Prantl L., Schubert TEO., Zellner J., Fischbach-Teschl C., Spruss T., Seitz AK., Tessmar J., Goepferich A., Blunk T., In vivo development and long-term survival of engineered adipose tissue depend on the in vitro precultivation strategy, *Tissue Eng.*, 2008, 14, 275f.
- 43** Fischbach C., Seufert J., Staiger H., Hacker M., Neubauer M., Goepferich A., Blunk T., Three-dimensional in vitro model of adipogenesis: comparison of culture conditions, *Tissue Eng.*, 2004, 10, 215f.
- 44** Kang X., Xie Y., Kniss DA., Adipose tissue model using three-dimensional cultivation of preadipocytes seeded onto fibrous polymer scaffolds, *Tissue Eng.*, 2005, 11, 458f.
- 45** Bauer-Kreisel P., Goepferich A., Blunk T., Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, 62, 798f.
- 46** Gimble JM., Katz AJ., Bunnell BA., Adipose-derived stem cells for regenerative medicine, *Circ. Res.*, 2007, 100, 1249f.
- 47** Owen M., Marrow stromal stem cells, *J. Cell Sci. Suppl.*, 1988, 10, 63f.
- 48** Caplan AI., Mesenchymal stem cells, *J. Orthop. Res.*, 1991, 9, 641f.

- 49** Zuk PA., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell JW., Katz AJ., Benhaim P., Lorenz HP., Hedrick MH., Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng.*, 2001, 7, 211f.
- 50** Bosch P., Musgrave DS., Lee JY., Cummins J., Shuler T., Ghivizzani TC., Evans T., Robbins TD., Huard J., Osteoprogenitor cells within skeletal muscle, *J. Orthoped. Res.*, 2000, 18, 933f.
- 51** Toma JG., Akhavan M., Fernandes KJ., Barnabé-Heider F., Sadikot A., Kaplan DR., Miller FD, Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin, *Nat. Cell Biol.*, 2001, 3, 778f.
- 52** Zuk PA., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte DA., Huang JI., Mizuno H. Alfonso ZC., Fraser JK., Benhaim P., Hedrick MH., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Mol. Biol. Cell*, 2002, 13, 4279f.
- 53** Gimble JM., Guilak F., Bunnell BA., Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose-derived stem cells, *Stem Cell Res. Ther.*, 2010, 1, 19f.
- 54** Lee RH., Kim BC., Choi IS., Kin H., Choi HS., Suh KT., Bae YC., Jung JS., Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue, *Cell Physiol. Biochem.*, 2004, 14, 311f.
- 55** Gentile P., Orlandi A., Scioli MG., Di Pasquali C., Bocchini I., Cervelli V., Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery, *Stem Cells Transl. Med.*, 2012, 1, 230f.
- 56** Zuk, Zhu, Mizuno; Gimble, Guilak, Bunnell; Bourin, P., Bunnell BA., Casteilla L., Dominici M., Katz AJ., March KL., Redl H., Rubin JP., Yoshimura K., Gimble JM., Stromal cells from the adipose tissue-derived

- stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT), *Cytotherapy*, 2013, 15, 641f.
- 57** Prieto González EA., Heterogeneity in adipose stem cells, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, 1123, 119f.
- 58** Flynn L., Woodhouse KA., Adipose tissue engineering with cells in engineered matrices, *Organogenesis*, 2008, 4, 228f.
- 59** Ahmed TAE., Dare EV., Hincke M., Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications, *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2008, 14, 199f.
- 60** Nicodemus GD., Bryant SJ., Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications, *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2008, 14, 149f.
- 61** Von Heimburg D., Zacchariah S., Low A., Pallua N., Influence of different biodegradable carriers on the in vivo behavior of human adipose precursor cells, *Plast. Reconstr. Surg.*, 2001, 108, 411f.
- 62** Von Heimburg D., Zaccharia S., Heschel I., Kuehling H., Schoof H., Hafemann B., Pallua N., Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo, *Biomaterials*, 2001, 22, 429f.
- 63** Stillaert FB., Di Bartolo C., Hunt JA., Rhodes NP., Tognana E., Monstrey S., Blondeel PN., Human clinical experience with adipose precursor cells seeded on hyaluronic acid-based spongy scaffolds, *Biomaterials*, 2008, 29, 3953f.
- 64** Song K., Li L., Yan X., Zhang W., Zhang Y., Wang Y., Liu T., Characterization of human adipose tissue-derived stem cells in vitro culture and in vivo differentiation in a temperature-sensitive

- chitosan/beta-glycerophosphate/collage hybrid hydrogel, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2017, 70 (Pt 1), 231f.
- 65** Huang Q., Zou Y., Arno MC., Chen S., Wang T., Gao J., Dove AP., Du J., Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, 46 (20), 6255f.
- 66** Von Heimburg D., Rendchen R., Di Bartolo C., Milella E., Pallua N., Implantation of preadipocyte-loaded hyaluronic acid-based scaffolds into nude mice to evaluate potential for soft tissue engineering, *Biomaterials*, 2005, 26, 7025f.
- 67** Barnett HH., Heimbuck AM., Pursell I., Hegab RA., Sawyer BJ., Newman JJ., Caldorera-Moore ME., Poly(ethylene glycol) hydrogel scaffolds with multiscale porosity for culture of human adipose-derived stem cells, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2019, 30 (11), 895f.
- 68** Rim NG., Shin CS., Shin H., Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering, *Biomed. Mater.*, 2013, 8, 014102f.
- 69** Kim JE., Kim SH., Jung Y., Current status of three-dimensional printing inks for soft tissue regeneration, *Tissue Eng. Regen. Med.*, 2016, 13 (6), 636f.
- 70** Jamróz W., Szafraniec J., Kurek M., Jachowicz R., 3D printing in pharmaceutical and medical applications – recent achievements and challenges, *Pharma Res.*, 2018, 35 (9), 176f.
- 71** Jammalamadaka U., Tappa K., Recent advances in biomaterials for 3D printing and tissue engineering, *J. Funct. Biomater.*, 2018, 9 (1)
- 72** Zhang L., Yang G., Johnson BN., Jia X., Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair, *Acta Biomater.*, 2019, 84, 16f.

- 73** Luo Y., Wei X., Wan Y., Lin X., Wang Z., Huang P., 3D printing of hydrogel scaffolds for future application in photothermal therapy of breast cancer and tissue repair, *Acta Biomater.*, 2019, 92, 37f.
- 74** Cleversey C., Robinson M., Willerth SM., 3D printing breast tissue models: a review of past work and directions for future work, 2019, 10 (8)
- 75** Hutmacher DW., Sittering M., Risbud MV., Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems, *Trends Biotechnol.*, 2004, 22, 354f.
- 76** Yang S., Leong KF., Du Z., Chua CK., The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques, *Tissue Eng.*, 2002, 8, 1f.
- 77** Tytgat L., Van Damme L., Van Hoorick J., Declercq H., Thienpont H. Ottevaere H., Blondeel P., Dubruel P., Van Vlierberghe S., Additive manufacturing of photo-crosslinked gelatin scaffolds for adipose tissue engineering, *Acta Biomater.*, 2019, 94, 340f.
- 78** Leong KF., Cheah CM., Chua CK., Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs, *Biomaterials*, 2003, 24, 2363 f.
- 79** Mahoney CM., Imbarlina C., Yates CC., Marra KG., Current therapeutic strategies for adipose tissue defects/repair using engineered biomaterials and biomolecule formulations, *Front. Pharmacol.*, 2018, 9, 507f.
- 80** Getova VE., Van Dongen JA., Brouwer LA., Harmsen MC., Adipose tissue-derived ECM hydrogels and their use as 3D culture scaffold, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2019, 47 (1), 1693f.
- 81** Blüher, M., Das Fettgewebe: ein endokrines Organ, *Der Internist*, 2014, 55, 687f.

- 82** Niemelä S., Miettinen S., Sarkanen J.R., Ashammakhi N., Adipose tissue and adipocyte differentiation: molecular and cellular aspects and tissue engineering applications, Topics in Tissue Engineering, Vol. 4, Eds. Ashammakhi N., Reis R., Chiellini F., 2008, [https://www oulu.fi/spareparts/ebook\\_topics\\_in\\_t\\_e\\_vol4/](https://www oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol4/)
- 83** Patrick CW., Zheng B., Johnston C. Reece GP., Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds, Tissue Eng., 2002, 8, 283f.
- 84** Patrick CW., Chauvin PB., Hogley J., Reece GP., Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering, Tissue Eng., 1999, 5, 139f.
- 85** Eyrich D., Wiese H., Maier G., Skodacek D., Appel B., Sarhan H., Tessmar J., Staudenmaier R., Wenzel M., Goepferich A., Blunk T., In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocyte-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactones-based polyurethane scaffolds, Tissue Eng., 2007, 13, 2207f.
- 86** Jovanovic D., Engels GE., Plantinga JA., Bruinsma M., Van Oeveren W., Schouten AJ., Van Luyn MJA., Harmsen MC., Novel polyurethanes with interconnected porous structure induce in vivo tissue remodeling and accompanied vascularization, J. Biomed. Mater. Res. A, 2010, 95, 198f.
- 87** Wiese H., Maier G., Open-pored polyurethane foam without skin formation, formulation for the production thereof and use thereof as a carrier material for cell and tissue cultures or medicaments, Pat. No. WO/2006/032501 A1, 2006
- 88** Norouz F., Halabian R., Salimi A., Ghollasi M., A new nanocomposite scaffold based on polyurethane and clay nanoplates for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro, Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl., 2019, 103, 109857

- 89** Ricard-Blum S., The collagen family, Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2011, 3 (1), a004978
- 90** Engel J., Odermatt E., Engel A., Madri JA., Furthmayr H. Rohde H., Timpl R., Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix, J. Mol. Biol., 1981, 150, 97f.
- 91** Martin GR, Timpl R., Laminin and other basement membrane components, Ann. Rev. Cell. Biol., 1987, 3, 57f.
- 92** Utani A., Nomitsu M., Sugiyama S., Miyamoto S., Roller PR., Yamada Y., A specific sequence of the laminin alpha2 chain critical for the initiation of heterotrimer assembly, J. Biol. Chem., 1995, 270, 3292f.
- 93** Nomizu M., Kim WH., Yamamura K., Utani A., Song SY., Otaka A., Roller PP., Kleinman HK., Yamada Y., Identification of cell binding sites in the laminin alpha1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides, J. Biol. Chem., 1995, 270, 20583f.
- 94** Shaw ARE, Domanska A., Mak A., Gilchrist A., Dobler K., Visser L., Poppema S., Fliegel L., Letarte M., Willett BJ., Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers  $\beta$ 1 integrin-independent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation, J. Biol. Chem., 1995, 270, 24092f.
- 95** Feucht A., Hoang N.T., Hien P.T., Mandlik V., Storck K., Staudenmaier R., Neovascularisation and free microsurgical transfer of cartilage-engineered constructs, HNO, 2011, 59 (3), 239f.
- 96** Hoang N.T., Hoehnke C., Hien P.T., Mandlik V., Feucht A., Staudenmaier R., Neovascularisation and free microsurgical transfer of in vitro cartilage-engineered constructs, Microsurgery, 2009, 29 (1), 52f.
- 97** Rittler-Ungethüm B., Tissue Engineering, Kultivierung humaner Präadipozyten zur Beimpfung dreidimensionaler Polyurethankonstrukte,



- Dissertation, Technische Universität München, HNO-Klinik und Poliklinik Rechts der Isar, 2011
- 98** Lemoine AY., Ledoux S., Larger E., Adipose tissue angiogenesis in obesity, *Thromb. Maemost.*, 2013, 110, 661f.
- 99** Gesta S., Tseng YH., Kahn CR., Developmental origin of fat: tracking obesity to its source, *Cell*, 2007, 131, 242f.
- 100** Fruehbeck G., Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders, *Meth. Mol. Biol.*, 2008, 456, 1f.
- 101** Shen W., Wang Z., Punyanita M., Lei J., Sinav A., Kral JG., Imielinsk C., Ross R., Heymsfield SB., Adipose quantification by imaging methods: a proposed classification, *Obes. Res.*, 2003, 11, 5f.
- 102** Trayhurn P., Adipocyte biology, *Obes. Rev. Suppl 1*, 2007, 8, 41f.
- 103** Ayad S., Boot-Handford R., Humphries MJ., Kadler KE., Shuttleworth A., The extracellular matrix, *Factsbook 2<sup>nd</sup> Ed.*, Academic Press, London, 1998
- 104** Lüllmann-Rauch R., Taschenlehrbuch Histologie, Thieme-Verlag, Stuttgart 2012, 132f.
- 105** J. H. Mayer, In vivo Langzeitstudie zur vaskulären Integration an in vivo vorkultivierten, tissue engineereten Präadipozyten im Polyurethangerüst, Dissertation Technische Universität München, HNO-Klinik und Poliklinik Rechts der Isar, 2016
- 106** K. Ojima, M. Oe, I. Nakajima, S. Muroya, T. Nishimura, Dynamics of protein secretion during adipocyte differentiation, *FEBS Open Bio*, 2016, 6, 816f.

- 107** Pierleoni C., Verdenelli F., Cinti S., Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue, *Eur. J. Histochem.*, 1998, 42, 183f.
- 108** Mariman E., Wang P., Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010, 67, 1277f.
- 109** Sillat T., Saat R., Pöllänen R., Hukkanen M., Takagi M., Kontinen Y., Basement membrane collagen type IV expression by human mesenchymal stem cells during adipocyte differentiation, *J. Cell. Mol. Med.*, 2012, 16 (7), 1485f.
- 110** Inoue S., Hori Y., Hirano Y., Effect of culture substrate and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of human adipo-stromal cells, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2005, 16, 57f.
- 111** Mauney J., Volloch V., Human bone marrow-derived stromal cells show highly efficient stress-resistant adipogenesis on denaturated collagen IV matrix but not on its native counterpart: implications for obesity, *Matrix Biol.*, 2010, 29, 9f.
- 112** Daley W.P., Peters S.B., Larsen M., Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine, *J. Cell Sci.*, 2008, 121, 255f.
- 113** McKee T.J., Perlman G., Morris M., Komarova S.V., Extracellular matrix composition of connective tissue: a systematic review and meta-analysis, *Sci. Rep.*, 2019, 9 (1), 10542
- 114** Schwarzbauer J., Basement membrane: putting up the barriers, *Curr. Biol.*, 1999, 9, 242f.
- 115** Myllyharju J., Kivirikko K.I., Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies, and worms, *Trends in Genetics*, 2004, 20, 33f.

- 116** Gordon M.K., Hahn R.A., Collagens, *Cell Tissue Res.*, 2010, 339 (1), 247f.
- 117** Godwin A., Histochemical uses of haematoxylin - a review, *JPCS*, 2011, 1, 24f.
- 118** Rozario T., DeSimone D.W., The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view, *Dev. Biol.* 2010, 341(1), 126f.
- 119** Kubo Y., Kaidzu S., Nakajima I., Takenouchi K., Nakamura F., Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 2000, 36 (1), 38f.
- 120** Aratani Y., Kitagawa Y., Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox Laminin complex, *J. Biol. Chem.*, 1988, 263 (31), 16163f.
- 121** Kielty, C.M., Grant, M.E., The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix, in: Royce, P.M., Steinmann, B., Eds., *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*, Wiley Inc., New York, 2002, 159f.
- 122** Nakajima I., Muroya S., Tanabe R., Chikuni K., Extracellular matrix development during differentiation into adipocytes with a unique increase in type V and VI collagen, *Biol. Cell.*, 2002, 94, 197f.
- 123** Green H., Meuth M., An established preadipose cell line and its differentiation in culture, *Cell*, 1974, 3, 127f.
- 124** Weiner F.R., Shah A., Smith P.J., Rubin C.S., Zern M.A., Regulation of collagen gene expression in 3T3-L1 cells. Effects of adipocyte differentiation and tumor necrosis factor alpha, *Biochemistry*, 1989, 28 (9), 4094f.

- 125** Renes J., Bouwman F., Noben J.P., Evelo C., Robben J., Mariman E., Protein profiling of 3T3-L1 adipocyte differentiation and (tumor necrosis factor alpha-mediated) starvation, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, 62 (4), 492f.
- 126** Molina H., Yang Y., Ruch T., Kim J.W., Mortensen P., Otto T., Nalli A., Tang Q.Q., Lane M.D., Chaerkady R., Pandey A., Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a 5-plex SILAC based strategy, *J. Proteome Res.*, 2009, 8 (1), 48f.
- 127** Khan T., Muise E.S., Iyengar P., Wang Z.V., Chandalia M., Abate N., Zhang B.B., Bonaldo P., Chua S., Scherer P.E., Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI, *Mol. Cell Biol.*, 2009, 29 (6), 1575f.
- 128** Noro A., Sillat T., Virtanen I., Ingerpuu S., Bäck N., Konttinen Y.T., Korhonen M., Laminin production and basement membrane deposition by mesenchymal stem cells upon adipogenic differentiation, *J. Histochem. Cytochem.*, 2013, 61(10), 719f

## 7. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Prozessablauf des Tissue Engineerings	2
Abb. 2	Möglichkeiten der Ausdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen	6
Abb. 3	Schematischer Aufbau des Fettgewebes	9
Abb. 4	Exemplarische Darstellung der Ermittlung der Probenfläche	26
Abb. 5	Ausschluss von randständigem Fettgewebe	27
Abb. 6	Mikroskop-Aufnahmen der Gewebe-Dünnschnitte von Konstrukten der Gruppe 2	32
Abb. 7	HE-Anfärbungen von Gewebe-Dünnschnitten aus Gruppe 4	33
Abb. 8	Gewebe-Dünnschnitte nach HE-Anfärbung aus den verschiedenen Mäusen mit Konstrukten der Gruppe 4	34
Abb. 9	Darstellung der durchschnittlichen Gesamtzahl an Adipozyten	36
Abb. 10	Darstellung der durchschnittlichen Zellzahlen an Adipozyten resultierend aus Zellen mit Größen > 20 µm	38
Abb. 11	Darstellung der durchschnittlichen Zellzahlen an Adipozyten resultierend aus Zellen mit Größen < 20 µm	40
Abb. 12	Immunohistochemische Darstellung der Kollagen I spezifisch angefärbten Gewebeproben	42
Abb. 13	Immunohistochemische Darstellung der Kollagen IV spezifisch angefärbten Gewebeproben	43
Abb. 14	Immunohistochemische Darstellung der Kollagen VI spezifisch angefärbten Gewebeproben	45
Abb. 15	Immunohistochemische Darstellung der Laminin spezifisch angefärbten Gewebeproben	46

Abb. 16	Entwicklung der Zellzahlen in den Größenkategorien <20µm (unreife Adipozyten) und >20µm (reife Adipozyten) für Gruppe 4	48
Abb. 17	Darstellung der zeitlichen Entwicklung der Komponenten der EZM (Col I, IV, VI und Laminin) für Gruppe 4	49
Abb. 18	Übersichtsdarstellung der Resultate der HE-Anfärbung und der immunohistochemischen Analyse der Komponenten der EZM (Col I, IV, VI und Laminin) für Gruppe 1	51
Abb. 19	Übersichtsdarstellung der Resultate der HE-Anfärbung und der immunohistochemischen Analyse der Komponenten der EZM (Col I, IV, VI und Laminin) für Gruppe 2	52
Abb. 20	Übersichtsdarstellung der Resultate der HE-Anfärbung und der immunohistochemischen Analyse der Komponenten der EZM (Col I, IV, VI und Laminin) für Gruppe 3	54
Abb. 21	Übersichtsdarstellung der Resultate der HE-Anfärbung und der immunohistochemischen Analyse der Komponenten der EZM (Col I, IV, VI und Laminin) für Gruppe 4	56

## 8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Die verschiedenen fibrillären und nicht-fibrillären Kollagene	11
Tab. 2	Übersicht der verwendeten Geräte und Instrumente	15
Tab. 3	Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien	15
Tab. 4	Übersicht der eingesetzten Chemikalien und Pufferlösungen	16
Tab. 5	Übersicht der verwendeten Antikörper zur Fluoreszenz-Markierung spezifischer Komponenten der EZM	16
Tab. 6	Eingesetzte Software und Bearbeitungsprogramme	16
Tab. 7	Auflistung der verschieden vorkultivierten Konstrukte der Gruppen 1-4	18
Tab. 8	Protokoll zur Entparaffinisierung mittels absteigender Alkohol-Reihe	20
Tab. 9	Protokoll zur zweistufigen HE-Anfärbung	20
Tab. 10	Protokoll zur Entwässerung und zum Konservieren der Proben	21
Tab. 11	Vorbehandlung der Konstrukte aus Gruppe 1	50
Tab. 12	Vorbehandlung der Konstrukte aus Gruppe 2	52
Tab. 13	Vorbehandlung der Konstrukte aus Gruppe 3	53
Tab. 14	Vorbehandlung der Konstrukte aus Gruppe 4	55
Tab. 15	Auswertung der Zellzahlen in Woche 5 nach Gruppen und Zellgrößen	85
Tab. 16	Auswertung der Zellzahlen in Woche 12 nach Gruppen und Zellgrößen	85
Tab. 17	Auswertung der Zellzahlen in Woche 24 nach Gruppen und	86

Zellgrößen

Tab. 18	Statistische Analyse der Ergebnisse der Gesamt-Zellzahlen	87
Tab. 19	Statistische Analyse der Ergebnisse der Zellzahlen >20µm (reife Adipozyten)	87
Tab. 20	Statistische Analyse der Ergebnisse der Zellzahlen <20µm (unreife Adipozyten)	88



## 9. Danksagung

Mein Dank für die Unterstützung während der Durchführung meiner Dissertation gilt einer ganzen Reihe von Personen.

Zuallererst gilt mein ganz besonderer und sehr herzlicher Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk für das Thema meiner Arbeit, die Aufnahme in den Arbeitskreis und die Betreuung meiner Arbeit, verbunden mit der immer sehr versierten und geduldigen Unterstützung bei der Klärung von wissenschaftlichen Fragestellungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Petra Bauer-Kreisel für die exzellenten fachlichen Hilfestellungen und die stets sehr fundierten Tipps und Ratschläge.

Besonderen Dank schulde ich zudem meiner Betreuerin, Frau Christiane Höfner, die mich bei den experimentellen Arbeiten im Labor immer tatkräftig unterstützt hat. Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für die stets sehr nette und kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Dank gilt auch meinem Bruder Christian Stebani sowie Frau Dr. Katrin Bolz für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen.

Zuletzt und ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während meines Studiums, über die Dauer meiner Dissertation und zum Start meiner Berufstätigkeit immer unterstützt und somit zum Erfolg dieser Lebensabschnitte ganz wesentlich beigetragen haben.

## 10. Curriculum Vitae

<b>Persönliche Informationen</b>	Name	Tanja Stebani
	Wohnort	München
	Staatsangehörigkeit	Deutsch
<b>Schul- ausbildung</b>	1994 – 2008	Abschluss: Abitur
<b>Universitäts- ausbildung</b>	2009 – 2015	Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg
	08/2015	Approbation als Zahnärztin
	10/2015 – 10/2016	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Würzburg, Arbeitskreis Prof. Dr. Torsten Blunk,
<b>Berufliche Tätigkeit</b>	02/2017 – 08/2019	Vorbereitungsassistentin in Berlin und München
	seit 09/2019	Angestellte Zahnärztin in München