

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Guido Hildebrandt

**„Nutzung von humanem Plättchenlysate in der Zellkultur
von adulten Stammzellen der Mamma als Alternative für
fetales Rinderserum – weiterführende Analysen zur
zellulären Strahlenantwort“**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Marit Frederike Langenthal

geb. am 07.12.1995 in Kassel

aus Rostock

Rostock, 2023

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

Gutachter:

Prof. Dr. med. habil. Guido Hildebrandt

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock

PD Dr.-Ing. Dr. habil. med. Benjamin Frey

Labor für molekulare und zelluläre Strahlenbiologie

Translationale Strahlenbiologie der Universitätsmedizin Erlangen

Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke

Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse & Institut für Immunologie

der Universitätsmedizin Rostock

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2024

Die vorliegende Arbeit wurde im Strahlenbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Frau PD Dr. rer. nat. habil. Katrin Manda angefertigt (Klinikdirektor: Prof. Dr. med. habil. Guido Hildebrandt).

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abkürzungsverzeichnis	IV
III. Tabellenverzeichnis	VII
IV. Abbildungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Stammzellen	1
1.1.1. Klassifizierung	1
1.1.2. Adipose-derived stem cells	2
1.1.3. Regeneratives Potential	3
1.2. Strahlenbiologie	4
1.2.1. Allgemeine Strahlenbiologie	5
1.2.2. Klinischer Hintergrund	6
1.2.3. Strahlenbiologie der ADSCs	7
1.3. Zellkultur	7
1.3.1. Grundlagen der Zellkultur	8
1.3.2. Fetales Rinderserum	8
1.3.3. Humanes Plättchenlysate	10
1.3.4. Humanes Plättchenlysate als Alternative für die Kultur der ADSCs	11
1.4. Zielstellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Zellbiologische Arbeitstechniken	15
2.1.1. ADSCs	15
2.1.2. Ausfrieren der Zellen	15
2.1.3. Mediumzusätze	15
2.1.4. Zellkultivierung	16

2.1.5. Zellzahlbestimmung	16
2.1.6. Poolen der Zellen	17
2.1.7. Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger	17
2.2. Experimentelle Methoden	18
2.2.1. Wachstumskurve	18
2.2.2. BrdU-Assay	19
2.2.3. γ H2AX-Assay	20
2.2.4. MMP-2- und VEGF-Assay	21
2.2.5. Mikrokerntest	22
2.3. Statistische Analyse	23
2.4. Materialien und Geräte	24
3. Ergebnisse	27
3.1. Charakterisierung der pADSCs	27
3.1.1. Morphologie	27
3.1.2. Wachstum	28
3.2. Proliferation	30
3.3. DNA-Doppelstrangbrüche	31
3.4. MMP-2- und VEGF-Sekretion	33
3.4.1. MMP-Sekretion	33
3.4.2. VEGF-Sekretion	34
3.5. Mikrokerne	35
4. Diskussion	41
4.1. Morphologie	41
4.2. Wachstum	42
4.3. Proliferation	43
4.4. Doppelstrangbrüche	46
4.5. MMP-2- und VEGF-Sekretion	48

4.6. Mikrokerne	50
4.7. Ausblick	51
5. Zusammenfassung	53
6. Thesen	55
V. Literaturverzeichnis	57
VI. Danksagung	
VII. Selbstständigkeitserklärung	
VIII. Curriculum vitae	

II. Abkürzungsverzeichnis

ASC	adulte Stammzellen (engl.: adult stem cells)
ADSCs	adulte Fettstammzellen (engl.: adipose-derived-stem cells)
AG	Antigen
<i>AKT</i>	Serin/Threonin-Kinase
ATM-Kinase	Serin-Proteinkinase ATM (engl.: Ataxia telangiectasia mutated kinase)
BME	Basal-medium Eagle
BMSCs	Knochenmarksstammzellen (engl.: bovine mesenchymal stem cells)
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
CD	Differenzierungscluster (engl.: cluster of differentiation)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbrüche
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: epidermal growth factor)
ERK 1/2	Serin/Threonin Kinase (engl.: extracellular-signal regulated kinases)
ESC	embryonale Stammzellen (engl.: embryonic stem cells)
eV	Elektronenvolt
FBS	fetales Rinderserum (engl.: fetale bovine serum)
FG	Fettgewebe

FGF-2	Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (engl.: fibroblast growth factor 2)
GM-CSF	Granulozytenstimulierender Faktor (engl.: granulocyte colony stimulating factor)
Gy	Gray
γ H2AX	Phosphorylierte Histonvariante
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor (engl.: hepatocyte growth factor)
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen
hPL	Humanes Plättchenlysat (engl.: human platelet lysat)
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IFATS	International Fat Applied Technology Society
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (engl.: insulin-like growth factor)
IPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
keV	Kiloelektronenvolt
KMP	Knochenmarkspunktion
LET	Linearer Energietransfer
Lag-Phase	Verzögerungsphase
Log-Phase	Logarithmische Phase
MHC-II	Histokompatibilitätskomplex II
MKT	Mikrokerntest
MMP-2	Matrix-Metalloprotease-2
MSCs	mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
nm	Nanometer

p21	Protein 21
p53	Protein 53
pADSCs	Gepoolte adulte Fettstammzellen (engl.: pooled adipose-derived stem cells)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Thrombozyten Wachstumsfaktor (engl.: platelet derived growth factor)
PDT	Populationsverdopplungszeit
RKI	Robert-Koch-Institut
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
SSB	Einzelstrangbrüche (engl.: single strand breaks)
Sv	Sievert
SVF	Stromale vaskuläre Fraktion
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (engl.: transforming growth factor- β)
VEGF	vaskulärer epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: vascular epidermal growth factor)

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Statistische Signifikanzniveaus für den zweiseitigen Einstichproben- und Zweistichproben-T-Test 24

Tabelle 2: Populationsverdopplungszeit der pADSCs kultiviert mit FBS bzw. hPL 29

IV. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Erzeugung von FBS nach HEMEDA et al. (2014)	9
Abb. 2: Die Erzeugung von hPL nach HEMEDA et al. (2014)	10
Abb. 3 A: Beispielhaftes Bild des Linearbeschleunigers Elekta VersaHD der Klinik und Poliklinik der Universität Rostock, B: Beispielhafter Aufbau der Zellbestrahlung	18
Abb. 4: Abfolgeschema für die Durchführung des BrdU-Assays	19
Abb. 5: Abfolgeschema für die Durchführung des γ H2AX-Assay	20
Abb. 6: Abfolgeschema für die Durchführung des Mikrokerntests	23
Abb. 7: Beispielhaftes Bild von pADSCs kultiviert in hPL-haltigem Kulturmedium 5 Tage nach Einsaat	27
Abb. 8: Beispielhaftes Bild von pADSCs kultiviert in FBS-haltigem Kulturmedium 4 Tage nach Einsaat	27
Abb. 9: Wachstumsverhalten von pADSCs unter dem Einsatz von FBS bzw. hPL	28
Abb. 10: Proliferation der pADSCs gemessen als BrdU-Inkorporation nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen unter dem Einsatz von FBS bzw. hPL	30
Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Bilder der pADSCs mittels γ H2AX-Assays eine und 24 Stunden nach Bestrahlung mit 0 Gy (Kontrolle) und 2 Gy	31
Abb. 12: DNA-Doppelstrangbrüche von bestrahlten und unbestrahlten pADSCs nach einer und 24 Stunden unter dem Einsatz von FBS bzw. hPL	32
Abb. 13: MMP-2-Konzentration im Medienüberstand von pADSCs unbestrahlt und 24 Stunden nach Bestrahlung unter dem Einsatz von FBS bzw. hPL	33
Abb. 14: VEGF-Konzentration im Medienüberstand von pADSCs unbestrahlt und 24 Stunden nach Bestrahlung unter dem Einsatz von FBS bzw. hPL	34

Abb. 15: Anzahl binukleärer pADSCs nach Zugabe von Cytochalasin B vs. DMSO unter dem Einsatz von 10%igem FBS-Kulturmedium	36
Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopisches Bild binukleärer pADSCs, kultiviert mit 10%igem FBS, nach Zugabe von Cytochalasin B	37
Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer binukleären pADSCs mit Mikrokern, kultiviert mit 10%igem FBS, nach Zugabe von Cytochalasin und Bestrahlung	37
Abb. 18: Mikrokerne in unbestrahlten und bestrahlten binukleären pADSCs unter dem Einsatz von 10%igem FBS-Kulturmedium	38
Abb. 19: Inadhärenz der pADSCs bei Durchführung des Mikrokerntests mit 10%igem hPL-Kulturmedium	39

1. Einleitung

Für Frauen ist das Mammakarzinom mit einem Anteil von knapp 30 % die häufigste maligne Krebserkrankung in Deutschland (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2021). Eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an dieser Krankheit. Die Brustkrebsinzidenz in Deutschland lag 2018 bei 69.900 Neuerkrankungen in einem Jahr, wobei bei Diagnosestellung knapp 30 % der Frauen jünger als 55 Jahre alt waren (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2021). Therapeutisch soll gemäß der S3-Leitlinie primär eine brusterhaltende Operation erfolgen und anschließend eine adjuvante Strahlentherapie, um das Risiko lokaler Rezidive zu minimieren und das Gesamtüberleben zu erhöhen (LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE DER AWMF, 2018). Nicht nur die Mortalität des Mammakarzinoms soll gesenkt werden, sondern Fokus der Forschung liegt auch darin, Verständnis dafür zu erlangen, wie es möglich ist, toxische Wirkungen der Strahlentherapie, insbesondere auch auf gesunde Gewebe- und Stammzellen, zu minimieren. Dabei sind letztgenannte durch ihr großes regeneratives Potential und ihre Bedeutung für die Homöostase im Gewebe in den letzten Jahren vermehrt Gegenstand der Forschung geworden.

1.1 Stammzellen

1.1.1 Klassifizierung

Stammzellen haben aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in verschiedene Gewebetypen (POTTEN & LOEFFLER, 1990) großes Potential für die Nutzung in der regenerativen Medizin. Selbsterneuerung definiert hierbei die Fähigkeit zur symmetrischen Teilung, aus der zwei zur Mutterstammzelle identische Zellen entstehen und einen immer ausreichenden Bestand an Stammzellen im Gewebe gewährleistet. Demgegenüber gestellt geht bei der Differenzierung aus einer asymmetrischen Teilung ein Replikat der Mutterstammzelle und eine differenzierte Tochterzelle hervor, welche für die Homöostase im Gewebe von Bedeutung ist (ORFORD & SCADDEN, 2008; POTTEN & LOEFFLER, 1990). Unterschieden werden können Stammzellen neben ihrer Herkunft in embryonale (engl.: embryonic stem cells, ESCs), induzierte pluripotente (engl.: induced pluripotent stem cells, iPSCs) und adulte Stammzellen (engl.: adult stem cells, ASCs) auch anhand ihrer Entwicklungsfähigkeit in toti-, pluri-, multi-, oligo- und unipotente Stammzellen.

Im Laufe der Embryonalentwicklung nimmt die Differenzierungskapazität der Stammzellen immer weiter ab. Bei der Befruchtung der Eizelle mit dem Spermium entsteht die befruchtete Eizelle (Zygote). Sie selbst und die aus ihr entstehenden Stammzellen sind bis zum Achtzellstadium in der Lage einen kompletten Organismus zu formen. Sie sind totipotent. Nach

der dritten Zellteilung fünf Tage nach der Befruchtung und mit Ausbildung des Blastozyste geht dieses Entwicklungspotenzial verloren. Die Zellen aus der inneren Masse des Blastozysten, aus der später der Embryo entsteht, sind nunmehr pluripotent und können noch in Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm) differenzieren (OTA, 2008). Hier sind die ESCs und iPSCs einzuordnen. Die ersten embryonalen Stammzellen konnten 1981 aus einem Embryo der Maus isoliert werden (KAUFMAN & EVANS, 1981) und ebneten den Weg für die erste Isolation einer humanen embryonalen Stammzelle wenige Jahre später (THOMSON et al., 1998). Eine neuere Entdeckung sind die induzierten pluripotenten Stammzellen, die durch eine Reprogrammierung somatischer Zellen mithilfe spezieller viral eingebrachter Transkriptionsfaktoren hergestellt werden können und ähnliche Eigenschaften wie embryonale Stammzellen aufweisen (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). Im Vergleich dazu können sich ASCs, die in ausgewachsenem Gewebe zu finden sind, nur noch in Zellen eines Keimblattes differenzieren, sie sind multipotent (KOLIOS & MOODLEY, 2012). Zu den multipotenten adulten Stammzellen zählen neben den hämatopoetischen Stammzellen des blutbildenden Systems u.a. auch die mesenchymalen Stammzellen, die erstmals 1968 von FRIEDENSTEIN et. al. (1968) im Knochenmark (engl.: bovine marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) entdeckt wurden. Nimmt das Differenzierungspotential weiter ab, können die nun oligopotente adulten Stammzellen nur noch in wenige bestimmte Zelltypen innerhalb eines Gewebes reifen und bei weiterer Ausdifferenzierung noch in genau eine bestimmte Zellart, sie sind nun unipotent (OTA, 2008).

Die Pluripotenz der ESCs und ihre unbegrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung bieten Potential zur Behandlung von Krankheiten wie Parkinson (THOMSON et al., 1998), sind gleichzeitig durch ihre Gewinnung aus humanen Embryos aber ethisch stark umstritten (GREEN, 2007). Adulte Stammzellen hingegen sind in verschiedensten Geweben ansässig und bieten durch ihre ethische Unbedenklichkeit und natürliche Immunkompatibilität neue Möglichkeiten für die Nutzung von Stammzellen in der Medizin (ZUK et al., 2001).

1.1.2 Adipose-derived stem cells

Mesenchymale Stammzellen sind Progenitorzellen für mesenchymales Gewebe wie Knorpel, Sehnen, Bänder, Muskel, Knochen und Fettgewebe (PITTENGER et al., 1999) und konnten bereits aus diversen Geweben wie u.a. Blut, Periost, Haut, Skelettmuskel, Knochenmark und Fett isoliert werden (KURODA et al., 2011). Nachdem RODBELL et. al (1964) vor 57 Jahren zum ersten Mal Stammzellen aus dem weißen Fettgewebe (FG) einer Ratte isolieren konnte, gelang ZUK et al. (2001) der Nachweis von einer neuen Art von MSCs, den adipose-derived stem cells (ADSCs), in der stromalen vaskulären Fraktion (SVF) des humanen FG. Da bisher kein Marker zur eindeutigen

Identifizierung und Abgrenzung von MSCs gegenüber anderen aus dem Stroma stammenden Vorläuferzellen gefunden werden konnte, definierte die Internationale Gesellschaft für Zelluläre Therapie (ISCT) 2006 Minimalkriterien für die Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen: Sie sollen plastikadhärent sein (1), CD105, CD73, CD90 exprimieren und eine fehlende Expression von CD14, CD34, CD79alpha oder CD19, CD45 oder CD11b und HLA-DR (Humanes Leukozyten Antigen – DR) aufweisen (2) und ein *In-vitro*-Differenzierungspotential in Chondroblasten, Osteoblasten und Adipozyten haben (3), wie die Arbeitsgruppe um DOMINICI et al. (2006) beschrieb. 7 Jahre später wurden diese Kriterien von der „International Federation for Adipose Therapeutics“ (IFATS) und der ISCT für ADSCs um die positive Expression der Oberflächenmarker CD13, CD29 und CD44 und das Fehlen von CD31, CD45 und Cd235 erweitert (BOURIN et al., 2013).

Diese ADSCs weisen eine fibroblastähnliche Morphologie auf, haben ihren Ursprung in der Embryonalentwicklung im Mesoderm und ihr davon abgeleitetes Potential sich in Adipozyten, Chondrozyten, Osteozyten und Myozyten zu differenzieren, konnte in vielen Studien bestätigt werden (ZUK et al., 2001; MIZUNO, 2009).

Weitere Studien zeigen jedoch darüber hinaus auch die Differenzierung in nicht-mesodermale bzw. ektodermale Zelllinien wie neuronale Zellen (SAFFORD et al., 2002), epitheliale Zellen (BRZOSKA et al., 2005), endotheliale Zellen (PLANAT-BENARD et al., 2004) sowie Zellen endodermalen Ursprungs wie die Hepatozyten (LINDROOS et al., 2011) und Pankreaszellen (TIMPER et al., 2006). Bei der Charakterisierung der ADSCs über ein Profil der CD-Oberflächenantigene konnten die bereits oben erwähnten Marker als positiv identifiziert werden, wohingegen die Mehrzahl der hämatopoetischen Antigene wie CD14, CD31, CD45 und CD144 von den ADSCs nicht exprimiert wurden (YOSHIMURA et al., 2006; ZUK, 2013). Nur ein sehr kleiner Teil der ADSCs exprimiert die im Hinblick auf Immuntoleranz bedeutenden HLA-DR Proteine auf ihrer Oberfläche, was hinsichtlich immunsuppressiver Effekte im Rahmen der Transplantationsmedizin- und regenerativen Medizin von Interesse ist (MAZINI et al., 2019). Dieses Oberflächenprofil genau wie Morphologie und Differenzierungspotential ist mit dem der BMSCs vergleichbar (MUSINA et al., 2005). Die Expression der immunmodulierenden Marker CD200, CD273 und CD274 variiert je nach Ursprungsgewebe der MSCs (FAZZINA et al., 2016).

1.1.3 Regeneratives Potential

Es wird darüber diskutiert, über welche Mechanismen die ADSCs ihr regeneratives Potential im Gewebe vermitteln (BAJEK et al., 2016). Ein potentieller Mechanismus ist die Geweberegeneration und -reparatur über die Ausschüttung von angiogenetischen sowie immunmodulatorischen

Wachstumsfaktoren und Zytokinen aus den ADSCs, welche die Reparatur geschädigter Gewebe unterstützen und für die Homöostase im Gewebe unentbehrlich sind (GIMBLE et al., 2012). Zu nennen wären hier der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (engl.: vascular endothelial growth factor, VEGF), der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl.: fibroblast growth factor 2, FGF-2), der Hepatozyten Wachstumsfaktor (engl.: hepatocyte growth factor, HGF), Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) und der Transformierende Wachstumsfaktor- β (engl.: transforming growth factor β , TGF- β) (BANAS et al., 2008; SALGADO et al., 2010; SHUKLA et al., 2015; PADUANO et al., 2017). Im Zuge weitergehender Forschung kristallisiert sich heraus, dass innerhalb der ADSC-Population verschiedene Subpopulationen existieren, die zwar alle die oben genannten Kriterien für adulte Fettstammzellen erfüllen, deren sekretorisches Profil jedoch different sein könnte (MERRICK et al., 2019; RAAJENDIRAN et al., 2019; BROOKS et al., 2020). LU et. al. (2008) zeigte in einer Studie, dass durch lokal injizierte ADSCs über Neovaskularisation eine erhöhte Viabilität von transplantierten Hautlappen erreicht werden kann. Auch eine verbesserte Wundheilung über die von ADSCs vermittelte Sezernierung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, HGF und FGF-2 konnte in einer anderen Studie gezeigt werden (TOYSERKANI et al., 2015). Die ADSCs haben also die Fähigkeit, bei Stimulation durch Chemokine und Wachstumsfaktoren aus Arealen mit Gewebeschäden, dorthin zu migrieren und die Geweberegeneration zu fördern (BAEK et al., 2011). Zum jetzigen Zeitpunkt werden die ADSCs in unzähligen Studien unter Anderem zur Behandlung von ischämischen Krankheiten, zur Wundheilung, Geweberekonstruktion oder Knochenreparation erforscht, wobei sich viele Studien erst in Phase I/ II befinden (RIIS et al., 2015; CHU et al., 2019). Da die ADSCs im Vergleich zu den BMSCs einfach und in großen Mengen gewonnen werden können (ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002), besteht großes Interesse, ADSCs in der regenerativen Medizin sowie radiologischen Onkologie zu nutzen, weshalb ein immer größeres Augenmerk auf die Erforschung von Stammzellen gelegt wird. Die Rolle der ADSCs im Feld der Strahlentherapie wird im nächsten Kapitel erörtert.

1.2 Strahlenbiologie

Neben Chemotherapie und Chirurgie bildet die Strahlentherapie eine zentrale Therapiesäule für die Behandlung von Tumoren. Klassische Indikation in der Onkologie stellen dabei sowohl maligne (bösartige) als auch benigne (gutartige) Neoplasien dar. Ziel ist es hierbei, die weitere Vermehrung von Tumorzellen zu stoppen oder sie abzutöten, wobei das umliegende gesunde Gewebe jedoch geschont werden soll.

1.2.1 Allgemeine Strahlenbiologie

Strahlung kann als Ausbreitung von Energie verstanden werden. Hat Strahlung eine ausreichend hohe Energie ($> 10 \text{ keV}$), können die stoßenden geladenen Teilchen Elektronen aus der Hülle der Atome herauslösen und dabei Teile ihrer Energie abgeben oder über elektromagnetische Wechselwirkungen durch den Compton- und Photoeffekt teilweise oder vollständig ihre Energie an eines der Hüllenelektronen übertragen. Dieser Prozess wird Ionisation genannt. Der Quotient (J / kg) aus der hierbei auf die Masse des absorbierenden Materials (kg) transferierten Energie (Joule, J) wird als Energiedosis bezeichnet und in der Maßeinheit Gray (Gy) angegeben (WEBER & WENZ, 2006). Da trotz derselben Dosis die kanzerogene Wirkung unterschiedlicher Strahlenarten different ist und zudem die einzelnen Organe und Gewebe nicht gleichsam empfindlich auf die Strahlung reagieren, dient zur differenzierten Beurteilung des kanzerogenen Risikos nach Bestrahlung die effektive Äquivalentdosis. Diese errechnet sich aus einer Multiplikation der Energiedosis mit einem Strahlengewichtungs- und einem Gewebegewichtungsfaktor und wird in Sievert (Sv) angegeben (SAUER et al., 2010).

In der Strahlentherapie wird im Linearbeschleuniger ionisierender Strahlung in Form von energiereicher Elektronen- oder Photonenstrahlung erzeugt, die über direkte und indirekte Mechanismen Gewebe schädigen können. Während beim direkten Effekt die Energieabsorption und ihre Wirkung in demselben Biomolekül erfolgt (HALL, 1994), wechselwirkt die Strahlung beim indirekten Effekt zunächst mit Wasser in der Zelle. Die daraufhin stattfindende Wasserradiolyse produziert freie Wasserradikale, welche wiederum über Oxidation indirekt die Desoxyribonukleinsäure (DNA) schädigen (HALL, 1994). Die klinisch verwendete Elektronen- und Photonenstrahlung interagiert durch ihren niedrigen linearen Elektronentransfer (LET), also einer niedrigen Dichte an Ionisierungsprozessen im Gewebe (locker ionisierende Strahlung), und aufgrund des hohen Wassergehaltes des menschlichen Gewebes zunächst hauptsächlich mit Wassermolekülen. So werden die Biomoleküle der Zelle zu Zweidritteln über den indirekten Weg geschädigt (WEBER & WENZ, 2006; SAUER et al., 2010). Dabei führt die Anwesenheit von Sauerstoff zu einer vermehrten Produktion von Peroxid- und Wasserstoffradikalen, weshalb alle Gewebe unter Wirkung von locker ionisierender Strahlung in Euoxie um den Faktor 2 - 3 strahlensensibler sind als in Anoxie. Daraus folgend wäre im Vergleich zu einem optimal oxygenierten Tumor eine zwei- bis dreifach gesteigerte Strahlendosis nötig, um einen Tumor, der schlecht mit Sauerstoff versorgt ist, zu zerstören (SAUER et al., 2010).

1.2.2 Klinischer Hintergrund

Die Veränderungen der DNA durch ionisierende Strahlung spielen die größte Rolle für die Strahlenfolgen am Menschen. Wie bereits oben beschrieben, können diese Schäden auf direktem oder indirektem Wege zustande kommen und zu Brüchen der DNA (Einzelstrangbrüche, SSB), aber auch zu Brüchen der Wasserstoffbrücken, Vernetzungen der DNA und DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) führen, wobei durch locker ionisierende Strahlung im Verhältnis zu DSB 20:1 mehr SSB verursacht werden (MITZEL-LANDBECK, 1976). Während Einzelstrangbrüche und einfache Basenveränderungen für die schädigende Wirkung von ionisierender Strahlung an Zellen von untergeordneter Bedeutung zu sein scheinen, sind die DSB hauptanteilig für die strahleninduzierten Zellschäden verantwortlich (GOODHEAD, 1994) und ihre Anzahl korreliert mit dem Sterben der Zellen und steigt linear mit der Strahlendosis (HALL & GIACCIA, 2007).

Um diese DNA-Schäden beheben zu können, verfügt die Zelle über verschiedene Reparatursysteme. Bei Intaktheit dieser Systeme sind die Reparaturen nach sechs bis acht Stunden weitestgehend abgeschlossen (SAUER et al., 2010). Können Schäden nicht repariert werden, kommt es entweder zu Mutationen oder zum Zelltod, wobei dem klonogenem Zelltod und der Apoptose für die Strahlentherapie die meiste Bedeutung beigemessen werden kann (ROSS, 1999). Unter einem klonogenem oder auch reproduktiven Zelltod wird verstanden, dass die Zellen ihre Fähigkeit zur immer weiteren Zellteilung verloren haben und sich somit nicht mehr reproduzieren können, auch wenn sie noch physiologisch intakt sind. Die Apoptose hingegen ist ein programmierter Zelltod, der über zwei verschiedene Wege, intrinsisch oder extrinsisch, ausgelöst werden kann. Tumorzellen werden durch die Strahlentherapie in besonderem Maße geschädigt, da sie im Vergleich zu gesunden Zellen eine begrenzte DNA-Reparaturkapazität aufweisen. Die Gesamtdosis richtet sich dabei nach der Strahlensensibilität des Tumors und wird in Fraktionen aufgeteilt, da auch die Fähigkeit zur Reparatur in gesunden Zellen begrenzt ist und deshalb Zeit zur Regeneration zwischen den einzelnen Bestrahlungsdosen benötigt wird (SCHMOLL, 2020). Beim Mammakarzinom soll laut S3-Leitlinie von 2021 nach einer brusterhaltenen Operation eine adjuvante Bestrahlung entweder hypo- oder konventionell fraktioniert erfolgen. Letzteres impliziert eine Gesamtdosis von ca. 50 Gy, wobei die Einzeldosen 1,8 bis 2 Gy betragen (LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE DER AWMF, 2021). Deshalb wurde in dieser Arbeit für einen überwiegenden Teil der Versuche eine Dosis von 2 Gy zur Bestrahlung der ADSCs gewählt.

1.2.3 Strahlentherapie und ADSCs

Im Vergleich zu ESCs, die hoch strahlensensibel sind (LIU et al., 2014), konnte für die ADSCs bereits eine intermediäre Radiosensitivität nachgewiesen werden (BAABE et al., 2018). Studien konnten außerdem zeigen, dass das CD-Oberflächenantigenprofil der ADSCs und auch ihr Differenzierungspotential in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten von der ionisierenden Strahlung unbeeinflusst bleibt (MARIA et al., 2016). Strahleninduzierte DSB führen in der Zelle entweder zum Zellzyklusarrest, wobei die Zellen am Phasenübergang gehindert werden, um Zellschäden mithilfe von Reparaturmechanismen beheben zu können, oder die Apoptose wird initiiert. Das Tumorsuppressorgen p53 nimmt in beiden genannten Wegen eine zentrale Rolle ein (BAABE et al., 2018). Die Phosphorylierung von p53 durch zellulären Stress führt zur vermehrten Transkription proapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie (Noxa, Bax, Puma) und über eine Freisetzung von Cytochrom c zur Apoptose (RILEY et al., 2008). Auf der anderen Seite kann durch p53 in geschädigten Zellen auch ein Zellzyklusarrest vermittelt werden, indem die Upregulation des Proteins 21 (p21) vermittelt wird (BATES et al., 1998). Eine Studie um MARIA et al. (2016) konnte direkt nach Bestrahlung die gesteigerte Transkription diverser DNA-Reparaturgene, u.a. der Serin-Proteinkinase-ATM (engl.: Ataxia telangiectasia mutated Kinase, ATM-Kinase), die für eine Aktivierung von p53 verantwortlich ist, für ADSCs aus der Maus nachweisen. Außerdem konnte p21 als ein möglicher Modulator des Zellzyklusarrestes für ADSCs aus der Mamma identifiziert werden (BAABE et al., 2018). Wenn bei fehlerhaften oder beschädigten Reparatursystemen keine oder nur eine inadäquate Reparatur der Zellschäden möglich ist, könnte ionisierende Strahlung auf diesem Wege auf der einen Seite zu einem verminderten Stammzellüberleben und auf der anderen Seite zu Mutationen bzw. genomischen Instabilitäten im Stammzellpool führen und infolgedessen kanzerogen wirken (LIU et al., 2014). Aufgrund der bereits im ersten Unterkapitel erläuterten Bedeutung der ADSCs für Homöostase und Geweberegeneration, sollte ein weiterführendes Verständnis über die Strahlenbiologie und Auswirkungen der ionisierenden Strahlung auf ADSCs verstärkt ein Ziel der Forschung sein, um so unerwünschte Nebeneffekte der Strahlentherapie durch Schäden an den ADSCs zu minimieren. Um die genannten Effekte auf die Stammzellen außerhalb des menschlichen Körpers zu untersuchen, kann eine Zellkultur genutzt werden.

1.3 Zellkultur

Die Zellkultur ist heute ein nicht mehr wegzudenkender Bestandteil der medizinischen Forschung. Sie dient dazu, mithilfe unterschiedlichster Zelllinien wie Normal-, Tumor- oder Stammzellen

Prozesse im Körper *in vitro* bestmöglich untersuchen zu können. Dazu zählt die Wirkung von Therapien, Pathomechanismen von Krankheiten oder die Wechselwirkung zwischen Zellen. Die Zellkultur kann dabei allerdings nur als Modell dienen, was zur Folge hat, dass Ergebnisse die Realität *in vivo* zu einem gewissen Anteil verfälscht darstellen.

1.3.1 Grundlagen der Zellkultur

Der Begriff Zellkultur bezeichnet die Kultivierung einer Zellpopulation *in vitro*, also außerhalb des Organismus (GSTRAUNTHALER, 2003). Es kann hierbei unterschieden werden, ob Zellen adhärent wachsen, also auf einer Oberfläche als Monolayer, als Sphäroid, oder ob sie als Suspensionskultur vorliegen. Letzteres liegt vor, wenn die Zellpopulation aus sich *in vivo* bewegenden Zellen besteht (SCHMITZ, 2009). Weiterhin kann zwischen primär- und permanenten Zellkulturen differenziert werden (SCHMITZ, 2009). Für einen funktionierenden Zellmetabolismus und eine optimale Proliferation der Zellen *in vitro* sollten Bedingungen wie pH-Wert, Osmolarität und Temperatur denen der physiologischen Zellumgebung *in vivo* entsprechen (DAVIS, 2002), die daraus schlussfolgernd je nach Zelllinie erheblich variieren können (PRICE, 2017). Dafür ist ein Kulturmedium mit allen für die Zelle wichtigen Hormonen, Salzen, Wachstumsfaktoren und Nährstoffen u.a. eine Grundvoraussetzung (BUTLER & JENKINS, 1989) und bei adhären Zellen zusätzlich eine Adhäsionsfläche notwendig.

Als Kulturmedium steht eine große Bandbreite zur Auswahl, eine - wie auch in dieser Doktorarbeit verwendete - Variante ist ein Basalmedium, das mit Serum supplementiert wird. Die Grundlage für die heutigen Basalmedien wurde 1955 durch Harry Eagle gelegt, der mit dem BME (engl.: basal medium Eagle) ein Medium für Säugetierzellen mit 27 für die Zellen in definierter Konzentration essentiellen Faktoren identifizierte, darunter eine Vielzahl von Aminosäuren, Vitaminen, Salzen und Glucose (SCHMITZ, 2009). DMEM (engl.: Dulbeccos modified Eagles medium) ist eine Variante des BME, die im Vergleich eine vierfach höhere Konzentration an Aminosäuren und Vitaminen enthält (SCHMITZ, 2009). Ergänzt werden diese Basalmedien mit Serum, welches den Zellen Wachstumsfaktoren, Hormone, Binde- und Transportproteine, Komponenten der extrazellulären Matrix sowie Faktoren zur Stabilisierung des pH-Wertes zur Verfügung stellt (GSTRAUNTHALER, 2003).

1.3.2 Fetales Rinderserum

Das Fetale Rinderserum (engl.: fetale bovine serum, FBS) gilt bisher als Goldstandard für die Isolierung und Kultivierung von Zellen *in vitro* und wird meistens in Konzentrationen von 5-10 %

dem Basalmedium zugefügt wird. Das FBS wird von ungeborenen Rinderfeten gewonnen, die bei Schlachtung der schwangeren Kuh aus dem Mutterleib entfernt, anschließend desinfiziert und herzpunktiert werden. Das steril gewonnene Blut gerinnt in einem Behältnis und wird daraufhin zentrifugiert, sodass man nur noch das Serum ohne Zellen, Plättchen oder Fibrin erhält. Abschließend wird dieses Serum durch eine 0,1µm Membran filtriert, um Zellreste zu entfernen (HEMEDA et al., 2014). Die Herstellung des FBS wird in Abbildung 1 gezeigt.

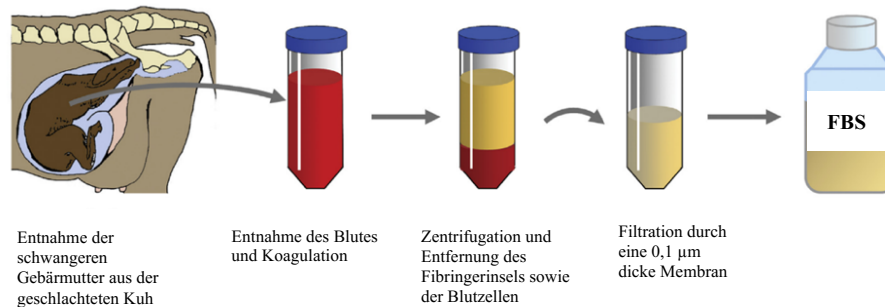


Abb. 1: Die Erzeugung von FBS nach HEMEDA et. al. (2014); FBS: Fetales Rinderserum.

Durch den niedrigen Gehalt an Gammaglobulinen, was eine durch Antikörper (AK) vermittelte Wachstumshemmung vermeidet, die Nutzung für eine große Zahl verschiedener Zelltypen und die Unterstützung zur Differenzierung in unterschiedliche Zelllinien, hat sich FBS in der Zellkultur als Mediumzusatz etabliert (HEMEDA et al., 2014). Doch im Hinblick auf ethische Aspekte, Sicherheit und Qualität ist FBS in den letzten Jahren immer mehr in die Kritik geraten (VAN DER VALK et al., 2010). Pro Jahr werden weltweit knapp 500.000 Liter FBS verbraucht (HODGSON, 1995). Gewonnen wird dieses Serum von mehr als einer Million ungeborener Rinderfeten (JOCHEMS et al., 2002). Bei der Schlachtung der Kühe wird den schwangeren Kühen der Uterus mit dem Rinderfetus entnommen und über eine sterile Punktion des Herzens vom Fetus Blut gewonnen. Es wird davon ausgegangen, dass die Feten durch verschiedene Aspekte, insbesondere einer erhöhten Resistenz gegenüber Anoxie, die mit einer Durchtrennung der Nabelschnur einhergeht, während des Prozederes Schmerzen empfinden (JOCHEMS et al., 2002). Problematisch sind weiterhin die enormen Charge-zu-Charge Variabilitäten (HORN et al., 2010). Darüber hinaus ist neben potentiellen Kontaminationen des FBS mit Viren, Bakterien oder Pilzen (ANGULO et al., 2000), auch die mögliche Gefahr einer Übertragung tierischer Krankheiten wie der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) auf den Menschen kritisch zu sehen (DORMONT, 1999). Mehrere Studien haben außerdem gezeigt, dass bei Patienten, denen therapeutisch in FBS-kultivierte Zellen (Lymphozyten, MSCs) transplantiert wurden, Immun- und anaphylaktische Reaktionen aufgetreten sind (SELVAGGI et al., 1997; SPEES et al., 2004) und Antikörper gegen FBS-

Komponenten gefunden wurden (HORWITZ et al., 2002). Des Weiteren sind nach wie vor nicht alle Komponenten des bovinen Serumersatzes definiert worden (HEMEDA et al., 2014).

Aufgrund der oben genannten Aspekte ist zum einen die Etablierung einer humanen und ethisch unbedenklicheren Serumalternative in der Zellkultur insbesondere mit Hinblick auf Stammzelltherapie und tissue engineering von Bedeutung, wie es auch in internationalen Richtlinien gefordert wird (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2008). Zum anderen entspricht FBS als tierisches Produkt nicht dem Milieu humaner Zellen und ist insbesondere nicht optimal für die Kultivierung humaner Primärzellen, weshalb ein alternativer Serumersatz für die Kultur der ADSCs unumgänglich ist.

1.3.3 Humanes Plättchenlysat

Eine mögliche Alternative zu FBS stellt neben serumfreien Alternativen das humane Plättchenlysat (hPL) dar, welches die Proliferation von Fibroblasten, Keratinozyten, etablierten Zelllinien und MSCs unterstützt (HARA et al., 1980; UMENO et al., 1989; DOUCET et al., 2005; HORN et al., 2010; LOHMANN et al., 2012; HOFBAUER et al., 2014; BAIK et al., 2014). HPL kann aus blutbankzertifizierten, abgelaufenen Thrombozytenaggregaten gewonnen werden (HEMEDA et al., 2014). Durch wiederholte Gefrier- und Auftauschritte der Thrombozytenaggregate werden die Thrombozyten aufgebrochen (SCHALLMOSER & STRUNK, 2013) und besonders durch Degranulation der Alpha-Granula (BLAIR & FLAUMENHAFT, 2009) Chemokine und Wachstumsfaktoren wie der Thrombozytenwachstumsfaktor (engl.: platelet-derived growth factor, PDGF), Fibronectin, der insulinähnliche Wachstumsfaktor (engl.: Insulin-like growth factor, IGF), TGF- β , der epidermale Wachstumsfaktor (engl.: Epidermal growth factor, EGF), FGF und Fibrinogen als wichtige Faktoren für Wachstum, Homöostase und Gewebereparatur freigesetzt (LEDENT et al., 1995; SANCHEZ et al., 2003; MIRABET et al., 2008; BURNOUF et al., 2016). Bei der Herstellung folgt abschließend eine Zentrifugation und Filtration (HEMEDA et al., 2014). Die Herstellung des hPLs wird in Abbildung 2 gezeigt.

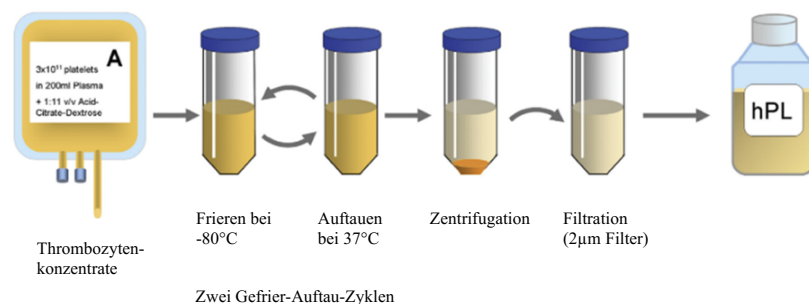


Abb. 2: Die Erzeugung von hPL nach HEMEDA et al. (2014); hPL: humanes Plättchenlysat.

Die Verwendung von hPL anstelle von FBS als Mediumzusatz bringt somit den Vorteil einer ressourcenschonenden Nutzung eines Abfallproduktes mit sich. Ein weiterer positiver Aspekt des hPLs als Serumersatz ist, dass durch das Poolen von bis zu 50 Chargen ein Reservoir geschaffen werden kann und mithilfe dessen Charge-zu-Charge Variabilitäten auf ein Minimum reduziert werden, was eine Nutzung in der regenerativen Medizin sicherer macht und in der *in vitro* Zellkultur schlussfolgernd zu reproduzierbareren Ergebnissen führen sollte (SCHALLMOSER & STRUNK, 2009). Naheliegende Vorteile eines humanen Serums sind zudem, dass es zu keiner Immunreaktion gegen tierische Eiweiße oder Übertragung tierischer Krankheiten kommen kann (JOHANSSON et al., 2003). Da hPL aus Material gewonnen wird, das dem Blut des Menschen entspringt, muss die hämatogene Übertragung von humanen Krankheiten wie HIV oder Hepatitis B/ C ausgeschlossen werden, was jedoch durch bereits etabliertes Screening der potentiellen Blutspender, Testung von Spenderblut in spezialisierten Blutspendezentren und standardisierter Prozessierung des Blutes auf ein absolutes Minimum reduziert werden kann (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011; BURNOUF et al., 2016). Trotz allem besteht auch ein gewisses Kontaminationsrisiko des hPLs mit nicht routinemäßig getesteten Bakterien und insbesondere Viren. Dieses kann jedoch durch Protokolle zur Inaktivierung der Pathogene, meist mithilfe photochemischer Behandlung, enorm verringert werden (STÄHLE et al., 2010; SHIH et al., 2011). Eine Studie von KIM et. al (2016) konnte zeigen, dass die oben beschriebenen Wachstumsfaktoren in hPL die Vaskularisierung und das Überleben von Endothelzellen *in vivo* fördern können. Im Hinblick auf die Stammzellforschung konnten mehrere Studien zwar auch nachweisen, dass die Addition von Wachstumsfaktoren wie FGF und PDGF zu FBS die Proliferation von MSCs enorm steigern konnte (MARTIN et al., 1997; LENNON et al., 2018). Da jedoch eine humane Alternative von Bedeutung ist, stellt hPL mit seinem Reichtum an Wachstumsfaktoren, wie oben beschrieben, eine attraktive Möglichkeit für die *in vitro* Kultivierung von MSCs dar.

1.3.4 hPL als Alternative für die Kultivierung von ADSCs

Die Kultivierung von BMSCs in hPL wurde erstmals 2005 von DOUCET et al. beschrieben (DOUCET et al., 2005). Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Verwendung von hPL als Mediumzusatz eine verbesserte Kultivierbarkeit von mesenchymalen Stammzellen bietet (NAAIKENS et al., 2012; JONSDOTTIR-BUCH et al., 2013; RAUCH et al., 2014). Neben dem Erhalt ihrer ursprünglichen spindelförmigen Form, kann die Proliferationsrate von MSCs enorm gesteigert werden und die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierungskapazität sowie immunsuppressive Eigenschaften der Stammzellen bleiben erhalten (BARTHOLOMEW et al., 2002; DOUCET et al., 2005; AZOUNA et al., 2012). Für ein leichteres Verständnis werden im

Folgendes die Begriffe (p)ADSCs-hPL und (p)ADSCs-FBS verwendet, je nachdem mit welchem Mediumzusatz die Zellen kultiviert worden sind. Für die ADSCs konnte eine Verkürzung der Populationsverdopplungszeit (engl.: population doubling time, PDT) bei Kultivierung in hPL im Vergleich zu FBS nachgewiesen werden (KAKUDO et al., 2008). Es wird vermutet, dass dieser proliferationssteigernde Effekt von hPL über verschiedene Signalwege, ERK1/2 (engl.: Extracellular-signal regulated kinases 1/2), AKT (Protein Kinase B) und JNK (c-Jun-N-terminale Kinasen) eingeschlossen, vermittelt wird (LAI et al., 2018; KAKUDO et al., 2019). Bei Kultivierung mit hPL konnte im Vergleich zu FBS eine Verkürzung der Telomere und die damit verbundene Seneszenz später beobachtet (SHAHDAFAR et al., 2005) und keine chromosomalen Aberrationen in den ADSCs-hPL gefunden werden (CRESPO-DIAZ et al., 2011; TROJAHN KØLLE et al., 2013). Studien konnten weiterhin zeigen, dass die ADSCs-hPL eine kleinere, homogenere spindelförmige Morphologie und höhere Viabilität verglichen mit ADSCs-FBS aufweisen (DESSELS et al., 2016; RIIS et al., 2016; LENSCH et al., 2018). Des Weiteren wird das Profil der CD-Oberflächenmarker auf den ADSCs sowie ihre Differenzierungskapazität durch hPL nicht verändert (WITZENEDER et al., 2013; KAKUDO et al., 2019). Auch ihre immunmodulierenden Eigenschaften bleiben erhalten (BIEBACK et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit ist außerdem die Nutzung von autologen anstelle von allogenen hPL, sodass das Risiko von Immunreaktionen gegen allogene Bestandteile des hPLs weiter reduziert werden kann (HORN et al., 2010).

Das hPL aus humanem Thrombozytenaggregat entspricht im Vergleich zum xenogenem FBS eher den physiologischen Bedingungen und bietet eine verbesserte Kultivierbarkeit der ADSCs, wodurch die Untersuchungen der *in vitro* Kultur in hPL näher denen der Situation im menschlichen Körper *in vivo* kommen. FAZZINI et al. (2016) konnten für leukämische Zelllinien, die in hPL kultiviert wurden, bereits zeigen, dass diese sich eher wie Primärzellen verhalten. Außerdem konnte durch die Verwendung von hPL bereits eine verbesserte Kultivierung von MSCs im Hinblick auf eine erhöhte Differenzierbarkeit sowie Proliferationsrate nachgewiesen werden (NAAIKENS et al., 2012; JONSDOTTIR-BUCH et al., 2013; RAUCH et al., 2014). Da bisher ein Großteil der Studien zu ADSCs mit FBS als Serumersatz durchgeführt wurde, wird die Frage aufgeworfen, ob bisherige Erkenntnisse zur zellulären Strahlenantwort übertragbar sind. Die Verwendung von hPL als Mediumzusatz bringt somit zwei wesentliche Vorteile mit sich. Zunächst führt die Verwendung von humanen Mediumzusätzen dazu, dass eine Nutzung der ADSCs im Zuge der regenerativen Medizin und Stammzelltherapie realisierbarer als mit xenogenem Material zu sehen ist. Mit Blick auf das wachsende Feld der regenerativen Medizin und die Verwendung von Fettstammzellen im Zuge kosmetischer Brustrekonstruktionen vor einer Strahlentherapie (MIZUNO & HYAKUSOKU, 2010) ist die Beurteilung der strahlenbiologischen Reaktion der

pADSCs abhängig vom verwendetem Serumersatz von enormer Bedeutung.. Hervorzuheben ist abschließend, dass die Nutzung von humanem hPL die Möglichkeit eines verbesserten *in vivo* Modells bietet, mithilfe dessen z.B. die Strahlenbiologie bzw. Auswirkung von ionisierender Strahlung auf die ADSCs untersucht und evtl. Rückschlüsse auf die Therapie von Brustkrebs gezogen werden können, worauf in dieser Arbeit besonders der Fokus gelegt werden soll.

1.4. Zielstellung

Die Strahlentherapie stellt eine zentrale Säule in der Behandlung des Mammakarzinoms dar. Hierbei sind die effiziente Abtötung des Tumorgewebes und gleichzeitig die Vermeidung von Spätfolgen von elementarer Bedeutung. Zur Minimierung des onkogenen Potentials nach Bestrahlung liegt dabei ein besonderes Augenmerk auf der Schonung des gesunden Gewebes und eines möglichen Eigenfetttransplantats zur Rekonstruktion nach Mastektomie. Die Stammzellen des Fettgewebes der Mamma spielen dabei eine bedeutende Rolle für die Homöostase im Gewebe und haben großes regeneratives Potential. Aufgrund dessen ist es ein Ziel der medizinischen Forschung, die Reaktionen der adulten Fettstammzellen (engl.: adipose derived stem cells, ADSCs) auf die Bestrahlungsbehandlung zu verstehen und Strahlungsschäden derselben zu reduzieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte daher sein, mithilfe verschiedener *In-vitro*-Experimente die strahlenbiologischen Eigenschaften von gepoolten adulten Fettstammzellen (engl.: pooled adipose derived stem cells, pADSCs) zu untersuchen. Dabei sollte die Verwendung von humanem Plättchenlysat (engl.: human platelet lysat, hPL) als alternativer Mediumzusatz anstelle von fetalem Rinderserum (engl.: fetal bovine serum, FBS), welches bisher als Standard für die Kultivierung von pADSCs gilt, untersucht werden. Um die Unterschiede zwischen den beiden Mediumzusätzen genauer zu charakterisieren, waren alle Versuche jeweils mit hPL und FBS in gleicher Dosierung geplant. Die *In-vitro*-Untersuchungen sollten zunächst Morphologie und Wachstum der pADSCs beleuchten. Weiterhin war geplant, wichtige Aspekte wie das Proliferationsverhalten und die Zytokinausschüttung von MMP2 und VEGF nach Bestrahlungsbehandlung zu betrachten. Abschließend war vorgesehen, zu untersuchen, welchen Einfluss ionisierende Strahlung auf die pADSCs im Hinblick auf zyto- und genotoxische Schäden hat.

Die gewonnenen Daten der *In-vitro*-Experimente sollten in ihrer Gesamtheit einer Beurteilung dienen, ob im Hinblick auf die zelluläre Strahlenantwort Unterschiede zwischen den Mediumzusätzen detektierbar und bisherige strahlenbiologische Erkenntnisse unter Verwendung von FBS somit auf hPL übertragbar sind.

2. Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Arbeitstechniken

Die Grundlage für alle Arbeitsschritte mit den Zellkulturen war eine sterile Arbeitsweise. Der Transport der Zellen zum Bestrahlungsgerät erfolgte in vorher desinfizierten Beförderungsboxen. Die Flächen des Bestrahlungsgeräts, die in Berührung mit den Zellkulturflaschen, Wellplatten und 4-Kammer-Objektträger kamen, wurden zuvor desinfiziert.

2.1.1 Adipose-derived stem cells

Die ADSCs werden aus dem Primärgewebe von Brustreduktionen gewonnen. Sie wurden für diese Arbeit im strahlenbiologischen Labor der Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock in mehreren Arbeitsschritten aus dem Fettgewebe der Mamma isoliert (BAABE et al., 2018). Dieses Vorgehen wurde von der Ethikkommission der Universität Rostock genehmigt (Registriernummer A2017-0049). Für alle Versuche wurden die ADSCs in den Passagen drei bis fünf verwendet.

2.1.2 Ausfrieren der Zellen

Die ADSCs wurden nach Isolierung bei -152°C in einem Kryomedium aus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 90 % Zellmedium kryokonserviert. Zum Ausfrieren der Zellen wurden diese für drei Minuten zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend unter der Sterilbank in eine mit 10 ml Zellmedium vorbereitete und erwärmte (37°C) 75 cm^2 (T75)-Zellkulturflasche pipettiert. Anschließend folgte nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 ein Mediumwechsel.

2.1.3 Mediumzusätze (FBS und hPL)

Für die Versuche dieser Arbeit wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12) mit 1% Penicillin-Streptomycin (PS) verwendet. Diesem Medium wurde entweder 10 % fetales Rinderserum (engl.: fetale bovine serum, FBS) bzw. 10 % humanes Plättchenlysate (engl.: human platelet lysate, hPL) zugesetzt. Das hPL-haltige Zellmedium enthielt zudem 0,04 % Heparin, um eine Koagulation zu unterbinden.

2.1.4 Zellkultivierung

Für die Kultivierung bzw. Subkultivierung wurden die Flüssigkeiten vor Verwendung stets bei 37°C im Wasserbad erwärmt und für diese Versuche ausschließlich unter der Sterilbank verwendet. Die ADSCs wurden in 25 cm² (T25)-Zellkulturflaschen mit einer Zelldichte von 1,25 x 10⁵ oder in T75-Zellkulturflaschen mit einer Zelldichte von 5 x 10⁵ eingesät und in einem Zellmedium aus 10 % FBS bzw. 10 % hPL, 89 % DMEM/ F12 und 1 % PS kultiviert. Dem Medium mit hPL wurde wie oben beschrieben Heparin zugesetzt. Für die T25-Flaschen wurden Volumina von 5 ml, für die T75-Flaschen von 10 ml Zellmedium gewählt.

Sobald die Stammzellen zu 70 – 80 % konfluent gewachsen waren, fand eine Subkultivierung der ADSCs statt, um eine Kontaktinhibition der Zellen untereinander zu vermeiden. Für dieses Passagieren wurde als erster Schritt das Kulturmedium abpipettiert und der Zellrasen abhängig von der Flaschengröße mit 3 ml (T25-Zellkulturflasche) beziehungsweise 5 ml (T75) Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline, PBS) gespült, um tote und destruierte Zellen zu entfernen. Nach sorgfältigem Entfernen des PBS konnte nun die Verdauungsprotease Trypsin verwendet werden, um Zell-Zell-Kontakte untereinander und Zell-Matrix-Kontakte zwischen Zellen und Flaschenboden zu lösen. Hierzu wurden 1,5 ml (T25-Zellkulturflasche) beziehungsweise 3 ml (T75-Zellkulturflasche) 0,25%iges Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in die Zellkulturflaschen pipettiert und diese im Brutschrank für 3 Minuten bis 15 Minuten inkubiert, bis sich alle Zellen gelöst hatten und als Einzelzellen vorlagen. Das Ablösen aller Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und bei Vorliegen noch adhärenter Zellen die Inkubationszeit verlängert. Zur Deaktivierung des Trypsins wurden 4 ml (T25-Zellkulturflaschen) bzw. 7 ml (T75-Zellkulturflaschen) Zellmedium zu den Zellen gegeben und für die Zentrifugation in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Nach dem fünfminütigen Zentrifugieren bei 250 x g wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt, um 5 x 10⁵ (75 cm²) bzw. 1,25 x 10⁵ (25 cm²) ADSCs in die Zellkulturflaschen einsähen zu können.

2.1.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte anfangs mit dem Zellzählgerät Coulter-Counter Z2, welcher im Verlauf durch den CASY Cell Counter & Analyzer ersetzt wurde, sodass hier die Methode für Letztgenanntes beschrieben wird. Messprinzip ist eine Partikelmesstechnik, die im Weiteren kurz erläutert wird. Über eine Präzisionsmesspore im Kapillarkörper wird die Zellsuspension in die elektrolytgefüllte Messkapillare gezogen, wobei die elektrolytgefüllte Messpore einen elektrischen Widerstand darstellt. Beim Durchgang der Zellen durch die Pore wird Elektrolyt

verdrängt und so je Zählereignis ein elektrischer Impuls detektiert. Dabei entspricht das Zellvolumen der Größe jedes Impulses.

Für die Zellzahlbestimmung wurde ein Coultergefäß mit 10 ml CASYton vorbereitet und anschließend jeweils 50 µl der Probe hinzugegeben, wobei ein dreimaliges Schwenken des Coultergefäßes vor der Messung eine gleichmäßige Zellsuspension gewährt. Das Gerät hat dreimal die Zellzahl der Probe pro ml gemessen und daraus einen Mittelwert gebildet.

2.1.6 Poolen der Zellen

Um interindividuelle Schwankungen der Ergebnisse aufgrund von Unterschieden zwischen den Stammzellen verschiedener Spenderinnen zu vermeiden, wurden für die Experimente die Zellen aus 10 unterschiedlichen Spenderfettgeweben gepoolt. Hierzu wurden die ADSCs jeweils wie oben beschrieben ausgefroren (s. Kap. 2.1.2), ein Medienwechsel nach 24 Stunden durchgeführt und bis zu einer Konfluenz von 80 % im Brutschrank inkubiert. Als nächster Schritt wurden die Zellen gesplittet, jeweils die Zellzahlen bestimmt und von jeder Spenderin die gleiche Zellzahl zusammen in ein Falconröhrchen pipettiert, ab hier dann als **pADSCs** (engl.: pooled adipose derived stem cells) bezeichnet. Nach erneuter Zentrifugation bei 250 x g, Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren mit einem Kryomedium (Kulturmedium mit 10 % DMSO), wurden jeweils 5×10^5 Zellen in 1,5 ml Medium in Kryogefäße überführt und für 24 Stunden bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in die 152°C Gefriertruhe umgelagert, wo sie bis zur erneuten Verwendung lagerten. Die so eingefrorenen ADSCs befanden sich somit in Passage zwei.

2.1.7 Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger

Für die Bestrahlung der Zellen für die Versuche dieser Doktorarbeit wurde der Linearbeschleuniger Elekta Versa HD an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock eingesetzt (Abb. 3). Erzeugte Elektronen werden hierbei durch eine Wechselspannung in einem Rohr auf nahezu Lichtgeschwindigkeit beschleunigt, in Röntgen-Bremsstrahlung umgewandelt und treffen durch einen 160-Multi-Leaf Kollimator millimetergenau auf das gewünschte Ziel. Durch diese Mehrfeldertechnik konnten die pADSCs optimal bestrahlt werden.

Die Zellkulturflaschen, Vierkammerobjektträger oder Wellplatten wurden auf dem HexaPOD™ Bestrahlungstisch auf einer 8 mm dicke Plexiglasplatte positioniert und von unten bestrahlt. Der Abstand zwischen Bestrahlungstisch und Linearbeschleuniger betrug 1 m. Die Kennwerte des

verwendeten Beschleunigers waren dabei eine Dosisleistung von 6.6 ± 0.6 Gy/min und eine nominelle Photonenenergie von 6 MV.

Für den BrdU-Assay wurden die Zellen mit 0,5 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy, für den Mikrokerntest, den MMP2/ VEGF- und den γ H2AX-Assay mit 2 Gy bestrahlt. Als Kontrolle dienten für alle Versuche unbestrahlte Zellen (0 Gy), die jedoch mit in den Bestrahlungsraum genommen wurden, um gleich Verhältnisse für alle Zellen zu schaffen.



Abb. 3: A) Der Linearbeschleuniger Elekta VersaHD der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock, mit welchem die Bestrahlungen durchgeführt wurden; B) Beispielhafter Aufbau der Bestrahlung einer 96-Wellplatte.

2.2 Experimentelle Methoden

2.2.1 Wachstumskurve

Als erster Versuch dieser Doktorarbeit wurden Wachstumskurven erstellt, mithilfe derer die Populationsverdopplungszeiten der pADSCs-hPL und -FBS bestimmt werden konnten. Hierzu wurden Zellen im entsprechenden Medium (hPL bzw. FBS) kultiviert, passagiert, jeweils 1×10^4 pADSCs in 1 ml Medium pro Well eingesät und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Der Tag des Einsäens wurde als „t = 0 h“ gesetzt. Alle 24 Stunden wurde die Zellzahl von drei Wells mit dem Cell-Coulter-Counter bzw. dem CASY-Cell-Counter bestimmt (s. Kap. 2.1.5) und daraus folgend die mittlere Zellzahl ermittelt.

2.2.2 BrdU-Assay

Dieser Versuch ist ein kolorimetrischer Immunoassay, mithilfe dessen die Proliferation von Zellen quantifiziert werden kann. Er diente in dieser Arbeit dazu, die Veränderungen des Zellproliferationsverhaltens infolge von Bestrahlung detektieren zu können. Der BrdU-Assay basiert auf der Interkalierung des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle der Nukleinbase Thymin in die DNA während der S-Phase des Zellzyklus. Für den Versuch wurden, wie bereits beschrieben, Zellen im entsprechenden Medium (hPL bzw. FBS) kultiviert. Um eine Beeinflussung der Proliferation durch Kontaktinhibition zu vermeiden und trotz dessen die maximal mögliche Anzahl an Zellen zu verwenden, wurde ein Vorversuch durchgeführt, mithilfe dessen verschiedene Zellzahlen betrachtet und die für den Versuch zu verwendende Zellzahl pro Well ermittelt werden konnte.

Aus dem Vorversuch ergab sich sowohl für die pADCSs in hPL als auch die in FBS eine Einsaatdichte von 2×10^3 Zellen in 200 μ l Medium pro Well in eine 96er Wellplatte. Die BrdU-Inkorporationswerte der pADSCs wurden jeweils in 7-fach-Bestimmung, die Kontrollen ohne BrdU-Antikörper sowie die Leerwerte von hPL- und FBS-Medium in 2-fach-Bestimmung ermittelt. Die zeitliche Abfolge der Arbeitsschritte sah wie folgt aus (Abb. 4).

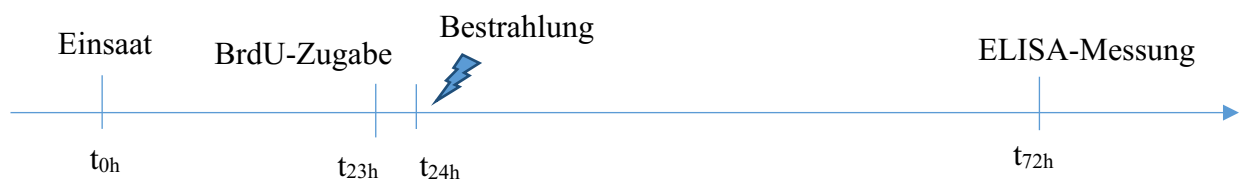


Abb. 4: Abfolgema für die Durchführung des BrdU-Assays; t: Zeitpunkt; BrdU: 5-Brom-2-desoxyuridin.

In den Zeiten zwischen den Arbeitsschritten wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Weiterführend wurde der kolorimetrische Immunoassay nach Anleitung des Zellproliferationskits (Cell Proliferations ELISA, BrdU) umgesetzt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Fixierung der Zellen für 30 Minuten wurde der Anti-BrdU-Antikörper hinzugefügt und für 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Antikörper-Konjugat durch Ausschütten und Waschen entfernt und die Substratlösung zugefügt. Eine ideale Inkubationszeit nach Substratzugabe ergab sich aus dem Vorversuch durch einen deutlichen Farbumschlag nach 15 Minuten und wurde für alle weiteren Versuchswiederholungen beibehalten. Durch Zugabe von 25 μ l 1 M Schwefelsäure konnte die Reaktion gestoppt und nachfolgend die Messung innerhalb von 5 Minuten mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm durchgeführt werden. Die Absorptionen stehen in

direkter Korrelation zur Anzahl abgelaufener DNA-Synthesen in den Zellen.

Insgesamt wurde der Versuch fünfmal unabhängig voneinander durchgeführt und alle Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardabweichung (MW \pm SD) präsentiert. Es erfolgte eine Normierung aller Ergebnisse auf die Proliferation des Kontrollansatzes der unbestrahlten pADSCs, welche eine 100 % BrdU-Aufnahme repräsentierte.

2.2.3 γ H2AX-Assay

Mithilfe des γ H2AX-Assay können DNA-Doppelstrangbrüche detektiert werden, welche als Indikator für strahleninduzierte DNA-Schäden genutzt werden können. Das Histon H2AX wird im Falle eines DNA-Doppelstrangbruches innerhalb eines Zeitraums von wenigen Minuten durch eine Proteinkinase am Serin auf Position 139 phosphoryliert. Das Produkt dieser Phosphorylierung ist das γ H2AX. Nach einer Immunfluoreszenzfärbung wurden die DNA-Schäden als einzelne Foci in den Zellen mittels Mikroskop sichtbar.

Für diesen Versuch wurde eine Kultivierung der Zellen mit 10%igem-hPL und 10%igem-FBS vorgenommen und jeweils 3×10^4 pADSCs in 1 ml Medium pro Kammer in einen 4-Kammer-Objektträger eingesät und für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die weitere zeitliche Abfolge wird im Folgenden dargestellt (Abb. 5).

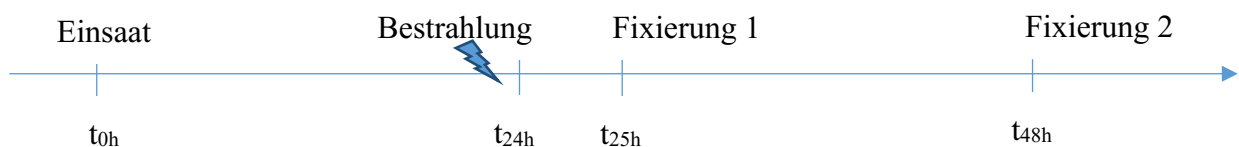


Abb. 5: Abfolgeschema für die Durchführung des γ H2AX-Assays. t: Zeitpunkt.

24 Stunden nach Einsaat wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt. Um die Reparaturmechanismen der pADSCs, die innerhalb von 24 Stunden abgeschlossen sind, analysieren zu können, wurde im ersten Ansatz zum Zeitpunkt t_{25h} , eine Stunde nach Bestrahlung, und im zweiten Ansatz zum Zeitpunkt t_{48h} , 24 Stunden nach Bestrahlung, fixiert. Eine Stunde nach Bestrahlung (t_{25h}) wurden somit die strahlungsinduzierten, 23 Stunden später (t_{48h}) die residualen DNA-DSB nach abgelaufener Reparatur ermittelt.

Im ersten Schritt wurde das Medium verworfen und mithilfe eines Schiebers die Kammern von den Objektträgern gelöst. Nach der 15-minütigen Fixierung mit 2%iger Formaldehydlösung unter dem Abzug und anschließendem Waschen mit 1 x PBS, wurden die pADSCs mit 0,25 % Triton

X-100 für 15 Minuten permeabilisiert. Der nächste Arbeitsschritt bestand aus der einstündigen Blockierung mit 0,1 % Tween, 20,2 % Goat-Serum und 1 % Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin, BSA). Anschließend wurden die Zellen für 60 Minuten mit dem anti- γ H2AX-Primärantikörper in einer feuchten Kammer inkubiert und abermals mit 1 x PBS gewaschen.

Das weitere Arbeiten erfolgte im Dunkeln. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation mit Alexa-Fluor 594 Goat Anti-Mouse IgG als Sekundärantikörper für weitere 60 Minuten in einer feuchten Kammer. Es wurde anschließend eine weitere Waschung mit 1 x PBS durchgeführt. Eingedeckt wurden die Objektträger mit einem Tropfen Vectashield pro Kammer, welches den Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthält. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas blasenfrei abgedeckt, mit Nagellack versiegelt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert, bevor sie innerhalb von 4-5 Tagen ausgezählt wurden.

Bei einer 1.000-fachen Vergrößerung konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop mit monochromatischem Licht die fluoreszierenden Sekundärantikörper und somit die γ H2AX-Foci sichtbar gemacht werden. Die durch die γ H2AX definierten DNA-Doppelstrangbrüche stellen sich unter dem Mikroskop als „Foci“ dar, wobei in jeweils 2 Kammern die Zahl der Foci in 50 Zellen ausgezählt wurden.

Die Anzahl der Foci ist direkt proportional zur Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche. Der Versuch wurde zweimal wiederholt, die Werte gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

2.2.4 MMP2- und YEGF-Assay

Die Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) und der Endothelwachstumsfaktor (VEGF) nehmen mitunter Einfluss auf Wundheilungsprozesse, die Angiogenese und den Gewebeumbau, weshalb ihnen hinsichtlich des regenerativen Potentials der ADSCs neben anderen sekretorischen Proteinen eine bedeutende Rolle zugeschrieben werden kann. Der MMP-2- und VEGF-Immunoassay diente der Konzentrationsmessung der beiden Zytokine im Medienüberstand der pADSCs. Grundlage ist eine Sandwich-ELISA-Technik.

Wie für die vorher beschriebenen Versuche wurden die pADSCs in Medium kultiviert, welchem 10 % hPL bzw. 10 % FBS zugesetzt wurde und passagiert. Es wurden in eine 24-Wellplatte jeweils 20.000 Zellen in 1 ml Medium pro Well eingesät und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt. 72 Stunden nach der Einsaat wurde in mehreren Arbeitsschritten der Medienüberstand der pADSCs eingefroren. Zunächst wurden die Medienüberstände aus den Wells in vorher beschriftete 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und jeweils sofort auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie bei 1 °C

und 15.000 x g für 5 Minuten zentrifugiert und jeweils 800µl Überstand in neue Eppendorfgefäße pipettiert und wieder sofort auf Eis gelegt. Als letzter Schritt wurde ein Gefäß mit Flüssigstickstoff vorbereitet, die Eppendorfgefäße mit dem Medienüberstand in diesem schockgefroren und nach 5 Minuten einzeln in eine Box überführt, sodass sie bei -80 °C eingefroren werden konnten. Genauso wurde bei den folgenden zwei Versuchswiederholungen verfahren. Anschließend wurde mit allen Proben der ELISA durchgeführt. Die MMP-2- und VEGF-Konzentrationen der einzelnen Versuchsansätze wurden dabei als 6-fach Messung auf der ELISA-Platte bestimmt und anschließend die erhaltenen Messergebnisse pro Ansatz gemittelt.

Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Als erster Arbeitsschritt wurde eine Verdünnungsserie des jeweiligen hergestellt. Es wurden 50 µl Verdünnungsmittel in jedes Well pipettiert, danach jeweils 50 µl des Standards, des Mediums oder der Probe pro Well hinzugefügt und abgedeckt mit einer Plastikfolie für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 500 x g inkubiert. Anschließend erfolgte eine viermalige Waschung der ELISA-Platte, eine Zugabe von 200 µl Total-MMP-2-Konjugat pro Well und abermals die Inkubation bei Abdeckung für 120 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Waschschrte wurden, wie oben beschrieben, wiederholt, 200 µl Substratlösung in jedes Well pipettiert und unter Ausschluss von Licht für 30 Minuten inkubiert, bevor 50 µl Stopplösung hinzugegeben wurden. Ein deutlicher Farbumschlag von blau zu gelb konnte beobachtet werden. Als letzter Schritt wurden die ELISA-Platte bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm im ELISA-reader gemessen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden ermittelt und das Hintergrundrauschen, als Messwerte der Blanks, abgezogen. Mittels einer Standardkurve konnten die gemessenen Absorptionen der Überstände in den Konzentrationsgehalt der Zytokine in pg/ml (VEGF) und ng/ml (MMP-2) umgerechnet werden.

2.2.5 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest (MKT) kann zur Messung chromosomaler DNA-Schäden herangezogen werden. Durch Zugabe von Cytochalasin B wird selektiv nur die Zellteilung, nicht die Kernteilung, blockiert, sodass in diesen Zellen nur eine Endomitose ablaufen kann. Das Resultat sind Zellen mit 2 Kernen, im Weiteren binukleäre Zellen genannt. Die Detektion von chromosomalen DNA-Schäden erfolgt hier über die Anzahl der Mikrokerne, intrazelluläre Strukturen mit eigener Membran, welche während der Zellteilung durch Ausschluss von Chromosomen oder Chromatinfragmenten aus dem Zellkern entstehen. Ihr Durchmesser ist kleiner (maximal ein Drittel) als der des Hauptkernes und ihre Farbtintensität vergleichbar oder heller. Die Mikrokerne

liegen als runde, ovale Form ohne Verbindung zum Zellkern im Zytoplasma vor (FENECH, 2000). Die Anzahl der Mikrokerne ist abhängig von der Art, sowie der Intensität der chromosomalen Schädigung, wobei sich mit zunehmender Schädigung auch die Anzahl der Mikrokerne vergrößert. Auch für diesen Versuch wurde eine Kultivierung und Passagierung der Zellen in 10 % FBS bzw. 10% hPL als Mediumzusatz vorgenommen. Vor Einsaat wurde in jedes Well ein Deckgläschen gelegt und für 20 Minuten bei 37°C mit 150 µl PDL beschichtet und anschließend gewaschen. Nach Ergebnissen eines Vorversuchs, welcher die Einsaatdichte, Inkubationszeit und Konzentration des Cytochalasin-B ergeben hat, wurden 2×10^4 Zellen in 1 ml Medium pro Well eingesät und für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die weitere zeitliche Abfolge, wie in Abbildung 6 dargestellt, sah wie folgt aus.

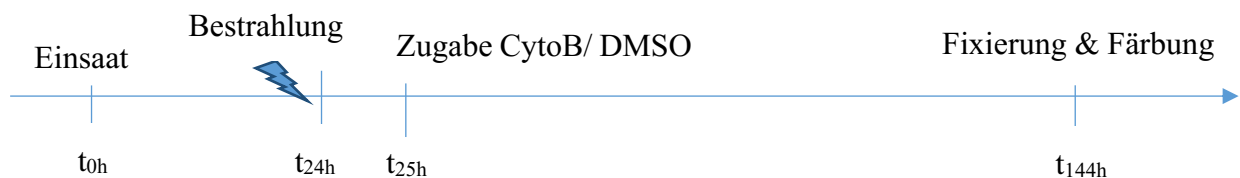


Abb. 6: Abfolgeschema für die Durchführung des Mikrokerntests; t: Zeitpunkt; CytoB: Cytochalasin B.

Der Zeitpunkt der Fixierung hatte sich aus dem Vorversuch danach ergeben, zu welchem Zeitpunkt mehr als 50 % der Zellen binukleär waren. In diesen Zellen hatte genau eine Kernteilung stattgefunden. Nach Abnahme des Mediums und zweimaliger Waschung der Zellen mit warmem PBS wurde jedes Deckgläschen für mindestens 20 Minuten in je 500 µl -20°C kaltem Ethanol im Gefrierschrank fixiert. Anschließend trockneten die Präparate 20 Minuten an der Luft. Das weitere Arbeiten erfolgte im Dunkeln. Nach der Zugabe von 500 µl Hoest-Lösung mit einer Konzentration von 1 µg/ml auf jedes Deckgläschen und 5 Minuten Inkubationszeit folgte wieder eine zweimalige Waschung mit Aqua dest.. Abschließend wurden auf einen Objektträger 2 Tropfen des Eindeckmediums gegeben und die Deckgläschen so aufgeklebt. Innerhalb von 4 Wochen wurden diese bei 1.000facher Vergrößerung unter Fluoreszenzlicht mikroskopiert. Hierbei wurde schrittweise vorgegangen. Als Erstes wurden 500 Zellen unter dem Gesichtspunkt ausgezählt, ob insgesamt > 50 % der Zellen als binukleäre Zellen vorlagen. Wenn diese Voraussetzung erfüllt war, wurde auf 3 Deckgläschen jeweils für 500 binukleäre Zellen die Anzahl der Mikrokerne bestimmt.

2.3. Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurden Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Durchläufen der *In-vitro*-Experimente ausgewertet. Als Erstes wurden die erhobenen Daten mittels Anderson-

Darling-Test auf Normalverteilung geprüft. Bei vorliegender Normalverteilung konnte für die weitere statistische Auswertung der „Students-t-Test“ verwendet werden. Die Daten für den BrdU-Assay wurden mithilfe des zweiseitigen Einstichproben-t-Tests ausgewertet. Hierbei wurden die Abweichungen von dem 100 % Kontrollwert (hier 0 Gy) berechnet und die statistische Signifikanz mit $p < 0,02$ festgelegt. Für alle anderen *In-vitro*-Experimente der vorliegenden Arbeit wurde der zweiseitige Zweistichproben-t-Test und eine statistische Signifikanz von $p < 0,05$ angewendet. Eine Zusammenfassung der statistischen Signifikanzniveaus sind zur Veranschaulichung im Folgenden tabellarisch dargestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Statistisches Signifikanzniveau für die zweiseitigen Einstichproben- und Zweistichproben-t-Tests.

Signifikanzniveau	Zweiseitiger Zweistichproben-t-Test	Zweiseitiger Einstichproben-t-Test
*	$p < 0,05$	$p < 0,02$
**	$p < 0,01$	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$	$p < 0,002$

2.4 Materialien und Geräte

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Materialien und Geräte werden im Folgenden aufgeführt.

Geräte	Hersteller, Ort
Brutschrank I	Binder GmbH, Tuttlingen
Brutschrank II	Nuaire Biotool AG, Kirchberg
Linearbeschleuniger Elekta VersaHD	Elekta GmbH, Hamburg
Mikroskop Eclipse TE300	Nikon, Düsseldorf
Zentrifuge Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Magnetrührer VarioMag monotherm	Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt
Fluoreszenzmikroskop Elipse TE300	Nikon GmbH, Düsseldorf
ELISA-Plattenreader Anthoszenyth 340r	Anthos Microsysteme GmbH, Krefeld
Sicherheitswerkbank Hera Safe KSP	Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt,

Feinstwaage BP61S	Sartorius AG, Göttingen
Zellzählgerät Coulter-Counter Z2	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zellzählgerät CASY Cell Counter	OLS OMNI Life Science GmbH & KG, Bremen
Tiefkühltruhe Ultra Flow	SANYO Component Europe GmbH, München
Vortexer	Scientific industries Bohemia, NY USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Chemikalien und Lösungen

Hersteller, Ort

Ethanol (70 %, vergällt)	Zentralapotheke, Universitätsmedizin Rostock
Trypsin/EDTA (0,25 % und 0,05 %)	Biochrom AG, Berlin
Höchst-Färbelösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphatgepufferte NaCl-Lösung (PBS)	PAN-Biontech GmbH, Aidenbach
Poly-D-Lysin (PDL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Schwefelsäure (1 M)	Morphisto GmbH, Offenbach am Main
Cytochalasin B (CytoB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck Millipore, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck Millipore, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCL)	Merck Millipore, Darmstadt
Formaldehyd (2 %)	Merck Millipore, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-phospho-Histone H2A.X Antibody (Mouse)	Merck Millipore, Darmstadt
Alexa Fluor 594 Goat Anti-Mouse IgG	Invitrogen [®] by Thermo Fisher Scientific [™] , Darmstadt

Vectashield® Eindeckelmedium mit DAPI	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Dulbecco's modified Eagle medium/F12 (DMEM/F-12)	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Fetal Bovine Serum (FBS)	Merck Millipore, Darmstadt
Human Platelet Lysate (hPL)	PL-BioScience GmbH, Aachen
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Verbrauchsmaterialien

Hersteller, Ort

Falconröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Multiwellplatten (24- und 96-Well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (5 ml, 10 ml und 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Chamber Slide System	Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt
Objektträger 76 x 26 mm	Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt
Glas-Deckgläschen, 60 mm	Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt
Eindeckmedium	
- Glycerin	Merck Millipore, Darmstadt
- Polyethylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Aqua dest.	Universitätsmedizin, Rostock
- PheNol	Roth, Karlsruhe

Kits

Hersteller, Ort

Cell Proliferation ELISA-Immunoassay, BrdU	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim
Quantikine ELISA, Total MMP-2	R&D Systems, Minneapolis, USA
Quantikine ELISA, Human-VEGF	R&D Systems, Minneapolis, USA

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der pADSCs

3.1.1 Morphologie

Die Morphologie der pADSCs war different in Abhängigkeit davon, in welchem Medium die Zellen kultiviert wurden. Diese Unterschiede zeigen die Abbildungen 7 und 8.

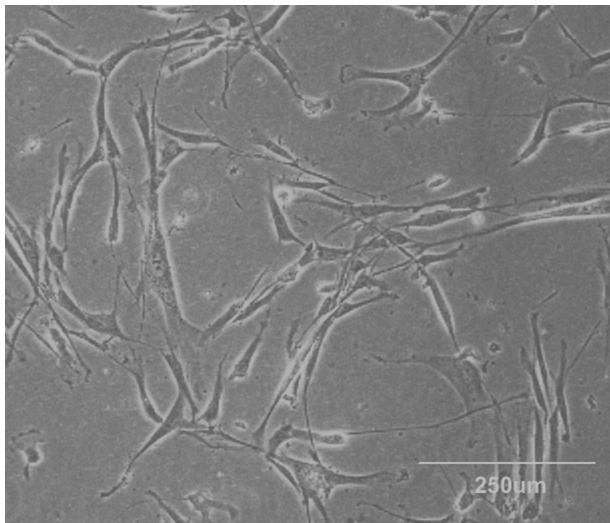


Abb. 7: pADSCs kultiviert in 10%igem hPL-haltigem Kulturmedium, Tag 5 nach der Einsaat; 100x Vergrößerung

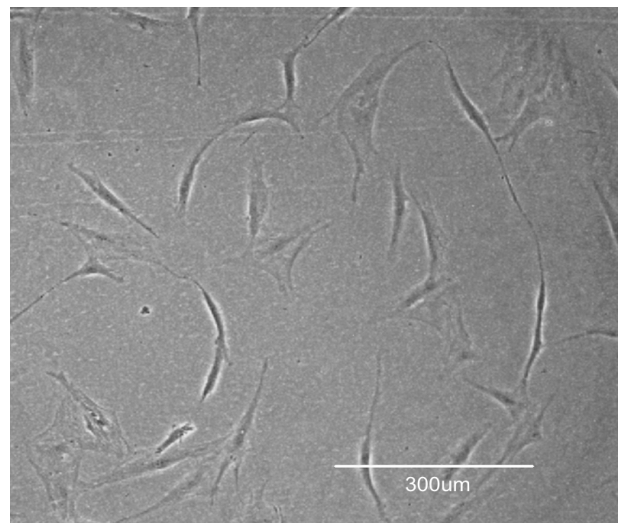


Abb. 8: pADSCs kultiviert in 10%igem FBS-haltigem Kulturmedium, Tag 4 nach der Einsaat; 100x Vergrößerung

Während die pADSCs, kultiviert mit hPL, in einer gleichmäßigen, spindelförmig-länglichen Struktur wuchsen (Abb. 7), war die Morphologie der Zellen mit FBS inhomogener und variierte von breit bis schlank (Abb. 8). Außerdem konnte in FBS ab einer Konfluenz von 80 % eine Wachstumsinhibierung beobachtet werden. Bei den ADSCs in hPL wuchsen die Zellen hingegen auch bei einer fortgeschrittenen Konfluenz ggf. in mehreren Ebenen. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass sich die mit hPL kultivierten Stammzellen ab Tag 5-6 nach Einsaat zu sog. Sphären zusammenlagern.

Zu verzeichnen war auch, dass bei den pADSCs-FBS nach der Zugabe von 0,25%igem Trypsin 15 - 20 Minuten bis zur vollständigen Ablösung aller Zellen vergingen. Diese Zeit ist verglichen mit den pADSCs-hPL um drei- bis viermal länger (pADSCs in hPL: 3-5 Minuten) und lässt eine stärkere Adhärenz der Zellen an der Oberfläche vermuten.

3.1.2 Wachstum

Als zweiter Versuch wurde in dieser Dissertation eine native Wachstumskurve erstellt, die der Beurteilung des Wachstumsverhaltens der pADSCs diene. Einerseits konnte so die charakteristische Wachstumskinetik verschiedener Zellen dargestellt und gleichzeitig eine Populationsverdopplungszeit errechnet werden.

Die Wachstumskurve der pADSCs ist in Abbildung 9 dargestellt. Anhand dieser sollen im Weiteren auch die charakteristischen Phasen einer Wachstumskurve, die Lag-, Log-, und Plateauphase, erläutert werden.

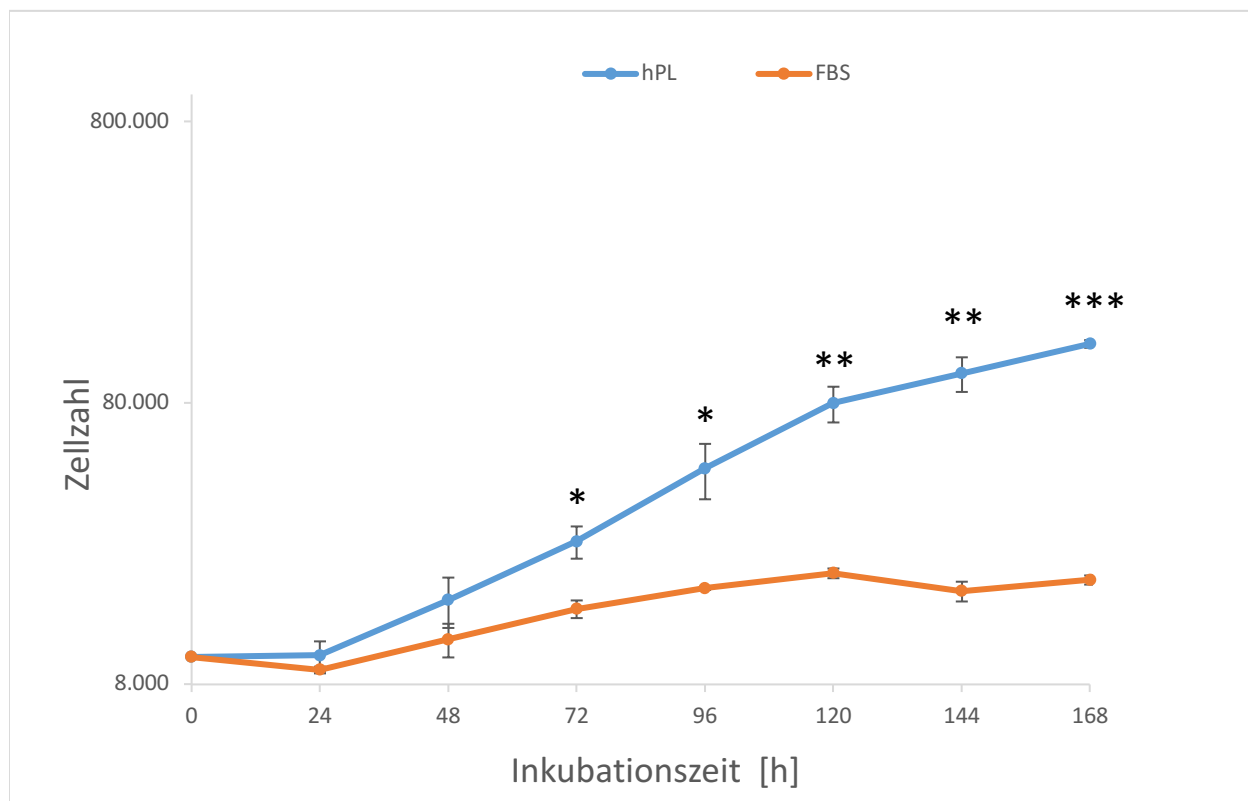


Abb. 9: Wachstumsverhalten von pADSCs unter dem Einsatz unterschiedlicher Mediumzusätze (FBS bzw. hPL); dargestellt sind MW \pm SD aus n=3; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Die erste Zeit nach der Einsaat entsprach der Lag- oder Latenzphase, die durch ein schwaches Wachstum bis hin zu einem Abfall der Zellzahl gekennzeichnet war. In diesem Abschnitt gewöhnten sich die Zellen an die neuen Umgebungsbedingungen und hefteten sich an die Oberfläche an. Diese Zellzahlreduktion konnte in diesem Versuch besonders bei den Zellen, die mit FBS kultiviert wurden, beobachtet werden, wo die Zellzahl im Vergleich zum Zeitpunkt t_{0h} mit 10.000 Zellen 24 Stunden nach Einsaat ca. 9.000 betrug und gleichzeitig das Ende der Lagphase darstellte. Diese anfängliche Reduktion der Zellzahl konnte bei den mit hPL-inkubierten pADSC nicht beobachtet werden. Für die pADSCs-hPL war diese Latenzphase im Vergleich zu

den mit FBS kultivierten Zellen kurz und dauerte ca. einen Tag.

Danach geht das Wachstum in die Log-Phase über. Charakteristisch ist hierbei ein exponentielles Wachstum, das zu einer konstanten Zunahme der Zellzahl führt. Wie der Abbildung 9 zu entnehmen ist, erstreckte sich das logarithmische Wachstum bei den pADSCs-hPL und den pADSCs-FBS jeweils von 24 Stunden bis 120 Stunden nach Einsaat. In diesem Abschnitt konnten jeweils die Populationsverdopplungszeiten (PDT) mittels linearer Regression aus den Werten der Wachstumskurve ermittelt werden. Wie der Tabelle 2 zu entnehmen, duplizierten sich die Zellzahlen der pADSCs-hPL mit einer PDT von 32,29 Stunden mehr als doppelt so schnell wie die der pADSCs kultiviert mit FBS mit einer PDT von 84,40 Stunden.

Tabelle 2: Populationsverdopplungszeit (PDT) der pADSCs kultiviert mit hPL bzw. mit FBS; ermittelt jeweils zwischen 24 h- 120 h. SD: Standardabweichung.

	PDT [h] ± SD
pADSCs-hPL	32,29 ± 0,44
pADSCs-FBS	84,40 ± 4,63

Die Plateauphase, wie in Abbildung 9 zu sehen, trat nur bei den pADSCs kultiviert mit FBS ab 120 Stunden nach Einsaat bei einer Zellzahl von 2×10^4 Zellen auf. Bei den Zellen im hPL-supplementierten Kulturmedium befanden sich die pADSCs am letzten Tag der Messung mit einer Zellzahl von $1,3 \times 10^5$ noch im Wachstum.

In der letzten Phase, der Absterbe-Phase, übersteigt die Sterberate die Wachstumsrate und es kommt zu einem Abfall der Zellzahl. Diese Phase konnte im gewählten Versuchszeitraum in keinem der Ansätze beobachtet werden.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die pADSCs-hPL ab 72 Stunden nach der Einsaat ein signifikant schnelleres Wachstum als die Zellen in FBS aufwiesen.

Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag darin, die Zellantwort der pADSCs auf ionisierende Strahlung in Abhängigkeit vom Mediumzusatz (pADSCs-hPL versus -FBS) zu betrachten. Dazu wurden die Proliferation, die strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüche, die MMP2- und VEGF-Sekretion sowie Mikrokerne genauer untersucht.

3.2 Proliferation

Zur Prüfung der Proliferation der pADSCs unter Einwirkung zunehmender Bestrahlungsdosen wurde der BrdU-Test durchgeführt. Die Ergebnisse in Abhängigkeit vom verwendeten Mediumzusatz sind der Abbildung 10 zu entnehmen.

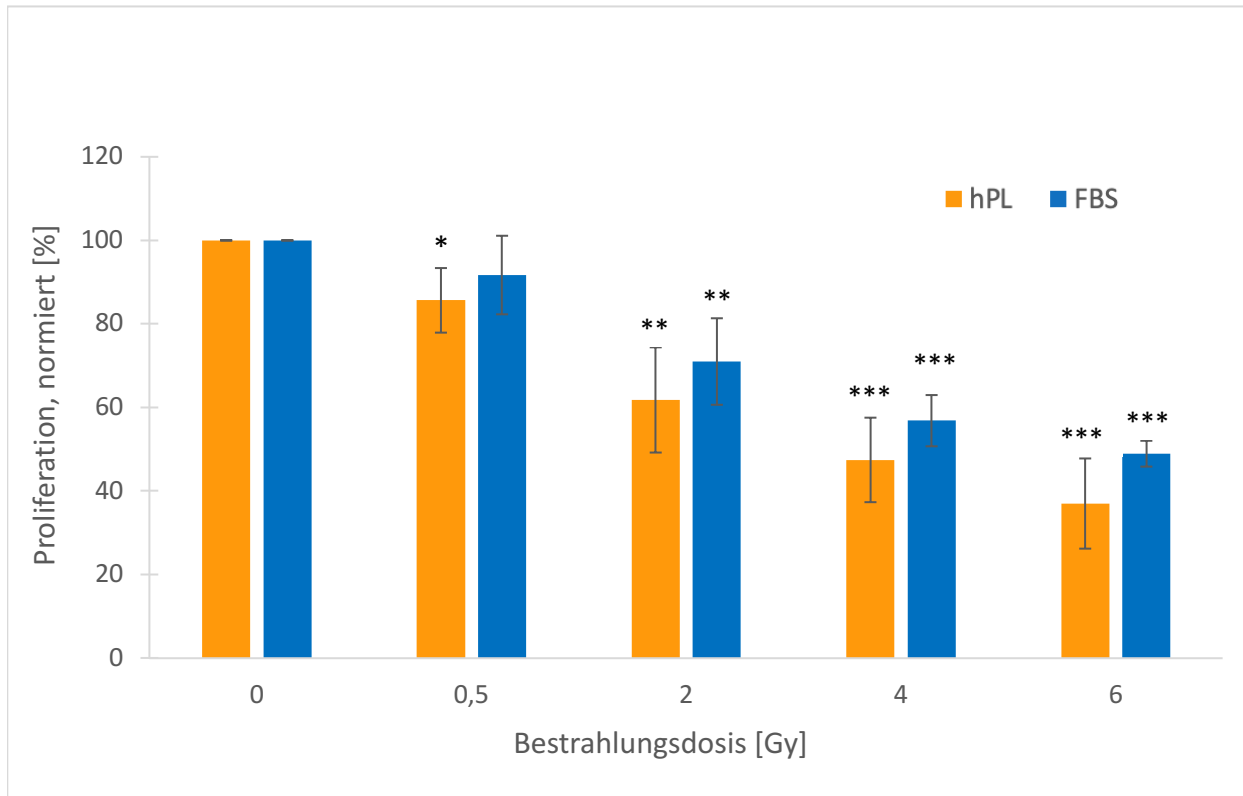


Abb. 10: Proliferation der pADSCs gemessen als BrdU-Inkorporation nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen unter dem Einsatz unterschiedlicher Mediumzusätze (FBS bzw. hPL), normiert auf die jeweils unbestrahlte Kontrolle (100 %); dargestellt sind MW \pm SD aus n=5; *p < 0,02, ** p < 0,01, * p < 0,002 bezogen auf 0 Gy als Kontrolle.**

Die Proliferationen aller Ansätze wurden auf die jeweils unbestrahlten Kontrollen (0 Gy, 100 %) normiert. Bei beiden Mediumzusätze war in Gegenüberstellung zur Kontrolle (0 Gy) eine signifikante Abnahme der Proliferation mit steigender Bestrahlungsdosis zu beobachten. Bei den pADSCs-hPL war diese signifikante ($p < 0,05$) Proliferationshemmung bereits nach einer Exposition mit 0,5 Gy (Proliferation: 85,7 %) festzustellen. Bei einer Dosis von 6 Gy war die Proliferation für diesen Ansatz auf 37% reduziert. In Gegenüberstellung dazu war bei den Stammzellen mit FBS-haltigem Medium erst ab 2 Gy (71,0 %) eine signifikante Verminderung des BrdU-Einbaus zu verzeichnen. Die Proliferation war nach einer Radiatio mit 6 Gy auf knapp die Hälfte (48,95 %) gegenüber den unbestrahlten Zellen gesunken.

Im Vergleich beider Mediumzusätze konnte bei keiner Bestrahlungsdosis ein signifikanter Unterschied in der Proliferation beobachtet werden. Allerdings lag die BrdU-Inkorporation der pADSCs-hPL nach der Radiatio mit 0,5 Gy, 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy jeweils unter der der pADSCs-

FBS, sodass für die pADSCs-hPL keine signifikante, aber eine numerisch reduzierte Proliferation zu vermerken war. Bei Betrachtung der Daten ohne Normierung auf die unbestrahlte Kontrolle (hier graphisch nicht dargestellt), fiel weiterhin auf, dass die Ausgangsproliferationsraten ohne den Einfluss von ionisierender Strahlung (0 Gy) bei den pADSCs-FBS deutlich über denen der pADSCs-hPL lagen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bzgl. der Proliferation im Vergleich der pADSCs-FBS versus -hPL bei verschiedenen Bestrahlungsdosen kein signifikanter Unterschied zu beobachten war.

3.3 DNA-Doppelstrangbrüche

Mithilfe des γ H2AX-Assays konnte neben der schädigenden Wirkung von ionisierender Strahlung auch die Reparaturkapazität der pADSCs für DSB nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy betrachtet werden. Die Abbildung 11 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Bilder, auf welchen die DNA-DSB durch Antikörper-Markierung als rote Foci zu erkennen sind. Die Zellkerne stellen sich durch eine DAPI-Färbung blau dar. Die Foci wurden mikroskopisch ausgezählt. Ihre Anzahl ist dabei direkt proportional zur Summe der DSB in der DNA.

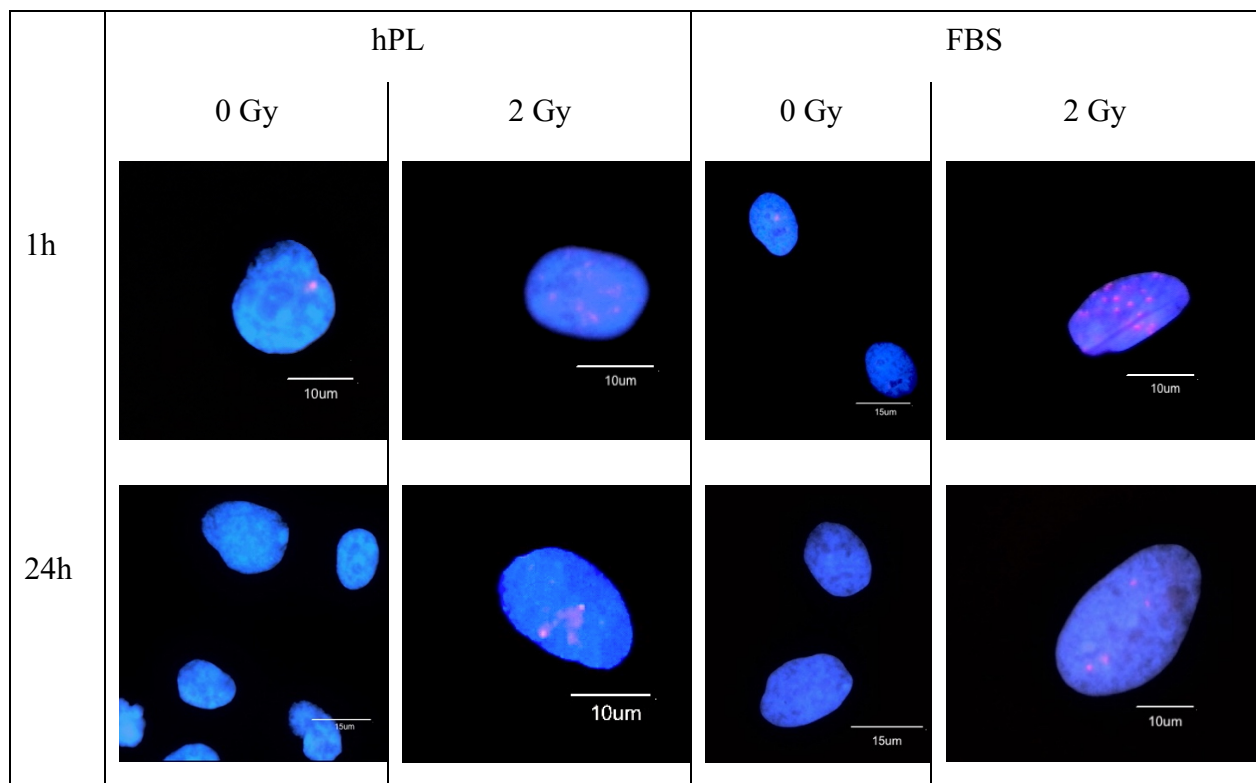


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Bilder der pADSCs mittels γ H2AX-Assay nach einer und 24 Stunden unbestrahlt bzw. nach Bestrahlung mit 2 Gy, 1000x Vergrößerung, hPL: humanes Plättchenlysate; FBS: fetales Rinderserum; blau: Zellkern; rot: γ H2AX foci.

Für jede Bestrahlungsdosis (0 Gy und 2 Gy) und Inkubationszeit nach Radiatio (eine Stunde und 24 Stunden) wurde die Anzahl der Foci in 100 Zellkernen ausgezählt und der Versuch zweimal wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 als Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle dargestellt.

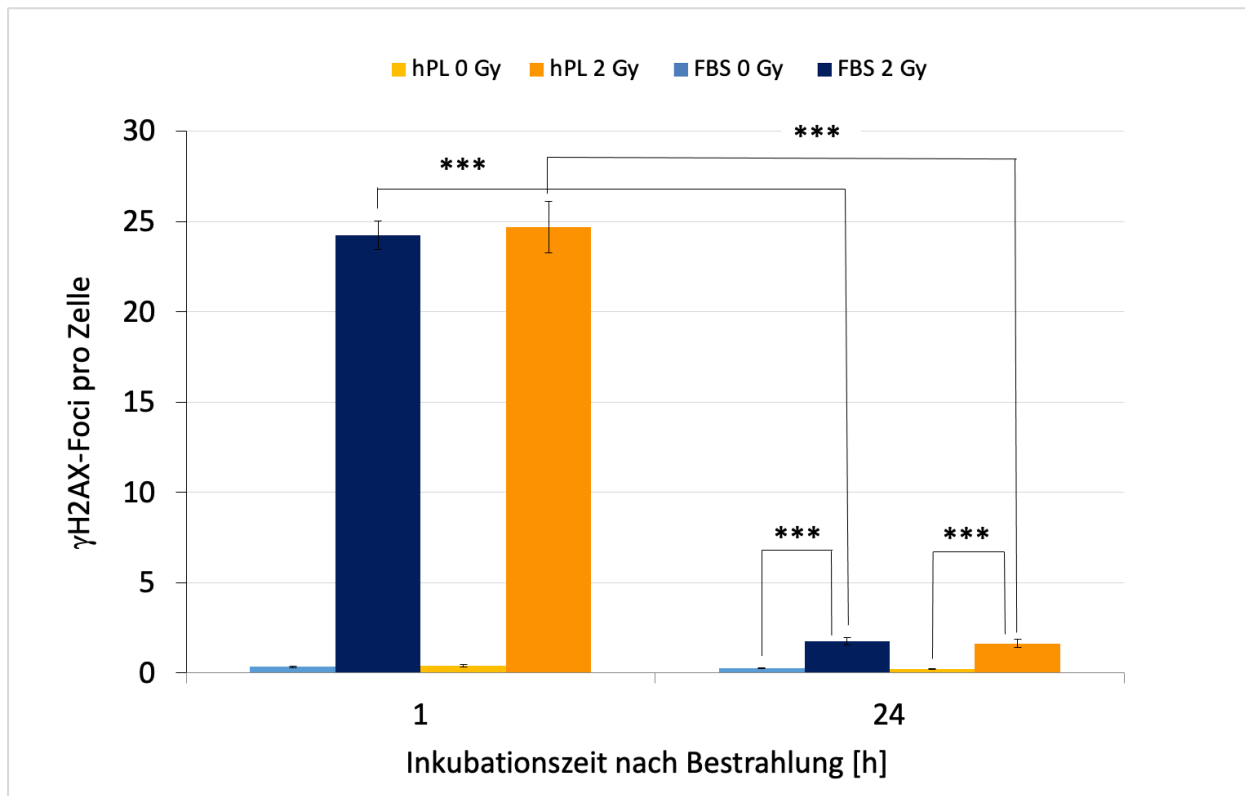


Abb. 12: DNA-Doppelstrangbrüche von bestrahlten und unbestrahlten pADSCs nach einer und 24 Stunden unter dem Einsatz verschiedener Mediumzusätze; dargestellt sind MW ± SD aus n=3; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 bezogen auf 0 Gy als Kontrolle.

Eine Stunde nach Radiatio mit 2 Gy lag die Anzahl der Foci mit $24,69 \pm 1,42$ für die pADSCs mit hPL und $24,23 \pm 0,79$ mit FBS auf einem vergleichbaren Niveau und zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Serumersätzen. Bei anschließender Betrachtung der Focianzahl zum zweiten Zeitpunkt (24 Stunden nach Bestrahlung), war im Vergleich zur vorherigen Inkubationszeit eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$) der DNA-DSB um > 90 % in beiden Mediumzusätzen erkennbar (hPL: $1,64 \pm 0,21$, FBS: $1,75 \pm 0,22$).

Des Weiteren fiel auf, dass bei den ADSCs-hPL und -FBS, nach Einwirkung von 2 Gy (hPL: $1,64 \pm 0,21$, FBS: $1,75 \pm 0,22$) verglichen mit den unbestrahlten Versuchsansätzen (hPL: $0,23 \pm 0,02$, FBS: $0,26 \pm 0,03$), 24 Stunden nach Bestrahlung noch residuelle γ H2AX-Foci detektierbar waren. Da bekannt ist, dass die Reparatur der DNA-DSB 24 Stunden nach Bestrahlung abgeschlossen ist, kann davon ausgegangen werden, dass es weder bei den Zellen in hPL noch in FBS nach ionisierender Strahlung mit 2 Gy zu einer vollständigen Reparatur aller Doppelstrangbrüche kam. Zusammengefasst konnten weder in der Induktion noch in der Reparaturfähigkeit von DNA-

Doppelstrangbrüchen signifikante Unterschiede zwischen den pADSCs-hPL versus -FBS ermittelt werden.

3.4 MMP-2- und VEGF-Sekretion

Um den Einfluss der ionisierenden Strahlung auf die von den Zellen ausgeschüttete Menge von MMP-2 und VEGF zu bestimmen, konnte mithilfe eines Sandwich ELISA die quantitative Messung dieser Zytokine aus dem Medienüberstand von bestrahlten bzw. unbestrahlten pADSCs durchgeführt werden. Dabei fand wiederum ein Vergleich zwischen hPL- und FBS-supplemierten Zellen statt.

3.4.1. MMP2-Sekretion

Das humane MMP-2 gehört zur Gruppe der Gelatinasen und bewirkt eine Endothelzellmigration, Beförderung der Angiogenese und eine vermehrte Ausschüttung von VEGF (R&D SYSTEMS, 2019). Die Ergebnisse der MMP-2-Konzentration wurden als normierte Mittelwerte je Bestrahlungsdosis und Mediumzusatz in Abbildung 13 dargestellt.

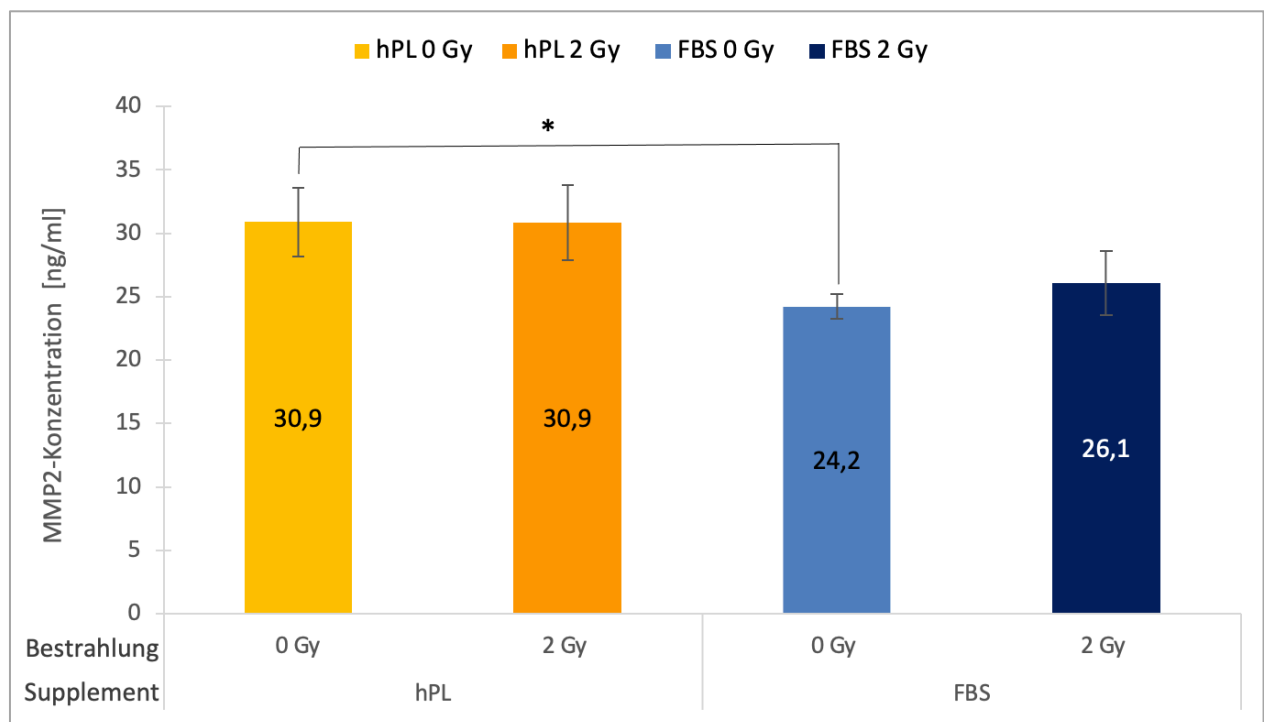


Abb. 13: MMP-2-Konzentration im Medienüberstand von pADSCs 24 Stunden nach Bestrahlung unter dem Einsatz verschiedener Mediumzusätze; dargestellt sind MW ± SD aus n=3, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Die Bestrahlung führte weder in den pADSCs-hPL (0 Gy: 30,9 ng/ml vs. 2 Gy: 30,9 ng/ml) noch in den pADSCs-FBS (0 Gy: 24,2 ng/ml vs. 2 Gy: 26,1 ng/ml) zu einer Änderung der MMP-2-

Ausschüttung. Lediglich im Vergleich der beiden Mediumzusätze konnte bei den unbestrahlten Zellen mit hPL-Zusatz eine signifikant ($p < 0,05$) höhere MMP-2-Konzentration erfasst werden als mit FBS-Zusatz. So lag die Sekretion von MMP-2 bei den pADSCs-hPL bei 30,9 ng/ml und bei den pADSCs-FBS bei 24,2 ng/ml. Auch nach Bestrahlung mit 2 Gy konnte beim Versuchsansatz mit hPL als Mediumzusatz mit 30,9 ng/ml vs. 26,1 ng/ml mit FBS eine höhere MMP-2-Konzentration gemessen werden. Diese Unterschiede waren aufgrund der Standardabweichungen jedoch nicht signifikant.

3.4.2. VEGF-Sekretion

Der VEGF gehört zur PDGF-Familie, bindet an Tyrosinrezeptorkinasen und bewirkt ebenfalls eine Endothelzellmigration, Angiogenese und darüber hinaus eine Vaskulogenese (R&D SYSTEMS, 2020). Die Ergebnisse der VEGF-Konzentrationsmessung wurden genau wie beim MMP-2 als normierte Mittelwerte je Bestrahlungsdosis und Mediumzusatz gemessen und in Abbildung 14 dargestellt.

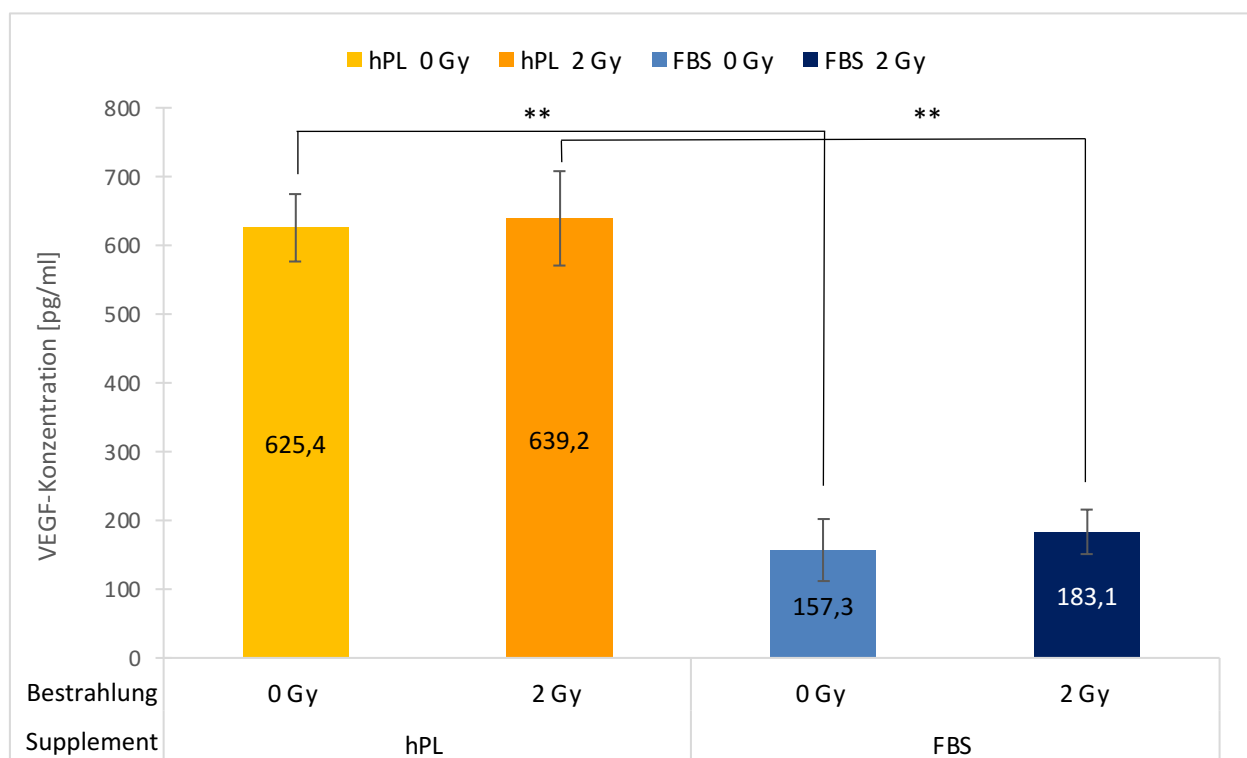


Abb. 14: VEGF-Konzentration im Medienüberstand von pADSCs 24 Stunden nach Bestrahlung unter dem Einsatz verschiedener Mediumzusätze; dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus $n=3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Durch die Radiatio mit einer Dosis von 2 Gy war bei den pADSCs mit beiden Mediumzusätzen im Vergleich zum unbestrahlten Ansatz eine leichte numerische Zunahme, bei hPL um 2,2 % (13,9 pg/ml) und bei FBS um 14,1 % (25,8 pg/ml), der VEGF-Konzentration im Medienüberstand

zu beobachten. Diese Konzentrationserhöhung durch die ionisierende Strahlung war jedoch statistisch nicht signifikant. Die unbestrahlten (625,4 pg/ml) sowie bestrahlten (639,2 pg/ml) pADSCs-hPL schütteten knapp viermal so viel und damit signifikant mehr VEGF ($p < 0,01$) als die pADSCs-FBS aus (0 Gy: 157,3 pg/ml; 2 Gy: 183,1 pg/ml).

Zusammenfassend konnte keine signifikante Zu- oder Abnahme der MMP-2-/ VEGF-Konzentration im Mediumüberstand der pADSCs-hPL oder -FBS nach einer 2 Gy Bestrahlung beobachtet werden. Bei Gegenüberstellung der Mediumzusätze konnte der Assay zeigen, dass die pADSCs-hPL signifikant mehr MMP-2 ($p < 0,05$) und VEGF ($p < 0,01$) ausschütteten.

3.5 Mikrokerne

Zur weiteren Detektion genotoxischer Schäden, verursacht durch Einwirkung von ionisierender Strahlung im therapeutischen Dosisbereich, wurde ein Mikrokerntest durchgeführt.

Die folgenden Diagramme stellen nur die Ergebnisse von pADSCs dar, die in 10%igem FBS-Medium kultiviert wurden, da eine standardisierte Durchführung des Mikrokerntests mit pADSCs-hPL nicht möglich war. Darauf wird im Weiteren (S. 51ff) noch näher eingegangen.

Als Erstes wurde beim Ansatz ohne Radiatio die Anzahl der einkernigen, doppelkernigen und mehrkernigen Zellen sowie Apoptosen und Mitosen erfasst (Abbildung 15). Die vorherige Zugabe von Cytochalasin B diente hierbei der Hemmung der Zytokinese und führte im Ergebnis zu binukleären Zellen, die somit genau eine Zellteilung durchlaufen hatten. DMSO diente hierbei als vergleichende Negativkontrolle.

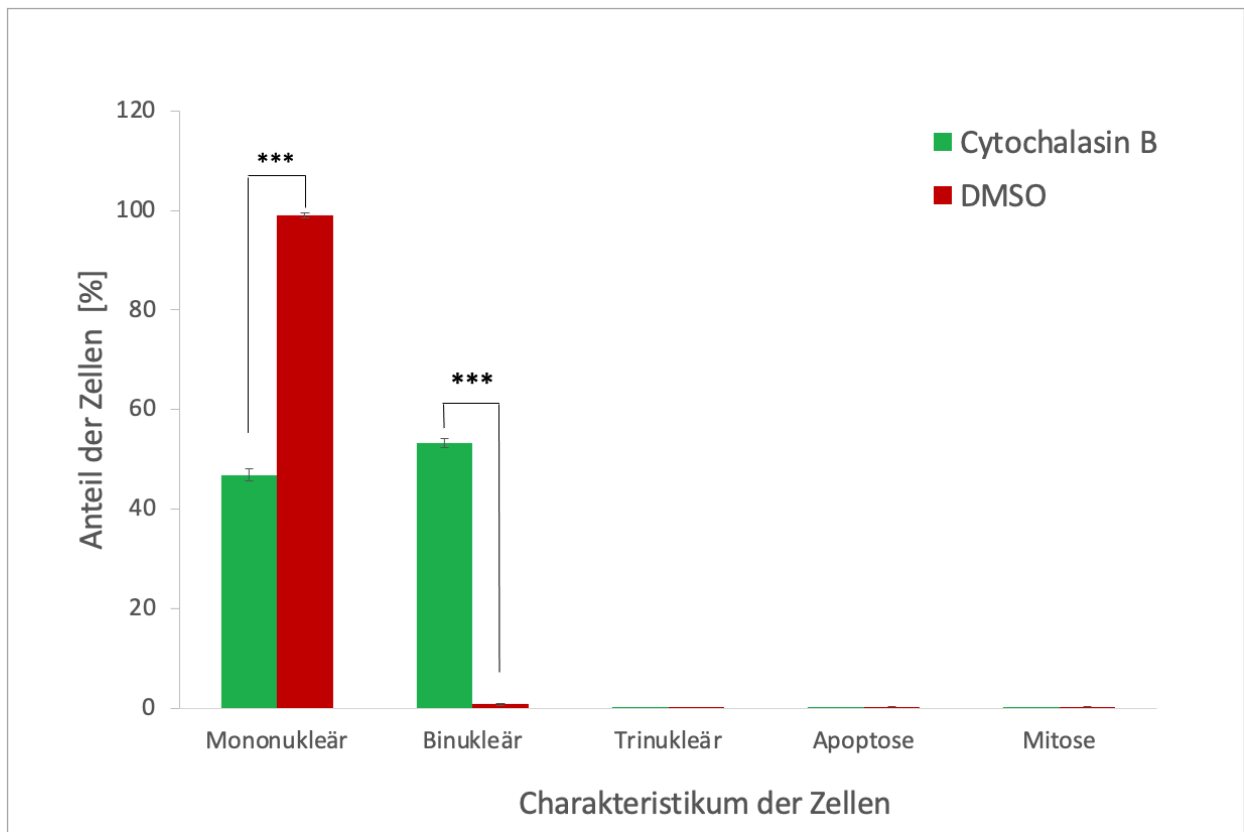


Abb. 15: Anzahl binukleärer pADSCs nach Zugabe von Cytochalasin B vs. DMSO unter dem Einsatz von 10%igem FBS-Kulturmedium; dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus $n=3$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ bezogen auf DMSO als Kontrolle.

Der Anteil binukleärer Zellen nach Cytochalasin B-Zugabe lag mit 53,27 % signifikant höher als bei den mit DMSO behandelten Zellen (0,75 %, $p < 0,001$) und erfüllte das Kriterium, dass mehr als 50 % der pADSCs als binukleäre Zellen vorliegen müssen, um die Wirkung des Cytochalasin B zu gewährleisten und die Anzahl der Mikrokerne auszählen zu dürfen. Bei Betrachtung mehrkerniger Zellen, Apoptosen und Mitosen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen mit Cytochalasin B und DMSO detektiert werden. Die Abbildung 16 zeigt beispielhaft drei dieser binukleären Zellen.

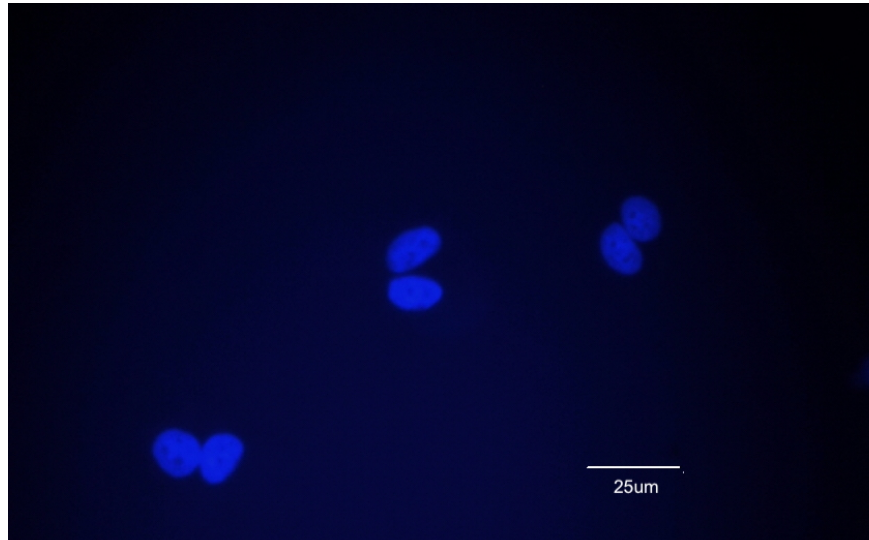


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopisches Bild binukleärer pADSCs, kultiviert mit 10%igem FBS, nach Zugabe von Cytochalasin B, 500x Vergrößerung.

Im zweiten Schritt wurde eine standardisierte Bestimmung der Mikrokernzahl der binukleären Zellen (FENECH, 2000), jeweils nach 0 Gy und 2 Gy durchgeführt. Eine binukleäre Zelle mit Mikrokern ist beispielhaft in Abbildung 17 dargestellt.

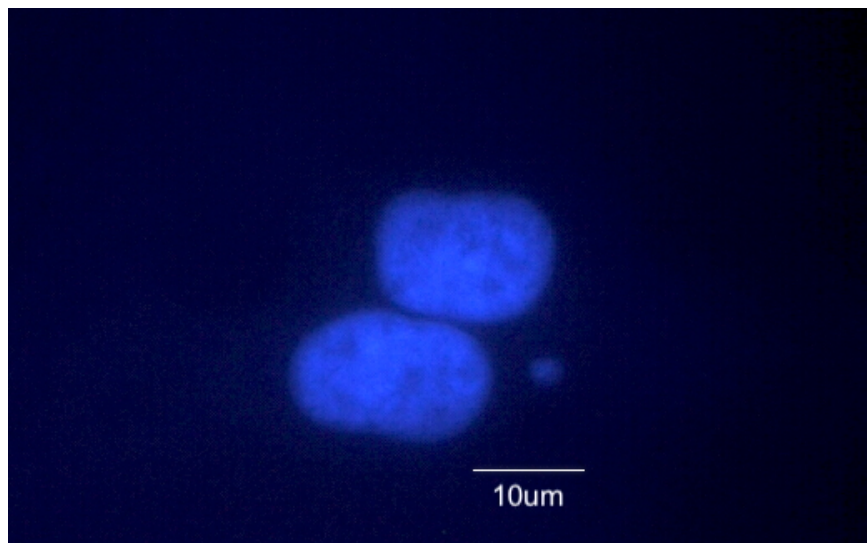


Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer binukleären pADSC mit Mikrokern, kultiviert in 10%igem FBS, nach Zugabe von Cytochalasin B und nach Bestrahlung mit 2 Gy, 1000x Vergrößerung.

In der Abbildung 18 wurde die Anzahl der Mikrokerne in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis in % dargestellt und zwischen 0, 1, 2 und mehr als 3 Mikrokernen pro Zelle differenziert.

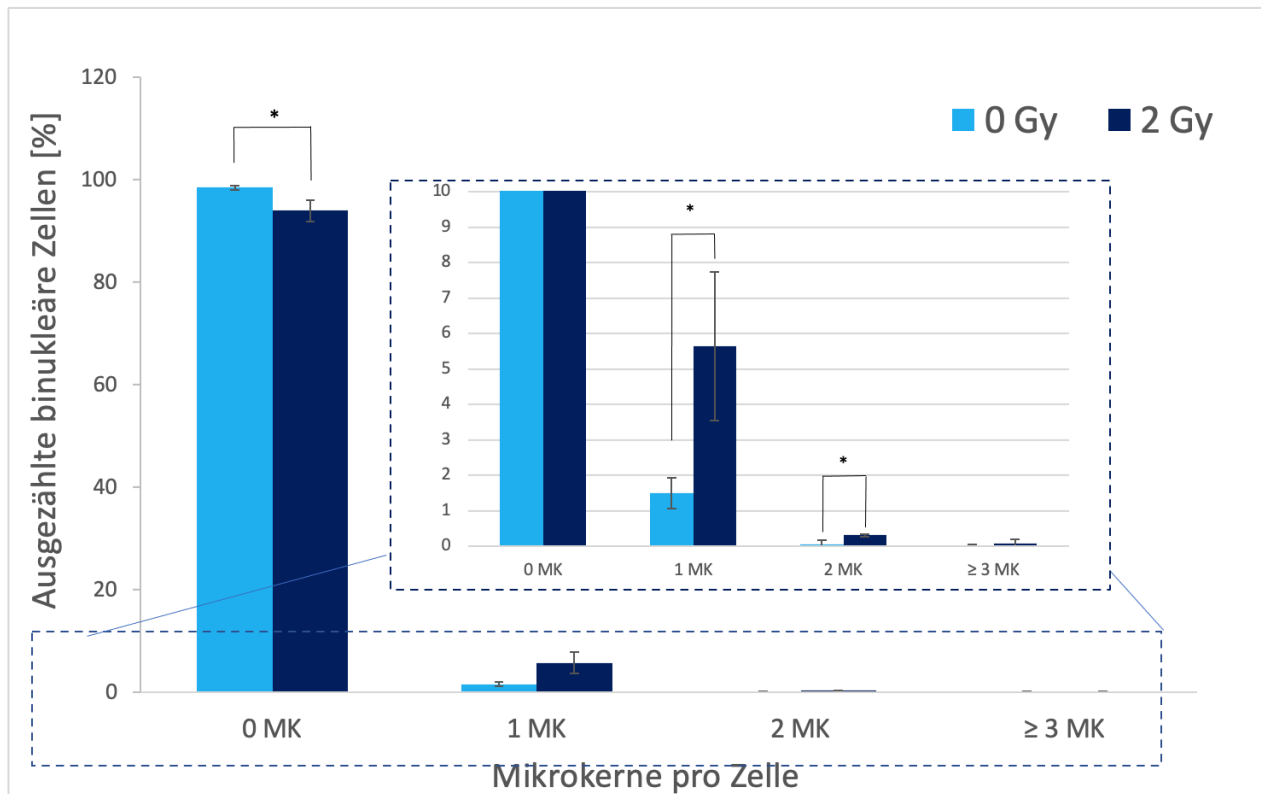


Abb. 18: Mikrokerne (MK) in unbestrahlten und bestrahlten binukleären pADSCs unter dem Einsatz von 10%igem FBS-Kulturmedium; dargestellt sind MW \pm SD aus n=3; * p < 0,05 bezogen auf 0 Gy als Kontrolle.

Beim unbestrahlten Versuchsansatz (Negativkontrolle) waren bei 98,4 % der binukleären Zellen keine Mikrokerne und bei 1,5 % ein Mikrokern detektierbar. Durch Bestrahlung der pADSCs mit einer Dosis von 2 Gy waren ca. 4 % mehr einzelne Mikrokerne zählbar (5,6 %) und im Vergleich zum Ansatz ohne Radiatio ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied der Mikrokernanzahl und somit der chromosomalen Aberrationen festzustellen. Auch im Bereich von zwei Mikrokernen pro binukleäre Zelle war mit 0,31 % (vs. 0 Gy mit 0,07 %) eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Mikrokernzahl nach Radiatio zu detektieren. Die Anzahl der zweikernigen Zellen mit 3 oder mehr Mikrokernen war beim Ansatz mit 0 Gy sowie 2 Gy vernachlässigbar klein.

Da dieser Versuch als Indikator-test für genotoxische Einflüsse dient, kann das hier signifikant vermehrte Auftreten von Mikrokernen nach Bestrahlung der pADSCs mit 2 Gy im Vergleich zur Negativkontrolle als Hinweis auf eine chromosomale Schädigung oder Schädigung des Spindelapparates der pADSCs dienen.

Neben der Durchführung des Versuchs mit pADSCs-FBS wurde wie auch bei allen vorherigen Experimenten ein Ansatz mit 10%igem hPL-Kulturmedium als Vergleich angestrebt. Dies konnte

jedoch nicht realisiert werden, da trotz diverser Vorversuche bzw. geänderter Versuchsdurchführungen spätestens 30 Minuten nach Zugabe von Cytochalasin B eine Inadhärenz der pADSCs bzw. ein Abkugeln von der Oberfläche im Mikroskop beobachtet werden konnte (Abb. 19).

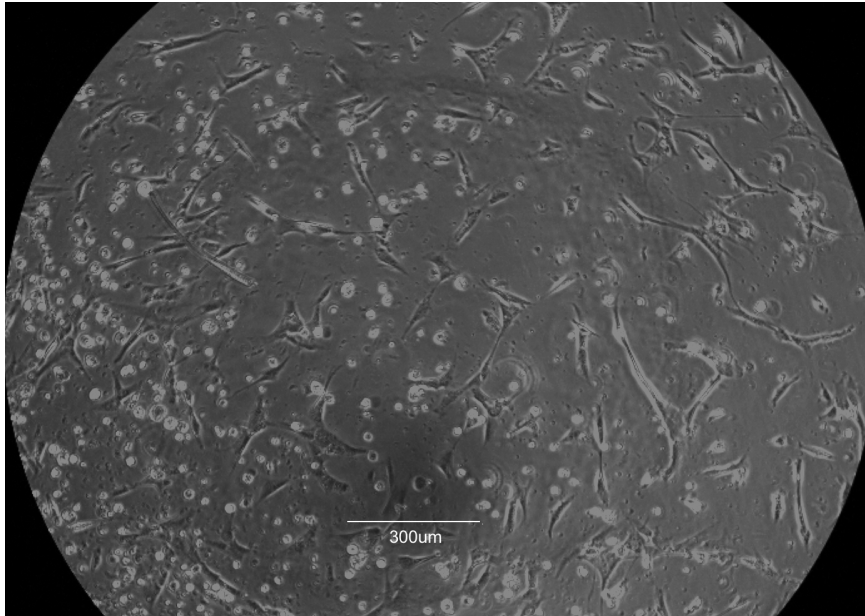


Abb. 19: Bei Durchführung des Mikrokerntests mit 10%igem hPL-Kulturmedium kam es zur Inadhärenz fast aller pADSCs eine Stunde nach Zugabe von Cytochalasin B (bes. Bildrand links unten); 100x Vergrößerung.

Die unterschiedlichen Ansätze werden im Folgenden kurz erläutert. Die erste Überlegung war, die Einsaatdichte der pADSCs pro Well von 2×10^2 auf 5×10^2 Zellen zu erhöhen, da die pADSCs, insbesondere im hPL-haltigen Medium, eine gewisse Konfluenz zur gegenseitigen Unterstützung der Proliferation benötigten. Neben der Variation der Einsaatdichte wurde die Menge des Cytochalasin B auf $1 \mu\text{l}$ und $0,5 \mu\text{l}$ reduziert. Der Gedanke dahinter war, ob das Cytochalasin B in der Konzentration von $2 \mu\text{l}$ eventuell nicht nur die Zytokinese der pADSCs hemmt, sondern zu einer Apoptoseinduktion führt. Ein weiterer Ansatz war, den Zugabezeitpunkt des Cytochalasins nach Bestrahlung zu verlängern, das Cytochalasin B also nicht eine Stunde, sondern 24 Stunden, 48 Stunden oder 72 Stunden nach Bestrahlung zu den Zellen zu geben, um die Zeitspanne zur Adhärenz an das Deckgläschen für die Stammzellen zu verlängern. Weiterhin wurde in einem Ansatz die Beschichtung mit PDL ausgesetzt und des Weiteren statt einer Wellplatte ein 4-chamber slide verwendet, um auszuschließen, dass der Grund für das Abkugeln der pADSCs eine Materialinkompatibilität war. Als letzter Versuch wurde ein Heparin- und Ca^{2+} -freies hPL-Medium von der Firma BioScience verwendet, da die Frage im Raum stand, ob das Cytochalasin B eventuell zu einer Interaktion mit dem zum hPL-Medium zugesetzten Heparin führte. Trotz aller Versuche war es nicht möglich, eine Adhärenz der pADSCs-hPL nach Cytochalasin B-Zugabe zu

erreichen, weshalb eine Fixierung und Färbung der pADSCs-hPL nicht möglich war.

Als letztes kam die Idee auf, den Mikrokerntest ohne Cytochalasin B durchzuführen. Der Gedanke dahinter war, dass das Cytochalasin B in diesem Versuch primär dazu dient, sicherzustellen, dass nur die Zellen mit Mikrokernen ausgewertet werden, die sich genau einmal geteilt haben (binukleär). Weitergehend war deshalb die Überlegung, die Zellen mithilfe eines Antikörpers zu markieren und im Durchflusszytometer die Zeit zu bestimmen, in der sich mindestens 50 % der Zellen einmal geteilt haben. Im Mikroskop wären diese binukleären Zellen dann daran zu erkennen, dass ihre Farbintensität mit jeder Zellteilung abnimmt und nach einer Zytokinese eine charakteristische Farbe vorliegt. So wäre es ohne Cytochalasin B möglich gewesen, den Anteil an binukleären Zellen zu bestimmen und anschließend die Mikrokerne dieser auszuzählen. Leider war das Durchflusszytometer defekt, sodass dieser Versuchsansatz nicht durchgeführt werden konnte.

Somit konnte der Versuchsansatz mit hPL als Mediumzusatz nicht wie geplant durchgeführt werden und ein Vergleich von pADSCs-hPL und -FBS war nicht möglich.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Nutzung von hPL anstelle von FBS für die Kultivierung von pADSCs aus der Mamma untersucht werden, wobei ein besonderes Augenmerk auf der zellulären Strahlenantwort dieser lag. Es konnte anhand verschiedener Methoden gezeigt werden, dass die pADSCs aus der Brust in hPL (10 %) eine schnellere Wachstumskinetik und erhöhte Zytokinausschüttung von MMP-2 und VEGF als die mit FBS (10 %) kultivierten Zellen aufwiesen, welche von der ionisierenden Strahlung unbeeinflusst war. Außerdem war mit beiden Mediumzusätzen eine zunehmende Proliferationsregression bei steigender Bestrahlungsdosis und eine hohe Reparaturkapazität von strahleninduzierten DNA-DSB innerhalb der ersten 24 Stunden nach Radiatio zu beobachten. Auch der Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Entstehung chromosomaler Aberrationen konnte für die pADSCs mit 10 % FBS im Kulturmedium gezeigt werden.

4.1 Morphologie

Während für das an Bedeutung gewinnende Feld der regenerativen Medizin die Entnahme von MSCs aus dem Knochenmark (BMSCs) eine etablierte, jedoch schmerzassoziierte und mit wenig Zellertrag einhergehende Methode ist (ZUK et al., 2001; LINDROOS et al., 2011), rückt das MSC reiche und gut zugängliche Fettgewebe in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Stammzellforschung (STREM et al., 2005; LAI et al., 2018). Um in dieser Arbeit die Reaktionen der adulten Stammzellen aus der Mamma auf eine therapeutische Radiotherapie beurteilen zu können, erfolgte zunächst eine Isolation der ADSCs aus dem Brustreduktionsgewebe gesunder Patientinnen nach dem anerkannten und etablierten Isolationsprotokoll von ZUK et al. (2001), sodass die Resultate dieser Arbeit mit denen anderer Arbeitsgruppen so gut wie möglich vergleichbar waren.

Die ADSCs aus der Brust stellen sich *in vitro* klassischerweise schmal, dünn, lang und spindelförmig dar. Wie bereits von den Arbeitsgruppen um CHOLEWA et al. (2011) und TROJAHN KØLLE et al. (2013) beschrieben, konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, dass die Kultivierung der pADSCs mit hPL die Erhaltung ihrer ursprünglichen spindelförmigen Form unterstützt, wohingegen die pADSCs bei Kultivierung mit FBS ungleichmäßig groß, dicker und weniger spindelförmig aussahen (NAAIJKENS et al., 2012). Diese Beobachtung wurde ebenso für BMSCs-hPL gemacht (AZOUNA et al., 2012). KAKUDO et al. (2019) konnten außerdem zeigen, dass der Zellkern in den pADSCs-hPL nach Kultivierung sichtbar ist. Des Weiteren fiel in der vorliegenden Arbeit, als Abgrenzung zu den pADSCs-FBS, in der Kultur mit hPL eine spezielle

Zellanordnung in sogenannten Sphären auf. Dieses Wachstumsmuster konnte in einer Studie von JONSDOTTIR-BUCH et al. (2013) auch für BMSCs in hPL beobachtet werden, wobei auch dort ein Wachstum ohne Sphärenbildung in der FBS-supplemierten Kultur zu verzeichnen war. Mögliche Mechanismen, die hinter dieser Sphärenbildung der mit hPL kultivierten Zellen stecken, sollten in zukünftigen Forschungen untersucht werden.

4.2 Wachstum

Mittels einer nativen Wachstumskurve konnte das Wachstum der pADSCs über 7 Tage im Vergleich zweier Mediumzusätze betrachtet werden. Die Daten zeigten ein signifikant schnelleres Wachstum ($p < 0,05$) der pADSCs in hPL-haltigem Kulturmedium im Vergleich zu FBS-supplemiertem Medium ab dem dritten Tag nach der Einsaat. Diese Beobachtung wurde bereits in der Literatur beschrieben (CHOLEWA et al., 2011; BURNOUF et al., 2016; KAKUDO et al., 2019). Auch für BMSCs ist dieser wachstumssteigernde Effekt durch die Nutzung von hPL bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben worden (SCHALLMOSER et al., 2007; BIEBACK et al., 2009; AZOUNA et al., 2012).

Werden die Werte in dieser Arbeit im Hinblick auf den Eintritt der Log-Phase und somit den Beginn des exponentiellen Wachstums verglichen, trat dieser bei den pADSCs-hPL und pADSCs-FBS zum gleichen Zeitpunkt 24 Stunden nach Einsaat auf. Die auf das logarithmische Wachstum folgende Plateauphase ist durch einen wachsenden Verbrauch der Nährstoffe im Medium, eine beginnende Kontaktinhibition zwischen den Zellen und darüber hinaus die Ausschüttung von wachstumshemmenden Stoffwechselprodukten gekennzeichnet. Dies führt zu einer Wachstumsrate, die der Sterberate der Zellen entspricht und somit konstante Zellzahlen zur Folge hat. Wie der Abbildung 9 zu entnehmen, trat diese Phase bei 2×10^4 Zellen nur bei den pADSCs-FBS ein, beim Versuchsansatz mit hPL befanden sich die Zellen auch bei Versuchsende an Tag 7 noch in der Wachstumsphase.

Für die pADSCs-hPL ließ sich eine Zellpopulationsverdopplungszeit von 32,3 Stunden berechnen. Verglichen mit dem Wert von 29,6 Stunden aus der Arbeitsgruppe um TROJAHN KØLLE et al. (2013) lag der Wert unserer Arbeit etwas höher. TROJAHN KØLLE et al. isolierten ADSCs, die nach kosmetischer Fettabsaugung aus dem Bauch und den Oberschenkelinnenseiten gewonnen wurden, und untersuchten neben den Proliferationsraten von pADSCs-hPL und pADSCs-FBS auch die chromosomale Stabilität dieser. Allerdings wurden in der Studie von TROJAHN KØLLE et al. (2013) ADSCs von nur vier und darüber hinaus männlichen Patienten isoliert und gepoolt, sodass individuelle Unterschiede stärker ins Gewicht fallen könnten als in dieser Arbeit und so die Differenz erklären. Für die pADSCs-FBS lag die Populationsverdopplungszeit in dieser Arbeit mit

84,4 Stunden um mehr als 50 % niedriger als der von den pADSCs-hPL. Verglichen mit den Werten anderer Studien, lag der Wert aus unseren Daten im Mittelfeld. BAER et al. (2010) haben mit 55,6 Stunden eine etwas schnellere Populationsverdopplungszeit für pADSCs-FBS aufgezeigt. Das deckt sich mit Daten aus einer anderen Studie (WITZENEDER ET AL., 2013). Auf der anderen Seite geben TROJAHN KØLLE et al. (2013) in ihrer Arbeit eine fast doppelt so lange Populationsverdopplungszeit (123,9 Stunden) an, die nochmals knapp 30 % über unseren Ergebnissen liegt. Gründe für diese doch deutlichen Differenzen könnten saisonale, kontinentale und individuelle Charge-zu-Charge Variationen des FBS sein, die eine nicht zu vernachlässigende Problematik darstellen (HORN et al., 2010; VAN DER VALK et al., 2010).

Zusammenfassend sind für die pADSCs Zellpopulationsverdopplungszeiten von 40 Stunden bis 120 Stunden beschrieben worden (BAJEK et al., 2016). Einflüsse haben hier die Kulturbedingungen wie die Mediennzusammensetzung, wie oben aufgezeigt, und die Einsaatdichte der Zellen, aber auch die Gewinnungsmethode, die Art des Fettgewebes (weiß oder braun), das Alter der Personen, von denen die ADSCs isoliert wurden und der Isolationsort der adulten Stammzellen (IZADPANAHA et al., 2006; BAJEK et al., 2016). IZADPANAHA et al. (2006) konnten in ihrer Studie außerdem zeigen, dass die Populationsverdopplungszeit von pADSCs-FBS passageabhängig zunimmt. Dieses Phänomen konnte noch verstärkt bei BMSC beobachtet werden, wo sich die Populationsverdopplungszeit ab Passage 20 mehr als verdreifacht hat (50 Stunden zu 160 - 180 Stunden) und Passage 30 nicht erreicht werden konnte (IZADPANAHA et al., 2006), was von anderen Studien bestätigt wurde (CRESPO-DIAZ et al., 2011). Ein weiterer kontroverser Aspekt ist die Einsaatdichte der ADSCs. Während in unserem Versuchsaufbau die Zellen mit einer Dichte von knapp $6,5 \times 10^2$ Zellen/ cm^2 in die Flaschen eingesät wurden, bewegen sich die Werte in der Literatur bei einer Einsaatdichte zwischen 3 bis 1×10^4 Zellen/ cm^2 (CHOLEWA et al., 2011) und die Forscher sind sich nach wie vor uneinig, welche Wahl die Proliferation und Qualität von MSCs am besten unterstützt (BOTH et al., 2007; LUND et al., 2009). Aufgrund dieser heterogenen Kulturbedingungen zwischen den Studien sollten in der Zukunft weitere Versuche zu Passageintervallen, Einsaatdichte und Alter der Personen, aus denen die ADSCs isoliert werden, durchgeführt werden, um optimale und insbesondere einheitliche und somit vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

4.3 Proliferation

Anhand des BrdU-Assays konnte eine strahlungsassoziierte Proliferationshemmung in Abhängigkeit von der Dosis und im Vergleich der Mediumzusätze nachgewiesen werden. Die Daten zeigten insgesamt eine signifikante ($p < 0,05$) Proliferationsregression bei den pADSCs-

hPL sowie pADSCs-FBS bereits nach 0,5 Gy (Abb. 10). Anhand der Daten konnte veranschaulicht werden, dass mit jeweils steigender Dosis auch die Proliferationsfähigkeit immer weiter abnahm. Nach 6 Gy war die BrdU-Inkorporation bei den pADSCs-FBS auf knapp die Hälfte (48,95%) und bei den pADSCs-PL noch weiter auf 37,01% gesunken. BAABE et al. (2018) konnten für pADSCs-FBS aus der Mamma eine progressive Reduktion des BrdU-Einbaus bei steigender Bestrahlungsdosis auf knapp 55% bei 6 Gy zeigen, was mit unseren Ergebnissen vergleichbar ist. Verschiedene Mechanismen können hierbei Ursache für die abnehmenden Proliferationsraten nach Radiatio sein. Abhängig vom Ausmaß der Zellschädigung, kann die Bestrahlung zu einem Zellzyklusarrest führen, um den Zellen Zeit für eine Reparatur von DNA-Schäden zu geben, oder zum anderen bei zu erheblichen Defekten zur Einleitung eines programmierten Zelltods, einer Apoptose, kommen. Während die sehr strahlensensiblen ESCs auf zellulären Stress und DNA-Schäden zu überwiegenden Teilen mit Apoptose reagieren, scheinen Mechanismen bei adulten Stammzellen vermehrt in Form von Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur zu greifen (LIU et al, 2014). Für adulte Stammzellen aus dem Knochenmark konnten CHEN et al. (2006) beobachten, dass sich 36 Stunden nach 9 Gy Bestrahlung im Vergleich zur nichtbestrahlten Kontrolle mehr BMSCs in der G1 und G2/ M-Phase befanden, was zeigt, dass die Checkpoint-Mechanismen in Reaktion auf zellulären Stress in BMSCs funktioniert haben. Auch für ADSCs aus der Maus konnte diese Tendenz bestätigt werden (MARIA et al., 2016). BAABE et al. (2018) konnten für pADSCs aus der Mamma eine um 2 % verringerte S-Phase-Fraktion nach Dosen von 2-8 Gy und gleichzeitig einen deutlichen Anstieg (73 % auf 86 %) in der G0/ G1-Phase-Fraktion zeigen. Dieser G1-Arrest nach Radiatio und der damit einhergehende prozentuell geringere Anteil von pADSCs in der S-Phase führte dazu, dass weniger Zellen für den Einbau des BrdUs in der S-Phase zur Verfügung standen und die Proliferationsrate somit sank. Wie bereits in BMSCs beobachtet (MEHRARA et al., 2010), könnte ein möglicher Mediator für einen Zellzyklusarrest in den pADSCs der Mamma das Protein p21 sein, welches bei Zellschädigung durch p53 aktiviert und über eine Hemmung von Cyclin-abhängigen Kinasen zu einem Zellzyklusarrest führt (BAABE et al., 2018).

Die oben aufgeführten Ergebnisse aus anderen Arbeitsgruppen beziehen sich alle auf pADSCs-FBS. Diese Arbeit ist unserem Kenntnisstand nach die erste, welche die zelluläre Strahlenantwort von pADSCs-hPL aus der Mamma untersucht. Bisher gibt es nur Studien zum Einfluss von hPL auf die pADSCs unabhängig von einer Radiatio. So konnten TROJAHN KÖLLE et al. (2013) zeigen, dass die CD-Oberflächenmarker und das Differenzierungspotential der pADSCs bei gleichzeitig signifikant höherer Proliferation durch die Verwendung von hPL als Serumersatz unbeeinflusst bleiben. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit, in welcher die Ausgangsproliferationsrate der pADSCs-hPL bei der unbestrahlten Kontrolle unter der der pADSCs-FBS lag, konnte KAKUDO et

al. (2019) für Fettstammzellen aus dem Abdomen zeigen, dass die pADSCs in 5 %igem hPL verglichen mit 0,1 % -, 1 % - und 3 %igem hPL sowie 10 %igem FBS, die höchste Proliferation zeigten. Allerdings wurde in der eben aufgeführten Studie PLTmax der Firma Merck verwendet, was die Frage aufwirft, ob die Zusammensetzung mit dem hPL von BioScience, wie in der vorliegenden Arbeit verwendet, vergleichbar und die Überlegenheit einer 5 %igen Konzentration des hPL somit reproduzierbar wäre. Die genauen Mechanismen hinter diesem proliferationssteigernden Effekt von hPL sind bisher spärlich untersucht. Beteiligt zu sein scheinen ERK 1/2, JNK, p38 und Akt, was multiple beteiligte Signalwege vermuten lässt (KAKUDO et al., 2019; LAI et al., 2018). Mögliche Veränderungen dieser Signalproteine und -wege durch eine Bestrahlung sollten in der Zukunft untersucht werden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Hemmung der Proliferation bei den pADSCs-hPL im direkten Vergleich zu den pADSCs-FBS stärker ausgeprägt war, wobei der Unterschied zwischen den Mediumzusätzen nicht signifikant war. Möglicherweise kommt es durch die Radiatio bei den pADSCs-hPL zu einer stärkeren Verschiebung der Zellen aus der S- in die G1/G0-Phase-Fraktion zur DNA-Reparatur, was die im Vergleich zu den pADSCs-FBS stärker abnehmende Proliferationsrate bei steigenden Bestrahlungsdosen erklären könnte. Die Wahl der Zeit der kolorimetrischen Messung von 48 Stunden nach Bestrahlung wurde aufgrund von Vorversuchen getroffen, da sich zu diesem Zeitpunkt laut Wachstumskurve sowohl die pADSCs-hPL sowie die pADSCs-FBS im logarithmischen Wachstum befunden haben. Die pADSCs in beiden Mediumzusätzen wiesen eine vergleichbare effiziente Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Radiatio auf (s. Kap. 3.3 DNA-Doppelstrangbrüche), weshalb mögliche weitere Gründe für die stärker verminderte Proliferation der pADSCs-hPL eine vermehrte Apoptoseinduktion oder Seneszenz sein könnten (RUSIN et al., 2021). Hier sei erwähnt, dass Untersuchungen an pADSCs der Maus, bisher aber nur in FBS, nach Bestrahlung mit 6 Gy niedrige Level apoptotischer Zellen zeigten (MARIA et al., 2016). Ziel zukünftiger Studien sollten weiterführende Untersuchung beispielsweise in Form eines Annexin-V-Tests für die Detektion früher Apoptose, LDH-Zytotoxizitätstest oder Zellzyklusanalysen sein, die bisher nur bei pADSCs-FBS durchgeführt wurden (CHEN et al., 2006; RÜHLE et al., 2018), um ein noch genaueres Verständnis für die zellulären Reaktionsmechanismen der pADSCs-hPL nach Radiatio zu erlangen.

4.4 DNA-Doppelstrangbrüche

Die Einwirkung von ionisierender Strahlung führt neben Schäden an Zellmembran und -organellen insbesondere zu Veränderungen der DNA. Neben DNA-Vernetzungen und Einzelstrangbrüchen (SSB) spielen insbesondere DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) eine bedeutende Rolle (MAH et al., 2010), welche mittels des γ H2AX-Assays immunhistochemisch sichtbar gemacht werden konnten. Schon ROGAKOU et al. (1998) konnten vor zwei Jahrzehnten zeigen, dass ionisierende Strahlung zu einer schnellen Phosphorylierung der Histonvariante H2AX am Serin 139, dann γ H2AX genannt, führt und in der strahleninduzierten Reparatur eine zentrale Position einnimmt. Diese reduzieren die Strahlensensitivität und erhöhen die Effektivität der DNA-Reparatur (MAH et al., 2010). Die Anzahl der γ H2AX-Foci korreliert dabei in einem Verhältnis von 1:1 mit der DSB (SEDELNIKOVA et al., 2002). Die maximale Anzahl von γ H2AX tritt 30 Minuten nach Bestrahlung auf, bleibt anschließend für 60 Minuten auf einem Niveau, bevor es zu einem Abfall kommt. Aus diesem Grund wurde die erste Fixierung der Zellen zu einem Zeitpunkt eine Stunde nach Bestrahlung gewählt, um die maximale Anzahl an induzierten γ H2AX zu erfassen (MAH et al., 2010). Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen ebenfalls fixiert, um die verbleibenden DSB nach abgeschlossenen Reparaturmechanismen zu detektieren (MAH et al., 2010). Auch wenn der γ H2AX-Assay bei klinisch relevanten Dosen über 100 mal sensitiver als die meisten anderen Methoden wie beispielsweise der Comet-Assay oder die Elektrophoresis sein soll (MAH et al., 2010), ist für das manuelle Auszählen der dreidimensional angeordneten γ H2AX-Foci im Zellkern genaues Arbeiten unabdingbar. Somit bleibt trotz größter Sorgfalt die händische Auswertung des Versuchs unter dem Mikroskop eine subjektive Vorgehensweise, welche als Fehlerquelle zu bedenken ist.

Die Daten unter Kap. 3.3 zeigen für die pADSCs nach Bestrahlung mit 2 Gy, verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle (0 Gy), eine signifikant höhere Anzahl an DSB und gleichzeitig nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion dieser. Diese Ergebnisse deuten auf frühe und effektive Reparaturmechanismen hin. Daten aus einer Studie zur Strahlensensitivität von pADSCs-FBS aus der Mamma zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen Dosis und durch ionisierende Strahlung induzierter DSB nach Bestrahlung der Zellen mit 0,5 bis 6 Gy (BAABE et al., 2018). Bei 2 Gy zeigte sich dabei innerhalb von 24 Stunden eine Reduktion von über 90 % der γ H2AX Foci/Zelle (BAABE et al., 2018). Auch die Arbeitsgruppe um MARIA et al. (2016) konnte zeigen, dass es bei pADSCs zu einer effektiven Behebung der durch ionisierende Strahlung induzierter DNA-Schäden kommt, wobei nach 24 Stunden erst ein leichter Abfall und dann nach 48 Stunden Post-Radiatio eine komplette Reduktion von γ H2AX zu beobachten war, welche dem Level der

Kontrolle entsprach. Erklären lässt sich diese verzögerte Reparatur möglicherweise über eine höhere Bestrahlungsdosis und der tierischen Herkunft der Zellen, die aus der Maus isoliert wurden. In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass sich in pADSCs-FBS der Maus innerhalb der ersten sechs Stunden nach Radiatio, verglichen mit mesenchymalen Krebszellen und Fibroblasten, die höchste Rate upregulierter DNA-Reparaturgene fand, was die Beobachtung früher und effektiver Reparatur von DNA-DSB unterstreicht (MARIA et al., 2016). Für die zelluläre Strahlenantwort nach ionisierender Strahlung spielen verschiedene Proteine und Kinasen eine wichtige Rolle. Die Entstehung von strahleninduzierten DSB führt zuerst zu einer Phosphorylierung von ATM, ATR und DNA-PK, welche ihrerseits die H2AX entlang der DSB phosphorylieren (BURMA et al., 2001; PARK et al., 2003; BARTKOVA et al., 2005; CHANOUX et al., 2009). ATM vermittelt außerdem über die Aktivierung von u.a. p53 und weiterhin dem Zellzyklusinhibitor p21 eine zelluläre Antwort in Form von Apoptose, Zellzyklusarrest und SIPS (engl.: Stress-induced premature Senescence) (HARRIS & LEVINE, 2005). Diese Aktivierung von ATM nach ionisierender Strahlung konnte bereits für ESC, BMSCs sowie pADSCs-FBS bestätigt werden (CHEN et al., 2006; MOMCILOVIĆ et al., 2009; MARIA et al., 2016). CHEN et al. (2006) konnte für BMSCs außerdem aufzeigen, dass die DSB mittels homologer Rekombination und nicht-homologer End-zu-Endverknüpfung repariert werden. Auch wenn anhand unserer Daten ähnliche Ergebnisse für humane pADSCs aus der Mamma zu vermuten sind, sollte es Ziel zukünftiger Studien sein, diese Mechanismen für pADSCs mit FBS und insbesondere mit hPL als Mediumzusatz nachzuweisen. Zusammenfassend sei zu sagen, dass zwischen den pADSCs-hPL und -FBS bei Anzahl der γ H2AX und anschließender Reduktion innerhalb von 24 Stunden kein signifikanter Unterschied detektiert werden konnte, was in Zusammenschau mit den vorherigen Versuchen auf eine vergleichbare zelluläre Strahlenantwort hindeutet. Des Weiteren war auffällig, dass 24 Stunden nach Bestrahlung in beiden Versuchsansätzen noch residuelle γ H2AX zu messen waren, deren Anzahl deutlich über der der unbestrahlten Kontrolle lag. Dies lässt auf eine unvollständige Reparatur der DNA-Schäden in den Zellen nach ionisierender Strahlung mit 2 Gy schließen. Für die pADSCs-FBS wurde dieses Phänomen bereits von BAABE et al. (2018) beschrieben und deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die Daten zeigten weiterhin auch für die unbestrahlten Zellen DSB, die für pADSCs-PL mit 0,23 und pADSCs-FBS mit 0,26 auf einem vergleichbaren Level lagen. Diese Veränderungen der DNA, auch unter physiologischen Bedingungen, lassen sich u.a. durch oxidativen Stress während des Zellzyklus und ATM-Autoaktivierung erklären (BARTKOVA et al., 2005; HUANG et al., 2006).

4.5 MMP2- und VEGF-Sekretion

Die pADSCs nehmen als multipotente Stammzellen mit ihrem enormen regenerativen Potential für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Fettgewebes, dem Geweberemodelling und der Anlockung anderer Zellen an bestimmte Gewebestellen eine zentrale Stellung ein (SHUKLA et al., 2015). Eine wichtige Rolle spielt dabei auch die Ausschüttung bestimmter Zytokine, welche für Aufgaben wie der Modulation der Immunfunktion sowie die Selbstregulation des Gewebes unabdingbar sind. Zwei dieser Zytokine sind das MMP2 und VEGF. Da diese beiden Faktoren für Wundheilungsprozesse, die Induktion von Angiogenese und Vaskulogenese in ihren Zielzellen sowie dem Gewebeumbau von besonderer Relevanz sind (SHUKLA et al., 2015; R&D SYSTEMS, 2019; ZHANG et al., 2020), liegt auf der Hand, dass Veränderungen dieser durch eine Strahlentherapie Auswirkungen auf das Gewebe haben. Faktisch waren die Effekte von mittleren Dosen ionisierender Strahlung auf das Zytokinmuster der pADSCs in der Literatur bisher kaum untersucht; insbesondere Daten unter Verwendung von hPL fehlten. Um in diesem Versuch somit die strahlenassoziierten Veränderungen der Zytokinausschüttung im Vergleich der beiden Mediumzusätze zu untersuchen, wurden die pADSCs jeweils mit einer Einzeldosis von 2 Gy bestrahlt. Wie bereits in Kap. 1.3.3 aufgeführt, enthalten die alpha-Granula der Plättchen ein breites Muster an Zytokinen und schlussendlich das hPL nach Lyse der Thrombozyten schon deutlich höhere Konzentration an VEGF als FBS (LAI et al., 2018). Deshalb wurden die Medienleerwerte von hPL und FBS als Blanks gemessen und jeweils von den Messwerten abgezogen, um ausschließlich die Zytokinkonzentrationen zu messen, die von den pADSCs ausgeschüttet wurden und keine Verfälschung durch Konzentrationsunterschiede im Medium zu haben. Die Daten zeigten für die pADSCs-hPL sowie -FBS nach Bestrahlung mit 2 Gy weder eine Konzentrationszunahme noch -abnahme für MMP2 und VEGF (Abb. 13 und 14), was für MMP-2 in der Literatur bestätigt wird (SCHRÖDER et al., 2019). EBRAHIMIAN et al. (2009) wiederum verzeichneten nach Bestrahlung von pADSCs-FBS eine 2,6-fache Abnahme der VEGF-Konzentration. Die Daten dieser Arbeit zeigten darüber hinaus, dass es zwischen den Mediumzusätzen vergleichsweise zu einer signifikant höheren VEGF- und MMP2-Ausschüttung der pADSCs-hPL kam (Abb. 13 und 14). Im Kontrast dazu konnte diese Beobachtung für BMSCs in 10 % hPL nicht gemacht werden (AZOUNA et al., 2012).

Das stetig wachsende Feld der regenerativen Medizin rückt das einfach und in relativ großen Mengen zu erreichende Fettgewebe immer mehr in den Fokus der Stammzellforschung, da die darin enthaltenen adulten Fettstammzellen mit ihrem Potential zur Geweberegeneration, immunmodulatorischen Eigenschaften und der Sekretion angiogener Faktoren großes Potential haben (SHUKLA et al., 2015). Das pro-angiogene und anti-apoptische VEGF ist dabei neben IL-

8 und IGF-1, um nur einige zu nennen, in der Modulation von strahlenassoziierten Schäden im Gewebe beteiligt (SHUKLA et al., 2015). Dieses Signalmolekül soll auch beim „cell-assisted lipotransfer enrichment“ (CAL), einer Anreicherung von Fetttransplantaten mit pADSCs, involviert sein (YOSHIMURA et al., 2020). Auch die ionisierende Strahlung mit geringen Dosen soll über eine erhöhte Ausschüttung von VEGF und MMP2 zu einem verbesserten Zellüberleben von Lipografts führen, wobei die Zytokin-vermittelte initial erhöhte Vaskularisierung entscheidenden Anteil daran haben soll (ADACHI et al., 2015). Konträr dazu konnten SCHRÖDER et al. (2019) bei Dosen unter 0,1 Gy und über 0,5 Gy keinerlei Veränderungen in der Konzentration des MMP2 beobachten; nur bei 0,5 Gy kam es zu einer signifikanten Konzentrationszunahme. Diskrepanzen sind hier vermutlich auch dem geschuldet, dass es bisher keine einstimmige Definition für niedrigdosierte ionisierende Strahlung in der Literatur gibt und diese somit zwischen den Studien variiert (SCHRÖDER et al., 2019). Interessant ist auch, dass HE et al. (2013) in einer Studie zu hepatozellulären Krebszellen zeigen konnten, dass es nach Bestrahlung des Gewebes zu einer erhöhten Invasivität der bestrahlten sowie nichtbestrahlten Bystanderleberzellen kommt, wobei einer Hochregulation des VEGF-MMP2-Weges auch hier eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird (He et al., 2013). Durch seine proangiogenen Eigenschaften und der vermehrten Sekretion unter hypoxischen Bedingungen wird dem VEGF aus pADSCs neben seinen positiven Effekten auf das umliegende Gewebe auch eine Rolle im Brustkrebswachstum zugeschrieben (SHUKLA et al., 2015), was für Brustrekonstruktion mittels pADSCs aber auch für das Restgewebe nach Mastektomie relevant ist, da hier eine Proliferationsförderung von residualen Brustkrebszellen fatal wäre. Diese Förderung von pADSCs auf Brustkrebszellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert (KUHBIER et al., 2014; ZHANG et al., 2020). Studien lassen dabei vermuten, dass hierbei von den pADSCs ausgeschüttete Chemokine eine entscheidende Rolle spielen. Eine Bestrahlung der Brust mit mittleren bis hohen Dosen scheint die sonst fördernde Wirkung der pADSCs-FBS auf Krebszellen umzukehren (BAAËE et al., 2018). Diese Ergebnisse zeigen den enormen Forschungsbedarf auf diesem Gebiet, wobei die Sekretion von Mediatoren wie Wachstumsfaktoren, Zyto- und Chemokinen wie VEGF und MMP2 von entscheidender Bedeutung für die Rekrutierung von endogenen Stammzellen, die Regeneration von geschädigtem Gewebe und die potentielle kanzerogene Wirkung der pADSCs ist. In diesem Versuch konnte durch eine Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy keine auf- oder abnehmenden Tendenzen im Hinblick auf die Zytokinausschüttung von VEGF und MMP2 festgestellt werden. Zur Kenntnis genommen werden sollte allerdings die signifikant erhöhte MMP2- und VEGF-Konzentrationen nach Kultivierung der pADSCs mit hPL im Vergleich zu FBS.

4.6. Mikrokerne

Mithilfe des Mikrokerntests konnten in dieser Arbeit chromosomale Aberrationen nach Einwirkung von ionisierender Strahlung (2 Gy) detektiert werden. Mikrokerne entstehen dabei durch Brüche der Chromosomen oder Verteilungsfehler dieser während der Metaphase nach Einwirkung einer genotoxischen Substanz oder ionisierender Strahlung (DECORDIER & KIRSCH-VOLDERS, 2006). In der Literatur wird der Mikrokerntest als verlässlicher Marker in Bezug auf Radiosensitivität, genomische Instabilität und Krebsrisiko beschrieben (HOLLAND et al., 2008; IARMARCOVAI et al., 2008; VRAL et al., 2011). Zu erwähnen sei hier dennoch kurz, dass das händische mikroskopische Auszählen der binukleären Zellen und anschließend der Mikrokerne als Fehlerquelle bedacht werden muss. Unserem Kenntnisstand nach gibt es bisher keine Daten zur Mikrokerntestung in pADSCs aus der Mamma als Folge ionisierender Strahlung. Die vorliegende Arbeit zeigte in den binukleären pADSCs-FBS im Vergleich zur Negativkontrolle (0 Gy) eine signifikant höhere Anzahl an Mikrokerne pro Zelle nach Radiatio (s. Kap. 3.5). Dieses Ergebnis unterstreicht die klastogene und mutagene Wirkung von ionisierender Strahlung, welche für die Entstehung von Krebs von Bedeutung ist (VRAL et al., 2011). Das verdeutlicht auch nochmals, weshalb es von Relevanz ist, dass sich die Forschung neben den Wirkungen ionisierender Strahlung auf das Tumorgewebe auch mit dem Einfluss auf das umliegende gesunde Gewebe auseinandersetzt. Die Stammzellen im Gewebe sind für die Gewebemöostase unentbehrlich, weshalb neue Kenntnisse über eine bestmögliche Schonung des gesunden Tumorumgebungsgewebes für sichere radioonkologische Therapien und die Vermeidung unerwünschter Nebeneffekte einer Strahlentherapie im Fokus der Forschung stehen sollten.

Wie bereits unter Kap. 3.5 angemerkt, konnte dieser Versuch nur mit den pADSCs-FBS durchgeführt werden, da es beim Versuchsansatz mit hPL 30 Minuten nach Cytochalasin B Zugabe zum Ablösen der Zellen kam. Neben einer Erhöhung der Einsaatdichte, einer Verringerung der Cytochalasin B Konzentration und Variation des Zugabezeitpunktes des Cytochalasin B nach Bestrahlung, wurde weiterhin die PDL-Beschichtung der Deckgläschen ausgesetzt und als letztes ein Heparin- sowie Ca^{2+} -freies hPL-Medium verwendet. Kein Versuchsansatz konnte die oben erwähnte Problematik lösen. Möglicherweise interagieren Bestandteile des hPL mit dem Cytochalasin B und verstärken dessen Wirkung, weshalb es nicht nur zu einer Hemmung der Zytokinese, sondern sofort zu einer Apoptose der Zellen kommt. Konträr dazu hat BERNARDI et al. (2014) eine Studie zu CHO-K1, einer sehr stabilen Nagetier-Zelllinie, eine Versuchsdurchführung mit hPL als Serumersatz und Cytochalasin B durchgeführt, wo obig beschriebene Probleme nicht aufgetreten sind. Welche Ursachen hinter der Nichtdurchführbarkeit des Mikrokerntests mit den pADSCs-hPL und der Nutzung von Cytochalasin B stecken, konnte in

dieser Arbeit nicht evaluiert werden und lassen den enormen Forschungsbedarf auf diesem Gebiet erahnen.

4.7 Ausblick

Die Nutzung von FBS als Serumersatz stellt in der *In-vitro*-Zellkultur verschiedenster Zelllinien und Primärzellen wie den pADSCs nach wie vor den Goldstandard dar. Aufgrund verschiedener Aspekte ist FBS in den letzten Jahren in die Kritik geraten. Hierzu zählen neben ethischen Standpunkten, die Variabilität zwischen einzelnen Chargen, Immunreaktionen bei therapeutischer Nutzung und Kontaminationen aufgrund der bovinen Herkunft dieses Mediumzusatzes (VAN DER VALK et al., 2018). Weiterhin sind bis jetzt nicht alle Komponenten im FBS bekannt bzw. konnten nicht genau definiert werden (HEMEDA et al., 2014). Somit ist insbesondere im Hinblick auf die Nutzung von Stammzellen in der regenerativen und onkologischen Medizin eine humane Alternative zu FBS unabdingbar. Neben diesen ethischen und infektiologischen Gesichtspunkten, ist der bovine Ursprung des FBS auch in der Kultivierung humaner Primärzellen als kritisch zu beurteilen, da es nicht optimal für die Kultivierung dieser geeignet ist. Das hat den Grund, dass eine humane Alternative das Mikroenviroment der pADSCs deutlich besser abbildet. Neben serumfreien Versuchsansätzen ist das humane Plättchenlysat eine dieser vielversprechenden Alternativen. Anzumerken sei hier, dass durch die Nutzung von hPL in der Zellkultur zwar ein verbessertes Zellkulturmodell dargestellt wird und die Ergebnisse zur zellulären Strahlenantwort näher an der Realität liegen, es aber zweifelsohne auch Grenzen des Zellmodells gibt, die für die Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf die Situation *in vivo* nicht zu vernachlässigen sind. Durch die Monokultur der pADSCs *in vitro* werden Faktoren wie Nachbarzellen im Fettgewebe oder beeinflussende Signalstoffe vernachlässigt, wie sie im Mikroenvironment im menschlichen Körper vorhanden sind. Ein daraus resultierender Vorteil ist allerdings, dass die Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Zellen selbst untersucht werden kann. Auch Faktoren wie der pH-, CO₂- und O₂-Wert können in der Zellkultur nur in einem gewissen Rahmen dargestellt werden und zudem kann eine Zellkultur in 2D die dreidimensionalen Gegebenheiten im menschlichen Körper nicht exakt abbilden, weshalb in der Zukunft weitere Versuche in einer 3D-Kultur durchgeführt werden sollten, um den Forschungsstand bis zum jetzigen Zeitpunkt zu verifizieren.

Die Verwendung von hPL als Serumersatz bringt diverse Vorteile mit sich. Neben der Nutzung eines Abfallproduktes, kann durch das Poolen eine enorme Charge-zu-Charge Variabilität und durch die humane Herkunft von hPL die Übertragung xenogener Krankheiten vermieden werden (HEMEDA et al., 2014). Demgegenüber stehen Gefahren wie die Übertragung hämatogener

Krankheiten und Kontaminationen des Batchs, welche jedoch durch die Kontrolle der Plättchenkonzentrate in qualifizierten Blutzentren auf ein Minimum reduziert werden können. Weiterhin ist eine standardisierte Herstellung des hPL bislang problematisch (HENSCHLER et al., 2019).

Durch das Rekapitulieren der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich feststellen, dass die zelluläre Strahlenantwort der pADSCs-hPL mit denen der pADSCs-FBS vergleichbar zu sein scheint. Das legt nahe, dass bisherige Ergebnisse zu strahlenassoziierten Veränderungen in Fettstammzellen, die mit FBS als Serumersatz durchgeführt wurden, Bestand haben (MARIA et al., 2016; BAABE et al., 2018; RÜHLE et al., 2018; SCHRÖDER et al., 2019). Während MSCs aus dem Knochenmark als strahlenresistent charakterisiert worden sind (CHEN et al., 2006; HE et al., 2019), hatten BAABE et al. (2018) die Strahlensensitivität von pADSCs-FBS aus der Brust mit der von strahlensensibleren (ZR-75-1, MCF-7) und der strahlenresistenten Linie (MCF10A) verglichen und anhand von Zellzyklusanalysen, p21-Expression und Reparatur von durch ionisierende Strahlung induzierten DNA-DSB eine mittlere Strahlensensitivität zeigen können.

Die Arbeitsgruppe um LIU et al. (2014) hat für adulte Stammzellen eine gewebespezifische Strahlensensitivität postuliert. Da ADSCs aus verschiedenen Geweben eine differente Wachstumskinetik aufweisen (HANSON et al., 2013; GUNETA et al., 2016), stellt sich folglich die Frage, inwieweit die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich der zellulären Strahlenantwort auf ADSCs aus dem abdominellen Fettgewebe übertragbar sind. Auch die Methoden zur Gewinnung der Fettstammzellen variieren von Resektion bis zur Fettabsaugung, was unweigerlich zu einer gewissen Heterogenität der *in vitro* untersuchten ADSCs führt und die Frage nach einer fehlenden Generalisierbarkeit aufwirft (BAJEK et al., 2016; KAKUDO et al., 2019). Diese klinisch relevanten Fragen sollten Gegenstand zukünftiger Forschung sein, um sichere radioonkologische Therapiekonzepte entwerfen und ADSCs in der Nutzung für die regenerative Medizin etablieren zu können. Dabei sollte ein Ziel sein, neben der effektiven Abtötung des Tumorgewebes die Schonung der Fettstammzellen aus der Mamma zu realisieren, da diese mit ihrer Erhaltung von Homöostase sowie Wundheilung und Regeneration des Brustfettgewebes nach Radiatio von enormer Bedeutung für den Therapieerfolg und die Vermeidung von Nebenwirkungen nach der Bestrahlungsbehandlung sein.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Nutzung von humanem Plättchenlysate (hPL) als alternativen Serumersatz für fetales Rinderserum (engl: fetal bovine serum, FBS) in der Kultur humaner adulter Stammzellen der Mamma (engl: pooled adipose derived stem cells, pADSCs), mit Fokus auf Analysen zur zellulären Strahlenantwort zu untersuchen. Diesbezüglich wurden verschiedene *In-vitro*-Methoden durchgeführt, mithilfe derer die Strahlenantwort der Fettstammzellen, welche entweder mit hPL (pADSCs-hPL) oder mit FBS (pADSCs-FBS) kultiviert wurden, charakterisiert werden sollte.

Zusammenfassend zeigten sich folgende Ergebnisse:

- In der Zellkultur wiesen die pADSCs-hPL im Vergleich zum Versuchsansatz mit FBS, bei dem die Stammzellen ein variables Erscheinungsbild von breit bis schmal hatten, eine homogenere spindelförmig-längliche Morphologie auf.
- Die pADSCs-hPL zeigten in der logarithmischen Wachstumsphase ein signifikant schnelleres Wachstum als die pADSCs-FBS, was sich in einer deutlich kürzeren Populationsverdopplungszeit widerspiegelte.
- Die Einwirkung von ionisierender Strahlung führte im BrdU-Assay zu einer signifikanten, regressiven Proliferationshemmung der pADSCs-hPL sowie -FBS mit steigenden Strahlungs Dosen. Die Hemmung war in den pADSCs-FBS im Vergleich zu den pADSCs-hPL weniger stark ausgeprägt.
- Der γ H2AX-Assay zeigte eine Stunde nach Bestrahlung mit 2 Gy für die pADSCs-hPL und -FBS eine ähnliche Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen.
- Die strahlenassoziierten DNA-Doppelstrangbrüche konnten bei pADSCs-hPL sowie -FBS innerhalb von 24 Stunden nach Bestrahlung signifikant reduziert werden, was auf eine vergleichbare Reparaturfähigkeit, unabhängig vom verwendeten Mediumzusatz, schließen ließ. Bei beiden Ansätzen waren 24 Stunden nach Bestrahlung noch residuelle DNA-Doppelstrangbrüche zu verzeichnen.
- Die Ausschüttung des angiogenetischen sowie regenerativen Zytokins MMP-2, gemessen mittels ELISA, blieb von der Bestrahlung unbeeinflusst, unabhängig vom Mediumzusatz.
- Die Bestrahlung mit 2 Gy führte zu einer numerischen, nicht signifikanten Konzentrationszunahme der VEGF-Sekretion bei den mit hPL und FBS kultivierten pADSCs.

- Der VEGF-Assay zeigte, dass bestrahlte sowie unbestrahlte pADSCs-hPL signifikant mehr VEGF ausschütteten als die pADSCs-FBS, auch die Konzentration des MMP-2 war bei den unbestrahlten pADSCs-hPL derer der pADSCs-FBS überlegen, was mittels ELISA gemessen wurde.
- Im Genotoxizitätstest waren nach Einwirkung von ionisierender Strahlung mit einer Dosis von 2 Gy signifikant mehr chromosomale Schäden in den pADSCs-FBS, gemessen anhand der Anzahl der Mikrokerne in den binukleären pADSCs-FBS, im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle nachweisbar.
- Eine Durchführung des Mikrokerntests mit pADSCs-hPL war nicht möglich.

Da bisherige strahlenbiologische Erkenntnisse zu pADSCs mit FBS als Goldstandard durchgeführt worden sind, dieser Mediumzusatz durch seine tierische Herkunft jedoch nicht dem natürlichen Mikroenvironment der Stammzellen *in vivo* entspricht, wurde in dieser Dissertation hPL als humane Alternative für die Kultur der pADSCs untersucht. Die Ergebnisse der Versuche deuten in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass die pADSCs-hPL eine zelluläre Strahlenantwort aufweisen, welche mit der der pADSCs-FBS vergleichbar ist.

6. Thesen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nutzung von humanem Plättchenlysät (hPL) als alternativer Mediumzusatz für fetales Rinderserum (FBS) in der Kultur humaner adulter Stammzellen der Mamma (pADSCs) untersucht, wobei der Fokus auf Analysen zur zellulären Strahlenantwort lag und die Ergebnisse der *In-vitro*-Experimente einer Beurteilung dienen sollten, inwiefern bisherige strahlenbiologische Erkenntnisse unter Verwendung von FBS somit auf hPL übertragbar sind.

In der Zellkultur wiesen die pADSCs-hPL im Vergleich zum Versuchsansatz mit FBS, bei dem die Stammzellen ein variables Erscheinungsbild von breit bis schmal hatten, eine homogenere spindelförmig-längliche Morphologie auf.

Die pADSCs-hPL zeigten in der logarithmischen Wachstumsphase ein signifikant schnelleres Wachstum als die pADSCs-FBS, was sich in einer deutlich kürzeren Populationsverdopplungszeit widerspiegelte.

Die Einwirkung von ionisierender Strahlung führte zu einer signifikanten, regressiven Proliferationshemmung der pADSCs-hPL sowie -FBS mit steigenden Strahlungsdosen, wobei die Hemmung in den pADSCs-FBS im Vergleich zu den pADSCs-hPL weniger stark ausgeprägt war.

Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy waren bei den pADSCs-hPL und -FBS eine ähnliche Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen zu vermerken.

Die strahlenassoziierten DNA-Doppelstrangbrüche konnten bei pADSCs-hPL sowie -FBS innerhalb von 24 Stunden nach Bestrahlung signifikant reduziert werden, was auf eine vergleichbare Reparaturfähigkeit schließen ließ, wobei unabhängig vom verwendeten Mediumzusatz 24 Stunden nach Bestrahlung noch residuelle DNA-Doppelstrangbrüche zu verzeichnen waren.

Die Ausschüttung des angiogenetischen sowie regenerativen Zytokins MMP-2 blieb von der Bestrahlung unbeeinflusst, unabhängig vom Mediumzusatz.

Die Bestrahlung mit 2 Gy führte zu einer numerischen, nicht signifikanten Konzentrationszunahme der VEGF-Sekretion bei den mit hPL und FBS kultivierten pADSCs.

Bestrahlte sowie unbestrahlte pADSCs-hPL schütteten signifikant mehr VEGF aus als die pADSCs-FBS, auch die Konzentration des MMP-2 war bei den unbestrahlten pADSCs-hPL derer der pADSCs-FBS überlegen.

Im Genotoxizitätstest waren nach Einwirkung von ionisierender Strahlung mit einer Dosis von 2 Gy signifikant mehr chromosomale Schäden in den pADSCs-FBS, gemessen anhand der Anzahl der Mikrokerne in den binukleären pADSCs-FBS, im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle nachweisbar.

V. Literaturverzeichnis

- ADACHI, N., KUBOTA, Y., KOSAKA, K., AKITA, S., SASAHARA, Y., KIRA, T., KURODA, M., MITSUKAWA, N., BUJO, H., & SATOH, K. (2015). Low-dose radiation pretreatment improves survival of human ceiling culture-derived proliferative adipocytes (ccdPAs) under hypoxia via HIF-1 alpha and MMP-2 induction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463(4), 1176–1183. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.079>
- ANGULO, A. F., REIJGERS, R., BRUGMAN, J., KROESEN, I., HEKKENS, F. E. N., CARLE, P., BOVÉ, J. M., TULLY, J. G., HILL, A. C., SCHOOLS, L. M., SCHOT, C. S., ROHOLL, P. J. M., & POLAK-VOGELZANG, A. A. (2000). *Acholeplasma vituli* sp. nov., from bovine serum and cell cultures. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1125–1131. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1125>
- AZOUNA, N., JENHANI, F., REGAYA, Z., BERRAEIS, L., OTHMAN, T., DUCROCQ, E., & DOMENECH, J. (2012). Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: Comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. *Stem Cell Research and Therapy*, 3(1), 6. <https://doi.org/10.1186/scrt97>
- BAABE, A., JUERß, D., REAPE, E., MANDA, K., & HILDEBRANDT, G. (2018). Promoting effects of adipose-derived stem cells on breast cancer cells are reversed by radiation therapy. *Cytotechnology*, 70(2), 701–711. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0172-6>
- BAABE, A., MACHOY, F., JUERß, D., BAAKE, J., STANG, F., REIMER, T., KRAPOHL, B. D., & HILDEBRANDT, G. (2018). Radiation sensitivity of adipose-derived stem cells isolated from breast tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19071988>
- BAEK, S. J., KANG, S. K., & RA, J. C. (2011). In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. *Experimental and Molecular Medicine*, 43(10), 596–603. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.10.069>
- BAER, P. C., GRIESCHE, N., LUTTMANN, W., SCHUBERT, R., LUTTMANN, A., & GEIGER, H. (2010). Human adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness. *Cytotherapy*, 12(1), 96–106. <https://doi.org/10.3109/14653240903377045>
- BAIK, S. Y., LIM, Y. A., KANG, S. J., AHN, S. H., LEE, W. G., & KIM, C. H. (2014). Effects of platelet lysate preparations on the proliferation of hacat cells. *Annals of Laboratory Medicine*, 34(1), 43–50. <https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.1.43>
- BAJEK, A., GURTOWSKA, N., OLKOWSKA, J., KAZMIERSKI, L., MAJ, M., & DREWA, T. (2016). Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 64(6), 443–454. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0394-x>
- BANAS, A., TERATANI, T., YAMAMOTO, Y., TOKUHARA, M., TAKESHITA, F., OSAKI, M., KAWAMATA, M., KATO, T., OKOCHI, H., & OCHIYA, T. (2008). IFATS Collection: In Vivo Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Mice with Liver Injury. *Stem Cells*, 26(10), 2705–2712. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0034>

- BARTHOLOMEW, A., STURGEON, C., SIATSKAS, M., FERRER, K., MCINTOSH, K., PATIL, S., HARDY, W., DEVINE, S., UCKER, D., DEANS, R., MOSELEY, A., & HOFFMAN, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, 30(1), 42–48. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00769-X](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00769-X)
- BARTKOVA, J., BAKKENIST, C. J., RAJPERT-DE MEYTS, E., SKAKKEBÆK, N. E., SEHESTED, M., LUKAS, J., KASTAN, M. B., & BARTEK, J. (2005). ATM activation in normal human tissues and testicular cancer. *Cell Cycle*, 4(6), 838–845. <https://doi.org/10.4161/cc.4.6.1742>
- BATES, S., RYAN, K. M., PHILLIPS, A. C., & VOUSDEN, K. H. (1998). Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21(Waf1/Cip1) expression. *Oncogene*, 17(13), 1691–1703. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202104>
- BERNARDI, M., ADAMI, V., ALBIERO, E., MADEO, D., RODEGHIERO, F., & ASTORI, G. (2014). Absence of micronucleus formation in CHO-K1 cells cultivated in platelet lysate enriched medium. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 66(2-3), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2013.11.001>
- BIEBACK, K., HECKER, A., KOCAÖMER, A., LANNERT, H., SCHALLMOSER, K., STRUNK, D., & KLÜTER, H. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*, 27(9), 2331–2341. <https://doi.org/10.1002/stem.139>
- BLAIR, P., & FLAUMENHAFT, R. (2009). Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*, 23(4), 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001>
- BOTH, S. K., VAN DER MUIJSENBERG, A. J. C., VAN BLITTERSWIJK, C. A., DE BOER, J., & DE BRUIJN, J. D. (2007). A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, 13(1), 3–9. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.0513>
- BOURIN, P., BUNNELL, B. A., CASTEILLA, L., DOMINICI, M., KATZ, A. J., MARCH, K. L., REDL, H., RUBIN, J. P., YOSHIMURA, K., & GIMBLE, J. M. (2013). 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 So. *Cytotherapy*, 15(6), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
- BROOKS, A. E. S., IMINITOFF, M., WILLIAMS, E., DAMANI, T., JACKSON-PATEL, V., FAN, V., JAMES, J., DUNBAR, P. R., FEISST, V., & SHEPPARD, H. M. (2020). Ex Vivo Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stromal Cells (ASC) Are a Heterogeneous Population That Demonstrate Rapid Culture-Induced Changes. *Frontiers in Pharmacology*, 10(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01695>
- BRZOSKA, M., GEIGER, H., GAUER, S., & BAER, P. (2005). Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(1), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.141>
- BURMA, S., CHEN, B. P., MURPHY, M., KURIMASA, A., & CHEN, D. J. (2001). ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42462–42467. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100466200>
- BURNOUF, T., STRUNK, D., KOH, M. B. C., & SCHALLMOSER, K. (2016). Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.065>

- BUTLER, M., & JENKINS, H. (1989). Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. *Journal of Biotechnology*, 12(2), 97–110. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(89\)90009-6](https://doi.org/10.1016/0168-1656(89)90009-6)
- CHANOUX, R. A., YIN, B., URTISHAK, K. A., ASARE, A., BASSING, C. H., & BROWN, E. J. (2009). ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *Journal of Biological Chemistry*, 284(9), 5994–6003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806739200>
- CHEN, M. F., LIN, C. T., CHEN, W. C., YANG, C. T., CHEN, C. C., LIAO, S. K., LIU, J. M., LU, C. H., & LEE, K. DER. (2006). The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 66(1), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.03.062>
- CHOLEWA, D., STIEH, T., SCHELLENBERG, A., BOKERMANN, G., JOUSSEN, S., KOCH, C., WALENDA, T., PALLUA, N., MARCINIAK-CZOCRA, A., SUSCHEK, C. V., & WAGNER, W. (2011). Expansion of adipose mesenchymal stromal cells is affected by human platelet lysate and plating density. *Cell Transplantation*, 20(9), 1409–1422. <https://doi.org/10.3727/096368910X557218>
- CHU, D. T., PHUONG, T. N. T., TIEN, N. L. B., TRAN, D. K., MINH, L. B., THANH, V. VAN, ANH, P. G., PHAM, V. H., & NGA, V. T. (2019). Adipose tissue stem cells for therapy: An update on the progress of isolation, culture, storage, and clinical application. *Journal of Clinical Medicine*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/jcm8070917>
- CRESPO-DIAZ, R., BEHFAR, A., BUTLER, G. W., PADLEY, D. J., SARR, M. G., BARTUNEK, J., DIETZ, A. B., & TERZIC, A. (2011). Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplantation*, 20(6), 797–811. <https://doi.org/10.3727/096368910X543376>
- DAVIS, J. M. (2002). *Basic Cell Culture. A Practical Approach*. 2nd Ed., Oxford University Press.
- DECORDIER, I., & KIRSCH-VOLDERS, M. (2006). The in vitro micronucleus test: From past to future. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 607(1), 2–4. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.04.008>
- DESSELS, C., POTGIETER, M., & PEPPER, M. S. (2016). Making the switch: Alternatives to fetal bovine serum for adipose-derived stromal cell expansion. *Frontiers in Cell and Developmental Biology, Frontiers Media S.A.*, 4(OCT), 115. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00115>
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., KRAUSE, D. S., DEANS, R. J., KEATING, A., PROCKOP, D. J., & HORWITZ, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- DORMONT, D. (1999). Transmissible spongiform encephalopathy agents and animal sera. *Developments in Biological Standardization*, 99, 25–34.
- DOUCET, C., ERNOU, I., ZHANG, Y., LLENSE, J. R., BEGOT, L., HOLY, X., & LATAILLADE, J. J. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *Journal of Cellular Physiology*, 205(2), 228–236. <https://doi.org/10.1002/jcp.20391>
- EBRAHIMIAN, T. G., POUZOULET, F., SQUIBAN, C., BUARD, V., ANDRÉ, M., COUSIN, B., GOURMELON, P., BENDERITTER, M., CASTEILLA, L., & TAMARAT, R. (2009). Cell therapy

- based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(4), 503–510. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.178962>
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2008). Guideline on human cell-based medicinal products. *EMA* (May), EMA/CHMP/410869/2006.
- FAZZINA, R., IUDICONE, P., FIORAVANTI, D., BONANNO, G., TOTTA, P., ZIZZARI, I. G., & PIERELLI, L. (2016). Potency testing of mesenchymal stromal cell growth expanded in human platelet lysate from different human tissues. *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0383-3>
- FENECH, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455(1–2), 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- FRIEDENSTEIN, A. J., PETRAKOVA, K. V, KUROLESOVA, A. I., & FROLOVA, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230–247.
- GIMBLE, J. M., BUNNELL, B. A., & GUILAK, F. (2012). Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regenerative medicine*, 7(2), 225–235. <https://doi.org/10.2217/rme.11.119>
- GOODHEAD, D. T. (1994). Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: Clustered damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), 7–17. <https://doi.org/10.1080/09553009414550021>
- GREEN, R. M. (2007). Can we develop ethically universal embryonic stem-cell lines? *Nature Reviews Genetics*, 8(6), 480–485. <https://doi.org/10.1038/nrg2066>
- GSTRAUNTHALER, G. (2003). Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *Altex*, 20(4), 275–281. <https://doi.org/10.1021/bp060121o>
- GUNETA, V., TAN, N. S., SUGII, S., LIM, T. C., WONG, T. C. M., & CHOONG, C. (2016). Comparative study of adipose-derived stem cells from abdomen and breast. *Annals of Plastic Surgery*, 76(5), 569–575. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000000797>
- HALL, E.J. (1994) The Physics and Chemistry of Radiation Absorption in: Radiobiology for the Radiologist. 4th Edition, *J. B. Lippincott Company*, Philadelphia, 1-13
- HALL, E., & GIACCIA, J. A. (2007). Radiobiology for the radiologist. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 34(6), 965–966. <https://doi.org/10.1007/s00259-007-0383-8>
- HANSON, S. E., KIM, J., & HEMATTI, P. (2013). Comparative analysis of adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from abdominal and breast tissue. *Aesthetic Surgery Journal*, 33(6), 888–898. <https://doi.org/10.1177/1090820X13496115>
- HARA, Y., STEINER, M., & BALDINI, M. G. (1980). Platelets as a Source of Growth-Dromotina Factor(s) for Tumor Cells. *Cancer Research*, 40(4), 1212–1216.
- HARRIS, S. L., & LEVINE, A. J. (2005). The p53 pathway: Positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17), 2899–2908. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208615>
- HE, M., DONG, C., REN, R., YUAN, D., XIE, Y., PAN, Y., & SHAO, C. (2013). Radiation enhances the invasiveness of irradiated and nonirradiated bystander hepatoma cells through a VEGF-MMP2 pathway initiated by p53. *Radiation Research*, 180(4), 389–397. <https://doi.org/10.1667/RR3355.1>

- HE, N., XIAO, C., SUN, Y., WANG, Y., DU, L., FENG, Y., LIU, Y., WANG, Q., JI, K., WANG, J., ZHANG, M., XU, C., & LIU, Q. (2019). Radiation Responses of Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Different Sources. *Dose-response: a publication of International Hormesis Society*, 17(4), 1–9. <https://doi.org/10.1177/1559325819893210>
- HEMEDA, H., GIEBEL, B., & WAGNER, W. (2014). Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 16(2), 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.004>
- HENSCHLER, R., GABRIEL, C., SCHALLMOSER, K., BURNOUF, T., & KOH, M. B. C. (2019). Human platelet lysate current standards and future developments. *Transfusion*, 59(4), 1407–1413. <https://doi.org/10.1111/trf.15174>
- HODGSON, J. (1995). To Treat or Not to Treat: That Is the Question for Serum. *Nature Biotechnology*, 13(4), 334–337. <https://doi.org/10.1038/nbt0495-333>
- HOFBAUER, P., RIEDL, S., WITZENEDER, K., HILDNER, F., WOLBANK, S., GROEGER, M., GABRIEL, C., REDL, H., & HOLNTHONER, W. (2014). Human platelet lysate is a feasible candidate to replace fetal calf serum as medium supplement for blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Cytotherapy*, 16(9), 1238–1244. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.04.009>
- HOLLAND, N., BOLOGNESI, C., KIRSCH-VOLDERS, M., BONASSI, S., ZEIGER, E., KNASMUELLER, S., & FENECH, M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 659(1–2), 93–108. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.007>
- HORN, P., BOKERMANN, G., CHOLEWA, D., BORK, S., WALENDA, T., KOCH, C., DRESCHER, W., HUTSCHENREUTHER, G., ZENKE, M., HO, A. D., & WAGNER, W. (2010). Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 12(7), 888–898. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.501788>
- HORWITZ, E. M., GORDON, P. L., KOO, W. K. K., MARX, J. C., NEEL, M. D., MCNALL, R. Y., MUUL, L., & HOFMANN, T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), 8932–8937. <https://doi.org/10.1073/pnas.132252399>
- HUANG, X., TANAKA, T., KUROSE, A., TRAGANOS, F., & DARZYNKIEWICZ, Z. (2006). Constitutive histone H2AX phosphorylation on Ser-139 in cells untreated by genotoxic agents is cell-cycle phase specific and attenuated by scavenging reactive oxygen species. *International Journal of Oncology*, 29(2), 495–501. <https://doi.org/10.3892/ijo.29.2.495>
- IARMARCOVAI, G., CEPPI, M., BOTTA, A., ORSIÈRE, T., & BONASSI, S. (2008). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 659(3), 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.05.006>
- IZADPANAH, R., TRYGG, C., PATEL, B., KRIEDT, C., DUFOUR, J., GIMBLE, J. M., & BUNNELL, B. A. (2006). Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of cellular biochemistry*, 99(5), 1285–1297. <https://doi.org/10.1002/jcb.20904>

- JOCHEMS, C. E. A., VAN DER VALK, J. B. F., STAFLEU, F. R., & BAUMANS, V. (2002). The use of fetal bovine serum: Ethical or scientific problem? *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 30(2), 219–227. <https://doi.org/10.1177/026119290203000208>
- JOHANSSON, L., KLINTH, J., HOLMQVIST, O., & OHLSON, S. (2003). Platelet lysate: A replacement for fetal bovine serum in animal cell culture? *Cytotechnology*, 42(2), 67–74. <https://doi.org/10.1023/B:CYTO.0000009820.72920.cf>
- JONSDOTTIR-BUCH, S. M., LIEDER, R., & SIGURJONSSON, O. E. (2013). Platelet Lysates Produced from Expired Platelet Concentrates Support Growth and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *PloS one*, 8(7), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068984>
- KAKUDO, MORIMOTO, MA, & KUSUMOTO. (2019). Differences between the Proliferative Effects of Human Platelet Lysate and Fetal Bovine Serum on Human Adipose-Derived Stem Cells. *Cells*, 8(10), 1218. <https://doi.org/10.3390/cells8101218>
- KAKUDO, N., MINAKATA, T., MITSUI, T., KUSHIDA, S., NOTODIHARDJO, F. Z., & KUSUMOTO, K. (2008). Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 122(5), 1352–1360. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181882046>
- KAUFMAN, M. H., & EVANS, M. J. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(July), 154–156.
- KIM, H., PRASAIN, N., VEMULA, S., FERKOWICZ, M. J., YOSHIMOTO, M., VOYTIK-HARBIN, S. L., & YODER, M. C. (2015). Human platelet lysate improves human cord blood derived ECFC survival and vasculogenesis in three dimensional (3D) collagen matrices. *Microvascular research*, 101, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2015.06.006>
- KOlios, G., & MOODLEY, Y. (2012). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85(1), 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
- KUHBIER, J. W., BUCAN, V., REIMERS, K., STRAUSS, S., LAZARIDIS, A., JAHN, S., RADTKE, C., & VOGT, P. M. (2014). Observed changes in the morphology and phenotype of breast cancer cells in direct co-culture with adipose-derived stem cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 134(3), 414–423. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000000525>
- KURODA, Y., KITADA, M., WAKAO, S., & DEZAWA, M. (2011). Bone marrow mesenchymal cells: How do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 59(5), 369–378. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0139-9>
- LAI, F., KAKUDO, N., MORIMOTO, N., TAKETANI, S., HARA, T., OGAWA, T., & KUSUMOTO, K. (2018). Platelet-rich plasma enhances the proliferation of human adipose stem cells through multiple signaling pathways. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0851-z>
- LEDENT, E., WASTESON, & BERLIN, G. (1995). Growth Factor Release during Preparation and Storage of Platelet Concentrates. *Vox Sanguinis*, 68(4), 205–209. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1995.tb02573.x>
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE DER ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN E. V. (AWMF), DEUTSCHEN KREBSGESELLSCHAFT E. V. (DKG) UND DEUTSCHEN KREBSHILFE (DKH) (2018). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. *AWMF*

- Online*, September, 32–45. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLk_S3_Mammakarzinom_2020-02.pdf, zuletzt besucht 02.03.2021
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE DER ARBEITSGEMEINSCHAFT DER WISSENSCHAFTLICHEN MEDIZINISCHEN FACHGESELLSCHAFTEN E.V. (AWMF), DEUTSCHEN KREBSGESELLSCHAFT E.V. (DKG) UND DEUTSCHEN KREBSHILFE (DKH) (2021). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. *AWMF Online*, Juni, 32–45. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.4/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.4.pdf, zuletzt besucht 10.06.2023
- LENNON, D., SOLCHAGA, L. A., SOMOZA, R. A., SCHLUCHTER, M. D., MARGEVICIUS, S., & CAPLAN, A. I. (2018). Human and rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells differ in their response to fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor. *Tissue Engineering - Part A*, 24(23–24), 1831–1843. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0126>
- LENSCH, M., MUISE, A., WHITE, L., BADOWSKI, M., & HARRIS, D. (2018). Comparison of synthetic media designed for expansion of adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Biomedicines*, 6(2), 1–7. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020054>
- LINDROOS, B., SUURONEN, R., & MIETTINEN, S. (2011). The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(2), 269–291. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9193-7>
- LIU, J. C., LEROU, P. H., & LAHAV, G. (2014). Stem cells: Balancing resistance and sensitivity to DNA damage. *Trends in Cell Biology*, 24(5), 268–274, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.03.002>
- LOHMANN, M., WALENDA, G., HEMEDA, H., JOUSSEN, S., DRESCHER, W., JOCKENHOEVEL, S., HUTSCHENREUTER, G., ZENKE, M., & WAGNER, W. (2012). Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS one*, 7(5), 14–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037839>
- LU, F., MIZUNO, H., UYSAL, C. A., CAI, X., OGAWA, R., & HYAKUSOKU, H. (2008). Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 121(1), 50–58. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000293876.10700.b8>
- LUND, P., PILGAARD, L., DUROUX, M., FINK, T., & ZACHAR, V. (2009). Effect of growth media and serum replacements on the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells. *Cytotherapy*, 11(2), 189–197. <https://doi.org/10.1080/14653240902736266>
- MAH, L. J., EL-OSTA, A., & KARAGIANNIS, T. C. (2010). gammah2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, 24(4), 679–686. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.6>
- MARIA, O. M., KUMALA, S., HERAVI, M., SYME, A., ELIOPOULOS, N., & MUANZA, T. (2016). Adipose mesenchymal stromal cells response to ionizing radiation. *Cytotherapy*, 18(3), 384–401. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.12.001>
- MARTIN, I., MURAGLIA, A., CAMPANILE, G., CANCEDDA, R., & QUARTO, R. (1997). Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology*, 138(10), 4456–4462. <https://doi.org/10.1210/endo.138.10.5425>

- MAZINI, L., ROCHETTE, L., AMINE, M., & MALKA, G. (2019). Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2523. <https://doi.org/10.3390/ijms20102523>
- MEHRARA, B. J., AVRAHAM, T., SOARES, M., FERNANDEZ, J. G., YAN, A., ZAMPELL, J. C., ANDRADE, V. P., CORDEIRO, A. P., & SORRENTO, C. M. (2010). p21 cip/WAF is a key regulator of long-term radiation damage in mesenchyme-derived tissues. *The FASEB Journal*, 24(12), 4877–4888. <https://doi.org/10.1096/fj.10-155762>
- MERRICK, D., SAKERS, A., IRGEBAY, Z., OKADA, C., CALVERT, C., MORLEY, M. P., PERCEC, I., & SEALE, P. (2019). Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 3(C), 305–311. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-82033-4.50032-5>
- MIRABET, V., SOLVES, P., MIÑANA, M. D., ENCABO, A., CARBONELL-UBEROS, F., BLANQUER, A., & ROIG, R. (2008). Human platelet lysate enhances the proliferative activity of cultured human fibroblast-like cells from different tissues. *Cell and Tissue Banking*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10561-007-9048-x>
- MITZEL-LANDBECK, L., HAGEN, U. (1976). Strahlenwirkung auf Biopolymere. *Chemie in unserer Zeit*, 10(3), 65–74, <https://doi.org/10.1002/ciuz.19760100302>
- MIZUNO, H. (2009). Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review. *Journal of Nippon Medical School*, 76(2), 56–66. <https://doi.org/10.1272/jnms.76.56>
- MIZUNO, H., & HYAKUSOKU, H. (2010). Review article: Fat grafting to the breast and adipose-derived stem cells: Recent scientific consensus and controversy. *Aesthetic Surgery Journal*, 30(3), 381–387. <https://doi.org/10.1177/1090820X10373063>
- MOMCILOVIĆ, O., CHOI, S., VARUM, S., BAKKENIST, C., SCHATTEN, G., & NAVARA, C. (2009). Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated-dependent checkpoint signaling and G(2) but not G(1) cell cycle arrest in pluripotent human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 27(8), 1822–1835. <https://doi.org/10.1002/stem.123>
- MUSINA, R. A., BEKCHANOVA, E. S., & SUKHIKH, G. T. (2005). Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 139(4), 504–509. <https://doi.org/10.1007/s10517-005-0331-1>
- NAAIJKENS, B. A., NIESSEN, H. W. M., PRINS, H. J., KRIJNEN, P. A. J., KOKHUIS, T. J. A., DE JONG, N., VAN HINSBERGH, V. W. M., KAMP, O., HELDER, M. N., MUSTERS, R. J. P., VAN DIJK, A., & JUFFERMANS, L. J. M. (2012). Human platelet lysate as a fetal bovine serum substitute improves human adipose-derived stromal cell culture for future cardiac repair applications. *Cell and Tissue Research*, 348(1), 119–130. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1360-5>
- ORFORD, K. W., & SCADDEN, D. T. (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: Genetic insights into cell-cycle regulation. *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 115–128. <https://doi.org/10.1038/nrg2269>
- OTA, K. I. (2008). Fuel Cells: Past, Present and Future. *IEEJ Transactions on Fundamentals and Materials*, 128(5), 329–332. <https://doi.org/10.1541/ieejfms.128.329>
- PADUANO, F., MARRELLI, M., AMANTEA, M., RENGO, C., RENGO, S., GOLDBERG, M., SPAGNUOLO, G., & TATULLO, M. (2017). Adipose tissue as a strategic source of mesenchymal stem cells in bone regeneration: A topical review on the most promising

- craniomaxillofacial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102140>
- PARK, E. J., CHAN, D. W., PARK, J. H., OETTINGER, M. A., & KWON, J. (2003). DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Research*, 31(23), 6819–6827. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg921>
- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S., & MARSHAK, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- PLANAT-BENARD, V., SILVESTRE, J. S., COUSIN, B., ANDRÉ, M., NIBBELINK, M., TAMARAT, R., CLERGUE, M., MANNEVILLE, C., SAILLAN-BARREAU, C., DURIEZ, M., TEDGUI, A., LEVY, B., PÉNICAUD, L., & CASTELLA, L. (2004). Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells: Physiological and Therapeutic Perspectives. *Circulation*, 109(5), 656–663. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000114522.38265.61>
- POTTEN, C. S., & LOEFFLER, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development (Cambridge, England)*, 110(4), 1001–1020. <https://doi.org/10.1242/dev.110.4.1001>
- PRICE, P. J. (2017). Best practices for media selection for mammalian cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 53(8), 673–681. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0186-6>
- R&D SYSTEMS, I. (2019). Total MMP-2 Immunoassay. *Bio-Techne Corporation, Minneapolis*. <https://www.bio-techne.com/datasheet-pdf?src=rnd&pdf=mmp200.pdf>, zuletzt besucht 08.05.2023
- R&D SYSTEMS, I. (2020). Human VEGF Immunoassay. *Bio-Techne Corporation, Minneapolis*. <https://www.bio-techne.com/datasheet-pdf?src=rnd&pdf=dve00.pdf>, zuletzt besucht 08.05.2023
- RAAJENDIRAN, A., OOI, G., BAYLISS, J., O'BRIEN, P. E., SCHITTENHELM, R. B., CLARK, A. K., TAYLOR, R. A., RODEHEFFER, M. S., BURTON, P. R., & WATT, M. J. (2019). Identification of Metabolically Distinct Adipocyte Progenitor Cells in Human Adipose Tissues. *Cell Reports*, 27(5), 1528-1540.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.010>
- ROGAKOU, E. P., PILCH, D. R., ORR, A. H., IVANOVA, V. S., & BONNER, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry*, 273(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
- RAUCH, C., FEIFEL, E., FLÖRL, A., PFALLER, K., & GSTRALTHALER, G. (2014). Human Platelet Lysates Promote the Differentiation Potential of Adipose-Derived Adult Stem Cell Cultures. *Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering*, 2(2), 39–48. <https://doi.org/10.12970/2311-1755.2014.02.02.1>
- RIIS, S., ZACHAR, V., BOUCHER, S., VEMURI, M. C., PENNISI, C. P., & FINK, T. (2015). Critical steps in the isolation and expansion of adipose-derived stem cells for translational therapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 17(Table 1), 1–11. <https://doi.org/10.1017/erm.2015.10>
- RIIS, S., NIELSEN, F. M., PENNISI, C. P., ZACHAR, V., & FINK, T. (2016). Comparative Analysis of Media and Supplements on Initiation and Expansion of Adipose-Derived Stem

- Cells. *Stem cells translational medicine*, 5(3), 314–324.
<https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0148>
- RILEY, T., SONTAG, E., CHEN, P., & LEVINE, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Analysis*, 9, 402–412. <https://doi.org/10.1038/nrm2395>
- ROBERT KOCH-INSTITUT (2021). Inzidenz des Mammakarzinoms in Deutschland 2018. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/Kid_2021/Kid_2021_c50_brust.Pdf?__blob=publicationFile, 86–89, zuletzt aufgerufen am 22.03.2022
- RODBELL, M. (1964). Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *The Journal of biological chemistry*, 239, 375–380.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14169133>
- ROSS, G. M. (1999). Induction of cell death by radiotherapy. *Endocrine-Related Cancer*, 6(1), 41–44. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0060041>
- RÜHLE, A., XIA, O., PEREZ, R. L., TRINH, T., RICHTER, W., SARNOWSKA, A., WUCHTER, P., DEBUS, J., SAFFRICH, R., HUBER, P. E., & NICOLAY, N. H. (2018). The Radiation Resistance of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Is Independent of Their Tissue of Origin. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 100(5), 1259–1269. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.01.015>
- RUSIN, M., GHOBRIAL, N., TAKACS, E., WILLEY, J. S., & DEAN, D. (2021). Changes in ionizing radiation dose rate affect cell cycle progression in adipose derived stem cells. *PLoS ONE*, 16(4 April 2021), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250160>
- SAFFORD, K. M., HICOK, K. C., SAFFORD, S. D., HALVORSEN, Y. D. C., WILKISON, W. O., GIMBLE, J. M., & RICE, H. E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2), 371–379. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00469-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00469-2)
- SALGADO, A. J., REIS, R. L., SOUSA, N., & GIMBLE, J. M. (2010). Adipose Tissue Derived Stem Cells Secretome: Soluble Factors and Their Roles in Regenerative Medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 5(2), 103–110.
<https://doi.org/10.2174/157488810791268564>
- SÁNCHEZ, A. R., SHERIDAN, P. J., & KUPP, L. I. (2003). Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 18(1), 93–103.
- SAUER, R. (2010) Allgemeine Onkologie in: Strahlentherapie und Onkologie. 5. Ausgabe, Elsevier GmbH, München, 21-77.
- SCHALLMOSER, K., BARTMANN, C., ROHDE, E., REINISCH, A., KASHOFER, K., STADELMEYER, E., DREXLER, C., LANZER, G., LINKESCH, W., & STRUNK, D. (2007). Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, 47(8), 1436–1446. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x>
- SCHALLMOSER, K., & STRUNK, D. (2009). Preparation of pooled human platelet lysate (pHPL) as an efficient supplement for animal serum-free human stem cell cultures. *Journal of Visualized Experiments*, 32. <https://doi.org/10.3791/1523>

- SCHALLMOSER, K., & STRUNK, D. (2013). Generation of a pool of human platelet lysate and efficient use in cell culture. *Methods in Molecular Biology*, 946, 349–362. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-128-8-22>
- SCHMITZ, S. (2009). *Der Experimentator: Zellkultur*. 4. Auflage, Springer Verlag GmbH. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2192-0>
- SCHMOLL, H.-J. (2020). Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie, continuously updated edition (Eds.), Springer Verlag GmbH <https://doi.org/10.1007/978-3-662-46764-0>
- Schröder, A., Kriesen, S., Hildebrandt, G., & Manda, K. (2019). First insights into the effect of low-dose X-ray irradiation in adipose-derived stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms20236075>
- SEDELNIKOVA, O. A., ROGAKOU, E. P., PANYUTIN, I. G., & BONNER, W. M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiation research*, 158(4), 486–492. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2002\)158\[0486:qdoiid\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2002)158[0486:qdoiid]2.0.co;2)
- SELVAGGI, T. A., WALKER, R. E., & FLEISHER, T. A. (1997). Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*, 89(3), 776–779. <https://doi.org/10.1182/blood.v89.3.776>
- SHAHDAFAR, A., FRØNSDAL, K., HAUG, T., REINHOLT, F. P., & BRINCHMANN, J. E. (2005). In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells: Choice of Serum Is a Determinant of Cell Proliferation, Differentiation, Gene Expression, and Transcriptome Stability. *Stem Cells*, 23(9), 1357–1366. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0094>
- SHIH, D. T. B., CHEN, J. C., CHEN, W. Y., KUO, Y. P., SU, C. Y., & BURNOUF, T. (2011). Expansion of adipose tissue mesenchymal stromal progenitors in serum-free medium supplemented with virally inactivated allogeneic human platelet lysate. *Transfusion*, 51(4), 770–778. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02915.x>
- SHUKLA, L., MORRISON, W. A., & SHAYAN, R. (2015). Adipose-Derived Stem Cells in Radiotherapy Injury: A New Frontier. *Frontiers in Surgery*, 2, 1. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2015.00001>
- SPEES, J. L., GREGORY, C. A., SINGH, H., TUCKER, H. A., PEISTER, A., LYNCH, P. J., HSU, S. C., SMITH, J., & PROCKOP, D. J. (2004). Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Molecular Therapy*, 9(5), 747–756. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.02.012>
- STÄHLE, M., CARLSSON, B., LE BLANC, K., KORSGREN, O., & KNUTSON, F. (2010). Photochemical pathogen inactivation of human serum enables its large-scale application in clinical cell transplantation. *Vox Sanguinis*, 98(3 A), 2009–2010. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01257.x>
- STREM, B. M., HICOK, K. C., ZHU, M., WULUR, I., ALFONSO, Z., SCHREIBER, R. E., FRASER, J. K., & HEDRICK, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio Journal of Medicine*, 54(3), 132–141. <https://doi.org/10.2302/kjm.54.132>
- TAKAHASHI, K., & YAMANAKA, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

- THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S., & JONES, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- TIMPER, K., SEBOEK, D., EBERHARDT, M., LINSCHIED, P., CHRIST-CRAIN, M., KELLER, U., MÜLLER, B., & ZULEWSKI, H. (2006). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(4), 1135–1140. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.072>
- TOYSERKANI, N. M., CHRISTENSEN, M. L., SHEIKH, S. P., & SØRENSEN, J. A. (2015). Adipose-Derived Stem Cells: New Treatment for Wound Healing? *Annals of Plastic Surgery*, 75(1), 117–123. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000000083>
- TROJAHN KØLLE, S. F., OLIVERI, R. S., GLOVINSKI, P. V., KIRCHHOFF, M., MATHIASSEN, A. B., ELBERG, J. J., ANDERSEN, P. S., DRZEWIECKI, K. T., & FISCHER-NIELSEN, A. (2013). Pooled human platelet lysate versus fetal bovine serum-investigating the proliferation rate, chromosome stability and angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells intended for clinical use. *Cytotherapy*, 15(9), 1086–1097. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.01.217>
- UMENO, Y., OKUDA, A., & KIMURA, G. (1989). Proliferative behaviour of fibroblasts in plasma-rich culture medium. *Journal of Cell Science*, 94(3), 567–575.
- VAN DER VALK, J., BRUNNER, D., DE SMET, K., FEX SVENNINGSEN, Å., HONEGGER, P., KNUDSEN, L. E., LINDL, T., NORABERG, J., PRICE, A., SCARINO, M. L., & GSTRAUNTHALER, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1053–1063. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>
- VAN DER VALK, JAN, BIEBACK, K., BUTA, C., COCHRANE, B., DIRKS, W. G., FU, J., HICKMAN, J. J., HOHENSEE, C., KOLAR, R., LIEBSCH, M., PISTOLLATO, F., SCHULZ, M., THIEME, D., WEBER, T., WIEST, J., WINKLER, S., & GSTRAUNTHALER, G. (2018). Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*, 35(1), 99–118. <https://doi.org/10.14573/altex.1705101>
- VRAL, A., FENECH, M., & THIERENS, H. (2011). The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*, 26(1), 11–17. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq078>
- WEBER, K.-J., WENZ, F. (2006). Strahlenbiologische Grundlagen In: Wannemacher Michael (Hrsg.), Debus, J., Wenz, F., Strahlentherapie, *Springer Verlag GmbH*, 11-48
- WITZENEDER, K., LINDENMAIR, A., GABRIEL, C., HÖLLER, K., THEIß, D., REDL, H., & HENNERBICHLER, S. (2013). Human-derived alternatives to fetal bovine serum in cell culture. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 40(6), 417–423. <https://doi.org/10.1159/000356236>
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2011). Annex 4, WHO guidelines on good manufacturing practices for blood establishments. *WHO Technical Report Series*, 961, 148–214.
- YOSHIMURA, K., SHIGEURA, T., MATSUMOTO, D., SATO, T., TAKAKI, Y., AIBA-KOJIMA, E., SATO, K., INOUE, K., NAGASE, T., KOSHIMA, I., GONDA, K. (2006) Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction

- aspirates. *Journal of cellular physiology*, 208(1), 64-76. doi: 10.1002/jcp.20636. PMID: 16557516.
- YOSHIMURA, K., SATO, K., AOI, N., KURITA, M., HIROHI, T., & HARI, K. (2020). Cell-Assisted Lipotransfer for Cosmetic Breast Augmentation: Supportive Use of Adipose-Derived Stem/Stromal Cells. *Aesthetic Plastic Surgery*, 44(4), 1258–1265. <https://doi.org/10.1007/s00266-020-01819-7>
- ZHANG, J., LIU, Y., CHEN, Y., YUAN, L., LIU, H., WANG, J., LIU, Q., & ZHANG, Y. (2020). Adipose-Derived Stem Cells: Current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. *Stem cells international*, 2020, 8810813. <https://doi.org/10.1155/2020/8810813>
- ZUK, P. (2013). Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells*, 2013(1), 1–35. <https://doi.org/10.1155/2013/713959>
- ZUK, P. A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J. W., KATZ, A. J., BENHAIM, P., LORENZ, H. P., & HEDRICK, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>
- ZUK, PATRICIA A., ZHU, M., ASHJIAN, P., DE UGARTE, D. A., HUANG, J. I., MIZUNO, H., ALFONSO, Z. C., FRASER, J. K., BENHAIM, P., & HEDRICK, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0105>

VI. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit und die freundliche Betreuung.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich beim gesamten Team des strahlenbiologischen Labors und bei allen weiteren Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie für die tolle Arbeitsatmosphäre, die anregenden Gespräche und die stetige Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt außerdem Frau PD Dr. rer. nat. Katrin Manda und Frau Dr. rer. nat. Annemarie Schröder für Ihre intensive Betreuung und immense Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit. Den regelmäßigen Austausch, die konstruktiven Anregungen und Ihr stets offenes Ohr habe ich immer als große Ermutigung und Hilfe empfunden.

Weiterhin danke ich von ganzem Herzen Shahana Hohlweg für ihre stetige Geduld und die emotionale Unterstützung. Du hast mir immer den Rücken freigehalten.

Zum Abschluss möchte ich meinen Eltern danken, die nie aufgehört haben an mich zu glauben, mich auf jedem Schritt meines akademischen und persönlichen Werdegangs unterstützt haben und denen ich diese Arbeit widme.

VII. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden.

Rostock, den 19.06.2023

Marit Langethal

VIII. Curriculum Vitae

Persönliche Informationen

Name: Marit Frederike Langenthal
Geburtsdatum: 07.12.1995
Geburtsort: Kassel
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

2002 - 2006 Besuch der Grundschule, Fahrenkrug
2006 - 2015 Besuch des Gymnasiums Dahlmansschule, Bad Segeberg
2015 Erreichen der Allgemeinen Hochschulreife

Medizinische Ausbildung

2016 - 2023 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
09 / 2018 Bestehen des Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04 / 2019 Beginn der Dissertation in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt
10 / 2021 Bestehen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
05 / 2022 - 04 / 2023 Praktisches Jahr
05 / 2023 Bestehen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

05 / 2022 - 09 / 2022 Universitätsmedizin Rostock
Klinik und Poliklinik für Venerologie und Dermatologie
09 / 2022 - 12 / 2022 Universitätsmedizin Rostock
Abteilung für Innere Medizin
- Endokrinologie
- Hämatologie und Onkologie

12 / 2022 - 04 / 2023 Klinikum Südstadt Rostock
Klinik für Hand-, Wirbelsäulen- und Unfallchirurgie

Famulaturen

02 / 2019 Universitätsklinik Lübeck, Klinik für Kinder- u. Jugendmedizin
Abteilung für Hämatologie und Onkologie

08 / 2019 Universitätsmedizin Rostock
Abteilung für Neurologie

09 / 2019 Klinikum Südstadt Rostock
Abteilung für Gastroenterologie

02 / 2020 MVZ der Universitätsmedizin Rostock
Abteilung für Strahlentherapie

07 / 2020 Praxis für Allgemeinmedizin
Katy Klook, Rostock

02 / 2021 Praxis für Dermatologie
Dr. med. Maren Horne, Rostock

Auslandsaufenthalte

09 / 2015 - 05 / 2016 Freiwilliges ökologisches Jahr in Neuseeland über die Organisation
„Experiment e.V.“