

Aus der Abteilung  
für  
Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Prof. Dr. Dr. Lukas Prantl  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Der Einfluss von aus adipogenen Stammzellen gewonnenen Exosomen auf  
die Vitalität und Genexpression von MCF-7 Zellen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Simon Vedlin*

2024



Aus der Abteilung  
für  
Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Prof. Dr. Dr. Lukas Prantl  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**Der Einfluss von aus adipogenen Stammzellen gewonnenen Exosomen auf  
die Vitalität und Genexpression von MCF-7 Zellen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Simon Vedlin*

2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Lukas Prantl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Schreml

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2024

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis .....	1
2	Einleitung .....	4
2.1	Das Mammakarzinom und mögliche Therapieoptionen .....	4
2.2	Rekonstruktionsoptionen der Mamma nach operativen Tumorresektionen .....	5
2.3	Autologe Fetttransplantation .....	6
2.4	Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe .....	8
2.5	Sekretom und Extrazelluläre Vesikel der ADSC .....	9
2.5.1	Exosomen .....	11
2.6	Onkologische Sicherheit der autologen Fetttransplantation .....	12
2.7	Onkogenese und Tumormikroumgebung .....	13
2.7.1	Zellzyklus, Pro- und antiapoptotische Signale .....	15
2.7.2	p53 und pRB als Tumorsuppressorproteine .....	17
2.7.3	Angiogenese und Wachstumsfaktoren in der Tumorentwicklung .....	18
3	Zielsetzung .....	21
4	Material und Methoden .....	22
4.1	Isolierung von humanen adipogenen Stammzellen aus Lipoaspirat .....	22
4.2	Kultivierung und Passagierung der humanen adipogenen Stammzellen .....	22
4.3	Kultivierung und Passagierung der MCF-7 Zellen .....	23
4.4	Isolierung der Exosomen von humanen adipogenen Stammzellen .....	23
4.4.1	Inkubation in serumfreiem Medium .....	24
4.4.2	Reinigung des ADSC-KM .....	24
4.4.3	Konzentrierung des ADSC-KM .....	24
4.4.4	Magnetische Separation des Ultrafiltrats .....	25
4.5	Western Blot .....	25
4.5.1	SDS-PAGE .....	25
4.5.2	Transfer und Blocking .....	26
4.6	Herstellung von ADSC-KM und Exosomenmedium .....	27
4.6.1	ADSC-KM .....	27
4.6.2	Exosomenmedium .....	27
4.7	Vitalitätstest auf Grundlage von Resazurin .....	28

4.8	Zytotoxizitätstest auf Grundlage der freigesetzten Laktatdehydrogenase .....	29
4.9	Bestimmung der relativen Genexpression .....	29
4.9.1	RNA-Isolierung.....	30
4.9.2	Reverse Transkription.....	30
4.9.3	Polymerasekettenreaktion .....	31
4.10	Statistische Analyse und grafische Darstellung der Daten .....	33
5	Ergebnisse.....	35
5.1	Kultivierung adipogener Stammzellen und MCF-7 Zellen .....	35
5.2	Die isolierten Exosomen lassen sich mittels Western Blot nachweisen .....	35
5.3	ADSC-KM hat einen deutlich positiven Effekt auf die Vitalität von MCF-7 Zellen .....	36
5.4	Die Vitalität der MCF-7 Zellen ist abhängig von der Konzentration und der Einflussdauer des Exosomenmediums.....	37
5.5	ADSC-KM wirkt protektiv auf MCF-7 Zellen, während Exosomenmedium in Abhängigkeit von der Konzentration zunehmend zytotoxisch wirkt.....	38
5.6	ADSC-KM und Exosomenmedium beeinflussen die relative Genexpression von MCF-7 Zellen auf unterschiedliche Weise .....	39
5.6.1	Bcl-2 Familie: <i>Bad</i> , <i>Bax</i> und <i>Bcl-2</i> .....	39
5.6.2	Tumorsuppressorgene: <i>TP53</i> und <i>RBI</i> .....	41
5.6.3	Wachstumsfaktorgene: <i>VEGFA</i> , <i>PDGF-A</i> und <i>PDGF-B</i> .....	41
6	Diskussion.....	43
6.1	ADSC-Exosomen lassen sich durch die verwendeten Isolationsmethoden in einem Western Blot nachweisen.....	43
6.2	ADSC-KM steigert die Vitalität von MCF-7 Zellen und hemmt dessen Zelltod ....	46
6.3	Exosomen wirken mit zunehmender Konzentration suppressiv auf MCF-7 Zellen	47
6.4	ADSC-KM hat einen antiapoptotischen Effekt auf MCF-7 Zellen, während durch Exosomen eine eher proapoptotische Signalvermittlung initiiert wird.....	48
6.5	Exosomen vermitteln einen tumorsuppressiven Effekt durch die Initiierung der Tumorsuppressorproteine p53 und pRB .....	51
6.6	ADSC-KM vermittelt proonkogene Signale durch die Expression von Wachstumsfaktoren, während Exosomen insgesamt uneindeutige Effekte auf diese darstellen .....	52
6.7	Fazit zur onkologischen Sicherheit der AFT .....	55
7	Zusammenfassung.....	58
8	Abkürzungsverzeichnis.....	59
9	Literaturverzeichnis .....	62

10	Materialienverzeichnis .....	81
10.1	Einwegmaterialien .....	81
10.2	Chemikalien .....	81
10.3	Zelllinien .....	82
10.4	Primer.....	82
10.5	Antikörper .....	82
10.6	Kits.....	82
10.7	Geräte.....	82
10.8	Software .....	83
11	Abbildungsverzeichnis.....	84
12	Tabellenverzeichnis .....	85
13	Danksagung.....	86
14	Eigenständigkeitserklärung.....	87

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Mammakarzinom und mögliche Therapieoptionen

Das Mammakarzinom ist eine der am häufigsten auftretenden malignen Tumorarten und trotz modernster Therapieverfahren noch immer die Form von Krebs mit der höchsten Mortalität bei Frauen (1). So sind etwa 25 % aller Tumordiagnosen bei Frauen ein Mammakarzinom und machen etwa 15 % aller Tode durch Tumoren aus (1). Einerseits ist die Mortalität des Mammakarzinoms in Europa in den letzten 25-30 Jahren durch neue therapeutische Optionen und Screening als Möglichkeit zur Früherkennung gesunken, andererseits nahm die Inzidenz in dieser Zeit stetig zu (2,3). Diese kontrovers anmutende Korrelation zwischen sinkender Mortalität und steigender Inzidenz wird durch die zunehmende Exposition von Faktoren wie z.B. Hormontherapie und Übergewicht diskutiert (4). Aus epidemiologischer Betrachtungsweise ist nachgewiesen, dass Screening als Bestandteil der Prävention die Inzidenz ebenfalls steigert (3,5). Diese Annahme wird durch das von der deutschen Bundesregierung im Jahre 2002 eingeführte Mammakarzinom-Screening bei Frauen zwischen 50 und 69 Jahren gestützt, wobei die Effektivität dieser Maßnahme durch Senkung der Mortalität für diese Altersgruppe bestätigt werden konnte (2).

Grundsätzlich sind die Therapieoptionen bei Mammakarzinom folgende: operative Tumoresektion, Hormon-, Strahlen- und Chemotherapie. Zur Einschätzung und möglicher Therapieauswahl wird der Tumor nach der TNM-Klassifikation klassifiziert und im Verlauf in das jeweilige AJCC (American Joint Committee on Cancer) Stadium eingeteilt (6). Durch neue Forschungsergebnisse und innovative Tumortherapien wurde die ursprüngliche Klassifikation um den Östrogen-, Progesteron- und HER2/neu-Rezeptorstatus sowie den Ki67 Proliferationsmarker weiterentwickelt, da diese Faktoren mit der Prognose korrelieren und die möglichen Therapieoptionen erweitern können (6). Im Rahmen der zunehmend relevant werdenden personalisierten Medizin, bedingt durch die hohe Heterogenität zwischen Tumoren innerhalb und außerhalb eines Individuums, bleibt abzuwarten welche weiteren Therapien Einzug in die AJCC-Klassifikation finden (7). Obwohl man bereits auf andere nicht-chirurgische Optionen zurückgreifen kann, ist die operative Resektion noch immer essenzieller Bestandteil in der Tumortherapie (8).

Im Rahmen der chirurgischen Resektion beim Mammakarzinom wird zwischen Mastektomie und brusterhaltender Therapie (BET) differenziert (9). Für Tumoren in höheren Stadien oder



bei bestehenden Kontraindikationen für die BET, ist die Therapie der Wahl die Mastektomie (9). Im Unterschied zur vollständigen Resektion der Mamma bei der Mastektomie, wird im Rahmen der BET der Tumor im Gesunden reseziert, um so die Mamma zu erhalten und die Lebensqualität optimal wiederherzustellen (10). Die Methode wird bei Tumoren im frühen Stadium eingesetzt und zeigt dabei keinen Unterschied in der Überlebensrate in Kombination mit lokaler Strahlentherapie zur radikalen Mastektomie (11,12). Zusätzlicher Bestandteil der operativen Therapie ist die Lymphknotenresektion. Statt einer axillären Lymphknotendissektion mit vielen Nebenwirkungen, wird heutzutage initial die weniger invasive Sentinel-Lymphknoten Biopsie angewandt und zeigt den gleichen Erfolg für das Überleben im Vergleich zur ursprünglich routiniert verwendeten Lymphknotendissektion (9,13).

## **2.2 Rekonstruktionsoptionen der Mamma nach operativen Tumorresektionen**

Das Bedürfnis einer Rekonstruktion der Mamma im Anschluss einer operativen Resektion ist bei den Patienten stark ausgeprägt (10). Neben ästhetischen Aspekten und einer allgemein erhöhten Lebensqualität, nimmt die psychologische Zufriedenheit durch eine Mammarekonstruktion zu (10,14). So leiden Patientinnen ohne rekonstruktiven Eingriff zunehmend an Depression und Angst (15,16). Die Therapie der Wahl ist somit die Rekonstruktion, um auch diesen Komorbiditäten entgegenzuwirken.

Bei der Mammarekonstruktion wird zwischen zwei Rekonstruktionsoptionen, sowie zwei Zeiträumen entschieden (17). Die Rekonstruktion unmittelbar anschließend an die chirurgische Tumorresektion wird „sofortige Rekonstruktion“ genannt. Eine Rekonstruktion zu einem späteren Zeitpunkt bezeichnet man als „zweizeitige Rekonstruktion“. Vorteile der sofortigen Rekonstruktion sind eine zügigere postoperative Genesung, verringerte Morbidität, geringere Kosten und günstigere ästhetische Ergebnisse (18). Der Grund für eine zweizeitige Rekonstruktion und somit gegen die sofortige Rekonstruktion, ist eine nach der Mastektomie anschließend benötigte Strahlentherapie (19,20). Wegen möglicher strahlenbedingter Komplikationen des Implantats oder der autologen Rekonstruktion (AR), wird bei der zweizeitigen Rekonstruktion bis zum Abschluss der Strahlentherapie gewartet (21–23). Jedoch konnte ebenfalls gezeigt werden, dass allgemein eine präoperative Strahlentherapie zu einem geringeren Erfolg einer AR im Sinne einer alleinigen autologen Fetttransplantation (AFT) führt (24).

Die Rekonstruktionsoptionen werden in zwei übergeordnete Gruppen unterteilt. Einerseits besteht die Möglichkeit zur Implantat-basierten Rekonstruktion (IBR) oder andererseits zur AR in Form von Lappenplastiken und AFT (17,25). Beide Techniken werden routiniert angewandt und weisen gewisse Vorteile und Nachteile auf (26). Jedoch erreicht man durch eine IBR nicht das ursprüngliche natürliche Gefühl der Mamma (25). Daher zeigen AR eine erhöhte postoperative Lebensqualität und Zufriedenheit verglichen mit der IBR (10). Dieser Nachteil lässt sich möglicherweise durch eine Hybridtherapie von IBR und AR ausgleichen, bei der nach primärer Implantierung sekundär eine Rekonstruktion durch eine AFT durchgeführt wird (27). Dabei ist ein günstiger Nebeneffekt der Hybridtherapie das ästhetisch wertigere *Outcome* durch kaschieren des Implantatrandes und der üblichen irregulären Konturen des Implantatmaterials (27). Eine weitere Indikation zur sekundären Rekonstruktion mittels AFT ist die Optimierung von Lappenplastiken bei AR. So können z.B. ein zu geringes Spendermaterial des Lappens einer AR bei schlanken Patientinnen oder postoperative Asymmetrien der Brust durch überschüssiges Fettgewebe von andererorts ausgeglichen werden (25).

### **2.3 Autologe Fetttransplantation**

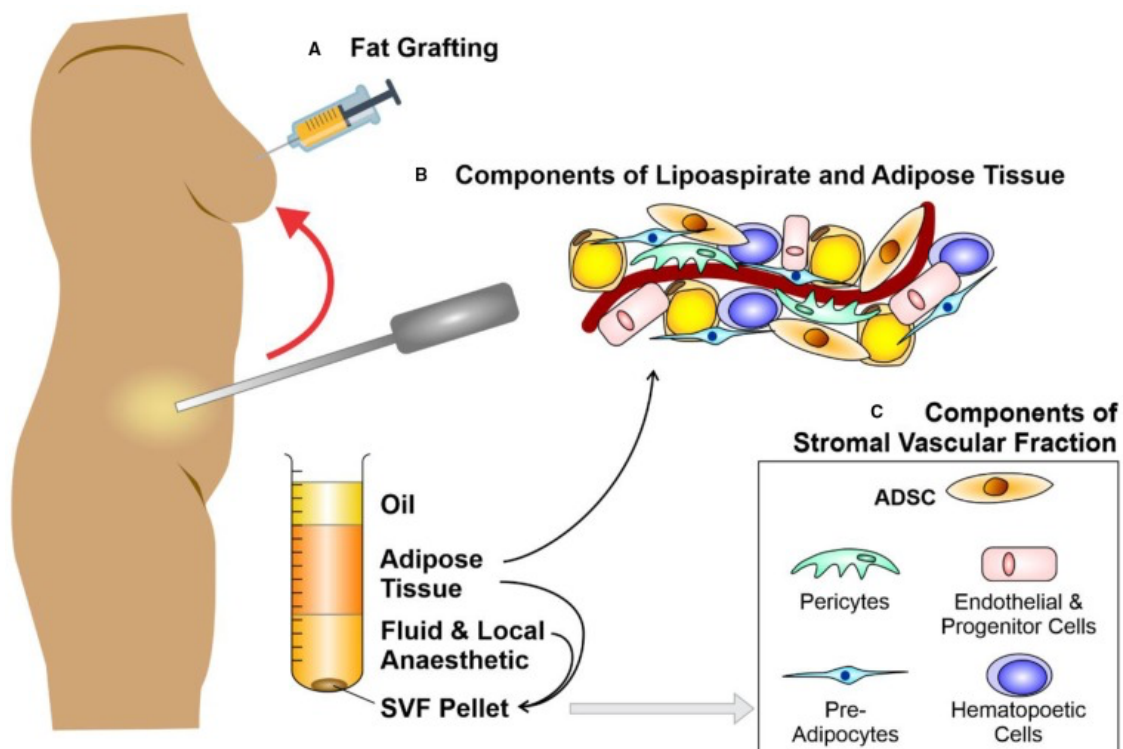
Die autologe Option zur Mammarekonstruktion in Form von autologen Fetttransplantationen wird auch *Fat Grafting* oder Lipofilling genannt (28). Dabei wird Fettgewebe an besonders fettreichen Stellen, wie z.B. dem Abdomen oder der Oberschenkel per Liposuktion gesammelt und definitionsgemäß, distanziert ohne intrinsische Blutversorgung reimplantiert (29,30). Eine gesicherte Revaskularisierung ist somit für das implantierte Gewebe und dem Überleben der AFT unerlässlich (31). Das Fettgewebe wird durch verschiedene Techniken gewonnen, wobei die Qualität des gesammelten Gewebes von verschiedenen methodischen Faktoren, wie der Spenderstelle, den verwendeten Sammelkanülen und der Größe des negativen Drucks bei der Liposuktion abhängig ist (32–36). Nach der Liposuktion bestehen zwei Optionen. Einerseits kann das Lipoaspirat als AFT reimplantiert werden. Andererseits kann dieses auch für Forschungszwecke weiterverwendet werden. Dabei wird aus methodischer Perspektive das Lipoaspirat nach dem Zentrifugieren und dem enzymatischen Verdau in drei Phasen aufgeteilt. Erstens die ölige Phase, zweitens die Fettgewebephase und als letztes die wässrige Phase. Am Grund des Zentrifugats befinden sich neben der wässrigen Phase vor allem Zellen mesodermalen oder mesenchymalen Ursprungs, welche als stromale vaskuläre Fraktion (SVF) definiert werden und als Pellet sichtbar sind (29). Neben adipogenen Stammzellen (Adipose-Derived

Stem Cells, ADSC) befinden sich in der SVF Perizyten, Präadipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und hämatopoetische Zellen (28,31). Im Vergleich zur mesenchymalen Stammzellen (MSC)-Gewinnung aus dem Knochenmark, sind in der SVF von Fettgewebe etwa 500-mal mehr MSC vorhanden (37).

Reine Fettgewebetransplantationen wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts durchgeführt (38). Trotz vielversprechender Aussicht nahm die Bedeutung der Methode zeitweise ab und wurde durch Silikon, als sogenanntes Material der Zukunft, für Mammarekonstruktionen in den 60er Jahren abgelöst (39). Die Liposuktion wurde erstmals 1977 erfolgreich verwendet (40). Durch Fortschritt dieser Methode und schwerwiegender Komplikationen der Implantate, gewann die AFT in den 80er Jahren wieder an Popularität (39). Erste Verwendungen der AFT für Indikationen an der Mamma lassen sich auf das Jahr 1987 datieren (39). Ein negativer Aspekt der AFT bestand damals in der hohen Rate an Volumenverlust des Transplantats, indem große Anteile des implantierten Gewebes durch den Empfänger absorbiert wurden (41). Dabei wird von Volumenverlusten von 50 % bis 90 % berichtet (41,42). Trotz Weiterentwicklung der Methode erzielten weiterhin viele AFT nicht den gewünschten Erfolg (43,44). Um die Transplantatqualität zu verbessern wurde in den 2000er Jahren die AFT experimentell mit ADSC angereichert (45). Darunter bestand einerseits die Annahme, dass ADSC robuster gegenüber dem Prozess des *Fat Grafting* seien, um ein zellreicheres Transplantat herzustellen. Andererseits können so die ADSC die positiven Effekte der Stammzellen, wie proliferative und angiogene Eigenschaften, auf das umliegende Zielgewebe ausüben, um das Transplantatüberleben zu fördern (41,46). Diese Methode wird als Zell-angereicherter Lipotransfer (cell-assisted Lipotransfer, CAL) bezeichnet (41). Im Vergleich zur klassischen AFT konnte gezeigt werden, dass Zell-angereicherte Transplantate auch nach längerer Zeit eine geringere Nekroserate aufwiesen und ein größeres Volumen behielten (47,48). Weiter wurde eine verbesserte Neovaskularisierung durch eine höhere Kapillardichte nachgewiesen (49).

Heutzutage wird die AFT vielfältig am gesamten Körper, sowohl in der ästhetischen als auch in der rekonstruktiven Chirurgie eingesetzt. Über Verwendungen bei chronischen Wunden durch Strahlentherapie, Narbendeformitäten, Verbrennungswunden oder bei ästhetischen Eingriffen der Mamma und dem Gesicht wird berichtet (33,50,42,23). Zu den speziellen Indikationen an der Brust, neben rekonstruktiven Interventionen nach operativer Therapie bei Mammakarzinom, zählen kongenitale oder erworbene Mammafehlbildungen wie die Mikromastie, tubuläre Deformitäten und das Polandsyndrom (51,52). Als therapeutische Option steht die AFT auch zur Sekundärtherapie des Post-Mastektomie-Schmerzsyndroms und der schmerzhaften Kapselkontraktur zur Verfügung. Die Kapselkontraktur zählt zu den

wichtigsten und häufigsten Komplikationen der IBR und ist bei bis zu 30 % der Patienten nachweisbar (53,54). Durch eine AFT ist es möglich den auftretenden Schmerz und den Grad der Kontraktur zu senken (54). Daneben macht man sich die regenerativen Funktionen der AFT zur optimierten Genesung nach Strahlentherapie zu Nutze. Es wird angenommen, dass dieser Effekt auf dem hohen Vorkommen von Stammzellen beruht (55,56). Jedoch ist der CAL auf Grund des hohen Vorkommens von ADSC als kritisch zu betrachten, da Stammzellen in experimentellen Studien einen proonkogenen Effekt aufweisen (57).



**Abbildung 1: Prinzip der AFT und die verschiedenen Phasen des zentrifugierten Lipoaspirats mit der Zusammensetzung der SVF (Shukla *et al.* (31), CC BY)**

## 2.4 Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe

Stammzellen aus dem Fettgewebe oder adipogene Stammzellen sind eine bestimmte Art von MSC mit typischem multipotenten Differenzierungspotential (31,58). MSC wurden erstmals 1976 im Knochenmark entdeckt und besitzen die Fähigkeit in mesenchymales Gewebe wie Knochen, Knorpel, Fett-, Sehnen- und Muskelgewebe zu differenzieren (59–61). Jedoch gestaltete sich der Ernteprozess für mesenchymale Knochenmark Stammzellen (BMSC) als schwierig, da Schmerzen bei der Intervention, höhere Morbidität und geringe Ausbeute in der Zellzahl als üblich galten (58). Erst Anfang der 2000er konnte Fettgewebe als eine weitere

Quelle für MSC nachgewiesen werden (58). Somit ergab sich im Vergleich zu BMSC eine medizinisch günstigere Sammelmethode für MSC, da ADSC im subkutanen Fettgewebe ubiquitär am gesamten Körper vorkommen und Nebenprodukt von ästhetischen und therapeutischen Liposuktionen sind (62).

Durch steigendes Interesse an der Stammzellforschung, nahm die Anzahl an Isolations- und Expansionsmethoden rasant zu. Um ein einheitliches Profil der MSC-Forschung zu schaffen und so Studien miteinander vergleichbar zu gestalten, etablierte die International Society for Cellular Therapy (ISCT) Kriterien zur Definition von MSC. Zu den Kriterien zählen die Plastikadhärenz unter Standardkultur Bedingungen, die Expression der Oberflächenmerkmale: CD105, CD90 und CD73, die fehlende Expression von: CD79alpha, CD45, CD34, CD19, CD14, CD11b, HLA-DR und als letztes Kriterium die Möglichkeit der MSC zur Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten *in vitro* (63,64). Die verschiedenen MSC teilen sich immunphänotypische und funktionale Eigenschaften, wobei es Unterschiede in ihren Sekretomen gibt (65–69).

## **2.5 Sekretom und Extrazelluläre Vesikel der ADSC**

Ein Großteil der Zellkommunikation findet durch sezernierende Mechanismen über einen parakrinen, endokrinen oder autokrinen Signalweg statt. Das Sekretom der ADSC besitzt eine hohe Varianz und beinhaltet neben sezernierten Faktoren einige unterschiedliche Typen extrazellulärer Vesikel (EV), welche im Rahmen der Zellkommunikation einen wesentlichen Einfluss ausüben (70–72). Im Gegensatz zu anderen Zellen sind MSC in der Lage zahlreiche EV zu produzieren, wodurch sie eine geeignete Quelle für Forschungsarbeiten und therapeutische Interventionen mit EV darstellen (73,74).

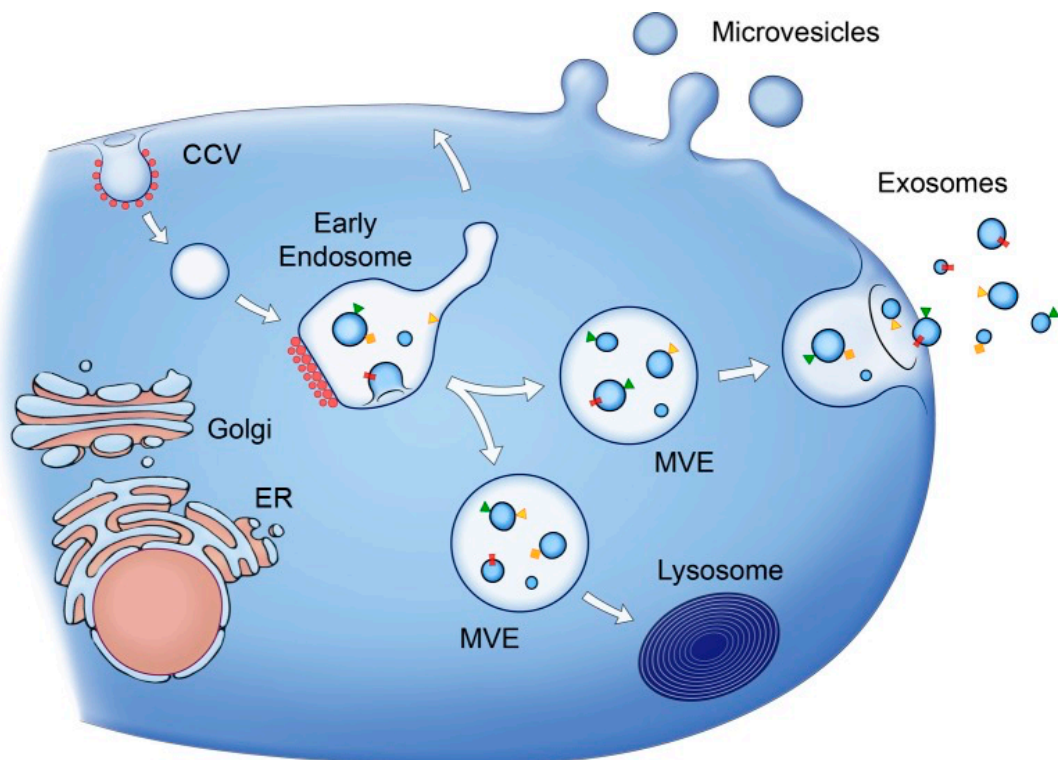
Obwohl EV erstmals Anfang der 1970er als solche beschrieben wurden, geht man von einer viel früheren Entdeckung mit unklarer Definition der damals entdeckten Strukturen aus (75–80). Heute definiert die International Society of Extracellular Vesicles (ISEV) EV als natürlich sezernierte Partikel, mit Lipiddoppelschicht ohne Fähigkeit der Replikation (81). Seit der Entdeckung der EV wurden mehrere Subtypen definiert, die sich nicht nur in ihrer Größe, sondern auch in ihrer Zusammensetzung aus Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden unterscheiden (73,75). In der Vesiclepedia-Datenbank sind bisher viele einzigartige Moleküle eingetragen, die in EV vorkommen. Darunter 32.000 Proteine, 19.000 messenger RNA (mRNA) und 600 Lipide, wovon zurzeit 591 Proteine, 604 micro RNA (miRNA) und wenig

untersuchte Lipide in ADSC-EV bekannt sind (73,82,83). Obwohl die unterschiedliche Komposition der EV umfassend untersucht wurde, überschneiden sich einige Proteinprofile in den verschiedenen EV. Dieser Aspekt wird jedoch auf fehlende standardisierte Isolations- und Analysemethoden zurückgeführt (84,85). Die Größenangabe der verschiedenen EV variiert in der Literatur; meist wird sie zwischen 1000-5000 Nanometer (nm) bei apoptotischen Körpern (AK), 100-1000 nm bei Mikrovesikeln (MV) und 30-100 nm bei Exosomen (teilweise auch Nanovesikel genannt) angegeben (81,86–89). Zusätzlich wurde vor kurzem ein weiterer EV-Subtyp identifiziert. Die Autoren bezeichneten die neuentdeckten EV als Nanovesikel und haben eine vergleichsweise homogene Größe von nur 8-12 nm (90). Da in der Literatur Exosomen oft mit Nanovesikeln gleichgesetzt werden, ist darauf zu achten diese nicht mit den kürzlich entdeckten EV zu verwechseln (91).

Eine weitere mögliche Klassifikation der EV ist die Differenzierung in Ektosomen und Exosomen, wobei AK hiervon ausgenommen sind. Diese Unterteilung zielt auf die unterschiedliche Biogenese der EV ab. Durch Abschnürung an der Plasmamembran entstehen die zur Gruppe der Ektosomen gehörenden Mikrovesikel (92,88,93). Exosomen entstehen auf eine grundlegend unterschiedliche Art und Weise. Sogenannte frühe Endosomen reifen durch Akkumulation von intraluminären Vesikeln (ILV) zu späten Endosomen. Auf Grund der Morphologie werden die Endosomen auch als multivesikuläre Endosomen (MVE) bezeichnet. Ab hier können die MVE mit Lysosomen fusionieren, wodurch der Inhalt von Hydrolasen zersetzt wird. Eine andere Möglichkeit ist die Exozytose des Inhalts der MVE in das extrazelluläre Milieu über bestimmte Membranmoleküle, wie Tetraspanine (vor allem CD63), lysosomale Proteine und andere im späten Endosom vorkommenden Moleküle. Nach Fusion der MVE mit der Zell-Plasmamembran werden die ILV nach Freisetzung als Exosomen bezeichnet (94,88,95–97).

MV ähneln in ihrer Biogenese den Exosomen, entstehen aber durch direkte Abschnürung der Zellmembran und unterscheiden sich somit auch in ihrer Zusammensetzung. Daher sind wesentliche Bestandteile der MV Zytosol- und Plasmamembran-assoziierte Proteine (88,93).

Die Biogenese von AK unterscheidet sich von den anderen EV fundamental, da sie durch apoptotische Zellen entstehen und nicht durch exozytotische Vorgänge wie es bei MV und Exosomen der Fall ist. Durch den unterschiedlichen Entstehungsmechanismus, steht ihr Inhalt im direkten Kontrast zu anderen EV (84). AK enthalten daher intakte Zellorganellen, Chromatin und andere Substanzen (98). Durch Formung zu Vesikeln, können AK durch umliegende Zellen mit ihrem Inhalt phagozytiert und durch das Phagolysosom abgebaut werden (86,88,99).



**Abbildung 2: Die unterschiedliche Biogenese der verschiedenen EV (Raposo und Stoorvogel (88), CC BY-NC-SA)**

### 2.5.1 Exosomen

Exosomen wurden 1981 zum ersten Mal als EV erkannt (100). 1983 entdeckte man ihren komplexen Sekretionsmechanismus über Bildung der MVE, jedoch nahm man an sie seien zellulärer Abfall (101,94,102,103). Auf Grund ihres endosomalnen Ursprungs und Freisetzung durch Exozytose, etablierte sich der Begriff „Exosom“ kurze Zeit später und fand so zunehmend Einzug in die Wissenschaft (94,104).

Die Zusammensetzung von Proteinen und mRNA in Exosomen unterschiedlicher zellulärer Herkunft überschneidet sich in vielen Anteilen, jedoch sind einige exosomale Proteine für bestimmte Zelltypen spezifisch (105,106). So nimmt der Gewebetyp von MSC-Exosomen im Bezug zur Tumorforschung einen erheblichen Einfluss auf entweder suppressive oder onkogene Eigenschaften (75,107). Ebenfalls kann sich die Zusammensetzung der Exosomen auch innerhalb einer Zelllinie unterscheiden (108). In den letzten 10 Jahren hat die Exosomenforschung exponentiell zugenommen, sodass nach der erstmals 2009 präsentierten ExoCarta mittlerweile über 9000 Proteine und über 3000 mRNA in Exosomen nachweisbar sind (73,75,109,110). Durch den endosomalnen Ursprung von Exosomen nahm man an, dass einige

Zellproteine, die mit Mitochondrien oder dem Nukleus assoziiert sind, nicht in Exosomen vorkommen. Neue Erkenntnisse in der intrazellulären Kommunikation des mitochondrialen und endolysosomalen Systems stellen die ursprüngliche Annahme in Frage und lassen vermuten, dass auch nicht-endosomale Substanzen Bestandteil in Exosomen sein können (84,111).

Zur Isolation von Exosomen gibt es verschiedene Ansätze. Eine häufig verwendete und 1996 zuerst genutzte Variante besteht in der Möglichkeit zellfreies, konditioniertes Medium zu Zentrifugieren und im Verlauf zu ultrazentrifugieren (bis zu 100.000 relative centrifugal force (rcf)) (112,96). Weiter gibt es die Ultrafiltrationsmethode. Sie wurde 2002 zur Massenproduktion von Exosomen entwickelt um diese im klinischen Bereich anzuwenden (113). Die neben der Ultrafiltrationsmethode in der vorliegenden Arbeit genutzte Isolationsmethode lässt sich bis auf das Jahr 2001 zurückverfolgen. Dabei macht man sich die in der Plasmamembran reich vorkommenden Tetraspanine CD9, CD63 und CD81 der Exosomen zu Nutze und bindet sie an mit Antikörpern besetzte magnetische Elemente (114). Unter anderem dienen die Tetraspanine der Zellkommunikation und interagieren zwischen Proteinpartnern von Exosomen, wie Haupthistokompatibilitätskomplex Molekülen und Integrinen (106,115).

## **2.6 Onkologische Sicherheit der autologen Fetttransplantation**

Um Rezidive einer ursprünglichen Tumorerkrankung zu minimieren, muss mindestens ein proonkogener Effekt durch die AFT ausgeschlossen werden. Weiter darf die Methode keinen negativen Einfluss auf die Qualität der Nachsorgeuntersuchungen nach operativer Tumorresektion haben. Auf Grund intensiv ausgeübter Kritik gegenüber der Erfüllung dieser Voraussetzungen, wurden bereits viele Versuche unternommen die Sicherheit der AFT nachzuweisen.

Ein obligatorischer Bestandteil nach Tumorresektionen der Mamma, ist die regelmäßige Nachsorge durch verschiedene Arten bildgebender Verfahren. Um frühe Rezidive zu erkennen, ist daher eine hochwertige Röntgenaufnahme entscheidend. Beeinträchtigt wird diese Nachsorgeuntersuchung durch Komplikationen und morphologische Veränderungen einer AFT. Dazu zählen die Entstehung von Mikrokalzifikationen, Zysten und Fettgewebnekrosen im implantierten Areal (116,117). Dadurch werden möglicherweise Karzinome maskiert und bleiben durch Radiologen unentdeckt oder führen zu weiteren invasiven Maßnahmen (116–



119). So müssen auffällige Befunde in der Nachsorgeuntersuchung durch Biopsien weiter abgeklärt werden und stellen eine zusätzliche Belastung für Patienten dar (116).

Die zwei Elemente Neovaskularisierung und Produktion von Wachstumsfaktoren sind für eine erfolgreiche AFT unerlässlich und bilden die Grundlage für ein vitales Transplantat (66). Jedoch wirken sich diese Faktoren auch positiv auf das Fortbestehen von Residualtumorzellen aus, weshalb ein proonkogener Effekt durch die AFT ausgeschlossen werden muss (66). Die Unsicherheit bezüglich der AFT ist besonders durch das Vorkommen von ADSC bedingt, da sie durch ihren positiven Einfluss auf Regeneration und Neovaskularisierung ein optimales Tumormilieu darstellen (120). Grade der CAL, durch den explizit hohen Anteil an ADSC, muss kritisch betrachtet werden. Die aktuelle Datenlage bietet noch heute ambivalente Ergebnisse zur onkologischen Sicherheit der AFT (120). Obwohl dieser Aspekt mehrfach untersucht wurde, konnte bisher kein gänzlicher Konsens gefunden werden (120). Klinisch wurde wiederholt kein Unterschied in der Rezidivrate nach Tumorresektion inklusive oder exklusive AFT festgestellt (121,122). Jedoch zeigten sich in experimentellen Ansätzen Hinweise auf proonkogene Eigenschaften der ADSC. So konnte eine Zunahme der Proliferation von Tumorzellen unter Einfluss von ADSC nachgewiesen werden (123). *In vivo* Experimente belegen diese Annahme, dass ADSC eine Tumorprogression und die Vaskularisierung der Tumormikroumgebung begünstigen (124).

Obwohl bereits viele Studien zur bestehenden Problematik veröffentlicht wurden, weisen einige der bisher erhobenen Daten nur einen geringen Grad an Evidenz auf und erschweren so den Vergleich dieser Studien (120). Deshalb wird aus heutiger Sicht weiterhin angenommen, dass noch nicht genügend Daten zur Abklärung der vollständigen onkologischen Sicherheit dieser Rekonstruktionsmethode vorliegen (125,117,126).

## **2.7 Onkogenese und Tumormikroumgebung**

Die Entstehung von Tumoren ist ein multimodaler Prozess und beschränkt sich nicht alleine auf das Entarten einzelner Zellen (127). Obwohl die Entartung einen wesentlichen Beitrag leistet, werden andere Faktoren als essenziell für die Tumorentwicklung beschrieben und weisen Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Tumorentitäten auf (128). Diese Faktoren lassen sich unter den sogenannten Kennzeichen für Tumoren oder im Englischen „*Hallmarks of cancer*“ zusammenfassen (127). Im Jahre 2000 wurden die ursprünglichen sechs Kennzeichen definiert: Persistenz von Proliferationssignalen, Umgehung von

Wachstumssuppressionsmechanismen, Aktivierung von Gewebeinvasion und Metastasierung, Fähigkeit zur unlimitierten Zytokinese, Induktion der Angiogenese und Resistenz gegenüber Apoptose (128). Durch neue Forschungsergebnisse nehmen die Anzahl sowie der Umfang der Kennzeichen stetig zu, sodass heutzutage bisher 14 Kennzeichen, mit zunehmender Tendenz, beschrieben worden sind (128).

Die Entartung von Zellen ist ein permanenter Prozess im Körper, welcher durch ein funktionierendes Immunsystem reguliert wird. Durch dysregulierte Umgebungsbedingungen, die sogenannte Tumormikroumgebung mit dem tumorassoziierten Stroma, wird das Entstehen eines Tumors aus zuvor entarteten Zellen begünstigt und ist daher eine komplexe Interaktion verschiedener Zelltypen und nicht nur eine Masse an proliferierenden Tumorzellen (129,130). Dabei leisten rekrutierte Zellen und Makromoleküle des tumorassoziierten Stromas einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung eines Tumors (129,130,127).

Die Mikroumgebung eines Tumors, mit dem umliegenden Stroma und organspezifischen Parenchym, unterscheidet sich zwischen den Tumorentitäten, sodass im Rahmen von Mammakarzinomen vorwiegend Adipozyten und ADSC, aber auch tumorassoziierte Fibroblasten und Zellen des Immunsystems, den größten Anteil der Mikroumgebung ausmachen (131). Es konnte gezeigt werden, dass Adipozyten im unmittelbaren Umfeld von Tumorzellen durch diese angeregt werden, um spezifische inflammatorische Zytokine zu produzieren, wodurch proonkogene Effekte initiiert werden können (131). Diese Zytokinproduktion konnte ebenfalls für ADSC nachgewiesen werden, sodass in mehreren Modellen eine proliferative Wirkung von ADSC auf Tumorzellen beschrieben wurde (131). Darüber hinaus wird in Anwesenheit von ADSC das Potential zur Metastasierung, Invasion und Angiogenese von Tumorzellen verstärkt (132). Die Wirkung von ADSC auf Tumorzellen ist nicht nur unidirektional, sondern bildet eine bidirektionale Interaktion beider Zelltypen (132). Neben funktionellen und phänotypischen Veränderungen in tumor-rekrutierten ADSC, haben Tumorzellen durch den sogenannten „*Homing*-Effekt“ eine rekrutierende Wirkung auf ADSC und stellen einen gewissen Anziehungspunkt für diese dar (133,132,134). Der *Homing*-Effekt ist nicht lokal begrenzt, sodass eine Rekrutierung der ADSC über den gesamten Organismus ausgeübt wird. Es besteht die Annahme, dass dieser Effekt auf einer inflammatorischen Komponente durch Zytokine beruht (132,135,136).

Obwohl Mammakarzinomzellen weniger resistent *in vitro* als andere maligne Zellen sind und das Kultivieren von Tumorzellen damals noch durch erhebliche Schwierigkeiten beeinträchtigt wurde, gelang es erstmals 1958 Mammakarzinomzellen zu vervielfältigen (137). Daraus entstand die erste Mammakarzinomzelllinie BT-20 (137). Eine lange Zeit nahm man an, dass

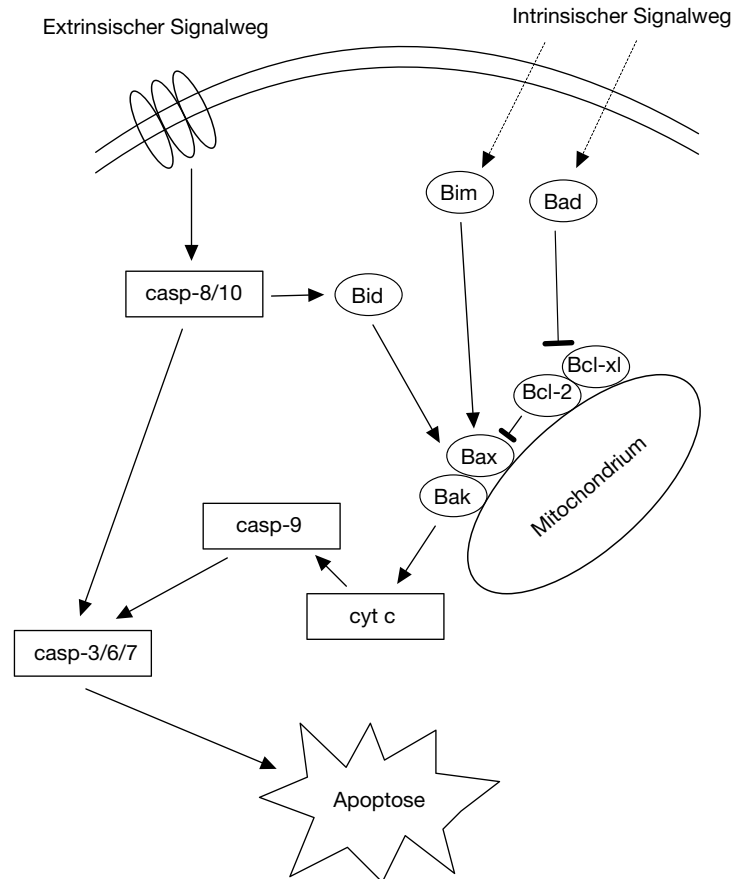
sich die verschiedenen Mammakarzinomzelllinien nur gering unterscheiden, jedoch konnte die Differenz unter den Zelllinien durch moderne Verfahren, wie der genetischen Analyse, dargestellt werden (138). Die bisher etablierten Mammakarzinomzelllinien unterscheiden sich neben anderen Charakteristiken auch in ihrem Hormonrezeptorstatus. In der vorliegenden Arbeit wurde die MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) Zelllinie für die Versuche verwendet, wobei diese als eine der ersten gezüchteten Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomzelllinien gilt (139,140). Die ursprünglichen MCF-7 Tumorzellen wurden einer kaukasischen 69-jährigen Patientin mit einem metastasierten duktalem Adenokarzinom aus einem malignen Pleuraerguss im Jahre 1970 entnommen und erfolgreich in der primären 734B Zellkultur kultiviert (140). Erst ein Jahr später etablierte sich unter regelmäßiger Passagierung mit Trypsin die stabile MCF-7 Zelllinie (140). Der Begriff MCF-7 ist ein Akronym und steht für die Herkunft der Zelllinie: Michigan Cancer Foundation, wobei die sieben den siebten Versuch von Dr. Soule zur Herstellung einer Tumorzelllinie darstellt (141). Seitdem gelten die MCF-7 Zellen als die am häufigsten untersuchten Mammakarzinomzellen überhaupt und haben, sowie hatten bereits einen fundamentalen Einfluss auf die Tumorzellforschung (138,141).

### **2.7.1 Zellzyklus, Pro- und antiapoptotische Signale**

Der Zellzyklus besteht aus vier unterschiedlichen Phasen mit Checkpoints als Kontrollinstanzen. In der G<sub>1</sub>-Phase bereitet sich die Zelle auf die anstehende DNA-Synthese durch Wachstum und Proteinbiosynthese vor. Daran schließt sich die eigentliche DNA-Synthese mit der S-Phase an. Diese dient der Verdopplung der DNA, damit sie in einem diploiden Satz vorliegt und gleichmäßig aufgeteilt werden kann. Zur Vorbereitung auf die Mitose nimmt das Zellwachstum in der G<sub>2</sub>-Phase weiter zu. In der M-Phase geschieht die eigentliche Zytokinese und es entstehen zwei Tochterzellen. Hier beginnt der Zyklus erneut (142). Je nach Phase haben spezifische Signale inhibierende oder aktivierende Funktionen auf die Zelle, sodass sie entweder aktiv ist und Zytokinese betreibt, in bestimmten Phasen verweilt oder ruht. Um die unkontrollierte Proliferation einer Zelle und somit eine der „*Hallmarks of cancer*“ zu vermeiden, gibt es streng regulierte Mechanismen. Zu verschiedenen Zeitpunkten und über verschiedene Signalwege können diese in den Zellzyklus eingreifen und so den Übertritt in die nächste Phase verhindern oder Apoptose einleiten (128,142). Die sogenannten Cyclin-Dependent Kinases (CDK) regulieren dabei als Schlüsselfaktoren die Transition in

verschiedene Phasen des Zellzyklus (142). Die Aktivierung dieser ist wiederum von anderen Faktoren abhängig (143). Eine andere Möglichkeit der Zytokinese Regulation erfolgt über das Registrieren von DNA-Schäden und Fehlfunktionen anderer Zellorganellen, wodurch diese zum Zyklusarrest führen oder sogar Apoptose initiieren (144). Der programmierte Zelltod, Apoptose, ist im Gegensatz zur Nekrose, dem unkontrollierten Zelltod, ein physiologisches Phänomen, welches nicht nur zur Eliminierung geschädigter Zellen eingesetzt wird. Bereits in der embryologischen Entwicklung ist die Apoptose ein essenzieller Bestandteil für die Entwicklung des Organismus (145).

Die Apoptose ist eine komplexe Verkettung von Signalwegen, die schließlich zum Zelltod führt und dabei über den extrinsischen und intrinsischen Signalweg eingeleitet werden kann (145). Während das extrinsische System durch den Tumor Nekrose Faktor rezeptorabhängig gesteuert wird, ist der intrinsische Signalweg mitochondrial reguliert und resultiert in einer Aktivierung von Proteinen der B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2) Familie (146,142). Proapoptotisch wirken in der Gruppe Bcl-2-Associated X Protein (Bax) und Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer (Bak) durch eine Translokation nach intramitochondrial. Darauf folgt eine Destabilisierung der mitochondrialen Membran und somit eine Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus dem Mitochondrium wie Cytochrom c und anderen Faktoren mit anschließender Aktivierung von Caspasen (146–148). Hingegen führen Bcl-2 und B-Cell Lymphoma-Extra Large (Bcl-x<sub>L</sub>) selbst zu einer Stabilisierung der Barrierefunktion der Mitochondriummembran und blockieren den Transfer von Apoptose-induzierenden Faktoren durch eine Hemmung von Bax und Bad (146,149). Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> wiederum können einer Hemmung durch Bcl-2 Associated Agonist Of Cell Death Protein (Bad) unterliegen und den antiapoptotischen Effekt reduzieren, sodass proapoptotische Signale überwiegen (142,150).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs der Apoptose in vereinfachter Form (eigene Darstellung in Anlehnung an Plati *et al.* (151))**

## 2.7.2 p53 und pRB als Tumorsuppressorproteine

In der Regulation der Apoptose stellen neben Proteinen der Bcl-2 Familie auch Tumorsuppressorproteine einen wesentlichen Anteil dar. Das bekannteste und damit am intensivsten erforschte unter ihnen ist das Tumorsuppressorprotein 53 (p53), welches durch das *TP53*-Gen exprimiert wird (152). p53 interagiert auf direktem Weg mit den Proteinen der Bcl-2 Familie und ist somit am intrinsischen Signalweg der Apoptose involviert. Biochemisch kann p53 Bcl2 und Bcl-x<sub>L</sub> binden und neutralisieren, sodass eine vermehrte Freisetzung von Bax und Bak, den proapoptotischen Proteinen, resultiert (152,153). Eine weitere Wirkung von p53 ist der Arrest des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>- sowie G<sub>2</sub>-Phase als Transkriptionsfaktor. Durch p53 wird der CDK-Inhibitor p21/WAF1/CIP1 exprimiert und vermittelt durch das Tumorsuppressorprotein 21 (p21) eine Inhibition der Cyclin-CDK-Komplexe im Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase (154,155). Dadurch ist eine Transition in die S-Phase nicht mehr möglich

und der Zellzyklus stagniert. Regulative Effekte durch p53 wurden ebenfalls in der G<sub>2</sub>-Phase beschrieben. Eine p53 induzierte Transkription von p21 und anderen Faktoren wie 14-3-3 $\sigma$  und GADD45 hemmen hier die Progression der G<sub>2</sub>- zur M-Phase (154,156,157). Somit stellt p53 neben vielen weiteren Interaktionen, eine wichtige und komplexe Funktion mit Faktoren der Apoptoseinduzierung und der Zellzyklusregulierung dar.

Ebenfalls zur Gruppe der Tumorsuppressorproteine zählt Retinoblastoma-Associated Protein (pRB) und wird durch das *RBI*-Gen kodiert. Dieses gilt als erstes entdecktes Tumorsuppressorprotein (158). *RBI* wurde erstmals im Retinoblastom entdeckt, wodurch das pRB seinen spezifischen Namen erhielt (159). Mutationen in dem Gen und anderen Funktionsverlusten des Proteins sind nicht nur auf das Retinoblastom begrenzt, sondern konnten bereits in einer Vielzahl anderer Tumoren nachgewiesen werden (158,160). pRB gilt als zentraler Regulator des Zellzyklus und vermittelt seine Wirkung als Ko-Transkriptionsfaktor (161). Durch Komplexbildung mit den Transkriptionsfaktoren der E2F Familie, führt dies zu einer Herunterregulierung von Genen, die an der Transition von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase beteiligt sind (158). Darunter auch die der CDK-Familie, wodurch ein Arrest des Zellzyklus resultiert (162). Die tumorsuppressive Eigenschaft von pRB erfolgt somit über eine Hemmung von wachstumsfördernden Genen und unterscheidet sich dadurch von p53, welches eine tumorsuppressive Wirkung durch Aktivierung von wachstumshemmenden Genen ausübt (162).

### **2.7.3 Angiogenese und Wachstumsfaktoren in der Tumorentwicklung**

Die Induktion der Angiogenese ist als eine der „*Hallmarks of cancer*“ essenzieller Bestandteil in der Entstehung von Tumoren (128). Es herrscht eine fundamentale Beziehung zwischen Angiogenese und dem Wachstum eines Tumors, sodass eine unzureichende Vaskularisation zu einer maximalen Tumorgröße von nur 2-3 mm im Durchmesser führt (163).

Das Innere einer Gefäßwand wird durch Endothelzellen gebildet, die sich unter physiologischen Bedingungen in einem Ruhezustand befinden (164). Unter Einwirkung von hypoxischen Zuständen oder Gewebeverletzungen formen Endothelzellen neue Gefäße, die Angiogenese, durch eine Sequenz von Vasodilatation, Degradierung der Basalmembran, Migration von Endothelzellen, Chemotaxis, Zunahme der vaskulären Permeabilität, Proliferation der Endothelzellen und schließlich der eigentlichen Gefäßbildung (164,165). Die Faktoren der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Familie nehmen dabei relevanten Einfluss auf die

Induktion der Angiogenese von Gewebe. Unter der VEGF-Familie stellt Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) den Hauptfaktor für diesen Prozess dar und vermittelt seine angiogenetische Wirkung über den VEGF-Rezeptor 2 (165,166). Je nach Konzentration des VEGF-Rezeptor-2 in den einzelnen Endothelzellen, wird so um den Ursprung eines neuen Gefäßes konkurriert (167). Die angiogenetische Aktivität von VEGF ist, neben weiteren Komponenten, auf das Überleben der Endothelzellen zurückzuführen (168). VEGF wirkt sich auf den Zellzyklus durch eine positive Korrelation der Expression von Bcl-2 aus, wobei dieser antiapoptotische Effekt insbesondere für Endothelzellen festgestellt werden konnte (168). Eine antiapoptotische Wirkung vermittelt durch Bcl-2 von VEGF auf Tumorzellen und speziell der MCF-7 Zelllinie wurde ebenfalls nachgewiesen (169,170). Dadurch, dass die Funktion von VEGF nicht nur auf die Angiogenese beschränkt ist und es regulatorische Elemente im Zellzyklus aufweist, muss von einer wesentlich komplexeren Wirkung des Faktors ausgegangen werden.

Zur Familie der Wachstumsfaktoren zählen viele weitere Proteine. Neben VEGF sind im Rahmen des Zellwachstums und der Proliferation die Faktoren Fibroblast Growth Factor (FGF), Connective Tissue Growth Factor (CTGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Epidermal Growth Factor (EGF) und Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) relevant (171). Durch regulative Fähigkeiten und über verschiedene Signalkaskaden können die Wachstumsfaktoren Einfluss auf Tumorwachstum und Metastasierung nehmen. Besonders PDGF und FGF stellen eine große angiogenetische Potenz dar und können wie VEGF auf Endothelzellen und andere Zellentitäten wirken (172,173). Im weiteren Verlauf wird der Fokus auf die PDGF-Familie gelegt, wobei die Proteine der Gruppe strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu VEGF haben und dadurch zu einer gemeinsamen Obergruppe gezählt werden (174). PDGF kann über Disulfidbrücken Homo- und Heterodimere bilden und trägt durch die Dimerbildung so zu einer höheren Diversität des Faktors bei (175). PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB werden daher nur durch die zwei Gene *PDGF-A* und *PDGF-B* kodiert (176). Später wurden weitere Faktoren, PDGF-C und PDGF-D, sowie die dazugehörigen Gene entdeckt und der PDGF-Familie zugeordnet (177). Die Wirkung von PDGF-A und -B, sowie -C und -D wird jedoch nur durch die PDGF-Rezeptoren  $\alpha$ ,  $\alpha\beta$  und  $\beta$  vermittelt (177). Die Funktion von PDGF ist vielseitig und bereits im Embryonalstadium der Organismusentwicklung essenziell (177). In Bezug auf die Kanzerogenität, sind viele Tumoren in der Lage PDGF zu exprimieren und so dabei proonkogenen Einfluss in Form von Angiogenese, Proliferation, Migration und Immunfunktion zu nehmen (178). Es konnte gezeigt werden, dass besonders PDGF-BB den Prozess der Angiogenese stimuliert, sodass dieser Faktor die VEGF-Synthese in Endothelzellen

der Tumormikroumgebung induziert (179). Weiter scheint PDGF-BB ebenfalls Funktionen der Zellrekrutierung auszuüben und dadurch die Tumormikroumgebung proonkogen zu gestalten (178). Es wird angenommen, dass die Zellrekrutierung durch Migration von ADSC zu Tumorzellen hauptsächlich von der Expression von PDGF-BB abhängig ist (180).



### 3 Zielsetzung

Obwohl der Einfluss von ADSC und deren EV auf Tumoren vielfach untersucht wurde, gibt es trotzdem unklare und teils kontroverse Ergebnisse. Es gilt herauszufinden, wie der Einfluss von Stammzellen sich auf Tumoren auswirkt, da sich die rekonstruktive Therapie nach Eingriffen bei Mammakarzinomen die positiven Effekte und Eigenschaften von ADSC in der AFT zu Nutze macht. Als negativen Begleiteffekt der AFT wird in einigen Studien auf einen möglicherweise kanzerogenen Effekt hingewiesen. Bisher wurden ADSC selbst und deren Mikrovesikel, und erst im geringen Maß Exosomen, in ihrer Wirkung auf MCF-7 Zellen erforscht.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von aus Lipoaspirat gewonnenen ADSC und deren isolierten Exosomen auf das Tumorpotential von MCF-7 Zellen *in vitro*, um neue Erkenntnisse zur onkologischen Sicherheit der AFT zu gewinnen. Dazu wurden zunächst Vitalitätstests und Zytotoxizitätstests mit ADSC-konditioniertem Medium (ADSC-KM) und Exosomen in verschiedenen Konzentrationen angefertigt. Um neben kolorimetrischen Assays die molekularbiologischen Effekte von Exosomen und ADSC-KM der ADSC nachzuvollziehen, wurde nach deren Einfluss auf Tumorzellen RNA isoliert und Polymerasekettenreaktionen (polymerase chain reaction, PCR) durchgeführt. In den PCR wurden Gene der Kategorien: antiapoptotische und proapoptotische Gene der Bcl-2 Familie, Tumorsuppressor- und Wachstumsfaktorgene untersucht.

Durch die vielseitige Betrachtungsweise der Exosomen auf Tumorzellen, soll ein annähernd ganzheitliches Bild über deren Effekt präsentiert werden, um rekonstruktiven Eingriffen mit ADSC in der plastischen Chirurgie zukünftig mehr Sicherheit zu gewähren.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Isolierung von humanen adipogenen Stammzellen aus Lipoaspirat**

Für die Versuche wurden frisch isolierte oder eingefrorene ADSC genutzt. Zur Isolation der Stammzellen wurden 15 Milliliter (ml) Fettgewebe, welches zuvor per Liposuktion gewonnen wurde, mit 15 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM) vermischt. Dazu wurden 750 Mikroliter ( $\mu$ l) einer 2 % Kollagenase-Lösung (Collagenase von *Clostridium histolyticum*, Sigma Aldrich) hinzugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Suspension für 1 Stunde bei 37 °C in einem Inkubator mit Mischfunktion inkubiert. Danach wurde bei 500 revolutions per minute (rpm) für 5 Minuten (min) zentrifugiert und die verschiedenen Phasen bis auf die SVF abgenommen. Die SVF wurde mit 10 ml Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma Aldrich) resuspendiert und erneut bei 500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder bis auf die SVF abgenommen und die SVF mit 1 ml Medium resuspendiert. Das Zellkulturmedium bestand aus  $\alpha$ -Minimum Essential Medium Eagle ( $\alpha$ -MEM, Sigma Aldrich) mit 10 % Fetal Bovine Serum (FBS, PAN-Biotech) und 1 % Penicillin und Streptomycin. Das resuspendierte Pellet wurde in eine T175 Flasche mit 20 ml Medium überführt. Die Wachstumsbedingungen zur Kultivierung waren 37 Grad Celsius (°C) und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>). Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert. Nach dem Erreichen einer Subkonfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Danach wurden die Zellen nach dem Zentrifugieren bei 500 rpm für 5 min mit 500  $\mu$ l Freezing Medium ( $\alpha$ -MEM, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), 10 % FBS und 1 % Penicillin und Streptomycin) resuspendiert. Darauf erfolgte die Lagerung der Suspension bei -180 °C im Stickstofftank.

### **4.2 Kultivierung und Passagierung der humanen adipogenen Stammzellen**

Die zuvor eingefrorenen Zellen wurden für die weiteren Versuche verwendet. Nach dem Auftauen der Zellen wurde 500  $\mu$ l Medium zugegeben und bei 300 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit dem restlichen DMSO entfernt. Das Pellet wurde mit 1 ml Medium resuspendiert und in eine T175 Flasche überführt.

Nachdem die Konfluenz 80 % betrug, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium der T175 Flasche entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und 2 ml Trypsin hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 37 °C lösten sich die Zellen von dem Grund der

Flasche. Danach wurde die Reaktion mit 4 ml Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 300 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 1 ml Medium gelöst. Nach vollständiger Lösung wurden weitere 9 ml Medium zugegeben. Zum Zählen der Zellen in der Suspension, wurden 10 µl dieser auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen und bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Für die weitere Kultivierung wurden 5.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einer T175 Flasche ausgesät und mit 20 ml Medium versetzt. Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert. Bei einer Konfluenz von 80 %, wurden die Zellen erneut passagiert.

Die Kultivierung und Exosomenisolierung fand bis zur Passage 6 statt.

### **4.3 Kultivierung und Passagierung der MCF-7 Zellen**

Die MCF-7 Zellen wurden von einem kommerziellen Händler (Cell Lines Service) in Passage 37 erworben. Die eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut und 500 µl Medium ( $\alpha$ -MEM) mit 10 % FBS und 1 % Penicillin und Streptomycin hinzugegeben. Danach wurden sie bei 300 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 500 µl Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in eine T75 Flasche überführt und weitere 9,5 ml Medium hinzugegeben.

Die MCF-7 Zellen wurden zur Kultivierung und Passagierung nach gleichem Protokoll, wie die adipogenen Stammzellen behandelt. Jedoch wurden sie mit 30.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und in T75 Flaschen kultiviert.

Die Versuche wurden in den Passagen 40 - 50 durchgeführt.

### **4.4 Isolierung der Exosomen von humanen adipogenen Stammzellen**

Die Isolierung der Exosomen fand in verschiedenen Schritten statt.

- 1) Kultivierung in serumfreiem Medium
- 2) Serielle Zentrifugation und Filtration zur Reinigung des ADSC-KM
- 3) Konzentration des ADSC-KM durch Ultrafiltration
- 4) Isolierung der Exosomen aus Ultrafiltrat

#### **4.4.1 Inkubation in serumfreiem Medium**

Bei einer Konfluenz von 80 % wurde das Nährmedium der adipogenen Stammzellen entfernt und sie wurden zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden pro T175 Flasche 15 ml Medium ( $\alpha$ -MEM) mit 1 % Penicillin und Streptomycin ohne Serum hinzugegeben. Die Inkubation mit serumfreiem Medium war notwendig, da im FBS Exosomen bovinen Ursprungs vorkommen. Insgesamt wurden fünf T175 Flaschen genutzt. Nach 24 Stunden wurde das ADSC-KM gesammelt und sofort weiterbearbeitet.

#### **4.4.2 Reinigung des ADSC-KM**

Vor der eigentlichen Exosomenisolation wurden 75 ml ADSC-KM mit serieller Zentrifugation und Filtration gereinigt. Um Zellen, Zelldebris und größere Vesikel zu entfernen, wurde bei 300 rcf für 10 min, bei 2000 rcf für 30 min und bei höchster Zentrifugengeschwindigkeit für 45 min zentrifugiert. Zwischen jedem Zentrifugationsschritt wurde das ADSC-KM in ein neues Gefäß überführt. Im letzten Schritt wurde es mit einem 0,2 Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) Spritzenfilter (Sarstedt) filtriert.

#### **4.4.3 Konzentrierung des ADSC-KM**

Zur Konzentrierung des ADSC-KM wurde die Ultrafiltrationsmethode genutzt. Eingesetzt wurden Centricon Plus-70 Zentrifugen-Filtereinheiten (Merck Millipore) mit 100 Kilodalton (kDa) Molecular Weight Cut Off (MWCO).

Zur Desinfektion der Filtereinheit wurde mit 50 ml 70 % Ethanol bei 3500 rcf für 5 min zentrifugiert und anschließend das Ethanol entfernt. Um vorhandene Ethanolreste zu entfernen, wurde die Einheit mit 50 ml PBS bei 3500 rcf für 5 min gespült. Nach Entfernen des PBS wurden 70 ml ADSC-KM in den Filter überführt und bei 3500 rcf für 40 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde die Vorrichtung umgedreht und mit einem Sammelbehälter gekoppelt. Um das Konzentrat zu gewinnen, wurde bei 1000 rcf für 2 min zentrifugiert. Das Endvolumen des Ultrafiltrats nach der Konzentrierung betrug etwa 350  $\mu\text{l}$ .

#### **4.4.4 Magnetische Separation des Ultrafiltrats**

Die eigentliche Exosomenisolierung fand als letzter Schritt statt. Dafür wurde das Exosome Isolation Kit Pan, human (Miltenyi Biotec) genutzt. Das Prinzip beruhte auf der Kopplung der exosomalen Tetraspanine mit magnetischen Partikeln und der anschließenden Separation dieser. Alle der hier verwendeten Materialien lagen dem Kit bei.

Die etwa 350  $\mu$ l des Ultrafiltrats wurden mit 50  $\mu$ l Exosome Isolation MicroBeads gemischt, kurz gevortext und für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden der Equilibration Buffer und Isolation Buffer auf RT erwärmt. Eine  $\mu$ Column wurde in das magnetische Feld des  $\mu$ MACS Separator (Miltenyi Biotec) eingeführt, zuerst mit 100  $\mu$ l Equilibration Buffer und danach dreimal mit 100  $\mu$ l Isolation Buffer gespült. Dann wurde die Probe in die  $\mu$ Column überführt und viermal mit 200  $\mu$ l Isolation Buffer gespült. Die  $\mu$ Column wurde vom  $\mu$ MACS Separator getrennt und auf ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß montiert. Es wurden 100  $\mu$ l Isolation Buffer hinzugegeben und mit dem beiliegenden Stempel gespült. In dem 1,5 ml Gefäß befanden sich nun etwa 100  $\mu$ l Exosomenkonzentrat. Es wurde zwischen jedem Schritt auf eine vollständige Entleerung des  $\mu$ Column Reservoir geachtet.

#### **4.5 Western Blot**

Es besteht die Möglichkeit Exosomen per Western Blot nachzuweisen, da primäre Antikörper an verschiedene Tetraspanine der Exosomen wie z.B. CD9, CD63 und CD81 binden können. Das Verfahren bestand aus drei Schritten.

- 1) Auftrennung der Proteine und Exosomen nach Größe per Gelelektrophorese
- 2) Übertragung auf eine Trägermembran
- 3) Visualisierung der Proteinbanden durch Antikörper

##### **4.5.1 SDS-PAGE**

Zuerst mussten das Running Gel (Trenngel) und Stacking Gel (Sammelgel) hergestellt werden. Das 10 %ige Trenngel bestand aus 30 % Acrylamid, 1,5 Mol (M) Tris Base (potencia Hydrogenii (pH) 8,8) als Puffer, 10 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) und destilliertem Wasser. Für das Trenngel wurden 8,94 ml Running Gel, 60  $\mu$ l Ammoniumperoxidsulfat und 20  $\mu$ l

Temed miteinander vermischt. Das Gemisch wurde zum Polymerisieren in die Gelkammern gefüllt, mit Isopropanol überschichtet und dann 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Isopropanol abgegossen und die Gelkammern mehrfach mit Wasser gespült. Um die Gelqualität nicht zu beeinflussen, wurde das restliche Wasser mit Whatman Filterpapier entfernt. Auf das Running Gel wurde nun Stacking Gel gegeben. Das 5 %ige Stacking Gel besteht aus 30 % Acrylamid, 0,5 M Tris Base (pH 6,8), 5 % SDS und destilliertem Wasser. Zu 2,97 ml Stacking Gel wurden 32 µl Ammoniumperoxidsulfat und 6 µl Temed hinzugegeben und vermischt. Danach wurde es auf das Running Gel gegeben. Anschließend wurde ein Kamm in das noch flüssige Gel eingesetzt. Die Zeit zur vollständigen Polymerisierung des Gels betrug ebenfalls 30 min.

Zur Vorbereitung der Probe wurden 15 µl Exosomenkonzentrat mit 15 µl nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer, bestehend aus 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 30 % Glycerol, 6 % SDS und 0,02 % Bromphenolblau aufgefüllt. Die Mischung wurde gut vermischt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Die Gelkammern wurden in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1x Laufpuffer, bestehend aus Tris, Glycin, SDS und destilliertem Wasser, aufgefüllt. Der Kamm wurde entfernt und die einzelnen Kammern mit einer Kanüle ausgespritzt. In die erste Kammer wurden 3 µl der Proteinleiter (Page Ruler Prestained NIR, Thermo Scientific) eingefüllt. In die zweite Kammer wurden 30 µl des Exosomen-Puffer Gemischs pipettiert. Danach wurde die Elektrophorese bei 4 °C für 20 min bei 80 Volt (V) gestartet. Darauf folgten 100 min bei 150 V. 1 Zentimeter (cm) bevor die Lauffront das Ende des Gels erreicht, wurde das Gel mit einem Spatel aus der Glasplatte genommen.

#### **4.5.2 Transfer und Blocking**

In den letzten beiden Schritten wurden die Proteine und Exosomen vom Gel auf eine Membran übertragen. Dazu wurden in einer Wanne die Nitrocellulosemembran (Amersham Protran 0.2 NC, Sigma-Aldrich), zwei Schwämme und vier Filterpapiere in 1x Transferpuffer eingelegt. In folgender Reihenfolge wurde der Western Blot mit dem Gel zusammengesetzt: Schwamm, zwei Filterpapiere, Membran, Gel, zwei Filterpapiere, Schwamm. Mit Hilfe eines 15er Falcon wurden Luftblasen durch Rollen entfernt. Die Kassette wurde in eine Laufkammer mit 1x Transferpuffer und einem Kühlelement eingesetzt. Nachdem die Kammer verschlossen wurde, fand der Transfer der Partikel des Gels auf die Membran bei 4 °C für 60 min bei 100 V statt.

Danach wurde die Membran zurechtgeschnitten und in eine lichtgeschützte Inkubationsbox überführt. Dazu wurden 10 ml Odyssey-Blockingpuffer (LI-COR), 1:4 verdünnt mit PBS, hinzugegeben. Bei RT wurde für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Blockingpuffer gründlich entfernt. In die Box wurden 5 ml primäre Antikörperlösung gegeben. Die Lösung besteht aus 1:250 mit Odyssey-Blockingpuffer verdünntem primären murinen Anti-Human Antikörper CD63 (Thermo Scientific). Über Nacht wurde bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und drei Mal jeweils 5 min mit Tris-buffered Saline (TBS)-Tween gewaschen. Danach wurde die Membran mit 10 ml einer sekundären Antikörperlösung versetzt. Diese bestand aus 1:15.000 mit Odyssey-Blockingpuffer verdünntem sekundären infrarot markierten Ziege-Anti-Maus Antikörper (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA). Die Inkubation erfolgte eine Stunde auf dem Schüttler bei RT. Zuletzt wurde die Membran wieder dreimal jeweils 5 min mit TBS-Tween gewaschen und mit dem Odyssey Imaging System von LI-COR ausgewertet.

#### **4.6 Herstellung von ADSC-KM und Exosomenmedium**

Für die nachfolgenden Versuche wurden modifiziertes ADSC-KM und Exosomenmedium verwendet. Zur Exosomenisolierung wurden die ADSC in  $\alpha$ -MEM mit 1 % Penicillin und Streptomycin ohne Serum für 24 Stunden kultiviert.

Nicht verwendetes Medium wurde bei -80 °C zwischengelagert.

##### **4.6.1 ADSC-KM**

Da die MCF-7 Zellen in den Versuchen unter normalen Wachstumsbedingungen mit ADSC-KM inkubieren sollten, wurde zum serumfreien ADSC-KM der 24-stündigen Inkubation nach serieller Zentrifugation und Filtration durch einen 0,2  $\mu$ m Filter, wie in Schritt 4.4.2 beschrieben, 10 % FBS zugegeben.

##### **4.6.2 Exosomenmedium**

70 ml serumfreies ADSC-KM wurden zur Konzentrierung und Exosomenisolierung verwendet. Nach der Isolierung erhielt man etwa 100  $\mu$ l Exosomenkonzentrat. Dieses wurde zur weiteren Verwendung in verschiedenen Lösungen angesetzt. Eine photometrische Bestimmung des

Proteingehalts bei der Isolierung mit  $\mu$ MACS war auf Grund starker Eigenfärbung des Isolationsmediums nicht möglich. Deshalb wurde strikt darauf geachtet für jeden Versuch aus derselben Gesamtzellkulturfläche von fünf T175 Flaschen mit je 15 ml serumfreiem Medium die etwa 100  $\mu$ l Exosomenkonzentrat zu isolieren. Die Subkonfluenz betrug dabei 80 %. Durch die MCF-7 Wachstumsfläche der anstehenden Versuche, ergab sich so die Einheit  $\mu$ l Exosomenisolat pro  $\text{cm}^2$  MCF-7 Wachstumsfläche ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). Das Exosomenmedium bestand aus  $\alpha$ -MEM mit 10 % FBS, 1 % Penicillin und Streptomycin und verschiedenen Konzentrationen an Exosomenkonzentrat. Die Konzentration betrug im Vitalitäts- und Zytotoxizitätstest 10, 20 und 30  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  (im Zytotoxizitätstest zusätzlich 35  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). Die Exosomenkonzentration zur Bestimmung der relativen Genexpression betrug 30  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ .

#### **4.7 Vitalitätstest auf Grundlage von Resazurin**

Mit Hilfe diesen Tests war es möglich, photometrisch die Vitalität von Zellen anhand einer enzymatischen Reaktion zu messen. Dabei wurde der Ausgangsstoff Resazurin zu Resofurin durch das Enzym Diaphorase irreversibel in den Mitochondrien umgesetzt. Gemessen wurde schließlich der Anteil an Resofurin, wobei dieser direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen ist.

Der Test wurde verwendet um den Einfluss von ADSC-KM der ADSC, sowie die Wirkung von verschiedenen Konzentrationen an Exosomen auf die Tumorzellen zu messen.

Dazu wurden die MCF-7 Zellen mit einer Dichte von 4.800 Zellen/ $\text{cm}^2$  auf eine 96-well Platte ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden fand die erste Messung statt (Tag 0). Zur photometrischen Bestimmung der Zellvitalität wurden 10 % Resazurin (Sigma Aldrich) in Zellkulturmedium ( $\alpha$ -MEM, 10 % FBS, 1 % Penicillin und Streptomycin) verwendet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und pro well durch 100  $\mu$ l der Resazurininlösung ersetzt. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C folgte die Messung bei 530 nm Anregungswellenlänge und 590 nm Emissionswellenlänge. Als Gerät diente das Plattenphotometer VarioSkan Flash von Thermo Scientific.

Nach der Messung wurde die Resazurininlösung entfernt und durch ADSC-KM ersetzt. Als Kontrolle diente unkonditioniertes Medium mit 10 % FBS. Um den Einfluss der Exosomen zu messen, wurde die Resazurininlösung durch Exosomenmedium in den Konzentrationen 10  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , 20  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  und 30  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  ersetzt. Als Kontrolle diente auch hier unkonditioniertes Medium mit 10 % FBS. Die Anzahl der Wiederholungen betrug drei.



Die Messung erfolgte an Tag 1, Tag 2 und Tag 3. Nach jedem Tag wurden Kontrollmedium, ADSC-KM und Exosomenmedium durch neues ersetzt.

#### **4.8 Zytotoxizitätstest auf Grundlage der freigesetzten Laktatdehydrogenase**

Um die Toxizität von ADSC-KM und Exosomen auf Zellen zu messen, wurde ein LDH Assay (abcam) durchgeführt. Bei einer Schädigung von Zellen wurde das intrazellulär vorkommende Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) freigesetzt. Anschließend konnte man mit Hilfe eines photometrischen Verfahrens die Menge an freier LDH bestimmen.

Für den Test wurden die MCF-7 Zellen mit einer Dichte von 4.800 oder 7.200 Zellen/cm<sup>2</sup> auf eine 96-well Platte ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde das Zellkulturmedium ( $\alpha$ -MEM, 10 % FBS, 1 % Penicillin und Streptomycin) entfernt und durch ADSC-KM und Exosomenmedium in den Konzentrationen 10  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>, 20  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>, 30  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> und 35  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> ersetzt. Als Kontrolle für das Exosomenmedium diente unkonditioniertes Zellkulturmedium. Für den Versuch des ADSC-KM wurde eine Referenzprobe mit ADSC-KM gewählt, da das ADSC-KM einen höheren Grundbetrag an LDH besaß. Die Anzahl der Wiederholungen betrug drei.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit erfolgte die photometrische Bestimmung der freigesetzten LDH. Dazu wurden das ADSC-KM und Exosomenmedium der Zellen abgenommen und jeweils bei 6000 rpm für 10 min bei RT zentrifugiert. 10  $\mu$ l des zentrifugierten ADSC-KM und Exosomenmediums wurden auf eine neue 96-well Platte übertragen. Danach wurden 100  $\mu$ l LDH-Mix (LDH Assay Buffer, 2 % WST Substrate Mix) pro well zugegeben und lichtgeschützt inkubiert. Nach 30 min erfolgte die photometrische Messung bei 450 nm Absorptionswellenlänge und 650 nm Referenzwellenlänge. Als Gerät diente das Plattenphotometer VarioSkan Flash von Thermo Scientific.

#### **4.9 Bestimmung der relativen Genexpression**

Um den Einfluss der Exosomen und des ADSC-KM auf MCF-7 Zellen molekularbiologisch zu analysieren, wurde die relative Genexpression bestimmter Gene mittels PCR untersucht.

- 1) Isolierung von RNA der MCF-7 Zellen
- 2) Synthese von complementary DNA (cDNA) durch reverse Transkriptase

### 3) Polymerasekettenreaktion verschiedener Primer

#### 4.9.1 RNA-Isolierung

Der erste Schritt bestand aus der Isolierung von RNA der Tumorzellen. Hierfür wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 13.000 rpm. Hierzu wurden die MCF-7 Zellen auf 24-well Platten mit 50.000 Zellen pro well in dreifacher Wiederholung ausgesäht. Nach etwa 24-stündiger Inkubation wurde das ursprüngliche Medium durch Kontrollmedium, ADSC-KM und Exosomenmedium in der Konzentration 30  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  ersetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Danach wurden 350  $\mu\text{l}$  Lysepuffer, bestehend aus RLT-Puffer und 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich), pro well hinzugegeben. Um eine größtmögliche Lyse zu erzielen, wurde das Lysat mit einer 5 ml Spritze und 27 Gauge Kanülenaufsatz mehrfach aspiriert. Danach wurden 350  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol hinzugefügt und miteinander vermischt. 700  $\mu\text{l}$  der Lysat-Ethanollösung wurden in eine RNeasy Mini spin column überführt. Nach 30 Sekunden (sec) Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen und 700  $\mu\text{l}$  RW1 Puffer hinzugegeben. Es wurde wieder für 30 sec zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurden 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer zugegeben, für 30 sec zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nach den Waschschritten befand sich reine RNA in der Membran der Säule. Um diese zu trocknen, wurde die RNeasy Mini Spin column in ein neues 2 ml collection tube gesetzt und 1 min zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die RNeasy Mini spin column auf ein 1,5 ml collection tube gesetzt und 30  $\mu\text{l}$  RNase freies Wasser auf die Membran pipettiert. Nach einer ein-minütigen Inkubation wurde für ebenfalls eine Minute zentrifugiert. Jetzt befand sich die isolierte RNA in dem 1,5 ml collection tube. Dieses wurde zügig im  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  Schrank eingefroren.

#### 4.9.2 Reverse Transkription

Um die PCR mittels DNA-abhängigen DNA-Polymerasen durchzuführen, musste die zuvor isolierte RNA zu cDNA synthetisiert werden. Hierzu wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet.

Zur Herstellung der cDNA wurden 1 Mikrogramm ( $\mu\text{g}$ ) RNA verwendet. Dazu wurde zunächst eine Messung der RNA-Konzentration mit dem Spektralphotometer Nano Drop 2000c (Thermo

Scientific) durchgeführt. Nachdem das Volumen bestimmt wurde, in dem sich 1 µg RNA befinden, wurde dieses mit Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Danach wurden 2 µl gDNA Wipeout Puffer hinzugegeben und für 2 min bei 42 °C inkubiert. Dieser Schritt war notwendig, um ggf. Reste genomischer DNA zu entfernen. Für die eigentliche reverse Transkription wurden zu den 14 µl Probe nun 4 µl 5-fach konzentrierter RT-Puffer, 1 µl Reverse Transkriptase und 1 µl Primer-Mix hinzugefügt. Bei einer Inkubationszeit von 15 min bei 42 °C wurde die RNA nun in cDNA synthetisiert. Danach erfolgte die Trennung der komplementären Nukleinsäurestränge bei 95 °C für 3 min. Die cDNA wurde bei +4 °C oder -20 °C gelagert.

### **4.9.3 Polymerasekettenreaktion**

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wurden bestimmte Abschnitte der synthetisierten cDNA vervielfältigt. So war es möglich die Expression eines Gens unter verschiedenen Konditionen zu vergleichen.

Hierzu wurde der Blue S'Green qPCR Kit Separate ROX Master Mix von Biozym verwendet. Der Master Mix bestand aus: DNA-Polymerase, Polymerasepuffer, Desoxyribonukleotide und SYBR Green zur fluorometrischen Messung des PCR-Produkts. Dazu wurde der für ein bestimmtes Gen spezifische Primer hinzugegeben, um die jeweilige Sequenz des Gens zu vervielfältigen. Die Primer wurden unter Anwendung der Software Primer-BLAST (NCBI), basierend auf Primer3, generiert und von Eurofins Genomics GmbH synthetisiert.

Als ersten Schritt wurden für jede Probe 5 µl Master Mix, 3 µl Wasser, 1 µl Primer Mix (bestehend aus 0,5 µl bzw. 5 Pikomol (pmol) forward Primer und 0,5 µl bzw. 5 pmol reverse Primer) und 1 µl cDNA-Probe (entsprechen 50 Nanogramm (ng)) in ein well einer 48-well-plate (Cole-Parmer) pipettiert. Als No-Template-Kontrolle diente eine Probe ohne cDNA-Zusatz.

Nach der Versiegelung und Zentrifugation der 48-well-plate, wurde die PCR im Thermocycler gestartet. Verwendet wurde das ECO-Real-Time PCR Gerät. In einer zehnminütigen initialen Startphase wurde die Polymerase bei 95 °C aktiviert. Darauf folgte die Denaturierung bei 95 °C für 10 sec um die gebildeten DNA-Doppelstränge zu trennen. In der Hybridisierungsphase lagerten sich die Primer je nach Annealingtemperatur (siehe Tabelle 1) für 10 sec an die cDNA an. Bei der darauffolgenden Amplifikation synthetisierte die Polymerase bei 72 °C für 25 sec in 5'-3'-Richtung den komplementären Strang. Hier begann der Zyklus erneut mit der Denaturierung bei 95 °C für 10 sec. Nach insgesamt 40 Wiederholungen wurde eine

Schmelzkurve der entstandenen Produkte erstellt. Dazu wurde zunächst auf 95 °C für 15 sec erhitzt und auf 55 °C für 15 sec abgekühlt. In 0,1 °C Schritten wurde langsam auf 95 °C erhitzt. Währenddessen wurde die Fluoreszenz in den wells kontinuierlich gemessen. Mit der entstandenen Schmelzkurve ließ sich abschätzen, ob ein einziges PCR-Produkt amplifiziert wurde. Zur Validierung des PCR-Produkts fand eine Gelelektrophorese statt. Durch den Vergleich mit einer standardisierten Proteinleiter, konnte so die bereits vorbekannte Größe des PCR-Produkts ermittelt werden.

Mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurde die relative Genexpression berechnet (181). *GAPDH* diente als Housekeeping-Gen.

<b>Gen</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Annealingtemperatur</b>
<i>Bad</i>	5'-TCACAAATCCTCCCCAAGTGG-3' 5'-GAATGCGCCCTAAATCACTGA-3'	60 °C
<i>Bax</i>	5'-TTCCGAGTGGCAGCTGAGATGTTT-3' 5'-TGCTGGCAAAGTAGAAGAGGGCAA-3'	60 °C
<i>Bcl-2</i>	5'-ATCGCCCTGTGGATGACTGAG-3' 5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'	60 °C
<i>GAPDH</i>	5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3' 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'	60 °C
<i>PDGF-A</i>	5'-CCCCTGCCCATTCGGAGGAAGAG-3' 5'-TTGGCCACCTTGACGCTGCGGTG-3'	60 °C
<i>PDGF-B</i>	5'-GATCCGCTCCTTTGATGATC-3' 5'-GTCTCACACTTGCATGCCAG-3'	60 °C
<i>RBI</i>	5'-TTGGATCACAGCGATACAACTT-3' 5'-AGCGCACGCCAATAAAGACAT-3'	60 °C
<i>TP53</i>	5'-GGAGTATTTGGATGACAGAAAC-3' 5'-GATTACCACTGGAGTCTTC-3'	60 °C
<i>VEGFA</i>	5'-AACCAGCAGAAAGAGGAAAGAGG-3' 5'-CCAAAAGCAGGTCCTCACTTTG-3'	60 °C

**Tabelle 1: Sequenzen und Annealingtemperaturen der verwendeten PCR-Primer**

#### **4.10 Statistische Analyse und grafische Darstellung der Daten**

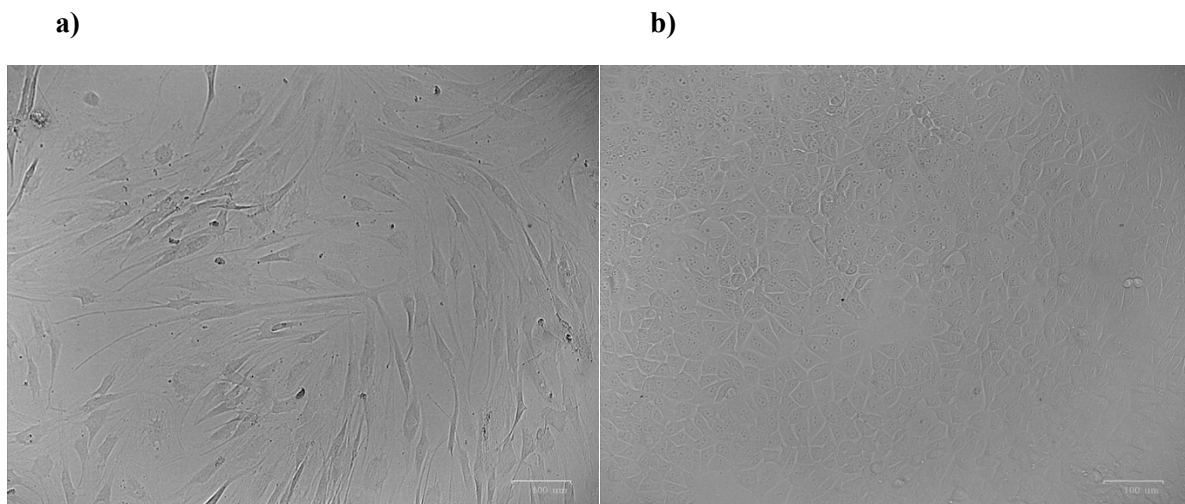
Zur Auswertung der Daten wurden die Variablen mit dem Jarque-Bera Test auf Normalverteilung geprüft. Dabei wurde die Wiederholungsanzahl von mindestens vier

berücksichtigt. Die Signifikanztestung erfolgte mit einem ungepaarten Zweistichproben t-Test mit gleicher Varianz. Das Signifikanzniveau wurde mit einem Wert von 0,05 festgelegt. Es erfolgten Vergleiche zwischen Kontrollmedium, ADSC-KM und Exosomenmedium in den Konzentrationen von 10, 20, 30 und 35  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ . Die Datenauswertung sowie das Erstellen von Abbildungen erfolgten mit Excel (Microsoft Office) und GIMP (Das GIMP-Team).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kultivierung adipogener Stammzellen und MCF-7 Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit ADSC und Tumorzellen der Zelllinie MCF-7 gearbeitet. Mit einem Mikroskop wurden Bilder angefertigt, um die verschiedenen Zelltypen während der Kultivierung zu präsentieren. Man erkennt in Bild a) spindelförmige, langgezogene Zellen, während in Bild b) ein Epithelgebilde herrscht. Im Vergleich zu Bild a), liegen die Zellen in Bild b) dichter und besitzen keine Ausläufer.

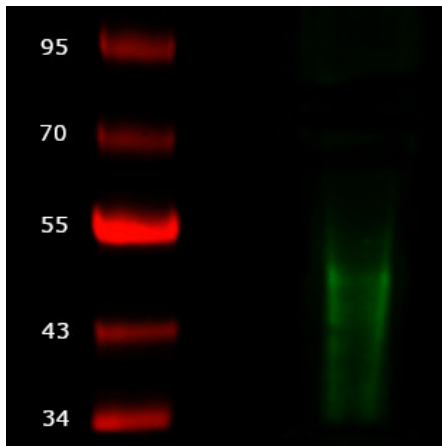


**Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahmen der adipogenen Stammzellen (a) und MCF-7 Zellen (b)**

### 5.2 Die isolierten Exosomen lassen sich mittels Western Blot nachweisen

Um nach erfolgreicher Exosomenisolation (Kapitel 4.4.4) die Exosomen nachzuweisen, wurde ein Western Blot mit einem CD63-Antikörper unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Als Probe wurden 15 µl Exosomenkonzentrat verwendet. Alle Angaben sind in kDa dargestellt.

Die roten Banden zeigen das Signal der Standardproteinleiter in vordefinierten Größen. Rechts davon ist eine langgezogene grüne Bande zwischen 34 und 55 kDa zu erkennen. Diese stellt die aus ADSC isolierten Exosomen dar, wobei die charakteristische Länge aus den unterschiedlichen Größen der Exosomen resultiert.



**Abbildung 5: Western Blot zum Nachweis von Exosomen nach erfolgter Isolierung. Standardproteinleiter links (rot), Exosomenbande zwischen 55 und 34 kDa rechts (grün).**

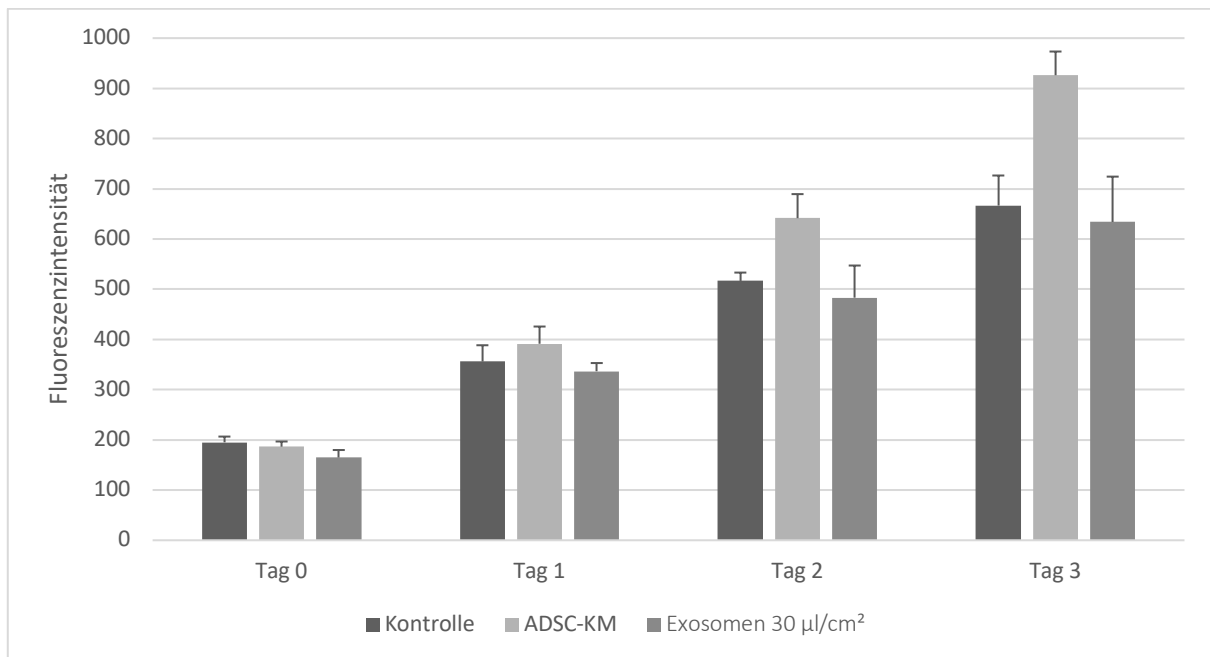
### **5.3 ADSC-KM hat einen deutlich positiven Effekt auf die Vitalität von MCF-7 Zellen**

Die Signifikanz wurde durch einen t-Test unter Berücksichtigung einer Anzahl von mindestens vier Wiederholungen und Berechnung der Normalverteilung mit dem Jarque-Bera Test ermittelt.

Die Vitalität der MCF-7 Zellen wurde unter Einfluss verschiedener Proben gemessen. Hierzu wurde nach Inkubation mit Kontrollmedium, ADSC-KM und Exosomenmedium in der Konzentration  $30 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  die Fluoreszenzintensität von Resorufin bestimmt. Die Messung erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen zum selben Zeitpunkt. Das Medium wurde nach jeder Messung erneuert.

An Tag 0 ist die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Gruppen annähernd gleich. Diese Messung diente als Nullabgleich. Nach Einfluss von ADSC-KM ist an den Tagen eins bis drei eine deutliche Zunahme der Vitalität zu erkennen. Bereits am ersten Tag ist die Fluoreszenzintensität des ADSC-KM im Vergleich zum Kontrollmedium um 10 % größer. Sie nimmt an Tag 2 um 24 % und an Tag 3 um 39 % weiter zu. Das Exosomenmedium hat insgesamt einen geringeren Einfluss auf die Vitalität der MCF-7 Zellen. Hier fällt die Vitalität der Zellen geringer als die Zellen des Kontrollmediums aus und unterscheidet sich davon an allen Tagen im Mittel um 6 %.



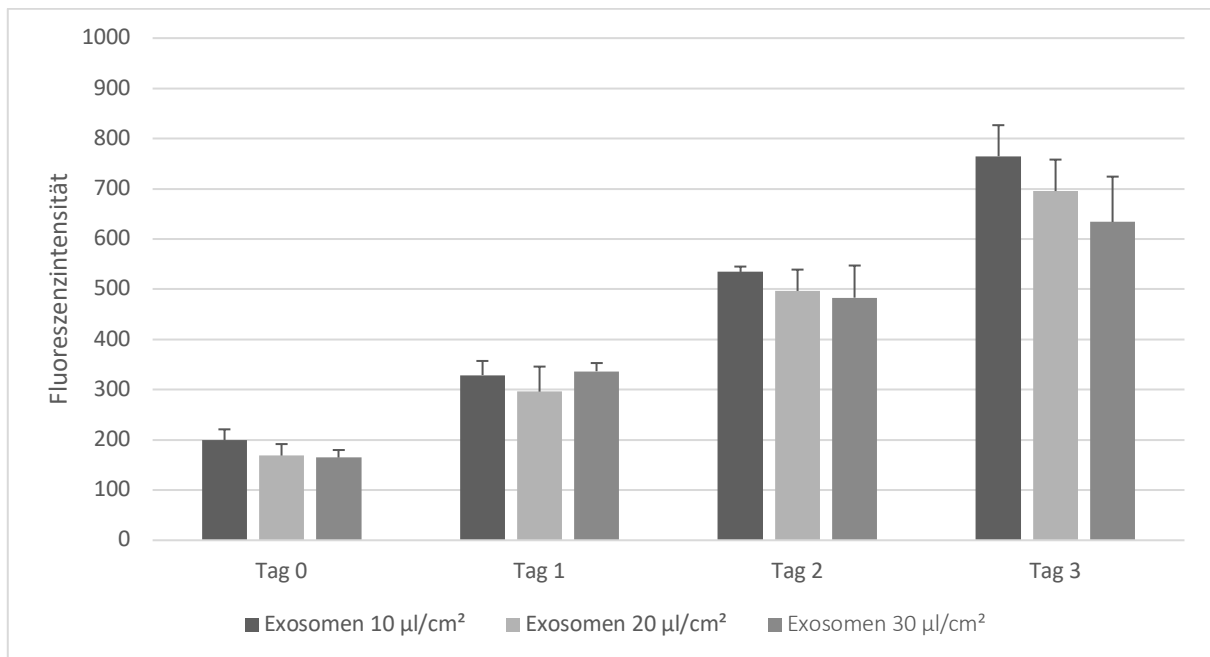


**Abbildung 6: Vitalitätstest auf Grundlage von Resazurin. Zellvitalität der MCF-7 Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Als Probe wurden ADSC-KM und Exosomenmedium in der Konzentration von 30 µl/cm<sup>2</sup> verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.**

#### **5.4 Die Vitalität der MCF-7 Zellen ist abhängig von der Konzentration und der Einflussdauer des Exosomenmediums**

Der Vitalitätstest wurde ebenfalls mit verschiedenen Konzentrationen von Exosomen durchgeführt, um mögliche konzentrationsabhängige Effekte zu untersuchen. Die unterschiedlichen Konzentrationen des Exosomenmediums betragen 10, 20 und 30 µl/cm<sup>2</sup>.

Als Nullabgleich wurde auch hier eine Untersuchung an Tag 0 durchgeführt. An Tag 1 ist die Fluoreszenzintensität der Zellen annähernd gleich. Die Vitalität wird insgesamt durch steigende Exosomenkonzentration sowie zunehmender Dauer des Einflusses vermindert. An Tag 2 und Tag 3 zeigen die MCF-7 Zellen des 20 µl/cm<sup>2</sup> Mediums sowie 30 µl/cm<sup>2</sup> Mediums eine verminderte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Zellen des 10 µl/cm<sup>2</sup> Mediums. Der Effekt ist bei den Zellen des 30 µl/cm<sup>2</sup> Mediums an beiden Tagen noch stärker ausgeprägt.

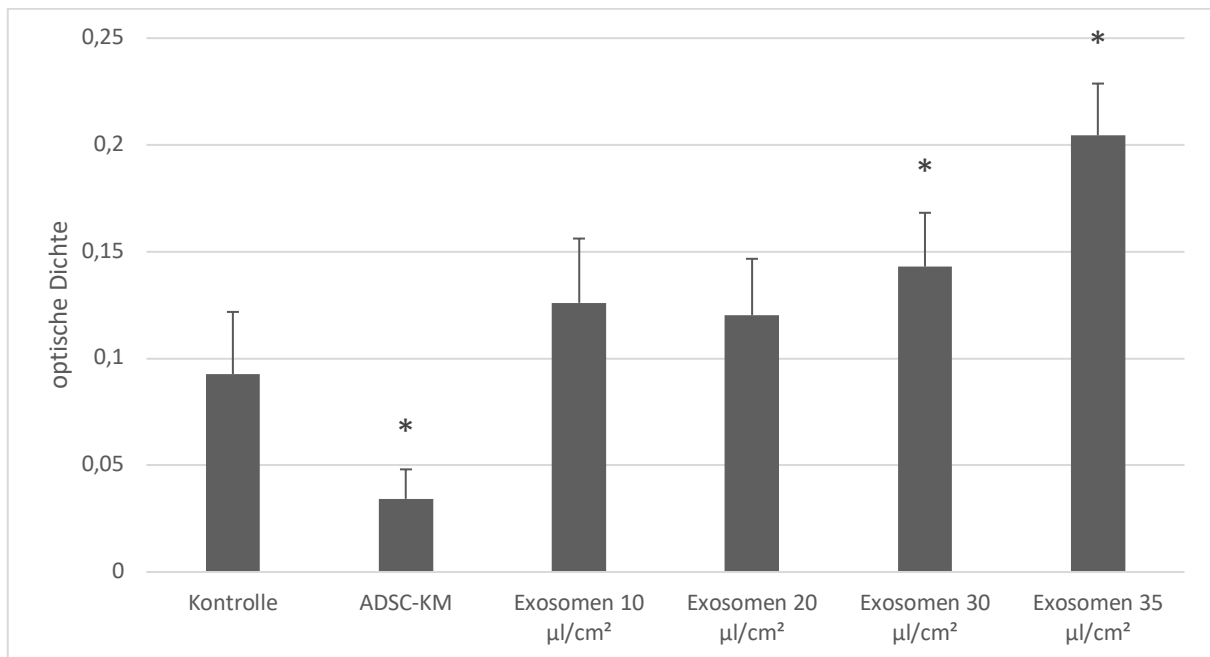


**Abbildung 7: Vitalitätstest auf Grundlage von Resazurin. Zellvitalität der MCF-7 Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Als Probe wurde Exosomenmedium in den Konzentrationen von 10, 20 und 30 µl/cm<sup>2</sup> verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.**

### **5.5 ADSC-KM wirkt protektiv auf MCF-7 Zellen, während Exosomenmedium in Abhängigkeit von der Konzentration zunehmend zytotoxisch wirkt**

Um neben Effekten auf die Vitalität auch zytotoxische Effekte zu erkennen, wurde ein LDH Assay durchgeführt. Dazu wurde die Menge an LDH nach 24 Stunden gemessen, welche durch den Einfluss verschiedener Proben von MCF-7 Zellen freigesetzt wird. Es wurden ADSC-KM und Exosomenmedium in den Konzentrationen: 10 µl/cm<sup>2</sup>, 20 µl/cm<sup>2</sup>, 30 µl/cm<sup>2</sup> und 35 µl/cm<sup>2</sup> verwendet und mit einer Kontrollprobe verglichen.

ADSC-KM hat als einzige Probe einen signifikant reduzierenden Effekt auf den Zelltod der Tumorzellen. Die Zytotoxizität nimmt um 63 % im Vergleich zur Kontrolle ab. Das Exosomenmedium führte in allen untersuchten Konzentrationen zu einer stärkeren Freisetzung von LDH, wobei dieser Effekt von der gewählten Konzentration abhängig ist. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt das Medium in den Konzentrationen 10 und 20 µl/cm<sup>2</sup> eine Zunahme von 36 % bzw. 30 %. Die Zytotoxizität nimmt mit der 30 µl/cm<sup>2</sup> Probe um 54 % weiter zu. Den höchsten Effekt erzielt die 35 µl/cm<sup>2</sup> Probe mit einer Zunahme der Toxizität von 121 %.



**Abbildung 8: Zytotoxizitätstest auf Grundlage der freigesetzten Laktatdehydrogenase. Optische Dichte der MCF-7 Zellen nach 24 Stunden. Als Probe wurden ADSC-KM und Exosomenmedium in der Konzentration von 10 µl/cm<sup>2</sup>, 20 µl/cm<sup>2</sup>, 30 µl/cm<sup>2</sup> und 35 µl/cm<sup>2</sup> verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen mit einem p-Wert unter 0,05 im Bezug zur Kontrolle.**

## 5.6 ADSC-KM und Exosomenmedium beeinflussen die relative Genexpression von MCF-7 Zellen auf unterschiedliche Weise

Zur Untersuchung des molekularbiologischen Einflusses von ADSC-Exosomen und ADSC-KM auf MCF-7 Zellen, wurde die relative Genexpression verschiedener Gene bestimmt. Die untersuchten Gene lassen sich in die Kategorien: proapoptotische und antiapoptotische Gene der Bcl-2 Familie, Tumorsuppressor- und Wachstumsfaktorgene einteilen.

Als Proben wurden ADSC-KM und Exosomenmedium in der Konzentration von 30 µl/cm<sup>2</sup> verwendet. Die Isolation der RNA fand nach 24-stündiger Inkubation der Proben statt.

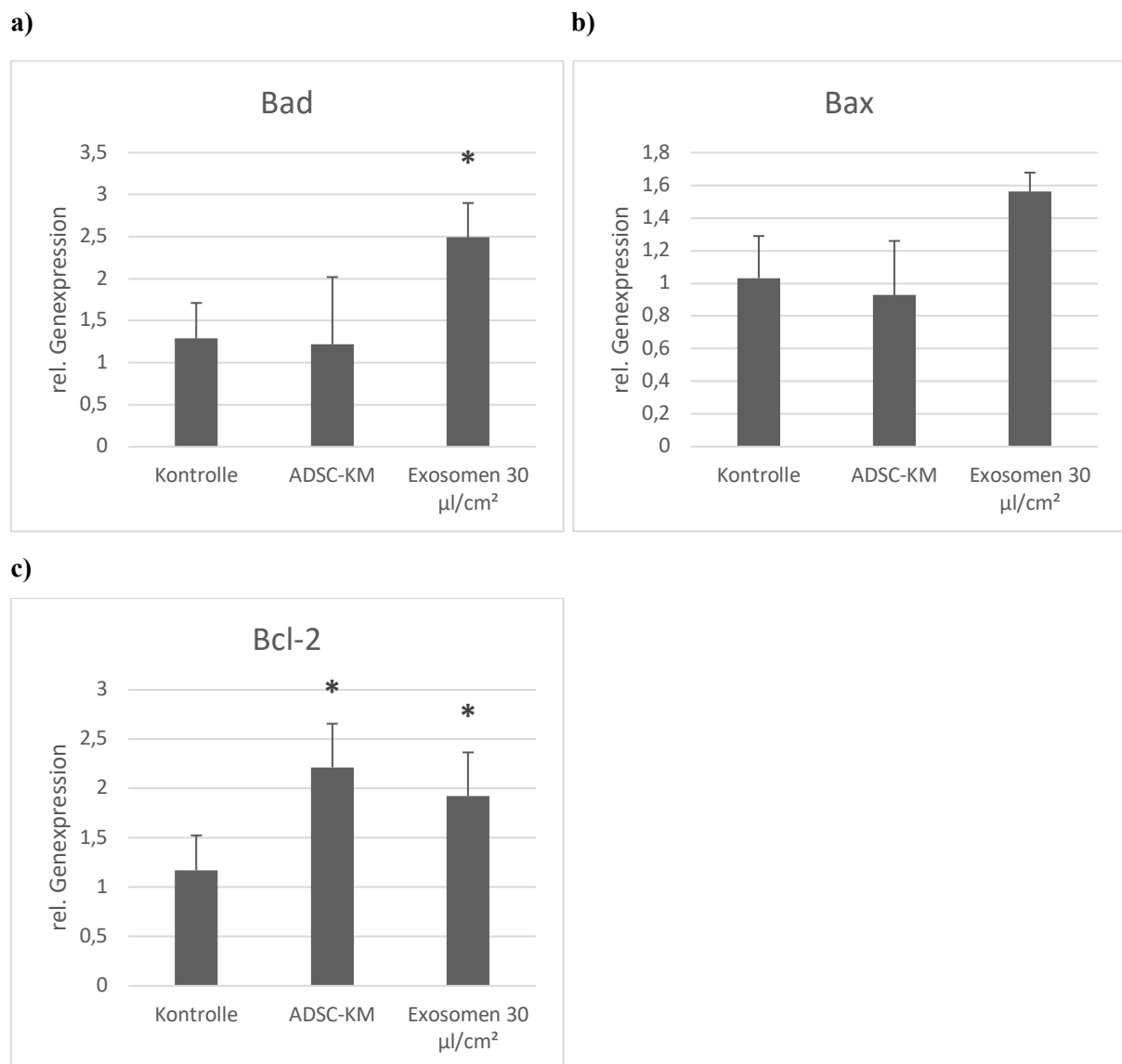
### 5.6.1 Bcl-2 Familie: *Bad*, *Bax* und *Bcl-2*

Unter den untersuchten proapoptotischen Genen sind *Bad* und *Bax* Teil der übergeordneten Bcl-2 Familie. Zusätzlich wird das namensgebende *Bcl-2* als antiapoptotisches Gen dieser Gruppe dazu gezählt.

ADSC-KM scheint nur einen geringen Einfluss auf die relative Genexpression der proapoptotischen Gene *Bad* und *Bax* zu haben. Dagegen steigert Exosomenmedium die

Expression beider Gene. Die Expression von *Bad* steigt signifikant um das 2,5-fache und die von *Bax* um das 1,5-fache.

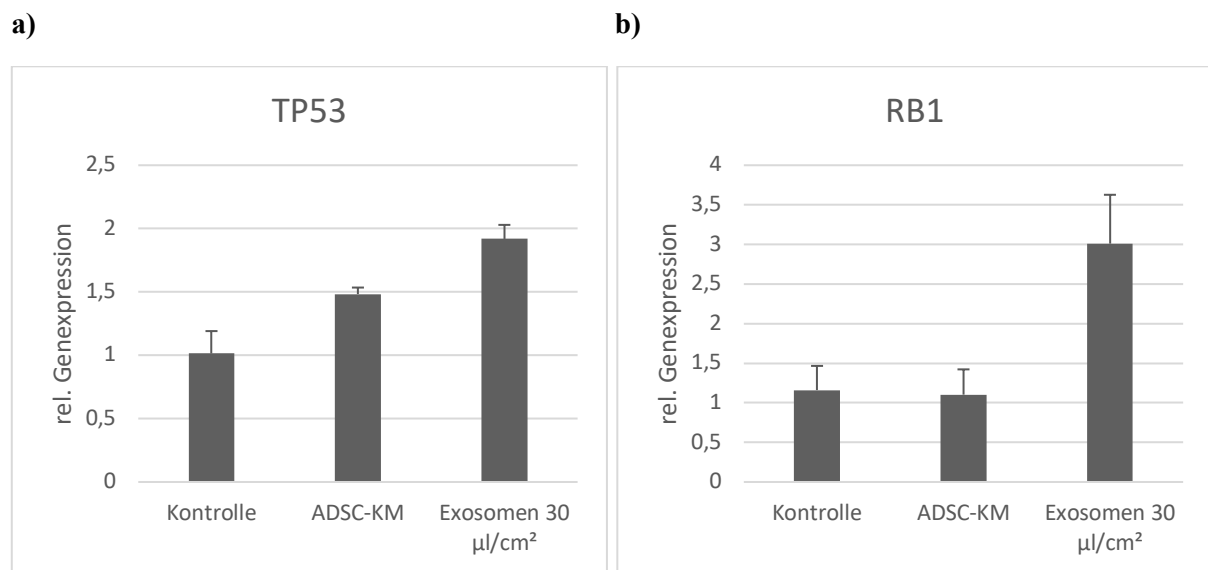
Das antiapoptotische Gen *Bcl-2* wird durch ADSC-KM und Exosomenmedium signifikant positiv beeinflusst. Nach Einfluss von ADSC-KM steigt die Expression auf das etwa 2-fache, wogegen der Einfluss von Exosomenmedium geringer ausfällt.



**Abbildung 9: Relative Genexpression der Gene *Bad* (a), *Bax* (b) und *Bcl-2* (c) nach 24 Stunden. Verwendet wurden ADSC-KM und 30 µl/cm² Exosomenmedium. Gezeigt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen mit einem p-Wert unter 0,05 im Bezug zur Kontrolle.**

### 5.6.2 Tumorsuppressorgene: *TP53* und *RBI*

Es wird die Expression der beiden Tumorsuppressorgene *TP53* und *RBI* dargestellt. Die Expression des für das Tumorsuppressorprotein 53 codierende Gens *TP53* nimmt unter Einfluss von ADSC-KM gering zu. Die Expressionszunahme ist unter Exosomenmedium auf das etwa 2-fache stärker ausgeprägt. Das durch das *RBI*-Gen exprimierte Retinoblastom-Protein wird nur durch Exosomenmedium auf das etwa 3-fache hochreguliert. Nach Einfluss von ADSC-KM tritt kein Effekt auf das untersuchte Gen auf.

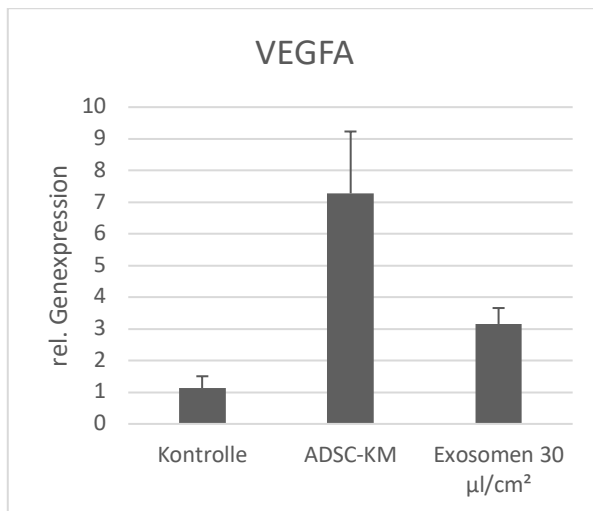


**Abbildung 10: Relative Genexpression der Gene *TP53* (a) und *RBI* (b) nach 24 Stunden. Verwendet wurden ADSC-KM und 30 µl/cm² Exosomenmedium. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.**

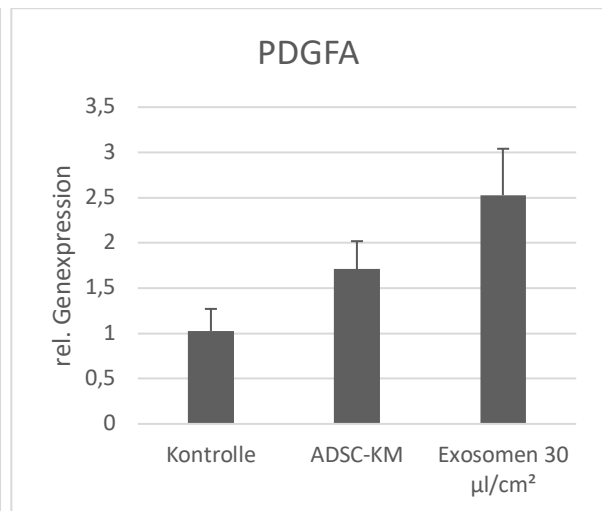
### 5.6.3 Wachstumsfaktorgene: *VEGFA*, *PDGF-A* und *PDGF-B*

Das *VEGFA* Gen zeigt einen deutlichen Anstieg in der Expression unter Einfluss von ADSC-KM auf das etwa 7-fache. Exosomen zeigen diesen Effekt in geringerer Form auf das über 3-fache. Es wurden weitere zwei Faktoren der PDGF-Familie untersucht. Durch ADSC-KM nimmt die Expression von sowohl *PDGFA* als auch *PDGFB* zu. Exosomen bewirken eine stärkere Zunahme der Expression auf das 2,5-fache bei *PDGFA* im Gegensatz zum ADSC-KM. Bei *PDGFB* nimmt hingegen die Expression um die Hälfte ab.

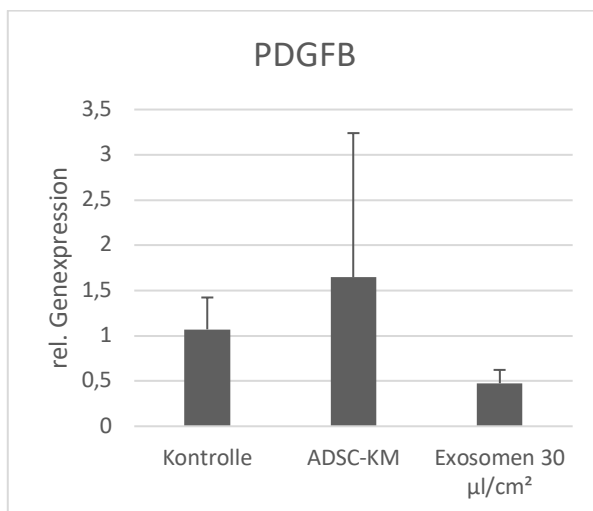
a)



b)



c)



**Abbildung 11: Relative Genexpression der Gene *VEGFA* (a), *PDGFA* (b) und *PDGFB* (c) nach 24 Stunden. Verwendet wurden ADSC-KM und 30  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Exosomenmedium. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.**

## 6 Diskussion

### 6.1 ADSC-Exosomen lassen sich durch die verwendeten Isolationsmethoden in einem Western Blot nachweisen

Die AFT ist eine häufig genutzte Option zur Rekonstruktion der Mamma nach Karzinomen. Obwohl diese Methode schon lange routiniert verwendet wird, gibt es noch keine abschließende Beurteilung zur onkologischen Sicherheit, obwohl die zahlreichen Stammzellen potenziell einen proonkogenen Effekt auf Residualtumorzellen haben können (117,125,126). Um dieses Thema weiter zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von ADSC-Exosomen, eine Subgruppe der EV, sowie ADSC-KM auf MCF-7 Tumorzellen untersucht. Durch die Sekretion von Stoffen und EV der ADSC in das umliegende Medium, wurde dieses als KM bezeichnet und diente als eine Repräsentation des Sekretoms der ADSC. Eine Untersuchung von jeweils Exosomen und KM, inklusive Exosomen, im getrennten Versuchsansatz ermöglichte die differenzierte Betrachtung der Effekte von Exosomen auf MCF-7 Zellen im direkten Vergleich zum vollständigen Sekretom der ADSC.

Zur Gewinnung von KM und Exosomen der ADSC, wurden diese mit bekannten Laborprotokollen kultiviert und passagiert. Die Methodik ist bereits seit über zehn Jahren in der Arbeitsgruppe etabliert und wird regelmäßig angewandt (182). Jedoch wurde durch die anstehende Exosomenisolierung die ursprüngliche Kultivierung der ADSC gering modifiziert. Da bovines Serum Teil des Standardmediums ist, liegen bereits große Mengen an EV nicht humanen Ursprungs in diesem Medium vor und würden die nachfolgende Exosomenisolierung behindern und die Ergebnisdarstellung verfälschen (183–185). Um diese Problematik zu umgehen, mussten die ADSC 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert werden, jedoch gibt es dazu bisher keine offiziellen Empfehlungen. Die plötzliche Zustandsänderung des Mediums von serumhaltig zu serumfrei könnte möglicherweise einen unvorhersehbaren Effekt auf ADSC haben (184). Durch insbesondere die serumfreie Inkubation werden die physiologischen Umstände *in vivo* noch weniger dargestellt und schränken eine Übertragung auf humane Zustände weiter ein (186). Einerseits konnten Kornilov *et al.* zeigen, dass die Fähigkeit der Osteoklastendifferenzierung der ADSC auch nach 48-stündiger, serumfreier Inkubation nicht beeinträchtigt wurde (187). Andererseits nahm die Proliferationsrate der Stammzellen im Vergleich zu Standardmedium mit FBS ab und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies als Marker für u.a. Apoptose zu (187,188). Um möglichst physiologische

Zustände in der Kultivierung von ADSC und zur späteren Isolierung von EV herzustellen, gibt es verschiedene Ansätze. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von kommerziellem EV-depletierten FBS. Jedoch sind die Kosten für dieses Produkt zur Zeit sehr hoch und zudem konnte gezeigt werden, dass die Reinheit des EV-depletierten FBS begrenzt ist und sich noch einige Rest-EV in diesem Produkt befinden (187). Weitere Möglichkeiten sind die Ultrafiltration und Ultrazentrifugation des üblich verwendeten FBS um bovine EV zu beseitigen, wobei die Filtration der Ultrazentrifugation in der Reinheit des Produkts überlegen ist (187). Obwohl die Exosomenforschung ein aktuelles Thema ist, fehlen standardisierte Protokolle zur Entfernung der EV im FBS (187). Die Annahme, dass ein Entzug der EV des FBS zu natürlichen Bedingungen der Zellkultivierung führt ist irreführend, da der Effekt von EV-depletiertem FBS auf Zellen ebenfalls kritisch betrachtet werden muss. So konnten Eitan *et al.* zeigen, dass das Zellwachstum unter diesen Konditionen abnahm (189).

Die Ultrafiltration mit einem MWCO von 100 kDa sowie die magnetische Isolation sind bereits etablierte Methoden und werden zuverlässig in der Exosomenforschung angewandt (187,113,114). Obwohl sie in der vorliegenden Arbeit erfolgreich kombiniert wurden, ist eine Verunreinigung des Exosomenisolats durch andere EV und nicht-exosomale Substanzen nicht auszuschließen. Es galt der magnetischen Separation über verschiedene Tetraspanine die Exosomen aus einem Konzentrat zu isolieren. Obwohl die Tetraspanine CD9, CD63 und CD81 oft als Exosomen-spezifisch angenommen werden, sind sie nicht nur auf rein exosomales Vorkommen beschränkt (190). So konnten CD63 und CD81 auch in AK und MV mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (191). Die am häufigsten verwendete Exosomenisolationsmethode ist die Ultrazentrifugation (192). Entgegen der weit verbreiteten Annahme, dass die Ultrazentrifugation zu einem reinen Exosomenkonzentrat führt, konnten Bobrie *et al.* trotz Ultrazentrifugation bei 100.000 *ref* in der Elektronenmikroskopie sowie Immuno-Elektronenmikroskopie CD9 positive EV neben 50 – 100 nm großen Vesikeln, auch welche mit über 200 nm darstellen (193). Ab einer Größe von etwa 100 nm Durchmesser kann man nicht mehr von Exosomen ausgehen und muss diese als MV bezeichnen (88). Im Vergleich zur Ultrazentrifugation konnte bei Verwendung der Ultrafiltration gezeigt werden, dass das Filtrat von der Wahl des jeweiligen kommerziell erhältlichen Filters abhängig ist. Die Filtergröße 100 kDa wird bei der Isolationsmethode am häufigsten verwendet (194). Jedoch wird auch hier über Verunreinigungen des Filtrats mit nicht-exosomalen Proteinen und über eine geringe Reinheit des Produkts berichtet (195,196). Es wird angenommen, dass durch eine Interaktion der Exosomen mit der Membran des Filters weitere Substanzen innerhalb des Filters akkumulieren und Filterporen blockiert werden (195). Durch das gemischte Konzentrat mit



möglicherweise Vesikeln über einer Größe von 100 nm und Vorkommen der Tetraspanine in anderen EV außer Exosomen, könnten so neben Exosomen auch andere EV durch die magnetische Kopplung isoliert werden. Somit lässt sich eine Kontamination des Exosomenisolats durch andere EV und unspezifische Substanzen nicht vollständig ausschließen und ist in der Interpretation der Daten zu berücksichtigen.

Nach 24-stündiger Inkubation der ADSC unter serumfreien Bedingungen und Konzentrationen des KM, erfolgte die eigentliche Exosomenisolation des Ultrafiltrats durch Separation unter Kopplung der exosomalen Tetraspanine CD8, CD63 und CD81 mit magnetischen Partikeln. Das Substrat zur Exosomenisolation wies eine ausgeprägte Eigenfärbung auf. Dadurch interferierte dieses mit den gängigen Messmethoden zur Proteinbestimmung. Somit war eine Angabe des Proteinanteils in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  nicht möglich, weshalb die Einheit  $\mu\text{l}$  Exosomenisolat pro  $\text{cm}^2$  MCF-7 Wachstumsfläche verwendet wurde. Obwohl strikt darauf geachtet wurde, dass für jede Exosomenisolation die gleichen Bedingungen, wie Ausgangsmenge, Gesamtzellkulturfläche und Subkonfluenz geschaffen wurden, ist eine Proteinbestimmung in  $\mu\text{g}$  des Exosomenkonzentrats präziser. Somit ist eine Angabe des Exosomenkonzentrats in  $\mu\text{l}$  weniger präzise, wodurch dies in der Interpretation und den Vergleich der Versuche zu berücksichtigen ist.

Zur Bestätigung der erfolgreichen Exosomenisolation wurden diese in einem Western Blot nachgewiesen. Neben dieser Methode gibt es weitere mögliche Nachweisverfahren für Exosomen, wie z.B. die häufig genutzte Elektronenmikroskopie oder Nanopartikelanalyse. Auf Grund bewährter Protokolle der Arbeitsgruppe, fiel die Entscheidung für den Exosomennachweis auf den Western Blot. Mittels Gelelektrophorese und anschließendem Blotting unter Verwendung eines CD-63-Antikörpers wurde so eine Exosomenbande zwischen 34 und 55 kDa nachgewiesen. Dieser Nachweis deckt sich mit weiteren Ergebnissen der Exosomenforschung. Dabei konnte meist eine Bande zwischen 30 und 60 kDa dargestellt werden (197,198). Somit ist anzunehmen, dass es sich bei dem isolierten Material um Exosomen handelt.

Nicht nur die Heterogenität der verwendeten Methoden stellt ein Problem in der EV-Forschung dar, da es viele weitere Variablen mit einem Einfluss auf sezernierende Vesikel gibt. Beispielsweise sind bereits präanalytisch neben der Wahl des Serums einige weitere Faktoren relevant. So haben zur Isolation von EV aus Kulturmedium, wie in dieser Arbeit, Antibiotikum und andere Mediumzusätze einen Effekt auf die Produktion und Komposition der EV (81,199). Darüber hinaus unterliegen ADSC und deren EV einer Seneszenz, wodurch diese von Spender zu Spender individuell unterschiedlich sind (75,200). Abhängig von ihrem Gewebetyp

unterscheidet sich die Komposition der Exosomen, weshalb sich u.a. entweder proonkogene oder tumorsuppressive Effekte beobachten lassen (75,107). Es besteht eine hohe Anzahl an verschiedenen Variablen in den Forschungsmethoden, wobei jede Methodik Vor- und Nachteile aufweist. Der Wunsch nach standardisierten Protokollen nimmt zu, ist jedoch nicht immer ohne Weiteres durchführbar (81,201). Deshalb ist die mindeste Forderung der ISEV die vollständige Transparenz der verwendeten Methoden in den veröffentlichten Studien, um die Datenlage vergleichbar zu gestalten (81).

## **6.2 ADSC-KM steigert die Vitalität von MCF-7 Zellen und hemmt dessen Zelltod**

Nach der erfolgreichen Isolation von Exosomen wurden diese und konditioniertes Medium der ADSC für weitere Experimente genutzt. Da die onkologische Sicherheit der AFT umstritten ist und die Datenlage noch unklar, wurden zur Bestimmung der Vitalität von MCF-7 Zellen photometrische Versuche mit einem Resazurin Assay durchgeführt, um einen grundlegenden Überblick über die Wirkung der gesammelten Produkte auf Tumorzellen zu gewinnen. Dazu wurde zunächst ADSC-KM durch 24-stündige Inkubation unter serumfreien Bedingungen generiert und als indirekte Kokultur mit MCF-7 Zellen kultiviert. Bereits ab dem ersten Tag zeigte das ADSC-KM eine signifikant verstärkte Zunahme in der Vitalität verglichen mit der Kontrolle. Die Vitalität nahm im Verlauf der drei Messtage weiter zu. Neben gesteigerter Vitalität konnte in einem Gegenversuch durch einen Zytotoxizitätstest gezeigt werden, dass ADSC-KM durch eine Verringerung der LDH-Freisetzung zusätzlich den Zelltod der Tumorzellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduzierte.

In Bezug auf die Zunahme der Vitalität der Tumorzellen durch ADSC-KM, bestätigen die eigenen Daten die Ergebnisse anderer Autoren. Darüber hinaus konnte in anderen Experimenten gezeigt werden, dass MSC und speziell auch ADSC nicht nur zu einer gesteigerten Proliferation, sondern auch zu einer Zunahme der Metastasierung und Invasion verschiedener Tumorzelllinien, darunter auch Mammakarzinomzellen, führen (57,202,203,136,204). Gebremeskel *et al.* wiesen eine gesteigerte Proliferation und Migration von Mammakarzinomzellen ebenfalls unter Einfluss von ADSC-KM in einem Tiermodell nach (57). Weiterführend konnte der proonkogene Effekt der Stammzellen von Muehlberg *et al.* in einem weiteren Tiermodell verifiziert werden. In dieser Studie wurden einerseits die ADSC direkt in das Mammakarzinom appliziert und andererseits venös injiziert. Dabei konnte neben einer Zunahme der Proliferation, Invasion und Metastasierung der Tumorzellen, auch eine

Zellrekrutierung von ADSC durch die Tumormikroumgebung im Sinne eines *Homing*-Effekts nachgewiesen werden (136).

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Befunde anderer experimenteller, sowie tierexperimenteller Studien und bekräftigen die Annahme, dass ADSC und ihr Sekretom über proonkogene Eigenschaften verfügen.

### **6.3 Exosomen wirken mit zunehmender Konzentration suppressiv auf MCF-7 Zellen**

Um konditioniertes Medium und ADSC-Exosomen miteinander in ihrer Wirkung auf Tumorzellen zu vergleichen, wurde neben dem ADSC-KM, Exosomenmedium als Testmedium in verschiedenen Konzentrationen für den Vitalitäts- sowie Zytotoxizitätstest verwendet.

Im Vitalitätstest zeigte sich nur ein geringer Unterschied in der Vitalität des Exosomenmediums der Konzentration von 30  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  zur Kontrolle. Dabei wurde nur eine geringfügige Abnahme der Vitalität der MCF-7 Zellen verzeichnet. Stattdessen konnte in einem weiteren Versuch ein Trend dargestellt werden, in dem die Vitalität der Tumorzellen mit zunehmender Konzentration des Exosomenmediums von 10, 20 und 30  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  im Verlauf von drei Tagen abnahm. Im Zytotoxizitätstest zeigte sich hingegen eine signifikant toxische Wirkung auf die Tumorzellen ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Exosomenmedium.

Bisher wurden ADSC mit ihrem Sekretom und den dazugehörigen EV vielfach in ihrem Einfluss auf Tumorzellen untersucht. Eine erst kürzlich erschienene Veröffentlichung von Rezaie *et al.* zeigte eine tumorsuppressive Wirkung von ADSC-MV auf MCF-7 Zellen in einem Vitalitätstest und in einer molekularbiologischen Diagnostik (205). Daneben ist der Effekt von ADSC- und anderen MSC-Exosomen auf Tumoren ungewiss, da die wissenschaftliche Datenlage kontroverse Ergebnisse in Bezug auf die Tumorprogression zeigt (75). Einerseits konnten Takahara *et al.* zeigen, dass ADSC-Exosomen miRNA vermittelte Apoptose in Prostatumoren initiieren (206). Der Vergleich mit den vorliegenden Daten wird allerdings durch die Wahl der Tumorzelllinie eingeschränkt. Jedoch berichteten Lin *et al.* über eine Zunahme der Proliferation und Migration von MCF-7 Zellen unter Einfluss von ADSC Exosomen vermittelt über den Wnt-Signalweg (207). Dabei konnte nach 48 Stunden Inkubation eine Zunahme der Proliferation der Tumorzellen nachgewiesen werden. Allerdings unterscheiden sich neben der Methodik der Studie auch die verwendeten Materialien im Vergleich zur vorliegenden Arbeit. Dabei wurden die ADSC für die Exosomenisolation in RMP-1640 Medium mit 10 % EV-depletierten FBS für 48 Stunden, statt in  $\alpha$ -MEM und unter

serumfreien Bedingungen für 24 Stunden inkubiert. Einerseits wird angenommen, dass serumfreies Medium die Vitalität der ADSC vermutlich einschränkt, andererseits befinden sich keine Rest-EV in diesem und reduzieren so die Kontamination durch bovine Exosomen (187). Da das EV-depletierte FBS von Lin *et al.* durch Ultrazentrifugation bei 100.000 rcf gewonnen wurde, ist zu erwähnen, dass trotz Depletierung auch in diesem Produkt weiterhin bovine EV nachzuweisen sind (187,207). In einer weiteren Studie von Wang *et al.*, wurde ebenfalls ein proonkogener Effekt durch sezernierte Exosomen von aus Stammzellen differenzierten Adipozyten in MCF-7 Zellen bestätigt (208). Allerdings unterscheidet sich die Studie maßgeblich durch die adipogene Differenzierung der ADSC mittels Dexamethason zur vorliegenden Arbeit, in welcher nicht differenzierte ADSC verwendet wurden.

Unter Hinzunahme der Resultate des Vitalitäts- sowie Zytotoxizitätstests, lassen sich die Ergebnisse mit einer vermutlich suppressiven Wirkung auf Tumorzellen durch ADSC Exosomen vereinbaren. Im Vergleich mit ADSC-KM, wirkt Exosomenmedium weniger proliferativ und möglicherweise suppressiv. Besonders im Zytotoxizitätstest lässt sich ein suppressiver Effekt des Exosomenmediums in den Konzentrationen von 30 und 35  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  darstellen. Daher stellt sich die Frage, ob sich deutlichere Auswirkungen durch Konzentrationen des Exosomenmediums über 30  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  oder längerer Versuchsdauer als 72 Stunden auch im Vitalitätstest gezeigt hätten. So stellt sich auch ein gesamtes Ausgangsmaterial von 70 ml konditioniertem Medium möglicherweise als zu gering gewählt dar, da in anderen Studien teilweise über ein Ausgangsmaterial von 250 – 500 ml konditioniertem Medium berichtet wird (207). Des Weiteren gestaltet sich der Vergleich mit anderen Studien schwierig. Die aktuelle Datenlage bietet einen hohen Grad an Heterogenität in den Ergebnissen. Weiter wird eine direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse relevant eingeschränkt, da es sich bei der Exosomenisolation um einen aufwendigen Prozess mit einer hohen Variabilität der verwendeten Materialien und Methoden handelt.

#### **6.4 ADSC-KM hat einen antiapoptotischen Effekt auf MCF-7 Zellen, während durch Exosomen eine eher proapoptotische Signalvermittlung initiiert wird**

Durch kolorimetrische Nachweise konnte unter Einfluss von ADSC-KM auf die MCF-7 Zellen eine Zunahme der Vitalität bzw. eine Abnahme der Zytotoxizität verzeichnet werden. Dagegen zeigte sich in den Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen an Exosomenmedium eine nur gering unterschiedliche Vitalität im Vergleich zur Kontrolle. Im Zytotoxizitätstest wurde ein zunehmend zytotoxischer Trend durch steigende Exosomenkonzentrationen dargestellt. Um

molekularbiologische Aspekte genauer betrachten zu können, wurde analog zu den vorherigen Versuchen zuerst ADSC-KM unter serumfreien Bedingungen über 24 Stunden generiert. Anschließend erfolgte die indirekte Kokultur mit MCF-7 Zellen für 24 Stunden in ADSC-KM und Exosomenmedium in der Konzentration von 30  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ . Danach wurden PCR mit spezifischen Primern für die Untersuchung der Expression von verschiedenen Genen durchgeführt. Es zeigte sich ein vielfältiger molekularbiologischer Einfluss von ADSC-KM und Exosomenmedium auf MCF-7 Zellen.

Zu den „*Hallmarks of cancer*“ zählen u.a. die Persistenz von Proliferationssignalen sowie die Resistenz von Apoptose (128). Anhand der Expression von Genen der Bcl-2 Familie, wurden im Rahmen des Zellzyklus die pro- und antiapoptotischen Signale der intrinsischen Signalkaskade der Apoptose untersucht. Hierbei zeigte sich nach Einwirkung von ADSC-KM eine etwa 2-fache Zunahme der Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Das Exosomenmedium hatte einen geringeren Effekt auf die Expression von Bcl-2. Die proapoptotischen Marker der Bcl-2 Familie, Bax und Bad, zeigten im Versuch mit ADSC-KM keinen Unterschied zur Kontrolle. Dagegen zeigte sich nach Einfluss von Exosomenmedium in der Expression der Proteine eine 1,5-fache Zunahme von Bax bzw. 2,5-fache Zunahme von Bad. Die proapoptotischen Proteine Bax und Bad führen über eine Translokation nach intramitochondrial zu einer Destabilisierung der mitochondrialen Membran und so zu einer Freisetzung von Cytochrom c nach intrazellulär (146). Dabei ist dieses für die Initiierung der Apoptose durch Caspasen und schließlich den Zelltod relevant (148). Antagonistisch wirken Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> durch eine Stabilisierung der Barrierefunktion der mitochondrialen Membran und damit eine Blockade des Transfers von Apoptose-induzierenden Faktoren über eine Hemmung von Bax und Bad (146,149). Bei diesem Prozess ist somit nicht von einem singulären Effekt der jeweiligen pro- bzw. antiapoptotischen Proteine auszugehen, sondern vielmehr von einem Mechanismus durch eine Verknüpfung der Proteine ineinander. Entscheidend für die Apoptoseinitiierung ist dabei der Quotient von Bcl-2/Bax, wobei je nach Überwiegen des einen bzw. des anderen Faktors die Apoptose initiiert oder inhibiert wird (169). Durch die Zunahme der Expression von Bcl-2 im Vergleich zu Bax ist von einem höheren Bcl-2/Bax Quotienten der MCF-7 Zellen unter Einfluss von ADSC-KM auszugehen. Insgesamt lässt sich so ein Überwiegen der antiapoptotischen Signale feststellen, welches Ergebnis mit den kolorimetrischen Experimenten kongruent ist. Nach dem Einfluss von Exosomenmedium auf MCF-7 Zellen wird ein Anstieg der Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und ebenfalls der zwei proapoptotischen Proteine Bax und Bad festgestellt. Es stellt sich die Frage, ob sich die Effekte der verschiedenen Proteine aufheben bzw. die der proapoptotischen Proteine

gering überwiegen und so einen vitalitätsvermindernden Trend aufzeigen. Wang *et al.* konnten einen proapoptotischen Effekt durch eine Zunahme von Bax sowie eine Abnahme von Bcl-2 phänotypisch in der Differenzierung von ADSC nachweisen (146). Zeitweise zeigte sich in den Versuchen von Wang *et al.* die gleiche Expressionsrate von Bcl-2 und Bax. Die Experimente in der Studie wurden im Verlauf von acht Stunden zu verschiedenen Zeiten durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit erfolgten die PCR gesammelt nach 24 Stunden. Wohlmöglich würde sich ein ähnlicher Effekt bei einer Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten präsentieren, sodass eine Dynamik von Bcl-2 und Bax nach Einfluss von Exosomenmedium auf MCF-7 Zellen darstellbar wäre.

Als proapoptotisches Protein besitzt Bad neben einer proapoptotischen Wirkung zusätzlich die Fähigkeit Cycline zu inhibieren und so die Expression von metastatisch-assoziierten Proteinen wie Matrix-Metalloproteasen und Proteinen der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) zu hemmen (209). Die EMT spielt eine zentrale Rolle in der Migration von Tumorzellen. Durch einen Verlust von E-Cadherin und damit den Verlust der Zelladhärenz nimmt dabei das Migrationspotenzial von Zellen zu (210). Der Einfluss von Exosomen auf die Expression von metastasierungs-assoziierten Proteinen in Tumorzellen wird kontrovers diskutiert. Modh Ali *et al.* konnten eine verringerte Metastasierungsfähigkeit von MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen durch exosomale miRNA feststellen, die zu einem Ruhezustand der Tumorzelltypen und einer verringerten EMT führte (211). Wang *et al.* zeigten tumorsuppressive und antimetastatische Effekte in MCF-7 Zellen vermittelt durch exosomale miR-363-5p über eine Suppression von *PDGF-B* (212). Dagegen nehmen Wu *et al.* eine Zunahme von metastasierungs-assoziierten Proteinen nach Einfluss von ADSC-Exosomen auf MCF-7 Zellen an (213). In der vorliegenden Arbeit wurde eine 2,5-fache Expressionszunahme von Bad dargestellt, wodurch man ein verringertes Metastasierungspotenzial durch die erhöhte Expression von Bad annehmen kann. Es ist ein Überwiegen der antiapoptotischen Signale in MCF-7 Zellen nach dem Einfluss von ADSC-KM zu erkennen, welches Ergebnis sich in den Vitalitäts- und Zytotoxizitätstest widerspiegelt. Dagegen ist nach Einfluss von Exosomen auf MCF-7 Zellen kein eindeutiges pro- bzw. antiapoptotisches Ergebnis darstellbar. Es lässt sich zunächst nur ein Überwiegen der proapoptotischen Signale annehmen. Des Weiteren gibt es Hinweise auf ein verringertes Migrationspotenzial von Tumorzellen nach exosomalen Einfluss, durch die Bad-vermittelte Hemmung von Proteinen der EMT.

## 6.5 Exosomen vermitteln einen tumorsuppressiven Effekt durch die Initiierung der Tumorsuppressorproteine p53 und pRB

Neben den Proteinen der Bcl-2-Familie wurde die Expression der Tumorsuppressorproteine pRB und p53 in MCF-7 Zellen untersucht. Das Umgehen von Tumorsuppressormechanismen zählt zu einer weiteren „Hallmark of cancer“ und ist damit essenziell an der Tumorentwicklung beteiligt (128). Tumorsuppressorproteine haben vielfältige Effekte, üben aber einen wesentlichen Einfluss auf den Zellzyklus aus. Die Wirkung beruht dabei auf der Inhibition der Transition in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten und somit einer Hemmung der Proliferation bis hin zur Apoptose (158,127,154).

In Tumoren ist *TP53* das am häufigsten mutierte Gen. Es wird angenommen, dass etwa die Hälfte aller Tumoren Mutationen in der Gensequenz aufweisen (158). Daher ist eine Mutation der entsprechenden Tumorsuppressorgene oder ein Funktionsverlust dieser ein erheblicher Faktor für die Onkogenese (127). Während viele Tumorzellen bzw. -zelllinien Mutationen des *TP53* Gens aufweisen, konnte für MCF-7 Zellen ein *TP53* Wildtyp festgestellt werden (214). Somit ist anzunehmen, dass trotz funktionsfähigem p53 eine Tumorentstehung plausibel erscheint und weitere Faktoren an der Onkogenese beteiligt sind. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Expressionszunahme der Tumorsuppressorproteine und speziell p53 mit einem Apoptose-induzierenden Effekt in MCF-7 Zellen verknüpft sind (215). Das *RBI*-Gen wird ebenfalls als eines der wichtigsten Gene für Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion beschrieben (214). Neben *TP53* ist *RBI* als Wildtyp in MCF-7 Zellen vorhanden, obwohl es wie *TP53* ein häufig mutiertes Gen in Tumoren darstellt (214,216). Das eine Tumorinduktion nicht nur abhängig von einem Funktionsverlust der Tumorsuppressorproteine ist und weitere Faktoren an der Onkogenese beteiligt sind, zeigt eine Studie von Huun *et al.* Dabei wurde keine Veränderung der Apoptoserate von p53 und pRB Knockout MCF-7 Zellen zur Kontrollgruppe vermerkt. Jedoch konnte ein Zellzyklusarrest festgestellt werden, wobei der Effekt der gleichzeitigen Hemmung beider Faktoren stärker ausgeprägt war, als die alleinige Hemmung von pRB und p53 (214). Die synergistischen Effekte beider Tumorsuppressorproteine wurden ebenfalls in anderen Tumorzelllinien nachgewiesen, wobei der gleichzeitige Funktionsverlust von p53 und pRB in einer ausgeprägten Chromosomeninstabilität resultierte, welche mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert ist (216).

Nach Einfluss von ADSC-KM auf MCF-7 Zellen, wurde keine Veränderung der Expression von pRB und nur eine gering erhöhte Expressionsrate von p53 festgestellt. Im Gegensatz dazu vermittelte Exosomenmedium einen wesentlich stärkeren Effekt auf die Tumorzellen. Die

Expressionsrate der Gene war um das 2-fache bei p53 und um das 3-fache bei pRB erhöht. Durch die ausgeprägte Initiierung der Tumorsuppressorproteine durch Exosomen, lässt sich von zellzyklusinhibierenden oder sogar proapoptotischen Effekten ausgehen (153,161,214). Die gesteigerte Vitalität sowie verminderte Zytotoxizität der Zellen des ADSC-KM, würde zunächst eine Abnahme bzw. keine Zunahme der Expression in den Tumorsuppressorproteinen vermuten. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zur vermehrten p53 Expression in MCF-7 Zellen nach Einfluss von ADSC-KM. In den Signalkaskaden von pRB und p53 sind kompensatorische Effekte beschrieben, wobei die Tumorsuppressorproteine reziproke Effekte zeigen (217). So würde eine Hemmung oder ein Funktionsverlust von pRB zu einer zunehmenden Expression von p53 als eine weitere Instanz der Zellzykluskontrolle führen (217). Möglicherweise finden nach Einfluss von ADSC-KM diese pRB hemmenden Mechanismen statt, wobei wiederum intuitiv eine ausgeprägtere Abnahme der Expression von pRB zu erwarten wäre. Jedoch können ebenso eine verminderte Funktion der pRB-Komplexbildner der E2F Familie zu einer Hochregulation von p53 führen, welche in den durchgeführten PCR nicht gezeigt wurden (216).

Unter Hinzunahme der kolorimetrischen Assays, der vermutlich proapoptotischen Beobachtung in den Proteinen der Bcl-2 Familie und der Expressionszunahme in den Tumorsuppressorproteinen, lässt sich ein suppressiver Effekt von Exosomenmedium auf MCF-7 Zellen darstellen, wodurch die Vitalität nur gering beeinflusst wird, aber zytotoxische Parameter erhöht sind. ADSC-KM zeigt nur einen geringen Effekt auf die Tumorsuppressorproteine bzw. eine möglicherweise kompensatorische Regulation von p53, wobei durch die vorherigen Versuche insgesamt von einer antiapoptotischen Wirkung ausgegangen werden kann.

## **6.6 ADSC-KM vermittelt proonkogene Signale durch die Expression von Wachstumsfaktoren, während Exosomen insgesamt uneindeutige Effekte auf diese darstellen**

Durch das Betrachten von Apoptosemechanismen und Tumorsuppressorfaktoren in MCF-7 Zellen, ließ sich ein molekularbiologischer Überblick über die Wirkung von ADSC-KM und Exosomen auf die Tumorzellen verschaffen. Während die Apoptoseresistenz und die Umgehung von Tumorsuppressionsmechanismen einzelner Tumorzellen essenzielle Kennzeichen für die Onkogenese darstellen, ist die Entstehung eines soliden Tumors ein weitaus komplexeres Geschehen (128,129). Dabei leistet die Tumormikroumgebung einen



wesentlichen Beitrag (130). Einflüsse wie die Rekrutierung von Tumor-assoziierten Zellen und die Induktion von Angiogenese zählen zu weiteren Faktoren einer proonkogenen Tumormikroumgebung (128). Die Neoangiogenese stellt dabei eine so tragende Rolle dar, sodass bei unzureichender Vaskularisierung ein Tumorwachstum über eine geringe Größe nicht möglich ist (163). Für die Induktion des Prozesses der Angiogenese wird VEGFA als Hauptfaktor angesehen (166).

In der vorliegenden Arbeit konnte besonders durch Einfluss von ADSC-KM auf MCF-7 Zellen eine Expressionszunahme des etwa 7-fachen von VEGFA erreicht werden. Somit ergibt sich ein Hinweis auf das hohe angiogenetische Potenzial von ADSC. Martin *et al.* konnten anhand von *in vitro* Versuchen ebenfalls eine Expressionszunahme von VEGF nach Einfluss von BMSC in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien nachweisen (218). In einem Tiermodell konnten Gebremeskel *et al.* diesen Effekt bestätigen. In den *in vivo* Versuchen wurde durch murine ADSC eine Expressionszunahme von VEGF in 4T1 Tumorzellen, einer weiteren Mammakarzinomzelllinie, verzeichnet (57). In der Literatur ist man mehrheitlich vom angiogenen Potenzial der MSC überzeugt, jedoch ist dabei die exakte Rolle von Exosomen noch unklar und wird diskutiert (75). Huang *et al.* nehmen an, dass die proangiogenen Funktionen der MSC besonders durch MV reguliert werden, während Exosomen und andere parakrine Faktoren des Sekretoms eher zu einem antivaskulären *Remodeling* führen (219). In verschiedenen Studien konnte nach Einfluss von MSC-Exosomen unterschiedlicher Herkunft eine Zunahme bzw. Abnahme der Expression von VEGF in Tumorzellen verzeichnet werden (220,221). In den durchgeführten Experimenten der vorliegenden Arbeit, wurde eine Expressionszunahme von VEGFA von dem etwa 3-fachen nach Einfluss von Exosomenmedium festgestellt. Damit ist der Effekt im Vergleich zum ADSC-KM geringer ausgeprägt, aber noch deutlich über den Versuchen mit Kontrollmedium. Es wurden nachweislich miRNA in Exosomen identifiziert, welche mit Angiogenese und Gefäßformation assoziiert sind (222). Diese Entdeckung würde die Annahme unterstützen, dass Exosomen angiogenetische Fähigkeiten besitzen.

Des Weiteren konnte eine regulative Funktion von VEGF im Zellzyklus nachgewiesen werden. VEGF zeigte einen antiapoptotischen Effekt über eine Stimulierung von Bcl-2 in verschiedenen Zelltypen (223). Neben einer Expressionszunahme von VEGF, lies sich ebenfalls eine Expressionszunahme von Bcl-2 nach Einfluss von ADSC-KM und Exosomenmedium in MCF-7 Zellen darstellen. Obwohl ein eher suppressiver bzw. proapoptotischer Effekt von ADSC-Exosomen vermutet wird, würde eine verstärkte Bcl-2 Expression eine antiapoptotische Wirkung zeigen, wobei der Bcl-2/Bax-Quotient zu berücksichtigen ist. Die

Expressionszunahme von Bcl-2 ließe sich somit durch die Interaktion mit VEGF erklären, sodass trotzdem die suppressive bzw. proapoptotische Funktion der Exosomen vorrangig ist. Die Annahme einer antiapoptotischen Wirkung durch VEGF wird durch ein Gegenexperiment von Ge *et al.* unterstützt. Dabei konnte eine Expressionsabnahme von Bcl-2 vermittelt durch eine VEGF interferierende und damit hemmende small interfering RNA (siRNA) festgestellt werden (169).

Zur weiteren Untersuchung des angiogenetischen und proonkogenen Potenzials von ADSC-KM und Exosomen, wurden die Gene *PDGF-A* und *PDGF-B* untersucht. Diese kodieren die drei Wachstumsfaktoren PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB (176). Die Wachstumsfaktoren der PDGF Familie üben viele Funktionen aus und nehmen dabei wesentlichen Einfluss auf Angiogenese, Proliferation, Migration und Immunfunktion in Tumorzellen und der Tumormikroumgebung (178). PDGF-BB wird in der Tumormikroumgebung von verschiedenen Zelltypen exprimiert und ist mit einer verstärkten Angiogenese und Lymphangiogenese der Tumormikroumgebung und Migration von Tumorzellen assoziiert (224,225). Dadurch, dass Endothelzellen die Grundlage für Neoangiogenese darstellen, wird das angiogenetische Potenzial der Wachstumsfaktoren und speziell PDGF-BB deutlich. Exosomenmedium stimulierte die Expression in MCF-7 Zellen von *PDGF-A* um das 2,5-fache, während die Expression von *PDGF-B* auf die Hälfte abnahm. Eine Exosomen vermittelte PDGF-BB Reduktion in MCF-7 Zellen, stellt somit eine verringerte angiogenetische Potenz als ADSC-KM dar, da dieses im Vergleich zu den ADSC-Exosomen zu einer Expressionszunahme beider PDGF-Gene führt und sich so mit einem proangiogenetischen Effekt vereinbaren lässt. Neben der vermutlich verringerten angiogenetischen Potenz, wirkt sich eine PDGF-BB Reduktion ebenfalls negativ auf die Zellrekrutierung von ADSC durch Tumorzellen aus (180). In einer Studie von Wang *et al.* konnte gezeigt werden, dass die exosomale miRNA miR-363-5p tumorsuppressive Effekte durch Inhibition von *PDGF-B* ausübt und so zu einer Abnahme der Proliferation und Migration von MCF-7 Zellen führt (212). Des Weiteren ist eine verringerte miR-363-5p Konzentration mit Metastasierung und einem verringertem Gesamtüberleben von Mammakarzinompatienten assoziiert (212).

In Gliomen konnte eine positive Korrelation von PDGF-AA und PDGF-BB mit dem Grad an Malignität nachgewiesen werden (226). PDGF-BB hat direkte Effekte auf Endothelzellen und kann so proangiogene Effekte ausüben, wogegen PDGF-AA nicht dasselbe angiogene Potenzial besitzt (172,227). Es wird kontrovers diskutiert, ob PDGF-AA im Vergleich zu PDGF-BB eher eine antiangiogenetische Wirkung über FGF vermittelt (227,228). Damit wäre eine Expressionszunahme von *PDGF-A* durch Exosomen mit dem vorher beschriebenen

antivaskulären *Remodeling* vereinbar (219). PDGF besitzt die Fähigkeit zu dimerisieren und aus den Genen *PDGF-A* und *PDGF-B* drei verschiedene Wachstumsfaktoren zu bilden (175). Darüber hinaus werden die exprimierten Proteine posttranslational bearbeitet und unterliegen dem alternativen Spleißen (229). Die Untersuchung auf molekularer Ebene gibt daher nur einen Anhalt für den Effekt von ADSC-KM und Exosomen. Eine endgültige Aussage zur Expressionsveränderung der verschiedenen PDGF Isoformen ließe sich somit nur durch die Bestimmung der Proteinkonzentration dieser treffen.

Die Ergebnisse eines *in vitro* Experiments sind nur bedingt auf die Realität übertragbar und können nur einen Überblick über die Tendenz eines Forschungsvorhabens geben. Zur *in vivo* Validierung von angiogenetischen Prozessen, Wachstumsverhalten, Zellrekrutierung, Metastasierung und Migration von Tumorzellen eignet sich ein Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Assay (CAM-Assay). Durch ein natürlich unterentwickeltes Immunsystem des Hühnerembryos wird xenogenes Material, wie Zellen humanen Ursprungs, nicht abgestoßen und lässt sich daher ausgezeichnet untersuchen (230,231). Es wurde bereits der Einfluss von ADSC auf MCF-7 Zellen in diesem Modell geprüft. So konnte gezeigt werden, dass die MCF-7 Zellen einen aggressiveren Phänotypus ausbildeten und die ADSC zu vaskulären Vorläuferzellen differenzierten. Neben eines *Homing*-Effekts konnte zusätzlich festgestellt werden, dass die Angiogenese positiv beeinflusst wurde und molekularbiologisch die VEGF Expression der Tumorzellen zunahm (232). Damit sind die Ergebnisse des CAM-Assays kongruent zu den *in vitro* Ergebnissen mit einer ADSC-KM vermittelten VEGF-Expressionszunahme der vorliegenden Arbeit. Durch die verstärkte *PDGF-A* sowie *PDGF-B* Expression, ließe sich wohlmöglich zusätzlich der beobachtete *Homing*-Effekt und die provaskuläre Modulation erklären. Bisher wurde die Wirkung von ADSC-Exosomen auf Tumorzellen im CAM-Assay noch nicht untersucht. Vermutlich ließe sich eine endgültige Schlussfolgerung über den angiogenetischen und onkogenen Einfluss von Exosomen auf Tumorzellen im CAM-Assay finden.

## **6.7 Fazit zur onkologischen Sicherheit der AFT**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ADSC-KM einen pronkogenen Effekt sowohl in den kolorimetrischen Assays als auch auf molekularer Ebene aufweist. Neben einer Vitalitätszunahme und einer Verringerung der Zytotoxizität, wurden antiapoptotische Signale im Vergleich zu proapoptotischen Signalen in den Tumorzellen vermehrt exprimiert. Des

Weiteren konnte eine Expressionszunahme der Wachstumsfaktoren verzeichnet werden. Diese proonkogene Beobachtung wird durch weitere Studien, die den Einfluss von ADSC auf Tumorzellen untersuchten unterstützt (57,136,202). Dagegen zeigten ADSC-Exosomen keinen proonkogenen und vermutlich einen eher suppressiven Effekt auf MCF-7 Zellen. Es konnte eine zunehmende Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Exosomenkonzentration nachgewiesen werden. Molekularbiologisch wurden proapoptotische und Tumorsuppressorproteine vermehrt exprimiert. Unter den Wachstumsfaktoren wurde ebenfalls eine vermehrte Expression von VEGFA, jedoch uneindeutige Effekte auf die Gene der PDGF-Familie festgestellt. Der Einfluss von Exosomen auf Tumorzellen ist in geringerem Maß, als der Einfluss von ADSC-KM untersucht. Bisher konnte gezeigt werden, dass speziell exosomale miRNA eine tumorsuppressive und antimetastatische Wirkung durch Hemmung der EMT ausübt (211,212). Neben der Untersuchung einzelner Zellen und derer EV ist unter den klinischen Aspekten einer AFT als Rekonstruktionsoption nach Mammakarzinom, die genaue Betrachtung von Lipoaspirat als Ganzes relevant. Dieses ist unter anderem reich an Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF, PDGF-BB und Insulin Growth Factor (IGF) und besitzt daher eine ausgeprägte regenerative Fähigkeit und dadurch möglicherweise proonkogenes Potenzial (233). Der Einfluss von Lipoaspirat und fetthaltigem Gewebe auf Tumorzellen wurde bereits untersucht, jedoch werden auch hier die Ergebnisse kontrovers diskutiert. Einige Autoren sprechen sich weder für einen proonkogenen noch einen tumorsuppressiven Effekt von Lipoaspirat aus, während Almarzouqi *et al.* von einer onkogenesestimulierenden Wirkung ausgehen (57,123,234). Die Diskrepanz der Ergebnisse in den unterschiedlichen Studien in Bezug auf Stammzellen und deren Einfluss auf Tumorzellen ist weitreichend. Möglicherweise lässt sich diese Beobachtung, neben unterschiedlicher Methodik, durch die Wahl der zu untersuchenden Tumorzellen erklären. So eignen sich hochaktive Tumorzelllinien wie MCF-7 nur bedingt für die Verwertung eines Experiments, da klinische Isolate eine realistischere Situation darstellen (66).

Obwohl experimentelle Daten teilweise für einen proonkogenen Effekt von ADSC oder fetthaltigem Gewebe sprechen, ist man sich aus klinischer Betrachtungsweise zunehmend über die onkologische Sicherheit der AFT einig. Nach einer AFT können morphologische Veränderungen der Mamma auftreten, sodass die radiologische Begutachtung eingeschränkt ist (116,117). Gerade für die Erkennung von Mammakarzinom-Rezidiven spielt die Mammographie eine wesentliche Rolle. Delay *et al.* konnten zeigen, dass bildgebende Verfahren in ihrer Methodik durch morphologische Veränderungen nach einer AFT nicht eingeschränkt wurden (235). Des Weiteren konnte auch nach zehnjährigem Follow-Up keine

Zunahme von Rezidiven oder neuen Tumorprogressen verzeichnet werden (235). Zudem stellen aktuelle Daten keinen Unterschied in der Rezidivrate, dem Gesamtüberleben, Fernmetastasierung und damit keinen proonkogenen Effekt einer AFT fest (120–122).

Der CAL stellt eine weitere Verbesserung der AFT dar und weist positive regenerative Funktionen durch den hohen Anteil an ADSC auf (41). Es stellt sich die Frage, ob durch die Anreicherung mit ADSC wiederum proonkogene Effekte verstärkt werden. In einem Tiermodell konnten Jin *et al.* einerseits die Überlegenheit von Zell-angereicherten Transplantaten und andererseits die onkologische Sicherheit im Vergleich zur klassischen AFT nachweisen (236). Durch die methodische Limitation im Sinne eines Tiermodells, bleibt abzuwarten ob humane Studien die Sicherheit des CAL ebenfalls belegen können.

## 7 Zusammenfassung

Die Plastische Chirurgie macht sich in rekonstruktiven Eingriffen nach der Resektion von Mammakarzinomen die ausgeprägten regenerativen Fähigkeiten von ADSC zu Nutze. Während man sich in klinischen Studien über die onkologische Sicherheit der AFT zunehmend einig ist, weisen experimentelle Daten auf einen proonkogenen Effekt der in der AFT befindlichen ADSC hin. Die zu den EV gehörenden Exosomen wurden in diesem Kontext bisher nur gering untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollten durch die verschiedenen Betrachtungsweisen der ADSC-Exosomen und den direkten Vergleich mit ADSC-KM, neue Erkenntnisse über die onkologische Sicherheit der AFT präsentiert werden. Dazu wurden ADSC unter serumfreien Bedingungen kultiviert und aus dem Medium die Exosomen über eine Kombination verschiedener Methoden isoliert. Danach wurden Vitalitäts- und Zytotoxizitätstests mit MCF-7 Zellen unter Zugabe von ADSC-KM und Exosomen durchgeführt. Nach diesen kolorimetrischen Versuchen wurde im gleichen Versuchsansatz die RNA der MCF-7 Zellen isoliert und die Expression verschiedener Gene molekularbiologisch untersucht. Unter molekularbiologischer Verifizierung konnte gezeigt werden, dass ADSC-KM einen antiapoptischen und Zytolyse-hemmenden Effekt auf MCF-7 Zellen ausübte. Darüber hinaus wirkte sich ADSC-KM positiv auf Wachstumsfaktoren aus. Dagegen zeigten Exosomen einen proapoptischen Trend und einen zytotoxischen Effekt. Des Weiteren ist der Einfluss von Exosomen auf Wachstumsfaktoren suppressiver als durch ADSC-KM ausgeprägt, jedoch uneindeutig im Bezug zur PDGF-Familie.

Die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse geben eine Übersicht über die vermutlich tumorsuppressive Funktion von ADSC-Exosomen. Zukünftig würde sich ein *in vivo* Experiment in Form eines CAM-Assays anbieten um die ermittelten Ergebnisse zu verifizieren und die exakte Wirkung der Exosomen darzustellen.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

°C .....	Grad Celsius
ADSC .....	Adipose-Derived Stem Cell
ADSC-KM .....	ADSC-konditioniertes Medium
AFT .....	autologe Fetttransplantation
AJCC .....	American Joint Committee on Cancer
AK .....	apoptotische Körper
AR .....	autologe Rekonstruktion
Bad .....	Bcl-2 Associated Agonist Of Cell Death Protein
Bak .....	Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer
Bax .....	Bcl-2-Associated X Protein
Bcl-2 .....	B-Cell Lymphoma 2
Bcl-xL .....	B-Cell Lymphoma-Extra Large
BET .....	brusterhaltende Therapie
BMSC .....	mesenchymale Knochenmark Stammzelle
CAL .....	cell-assisted Lipotransfer
CAM-Assay .....	Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Assay
CDK .....	Cyclin-Dependent Kinase
cDNA .....	complementary DNA
cm .....	Zentimeter
CO <sub>2</sub> .....	Kohlenstoffdioxid
CTGF .....	Connective Tissue Growth Factor
DMEM .....	Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
EGF .....	Epidermal Frowth Gactor
EMT .....	epitheliale-mesenchymale Transition
EV .....	extrazelluläre Vesikel
FBS .....	Fetal Bovine Serum
FGF .....	Fibroblast Growth Factor
HGF .....	Hepatocyte Growth Factor
IBR .....	Implantat-basierte Rekonstruktion
IGF .....	Insulin Growth Factor

ILV .....	intraluminäre Vesikel
ISCT .....	International Society for Cellular Therapy
ISEV .....	International Society of Extracellular Vesicles
kDa .....	Kilodalton
LDH .....	Lakatdehydrogenase
M .....	Mol
MCF-7 .....	Michigan Cancer Foundation-7
min .....	Minuten
miRNA .....	micro RNA
ml .....	Milliliter
mm .....	Millimeter
mRNA .....	messenger RNA
MSC .....	mesenchymale Stammzelle
MV .....	Mikrovesikel
MVE .....	multivesikuläre Endosomen
MWCO .....	Molecular Weight Cut Off
ng .....	Nanogramm
nm .....	Nanometer
p21 .....	Tumorsuppressorprotein 21
p53 .....	Tumorsuppressorprotein 53
PBS .....	Phosphate Buffered Saline
PCR .....	polymerase chain reaction
PDGF .....	Plateled-Derived Frowth Factor
pH .....	potencia Hydrogenii
pmol .....	Pikomol
pRB .....	Retinoblastoma-Associated Protein
rcf .....	relative centrifugal force
rpm .....	revolutions per minute
RT .....	Raumtemperatur
SDS .....	Sodium Dodecyl Sulfate
sec .....	Sekunde
siRNA .....	small interfering RNA
SVF .....	stromale vaskuläre Fraktion
TBS .....	Tris-buffered Saline



V ..... Volt  
VEGF ..... Vascular Endothelial Growth Factor  
VEGFA ..... Vascular Endothelial Growth Factor A  
 $\alpha$ -MEM .....  $\alpha$ -Minimum Essential Medium Eagle  
 $\mu$ g ..... Mikrogramm  
 $\mu$ l ..... Mikroliter  
 $\mu$ m ..... Mikrometer

## 9 Literaturverzeichnis

1. Ciuba A, Wnuk K, Nitsch-Osuch A, Kulpa M. Health Care Accessibility and Breast Cancer Mortality in Europe. *Int J Environ Res Public Health*. 20. Oktober 2022;19(20):13605.
2. Canelo-Aybar C, Ferreira DS, Ballesteros M, Posso M, Montero N, Solà I, u. a. Benefits and harms of breast cancer mammography screening for women at average risk of breast cancer: A systematic review for the European Commission Initiative on Breast Cancer. *J Med Screen*. 1. Dezember 2021;28(4):389–404.
3. Sant M, Francisci S, Capocaccia R, Verdecchia A, Allemani C, Berrino F. Time trends of breast cancer survival in Europe in relation to incidence and mortality. *Int J Cancer*. 15. November 2006;119(10):2417–22.
4. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*. Oktober 2008;61(1–2):203–13; discussion 213.
5. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol*. März 2001;2(3):133–40.
6. Zhu H, Doğan BE. American Joint Committee on Cancer’s Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: Summary for Clinicians. *Eur J Breast Health*. 24. Juni 2021;17(3):234–8.
7. Guo L, Kong D, Liu J, Zhan L, Luo L, Zheng W, u. a. Breast cancer heterogeneity and its implication in personalized precision therapy. *Exp Hematol Oncol*. 9. Januar 2023;12(1):3.
8. Jonczyk MM, Jean J, Graham R, Chatterjee A. Surgical trends in breast cancer: a rise in novel operative treatment options over a 12 year analysis. *Breast Cancer Res Treat*. Januar 2019;173(2):267–74.
9. Burguin A, Diorio C, Durocher F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *J Pers Med*. 19. August 2021;11(8):808.
10. Vieira RA da C, Bailão-Junior A, Oliveira-Junior I de. Does breast oncoplastic surgery improve quality of life? *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2022 [zitiert 6. Februar 2023];12. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9877289/>
11. Sinnadurai S, Kwong A, Hartman M, Tan EY, Bhoo-Pathy NT, Dahlui M, u. a. Breast-conserving surgery versus mastectomy in young women with breast cancer in Asian settings. *BJS Open*. 18. Oktober 2018;3(1):48–55.
12. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, u. a. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med*. 17. Oktober 2002;347(16):1227–32.

13. Fisher B, Montague E, Redmond C, Deutsch M, Brown GR, Zauber A, u. a. Findings from NSABP Protocol No. B-04-comparison of radical mastectomy with alternative treatments for primary breast cancer. I. Radiation compliance and its relation to treatment outcome. *Cancer*. 1. Juli 1980;46(1):1–13.
14. Chen W, Lv X, Xu X, Gao X, Wang B. Meta-analysis for psychological impact of breast reconstruction in patients with breast cancer. *Breast Cancer*. 1. Juli 2018;25(4):464–9.
15. Kim MS, Kim SY, Kim JH, Park B, Choi HG. Depression in breast cancer patients who have undergone mastectomy: A national cohort study. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175395.
16. Khan S, Khan NA, Rehman AU, Khan I, Samo KA, Memon AS. Levels of Depression and Anxiety Post-Mastectomy in Breast Cancer Patients at a Public Sector Hospital in Karachi. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(3):1337–40.
17. Saldanha IJ, Cao W, Broyles JM, Adam GP, Bhuma MR, Mehta S, u. a. Breast Reconstruction After Mastectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2021 [zitiert 12. September 2021]. (AHRQ Comparative Effectiveness Reviews). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572812/>
18. Al-Ghazal SK, Sully L, Fallowfield L, Blamey RW. The psychological impact of immediate rather than delayed breast reconstruction. *Eur J Surg Oncol*. Februar 2000;26(1):17–9.
19. Buchholz TA, Kronowitz SJ, Kuerer HM. Immediate breast reconstruction after skin-sparing mastectomy for the treatment of advanced breast cancer: Radiation oncology considerations. *Annals of Surgical Oncology*. Oktober 2002;9(8):820–1.
20. Tran NV, Chang DW, Gupta A, Kroll SS, Robb GL. Comparison of immediate and delayed free TRAM flap breast reconstruction in patients receiving postmastectomy radiation therapy. *Plast Reconstr Surg*. Juli 2001;108(1):78–82.
21. Wilkins EG, Hamill JB, Kim HM, Kim JY, Greco RJ, Qi J, u. a. Complications in Postmastectomy Breast Reconstruction: One-year Outcomes of the Mastectomy Reconstruction Outcomes Consortium (MROC) Study. *Ann Surg*. Januar 2018;267(1):164–70.
22. El-Sabawi B, Sosin M, Carey JN, Nahabedian MY, Patel KM. Breast reconstruction and adjuvant therapy: A systematic review of surgical outcomes. *Journal of Surgical Oncology*. 2015;112(5):458–64.
23. Haubner F, Leyh M, Ohmann E, Pohl F, Prantl L, Gassner HG. Effects of external radiation in a co-culture model of endothelial cells and adipose-derived stem cells. *Radiat Oncol*. 20. März 2013;8:66.

24. Heine N, Eigenberger A, Brebant V, Kempa S, Seitz S, Prantl L, u. a. The effect of radiotherapy on fat engraftment for complete breast reconstruction using lipofilling only. *Arch Gynecol Obstet*. Februar 2023;307(2):549–55.
25. Stark RY, Mirzabeigi MN, Vonderhaar RJ, Bucky LP. Utilizing large volume fat grafting in breast reconstruction after nipple sparing mastectomies. *Gland Surg*. Juni 2018;7(3):337–46.
26. Winters M, Ortiz JA. Postoperatively Adjustable Breast Implant. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [zitiert 14. September 2021]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560741/>
27. Weinzierl A, Schmauss D, Brucato D, Harder Y. Implant-Based Breast Reconstruction after Mastectomy, from the Subpectoral to the Prepectoral Approach: An Evidence-Based Change of Mind? *J Clin Med*. 30. Mai 2022;11(11):3079.
28. Piccotti F, Rybinska I, Scoccia E, Morasso C, Ricciardi A, Signati L, u. a. Lipofilling in Breast Oncological Surgery: A Safe Opportunity or Risk for Cancer Recurrence? *Int J Mol Sci*. 3. April 2021;22(7):3737.
29. Shukla L, Morrison WA, Shayan R. Adipose-Derived Stem Cells in Radiotherapy Injury: A New Frontier. *Front Surg*. 28. Januar 2015;2:1.
30. Nishimura T, Hashimoto H, Nakanishi I, Furukawa M. Microvascular angiogenesis and apoptosis in the survival of free fat grafts. *Laryngoscope*. August 2000;110(8):1333–8.
31. Shukla L, Yuan Y, Shayan R, Greening DW, Karnezis T. Fat Therapeutics: The Clinical Capacity of Adipose-Derived Stem Cells and Exosomes for Human Disease and Tissue Regeneration. *Front Pharmacol*. 2020;11:158.
32. Eigenberger A, Felthaus O, Schratzenstaller T, Haerteis S, Utpatel K, Prantl L. The Effects of Shear Force-Based Processing of Lipoaspirates on White Adipose Tissue and the Differentiation Potential of Adipose Derived Stem Cells. *Cells*. 16. August 2022;11(16):2543.
33. Shauly O, Gould DJ, Ghavami A. Fat Grafting: Basic Science, Techniques, and Patient Management. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 18. März 2022;10(3):e3987.
34. Prantl L, Eigenberger A, Brix E, Kempa S, Baringer M, Felthaus O. Adipose Tissue-Derived Stem Cell Yield Depends on Isolation Protocol and Cell Counting Method. *Cells*. 5. Mai 2021;10(5):1113.
35. Fontes T, Brandão I, Negrão R, Martins MJ, Monteiro R. Autologous fat grafting: Harvesting techniques. *Ann Med Surg (Lond)*. 13. November 2018;36:212–8.
36. Fisher C, Grahovac TL, Schafer ME, Shippert RD, Marra KG, Rubin JP. Comparison of harvest and processing techniques for fat grafting and adipose stem cell isolation. *Plast*

Reconstr Surg. August 2013;132(2):351–61.

37. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* April 2006;24(4):150–4.
38. Lexer E. Lexer, Erich. „Freie Fettransplantation.“ *Dtsch Med Wochenschr* 36.36: 340. 1910;
39. Bircoll M. Cosmetic breast augmentation utilizing autologous fat and liposuction techniques. *Plast Reconstr Surg.* Februar 1987;79(2):267–71.
40. Illouz YG. The fat cell „graft“: a new technique to fill depressions. *Plast Reconstr Surg.* Juli 1986;78(1):122–3.
41. Prantl L, Eigenberger A, Reinhard R, Siegmund A, Heumann K, Felthaus O. Cell-Enriched Lipotransfer (CELT) Improves Tissue Regeneration and Rejuvenation without Substantial Manipulation of the Adipose Tissue Graft. *Cells.* 8. Oktober 2022;11(19):3159.
42. Francesco S, Nicolò B, Michele PG, Edoardo R. From liposuction to adipose-derived stem cells: indications and technique. *Acta Biomed.* 2019;90(2):197–208.
43. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, u. a. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng.* Dezember 2006;12(12):3375–82.
44. Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA. In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg.* Januar 2004;113(1):391–5; discussion 396-397.
45. Kølle TK, Rs O, Pv G, Jj E, A FN, Kt D. Importance of mesenchymal stem cells in autologous fat grafting: a systematic review of existing studies. *Journal of plastic surgery and hand surgery [Internet].* April 2012 [zitiert 7. November 2022];46(2). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22471250/>
46. Eto H, Suga H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, u. a. Adipose injury-associated factors mitigate hypoxia in ischemic tissues through activation of adipose-derived stem/progenitor/stromal cells and induction of angiogenesis. *Am J Pathol.* Mai 2011;178(5):2322–32.
47. Kølle SFT, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, u. a. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 28. September 2013;382(9898):1113–20.
48. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-Assisted Lipotransfer for Cosmetic Breast Augmentation: Supportive Use of Adipose-Derived Stem/Stromal Cells.

Aesth Plast Surg. Januar 2008;32(1):48–55.

49. Zhu M, Zhou Z, Chen Y, Schreiber R, Ransom JT, Fraser JK, u. a. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Ann Plast Surg.* Februar 2010;64(2):222–8.

50. Prantl L, Brix E, Kempa S, Felthaus O, Eigenberger A, Brébant V, u. a. Facial Rejuvenation with Concentrated Lipograft-A 12 Month Follow-Up Study. *Cells.* 8. März 2021;10(3):594.

51. Brébant V, Weiherer M, Noisser V, Seitz S, Prantl L, Eigenberger A. Implants Versus Lipograft: Analysis of Long-Term Results Following Congenital Breast Asymmetry Correction. *Aesthetic Plast Surg.* Oktober 2022;46(5):2228–36.

52. Gutowski KA, ASPS Fat Graft Task Force. Current applications and safety of autologous fat grafts: a report of the ASPS fat graft task force. *Plast Reconstr Surg.* Juli 2009;124(1):272–80.

53. Kuehlmann B, Burkhardt R, Kosaric N, Prantl L. Capsular fibrosis in aesthetic and reconstructive-cancer patients: A retrospective analysis of 319 cases. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;70(2):191–200.

54. Papadopoulos S, Vidovic G, Neid M, Abdallah A. Using Fat Grafting to Treat Breast Implant Capsular Contracture. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* November 2018;6(11):e1969.

55. Maione L, Vinci V, Caviggioli F, Klinger F, Banzatti B, Catania B, u. a. Autologous fat graft in postmastectomy pain syndrome following breast conservative surgery and radiotherapy. *Aesthetic Plast Surg.* Juni 2014;38(3):528–32.

56. Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev Rep.* Juni 2011;7(2):269–91.

57. Gebremeskel S, Gencarelli J, Gareau AJ, Levatte T, Dugandzic B Sc A, Johnston B, u. a. Promotion of Primary Murine Breast Cancer Growth and Metastasis by Adipose-Derived Stem Cells Is Reduced in the Presence of Autologous Fat Graft. *Plast Reconstr Surg.* Januar 2019;143(1):137–47.

58. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, u. a. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* Dezember 2002;13(12):4279–95.

59. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 10. Januar 1998;238(1):265–72.

60. Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab.* April

1987;64(4):832–5.

61. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol.* 1976;47:327–59.
62. Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells. *Sultan Qaboos Univ Med J.* August 2018;18(3):e264–77.
63. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, u. a. 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.* Juni 2013;15(6):641–8.
64. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, u. a. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
65. Klopp AH, Zhang Y, Solley T, Amaya-Manzanares F, Marini F, Andreeff M, u. a. Omental adipose tissue-derived stromal cells promote vascularization and growth of endometrial tumors. *Clin Cancer Res.* 1. Februar 2012;18(3):771–82.
66. Zimmerlin L, Donnenberg AD, Rubin JP, Basse P, Landreneau RJ, Donnenberg VS. Regenerative Therapy and Cancer: In Vitro and In Vivo Studies of the Interaction Between Adipose-Derived Stem Cells and Breast Cancer Cells from Clinical Isolates. *Tissue Eng Part A.* Januar 2011;17(1–2):93–106.
67. Jansen BJH, Gilissen C, Roelofs H, Schaap-Oziemlak A, Veltman JA, Raymakers RAP, u. a. Functional differences between mesenchymal stem cell populations are reflected by their transcriptome. *Stem Cells Dev.* April 2010;19(4):481–90.
68. Donnenberg VS, Zimmerlin L, Rubin JP, Donnenberg AD. Regenerative therapy after cancer: what are the risks? *Tissue Eng Part B Rev.* Dezember 2010;16(6):567–75.
69. Noël D, Caton D, Roche S, Bony C, Lehmann S, Casteilla L, u. a. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res.* 15. April 2008;314(7):1575–84.
70. Trzyna A, Banaś-Ząbczyk A. Adipose-Derived Stem Cells Secretome and Its Potential Application in “Stem Cell-Free Therapy”. *Biomolecules.* 13. Juni 2021;11(6):878.
71. Noverina R, Widowati W, Ayuningtyas W, Kurniawan D, Afifah E, Laksmiawati DR, u. a. Growth factors profile in conditioned medium human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (CM-hATMSCs). *Clinical Nutrition Experimental.* 1. April 2019;24:34–44.
72. Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, u. a. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-

inflammatory factors. *J Cell Physiol.* September 2007;212(3):702–9.

73. Alonso-Alonso ML, García-Posadas L, Diebold Y. Extracellular Vesicles from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Review of Common Cargos. *Stem Cell Rev Rep.* 26. April 2021;

74. Yeo RWY, Lai RC, Zhang B, Tan SS, Yin Y, Teh BJ, u. a. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* März 2013;65(3):336–41.

75. Vakhshiteh F, Atyabi F, Ostad SN. Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:2847–59.

76. Witwer KW, Théry C. Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *J Extracell Vesicles.* 1. August 2019;8(1):1648167.

77. Aaronson S, Behrens U, Orner R, Haines TH. Ultrastructure of intracellular and extracellular vesicles, membranes, and myelin figures produced by *Ochromonas danica*. *J Ultrastruct Res.* Juni 1971;35(5):418–30.

78. Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol.* April 1969;41(1):59–72.

79. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* Mai 1967;13(3):269–88.

80. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* November 1946;166(1):189–97.

81. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, u. a. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 23. November 2018;7(1):1535750.

82. Bari E, Ferrarotti I, Di Silvestre D, Grisoli P, Barzon V, Balderacchi A, u. a. Adipose Mesenchymal Extracellular Vesicles as Alpha-1-Antitrypsin Physiological Delivery Systems for Lung Regeneration. *Cells.* 23. August 2019;8(9):965.

83. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, u. a. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol.* 18. Dezember 2012;10(12):e1001450.

84. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 15. Juli 2019;8(7):727.

85. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, u. a.



Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.

86. Pardo F, Villalobos-Labra R, Sobrevia B, Toledo F, Sobrevia L. Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. *Mol Aspects Med*. April 2018;60:81–91.
87. Armstrong JP, Holme MN, Stevens MM. Re-Engineering Extracellular Vesicles as Smart Nanoscale Therapeutics. *ACS Nano*. 24. Januar 2017;11(1):69–83.
88. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 18. Februar 2013;200(4):373–83.
89. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. August 2009;9(8):581–93.
90. Zhang HG, Cao P, Teng Y, Hu X, Wang Q, Yeri AS, u. a. Isolation, identification, and characterization of novel nanovesicles. *Oncotarget*. 12. Mai 2016;7(27):41346–62.
91. Liu J, Ren L, Li S, Li W, Zheng X, Yang Y, u. a. The biology, function, and applications of exosomes in cancer. *Acta Pharm Sin B*. September 2021;11(9):2783–97.
92. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol*. Juni 2015;25(6):364–72.
93. Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and  $\alpha$ -Granules. *Blood*. 1. Dezember 1999;94(11):3791–9.
94. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2014;30(1):255–89.
95. Jaiswal JK, Andrews NW, Simon SM. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J Cell Biol*. 25. November 2002;159(4):625–35.
96. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, u. a. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1. März 1996;183(3):1161–72.
97. Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V, Schwartz AL. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell*. 3. Mai 1991;65(3):417–27.
98. Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, u. a. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*. 15. Juni 2001;166(12):7309–18.
99. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance

the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 1. November 2004;104(9):2761–6.

100. Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 6. Juli 1981;645(1):63–70.

101. Tang Y, Zhou Y, Li HJ. Advances in mesenchymal stem cell exosomes: a review. *Stem Cell Res Ther*. 19. Januar 2021;12(1):71.

102. Harding et al. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*. 1. August 1983;97(2):329–39.

103. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. Juli 1983;33(3):967–78.

104. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 5. Juli 1987;262(19):9412–20.

105. van Balkom BWM, Gremmels H, Giebel B, Lim SK. Proteomic Signature of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Small Extracellular Vesicles. *Proteomics*. Januar 2019;19(1–2):e1800163.

106. Tickner JA, Urquhart AJ, Stephenson SA, Richard DJ, O’Byrne KJ. Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. *Front Oncol*. 2014;4:127.

107. An Y, Zhao J, Nie F, Qin Z, Xue H, Wang G, u. a. Exosomes from Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Overexpressing miR-21 Promote Vascularization of Endothelial Cells. *Sci Rep*. 6. September 2019;9(1):12861.

108. Smith ZJ, Lee C, Rojalin T, Carney RP, Hazari S, Knudson A, u. a. Single exosome study reveals subpopulations distributed among cell lines with variability related to membrane content. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:28533.

109. Bazzan E, Tinè M, Casara A, Biondini D, Semenzato U, Cocconcelli E, u. a. Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles’ Knowledge: From 1946 to Today. *Int J Mol Sci*. 15. Juni 2021;22(12):6417.

110. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*. November 2009;9(21):4997–5000.

111. Soto-Herederó G, Baixauli F, Mittelbrunn M. Interorganelle Communication between Mitochondria and the Endolysosomal System. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:95.

112. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. April 2006;Chapter 3:Unit 3.22.

113. Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao JY, Patel S, Hsu DH, Ruegg C, u. a. Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods*. 15. Dezember 2002;270(2):211–26.
114. Clayton A, Court J, Navabi H, Adams M, Mason MD, Hobot JA, u. a. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1. Januar 2001;247(1–2):163–74.
115. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. August 2002;2(8):569–79.
116. Juhl AA, Redsted S, Engberg Damsgaard T. Autologous fat grafting after breast conserving surgery: Breast imaging changes and patient-reported outcome. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. November 2018;71(11):1570–6.
117. Krastev TK, Jonasse Y, Kon M. Oncological safety of autologous lipoaspirate grafting in breast cancer patients: a systematic review. *Ann Surg Oncol*. Januar 2013;20(1):111–9.
118. Chala LF, de Barros N, de Camargo Moraes P, Endo E, Kim SJ, Pincerato KM, u. a. Fat necrosis of the breast: mammographic, sonographic, computed tomography, and magnetic resonance imaging findings. *Curr Probl Diagn Radiol*. Juni 2004;33(3):106–26.
119. Bassett L, Gold R, Cove H. Mammographic spectrum of traumatic fat necrosis: the fallibility of „pathognomonic“ signs of carcinoma. *American Journal of Roentgenology*. 1. Januar 1978;130(1):119–22.
120. Goncalves R, Mota BS, Sobreira-Lima B, Ricci MD, Soares JM, Munhoz AM, u. a. The oncological safety of autologous fat grafting: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 11. April 2022;22:391.
121. Kempa S, Brix E, Heine N, Hösl V, Strauss C, Eigenberger A, u. a. Autologous fat grafting for breast reconstruction after breast cancer: a 12-year experience. *Arch Gynecol Obstet*. 2022;305(4):921–7.
122. Krastev T, van Turnhout A, Vriens E, Smits L, van der Hulst R. Long-term Follow-up of Autologous Fat Transfer vs Conventional Breast Reconstruction and Association With Cancer Relapse in Patients With Breast Cancer. *JAMA Surg*. 1. Januar 2019;154(1):56–63.
123. Almarzouqi F, Rennekampff HO, Stromps JP, Alharbi Z, Pallua N. The effect of lipoaspirates vs. dissected abdominal fat on breast cancer cells in vitro. *Eur J Med Res*. 21. März 2017;22:10.
124. Bielli A, Scioli MG, Gentile P, Agostinelli S, Tarquini C, Cervelli V, u. a. Adult adipose-derived stem cells and breast cancer: a controversial relationship. *Springerplus*. 8. Juli 2014;3:345.

125. Cohen S, Sekigami Y, Schwartz T, Losken A, Margenthaler J, Chatterjee A. Lipofilling after breast conserving surgery: a comprehensive literature review investigating its oncologic safety. *Gland Surg.* Oktober 2019;8(5):569–80.
126. Lohsiriwat V, Curigliano G, Rietjens M, Goldhirsch A, Petit JY. Autologous fat transplantation in patients with breast cancer: “silencing” or “fueling” cancer recurrence? *The Breast.* 1. August 2011;20(4):351–7.
127. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 4. März 2011;144(5):646–74.
128. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery.* 12. Januar 2022;12(1):31–46.
129. Gehmert S, Lehoczyk G, Loibl M, Jung F, Prantl L, Gehmert S. Interaction between extracellular cancer matrix and stromal breast cells. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2020;74(1):45–52.
130. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* Dezember 2014;15(12):1243–53.
131. Brock CK, Hebert KL, Artiles M, Wright MK, Cheng T, Windsor GO, u. a. A Role for Adipocytes and Adipose Stem Cells in the Breast Tumor Microenvironment and Regenerative Medicine. *Front Physiol.* 2021;12:751239.
132. Scioli MG, Storti G, D’Amico F, Gentile P, Kim BS, Cervelli V, u. a. Adipose-Derived Stem Cells in Cancer Progression: New Perspectives and Opportunities. *Int J Mol Sci.* 4. Juli 2019;20(13):3296.
133. Garroni G, Balzano F, Cruciani S, Pala R, Coradduzza D, Azara E, u. a. Adipose-Derived Stem Cell Features and MCF-7. *Cells.* 11. Juli 2021;10(7):1754.
134. Hung SP, Yang MH, Tseng KF, Lee OK. Hypoxia-induced secretion of TGF- $\beta$ 1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression. *Cell Transplant.* 2013;22(10):1869–82.
135. Gehmert S, Gehmert S, Bai X, Klein S, Ortmann O, Prantl L. Limitation of in vivo models investigating angiogenesis in breast cancer. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011;49(1–4):519–26.
136. Muehlberg FL, Song YH, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X, u. a. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis.* April 2009;30(4):589–97.
137. Lasfargues EY, Ozzello L. Cultivation of Human Breast Carcinomas. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 1. Dezember 1958;21(6):1131–47.

138. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.* Februar 2004;83(3):249–89.
139. Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 1. August 1997;57(15):3071–8.
140. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* November 1973;51(5):1409–16.
141. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J Natl Cancer Inst.* Juli 2015;107(7):djv073.
142. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, u. a. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat.* 2007;10(1–2):13–29.
143. Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol.* 31. Januar 2003;36(1):60–5.
144. Rowinsky EK. Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. *J Clin Oncol.* 20. Dezember 2005;23(36):9394–407.
145. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* Juni 2007;35(4):495–516.
146. Wang Q, Zhang L, Yuan X, Ou Y, Zhu X, Cheng Z, u. a. The Relationship between the Bcl-2/Bax Proteins and the Mitochondria-Mediated Apoptosis Pathway in the Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells into Neurons. *PLoS One.* 5. Oktober 2016;11(10):e0163327.
147. Inayat-Hussain SH, Chan KM, Rajab NF, Din LB, Chow SC, Kizilors A, u. a. Goniothalamine-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis via caspase-2 independent and Bcl-2 independent pathways in Jurkat T-cells. *Toxicol Lett.* 1. März 2010;193(1):108–14.
148. Barczyk K, Kreuter M, Pryjma J, Booy EP, Maddika S, Ghavami S, u. a. Serum cytochrome c indicates in vivo apoptosis and can serve as a prognostic marker during cancer therapy. *Int J Cancer.* 20. August 2005;116(2):167–73.
149. Vitagliano O, Addeo R, D'Angelo V, Indolfi C, Indolfi P, Casale F. The Bcl-2/Bax and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways: implications in pediatric leukemia pathogenesis and new prospects for therapeutic approaches. *Expert Rev Hematol.* Oktober 2013;6(5):587–97.
150. Huang Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene.* 27. Dezember 2000;19(56):6627–31.
151. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and

- therapy. *Integr Biol (Camb)*. April 2011;3(4):279–96.
152. Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*. Mai 2009;1787(5):414.
153. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. März 2016;6(3):a026104.
154. Krause K, Wasner M, Reinhard W, Haugwitz U, Lange-zu Dohna C, Mössner J, u. a. The tumour suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B. *Nucleic Acids Res*. 15. November 2000;28(22):4410–8.
155. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, u. a. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 19. November 1993;75(4):817–25.
156. Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Kontny HU, Yu L, u. a. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30. März 1999;96(7):3706–11.
157. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, u. a. 14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*. Dezember 1997;1(1):3–11.
158. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ*. Mai 2022;29(5):946–60.
159. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, u. a. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*. 16. Oktober 1986;323(6089):643–6.
160. Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet*. Oktober 2013;45(10):1127–33.
161. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 5. Mai 1995;81(3):323–30.
162. Chicas A, Wang X, Zhang C, McCurrach M, Zhao Z, Mert O, u. a. Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell*. 13. April 2010;17(4):376–87.
163. Gimbrone MA, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med*. 1. August 1972;136(2):261–76.
164. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 7. September 2019;20(18):4411.
165. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 19. Mai 2011;473(7347):298–307.
166. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw*.

Dezember 2009;20(4):158–63.

167. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, u. a. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol.* Oktober 2010;12(10):943–53.

168. Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Mediated Angiogenesis Is Associated with Enhanced Endothelial Cell Survival and Induction of Bcl-2 Expression. *Am J Pathol.* Februar 1999;154(2):375–84.

169. Ge YL, Zhang X, Zhang JY, Hou L, Tian RH. The mechanisms on apoptosis by inhibiting VEGF expression in human breast cancer cells. *Int Immunopharmacol.* April 2009;9(4):389–95.

170. Pidgeon GP, Barr MP, Harme JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer.* 20. Juli 2001;85(2):273–8.

171. Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B.* September 2015;5(5):402–18.

172. Zhao Y, Adjei AA. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *Oncologist.* Juni 2015;20(6):660–73.

173. Gehmert S, Gehmert S, Hidayat M, Sultan M, Berner A, Klein S, u. a. Angiogenesis: the role of PDGF-BB on adipose-tissue derived stem cells (ASCs). *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011;48(1):5–13.

174. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* August 2004;15(4):197–204.

175. Johnsson A, Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. Platelet-derived growth factor: identification of constituent polypeptide chains. *Biochem Biophys Res Commun.* 15. Januar 1982;104(1):66–74.

176. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* Oktober 1999;79(4):1283–316.

177. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 15. Mai 2008;22(10):1276–312.

178. Cao Y. Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. *Trends Mol Med.* August 2013;19(8):460–73.

179. Guo P, Hu B, Gu W, Xu L, Wang D, Huang HJS, u. a. Platelet-Derived Growth Factor-B Enhances Glioma Angiogenesis by Stimulating Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Tumor Endothelia and by Promoting Pericyte Recruitment. *The American*

Journal of Pathology. 1. April 2003;162(4):1083–93.

180. Salha S, Gehmert S, Brébant V, Anker A, Loibl M, Prantl L, u. a. PDGF regulated migration of mesenchymal stem cells towards malignancy acts via the PI3K signaling pathway. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;70(4):543–51.

181. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* Dezember 2001;25(4):402–8.

182. Schreml S, Babilas P, Fruth S, Orsó E, Schmitz G, Mueller MB, u. a. Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy.* 2009;11(7):947–57.

183. Kurian TK, Banik S, Gopal D, Chakrabarti S, Mazumder N. Elucidating Methods for Isolation and Quantification of Exosomes: A Review. *Mol Biotechnol.* 2021;63(4):249–66.

184. Gardiner C, Vizio DD, Sahoo S, Théry C, Witwer KW, Wauben M, u. a. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles.* 31. Oktober 2016;5:10.3402/jev.v5.32945.

185. Shelke GV, Lässer C, Gho YS, Lötvall J. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles.* 30. September 2014;3:10.3402/jev.v3.24783.

186. Kim JY, Rhim WK, Seo HJ, Lee JY, Park CG, Han DK. Comparative Analysis of MSC-Derived Exosomes Depending on Cell Culture Media for Regenerative Bioactivity. *Tissue Eng Regen Med.* Juni 2021;18(3):355–67.

187. Kornilov R, Puhka M, Mannerström B, Hiidenmaa H, Peltoniemi H, Siljander P, u. a. Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles.* 21. Januar 2018;7(1):1422674.

188. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NRD, Huang P. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid Redox Signal.* August 2008;10(8):1343–74.

189. Eitan E, Zhang S, Witwer KW, Mattson MP. Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *J Extracell Vesicles.* 26. März 2015;4:10.3402/jev.v4.26373.

190. Tsai YC, Cheng TS, Liao HJ, Chuang MH, Chen HT, Chen CH, u. a. Mesenchymal Stem Cell Secreted-Extracellular Vesicles are Involved in Chondrocyte Production and Reduce Adipogenesis during Stem Cell Differentiation. *Tissue Eng Regen Med.* 8. November 2022;19(6):1295–310.

191. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel A, Eldh M, Dinzani I, u. a. Distinct RNA



- profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles*. 12. September 2013;2:10.3402/jev.v2i0.20677.
192. Stam J, Bartel S, Bischoff R, Wolters JC. Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods. *Journal of Chromatography B*. 15. April 2021;1169:122604.
193. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Théry C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles*. 1. Januar 2012;1(1):18397.
194. Vergauwen G, Dhondt B, Van Deun J, De Smedt E, Berx G, Timmerman E, u. a. Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research. *Sci Rep*. 2. Juni 2017;7(1):2704.
195. Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *Int J Mol Sci*. 4. September 2020;21(18):6466.
196. Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, DiStefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int*. November 2012;82(9):1024–32.
197. Kowal EJK, Ter-Ovanesyan D, Regev A, Church GM. Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting. *Methods Mol Biol*. 2017;1660:143–52.
198. Oksvold MP, Neurauter A, Pedersen KW. Magnetic bead-based isolation of exosomes. *Methods Mol Biol*. 2015;1218:465–81.
199. Németh A, Orgovan N, Sódar BW, Osteikoetxea X, Pálóczi K, Szabó-Taylor KÉ, u. a. Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA. *Sci Rep*. 15. August 2017;7(1):8202.
200. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*. 7. Januar 2014;12:8.
201. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvald J, u. a. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013;2.
202. Rowan BG, Gimble JM, Sheng M, Anbalagan M, Jones RK, Frazier TP, u. a. Human adipose tissue-derived stromal/stem cells promote migration and early metastasis of triple negative breast cancer xenografts. *PLoS One*. 2014;9(2):e89595.
203. Zimmerlin L, Park TS, Zambidis ET, Donnenberg VS, Donnenberg AD. Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. *Biochimie*. Dezember

2013;95(12):2235–45.

204. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, u. a. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 4. Oktober 2007;449(7162):557–63.

205. Rezaie Z, Ardeshirylajimi A, Ashkezari MD, Seifati SM. Antitumoral potential of microvesicles extracted from human adipose-derived mesenchymal stem cells on human breast cancer cells. *J Cancer Res Ther*. September 2019;15(5):1114–9.

206. Takahara K, Inamoto T, Ibuki N, Uchimoto T, Saito K, Takai T, u. a. 245 MicroRNA-145 mediates the inhibitory effect of adipose-derived stem cells on androgen-independent prostate cancer. *European Urology Supplements*. 1. März 2016;15(3):e245.

207. Lin R, Wang S, Zhao RC. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Mol Cell Biochem*. November 2013;383(1–2):13–20.

208. Wang S, Su X, Xu M, Xiao X, Li X, Li H, u. a. Exosomes secreted by mesenchymal stromal/stem cell-derived adipocytes promote breast cancer cell growth via activation of Hippo signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*. 11. April 2019;10:117.

209. Cekanova M, Fernando RI, Siriwardhana N, Sukhthankar M, Parra C de la, Woraratphoka J, u. a. BCL-2 family protein, BAD is down-regulated in breast cancer and inhibits cell invasion. *Exp Cell Res*. 1. Februar 2015;331(1):1–10.

210. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. November 2013;13(9):963–72.

211. Mohd Ali N, Yeap SK, Ho WY, Boo L, Ky H, Satharasinghe DA, u. a. Adipose MSCs Suppress MCF7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Metastasis and EMT Pathways Leading to Dormancy via Exosomal-miRNAs Following Co-Culture Interaction. *Pharmaceuticals (Basel)*. 24. Dezember 2020;14(1).

212. Wang X, Qian T, Bao S, Zhao H, Chen H, Xing Z, u. a. Circulating exosomal miR-363-5p inhibits lymph node metastasis by downregulating PDGFB and serves as a potential noninvasive biomarker for breast cancer. *Mol Oncol*. September 2021;15(9):2466–79.

213. Wu Q, JIN C xin, CHEN H, LI X yong, LI Y jun. Interaction of adipose-derived mesenchymal stem cells with MCF-7 cells in vitro: A study emphasizing signaling molecule expression and transcriptional changes. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*. 1. Januar 2017;41:785–95.

214. Huun J, Lønning PE, Knappskog S. Effects of concomitant inactivation of p53 and pRb on response to doxorubicin treatment in breast cancer cell lines. *Cell Death Discov*. 22. Mai

2017;3(1):1–6.

215. Wang H, Yan C. A small-molecule p53 activator induces apoptosis through inhibiting MDMX expression in breast cancer cells. *Neoplasia*. Juli 2011;13(7):611–9.

216. Manning AL, Benes C, Dyson NJ. Whole chromosome instability resulting from the synergistic effects of pRB and p53 inactivation. *Oncogene*. 8. Mai 2014;33(19):2487–94.

217. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. August 2002;2(2):103–12.

218. Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, Khan S, Murphy JM, Curran C, u. a. Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res Treat*. November 2010;124(2):317–26.

219. Huang L, Ma W, Ma Y, Feng D, Chen H, Cai B. Exosomes in Mesenchymal Stem Cells, a New Therapeutic Strategy for Cardiovascular Diseases? *Int J Biol Sci*. 12. Januar 2015;11(2):238–45.

220. Lee JK, Park SR, Jung BK, Jeon YK, Lee YS, Kim MK, u. a. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(12):e84256.

221. Zhu W, Huang L, Li Y, Zhang X, Gu J, Yan Y, u. a. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer Lett*. 1. Februar 2012;315(1):28–37.

222. Ferguson SW, Wang J, Lee CJ, Liu M, Neelamegham S, Canty JM, u. a. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. *Sci Rep*. 23. Januar 2018;8(1):1419.

223. Kim WU, Kang SS, Yoo SA, Hong KH, Bae DG, Lee MS, u. a. Interaction of vascular endothelial growth factor 165 with neuropilin-1 protects rheumatoid synoviocytes from apoptotic death by regulating Bcl-2 expression and Bax translocation. *J Immunol*. 15. Oktober 2006;177(8):5727–35.

224. Wu R, Gandhi S, Tokumaru Y, Asaoka M, Oshi M, Yan L, u. a. Intratumoral PDGFB gene predominantly expressed in endothelial cells is associated with angiogenesis and lymphangiogenesis, but not with metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. August 2022;195(1):17–31.

225. Gehmert S, Gehmert S, Prantl L, Vykoukal J, Alt E, Song YH. Breast cancer cells attract the migration of adipose tissue-derived stem cells via the PDGF-BB/PDGFR- $\beta$  signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Juli 2010;398(3):601–5.

226. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, u. a. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 1. Juni 2001;15(11):1311–33.
227. Raica M, Cimpean AM. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 11. März 2010;3(3):572–99.
228. De Marchis F, Ribatti D, Giampietri C, Lentini A, Faraone D, Scoccianti M, u. a. Platelet-derived growth factor inhibits basic fibroblast growth factor angiogenic properties in vitro and in vivo through its alpha receptor. *Blood*. 15. März 2002;99(6):2045–53.
229. Dirks RP, Bloemers HP. Signals controlling the expression of PDGF. *Mol Biol Rep.* 1996 1995;22(1):1–24.
230. Boulland JL, Halasi G, Kasumacic N, Glover JC. Xenotransplantation of human stem cells into the chicken embryo. *J Vis Exp.* 11. Juli 2010;(41):2071.
231. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec.* 1. Dezember 2001;264(4):317–24.
232. Comşa Ş, Ceauşu AR, Popescu R, SÂrb S, Cîmpean AM, Raica M. The MSC-MCF-7 Duet Playing Tumor Vasculogenesis and Angiogenesis onto the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane. *In Vivo*. Dezember 2020;34(6):3315–25.
233. Pallua N, Pulsfort AK, Suschek C, Wolter TP. Content of the growth factors bFGF, IGF-1, VEGF, and PDGF-BB in freshly harvested lipoaspirate after centrifugation and incubation. *Plast Reconstr Surg.* März 2009;123(3):826–33.
234. Ejaz A, Yang KS, Venkatesh KP, Chinnapaka S, Kokai LE, Rubin JP. The Impact of Human Lipoaspirate and Adipose Tissue-Derived Stem Cells Contact Culture on Breast Cancer Cells: Implications in Breast Reconstruction. *Int J Mol Sci.* 1. Dezember 2020;21(23).
235. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R. Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years. *Aesthet Surg J.* 2009;29(5):360–76.
236. Jin X, Huang Y, Yoo HK, Lee SY, Chun YS, Hong KY, u. a. Oncologic Safety and Efficacy of Cell-Assisted Lipotransfer for Breast Reconstruction in a Murine Model of Residual Breast Cancer. *Aesthetic Plast Surg.* Februar 2023;47(1):412–22.

## 10 Materialienverzeichnis

### 10.1 Einwegmaterialien

Advanced TC™ Multi Platten (6-, 24-, 96-)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Centricon Plus-70 Zentrifugen- Filtereinheiten	Merck Millipore, Darmstadt
Gefrierlagerröhrchen Cryo.s	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroreaktionsgefäß SafeSeal (1,5 ml)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran Amersham Protran 0.2 NC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Parafilm	VWR International GmbH, Darmstadt
PCRmax ECO 48 Real-Time qPCR PCR Plate	Cole-Parmer, Vernon Hills, USA
Pipettenspitzen, gestopft	Biosphere plus, SARSTEDT, Nümbrecht
Serologische Pipettenspitzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritzenfilter (0,2 µm)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (T75, T175)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen Cellstar (100 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht

### 10.2 Chemikalien

Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe
α-MEM Eagle	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Collagenase von Clostridium hystolyticum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
FBS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Glutamax	Invitrogen, Carlsbad, USA
Isopropanol	Merck Millipore, Darmstadt
Odyssey Blocking Buffer	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Page Ruler Prest NIR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Resazurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Temed	Carl Roth, Karlsruhe
Tris Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach
TWEEN 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Blue S'Green qPCR Kit Separate ROX  
Master Mix

Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf

### 10.3 Zelllinien

MCF-7

Cell Lines Service, Eppelheim

### 10.4 Primer

Bad

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

Bax

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

Bcl-2

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

GAPDH

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

PDGF-A

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

PDGF-B

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

RB1

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

TP53

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

VEGFA

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

### 10.5 Antikörper

Mouse Anti-Human CD63 antibody

Thermo Scientific, Waltham, USA

IRDye 680CW Goat Anti-Mouse antibody

LI-COR Biosciences, Lincoln, USA

### 10.6 Kits

Exosome Isolation Kit Pan, human

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

LDH Assay Kit

Abcam, Cambridge, UK

QuantiTect Reverse Transcription Kit

Qiagen, Hilden

RNeasy Mini Kit

Qiagen, Hilden

### 10.7 Geräte

Brutschrank (HERA cell 240)

Thermo Scientific, Waltham, USA

ECO Real-Time PCR Gerät

Illumina, San Diego, USA

Einfrierbehälter

NALGENE, New York, USA

Inkubationsbox

LI-COR Biosciences, Lincoln, USA

Lichtmikroskop

hund WETZLAR, Wetzlar

MACS MultiStand

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Mini Protean tetra System

Bio Rad, Hercules, USA

Neubauer Zählkammer

Marienfeld, Lauda-Königshofen

Odyssey Imaging System  
Pipetten (2 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)  
Plattenphotometer Varioskan Flash  
Schüttelgerät  
Sicherheitswerkbank  
Spektralphotometer Nano Drop 2000c  
Vortexer (Combi-SPIN FVL-2400)  
Wasserbad  
Zentrifuge (Rotina 380R)  
µMACS Separator

LI-COR Biosciences, Lincoln, USA  
eppendorf Reference, Wesseling-Berzdorf  
Thermo Scientific, Waltham, USA  
Edmund Bühler GmbH, Hechingen  
Schulz Lufttechnik GmbH, Sprockhövel  
Thermo Scientific, Waltham, USA  
Kisker, Steinfurt  
memmert, Schwabach  
Hettich Zentrifugen, Tuttlingen  
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

## 10.8 Software

Excel  
GIMP

Microsoft Office  
Das GIMP-Team

## 11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der AFT und die verschiedenen Phasen des zentrifugierten Lipoaspirats mit der Zusammensetzung der SVF (Shukla <i>et al.</i> (31), CC BY) .....	8
Abbildung 2: Die unterschiedliche Biogenese der verschiedenen EV (Raposo und Stoorvogel (88), CC BY-NC-SA) .....	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs der Apoptose in vereinfachter Form (eigene Darstellung in Anlehnung an Plati <i>et al.</i> (151)).....	17
Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahmen der adipogenen Stammzellen (a) und MCF-7 Zellen (b).....	35
Abbildung 5: Western Blot zum Nachweis von Exosomen nach erfolgter Isolierung. Standardproteinleiter links (rot), Exosomenbande zwischen 55 und 34 kDa rechts (grün). ...	36
Abbildung 6: Vitalitätstest auf Grundlage von Resazurin. Zellvitalität der MCF-7 Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Als Probe wurden ADSC-KM und Exosomenmedium in der Konzentration von 30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. ....	37
Abbildung 7: Vitalitätstest auf Grundlage von Resazurin. Zellvitalität der MCF-7 Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Als Probe wurde Exosomenmedium in den Konzentrationen von 10, 20 und 30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. ....	38
Abbildung 8: Zytotoxizitätstest auf Grundlage der freigesetzten Laktatdehydrogenase. Optische Dichte der MCF-7 Zellen nach 24 Stunden. Als Probe wurden ADSC-KM und Exosomenmedium in der Konzentration von 10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , 20 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , 30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ und 35 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen mit einem p-Wert unter 0,05 im Bezug zur Kontrolle. ....	39
Abbildung 9: Relative Genexpression der Gene <i>Bad</i> (a), <i>Bax</i> (b) und <i>Bcl-2</i> (c) nach 24 Stunden. Verwendet wurden ADSC-KM und 30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Exosomenmedium. Gezeigt sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen mit einem p-Wert unter 0,05 im Bezug zur Kontrolle. ....	40
Abbildung 10: Relative Genexpression der Gene <i>TP53</i> (a) und <i>RBI</i> (b) nach 24 Stunden. Verwendet wurden ADSC-KM und 30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Exosomenmedium. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. ....	41
Abbildung 11: Relative Genexpression der Gene <i>VEGFA</i> (a), <i>PDGFA</i> (b) und <i>PDGFB</i> (c) nach 24 Stunden. Verwendet wurden ADSC-KM und 30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Exosomenmedium. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....	42



## **12 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Sequenzen und Annealingtemperaturen der verwendeten PCR-Primer ..... 33

## 13 Danksagung

In diesem letzten Kapitel möchte ich allen nachstehenden Personen danken, die an der Fertigstellung dieser Arbeit mitverantwortlich sind.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Prantl für die freundliche Überlassung des Themas. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Möglichkeit der Arbeit in den Laboren und die Finanzierung der Verbrauchsmaterialien.

Bei Herrn Prof. Dr. Stephan Schreml bedanke ich mich für die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Oliver Felthaus bedanken. In dem studiuminternen Wahlfach plastische Chirurgie, bin ich durch seine Tätigkeit auf eine experimentelle Arbeit in der Arbeitsgruppe aufmerksam geworden. Durch seine Betreuung und dem stetigen wissenschaftlichen Austausch stand er mir zu jeder Zeit mit Rat zur Verfügung. Seine Ideen und seine Kreativität hatten großen Einfluss auf die Promotionsarbeit. Des Weiteren möchte ich mich für die anspruchsvolle Korrekturarbeit bei ihm bedanken.

Für die Einarbeitung und Unterstützung während der Arbeit im Labor sowie die immer freundliche Atmosphäre bedanke ich mich herzlich bei Frau Bernadette Fürnstein und Frau Yana Urban.

Mein Dank gilt allen weiteren Mitarbeitern der Klinik für Plastische-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Regensburg. Darunter insbesondere Ruben Reinhard und Andreas Eigenberger für den intellektuellen Austausch und der sonstigen Unterstützung des Projekts.

Zuletzt möchte ich mich für die ständige und liebevolle Unterstützung ganz besonders bei meiner Familie und all meinen Freunden bedanken.

## **14 Eigenständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Koblenz, den 07.06.2024

Simon Vedlin