

AUS DER ABTEILUNG FÜR
PLASTISCHE, HAND- UND WIEDERHERSTELLUNGSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. LUKAS PRANTL
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Der Einfluss des PI3-Kinase-Inhibitors Buparlisib auf den PI3-Kinase-Akt-mTOR-
Signalweg bei der Multiplen Symmetrischen Lipomatose**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Schreiner

2025

AUS DER ABTEILUNG FÜR
PLASTISCHE, HAND- UND WIEDERHERSTELLUNGSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. LUKAS PRANTL
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss des PI3-Kinase-Inhibitors Buparlisib auf den PI3-Kinase-Akt-mTOR-
Signalweg bei der Multiplen Symmetrischen Lipomatose**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Schreiner

2025

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Lukas Prantl

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stephan Schreml

Tag der mündlichen Prüfung:

06. August 2025

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. Multiple Symmetrische Lipomatose.....	6
1.2. Stammzellen.....	11
1.3. Fettgewebe als Quelle mesenchymaler Stammzellen.....	14
1.4. Fettgewebe.....	17
1.5. Beiges Fettgewebe.....	20
1.6. Apoptose.....	22
1.7. PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg.....	26
1.8. Buparlisib.....	30
2. Zielsetzung.....	31
3. Material und Methoden.....	32
3.1. Isolierung von adipogenen Stammzellen aus humanem Fettgewebe.....	32
3.2. Zellkultivierung und Passagieren.....	33
3.3. Kryokonservierung von Stammzellen.....	34
3.4. Vitalitätstests mit Resazurin.....	35
3.5. Adipogene Differenzierung.....	36
3.6. Oil Red-Färbung und Quantifizierung.....	36
3.7. RNA-Isolierung.....	38
3.8. Reverse Transkription	39
3.9. Polymerasekettenreaktion.....	40
3.10. Proteinisolierung.....	44
3.11. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	46
3.12. Western Blot	48
4. Ergebnisse	51
4.1. Vitalitätstests mit Resazurin	51
4.2. Adipogene Differenzierung.....	57
4.3. Polymerasekettenreaktion	63
4.3.1. Apoptosemarker	63
4.3.1.1. Proapoptotisch wirksame Gene.....	63
4.3.1.2. Antiapoptotisch wirksame Gene.....	65
4.3.2. PI3-Kinase-Akt.mTOR-Signalweg	66

4.3.2.1.PI3KR1	66
4.3.2.2.PIK3CA	71
4.3.2.3.PTEN.....	76
4.3.2.4.AKT1	78
4.3.2.5.MTOR	83
4.3.2.6.RPS6KB1	88
4.3.2.7.EIF4EBP1	91
4.4. Western Blot.....	96
4.4.1. PIK3CA.....	96
4.4.2. RPS6K1.....	98
4.4.3. p-RPS6K1.....	101
5. Diskussion.....	104
5.1. Multiple Symmetrische Lipomatose als hyperproliferative Erkrankung adipogener Stammzellen.....	104
5.2. Buparlisib führt zur signifikanten Reduktion von Zellproliferation und Adipogenese bei ASCs aus betroffenem Gewebe.....	106
5.3. Bei der Multiplen Symmetrischen Lipomatose kommt es zur autonomen Induktion des PI3-Akt-mTOR-Signalwegs auf Ebene adipogener Stammzellen.....	108
5.4. Bei ASCs aus lipomatösem Gewebe besteht eine PI3-Kinase-induzierte Dysregulation der Apoptose.....	116
5.5. Durch Buparlisib kommt es bei ASCs aus betroffenem Gewebe zu einer p53-abhängigen Apoptoseinduktion.....	118
6. Zusammenfassung.....	120
7. Fazit.....	123
8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	124
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	124
8.2 Tabellenverzeichnis	128
9. Literaturverzeichnis	129
10. Materialverzeichnis.....	145
10.1 Verbrauchsmaterial	145
10.1.1 Einwegmaterialien.....	145
10.1.2 Chemikalien.....	146
10.1.3 Kits.....	148
10.1.4 Antikörper.....	148

10.2. Geräte.....	148
11. Abkürzungsverzeichnis.....	150
11.1. Materialien.....	150
11.2. Einheiten.....	150
11.3. Institutionen.....	151
11.4. Fachbegriffe.....	151
12. Danksagung.....	157
13. Lebenslauf.....	158
14. Erklärung.....	160

1. Einleitung

1.1. Multiple Symmetrische Lipomatose

Die Multiple Symmetrische Lipomatose (MSL) ist eine Fettverteilungsstörung unbekannter Ätiologie, die durch das disproportionale Wachstum lipomatösen Gewebes im subkutanen Fettgewebe charakterisiert ist. Erstmals wurde die Lipomatose 1846 von Sir Benjamin Brodie beschrieben (3). 1888 berichtete Madelung in einer ersten Fallserie mit 33 Patienten über eine symmetrische submentale Fettansammlung, die seitdem als „Madelung'scher Fetthals“ bezeichnet wird (4, 5). Die Charakterisierung der Erkrankung erfolgte 1898 durch Launois und Bensaude, die die MSL als symmetrische Adenolipomatose bezeichneten (6). Die MSL wird daher auch als Morbus Madelung, Launois-Bensaude-Syndrom oder Benigne Symmetrische Lipomatose bezeichnet (1, 5).

Die bekannteste Einteilung der MSL geht auf Donhauser *et al.* zurück, der anhand der Lokalisation des lipomatösen Gewebes zwischen vier Phänotypen unterscheidet (8). Typ 1 zeichnet sich durch Fettgewebsansammlungen im Hals- bzw. Nackenbereich (Madelung'scher Fetthals, Stiernacken, *horse collar lipoma*), dem oberen Rücken, dem Schultergürtel und den Oberarmen aus. Typ 2 besitzt ein pseudoathletisches Erscheinungsbild durch Wucherungen im Bereich des Schultergürtels, der Deltoidregion, der Oberarme und des Thorax. Der gynäkoide Typ (Typ 3) weist Lipome an den Oberschenkeln und der medialen Seite des Knies auf. Typ 4 besitzt Ansammlungen des lipomatösen Gewebes im abdominellen Bereich. Das Erscheinungsbild betroffener Frauen lässt sich meist jedoch keinem der oben genannten Phänotypen zuordnen. Durch die diffuse Verteilung der Lipomatose im Bereich des subkutanen Fettgewebes entsteht bei Frauen häufig der Eindruck einer gewöhnlichen Fettleibigkeit (9). Da sich bei der Untersuchung einer Patientenkohorte an der hiesigen Fakultät mehr als 50 % der Patienten keinem klassischen Phänotyp zuteilen ließ, hat diese Arbeitsgruppe anhand der Konstellation der betroffenen Körperareale der Patienten eine neue Einteilung entwickelt. Die neue Klassifikation unterscheidet zwischen drei verschiedenen Hauptgruppen. Bei dem Typ I befindet sich die Fettverteilungsstörung im Bereich des Oberkörpers, bei dem Typ II hingegen im Bereich des Unterkörpers. Bei der Typ III-Lipomatose zeigt sich ein generalisierter Befall des gesamten Körpers, wobei die Areale des Kopfes, sowie der Unterarme und Unterschenkel ausgespart bleiben. Die Klasse I kann durch ihr variables Erscheinungsbild wiederum in drei weitere Subtypen unterteilt werden. Der Typ Ia zeichnet sich durch Fettgewebsansammlungen am Hals bzw. Nacken aus. Bei dem Typ Ib sind zusätzlich der Schultergürtel und die Oberarme

betroffen. Finden sich die Fettgewebsansammlungen sowohl in der Schulter-Nacken-Region, als auch im abdominellen Bereich, handelt es sich um eine Typ Ic-Lipomatose. Im Gegensatz zu älteren Klassifikationen wird in der neuen Einteilung ein kombinierter Befall des Halses mit dem abdominellen Bereich (Typ Ic) sowie ein ganzheitlicher Befall des Körpers (Typ III) berücksichtigt, was eine flächendeckendere Klassifikation der MSL ermöglicht (2).

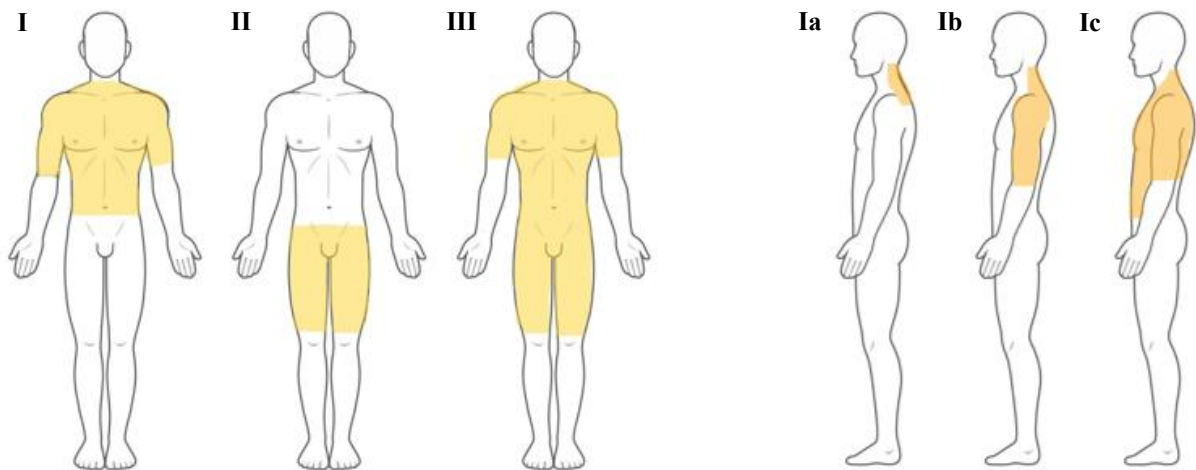


Abbildung 1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Phänotypen der neuen MSL-Klassifikation. Gelb: betroffene Areale der Hauptgruppen I-III, orange: betroffene Areale der Klasse-I-Subtypen. (eigene Darstellung in Anlehnung an Schiltz et al., 2018)



Abbildung 2: Patient mit einer Typ Ia-MSL (neue Klassifikation). (Schiltz et al., 2018)

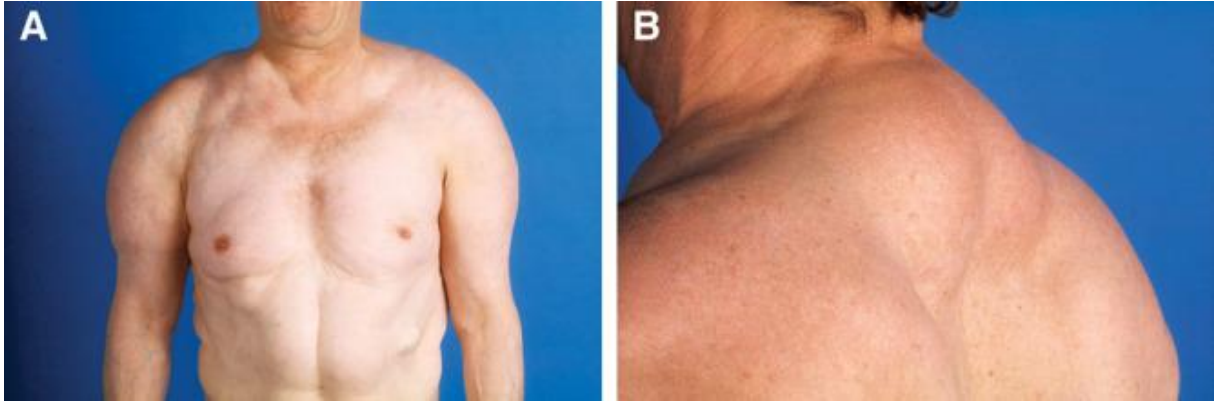


Abbildung 3: A und B: Patient mit einer Typ Ib-MSL (neue Klassifikation). (Schiltz et al., 2018)

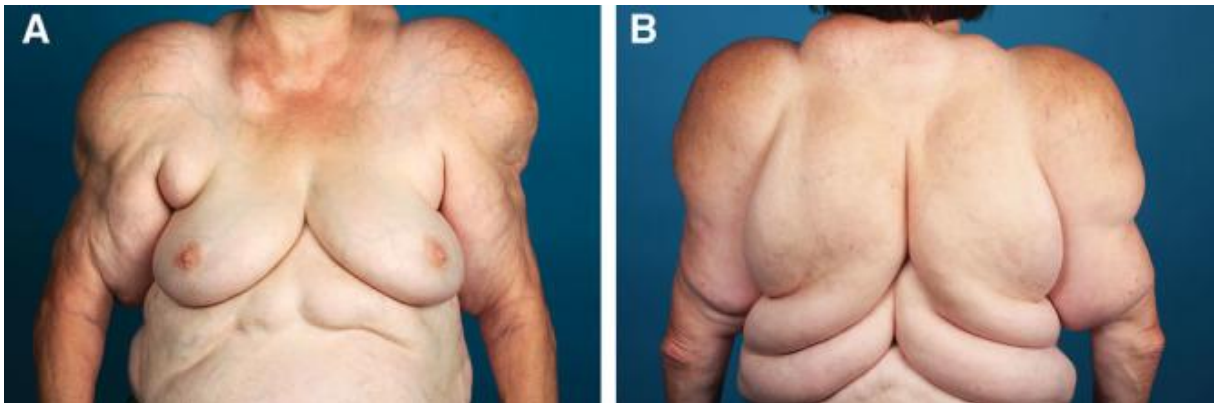


Abbildung 4: A und B: Patient mit einer Typ Ic-MSL (neue Klassifikation). (Schiltz et al., 2018)



Abbildung 5: Patient mit einer Typ II-MSL (neue Klassifikation). (Schiltz et al., 2018)

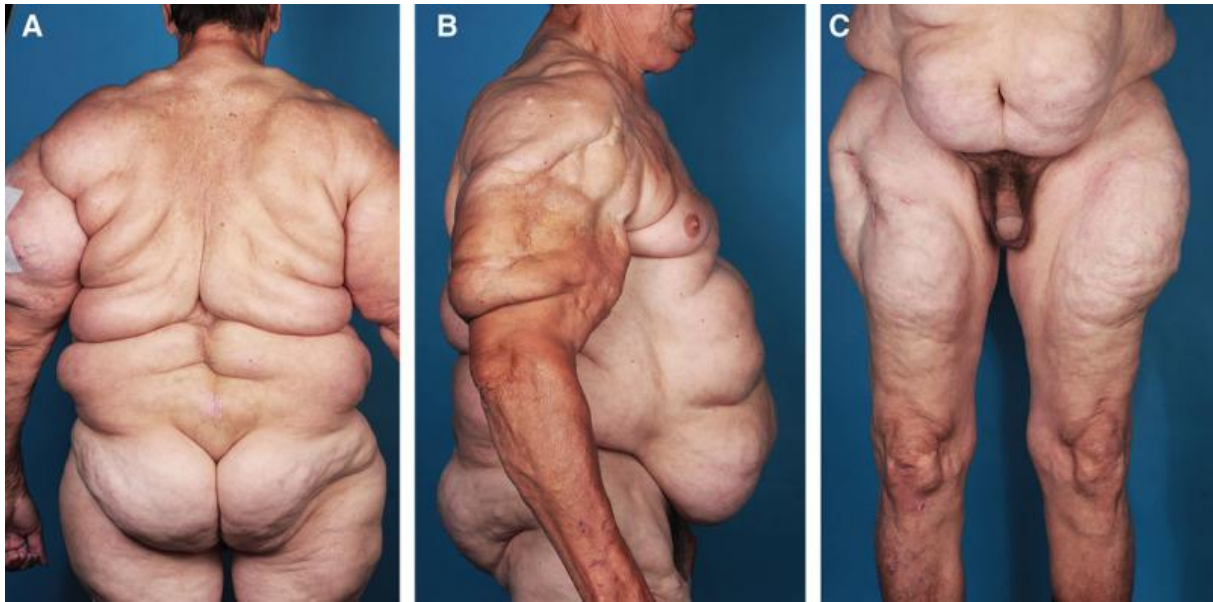


Abbildung 6: Patient mit einer Typ III-MSL (neue Klassifikation). (Schiltz et al., 2018)

Die Prävalenz der MSL wird in der Literatur mit 1:25.000 angegeben (10). Allerdings muss von einem deutlich höheren Auftreten der Erkrankung ausgegangen werden, da viele Fälle unerkannt bleiben. Bisher wurde das Auftreten der MSL vor allem bei Männern aus dem mediterranen Raum zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr bei einer Männer-Frauen-Ratio von 15:1 bis 30:1 beschrieben (11, 12). In der oben genannten Patientenkohorte zeigte sich jedoch ein gegenteiliges Bild, bei dem Frauen um das 2,5-Fache häufiger betroffen waren als Männer (2). Die Diagnose der MSL wird anhand des klinischen Erscheinungsbildes und der Anamnese gestellt (2). Das Wachstum des lipomatösen Gewebes ereignet sich hierbei unabhängig von einer generellen Körperfett- bzw. Gewichtszunahme und zeigt sich gegenüber einer konservativen Therapie, wie einer Diät, resistent (2). Die MSL lässt sich von echten Lipomen durch ihr symmetrisches Auftreten abgrenzen. Außerdem infiltriert das lipomatöse Gewebe das umliegende Fettgewebe und besitzt keine Kapsel. Eine maligne Entartung wurde nur in Einzelfällen beschrieben (13). Durch die diffuse Verteilung der Lipomatose Typ II im Bereich der Oberschenkel ist eine Differenzierung von einem Lipödem oft schwierig. Im Gegensatz zu der MSL sind die Bereiche der Hüfte und des Gesäßes bei einem Lipödem nicht betroffen, sodass dies als Unterscheidungskriterium herangezogen werden kann (2).

Die durchschnittliche Zellgröße des lipomatösen Gewebes ist deutlich kleiner als die des subkutanen Fettgewebes, was auf ein hyperplastisches (durch vermehrte Zellteilung bedingtes) Wachstum des lipomatösen Gewebes hindeutet (14). Schmerzen werden durch die Lipomatose an sich nicht hervorgerufen. Aufgrund des expansiven Wachstums des lipomatösen Gewebes können Kompressionserscheinungen im Tracheal-, Laryngeal- oder Mediastinalbereich

auftreten, die zu Schluckbeschwerden, Sprachstörungen, Dyspnoe oder Schlafapnoe bis hin zum plötzlichen Herztod führen können (15–17). Daher wird die Bezeichnung der Benigen Symmetrischen Lipomatose heute weitestgehend abgelehnt (18). Der derzeitige Goldstandard zur Behandlung der MSL besteht in der operativen Resektion mittels Liposuktion bzw. Lipektomie (19). Da jede Operation ein gewisses Risiko mit sich bringt, ist eine zukünftige medikamentöse Therapie anzustreben.

Häufig findet sich bei MSL eine Assoziation zu metabolischen Störungen, wie Diabetes mellitus, Hyperinsulinämie, Hyperlipoproteinämie, Leberfunktionsstörungen, Hyperurikämie, renaler tubulärer Azidose sowie Neuro- und Myopathien (11, 20–23). Der Einfluss von Alkohol auf die Entstehung der MSL wird kontrovers diskutiert. Möglicherweise stellt ein moderater bis übermäßiger Alkoholkonsum einen Triggerfaktor bei der Entstehung der Lipomatose dar (2, 18, 19). Eine genetische Prädisposition im Sinne einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung ist durch ein vereinzelt, familiär gehäuftes Auftreten der MSL ebenso denkbar (24). Die genaue Krankheitsursache ist bis heute jedoch unbekannt. Es wird derzeit kontrovers diskutiert, ob die Lipomatose aus dem beigen oder braunen Fettgewebe hervorgeht. Einerseits befindet sich die MSL an Stellen, die für das Vorkommen von braunem Fettgewebe bei Erwachsenen charakteristisch sind (25–27). Andererseits exprimieren die Zellen aus betroffenem Gewebe charakteristische Zellmarker für das beige Fettgewebe (28). Eine Entkopplung der β_3 -adrenergen Stimulation von der Fettsäureoxidation im Rahmen der zitterfreien Thermogenese könnte als weiterer Erklärungsansatz für die gesteigerte Akkumulation von Triglyceriden in den Zellen dienen (29, 30). Die Hypothese dieser Arbeitsgruppe besteht in der Annahme, dass die ursprüngliche Mutation auf Ebene adipogener Vorläuferzellen zu finden ist, wodurch diese eine aberrante Differenzierung und Proliferation durchlaufen (28).

In Vorversuchen dieser Arbeitsgruppe wurden adipogene Vorläuferzellen von MSL-Patienten mittels Reverse-Phase-Protein-Array bezüglich ihrer Proteinexpression untersucht und mit adipogenen Vorläuferzellen aus unbetroffenem Fettgewebe verglichen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass vermehrt Enzyme entlang des Phosphoinositid-3-Kinase(PI3-Kinase)-Akt-*mammalian target of rapamycin (mTOR)*-Signalwegs, welcher an der Regulation von Adipogenese, Zellproliferation, und Zellzyklus beteiligt ist (31, 32), unterschiedlich reguliert sind. Dabei konnte eine Regulation von *Insulin-like growth factor (IGF)*, PI3-Kinase (PI3K) und der Proteinkinase B (syn. Akt) festgestellt werden (33). Weiterführende Studien zeigten eine unterschiedliche, teils gegenläufige Genexpression von mTOR und dessen Downstream-Substraten Ribosomaler Protein S6-Kinase (RPS6-Kinase) und *4E-binding*

protein 1 (4E-BP1) zwischen Zellen aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nach Zugabe von Rapamycin, einem selektiven mTOR-Inhibitor (33). Dies legt nahe, dass die veränderte Regulation des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs einen Einfluss auf die Entstehung der Multiplen Symmetrischen Lipomatose hat. Außerdem wurde *phosphatase and tensin homolog (PTEN)* mit der Pathogenese der Erkrankung in Verbindung gebracht. PTEN ist über die Inhibition der PI3-Kinase an der normalen Adipozytenaktivität brauner Fettzellen beteiligt (34). PTEN-Knockout-Mäuse besitzen eine Fettgewebsverteilungsstörung mit Stiernacken-artigem Erscheinungsbild bei signifikant erhöhter Körperfettmasse. Zudem zeigt isoliertes Fettgewebe von PTEN-Knockout-Mäusen identische histologische Merkmale zu isolierten MSL-Adipozyten (35). Um die Rolle des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs bei der Entstehung der MSL zu evaluieren und weitere Erkenntnisse über die Pathogenese der Lipomatose zu gewinnen, sollen in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen des PI3K-Inhibitors Buparlisib auf humane adipogene Stammzellen von MSL-Patienten untersucht werden.

1.2. Stammzellen

Stammzellen sind Zellen, die die Fähigkeit der Selbsterneuerung besitzen und sich in verschiedene funktionale Zelltypen oder Gewebsarten differenzieren können (36). Selbsterneuerung bedeutet, dass nach einer mitotischen Teilung mindestens eine der beiden entstandenen Tochterzellen dieselben Eigenschaften besitzt wie die Ausgangszelle. Bei der symmetrischen Teilung entstehen zwei klonale Replikate der Mutterzelle. Bei der asymmetrischen Teilung entwickelt sich neben einer Tochterzelle mit Stammzellcharakter eine mehr oder weniger differenzierte Progenitorzelle (Vorläuferzelle) (36–41). Ob und auf welche Weise sich eine Stammzelle teilt, hängt von den Signalen ihres umgebenen Mikromilieus ab (42–45). Die sogenannte Stammzellnische stellt ein spezialisiertes Kompartiment dar, das das Teilungs- und Differenzierungsverhalten der Stammzellen über extrinsische und intrinsische Komponenten reguliert (36). Eine Polarisation durch angrenzende Supportzellen veranlasst die Stammzellen zur asymmetrischen Zellteilung und somit zur Ausdifferenzierung in spezialisierte Gewebe (43, 46, 47). Der Bestand der Stammzellen wird wiederum über die Sekretion löslicher Faktoren reguliert, die von der Stammzellnische ausgehen (45, 48–51). Nahm man früher an, dass alle Stammzellen das gleiche Regenerations- und Differenzierungspotential besitzen, konnten neuere Forschungen zeigen, dass es sich um einen heterogenen Pool aus aktiven und ruhenden Stammzellen handelt (52–54).

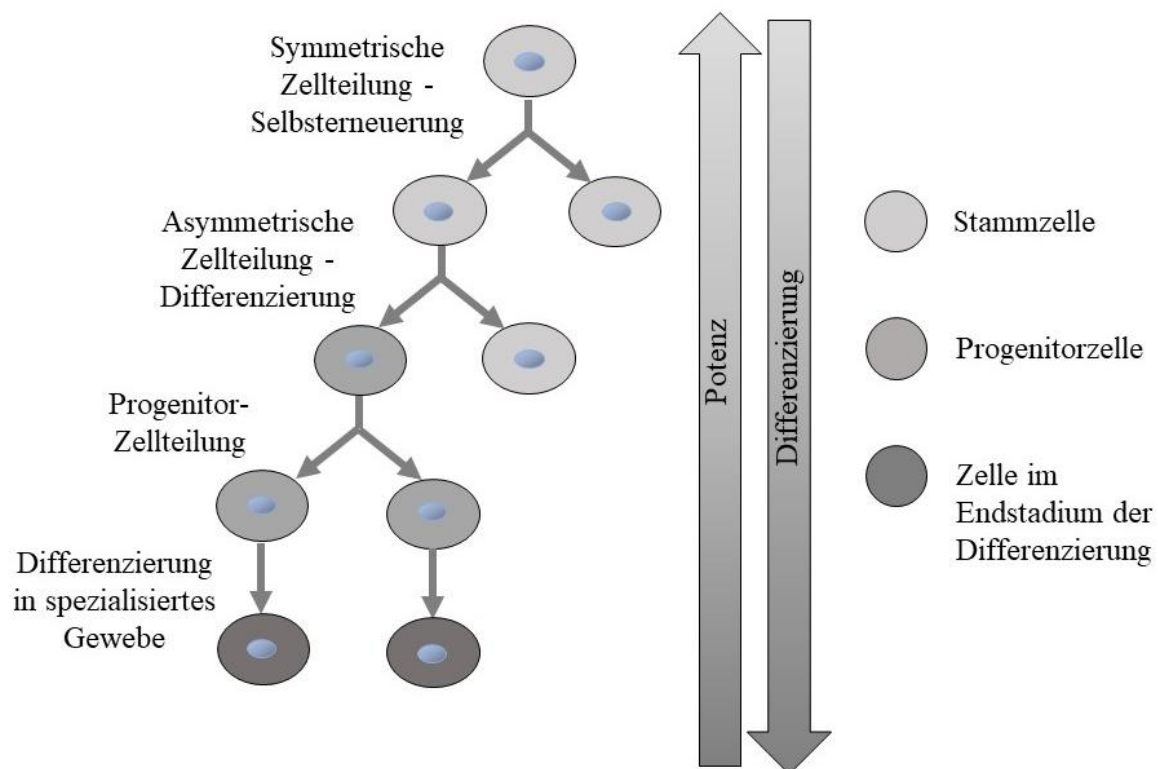


Abbildung 7: Schematische Darstellung der symmetrischen und asymmetrischen Zellteilung zur Selbsterneuerung bzw. Differenzierung von Stammzellen (eigene Darstellung in Anlehnung an https://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell, aufgerufen am 10.05.2022)

Das Differenzierungspotential einzelner Stammzellen ist je nach Art der Stammzelle mehr oder weniger determiniert (55). Stammzellen werden nach ihrem ontogenetischen Alter und dem entsprechenden Differenzierungspotential unterschieden. Totipotente Stammzellen sind Zellen, die zur Bildung eines gesamten Organismus sowie des extraembryonalen Gewebes zur Entwicklung des Fetus in der Lage sind. Dieses Potential wird der Zygote und den frühen embryonalen Blastomeren zugerechnet (56, 57). Mit der Blastulation (Entwicklung der Blastozyste aus der Morula) differenzieren sich die frühen embryonalen Zellen in die ersten zwei spezialisierten Zelllinien und verlieren ihre Totipotenz. Die äußere Schicht der Blastozyste wird aus Trophoblasten gebildet, aus denen sich das extraembryonale Gewebe entwickelt. Dazu gehören die Eihäute und der extraembryonale Teil der Plazenta, welcher den Fetus mit Sauerstoff und den lebenswichtigen Nährstoffen versorgt. Die innere Zellmasse (ICM) besteht aus pluripotenten Zellen, die den embryonalen Teil der Plazenta bilden und als Embryonalanlage dienen (56–59). Pluripotente Zellen sind in der Lage, sich in Zellen aller drei Keimblätter, Entoderm, Mesoderm und Ektoderm, zu differenzieren (56, 60). Aus dem Entoderm entwickeln sich unter anderem die Epithelien des Verdauungstraktes, aus dem

Mesoderm gehen Knochen, Muskeln, Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäße sowie die Nieren hervor und aus dem Ektoderm entstehen die Haut, das Nervensystem und die Sinnesorgane. Pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) können sich also in jegliche Gewebsarten des Fetus oder adulten Organismus differenzieren, sind aber nicht fähig, die Extraembryonalanlage zu bilden bzw. sich zu einem kompletten Organismus zu entwickeln (56). Im Jahre 1981 gelang es Martin, sowie Evans und Kaufmann erstmals, embryonale Stammzellen aus der ICM der Maus zu isolieren und diese *in vitro* zu kultivieren (61, 62). 1988 wurden die ersten ES-Zellen aus humanen, *in-vitro*-fertilisierten Embryonen gewonnen (63). ES-Zellen behalten ihr unbegrenztes Entwicklungspotential auch *in vitro* bei (61). Trotz der sich daraus ergebenden, vielseitigen therapeutischen Möglichkeiten stellt die Isolation der ES-Zellen eine ethische Kontroverse dar, da sie mit der Spaltung der Blastozyste und somit der Tötung des Embryos einhergeht (64).

Die embryonalen Stammzellen sind von den somatischen Stammzellen abzugrenzen, die sowohl aus dem fetalen, als auch aus dem adulten Organismus gewonnen werden können - daher auch als adulte Stammzellen bezeichnet - und nach der Gastrulation (Ausbildung der drei Keimblätter) entstehen (65–67). Folglich wird zwischen entodermalen, mesenchymalen und ektodermalen somatischen Stammzellen unterschieden. Nach dem heutigen Stand der Forschung scheinen somatische Stammzellen in fast allen adulten Organen nachweisbar zu sein (64). Sie wurden nach der ursprünglichen Definition als multipotent angesehen (68, 69). Multipotente Stammzellen können sich nur zu den verschiedenen Gewebsarten ihres ursprünglichen Keimblattes entwickeln, differenzieren sich aber nicht in Zellarten der anderen Keimblätter (42). In der jüngeren Forschung wird allerdings über eine Transdifferenzierung adulter Stammzellen *in vitro* und *in vivo* über die Keimblattgrenzen hinaus berichtet. Mesenchymale Stammzellen zeigen eine ungeahnte Plastizität abhängig vom umgebenen Gewebe, sodass ihnen heute ein Keimblattgrenzen-überschreitendes Differenzierungspotential zugeschrieben wird (70–79).

Mit der fortschreitenden Organogenese entstehen weitere spezialisierte Stammzellen, die sich in wenige verschiedene (oligopotent) oder in eine (unipotent) Zellart eines Gewebetyps differenzieren können (80, 81). Die Potenz der Zellen, sich in verschiedene Gewebe zu entwickeln, nimmt mit fortschreitender Ausdifferenzierung ab (56). Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich dabei um einen irreversiblen Prozess handelt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich somatische Zellen der Maus durch die Induktion der richtigen Signale in sog. induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) umprogrammieren lassen und ein gewisses Differenzierungspotential wiedererlangen. Gleiches konnte später für humane Zellen

gezeigt werden (82, 83). Die Reprogrammierung der Zellen kann durch verschiedene Mechanismen induziert werden, die diese zur Expression bestimmter „stammzellkritischer“ Transkriptionsfaktoren veranlassen. In den ersten Versuchen zu den iPS-Zellen wurden die OSKM-Faktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc als stammzellkritische Transkriptionsfaktoren identifiziert, deren Kombination zur Ausbildung eines pluripotenten Stammzellcharakters beizutragen scheint (84–87). Je nachdem, aus welchem Gewebe die ursprüngliche Zelle abstammt, wurden Abwandlungen der OSKM-Faktoren beschrieben (82, 88), jedoch ist es Gegenstand der heutigen Forschung die genauen Prozesse der Stammzelldifferenzierung und Reprogrammierung zu beleuchten.

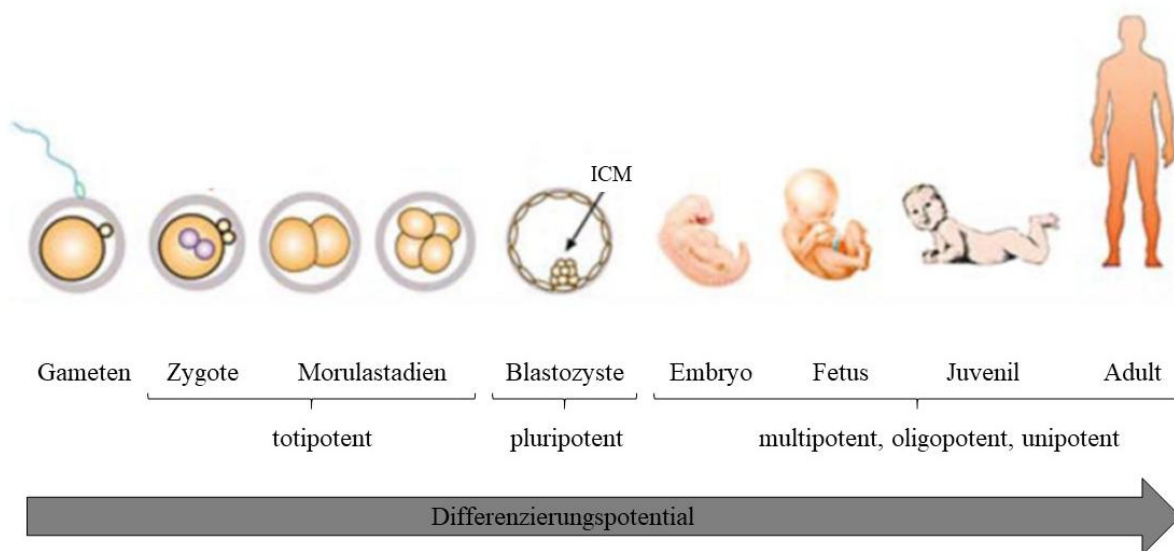


Abbildung 8: Das Differenzierungspotential von Stammzellen in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Mit fortschreitender Entwicklung verlieren die Stammzellen an Potenz (Felthaus, 2014, verändert nach Mitalipov und Wolf, 2009)

1.3. Fettgewebe als Quelle mesenchymaler Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind eine heterogene Gruppe mesodermaler Progenitorzellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in Zellen mesodermalen Ursprungs, wie Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Adipozyten und Fibroblasten, zu differenzieren, aber auch über ihre Keimblattgrenzen hinaus in Zellen ektodermalen und entodermalen Ursprungs, beispielsweise in epitheliale und neuronale Zellen (89–91). MSCs bleiben bis ins adulte Lebensalter erhalten und tragen zur Regeneration und Homöostase der Gewebe bei (92). Ihr Name geht auf die Entwicklung des embryonalen Bindegewebes, dem sog. Mesenchym, zurück, welches den Ursprung des späteren Stütz- und Bindegewebes des adulten Organismus darstellt (93). Erstmals wurden MSCs von Friedenstein *et al.* aus dem Knochenmark isoliert

(94). Mesenchymale Knochenmarksstammzellen (BM-MSCs) stellen die heute am meisten untersuchte Stammzellpopulation dar (95, 96). Diese sind abzugrenzen von den hämatopoetischen Stammzellen, die sich in alle Zellen des Blutes differenzieren können und somit den Ausgangspunkt der Hämatopoese darstellen (97). BM-MSCs besitzen hingegen keinerlei hämatopoetische Funktion. Seit der Entdeckung der BM-MSCs wurde von einer Vielzahl von MSC-Untergruppen berichtet, die vergleichbare Merkmale zu den Zellen aus dem Knochenmark zeigen. Diese wurden auch an anderen Lokalisationen, wie dem Fettgewebe, dem Nabelschnurblut, der Plazenta, dem Periost, dem Gelenkknorpel, der Skelettmuskulatur, der Leber oder Milz, dem Thymus u.a., nachgewiesen (92, 98–100). Je nach Art des ursprünglichen Gewebes unterscheiden sich die Zellen im Phänotyp, der Morphologie und der Proliferationskapazität, gleichen sich aber in ihrem Potential, sich in mesodermale Zelllinien zu differenzieren, sodass von einer gemeinsamen Ontogenese ausgegangen wird (92, 99). Um die heterogene Stammzellpopulation der MSCs besser definieren zu können, hat die *International Society for Cell and Gene Therapy (ISCT)* im Jahr 2006 drei Minimalkriterien definiert, die sich von den Zelleigenschaften *in vitro* ableiten: die Plastikadhärenz der Zellen unter Standard-Zellkulturbedingungen, ihr Differenzierungspotential in Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe sowie die Expression der Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 bei über 95 % der Zellen bzw. die fehlende Expression von CD34, CD45, CD14 oder CD11b, CD79α oder CD19 und HLA-DR bei mehr als 95 % der Zellen in Kultur (101). Jedoch ist zu berücksichtigen, dass sich die Expression von Oberflächenmarkern bzw. die Fähigkeit zur Plastikadhärenz der Zellen mit der Anzahl der Zellpassagen ändern kann (102, 103). So konnte die Expression von CD34 bei MSCs aus adipogenem Gewebe zumindest in den frühen Passagen nachgewiesen werden (102, 104). Daher wird das Heranziehen des Oberflächenmarkers CD34 für die Identifikation und Charakterisierung von MSCs mittlerweile kontrovers diskutiert.

Da das Fettgewebe eine leicht verfügbare Quelle für MSCs darstellt, ist es in den Fokus der Stammzellforschung gerückt. Die Entdeckung adipogener Stammzellen (ASCs) geht auf Zuk *et al.* zurück, der im Jahre 2001 erstmals eine Zellpopulation selbsterneuernder, Fibroblasten-ähnlicher Progenitorzellen aus humanem Fettgewebe anhand ihrer Plastikadhärenz isolierte, welche er als prozessiertes Lipoaspirat (PLA) bezeichnete. Darüber hinaus konnte diese Arbeitsgruppe die Expression von fibroblastenspezifischen, monoklonalen Antikörpern ASO2 bzw. Vimentin mittels Immunofluoreszenz und Durchflusszytometrie nachweisen, was auf eine mesenchymale Abstammung der PLA-Zellen hindeutete. Da sich die Zellen unter den richtigen Kulturbedingungen in adipogenes, chondrogenes, myogenes und osteogenes Gewebe

differenzieren ließen, erhoben Zuk *et al.* bereits im Jahr 2001 die Hypothese, dass es sich bei den PLA-Zellen um MSC-ähnliche Zellen handeln könne (105). Ein Jahr später wurden die PLA-Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker untersucht, um den Stammzellcharakter der Zellen zu belegen. Dabei ist hervorzuheben, dass die Oberflächenmarker nach damaligen Kenntnisstand ausgewählt wurden und sich teilweise von den heutigen ISCT-Kriterien unterscheiden. Analog zu den BM-MSCs konnte bei den PLA-Zellen die Expression von CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2 und SH3 nachgewiesen werden, wohingegen CD31, CD34 und CD45 von beiden Zellarten nicht exprimiert werden. Die Expression von CD73 wurde nicht evaluiert. Weiterhin sind die Zellen des PLA positiv für CD13 und negativ für CD14, CD16, CD56, CD62e und CD104. Folglich konnte ein ähnliches Oberflächenprofil der PLA-Zellen zu den BM-MSCs nachgewiesen werden. Lediglich bei zwei untersuchten Oberflächenmarkern zeigte sich ein unterschiedliches Expressionsmuster bei den Zellarten. Während PLA-Zellen CD49d positiv und CD106 negativ sind, ließ sich für BM-MSCs ein gegenteiliges Expressionsmuster nachweisen (106). Bei CD106 handelt es sich um einen Oberflächenmarker, der von den Stromazellen des Knochenmarks exprimiert wird und an der Regulation der Blutbildung beteiligt ist (107). Das Fehlen von CD106 auf den ADSCs steht im Einklang damit, dass den Fettstammzellen keine Aufgaben zukommen, die mit der Hämatopoese und deren Nische assoziiert sind. Im Rahmen der zeitgleichen Entwicklung verschiedener Forschungsfelder wurden zahlreiche Bezeichnungen für die Beschreibung adipogener Stammzellen verwendet: *adipose derived adult stem cells (ADAS)*, *adipose-derived stromal cells (ADSCs)*, *adipose mesenchymal stem cells (AdMSC)*, *preadipocyte*, *processed lipoaspirat (PLA)* u.v.m.. 2013 wurde deshalb von der *International Fat Applied Technology Society (IFATS)* der Terminus der *adipose-derived stem cells (ASCs)* für plastikadhärente, mesenchymale Fettstammzellen etabliert (108).

Weiterhin muss zwischen den ASCs und der sog. stromalen vaskulären Fraktion (SVF) unterschieden werden. Bei der Isolation von Stammzellen aus dem Fettgewebe werden initial nicht nur die ASCs gewonnen, sondern ein heterogenes Zellgemisch aus zirkulierenden Blutzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Perizyten sowie ASCs und Präadipozyten (108, 109). Nach einer gewissen Inkubationszeit exprimieren die ASCs im Gegensatz zu den restlichen Zellen der SVF Oberflächenmarker, die Plastikadhärenz vermitteln (102, 103). Daher können die ASCs durch ein mehrmaliges Abspülen der Kulturschale von den nicht adhären Zellen der SVF separiert werden (95, 110). Alternativ kann eine Immunophänotypisierung der ASCs durch Durchflusszytometrie oder eine Charakterisierung anhand von Immunfluoreszenz erfolgen (108, 111).

Seit ihrer Entdeckung wird den ASCs ein großes Potential in der regenerativen Medizin zugesprochen. Zum einen bietet die Liposuktion gegenüber der Knochenmarkspunktion eine minimalinvasive Alternative zur Gewinnung von MSCs mit geringerer Morbidität. Zum anderen lassen sich Stammzellen aus dem Fettgewebe in einer 10-100fach höheren Frequenz pro Volumeneinheit isolieren als BM-MSCs (95, 102). Verglichen mit den Zellen aus dem Knochenmark besitzen die ASCs ein ähnlich breites Differenzierungspotential. Ging man zu Beginn davon aus, dass sich ASCs nur in adipogene, chondrogene, osteogene und myogene Zellen differenzieren, kann durch Zugabe zelllinienspezifischer Induktionsfaktoren eine Transdifferenzierung der ASCs *in vitro* in ekto- und entodermale Zellen, wie Neurone (112), Schwann-Zellen (113, 114), Kardiomyozyten (115), Endothelzellen (116), hämatopoetische Supportzellen (117), Hepatozyten (118) und Pankreas-Inselzellen (119) herbeigeführt werden. Des Weiteren können ASCs effizienter in iPS-Zellen umprogrammiert werden als andere Zellarten (120). Als immunprivilegierte Zellen, die weder Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II (MHC-II) noch costimulatorische Oberflächenmoleküle exprimieren, sind die ASCs vom Körper nicht als fremd zu erkennen und lösen im Zuge einer Transplantation nur eine geringe Abstoßungsreaktion des Immunsystems aus. Somit sind die ASCs neben einer autologen Transplantation für eine allogene Transplantation bei einem immunkompetenten Empfänger geeignet (121, 122). Durch die Sekretion immunmodulatorischer, antiapoptotischer, angiogener und hämatopoetischer Faktoren wirken sich die ASCs ebenfalls positiv auf Wundheilung des Gewebes aus (120, 123–125). All diese Vorteile verdeutlichen das große Potential der ASCs in der regenerativen Medizin und machen sie auch in Zukunft zu einem interessanten Forschungsgebiet der Wissenschaft.

1.4. Fettgewebe

Bei Fettgewebe handelt es sich um ein metabolisch aktives Gewebe aus Adipozyten, dessen grundsätzliche Aufgabe darin besteht, die Gewebshomöostase durch die Speicherung und Bereitstellung von Energie aufrecht zu erhalten (126). Abhängig von den zugeführten Nährstoffen, neuronalen und hormonellen Signalen sezerniert das Fettgewebe verschiedene Signalmoleküle, die das Hungergefühl, neuroendokrine Funktionen, die Thermogenese und die Immunabwehr regulieren (127).

Adipozyten stellen das Endstadium der adipogenen Differenzierung der ASCs dar. Diese werden zum Erhalt der Zellzahl bei ausgeglichener Energiebilanz bzw. zur Fettgewebsexpansion bei erhöhter Energiezufuhr zur Differenzierung angeregt (128). Die

Differenzierungskapazität von ASCs im Fettgewebe unterscheidet sich je nach Alter, Geschlecht und Ernährungszustand sowie der Lokalisation des Gewebes im Körper (129). Die adipogene Differenzierung verläuft in zwei Schritten. Zunächst differenzieren sich die ASC entlang der adipogenen Zelllinie in unipotente Präadipozyten, was als *Commitment*, also als Festlegung auf eine Zelllinie, bezeichnet wird. Danach entwickeln sich die Präadipozyten im Rahmen der sog. terminalen Differenzierung zu reifen Fettzellen (120). Es konnten einige Signalmoleküle identifiziert werden, die die Differenzierung der ASCs entlang der adipogenen Zelllinie vermitteln. Zu ihnen gehören unter anderem Wnt, *transforming growth factor β* (*TGF β*), *bone morphogenic proteins* (*BMPs*), IGF1, Interleukin 17 (IL-17), *fibroblast growth factor 1* bzw. 2 (*FGF1/ FGF2*) und Activin (130, 131). Der genaue Mechanismus für das Zustandekommen des *Commitments* ist bislang nicht genau geklärt. Bei der terminalen Differenzierung kommt es zu einer Reihe von Transkriptionsprozessen, die unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren *peroxisome proliferator-activated-rezeptor γ* (*PPAR γ*) und *members of CCAAT/enhancer binding proteins* (*C/EBPs*) vermittelt werden (130, 132). PPAR γ nimmt dabei eine besondere Rolle ein, da alle Signalwege, die die Adipogenese (Bildung neuer Fettzellen) vermitteln, schließlich in PPAR γ münden. Dieser steigert daraufhin die Expression adipogener Gene, wie Leptin, Adiponectin, *adipocyte fatty acid binding protein 2* (*aP2*) und Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4) (132).

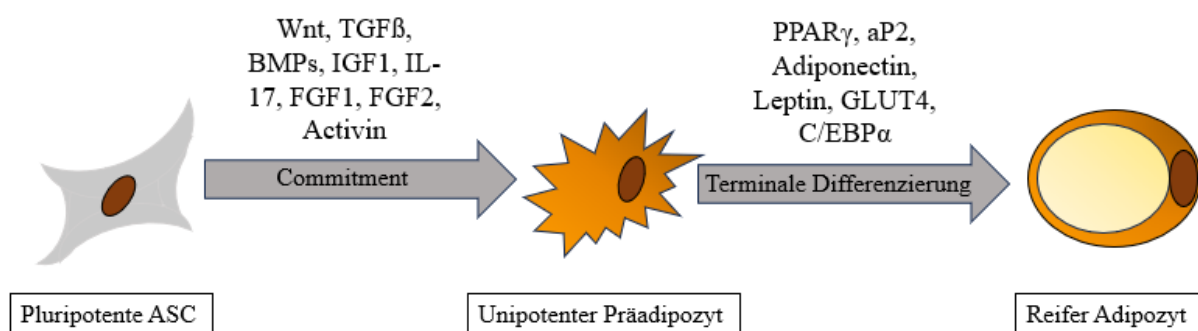


Abbildung 9: Adipogene Differenzierung und regulierende Faktoren (eigene Darstellung in Anlehnung an Ong et al., 2013)

Klassischerweise wird zwischen weißem und braunem Fettgewebe differenziert, die sich in ihrer Funktion, metabolischen Aktivität und Lokalisation unterscheiden (133, 134). Weißes Fettgewebe (WAT, *white adipose tissue*) macht den Hauptanteil des adipogenen Gewebes im Körper aus und wird traditioneller Weise als Fettgewebe per se bezeichnet (135). Es besteht aus unilokulären Adipozyten, die eine große Lipidvakuole, einen exzentrisch gelegenen

Zellkern und wenige, kleine Mitochondrien besitzen. Sie zeichnen sich durch die Expression adipogener Markergene, wie Adiponectin, Resistin, Lipoproteinlipase (LPL) und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (G3PDH), aus (127, 134, 136–139). WAT dient in erster Linie dazu, Energie in Form von Triglyceriden zu speichern, um diese bei einer negativen Energiebilanz erneut bereitstellen zu können (126). Die größten Speicherdepots befinden sich je nach Ernährungszustand im subkutanen Gewebe des Gesäßes, der Oberschenkel und der Hüften. Subkutanes Fettgewebe (sWAT) dient durch seine schlechte Leitfähigkeit außerdem als Isolierschicht des Körpers. Viszerales Fettgewebe (vWAT) bietet den intraabdominellen Organen einen mechanischen Schutz (136).

Braunes Fettgewebe (BAT, *brown adipose tissue*) hat nicht die Speicherung von Triglyceriden als Hauptaufgabe, sondern besitzt eine thermoregulatorische Funktion. Ursprünglich nahm man an, dass BAT ausschließlich in der Neugeborenenperiode vorkommt und der zitterfreien Wärmeproduktion dient (140, 141). Mehrere unabhängige Arbeiten konnten BAT jedoch auch im adulten Organismus nachweisen, sodass heute davon ausgegangen wird, dass BAT ebenfalls im Erwachsenenalter existiert – allerdings in weit geringerem Maße als in der Neugeborenenperiode (26, 27, 142). Auch wenn das BAT nur einen geringen Teil des Fettgewebes des Körpers ausmacht, findet es sich an zahlreichen Lokalisationen des Körpers, insbesondere im subkutanen Fettgewebe der inneren Nackenmuskeln und supraclaviculärer Areale. In der Bauchhöhle und im Hals-/Brustbereich befindet sich das BAT in unmittelbarer Nähe großer Gefäße und der Hohlorgane (26, 27, 136, 143). Somit kann eine direkte Regulation der Körperkerntemperatur auf die Organe und den Blutkreislauf vorgenommen werden, wenn kälteres Blut von der Körperoberfläche rezirkuliert (144). Die Adipozyten des BAT besitzen im Gegensatz zu den Adipozyten des WAT ein multilokuläres Erscheinungsbild mit zentralem Nucleus und mehreren kleinen Fettvakuolen im Zytoplasma (139). Charakteristisch ist ihre Braunfärbung, die auf den hohen Gehalt an Mitochondrien und dem darin enthaltenen, eisenhaltigen Cytochrom zurückzuführen ist (145). Außerdem ist das BAT reich vaskularisiert und besitzt eine eigene sympathische Innervation, die die Lipolyse zur zitterfreien Wärmeproduktion bei Aktivierung des Thermoregulationszentrums einleitet (146). Stimuliert wird die Lipolyse durch den intrazellulären Spiegel von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Dieser wird unter anderem durch das autonome Nervensystem reguliert. Die Bindung von Katecholaminen an die β_3 -Adrenorezeptoren im BAT führt dabei zur Aktivierung der G-Protein gekoppelten Adenylatcyclase (AC), die die Bildung von cAMP aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert. Ein erhöhter cAMP-Spiegel aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA), welche lipolytische Enzyme, wie die hormonsensitive Lipase (HSL),

die Adipozyten-Triglyzeridlipase (ATGL) und die Monoacylglycerin-Lipase (MGL) durch Phosphorylierung aktiviert. Die freien Fettsäuren werden anschließend in die Mitochondrien transportiert und abgebaut (147–150). Damit die Energie der Fettsäureoxidation zur Thermogenese genutzt werden kann, wird die ATP-Synthese im BAT durch das *uncoupling protein-1 (UCP-1)* von der oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette entkoppelt. Dabei werden die Protonen der Atmungskette von UCP-1, einem Protonenkanal an der inneren Mitochondrienmembran, zurück in die Mitochondrienmatrix geleitet. Der aufgebaute Protonengradient wird zerstört und die Energie als Wärme freigesetzt (151–153). UCP-1 wird von BAT exprimiert und gilt als ein spezifischer Marker für die zitterfreie Thermogenese in Zellen (154). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass ein Kalorienüberschuss zur Stimulation der Thermogenese im BAT führt, was zur Erhaltung des Körpergewichts beiträgt. Dieser Prozess wird als Diät-induzierte Thermogenese bezeichnet (155). UCP-1-Knockoutmäuse waren wesentlich häufiger von Übergewicht betroffen (156).

1.5. Beiges Fettgewebe

Vor einigen Jahren wurde von Adipozyten innerhalb des WAT berichtet, die ein intermediäres, pauciloculäres Erscheinungsbild mit Charakteristika von beiden Fettgewebsarten aufweisen. Neben einer großen zentralen Fettvakuole besitzen diese Zellen mehrere, kleine Lipideinlagerungen, einen peripher gelegenen Zellkern sowie zahlreiche Mitochondrien, die teilweise denen des braunen, teilweise denen des weißen Fettgewebes ähneln. Im Vergleich zu Adipozyten des BAT besitzen diese Adipozyten jedoch eine geringe basale Expressionsrate von UCP-1 (139, 157–159). Durch genetische Analysen konnte später gezeigt werden, dass diese Zellen nicht, wie zuerst angenommen, dem BAT zugeordnet werden können, sondern dass von der Existenz einer dritten Fettgewebsart ausgegangen werden muss, welche als beige oder *brite (brown-in-white)* bezeichnet wird (160). Während die Zellen des „klassischen“ braunen Fettgewebes von einer myf-5-positiven muskelzellähnlichen Zelllinie abstammen (161), konnte myf-5 bei den Adipozyten des beigen Fettgewebes nicht nachgewiesen werden. Folglich durchlaufen die Adipozyten des beigen Fettgewebes einen anderen Differenzierungsweg als die Adipozyten des BAT (161–163). Zum jetzigen Forschungsstand werden zwei unterschiedliche Differenzierungswege für die Entstehung beiger Fettzellen postuliert. Zum einen konnte eine gemeinsame *Platelet-derived growth factor α (PDGFR α)*-positive Progenitorzelle der beigen Adipozyten und der Adipozyten des WAT *in vivo* identifiziert werden (164). Zum anderen wurde eine bidirektionale Transdifferenzierung der Adipozyten des WAT in beige Fettzellen

unter der Stimulation mit β 3-adrenergen bzw. PPAR γ -Agonisten oder Kälte nachgewiesen (136, 139, 165, 166), was als *Browning* bezeichnet wird. Die Induktion des Brownings wird zum Großteil durch die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und PPAR γ -Koaktivator 1 α (PGC-1 α) reguliert, welche die Expression von Genen, die an der mitochondrialen Biosynthese, dem oxidativen Metabolismus und der zitterfreien Thermogenese beteiligt sind, stimulieren (167–169). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *PR domain containing 16 (PRDM16)* die Determinierung auf einen braunen Fettgewebstyp von Präadipozyten durch direkte Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren, u.a. PGC1 α , bewirkt (170). Diese Prozesse führen zum Wechsel des univakuolären WAT-Phänotyps zu einem BAT-ähnlichen Phänotyp über eine pauciloculäre Zwischenstufe, sowie einer Induktion der UCP-1-Expression der Zellen. Interessanterweise lässt sich die UCP-1-Expression beiger Fettzellen durch die Stimulation von cAMP auf das absolute mRNA-Level von klassischem BAT anheben (139, 159).

An der Induktion des *Brownings* sind viele Transkriptionsfaktoren beteiligt, die mit der Entstehung der Adipozyten des klassischen BAT assoziiert sind (167). Die Expression von FGF21 (171) und die Ausschüttung natriuretischer Peptide (172) scheinen auf das *Browning* sowie auf die Differenzierung brauner Adipozyten gleichermaßen Einfluss zu nehmen. Irisin, ein neu entdecktes Adipokin, wirkt hingegen ausschließlich auf die Transdifferenzierung von WAT in beige Adipozyten. Es konnte gezeigt werden, dass Irisin bei vermehrtem körperlichem Training von der Muskulatur ausgeschüttet wird und ein *Browning* von sWAT induziert, wohingegen das klassische BAT durch die Irisinausschüttung weitestgehend unbeeinflusst blieb. Dieser Einfluss ist auf die Stimulation von PPAR α zurückzuführen, welche die UCP-1-Expression ebenfalls induzieren kann (173, 174). Außerdem scheint die Cyclooxygenase-2-vermittelte Generierung von Prostaglandin E2 im selektiven Zusammenhang mit dem *Browning* zu stehen (175). Von einem ubiquitären Transdifferenzierungspotential der Fettzellen kann im Allgemeinen jedoch nicht ausgegangen werden, da ein *Whitening* von Adipozyten des BAT zum vermehrten Zelltod und einer Gewebsinflammation führt (176).

Zwar kann die Expression von UCP-1 und PRDM16 in WAT als Kennzeichen für das Vorhandensein von beigen Fettzellen herangezogen werden (177, 178), jedoch handelt es sich hierbei um keine selektiven Zellmarker beiger Adipozyten. Als spezifische Zellmarker beiger Fettzellen wurden CD137, TMEM26, TBX1, HoxC9 und Cited1 identifiziert. Im Gegensatz zu den Adipozyten des BAT sind die Adipozyten des beigen Fettgewebes nicht in der Lage, Zic1 zu exprimieren, was eine Abgrenzung beider Zellarten ermöglicht. Als gemeinsamer Zellmarker von weißen und beigen Adipozyten gilt HoxC8, welches vom BAT nicht exprimiert wird. Als ein selektiver Marker des WAT wird Tcf21 herangezogen (154, 159, 179).

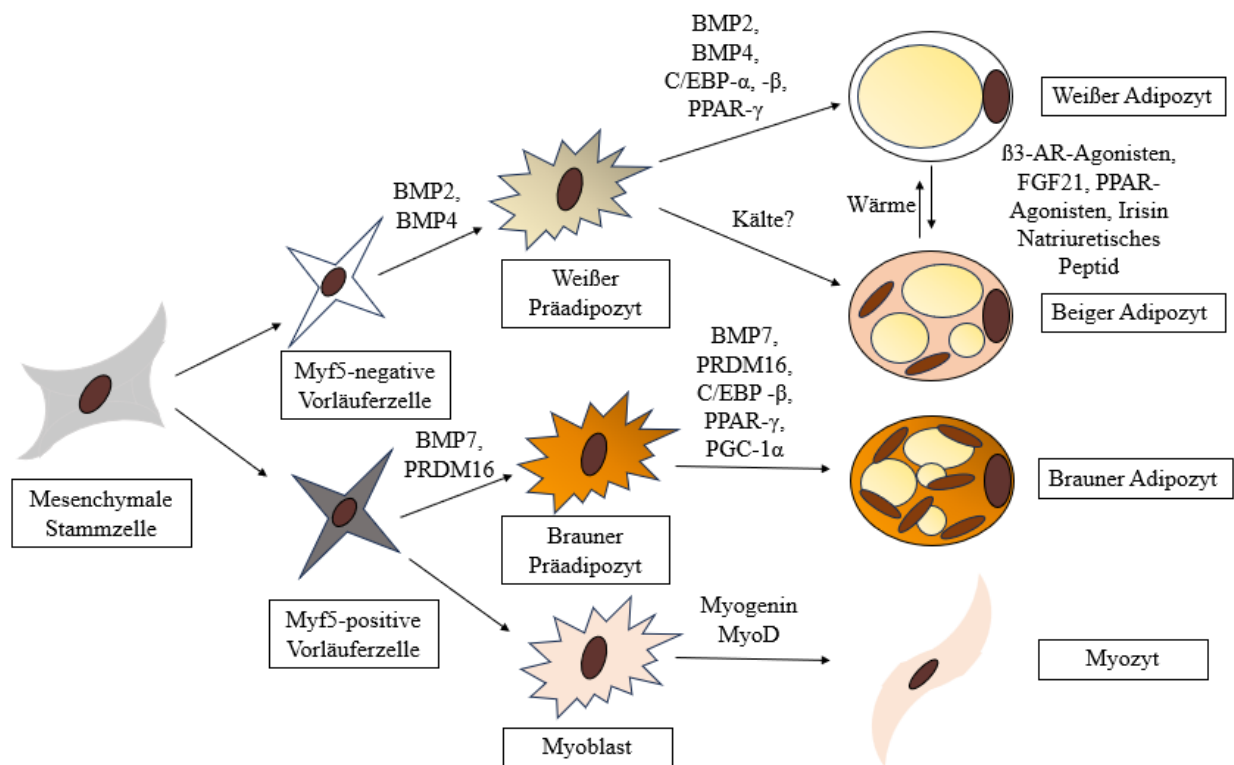


Abbildung 10: Differenzierung in weiße, beige oder braune Adipozyten und entsprechende Differenzierungsfaktoren (eigene Darstellung nach Park A. et al., 2014)

1.6. Apoptose

Apoptose bezeichnet den physiologischen Prozess des programmierten Zelltods, welcher im Rahmen der Zellerneuerung während der Ontogenese, des Zellumsatzes, der Entwicklung und Funktion der Immunabwehr oder bei atraumatischer Zellschädigung durch externe Noxen oder Infektionen stattfindet. Eine aberrante Apoptose kann zur Entwicklung degenerativer und autoimmuner Erkrankungen sowie zur Entstehung von Tumoren führen. Dem gegenüber zu stellen ist die Nekrose, welche einen passiven Zelltod nach traumatischer Zellschädigung bezeichnet und eine umliegende Gewebsinflammation hervorruft. Die Apoptose kann sowohl durch Stimuli innerhalb der betroffenen Zelle, wie vermehrten oxidativen Stress oder Hyperkalziämie, als auch durch extern generierte Signale, wie Stickstoffmonoxid, Glukokortikoide, Zytokine oder dem Ausbleiben von Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren, generiert werden (180, 181). Dementsprechend werden zwei übergreifende Signalwege unterschieden: eine extrinsische und eine intrinsische Apoptose-Kaskade. Beide Signalwege resultieren in der Aktivierung der Caspasen-Kaskade, die durch Proteolyse, DNA-Fragmentierung und Spaltung des Cytoskeletts zum letztendlichen Zelltod der Zelle führt. Bei

Caspasen handelt es sich um Aspartat-spezifische Cysteinproteasen, die sich in apoptotisch wirksame Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 9 und 10) bzw. Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7) und andere Caspasen (Caspase 1, 4, 5, 11, 12, 13 und 14), die unter anderem an der Vermittlung von Inflammationsgeschehen beteiligt sind, unterteilen lassen (182).

Bei der extrinsischen Apoptose kommt es zur extrazellulären Ligandenbindung sogenannter Todesfaktoren, wie *tumor necrosis factor (TNF)*, Fas-Ligand (FasL) oder *TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)* an transmembranständige Todesrezeptoren, wie TNF-Rezeptor (TNFR-1, TNFR-2), Fas-Rezeptor (FasR, CD95), TRAIL-Rezeptor (TRAIL-R1, TRAILR2, syn. DR4/DR5). Durch die Trimerisierung des Rezeptors wird eine Konformationsänderung der intrazellulären Rezeptordomäne, der sog. *Death domain*, hervorgerufen, an der sich die Adaptormoleküle *TNF-rezeptor associated death domain (TRADD)* und *Fas-associated death domain (FADD)* durch eine homotypische Reaktion anlagern. Dies führt zu einer Rekrutierung von Procaspase 8 oder 10 an die *Death effector domain (DED)* von FADD, was zur Ausbildung des *death inducing signal complex (DISC)* führt. Dies resultiert in der autolytischen Spaltung der Procaspasen in deren aktive Form. Caspase 8 aktiviert seinerseits durch proteolytische Spaltung die Effektorcaspase 3, was zur Einleitung der Caspasenkaskade und damit zum irreversiblen Zelltod führt (183–185). Einen wesentlichen Einfluss auf die extrinsische Apoptose im Sinne einer negativen Regulation besitzt das *cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP)*, welches sich an den DISC anlagert und die Wirkung der Caspasen unterbinden kann (186).

Die intrinsische Apoptose wird auch als mitochondrielle Apoptose bezeichnet, da sie von der Ausschüttung mitochondrieller Apoptosefaktoren abhängt. Bei der mitochondriellen Apoptose führen intrazelluläre Signale zu biochemischen Veränderungen innerhalb der Mitochondrien. Durch den Verlust des elektrochemischen Gradienten an der inneren Mitochondrienmembran kommt es zu einer verminderten mitochondrialen ATP-Synthese sowie zur Öffnung nichtselektiver Protonenkanäle, sogenannter mitochondrialer *permeability transition pores (PTPs, syn. MTPs)*, die eine Verbindung zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran bilden. Diese erlauben eine massive Ionenbewegung, die zu einer erhöhten Membranpermeabilität (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*), zum Ödem und der Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran führt (181, 187, 188). Intermembranständige Proteine, wie Cytochrom C, Smac/DIABLO, die Serin-Protease HrtA2/OMI, gelangen daraufhin ins Zytosol und aktivieren zytosolische Downstream-Effektor-Caspasen (189). Dabei führt die Bindung von Cytochrom C an den zytosolischen apoptotischen Proteaseaktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) zu einer Konformationsänderung von Apaf-1, die die

Bindungsstelle für dATP an Apaf-1 freigibt. Dessen Bindung induziert eine zweite Konformationsänderung von Apaf-1, die dessen Oligomerisierung um die Caspasen-Rekrutierungsdomäne (CARD) bewirkt. Procaspase 9 wird daraufhin zu CARD rekrutiert und durch autolytische Spaltung aktiviert. Dieser Komplex wird als Apoptosom bezeichnet (190–192). Caspase 9 spaltet Procaspase 3 und leitet somit die Caspasenkaskade ein. SMAC/DIABLO und HrtA2/OMI vermitteln die Apoptose hingegen über die Hemmung von *inhibitors of apoptosis proteins (IAPs)*, welche die Aktivität von Caspase 3 in der vitalen Zellen unterbinden (181, 189, 193). Weiterhin werden Caspase-unabhängig wirkende, proapoptotische Faktoren von den Mitochondrien ins Cytoplasma freigegeben. Hierzu zählen beispielsweise *apoptosis inducing factors (AIFs)*, Endonuklease G und Caspase-aktivierte DNase (CAD), welche zur DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation im Zellkern führen (194, 195).

Die Cytochrom C-Ausschüttung wird durch das Gleichgewicht zytoplasmatischer oder endoplasmatischer, pro- und antiapoptotisch wirkender Signale reguliert. Eine Hauptrolle spielt dabei die Bcl-2-Proteinfamilie, die sich anhand ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften, insbesondere dem Vorkommen bestimmter Bcl-2-Homologie (BH)-Domänen, in drei Untergruppen unterteilen lässt. Zu den proapoptotisch wirksamen Effektorproteinen gehören *Bcl-2 associated X protein (syn. apoptosis regulator BAX)*, *Bcl-2 homologous antagonist/killer (syn. apoptosis regulator BAK)* und *Bcl-2-related ovarian killer protein (BOK)* sowie zu den proapoptotischen *BH3-only*-Proteinen *BH3-interacting domain death agonist (BID)*, *Bcl-2 interacting mediator of cell death (syn. Bcl-2 interacting protein Bim)*, *Bcl-2-binding component 3 (BBC3, syn. p53 up-regulated modulator of apoptosis (Puma))*, *Bcl-2-interacting killer (Bik)*, *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1, syn. NADPH oxidase activator 1 (Noxa))*, *Bcl-2-associated agonist of cell death (Bad)*, *Bcl-2-modifying factor (BMF)*, *activator of apoptosis harakiri*, Beclin-1 und *mitochondrial ubiquitin ligase activator of NFκB 1 (syn. E3 ubiquitin-protein ligase MUL1)*.

Zu den antiapoptotisch wirksamen Proteinen zählen *B-cell lymphoma 2 (syn. apoptosis regulator Bcl-2)*, *Bcl-2-like protein 1 (syn. B-cell lymphoma-extra large (Bcl-X(L)))*, *Bcl-2-like protein 2 (Bcl-W)*, *Bcl-2-like protein 10 (Bcl-B)*, *induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1 (Mcl-1)*, *Bcl-2-related protein A1 (syn. Bcl-2-like protein 5 (Bcl2-L-5))* und *Bcl2-like protein 12 (Bcl2-L-12)* (196).

Im ausgeglichenen Zustand werden die Apoptoseregulatoren BAX und BAK durch die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie, wie dem Apoptoseregulator Bcl-2 oder Mcl-1, gehemmt. Nehmen proapoptotische Signale Überhand, kommt es zur Expressionssteigerung

oder posttranskriptionellen Stimulation der *BH3-only*-Proteine, welche mit hoher Affinität an antiapoptotische Bcl-2-Proteine binden. Dabei weisen unterschiedliche *BH3-only*-Proteine unterschiedliche Affinitäten zu den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen auf. Beispielsweise bindet Noxa mit hoher Affinität ausschließlich an Mcl-1, während sich BID, Bim oder Puma allen antiapoptotischen Bcl-2-Mitgliedern anlagern können. Die Anlagerung der *BH3-only*-Proteine führt zur Freisetzung der Apoptoseregulatoren BAX und BAK, die oligomerisieren und in die äußere Mitochondrienmembran integrieren. Dies resultiert in einer Porenbildung innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran, was zur MOMP und schließlich der Freisetzung von transmembranständigen Apoptosefaktoren, wie Cytochrom C führt (189, 197–200).

Die Cytochrom C-Ausschüttung kann auch unabhängig von der intrinsischen Apoptose über Todesrezeptorsignale ausgelöst werden. Dabei stellt die Caspase 8-induzierte Spaltung von BID eine Verbindung zwischen der mitochondriellen und der extrinsischen Apoptose dar, die durch Fas/TNF-R1-Stimulation initiiert wird und die Bcl-2-Regulation umgeht. Das aktivierte Spaltprodukt von BID, *truncated BID (tBID)*, transloziert zu den Mitochondrien und führt seinerseits zur Cytochrom C-Ausschüttung und der Aktivierung von Downstream-Caspasen (201, 202).

Das Verhältnis zwischen pro- und antiapoptotischen Stimuli innerhalb einer Zelle wird wiederum durch Signalkaskaden beeinflusst, die Informationen wie Zellstress, DNA-Schädigung, Hypoxie, die Expression von Onkogenen oder Nährstoff- bzw. Wachstumsfaktormangel weiterleiten. Eine Schlüsselrolle wird dabei dem Tumorsuppressor p53 und den p53-assoziierten Genen zugesprochen. Eine p53-Mutation konnte in ca. 50-55 % der Karzinome nachgewiesen werden (203). Bei p53 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher durch TP53 codiert wird und die Transkription von Faktoren der extrinsischen und intrinsischen Apoptosekaskade reguliert, was in der Einleitung der Caspase-Kaskade resultiert. (204). Die Apoptose wird hauptsächlich durch die Stimulation proapoptotischer Bcl-2-Mitglieder, wie dem Apoptoseregulator BAX, Puma, Noxa oder BID (205–207) vermittelt. Über die p53-abhängige Induktion der p21-Expression kann zudem ein G1-Zellzyklusarrest ausgelöst werden. Über weitere Zielgene übernimmt p53 zudem die Funktion eines Checkpoint-Inhibitors oder induziert die Seneszenz. Mittlerweile wurden über 4.000 potentielle p53-Bindungsstellen im menschlichen Genom ausfindig gemacht (204). Zu den p53-assoziierten Signalwegen gehören beispielsweise der *AMP-activated protein kinase (AMPK)*-Signalweg, der eine p53-induzierte Apoptose bei ATP- und Nährstoffmangel einleitet (204, 208), sowie dessen Gegenspieler, der PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg,

welcher an der Vermittlung einer vermehrten Zellproliferation und Expression proinflammatorischer Gene beteiligt ist (209) .

Des Weiteren kann die Apoptose über vermehrten Zellstress des Endoplasmatischen Retikulums, beispielsweise im Rahmen einer veränderten Calciumhomöostase, fehlgefalteter Proteine oder Hypoxie ausgelöst werden. Dabei spielt die Aktivierung von Caspase 12, sowie die Bcl-2-Protein-regulierte, mitochondrielle Caspase 3 und Caspase 7-Aktivierung eine Rolle bei der Apoptoseinduktion. (210, 211)

Die Caspasekaskade stellt die gemeinsame Endstrecke der extrinsischen und intrinsischen Apoptose dar. Nach Aktivierung der Initiatorcaspasen kommt es zu einer Kaskade der weiteren, zum Teil gegenseitigen Aktivierung der Effektorcaspasen (insb. Caspase 3, 6, 7) sowie zu positiven Feedbackschleifen, die die Ausschüttung von Cytochrom C verstärken (189). Zudem werden zytosolische Endonukleasen sowie Proteasen durch die Effektorcaspasen aktiviert. Dies resultiert in einer Proteolyse, DNA-Fragmentierung und Spaltung des Cytoskeletts und damit im letztendlichen Zelltod der Zelle (212). Morphologisch korreliert die Apoptose mit einer Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Pyknosis und Karyorrhexis. Durch den erhöhten hydrostatischen Druck innerhalb der apoptotischen Zelle kommt es zur Bläschenbildung auf der Membranoberfläche, was als sog. *Blebbing* bezeichnet wird. Die gezielte Kontraktion von Actinomyosin führt zur Abschnürung von *apoptotic bodies (ApoBDs)*, welche Zellinhalte der sterbenden Zelle beinhalten. Die ApoBDs werden von Makrophagen anhand von „*Find-me*-Signalen“, die während der Apoptose ausgeschüttet werden, sowie dem Austreten von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche als „*Eat-me*-Signal“ erkannt und schließlich phagozytiert. (181, 213–215).

1.7. PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg

Der PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg ist an der Regulation vieler physiologischer Prozesse, wie der Proteinsynthese und Zellproliferation, des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt (216–219). Eine aberrante Aktivierung dieser Signalkaskade führt zur Entstehung einer Vielzahl von Tumorentitäten (220). Es ist vorstellbar, dass andere Erkrankungen mit proliferativem Charakter ihren Ursprung ebenfalls in einer veränderten PI3-Kinasen-Signalkaskade haben.

Die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinasen) gehören zu der Familie der Lipid-Kinasen, die den Inositolring von Phosphoinositiden an der 3'-OH-Gruppe phosphorylieren. Sie werden in drei Klassen unterteilt (221). Die Klasse I ist die am meisten untersuchte Subfamilie der PI3Ks und unter anderem für die Initiierung der PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalkaskade verantwortlich

(222). Sie besteht aus zwei Unterkategorien. Die Klasse IA-Kinasen sind heterodimere Enzyme, die aus einer katalytischen p110- (p110 α , p110 β , p110 δ) und einer regulatorischen p85-Untereinheit (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ , p50 α) bestehen. Klasse IA-PI3-Kinasen werden von membranständigen Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) aktiviert, die die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren, wie IGFs, oder Hormone vermitteln. Dabei gehört der PI3-Kinaseweg zu den am besten charakterisierten Downstream-Kaskaden von Insulin (223), weshalb dieser im Folgenden im Kontext einer Insulinstimulation exemplarisch erläutert werden soll. Die Klasse IB-PI3-Kinasen bestehen aus der katalytischen p110 γ -Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit (p101, p84, p87) und interagieren mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) (216, 224–226). Die regulatorische p85-Untereinheit, welche von den Genen PIK3R1, PIK3R2 und PIK3R3 codiert wird, dient der Stabilisierung der katalytischen p110-Untereinheit und unterdrückt die basale Aktivität der PI3-Kinase. Eine Mutation der katalytischen Untereinheit, deren Expression von PIK3CA, PIK3CB und PIK3CD codiert wird, führt zu einer dauerhaften Stimulation der Enzymaktivität und ist in der Pathogenese vieler Tumoren beschrieben (227). Die Funktion und der Aufbau der Klassen II und III der PI3-Kinasen soll hier nicht näher diskutiert werden.

Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor führt zur Autophosphorylierung der zytosolischen Rezeptordomäne, die eine Konformationsänderung ihres Adaptorkomplexes bewirkt, an dem sich daraufhin die einzelnen Untereinheiten der Insulinrezeptorsubstrat(IRS) - Familie anlagern (228). IRS-1 nimmt dabei eine Schlüsselrolle in der Transduktion der Insulinwirkung über die Aktivierung der PI3-Kinase ein (229). Es besteht aus den Adaptorproteinen *SHC-transforming protein 1 (Shc)*, *Son of Sevenless (SoS)*, *growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)* und dem Ras-Protein und wird unter der Stimulation von Insulin, IGFs und anderer Zytokine von den Insulinrezeptoren an bestimmten Serin- und Tyrosinresten phosphoryliert. Insgesamt gibt es 50 verschiedene Phosphorylierungsstellen für IRS-1, die die Funktion von IRS-1 negativ oder positiv regulieren (230). Eine Aktivierung von IRS-1 resultiert in der Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Signalmoleküle, die eine Src-Homologie-2(SH2)-Domäne beinhalten. Die Phosphorylierung von Tyrosin⁶¹² (Tyr⁶¹²) und Tyrosin⁶³² (Tyr⁶³²) dient der PI3-Kinase als Bindungsstelle (228, 229, 231–233). Die Funktion der PI3-Kinase besteht in der Generierung eines *Second-Messenger*-Pools an der Plasmamembran durch die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP₃). Als ihr wichtigster Antagonist gilt der Tumorsuppressor PTEN, der PIP₃ zu PIP₂ dephosphoryliert (222). Durch die Wechselwirkung zwischen PIP₃ und der Pleckstrin-Homologie(PH)-Domäne der Serin-Threonin-Kinase Akt

wird diese an die Zellmembran rekrutiert (234–236). Dort wird sie für ihre vollständige Aktivierung von der Phosphoinositid-abhängigen-Kinase (PKC) an Threonin³⁰⁸ (Thr³⁰⁸) sowie vom mTORC2-Komplex an Serin⁴⁷³ (Ser⁴⁷³) phosphoryliert (236, 237). Aktiviertes Akt ist an der Phosphorylierung unterschiedlicher Proteine beteiligt, die Zellzyklus und Apoptose (Bad, p21, Caspase 9, *mouse double minute 2 homolog* (MDM2), *IκB kinase complex* (IKK)), Glykogensynthese (Glykogensynthase-Kinase β (GSK3β)) und Gentranskription (*forkhead protein box O* (FOXO)) regulieren (227, 230). Weiterhin besitzt Akt regulativen Einfluss auf Proteinsynthese, Zellwachstum und Proliferation über den mTOR-RPS6-Kinase/4E-BP1-Signalweg. Dieser wird einerseits über den direkten stimulatorischen Einfluss auf mTORC1 über *proline-rich AKT substrate 40 kDa* (PRAS40) vermittelt (238). Durch die Phosphorylierung des TSC1/TSC2-Komplexes ist Akt andererseits auch indirekt an der Regulierung von mTORC1 beteiligt. Im aktivierten Zustand besitzt der TSC1/TSC2-Komplex eine GTPase-Aktivität, die durch die Umwandlung von GTP-Rheb zu GDP-Rheb zur Hemmung von mTORC1 führt. Durch die Phosphorylierung von Tuberin (TSC2) des TSC1/TSC2-Komplexes durch Akt wird dessen inhibitorischer Einfluss auf mTORC1 aufgehoben (239).

mTOR gehört zur Familie der PI3K-ähnlichen Kinasen (PIKK) und besteht aus den zwei strukturell und funktionell unterschiedlichen Komplexen mTORC1 und mTORC2 (222). mTORC1, welches aus mTOR, *regulatory associated protein of mTOR* (Raptor), PRAS40 und mLST8/GbL (240) aufgebaut ist, ist über die Phosphorylierung und Aktivierung der RPS6-Kinase 1 und der Phosphorylierung und Inaktivierung des Translationsrepressors 4E-BP1 entscheidend an der Regulation der Proteinbiosynthese und des Zellwachstums beteiligt (241–243). Phosphorylierte RPS6K1 (p-RPS6K1) bildet einen Bestandteil des 40S-Ribosoms und initiiert die Translation von 5'-terminalen-Oligopyrimidin-haltigen mRNAs, welche für ribosomale Proteine und anderen Elementen des Translationskomplexes codieren (244). 4E-BP1 hingegen inhibiert die 5'-cap-abhängige-Translation im unphosphorylierten Zustand, indem es sich an *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E) anlagert. Wird der eIF4E-BP1-Komplex durch mTORC1 phosphoryliert, spaltet sich der Initiierungsfaktor eIF4E vom Proteinkomplex ab und lagert sich mit anderen Initiierungsfaktoren der 5'-cap-Struktur eukaryotischer mRNAs an, was in der Initiierung des Translationsprozesses resultiert (245, 246).

mTORC2 spielt, wie oben beschrieben, eine Rolle bei der vollständigen Aktivierung von Akt und ist aus mTOR, *rapamycin insensitive companion of mTOR* (Rictor), *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1* (mSIN1) und mLST8/GbL aufgebaut (247). Die

Zellzyklusprogression und Zellvitalität werden ebenfalls durch Downstream-Substrate von Akt gesteuert (219), deren Signalkaskaden nicht weiter besprochen werden sollen.

Durch die Downstream-Substrate des PI3-Kinasewegs kann durch verschiedene Feedbackmechanismen eine Regulation auf Ebene von IRS-1 vorgenommen werden. Dabei wird die Insulinwirkung und die daraus resultierende Aktivierung der PI3-Kinase durch die Phosphorylierung unterschiedlicher Serinreste von IRS-1 positiv oder negativ beeinflusst. Eine verminderte Tyrosinphosphorylierung führt ebenfalls zur Verminderung des Insulineffekts, indem die Interaktion von IRS-1 mit den Insulinrezeptoren unterbunden wird. Insgesamt wird die Wirkung von IRS-1 folglich durch die Bilanz hemmender Serin- und aktivierender Serin- und Tyrosinphosphorylierungen reguliert (229). Diese Feedbackmechanismen könnten eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die Signaltransduktion von Insulin unter der Wirkung verschiedener PI3-Kinase- bzw. mTOR-Inhibitoren aufrechterhalten bleibt (248, 249).

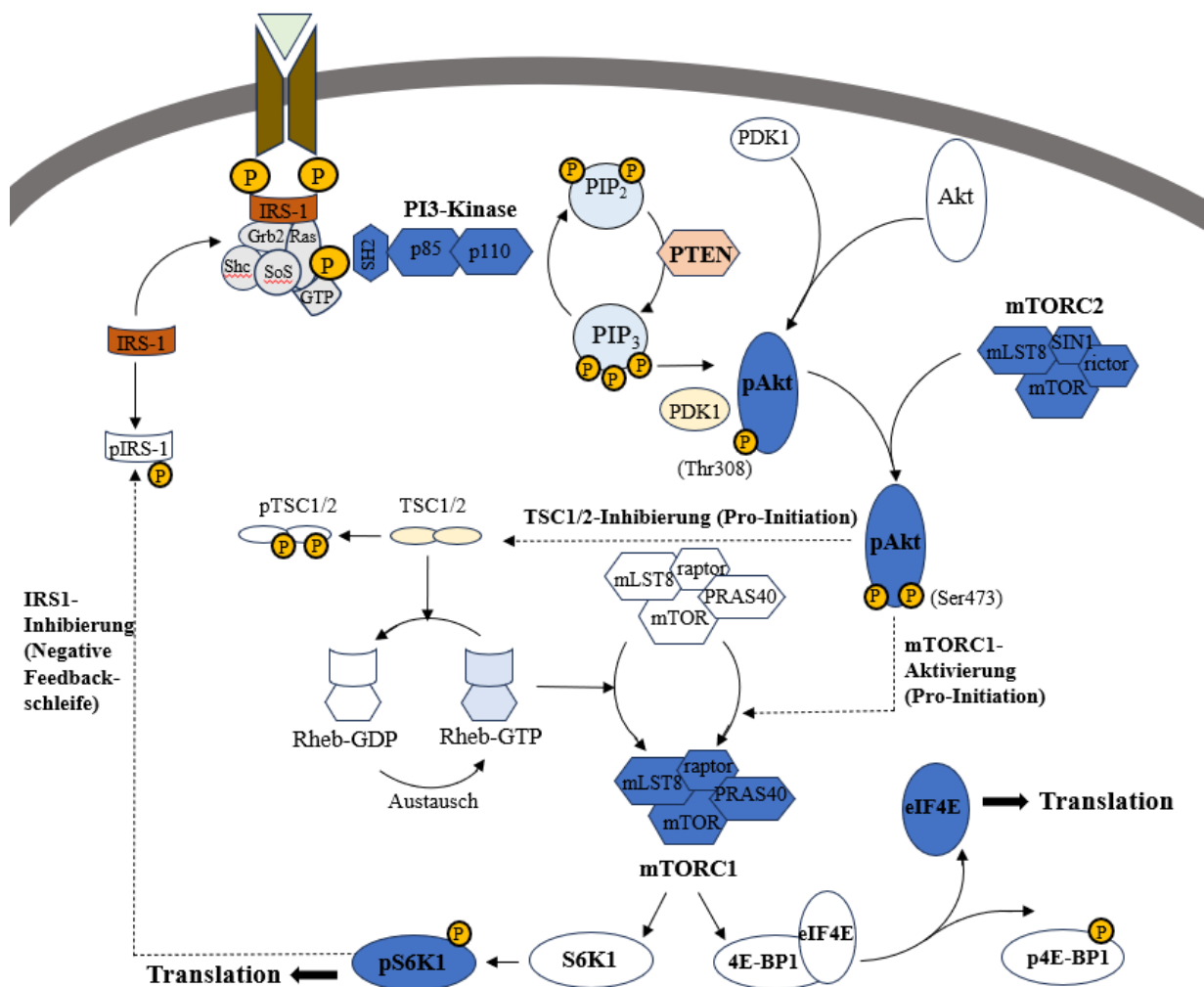


Abbildung 11: Schematische Darstellung des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs. Inaktive Enzyme sind weiß hinterlegt, aktive Enzyme sind farbig hinterlegt; (eigene Darstellung nach Lequieu J. et al. 2011)

1.8. Buparlisib

Buparlisib (NVP-BKM120) ist ein oral verfügbarer Pan-Klasse-I-PI3-Kinase-Inhibitor und ein Derivat des 2,6-Dimorpholin-Pyrimidins (250). Es wurde im Rahmen einer Studie zur Optimierung der Wirkeigenschaften der Pan-PI3K-Inhibitoren *in vivo* anhand eines strukturbasierten Medikamentendesigns entdeckt (251). NVP-BKM120 hemmt selektiv alle vier Isoformen der Klasse I-PI3-Kinasen, wobei es gegen PI3K α , β und δ (Klasse IA) eine höhere Potenz aufweist als gegen PI3K γ (Klasse IB). Gegenüber anderen Lipid- oder Proteinkinasen, wie mTOR, wirkt es hochselektiv (250). Allgemein besitzt Buparlisib gegenüber Mutationen des PIK3CA-Gens, welches für die p110 α -Untereinheit der Klasse-IA-Kinasen codiert, eine höhere Sensitivität als gegenüber dem Wildtyp (250, 252). Die Wirkung von Buparlisib ist auf eine kompetitive Enzymhemmung zurückzuführen, bei der es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken an der ATP-Bindungsstelle der PI3-Kinase kommt, sodass sowohl die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{MAX} als auch die Affinität zwischen Enzym und Substrat K_M (Michaelis-Menten-Konstante) negativ beeinflusst werden (250, 253). Durch die Senkung der zellulären p-Akt-Level werden die *Downstream*-Substrate mTORC1 bzw. p-RPS6-Kinase konzentrationsabhängig erniedrigt (250). Da es durch mTORC1 auf Ebene der Rezeptortyrosinkinasen zu einer negativen Feedbackschleife kommt, die zur Reaktivierung der PI3-Kinase führt (s.o.), muss in manchen Fällen über eine Komedikation mit mTOR-Inhibitoren nachgedacht werden (250). Buparlisib wird oral appliziert und weist eine gute Bioverfügbarkeit auf. Außerdem sind seine inhibitorischen Einflüsse nach Absetzen der Medikation schnell und vollständig reversibel (250). Den antiproliferativen und proapoptotischen Charakter des Medikaments macht man sich in der Behandlung verschiedener Tumorentitäten, wie dem Glioblastom, Prostata-, Magen-, Colon- oder Mammakarzinom, zu Nutze (254–258). Die Phase-3-Studien BELLE-2 und BELLE-3 zur medikamentösen Therapie des hormonsensitiven, HER-2-negativen Mammakarzinoms zeigten eine gute Wirksamkeit von Buparlisib in Kombination mit einer endokrinen Therapie mit Fulvestrant (252, 259), die zur Verlängerung des tumorprogressionsfreien Überlebens führte (252). Außerdem stellte Buparlisib für manche Patienten, bei denen eine mTOR-Inhibition versagte, eine alternative Behandlungsmöglichkeit dar. Allerdings müssen die schweren Nebenwirkungen, wie einem Leberenzymanstieg, Angststörungen oder Depressionen sowie eine gesteigerte Suizidalität bei der Behandlung mit Buparlisib berücksichtigt werden (252). In dieser Arbeit soll die Proliferationshemmung durch die PI3-Kinase-Inhibition als Therapieansatz der Multiplen Symmetrischen Lipomatose überprüft werden.

2. Zielsetzung

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweges als Regulator von Zellproliferation, Zellmetabolismus und Apoptose bei der Multiplen Symmetrischen Lipomatose. In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass eine vermehrte Regulation bei Genen des mTOR-Signalweges bei ASCs aus betroffenem Gewebe nachweisbar ist ((2), bisher unveröffentlichte Daten). Um Rückschlüsse auf die regulativen Prozesse auf den Zellumsatz bei der MSL zu ziehen, wurden ASCs aus betroffenem, lipomatösem Gewebe und unbetroffenem, subkutanem Fettgewebe von MSL-Patienten isoliert und anhand ihrer Vitalität, Differenzierbarkeit und der Expression von Apoptosefaktoren verglichen. Da weiterhin kontrovers diskutiert wird, ob es sich bei der MSL um eine Hyperproliferation von ASCs oder eine Mutation reifer Adipozyten handelt, wurde die Genexpression des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs sowohl auf Ebene der ASCs, als auch nach adipogener Differenzierung analysiert. Zuletzt wurde die Proteinexpression der PI3-Kinase sowie der RPS6-Kinase 1 mittels Western Blots analysiert, um eine mögliche Regulation der Kinasen auf Proteinebene nachzuweisen.

Bislang konnte die Ursache der MSL nur unzureichend geklärt werden. Ein weiteres Verständnis der Pathophysiologie könnte einen Ansatz für eine medikamentöse Therapie liefern. In dieser Arbeit soll der Einfluss des PI3-Kinase-Inhibitors Buparlisib auf die Gen- und Proteinexpression von ASCs und adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe und unbetroffenem Fettgewebe gezogen und mögliche Fehlregulationen aufgedeckt werden. Des Weiteren soll ein mögliches Therapiekonzept durch die *in vitro*-Behandlung mit Buparlisib evaluiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Isolierung von adipogenen Stammzellen aus humanem Fettgewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich adipogene Stammzellen verwendet. Diese wurden aus humanem Fettgewebe isoliert, das Patienten mit diagnostizierter Multipler Symmetrischer Lipomatose während eines operativen Eingriffs an der Abteilung für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der hiesigen Fakultät entnommen wurde. Neben dem erkrankten Gewebe wurden Kontrollproben aus unbetroffenen Arealen extrahiert. Die Patienten wurden im Voraus über die Verwendung ihrer Gewebeproben für Forschungszwecke aufgeklärt, was sie mit einer schriftlichen Einverständniserklärung bestätigten. Die Genehmigung für die *in vitro*-Differenzierungsversuche mit adipogenen Stammzellen wurde vorab bei der Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg eingeholt.

Die Isolierung der hASCs fand maximal 24 Stunden nach der Liposuktion statt. Dabei wurde das gewonnene Fettgewebe unter sterilen Bedingungen mittels Skalpell und Schere bis zum Erhalt einer weitestgehend homogenen, flüssigen Konsistenz zerkleinert und anschließend in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Der Zellsuspension von 15 ml zerkleinertem Fettgewebe wurde ein äquivalentes Volumen eines glucosearmen Zellkulturmediums ohne Anteil an fetalem Rinderserum, welches aus *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* ((DMEM) mit 1 g/l Glucose, L-Glutamin und Natriumbicarbonat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten)) und 1 % einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 units Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml (Sigma-Aldrich)) besteht, zugefügt. Durch Zugabe von je 10 µl pro ml Gesamtvolumen einer Kollagenaselösung (Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich), 100 U/ml, gelöst in sterilem *Phosphate Buffered Saline* (PBS (Sigma-Aldrich)) erfolgte bei anschließender Inkubation für 45 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator (HS 501 digital (IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland)) die Verdauung der extrazellulären Matrix und das Herauslösen der Zellen aus dem Gewebsverband. Weiterhin wurde die Suspension mindestens zehn Mal mit einer 10 ml-Pipette (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) auf- und abpipettiert. Durch die Filtration durch ein Zellsieb der Porengröße 100 µm (Steriflip Filter, unit 50 ml/100 µm (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, Vereinigte Staaten)) wurden die Zellen von größeren Gewebsbestandteilen separiert und vereinzelt. Es erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation (Zentrifuge Rotina 380 R (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)) bei

500 ref (relative Zentrifugalkraft). Der Überstand aus Gewebe und kollagenen Fasern wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, während das Zellpellet aus Zellen der SVF unberührt blieb. Nach einem Waschvorgang mit 10 ml PBS wurde erneut für 5 Minuten bei 500 ref zentrifugiert, der Überstand wurde ebenfalls verworfen. Schließlich wurde das SVF-Zellpellet in 1 ml Medium (bestehend aus *α -Minimum Essential Medium (α -MEM) Eagle* mit Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin und Ribo- bzw. Desoxyribonucleinsäuren (Sigma-Aldrich)), 16,7 % Fetalem Rinderserum (FBS (PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland)), 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (Sigma-Aldrich), 1 % GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)), im Folgenden als Kultivierungsmedium (CM) bezeichnet, resuspendiert und in eine T175-Zellkulturflasche (Greiner Bio-One) mit 25 ml vorgewärmten Kultivierungsmedium überführt. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator (Heracell 240 (Thermo Fisher Scientific)) bei 37 °C und 5 % CO₂.

Um eine größere Zellausbeute zu gewinnen, wurde der Überstand der T175-Flasche am Tag nach der Isolation in einer zweiten Zellkulturflasche ausgesät, um beide Kulturen beim ersten Passagieren vereinigen zu können. Dafür wurde die oben beschriebene zweimalige Zentrifugation mit dazwischenliegendem Waschschrift und anschließender Resuspension des Zellpellets in Kultivierungsmedium wiederholt. Der ursprünglichen T175-Zellkulturflasche, deren Zellen weiterhin am Flaschenboden hafteten, wurde zur weiteren Kultivierung frisches Kultivierungsmedium zugefügt.

3.2. Zellkultivierung und Passagieren

Die Kultivierung der Stammzellen erfolgte unter regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrolle bei 40-facher Vergrößerung (Hund Wetzlar, Wetzlar, Deutschland). Das Kultivierungsmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Sobald eine 80%ige Konfluenz des Zellkulturflaschenbodens erreicht wurde, wurden die Zellen zur Vermeidung einer gegenseitigen Kontaktinhibition gelöst, in eine neue Zellkulturflasche überführt und als Zellen der Passage 1 weiterkultiviert. Alle folgenden Passagen wurden fortsetzend durchnummeriert. Die Versuche wurden in Passage 5 bzw. 6 durchgeführt.

Zu Beginn jeder Passage wurde das Kultivierungsmedium unter der Sicherheitswerkbank (Modell M18 (Schulz Lufttechnik, Sprockhövel, Deutschland)) abgesaugt und die Zellen mit 20 ml PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche erfolgte durch Zugabe von 2 ml einer 0,25%igen Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich) in PBS. Diese wurde für optimale Wirkbedingungen des Enzyms im Wasserbad (Mettler, Schwabach, Deutschland)

bei 37 °C vorgewärmt. Nach 4-7-minütiger Inkubation wurde das Lösen der Zellen vom Zellkulturflaschenboden unter dem Mikroskop kontrolliert. Zusätzliches Beklopfen des Flaschenbodens diente dem besseren mechanischen Lösen der Zellen. Anschließend wurde die Verdauungsreaktion durch Zugabe von 5 ml Kultivierungsmedium gestoppt. Durch den Überschuss an im Medium enthaltenen FBS kommt es zur Hemmung der Protease. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt und für 5 Minuten bei 300 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Kultivierungsmedium resuspendiert. Nach dem Auszählen der Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurden diese für die weitere Kultivierung in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² ausgesät. Die Versuche wurden ebenfalls im Rahmen einer Passage ausplattiert, wobei jeder Probe aus betroffenem Gewebe eine Kontrollprobe aus unbetroffenem Gewebe zugeordnet wurde.

Neben Zellen, die bis zur entsprechenden Versuchspassage herangezuchtet wurden, fanden in dieser Arbeit ebenso im Stickstofftank (Espace 661 Gaz (Air Liquide S.A., Paris, Frankreich) bei -196 °C eingefrorene Zellen Verwendung. Diese wurden bis zur Durchführung der Experimente nach dem Auftauen mindestens einmal passagiert, um eine mögliche Selektion durch eine Zellschädigung beim Temperaturwechsel zu vermeiden. Besonders zu beachten war eine schnelle Durchführung des Auftauvorgangs, welche durch das Erwärmen des Einfrierröhrchens im Wasserbad bei 37 °C gewährleistet wurde, sowie eine anschließend starke Verdünnung des Einfriermediums (hergestellt aus CM und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO (Sigma-Aldrich)) mit Kultivierungsmedium. Außerdem wurde der erste Medienwechsel nach 24 Stunden durchgeführt, um die zytotoxischen Effekte des DMSO auf die Zellen möglichst gering zu halten.

3.3. Kryokonservierung von Stammzellen

Zellen, die nicht sofort benötigt wurden, wurden durch Einfrieren in einen Stickstofftank für spätere Versuche konserviert. Dabei wurden je 10⁶ Zellen in ein Cryo.sTM Einfrierröhrchen (Greiner Bio-One) mit 0,5 ml des Einfriermediums überführt und mittels Einfrierbehälter (NALGENE Nunc International, Rochester, New York, Vereinigte Staaten) schrittweise um 1 °C pro Minute auf -80 °C (Forma ® 900, -86 °C ULT Freezer, Thermo Fisher Scientific) herabgekühlt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen in den Flüssigstickstoffcontainer zur Lagerung bei -196 °C überführt.

3.4. Vitalitätstests mit Resazurin

Die Vitalitätstests wurden mit Zellen der Passage 5 und 6 durchgeführt. Diese wurden in einer Dichte von 2.500 Zellen/cm² in 96 Well-Platten (Greiner Bio-One) ausgesät. Nach Zugabe von 100 µl Kultivierungsmedium pro Well-Platte wurde die Platte über Nacht im Brutschrank inkubiert. Der folgende Tag wurde als Tag 0 (im Folgenden als d0 bezeichnet) definiert. Das Kultivierungsmedium wurde durch eine 1:10 in Kultivierungsmedium verdünnte Resazurinlösung (*Resazurin Sodium Salt* (Sigma-Aldrich), 0,7 µM in PBS verdünnt) ersetzt. Bei Resazurin handelt es sich um einen blauen, nicht fluoreszierenden Redoxfarbstoff, der in den Mitochondrien vitaler Zellen zum fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Gleichzeitig wird NADH zu NAD⁺ oxidiert. Da die Fluoreszenzintensität von Resorufin als proportional zu seiner Konzentration in den Zellen anzusehen ist, lassen sich Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität bzw. Vitalität der Zellen ziehen. Nach einer zweistündigen Inkubation der Resazurinlösung bei 37 °C wurden 90 µl des Überstandes zur Messung der Fluoreszenzintensität in eine neue 96 Well-Platte überführt. Diese wurde mit dem Plattenphotometer Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) bei 520 nm Anregung und 590 nm Emission ermittelt. Die restlichen 10 µl des alten Mediums wurden abgesaugt und die Zellen aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe in Form von Quadruplikaten mit Kultivierungsmedium unterschiedlicher Buparlisibkonzentrationen (0,01 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM (NVP-BKM120 (ChemieTek, Indianapolis, Indiana, Vereinigte Staaten))) behandelt. Die Kontrollproben wurde nicht mit Buparlisib behandelt. Die photometrische Messung wurde an den folgenden 10 Tagen wiederholt. Aus den Quadruplikaten wurden die Mittelwerte errechnet. Alle Säulendiagramme stellen den Mittelwert + die Standardabweichung dar. Die Normalverteilung der Werte wurde mittels Kolmogorov-Smirnow-Test überprüft. Die Signifikanztestung erfolgte mittels zweifaktorieller Anova ohne Messwiederholung (vgl. Abbildung 14 A und 15 A) bzw. einfaktorieller Anova ohne Messwiederholung (vgl. Abbildung 14 B, 14 C, 15 B und 15 C) und dem Bonferroni-Post-Hoc-Test. Ein Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). Bei fehlender Normalverteilung wurde Mann-Whitney-U-Test bzw. eine einfaktorielle Anova nach Kruskal-Wallis und der Dunn's-Post-hoc-Test durchgeführt. Signifikanzen wurden nach obigem Schema mit ♦ statt * gekennzeichnet.

3.5. Adipogene Differenzierung

Um die Auswirkungen der Buparlisibsupplementierung auf die adipogene Differenzierung nachverfolgen zu können, wurden die Stammzellen in den folgenden Versuchen zunächst für zwei Wochen, im späteren Verlauf für eine Woche in adipogenem Differenzierungsmedium (ADM) kultiviert. Dem Kultivierungsmedium wurden dazu 1 μ M Dexamethason und 0,5 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), beide gelöst in DMSO, sowie 200 μ M Indomethacin in Ethanol gelöst und 10 μ M Insulin (10 mg/ml) (alle von Sigma-Aldrich) zugefügt. Die Differenzierung wurde mit Erreichen der Konfluenz gestartet, wobei je nach Versuchsaufbau am gleichen Tag die entsprechenden d0-Kontrollproben erhoben wurden. Für jede Probe, die mit ADM differenziert wurde, wurde eine Kontrollprobe angelegt, die während dieser Zeit mit CM kultiviert wurde.

3.6. Oil Red-Färbung und Quantifizierung

Die Oil Red-Färbung erlaubt die Quantifizierung von in adipogen differenzierten Zellen eingelagerten Triglyceriden anhand ihrer optischen Dichte. Die adipogene Differenzierung der ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe wurde unter Einfluss verschiedener Buparlisibkonzentrationen sowie bei Kultivierung in ADM bzw. CM untersucht. Dafür wurden ASCs der Passage 5 und 6 in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² in eine 24 Well-Platte (Greiner Bio-One) ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz mit CM behandelt. Anschließend wurden die ASCs für eine Woche mit ADM bzw. CM kultiviert, welches mit Buparlisib unterschiedlicher Konzentrationen (0 μ M, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M) supplementiert wurde. Der Medienwechsel erfolgte alle drei Tage.

Nach zwei- bzw. einwöchiger Differenzierung bzw. Kultivierung wurden die Zellen mit Oil Red-Färbelösung gefärbt. Hierfür wurden die Zellen mit 1 ml gekühltem PBS pro Well-Platte gewaschen und mit 500 μ l einer 10%igen Formalinlösung (formalin solution, neutral buffered, 10 % (Sigma-Aldrich) in PBS) fixiert. Nach fünfminütigem Einwirken wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das restliche Formalin mit 500 μ l 60%igem Isopropanol ((Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in PBS) ausgewaschen. Der Überstand wurde ebenfalls gründlich abpipettiert und die 24 Well-Platte zum Trocknen mit offenem Deckel unter dem Abzug (Digestorium Airflow Controller AC2 (Waldner, Wangen im Allgäu, Deutschland)) stehen gelassen. Währenddessen konnte die Oil Red-Färbelösung durch eine 3:2-Verdünnung der Stammlösung (s.u.) mit destilliertem Wasser (ddH₂O (Merck Millipore) hergestellt werden.

Diese wurde im Anschluss durch eine 20 ml Spritze mit aufgesetztem Minisart® NML-Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm Porengröße (Sarstedt)) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen filtriert. Die Stammlösung wurde im Voraus angefertigt und im Kühlschrank (Liebherr, Bulle, Schweiz) bei 4 °C gelagert. Dazu wurden 175 mg Oil Red O (1-([4-(Xylylazo)xylyl]azo)-2-naphthol (Sigma-Aldrich)) in 50 ml Isopropanol gelöst und über Nacht bei 37 °C mit einem Heizrührer (Variomag (Thermo Fisher Scientific)) vermischt. Anschließend wurde die Suspension filtriert. Nachdem die 24 Well-Platte vollständig getrocknet war, wurden je 500 µl der Oil Red-Färbelösung zugegeben. Der *Blank* wurde in einer Well-Platte ohne Zellen angelegt. Die Färbung wurde alle 10 Minuten unter dem Mikroskop bei 40- bzw. 100-facher Vergrößerung kontrolliert. Die Einwirkdauer betrug insgesamt 30-40 Minuten. Schließlich wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und die Well-Platten vier Mal mit 500 µl ddH₂O gewaschen, wobei das Wasser beim letzten Waschen nicht verworfen wurde. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung fotografiert.

Quantifiziert wurde die optische Dichte der Färbungen anschließend durch eine plattenphotometrische Messung (Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific)) bei einer Absorption von 520 nm Wellenlänge. Dazu wurden die Well-Platten drei Mal mit 500 µl 60%igem Isopropanol gewaschen und der Farbstoff durch Zugabe von 200 µl 100%igem Isopropanol extrahiert. Nach fünfminütigem Einwirken wurden 100 µl des Überstandes zur Messung in eine 96 Well-Platte überführt.

Die ursprünglich geplante Kultivierungszeit von zwei Wochen wurde im Verlauf der Versuchsdurchführung aufgrund starker zytotoxischer Einflüsse von Buparlisib auf eine Woche verkürzt. Bei Buparlisibkonzentrationen von 10 µM kam es beim ersten Waschen mit PBS zum Ablösen der Zellen, sodass eine anschließende Quantifizierung nicht mehr möglich war. Infolgedessen wurden auch die Inhibitorkonzentrationen von 1 µM, 5 µM und 10 µM auf 0,1 µM, 1 µM, 5 µM bzw. 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM und 2,5 µM reduziert. Die Säulendiagramme beziehen sich dementsprechend auf die optische Dichte der Oil Red-Färbung nach einwöchiger Kultivierung der Zellen mit adipogenem Differenzierungsmedium.

Bei Patient 1, 2, 6 wurden Duplikate angelegt, für Patient 3, 4, 5 Quadruplikate. Aus den Proben wurden die Mittelwerte errechnet. Alle Säulendiagramme stellen den Mittelwert + die Standardabweichung dar. Die Normalverteilung der Werte wurde mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Da eine Testung auf Normalverteilung bei $n < 2$ nicht möglich ist, erfolgte die weitere Testung von Patient 1,2 und 6 unter Annahme einer Normalverteilung. Die Signifikanztestung erfolgte bei bestehender Normalverteilung mittels zweifaktorieller Anova ohne Messwiederholung und dem Bonferroni-Post-Hoc-Test sowie einem zweiseitigem t-Test

unabhängiger Stichproben. Ein Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). Bei fehlender Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Signifikanzen wurden nach obigem Schema mit ♦ statt * gekennzeichnet.

3.7. RNA-Isolierung

Um die Genexpression von Zellen aus betroffenem und gesundem Gewebe mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vergleichen zu können, musste die RNA zunächst aus den Zellen extrahiert werden. Für die Isolierung wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Mit Ausnahme des β -Mercaptoethanols (Sigma-Aldrich), PBS und des Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) entstammten alle eingesetzten Chemikalien diesem Kit.

Die RNA wurde aus Zellen der Passage 5 und 6 isoliert, wobei diese zuvor in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² in Form von Triplikaten in 6-Well-Platten (Greiner Bio-One) ausgesät wurden. Die Proliferation wurde regelmäßig unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Sobald der Boden der Well-Platten mit Zellen bedeckt war, wurde die RNA der d0-Proben isoliert. Es wurden je drei d0-Proben angelegt. Die restlichen Zellen wurden für eine Woche adipogen differenziert bzw. mit Kultivierungsmedium kultiviert. ADM und CM wurde Buparlisib der Konzentrationen 0 μ M, 1 μ M und 10 μ M zugefügt. Der Medienwechsel erfolgte alle drei Tage. Am siebten Tag der Differenzierung erfolgte die RNA-Extraktion der übrigen Proben.

Dazu wurden die Zellen mit je 2 ml PBS gewaschen und anschließend mittels 350 μ l RLT-Puffer lysiert. Dieser beinhaltet eine hohe Konzentration an chaotropen Salzen, die durch ihre Tonizität zum Aufbrechen der Biomembranen führen und frei gewordene RNasen denaturieren. Der Lysepuffer wurde zuvor mit 1 % β -Mercaptoethanol versetzt, der die RNA vor Oxidation schützt. Nach kurzem Einwirken wurde die Suspension durch mehrmaliges Abspülen der Well-Platten in ein 1,5 ml Sammelgefäß (Sarstedt) überführt und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurde dem Sammelgefäß ein dem Lysepuffer äquivalentes Volumen an 70%igem Ethanol in ddH₂O zugefügt. Die Lösung wurde mittels Auf- und Abpipettierens sorgfältig gemischt und maximal 700 μ l in eine Zentrifugationssäule überführt. Diese beinhaltet eine Silica-Membran, die negativ geladene RNA einer Länge von mehr als 200 Basen durch ihre positive Ladung mit hoher Affinität bindet. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 U/min (Umdrehungen pro Minute) für 30 Sekunden. Der Durchfluss mit Zellmembrantrümmern, DNA, Proteinen, Fettsäuren und Salzen wurde verworfen. Bei einem Gesamtvolumen der Lösung über 700 μ l

wurde der Vorgang entsprechend häufig wiederholt. Die an die Silica-Membran gebundene RNA wurde im weiteren Verlauf unter Zugabe unterschiedlicher Waschpuffer dreimal gewaschen (13.000 U/min, zwei Mal für 30 Sekunden, einmal für zwei Minuten). Zunächst wurden je 700 µl RW1-Puffer in die Säule pipettiert. Für die nächsten beiden Waschvorgänge wurden je 500 µl RPE-Puffer verwendet. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Um die Membran vollständig zu trocknen, wurde das Sammelröhrchen der Isolationssäule gewechselt und bei 13.000 U/min für 60 Sekunden zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß überführt. Durch Zugabe von 30 µl Nuklease-freiem Wasser wurde die RNA bei einer weiteren einminütigen Zentrifugation bei 13.000 U/min aus der Membran eluiert und ihre Konzentration photospektrometrisch (Nano Drop 2000 c, 220-350 nm (Thermo Fisher Scientific)) bestimmt. Die Reinheit der RNA wurde überprüft, indem die Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt wurde. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung im Gefrierschrank bei - 80 °C eingefroren.

Ähnlich wie bei den Versuchen zur adipogenen Differenzierung war der zytotoxische Einfluss von 10 µM Buparlisib auf die Zellen zu hoch, um eine für den weiteren Versuchsaufbau ausreichende Menge RNA zu extrahieren, weshalb die entsprechend behandelten Proben im weiteren Verlauf verworfen wurden.

3.8. Reverse Transkription

Da es sich bei dem in der PCR verwendeten Enzym um DNA-abhängige DNA-Polymerasen handelt, die folglich Desoxyribonukleinsäuren als Matrizen benötigen, musste die extrahierte RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die Reverse Transkription erfolgte unter Verwendung des QuantiTect Reverse Transkription Kits (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben. Alle verwendeten Chemikalien stammten aus diesem Kit.

Zum Entfernen möglicher Reste genomischer DNA in den Proben, die zu falsch-positiven Ergebnissen in den PCRs führen würden, wurde der eigentlichen Reversen Transkription ein DNA-Verdau vorangestellt. Dazu wurden pro 1 µg RNA je 2 µl des 7-fach konzentrierten *gDNA-Wipeout*-Puffers zugegeben und mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14 µl aufgefüllt, welches nach sorgfältigem Mischen für zwei Minuten bei 42 °C im Thermo Cycler CFX96 C1000 Touch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten) inkubiert wurde. Für die Reverse Transkription wurde zu den vorherigen 14 µl aufbereiteter RNA je 4 µl 5-fach konzentrierten RT-Puffer, 1 µl RT Primer Mix und 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase, die für die Umschreibung verantwortliche RNA-abhängige DNA-

Polymerase, pipettiert und ebenfalls gut vermischt. Es folgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 42 °C. Bei den hinzugefügten Primern handelte es sich einerseits um spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindende Oligo-dT-Primer, andererseits um Primer mit kurzen zufälligen Sequenzen, die nicht spezifisch für ein bestimmtes Gen sind, sondern deren komplementäre Sequenzen überall im Genom vorkommen, sog. *Random Hexamer Primer*. Durch die unterschiedlichen Bindungseigenschaften wurde die vollständige Umschreibung der gesamten in den Proben enthaltenen RNA bewerkstelligt. Durch eine anschließende dreiminütige Inkubation bei 95 °C wurden die Reverse Transkriptase sowie gebildete RNA-DNA-Hybridmoleküle denaturiert. Die erhaltene cDNA wurde für die weitere Verwendung auf Eis gestellt oder im Gefrierschrank bei -20 °C (Liebherr) eingefroren.

3.9. Polymerasekettenreaktion

Mit der Polymerasekettenreaktion können spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert und bezüglich ihrer Expression untersucht werden. Dabei wird die gebildete Kopienzahl der mRNAs der Zielgene bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe miteinander verglichen, die zuvor auf die Kopienzahl eines sogenannten *Housekeeping*-Gens, welches unabhängig des physiologischen Zustands der Zelle exprimiert wird, normalisiert wurden. Durch dieses Verhältnis können Rückschlüsse über Regulationsvorgänge in den Zellen gezogen werden. Als *Housekeeping*-Gen wurde GAPDH verwendet. Als Zielgene wurden die proapoptotisch wirksamen Gene von Apoptoseregulator BAX (BAX1), Bad (BAD), Apoptoseregulator BAK (BAK1), Caspase 3 (CASP3) Tumorprotein p53 (TP53) und Retinoblastom-assoziiertem Protein (RB1) bzw. antiapoptotisch wirksame Gene von Apoptoseregulator Bcl-2 (BCL2) und Bcl-X(L), welcher durch BCLXL codiert wird, sowie Gene des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs, wie PIK3R1, PIK3CA, PTEN, AKT1, MTOR, EIF4EBP1 und RPS6KB1 untersucht.

Für die Amplifikation wurde der DyNAmo ColorFlash SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) gemäß den Herstellerangaben verwendet, der die benötigten Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), den für die Reaktionsbedingungen optimalen Puffer, die DNA-Polymerase und SYBR Green beinhaltet. Des Weiteren wurden Primer benötigt, die eine definierte komplementäre Sequenz des Zielgens spezifisch binden. Bezogen wurden die Primer von Eurofins MWG Operon (Louisville, Kentucky, Vereinigte Staaten). Die Primersequenzen wurden mit der Primer-Blast-Software auf der Homepage des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* erstellt, welches der *United States National*

Library of Medicine (NLM) untergeordnet ist. Diese ist Bestandteil des *National Institutes of Health (NIH)*. Tabelle 1 zeigt eine Auflistung aller verwendeten PCR-Primer, deren Basenabfolge und Annealing-Temperatur.

Tabelle 1: Codierende Gene, Sequenzen und Annealing-Temperaturen der verwendeten PCR-Primer

Gen		Sequenz	Annealing-Temperatur
GAPDH	forward	5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'	60 °C
	reverse	5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'	
BAD	forward	5'-TCACAAATCCTCCCCAAGTGG-3'	60 °C
	reverse	5'-GAATGCGCCCTAAATCACTGA-3'	
BAX1	forward	5'-TTCCGAGTGGCAGCTGAGATGTTT-3'	60 °C
	reverse	5'-TGCTGGCAAAGTAGAAGAGGGCAA-3'	
BAK1	forward	5'-TCATCGGGGACGACATCAAC-3'	63 °C
	reverse	5'-CAAACAGGCTGGTGGCAATC-3'	
CASP3	forward	5'-GCAAACCTCAGGGAAACATT-3'	60 °C
	reverse	5'-TTTTTCAGGTCAACAACAGGTCCA-3'	
TP53	forward	5'-GGAGTATTTGGATGACAGAAAC-3'	60 °C
	reverse	5'-GATTACCACTGGAGTCTTC-3'	
RB1	forward	5'-TTGGATCACAGCGATACAAACTT-3'	60 °C
	reverse	5'-AGCGCACGCCAATAAAGACAT-3'	
BCL2	forward	5'-ATCGCCCTGTGGATGACTGAG-3'	60 °C
	reverse	5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'	
BCL-XL	forward	5'-GCCACTTACCTGAATGACCACC-3'	60 °C
	reverse	5'-AACCAGCGGTTGAAGCGTTCCT-3'	
PIK3R1	forward	5'-ACCACTACCGGAATGAATCTCT-3'	60 °C
	reverse	5'-GGGATGTGCGGGTATATTCTTC-3'	
PIK3CA	forward	5'-AGAGCCCCGAGCGTTTCTG-3'	62 °C
	reverse	5'-GGTCGTGGAGGCATTGTTCT-3'	
PTEN	forward	5'-GGACGAACTGGTGTAAATGATATG-3'	60 °C
	reverse	5'-TCTACTGTTTTTGTGAAGTACAGC-3'	

AKT1	forward	5'-TCTATGGCGCTGAGATTGTG-3'	57 °C
	reverse	5'-CTTAATGTGCCCGTCCTTGT-3'	
MTOR	forward	5'-CGAAGCCGCGCGAACC-3'	59 °C
	reverse	5'-ATTCCGGCTCTTTAGGCCAC-3'	
EIF4EBP1	forward	5'-GGAGTGTGCGGAACCTACCTG-3'	59 °C
	reverse	5'-ACTGTGACTCTTCACCGCC-3'	
RPS6KB1	forward	5'-TGTCGACAGCCCAGATGACT-3'	60 °C
	reverse	5'-ATTTGACTGGGCTGACAGGT-3'	

Für die Durchführung der PCR wurden je 5 µl zweifach konzentrierter DyNamo ColorFlash SYBR Green Master Mix, 0,5 µl *forward* Primer (10 pmol/µl), 0,5 µl *reverse* Primer (10 pmol/µl) und 3 µl RNase freies Wasser zu 1 µl (50 ng) der cDNA-Proben in eine 48 Well-Platte (Greiner Bio-One) pipettiert. Außerdem wurde eine *No Template Control* angelegt, bei der statt der cDNA 1µl RNase freies Wasser zugegeben wurde. Nach der Zentrifugation (EcoSpin™ Zentrifuge, Elmi, Riga, Lettland) zum Entfernen vorhandener Luftbläschen wurde die PCR-Software des Illumina Eco Real-Time PCR Systems (San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) gestartet. Die PCR wurde anhand des folgenden Schemas durchgeführt:

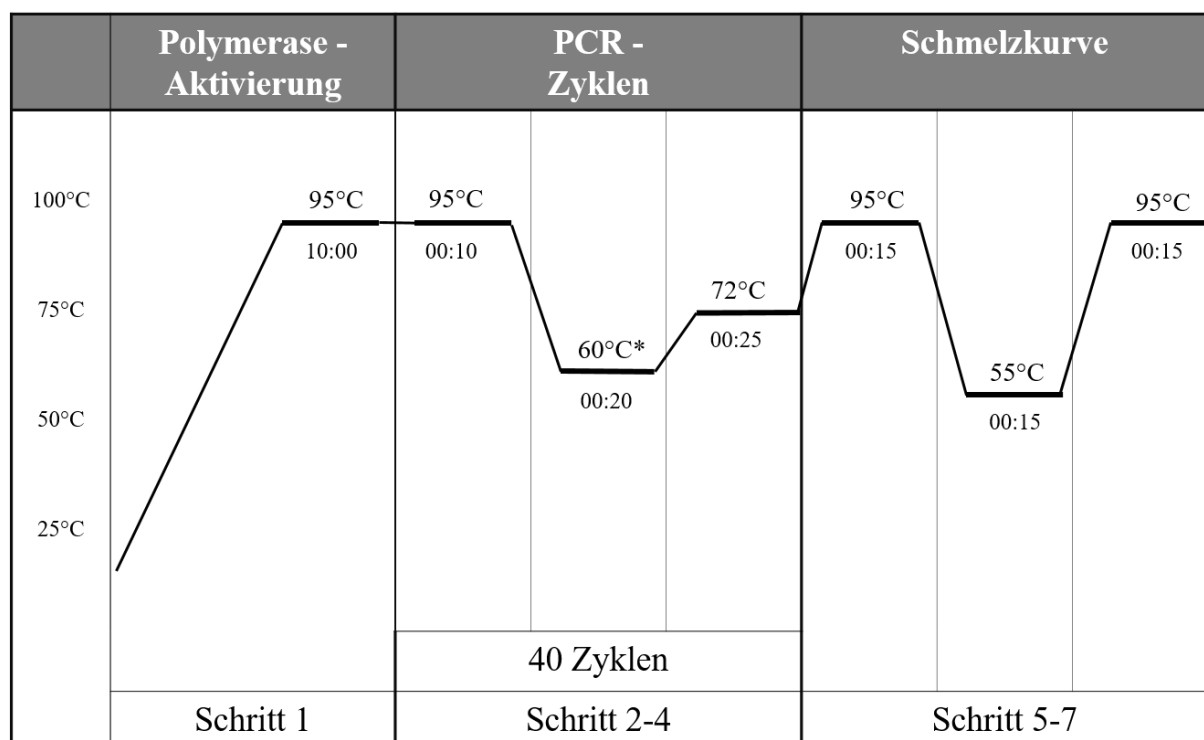


Abbildung 129: Schematische Darstellung der einzelnen PCR-Schritte. *Annealing-Temperatur abhängig vom Primer (in der Regel 60 °C). (eigener Entwurf in Anlehnung an das PCR-Layout der Software des Illumina ECO Real-Time PCR Systems)

Zu Beginn der quantitativen *real-time* RT-PCR (qRT-PCR) wurde die Polymerase bei einer initialen Inkubation von 95 °C aktiviert. Dabei wurde die Bindung des Enzyms an einen stabilisierenden Antikörper gelöst, der einen vorzeitigen Start der Polymerisation bei niedrigeren Temperaturen verhindert. Daher wird diese auch als Hot-Start-Polymerase bezeichnet. Bei einer weiteren Denaturierung bei 95 °C wurden die im Verlauf gebildeten DNA-Doppelstränge voneinander getrennt. Im dritten Schritt lagerten sich die Primer bei ihrer spezifischen Annealing-Temperatur an die zu ihnen komplementären Basensequenzen der cDNA an. Bei 72 °C wurden die Primer anschließend von der Polymerase in 5'-3'-Richtung verlängert (Schritt 4). Außerdem erfolgte am Ende jedes 4. Schrittes eine Fluoreszenzmessung des SYBR Green-Farbstoffes. Dieser interkaliert in doppelsträngige DNA und wird auf diese Weise zur Anregung der Fluoreszenz befähigt. Durch die Zunahme der gemessenen Fluoreszenz am Ende jedes Amplifikations-Zyklus konnte die Menge an neu synthetisierter DNA in Echtzeit quantifiziert werden. Insgesamt durchlief die cDNA 40 Polymerisationszyklen (Schritt 2-4).

Zum Ende jeder PCR wurde ein Schmelzkurvenprogramm (Schritt 5-7) durchgeführt, um zu überprüfen, ob die gemessene Fluoreszenz nur auf ein entstandenes Produkt zurückzuführen ist. Die Fluoreszenz wurde während des Schmelzkurvenprogramms kontinuierlich gemessen. Dazu wurden die komplementären DNA-Stränge bei 95 °C getrennt und auf 55 °C herabgekühlt, wobei sich die entstandenen Einzelstränge neu zusammenlagerten. Anschließend wurden die Proben um 0,1 °C/s bis auf 95 °C erwärmt. Während des Temperaturanstieges kam es zum erneuten Auftrennen der Doppelstränge, was durch einen Fluoreszenzabfall detektiert wurde. Je mehr Basen komplementär gebunden waren, desto eine höhere Temperatur wurde benötigt, um die zwischen den Strängen ausgebildeten Wasserstoffbrücken (bei Guanin-Cytosin-Bindungen drei, bei Adenin-Thymin-Bindungen zwei) zu lösen. Zu Beginn des Schmelzprogramms wurde eine relativ hohe Fluoreszenzintensität gemessen, da bei 55 °C viele DNA-Moleküle auch unspezifisch doppelsträngig vorlagen. Diese konnten im weiteren Verlauf bei relativ niedrigen Temperaturen voneinander getrennt werden. Da die unspezifisch gebundenen Sequenzen im Vergleich zum Hauptprodukt der PCR nur in geringer Menge vorhanden waren, blieb der Fluoreszenzabfall zunächst gering. Wurde eine bestimmte Temperatur erreicht, lösten sich die Doppelstränge des spezifischen PCR-Produkts und die Fluoreszenz fiel aufgrund seiner hohen Kopienzahl schlagartig ab. Bei dieser Temperatur handelte es sich um die für die amplifizierte Gensequenz spezifische Schmelztemperatur, die von der Länge der Sequenz und dem GC-Basengehalt abhängt. Der Graph der Schmelzkurve

wurde durch die verwendete Software ersten Grades abgeleitet, wobei sich Abfall der Fluoreszenzintensität als Maximum darstellte. Lag der Peak nicht bei der für die zu untersuchenden Gensequenz spezifische Schmelztemperatur oder waren mehr als ein Peak vorhanden, konnte von der Amplifizierung eines vom Primer unspezifisch gebunden DNA-Abschnittes ausgegangen werden. Daten einer solchen PCR wurden nicht verwendet.

Als Ergebnis der PCR wird der sogenannte Ct-Wert errechnet. Dieser entspricht der Anzahl an PCR-Zyklen, bei der die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (260) kann anschließend die relative Genexpression bestimmt werden. Dabei wird der erhaltene Ct-Wert zum einen auf ein *Housekeeping*-Gen normiert, zum anderen auf eine als Kalibrator definierte Probe. Zunächst wird die Differenz zwischen dem Ct-Wert des *Housekeeping*-Gens und des Zielgens gebildet ($\Delta\text{Ct Probe} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$). Als *Housekeeping*-Gen wurde GAPDH verwendet, das für die Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase verantwortlich ist. Es wird angenommen, dass das Enzym unabhängig des physiologischen Zustands der Zelle exprimiert wird. Bei der zweiten Normierung ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Probe} - \Delta\text{Ct Kalibrator}$) wurde sich in dieser Arbeit auf den Mittelwert der d0-Proben von Zellen aus unbetroffenem Gewebe bezogen. Da sich die zu untersuchenden Gensequenzen unter der Annahme einer 100%igen PCR-Effizienz mit jedem Zyklus verdoppeln, entspricht die relativen Genexpression einer normierte Zyklendifferenz von $2^{\Delta\Delta}$.

Zur statistischen Analyse wurde der Mittelwert der relativen Genexpression der Zellen, die in Form von Triplikaten angelegt wurden, sowie die Standardabweichung ermittelt. Alle Säulendiagramme stellen den Mittelwert + die Standardabweichung dar. Die Normalverteilung der Werte wurde mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Die Signifikanztestung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test unabhängiger Stichproben. Ein Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). Bei fehlender Normalverteilung wurde Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Signifikanzen wurden nach obigem Schema mit ♦ statt * gekennzeichnet.

3.10. Proteinisolierung

Da durch die RNA-Analyse keine konkrete Aussage über die spätere Translation und damit über die gebildeten Proteine von Zellen aus betroffenem Gewebe getroffen werden kann, wurde deren Proteinexpression als weitere Regulationsebene durch *Immunoblotting* untersucht. Dafür wurden Zellen der Passage 6 von gesundem und betroffenem Gewebe in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² in je 6 Zellkulturschalen (Greiner Bio-One) ausplattiert und bis zur vollständigen

Konfluenz mit Kultivierungsmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für eine Woche mit CM kultiviert, welches mit Buparlisib der Konzentration 1 μ M supplementiert wurde. Außerdem wurden Kontrollen ohne Buparlisibzugabe angelegt. Am siebten Tag wurden die Proteine isoliert. Dazu wurden die Schalen mit ca. 5 ml einer Hank's Balanced Salt Solution (HBSS (Sigma-Aldrich), 1:3 verdünnt in autoklaviertem Leitungswasser) gewaschen. Es wurde bewusst auf den Einsatz phosphathaltiger Puffer verzichtet, um deren spätere Interaktion mit phosphorylierungssensitiven Antikörpern auszuschließen. Nach Zugabe weiterer 5 ml HBSS wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt) vom Plattenboden gelöst und die Suspension in einem 15 ml Sammelgefäß (Sarstedt) auf Eis gestellt. Das Überführen der Zellen wurde lichtmikroskopisch überprüft. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation (Rotina 380 R) bei 300 rcf. Die Zellpellets wurde in je 100 μ l eines Proteinlysepuffers resuspendiert, der sich aus einem RIPA-Puffer (5 ml eines 1M Tris pH 8,8, 3 ml einer 5M NaCl-Lösung, 1 ml Triton-X-100, 1 ml 10 % SDS-Puffer auf 100 ml Aqua dest (Sigma-Aldrich)) zum Lösen der Zellmembranen und den Protease-Inhibitoren cOmplete™ (Roche Holding AG, Basel, Schweiz) und PhosSTOP™ (Roche Holding AG) zusammensetzte. Bei einer zwanzigminütigen Zentrifugation (Heraeus™ Biofuge Fresco, Thermo Fisher Scientific) bei 4 °C und 13.000 U/min wurden die Proteine von den Zellresten separiert, welche sich als Pellet niederschlugen. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden ohne das Pellet zu berühren in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß überführt und 5 μ l für die anschließende Konzentrationsmessung aliquotiert. Die Proteinproben wurden bis zur Verwendung in der Gelelektrophorese im Gefrierschrank bei - 80 °C eingefroren.

Die Konzentrationsmessung der in den Proben enthaltenen Proteine erfolgte unter Verwendung des DC™ Protein Assay Kits (Bio-Rad Laboratories) mit den enthaltenen Reagenzien A, B und S. Zunächst wurde eine Eichlösung bekannter Proteinkonzentration durch eine 1:2 Verdünnungsreihe des Proteinstandards II (1,38 mg/ml (Bio-Rad Laboratories)) mit destilliertem Wasser hergestellt. Diese wurde in Form von Triplikaten von je 5 μ l der Konzentrationen 1,38 mg/ml, 0,69 mg/ml, 0,345 mg/ml, 0,1725 mg/ml, 0,08625 mg/ml und 0,043125 mg/ml in eine 96 Well-Platte pipettiert. Die zu untersuchenden Proteine wurden im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnt und ebenfalls als 5 μ l-Triplikate angelegt. Anschließend wurden je 25 μ l einer Suspension aus den Reagenzien A und S zu den Proben und dem Proteinstandard gegeben, wobei pro benötigtem Milliliter des Reagenz A 20 μ l des Reagenz S supplementiert wurden. Durch die Zugabe von je 200 μ l des Reagenz B wurde eine Reaktion in Gang gesetzt, die zu einem Farbumschlag entsprechend der in den Proben enthaltenen Proteinkonzentration führte. Dabei wird das im Reagenz A enthaltene Kupfer unter alkalischen

Bedingungen zu Cu^+ reduziert, welches sich primär mit den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, aber auch mit Cytosin, Cystein und Histidin zu einem Protein-Kupfer-Komplex zusammenlagert. Dieser Komplex reduziert anschließend das im Substrat B enthaltene Folin-Ciocalteu-Reagenz zu einem blauen Molybdän-Farbstoff. Je mehr Protein in den Proben enthalten war, desto intensiver wurde die Blaufärbung. Nach einer fünfzehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur unter lichtgeschützten Bedingungen wurden die optischen Dichte der Proben und der Standardreihe bei 750 nm kolorimetrisch mit dem Varioskan-Plattenphotometer bestimmt. Durch den Vergleich mit der Eichlösung bekannter Proteinkonzentration wurde die Konzentration der Proben errechnet. Diese Methode beruht auf einer Modifizierung der Lowry-Proteinkonzentrationsbestimmung (261). Aus den Konzentrationen der Triplikate wurden die Mittelwerte errechnet.

3.1.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine nach ihrer Ladung und ihrem Molekulargewicht auftrennen. Diese werden zuvor durch die Zugabe von SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat (Sigma-Aldrich)) denaturiert und in ihre anionische Form überführt. Unter der Wirkung eines elektrischen Feldes durchlaufen sie anschließend zwei Polyacrylamidgele unterschiedlicher Porengröße in Richtung Anode. Das weitmaschige Sammelgel ermöglicht den gleichzeitigen Start der Proben zur Proteinauftrennung. Dabei erzeugen das Vorläuferion Chlorid und das Folgemolekül Glycin, welches durch den niedrigen pH vor allem in seiner ungeladenen Form vorliegt, eine Spannung entlang ihrer Ladungsverteilung, in der sich die Proteine bewegen. Diese werden an der Chlorid-Ionen-Front in Form einer Bande aufkonzentriert bis sie das engmaschige Trenngel erreichen. Dort geht der Sammeleffekt aufgrund eines höheren pHs verloren. In Abhängigkeit der Ladungsanzahl und Molekülgröße wandern die Proteine unterschiedlich schnell durch die Gelmatrix, die wie ein Sieb wirkt. Je kleiner und negativer geladen das Protein war, desto weiter konnte es im Gel fortschreiten. Die Lage der Banden der Proben wird im Anschluss mit den Banden eines Massenstandards verglichen, der eine Leiter bekannter Molekülgrößen abbildet.

Für die SDS-PAGE wurde das Mini-PROTEAN™ Tetra Cell System in Kombination mit dem PowerPac™ HC High-Current Power Supply von Bio-Rad Laboratories verwendet. Die Polyacrylamidgele wurden selbst gegossen. Der Vernetzungsgrad des Trenngels wurde dabei an das Molekulargewicht des zu nachzuweisenden Proteins angepasst. Das Sammelgel wurde stets in 5%iger Konzentration hergestellt. Das Trenngel wurde aus dem entsprechenden

Gelpuffer (aus eigener Herstellung), APS (Ammoniumperoxidsulfat, 10 % (Carl Roth) und TEMED (Carl Roth) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde die Isopropanol-Phase entfernt. Das Sammelgel wurde analog hergestellt und ein Kamm für die Proteintaschen eingesetzt. Tabelle 2 stellt eine Übersicht über die genaue Zusammensetzung der eingesetzten Sammel- und Trenngele dar. Die Gelkammer wurde nach dem Aushärten des Sammelgels in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und diese bis zur vorgegebenen Markierung mit einfach konzentriertem Laufpuffer (aus eigener Herstellung – vgl. Tabelle 3) befüllt. Der Kamm wurde vorsichtig abgenommen. Die Proteinproben wurden mit 15 µl einfach konzentriertem Laemmli-Puffer ((Bio-Rad Laboratories) 20:1 verdünnt mit β-Mercaptoethanol) und RIPA-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C gekocht (Thermomixer comfort (Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland)). Das Kochen führt zum Auffalten der Proteine, da Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur durch die Hitze zerstört werden. Die Proteinproben wurden zu je 30 µl in die Geltaschen pipettiert. Außerdem wurden 10 µl eines Proteinstandards aufgetragen. Bis sich die Proteine am Unterrand des Sammelgels gesammelt haben, wurde für die Gelelektrophorese eine Spannung von 80 V angelegt. Sobald die Proteine ins Trenngel gewandert waren, wurde diese für die Restlaufzeit auf 140 V erhöht.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Gel	Bestandteile des Gelpuffers		Eingesetzte Volumina pro Gel	
Sammelgel 5 %	Aqua dest.	36 ml	Gelpuffer	1,485 ml
	Acrylamid 30 %	30 ml	APS 10 %	16 µl
	Tris 0,5M (pH 6,8)	22,5 ml	TEMED	3 µl
	SDS 10 %	9 ml		
Trenngel 10 %	Aqua dest.	36 ml	Gelpuffer	4,485 ml
	Acrylamid 30 %	30 ml	APS 10 %	30 µl
	Tris 1,5M (pH 8,8)	22,5 ml	TEMED	10 µl
	SDS 10 %	0,9 ml		

Tabelle 3: Zusammensetzung der Laufpuffer

Laufpuffer	Bestandteile des Puffers	Eingesetzte Menge
Laufpuffer 10x	Tris Base	29,0 g
	Glycin	144,0 g
	SDS	10 g
	Auf 1 Liter Aqua dest.	

Laufpuffer 1x	Tris Base Glycin SDS Auf 1 Liter Aqua dest.	2,9 g 14,4 g 1 g
----------------------	--	------------------------

3.12. Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zur Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, auf der sie für weitere Antikörperreaktionen zugänglich sind. Die Methode geht auf die 1975 von Edwin Southern erfundene Blotting-Technik zum Nachweis von DNA-Fragmenten zurück, welche er als Southern-Blot etablierte (262). Entsprechend wurde der RNA-Nachweis als Northern Blot, der Proteinnachweis als Western Blot bezeichnet.

Beim *Blotten* durchlaufen die Proteine ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld in Richtung Pluspol, wobei sie durch ionische und polare Wechselwirkungen an eine anodenseitig gelegene Membran binden. Das Bandenmuster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt erhalten. Anschließend werden die Proteine durch zwei Antigen-Antikörper-Reaktionen nachgewiesen. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an das Epitop des gesuchten Proteins. An den Fc-Teil des primären Antikörpers lagert sich wiederum der sekundäre Markierungsantikörper an, über den die Detektion erfolgt. Die verwendeten Antikörper werden im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 4: Primäre Antikörper

Name	Hersteller	Verdünnung
Mouse-anti-GAPDH	Abcam	1:2.000
Rabbit-anti-β-Actin	Abcam	1:5.000
Rabbit-anti-PIK3CA	Thermo Fisher Scientific	1:5.000
Rabbit-anti-p70 S6 Kinase	Merck Millipore	1:1.000
Mouse-anti-phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)	Merck Millipore	1:500

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper

Name	Hersteller	Verdünnung
IRDye® 800CW Goat Anti-Rabbit IgG	LI-COR Biosciences	1:15.000

IRDye® 680RD Goat Anti-Rabbit IgG	LI-COR Biosciences	1:10.000
IRDye® 800CW Goat Anti-Mouse IgG	LI-COR Biosciences	1:10.000
IRDye® 680RD Goat Anti-Mouse IgG	LI-COR Biosciences	1:15.000

Für den Western Blot wurde eine Nitrocellulosemembran (Amersham™ Protran® 0.2 NC, 300 mm x 4 m (GE HealthCare Technologies, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten)) verwendet. Der Western Blot wurde so aufgebaut, dass das Gel und die Nitrocellulose-Membran jeweils von zwei in einfachkonzentriertem Transferpuffer (aus eigener Herstellung – vgl. Tabelle 6) getränkten Whatman-Filterpapieren (Grade 3MM CHR (Cytiva, Marlborough, Massachusetts, Vereinigte Staaten)) und einem Schwamm in der Western-Blot-Kammer umgeben waren. Die Membran wurde zunächst für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttelgerät (Polymax 2040, Stufe 5 (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland)) in 10 ml Odyssey® Blocking Buffer ((LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Vereinigte Staaten), 1:4 verdünnt in PBS) inkubiert. Mit den im Blocking Buffer enthaltenen Proteinen wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran besetzt. Nach dem Entfernen des Blockierungspuffers wurde der primäre Antikörper zugegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttelgerät (Stufe 150-200 (Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland)) inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und die Membran zum Entfernen überschüssiger Antikörper drei Mal für fünf Minuten unter Schütteln (Polymax 2040, Stufe 7) in ca. 20 ml eines TBS-Tween®-Puffer (*Tris-buffered saline stocking solution* mit 0,1 % Tween®-20-Lösung (Sigma-Aldrich)) gewaschen. Schließlich wurde der Sekundärantikörper zugegeben. Die Detektion erfolgte mittels eines an den Sekundärantikörper gekoppelten Farbstoffs IRDye® 680RD bzw. 800CW, der im Infrarotbereich emittiert. Nach 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttelgerät (Polymax 2040, Stufe 5) wurde der Sekundärantikörper entfernt und die Nitrocellulosemembran erneut drei Mal für fünf Minuten in TBS-Tween®-Puffer gewaschen. Die Visualisierung des Western Blots erfolgte mit dem Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

Das Western Blot-*Stripping* bezeichnet das Ablösen des primären und sekundären Antikörpers von den Proteinen, wodurch diese für eine weitere Immundetektion zur Verfügung stehen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Membranen zwei Mal gestrippt. Dazu wurde die Membran für zehn Minuten in einfachkonzentrierten *NewBlot™ Nitro Stripping Buffer* (LI-COR Biosciences) 5x, verdünnt in ddH₂O) inkubiert (Polymax 2040, Stufe 5) und anschließend drei

Mal für fünf Minuten in TBS-Tween gewaschen. Nach dem zehnminütigen Blockieren freier Bindungsstellen durch die Zugabe von 10 ml Odyssey® Blockierungspuffer (1:4 verdünnt in PBS) wurde der neue Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C auf ein Schüttelgerät (Stufe 150-200 (Edmund Bühler GmbH)) gestellt. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Transferpuffer

Transferpuffer	Bestandteile des Puffers	Eingesetzte Menge
Transferpuffer 10x	Tris Base Glycin Auf 1 Liter Aqua dest.	30,0 g 144,0 g
Transferpuffer 1x	Transferpuffer 10x Methanol Aqua dest.	100 ml 200 ml 1000 ml

Mittels Western Blots wurde einerseits die Proteinexpression der PI3-Kinase selbst, sowie die Expression der RPS6-Kinase 1 und dem Anteil der phosphorylierten p-RPS6-Kinase 1 am Gesamtprotein bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe untersucht. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 5 und 6 aufgeführt. Insgesamt wurden drei Patienten untersucht. Die Proben wurden als Unikate angelegt. Die Auswertung der Western Blots erfolgte mittels Quantifizierung der optischen Dichte der Banden des jeweiligen Zielgens, die mit der optischen Dichte der Bande des *Housekeeping*-Gens derselben Probe ins Verhältnis gesetzt wurden. Als *Housekeeping*-Gene wurden GAPDH und β -Actin verwendet. Zur statistischen Analyse wurde der Mittelwert der Proteinexpression der ASCs aller Patienten sowie die Standardabweichung ermittelt und als zusammenfassendes Diagramm dargestellt, welches den Mittelwert + die Standardabweichung zeigt. Bei Darstellung der Proteinexpression der einzelnen Patienten wurde folglich auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Die Normalverteilung der Werte wurde für das zusammenfassende Diagramm mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Bei der Darstellung der einzelnen Patienten wurde von einer Normalverteilung ausgegangen. Die Signifikanztestung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test unabhängiger Stichproben. Ein Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). Bei fehlender Normalverteilung wurde Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Signifikanzen wurden nach obigem Schema mit ♦ statt * gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Vitalitätstests mit Resazurin

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Vitalitätstests mit Resazurin der ASCs von insgesamt 12 Patienten unter der Behandlung von Buparlisib unterschiedlicher Konzentrationen im zeitlichen Verlauf nach einem, drei und sechs Tagen dargestellt. Hierbei wurde aus allen Patientendaten die durchschnittliche Fluoreszenzintensität ermittelt (vgl. Abbildung 13). Übersichtshalber wurden Inhibitorkonzentrationen von 0 μM , 0,1 μM , 1 μM , 2,5 μM und 5 μM in die Gesamtdarstellung einbezogen

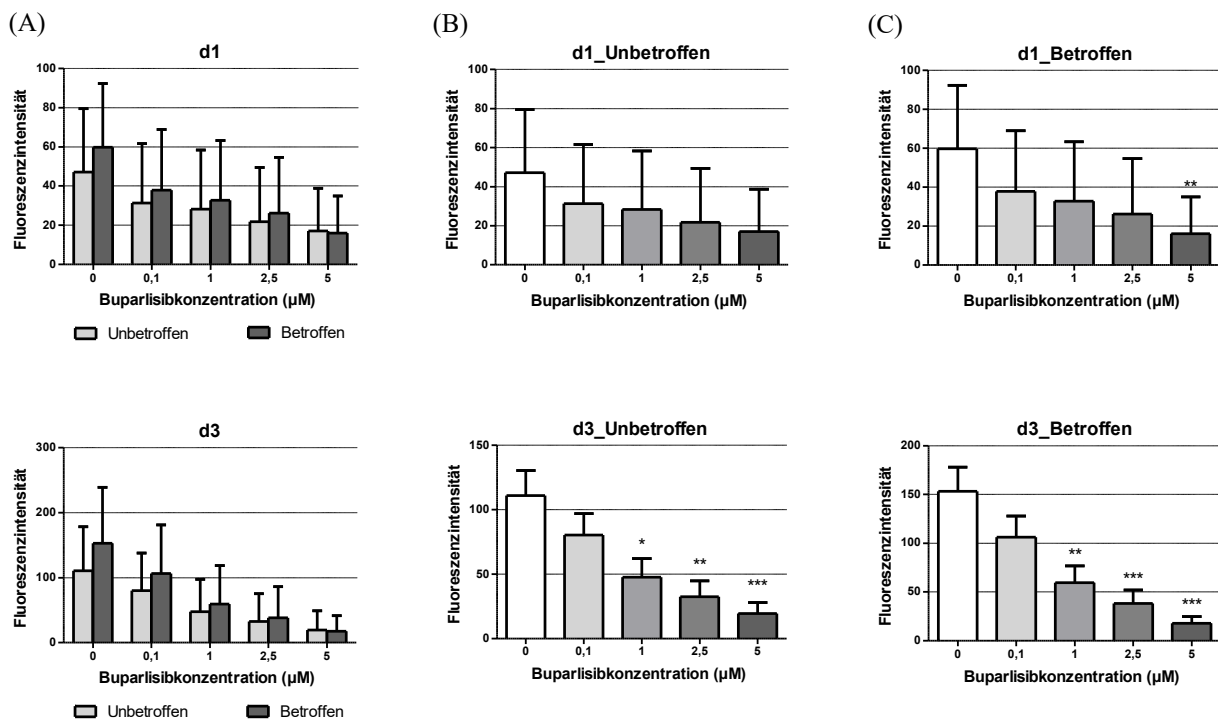
ASCs aus betroffenem Gewebe zeigten an d1, d3 und d6 im unbehandelten Zustand stets eine höhere durchschnittliche Fluoreszenzintensität als ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 13 A, d1-d6). Unter Zugabe von Buparlisib wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität bei beiden Zellarten konzentrationsabhängig reduziert, wobei die Fluoreszenzintensität der ASCs aus betroffenem Gewebe durch Zugabe von 5 μM Buparlisib an allen Tagen unter das Niveau von ASCs aus unbetroffenem Gewebe gesenkt werden konnte. ASCs aus betroffenem Gewebe wurden durch die Behandlung mit Buparlisib ab d1 signifikant gehemmt (vgl. Abbildung 13 C, d1), ASCs aus unbetroffenem Gewebe hingegen ab d3 (vgl. Abbildung 13 B, d3). Des Weiteren wurden ASCs aus betroffenem Gewebe bei gleicher Konzentration mit höherem Signifikanzniveau gehemmt als ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 13 B und C, d3 und d6).

Am ersten Tag nach Start der Versuchsreihe (vgl. Abbildung 13, d1) wiesen ASCs aus betroffenem Gewebe im unbehandelten Zustand im Durchschnitt eine Fluoreszenzintensität von 59,76 auf, ASCs aus unbetroffenem Gewebe von 47,20. Die Fluoreszenzintensität von ASCs aus betroffenem Gewebe konnte durch die Zugabe von Buparlisib unterschiedlicher Konzentrationen schrittweise bis auf einen Wert von durchschnittlich 16,04 gesenkt werden. Bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe führte die Zugabe von 5 μM Buparlisib zu einer Reduktion der Fluoreszenzintensität auf einen Wert von durchschnittlich 17,01. Bei ASCs aus betroffenem Gewebe ließ sich durch Behandlung mit 5 μM Buparlisib bereits eine hoch signifikante Reduktion der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Ausgangswert feststellen (vgl. Abbildung 13 C, d1).

Nach drei Tagen (vgl. Abbildung 13, d3) konnte bei unbehandelten ASCs aus betroffenem Gewebe eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 153,2 nachgewiesen werden, bei

ASCs aus unbetroffenem Gewebe eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 110,9. Die Fluoreszenzintensität konnte bei ASCs aus betroffenem Gewebe durch die Zugabe von Buparlisib der Konzentration von 5 μM auf einen Wert von 17,84 und bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe auf einen Wert von 19,48 gesenkt werden. Die Fluoreszenzintensität beider Zellarten wurde ab einer Konzentration von 1 μM signifikant zur unbehandelten Probe gesenkt, wobei das Signifikanzniveau bei ASCs aus betroffenem Gewebe höher war als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 13 B und C, d3).

Nach dem sechsten Tag nach Start der Versuchsreihe (vgl. Abbildung 13, d6) ließ sich bei ASCs aus betroffenem Gewebe im unbehandelten Zustand eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 460,78, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe von 316,58 detektieren. Durch die Zugabe von Buparlisib wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität bei ASCs aus betroffenem Gewebe schrittweise bis auf einen Wert von 30,58 gesenkt, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bis auf einen Wert von 33,6. Ab einer Inhibitorkonzentration von 1 μM wurden beide Zellarten dabei signifikant zu ihrem Ausgangswert gehemmt (vgl. Abbildung 13 B und C, d6). Dabei unterschieden sich die behandelten Proben von ASCs aus betroffenem Gewebe zu einem höheren Signifikanzniveau von ihren unbehandelten Kontrollen als die ASCs aus gesundem Gewebe.



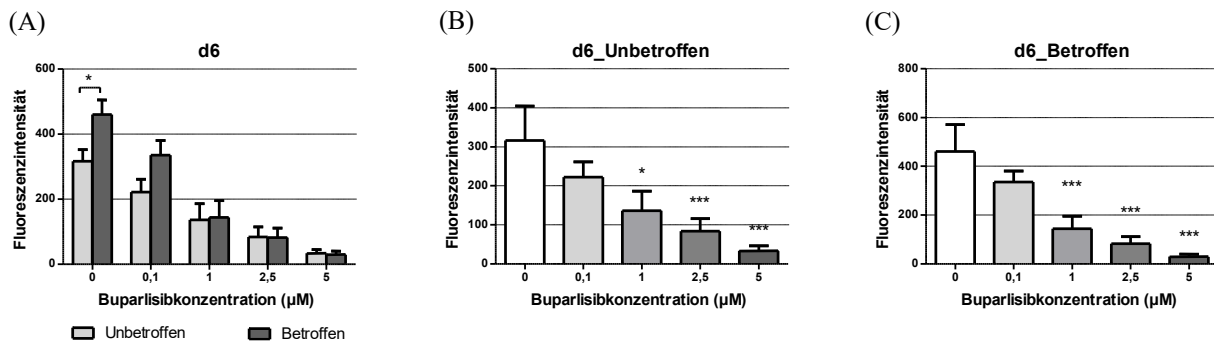


Abbildung 13: Vitalitätssays der ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nach einem, drei und sechs Tagen unter Buparlisibbehandlung der Konzentrationen 0 µM, 0,1 µM, 1 µM, 2,5 µM und 5 µM sowie zweistündiger Inkubation mit Resazurin. x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: Fluoreszenzintensität; (A): Vergleich der Fluoreszenzintensität der ASCs aus unbetroffenem (hellgrau) und betroffenem (dunkelgrau) Gewebe untereinander bei den unterschiedlichen Buparlisibkonzentrationen; (B): Vergleich der Fluoreszenzintensität der ASCs des unbetroffenen Gewebes unter Behandlung mit Buparlisib der unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; (C): Vergleich der Fluoreszenzintensität der ASCs des betroffenen Gewebes unter Behandlung mit Buparlisib der unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung, Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

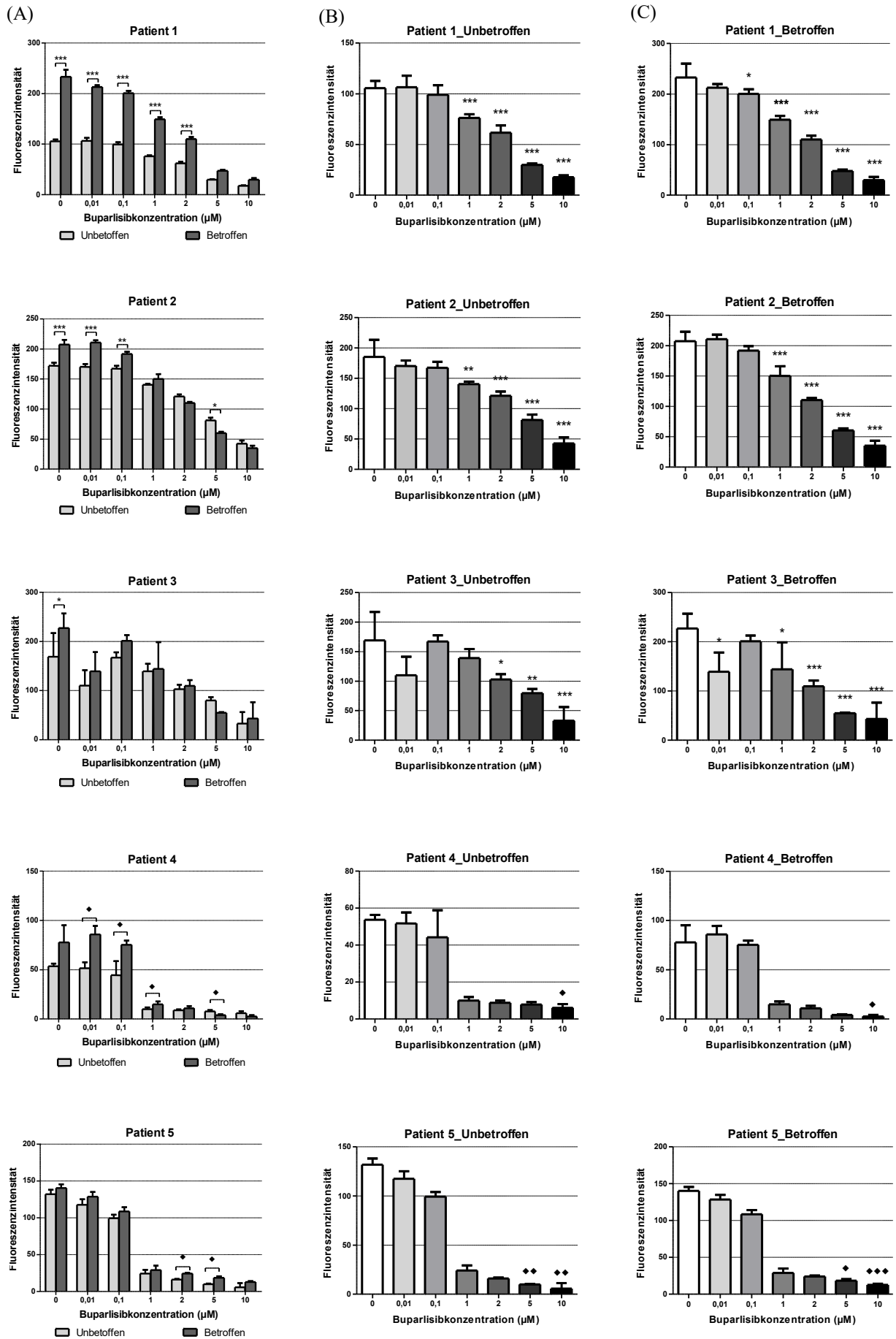
Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen MSL-Patienten nach drei Tagen nach Start der Versuchsreihe separat dargestellt (vgl. Abbildung 14). Dabei wurden Inhibitorkonzentrationen von 0,01 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 2,5 µM, 5 µM und 10 µM verwendet.

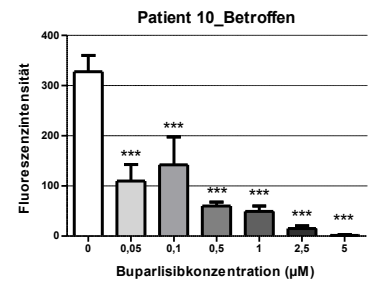
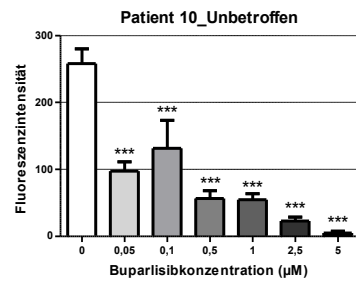
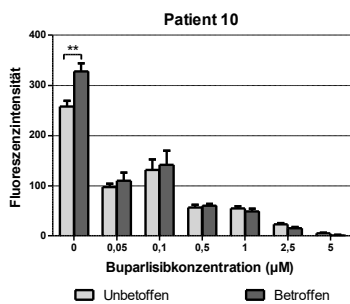
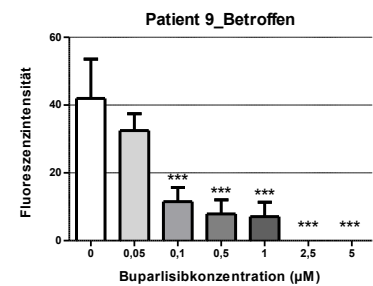
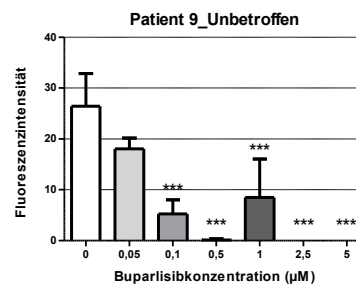
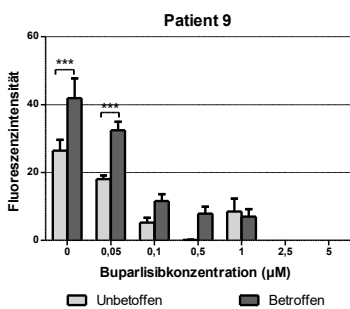
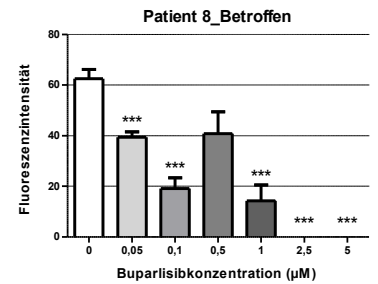
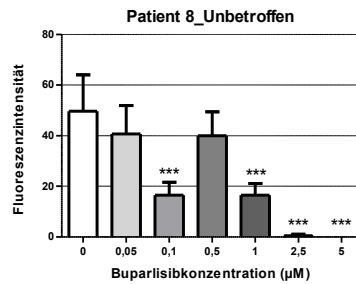
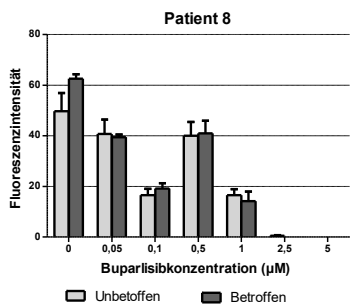
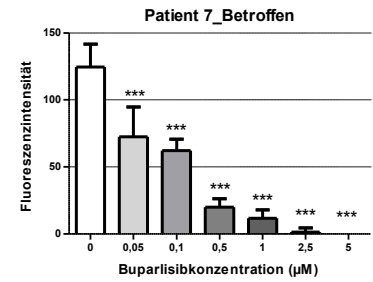
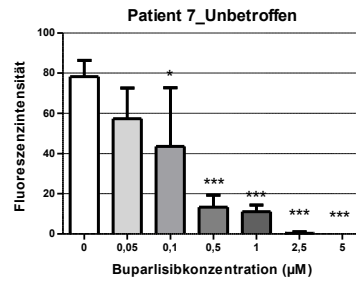
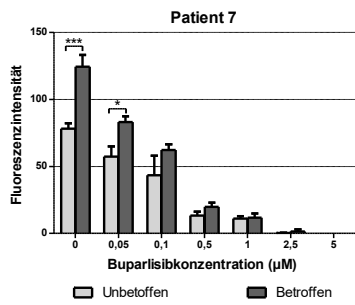
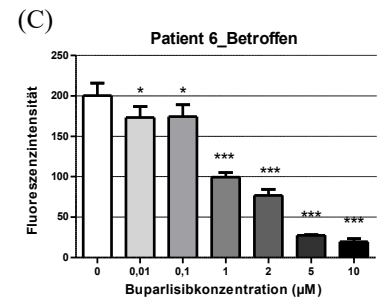
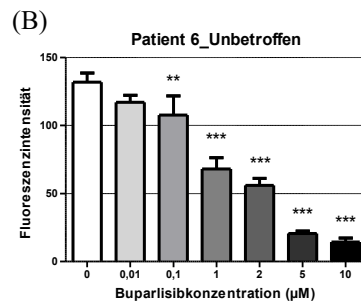
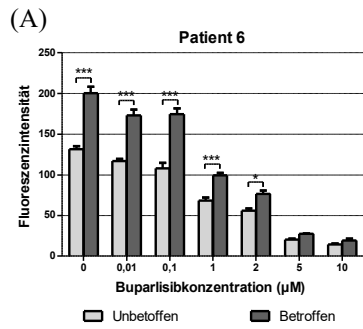
Ohne Buparlisibzugabe zeigten ASCs aus betroffenem Gewebe durchweg eine höhere Fluoreszenzintensität als ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 14 A). Bei 2/3 der Patienten (vgl. Patient 1, 2, 3, 6, 7, 9, 10 und 11) unterschied sich die Fluoreszenzintensität der ASCs aus betroffenem Gewebe dabei signifikant von den ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Des Weiteren ließ sich eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität unter Einfluss von Buparlisib bei allen Patienten detektieren (vgl. Abbildung 14 B und C). Bei 7 von 12 Patienten (vgl. Patient 2, 3, 4, 8, 9, 10 und 11) kam es unter Inhibitorzugabe dabei zur Reduktion der Fluoreszenzintensität der ASCs aus betroffenem Gewebe unter das Maß von ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Zudem wurde die Fluoreszenzintensität bei der Hälfte der Patienten (vgl. Patient 1, 2, 3, 6, 7 und 8) bei ASCs aus betroffenem Gewebe ab einer geringeren Inhibitorkonzentration signifikant erniedrigt bzw. bei der gleichen Inhibitorkonzentration mit einem höheren Signifikanzniveau gesenkt als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Bei Patient 1 wird die Fluoreszenzintensität bei ASCs aus betroffenem Gewebe ab einer Inhibitorkonzentration von 0,1 µM signifikant gesenkt. Ab einer Inhibitorkonzentration von 1 µM wurde die Fluoreszenzintensität bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe

im Vergleich zu den unbehandelten Proben höchst signifikant erniedrigt. Bei Patient 2 unterschied sich die Fluoreszenzintensität der ASCs aus unbetroffenem Gewebe unter Buparlisibbehandlung ab einer Konzentration von 1 μM hoch signifikant von der unbehandelten Kontrolle, bei ASCs aus betroffenem Gewebe höchst signifikant. Bei Patient 3 wurde die Fluoreszenzintensität der ASCs aus dem betroffenen Gewebe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Gegensatz zu ASCs aus unbetroffenem Gewebe ab einer Buparlisibkonzentration von 0,01 μM bzw. 1 μM signifikant gesenkt. ASCs aus unbetroffenem Gewebe wiesen einen signifikanten Unterschied der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab einer Buparlisibkonzentration von 2 μM auf. Bei Patient 6 unterschieden sich ASCs aus betroffenem Gewebe signifikant von ihrer unbehandelten Kontrolle ab einer Inhibitorkonzentration von 0,01 μM . ASCs aus unbetroffenem Gewebe unterschieden sich hoch signifikant ab einer Konzentration von 0,1 μM Buparlisib. Bei Patient 7 zeigte sich bei ASCs aus betroffenem Gewebe ab einer Buparlisibkonzentration von 0,05 μM ein höchst signifikanter Fluoreszenzunterschied zur unbehandelten Kontrolle. Bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe wurde die Fluoreszenz ab einer Konzentration von 0,1 μM signifikant erniedrigt. Bei Patient 8 wurde die Fluoreszenzintensität der ASCs aus unbetroffenem Gewebe unter der Behandlung von Buparlisib der Konzentrationen 0,1 μM bzw. 1 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle höchst signifikant erniedrigt. ASCs aus betroffenem Gewebe zeigten einen höchst signifikanten Fluoreszenzintensitätsunterschied zur unbehandelten Kontrolle ab einer Konzentration von 0,05 μM Buparlisib.

Bei weiteren fünf Patienten (vgl. Patient 4, 9, 10, 11 und 12) wurde die Fluoreszenzintensität der ASCs unter Einfluss von Buparlisib im Vergleich zum unbehandelten Zustand bei beiden Zellarten ab einer identischen Buparlisibkonzentration mit dem gleichen Signifikanzniveau gesenkt. Bei Patient 4 zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der Fluoreszenzintensität beider Zellarten ab einer Buparlisibkonzentration von 10 μM , bei Patient 11 ab 0,5 μM . Bei Patient 9, 10 und 12 wurde die Fluoreszenzintensität höchst signifikant ab 0,1 μM bei Patient 9, bzw. 0,05 μM bei Patient 10 und ab 0,5 μM bei Patient 12 reduziert.

Nur bei Patient 5 zeigte sich eine Inhibition der Fluoreszenzintensität zu höherem Signifikanzniveau seitens der ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Die Fluoreszenzintensität wurde bei Patient 5 ab einer Konzentration von 5 μM bei beiden Zellarten signifikant erniedrigt, wobei der Unterschied bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe hoch signifikant, bei ASCs aus betroffenem Gewebe hingegen signifikant war. Bei Zugabe von 10 μM Buparlisib kehrte sich dieses Verhältnis um. Die Fluoreszenzintensität bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe wurde hoch signifikant, bei ASCs aus betroffenem Gewebe jedoch höchst signifikant gesenkt.





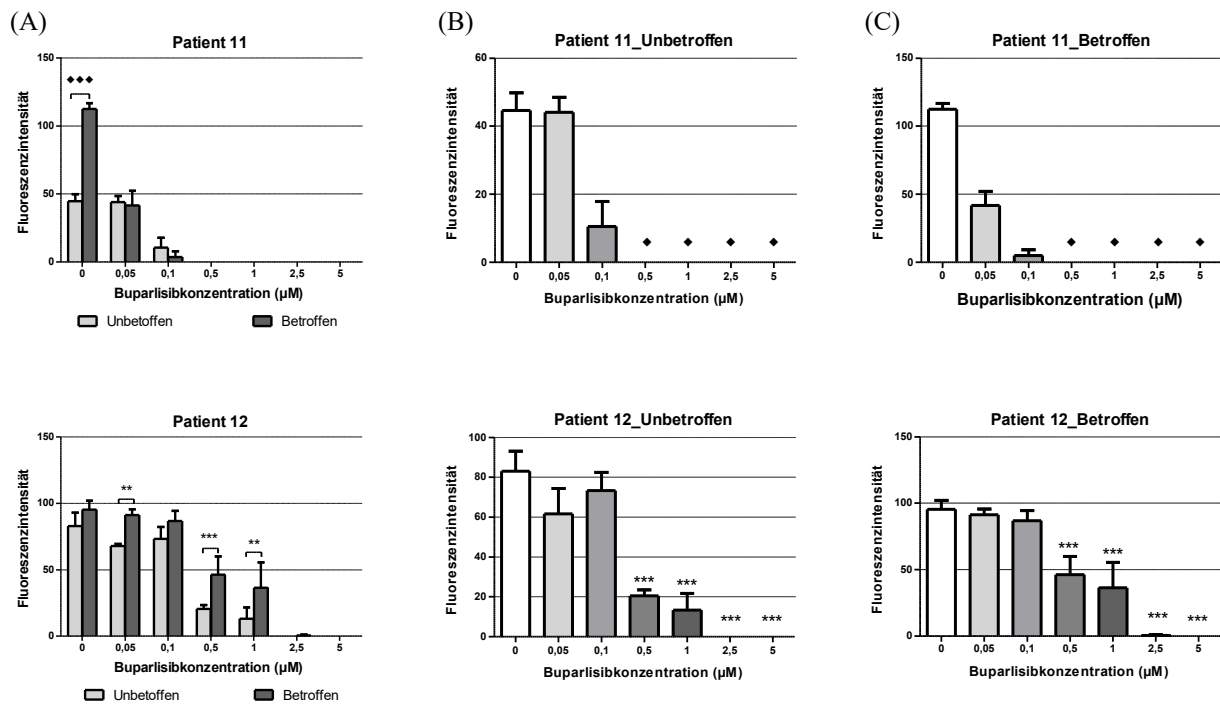


Abbildung 14: Vitalitätssays der ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach drei Tagen unter Buparlisibbehandlung der Konzentrationen 0 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM und 10 µM (Patient 1-6) bzw. 0 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM und 5 µM (Patient 7-12) sowie nach zweistündiger Inkubation mit Resazurin. x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: Fluoreszenzintensität; (a): Vergleich der Fluoreszenzintensität der ASCs aus betroffenem (grau) und unbetroffenem (weiß) Gewebe untereinander bei unterschiedlichen Buparlisibkonzentrationen; (b): Vergleich der Fluoreszenzintensität der ASCs des unbetroffenen Gewebes unter Behandlung mit Buparlisib der unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; (c): Vergleich der Fluoreszenzintensität der ASCs des betroffenen Gewebes unter Behandlung mit Buparlisib der unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; Mittelwert + Standardabweichung, Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ bzw. ◆: $p < 0,05$, ◆◆: $p < 0,01$, ◆◆◆: $p < 0,001$ bei fehlender Normalverteilung

4.2. Adipogene Differenzierung

Dargestellt sind die Ergebnisse zur adipogenen Differenzierung, die durch Oil Red-Färbung und anschließende Quantifizierung des Farbstoffes der Extraktionslösung von ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einwöchiger Kultivierung mit ADM bzw. CM und Supplementierung von Buparlisib unterschiedlicher Konzentrationen untersucht wurde. Die Versuchsreihe wurde mit ASCs von insgesamt 6 Patienten durchgeführt. Zunächst wird die durchschnittliche optische Dichte der Extraktionslösungen der Zellen dargestellt (vgl. Abbildung 15). Hierbei wurde der Durchschnitt der optische Dichte der Extraktionslösungen aus allen Patientendaten gebildet. Da im Verlauf die Konzentrationen für die Inhibitorbehandlung angepasst wurden, wurden für die Darstellung der durchschnittlichen

adipogenen Differenzierung nur Konzentrationen von 1 μM und 5 μM Buparlisib nach einwöchiger adipogener Differenzierung berücksichtigt.

Für das Oil-Red-Extrakt von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe war nach einwöchiger adipogener Differenzierung eine im Durchschnitt signifikant höhere optische Dichte nachweisbar als für die Extraktionslösung von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 15). Die optische Dichte der Extraktionslösung von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe betrug im unbehandelten Zustand im Durchschnitt 0,269, bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe durchschnittlich 0,216. Die optische Dichte der Extraktionslösungen von adipogen differenzierten Zellen unterschied sich nach einwöchiger Kultivierung nicht signifikant von der optischen Dichte der Extraktionslösung von ASCs, welche ausschließlich mit CM kultiviert und damit nicht zur Einlagerung von Triglyceriden simuliert wurden. Die optische Dichte der Oil Red-Färbung bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe lag bei durchschnittlich 0,092, bei ASCs aus betroffenem Gewebe bei 0,132.

Die durchschnittliche optische Dichte der Extraktionslösungen von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe ließ sich durch die Behandlung mit Buparlisib senken. Die Supplementierung von 1 μM Buparlisib führte bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe im Durchschnitt zu einer hoch signifikanten Reduktion der optischen Dichte der Extraktionslösung auf einen Wert von 0,194, nach Zugabe von 5 μM Buparlisib zu einer höchst signifikant Reduktion der optischen Dichte auf einen Wert von 0,19. Bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe wurde die optische Dichte der Extraktionslösung durch 1 μM Buparlisib im Mittel auf 0,157 gesenkt. Nach einer Supplementierung von 5 μM Buparlisib ließ sich eine signifikante Reduktion der durchschnittlichen optischen Dichte auf einen Wert von 0,156 nachweisen. Die durchschnittliche optische Dichte von ASCs aus betroffenem Gewebe betrug unter Supplementierung von 1 μM Buparlisib 0,041, unter Supplementierung mit 5 μM Buparlisib 0,033. Bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe wurde eine durchschnittliche optische Dichte von 0,121 unter 1 μM Buparlisib und 0,114 unter 5 μM Buparlisib detektiert. Ein signifikanter Unterschied zwischen der optischen Dichte von behandelten und unbehandelten ASCs ließ sich nicht nachweisen.

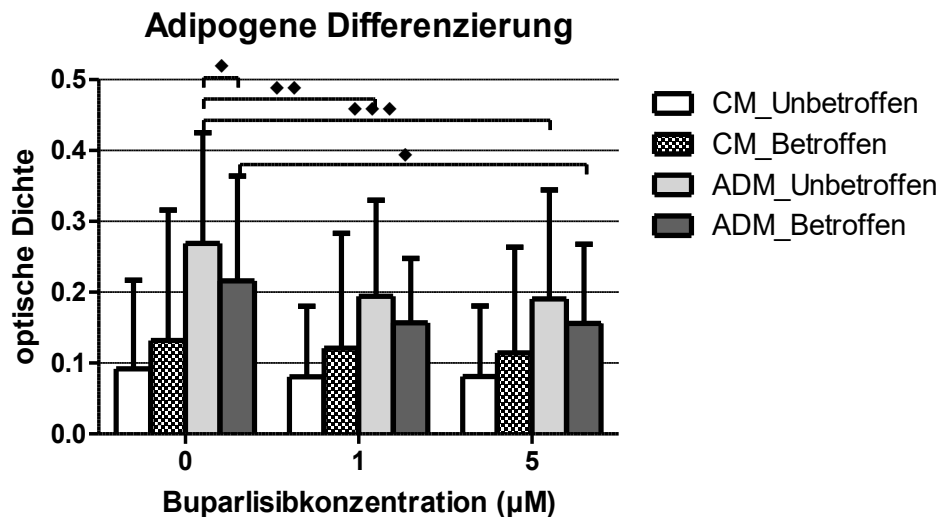
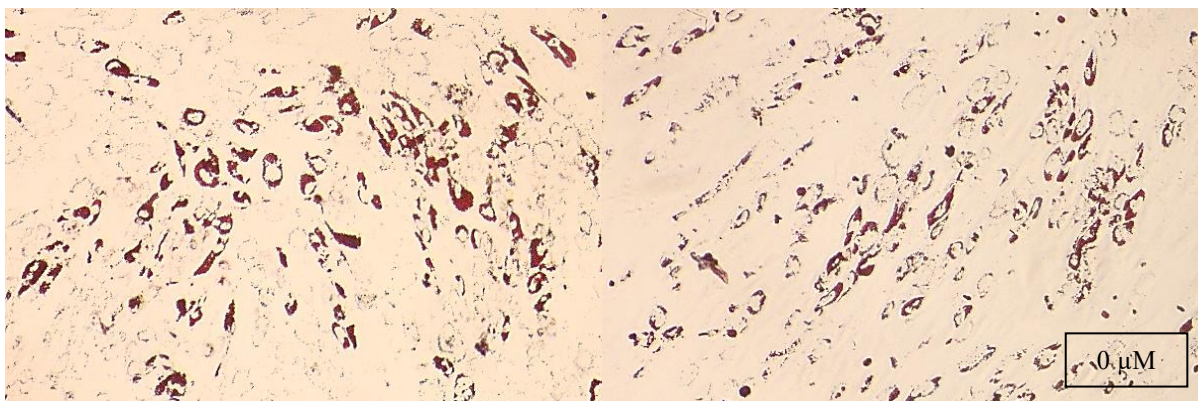


Abbildung 15: Durchschnittliche adipogene Differenzierung. Quantifizierung der Oil Red-Färbung durch photometrische Messung der optischen Dichte nach einer Woche der adipogenen Differenzierung in adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM) bzw. Kultivierungsmedium (=CM); Supplementierung von 0 µM, 1 µM, 5 µM Buparlisib; Darstellung von Mittelwerten aus allen Patientendaten; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: normalisierte optische Dichte, Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung, Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels ♦: $p < 0,05$, ♦♦: $p < 0,01$, ♦♦♦: $p < 0,001$ bei fehlender Normalverteilung

Im Folgenden (vgl. Abbildung 16) werden exemplarisch mikroskopische Aufnahmen von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem (A) und betroffenem Gewebe (B) im unbehandelten Zustand und unter Behandlung mit Buparlisib der Konzentrationen von 0,1 µM, 1 µM, 2,5 µM und 5 µM aufgeführt. Hierbei wird deutlich, dass der Anteil adipogen differenzierter Zellen, welcher sich durch die rote Färbung ihrer Lipidvakuolen quantifizieren lässt, unter Zugabe von Buparlisib sukzessive reduziert wurde. Ab einer Konzentration von 1 µM Buparlisib ließ sich eine deutliche, optische Reduktion der Lipide nachvollziehen. Dieser Effekt nimmt mit steigender Buparlisibkonzentration zu.

(A) Unbetroffenes Gewebe

(B) Betroffenes Gewebe



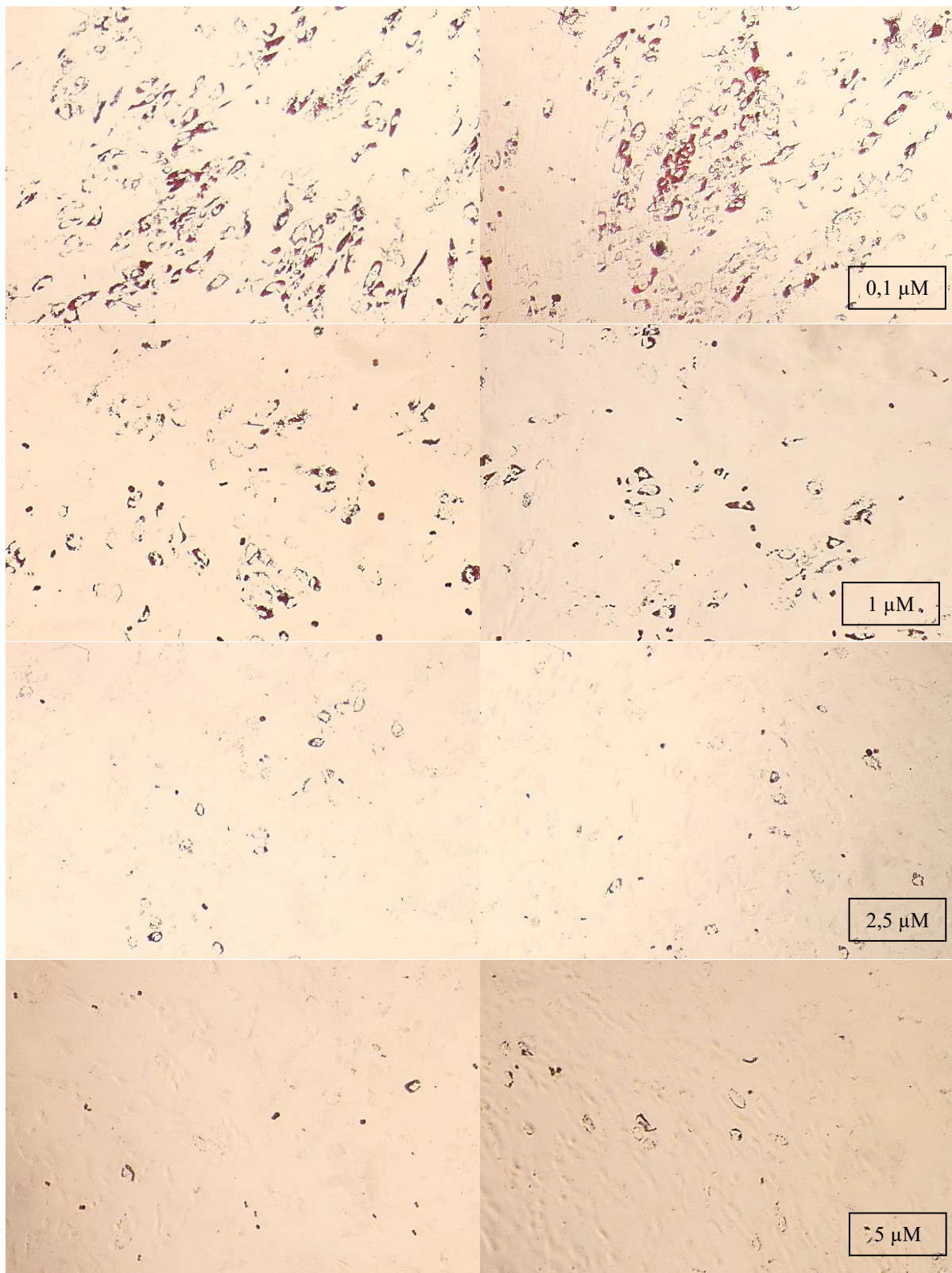


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahmen adipogen differenzierter Zellen ausgehend von ASCs aus unbetroffenem (A) und betroffenem (B) Gewebe nach einwöchiger adipogener Differenzierung ohne Buparlisibbehandlung sowie mit Buparlisibbehandlung der Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM , 2,5 μM und 5 μM und anschließender Oil Red-Färbung unter 40facher Vergrößerung

Werden die Patienten einzeln betrachtet, ließ sich bei 2/3 der Patienten (vgl. Abbildung 17, Patient 1, 3, 5 und 6) im unbehandelten Zustand eine signifikant höhere optischen Dichte für das Extrakt der Oil Red-Färbungen bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe nachweisen als bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe. Bei Patient 1 und 6 ließ sich dabei ein höchst signifikanter Unterschied zwischen der optischen Dichte des Extrakts von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nachweisen, bei Patient 3 ein hoch signifikanter Unterschied und bei Patient 5 ein signifikanter Unterschied. Unter Einfluss von Buparlisib wurde der signifikante Unterschied zwischen der optischen Dichte bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe reduziert bzw. aufgehoben. Bei Patient 1 wurde der höchst signifikante Unterschied der optischen Dichte der Extraktionslösungen bei Supplementierung von 1 μM Buparlisib auf ein signifikantes Maß reduziert. Durch 5 μM Buparlisib ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe mehr nachweisen. Bei Patient 3 wurde der hoch signifikante Unterschied zwischen der optischen Dichte der Extraktionslösungen beider Zellarten, der sich ohne Inhibitorzugabe und bei einer Buparlisibkonzentration von 1 μM nachweisen ließ, ebenfalls ab einer Konzentration von 5 μM Buparlisib aufgehoben. Bei Patient 5 zeigte sich im unbehandelten Zustand ein signifikanter Unterschied zwischen der optischen Dichte der Färbungen von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe, der unter Inhibitorbehandlung von 0,1 μM ausgeglichen wurde. Bei Patient 6 ließ sich der höchst signifikante Unterschied zwischen der optischen Dichte der Färbung beider Zellarten im unbehandelten Zustand sowie bei Zugabe von 0,1 μM Buparlisib nachweisen. Bei Supplementierung von 0,5 μM Buparlisib unterschied sich die optische Dichte beider Zellarten signifikant. Bei Zugabe von 1 μM Buparlisib glich sich die optische Dichte der Färbungen bei beiden Zellarten an und es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Extraktionslösungen beider Zellarten mehr nachweisbar. Bei den übrigen Patienten (vgl. Patient 2, 4) ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der optischen Dichte der Extraktionslösungen bei unbehandelten, adipogen differenzierten Zellen nachweisen. Unter Zugabe von 1 μM Buparlisib konnte bei Patient 4 ein signifikanter Unterschied zwischen der optischen Dichte adipogen differenzierter Zellen aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe induziert werden.

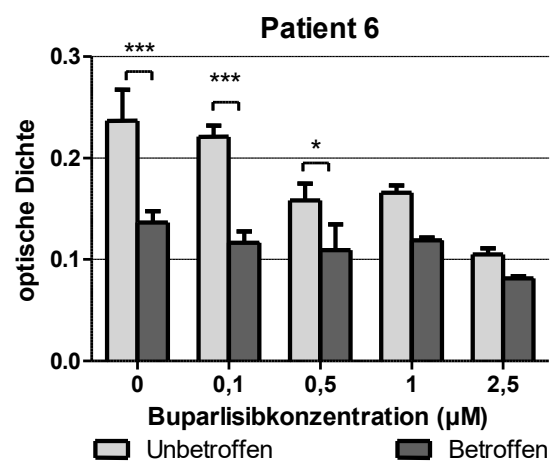
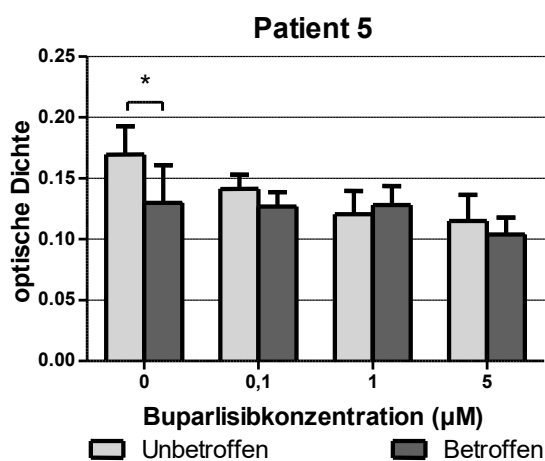
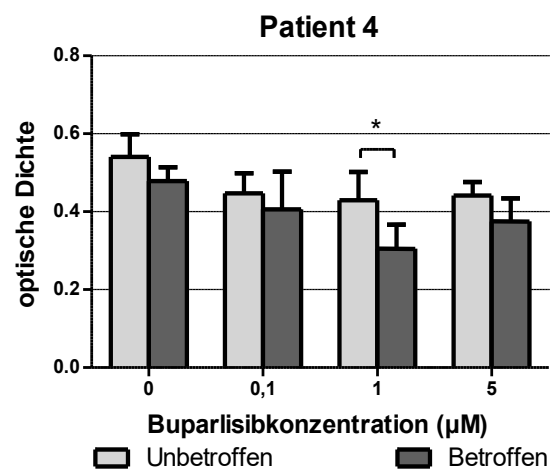
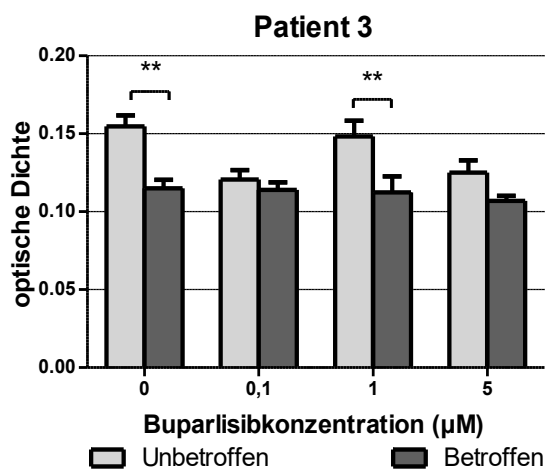
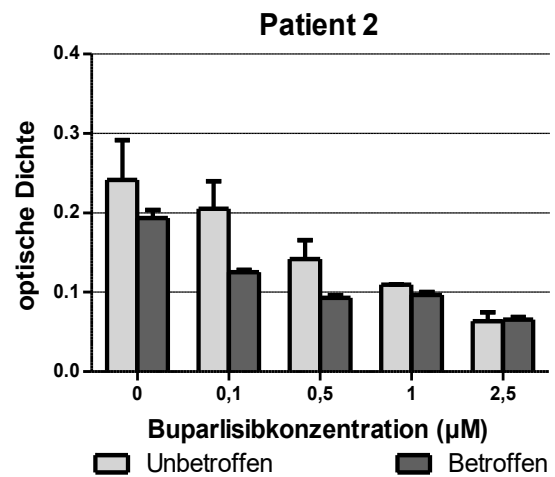
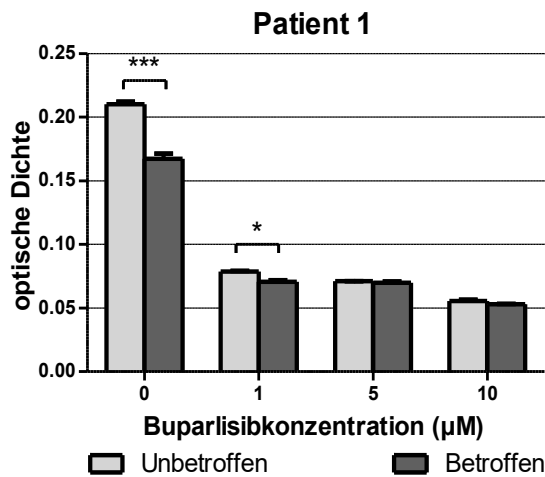


Abbildung 17: Adipogene Differenzierung einzelner Patienten. Quantifizierung der Oil Red-Färbung durch photometrische Messung der optischen Dichte nach einer Woche der adipogenen Differenzierung in adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM) mit Supplementierung von 0 µM, 1 µM, 5 µM und 10 µM (Patient 1) bzw. 0 µM, 0,1 µM, 1 µM und 5 µM Buparlisib (Patient 3-5) bzw. 0 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM und 2,5 µM (Patient 2 und 6); x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: optische Dichte, Mittelwert + Standardabweichung, Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

4.3. Polymerasekettenreaktion

Mittels Polymerasekettenreaktion wurde die Genexpression verschiedener Apoptose-regulierender Gene von ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Fettgewebe verglichen. Dabei wurden sechs proapoptotisch und zwei antiapoptotisch wirksame Gene analysiert. Zudem wurde die Genexpression von Genen des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweges untersucht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dabei sowohl in CM, als auch in ADM, um Rückschlüsse auf die Expression des Signalwegs bei unterschiedlichem Differenzierungsgrad der Zellen zu ziehen.

4.3.1. Apoptosemarker

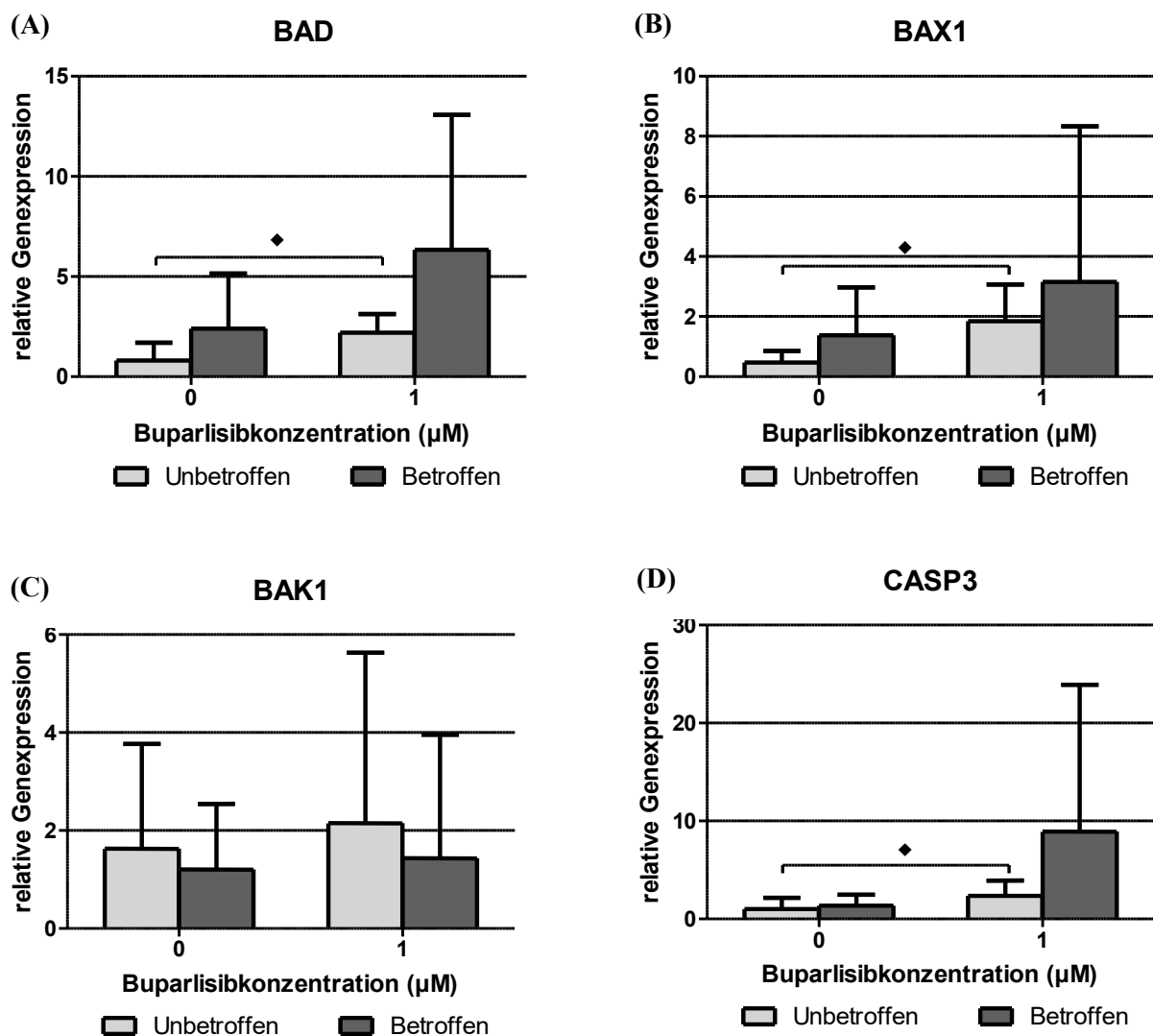
Um Rückschlüsse über die Expression proapoptotisch wirksamer Gene bei lipomatösem Gewebe zu erhalten, wurden ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe bezüglich der Expression von Genen der Bcl-2-Familie, BAD, BAX1, BAK1, der Expression der Effektorcaspase 3 (CASP3) sowie der Tumorsuppressoren p53 (TP53) und Retinoblastom-assoziiertem Protein (RB1) untersucht. Des Weiteren wurden ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe bezüglich ihrer Genexpression antiapoptotisch wirksamer Gene untersucht, wobei exemplarisch die Genexpression von BCL2 und BCLXL analysiert wurde. Insgesamt wurden drei Patienten untersucht.

4.3.1.1 Proapoptotisch wirksame Gene

Im unbehandelten Zustand ließ sich eine höhere durchschnittliche Genexpression bei allen proapoptotisch wirksamen Genen, außer bei BAK1, bei ASCs aus betroffenem Gewebe nachweisen (vgl. Abbildung 18 A-F). Für BAD wurde bei ASCs aus betroffenem Gewebe eine durchschnittliche Expression von 2,39 detektiert, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe von 0,8. Für BAX1 betrug die durchschnittliche Genexpression bei ASCs aus betroffenem Gewebe 1,38, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe 0,47. Bei BAK1 lag die Genexpression von ASCs aus betroffenem Gewebe mit einem Wert von 1,2 im Mittel niedriger als die Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe mit einem Wert von 1,62. Die Genexpression von CASP3 lag bei ASCs aus betroffenem Gewebe bei durchschnittlich 1,33. Bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe wurde eine Genexpression von 1,01 gemessen. Die Expression von TP53 von ASCs aus betroffenem Gewebe betrug durchschnittlich 3,06, von ASCs aus unbetroffenem Gewebe 1,98.

Für RB1 ließ sich ebenfalls eine höhere durchschnittliche Genexpression seitens der ASCs aus betroffenem Gewebe mit einem Wert von 3,28 nachweisen. Bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe wurde eine durchschnittliche Genexpression von 1,62 gemessen.

Unter Buparlisibeinfluss wurde die Genexpression aller Gene sowohl bei ASCs aus betroffenem, als auch aus unbetroffenem Gewebe gesteigert. Dabei blieb die bereits basal erhöhte Genexpression seitens der ASCs aus betroffenem Gewebe bei allen proapoptotisch wirksamen Genen, bis auf BAK1, auf höherem Niveau als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Die durchschnittliche Genexpression von BAD, BAX1 und CASP3 konnte bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe signifikant zum Ausgangswert gesteigert werden.



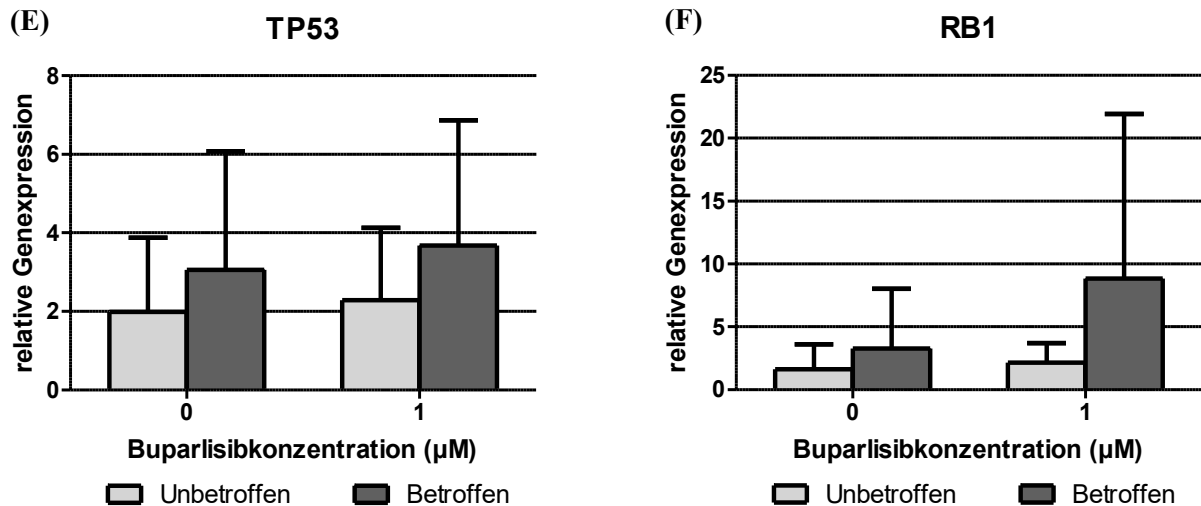


Abbildung 18: Durchschnittliche relative Genexpression von BAD (A), BAX1 (B), BAK1 (C), CASP3 (D), TP53 (E) und RB1 (F) bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe. Versuchsdurchführung nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 µM Buparlisib, Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels ♦: $p < 0,05$, ♦♦: $p < 0,01$, ♦♦♦: $p < 0,001$ bei fehlender Normalverteilung

4.3.1.2. Antiapoptotisch wirksame Gene

Die durchschnittliche Genexpression der antiapoptotisch wirksamen Gene BCL2 und BCLXL lag bei ASCs aus betroffenem Gewebe auf höherem Niveau als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 19 A-B). Dabei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der durchschnittlichen Expression von BCL2 und BCLXL bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nachgewiesen werden. Die Genexpression von BCL2 betrug bei ASCs aus betroffenem Gewebe durchschnittlich 14,72, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe 5,76 (vgl. Abbildung 19 A). Für BCLXL konnte bei ASCs aus betroffenem Gewebe eine durchschnittliche Expression von 1,81 detektiert werden. Bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe wurde eine Genexpression von im Mittel 0,54 gemessen (vgl. Abbildung 19 B).

Unter Buparlisibeinfluss zeigte sich ein gegensätzlicher Trend bezüglich der Genexpression antiapoptotisch wirksamer Gene bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe. Während die Genexpression aller antiapoptotisch wirksamer Marker bei ASCs aus betroffenem Gewebe unter Buparlisib reduziert werden konnte, wurde die durchschnittliche Genexpression bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe induziert (vgl. Abbildung 19 A und B). Bei BCL2 und BCLXL konnte unter Buparlisib eine Verhältnismkehr der Genexpression beobachtet werden,

wobei die Genexpression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe unter Inhibitoreinfluss über dem Niveau von ASCs aus betroffenem Gewebe lag.

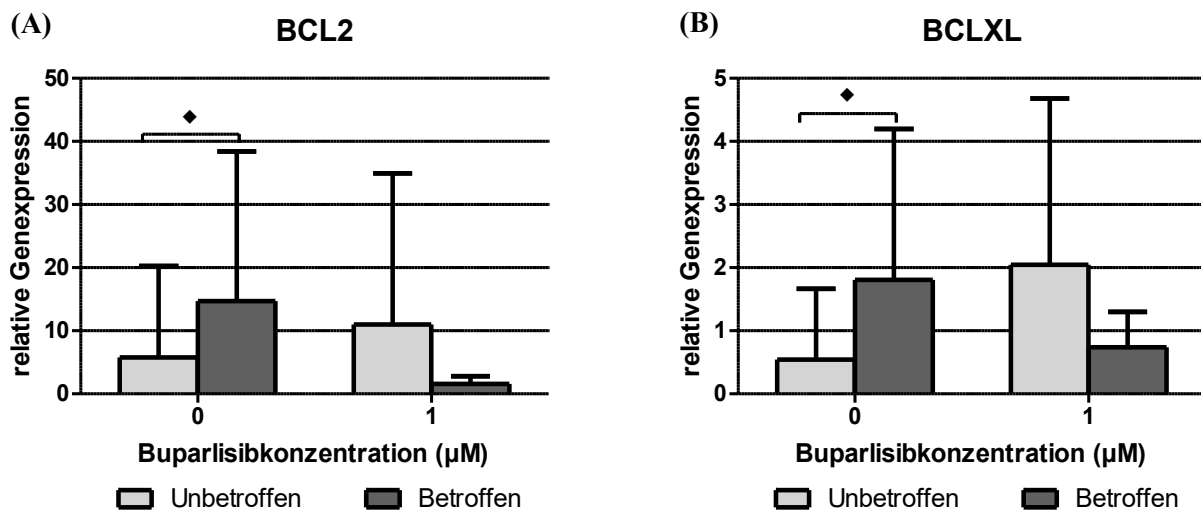


Abbildung 19: Durchschnittliche relative Genexpression von BCL2 (A) und BCLXL (B) bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe. Versuchsdurchführung nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 µM Buparlisib, Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels ♦: $p < 0,05$, ♦♦: $p < 0,01$, ♦♦♦: $p < 0,001$ bei fehlender Normalverteilung

4.3.2. PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg

Neben der Expression verschiedener Apoptosemarker wurde die Genexpression des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweges untersucht. Zum einen wurden dabei Gene der Signalweg-aktivierenden und proliferationsfördernden Enzyme, wie die PI3-Kinase (PIK3R1 für die regulatorische Untereinheit und PIK3CA für die katalytische Untereinheit), Akt (AKT1) und mTOR (MTOR), zum anderen aber auch Gene von Signalweg-inhibierenden und proliferationshemmenden Enzymen, wie PTEN (PTEN) und 4E-BP1 (EIF4EBP1), verglichen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dabei sowohl in CM, als auch in ADM, um Rückschlüsse auf die Expression bei unterschiedlichem Differenzierungsgrad der Zellen zu ziehen.

4.3.2.1. PIK3R1

Im unbehandelten Zustand zeigten ASCs aus unbetroffenem Gewebe eine im Durchschnitt höhere Genexpression von PIK3R1 als ASCs aus betroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 21 A). Bei Kultivierung mit CM betrug die Genexpression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe im

unbehandelten Zustand durchschnittlich 1,76, die Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe durchschnittlich 1,62. Durch die Supplementierung von Buparlisib wurde die durchschnittliche Genexpression von ASCs aus betroffenem Gewebe über das Maß der ASCs aus unbetroffenem Gewebe gesteigert. Bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe wurde die Genexpression unter Behandlung von 1 μ M Buparlisib auf im Durchschnitt 2,52, bei ASCs aus betroffenem Gewebe auf im Durchschnitt 2,97 angehoben.

Bei Kultivierung in ADM zeigte sich ein ähnlicher Trend (vgl. Abbildung 20 B). Adipogen differenzierte Zellen aus unbetroffenem Gewebe wiesen im unbehandelten Zustand eine durchschnittliche Genexpression von 6,23 auf, adipogen differenzierte Zellen aus betroffenem Gewebe von 5,35. Durch die Zugabe von 1 μ M Buparlisib wurde die Expression beider Zellarten im Durchschnitt auf 9,96 gesteigert.

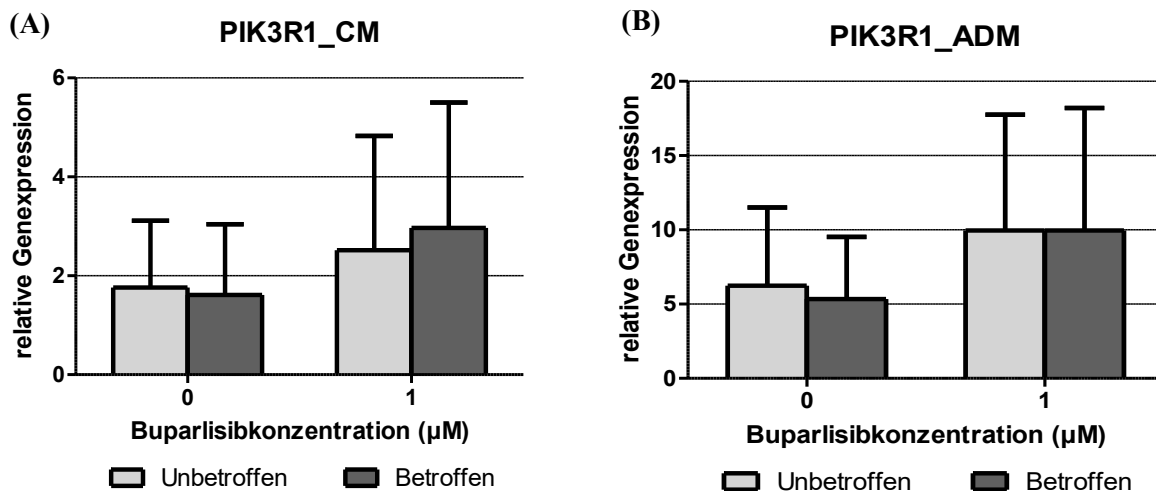
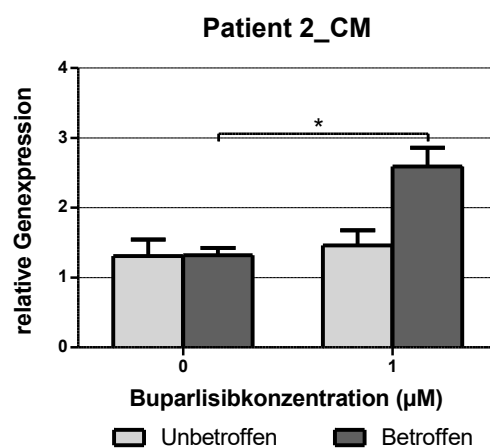
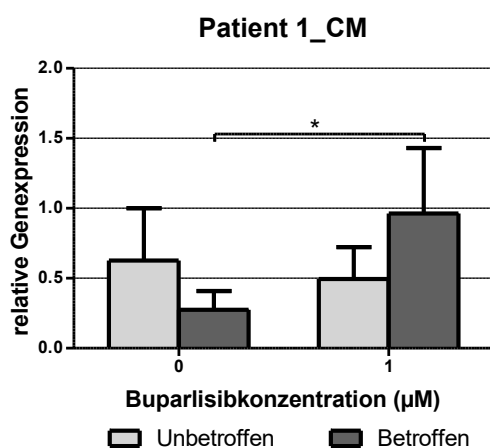


Abbildung 20: Durchschnittliche relative Genexpression von PIK3R1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) (Abb. 20 A) bzw. adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM) (Abb. 20 B). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 μ M Buparlisib, Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μ M; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur relativen Genexpression von PIK3R1 von sechs Patienten nach einwöchiger Kultivierung in CM im unbehandelten Zustand sowie unter Supplementierung von Buparlisib der Konzentration 1 μ M im Vergleich dargestellt (vgl. Abbildung 21). Im unbehandelten Zustand lag die Genexpression von PIK3R1 bei der Hälfte der Patienten (vgl. Patient 2, 4 und 12) bei beiden Zellarten auf einem identischen Niveau. Bei Patient 1 und 6 ließ sich eine höhere Genexpression seitens ASCs aus unbetroffenem Gewebe

feststellen. Bei Patient 5 ließ sich hingegen bei ASCs aus betroffenem Gewebe eine höhere Genexpression nachweisen als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe.

Unter Zugabe von 1 μM Buparlisib waren bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe zum Teil gegensätzliche Tendenzen detektierbar. Bei Patient 1 wurde die PIK3R1-Expression bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe gesenkt, wohingegen die Expression bei ASCs aus betroffenem Gewebe signifikant induziert wurde. Bei Patient 2 blieb die Genexpression von PIK3R1 bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe auf stabilem Niveau, die Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe wurde hingegen signifikant induziert. Bei Patient 4 und 5 wurde die Genexpression bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe gesteigert. Die Expression bei ASCs aus betroffenem Gewebe wurde signifikant unter das Niveau von ASCs aus unbetroffenem Gewebe reduziert. Bei Patient 6 fiel die Genexpression von PIK3R1 bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe gering ab. Bei ASCs aus betroffenem Gewebe wurde die Expression wiederum signifikant gesteigert, sodass ein signifikanter Unterschied zwischen ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe unter Inhibitoreinfluss nachzuweisen war. Bei Patient 12 wurde die Expression beider ASCs höchst signifikant zum Ausgangswert induziert, wobei die Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe die der ASCs aus unbetroffenem Gewebe überstieg. Insgesamt ließ sich unter Inhibitoreinfluss damit bei über 2/3 der Patienten eine Verhältnismkehr der basalen PIK3R1-Expression feststellen, bei der die Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe unter das Maß von ASCs aus unbetroffenem Gewebe reduziert bzw. über das Maß von ASCs aus unbetroffenem Gewebe gesteigert wurde (vgl. Patient 1, 4, 5, 6 und 12).



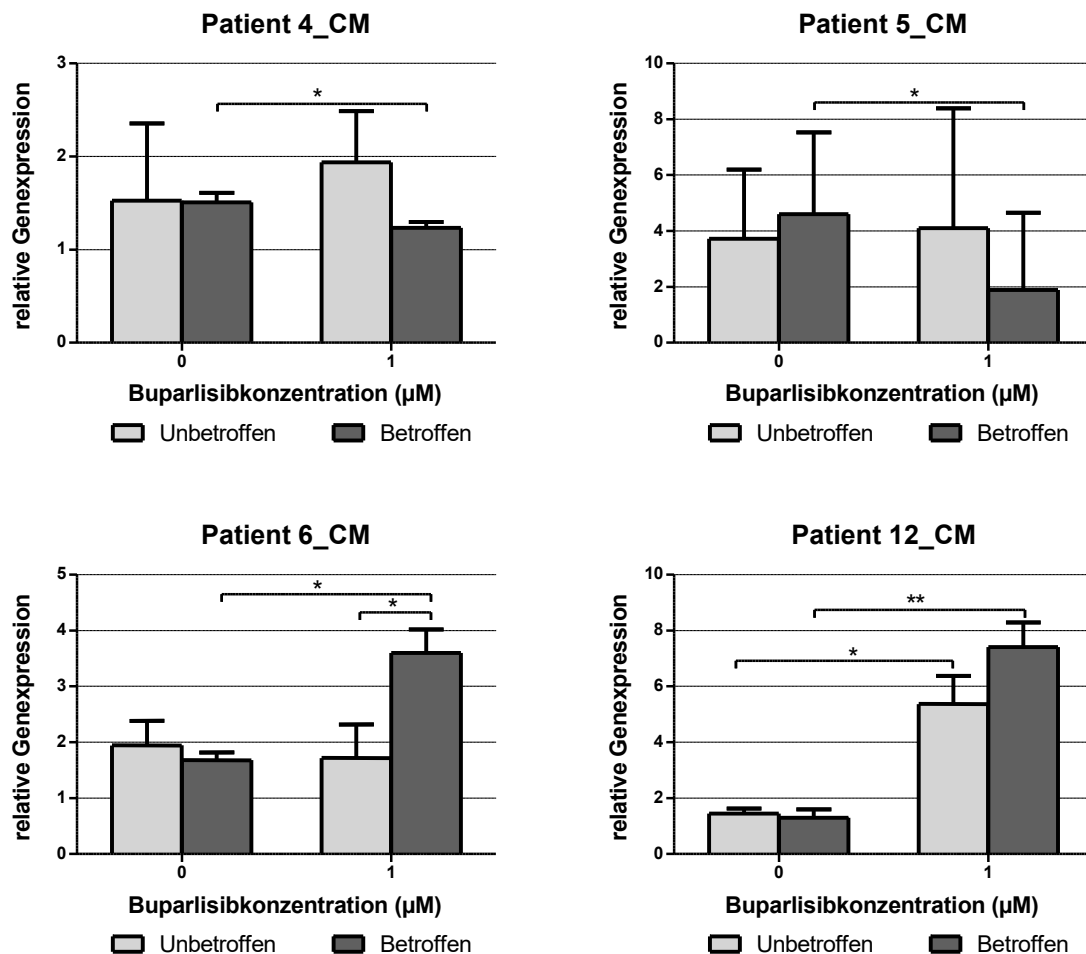
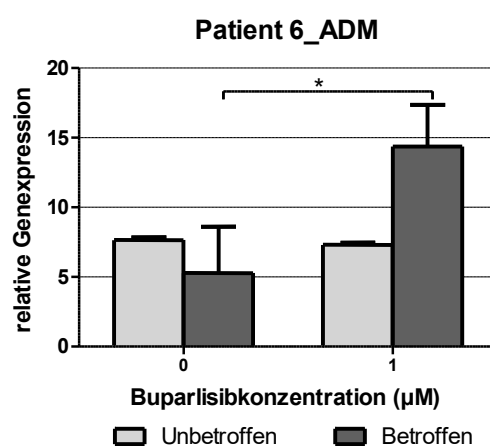
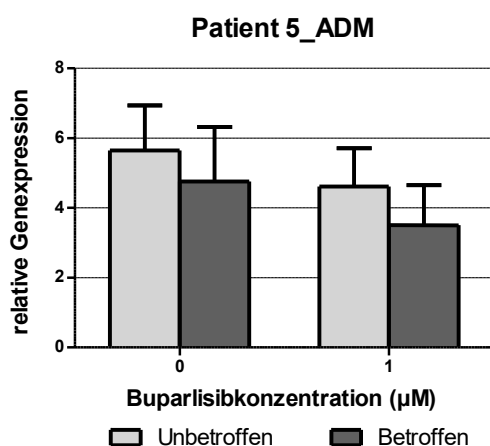
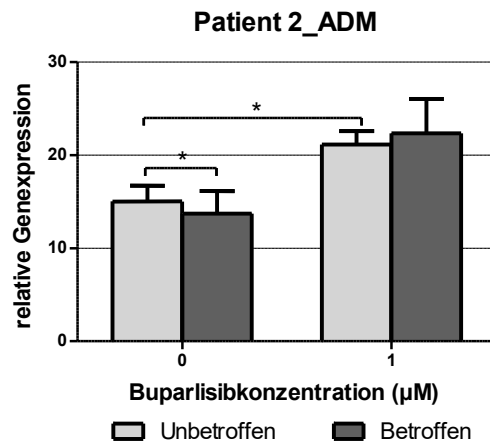
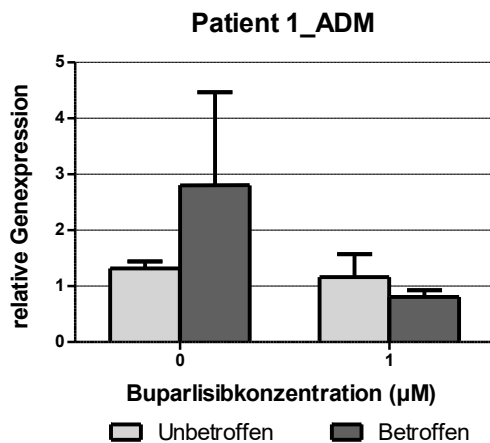


Abbildung 21: Relative Genexpression von PIK3R1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. mit Supplementierung von, 1 µM Buparlisib; Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Folgend wird die relative Genexpression von PIK3R1 von fünf Patienten nach einwöchiger Kultivierung mit ADM im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 µM dargestellt (vgl. Abbildung 22). Die Mehrheit der Patienten (vgl. Patient 2, 5 und 6) wies im unbehandelten Zustand eine höhere, relative Genexpression von PIK3R1 bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe auf. Bei Patient 2 war ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nachweisbar.

Unter Zugabe von Buparlisib zeigten sich unterschiedliche Tendenzen bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe. Während die PIK3R1-Expression von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe bei den meisten Patienten (vgl. Patient 1, 5 und 6) reduziert wurde, stieg die Expression von adipogen

differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe bei mehr als der Hälfte der Patienten unter Inhibitorzugabe an (vgl. Patient 2, 6 und 12). Bei Patient 6 und 12 wurde die Genexpression von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe signifikant bzw. hoch signifikant gesteigert. Bei Patient 2 und 12 kam es unter Buparlisibzugabe auch bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe zu einer signifikanten bzw. hoch signifikanten Induktion der PIK3R1-Genexpression gegenüber ihrem Ausgangswert. Der signifikante Unterschied der basalen Genexpression zwischen adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe wurde bei Patient 2 unter Inhibitoreinfluss aufgehoben. Bei allen Patienten, außer bei Patient 5, kehrten sich die Expressionsverhältnisse von ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe unter Inhibitoreinfluss im Vergleich zum Ausgangswert um.



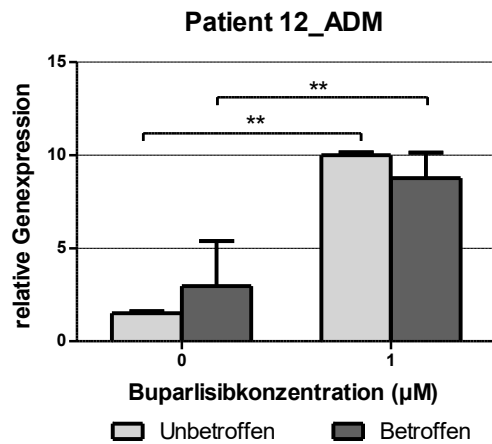


Abbildung 22: Relative Genexpression von PIK3R1 bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. mit Supplementierung von, 1 µM Buparlisib; Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

4.3.2.2. PIK3CA

Im Gegensatz zur PIK3R1-Expression konnte bei der relativen Genexpression von PIK3CA eine erhöhte durchschnittliche Expressionsrate bei ASCs aus betroffenem Gewebe festgestellt werden (vgl. Abbildung 23 A). Im unbehandelten Zustand betrug die relative Genexpression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe unter Kultivierung mit CM im Durchschnitt 3,5, die Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe 1,47. Bei der PIK3CA-Genexpression konnte der größte Expressionsunterschied von allen untersuchten Enzymen des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalswegs zwischen ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe festgestellt werden. Unter Zugabe von Buparlisib wurde die relative Genexpression von PIK3CA bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe signifikant angehoben, wohingegen die Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe gering reduziert wurde. Unter 1 µM Buparlisib wiesen ASCs aus unbetroffenem Gewebe eine durchschnittliche Expression von 2,72 auf, ASCs aus betroffenem Gewebe 3,32.

Unter Kultivierung mit ADM konnte für adipogen differenzierte Zellen aus betroffenem Gewebe im unbehandelten Zustand ebenfalls eine höhere Genexpression von PIK3CA nachgewiesen werden als bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 23 B). Im Durchschnitt betrug die Expression von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe 2,67. Bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe lag die durchschnittliche Genexpression von PIK3CA bei 2,23. Unter Inhibitoreinfluss wurde die PIK3CA-Expression bei beiden Zellarten induziert. Bei Zugabe von 1 µM Buparlisib

zeigten adipogen differenzierte Zellen aus unbetroffenem Gewebe im Mittel eine Expression von 5,84, adipogen differenzierte Zellen aus betroffenem Gewebe von 4,59.

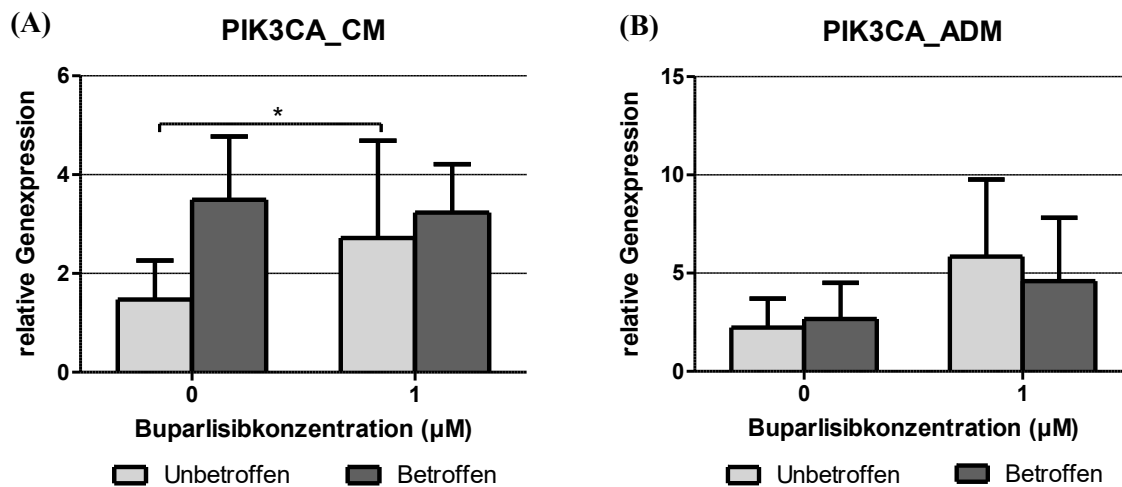
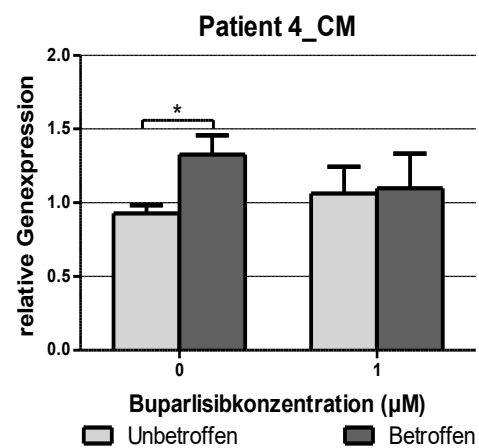
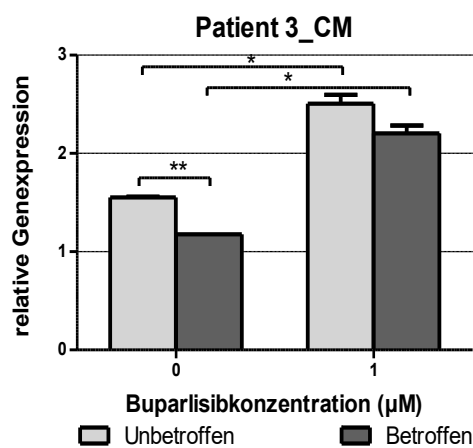
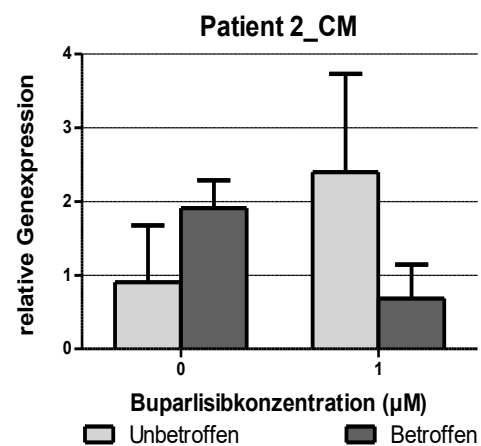
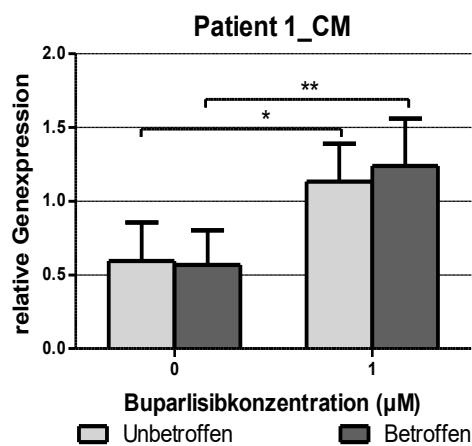


Abbildung 23: Durchschnittliche relative Genexpression von PIK3CA bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) (Abb. 23 A) bzw. adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM) (Abb. 23 B). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 μ M Buparlisib, Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μ M; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Nachfolgend sollen die Ergebnisse zur PIK3CA-Genexpression der einzelnen Patienten bei Kultivierung in CM dargestellt werden (vgl. Abbildung 24). Insgesamt wurden sieben Patienten anhand der PIK3CA-Expression untersucht. Im unbehandelten Zustand war die basale Genexpression von PIK3CA bei drei Patienten (vgl. Patient 2, 4 und 5) bei ASCs aus betroffenem Gewebe im Vergleich zu ASCs aus unbetroffenem Gewebe erhöht. Bei Patient 4 und 5 war ein signifikanter Unterschied zwischen beiden ASCs nachweisbar. Bei zwei Patienten (vgl. Patient 1 und 12) lag die Genexpression beider ASCs auf etwa gleichem Niveau. Bei Patient 3 und 6 war hingegen eine höhere Genexpression von PIK3CA bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe nachweisbar. Bei Patient 3 unterschied sich die Genexpression der ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe dabei hoch signifikant.

Unter Inhibitoreinfluss stieg die Genexpression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei allen Patienten an. Bei ASCs aus betroffenem Gewebe führte die Zugabe von 1 μ M Buparlisib bei mehr als der Hälfte der Patienten (vgl. Patient 1, 2, 6 und 12) zu einer Verhältnisumkehr, wobei die Genexpression von ASCs aus betroffenem Gewebe über das Maß von ASCs aus unbetroffenem Gewebe angehoben oder gesenkt wurde. Bei Patient 1 und 12 wurde die Genexpression beider ASCs induziert, wobei die PIK3CA-Expression von ASCs aus

unbetroffenem Gewebe signifikant und von ASCs aus betroffenem Gewebe hoch signifikant gesteigert wurde. Bei Patient 2 fiel die Genexpression bei ASCs aus betroffenem Gewebe nach Zugabe von 1 μM Buparlisib unter den Ausgangswert von ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Die Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe stieg über den Ausgangswert von ASCs aus betroffenem Gewebe an. Bei Patient 6 wurde die Genexpression von ASCs aus betroffenem Gewebe signifikant über das Maß von ASCs aus unbetroffenem Gewebe induziert. Bei den übrigen Patienten (vgl. Patient 3, 4, und 5) wurden vorher bestehende signifikante Unterschiede in der basalen Genexpression zwischen beiden ASCs durch die Inhibitorzugabe aufgehoben.



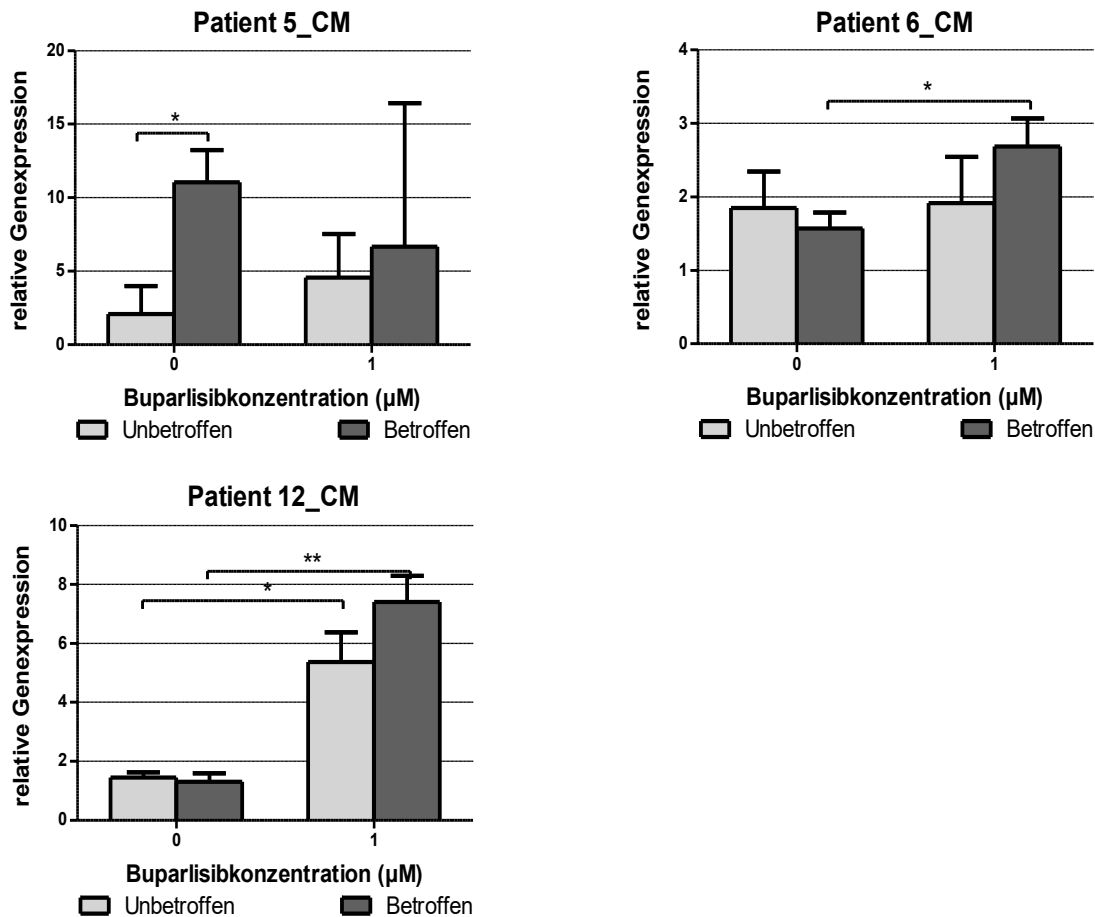
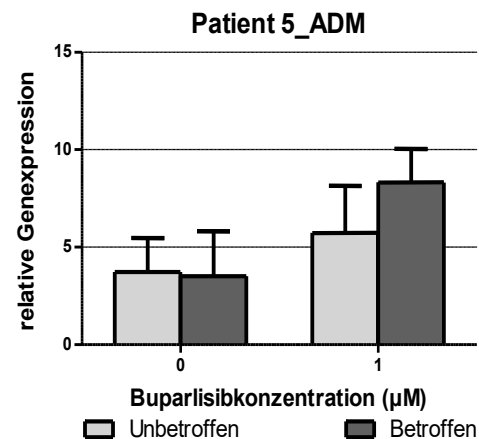
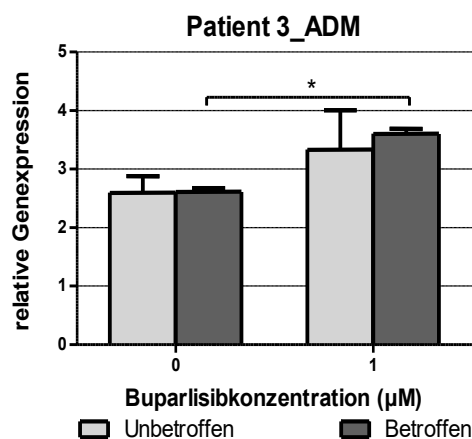
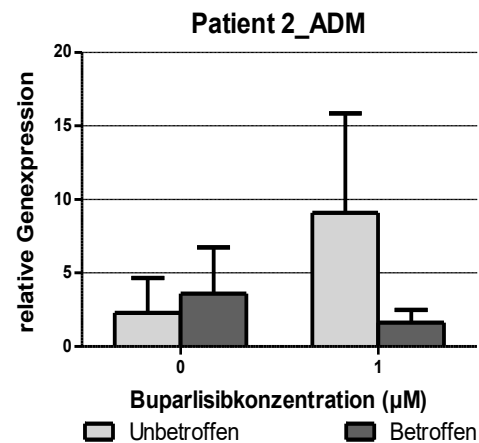
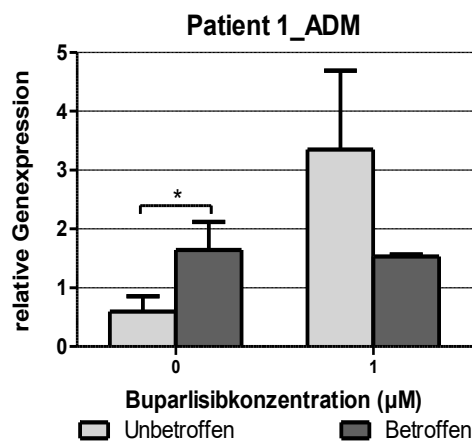


Abbildung 24: Relative Genexpression von PIK3CA bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. mit Supplementierung von, 1 µM Buparlisib; Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Bezüglich der Genexpression von PIK3CA nach einwöchiger Kultivierung in ADM wurden sechs Patienten untersucht (vgl. Abbildung 25). Bei der Hälfte der Patienten (vgl. Patient 1, 2, und 12) konnte eine höhere basale Genexpression von PIK3CA bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe nachgewiesen werden. Dabei ergab sich bei Patient 1 ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe. Bei Patient 3 und 5 lag das Expressionsniveau adipogen differenzierter Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe auf gleichem Niveau. Bei Patient 6 konnte hingegen eine höhere basale PIK3CA-Expression seitens adipogen differenzierter Zellen aus unbetroffenem Gewebe nachgewiesen werden, wobei sich ein signifikanter Unterschied ergab.

Ähnlich wie bei den ASCs führte die Inhibitorzugabe bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe zu einer Induktion der PIK3CA-Expression der Zellen. Bei Patient 12

konnte dabei ein hoch signifikanter Unterschied zum Ausgangswert bei beiden Zellarten festgestellt werden. Bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe konnte bei 2/3 der Patienten (vgl. Patient 3, 5, 6 und 12) ebenfalls eine Induktion der Genexpression nachgewiesen werden, wobei die Expression bei Patient 3 und 6 signifikant, bei Patient 12 hoch signifikant gesteigert wurde. Bei Patient 1 blieb die PIK3CA-Expression nach Zugabe von 1 μ M Buparlisib bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe auf konstantem Niveau, bei Patient 2 konnte hingegen eine Reduktion der Genexpression verzeichnet werden. Die signifikanten Unterschiede in der basalen Genexpression bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe konnte nach Inhibitorzugabe bei Patient 1 und 6 aufgehoben werden. Eine Verhältnismkehr der Expressionsverhältnisse der adipogen differenzierten Zellen im Vergleich zum Ausgangswert zeigte sich bei 5 von 6 Patienten (vgl. Patient 1, 2, 5, 6 und 12).



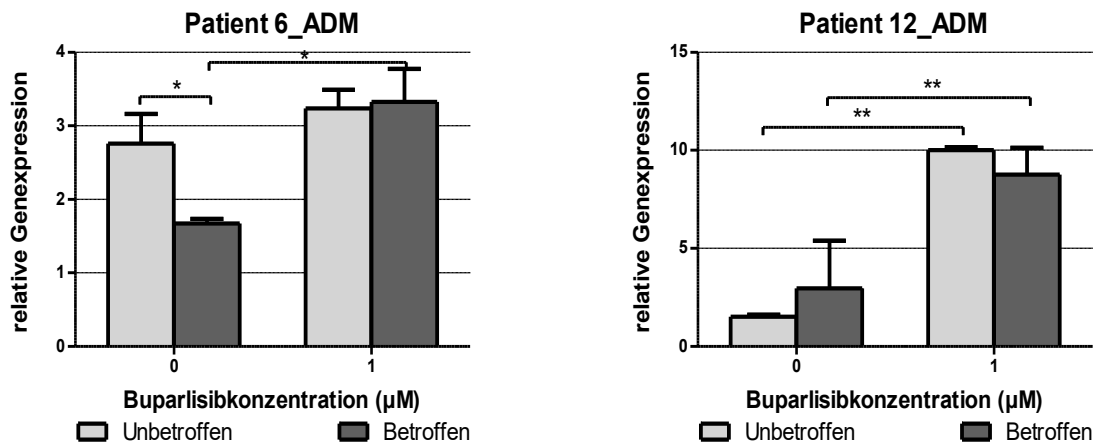


Abbildung 25: Relative Genexpression von PIK3CA bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. mit Supplementierung von, 1 µM Buparlisib; Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

4.3.2.3. PTEN

Bezüglich der PTEN-Genexpression wurden ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe von insgesamt 5 Patienten untersucht. Im unbehandelten Zustand wiesen ASCs aus betroffenem Gewebe im Durchschnitt eine höhere Genexpression von PTEN auf als ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 26). Die PTEN-Expression bei ASCs aus betroffenem Gewebe betrug dabei durchschnittlich 1,07, während die Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei im Mittel 0,98 lag. Unter Inhibitorzugabe kam es zum Angleichen der durchschnittlichen Genexpression. Dabei wurde die PTEN-Expression beider Zellarten unter Einfluss von Buparlisib der Konzentration 1 µM auf einen Wert von im Durchschnitt 1,52 gesteigert.

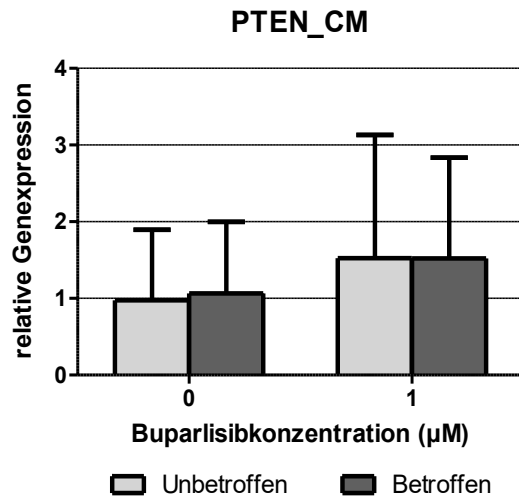
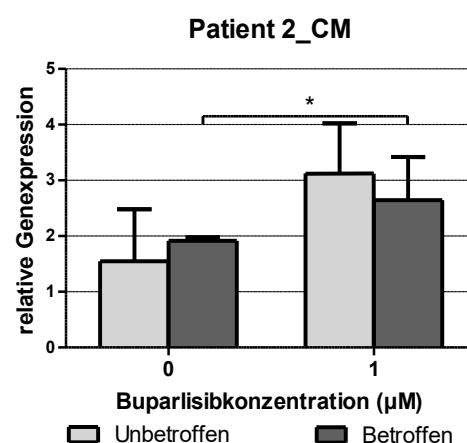
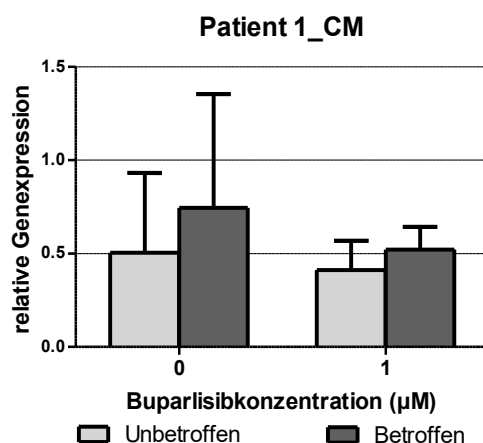


Abbildung 26: Durchschnittliche relative Genexpression von PTEN bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 µM Buparlisib; Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur PTEN-Genexpression der einzelnen Patienten dargestellt (vgl. Abbildung 27). Im unbehandelten Zustand wurde bei 3 von 5 Patienten eine höhere PTEN-Expression bei ASCs aus betroffenem Gewebe nachgewiesen (vgl. Patient 1, 2, 12). Unter Einfluss von Buparlisib konnte bei allen Patienten, außer Patient 1, eine Umkehr der initialen Expressionsverhältnisse erzeugt werden. Dabei wurde die PTEN-Expression bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei der Mehrzahl der Patienten herabreguliert (vgl. Patient 1, 4 und 6), bei ASCs aus betroffenem Gewebe hingegen induziert (vgl. Patient 2, 4, und 12). Bei Patient 2 ließ sich eine signifikante PTEN-Induktion seitens der ASCs aus betroffenem Gewebe unter Inhibitoreinfluss nachweisen.



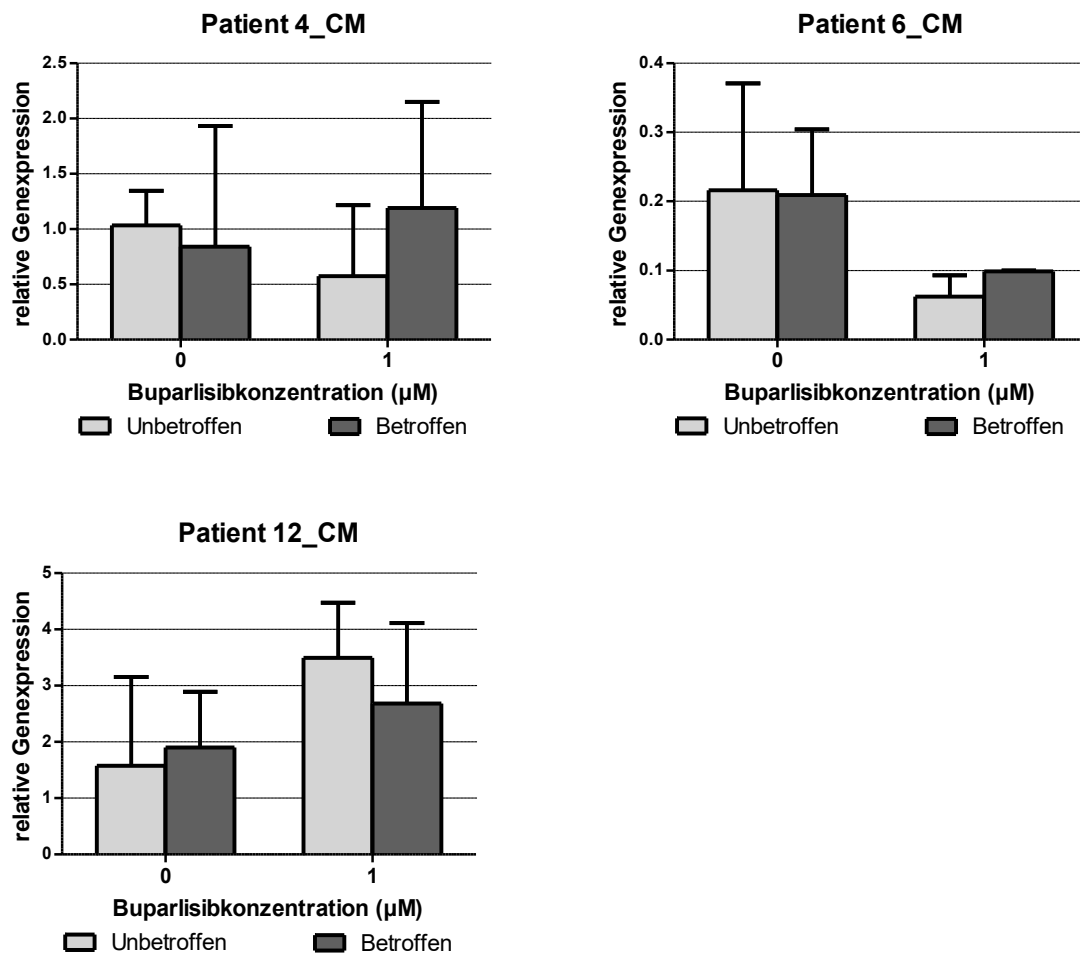


Abbildung 27: Relative Genexpression von PTEN bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. mit Supplementierung von, 1 µM Buparlisib; Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

4.3.2.4. AKT1

Bezüglich der relativen Genexpression von AKT1 wurden insgesamt sieben Patienten untersucht. Nach einwöchiger Kultivierung in CM konnte eine höhere Genexpression bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe festgestellt werden als bei ASCs aus betroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 28 A). Im unbehandelten Zustand wiesen ASCs aus unbetroffenem Gewebe eine durchschnittliche Expression von 1,54 auf, ASCs aus betroffenem Gewebe von 1,41. Unter Buparlisibsupplementierung konnte die Genexpression von AKT1 bei ASCs aus betroffenem Gewebe über das Maß von ASCs aus unbetroffenem Gewebe angehoben werden. Die

durchschnittliche Genexpression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe betrug bei Kultivierung mit 1 μ M Buparlisib 1,43, von ASCs aus betroffenem Gewebe im Mittel 1,88.

Bei einwöchiger Kultivierung in ADM zeigte sich hingegen eine höhere basale Genexpression von AKT1 seitens der adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 28 B). Durchschnittlich betrug die Genexpression von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe 2,59, von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe 1,28. Unter Supplementierung von Buparlisib ergab sich für beide Zellarten eine Zunahme der AKT1-Expression, wobei adipogen differenzierte Zellen aus betroffenem Gewebe unter Inhibitoreinfluss eine höhere Genexpression aufwiesen als adipogen differenzierte Zellen aus unbetroffenem Gewebe. Unter 1 μ M Buparlisib konnte für adipogen differenzierte Zellen aus unbetroffenem Gewebe eine durchschnittliche Genexpression vom 3,41 erhoben werden. Für adipogen differenzierte Zellen aus betroffenem Gewebe ergab sich eine Expression von 4,07.

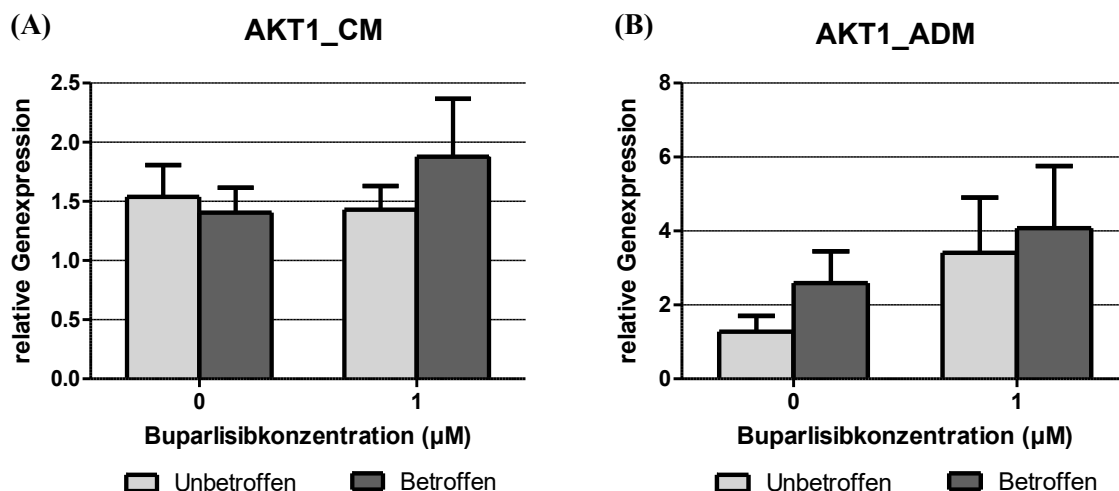
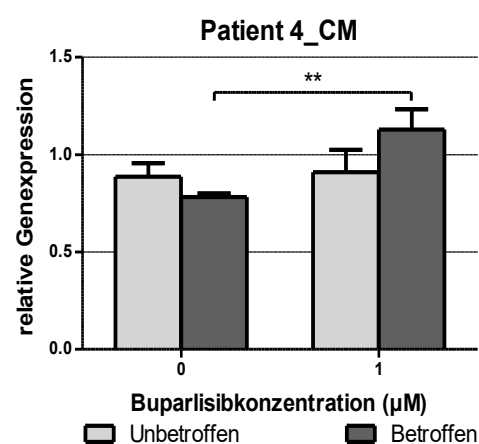
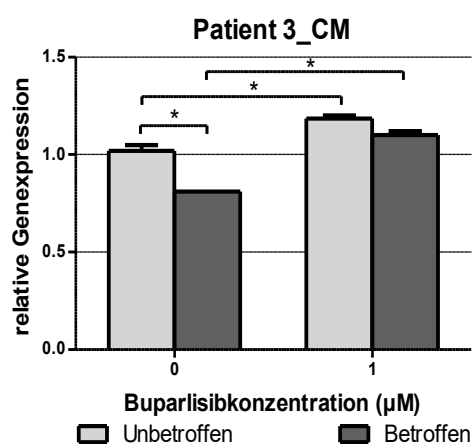
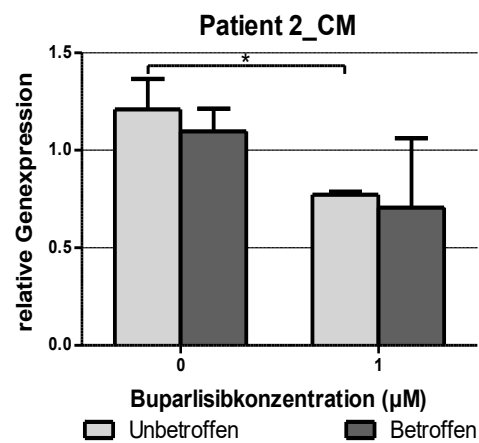
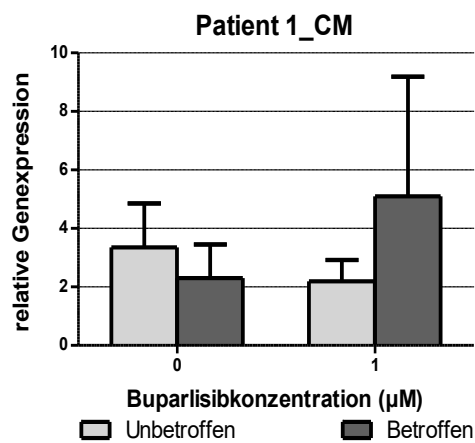


Abbildung 28: Durchschnittliche relative Genexpression von AKT1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) (Abb. 28 A) bzw. adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM) (Abb. 28 B). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 μ M Buparlisib, Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μ M; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Anschließend werden die Ergebnisse zur AKT1-Genexpression von ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe von sieben Patienten aufgeführt (vgl. Abbildung 29). Im unbehandelten Zustand zeigten ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei 6 von 7 Patienten eine höhere AKT-Expression als ASCs aus betroffenem Gewebe (vgl. Patient 1,2,3,4,6 und 12). Bei

Patient 3 war hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nachweisbar.

Unter Einfluss von Buparlisib konnte bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei der Mehrzahl der Patienten eine Reduktion der AKT-Expression (vgl. Patient 1, 2, 5 und 6), bei ASCs aus betroffenem Gewebe hingegen eine Induktion der Expression (vgl. Patient 1, 3, 4 und 12) gemessen werden. Bei Patient 2 ließ sich bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe dabei eine signifikante Reduktion der Expressionslevel nachweisen. Bei Patient 4 blieb die AKT1-Expression bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe unter Buparlisibeeinfluss stabil. Die Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe wurde hoch signifikant gesteigert. Bei Patient 3 und 12 zeigte sich bei beiden ASCs eine signifikante Steigerung der Genexpression zum Ausgangswert.



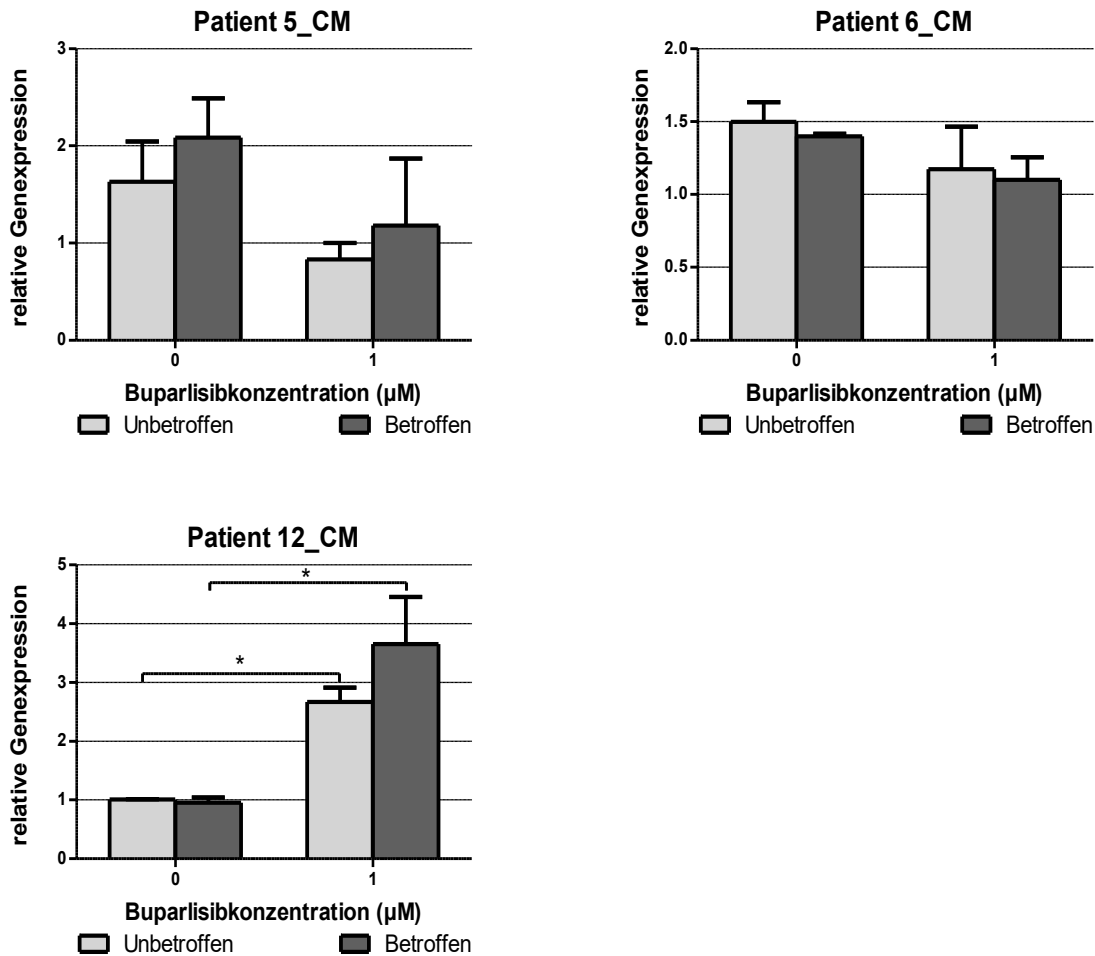
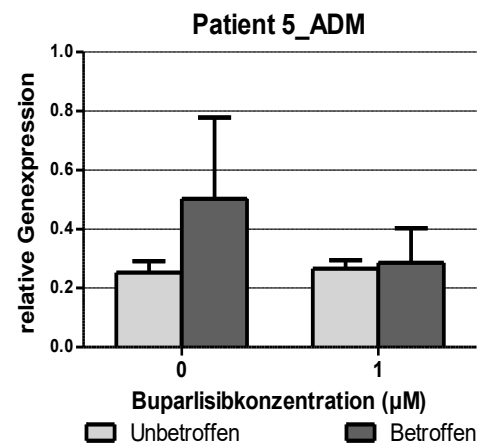
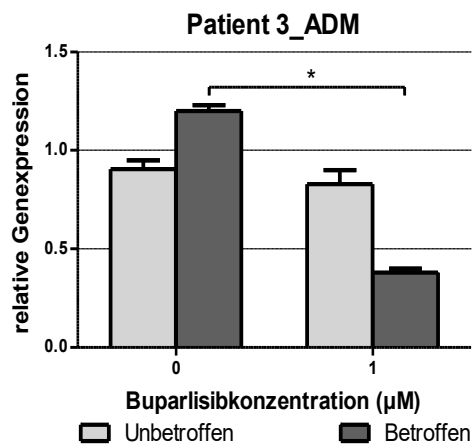
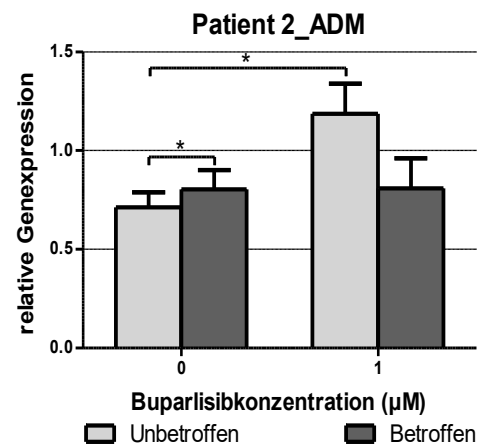
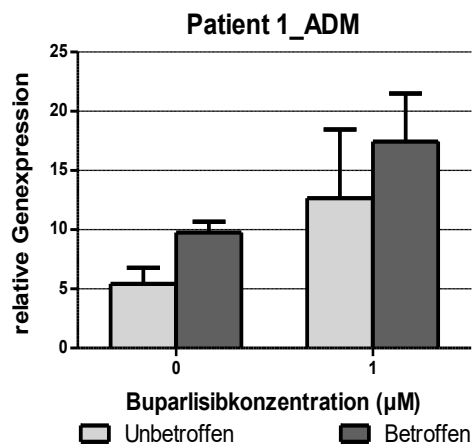


Abbildung 29: Relative Genexpression von AKT1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. mit Supplementierung von, 1 µM Buparlisib; Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Bezüglich der Genexpression von AKT1 bei adipogen differenzierten Zellen wurden sechs Patienten ausgewertet. Nach einwöchiger adipogener Differenzierung ließ sich bei allen Patienten eine höhere AKT1-Expression bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe nachweisen (vgl. Abbildung 30). Bei Patient 2 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der basalen Akt1-Expression von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe.

Unter Inhibitoreinfluss ließen sich für adipogen differenzierte Zellen aus betroffenem Gewebe unterschiedliche Tendenzen nachweisen. Bei Patient 1 und 12 wurde die Expression von AKT1 durch 1 µM Buparlisib induziert. Bei Patient 2 und 6 blieb die AKT1-Expression bei adipogen differenzierten Zellen auf gleichem Niveau. Bei Patient 3 und 5 kam es zu einer Abnahme der AKT1-Expression, wobei sich bei Patient 3 eine zum Ausgangswert signifikante Reduktion

nachweisen ließ. Bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe ließ sich bei der Mehrzahl der Patienten eine Induktion der Genexpression nachvollziehen (vgl. Patient 1, 2, 6 und 12), wobei die Genexpression bei Patient 2 und 12 signifikant gesteigert wurde. Bei Patient 3 kam es zur Reduktion der AKT1-Expression. Bei Patient 5 blieb die Expression von AKT1 bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe auf stabilem Niveau. Eine Umkehr der basalen Expressionsverhältnisse wurde bei adipogen differenzierten Zellen bei 2/3 der Patienten beobachtet (vgl. Patient 2, 3, 6 und 12).



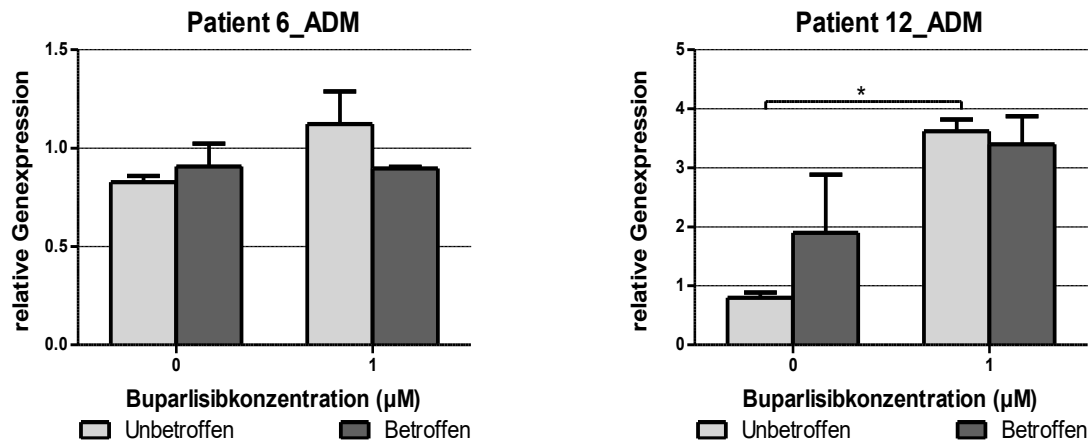


Abbildung 30: Relative Genexpression von AKT1 bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. mit Supplementierung von 1 μ M Buparlisib; Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μ M; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

4.3.2.5. MTOR

Bei den Untersuchungen zur MTOR-Genexpression konnte ähnliche Ergebnisse wie für AKT1 detektiert werden. Nach einwöchiger Kultivierung mit CM zeigten ASCs aus unbetroffenem Gewebe eine höhere durchschnittliche, basale Genexpression von MTOR (vgl. Abbildung 31 A). Dabei wurde die durchschnittliche Genexpression von ASCs aus unbetroffene Gewebe mit 1,17, von ASCs aus betroffenem Gewebe mit 1,14 bemessen. Unter Inhibitoreinfluss konnte die Genexpression von ASCs aus betroffenem Gewebe gesteigert werden, wohingegen die Expression von MTOR bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe reduziert wurde. Nach Supplementierung von 1 μ M Buparlisib wurde eine durchschnittliche MTOR-Expression von 1,14 für ASCs aus unbetroffenem Gewebe detektiert. Die durchschnittliche Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe lag unter Einfluss von 1 μ M Buparlisib bei 1,44.

Nach Kultivierung in ADM zeigten adipogen differenzierte Zellen aus betroffenem Gewebe im unbehandelten Zustand eine höhere durchschnittliche MTOR-Genexpression als adipogen differenzierte Zellen aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 31 B). Im Durchschnitt konnte für adipogen differenzierte Zellen aus unbetroffenem Gewebe eine Expression von 1,33, für adipogen differenzierte Zellen aus betroffenem Gewebe von 2,56 gemessen werden. Unter Inhibitoreinfluss zeigen sich gegenläufige regulatorische Vorgänge. Die Genexpression von MTOR wurde bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe unter Einfluss

von Buparlisib im Mittel gesteigert, die Expression von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe im Durchschnitt hingegen gesenkt. Dabei wurde die Genexpression von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe unter Zugabe von 1 μM auf durchschnittlich 3,51 angehoben. Bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe betrug die durchschnittliche Genexpression von MTOR bei 1 μM Buparlisibsupplementierung 2,16.

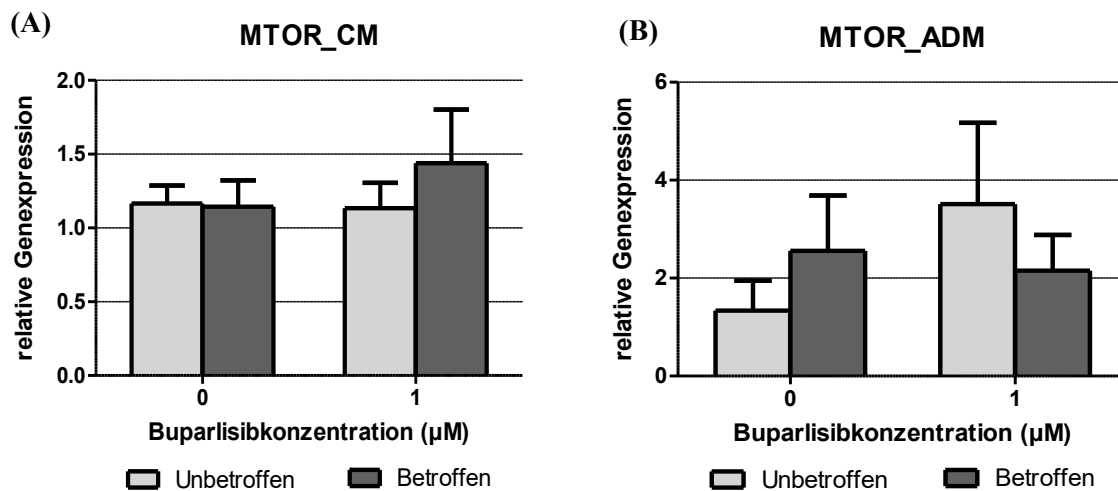
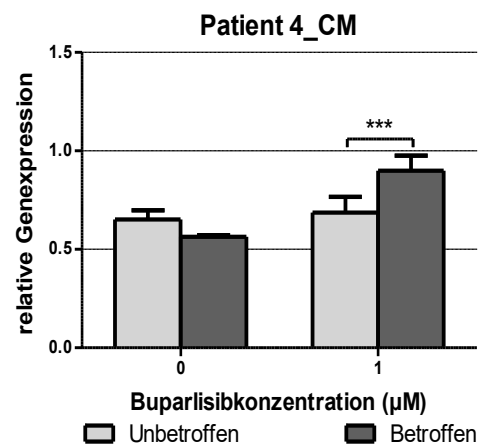
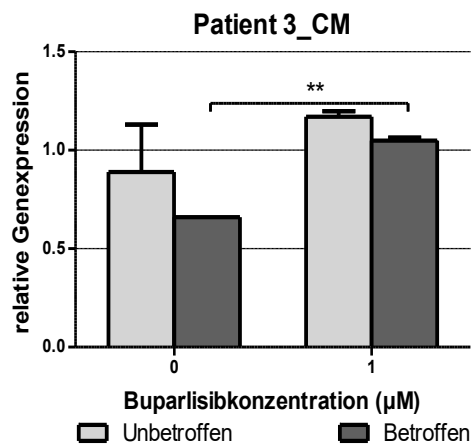
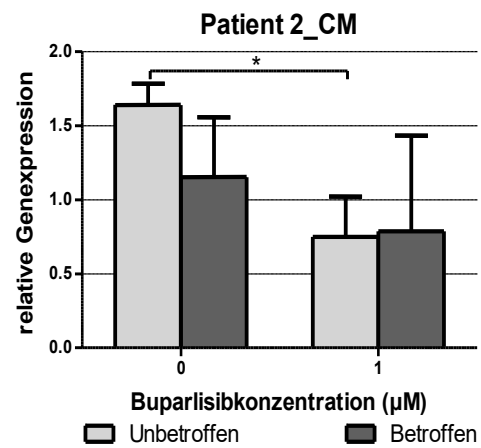
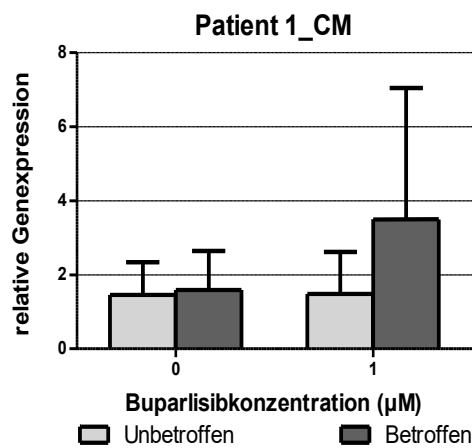


Abbildung 31: Durchschnittliche relative Genexpression von MTOR bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) (Abb. 25 A) bzw. adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM) (Abb. 25 B); Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 μM Buparlisib, Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μM ; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Bezüglich der MTOR-Genexpression wurden ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe von insgesamt sieben Patienten untersucht (vgl. Abbildung 32). Bei mehr als der Hälfte der Patienten wiesen ASCs aus unbetroffenem Gewebe eine höhere basale MTOR-Genexpression auf als ASCs aus betroffenem Gewebe (vgl. Patient 2, 3, 4, 6 und 12). Dabei ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den ASCs bei zwei Patienten nachweisen (vgl. Patient 6 und 12).

Nach Zugabe von 1 μM Buparlisib wurde die MTOR-Expression bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei drei Patienten (vgl. Patient 2, 5 und 6) gesenkt, wobei sich bei Patient 2 und 6 eine signifikante Reduktion der Genexpression nachweisen ließ. Bei weiteren zwei Patienten blieb die MTOR-Expression auf stabilem Niveau (vgl. Patient 1 und 4). Bei Patient 3 und 12 wurde die Genexpression der ASCs aus unbetroffenem Gewebe hingegen gesteigert, bei Patient 12 dabei höchst signifikant. Bei ASCs aus betroffenem Gewebe wurde die MTOR-Expression bei

2/3 der Patienten unter Inhibitoreinfluss gesteigert (vgl. Patient 1, 3, 4 und 12), wobei sich die Expression von Patient 3 hoch signifikant und bei Patient 12 signifikant zum Ausgangswert unterschied. Bei Patient 4 ließ sich zwischen ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe unter Inhibitoreinfluss ein höchst signifikanter Unterschied in der MTOR-Genexpression nachweisen. Eine Verhältnismkehr der basalen MTOR-Expression konnte unter Inhibitoreinfluss bei der Hälfte der Patienten detektiert werden (vgl. Patient 2, 4 und 6).



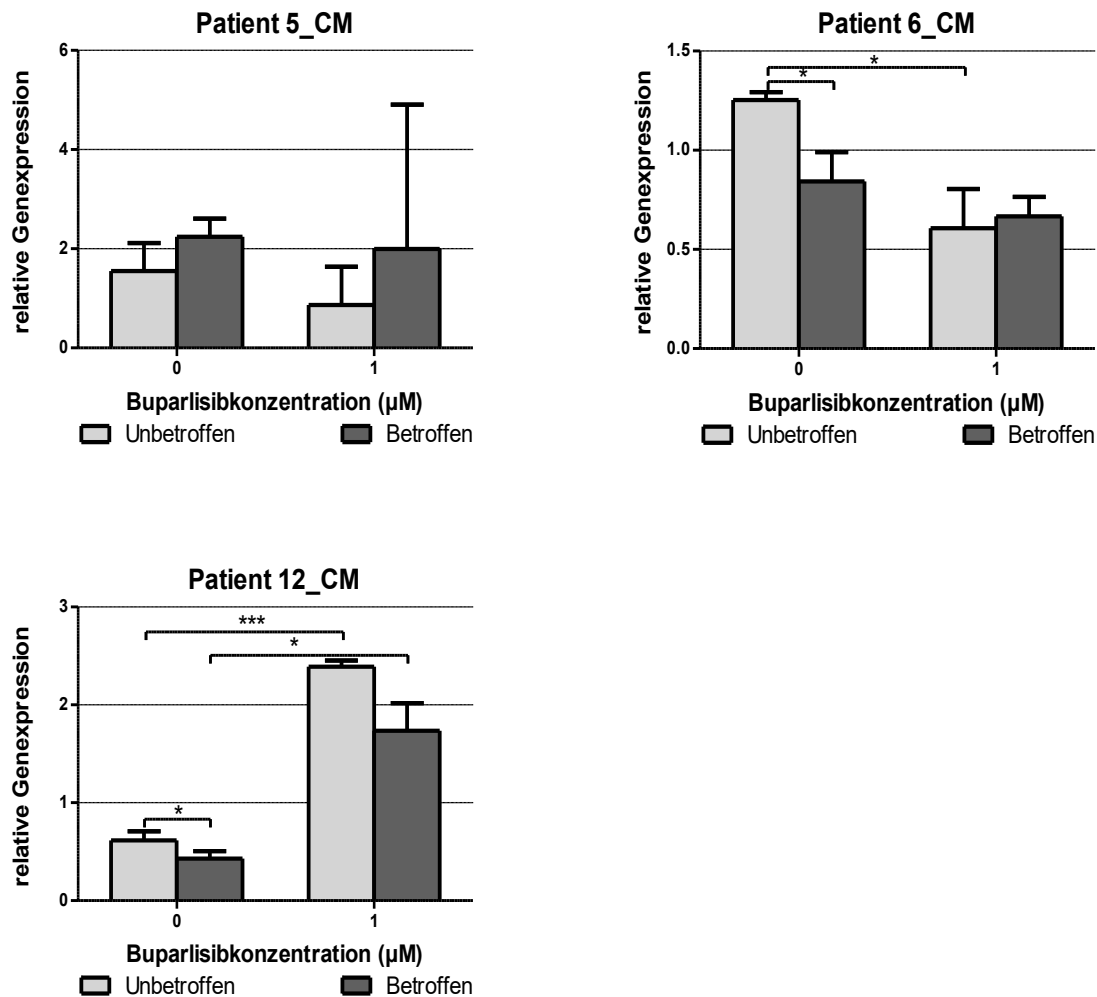
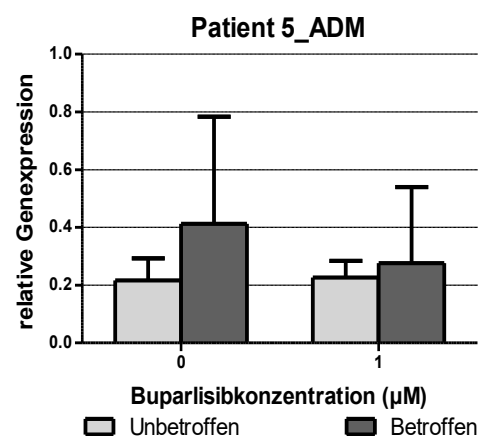
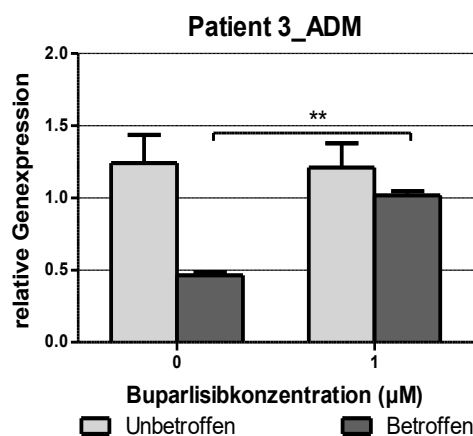
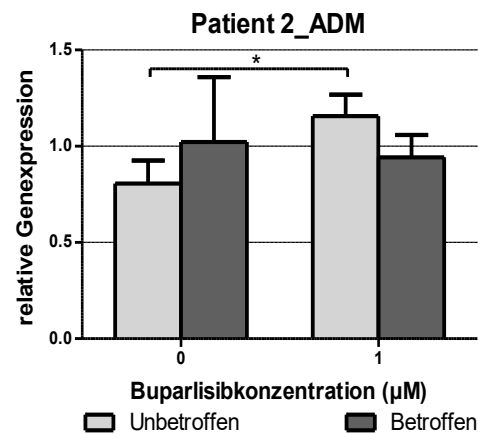
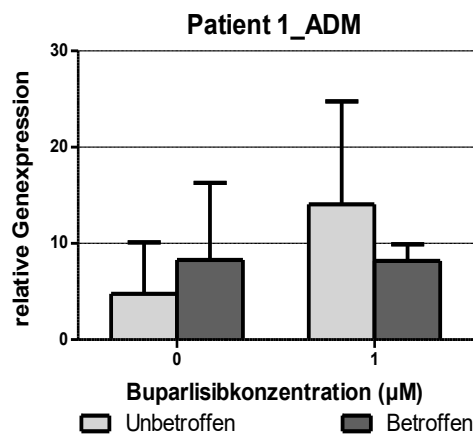


Abbildung 32: Relative Genexpression von MTOR bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 μM Buparlisib, Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Es wurden sechs Patienten bezüglich der MTOR-Expression nach adipogener Differenzierung der ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe ausgewertet. Dabei ließ sich eine höhere basale MTOR-Expression bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe bei 2/3 der Patienten nachweisen (vgl. Abbildung 33, Patient 1, 2, 5 und 12).

Unter Supplementierung von 1 μM Buparlisib wurde die Genexpression von MTOR bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe bei mehr als der Hälfte der Patienten (vgl. Patient 1, 2, 6 und 12) über das Maß adipogen differenzierter Zellen aus betroffenem Gewebe gesteigert, sodass es zu einer Verhältnismkehr der Expression adipogen differenzierter Zellen kam. Bei Patient 2 konnte hierbei eine signifikante Expressionssteigerung zum Ausgangswert von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe

nachgewiesen werden. Bei Patient 6 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe. Bei den übrigen Patienten (vgl. Patient 3 und 5) blieb die Expression der adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe auf gleichem Niveau. Bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe zeigte sich ein heterogenes Bild. Bei drei Patienten (vgl. Patient 2, 5 und 12) kam es unter Inhibitoreinfluss zu Reduktion der MTOR-Expression, bei zwei Patienten (vgl. Patient 3 und 6) zu einer Induktion der Expression. Bei einem Patienten blieb das Expressionsniveau stabil (vgl. Patient 1). Bei Patient 3 zeigte sich dabei eine hoch signifikante Expressionssteigerung unter Buparlisibeinfluss seitens adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe.



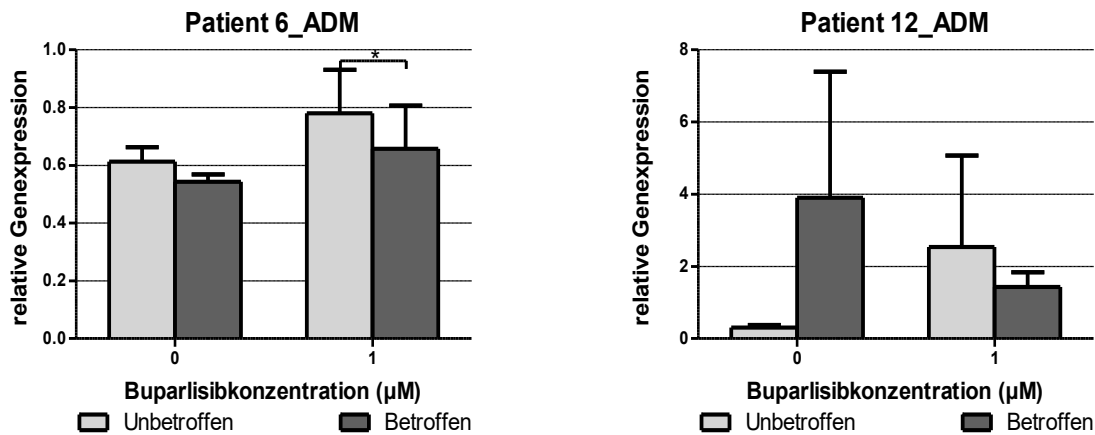


Abbildung 33: Relative Genexpression von MTOR bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM); Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 µM Buparlisib, Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

4.3.2.6. RPS6KB1

Bezüglich der Genexpression von RPS6KB1 konnten Ergebnisse von zwei Patienten erhoben werden. Sowohl nach Kultivierung in CM, als auch nach Kultivierung in ADM zeigten ASCs aus betroffenem Gewebe im unbehandelten Zustand eine höhere, durchschnittliche Genexpression von RPS6KB1 als ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 34 A und B). Für ASCs aus unbetroffenem Gewebe konnte eine durchschnittliche Expression von 2,14 nachgewiesen werden, bei ASCs aus betroffenem Gewebe von 2,56 (vgl. Abbildung 34 A). Durch die Supplementierung von Buparlisib wurde die durchschnittliche Expression von RPS6KB1 sowohl bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe, als auch bei ASCs aus betroffenem Gewebe induziert. Bei Zugabe von 1 µM Buparlisib wurde die Genexpression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe im Durchschnitt auf 3,81 angehoben. Die RPS6KB1-Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe betrug unter Inhibitoreinfluss im Mittel 4,04. Bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe konnte dabei eine zur basalen RPS6KB1-Expression signifikante Induktion nachgewiesen werden.

Bei adipogen differenzierten Zellen ließ sich im unbehandelten Zustand ebenfalls eine höhere durchschnittliche Genexpression bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe nachweisen (vgl. Abbildung 34 B). Dabei betrug die RPS6KB1-Expression im unbehandelten Zustand bei adipogen differenzierten Zellen im Durchschnitt 4,58, bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe 6,83. Unter Zugabe von 1 µM Buparlisib ließ sich bei beiden

Zellreihen eine Induktion der RPS6KB1-Expression feststellen, wobei die Expression von adipogen differenzierte Zellen aus unbetroffenem Gewebe signifikant gesteigert wurde. Die Expression von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe betrug im Durchschnitt 9,62, von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe durchschnittlich 12,72.

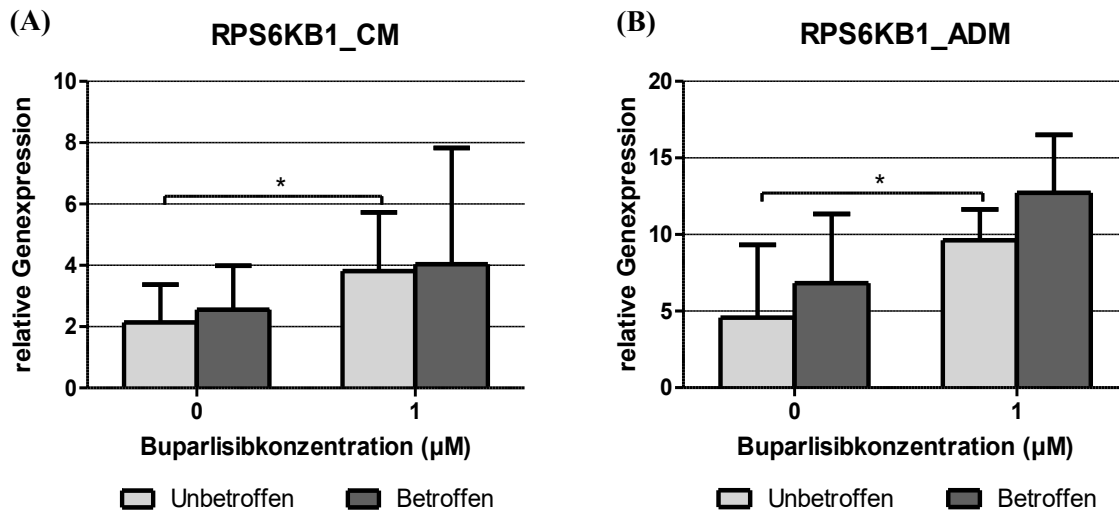


Abbildung 34: Durchschnittliche relative Genexpression von RPS6KB1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe. Versuchsdurchführung nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) (Abb. 33A) bzw. adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM) (Abb. 33B); Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 µM Buparlisib, Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Nachfolgend werden die Ergebnisse zur RPS6KB1-Expression der einzelnen Patienten auf Ebene der ASCs aufgeführt (vgl. Abbildung 35). Im unbehandelten Zustand lag die RPS6KB1-Genexpression von Patient 1 bei ASCs aus betroffenem Gewebe auf gleichem Niveau wie bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Unter Buparlisibzugabe kam es sowohl bei ASCs aus betroffenem, als auch aus unbetroffenem Gewebe zu einer Steigerung der RPS6KB1-Expression, wobei die Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe die von ASCs aus unbetroffenem Gewebe überstieg.

Bei Patient 3 konnte im unbehandelten Zustand eine höhere RPS6KB1-Expression seitens der ASCs aus betroffenem Gewebe nachgewiesen werden. Die Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe konnte unter Buparlisibeeinfluss im Gegensatz zu der Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe signifikant induziert werden. Unter Buparlisibeeinfluss ließ sich

ein signifikanter Unterschied zwischen der RPS6KB1-Expression unter Buparlisibeinfluss nachweisen.

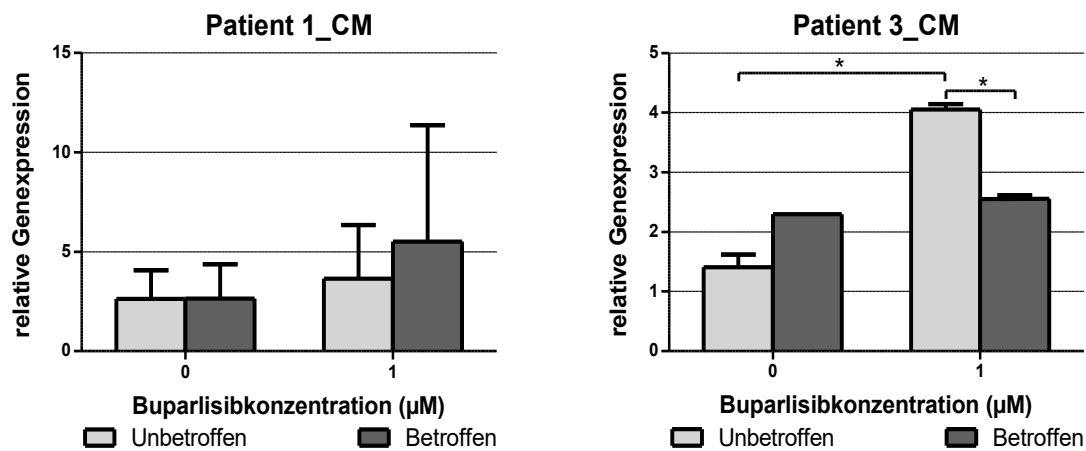
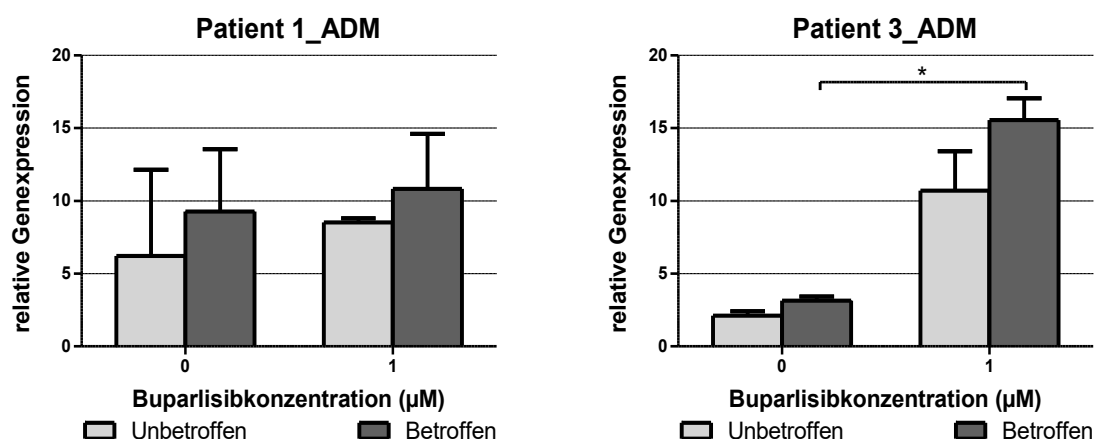


Abbildung 35: Relative Genexpression von RPS6KB1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 µM Buparlisib, Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Anschließend werden die Ergebnisse zur RPS6KB1-Expression auf Ebene adipogen differenzierter Zellen dargestellt (vgl. Abbildung 36). Im unbehandelten Zustand konnte bei beiden Patienten eine höhere RPS6KB1-Genexpression seitens adipogen differenzierter Zellen aus betroffenem Gewebe nachgewiesen werden. Unter Buparlisibzugabe kam es bei beiden Patienten sowohl bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe, als auch bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe zu einer RPS6KB1-Expressionssteigerung. Bei Patient 3 ließ sich eine signifikante Induktion der Expression bei ASCs aus betroffenem Gewebe detektieren.



*Abbildung 36: Relative Genexpression von RPS6KB1 bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 μ M Buparlisib, Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μ M; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$*

4.3.2.7. EIF4EBP1

Die durchschnittliche Genexpression von EIF4EBP1 war, so wie die durchschnittliche Genexpression von RPS6KB1, bei ASCs aus betroffenem Gewebe sowohl nach Kultivierung mit CM, als auch nach Kultivierung mit ADM im unbehandelten Zustand im Vergleich zu ASCs aus unbetroffenem Gewebe erhöht (vgl. Abbildung 37 A und B). Dabei betrug die basale Genexpression von ASCs aus betroffenem Gewebe bei Kultivierung mit CM im Durchschnitt 1,21, von ASCs aus unbetroffenem Gewebe 1,06. Unter Zugabe von 1 μ M Buparlisib wurde die Genexpression von beiden Zellarten reduziert, wobei die Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe unter die von ASCs aus betroffenem Gewebe abfiel. Bei ASCs aus betroffenem Gewebe wurde die durchschnittliche Genexpression auf 0,65, die Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe auf im Mittel 0,84 gesenkt.

Bei Kultivierung in ADM lag die basale EIF4EBP1-Expression bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe bei durchschnittlich 1,26, bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe bei 0,86. Unter Zugabe von 1 μ M Buparlisib zeigten die adipogen differenzierten Zellen gegenläufige Tendenzen. Während die Expression von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe auf durchschnittlich 1,21 gesteigert wurde, wurde die Expression von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe unter das Maß von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe auf durchschnittlich 1,05 gesenkt.

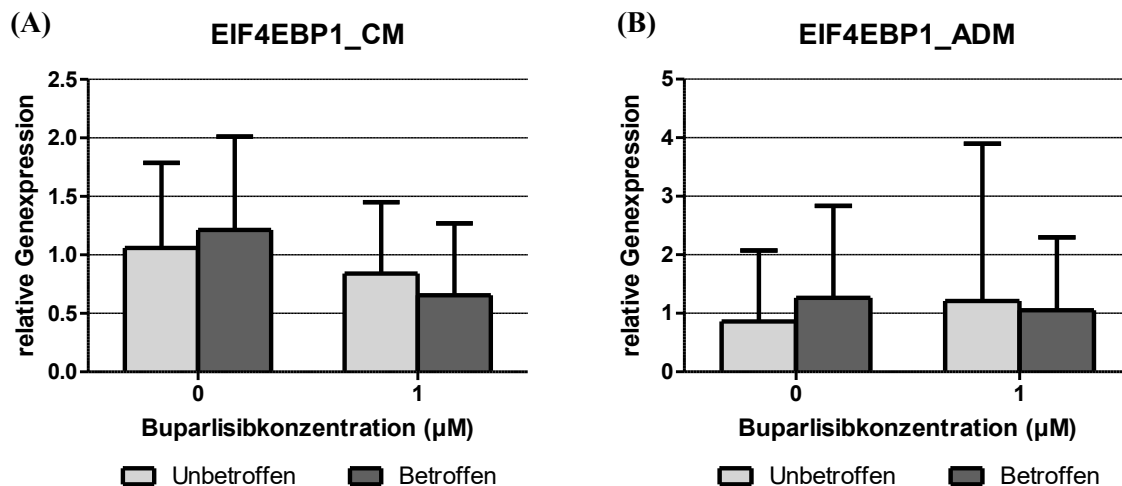
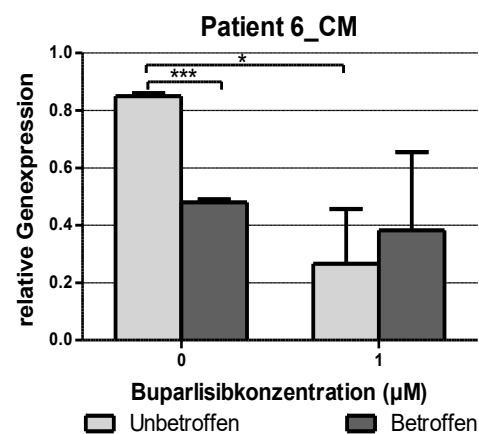
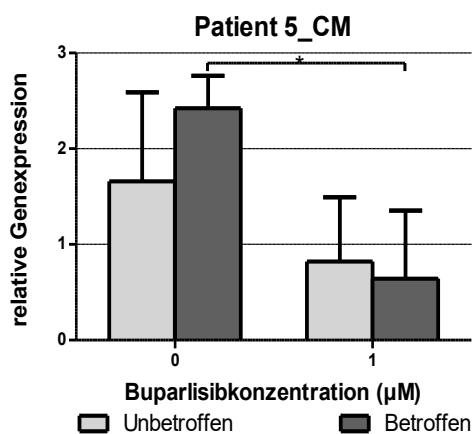
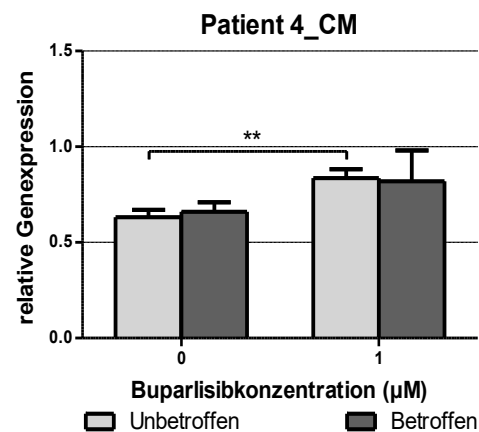
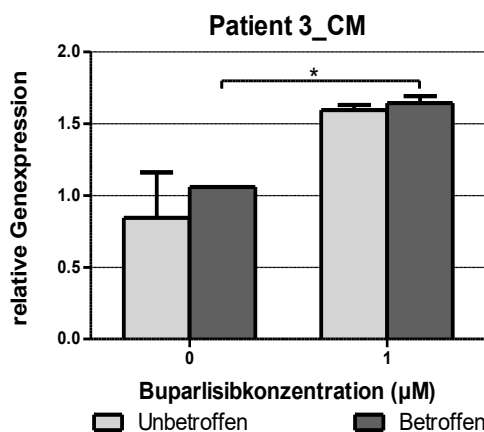
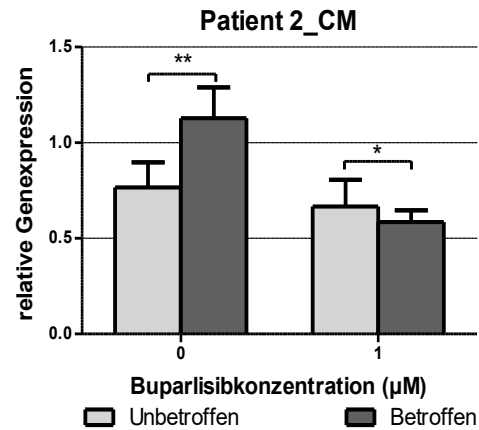
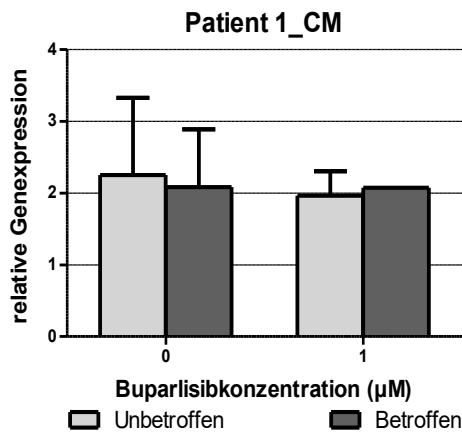


Abbildung 37: Durchschnittliche relative Genexpression von EIF4EBP1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) (Abb. 37A) bzw. adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM) (Abb. 37B). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 μM Buparlisib, Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Insgesamt wurde die EIF4EBP1-Genexpression von ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe von sieben Patienten untersucht (vgl. Abbildung 38). Bei 5 von 7 Patienten lag die EIF4EBP1-Genexpression bei ASCs aus betroffenem Gewebe über der Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Patient 2, 3, 4, 5 und 12). Bei Patient 2 zeigte sich dabei ein hoch signifikanter Unterschied in der basalen Expression beider ASCs. Bei Patient 1 und 6 lag die Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe hingegen unterhalb der Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe, wobei sich bei Patient 6 ein höchst signifikanter Unterschied nachweisen ließ. Unter Zugabe von Buparlisib wurde die Expressionslevel bei beiden ASCs bei der Mehrzahl der Patienten reduziert (vgl. Patient 2, 5, 6 und 12), wobei sich bei diesen Patienten stets eine Umkehr der Verhältnisse gegenüber basalen Genexpression der ASCs zeigte. Bei Patient 2 fiel die Genexpression von ASCs aus betroffenem Gewebe unter die Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe, wobei der hoch signifikante Unterschied zu einem signifikanten Unterschied zwischen der Genexpression beider ASCs reduziert wurde. Bei Patient 5 wurde die EIF4EBP1-Expression bei ASCs aus betroffenem Gewebe signifikant zum Ausgangswert reduziert und fiel unter das Niveau von ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Bei Patient 6 ließ sich eine signifikante Reduktion der Expression seitens der ASCs aus unbetroffenem Gewebe nachweisen, welches unter das Niveau von ASCs aus betroffenem Gewebe gesenkt wurde. Bei Patient 12 wurden die Expression beider ASCs im Vergleich zum unbehandelten Zustand signifikant gesenkt, wobei die Expression von ASCs aus betroffenem

Gewebe unter das Niveau von ASCs aus unbetroffenem Gewebe abfiel und sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden ASCs unter Inhibitoreinfluss ergab. Bei Patient 1 blieb die Genexpression unverändert. Bei Patient 3 und 4 zeigte sich eine Induktion der Genexpression beider ASCs, wobei bei Patient 3 eine signifikante Steigerung der Genexpression bei ASCs aus betroffenem Gewebe und bei Patient 4 eine hoch signifikante Steigerung bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe festgestellt werden konnte.



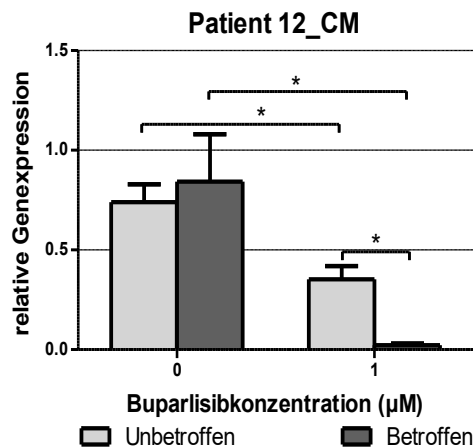


Abbildung 38: Relative Genexpression von EIF4EBP1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 µM Buparlisib, Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Bezüglich der EIF4EBP1-Expression adipogen differenzierter Zellen wurden sechs Patienten untersucht (vgl. Abbildung 39). Im unbehandelten Zustand zeigte sich ebenfalls eine höhere Genexpression seitens adipogen differenzierter Zellen aus betroffenem Gewebe bei 5 von 6 Patienten (vgl. Patient 1, 2, 3, 5, 12). Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der basalen EIF4EBP1-Expression adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe bei Patient 3. Bei Patient 6 hingegen zeigte sich eine signifikant höhere Genexpression von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe gegenüber der Expression von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe. Unter Inhibitorzugabe kam es bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem Gewebe bei allen Patienten zu einer Reduktion der EIF4EBP1-Expression, wobei die Expression bei 2/3 der Patienten (vgl. Patient 1, 2, 6 und 12) unter das Niveau von adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe gesenkt wurde. Zudem wurde bei Patient 3 der hoch signifikante Unterschied zwischen der basalen EIF4EBP1-Expression beider Zellreihen unter Inhibitoreinfluss aufgehoben. Bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem Gewebe fiel die Expression unter Buparlisibeeinfluss bei 2/3 der Patienten ab (vgl. Patient 3, 5, 6 und 12).

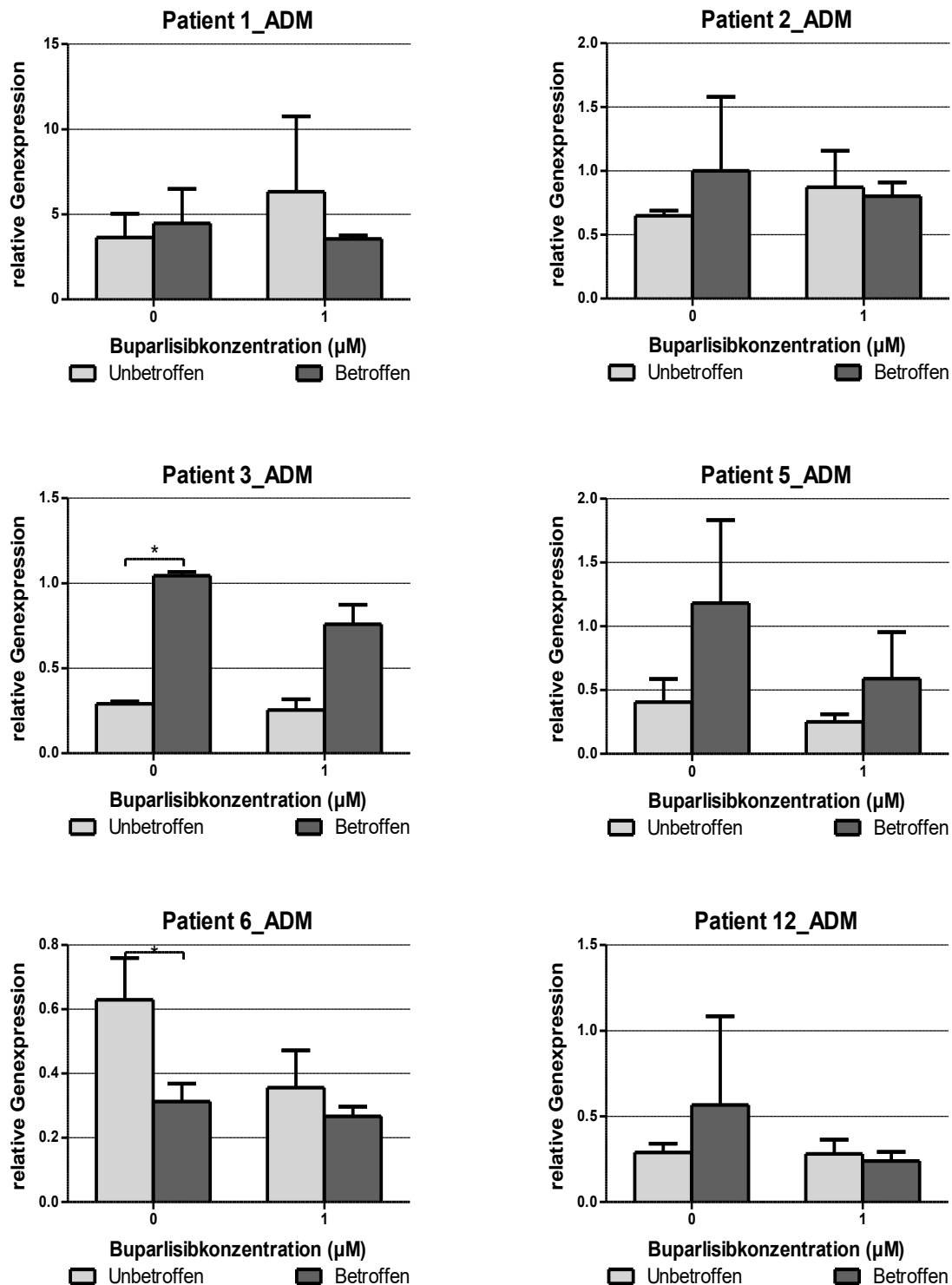


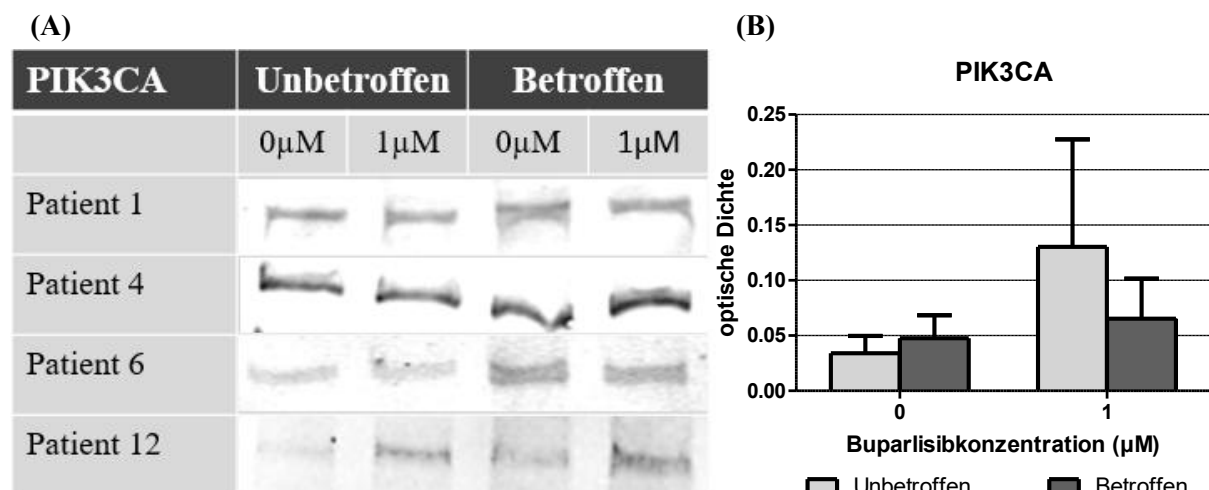
Abbildung 39: Relative Genexpression von EIF4EBP1 bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium (=ADM). Versuchsdurchführung im unbehandelten Zustand bzw. unter Supplementierung von 1 μ M Buparlisib, Mittelwert + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μ M; y-Achse: relative Genexpression; Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

4.4. Western Blot

Mittels Western Blots wurde die Proteinexpression des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs von ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe von MSL-Patienten untersucht. Hierbei wurde das Augenmerk zum einen auf die Expression der PI3-Kinase selbst gerichtet, zum anderen auf die Expression der RPS6-Kinase 1, einem Zielenzym der Signalkaskade, und dem Anteil von phosphorylierter und aktivierter p-RPS6-Kinase 1 am Gesamtprotein. Des Weiteren wurde der Einfluss des PI3-Kinase-Inhibitors Buparlisib auf die Proteinexpression ausgewertet.

4.4.1. PIK3CA

Bezüglich der PIK3CA-Proteinexpression wurden ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe von insgesamt vier Patienten mittels Western Blots untersucht (vgl. Abbildung 40 A). Im unbehandelten Zustand konnte im Durchschnitt eine höhere optische Dichte der Western Blot-Banden von PIK3CA bei ASCs aus betroffenem Gewebe festgestellt werden (vgl. Abbildung 40 B). Die optische Dichte der Banden von ASCs aus betroffenem Gewebe betrug im Durchschnitt 0,048, die optische Dichte der Banden von ASCs aus unbetroffenem Gewebe im Durchschnitt 0,034. Die Supplementierung von 1 μ M Buparlisib führte bei beiden Zellarten zur Induktion der durchschnittlichen PIK3CA-Expression, wobei die optische Dichte der Banden von ASCs aus unbetroffenem Gewebe über die optische Dichte der Banden von ASCs aus betroffenem Gewebe angehoben wurde. Im Durchschnitt wurde die optische Dichte der Banden bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe auf 0,13 und bei ASCs aus lipomatösem Gewebe auf 0,065 gesteigert.



*Abbildung 40 A): Darstellung der Western Blot-Banden von PIK3CA bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe von Patient 1, 4, 6 und 12 nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) mit und ohne Zugabe von 1 μ M Buparlisib. B): Durchschnittliche PIK3CA-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) mit und ohne Zugabe von 1 μ M Buparlisib; Quantifizierung der Proteinexpression durch photometrische Messung der optischen Dichte der Banden der Zielenzyme bezogen auf die optische Dichte der Banden des Housekeeping-Gens; Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μ M; y-Achse: optische Dichte, Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$*

Im Folgenden wird auf die relative Proteinexpression der einzelnen MSL-Patienten im Verhältnis zur Expression des *Housekeeping*-Gens nach einwöchiger Differenzierung in CM mit und ohne Inhibitorsupplementierung eingegangen. Bei drei von vier Patienten war die optische Dichte der PIK3CA-Banden im unbehandelten Zustand bei ASCs aus betroffenem Gewebe höher als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 41, Patient 1, 4, 6). Bei Patient 1 konnte bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe eine optische Dichte von 0,037 nachgewiesen werden, bei ASCs aus betroffenem Gewebe hingegen von 0,073. Bei Patient 4 wiesen die Banden bei ASCs aus betroffenem Gewebe eine optische Dichte von 0,022 im unbehandelten Zustand auf, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe von 0,013. Bei Patient 6 konnte eine optische Dichte von 0,048 bei ASCs aus betroffenem Gewebe detektiert werden, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe betrug diese 0,036. Bei Patient 12 lag die optische Dichte der Banden von ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe hingegen auf etwa gleichem Niveau, wobei diese bei von ASCs aus betroffenem Gewebe 0,047 betrug, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe 0,05.

Unter Einfluss von Buparlisib wurde die PIK3CA-Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei 3/4 der Patienten über das Maß von ASCs aus betroffenem Gewebe induziert (vgl. Patient 1, 6 und 12). Die Proteinexpression von ASCs aus betroffenem Gewebe blieb hingegen auf etwa stabilem Niveau (vgl. Patient 1, 4, 12). Bei Patient 1 zeigte sich die optische Dichte der PIK3CA-Banden bei ASCs aus betroffenem Gewebe mit einem Wert von 0,073 zum Ausgangswert unverändert, wohingegen die optische Dichte bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe mit einem Wert von 0,089 über das Niveau der optischen Dichte von ASCs aus betroffenem Gewebe anstieg. Bei Patient 4 wurde die optische Dichte der PIK3CA-Bande durch die Supplementierung von Buparlisib von ASCs aus unbetroffenem Gewebe auf einen Wert von 0,019 angehoben, wohingegen die optische Dichte bei ASCs aus betroffenem Gewebe mit 0,023 etwa unverändert blieb. Bei Patient 6 kam es zur Induktion der PIK3CA-Proteinexpression beider ASCs. Dabei konnte eine optische Dichte von 0,244 bei ASCs aus

unbetroffenem Gewebe detektiert werden. Bei ASCs aus betroffenem Gewebe betrug diese 0,11. Bei Patient 12 lag die optische Dichte der PIK3CA-Bande bei ASCs aus betroffenem Gewebe unter Buparlisibeeinfluss bei 0,053, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei 0,168.

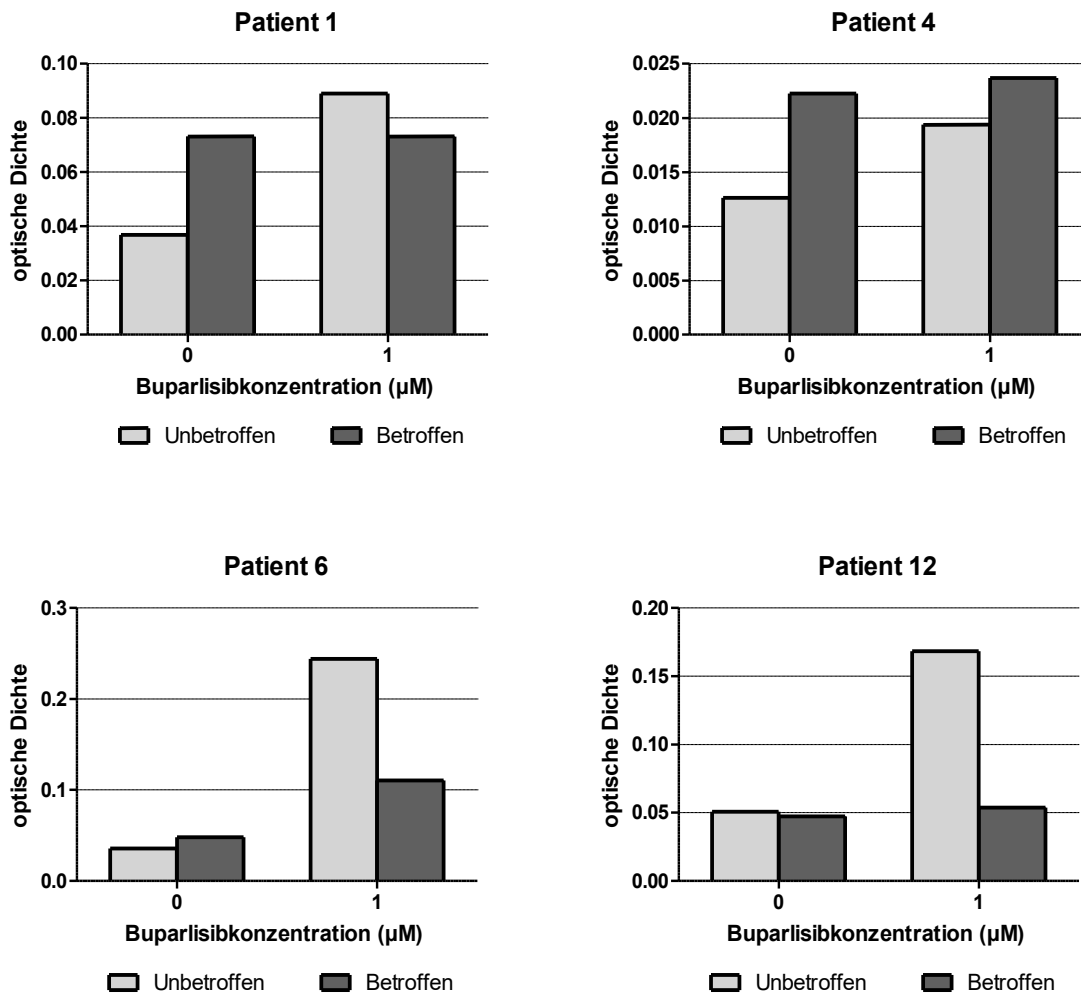


Abbildung 41: Relative PIK3CA-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe von Patient 1, 4, 6 und 12 (jeweils als Unikat) nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) mit und ohne Zugabe von 1 µM Buparlisib. Quantifizierung der Proteinexpression durch photometrische Messung der optischen Dichte der Banden der Zielenzyme bezogen auf die optische Dichte der Banden des Housekeeping-Gens; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Proteinexpression

4.4.2. RPS6K1

Mittels Western Blots wurde die Proteinexpression der RPS6-Kinase 1 als ein Zielenzym des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs von ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe von vier Patienten untersucht (vgl. Abbildung 42 A). Für ASCs aus betroffenem Gewebe konnte im Durchschnitt eine höhere Proteinexpression von RPS6K1 nachgewiesen werden als für

ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 42 B). Die optische Dichte der RPS6K1-Banden lag bei ASCs aus betroffenem Gewebe dabei durchschnittliche bei 10,92, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe hingegen bei 7,03. Durch die Supplementierung von 1 μ M Buparlisib ließ sich die durchschnittliche RPS6K1-Proteinexpression beider Zellarten senken, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen der optischen Dichte der Banden bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nachweisbar war. Die optische Dichte lag bei ASCs aus betroffenem Gewebe unter der Inhibitorbehandlung durchschnittliche bei 4,97, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei 1,61.

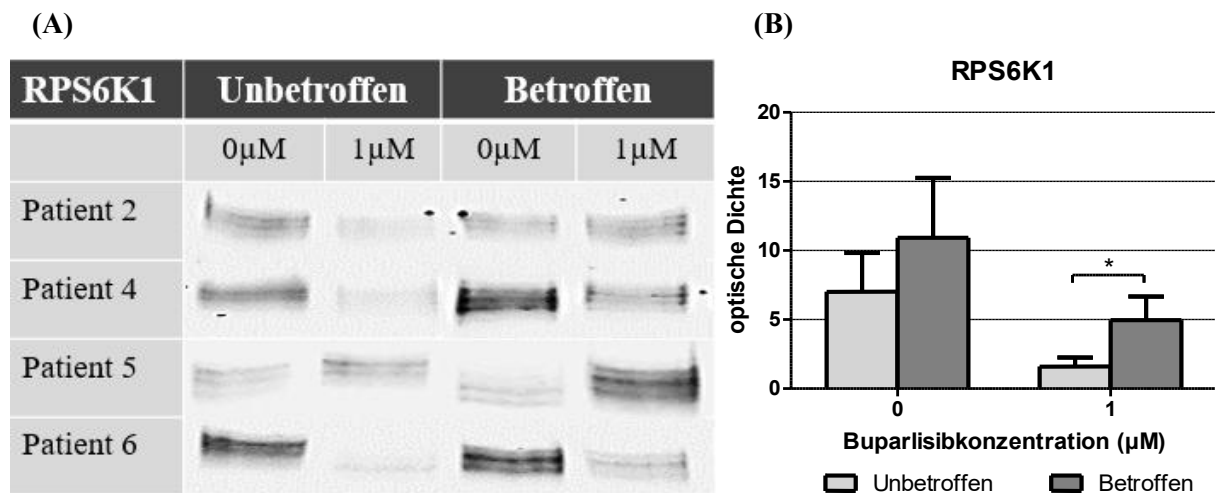
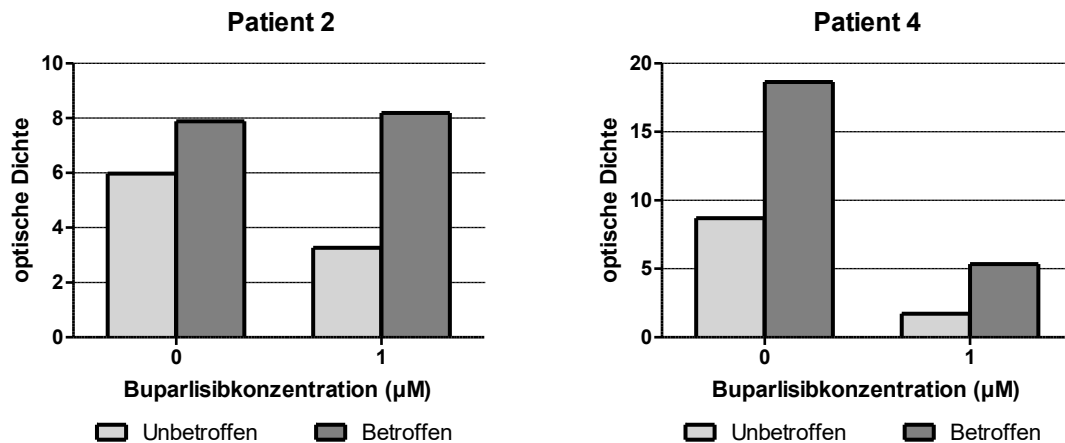


Abbildung 42 A): Darstellung der Western Blot-Banden von RPS6K1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe von Patient 2, 4, 5 und 6 nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) mit und ohne Zugabe von 1 μ M Buparlisib. B): Durchschnittliche RPS6K1-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) mit und ohne Zugabe von 1 μ M Buparlisib; Quantifizierung der Proteinexpression durch photometrische Messung der optischen Dichte der Banden der Zielenzyme bezogen auf die optische Dichte der Banden des Housekeeping-Gens; Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μ M; y-Achse: optische Dichte, Kennzeichnung der Signifikanzniveau mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Anschließend wird die Proteinexpression der einzelnen MSL-Patienten im Verhältnis zur Expression des *Housekeeping*-Gen nach einwöchiger Differenzierung in CM mit und ohne Inhibitorsupplementierung dargestellt (vgl. Abbildung 43). Im unbehandelten Zustand konnte bei allen Patienten für ASCs aus betroffenem Gewebe eine höhere RPS6K1-Proteinexpression nachgewiesen werden als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Bei Patient 2 lag die basale optische Dichte der RPS6K1-Bande bei ASCs aus betroffenem Gewebe bei 7,89, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei 5,98. Bei Patient 4 konnte eine optische Dichte von 18,65 bei ASCs aus betroffenem Gewebe nachgewiesen werden. Bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe wurde eine optische Dichte von 8,72 detektiert. Bei Patient 5 betrug die optische Dichte bei ASCs aus

betroffenem Gewebe 0,04 und bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe 0,03. Bei Patient 6 wies die RPS6K-Bande eine optische Dichte von 17,11 bei ASCs aus betroffenem Gewebe eine auf. Die optische Dichte bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe lag bei 13,40.

Durch die Behandlung mit 1 μ M Buparlisib wurde die Proteinexpression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei allen Patienten, außer Patient 5, gesenkt. Bei ASCs aus betroffenem Gewebe wurde die RPS6K1-Expression bei zwei Patienten reduziert (vgl. Patient 4 und 6). Bei zwei Patienten wurde die Expression von RPS6K1 unter Buparlisibeeinfluss gesteigert (vgl. Patient 2 und 5). Bei Patient 2 betrug die optische Dichte der RPS6K1-Bande bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe dabei 3,26. Die optische Dichte bei ASCs aus betroffenem Gewebe wurde auf einen Wert von 8,20 gesteigert. Bei Patient 4 ließ sich die optische Dichte der Banden unter Inhibitoreinfluss bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe auf 1,71, bei ASCs aus betroffenem Gewebe auf 5,34 senken. Bei Patient 5 wurde die optische Dichte bei ASCs aus betroffenem Gewebe auf einen Wert von 0,18 und bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe auf einen Wert von 0,08 gesteigert. Bei Patient 6 konnte bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe eine optische Dichte von 1,39 unter Inhibitoreinfluss nachgewiesen werden, bei ASCs aus betroffenem Gewebe von 6,14.



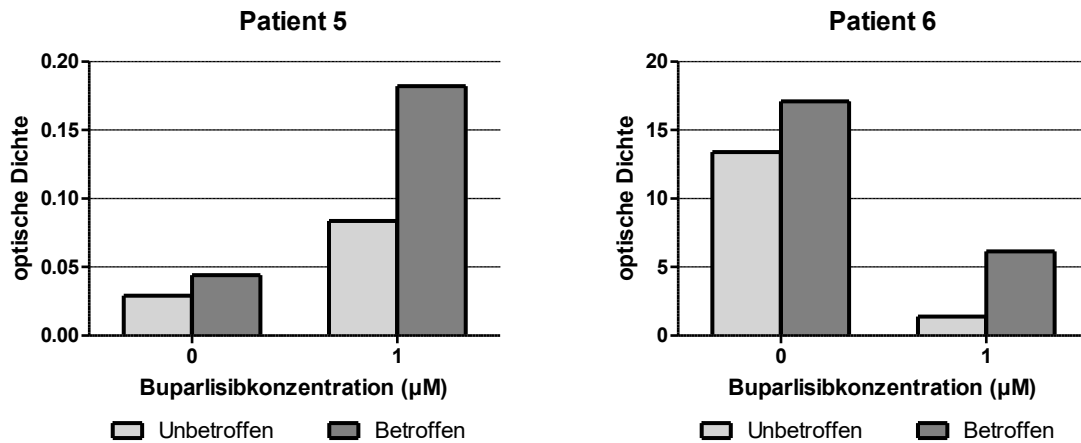
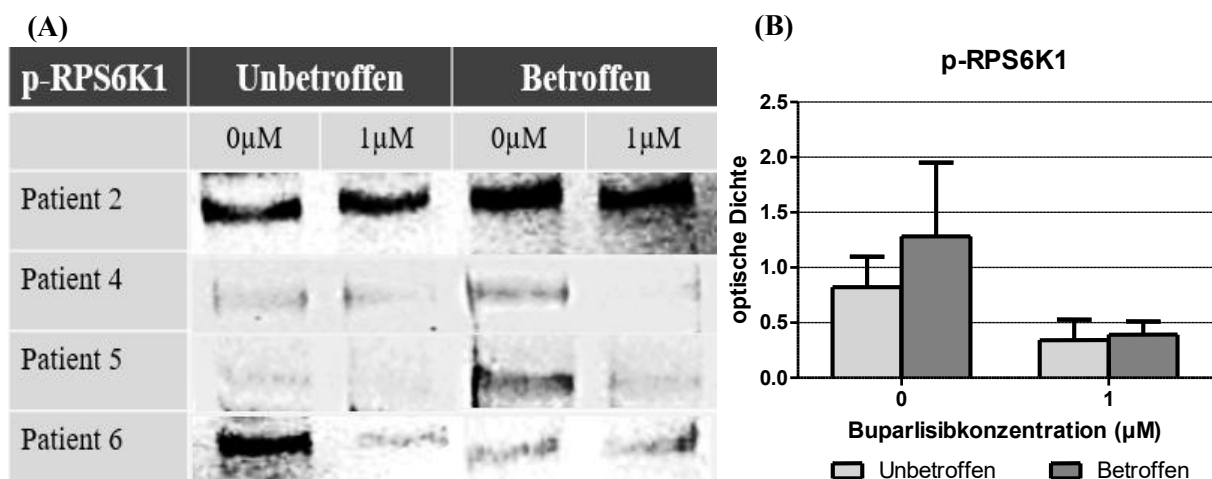


Abbildung 43: RPS6K1-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe von Patient 2, 4, 5 und 6 (jeweils als Unikat) nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) mit und ohne Zugabe von 1 µM Buparlisib; Quantifizierung der Proteinexpression durch photometrische Messung der optischen Dichte der Banden der Zielenzyme bezogen auf die optische Dichte der Banden des Housekeeping-Gens; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: optische Dichte

4.4.3. p-RPS6K1

Die Proteinexpression der phosphorylierten RPS6-Kinase 1 wurden bei vier Patienten anhand von Western Blots untersucht (vgl. Abbildung 44A). Wie bei der RPS6K1 konnte für die p-RPS6K1 eine im Mittel höhere Proteinexpression seitens der ASCs aus betroffenem Gewebe nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 44 B). Die optische Dichte der Bande für p-RPS6K1 von ASCs aus betroffenem Gewebe betrug durchschnittlich 1,28, von ASCs aus unbetroffenem Gewebe 0,82. Unter Buparlisibeinfluss konnte die durchschnittliche p-RPS6K1-Proteinexpression von ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe gesenkt werden, wobei die optische Dichte der Western Blot-Bande bei ASCs aus betroffenem Gewebe unter Inhibitoreinfluss durchschnittlich bei 0,39 lag, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei 0,34.



*Abbildung 44 A): Darstellung der Western Blot-Banden von p-RPS6K1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe von Patient 2, 4, 5 und 6 nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) mit und ohne Zugabe von 1 μ M Buparlisib. B): Durchschnittliche p-RPS6K1-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) mit und ohne Zugabe von 1 μ M Buparlisib; Quantifizierung der Proteinexpression durch photometrische Messung der optischen Dichte der Banden der Zielenzyme bezogen auf die optische Dichte der Banden des Housekeeping-Gens; Mittelwert aus allen Patientendaten + Standardabweichung; x-Achse: Buparlisibkonzentration in μ M; y-Achse: optische Dichte; Kennzeichnung des Signifikanzniveaus mittels *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$*

Im Folgenden wird die p-RPS6K1-Proteinexpression von vier Patienten nach einwöchiger Kultivierung mit und ohne Buparlisibzugabe einzeln erläutert. Bei den Western Blots zeigt sich die stärkste p-RPS6K1-Bande bei mehr als der Hälfte der Patienten bei ASCs aus betroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 45 A, Patient 2, 4 und 5). Da die Expression der p-RPS6K1 für das Säulendiagramm in Relation zur Expression des *Housekeeping*-Gens gesetzt wurde, zeigen sich zwischen den Western Blots und den Säulendiagrammen teils gegenteilige Tendenzen. Bei Patient 2 liegt die relative Proteinexpression von p-RPS6K1 bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe im unbehandelten Zustand daher über der Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe, wobei die Bande im Western Blot bei ASCs aus betroffenem Gewebe am höchsten war (vgl. Abbildung 44 A, Patient 2 und Abbildung 45, Patient 2). Auch bei Patient 5 und 6 führt diese Relation zu einer verhältnismäßig starken Expression von p-RPS6K1 bei ASCs aus betroffenem Gewebe unter Buparlisibeinfluss.

In den Säulendiagrammen zeigt sich bei der Hälfte der Patienten eine höhere p-RPS6K1-Proteinexpression seitens der ASCs aus betroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 45, Patient 4 und 5). Bei Patient 4 lag die optische Dichte der Bande von p-RPS6K1 bei ASCs aus betroffenem Gewebe bei 3,13, bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei 1,61. Bei Patient 5 konnte eine optische Dichte von 0,058 bei ASCs aus betroffenem Gewebe detektiert werden. Bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe betrug die optische Dichte der p-RPS6K1-Bande 0,034. Bei Patient 2 lag die optische Dichte bei ASCs aus betroffenem Gewebe mit einem Wert von 0,15 unter dem Wert von ASCs aus unbetroffenem Gewebe mit 0,34. Bei Patient 6 lag die optische Dichte bei ASCs aus betroffenem Gewebe mit einem Wert von 0,47 ebenfalls unter dem Niveau von ASCs aus unbetroffenem Gewebe mit 0,56.

Unter Inhibitoreinfluss konnte bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei allen Patienten eine Reduktion der p-RPS6K1-Proteinexpression nachgewiesen werden. Bei ASCs aus betroffenem Gewebe wurde die Proteinexpression bei zwei der Patienten gesteigert (vgl. Abbildung 45, Patient 5 und 6) und bei zwei Patienten gesenkt (vgl. Abbildung 45, Patient 2 und 4). Bei Patient 2 wurde die optische Dichte bei ASCs aus betroffenem Gewebe von einem Ausgangswert von

0,15 auf einen Wert von 0,10 gesenkt. Bei Patient 4 kam es unter Buparlisibeeinfluss bei ASCs aus betroffenem Gewebe zur Reduktion der optischen Dichte auf einen Wert von 0,33, wobei dieser Wert unter dem Niveau der optischen Dichte der Banden von ASCs aus unbetroffenem Gewebe mit einem Wert von 0,85 lag. Bei Patient 5 wurde die optische Dichte bei ASCs aus betroffenem Gewebe von 0,058 auf einen Wert von 0,076 gesteigert. Bei Patient 6 wurde die optische Dichte bei ASCs aus betroffenem Gewebe von einem Wert von 0,47 auf einen Wert von 0,66 erhöht.

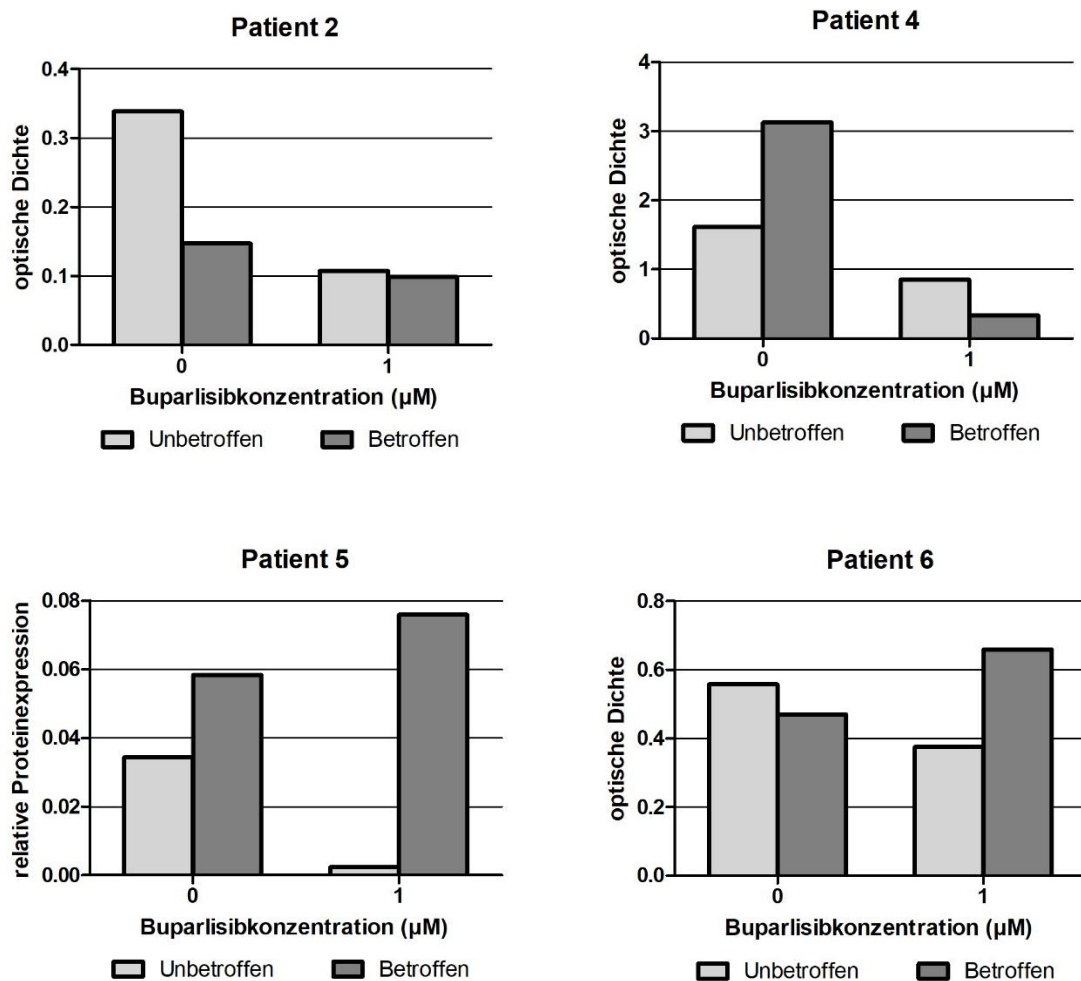


Abbildung 45: p-RPS6K1-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe von Patient 2, 4, 5 und 6 (jeweils als Unikat) nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium (=CM) mit und ohne Zugabe von 1 µM Buparlisib. Quantifizierung der Proteinexpression durch photometrische Messung der optischen Dichte der Banden der Zielenzyme bezogen auf die optische Dichte der Banden des Housekeeping-Gens; x-Achse: Buparlisibkonzentration in µM; y-Achse: relative Proteinexpression

5. Diskussion

5.1. Multiple Symmetrische Lipomatose als hyperproliferative Erkrankung adipogener Stammzellen

Da das disproportionale Wachstum des lipomatösen Gewebes bei der MSL nicht in direkten Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme der Patienten gebracht werden kann und sich das Gewebe in den betroffenen Körperarealen bei Restriktion der Nahrungszufuhr nicht signifikant reduziert, sind mehrere Entstehungsmechanismen bei der MSL denkbar - eine Hyperproliferation adipogener Vorläuferzellen, eine erhöhte adipogene Differenzierung von ASCs in adipogen differenzierte Fettzellen (Adipogenese) oder eine Hyperplasie adipogen differenzierter Zellen. Die Entstehung von Lipomen, Liposarkomen und Osteolipomen konnten bereits auf ASCs zurückgeführt werden (108, 263–265). Außerdem wird vermutet, dass ASCs für das rezidivierende Wachstum von Lipomen nach stattgefundener Liposuktion verantwortlich sind (266). Es konnte gezeigt werden, dass ASCs aus Lipomen eine vermehrte Proliferation aufweisen, was als Ursache für das Lipomwachstum diskutiert wurde (264, 265, 267). Daher ist es denkbar, dass eine Hyperproliferation von ASCs auch zur Entstehung des lipomatösen Gewebes bei der Multiplen Symmetrischen Lipomatose führen könnte.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass lipomatöses Gewebe von MSL-Patienten eine erhöhte Stammzellfrequenz aufweist (268, 269). Tresp *et al.* untersuchten die Stammzellfrequenz von lipomatösem Gewebe von MSL-Patienten mittels *colony-forming unit fibroblast (CFU-f)* - Assay. Dabei konnte ein erhöhter Anteil von adipogenen Vorläuferzellen innerhalb der Zellkolonien nach zweiwöchiger Kultivierung von ASCs aus lipomatösem Gewebe nachgewiesen werden. Ein Stammzellanteil von 1 bis 10 % aller kernhaltiger Zellen gilt dabei als allgemeiner Referenzwert (270). Die Anzahl adipogener Vorläuferzellen innerhalb der Zellkolonien nach Kultivierung von ASCs aus betroffenem Gewebe betrug $14,3 \pm 5 \%$ (269). Allerdings wurde der Versuchsaufbau unter Kultivierung von FGF durchgeführt, welches die Proliferation von ASCs bekannterweise steigert (271, 272). Ein erhöhte Stammzellfrequenz in lipomatösem Gewebe von MSL-Patienten konnte jedoch auch in neueren Studien von Sanna *et al.* nachgewiesen werden. Mittels Durchflusszytometrie wurde ein signifikant höherer Anteil von $CD45^-CD31^-CD34^+$ ASCs in extrahiertem, lipomatösem Gewebe quantifiziert als in unbetroffenem subkutanem Fettgewebe, wobei beide Gewebsarten bezüglich der Expression von Oberflächenmarkern mesenchymalen Zellen und Perizyten glichen. Dies deutet vielmehr

auf eine Hyperproliferation als auf eine Hyperplasie betroffenen Gewebes hin (268), lässt jedoch die Frage offen, ob es sich um eine Hyperproliferation oder vermehrte Adipogenese betroffenen Gewebes handelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ASCs aus betroffenen und unbetroffenem Gewebe von MSL-Patienten anhand ihrer Vitalität und Differenzierung miteinander verglichen. Eine Vitalitätssteigerung über die Zeit wurde mit einer erhöhten Proliferation gleichgesetzt. Im unbehandelten Zustand zeigen ASCs aus betroffenem Gewebe nach einem, drei und sechs Tagen eine durchweg höhere Vitalität als ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 13 und Abbildung 14 A). Werden die Ergebnisse der einzelnen Patienten betrachtet, so unterscheidet sich die Vitalität der ASCs aus betroffenem Gewebe bei 2/3 der Patienten nach drei Tagen der Versuchsdurchführung signifikant von der Vitalität der ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 14 A). Bereits einen Tag nach Versuchsstart ließ sich bei ASCs aus betroffenem Gewebe eine durchschnittlich 26 % höhere Proliferation nachweisen als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 13), welche exponentiell zunahm, sodass sich sechs Tage nach Versuchsstart ein signifikanter Unterschied zwischen der durchschnittlichen Proliferation von ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe ergab. ASCs aus betroffenem Gewebe proliferieren also deutlich schneller als ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen vieler Studien, die eine erhöhte Proliferation von ASCs aus lipomatösem Gewebe bei der MSL nachweisen konnten (14, 19, 28, 30).

Demgegenüber zu stellen sind die Ergebnisse der adipogenen Differenzierung, wobei ASCs aus betroffenem Fettgewebe ein gegenüber ASCs aus unbetroffenem Gewebe ca. 24 % vermindertes Differenzierungspotential aufwiesen. Dies zeigte sich zu der durchschnittlichen Differenzierungskapazität von ASCs aus unbetroffenem Gewebe signifikant reduziert (vgl. Abbildung 15). Da das Ausbleiben des Zellwachstums als Voraussetzung für die Differenzierung von Zellen gilt (273), untermauern diese Daten die Hypothese, dass es sich bei der MSL um eine hyperproliferative Erkrankung von ASCs handelt, deren Differenzierungskapazität in gleichem Zuge signifikant reduziert ist. Tremp *et al.* assoziierten diese Eigenschaften mit einer Expression von CD34 bei ASCs aus lipomatösem Gewebe von MSL-Patienten (269). Die Expression von CD34 wird neben einer erhöhten Proliferationsrate mit einer Blockade des Differenzierungsprozesses von Vorläuferzellen in Verbindung gebracht, die demnach ihren Stammzellcharakter beibehalten (265). Des Weiteren gilt CD34 als Marker für Angiogenese (274, 275), was eine Erklärung für die vermehrte Vaskularisation des betroffenen Gewebes von MSL-Patienten darstellen könnte. Ob es sich bei der Hyperproliferation der ASCs aus lipomatösem Gewebe bei der MSL um die Ursache oder Folge

der aberranten Differenzierung der Zellen handelt, ist zum bisherigen Forschungsstand unklar und bedingt weitere Forschungsarbeit.

5.2. Buparlisib führt zur signifikanten Reduktion von Zellproliferation und Adipogenese bei ASCs aus betroffenem Gewebe

Der PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg stellt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellumsatzes dar, da er je nach Vorhandensein von Wachstumsfaktoren, Nährstoffen sowie dem entsprechenden Energieniveau der Zelle die Proteinbiosynthese und das Zellwachstum sowie die Zellzyklusprogression bzw. Apoptose steuert (276–278). Des Weiteren haben der Nährstoffstatus der Zelle und Insulin einen entscheidenden Einfluss auf die adipogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen. Es konnte gezeigt werden, dass der Insulin-PI3-Kinase-Akt-Signalweg die Aktivität von PPAR γ , einem entscheidenden Transkriptionsfaktor für die adipogene Differenzierung, direkt über die Phosphorylierung und Inaktivierung von FOXO1 reguliert (279–282). Des Weiteren beeinflusst mTOR die Transaktivierung von C/EBP α durch PPAR γ , welche ihre Aktivität über eine positive Feedbackschleife gegenseitig aufrecht erhalten und zur Aktivierung weiterer adipogener Transkriptionsfaktoren führen, die die adipogene Differenzierung vermitteln (283).

In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Buparlisib, einem Pan-Klasse-I-PI3-Kinase-Inhibitor, auf die Vitalität und adipogene Differenzierung von ASCs untersucht. Dabei wurden ASCs aus subkutanem Fettgewebe sowie lipomatösem Gewebe von MSL-Patienten extrahiert und miteinander verglichen. Buparlisib konnte in den Vitalitätstests mit Resazurin bei ASCs aus unbetroffenem, subkutanem Fettgewebe sowie lipomatösem Gewebe eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellvitalität und -Proliferation herbeiführen (vgl. Abbildung 13 und 14). Dabei hat Buparlisib einen größeren inhibitorischen Einfluss auf die ASCs des betroffenen Gewebes, die prozentual zu ihrem Ausgangswert stärker gehemmt werden als ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Deutlich wird dies zum einen daran, dass die im Durchschnitt höhere Vitalität der ASCs aus betroffenem Gewebe durch die Behandlung mit 10 μ M Buparlisib an allen Untersuchungstagen unter das Stoffwechsellniveau der ASCs aus betroffenem Gewebe gesenkt wurde (vgl. Abbildung 13 A). Zum anderen wurden ASCs aus betroffenem Gewebe bei der Hälfte der Patienten bei einer niedrigeren Inhibitorkonzentrationen signifikant zu ihrem Ausgangswert gehemmt (vgl. Abbildung 14, Patient 1, 3, 6, 7 und 8) bzw. bei gleicher Inhibitorkonzentration zu einem höheren Signifikanzniveau gehemmt (vgl. Abbildung 13 B und C, d3 und d6; vgl. Abbildung 14, Patient 2) als ASCs aus unbetroffenem

Gewebe, wobei Letzteres nur als zusätzliche Untermauerung der Tendenz der Messwerte gesehen werden sollte. Im Durchschnitt ließ sich eine signifikante Reduktion der Vitalität der ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nach drei und sechs Tagen ab einer InhibitorKonzentration von 1 μ M nachvollziehen (vgl. Abbildung 13 B und C, d3 und d6), sodass diese Konzentration als mögliche therapeutische Dosis diskutiert werden könnte.

Auch in den Versuchen zur adipogenen Differenzierung konnte Buparlisib eine konzentrationsabhängige Reduktion der optischen Dichte der Extraktionslösung der Oil Red-Färbung und damit potentiell der adipogenen Differenzierung der Zellen bewirken, wobei der signifikante Unterschied zwischen der Differenzierungskapazität von ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe im unbehandelten Zustand durch Buparlisib ausgeglichen werden konnte (vgl. Abbildung 15). Durch Buparlisib konnte sowohl die durchschnittliche Differenzierung in adipogene Zellen bei ASCs aus betroffenem Gewebe als auch bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe signifikant reduziert werden, wobei eine signifikante Reduktion der adipogenen Differenzierung bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bereits bei einer InhibitorKonzentration von 1 μ M nachvollziehbar war, wohingegen ASCs aus betroffenem Gewebe erst bei einer Konzentration von 5 μ M Buparlisib signifikant zum Ausgangswert in ihrer adipogenen Differenzierung gehemmt wurden. Prozentual konnte die adipogene Differenzierungskapazität von ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe bei beiden Konzentrationen in etwa gleichem Maße, nämlich auf das 0,72-Fache vom Ausgangswert bei 1 μ M sowie das 0,72- bis 0,71-Fache bei 5 μ M Buparlisib, gesenkt werden, sodass von einer äquivalenten Potenz gegenüber der Inhibition der adipogenen Differenzierung von ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe ausgegangen werden kann. In Vorversuchen dieser Arbeitsgruppe zur adipogenen Differenzierung von ASCs aus unbetroffenem und lipomatösem Gewebe konnte gezeigt werden, dass Rapamycin auf die Differenzierung von ASCs aus betroffenem Gewebe keinen Einfluss hat, wohingegen die adipogene Differenzierung von ASCs aus unbetroffenem Gewebe reduziert werden konnte (33). Ein möglicher Erklärungsversuch könnte sein, dass Rapamycin die Phosphorylierung von PPAR γ durch mTOR unterbinden kann, die Phosphorylierung über die PI3K-Akt-FOXO1-Achse jedoch erhalten bleibt. Durch Buparlisib könnte eine Beeinflussung beider Signalwege initiiert werden, weshalb die adipogene Differenzierung unter Buparlisib im Vergleich zu Rapamycin bei ASCs aus betroffenem Gewebe signifikant reduziert werden konnte. Nichtsdestotrotz ließ sich die adipogene Differenzierung unter Buparlisib bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nur partiell inhibieren, was daran deutlich wird, dass die Zugabe von 5 μ M Buparlisib im Vergleich zu 1 μ M Buparlisib nur eine marginale zusätzliche Reduktion der optischen Dichte

der Extraktionslösung nach sich zog (vgl. Abbildung 15). Dies legt die Vermutung nahe, dass die adipogene Differenzierung über anderweitige Signalwege als dem PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg aufrechterhalten wird. Neben dem PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg wird die PPAR γ -Expression beispielsweise über BMP2-Smad1 oder p38-MAPK (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase) induziert (284). Dieser Signalweg könnte folglich zu einer persistierenden adipogenen Differenzierung unter Buparlisib führen. Um nachzuvollziehen, inwiefern der PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe reguliert ist und inwiefern dies zu einer Hyperproliferation des betroffenen Gewebes führen könnte, wurde die Gen- und Proteinexpression der Enzyme des PI3-Kinase-Signalwegs genauer untersucht.

5.3. Bei der Multiplen Symmetrischen Lipomatose kommt es zur autonomen Induktion des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs auf Ebene adipogener Stammzellen

Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zur Gen- und Proteinexpression des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs von ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe zeigen, dass der PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg bei ASCs aus betroffenem Gewebe induziert ist und eine unterschiedliche Regulation des Signalwegs auf Gen- und Proteinebene zwischen beiden Zellarten vorliegt. Sowohl für RPS6K1, dem Zielenzym des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs, als auch für dessen aktivierte, phosphorylierte Form p-RPS6K1 konnte bei ASCs aus betroffenem Gewebe eine höhere durchschnittliche Proteinexpression nachgewiesen werden. Die durchschnittliche RPS6K1-Expression betrug bei ASCs aus betroffenem Gewebe mehr als das 1,55-Fache als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 42 B). Ebenso konnte eine ca. 1,56-fach höhere durchschnittliche Proteinexpression der aktivierten p-RPS6K1 bei ASCs aus betroffenem Gewebe nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 44 B). Dies spricht zum einen für eine Induktion des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs bei ASCs aus betroffenem Gewebe auf Proteinebene, zum anderen auch für eine Stimulation der Translation, da die erhöhte Proteinexpression von RPS6K1 in gleichem Maße in deren Aktivierung resultiert. Ein erhöhter Translationsstimulus bei ASCs aus betroffenem Gewebe steht mit der Hypothese einer hyperproliferativen Erkrankung bei der MSL im Einklang. In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass eine RPS6K1-Deletion zu einer reduzierten Körperfettmasse, verminderten Adipozytengröße, einer erhöhten Lipolyse sowie zu einer Resistenz gegenüber High-Fat-Diät-induzierter Gewichtszunahme führt (285). Eine aberrante RPS6-Kinase 1-Stimulation wird im Gegenzug mit der Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes,

Übergewicht, verschiedenen Tumoren und Gewebshypertrophie in Verbindung gebracht (239, 286, 287). Demnach könnte eine Stimulation der RPS6-Kinase 1 bei der MSL einen wachstumsfördernden Einfluss auf ASCs des betroffenen Gewebes vermitteln.

Die Behandlung mit Buparlisib führte bei beiden Zellarten zu einer Reduktion der durchschnittlichen Proteinexpression von RPS6K1 und p-RPS6K1 (vgl. Abbildung 42 B und 44 B), wobei sich nach Inhibition ein signifikanter Unterschied zwischen der RPS6K1-Expression von ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nachweisen ließ. Dabei wurde die Expression von RPS6K bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe auf das 0,23-fache, bei ASCs aus betroffenem Gewebe auf das 0,45-fache des ursprünglichen Expressionswertes gesenkt (vgl. Abbildung 42 B). Dies deutet darauf hin, dass ASCs aus unbetroffenem Gewebe stärker in der Expression von RPS6K1 gehemmt werden als ASCs aus betroffenem Gewebe. Werden die Patienten einzeln betrachtet, lässt sich bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe eine gegensätzliche Regulation der Proteinexpression von RPS6K1 und p-RPS6K1 feststellen. Während es bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe unter Buparlisibeeinfluss bei $\frac{3}{4}$ der Patienten zu einer Reduktion der RPS6K1-Expression kam (vgl. Abbildung 43, Patient 2, 4 und 6), blieb die Expression von RPS6K1 bei ASCs aus betroffenem Gewebe bei der Hälfte der Patienten auf stabilem Niveau oder wurde gesteigert (Abbildung 43, Patient 2 und 5). Noch deutlicher ließ sich dieser Trend bei der Untersuchung der Proteinlevel der aktivierten, phosphorylierten p-RPS6K1 nachvollziehen. Während der Anteil von aktivierter p-RPS6K1 bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei allen Patienten gesenkt werden konnte, blieben die Proteinlevel von p-RPS6K1 bei $\frac{3}{4}$ der Patienten bei ASCs aus betroffenem Gewebe auf stabilem Niveau oder wurde gesteigert (vgl. Abbildung 45, Patient 2, 5 und 6). Insbesondere bei Patient 5, dem einzigen Patienten, bei dem sich eine Expressionssteigerung der RPS6-Kinase 1-Gesamtlevel unter Buparlisibeeinfluss bei beiden Zellarten nachvollziehen ließ (vgl. Abbildung 43, Patient 5), konnten die Proteinlevel der aktivierten p-RPS6Kinase 1 bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe unter Inhibitoreinfluss reduziert werden, wohingegen die Expression bei ASCs aus betroffenem Gewebe gesteigert wurde (vgl. Abbildung 45, Patient 5). Dies legt die Vermutung nahe, dass es bei ASCs aus betroffenem Gewebe zu einem Translationsstimulus kommt, der von externen Einflüssen in gewissem Maße unabhängig ist. Es wurde mehrfach beschrieben, dass sich Tumoren die Reprogrammierung des Zellmetabolismus zu Nutze machen, um eine anabole Stoffwechsellage zu vermitteln, indem sie die Aktivität von Nährstofftransportern, Stoffwechselenzymen und Transkriptionsfaktoren unabhängig von übergeordneten Stimulationsfaktoren steigern (246, 288). Eine autonome p-RPS6K-Stimulation wurde beispielweise bei Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs

nachgewiesen und gilt als negativer prädiktiver Wert für das Therapieansprechen (289). RPS6K1 induziert eine Hormon-unabhängige Aktivierung des Östrogenrezeptors ER α und trägt daher zum Aufrechterhalten des Östrogenspiegels und der autokrinen Tumorgenese bei (290). Daher wird p-RPS6K1 als Proliferationsmarker bei Brustkrebs herangezogen (291). Ebenso gilt p-RPS6K1 als Marker für eine erhöhte Adipogenese des Tumor-*Mikroenvironments* sowie bei Adipositas (291, 292). Auch bei der MSL könnte eine autonome p-RPS6K1-Stimulation beitragen, einen dauerhaften Proliferations- und Adipogenese-Stimulus auf das lipomatöse Gewebe zu vermitteln.

Um herauszufinden, ob eine gesteigerte Expression der RPS6-Kinase auf Transkriptionsebene nachzuvollziehen ist, wurde die Genexpression von RPS6KB1 untersucht. Während die durchschnittliche Proteinexpression von RPS6K1 und deren Aktivierung zu p-RPS6K1 durch Buparlisib auf Translationsebene reduziert werden konnte (vgl. Abbildung 43 B und 45 B), bewirkt Buparlisib auf Transkriptionsebene eine Steigerung der durchschnittlichen RPS6KB1-Genexpression bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 34 A). Berücksichtigt man die konzentrationsabhängige Vitalitätsinhibition durch Buparlisib bei den Resazurinassays (vgl. Abbildung 13), kann die Expressionssteigerung von RPS6KB1 unter Buparlisibkonzentrationen als reflektorische Antwort im Sinne einer Gegenregulation zu einer pro-apoptotischen, katabolen Stoffwechsellage der ASCs angesehen werden. Dabei versucht die Zelle die initiale RPS6K1-Proteinlevel durch Regulation der Transkription von RPS6KB1 aufrecht zu erhalten, sobald sie einen Abfall des Expressionsniveaus bzw. translationsstimulierender Signale durch p-RPS6K unter zytotoxischen Einflüssen von Buparlisib bemerkt. Während die Genexpression von RPS6KB1 bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe unter Buparlisibeeinfluss signifikant erhöht wurde, wurde die bereits basal höhere RPS6KB1-Genexpression seitens der ASCs aus betroffenem Gewebe weniger stark induziert (vgl. Abbildung 34 A). Dies deutet wiederum darauf hin, dass sich ASCs aus betroffenem Gewebe regulativen Einflüssen auf den PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs entziehen.

Auch bei EIF4EBP1, welches für das zweite Zielenzym des PI3-Akt-mTOR-Signalwegs, dem Translationsrepressor 4E-BP1 codiert, konnte im unbehandelten Zustand eine höhere durchschnittliche Genexpression bei ASCs aus betroffenem Gewebe festgestellt werden (vgl. Abbildung 37 A), was auf eine Induktion des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs hindeutet. Ob der Proteinkomplex eIF4E-BP1 ebenfalls gesteigert exprimiert wird und in welcher Form dieser intrazellulär vorliegt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Da eine gesteigerte RPS6KB1-Genexpression in einer gesteigerten RPS6K1- und p-RPS6K1-Proteinexpression resultierte, kann vermutet werden, dass die 4E-BP1-Proteinexpression bei ASCs aus

betroffenem Gewebe induziert ist. Bei insgesamt gesteigertem PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg würde dies in einer Phosphorylierung von 4E-BP1 und damit Inaktivierung resultieren, die zu einer Translationsstimulation bei ASCs aus betroffenem Gewebe führt - was im Einklang mit dem hyperproliferativen Charakter der MSL steht. Durch Zugabe von Buparlisib konnte die durchschnittliche Genexpression von EIF4EBP1 bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe gesenkt werden (vgl. Abbildung 37 A). In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Rapamycin-induzierte Hemmung von mTOR mit einem Anstieg des dephosphorylierten 4E-BP1, und damit mit einer Translationshemmung, assoziiert ist (293, 294). Folglich ist denkbar, dass der PI3-Kinase-Inhibitor Buparlisib ebenfalls zur Translationshemmung durch 4E-BP1 führt. Im Durchschnitt konnte das Expressionsniveau von EIF4EBP1 bei ASCs aus betroffenem Gewebe unter das Niveau von ASCs aus unbetroffenem Gewebe gesenkt werden. Auch bei den einzelnen Patienten lässt sich ein angleichendes Verhalten bzgl. der Genexpression von ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe unter Inhibitoreinfluss feststellen (vgl. Abbildung 38, Patient 1, 2, 3, 4, 5 und 6), wobei zum Teil signifikante Unterschiede in der basalen EIF4EBP1-Expression zwischen den ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe ausgeglichen wurden. Da die Expression von RPS6KB1 im Gegensatz zu EIF4EBP1 relativ unbeeinflusst blieb, deutet dies darauf hin, dass eine Fehlregulation in der PI3-Kinase-Akt-mTOR-RPS6-Kinase-Achse besteht und nicht bei 4E-BP1.

Interessanterweise ließen sich nach adipogener Differenzierung keinerlei Unterschiede zu oben beschriebenen Tendenzen bezüglich der durchschnittlichen Genexpression von RPS6KB1 und EIF4EBP1 feststellen (vgl. Abbildung 34 B und 37 B). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die ursächliche Fehlregulation der MSL auf Ebene der ASCs zu suchen ist. Letztendlich sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um Rückschlüsse auf die Regulation der Enzymaktivität des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweges von adipogen differenzierten Zellen ziehen zu können.

Die Aktivierung des PI3-Kinase-Akt-Signalweg stellt den häufigsten, autonomen Mechanismus in Tumoren dar, der zu aberrantem Zellwachstum führt (7). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass dieser Signalweg den Ausgangspunkt der Regulation des Glukosemetabolismus, der Proteinbiosynthese und der Zellzyklusprogression bildet. Die häufigsten Mutationen, die zu einer Wachstumsfaktor-unabhängigen Signalweginduktion führen, sind die Amplifikation oder Aktivierung von PI3-Kinase-spezifischen RTKs, aktivierende Mutationen von PIK3CA, eine *Loss of function*-Mutation oder Deletion von PTEN oder eine Amplifikation oder *Missense*-Mutation von AKT (288, 295, 296). Um

herauszufinden, welcher Ebene eine Induktion des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweges bei der MSL stattfindet, wurde die Genexpression von PIK3R1, PIK3CA, PTEN, AKT1, MTOR, sowie die Proteinexpression der PI3-Kinase untersucht. Dabei ließ sich eine Geninduktion für PIK3CA sowie im geringen Maße von PTEN nachweisen (vgl. Abbildung 23 A und 26), wohingegen die Expression der nachfolgenden Signalweg-aktivierenden Enzyme, Akt und mTOR (vgl. Abbildung 28 A und 31 A), reduziert war. Dies deutet auf eine Fehlregulation der PI3-Kinase selbst hin. Die Genexpression von PIK3R1, welches für die regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase codiert, war im unbehandelten Zustand sowohl bei ASC aus betroffenem Gewebe, als auch bei adipogen differenzierter Zellen aus betroffenem Gewebe im Vergleich zu Zellen aus unbetroffenem Gewebe reduziert (vgl. Abbildung 20 A und B). Bei der Genexpression von PIK3CA, welche für die katalytische p110 α -Untereinheit der PI3-Kinase codiert, konnte jedoch der größte Unterschied im gesamten PI3-Kinase-Signalweg zwischen ASCs aus betroffenem Gewebe und unbetroffenem Gewebe nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 23 A). Im unbehandelten Zustand betrug die durchschnittliche PIK3CA-Genexpression bei ASCs aus betroffenem Gewebe dabei das 2,4-Fache der Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Interessanterweise blieb die durchschnittliche PIK3CA-Expression bei ASCs aus betroffenem Gewebe nach Zugabe von Buparlisib weitestgehend stabil, während die Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe durch Buparlisib signifikant auf das 1,85-Fache gesteigert wurde (vgl. Abbildung 23 A). Möglicherweise spiegelt dies eine autonome Induktion des PI3-Kinase-Signalweges bei ASCs aus betroffenem Gewebe wider, die zu einer dauerhaften Stimulation der Lipidkinase auf Genebene führt und die durch Buparlisib unbeeinflusst bleibt. Aktivierende Mutationen des PIK3CA-Gens stellen die häufigsten onkogenen Mutationen dar (7) und sind mit einer unkontrollierten Signalweginduktion bei verschiedenen Tumoren, wie dem Mamma, Ovarial-, Magen-, Prostata- oder Endometriumkarzinom, dem kolorektalen Karzinom oder Glioblastom assoziiert (297–302). Ebenso werden PIK3CA-Mutationen als Ursache für eine Gruppe der PI3K-assoziiertem Großwuchssyndrome (*PI3K-related overgrowth syndroms, PROS*) beschrieben, zu denen verschiedene Lipomatosen, wie das CLOVE-Syndrom, das Hemihyperplasie-multiples-Lipomatosis-Syndrom oder die *Facial infiltrating lipomatosis* zählen (303). Dementsprechend scheint PIK3CA eine Rolle in der embryonalen Anlage von Fettgewebsdepots und der Entwicklung von Fettgewebswucherungen zu spielen. Unsere Arbeitsgruppe vertritt die Hypothese, dass eine Alteration in der PIK3CA-Expression auch bei der MSL zur Vermittlung eines hyperproliferativen Gewebswachstums beiträgt. Die Tatsache, dass die PIK3CA-Expression nach adipogener Differenzierung bei Zellen aus betroffenem und

unbetroffenem Gewebe auf einem ähnlichen Niveau lag (vgl. Abbildung 23 B), könnte ein weiteres Indiz dafür sein, dass sich bei der MSL um eine hyperproliferative Stammzellerkrankung handelt. Dabei zeigten adipogen differenzierte Zellen aus betroffenem Gewebe weiterhin eine gering erhöhte PIK3CA-Expression im Vergleich zu Zellen aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 23 B). Demnach ist denkbar, dass eine gewisse PI3-Kinase-Stimulation auch nach Differenzierung nachweisbar ist. Durch die Buparlisibzugabe ließ sich die Genexpression bei adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe steigern, wobei das Expressionsniveau von Zellen aus unbetroffenem Gewebe über das Niveau von Zellen aus betroffenem Gewebe angehoben wurde. Die Gegenregulation durch Buparlisib im Sinne einer Verhältnismkehr der Genexpression von adipogen differenzierten Zellen aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe könnte einen Ausgleich der Fehlregulation des PI3-Kinaseweges darstellen.

Als wichtigster Gegenspieler der PI3-Kinase gilt das Tumorsuppressorgen PTEN. Eine verminderte PTEN-Expression ist in der Pathogenese verschiedener Tumoren, wie dem Glioblastom (304), Malignen Melanom (305), Prostata- (306) und Mamma-Karzinom (306, 307) involviert. Die Ergebnisse zur PTEN-Expression legen nahe, dass die PTEN-Expression bei ASCs aus betroffenem Gewebe im Vergleich zur PIK3CA-Expression nicht adäquat gesteigert ist (vgl. Abbildung 26), sodass es zu einem Missverhältnis zwischen der PI3-Kinase- und PTEN-Aktivität bei der MSL kommen könnte. Folglich könnte die Hyperproliferation der MSL durch ein Missverhältnis zwischen Generierung und Abbau des Second-Messenger-pools zugunsten eines vermehrten Umsatzes von PIP₃ herbeigeführt sein. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um eine fundierte Aussage über eine potentielle *Loss-of-Function*-Mutation von PTEN bei der MSL treffen zu können. Durch die Behandlung mit Buparlisib konnte die Expression von PTEN bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe gleichermaßen induziert werden, was als Gegenregulation zu dem erhöhten PI3-Kinase-Stimulus durch Buparlisib interpretiert werden kann.

Die Ergebnisse der Western Blots zeigen, dass die durchschnittliche Proteinexpression von PIK3CA bei ASCs aus betroffenem Gewebe im Vergleich zu ASCs aus unbetroffenem Gewebe erhöht ist (vgl. Abbildung 40 A und B). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression von PIK3CA bei ASCs aus betroffenem Gewebe unter Buparlisibzugabe weniger induziert wird als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 41, Patient 1,4 und 6). Dies spricht dafür, dass die Proteinexpression von PIK3CA bereits im basalen Zustand bei ASCs aus betroffenem Gewebe soweit stimuliert ist, dass eine zusätzliche Induktion, ähnlich wie auf Transkriptionsebene, nur gering möglich ist. Die Tatsache, dass die durchschnittliche

Proteinexpression von PIK3CA trotz deutlich induzierter Genexpression bei ASCs aus betroffenem Gewebe gegenüber ASCs aus unbetroffenem Gewebe nur gering erhöht ist, könnte auf eine negative Regulation des Signalweges auf Proteinebene hindeuten. In einer Pionierstudie von Haruta *et al.* konnte ein negativer Feedbackmechanismus nachgewiesen werden, bei dem es unter chronischer Insulinexposition zu einer Serin/Threonin-Phosphorylierung von IRS und damit Reduktion der elektrophoretischen Mobilität sowie dem Abbau von IRS kam, was in einer verminderten Signaltransduktion und Phosphorylierung von Akt und RPS6-Kinase resultierte (308). Die Proteinexpression der PI3-Kinase wurde dabei nicht untersucht. Da die Phosphorylierung von Akt eine Konsequenz aus der PI3-Kinase-Aktivität darstellt und die PI3-Kinase durch IRS stimuliert wird, ist eine gleichzeitige Reduktion der PI3-Kinase-Aktivität durch einen dauerhaften Insulinstimulus zu folgern, was im Einklang mit der basal gering erhöhten PIK3CA-Proteinexpression von ASCs aus betroffenem Gewebe steht. Des Weiteren konnten verminderte IRS-Proteinlevel durch p110 CAAX, einer konstitutiv aktiven Form der PI3-Kinase, nachgewiesen werden (308). Dies legt nahe, dass eine vermehrte Stimulation der PI3-Kinase zu ihrer Selbstlimitation über einen negativen Feedbackmechanismus auf Ebene der IRS-Proteine führt. Es ist daher denkbar, dass die dauerhafte Induktion der PIK3CA-Expression auf Transkriptionsebene bei ASCs aus betroffenem Gewebe in einer vermehrten PI3-Kinase-Aktivität auf Translationsebene resultiert, die durch den beschriebenen Feedbackmechanismus limitiert wird und zur Reduktion der Proteinlevel der PI3-Kinase führen könnte. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass auch die Downstream-Substrate des PI3-Kinasewegs eine Regulation auf Ebene von IRS-1 bewirken. mTOR ist unter Stimulation von Insulin über die Phosphorylierung von Serin³¹² (Ser³¹²) an einem negativen Feedbackmechanismus beteiligt, der die Selbstlimitierung der Insulinwirkung generiert (248, 249, 309). Dabei wird die Interaktion von IRS-1 mit dem Insulinrezeptor unterbunden und eine zusätzliche Tyrosin-Dephosphorylierung des Substrates eingeleitet (309). Es wird vermutet, dass die RPS6-Kinase 1 ebenfalls an der Phosphorylierung von Ser³¹² beteiligt ist (229). Des Weiteren scheinen mTOR und RPS6K1 über die Phosphorylierung von Serin⁶¹² (Ser⁶¹²) und Serin⁶³² (Ser⁶³²) einen negativen Einfluss auf die Interaktion von IRS-1 mit der PI3-Kinase zu nehmen, da sich beide Serinreste in der Nähe der Andockstelle der PI3-Kinase befinden (229, 310, 311). Diese Feedbackmechanismen könnten eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die vermehrte PIK3CA-Genexpression seitens ASCs aus betroffenem Gewebe letztendlich in einer im Verhältnis wenig gesteigerten Expression der Proteinlevel der PI3-Kinase resultiert.

Bezüglich der durchschnittlichen Genexpression von AKT1 und MTOR konnte bei ASCs aus betroffenem Gewebe eine im Vergleich zu ASCs aus unbetroffenem Gewebe verminderte Expression nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 28 A und 31 A). Eine Induktion der PIK3CA-Proteinexpression könnte zu einer Akt- und mTOR-Stimulation auf Proteinebene führen, die eine Reduktion der Genexpression von AKT1 und MTOR bedingt. Eine weitere Erklärung für reduzierte AKT1- und MTOR-Genexpression könnte sein, dass die Induktion des PI3-Kinase-Signalweges nicht auf Ebene der PI3-Kinase, sondern durch eine *Gain of function* von Akt bedingt ist, die zur reflektorischen Reduktion der Genexpression von AKT1 und MTOR führen. Sanna *et al.* propagierten eine signifikante Überaktivierung von Akt-, ERK1/2 und CK2 im Rahmen einer überstimulierten Adipogenese von weißem Fettgewebe als Ursache des hypertrophem Wachstums von lipomatösem Gewebe von MSL-Patienten (268). Hierbei ist jedoch hervorzuheben, dass die Untersuchung der Proteinexpression bei differenzierten Zellen lipomatösen Gewebes durchgeführt wurde und nicht auf Ebene der SVF. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass eine vermehrte Proteinexpression von Akt auch auf Ebene der SVF nachzuweisen ist. Diese Vermutung ließe jedoch die Frage offen, weshalb die Genexpression von PIK3CA bei ASCs aus betroffenem Gewebe gegenüber ASCs aus unbetroffenem Gewebe deutlich induziert ist.

Die Genexpression von AKT1 und MTOR ließ sich durch die Behandlung mit Buparlisib bei beiden Zellarten konzentrationsabhängig steigern, wobei die Genexpression von ASCs aus betroffenem Gewebe über das Niveau von ASCs aus unbetroffenem Gewebe angehoben wurde (vgl. Abbildung 28 A und 31 A). Ähnlich wie bei der Expression der PI3-Kinase kann eine Expressionssteigerung unter Buparlisib als reflektorische Gegenregulation zu einer katabolen Stoffwechsellaage interpretiert werden. Dass das Expressionsniveau von ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe unter Buparlisibeeinfluss umgekehrt werden konnte, deutet darauf hin, dass Buparlisib regulative Wirkung auf die AKT1- und MTOR-Genexpression zeigt und keine Autonomie von Akt und mTOR vorzuliegen scheint.

Nach adipogener Differenzierung zeigen Zellen aus betroffenem Gewebe eine höhere AKT1- bzw. MTOR-Expression als Zellen aus unbetroffenem Gewebe (vgl. Abbildung 28 B und 31 B), was im Einklang mit den Ergebnissen von Sanna *et al.* steht. Dies könnte ein weiteres Anzeichen dafür sein, dass ein gewisses Proliferationssignal auf Ebene differenzierter Zellen beibehalten wird. Die Behandlung mit Buparlisib führte bei beiden Zellarten bei adipogen differenzierten Zellen zur Induktion der Genexpression von AKT1 und MTOR, was als reflektorische Steigerung durch eine Enzymhemmung auf Proteinebene stehen kann.

Zusammenfassend lässt sich für ASCs aus betroffenem Gewebe die höchste Geninduktion des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweges für PIK3CA selbst nachweisen, die zu einer reflektorischen Reduktion der Genexpression aktivierender Enzyme des PI3-Kinase-Weges, Akt und mTOR, und zur Induktion der Zielgene RPS6KB1 und EIF4EBP1 führt. Möglicherweise ist hierfür ebenfalls ein Missverhältnis zwischen PIK3CA und PTEN-Expression ursächlich. Eine vermehrte Genexpression kann möglicherweise zu einer Überaktivierung der PI3-Kinase auf Proteinebene führen, welche durch einen negativen *Feedback*-Mechanismus auf Ebene der IRS limitiert wird. Im Vergleich zu der Genexpression von adipogen differenzierten Zellen sind auf Stammzellebene vermehrt regulative Vorgänge nachweisbar, die darauf hindeuten, dass die ursächliche Mutation auf Stammzellebene zu finden ist.

5.4. Bei ASCs aus lipomatösem Gewebe besteht eine PI3-Kinase-induzierte Dysregulation der Apoptose

Um zu eruieren, ob der hyperproliferative Charakter der MSL-Lipomatose auf eine Dysregulation der Apoptose zugunsten eines vermehrten Zellumsatzes zurückzuführen sein könnte, wurde die Genexpression von pro- und antiapoptotisch wirksamen Apoptosemarkern bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe untersucht. Dabei war die Expression von allen untersuchten antiapoptotisch wirksamen Genen bei ASCs aus betroffenem Gewebe erhöht (vgl. Abbildung 19). Die Genexpression von BCL2 und BCLXL war dabei signifikant im Vergleich zur Expression von ASCs aus unbetroffenem Gewebe gesteigert. Des Weiteren konnte eine vermehrte Genexpression von den proapoptotisch wirksamen Apoptosemarkern BAD, BAX1, CASP3, TP53 und RB1 seitens der ASCs aus betroffenem Gewebe festgestellt werden, welche gegenüber ASCs aus unbetroffenem Gewebe jedoch nicht signifikant induziert waren (vgl. Abbildung 18). Dies spricht für ein verschobenes Gleichgewicht zwischen anti- und proapoptotischer Genregulation, was zu einem vermehrten Zellumsatz von ASCs aus betroffenem Gewebe führen könnte.

In Vorversuchen dieser Arbeitsgruppe wurden ASCs aus lipomatösem Gewebe von MSL-Patienten anhand der Expression verschiedener p53-assoziiierter, Zellzyklus-regulierender Gene untersucht. Bei 17 von 84 untersuchten Genen konnte eine signifikant unterschiedliche Genexpression zwischen ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nachgewiesen werden. Die größte Hochregulierung der Genexpression um etwa das 4,81-Fache wurde dabei für Interleukin-6 (IL-6) detektiert (28). Bei IL-6 handelt es sich um ein proinflammatorisches

Zytokin, welches an der Vermittlung der Akut-Phase-Reaktion im Rahmen der Immunantwort bei Entzündungs- oder Infektionsgeschehen beteiligt ist. Über die Aktivierung des *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*(JAK/STAT)- und *mitogen-activated protein kinase*(MAPK)-Signalweges nimmt IL-6 einen regulatorischen Einfluss auf Genexpression, Zellvitalität und Zelltod. Interessanterweise konnte ebenfalls eine Regulation des PI3-Kinase-Akt-Signalwegs durch IL-6 nachgewiesen werden, wobei der genaue molekulare Interaktionsmechanismus bisher nicht vollständig verstanden ist (312). Eine IL-6 induzierte PI3-Kinase/Akt-Aktivierung wurde bei verschiedenen Tumoren, wie dem Multiplen Myelom, Hepatozellulären Karzinom, Nierenzellkarzinom, Prostatakarzinom oder Kaposi-Sarkom mit einer aberranten Apoptose, und damit mit einem vermehrten Zellwachstum, in Verbindung gebracht (313–317). Bei kardialen Myozyten wurde die Akt-vermittelte Bad-Phosphorylierung und Inaktivierung als Ursache des IL-6 vermittelten Zellschutzes gegenüber Apoptose nachgewiesen (318). Bei Zellen des Basalzellkarzinoms konnten antiapoptotische Tumoreigenschaften auf eine IL-6 induzierte Stimulation der Mcl-1-Expression zurückgeführt werden, welche einerseits durch den PI3-Kinase-Akt-Signalweg, zum anderen über den JAK/STAT-Kinaseweg vermittelt wurde (313). Bei Mcl-1 handelt es sich um ein antiapoptotisch wirksames Mitglied der Bcl-2-Familie, welchen den Zelltod insbesondere über Cytochrom C-Freisetzung über die äußere Mitochondrienmembran reguliert. Infolgedessen kommt es zu einer verminderten Freisetzung von Caspase 9 und einer Negativregulation der intrinsischen Apoptosekaskade. Eine Mcl-1-Überexpression ist daher mit einer erhöhten Überlebensrate der Zellen assoziiert (319, 320). Auch bei ASCs aus lipomatösem Gewebe von MSL-Patienten konnte in Vorversuchen eine signifikant erhöhte Genexpression von Mcl-1 um das 2,91-Fache festgestellt werden. Des Weiteren war die Expression von CASP9 um das 2,89-Fache signifikant erhöht (28), was als reflektorische Gegenregulation zur Mcl-1-Überexpression angesehen werden könnte. Da mittels Western-Blots eine autonome Induktion des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs nachweisbar war, ist denkbar, dass eine durch IL-6-PI3K-Akt-induzierte Mcl-1-Stimulation bei der MSL zu einer Reduktion der Apoptoserate führt. Des Weiteren könnte eine autonome Stimulation des PI3-Kinase-Akt-Signalwegs durch IL-6 zur vermehrten Translation weiterer Proteine führen, was für den hyperproliferativen Charakter der Erkrankung ursächlich sein könnte.

5.5. Durch Buparlisib kommt es bei ASCs aus betroffenem Gewebe zu einer p53-abhängigen Apoptoseinduktion

Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass Buparlisib einen inhibitorischen Einfluss auf die Zellproliferation verschiedener Tumorentitäten besitzt (320–325). In Versuchen zum Multiplen Myelom konnte bei 80-90 % der Zellen bereits 24 Stunden nach der Behandlung mit Buparlisib ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase nachgewiesen werden, der in einer erhöhten Apoptoserate 48 Stunden nach der Buparlisibbehandlung resultierte (325). Bashash *et al.* konnten zeigen, dass der Buparlisib-induzierte Zelltod direkt über eine Inhibition der PI3K-Akt-*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*(NF-κB)-Achse, als auch indirekt über die vermehrte Expression p53-assoziiierter Apoptosemarker vermittelt wird (326). Bei NF-κB handelt es sich um einen onkogenen Transkriptionsfaktor, dessen Aktivität durch die Phosphorylierung von Akt enthemmt wird. Die Expression anti- und proapoptotischer Expressionsfaktoren wird von NF-κB zugunsten eines vermehrten Zellumsatzes reguliert. Eine Akt-NF-κB-Dysregulation wird mit Autoimmunkrankheiten und Krebs assoziiert (327–329). Der p53-abhängige Zelltod wurde hingegen über eine gesteigerte Expression bestimmter Zielgene des Tumorsuppressors p53, wie BAX1, BAD, p21 (CDKN1A) und p27 (CDKN1B), vermittelt (326). Bei BAX und Bad handelt es sich um proapoptotisch wirksame Proteine der Bcl-2-Familie, die die Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol der Mitochondrien bewirken und den Zelltod über die Aktivierung verschiedener Caspasen einleiten (330). Bei p21 und p27 handelt es sich um Cyclin-abhängige Kinasen, die eine ungehinderte Zellproliferation bei DNA-Schäden durch einen Zellzyklusarrest der Zellen in der G1-Phase verhindern (331–333).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei der MSL zu einer autonomen Induktion des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweges kommt, bei der die PIK3CA- und p-RPS6K1-Expression auch unter Einfluss von Buparlisib aufrecht erhalten bleibt (vgl. Abbildung 41 und Abbildung 45). Daher ist zu vermuten, dass sich die MSL der Buparlisib-vermittelten PI3K-Akt-NF-κB-Inhibition entzieht. Nichts desto trotz konnte die Vitalität und adipogene Differenzierung von ASCs aus unbetroffenem und lipomatösem Gewebe konzentrationsabhängig inhibiert werden (vgl. Abbildung 13 und 15). In den Vitalitätstests mit Resazurin hat Buparlisib sogar einen größeren inhibitorischen Einfluss auf die Zellen des betroffenen Gewebes als auf die Zellen des unbetroffenen Gewebes (vgl. 5.2.). Daher ist die Zelltoxizität von Buparlisib vermutlich auf die Induktion p53-abhängiger Expressionsfaktoren bei der MSL zurückzuführen. Dementsprechend konnte in den durchgeführten PCRs eine Steigerung der proapoptotisch

wirksamen Apoptosemarker bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe unter Buparlisibzugabe festgestellt werden. Dabei kam es sowohl zur Steigerung der Expression von TP53, als auch dessen Zielgenen BAD und BAX1 (vgl. Abbildung 18 A, B und E), wobei die Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe die der ASCs aus unbetroffenem Gewebe überstieg. Die Tatsache, dass auch die Expression der Effektorcaspase 3, welche im unbehandelten Zustand bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe auf gleichem Niveau lag, durch Buparlisib bei ASCs aus betroffenem Gewebe deutlich induziert werden konnte (vgl. Abbildung 18 D), spricht dafür, dass die Caspasekaskade durch Buparlisib eingeleitet wird. Außerdem wurde die Expression antiapoptotisch wirksamer Faktoren unter Buparlisib gesenkt (vgl. Abbildung 19 A und B). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Missverhältnis zwischen anti- und proapoptotischen Expressionsfaktoren bei ASCs aus lipomatösem Gewebe durch die Induktion p53-assoziiierter, proapoptotisch wirksamer Faktoren unter Buparlisibzugabe ausgeglichen werden kann. Daher ist Buparlisib als mögliche Therapieoption bei der MSL zu diskutieren.

6. Zusammenfassung

Der PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweg ist an der Regulation von Zellproliferation, Zellmetabolismus und Apoptose beteiligt. Eine Mutation im PI3-Kinase-Signalweg wird als häufige Ursache für unkontrolliertes Tumorwachstum beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ASCs aus betroffenem Gewebe eine höhere Vitalität aufweisen und im Vergleich schneller proliferieren als ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Entsprechend ist die Differenzierung von ASCs aus betroffenem Gewebe im Vergleich zu ASCs aus unbetroffenem Gewebe verringert. Um herauszufinden, ob das hyperproliferative Wachstum der MSL auf eine Dysregulation des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs zurückzuführen ist, wurden ASCs aus betroffenem und unbetroffenem, subkutanem Fettgewebe anhand der Gen- und Proteinexpression von Enzymen des PI3-Kinase-Signalwegs untersucht.

Bei ASCs aus betroffenem Gewebe konnte eine Induktion des PI3-Kinase-Signalwegs nachgewiesen werden, was sich in der erhöhten Proteinexpression von RPS6K1, dem Zielenzym des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs, zeigt. Auch die aktivierte, phosphorylierte Form der RPS6-Kinase 1, p-RPS6K1, wurde von ASCs aus betroffenem Gewebe vermehrt exprimiert. Interessanterweise konnte eine gegensätzliche Regulation der Proteinexpression von p-RPS6K1 bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe unter Buparlisibeeinfluss festgestellt werden. Während die Proteinexpression von p-RPS6K1 unter Zugabe von Buparlisib bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe bei allen Patienten gesenkt wurde, blieb die Expression von ASCs aus betroffenem Gewebe bei $\frac{3}{4}$ Patienten unbeeinflusst oder wurde gesteigert. Dies spricht dafür, dass sich ASCs aus betroffenem Gewebe dem Einfluss von Buparlisib entziehen. Eine autonome Regulation von Signalwegen wurde bei verschiedenen Tumoren beobachtet, um eine anabole Stoffwechsellaage aufrecht zu erhalten. Dementsprechend könnte eine Autonomie des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs zur Vermittlung eines dauerhaften Wachstumsreizes bei ASCs aus betroffenem Gewebe beitragen.

Eine der häufigsten Veränderungen, die zu einer Induktion des PI3-Kinase-Signalwegs führt, ist eine aktivierende Mutation von PIK3CA. Von allen untersuchten Genen des PI3-Kinase-Signalwegs konnte für PIK3CA die höchste Induktion der Genexpression seitens ASCs aus betroffenem Gewebe im Vergleich zu ASCs aus unbetroffenem Gewebe nachgewiesen werden. Des Weiteren blieb die Gen- und Proteinexpression von PIK3CA bei ASCs aus betroffenem Gewebe unter Buparlisibeeinfluss stabil, wohingegen die Expression bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe induziert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass eine

Signalwegstimulation bei ASCs aus betroffenem Gewebe durch die bereits basal erhöhte Induktion von PIK3CA limitiert ist und sich regulativen Vorgängen entzieht. Infolgedessen wird von unserer Arbeitsgruppe eine aktivierende Mutation von PIK3CA auch bei Zellen des lipomatösen Gewebes vermutet. Darüber hinaus kann ein Missverhältnis der PTEN- und PIK3CA-Expression als Ursache der MSL diskutiert werden, da die Genexpression von PTEN im Vergleich zur Expression von PIK3CA nicht adäquat gesteigert war. Um jedoch eine fundierte Aussage über mögliche Mutationen von für den PI3-Kinaseweg-codierenden Genen treffen zu können, sind weiterführende genetische Analysen notwendig.

Darüber hinaus konnte eine Selbstlimitation des PI3-Kinase-Signalwegs bei ASCs aus betroffenem Gewebe beobachtet werden. Bei insgesamt induziertem Signalweg auf Proteinebene, welches sich durch die erhöhte Expression von p-RPS6K1 zeigt, war die durchschnittliche PIK3CA-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem Gewebe im Vergleich zu ASCs aus unbetroffenem Gewebe nur gering erhöht. Als Ursache vermutet unsere Arbeitsgruppe einen negativen Feedbackmechanismus, welcher durch die Phosphorylierung von IRS-1 durch p-RPS6K1 vermittelt wird und zu einer reduzierten Aktivität der PI3-Kinase führt.

Die Untersuchungen zur Genexpression pro- und antiapoptotisch wirksamer Gene ergab eine signifikante Induktion der antiapoptotisch wirksamen Marker BCL2 und BCLXL bei ASCs aus betroffenem Gewebe, wohingegen die durchschnittliche Expression proapoptotisch wirksamer Gene bei ASCs aus betroffenem Gewebe im Vergleich zu ASCs aus unbetroffenem Gewebe nicht signifikant erhöht war. Dies könnte auf eine verminderten Apoptoserate bei der MSL hindeuten. Des Weiteren konnte die Genexpression proapoptotisch wirksamer Gene durch Buparlisib bei ASCs aus betroffenem Gewebe weniger induziert werden als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Daher wird von unserer Arbeitsgruppe eine Dysregulation der Apoptose bei ASCs aus betroffenem Gewebe vermutet. In Vorversuchen dieser Arbeitsgruppe zur Genexpression von 84 p53-assoziierten, Zellzyklus-regulierenden Genen konnte die höchste, signifikante Expressionssteigerung für IL-6 und Mcl-1 nachgewiesen werden (28). Es konnte bereits in Studien zum Basalzellkarzinom gezeigt werden, dass eine IL-6 induzierte Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs zu einer gesteigerten Proteinexpression des antiapoptotisch wirksamen Mcl-1 und damit zu einer verminderten Apoptoserate führt (313). Eine IL6-induzierte Stimulation des PI3-Kinase-Signalweges könnte eine Ursache für die autonomen Induktion des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs sowie die verminderte Apoptose bei der MSL darstellen.

Zwar konnte, wie bereits beschrieben, eine gewisse Unabhängigkeit der ASCs aus betroffenem Gewebe bezüglich der Expression des PI3-Kinase-Signalwegs unter Buparlisib festgestellt werden. Nichts desto trotz ließ sich unter Buparlisib eine signifikante, konzentrationsabhängige Reduktion der Zellvitalität von ASCs aus betroffenem Gewebe feststellen. Bei ASCs aus betroffenem Gewebe konnte sogar ein stärkerer antiproliferativer Effekt von Buparlisib nachgewiesen werden als bei ASCs aus unbetroffenem Gewebe. Es konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion bei ASCs aus betroffenem Gewebe indirekt über die Steigerung proapoptotischer, p53-assoziiierter Expressionsfaktoren vermittelt wird. Des Weiteren wurde die basal signifikante Induktion antiapoptotischer Expressionsfaktoren bei ASCs aus betroffenem Gewebe unter Buparlisib reduziert. Zusammenfassend lässt sich durch Buparlisib eine Umkehr hyperproliferativer Signale zugunsten einer proapoptotischen Stoffwechsellaage feststellen, sodass Buparlisib als mögliche Therapieoption für die MSL diskutiert werden kann. Ein Objekt zukünftiger Forschungsarbeiten könnte der Nachweis der PI3K-Akt-mTOR-Signalweginduktion über IL-6 oder alternativen RTKs darstellen. Des Weiteren könnte die systemische Behandlung mit Buparlisib nach gezielten genetischen Untersuchungen von MSL-Patienten anhand einer PIK3CA-Mutation als mögliche Therapie evaluiert werden.

7. FAZIT

Eine mögliche Erklärung für den hyperproliferativen Charakter bei der MSL könnte eine Dysregulation des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs darstellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei ASCs aus betroffenem Gewebe zu einer Induktion des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalwegs auf Ebene der PI3-Kinase selbst kommt, die in einem gesteigerten Translationsstimulus der Zellen durch die konsekutive Aktivierung von RPS6-Kinase resultiert. Dabei scheint eine autonome Regulation des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalweges vorzuliegen, da die Gen- und Proteinexpression der PI3-Kinase und RPS6-Kinase bei ASCs aus betroffenem Gewebe unter Zugabe von Buparlisib unbeeinflusst bleibt. Nichts desto trotz kann die Hyperproliferation des betroffenen Gewebes indirekt, durch die Regulation p53-assoziiierter, proapoptotischer Expressionsfaktoren, durch Buparlisib gesenkt werden. Folglich könnte Buparlisib eine medikamentöse Therapie bei der MSL darstellen.

8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der unterschiedlichen Phänotypen der neuen MSL-Klassifikation	7
Abbildung 2:	Patient mit einer Typ Ia-MSL (neue Klassifikation).....	7
Abbildung 3:	A und B: Patient mit einer Typ Ib-MSL (neue Klassifikation).....	8
Abbildung 4:	A und B: Patient mit einer Typ Ic-MSL (neue Klassifikation).....	8
Abbildung 5:	Patient mit einer Typ II-MSL (neue Klassifikation).....	8
Abbildung 6:	Patient mit einer Typ III-MSL (neue Klassifikation).....	9
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der symmetrischen und asymmetrischen Zellteilung zur Selbsterneuerung bzw. Differenzierung von Stammzellen...	12
Abbildung 8:	Das Differenzierungspotential von Stammzellen in den verschiedenen Entwicklungsstadien.....	14
Abbildung 9:	Adipogene Differenzierung und regulierende Faktoren.....	18
Abbildung 10:	Differenzierung in weiße, beige oder braune Adipozyten und entsprechende Differenzierungsfaktoren.....	22
Abbildung 11:	Schematische Darstellung des PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalswegs.....	29
Abbildung 12:	Schematische Darstellung der einzelnen PCR-Schritte.....	42
Abbildung 13:	Vitalitätssays der ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nach einem, drei und sechs Tagen unter Buparlisibbehandlung der Konzentrationen 0 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M und 5 μ M sowie zweistündiger Inkubation mit Resazurin.....	52
Abbildung 14:	Vitalitätssays der Zellen aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach drei Tagen unter Buparlisibbehandlung der Konzentrationen 0 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M und 10 μ M (Patient 1-6) bzw. 0 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M und 5 μ M (Patient 7-12) sowie nach zweistündiger Inkubation mit Resazurin.....	55
Abbildung 15:	Durchschnittliche Adipogene Differenzierung.....	59
Abbildung 16:	Mikroskopische Aufnahmen adipogen differenzierter Zellen ausgehend von ASCs aus unbetroffenem (A) und betroffenem (B) Gewebe nach einwöchiger	

	adipogener Differenzierung ohne Buparlisibbehandlung sowie mit Buparlisibbehandlung der Konzentrationen 0,1 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M und 5 μ M und anschließender Oil Red-Färbung unter 40facher Vergrößerung.....	59
Abbildung 17:	Adipogene Differenzierung einzelner Patienten.....	62
Abbildung 18:	Durchschnittliche relative Genexpression von BAD (A), BAX1 (B), BAK1 (C), CASP3 (D), TP53 (E) und RB1 (F) bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe.....	64
Abbildung 19:	Durchschnittliche relative Genexpression von BCL2 (A) und BCLXL (B) bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe.....	66
Abbildung 20:	Durchschnittliche relative Genexpression von PIK3R1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium bzw. adipogenem Differenzierungsmedium.....	67
Abbildung 21:	Relative Genexpression von PIK3R1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium.....	68
Abbildung 22:	Relative Genexpression von PIK3R1 bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium.....	70
Abbildung 23:	Durchschnittliche relative Genexpression von PIK3CA bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium bzw. adipogenem Differenzierungsmedium.....	72
Abbildung 24:	Relative Genexpression von PIK3CA bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium.....	73
Abbildung 25:	Relative Genexpression von PIK3CA bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium.....	75
Abbildung 26:	Durchschnittliche relative Genexpression von PTEN-Genexpression bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium.....	77
Abbildung 27:	Durchschnittliche relative Genexpression von PTEN-Genexpression bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium.....	77

Abbildung 28:	Durchschnittliche relative Genexpression von AKT1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium bzw. adipogenem Differenzierungsmedium.....	79
Abbildung 29:	Relative Genexpression von AKT1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium.....	80
Abbildung 30:	Relative Genexpression von AKT1 bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium.....	82
Abbildung 31:	Durchschnittliche relative Genexpression von MTOR bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium bzw. adipogenem Differenzierungsmedium.....	84
Abbildung 32:	Relative Genexpression von MTOR bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium.....	85
Abbildung 33:	Relative Genexpression von MTOR-Genexpression bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium.....	87
Abbildung 34:	Durchschnittliche relative Genexpression von RPS6KB1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium bzw. adipogenem Differenzierungsmedium.....	89
Abbildung 35:	Relative Genexpression von RPS6KB1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium.....	90
Abbildung 36:	Relative Genexpression von RPS6KB1-Genexpression bei adipogen differenzierten Zellen aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium.....	90
Abbildung 37:	Durchschnittliche relative Genexpression von EIF4EBP1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium bzw. adipogenem Differenzierungsmedium.....	92

Abbildung 38:	Relative Genexpression von EIF4EBP1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in Kultivierungsmedium.....	93
Abbildung 39:	Relative Genexpression von EIF4EBP1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe der einzelnen Patienten nach einer Woche der Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium.....	95
Abbildung 40:	A): Darstellung der Western Blot-Banden von PIK3CA bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe von Patient 1, 4, 6 und 12 nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium mit und ohne Zugabe von 1µM Buparlisib. B): Durchschnittliche PIK3CA-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium mit und ohne Zugabe von 1µM Buparlisib.....	96
Abbildung 41:	Relative PIK3CA-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe von Patient 1, 4, 6 und 12 nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium mit und ohne Zugabe von 1µM Buparlisib.....	98
Abbildung 42:	A): Darstellung der Western Blot Banden von RPS6K1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe von Patient 2, 4, 5, 6 nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium mit und ohne Zugabe von 1µM Buparlisib. B): Durchschnittliche RPS6K1-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium mit und ohne Zugabe von 1µM Buparlisib.....	99
Abbildung 43:	RPS6K1-Proteinexpression von ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe von Patient 2, 4, 5 und 6 nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium mit und ohne Zugabe von 1µM Buparlisib.....	100
Abbildung 44:	A): Darstellung der Western Blot-Banden von p-RPS6K1 bei ASCs aus unbetroffenem und betroffenem Gewebe von Patient 2, 4, 5 und 6 nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium mit und ohne Zugabe von 1µM Buparlisib. B): Durchschnittliche p-RPS6K1-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe nach einwöchiger Kultivierung in Kultivierungsmedium mit und ohne Zugabe von 1µM Buparlisib.....	101
Abbildung 45:	p-RPS6K1-Proteinexpression bei ASCs aus betroffenem und unbetroffenem Gewebe von Patient 2, 4, 5 und 6 nach einwöchiger Kultivierung in	

Kultivierungsmedium mit und ohne Zugabe von 1µM Buparlisib.....	103
---	-----

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Codierende Gene, Sequenzen und Annealing-Temperaturen der verwendeten PCR-Primer.....	41
Tabelle 2:	Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.....	47
Tabelle 3:	Zusammensetzung der Laufpuffer.....	47
Tabelle 4:	Primäre Antikörper.....	48
Tabelle 5:	Sekundäre Antikörper.....	48
Tabelle 6:	Zusammensetzung der Transferpuffer.....	50

9. Literaturverzeichnis

1. Ardeleanu V, Chicos S, Georgescu C, Tutunaru D. Multiple benign symmetric lipomatosis -- a differential diagnosis of obesity. *Chirurgia (Bucur)* 2013; 108(4):580–3.
2. Schiltz D, Anker A, Ortner C, Tschernitz S, Koller M, Klein S et al. Multiple Symmetric Lipomatosis: New Classification System Based on the Largest German Patient Cohort. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2018; 6(4):e1722.
3. Brodie BC. Lectures Illustrative of Various Subjects in Pathology and Surgery. Longman, Brown, Green; 1846. Available from: URL: https://books.google.de/books?id=AGQ__AAAAcAAJ.
4. Madelung O. Ueber den Fetthals (diffuses Lipom des Halses). *Berlin: Langenbecks Archiv Klin. Chir.*; 1888. (37; 106-30).
5. Meningaud J-P, Pitak-Arnnop P, Bertrand J-C. Multiple symmetric lipomatosis: case report and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65(7):1365–9.
6. Launois, P. E., Bensaude, R. (1898) De l'adéno-lipomatose symétrique. in *Bulletin Mémoires Société Médicale Hôpitaux Paris* 1: 298–318.
7. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 2014; 505(7484):495–501.
8. Donhauser G, Vieluf D, Ruzicka T, Braun-Falco O. Benigne symmetrische Lipomatose Launois-Bensaude Typ III und Bureau-Barrière-Syndrom. *Hautarzt* 1991; 42(5):311–4.
9. Busetto L, Sträter D, Enzi G, Coin A, Sergi G, Inelmen EM et al. Differential clinical expression of multiple symmetric lipomatosis in men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27(11):1419–22.
10. Guilemany JM, Romero E, Blanch JL. An aesthetic deformity: Madelung's disease. *Acta Otolaryngol* 2005; 125(3):328–30.
11. Enzi G, Inelmen EM, Baritussio A, Dorigo P, Prosdociami M, Mazzoleni F. Multiple symmetric lipomatosis: a defect in adrenergic-stimulated lipolysis. *J Clin Invest* 1977; 60(6):1221–9.
12. González-García R, Rodríguez-Campo FJ, Sastre-Pérez J, Muñoz-Guerra MF. Benign symmetric lipomatosis (Madelung's disease): Case reports and current management. *Aesthetic Plast Surg* 2004; 28(2):108-12; discussion 113.
13. Moritsch E. Vorkommen und Therapie des Madelung'schen Fetthalses (Benigne beidseitige Lipomatose).
14. Enzi G. Multiple symmetric lipomatosis: an updated clinical report. *Medicine (Baltimore)* 1984; 63(1):56–64.
15. Jang JH, Lee A, Han S-A, Ryu J-K, Song J-Y. Multiple Symmetric Lipomatosis (Madelung's Disease) Presenting as Bilateral Huge Gynecomastia. *J Breast Cancer* 2014; 17(4):397–400.
16. Fonseca VAO, Alves C, Marques H, Camacho E, Saraiva AP. Madelung's disease as a rare cause of obstructive sleep apnea. *J Bras Pneumol* 2009; 35(10):1053–6.
17. Milisavljevic D, Zivic M, Radovanović Z, Stankovic P. Severe dyspnea as atypical presenting symptom of Madelung's disease. *Hippokratia* 2010; 14(2):133–5.
18. Enzi G, Busetto L, Ceschin E, Coin A, Digito M, Pigozzo S. Multiple symmetric lipomatosis: clinical aspects and outcome in a long-term longitudinal study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26(2):253–61.
19. Enzi G, Busetto L, Sergi G, Coin A, Inelmen EM, Vindigni V et al. Multiple symmetric lipomatosis: a rare disease and its possible links to brown adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2015; 25(4):347–53.
20. Dorigo P, Prosdociami M, Carpenedo F, Caparrotta L, Tessari F, Enzi G. Multiple symmetric lipomatosis. A defect in adrenergic stimulated lipolysis II. *Pharmacol Res Commun* 1980; 12(7):625–38.
21. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14(4-6):311–24.
22. Kan Y, Yao P, Xin W, Chen Q, Wang J, Yue J et al. Recent progress on diagnosis and treatment of benign symmetric lipomatosis. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2010; 24(3):105–7.

23. Gu W, Dou J, Yang G, Li J, Ba J, Lu Z et al. The endocrine and metabolic evaluation of benign symmetrical lipomatosis: a case report and literature review. *Neuro Endocrinol Lett* 2010; 31(4):446–50.
24. McKusick VA, editor. Mendelian inheritance in man. Baltimore: John Hopkins University Press; 1978.
25. Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B et al. The presence of UCPI demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J* 2009; 23(9):3113–20.
26. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009; 360(15):1509–17.
27. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009; 360(15):1500–8.
28. Prantl L, Schreml J, Gehmert S, Klein S, Bai X, Zeitler K et al. Transcription Profile in Sporadic Multiple Symmetric Lipomatosis Reveals Differential Expression at the Level of Adipose Tissue-Derived Stem Cells. *Plast Reconstr Surg* 2016; 137(4):1181–90.
29. Fonseca VR, Freitas C, Palmeira M, Ferreira C, Victorino R. Cardiac noradrenergic denervation in a patient with multiple symmetric lipomatosis. *Cardiology* 2012; 121(3):160–3.
30. Nisoli E, Regianini L, Briscini L, Bulbarelli A, Busetto L, Coin A et al. Multiple symmetric lipomatosis may be the consequence of defective noradrenergic modulation of proliferation and differentiation of brown fat cells. *J Pathol* 2002; 198(3):378–87.
31. Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem* 2016; 109:314–41.
32. Xiang X, Zhao J, Xu G, Li Y, Zhang W. mTOR and the differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011; 43(7):501–10.
33. Felthaus O, Schön T, Schiltz D, Aung T, Kühlmann B, Jung F et al. Adipose tissue-derived stem cells from affected and unaffected areas in patients with multiple symmetric lipomatosis show differential regulation of mTOR pathway genes. *Clin Hemorheol Microcirc* 2018; 69(1-2):141–51.
34. Ortega-Molina A, Efeyan A, Lopez-Guadamillas E, Muñoz-Martin M, Gómez-López G, Cañamero M et al. Pten Positively Regulates Brown Adipose Function, Energy Expenditure, and Longevity. *Cell Metab* 2012; 15(3):382–94.
35. Sanchez-Gurmaches J, Hung C-M, Sparks CA, Tang Y, Li H, Guertin DA. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab* 2012; 16(3):348–62.
36. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006; 441(7097):1068–74.
37. Betschinger J, Knoblich JA. Dare to be different: Asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol* 2004; 14(16):R674-85.
38. Clevers H. Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nat Genet* 2005; 37(10):1027–8.
39. Doe CQ, Bowerman B. Asymmetric cell division: Fly neuroblast meets worm zygote. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(1):68–75.
40. Yamashita YM, Fuller MT, Jones DL. Signaling in stem cell niches: Lessons from the *Drosophila* germline. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 4):665–72.
41. Beckmann J, Scheitza S, Wernet P, Fischer JC, Giebel B. Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: Identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood* 2007; 109(12):5494–501.
42. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC. Review: Ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng* 2006; 12(11):3007–19.
43. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: Anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(1):11–21.
44. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4(1-2):7–25.

45. Kimble JE, White JG. On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1981; 81(2):208–19.
46. Deng W, Lin H. Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in *Drosophila*. *Dev Biol* 1997; 189(1):79–94.
47. Yamashita YM, Jones DL, Fuller MT. Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* 2003; 301(5639):1547–50.
48. Henderson ST, Gao D, Lambie EJ, Kimble J. lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. *Development* 1994; 120(10):2913–24.
49. Xie T, Spradling AC. A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* 2000; 290(5490):328–30.
50. Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB, Fuller MT. Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* 2001; 294(5551):2542–5.
51. Tulina N, Matunis E. Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science* 2001; 294(5551):2546–9.
52. Goodell MA, Nguyen H, Shroyer N. Somatic stem cell heterogeneity: Diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16(5):299–309.
53. Rosa L de, Luca M de. Cell biology: Dormant and restless skin stem cells. *Nature* 2012; 489(7415):215–7.
54. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 2010; 327(5965):542–5.
55. Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 2007; 21(5):860–7.
56. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2009; 114:185–99.
57. Lu F, Zhang Y. Cell totipotency: Molecular features, induction, and maintenance. *Natl Sci Rev* 2015; 2(2):217–25.
58. Ulfig N, Ritschel G. *Kurzlehrbuch Embryologie: 9 Tabellen ; [ideal für die neue AO]. 2[. Druck]. Stuttgart: Thieme; 2005.*
59. Chang C-W, Wakeland AK, Parast MM. Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension. *J Endocrinol* 2018; 236(1):R43-R56.
60. Poh Y-C, Chen J, Hong Y, Yi H, Zhang S, Chen J et al. Generation of organized germ layers from a single mouse embryonic stem cell. *Nat Commun* 2014; 5:4000.
61. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819):154–6.
62. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(12):7634–8.
63. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391):1145–7.
64. Raff M. Adult stem cell plasticity: Fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19:1–22.
65. Stanford WL, Caruana G, Vallis KA, Inamdar M, Hidaka M, Bautch VL et al. Expression trapping: Identification of novel genes expressed in hematopoietic and endothelial lineages by gene trapping in ES cells. *Blood* 1998; 92(12):4622–31.
66. Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo J-M, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: Switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells* 2005; 23(3):392–402.
67. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; 227(2):271–8.

68. BECKER AJ, McCULLOCH EA, TILL JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963; 197:452–4.
69. Mens MMJ, Ghanbari M. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem Cell Rev* 2018.
70. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279(5356):1528–30.
71. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(8):4080–5.
72. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284(5417):1168–70.
73. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31(1):235–40.
74. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410(6829):701–5.
75. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290(5497):1775–9.
76. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107(11):1395–402.
77. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6(11):1229–34.
78. Barui A, Chowdhury F, Pandit A, Datta P. Rerouting mesenchymal stem cell trajectory towards epithelial lineage by engineering cellular niche. *Biomaterials* 2018; 156:28–44.
79. Dezawa M. Muse Cells Provide the Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells: Direct Contribution of Muse Cells to Tissue Regeneration. *Cell Transplant* 2016; 25(5):849–61.
80. Carrelha J, Meng Y, Kettle LM, Luis TC, Norfo R, Alcolea V et al. Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature* 2018; 554(7690):106–11.
81. Giladi A, Paul F, Herzog Y, Lubling Y, Weiner A, Yofe I et al. Single-cell characterization of haematopoietic progenitors and their trajectories in homeostasis and perturbed haematopoiesis. *Nat Cell Biol* 2018; 20(7):836–46.
82. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858):1917–20.
83. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448(7151):318–24.
84. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4):663–76.
85. Golipour A, David L, Liu Y, Jayakumaran G, Hirsch CL, Trcka D et al. A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network. *Cell Stem Cell* 2012; 11(6):769–82.
86. Apostolou E, Hochedlinger K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* 2013; 502(7472):462–71.
87. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010; 465(7299):704–12.
88. Montserrat N, Nivet E, Sancho-Martinez I, Hishida T, Kumar S, Miquel L et al. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotency with lineage specifiers. *Cell Stem Cell* 2013; 13(3):341–50.
89. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893):41–9.
90. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143–7.

91. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276(5309):71–4.
92. Liu Z-J, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2009; 106(6):984–91.
93. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9(5):641–50.
94. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16(3):381–90.
95. Griffin M, Kalaskar DM, Butler PE, Seifalian AM. The use of adipose stem cells in cranial facial surgery. *Stem Cell Rev* 2014; 10(5):671–85.
96. Varghese J, Griffin M, Mosahebi A, Butler P. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: Implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1):45.
97. Dzierzak E, Speck NA. Of lineage and legacy: The development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2008; 9(2):129–36.
98. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: Adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2(7):373–82.
99. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008; 2(4):313–9.
100. Mimeault M, Batra SK. Recent progress on normal and malignant pancreatic stem/progenitor cell research: Therapeutic implications for the treatment of type 1 or 2 diabetes mellitus and aggressive pancreatic cancer. *Gut* 2008; 57(10):1456–68.
101. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315–7.
102. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; 24(2):376–85.
103. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: Temporal changes in vitro. *Stem Cells* 2006; 24(5):1246–53.
104. Sengenès C, Lomède K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumié A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 2005; 205(1):114–22.
105. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2):211–28.
106. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarte DA de, Huang JI, Mizuno H et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12):4279–95.
107. Lévesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 2001; 98(5):1289–97.
108. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; 100(9):1249–60.
109. Tholpady SS, Lull R, Ogle RC, Rubin JP, Futrell JW, Katz AJ. Adipose tissue: Stem cells and beyond. *Clin Plast Surg* 2006; 33(1):55–62, vi.
110. Araña M, Mazo M, Aranda P, Pelacho B, Prosper F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Isolation, expansion, and characterization. *Methods Mol Biol* 2013; 1036:47–61.
111. Locke M, Feisst V, Dunbar PR. Concise review: Human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells* 2011; 29(3):404–11.
112. Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE. Characterization of neuronal/glia differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol* 2004; 187(2):319–28.

113. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* 2007; 207(2):267–74.
114. Xu Y, Liu Z, Liu L, Zhao C, Xiong F, Zhou C et al. Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells in vitro. *BMC Neurosci* 2008; 9:21.
115. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EKW, Wei EKS. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* 2003; 75(3):775–9.
116. Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P, Larson R et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: Effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *J Surg Res* 2009; 152(1):157–66.
117. Corre J, Barreau C, Cousin B, Chavoïn J-P, Caton D, Fournial G et al. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J Cell Physiol* 2006; 208(2):282–8.
118. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(1):258–64.
119. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341(4):1135–40.
120. Ong WK, Sugii S. Adipose-derived stem cells: Fatty potentials for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(6):1083–6.
121. Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 2011; 7(2):269–91.
122. McIntosh KR, Lopez MJ, Borneman JN, Spencer ND, Anderson PA, Gimble JM. Immunogenicity of allogeneic adipose-derived stem cells in a rat spinal fusion model. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(9):2677–86.
123. Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* 2007; 212(3):702–9.
124. Salgado AJBOG, Reis RLG, Sousa NJC, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: Soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010; 5(2):103–10.
125. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* 2012; 2012:812693.
126. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: Adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 2007; 48(6):1253–62.
127. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14 Suppl 5:242S–249S.
128. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: Going back to the future. *J Lipid Res* 2012; 53(2):227–46.
129. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells: The great WAT hope. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(6):270–7.
130. Lowe CE, O'Rahilly S, Rochford JJ. Adipogenesis at a glance. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 16):2681–6.
131. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 2012; 81:715–36.
132. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: The diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 2008; 77:289–312.
133. Bae K-H, Kim WK, Lee SC. Involvement of protein tyrosine phosphatases in adipogenesis: New anti-obesity targets? *BMB Rep* 2012; 45(12):700–6.
134. Diedrich J, Gusky HC, Podgorski I. Adipose tissue dysfunction and its effects on tumor metabolism. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2015; 21(1):17–41.
135. Flier JS. Obesity wars: Molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004; 116(2):337–50.

136. Park A, Kim WK, Bae K-H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; 6(1):33–42.
137. Dani C, Amri EZ, Bertrand B, Enerback S, Bjursell G, Grimaldi P et al. Expression and regulation of pOb24 and lipoprotein lipase genes during adipose conversion. *J Cell Biochem* 1990; 43(2):103–10.
138. Bełtowski J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 2003; 9(2):RA55-61.
139. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298(6):E1244-53.
140. Foster DO, Frydman ML. Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: The dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can J Physiol Pharmacol* 1979; 57(3):257–70.
141. Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1: The only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1504(1):82–106.
142. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009; 360(15):1518–25.
143. Sacks H, Symonds ME. Anatomical locations of human brown adipose tissue: Functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2013; 62(6):1783–90.
144. Smith RE, Horwitz BA. Brown fat and thermogenesis. *Physiol Rev* 1969; 49(2):330–425.
145. Lean ME. Brown adipose tissue in humans. *Proc Nutr Soc* 1989; 48(2):243–56.
146. Valente A, Jamurtas AZ, Koutedakis Y, Flouris AD. Molecular pathways linking non-shivering thermogenesis and obesity: Focusing on brown adipose tissue development. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2015; 90(1):77–88.
147. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84(1):277–359.
148. Contreras C, Gonzalez F, Fernø J, Diéguez C, Rahmouni K, Nogueiras R et al. The brain and brown fat. *Ann Med* 2015; 47(2):150–68.
149. Villarroya F, Vidal-Puig A. Beyond the sympathetic tone: The new brown fat activators. *Cell Metab* 2013; 17(5):638–43.
150. Whittle AJ, López M, Vidal-Puig A. Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol Med* 2011; 17(8):405–11.
151. Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* 2012; 151(2):400–13.
152. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 2011; 17(2):200–5.
153. Krauss S, Zhang C-Y, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(3):248–61.
154. Waldén TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(1):E19-31.
155. Rothwell NJ, Stock MJ. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Obes Res* 1997; 5(6):650–6.
156. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 2009; 9(2):203–9.

157. Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: Molecular and morphological characterization. *J Cell Sci* 1992; 103 (Pt 4):931–42.
158. Young P, Arch JR, Ashwell M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* 1984; 167(1):10–4.
159. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; 150(2):366–76.
160. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 2011; 121(1):96–105.
161. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 2008; 454(7207):961–7.
162. Ishibashi J, Seale P. Medicine. Beige can be slimming. *Science* 2010; 328(5982):1113–4.
163. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 2010; 285(10):7153–64.
164. Lee Y-H, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by β 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab* 2012; 15(4):480–91.
165. Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(3):C670–81.
166. Rosenwald M, Perdikari A, Röllicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* 2013; 15(6):659–67.
167. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions? *Endocrinology* 2013; 154(9):2992–3000.
168. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 1998; 92(6):829–39.
169. Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 2001; 276(2):1486–93.
170. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 2007; 6(1):38–54.
171. Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F et al. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* 2012; 26(3):271–81.
172. Bordicchia M, Liu D, Amri E-Z, Ailhaud G, Dessi-Fulgheri P, Zhang C et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest* 2012; 122(3):1022–36.
173. Roca-Rivada A, Castela C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Belén Crujeiras A et al. FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PLoS ONE* 2013; 8(4):e60563.
174. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481(7382):463–8.
175. Wankhade UD, Lee J-H, Dagur PK, Yadav H, Shen M, Chen W et al. TGF- β receptor 1 regulates progenitors that promote browning of white fat. *Mol Metab* 2018.
176. Kotzbeck P, Giordano A, Mondini E, Murano I, Severi I, Venema W et al. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *J Lipid Res* 2018.
177. Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes* 2013; 62(6):1774–82.
178. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes Dev* 2013; 27(3):234–50.

179. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS ONE* 2012; 7(11):e49452.
180. Franko J, Pomfy M, Prosbová T. Apoptosis and cell death (mechanisms, pharmacology and promise for the future). *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2000; 43(2):63–8.
181. Xu X, Lai Y, Hua Z-C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep* 2019; 39(1).
182. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; 151(1):10–27.
183. Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer J-L, Hofmann K, Kataoka T et al. TRAIL Receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) Signal FADD-Dependent Apoptosis and Activate NF- κ B. *Immunity* 1997; 7(6):831–6.
184. Schneider P, Tschoep J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 2000; 74(2-3):281–6.
185. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol* 2021; 81(4):1133–43.
186. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002; 296(5573):1635–6.
187. Batandier C, Leverve X, Fontaine E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 2004; 279(17):17197–204.
188. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004; 23(16):2861–74.
189. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805):770–6.
190. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* 1996; 86(1):147–57.
191. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-Dimensional Structure of the Apoptosome. *Mol Cell* 2002; 9(2):423–32.
192. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 2002; 84(2-3):203–14.
193. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006; 13(9):1423–33.
194. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410(6828):549–54.
195. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4):495–516.
196. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis* 2019; 10(3):177.
197. Kelly GL, Strasser A. Toward Targeting Antiapoptotic MCL-1 for Cancer Therapy. *Annu. Rev. Cancer Biol.* 2020; 4(1):299–313.
198. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 2005; 17(3):393–403.
199. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 2005; 17(4):525–35.
200. Du H, Wolf J, Schafer B, Moldoveanu T, Chipuk JE, Kuwana T. BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J Biol Chem* 2011; 286(1):491–501.
201. Kim TH, Zhao Y, Barber MJ, Kuharsky DK, Yin XM. Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J Biol Chem* 2000; 275(50):39474–81.
202. Yin XM. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res* 2000; 10(3):161–7.

203. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):594–604. Available from: URL: <https://www.nature.com/articles/nrc864>.
204. Wang X, Simpson ER, Brown KA. p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Res* 2015; 75(23):5001–7.
205. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288(5468):1053–8.
206. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7(3):683–94.
207. Thornborrow EC, Patel S, Mastropietro AE, Schwartzfarb EM, Manfredi JJ. A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine bax genes. *Oncogene* 2002; 21(7):990–9.
208. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2005; 18(3):283–93.
209. Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(3):159–69. Available from: URL: <https://www.nature.com/articles/nrc3215>.
210. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010:186–94.
211. Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* 2006; 281(11):7260–70.
212. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(10):7320–6.
213. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; 407(6805):784–8.
214. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 2003; 171(9):4672–9.
215. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6(5):280–9.
216. Zhang J, Yu X-H, Yan Y-G, Wang C, Wang W-J. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. *Clin Chim Acta* 2015; 444:182–92.
217. Li T, Mo H, Chen W, Li L, Xiao Y, Zhang J et al. Role of the PI3K-Akt Signaling Pathway in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. *Reprod Sci* 2017; 24(5):646–55.
218. Jellusova J, Rickert RC. The PI3K pathway in B cell metabolism. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2016; 51(5):359–78.
219. Ouyang Z-H, Wang W-J, Yan Y-G, Wang B, Lv G-H. The PI3K/Akt pathway: a critical player in intervertebral disc degeneration. *Oncotarget* 2017; 8(34):57870–81.
220. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7):489–501.
221. Jean S, Kiger AA. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J Cell Sci* 2014; 127(Pt 5):923–8.
222. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(8):627–44.
223. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296(5573):1655–7.
224. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304(5670):554.
225. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008; 27(41):5497–510.
226. Ahmad A, Biersack B, Li Y, Kong D, Bao B, Schobert R et al. Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF-κB signaling by indole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2013; 13(7):1002–13.

227. Amzel LM, Huang C-H, Mandelker D, Lengauer C, Gabelli SB, Vogelstein B. Structural comparisons of class I phosphoinositide 3-kinases. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(9):665–9.
228. Lequieu J, Chakrabarti A, Nayak S, Varner JD. Computational modeling and analysis of insulin induced eukaryotic translation initiation. *PLoS Comput Biol* 2011; 7(11):e1002263.
229. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 2005; 87(1):99–109.
230. Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(1):35–42.
231. White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283(3):E413–22.
232. Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 2001; 15(12):2099–111.
233. Esposito DL, Li Y, Cama A, Quon MJ. Tyr(612) and Tyr(632) in human insulin receptor substrate-1 are important for full activation of insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and translocation of GLUT4 in adipose cells. *Endocrinology* 2001; 142(7):2833–40.
234. James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJ, Holmes AB, Alessi DR. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J* 1996; 315 (Pt 3):709–13.
235. Ma K, Cheung SM, Marshall AJ, Duronio V. PI(3,4,5)P₃ and PI(3,4)P₂ levels correlate with PKB/akt phosphorylation at Thr308 and Ser473, respectively; PI(3,4)P₂ levels determine PKB activity. *Cell Signal* 2008; 20(4):684–94.
236. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307(5712):1098–101.
237. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* 1997; 7(4):261–9.
238. Wiza C, Nascimento EBM, Ouwens DM. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(12):E1453–60.
239. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(1):21–35.
240. Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; 124(3):471–84.
241. Cota D, Proulx K, Smith KAB, Kozma SC, Thomas G, Woods SC et al. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 2006; 312(5775):927–30.
242. Marshall S. Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Sci STKE* 2006; 2006(346):re7.
243. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18(16):1926–45.
244. Thomas G, Hall MN. TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9(6):782–7.
245. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(2):113–27.
246. Yang M, Lu Y, Piao W, Jin H. The Translational Regulation in mTOR Pathway. *Biomolecules* 2022; 12(6).
247. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(9):729–34.
248. Gual P, Grémeaux T, Gonzalez T, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F. MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia* 2003; 46(11):1532–42.
249. Zick Y. Insulin resistance: A phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol* 2001; 11(11):437–41.

250. Maira S-M, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D et al. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(2):317–28.
251. Burger MT, Pecchi S, Wagman A, Ni Z-J, Knapp M, Hendrickson T et al. Identification of NVP-BKM120 as a Potent, Selective, Orally Bioavailable Class I PI3 Kinase Inhibitor for Treating Cancer. *ACS Med Chem Lett* 2011; 2(10):774–9.
252. Benefit Mixed with Caution for Buparlisib. *Cancer Discov* 2017; 7(2):121.
253. Palmer T. Understanding enzymes. 3. ed. London: Prentice Hall; 1991.
254. Yang S, Li X, Guan W, Qian M, Yao Z, Yin X et al. NVP-BKM120 inhibits colon cancer growth via FoxO3a-dependent PUMA induction. *Oncotarget* 2017; 8(47):83052–62.
255. Robert M, Frenel J-S, Bourbouloux E, Berton Rigaud D, Patsouris A, Augereau P et al. Efficacy of buparlisib in treating breast cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2017.
256. Netland IA, Førde HE, Sleire L, Leiss L, Rahman MA, Skeie BS et al. Treatment with the PI3K inhibitor buparlisib (NVP-BKM120) suppresses the growth of established patient-derived GBM xenografts and prolongs survival in nude rats. *J Neurooncol* 2016; 129(1):57–66.
257. Massard C, Chi KN, Castellano D, Bono J de, Gravis G, Dirix L et al. Corrigendum to 'Phase Ib dose-finding study of abiraterone acetate plus buparlisib (BKM120) or dactolisib (BEZ235) in patients with castration-resistant prostate cancer' *European Journal of Cancer* 76 (2017) 36-44. *Eur J Cancer* 2017; 81:242.
258. Park E, Park J, Han S-W, Im S-A, Kim T-Y, Oh D-Y et al. NVP-BKM120, a novel PI3K inhibitor, shows synergism with a STAT3 inhibitor in human gastric cancer cells harboring KRAS mutations. *Int J Oncol* 2012; 40(4):1259–66.
259. Baselga J, Im S-A, Iwata H, Cortés J, Laurentiis M de, Jiang Z et al. Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 2017; 18(7):904–16.
260. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4):402–8.
261. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265–75.
262. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98(3):503–17.
263. Makiguchi T, Terashi H, Hashikawa K, Yokoo S, Kusaka J. Osteolipoma in the glabella: pathogenesis associated with mesenchymal lipoma-derived stem cells. *J Craniofac Surg* 2013; 24(4):1310–3.
264. Lin T-M, Chang H-W, Wang K-H, Kao A-P, Chang C-C, Wen C-H et al. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human lipoma tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361(4):883–9.
265. Zavan B, Francesco F de, D'Andrea F, Ferroni L, Gardin C, Salzillo R et al. Persistence of CD34 Stem Marker in Human Lipoma: Searching for Cancer Stem Cells. *Int J Biol Sci* 2015; 11(10):1127–39.
266. Xu C-J, Cao M, Liu L, Guo L-Y, Li S-L, Liu Y-H et al. Nature of the residue hard tissue after liposuction in lipoma and its role in lipoma recurrence. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2013; 29(2):109–12.
267. Chang H, Park SO, Jin US, Hong KY. Characterization of two distinct lipomas: a comparative analysis from surgical perspective. *J Plast Surg Hand Surg* 2018; 52(3):178–84.
268. Sanna M, Borgo C, Compagnin C, Favaretto F, Vindigni V, Trento M et al. White Adipose Tissue Expansion in Multiple Symmetric Lipomatosis Is Associated with Upregulation of CK2, AKT and ERK1/2. *Int J Mol Sci* 2020; 21(21).
269. Tremp M, Menzi N, Tchang L, Di Summa PG, Schaefer DJ, Kalbermatten DF. Adipose-Derived Stromal Cells from Lipomas: Isolation, Characterisation and Review of the Literature. *Pathobiology* 2016; 83(5):258–66.
270. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A

- joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013; 15(6):641–8.
271. Engels PE, Tremp M, Kingham PJ, Di Summa PG, Largo RD, Schaefer DJ et al. Harvest site influences the growth properties of adipose derived stem cells. *Cytotechnology* 2013; 65(3):437–45.
 272. Güven S, Mehrkens A, Saxer F, Schaefer DJ, Martinetti R, Martin I et al. Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue. *Biomaterials* 2011; 32(25):5801–9.
 273. Nisoli E, Tonello C, Briscini L, Carruba MO. Inducible nitric oxide synthase in rat brown adipocytes: Implications for blood flow to brown adipose tissue. *Endocrinology* 1997; 138(2):676–82.
 274. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, García MP, Sáez FJ, Díaz-Flores L, JR, Valladares F et al. CD34+ stromal cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as a tissue reserve and a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. *Histol Histopathol* 2014; 29(7):831–70.
 275. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004; 110(3):349–55.
 276. Jacinto E, Hall MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(2):117–26.
 277. Oldham S, Hafen E. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol* 2003; 13(2):79–85.
 278. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; 103(2):253–62.
 279. Sakaue H, Ogawa W, Matsumoto M, Kuroda S, Takata M, Sugimoto T et al. Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 1998; 273(44):28945–52.
 280. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 1996; 271(49):31372–8.
 281. Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* 2003; 4(1):119–29.
 282. Peng X-D, Xu P-Z, Chen M-L, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* 2003; 17(11):1352–65.
 283. Kim JE, Chen J. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* 2004; 53(11):2748–56.
 284. Hata K, Nishimura R, Ikeda F, Yamashita K, Matsubara T, Nokubi T et al. Differential roles of Smad1 and p38 kinase in regulation of peroxisome proliferator-activating receptor gamma during bone morphogenetic protein 2-induced adipogenesis. *Mol Biol Cell* 2003; 14(2):545–55.
 285. Carnevalli LS, Masuda K, Frigerio F, Le Bacquer O, Um SH, Gandin V et al. S6K1 plays a critical role in early adipocyte differentiation. *Dev Cell* 2010; 18(5):763–74.
 286. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* 2012; 441(1):1–21.
 287. Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends Mol Med* 2007; 13(6):252–9.
 288. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2020; 20(2):74–88.
 289. Kim E-K, Kim H-A, Koh JS, Kim MS, Kim K-I, Lee JI et al. Phosphorylated S6K1 is a possible marker for endocrine therapy resistance in hormone receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126(1):93–9.
 290. Holz MK. The role of S6K1 in ER-positive breast cancer. *Cell Cycle* 2012; 11(17):3159–65.
 291. Cho HJ, Park J, Lee HW, Lee YS, Kim JB. Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321(4):942–8.

292. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 2004; 431(7005):200–5.
293. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 1999; 13(11):1422–37.
294. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* 2001; 15(21):2852–64.
295. Zhang Y, Kwok-Shing Ng P, Kucherlapati M, Chen F, Liu Y, Tsang YH et al. A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations. *Cancer Cell* 2017; 31(6):820-832.e3.
296. Zack TI, Schumacher SE, Carter SL, Cherniack AD, Saksena G, Tabak B et al. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat Genet* 2013; 45(10):1134–40.
297. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu I-I, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. *Int J Mol Sci* 2020; 22(1).
298. Kurman RJ, Shih I-M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol* 2011; 42(7):918–31.
299. Fujino T, Suda K, Mitsudomi T. Lung Cancer with MET exon 14 Skipping Mutation: Genetic Feature, Current Treatments, and Future Challenges. *Lung Cancer (Auckl)* 2021; 12:35–50.
300. Mazloumi Gavani F, Smith Arnesen V, Jacobsen RG, Krakstad C, Hoivik EA, Lewis AE. Class I Phosphoinositide 3-Kinase PIK3CA/p110 α and PIK3CB/p110 β Isoforms in Endometrial Cancer. *Int J Mol Sci* 2018; 19(12).
301. Huang D, Sun W, Zhou Y, Li P, Chen F, Chen H et al. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2018; 37(1):173–87.
302. Mishra R, Patel H, Alanazi S, Kilroy MK, Garrett JT. PI3K Inhibitors in Cancer: Clinical Implications and Adverse Effects. *Int J Mol Sci* 2021; 22(7).
303. Venot Q, Canaud G. Syndromes hypertrophiques secondaires aux mutations de PIK3CA. *Nephrol Ther* 2017; 13 Suppl 1:S155-S156.
304. Wang SI, Puc J, Li J, Bruce JN, Cairns P, Sidransky D et al. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 1997; 57(19):4183–6.
305. Guldberg P, thor Straten P, Birck A, Ahrenkiel V, Kirkin AF, Zeuthen J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 1997; 57(17):3660–3.
306. Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG et al. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* 1997; 57(22):4997–5000.
307. Rhei E, Kang L, Bogomolny F, Federici MG, Borgen PI, Boyd J. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57(17):3657–9.
308. Haruta T, Uno T, Kawahara J, Takano A, Egawa K, Sharma PM et al. A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Mol Endocrinol* 2000; 14(6):783–94.
309. Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA. Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem* 2003; 278(10):8199–211.
310. Mothe I, van Obberghen E. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem* 1996; 271(19):11222–7.
311. Ravichandran LV, Esposito DL, Chen J, Quon MJ. Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J Biol Chem* 2001; 276(5):3543–9.
312. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374(Pt 1):1–20.
313. Jee SH, Chiu HC, Tsai TF, Tsai WL, Liao YH, Chu CY et al. The phosphotidyl inositol 3-kinase/Akt signal pathway is involved in interleukin-6-mediated Mcl-1 upregulation and anti-apoptosis activity in basal cell carcinoma cells. *J Invest Dermatol* 2002; 119(5):1121–7.

314. Shi Y, Hsu J, Hu L, Gera J, Lichtenstein A. Signal pathways involved in activation of p70S6K and phosphorylation of 4E-BP1 following exposure of multiple myeloma tumor cells to interleukin-6. *J Biol Chem* 2002; 277(18):15712–20.
315. Chen RH, Chang MC, Su YH, Tsai YT, Kuo ML. Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem* 1999; 274(33):23013–9.
316. Aoyagi T, Takishima K, Hayakawa M, Nakamura H. Gene expression of TGF-alpha, EGF and IL-6 in cultured renal tubular cells and renal cell carcinoma. *Int J Urol* 1996; 3(5):392–6.
317. ADLER HL, McCURDY MA, KATTAN MW, TIMME TL, SCARDINO PT, THOMPSON TC. ELEVATED LEVELS OF CIRCULATING INTERLEUKIN-6 AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR-beta 1 IN PATIENTS WITH METASTATIC PROSTATIC CARCINOMA. *Journal of Urology* 1999; 161(1):182–7.
318. Negoro S, Oh H, Tone E, Kunisada K, Fujio Y, Walsh K et al. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction. *Circulation* 2001; 103(4):555–61.
319. Sancho M, Leiva D, Lucendo E, Orzáez M. Understanding MCL1: from cellular function and regulation to pharmacological inhibition. *FEBS J* 2021.
320. Ren H, Zhao L, Li Y, Yue P, Deng X, Owonikoko TK et al. The PI3 kinase inhibitor NVP-BKM120 induces GSK3/FBXW7-dependent Mcl-1 degradation, contributing to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Lett* 2013; 338(2):229–38.
321. Zang C, Eucker J, Liu H, Coordes A, Lenarz M, Possinger K et al. Inhibition of pan-class I phosphatidylinositol-3-kinase by NVP-BKM120 effectively blocks proliferation and induces cell death in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2014; 55(2):425–34.
322. Rosich L, Saborit-Villarroya I, López-Guerra M, Xargay-Torrent S, Montraveta A, Aymerich M et al. The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 overcomes resistance signals derived from microenvironment by regulating the Akt/FoxO3a/Bim axis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2013; 98(11):1739–47.
323. Zeng W, Pirzgalska RM, Pereira MMA, Kubasova N, Barateiro A, Seixas E et al. Sympathetic neuro-adipose connections mediate leptin-driven lipolysis. *Cell* 2015; 163(1):84–94.
324. Mueller A, Bachmann E, Linnig M, Khillimberger K, Schimanski CC, Galle PR et al. Selective PI3K inhibition by BKM120 and BEZ235 alone or in combination with chemotherapy in wild-type and mutated human gastrointestinal cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 69(6):1601–15.
325. Sahin I, Azab F, Mishima Y, Moschetta M, Tsang B, Glavey SV et al. Targeting survival and cell trafficking in multiple myeloma and Waldenstrom macroglobulinemia using pan-class I PI3K inhibitor, buparlisib. *Am J Hematol* 2014; 89(11):1030–6.
326. Bashash D, Safaroghli-Azar A, Delshad M, Bayati S, Nooshinfar E, Ghaffari SH. Inhibitor of pan class-I PI3K induces differentially apoptotic pathways in acute leukemia cells: Shedding new light on NVP-BKM120 mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 79:308–17.
327. Tanaka H, Matsumura I, Ezoe S, Satoh Y, Sakamaki T, Albanese C et al. E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol Cell* 2002; 9(5):1017–29.
328. Bashash D, Delshad M, Safaroghli-Azar A, Safa M, Momeny M, Ghaffari SH. Novel pan PI3K inhibitor-induced apoptosis in APL cells correlates with suppression of telomerase: An emerging mechanism of action of BKM120. *Int J Biochem Cell Biol* 2017; 91(Pt A):1–8.
329. Okamoto T, Sanda T, Asamitsu K. NF-kappa B signaling and carcinogenesis. *Curr Pharm Des* 2007; 13(5):447–62.
330. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 2001; 306(3):347–61.
331. Roy A, Banerjee S. p27 and leukemia: Cell cycle and beyond. *J Cell Physiol* 2015; 230(3):504–9.
332. Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: P21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 2005; 65(10):3980–5.

333. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55(22):5187–90.

10. Materialverzeichnis

10.1. Verbrauchsmaterial

10.1.1 Einwegmaterialien

Cryo.s™ Einfrierröhrchen (2ml, Cat. No. 122263)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
ECO Plates 48 well (Cat. No. EC200-1002)	Amplifa Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Minisart® NML Spritzenvorsatzfilter (Cat. No. 83.1826.001)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multiwellplatten, Advanced TC™ Plate, (6, 24, 48, 96 well) (Cat. No. 657960, 662160, 677980, 655980)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipetten (2 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl) (Cat. No. 0030075455; 0030081064; 0030075420; 0030075439)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, gestopft, 1000µl (Cat. No. 6314074)	Biosphere plus, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale 100/20 mm (Cat. No. 664160)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Sammelgefäß (1,5 ml, Cat. No. 72.706)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipettenspitzen (5, 10, 25, 50 ml) (Cat. No. P7615; P7740; P7865, Z652555)	Greiner Bio-One, Kremsmünster Österreich
Whatman-Filterpapier (3MM CHR; Cat. No. 3030-917)	Cytiva, Marlborough, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Zellkulturflasche (T175) (Cat. No. 660975)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber (Cat. No. 83.3952)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsieb Steriflip Filter (50ml/100µm) (Cat. No.SCNY00100)	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) (Cat. No. 62.554.502; 62.547.004)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

10.1.2. Chemikalien

α -MEM Eagle (Cat. No. M4526)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
APS (Ammoniumperoxidsulfat ,10 %, Cat. No. 9592.2)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol (Cat. No. M7522-100ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Collagenase from Clostridium histolyticum (Cat. No. C8176-100MG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
cOmplete™ (Cat. No. 04693132001)	Roche Holding AG, Basel, Schweiz
Destilliertes Wasser, ddH ₂ O CAS-Nr.: 7732-18-5)	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Dexamethason 98 % (Cat. No. D1756)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
DMEM, low glucose (Cat. No. D5796-500ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
DMSO (Dimethylsulfoxid, (Cat. No. D5879-100ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Ethanol (Cat. No. 9065.4)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FBS (Fetal Bovine Serum; Cat. No. P30-3302)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Formalin solution, neutral buffered in 10 % PBS (Cat. No. 158127-500G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
GlutaMAX™ (Cat. No. 35050-038)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution 10X, Cat. No 14060073)	Sigma-Aldrich, St. Luis, Missouri, Vereinigte Staaten
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine, Cat. No. I5879-100MG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Indomethacin (Cat. No. I7378)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Insulin solution human (Cat. No. I9278-5ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Isopropanol (Cat. No.1096341000)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Laemmli-Puffer (Cat. No. 1610737)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Master Mix 2x DyNAmo ColorFlash (Cat. No. F-416XL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

NewBlot™ Nitro Stripping Buffer (Cat. No. 928-40030)	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Vereinigte Staaten
Nitrocellulosemembran (Amersham™ Protran® western blotting membrane, 0.2µM pore size, 300 mm x 4 m, Cat. No. GE10600001)	GE HealthCare Technologies, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten
NVP-BKM120 (Cat. No. CT-BKM120)	ChemieTek, Indianapolis, Indiana, Vereinigte Staaten
Oil Red O (Cat. No. O0625.25G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Odyssey® Blocking Buffer (Cat. No 927-40000)	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska Vereinigte Staaten
PBS (Phosphate buffered saline; Cat. No. P3813-1PAK)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin pro ml in 0,9 % NaCl, Cat. No. P0781-20ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
PhosSTOP™ (Cat. No. 4906845001)	Roche Holding AG, Basel, Schweiz
Proteinstandard II (1,38mg/ml) (Cat. No. 5000007)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Resazurin, 0,7 mM (Cat. No. R70171G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
RIPA-Puffer (Cat. No. R0278-50ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
SDS (sodium dodecyl sulfate)- Solution (Cat. No. 436143-25G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
TEMED (Cat. No. 2367.1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS, Tris Buffered Saline, Cat. No. T5912)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Triton X 100 (Cat. No. T8787-100ML)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Trypsin-EDTA 10x (0,5 % Trypsin, 0,2 % EDTA, Cat. No. 59418C)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Tween® 20-Lösung (Cat. No. P1379)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

10.1.3. Kits

DCTM Protein Assay Kit I (Cat. No. 5000111)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
QuantiTect Reverse Transkription Kits (Cat. No. 205310)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74104)	Qiagen, Hilden, Deutschland

10.1.4. Antikörper

IRDye® 680RD Goat Anti-Mouse IgG (Cat. No. 926-68070)	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska Vereinigte Staaten
IRDye® 680RD Goat Anti-Rabbit IgG (Cat. No. 926-68071)	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska Vereinigte Staaten
IRDye® 800CW Goat Anti-Mouse IgG (Cat. No. 926-32210)	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska Vereinigte Staaten
IRDye® 800CW Goat Anti-Rabbit IgG (Cat. No. 926-32211)	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska Vereinigte Staaten
Mouse-anti-GAPDH (Cat. No. 8245)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Mouse-anti-phospho-p70 S6 Kinase (Thr389), (Cat. No. MABS82)	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts Vereinigte Staaten
Rabbit-anti-β-Actin (Cat. No. 8277)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Rabbit-anti-PIK3CA (Cat. No. PA5-85091)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Rabbit-anti-p70 S6 Kinase (Cat. No.05-781R)	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts Vereinigte Staaten

10.2. Geräte

Brutschrank (Heracell 240)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Digestorium Airflow Controller AC2	Waldner Holding SE& Co.KG, Wangen im Allgäu, Deutschland
ECO Real-Time PCR Gerät	Illumina, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Einfrierbehälter	NALGENE Nunc International, Rochester, New York, Vereinigte Staaten
Gefrierschrank Liebherr Mediline (4°C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank Liebherr Mediline (-20°C)	Liebherr, Bulle Schweiz
Gefrierschrank Forma ® 900 (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Heizrührer (Variomag)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Lichtmikroskop	Hund Wetzlar, Wetzlar, Deutschland
Mini-PROTEAN™ Tetra Cell System (Cat. No. 1658005EDU)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Odyssey® Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, Vereinigte Staaten
Plattenphotometer Varioskan Flash	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
PowerPac™ HC Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Schüttelgerät Polymax 2040	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Schüttelgerät	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland
Schüttelinkubator HS501	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Spektralphotometer Nano Drop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Sterilbank	Schulz Lufttechnik GmbH, Sprockhövel, Deutschland
Stickstofftank Espace 661	Air Liquide S.A., Paris, Frankreich
Thermo Cycler CFX96 C1000 Touch	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Thermomixer Comfort	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge EcoSpin™	Elmi, Riga, Lettland
Zentrifuge Heraeus™ Biofuge Fresco	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Zentrifuge Rotina 380 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

11. Abkürzungsverzeichnis

11.1. Materialien

ADM	Adipogenes Differenzierungsmedium
APS	Ammoniumperoxidsulfat
CM	Kultivierungsmedium
α -MEM	α -Minimum Essential Medium Eagle
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
FBS	Fetal Bovine Serum
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
NVP-BKM120	Buparlisib
Oil Red O	1-([4-(Xylylazo)xylyl]azo)-2-naphthol
PBS	Phosphate Buffered Saline
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBS	Tris Buffered Saline

11.2. Einheiten

°C	Grad Celsius
nm	Nanometer
pmol	Picomol
rcf	relative Zentrifugalkraft
U/min	Umdrehungen pro Minute
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol
μ g	Mikrogramm
V	Volt

11.3. Institutionen

IFATS	International Fat Applied Technology Society
ISCT	International Society for Cellular Therapy
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIH	National Institute of Health
NLM	National Library of Medicine

11.4. Fachbegriffe

AC	Adenylatcyclase
ADAS	adipose derived adult stem cells
AdMSCs	adipose mesenchymal stem cells
ADSCs	adipose-derived stromal cells
ADM	Adipogenes Differenzierungsmedium
AIFs	Apoptosis inducing factors
Akt	Proteinkinase B (syn. PKB)
AKT1	Akt-codierendes Gen
AMPK	AMP-activated protein kinasis
Apaf-1	apoptotischer Proteaseaktivierungsfaktor-1
ApoBDs	apoptotic bodies
aP2	adipocyte fatty acid binding protein 2
ASCs	adipose derived stem cells
ATGL	Adipozyten-Triglyzeridlipase
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-associated-agonist of cell death
BAD	Bad-codierendes Gen
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer, syn. Apoptoseregulator BAK
BAK1	BAK-codierendes Gen
BAT	brown adipose tissue, braunes Fettgewebe
BAX	Bcl-2 associated X protein, syn. Apoptoseregulator BAX
BAX1	BAX-codierendes Gen
BBC3	Bcl-2-binding component 3, syn. Puma (s.u.)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, syn. Apoptoseregulator Bcl-2

BCL2	Bcl-2-codierendes Gen
Bcl-2-L-2, syn. Bcl-W	Bcl-2-like protein 2
Bcl-2-L5, syn. Bcl-2 related protein A1	Bcl-2-like protein 5
Bcl-2-L-10, syn. Bcl-B	Bcl-2-like protein 10
Bcl-2-L12	Bcl-2-like protein 12
Bcl-X(L)	B-cell lymphoma-extra large
BCLXL	Bcl-X(L)-codierendes Gen
BFL-1/A1	Bcl-2-related protein A1
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
BID	BH3-interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death, syn. Bcl-2 interacting protein Bim
BMF	Bcl-2-modifying factor
BM-MSCs	mesenchymale Knochenmarksstammzellen
BMPs	bone morphogenic proteins
BMP2	bone morphogenic protein 2
BOK	Bcl-2-related ovarian killer protein
CAD	Caspase-activated DNase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CARD	Caspasen-Rekrutierungsdomäne
cDNA	komplementäre DNA
C/EBPs	members of CCAAT/enhancer binding proteins
c-FLIP	Cellular FLICE inhibitory protein
CFU-f-Assay	Colony-forming unit fibroblast-Assay
Cited1	Cbp/p300-interacting transactivator 1
CK2	Caseinkinase 2
CM	Kultivierungsmedium
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTP1	carnitine palmitoyltransferase 1
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DED	death effector domain
DISC	death inducing signal complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPS	Desoxyribonukleotidtriphosphate

eIF4E	eucaryotic translation initiation factor 4E
EIF4EBP1	4E-BP1 codierendes Gen
4E-BP1	4E-binding protein 1
ER α	Östrogenrezeptor α
ERK1/2	Extracellular-signal regulated kinases 1/2
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor, CD95
FGF1 / 2 / 21	fibroblast growth factor 1 / 2 / 21
FOXO	Forkhead-Box-Protein O
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-protein gekoppelter Rezeptor
G3PHD	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase β
GTP	Guanosintriphosphat
hASCs	humane adipogene Stammzellen
HoxC8/9	Homöobox C8/9
HRK	Activator of apoptosis Harakiri
HrtA2/OMI	Serine protease HTRA2, syn. Omi
HSL	Hormonsensitive Lipase
IAFs	apoptosis inducing factors
IAPs	inhibitors of apoptosis proteins
ICM	innere Zellmasse
IGF1	insulin-like growth factor 1
IKK	I κ B kinase complex
IL-6	Interleukin-6
IL-17	Interleukin-17
iPS-Zellen	Induzierte pluripotente Zellen
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription

K_m	Michaelis-Menten-Konstante
Klf4	Krüppel-like factor 4
LPL	Lipoproteinlipase
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MGL	Monoacylglycerin-Lipase
MHC-II	Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse II
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
mLST8/GbL	Target of Rapamycin Complex Subunit LST8
MSCs	mesenchymale Stammzellen
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1
MSL	Multiple Symmetrische Lipomatose
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTOR	mTOR codierendes Gen
mTORC1	mammalian target of rapamycin-Complex 1
mTORC2	mammalian target of rapamycin-Complex 2
MTPs	mitochondrial permeability transition pores, syn. PTPs
MUL1	mitochondrial ubiquitin ligase activator of NF κ B 1, syn. E3 ubiquitin-protein ligase MUL1
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
Noxa, syn. PMAIP1	NADPH oxidase activator 1
Oct4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
p53	Tumorsuppressor p53
p-Akt	phosphoryliertes Akt
PCG-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor γ -coactivator 1 α
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR α	Platelet-derived growth factor alpha
PDK1	Phosphoinositid-abhängigen-Kinase
PGE2	Prostaglandin E2

PFS	progression free survival
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PIK3CA	für die katalytische Untereinheit p110 α der PI3-Kinase codierendes Gen und gleichnamiges Protein
PI3K	PI3(Phosphoinositid-3)-Kinase (allgemein)
PIKK	PI3K-ähnliche Kinasen
PKA	Proteinkinase A
PLA	Prozessiertes Lipoaspirat
PMAIP1	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat-induziertes Protein 1, syn. Noxa
PPAR- α/γ	peroxisome proliferator-activated-receptor- $\alpha/-\gamma$
PRAS40	proline-rich AKT substrate 40 kDa
PRDM16	PR domain containing 16
PROS	PI3K-related overgrowth syndroms
p-RPS6K1	phosphorylierte Ribosomale Protein S6-Kinase 1
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
PTPs	permeability transition pores, syn. MTPs
Puma	P53 upregulated modulator of apoptosis, syn. BBC3 (s.o.)
Raptor	regulatory associated protein of mTOR
Rictor	rapamycin insensitive companion of mTOR
RNA	Ribonukleinsäure
RPS6K1	ribosomal protein S6 kinase 1
RT	Reverse Transkription
RTKs	Rezeptortyrosinkinasen
(SDS-) PAGE	(Sodium-Dodecyl-Sulfat-) Polyacrylamid-gelelektrophorese
SH2-Domäne	Scr-Homologie-2-Domäne
Shc 1	SHC-transforming protein 1
Smac/DIABLO	second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI
SMAD1	SMAD Family Member 1
SoS	Son of Sevenless
Sox2	sex determining region Y (SRY)- box 2

SVF	stromal vascular fraction
tBID	truncated BID
TBX1	T-Box-Transkriptionsfaktor 1
Tcf21	Transkriptionsfaktor 21
TGF β	transforming growth factor β
TMEM26	transmembrane protein 26
TNF	tumor necrosis factor
TNFR-1/-2	TNF-Rezeptor-1/-2
TRADD	TNF-rezeptor associated death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R 1/2	TRAIL-Reszptor 1/2, syn. DR4/DR5
TSC1	Hamartin
TSC2	Tuberin
UCP-1	uncoupling protein 1
$V_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WAT	white adipose tissue
sWAT	subkutanes Fettgewebe
vWAT	viszerales Fettgewebe

12. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. med. Lukas Prantl möchte ich mich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung der Labore sowie sämtlicher Geräte und die Finanzierung der Verbrauchsmaterialien danken, ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Außerdem möchte ich ihm für seine Gutachtertätigkeit danken. Bei Herrn Dr. Oliver Felthaus möchte ich mich für die gute Einarbeitung im Labor, die Hilfestellung bei der Planung und Durchführung sämtlicher Versuche und die stetige Unterstützung während allen Phasen der Arbeit danken. Des Weiteren danke ich ihm für seine stete Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse und der hierauf basierenden Weiterentwicklung der Arbeit. Bei Frau Bernadette Führnstein möchte ich mich ebenfalls für die freundliche Unterstützung und die wertvollen Ratschläge während der Durchführung aller Versuche bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank auch allen Mitarbeitern des Zentrums für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie und den Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg für die freundliche Unterstützung der Arbeit, insbesondere für die Bereitstellung von Lipoaspirat und solidem Fettgewebe aus chirurgischen Eingriffen. Tief verbunden und dankbar bin ich meinen Eltern für ihre vielseitige Unterstützung und ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit und während des gesamten Studiums. Zuletzt möchte ich in diesem Rahmen natürlich allen Patienten danken, die sich bereit erklärt haben, an der Studie teilzunehmen und ihr Fettgewebe für die Isolation der Stammzellen zur Verfügung zu stellen

14. Erklärung

Ich, Lisa Andrea Schreiner, geboren am 06.10.1994 in Lichtenfels, 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 Geld oder 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.

Regensburg, Januar 2025

.....
Lisa Schreiner