

**„*In-vitro*-Analyse zur Wirkung ionisierender
Strahlung auf *Adipose-derived stem cells* der
weiblichen Brust“**

Kumulative Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Frau Annemarie Schröder, geborene Baaße

geb. am 09.11.1989 in Teterow

aus Rostock

Rostock, den 14.07.2020

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Rostock angefertigt.

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

Gutachter:

1. Gutachter

Prof. Reinhard Schröder

Institut für Biowissenschaften Abt. Genetik, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Guido Hildebrandt

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Universitätsmedizin
Rostock

3. Gutachter:

Prof. Fritz-Olaf Lehmann

Institut für Biowissenschaften Abt. Tierphysiologie, Universität
Rostock

Datum der Einreichung: 15.07.2020

Datum der Verteidigung: 11.01.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Liste der Publikationen	VI
Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1 Stammzellen	1
1.1.1 Klassifizierung von Stammzellen	1
1.1.2 Die Stammzellnische	2
1.1.3 Stammzelltherapien	3
1.2 Adipose-derived stem cells (ADSCs)	5
1.2.1 Begriffsdefinition	5
1.2.2 Stammzellnische von ADSCs im weiblichen Brustfettgewebe.....	5
1.2.3 Wechselwirkung von ADSCs mit Brustkrebszellen.....	6
1.3 Ionisierende Strahlung –Röntgenstrahlung	7
1.3.1 Biologische Strahlenwirkung	7
1.3.2 Strahleninduzierter Bystandereffekt	9
1.3.3 Immunmodulierender Effekt niedrig dosierter Strahlung	9
2 Zielstellung	11
3 Diskussion	12
3.1 Interaktionen zwischen ADSCs und Brustkrebszellen	12
3.1.1 Eigenschaften isolierter ADSCs	12
3.1.2 Effekt unbestrahlter ADSCs auf Brustkrebszellen	13
3.1.3 Strahleninduzierter Bystandereffekt von ADSCs auf MCF-7 Brustkrebszellen	13
3.1.4 Klinische Relevanz	14

3.2 Sensitivität von ADSCs gegenüber Bestrahlung mit hohen und niedrigen Photonenenergien.....	15
3.2.1 Zellbiologische Effekte in ADSCs infolge hoch dosierter Photonenbestrahlung	15
3.2.2 Zellbiologische Effekte in ADSCs infolge niedrig dosierter Photonenbestrahlung	17
3.2.3 Klinische Relevanz	19
3.3 Heterogenität von ADSCs	20
4 Abschließende Betrachtung	22
5 Publikationen	23
5.1 Publikation 1: Promoting effects of adipose-derived stem cells on breast cancer cells are reversed by radiation therapy.....	23
5.2 Publikation 2: Radiation Sensitivity of Adipose-Derived Stem Cells Isolated from Breast Tissue	35
5.3 Publikation 3: First Insights into the Effect of Low-Dose X-Ray Irradiation in Adipose-Derived Stem Cells	51
Erklärung über den Eigenanteil an den Publikationen	i
Literaturverzeichnis	iii
Danksagung und Förderung	x
Selbständigkeitserklärung	xi
Publikationen und Kongressbeiträge	xii
Curriculum Vitae	xiii

Abkürzungsverzeichnis

ADSCs	adipose-derived stem cells
AS-Zellen	adulte Stammzellen
CD	cluster of differentiation
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ER	Östrogenrezeptor (engl. Estrogene receptor)
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
eV	Elektronenvolt
Gy	Gray
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen
HS-Zellen	hämatopoetische Stammzellen
IFATS	International Fat Applied Technology Society
IPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
IR	ionizing radiation, deutsch: ionisierende Strahlung
kV	Kilovolt
LD	low-dose
LD-RT	Low-dose radiotherapy
mGy	milli Gray
MMP2	Matrix-Metalloprotease-2
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, Engl.: messenger ribonucleic acid
MSCs	mesenchymal stem cells
MV	Megavolt
nm	Nanometer
ROS	reaktive oxidative Spezies
SMAD	Sma (Small body size) Mad (Mother against decapentaplegic)
TGF- β 1	Transformierender Wachstumsfaktor- β 1, engl.: transforming growth factor 1 β
VEGF	Endothelwachstumsfaktor, engl.: Vascular Endothelial Growth Factor

Liste der Publikationen

- Baaße, A.; Juerß, D.; Reape, E.; Manda, K.; Hildebrandt, G. . **Promoting effects of adipose-derived stem cells on breast cancer cells are reversed by radiation therapy.** *Cytotechnology* 2018, 70, 701–711, . <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0172-6>.

- Baaße, A.; Machoy, F.; Juerß, D.; Baake, J.; Stang, F.; Reimer, T.; Krapohl, B.; Hildebrandt, G. **Radiation Sensitivity of Adipose-Derived Stem Cells Isolated from Breast Tissue.** *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1988, doi:10.3390/ijms19071988.

- Schröder, A.; Kriesen, S.; Hildebrandt, G.; Manda, K. **First Insights into the Effect of Low-Dose X-Ray Irradiation in Adipose-Derived Stem Cells.** *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 6075.

Zusammenfassung

Innerhalb des Brustgewebes sind *Adipose-derived stem cells* (ADSCs) für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase verantwortlich. Dieses Potenzial kann jedoch auch zu dem unerwünschten Effekt der Tumorförderung beitragen. Hierbei ist weitestgehend unbekannt, inwieweit die Exposition von ADSCs mit ionisierender Strahlung, die in der Behandlung von Brustkrebspatientinnen routinemäßig zur Anwendung kommt, diese Interaktionen beeinflusst. Daher beschäftigte sich diese Arbeit mit der Wirkung ionisierender Strahlung auf selbst isolierte ADSCs der weiblichen Brust.

Insgesamt zeigte sich, dass die Strahlenexposition von ADSCs deren Interaktion mit Brustkrebszellen beeinflusst. So verbesserten einerseits unbestrahlte oder mit niedrigeren Dosen behandelte ADSCs das Wachstum und das klonogene Überleben von MCF-7-Brustkrebszellen, wohingegen die Verwendung höherer Strahlendosen eine Umkehr dieser Effekte zur Folge hatte. Dieser, über ADSCs vermittelte strahleninduzierte Bystandereffekt, bewirkt demnach sowohl Kurzzeit- (Wachstum) als auch Langzeiteffekte (klonogenes Überleben) in MCF-7-Brustkrebszellen. Dabei zeigte sich in Bezug auf die Wachstumsinhibition eine Abhängigkeit von der Strahlendosis, wohingegen das klonogene Überleben unabhängig von der Dosis applizierter ionisierender Strahlung gleichermaßen gesenkt wurde. Im Gegensatz dazu, konnten keine Effekte ko-kultivierter ADSCs auf die Strahlensensitivität von MCF-7-Brustkrebszellen nachgewiesen werden.

Analysen zur Wirkung ionisierender Strahlung auf die ADSCs selbst, ergaben eine mittlere Strahlenempfindlichkeit dieser Stammzellen, gekennzeichnet durch eine hohe Reparaturkapazität von DNS-Doppelstrangbrüchen. Die in diesem Zusammenhang festgestellte Zunahme des Anteils bestrahlter ADSCs im G2M-Zellzyklusarrest und die gleichzeitige Erhöhung der Expression des Cyclin-abhängigen Kinase- (CDK) Inhibitors p21 deuteten hierbei auf funktionelle Reparaturmechanismen hin.

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Niedrigdosisbestrahlung unterhalb von 0,1 Gy proliferationsfördernd auf die ADSCs wirkt, während weder zytoto- noch genotoxische Schädigungen auftraten. Dieser Effekt könnte innerhalb regenerativer Therapieansätze genutzt werden, um den Therapieerfolg zu optimieren.

Zusammenfassend konnte innerhalb dieser Arbeit ionisierende Strahlung als ein Regulationsfaktor der Stammzellnische von ADSCs identifiziert werden.

1. Einleitung

Laut aktueller Inzidenzrate erkrankt in Deutschland eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. So wurde im Jahr 2016 bei 69.000 Frauen ein Mammakarzinom diagnostiziert (Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts, 2019). Diese hohe Fallzahl verdeutlicht die Relevanz, mögliche Einflussfaktoren auf die Tumorentwicklung und Therapie zu untersuchen. Besonders Interaktionen mit benachbarten Stammzellen könnten in Zukunft einen besseren Einblick in den Verlauf der Karzinogene des Brusttumors geben und Angriffspunkte für die Etablierung verbesserter Therapieformen aufzeigen. Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit der Wirkung ionisierender Strahlung, die in der Behandlung von Brustkrebspatienten routinemäßig zur Anwendung kommt, auf adulte Stammzellen des Brustfettgewebes und deren Interaktion mit Brustkrebszellen.

1.1 Stammzellen

Das Brustgewebe der Frau unterliegt einem starken Wandel, der sich in Zeiten der Pubertät, im Verlauf des Menstruationszyklus, in der Schwangerschaft und schließlich im Übergang zur Menopause vollzieht. Maßgeblich beteiligt sind hierbei gewebespezifische Stammzellen (Briskin & Duss, 2007).

1.1.1 Klassifizierung von Stammzellen

Stammzellen definieren sich durch ihr unbegrenztes Potenzial zur Selbsterneuerung und ihrer Fähigkeit sich in mindestens einen Typ hoch differenzierter Nachkommen zu differenzieren (Watt & Hogan, 2000). Hierbei wird anhand ihres Entwicklungspotenzials zwischen totipotenten, pluripotenten, multipotenten, oligopotenten und unipotenten Stammzellen unterschieden. Totipotente Stammzellen sind in der Lage sich in jegliche Zellart zu spezialisieren und so einen kompletten Organismus aufzubauen. Sie befinden sich beispielsweise in der humanen Zygote bis zum 8-Zellstadium. In der weiteren Entwicklung zum Blastocysten, dem fünften Tag der Embryonalentwicklung, verfügen die Zellen der inneren Zellmasse über eine pluripotente Kapazität, d. h. sich in alle Zelltypen der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm zu entwickeln, wobei sich aus diesen Zellen jedoch kein kompletter Organismus mehr formen kann. Mit Einnistung der Blastozyste verlieren diese Stammzellen ihr Pluripotenz, woraufhin sie lediglich in Zelltypen differenzierbar sind, die demselben Keimblatt entstammen – dementsprechend gelten sie als

multipotent. Im Weiteren sind oligopotente Stammzellen in der Lage sich in einige wenige Zelltypen zu differenzieren und unipotente Zellen können sich wiederum nur in die Zellen des eigenen Typs entwickeln (Zakrzewski *et al.*, 2019).

Werden Stammzellen nach ihrem Ursprung klassifiziert, wird zwischen embryonalen (ES-Zellen), adulten (AS-Zellen) und induzierten pluripotenten Stammzellen (IPS-Zellen) unterschieden. Wie bereits im Vorherigen beschrieben wurde, können ES-Zellen nur zu einem spezifischen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung isoliert werden, während AS-Zellen in allen Geweben des gereiften Körpers zu finden sind. Der Begriff der AS-Zelle umfasst sowohl multipotente (z. B. hämatopoetische Stammzellen, HS-Zellen) als auch oligo- (z. B. lymphoide Stammzellen) und totipotente Stammzellen (Fibroblasten). IPS-Zellen sind hingegen ursprünglich totipotente, somatische Zellen, die mit Hilfe der genetischen Reprogrammierung pluripotente Eigenschaften gewinnen (Cieślak-Pobuda *et al.*, 2017; Takahashi & Yamanaka, 2006; Wasik *et al.*, 2014).

1.1.2 Die Stammzellnische

Stammzellen replizieren über symmetrische oder asymmetrische Zellteilung (Martin, 2009; Shahriyari & Komarova, 2013). Während die symmetrische Zellteilung die Wiederbesiedlung der Nische mit undifferenzierten Stammzellen ermöglicht, bewahrt die asymmetrische Zellteilung den Stammzellpool und gleichzeitig die Homöostase innerhalb des Gewebes (Molofsky *et al.*, 2004). Hierbei wird das Schicksal der Stammzelle über Zell-Zellverbindungen und molekulare Signalstoffe von ihrem spezialisierten Mikromilieu kontrolliert (Pennings *et al.*, 2018; s. S. 4, Abb. 1). Die Gesamtheit dieser externen Einflussfaktoren wird als Stammzellnische (Schofield, 1978) bezeichnet. Ohlstein *et al.* (2004) definieren im Weiteren die Stammzellnische als einen spezialisierten Ort in einem Gewebe, an dem sich Stammzellen auf unbestimmte Zeit befinden und Tochterzellen produzieren können, während sie sich selbst erneuern. Somit ist die zentrale Funktion der Stammzellnische, den undifferenzierten Status der Stammzelle zu erhalten und bei Verlust dieser, neue Stammzellen zu rekrutieren. Diese können sehr unterschiedlich sein und werden funktionell in simple, komplexe und Lagerungsnischen eingruppiert (Morrison & Spradling, 2008; Ohlstein *et al.*, 2004). Während Stammzellen in simplen Stammzellnischen lediglich über spezifische Adhäsionsmoleküle mit anderen Stammzellen interagieren (z. B. Epithelgewebe), wird das Schicksal der Stammzelle in komplexen Nischen von unterschiedlichen Zelltypen (z. B. Fibroblasten, Perizyten, Endothelzellen, Makrophagen) und

gewebespezifischen, der extrazellulären Matrix, sekretierten Faktoren und physikalischen Faktoren bestimmt (s. Abb. 1).

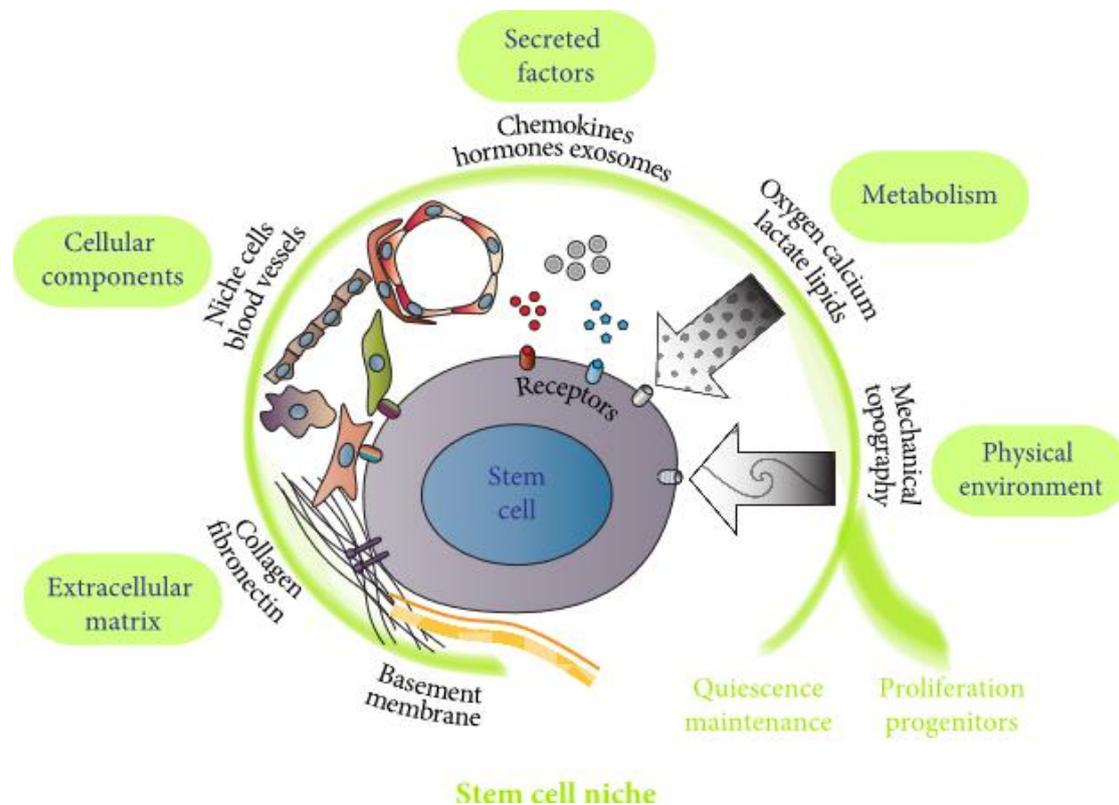


Abbildung 1. Schema der Einflussfaktoren innerhalb einer Stammzellnische nach Pennings *et al.*, 2018: Die residuale Stammzelle wird von Wechselwirkungsfaktoren und Komponenten der Mikroumgebung reguliert, wobei die Architektur der Nische und dessen Komponente variieren können. Nischenelemente können sein Fibroblasten, mesenchymale Stammzellen, Perizyten, Endothelzellen, Makrophagen, gewebespezifische Nischenarchitekturzellen und die interagierenden Rezeptoren, extrazelluläre Matrix (Kollagen, Fibronectin, Basalmembran und die interagierenden Integrine), sekretierte Faktoren (Exosomen, Chemokine, Hormone und die Signalrezeptoren); Stoffwechsel produzierende Nährstoffe und Redoxzustand sowie deren Kanäle und Transporter; und physikalische Kräfte innerhalb der Nischenarchitektur und der entsprechenden Mechanorezeptoren.

Stammzellen in Lagerungsnischen befinden sich hingegen in einer Art Ruhephase, wobei keine Zellteilung stattfindet. Sie dienen der Rekrutierung in andere Nischen bei Zellverlusten, indem sie selbst oder ihre Tochterzellen ausgesandt werden um als neue transiente Stammzelle zu fungieren (Ohlstein *et al.*, 2004).

1.1.3 Stammzelltherapien

Die Aufklärung der Regulationsmechanismen innerhalb der Stammzellnische ist essentiell, um die Etablierung von Stammzelltherapien in der Klinik voranzutreiben (Watt & Hogan, 2000). So ist es erforderlich für die Expansion isolierter Stammzellen Bedingungen zu schaffen, die den Erhalt der Stammzeleigenschaften garantieren. Ebenso kann das Wissen

über die Auswirkungen heutiger Therapieformen auf Stammzellen und der damit verbundenen Homöostase innerhalb des behandelten Gewebes dazu beitragen, unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren (Donnelly *et al.*, 2018).

Noch ohne zu wissen, dass es sich um eine solche handelt, wurde 1957 erstmals erfolgreich eine Stammzelltherapie in Form der Knochenmarktransplantation nach kombinierter Strahlen- und Chemotherapie von Edward Donall Thomas durchgeführt (Thomas *et al.*, 1957). Erst einige Jahre später konnte die Existenz der für diesen Erfolg verantwortlichen Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden, den hämatopoetischen Stammzellen (McCulloch *et al.*, 1963). Spätestens mit der Isolierung und Kultivierung humaner ES-Zellen (Thomson, 1998) entwickelte sich die Stammzellforschung zu einem der größten Hoffnungsträger für die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Medizin. Die Zahl aktuell zugelassener Stammzelltherapien verdeutlicht jedoch, dass die Etablierung angewandter Stammzelltherapien sich als sehr schwierig erweist (Cable *et al.*, 2020). Als Konsequenz weitreichender ethischer Diskussionen über die Tötung von Embryonen zum Zweck der Isolation von ES-Zellen (De Wert & Mummery, 2003), rückte in den letzten Jahren die Verwendung AS-Zellen immer weiter in den Fokus der Forschung. Neben dem Einsatz hämatopoetischer Stammzellen in Form von Knochenmarktransplantationen zum Aufbau des blutbildenden Systems bei verschiedenen Krankheitsformen (aplastische Anämie, angeborene Immundefekte, Leukämie und maligne Lymphome), etablierte sich ebenfalls die Anwendung aus dem Fettgewebe isolierter mesenchymaler Stammzellen (ADSCs, engl.: adipose-derived stem cells) als Routineverfahren für verschiedene regenerative Therapieansätze, wie der Brustrekonstruktion (Illouz & Sterodimas, 2009; Miana & González, 2018). So ist der Einsatz von ADSCs sowohl für Forschungs- als auch Therapiezwecke mit zahlreichen Vorteilen verbunden: AS-Zellen sind im Gegensatz zu ES-Zellen und IPS-Zellen von Natur aus immunkompatibel und ethische Bedenken entfallen im Zusammenhang mit ihrer Verwendung (Prochazkova *et al.*, 2015). Zweitens ist Fettgewebe als Quelle von AS-Zellen im Vergleich zur invasiveren, weitaus risikoreicheren und mit Schmerzen verbundenen Knochenmarkentnahme leichter zugänglich (Bourin *et al.*, 2013; Ismail *et al.*, 2016). Darüber hinaus wird das Fettgewebe aus Fettabsaugungen (Liposuktionen) oder Brustverkleinerungen (Mammareduktionen) häufig als medizinischer Abfall entsorgt, sodass die Gewebeentnahme keine zusätzliche Operation erforderlich macht. Gleichzeitig weisen ADSCs und HS-Zellen ähnliche Phänotypen auf, einschließlich ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung, einem spezifischen Set an Oberflächenproteinen und ähnlicher Differenzierungspotentiale (Bourin *et al.*, 2013; Strioga *et al.*, 2012; De Ugarte *et al.*, 2003).

1.2 Adipose-derived stem cells (ADSCs)

1964 gelang es Rodbell *et al.* erstmals Stammzellen aus dem weißen Fettgewebe einer Ratte zu isolieren (Rodbell *et al.*, 1964). Jedoch erst 37 Jahre später wurde diese multipotente Stammzellpopulation in humanem Fettgewebe nachgewiesen (Zuk *et al.*, 2002). Heute ist bekannt, dass Fettgewebstammzellen aus jedem Typ weißen Fettgewebes isoliert werden können (Locke *et al.*, 2009).

1.2.1 Begriffsdefinition

ADSCs sind aus dem Fettgewebe isolierte mesenchymale Stammzellen (engl.: mesenchymal stem cells, MSCs) und stellen folglich multipotente Progenitorzellen mit hohem Proliferations- und vielfältigem Differenzierungspotential dar. Denn diese Zellen sind nicht nur zur Differenzierung in Terminalzellen der mesenchymalen Linien (Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten) (Gimble & Guilak, 2003; Zuk *et al.*, 2002) beschränkt, sondern ebenfalls zur Entwicklung in neuronenähnliche Zellen, Pankreaszellen und hämatopoetische Vorläuferzellen befähigt (Kuhbier *et al.*, 2010). 2006 deklarierte die Internationale Gesellschaft für Zelluläre Therapie Eigenschaften als Minimalvoraussetzungen, die MSCs charakterisieren: (1) Kunststoffadhärenz, (2) Expression der Oberflächenmarker CD73 (cluster of differentiation 73, deutsch: Unterscheidungsgruppe), CD90 und CD45 sowie fehlende Expression von CD11b oder CD14, CD19 oder CD79 α , CD45 und HLA-DR (Humanes Leukozyten Antigen – DR), (3) Differenzierungspotential in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten (Dominici *et al.*, 2006). Später wurden diese Kriterien durch die International Fat Applied Technology Society (IFATS) auf ADSCs spezifiziert, wobei phänotypische Unterschiede zu knochenmarkassoziierten MSCs sowie Veränderungen infolge der *In vitro* Kultivierung implementiert wurden (Bourin *et al.*, 2013).

1.2.2 Stammzellnische von ADSCs im weiblichen Brustfettgewebe

Die Stammzellnische von ADSCs ist charakterisiert durch komplexe Wechselwirkungen (s. Kap. 1.1.2, Die Stammzellnische) mit externen Einflussfaktoren, wobei insbesondere ADSCs des weiblichen Brustfettgewebes durch die schwankende hormonelle Situation (Pubertät, Schwangerschaft, Menopause) stark beeinflusst werden (Briskin & Duss, 2007). Dies könnte eine Erklärung bieten für die unterschiedlichen Eigenschaften von ADSCs abhängig vom Gewebe, aus dem sie isoliert wurden. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass ADSCs des abdominalen Fettgewebes einerseits demselben Phänotyp entsprechen,

jedoch ein geringeres Differenzierungspotenzial und Faktoren wie Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2, engl.: fibroblast growth factor 2), die innerhalb des Gewebes zur Angiogenese und Wundheilung anregen, im geringeren Maße ausschütten als aus dem Fettgewebe der weiblichen Brust isolierte ADSCs (Guneta *et al.*, 2016; Hanson *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013). Daher ist es wiederum wahrscheinlich, dass sich ADSCs abhängig von ihrer gewebespezifischen Nische verschieden gut für einzelne Anwendungsbereiche eignen (Kaewsuwan *et al.*, 2012).

Bisherige Analysen zeigten hingegen, dass die Lokalisation der ADSCs innerhalb des Gewebes in den Gefäßwänden zwischen reifen Adipozyten und der extrazellulären Matrix (Tran *et al.*, 2012) konstant ist. Dementsprechend wird angenommen, dass ADSCs als eine Untergruppe vaskulärer Stamm- und Vorläuferzellen zu verstehen sind (Crisan *et al.*, 2008; Zannettino *et al.*, 2008), deren Aufgabe es ist, innerhalb dieses perivaskulären Bereichs endotheliale Netzwerke zu stabilisieren (Traktuev *et al.*, 2008, Traktuev *et al.*, 2009) und die Bildung neuer Blutgefäße zu fördern, wodurch die Architektur des Fettgewebes aufrechterhalten bleibt (Kim *et al.*, 2014). Ebenso, wie diese Förderung neovaskulärer Prozesse essentiell für die erfolgreiche Etablierung eines Transplantats im Zielgewebe ist, birgt der Einsatz von ADSCs innerhalb regenerativer Therapieansätze gleichzeitig das Risiko, die Entwicklung von Tumoren voranzutreiben.

1.2.3 Wechselwirkung von ADSCs mit Brustkrebszellen

Als Mammakarzinom werden maligne, epitheliale Gewebeneubildungen (Neoplasien) des Brustdrüsenparenchyms bezeichnet, die in einer raumgreifenden Weise unkontrolliert an Größe zunehmen, wobei sich die bildende Geschwulst nicht mehr vom gesunden Gewebe abgrenzen lässt. Im Gegensatz dazu fehlt „gutartigen“ (benignen) Neoplasien die Fähigkeit, die Funktion des umliegenden Gewebes zu zerstören oder zu metastasieren, sodass sie sich klar vom restlichen Gewebe abgrenzen lassen. Innerhalb des gesunden Gewebes dienen AS-Zellen der Aufrechterhaltung des Gewebes, während Karzinomzellen sich diese Effekte zu eigen machen, um über die unterstützende Wirkung der AS-Zellen die Initiation, den Erhalt, die Proliferation und des Wachstum des Tumors voranzutreiben (Nigam, 2013). Zu den Risikofaktoren, die das Entstehen und die Progression eines Mammakarzinoms begünstigen, zählen einerseits hormonell gesteuerte Prozesse, wie beispielsweise die Hormonersatztherapie (Beral, 2007) oder eine verhältnismäßig früh einsetzende Menopause (Trichopoulos, Macmahon & Cole, 1972). Ebenso wurde ein Zusammenhang mit

Veränderungen in der Komposition des Fettgewebes entdeckt, die beispielsweise durch Übergewicht (Lahmann *et al.*, 2004; van den Brandt *et al.*, 2000) oder dem Verzicht auf die Laktation nach der Geburt eines Kindes (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2002) bewirkt werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Brustkrebszellen mit ADSCs der Brust interagieren, um ihr tumorigenes Microenvironment aufzubauen. So gelang es der Gruppe um Cho einen TGF- β 1- (Transformierender Wachstumsfaktor- β 1, engl.: transforming growth factor 1 β) Rezeptor vermittelten Signalweg in Fettstammzellen zu identifizieren, der von Brustkrebszellen ausgeschütteten Exosomen ausgelöst wird, woraufhin wiederum über SMAD [Sma (Small body size), Mad (Mother against decapentaplegic)] abhängige Signalwege Metastasierungsprozesse vermittelt werden (Cho *et al.*, 2012; Massagué, 2012). Ebenso sind Brustkrebszellen in der Lage, ADSCs in ihr Mikroenvironment zu rekrutieren (Strong *et al.*, 2015). Zudem profitieren Tumoren von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, die native ADSCs innerhalb ihrer Nische aussondern, beispielsweise durch ein gesteigertes Wachstum (Kucerova *et al.*, 2007). Die bereits in der Literatur beschriebenen Interaktionen zwischen ADSCs und Brustkrebszellen sind vielfältig, wodurch sich die wirkliche Komplexität nur erahnen lässt.

Weitestgehend unbekannt ist jedoch, welche Wirkung eingesetzte Therapieformen zur Behandlung von Brustkrebs, wie die Strahlentherapie, auf ADSCs und deren vermittelte Effekte in Brustkrebszellen auslöst.

1.3 Ionisierende Strahlung – Röntgenstrahlung

Mithilfe ionisierender Strahlung (engl.: ionizing radiation, IR) können sowohl maligne als auch benigne Erkrankungen behandelt werden, wobei die eingesetzte Energiedosis entscheidend für die zellbiologische Wirkung ist. Während zur Behandlung maligner Tumore vorrangig IR mit hoher Photonenenergie (6-15 MV) und ebenso hoher Durchdringungstiefe verwandt wird, kommt für die Therapie benigner Erkrankungen IR mit geringerer Photonenenergie (20 – 150 kV) und geringerem Durchdringungsvermögen zum Einsatz. Die zugrundeliegenden physikalischen und biologischen Mechanismen werden im folgenden Abschnitt erläutert.

1.3.1 Biologische Strahlenwirkung

1895 beschrieb der Physiker Wilhelm Conrad Röntgen erstmals eine unsichtbare Strahlung, die Materialien je nach Dichte unterschiedlich stark zu durchdringen vermag (Röntgen, 1898).

Diese später nach ihm benannte Röntgenstrahlung entsteht durch die abrupte Geschwindigkeitsänderung geladener Teilchen (Elektronen) und wird daher auch als Bremsstrahlung bezeichnet. Hierbei entstehen zunächst durch die starke Abbremsung von Elektronen magnetische Wellen mit Quantenenergien oberhalb von 100 eV (Elektronenvolt) bzw. einer Wellenlänge unterhalb von 10 nm. Die Energie dieser Photonen ist groß genug um Elektronen aus der äußeren und inneren Schale der Atome zu lösen (Ionisation), woraufhin Röntgenstrahlung zur Gruppe der ionisierenden Strahlung (IR) gehört.

Trifft IR auf biologisches Material, erfolgt eine direkte Energieübertragung, die zum Bruch chemischer Bindungen in Makromolekülen führt. In Zellen kann dies zu Brüchen der Desoxyribonukleinsäure (DNS) führen, wobei auch Wasserstoffbrücken, Basen, DNS-Protein-Verbindungen oder DNS-Doppelstränge betroffen sein können (Hüttermann *et al.*, 1984). Begründet auf der Tatsache, dass die Zelle zu 80 % aus Wasser besteht, trifft der Hauptteil der IR jedoch auf Wassermoleküle, woraufhin reaktive oxidative Spezies (ROS) entstehen (Radiolyse), die wiederum zelluläre Biomoleküle oxidieren und auf diese Weise ebenfalls zu den bereits beschriebenen Schädigungen führen. Man unterscheidet daher zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung (Goodhead, 1994; Nikjoo *et al.*, 1997).

Verfügt die Zelle über intakte Reparatursysteme, wird ein Großteil der DNS-Schäden innerhalb weniger Stunden repariert (Sauer, 1999), wobei in Zellen mit irreparablen Läsionen der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet wird. Jedoch ist dieses System auch fehlerhaft und so führen nicht oder inkorrekt reparierte DNS-Läsionen teilweise zu Mutationen, die im Weiteren zur Entstehung von malignen Tumoren führen können (Eccles *et al.*, 2011; Sage & Harrison, 2011). Daher zählt unter anderem IR zu den Karzinogenen (Morgan, 2003). Gleichzeitig zählt die Strahlentherapie zu den gängigen Therapieformen, um gezielt Tumorzellen abzutöten. Hierbei wird die Eigenschaft des unbegrenzten Wachstums von Krebszellen genutzt, welches meist durch eine Vielzahl von Mutationen und dem damit verbundenen Ausschalten von DNS-Reparatursystemen verbunden ist. Die Folge ist einerseits, dass die DNS-Stränge der Tumorzellkerne durch die hohe Proliferationsrate in einer gelockerten Form vorherrschen, sodass die Angriffsfläche für die hochenergetischen Strahlen der Therapie vergrößert wird und somit das Ausmaß des Schadens erhöht wird. Zugleich sind die DNS-Reparatursysteme der Tumorzellen meist nicht in der Lage, induzierte DNS Schäden zu bereinigen, sodass der Zelltod eingeleitet wird (Good & Harrington, 2013).

1.3.2 Strahleninduzierter Bystandereffekt

Neben den bereits beschriebenen möglichen Wegen der direkte DNS-Schädigung strahlenexponierter Zellen, (s. S. 9, Kap. 1.3.1), gibt es die Beobachtung, dass unbestrahlte Zellen (Bystanderzellen) direkt über Zell-Zellkontakte oder auch über größere Entfernungen hinweg mittels löslichen Signalfaktoren (Prise & Sullivan, 2009) von strahlenexponierten Zellen dazu angeregt werden können, ähnliche strahleninduzierte Effekte (reduziertes Zellwachstum, Zelltod, Chromosomen-Aberrationen, Mutationen, genomische Instabilität) sowie eine Erhöhung der intrazellulären ROS (reactive oxygen species) zu entwickeln wie sie selbst (Goldberg & Lehnert, 2002; Mothersill & Seymour, 2004). Dieses Phänomen wird als strahleninduzierter Bystandereffekt bezeichnet (Goldberg & Lehnert, 2002). Markant für diesen Effekt ist eine häufig beobachtete Dosis-Wirkungs-Beziehung, wobei sich bereits bei kleinen Dosen unter einem Gray (Gy) eine Sättigung der Wirkung einstellen kann (Schettino *et al.*, 2005). Jedoch gibt es auch Beispiele, die gegen diesen Trend sprechen. So wurde beispielsweise in Lungenkarzinomzellen Bystander-Effekte bei hohen Bestrahlungsdosen (> 10 Gy) nachgewiesen (Shareef *et al.*, 2007).

1.3.3 Immunmodulierender Effekt niedrig dosierter Strahlung

Während mittlere Dosen (~ 2 Gy) IR zur Abtötung von Karzinomzellen eingesetzt werden, induzieren niedrig dosierte Strahlentherapien (LD-RT, engl.: Low-dose radiotherapy) immunmodulierende Reaktionen in Form von anti-inflammatorischen Effekten in humanen Geweben (Hildebrandt *et al.*, 2002, Frey *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2017). Entscheidend für diesen Effekt ist die Inhibierung der inflammatorischen Kaskade. Erreicht wird dies durch eine LD-abhängige Steigerung der Apoptoserate von Monozyten und Granulozyten (Kern *et al.*, 1999; Lödermann *et al.*, 2009) und gleichzeitiger Unterdrückung der Adhäsionsprozesse dieser Immunzellen an den Ort der Entzündung (Hildebrandt *et al.*, 2002; Kern *et al.*, 2000), sodass in der Folge Entzündungsreaktionen verhindert bzw. gehemmt werden. Neueste klinische Studien und *in vitro* Analysen bestätigten dafür die effektivste Dosis bei 0,5 Gy (Niewald *et al.*, 2015; Ott *et al.*, 2013; Ott *et al.*, 2014).

Durch eine weitere Reduzierung der applizierten Dosis auf unter 0,1 Gy, wurden wiederum neue Effekte in humanen Zellen sichtbar. So zeigten Jiang *et al.*, (2008) erstmals wachstumsfördernde Stimuli in mehreren normalen humanen Zelllinien auf, jedoch nicht in Leukämie- und Tumorzelllinien *in vitro* und *in vivo*. Liang *et al.*, (2016) und Truong *et al.* (2018) bestätigten diese Trends bei Fibroblasten und Lungenkrebszelllinien. Daher befasst

sich diese Arbeit mit der Frage, inwieweit ebenfalls die Proliferation mesenchymaler Stammzellen durch die LD-RT unter 0,1 Gy erhöht werden kann.

2. Zielstellung

In Deutschland erkranken jährlich etwa 70.000 Frauen an Brustkrebs, wobei verbesserte Therapieansätze und das frühzeitigen Erkennen von Brustkrebserkrankungen u. a. durch das gesetzliche Früherkennungsprogramm dazu geführt haben, dass die relative 5-Jahresüberlebensrate bei 88 % liegt (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut 2016). Daher sind erfolgreiche Therapieansätze mit möglichst geringen Spätfolgen von besonderer Bedeutung. Innerhalb des Brustgewebes sind AS-Zellen für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase verantwortlich, wobei einerseits geschädigte Zellen durch Teilung der Stammzellen in spezialisierte Tochterzellen ersetzt werden und ebenso über ein spezielles sekretorisches Repertoire regenerative Prozesse des Gewebes angeregt werden können. Daher beschäftigt sich diese Arbeit neben der direkten Wirkung von IR auf Brustkrebszellen ebenso mit den Effekten der IR auf ADSCs selbst, die einerseits in der Behandlung des Brustkrebses mittels hoher Photonenenergien (Linearbeschleuniger) erfolgt, als auch im Rahmen von niedrig-dosierten Expositionen unter Einsatz geringerer Photonenenergien (Röntgentherapiegerät).

Dabei stellten sich folgende Fragen:

- Ist ein fördernder Effekt von ADSCs auf MCF-7-Brustkrebszellen nachweisbar?
- Verändert sich der Effekt von ADSCs auf MCF-7-Brustkrebszellen in Folge der Bestrahlung von ADSCs?
 - Besteht eine Dosisabhängigkeit ionisierender Strahlung?
 - Handelt es sich hierbei um Kurzzeit- oder Langzeiteffekte?
- Inwieweit beeinflussen ADSCs die Strahlensensitivität von MCF-7 Brustkrebszellen?
- Ab welcher Schwellendosis sind zytotoxische Effekte in ADSCs nach Strahlenexposition nachweisbar?
- Können in ADSCs Reparatursysteme zur Bereinigung strahleninduzierter Schäden identifiziert werden?
- Welche Effekte löst niedrig dosierte Strahlung in ADSCs aus?

3. Diskussion

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Wirkung von IR auf MSCs des Fettgewebes in Hinblick auf verschiedene Aspekte hin *in vitro* untersucht. So konnte zunächst festgestellt werden, dass die häufig beobachteten fördernden Effekte von ADSCs auf das Wachstum und die Klonogenität von MCF-7-Brustkrebszellen infolge der Bestrahlungsbehandlung der ADSCs vor Ko-Kultur mit MCF-7-Brustkrebszellen neutralisiert bzw. in eine tumorinhibierende Wirkung umgekehrt wurden (**Publikation 1**). Die Analyse der Strahlensensitivität von ADSCs (**Publikation 2**) zeigte im Weiteren auf, dass diese Zellen eine mittlere Strahlensensitivität aufweisen, wobei die untersuchten Mechanismen für ein funktionierendes DNS-Reparatursystem sprachen. Zudem wurden im niedrigen Dosisbereich ionisierender Strahlung unterhalb von 0,1 Gy (**Publikation 3**) sowohl positive Langzeiteffekte auf das klonogene Zellüberleben als auch eine kurzzeitige Proliferationssteigerung von ADSCs ersichtlich, wobei diese Niedrigdosis-Exposition weder geno- noch zytotoxisch wirkte.

3.1 Interaktionen zwischen ADSCs und Brustkrebszellen

ADSCs nehmen aufgrund ihres hohen regenerativen Potenzials eine besondere Rolle innerhalb ihres Mikroenvironments ein. Daher verspricht die Verwendung von ADSCs im Rahmen zellbasierter Therapien zu einer wesentlichen Verbesserung der Behandlungsergebnisse zu führen. Um jedoch auch das mögliche onkogene Risiko therapeutischer Ansätze zu beurteilen, wurden ADSCs aus der humanen Brust zunächst isoliert und näher charakterisiert. Anschließend wurde der Einfluss bestrahlter ADSCs als Teil des endogenen Fettgewebes auf Brustkrebszellen untersucht.

3.1.1 Eigenschaften isolierter ADSCs

In dieser Arbeit wurden ADSCs aus dem Mammareduktionsgewebe gesunder Patientinnen nach einem Protokoll isoliert, das in den Grundsätzen der allgemein anerkannten und auch am häufigsten genutzten Isolationstechnik von Zuk *et al.* (2001) entspricht. Daher sind die Ergebnisse dieser Arbeit sehr gut vergleichbar mit dem Großteil der Publikation in diesem Fachgebiet. Ebenso wurden die definierten Minimalkriterien für ADSCs (Kurita *et al.*, 2008; Buschmann *et al.*, 2013) in den isolierten Zellen nachgewiesen.

3.1.2 Effekt unbestrahlter ADSCs auf Brustkrebszellen

Die indirekte Ko-Kultur mit ADSCs führte zu fördernden Effekten in MCF-7-Brustkrebszellen (**Publikation 1**). Während die Populationsverdopplungszeit der MCF-7-Brustkrebszellen um 2 Stunden sank, blieb die ermittelte Proliferationsrate konstant. Gleichzeitig führte die Übertragung des Mediumüberstandes von ADSCs zu einer um 9 % gesteigerten Überlebensfraktion der MCF-7-Brustkrebszellen. Dies deutete darauf hin, dass der wachstumssteigernde Effekt von ADSCs durch eine Senkung des Zelltods bei gleichbleibender Proliferationsrate der Tumorzellen entsteht. Eine mögliche Erklärung für diese zellfördernde Wirkung von ADSCs auf Krebszellen scheint auf die Vielzahl von Zytokinen zurückzuführen zu sein, von denen gezeigt wurde, dass sie von ADSCs freigesetzt werden (Rehman *et al.*, 2004; Kapur & Katz 2013; Kokai *et al.* 2014). Ebenso konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Zytokinsekretion von ADSCs nach Ko-Kultivierung mit Brustkrebszellen verändert wird (Eterno *et al.*, 2015) und beispielsweise über die Stimulation mit entzündlichen Zytokinen die Migrations- und Invasionsfähigkeit von MCF-7-Brustkrebszellen über TGF- β 1 (Trivanović *et al.*, 2016) gefördert wird. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit beschlossen, indirekte Ko-Kultursysteme zu verwenden, um die Wechselwirkungen zwischen ADSCs und Brustkrebszellen über lösliche Faktoren zu analysieren.

Insgesamt zeigte sich, dass die tumorfördernden Effekte abdominaler ADSCs (Muehlberg *et al.*, 2009; Ritter *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Zimmerlin *et al.*, 2011) auch in ADSCs nachweisbar sind, die aus dem Brustfettgewebe gesunder Patientinnen isoliert wurden. Neuere Analysen zeigen auf, dass von ADSCs ausgeschüttetes Adiposin einerseits das Zellwachstum von Brustkrebszellen fördert und andererseits als Teil der Brustkrebsstammzellnische zum Erhalt der Stammzeleigenschaften beiträgt (Goto *et al.*, 2019). Weitergehende Genexpressionsanalysen in ADSCs unterschiedlicher Spender ergab, dass vor allem in übergewichtigen Patienten die Expression der Adiposin mRNA (Boten Ribonukleinsäure, engl.: messenger ribonucleic acid) erhöht ist (Goto *et al.*, 2019). Gleichzeitig ist Adiposin ein wichtiger Regulator der Adipogenese (Song *et al.*, 2016), weshalb auch die Möglichkeit besteht, dass die hier beobachtete Tumorförderung über Beeinflussung der Adipozyten des Microenvironments verläuft (Goto *et al.*, 2019).

3.1.3 Strahleninduzierter Bystandereffekt von ADSCs auf MCF-7-Brustkrebszellen

Durch die Vorbehandlung der ADSCs mit IR änderte sich die zuvor beobachtete Förderung in eine signifikante Hemmung des Tumorzellwachstums. Auch bei diesem Ansatz blieb die

Proliferationsrate der MCF-7-Tumorzellen konstant, während ein wachstumsinhibierender Effekt, messbar an einer Erhöhung der Populationsverdopplungszeit um ca. 3 Stunden und eine Verringerung des Langzeitüberlebens unbehandelter Brustkrebszellen unabhängig von der Strahlendosis um durchschnittlich 14 % festgestellt wurde. Daher ist es naheliegend, dass diese Regulation des Tumorwachstums über die Induktion der Apoptose vermittelt wurde. Damit konnte erstmals die Übertragung eines strahleninduzierten Bystandereffektes von ADSCs des Brustfettgewebes auf Brustkrebszellen nachgewiesen werden. Neuere Studien zeigen, dass die Kombination von ADSCs und Strahlentherapie einen synergistischen Effekt auf das Leberzellkarzinom bewirkt, wobei innerhalb von *in-vitro* und *in-vivo* Analysen sowohl ein vermindertes Zellwachstum als auch eine reduzierte Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen nachgewiesen werden konnte (Wu *et al.*, 2019). Ebenso stellten bereits 2016 Mohammadpour *et al.* fest, dass die Behandlung von ADSCs mit Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) zu einer Apoptoseinduktion ko-kultivierter Tumorzellen führt, wobei die Bestrahlungsbehandlung ebenfalls einen synergistischen Effekt zeigte (Mohammadpour *et al.*, 2016). Diese Studien postulieren, dass die kombinierte Behandlung von ADSCs und Strahlentherapie den Erfolg der Tumorthherapie verbessern können. Trotzdem wurden hierbei stets Tumorzellen bestrahlt, inwieweit die Bestrahlung der ADSCs die Wirkung auf Tumorzellen beeinflusst, wurde bislang nicht untersucht.

3.1.4 Klinische Relevanz der Daten

Der kosmetische Vorteil einer natürlich aussehenden Brust ist insbesondere bei Brustkrebspatientinnen häufig ein ausschlaggebendes Argument zur Entscheidung für die Eigenfettrekonstruktionen der Brust als Alternative zur Silikonbehandlung. Solange jedoch die zugrundeliegenden Mechanismen der Interaktion zwischen Brustkrebszellen und ADSCs nicht aufgeklärt sind, verbleibt das Risiko einer therapiebedingten Tumorförderung. Innerhalb dieser Arbeit konnte erstmals *in vitro* gezeigt werden, dass durch die Behandlung von ADSCs mit IR strahleninduzierte Bystandereffekte auf MCF-7-Tumorzellen induziert werden, die das ansonsten unerwünschte Wachstum von Tumorzellen unterbinden.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit beschränken sich jedoch auf die Tumorentität, die durch das Zellmodell MCF-7 abgebildet wird. Die Brustkrebszelllinie MCF-7 stammt aus dem humanen duktalem Adenokarzinom der Brust und wurde 1970 aus dem Gewebe einer 69-jährigen Kaukasierin isoliert (Soule *et al.*, 1973). Diese Zelllinie ist besonders gut für *in-vitro* Experimente zur Untersuchung von Brustkrebs geeignet, da sie in mehreren speziellen Eigenschaften differenziertem Brustepithelium ähnelt. So besitzen MCF-7-Zellen unter

anderem zytoplasmatische Östrogenrezeptoren (ER), die zur Prozessierung von Estradiol befähigen. Jedoch stellt die MCF-7-Brustkrebszelllinie ein Modell für non-invasive Tumoren dar, wobei jedoch diese Tumorentität nur 10 % der diagnostizierten Brustkrebstumore in Deutschland ausmacht (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, 2016). Trotzdem sind MCF-7-Zellen ein gängiges Zellmodell der strahlenonkologischen Forschung. Eine Analyse zum Vergleich des strahleninduzierten Bystandereffektes von ADSCs auf unterschiedliche Brustkrebsentitäten wäre ein möglicher Ansatz zukünftiger Studien, wobei untersucht werden könnte, inwieweit tumorfördernde Effekte von ADSCs innerhalb der Brust abhängig von der Art des Tumors sind.

3.2 Sensitivität von ADSCs gegenüber Bestrahlung mit hohen und niedrigen Photonenenergien

Aufgrund verbesserter Therapieansätze und dem frühzeitigen Erkennen von Brustkrebserkrankungen durch das gesetzliche Früherkennungsprogramm liegt die relative 5-Jahresüberlebensrate von Frauen bei 88 % (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut 2016). Daher sind erfolgreiche Therapieansätze mit möglichst geringen Spätfolgen von besonderer Bedeutung. Innerhalb des Brustgewebes sind AS-Zellen für die Aufrechterhaltung zellulärer Homöostase verantwortlich, wobei einerseits geschädigte Zellen durch Teilung der Stammzellen in spezialisierte Tochterzellen ersetzt werden und ebenso über ein spezielles sekretorisches Repertoire regenerative Prozesse des Gewebes angeregt werden können. Daher beschäftigte sich diese Arbeit neben der direkten Wirkung auf Brustkrebszellen (**Publikation 1**) ebenso mit den Effekten der IR auf ADSCs selbst, die einerseits in der Therapie des Brustkrebses mittels hoher Photonenenergie (Linearbeschleuniger) erfolgt (**Publikation 2**), als auch im Rahmen von niedrig-dosierten Expositionen unter Einsatz geringerer Photonenenergien (Röntgentherapiegerät; **Publikation 3**).

3.2.1 Zellbiologische Effekte in ADSCs infolge hoch dosierter Photonenbestrahlung

Innerhalb dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass ADSCs im Vergleich zu strahlenresistenten und strahlensensitiven Zellen eine mittlere Strahlensensitivität aufweisen. Hierbei entspricht ihre Überlebensfraktion nach Bestrahlung mit Dosen von 4 bis 8 Gy in etwa der von MCF-7-Brustkrebszellen, einer Tumorzelllinie mit mittlerer Strahlensensitivität.

Interessanterweise sind ADSCs jedoch durch die Bestrahlung von 2 Gy weniger stark betroffen als MCF-7-Zellen, wobei eine solche Bestrahlungsdosis von 2 Gy von besonderer klinischer Bedeutung ist, da sie für die konventionell fraktionierte Ganzbrustbestrahlung von Brustkrebspatientinnen im Frühstadium verwendet wird. Dies deutet darauf hin, dass während der Bestrahlungsbehandlung des Mammakarzinoms, ADSCs mit einer etwas schwächeren Zellschädigung reagieren als Brustkrebszellen, wenn eine Dosis von 2 Gy appliziert wird.

Im Detail konnte festgestellt werden, dass bereits ab einer applizierten Dosis von 0,5 Gy DNS-Schädigungen in Form von DNS-Doppelstrangbrüchen (3,71/Zellkern) induziert werden. Nach einer Reparaturzeit von 24 Stunden entsprechen diese dann aber wieder der Rate unbestrahlter ADSCs (0,49/Zellkern). Im Weiteren konnten verschiedene Prozesse der Reparaturkaskade aufgezeigt werden. Zu diesen gehörte der frühe Stillstand des Zellzyklus verbunden mit einer erhöhten p21-Expression. Diese Ergebnisse entsprechen der Hypothese, dass AS-Zellen gegenüber IR resistenter sind als ES-Zellen. Dennoch ist bekannt, dass gewebespezifische Unterschiede bestehen, die wahrscheinlich auf Unterschiede in der Expression von proapoptotischen oder antiapoptotischen Proteinen sowie auf die Zellzyklusdauer und die p53-Dynamik zurückzuführen sind (Liu *et al.*, 2014). Während Stammzellen aus dem Knochenmark für ihre Strahlenempfindlichkeit gut charakterisiert sind (Chen *et al.*, 2006), fehlen Studien zu ADSCs bzw. bestehen lediglich aus Analysen, die mit Mäusen als Wirt durchgeführt wurden (Maria *et al.*, 2016). Darüber hinaus gibt es charakteristische Unterschiede zwischen AS-Zellen, die aus Fettgewebe unterschiedlichen Gewebes isoliert werden. So konnte bereits eine gewebespezifische Wachstumskinetik nachgewiesen werden (Guneta *et al.*, 2016; Hanson *et al.*, 2013) - ein Faktor, der möglicherweise für gewebespezifische Strahlenempfindlichkeiten verantwortlich ist (Liu *et al.*, 2014). Ausgehend von dieser Überlegung müssen in Zukunft umfangreiche Analysen der zugrunde liegenden strahleninduzierten Mechanismen in ADSCs unterschiedlicher Herkunft durchgeführt werden, um zuverlässige zelluläre Therapieoptionen in der Radioonkologie zu entwickeln. Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Arbeit, die die Strahlenantwort aus dem Brustfettgewebe isolierter ADSCs untersucht hat und somit erste Einblicke in unerwünschte Nebenwirkungen der Strahlentherapie des Mammakarzinoms liefert, die aus beschädigten Stammzellen resultieren könnten. Die Minimierung von Stammzellschäden sollte das Ziel einer modernen Strahlentherapie sein, um unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren. Hier konnten wir nur 24 h nach einer Bestrahlungsdosis von 0,5 Gy eine vollständige Reparatur der DNS-Doppelstrangbrüche feststellen. Nach höheren Strahlendosen wurde eine geringe Anzahl von verbleibenden DNS-Doppelstrangbrüchen beobachtet. Ob

Wiederholungen dieses Bestrahlungsverfahrens im Verlauf einer fraktionierten Strahlentherapie für das entsprechende Gewebe kritisch sein könnten, ist fraglich. In BMSCs scheinen fraktionierte Bestrahlungen jedoch eher schützend zu sein (Clavin *et al.*, 2008). Insgesamt sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die Langzeiteffekte von IR auf ADSCs und insbesondere der Wiederholung im Rahmen einer fraktionierten Strahlentherapie zu bestimmen. Zusammenfassend scheinen aus der Brust isolierte ADSCs für zelluläre Therapieoptionen in der Radioonkologie und der regenerativen Medizin vor der Strahlentherapie geeignet zu sein.

3.2.2 Zellbiologische Effekte in ADSCs infolge niedrig dosierter Photonenbestrahlung

In Deutschland ist die niedrig dosierte Strahlentherapie eine häufig verwendete Option bei der Behandlung von degenerativen Knochen- und Entzündungskrankheiten (Richter *et al.*, 2012), wobei die effektivste Dosis bei 0,5 Gy liegt (Niewald *et al.*, 2015; Ott *et al.*, 2013; Ott *et al.*, 2014). Die Beobachtungen einer proliferationsstimulierenden Wirkung (Jiang *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2016; Truong *et al.*, 2018) niedrig dosierter Strahlung auf Normalgewebszellen, die jedoch bislang nicht in Tumorzellen beobachtet wurde, führten daher zu der Überlegung, inwieweit ebenfalls adulte Stammzellen des Fettgewebes von einer solchen Behandlung in ihrem Wachstum positiv beeinflusst werden könnten.

Zunächst sollte jedoch ausgeschlossen werden, dass unerwünschte Nebeneffekte der Niedrigdosisbestrahlung in ADSCs auftreten. Im Allgemeinen ist davon auszugehen, dass jeder Treffer eines 100-kV-Röntgenstrahls (1 mGy) zu etwa 150 reaktiven Sauerstoffspezies sowie zwei DNS-Veränderungen führt, von denen etwa 10^{-2} DNS-Doppelstrangbrüche und 10^{-4} Chromosomenaberrationen entsprechen (Feinendegen *et al.*, 2007). Angewandt auf Niedrigdosisbestrahlung unterhalb von 0,1 Gy entspricht dies einem viel geringeren Schaden als jener, der durch die oxidativen Prozesse des normalen Stoffwechsels verursacht wird (Rothkamm & Lo, 2003; Sedelnikova *et al.*, 2004). Innerhalb dieser Arbeit konnten unterhalb von 0,1 Gy weder zyto- noch genotoxische Effekte entdeckt werden (**Publikation 3**). Eine signifikante Zunahme der DNS-Doppelstrangbruchrate durch niedrig frequente Photonenstrahlung wurde hierbei ab einer Dosis von 0,1 Gy erkennbar, wobei zytotoxische Effekte im untersuchten Dosenbereich bis 2 Gy im untersuchten Zeitraum von 48 Stunden nicht detektiert wurden. Während hochfrequente Photonenstrahlung im Dosisbereich von 0,5 Gy bis 8 Gy (**Publikation 2**) zu einer dosisabhängigen Abnahme der

Überlebensfraktion und der Proliferationsrate in ADSCs führte, konnte im Niedrigdosisbereich niedrigfrequenter Photonenstrahlung ein diskontinuierlicher Trend in diesen Endpunkten festgestellt werden (**Publikation 3**). So führten applizierte Dosen unterhalb von 0,1 Gy zu einer um 6 % erhöhten Überlebensfraktion und einer um 15 % gesteigerten Proliferationsrate in ADSCs.

In ähnlicher Weise konnten bereits proliferationssteigernde Trends in verschiedenen nicht krebserzeugenden Zelltypen entdeckt werden (Kim *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2011; Truong *et al.*, 2018), die das Modell einer durch niedrige Dosen induzierten hormetischen Reaktion unterstützen. So wurde beispielsweise die Zellproliferation von Fibroblasten der Lunge durch die Bestrahlung mit 0,05 Gy gesteigert, wobei die ebenso beobachtete Aktivierung von Raf (engl.: rapidly accelerated fibrosarcoma) und Akt (Proteinkinase B) als mögliche regulatorische Proteine identifiziert wurden (Kim *et al.*, 2007). Wir haben vergleichbare proliferationsstimulierende Trends in ADSCs festgestellt, jedoch nach Exposition sehr kleiner Dosen mit 0,08 Gy. Darüber hinaus konnten wir in unserer Studie erstmals einen Anstieg des klonogenen Überlebens der ADSCs infolge der Behandlung mit 0,05 Gy feststellen.

In dieser Arbeit wurde zudem die Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen-2 (MMP-2) in ADSCs infolge der Applikation niedrig dosierter Strahlung untersucht. Hierbei konnte lediglich bei einer Dosis von 0,5 Gy eine vermehrte Ausschüttung dieses Proteins aufgezeigt werden, während die Dosen unterhalb von 0,1 Gy zu keiner Änderung führten. MMP-2 ist ein wichtiger Mediator für Wundheilungsprozesse der Gewebereparatur (Zwicker *et al.*, 2019). Die Gruppe um Guo *et al.* (2010) hat in einem diabetischen Rattenmodell bei wiederholter Bestrahlung mit niedriger Dosis von 0,075 Gy neben der gesteigerten Expression von MMP2 und MMP9 positive Auswirkungen auf die Wundheilung beobachtet (Guo *et al.*, 2010). Dies war sowohl mit der Zunahme des Knochenmarks und zirkulierenden Stammzellen als auch mit einer gesteigerten Gefäßregeneration und Zellproliferation im Wundgewebe (Guo *et al.* 2010) verbunden. Daher kann trotz der Daten dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass sich eine wiederholte Exposition mit Niedrigdosisbestrahlung unterhalb von 0,1 Gy positiv auf die Wundheilung auswirkt. Diese Diskrepanz zeigt vielmehr den enormen Forschungsbedarf auf diesem Gebiet und das Potenzial dieser Strahlentherapie zur Verbesserung derzeitiger Stammzelltherapien auf.

3.2.3 Klinische Relevanz der Daten

Als Standardtherapie von Brustkrebs gilt die chirurgische Entfernung des Tumors, wobei abhängig vom Krebsstadium entweder die Brust vollständig abgenommen wird (Mastektomie) oder lediglich der Tumor und ein minimaler Bereich des Umgebungsgewebes entfernt werden (Lumpektomie). Befindet sich der Tumor in einem frühen Stadium wird meist die Lumpektomie gewählt, wobei das Risiko einer Rezidivbildung mit Hilfe der adjuvanten Strahlentherapie des Tumorbetts gesenkt wird. Jedoch können infolge dieser Bestrahlungsbehandlung langfristige Nebenwirkungen wie Fibrose, Vernarbung des Bindegewebes, Strahlenpneumonitis und strahleninduzierte Zweitkrebserkrankungen auftreten (Kindts *et al.*, 2017). Während der Bestrahlung des Tumorbetts werden neben residualen Brustkrebszellen ebenso Normalgewebszellen appliziert. Und da wie bereits besprochen, ADSCs im besonderen Maß sowohl die Regeneration des Gewebes als auch die Entwicklung des Tumors beeinflussen, ist es von besonderer Bedeutung, den Effekt der Strahlentherapie auf ADSCs des Brustfettgewebes zu untersuchen. Diese Arbeit zeigt erstmals auf, dass Dosen oberhalb von 0,5 Gy zu residualen DNS-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen führen, wohingegen die Schädigungen geringerer Dosen ($\leq 0,5$ Gy) mit Hilfe einer funktionierenden Reparaturkaskade bereinigt werden können (**Publikation 2**). Ebenso überleben lediglich 64 % der ADSCs eine Strahlenbehandlung mit der klinisch relevanten Dosis von 2 Gy. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Energie von IR nicht gleichmäßig an das durchdringende Gewebe abgegeben wird, sondern die applizierte Dosis mit Zunahme der Durchdringungstiefe abnimmt. Daher sind für das Verständnis der Effekte der adjuvanten Strahlentherapie in ADSCs ebenfalls Dosen unterhalb von 2 Gy relevant, die in einem gewissen Radius vom Zielgewebe entfernt sind. In dieser Arbeit konnte ebenso gezeigt werden, dass Bestrahlungsdosen unterhalb von 0,1 Gy weder zyto- noch genotoxisch sind, sondern einen wachstumsfördernden Effekt in ADSCs auslösen können (**Publikation 3**). Diese Beobachtung spricht dafür, dass ADSCs, die sich in einer bestimmten Entfernung zum Applikationsziel der Strahlentherapie befinden, durch die verringerte Strahlendosis vermehrt zur Proliferation angeregt werden und daraufhin verstärkt zur Regeneration des geschädigten Gewebes beitragen.

Diese positiven Effekte der Niedrigdosenbestrahlung unterhalb von 0,1 Gy könnten ebenfalls zur Verbesserung des Erfolgs von Eigenfetttransplantationen beitragen. So zeigten bereits Adachi *et al.* auf, dass die Bestrahlung von ADSCs im Niedrigdosenbereich eine erhöhte Ausschüttung der Angiogenese fördernden Signalstoffen MMP-2 und VEGF

(Endothelwachstumsfaktor, engl.: Vascular Endothelial Growth Factor) zur Folge hat (Adachi *et al.*, 2015), woraufhin die vorzeitige Vaskularisation des Eigenfett-Transplantats die Absterberate der Zellen reduzieren könnte. Denn bislang überleben lediglich 30-40 % der Zellen eines Eigenfett-Transplantats diese Prozedur der Transplantation (Tremolada *et al.*, 2010), sodass die Prozedur wiederholt werden muss, bis sich das gewünschte Ergebnis einstellt.

Daher ist es von besonderer Bedeutung die Funktionsweise von ADSCs zu untersuchen und mögliche Effektoren des Mikromilieus sowie verschiedener Behandlungsmöglichkeiten (z. B. Niedrigdosisbestrahlung) zu identifizieren und aufzuschlüsseln.

3.3 Heterogenität von ADSCs

Die Aufklärung der Regulationsmechanismen von ADSCs innerhalb ihrer Stammzellnische können in Zukunft sowohl dazu beitragen, die Nebenwirkungen aktueller Therapien zu minimieren als auch neue Zelltherapien zu etablieren (Watt & Hogan, 2000). Problematisch ist hierbei jedoch, dass durch verschiedene Faktoren wie Isolations- und Kultivierungstechnik oder die Wahl des Gewebes, aus dem ADSCs isoliert werden, zu einer starken Diskrepanz im Phänotyp der beschriebenen ADSCs kommt. Diese sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Zunächst resultiert aus den Diskrepanzen in der Isolation und Kultivierung von ADSCs eine Variabilität im Phänotyp dieser Zellen, je nach genutzter Methode in den Arbeitsgruppen (Buschmann *et al.*, 2013; Kurita *et al.*, 2008). So konnte kürzlich aufgezeigt werden, dass sich infolge der *in vitro* Kultivierung nicht nur die Genexpression (Brooks *et al.*, 2020) sondern auch die Zusammensetzung exprimierter miRNAs (Iminoff *et al.*, 2020) ändert. Dies spricht dafür, dass sich ADSCs in kürzester Zeit an die wechselnden Bedingungen durch den Übergang in die *in vitro* Kultivierung anpassen. Dieser Effekt kann durch eine die Kultur in einem Modellsystem, das den Bedingungen der physiologischen Nische eher entspricht, reduziert werden. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die Regulationsmechanismen innerhalb der spezifischen Stammzellnische entschlüsselt werden (Kaewsuwan *et al.*, 2012; Watt & Hogan, 2000). Daher kann die kurzzeitige *ex-vivo* Expansion AS-Zellen zu Langzeitfolgen führen, die zum Misserfolg verschiedener Therapieansätze führt. So konnte beispielsweise bei der Verwendung *ex-vivo* expandierter HS-Zellen zur Transplantation in immunsupprimierten Leukämiepatienten zunächst eine erfolgreiche Einbettung in die

Zielnische beobachtet werden, wobei sowohl myeloide als auch erythroide und multilineare Tochterzellen erzeugt wurden. Drei Monate nach der Transplantation stoppte jedoch die Aktivität der zugeführten Stammzellen und der Patient musste mit nicht *ex-vivo* kultivierten HS-Zellen nachtherapiert werden, die zuvor zusätzlich als Absicherung kryokonserviert worden waren (Brugger *et al.*, 1993). Dieses Beispiel zeigt auf, dass die Anpassung von Stammzellen an ihre Kulturbedingungen zu Änderungen führen können, die erst zu einem späteren Zeitpunkt messbar sind. Im Weiteren variieren die Kriterien, die zum Nachweis von ADSCs erfüllt ein müssen, je nachdem ob es sich um frisch isolierte oder *ex-vivo* kultivierte Zellen handelt (Bourin *et al.*, 2013).

Zudem weisen bereits native ADSCs eine Heterogenität auf, die durch vielfach beschriebene Subpopulationen geprägt ist (Blazquez-Martinez *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Borelli *et al.*, 2019). Einigen dieser Stammzelluntergruppen konnten bereits spezifische Eigenschaften zugeordnet werden. Demnach zeichnen sich ADSCs, die sowohl CD34 als CD146 exprimieren (CD34⁺/CD146⁺) durch eine höhere Kapazität zur Unterstützung neovaskulärer Prozesse aus (Röhrenbildung, engl: Tube Formation), die in CD146 nicht exprimierenden ADSC (CD34⁺/CD146⁻) geringer ausfällt (Li *et al.*, 2019). Daher postulieren Li *et al.*, dass die Charakterisierung der einzelnen Subpopulationen die Möglichkeit bietet, Populationen mit denen am besten geeigneten Voraussetzungen spezifisch für den einzelnen Therapieansatz zu verwenden und somit einerseits den Erfolg aber auch andererseits das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen zu reduzieren (Li *et al.*, 2011).

Das Ausmaß der Heterogenität von ADSCs nimmt wiederum zu, wenn Zellen aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben miteinander verglichen werden. Dies sollte bei der Wahl des Isolationsgewebes beachtet werden. Inwieweit zum Beispiel Effekte, die ADSCs des Abdominalfettgewebes auch in demselben Maß in ADSCs des Brustfettgewebes auftreten, ist derzeit noch nicht bekannt. Werden jedoch die unterschiedlichen Gegebenheiten der Stammzellnischen von ADSCs in Abdominal- und Brustfettgewebe (s. 1.2.2 Stammzellnische von ADSCs im weiblichen Brustfettgewebe) betrachtet, ist davon auszugehen, dass diese Zellen unterschiedlich reguliert werden. Daher wurden innerhalb dieser Arbeit ADSCs aus dem Mammareduktionsgewebe gesunder Frauen isoliert und einerseits auf die Strahlensensitivität gegenüber therapeutischer Bestrahlungsdosen hin untersucht und andererseits auf eine mögliche strahleninduzierten Beeinflussung von Brustkrebszellen analysiert.

4. Abschließende Betrachtung

ADSCs nehmen im Rahmen ihrer Stammzellfunktion eine zentrale Rolle zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ein. Neben der unbeschränkten Teilungskapazität und Fähigkeit zur Differenzierung in Tochterzellen der mesenchymalen Linie, verfügen ADSCs über ein sekretorisches Repertoire, um regenerative Prozesse innerhalb des Gewebes anzuregen. Bislang wurde angenommen, dass Tumorzellen von diesen Eigenschaften im vollen Umfang profitieren. So ist bekannt, dass Tumorzellen ADSCs rekrutieren können, um ihr Mikroenvironment aufzubauen. Jedoch gibt es auch Bedingungen, unter denen ADSCs Tumorzellen schädigen. So führt die Behandlung von ADSCs mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α zu intrazellulären Regulationswegen in ADSCs, woraufhin die Apoptose in benachbarten Tumorzellen eingeleitet wird (Mohammadpour *et al.*, 2016). Ebenso erhöht die Strahlentherapie die Expression inflammatorischer Mediatoren im Tumor, sodass die Migration von ADSCs zur Tumorseite verstärkt wird (S. M. Kim *et al.*, 2010; Klopp *et al.*, 2007; Shah, 2012). Daher ist es unter bestimmten Bedingungen möglich, dass die kombinierte Strahlentherapie mit ADSCs zu einem synergistischen Effekt gegen das Wachstum von Tumorzellen eingesetzt werden kann (Wu *et al.*, 2019). Auf diese Weise können Mechanismen wie die Tumor-assoziierte Rekrutierung von Stammzellen, welche zuvor als onkogene Risikofaktoren angesehen wurden, genutzt werden, um gezielt Tumorzellen abzutöten. Daher birgt die Klärung der Regulationsmechanismen der Stammzellnische ein großes Potenzial für die Medizin.

Innerhalb dieser Arbeit konnte ionisierende Strahlung als ein Regulationsfaktor der Stammzellnische von ADSCs identifiziert werden, der die unerwünschte Wachstumsförderung und Erhöhung der Überlebensfraktion von Brustkrebszellen in einen gegenteiligen Effekt umwandelt (**Publikation 1**). Hierbei dient die umfangreiche strahlenbiologische Analyse der Wirkung hoch (**Publikation 2**) und niedrig dosierter Photonenstrahlung (**Publikation 3**) als wichtiger Grundstein, um zukünftig die verschiedenen Möglichkeiten zur Beeinflussung von ADSCs mittels ionisierender Strahlung zu identifizieren.

5. Publikationen

5.1 Publikation 1: Promoting effects of adipose-derived stem cells are reversed by radiation therapy

A. Baaße, D. Juerß, E. Reape, K. Manda, G. Hildebrandt

Cytotechnology 70, 701–711 (2018).

Kurze Zusammenfassung

Adipose-derived stem cells (ADSCs) nehmen aufgrund ihres hohen regenerativen Potenzials eine besondere Rolle innerhalb ihres Mikroenvironments ein. Daher verspricht die Verwendung von ADSCs im Rahmen zellbasierter Therapien zu einer wesentlichen Verbesserung des Ergebnisses zu führen. Um jedoch auch das mögliche onkogene Risiko therapeutischer Ansätze zu beurteilen, wurden ADSCs aus der humanen Brust zunächst isoliert und näher charakterisiert. Anschließend wurde der Einfluss bestrahlter ADSCs als Teil des endogenen Fettgewebes auf Brustkrebszellen untersucht.

ADSCs wurden aus humanem Mammareduktionsgewebe gesunder weiblicher Spender isoliert und auf ihre spezifischen Eigenschaften, wie multilineare Differenzierungskapazität und die Expression spezifischer Oberflächenantigene analysiert. Um strahleninduzierte Bystander-Effekte von ADSCs auf MCF-7-Tumorzellen zu untersuchen, wurden die Zellen bestrahlt und im Anschluss indirekt ko-kultiviert. Danach wurden das Wachstum und das Überleben von MCF-7-Zellen analysiert.

Insgesamt zeigte sich, dass die Bestrahlungsbehandlung die Interaktion von ADSCs und Brustkrebszellen beeinflusst. So verbesserten einerseits unbestrahlte oder mit niedrigeren Dosen behandelte ADSCs das Wachstum von Tumorzellen, wohingegen die Verwendung höherer Strahlungsdosen zu einer signifikanten Hemmung des Tumorzellwachstums führte. Ebenso verminderte ein Mediumtransfer von bestrahlten ADSCs das klonogene Zellüberleben unbehandelter Brustkrebszellen, jedoch nicht bestrahlter Tumorzellen.

Promoting effects of adipose-derived stem cells on breast cancer cells are reversed by radiation therapy

Annemarie Baaße · Dajana Juerß · Elaine Reape · Katrin Manda · Guido Hildebrandt

Received: 4 May 2017 / Accepted: 15 November 2017 / Published online: 29 November 2017
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2017

Abstract Partial breast irradiation of early breast cancer patients after lumpectomy and the use of endogenous adipose tissue (AT) for breast reconstruction are promising applications to reduce the side effects of breast cancer therapy. This study tries to investigate the possible risks associated with these therapeutic approaches. It also examines the influence of adipose derived stem cells (ADSCs) as part of the breast cancer microenvironment, and endogenous AT on breast cancer cells following radiation therapy. ADSCs, isolated from human reduction mammoplasties of healthy female donors, exhibited multilineage

capacity and specific surface markers. The promoting effects of ADSCs on the growth and survival fraction of breast cancer cells were reversed by treatment with high (8 Gy) or medium (2 Gy) radiation doses. In addition, a suppressing influence on breast cancer growth could be detected by co-culturing with irradiated ADSCs (8 Gy). Furthermore the clonogenic survival of unirradiated tumor cells was reduced by medium of irradiated ADSCs. In conclusion, radiation therapy changed the interactions of ADSCs and breast cancer cells. On the basis of our work, the importance of further studies to exclude potential risks of ADSCs in regenerative applications and radiotherapy has been emphasized.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10616-017-0172-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Keywords Adipose-derived stem cells · Radiation · Radiation-induced bystander effect · Breast cancer

A. Baaße (✉) · D. Juerß · E. Reape · K. Manda · G. Hildebrandt
Department of Radiotherapy and Radiation Oncology,
University Medical Centre Rostock, Suedring 75,
18059 Rostock, Germany
e-mail: annemarie.baasse2@uni-rostock.de

D. Juerß
e-mail: dajana.jueress2@uni-rostock.de

E. Reape
e-mail: elaine.reape@uni-rostock.de

K. Manda
e-mail: katrin.manda@uni-rostock.de

G. Hildebrandt
e-mail: guido.hildebrandt@uni-rostock.de

Abbreviations

7-AAD	7-Aminoactinomycin
ADSCs	Adipose-derived stem cells
AT	Adipose Tissue
BrdU	Bromodeoxyuridine
CM	Conditioned medium
DMEM-F12	Dulbecco's modified Eagle medium and Kaighn's modification of Ham's F12
DMSO	Dimethyl sulfoxide
FBS	Fetal bovine serum Superior
MT	Medium transfer

NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
P/S	Penicillin/streptomycin
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Plating efficiency
RIBEs	Radiation-induced bystander effects
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of mean
SF	Survival fraction

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide with approximately 1.7 million new cases diagnosed in 2012 (Ferlay et al. 2015). Surgery is the standard therapy in breast cancer. Surgical options depend on the stage of the disease. These range from lumpectomy, the removal of the cancer and minimal surrounding tissue, a breast-conserving surgery in early-stage breast cancer patients or alternatively for more advanced stages of the disease, whole breast removal (mastectomy). For reconstruction of the breast, implants are still used. However, lipografting with endogenous AT appears to be a promising option for the future (reviewed in Gir et al. 2012). An advantage of AT is that it is a source of multipotent stem cells called Adipose-derived stem cells (ADSCs, Zuk et al. 2002). Noting their regenerative potential, ADSCs are advantageous for cell-based therapies, such as autologous fat grafting (Hanson et al. 2013). Since a unique definition for ADSCs does not exist, a successful isolation of ADSCs can be determined using a typical marker panel and by the capacity of these cells to undergo multilineage differentiation (Zuk et al. 2002; Mitchell et al. 2006; Locke et al. 2009). As part of the breast tumor microenvironment (Korkaya et al. 2011), ADSCs are believed to support the growth and metastasis of cancer, while conflicting data also exist that underline an anti-tumor effect (both reviewed in Schweizer et al. (2015)). As long as the interactions between ADSCs and breast cancer cells are not fully understood, new applications in plastic surgery, wound healing, regenerative medicine, and other clinical applications (Gir et al. 2012) represent a danger of having unknown side-effects.

ADSCs exist naturally in the AT surrounding the breast tumor bed. It is traditionally treated with radiation therapy in order to destroy any remaining tumor foci as well as reduce the chance of disease recurrence (Darby et al. 2011). To achieve this goal, a whole breast irradiation is used (Albuquerque et al. 2012). More than 20 years ago, studies investigated the late side effects of radiation on breast cancer patients, who were free from recurrence, but felt decreased levels of stamina and increased fatigue (Berglund et al. 1991). An alternative strategy called partial breast irradiation, using brachytherapy, was implemented to solve this problem. During partial breast irradiation therapy, only the breast tissue around the tumor bed is targeted. In an ongoing randomized phase III study of conventional whole breast irradiation versus partial breast irradiation for women with stage 0, I, or II breast cancer (NS ABP B-39/RT0G 0413) found out that partial breast irradiation allows patients to recover from cancer-related fatigue with improved quality of life in comparison to patients with whole breast irradiation (Albuquerque et al. 2012). In contrast to the advantages of partial breast irradiation, the risk of a rise in the number of remaining tumor foci cannot be excluded. As a result of this, irradiated cells exist in the region of unirradiated cells around the tumor bed. This consequently builds the basic requirement for radiation-induced effects in non-targeted cells, called radiation-induced bystander effects (RIBEs) (Goldberg and Lehnert 2002; Iyer and Lehnert 2002). In recent years, ADSC research has gained tremendous momentum in clinical research. This is because of increasing recognition of the endogenous and high regenerative capacity of ADSCs as a benefit in applications like breast reconstruction and partial breast irradiation to decrease late side effects of radiation therapy.

Therefore, ADSCs were isolated and tested for their multilineage capacity and their expression pattern of stem cell markers. For the following investigation on general effects and RIBEs on breast cancer cell growth, tumor cells were co-cultured with ADSCs indirectly; using either a transwell system or medium transfer (MT) method.

Thus, the aim of this study was to investigate the effects of ADSCs as part of the breast tumor microenvironment on the growth and survival of tumor cells during radiation.

Experimental procedures

Isolation and culture of ADSCs

Isolation of ADSCs

The isolation of ADSCs was performed with human reduction mammoplasties from healthy female donors. This work was approved by the ethics committee at the University of Rostock, Germany (registration-number: A2017-0049). The protocol for the isolation of fat tissue has been developed and optimized from previously described work (Yang et al. 2014b; Xiong et al. 2012). Tissue samples were mechanically minced and AT was washed three times with phosphate-buffered saline (PBS, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) and centrifuged ($250 \times g$). After each centrifugation step, the infranatant and resultant pellet were removed. Samples were digested with 0.1% collagenase type I (100 U/mL, Gibco Life Technologies, Darmstadt, Germany) supplemented with penicillin/streptomycin (P/S, 1%; 100 X, penicillin 10,000 U/ml, streptomycin 10,000 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) on a shaker at a low setting for 18 h at 37 °C. After complete dissociation, the tissue samples were washed with an equal volume of Dulbecco's modified Eagle medium and Kaighn's modification of Ham's F12 (DMEM-F12 media, Life Technologies) and filtered through 100 μm strainers (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). This was followed by a centrifugation step ($190 \times g$, 10 min, 37 °C) to obtain the ADSC fraction. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in ADSCs culture medium containing DMEM-F12 supplemented with 10% fetal bovine serum Superior (FBS, Biochrom AG, Berlin, Germany) and 1% P/S. Cells were cultured at 37 °C in the presence of 5% CO₂ for 48 h in order to enable them to adhere. Afterwards, the non-adherent fraction was removed and the remaining cells were washed twice with PBS before seeding. The medium was replaced every three days.

Cell maintenance of ADSCs

When cells reached approximately 80% confluence, the medium was discarded and cells were washed twice with PBS and trypsinized with 0.25% Trypsin/

EDTA (PAA Laboratories, Cölbe, Germany). The cell count was determined using Coulter Z2 automated cell counter (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Germany). The cells were cryopreserved in ADSCs culture medium containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Darmstadt, Germany) and 20% FBS. Experiments were performed in passage three to five.

Culture of MCF-7 cells

The breast cancer cell line, MCF-7 was cultured in DMEM (Lonza BioWhittaker, Verviers, Belgium) containing 1% P/S and 10% FBS at 37 °C with 5% CO₂. Cells were passaged twice a week using 0.05% Trypsin/EDTA.

Irradiation

MCF-7 cells and ADSCs were irradiated 24 h after seeding using the Linac Siemens Oncor Expression (Healthcare Sector Siemens AG, Erlangen, Germany) at a dose rate of 3.75 Gy/min. Irradiation doses of 2, 4, 6, and 8 Gy were used, alongside a sham irradiated 0 Gy control.

Multilineage capacity of ADSCs

All multilineage differentiation protocols were taken from Zhu et al. (2013). The differentiation potential of ADSCs was investigated with differentiation kits for adipogenesis, osteogenesis, and chondrogenesis, all three from StemPro[®], Gibco Life Technologies. All kits were used according to the manufacturer's instructions. DMEM/F-12 medium supplemented with 10% heat inactivated FBS (Provitro GmbH) and 5% P/S functioned as the control medium. Differentiated cells were dyed according to the differentiation lineage: adipocytes with Oil-Red O staining, chondrocytes with Alcian Blue (both from Sigma Aldrich) and osteocytes were stained with a Von Kossa staining kit, which included a counter-staining with nuclear red (Abcam, Cambridge, UK).

Immunophenotyping of ADSCs by flow cytometry

For analysis of mesenchymal surface markers, ADSCs in passage three to five were trypsinized,

washed with staining buffer (BD Pharmingen, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and stained with the following antibodies against CD29-PE, CD34-PE, CD90-FITC (all BD Biosciences), CD31-PE, CD45-PE and CD106-PE (all Biolegend, London, UK) on ice and in the dark for 20 min. Fluorochrome-conjugated isotype control antibodies (BD Biosciences) were used to determine the level of non-specific binding. Samples were washed (300 g, 4 °C, 5 min) and resuspended with staining buffer. The cells were analyzed by flow cytometry directly after incubation with 7-Aminoactinomycin (7-AAD, Biolegend) for 10 min on ice and protected from light (Cytomics FC 500, Beckmann Coulter). Positive and negative events were calculated using the CXP™ software and gated for living cells (negative for 7-AAD).

Bystander effects between MCF-7 cells and ADSCs

To investigate RIBEs, cell culture inserts (Fig. 1a, Greiner Bio-One) and the medium transfer (MT, Fig. 1b) were used in the experimental design for indirect co-culture. These methods allow the detection of RIBEs, which are caused by the release of

soluble factors into the surrounding medium of ADSCs.

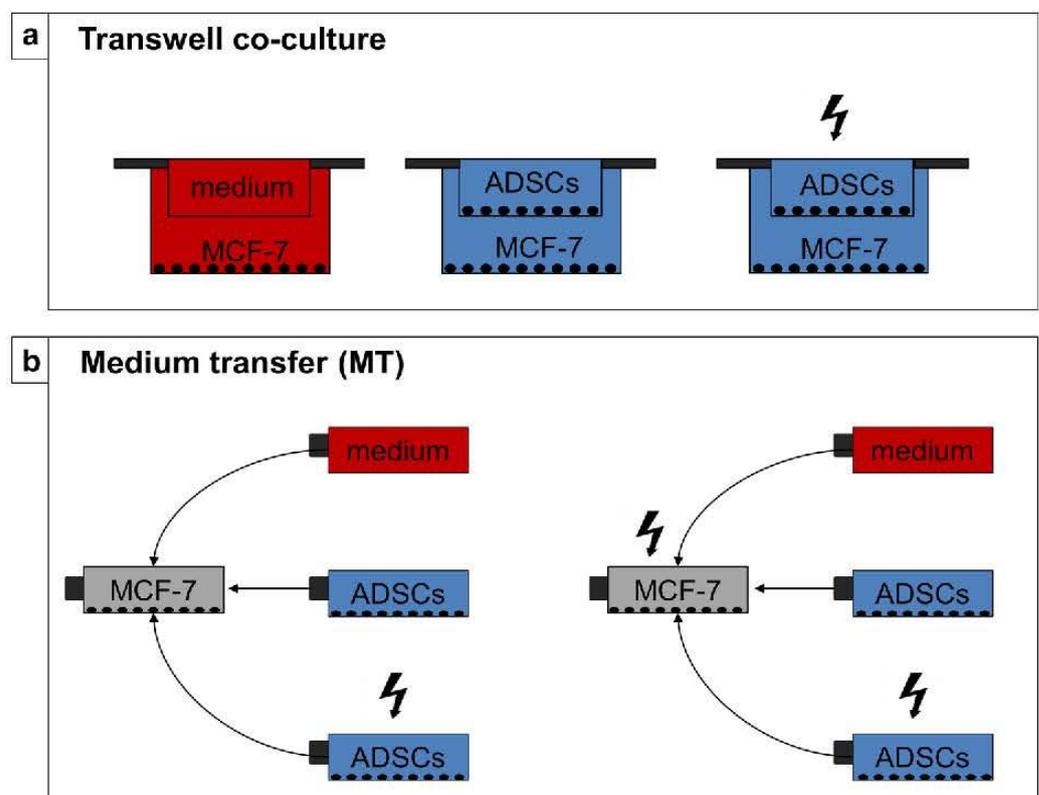
For transwell co-culture experiments, MCF-7 cells were seeded into 24-well plates. ADSCs were seeded into cell culture inserts within a 24-well plate containing culture medium. Immediately after irradiation with doses of 2 and 8 Gy, ADSCs were transferred into the well plates with MCF-7 cells. The cell number of MCF7 was measured in triplicate every 24 h to investigate the RIBE on cell viability.

For MT experiments, the cell culture supernatant of ADSCs, called conditioned medium (CM), was collected six hours after irradiation and centrifuged (250 × g, 5 min, 20 °C). Then the CM was transferred to MCF-7 cells as a half medium exchange. This MT was used for cell proliferation and colony formation assays.

Cell proliferation assay

An equal number of both MCF-7 cells and ADSCs were seeded in quintuplicate into 96-well plates (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland). For MT the same density of ADSCs was seeded. Radiation doses of 2 and 8 Gy were implemented. Changes in proliferation of MCF-7

Fig. 1 Experimental design for investigating the radiation induced bystander effect of adipose-derived stem cells in MCF-7 Cells: **a** Transwell co-culture system for indirect co-culture of MCF-7 cells in 24-well plates and adipose-derived stem cells (ADSCs) in ThinCerts™ were seeded 24 h before irradiation of ADSCs. Transfer of ThinCerts™ to well-plates containing MCF-7 cells was directly performed after irradiation **b** medium of unirradiated/irradiated ADSCs to MCF-7 cells was transferred 6 h after irradiation



cells were assessed by the colorimetric Cell Proliferation ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and performed according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated with bromodeoxyuridine (BrdU) for over 48 h, starting 30 min before irradiation. In order to calculate the relative BrdU Incorporation, unirradiated MCF-7 cells without MT (control) were defined as 100% BrdU incorporation.

Colony formation assay

MCF-7 cells were seeded in triplicates in T₂₅ flasks (Greiner Bio One) and treated with radiation and MT as described in Fig. 1. A full medium exchange with MCF-7 culture medium was carried out after seven days and crystal violet staining (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) was done 14 days after seeding. Stained colonies were counted to calculate the plating efficiency (PE) and survival fraction (SF) of MCF-7 cells.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm standard deviation (SD) or standard error of mean (SEM). To identify differences between data sets, the two tailed Student *T* test was performed. Significance was assessed at $p < 0.05$ (*/#; $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$). In case of the colony formation assay, the one-tailed T-test was used, whereby significant effects were defined at $p < 0.02$ (*: $p < 0.02$, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.002$).

Results

Characterization of isolated ADSCs

The isolated ADSCs showed the ability to adhere to plastic and were characterized by a spindle-shaped and fibroblast-like morphology, shown in Fig. 2a. To determine the stem cell characteristics of ADSCs, the multilineage capacity and expression pattern toward certain surface markers were analyzed.

Multilineage differentiation of ADSCs

Undifferentiated ADSCs were cultured with specific differentiation medium toward adipogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages following a minimum of 14 days of incubation. The results are illustrated in Fig. 2b. The multilineage capacity was confirmed microscopically prior to staining (a2, b2, c2) and then visualized by lineage specific staining methods (a1, b1, c1). The Oil Red O staining method revealed lipid vacuoles (bright red) in differentiated adipocytes (a1). Alcian blue confirmed the presence of glycosaminoglycan by blue staining of sulphated proteoglycans as an indicator for chondrogenesis (a2). After osteogenic differentiation, Von Kossa staining showed deposits of calcium precipitate stained grey when calcium was dispersed. It turned black when it was found in mass deposits and after an additional counterstaining with nuclear red the cell nuclei were visualized (a3). ADSCs cultured with control medium showed no induction properties for adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation (a3, b3, and c3).

Expression pattern of ADSCs

The expression patterns of ADSCs were analyzed by flow cytometry for specific surface markers at passage three to five of three different donor materials. As expected, CD29 and CD90 were expressed in nearly every way whereas CD31, CD34, CD45 and CD106 were not (Fig. 2c). This expression profile did not change between passage three to passage five (Figure in supplement, S1).

Transwell co-culture of MCF-7 Cells and ADSCs

Growth Curve

To analyze the RIBEs of irradiated ADSCs on their neighboring unirradiated MCF-7 cells, a transwell co-culture system was used. The number of co-cultured MCF-7 cells was measured daily and used to calculate the population doubling time during the period of logarithmic MCF-7 growth from day two to six (Fig. 3). While sham and medium dose (2 Gy) irradiated ADSCs accelerated the growth of co-cultured MCF-7 cells, high dose (8 Gy) irradiated ADSCs led to decreased MCF-7 cell numbers on the

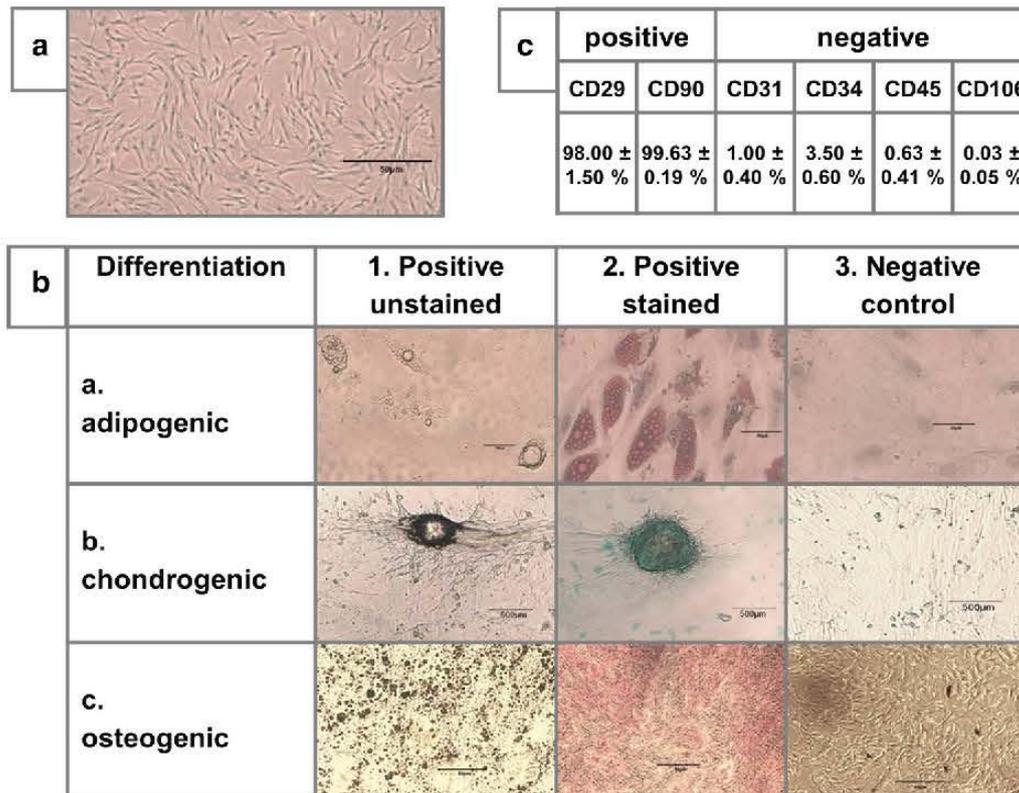


Fig. 2 Characterization of isolated human adipose derived stem cells. **a** Morphology of human adipose-derived stem cells (ADSCs) isolated from breast tissue 3 four days after seeding at passage 3 (scale bar: 500 μ m) **b** Trilineage differentiation capacity of ADSCs. **a** Adipogenic differentiation: Differentiated adipocytes (1) were stained with Oil red O (2, lipid droplets are shown as bright red globules) and undifferentiated ADSCs were stained as a control (3). **b** Chondrogenic differentiation: Differentiated chondrocytes (2) and undifferentiated ADSCs as control (3) stained with Alcian blue, blue

regions showing sulphated proteoglycans—an indicator for chondrogenesis **c** Osteogenic differentiation: Differentiated osteocytes (1, 2) and undifferentiated ADSCs as control (3) stained with Von Kossa Kit (2 and 3), calcium precipitate regions were distinguishable by a dark brown color. **c** Expression pattern of ADSCs from three different donors were tested towards the surface cell markers CD29, CD31, CD34, CD45, CD90 and CD106 by flow cytometry. Results are illustrated as mean \pm standard error of the mean (SEM, $n = 3$). (Color figure online)

days four, five and seven (Fig. 3a). Those effects are reflected in the PDT of co-cultured MCF-7 cells that decrease with increasing radiation dose of ADSCs from 32.4 h (0 Gy) to 35.1 h (8 Gy).

Medium transfer (MT) experiments from ADSCs to MCF-7 cells

To investigate the short-term effects of radiation on ADSCs, the MT procedure was carried out six hours after irradiation as a half medium exchange of MCF-7 cells with ADSCs CM. The CM contains any factor released from the ADSCs, which in turn affect MCF-7 cells. The different experimental approaches have been illustrated previously (Fig. 1).

Clonogenic survival

In order to examine the long-term effects following radiation exposure and treatment with ADSCs CM, the clonogenic survival of MCF-7 cells was measured 14 days after different treatment combinations (Fig. 1). The resulting survival fractions (SF) of MCF-7 cells were calculated by the relative number of surviving colonies. These were normalized after measuring MCF-7 cells that were not treated with ADSCs CM (control, Fig. 4).

In general, the number of MCF-7 colonies decreased upon increasing doses of radiation (Fig. 4b). A typical shoulder curve was observed within the low dose ranges up to 4 Gy. It progressed into an exponential curve after IR with higher doses (Fig. 4b). The treatment with CM from irradiated or unirradiated ADSCs did not change those

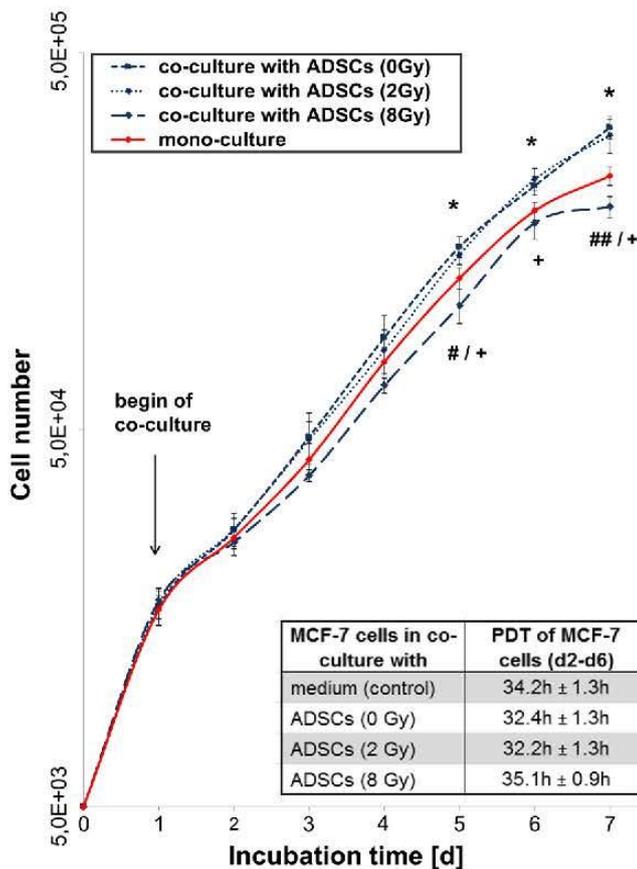


Fig. 3 Growth characteristics of MCF-7 cells in co-culture with differently irradiated adipose derived stem cells. Triplicates of 5×10^3 MCF-7 cells were seeded in 24-well plates and 1×10^3 adipose-derived stem cells (ADSCs) in cell culture inserts; 1 day after seeding ADSCs were irradiated with different doses (0 Gy, 2 Gy, 8 Gy) and transferred directly to MCF-7 cells (on day 1). Daily cell count of MCF-7 cells for over 7 days were performed and the results of the co-cultures of MCF-7 cells with ADSCs from 5 different donors are illustrated as mean \pm standard error of the mean (SEM, $n = 5$); * $##/+$ $p < 0.05$ and $##$ $p < 0.001$ significant differences to * control, # MCF-7 cells in co-culture with 2 Gy irradiated ADSCs and + MCF-7 cells in co-culture with 8 Gy irradiated ADSCs. MCF-7 cell numbers were used to calculate the population doubling time (PDT) of logarithmic growth from second day to sixth day, illustrated as mean \pm SEM

characteristics. In the second approach, unirradiated MCF-7 cells were treated with CM from irradiated ADSCs (Fig. 4a). This led to an average decrease in MCF-7 survival fraction of around 14%, independent of radiation dose (2–8 Gy).

Proliferation analysis (BrdU)

The short-term effects of radiation and the influence of ADSCs CM on MCF-7 proliferation involved the BrdU incorporation assay, which determines cell

divisions. These cell divisions were documented for 48 h, starting at the time-point of radiation (Fig. 5).

The MT from unirradiated ADSCs to MCF-7 cells, six hours after irradiation, caused small fluctuations, but no significant changes in the proliferation of MCF-7 cells.

Discussion

Based on our findings, we postulate that interactions of ADSCs and breast cancer cells are influenced by radiation therapy.

We view this as an important basis for new trials especially since the use of ADSCs containing lipografts for breast reconstruction are becoming increasingly more conventional in clinical practice. In spite of its advantages for reconstructive purposes, numerous investigations describe the promoting effects of ADSCs on residing cancer cells (Eterno et al. 2014; Yang et al. 2014a; Kuhbier et al. 2014; Trivanović et al. 2016). But so far the relevant mechanisms remain poorly understood. Bystander effects can occur from communication between cells through direct cell–cell contacts or via transmissible molecules secreted into the medium of the targeted cells. One possible explanation of promoting effects of ADSCs on residing cancer cells seems to be attributed to the wide range of cytokines, which were shown to be released by ADSCs (Rehman et al. 2004; Melief et al. 2013; Kokai et al. 2014). Therefore altered cytokine production of ADSCs after co-culturing with breast cancer cells was detected (Eterno et al. 2014). Likewise, with inflammatory cytokines primed ADSCs stimulate the migration and invasion capability of MCF-7 breast cancer cells via TGF- β 1 (Trivanović et al. 2016).

On the basis of these findings, we decided to use indirect co-culture systems to analyze the interactions between ADSCs and breast cancer cells via soluble factors. While transwell co-culture systems enable a bidirectional exchange, the medium transfer (MT) method only allows a unidirectional interaction. Following our investigation, these differences in the influence of ADSCs on breast cancer cells between two co-culture systems were not observed. This indicated that breast cancer cells in short-term co-culture do not change the radiation-induced negative effects of ADSCs. In contrast, Trivanovic et al.

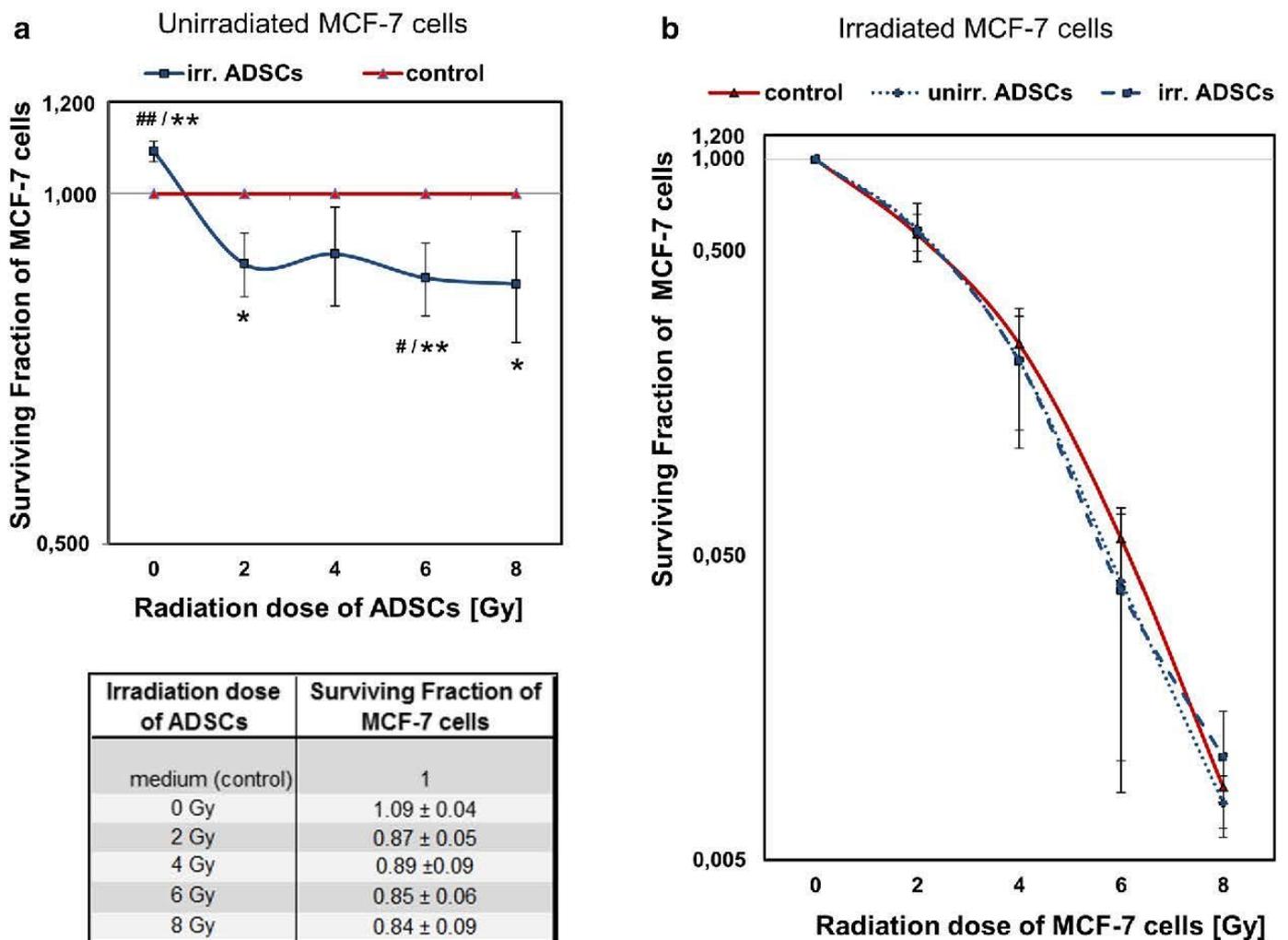


Fig. 4 Colony forming efficiency assay of irradiated and unirradiated MCF-7 cells after medium transfer from adipose-derived stem cells. Triplicates of MCF-7 cells (5×10^3) and adipose-derived stem cells (ADSCs, 13×10^4) were seeded 24 h before irradiation in cell culture flasks. Six hours after irradiation a medium transfer with ADSCs conditioned medium (CM) for unirradiated (a) or irradiated (b) MCF-7

cells was performed, followed by a full medium exchange with culture medium on day 8 and crystal violet staining on day 15. MCF-7 cells survival fractions (SF) of the different experimental approaches were normalized to the control; results are illustrated as mean \pm standard deviation (SD, $n = 3$), *: $p < 0.02$, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.002$

(2014) reported a proliferation stimulation on MCF-7 cells in direct mixed co-culture and transwell systems, but an antiproliferative effect using a conditioned medium. Therefore, Trivanovic and co-authors concluded that supporting and inhibiting effects of ADSCs on tumor cells seem to be dependent on the co-culture system whereas RIBEs are not. In contrast to their results we could not detect any antiproliferative effect on breast cancer cells using conditioned medium. This discrepancy may originate from different experimental designs of both studies. Whereas in our study the breast cancer cells were conditioned with medium of irradiated ADSCs, Trivanovic and co-worker treated tumor cells with

medium of untreated ADSCs and irradiated after medium transfer.

We demonstrated a supporting effect of unirradiated or with low doses treated ADSCs on the growth of breast cancer cells whereas higher radiation doses inhibited the tumor cell growth. On the other hand irradiated ADSCs reduced the survival of untreated tumor cells, independent of radiation dose. Yang et al. (2014a) used a comparable experimental design and postulated that ADSCs have a radioprotective effect on breast cancer cells. In contrast to the present study, MCF-7 cells were treated with supernatant of unirradiated ADSCs before irradiation. With regard to our results, it is conceivable that a second MT after

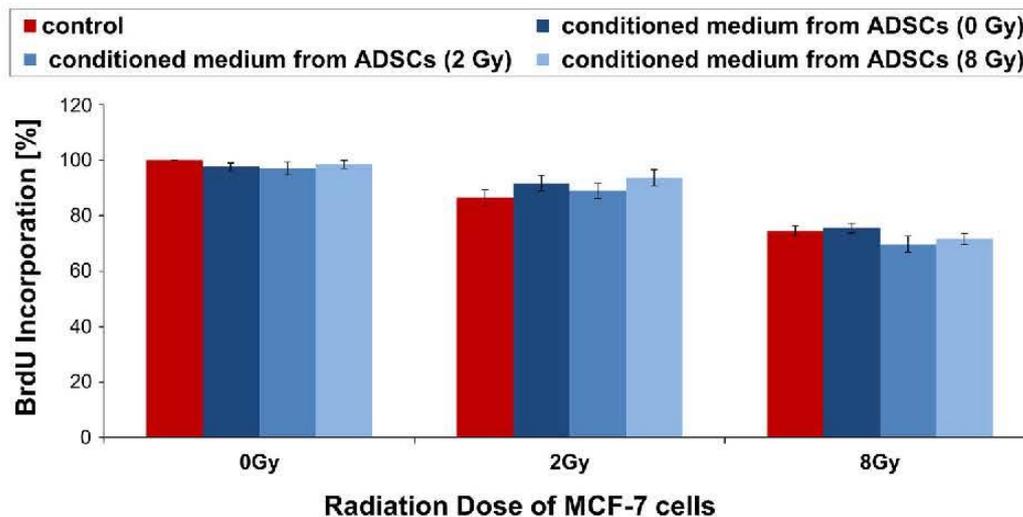


Fig. 5 BrdU-Incorporation in MCF-7 cells after irradiation and treatment with conditioned medium from adipose-derived stem cells. Conditioned medium from irradiated adipose-derived stem cells (ADSCs, 0 Gy, 2 and 8 Gy) of four different

donors to MCF-7 cells six hours after irradiation; BrdU-incorporation was measured 48 h after irradiation; results are illustrated as mean \pm standard deviation (SD, $n = 4$)

irradiation of ADSCs could neutralize this radioprotective effect on breast cancer cells.

There is also an inconsistency in publications that describe the promoting (Yang et al. 2014a; Kuhbier et al. 2014; Trivanović et al. 2016) and suppressing effects of ADSCs on breast cancer cells (Ryu et al. 2014; Trivanovic et al. 2014, 2016; Lee et al. 2015). This could be caused by the use of different radiation doses like in our study concerning the tumor cell growth. As shown, cell proliferation of MCF-7 cells is not affected and could not be the reason for the effects of ADSCs on tumor cell growth. It also could be due to the wide range of ADSCs isolation, cultivation, and co-culture methods (Klopp et al. 2011). The successful isolation of ADSCs can be determined using a distinctive cell surface marker panel and by the capacity of these cells to undergo multi lineage differentiation (Zuk et al. 2002; Mitchell et al. 2006; Locke et al. 2009). Differentiation potential in our study was proven by inducing various differentiation lineages. According to Zhu et al. (2013), a cell population that can be induced into these lineages are indicative of stem cells, as this is solely a stem cell characteristic. The second criterion for the successful isolation of ADSCs in the present study was achieved by the detection of CD90 and CD29 and lack of CD31, CD34, CD45 and CD106 as specific surface markers. Another source for discrepancy of effects in the literature could be caused by different sources of adipose tissue (AT),

like brown, mammary and white AT with different particularities (Kolaparthi et al. 2015). In our study, ADSCs isolated from healthy breast tissue from human reduction mammoplasties of female donors, were used as a model for endogenous stem cells in the vicinity of residing breast cancer cells. Because functional variations among ADSCs from different origins have already been described (Hanson et al. 2013; Chen et al. 2015), we also investigated the proliferation and colony formation ability of MCF-7 cells co-cultured with commercially available human derived ADSCs (Invitrogen™, Fisher Scientific) sourced from the abdomen. No qualitative differences were recognized (data not shown). Therefore, our results are also transferable to issues of fat grafting, where abdominal AT is used.

Conclusion

In conclusion, the present study demonstrates clearly that irradiation influences the interaction of ADSCs and breast cancer cells. Unirradiated or with lower doses treated ADSCs improved the growth of tumor cells, whereas using higher radiation doses resulted in a significant inhibition of tumor cell growth. Furthermore medium from irradiated ADSCs reduced clonogenic survival of untreated breast cancer cells, but not in irradiated tumor cells. This finding highlights the importance of further studies to

exclude potential risks of ADSCs in regenerative applications and radiotherapy. To work out the optimal conditions and those ADSCs inhibit cancer cells could be the key for the safe and effective use of ADSCs in regenerative medicine.

Acknowledgements Human breast tissue from cosmetic reduction mammoplasties were very kindly provided by Prof. Bernd Gerber at the Department of Obstetrics and Gynecology, University Medical Center Rostock and Dr. Jürgen Weber at the Clinic of Aesthetics of the Academy for Transdermal Delivery Research e.V., Rostock, as well as Prof. Dr. Björn Dirk Krapohl, specialist in plastic and hand surgery of the St. Marien Hospital, Berlin and Prof. Dr. Peter Mailänder, head of plastic surgery at the UKSH, Lübeck.

Compliance with ethical standards

Conflict of interests The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Albuquerque K, Tell D, Lobo P et al (2012) Impact of partial versus whole breast radiation therapy on fatigue, perceived stress, quality of life and natural killer cell activity in women with breast cancer. *BMC Cancer* 12:251. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-251>
- Berglund G, Bolund C, Fornander T et al (1991) Papers late effects of adjuvant chemotherapy and postoperative radiotherapy on quality of life among breast cancer patients. *Eur J Cancer and Clin Oncol* 27:1075–1081
- Chen J-Y, Mou X-Z, Du X-C, Xiang C (2015) Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pac J Trop Med* 8:739–746. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.07.022>
- Darby S, McGale P, Correa C et al (2011) Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 378:1707–1716. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61629-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61629-2)
- Eterno V, Zambelli A, Pavesi L et al (2014) Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling. *Oncotarget* 5:613–633. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1359>
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Gir P, Oni G, Brown SA et al (2012) Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 129:1277–1290. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31824ecae6>
- Goldberg Z, Lehnert BE (2002) Radiation-induced effects in unirradiated cells: a review and implications in cancer. *Int J Oncol* 21:337–349
- Hanson SE, Kim J, Hematti P (2013) Comparative analysis of adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from abdominal and breast tissue. *Aesthet Surg J* 33:888–898. <https://doi.org/10.1177/1090820X13496115>
- Iyer R, Lehnert BE (2002) Alpha-particle-induced increases in the radioresistance of normal human bystander cells. *Radiat Res* 157:3–7. <https://doi.org/10.1667/0033-7587>
- Klopp AH, Gupta A, Spaeth E et al (2011) Concise review: dissecting a discrepancy in the literature: Do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 29:11–19. <https://doi.org/10.1002/stem.559>
- Kokai LE, Marra K, Rubin JP (2014) Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res* 163:399–408. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.009>
- Kolaparthi LK, Sanivarapu S, Moogla S, Kutcham RS (2015) Adipose tissue—Adequate, accessible regenerative material. *Int J stem cells* 8:121–127. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2015.8.2.121>
- Korkaya H, Liu S, Wicha MS (2011) Review series breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest* 121:3804–3809. <https://doi.org/10.1172/JCI57099.3804>
- Kuhbier JW, Bucan V, Reimers K et al (2014) Observed changes in the morphology and phenotype of breast cancer cells in direct co-culture with adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 134:414–423. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000000525>
- Lee JH, Park CH, Chun KH, Hong SS (2015) Effect of adipose-derived stem cell-conditioned medium on the proliferation and migration of B16 melanoma cells. *Oncol Lett* 10:730–736. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3360>
- Locke M, Windsor J, Dunbar PR (2009) Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg* 79:235–244
- Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H (2013) Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med* 2:455–463. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0184>
- Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S et al (2006) Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24:376–385. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0234>
- Rehman J, Traktuev D, Li J et al (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109:1292–1298. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1>
- Ryu H, Oh J-E, Rhee K-J et al (2014) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN- β and suppress the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett* 352:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.06.018>
- Schweizer R, Tsuji W, Gorantla VS et al (2015) The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis. *Stem Cells Int.* <https://doi.org/10.1155/2015/120949>

- Trivanovic D, Nikolic S, Krstic J et al (2014) Characteristics of human adipose mesenchymal stem cells isolated from healthy and cancer affected people and their interactions with human breast cancer cell line MCF-7 in vitro. *Cell Biol Int* 38:254–265. <https://doi.org/10.1002/cbin.10198>
- Trivanović D, Jauković A, Krstić J et al (2016) Inflammatory cytokines prime adipose tissue mesenchymal stem cells to enhance malignancy of MCF-7 breast cancer cells via transforming growth factor- β 1. *IUBMB Life* 68:190–200. <https://doi.org/10.1002/iub.1473>
- Xiong L, Sun J, Hirche C et al (2012) In vitro n-acetyl-L-cysteine promotes proliferation and suppresses interleukin-8 expression in adipose-derived stem cells. *Aesthetic Plast Surg* 36:1260–1265. <https://doi.org/10.1007/s00266-012-9960-8>
- Yang HY, Qu RM, Lin XS et al (2014a) IGF-1 from adipose-derived mesenchymal stem cells promotes radioresistance of breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:10115–10119
- Yang J, Xiong L, Wang R et al (2014b) Adipose-derived stem cells from the breast. *J Res Med Sci* 19:112–116
- Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M et al (2013) Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/50585>
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al (2002) Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell* 13:4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0105>

5.2 Publikation 2: Radiation Sensitivity of Adipose-Derived Stem Cells Isolated from Breast Tissue

A. Baaße, F. Machoy, D. Juerß, J. Baake, F. Stang, T. Reimer, B.D. Krapohl, G. Hildebrandt
Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 1988, doi:10.3390/ijms19071988.

Kurze Zusammenfassung

Innerhalb der ersten Publikation konnte festgestellt werden, dass die Bestrahlungsbehandlung von *Adipose-derived stem cells* die Interaktion mit MCF-7 Brustkrebszellen maßgeblich beeinflusst. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind jedoch unbekannt. Daraus ergab sich zunächst die Frage, inwieweit die Strahlentherapie zu Zell- und DNS-Schädigungen in ADSCs führt und in welchem Maße diese repariert werden können. Daher war das Ziel dieser Untersuchung, erstmals die Strahlensensitivität adulter Stammzellen des Fettgewebes der weiblichen Brust zu untersuchen.

Um spenderabhängige Effekte auszuschließen, wurden die Zellen von 10 verschiedenen Spenderinnen zu gleichem Anteil zusammengeführt und für die strahlenbiologische Analyse verwendet. Das klonogene Zellüberleben wurde ermittelt, um die Strahlenempfindlichkeit der ADSCs im Vergleich zu strahlenempfindlichen (ZR-75-1), mäßig empfindlichen (MCF-7) und resistenten (MCF10A) Zelllinien zu klassifizieren. Anschließend wurde die Zyto- und Genotoxizität der Bestrahlung von ADSCs untersucht.

Insgesamt wiesen ADSCs eine mittlere Strahlungsempfindlichkeit auf, gekennzeichnet durch eine hohe Reparaturkapazität von DNS-Doppelstrangbrüchen. Die in diesem Zusammenhang festgestellte Zunahme des Anteils bestrahlter ADSCs im G2M- Zellzyklusarrest und die gleichzeitige Erhöhung der Expression des Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) -Inhibitors p21 deuteten hierbei auf funktionelle Reparaturmechanismen hin.



Article

Radiation Sensitivity of Adipose-Derived Stem Cells Isolated from Breast Tissue

Annemarie Baaße ^{1,*} , Friederike Machoy ¹, Dajana Juerß ¹, Jana Baake ¹, Felix Stang ², Toralf Reimer ³, Björn Dirk Krapohl ⁴ and Guido Hildebrandt ¹

¹ Department of Radiotherapy and Radiation Oncology, University Medical Centre Rostock, Suedring 75, 18059 Rostock, Germany; friederike.machoy@uni-rostock.de (F.M.); dajana.juerss2@uni-rostock.de (D.J.); jana.baake@uni-rostock.de (J.B.); guido.hildebrandt@uni-rostock.de (G.H.)

² Clinic for Plastic, Hand and Reconstructive Surgery, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Luebeck. Ratzeburger Allee 160, 23538 Luebeck, Germany; felix.stang@uksh.de

³ Department of Obstetrics and Gynecology, University of Rostock, Women's Hospital, Suedring 81, 18059 Rostock, Germany; toralf.reimer@med.uni-rostock.de

⁴ Berliner Centrum für Musikermedizin, Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany; bjoern-dirk-krapohl@charite.de

* Correspondence: annemarie.baasse2@uni-rostock.de; Tel.: +49-381-494-9112

Received: 28 May 2018; Accepted: 5 July 2018; Published: 7 July 2018



Abstract: Within their niche, adipose-derived stem cells (ADSCs) are essential for homeostasis as well as for regeneration. Therefore, the interest of physicians is to use ADSCs as a tool for radiation oncology and regenerative medicine. To investigate related risks, this study analyses the radiation response of adult stem cells isolated from the adipose tissue of the female breast. To avoid donor-specific effects, ADSCs isolated from breast reduction mammoplasties of 10 donors were pooled and used for the radiobiological analysis. The clonogenic survival fraction assay was used to classify the radiation sensitivity in comparison to a more radiation-sensitive (ZR-75-1), moderately sensitive (MCF-7), and resistant (MCF10A) cell lines. Afterwards, cytotoxicity and genotoxicity of irradiation on ADSCs were investigated. On the basis of clonogenic cell survival rates of ADSCs after irradiation, we assign ADSCs an intermediate radiation sensitivity. Furthermore, a high repair capacity of double-strand breaks is related to an altered cell cycle arrest and increased expression of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21. ADSCs isolated from breast tissue exhibit intermediate radiation sensitivity, caused by functional repair mechanisms. Therefore, we propose ADSCs to be a promising tool in radiation oncology.

Keywords: adipose-derived stem cells; radiation therapy; ionizing radiation; regenerative medicine

1. Introduction

The stromal vascular fraction of adipose tissue (AT) represents a source of multipotent stem cells called adipose-derived stem cells (ADSCs) [1,2]. Since their first isolation by Rodbell in 1964 [3], advantages of ADSCs in clinical applications have become more present in the past years. First, in contrast to embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs), adult stem cells are naturally immune-compatible and there are no ethical issues related to their use. Second, AT as a source of adult stem cells is easily accessible compared to the more invasive and severe pain-associated bone marrow harvesting. In addition, AT from liposuctions or breast reductions is often discarded as medical waste, so no additional surgery is required. Simultaneously, ADSCs and bone marrow-derived stem cells (BMSCs) bear similar phenotypes, including their capacity to self-renew, specific panels of surface proteins, and similar differentiation potentials [2,4,5]. Consequently, ADSCs seem to represent a more

promising tool for regenerative therapies than BMSCs [6–8]. From this reasoning, the characterization and usage of ADSCs for clinical applications have recently been the focus of research.

Some applications of AT have been routinely used for decades, such as mammary lipografting to patients for breast reconstructive and cosmetic purposes [9]. However, to receive satisfying results, several repetitions of the lipografting procedure have to be performed [9], because only about 30–40% of the transplanted cells survive this procedure [10], due to the initially missing vasculature of the transplant, which leads to the hypoxic situation and thus to the increased death rate of the cells within the lipograft. One solution is proposed by the working group around Adachi, who achieved an increase of MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) and VEGF (vascular endothelial growth factor) by low-dose irradiation (IR) of ADSCs; these signaling agents are known to increase angiogenesis in target cells. This way, the IR procedure of ADSCs might improve the cell survival of the autologous lipograft [11].

What has not yet been considered, however, is the risk of undesired side effects after radiation treatment of ADSCs. Therefore, this study investigates the cytotoxic effects of radiation on pooled ADSCs (pADSCs) as well as their repair capacity of DNA damage. In the course of radiation therapy, high energy is transferred either directly onto DNA molecules or indirectly by producing free radicals, which in turn affect the DNA strands. The result may also be lesions on the DNA bases or the sugar backbone, but the main cause of cell death is double-strand breaks (DSBs) [12]. Therefore, repair mechanisms of DSBs are crucial for cells to overcome radiation-induced cell lesions. Depending on the extent of cell damage, either apoptosis or cell cycle arrest is initiated, whereby the latter is being used to initiate repair mechanisms. In both directions, p53 was identified as the main regulator depending on activated target genes. While p53 regulates apoptosis through transcriptional activation of the bcl2 family members (bax, noxa, and puma) [13], the cell cycle arrest and the subsequent entry into repair mechanisms is targeted through the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21 [14]. Those repair pathways have already been confirmed for mouse and human BMSCs [15,16] as well as for ADSCs isolated from the mouse [17]. Whether, as expected, similar radiation-induced mechanisms are functional in human breast-derived ADSCs, is to be investigated within this study.

Being aware of the extent of possible damages to ADSCs after beam exposure may also be important for planning radiation treatment of patients, because they are crucial for the healing of many tissue damages. Within their niche, ADSCs are essential for homeostasis of adipose tissue through adipogenesis and angiogenesis. Activated by external signals, ADSCs are able to secrete factors to induce adipose remodeling and neovascularization in damaged tissue [18–20]. Therefore, the management of radiation therapies which do not cause extensive damage in ADSCs could reduce the incidence of undesirable side effects.

Thus, the purpose of this study is to classify the radiation sensitivity of ADSCs isolated from the breast and to clarify underlying mechanisms.

2. Results

2.1. Immunophenotype of pADSCs Does Not Change after IR with a Maximal Dose of 8 Gy

For this study, ADSCs were obtained from human reduction mammoplasties from healthy female donors. As shown in a previous study, these cells are characterized by a spindle-shaped and fibroblast-like morphology as well as their ability to adhere on plastics. Furthermore, the cells exhibit a multilineage capacity and a specific panel of expressed and lacking surface antigens (CD29⁺, CD90⁺, CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD106⁻) [21].

In this study, ADSCs isolated from 10 different donors were pooled (pADSCs) to avoid donor-specific effects. Their growth kinetics, proliferation rate, survival fraction, and repair capacity of DNA double-strand breaks after the irradiation procedure were comparable to the average of the single analysis of each donor (Appendix A, Table A2, Figures A1–A4). However, it should be noted that slight donor-specific differences exist in the growth rate of ADSCs. Therefore, pADSCs of a relatively high

number of donors were chosen for pooling, and experiments were performed only a few doubling times after cell pooling.

As a basis for this study, the immunophenotype of irradiated pADSCs was characterized by expressed and lacking surface antigens. Seventy-two hours after IR with a dose of 2 or 8 Gy, pADSCs constantly expressed CD29 (90.0% and 95.7%) and CD90 (96.2% and 96.5%) in nearly every way that CD31 (1.3% and 2.4%), CD34 (4.3% and 6.6%), CD45 (0.6% and 0.7%), and CD106 (0.3% and 0.4%) were not (Figure 1). No significant differences relative to unirradiated cells were detectable. In summary, with a maximum IR dose of 8 Gy, the immunophenotype of pADSCs did not change after IR.

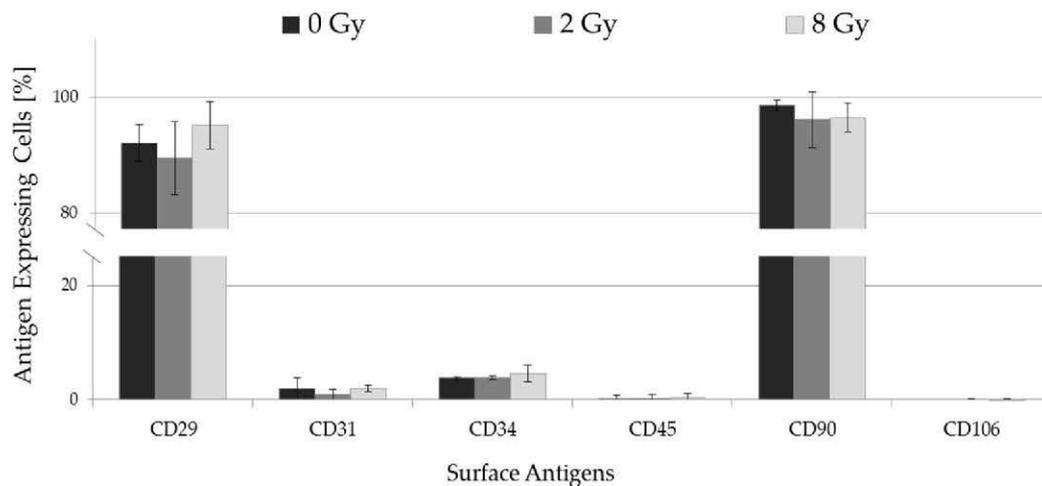


Figure 1. Surface antigen expressions (CD29, CD31, CD34, CD45, CD90, and CD106) of pADSCs 72 h after being irradiated with 2 or 8 Gy. The expression values of isotype-matched control immunoglobulin-labeled cells were deducted from determined expression levels of each surface antigen, and unstained cells were also carried as controls. Data are presented as mean \pm standard deviation, $n = 3$.

2.2. pADSCs Exhibit Intermediate Radiation Sensitivity

In order to classify the radiation sensitivity of ADSCs, the radiation-sensitive breast cancer cell line ZR-75-1, the more moderately sensitive breast cancer cell line MCF-7 [22], and the rather radiation-resistant cell line MCF10A [22] were tested for their clonogenic survival fraction (SF) parallel to the analysis of pADSCs. The observed SF of the reference cell lines (Figure 2) are consistent with published data [22,23]. Additionally, we tested the nontumorigenic epithelial cell line MCF10A in order to compare the radiation sensitivity of pADSCs with a normal adjacent cell type. In general, the number of ZR-75-1, MCF-7, MCF10A, and pADSCs colonies decreased with increasing IR dose, whereby the survival curve of pADSCs runs between that of MCF10A and MCF-7 cells. An already low-dose IR of 0.5 Gy leads to a reduction of pADSC SF to $88 \pm 9\%$. After IR with a dose range of 4 to 8 Gy, pADSCs and MCF-7 cells show comparable SFs, whereas pADSCs are less affected than MCF-7 cells after low-dose irradiation of 2 Gy (Appendix A, Table A1). It should be emphasized that such an irradiation dose of 2 Gy is of particular clinical importance, since it is used for conventionally fractionated whole-breast irradiation of early stage breast cancer patients. Compared to MCF-7 cells and pADSCs, the nontumorigenic epithelial cell line MCF10A is rather radiation-resistant and the tumorigenic cell line ZR-75-1 is rather radiation-sensitive. Altogether, pADSCs exhibit intermediate radiation sensitivity.

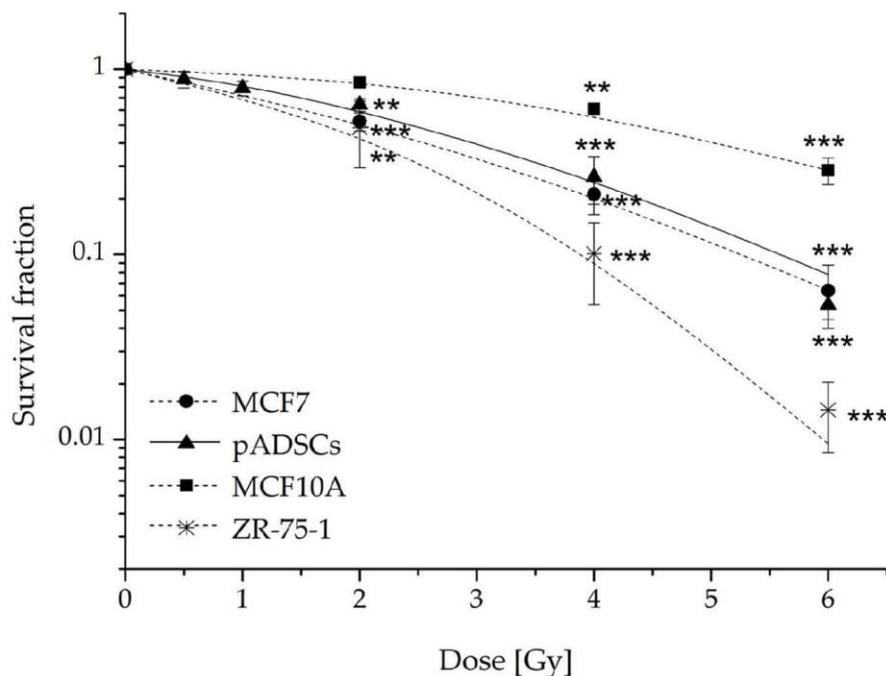


Figure 2. Colony-forming efficiency assay of pooled adipose-derived stem cells (pADSCs) in comparison to MCF-7, MCF10A, and ZR-75-1 cells. ADSCs of 10 donors were pooled and, like ZR-75-1, MCF-7, and MCF10A cells, seeded 24 h before the IR procedure, where 0 Gy was defined as the control. The cells were stained by crystal violet to visualize formed colonies. The cell survival fractions (SF) of the different experimental approaches were normalized to those of unirradiated cells; $n = 5$ (MCF-7 cells and ZR-75-1 cells), $n = 4$ (pADSCs), or $n = 3$ (MCF10A cells) presented as mean \pm standard deviation. Asterisks illustrate significance: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.002$ (one sample t -test).

2.3. Irradiation Alters Cell Cycle Progression of pADSCs, Whereby p21 Was Identified as a Possible Mediator

2.3.1. Irradiation Inhibits the Proliferation of pADSCs Even at Moderate Doses

As early as an IR dose of 2 Gy, the proliferation rates of pADSCs and MCF10A cells are significantly reduced, whereas an effect in MCF-7 cells could not be detected until a dose of 6 Gy (Figure 3). In contrast, the more radiation-resistant MCF10A cells react similarly to pADSCs, with an increasing inhibition of the proliferation rate with increasing IR dose, although the extent of this effect varies. The lowest inhibition was recorded for the tumorigenic MCF-7 cells, which were identified as a more radiation-sensitive cell line in the previous colony-forming units assay (see Section 2.2). Declining proliferation rates can be caused by two factors: (1) Irradiation causes apoptosis, so that the cell can no longer reproduce; (2) the repair of radiation-induced DNA damage is associated with the short-term stop of cell cycle progression and the transition to the cell cycle arrest. Therefore, relatively constant proliferation rates and low survival fractions can be explained by late or inefficient DNA repair mechanisms.

Altogether, pADSCs showed the strongest decrease in proliferation rate after IR. The reason for this could be an early initiation of apoptosis or the cell cycle arrest, the latter being associated with the introduction of DNA repair mechanisms.

2.3.2. Irradiation Exposure Induces the ADSCs to Move from the S-Phase into Cell Cycle Arrest

In response to IR, short-term effects on the cell cycle progression were detectable in pADSCs (Figure 4B, left). While the percentages of unirradiated cells in G1, S, and M phases were 73%, 6%, and 22%, respectively, a significant decrease to 2% of cells in the S-phase was observed 24 h after IR with application of 2 to 8 Gy, whereas the percentage of cells in G0/G1 phases numerically increased

(2 Gy: 86%, 4 Gy: 86%, 6 Gy: 85%, 8 Gy: 85%). This indicates that the G0/G1 cell cycle checkpoint is functional in pADSCs that enter G1 cell cycle arrest. At a later time point of 72 h after IR, differences between irradiated and unirradiated cells are no longer detectable as early DNA repair mechanisms might be completed (Figure 4B, right).

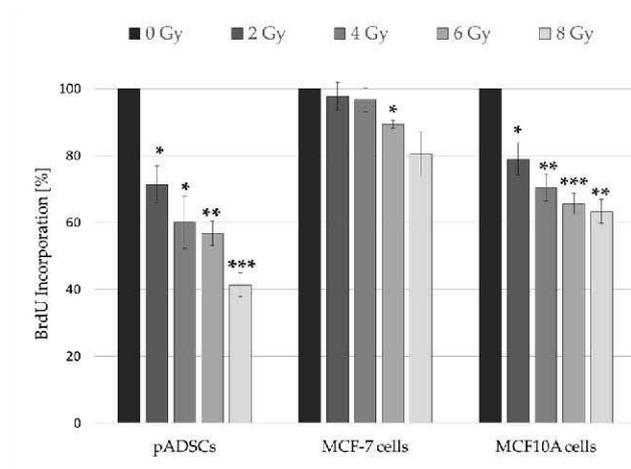


Figure 3. Proliferation rate of MCF-7 cells, pADSCs, and MCF10A cells within 48 h after the irradiation procedure. Cell proliferation was measured using a BrdU ELISA colorimetric assay. Results are illustrated as mean \pm standard deviation (SD, $n = 3$). Asterisks illustrate significance: * $p < 0.02$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.002$ (one sample t -test).

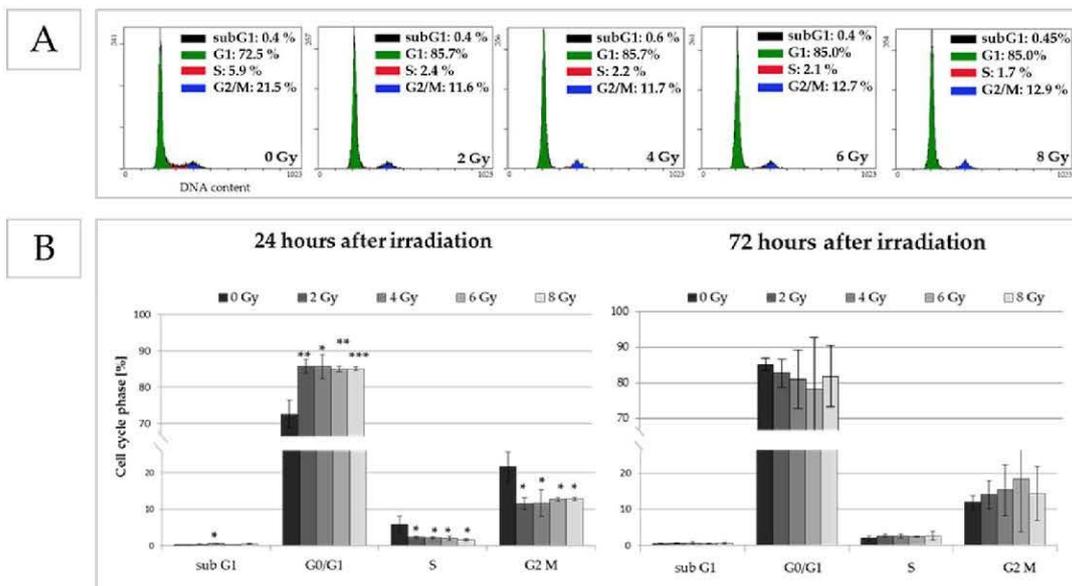


Figure 4. Effect of irradiation on cell cycle progression after an incubation time of 24 and 72 h. Distribution of cells in cell cycle phases (G0/G1, S and G2/M) and cells with degraded cell DNA (subG1) was determined by flow cytometry using propidium iodide (PI) to measure the DNA content of each cell. (A) Exemplary histograms of cell cycle assay by flow cytometry of unirradiated (0 Gy) and irradiated pADSCs (0.25, 1, 2, 4, and 6 Gy), 24 h after the irradiation procedure; on the right corner of each image, results are illustrated as mean \pm standard deviation (SD, $n = 3$); (B) Graphical illustration of cell cycle distribution of unirradiated and irradiated cells; asterisks illustrate significant differences to unirradiated cells (control): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (students t -test and two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test).

2.3.3. The Protein p21 Could Be One Mediator of Observed Cell Cycle Progressions

The gene of the CDK inhibitor p21 is known to be a critical mediator of p53-dependent G1 arrest in tumor cells and the subsequent entry into repair mechanisms [24,25]. Here, we detected a raise of the p21 gene expression in pADSCs after IR, whereby a direct linearity was observable with increasing radiation dose (Figure 5). These effects are detectable both 24 h and 72 h after IR with a time-dependent attenuation of p21 expression in pADSCs after 4 and 6 Gy IR (two-way ANOVA, $p < 0.001$). Consequently, p21 could be one mediator of observed IR-dependent cell cycle progressions in pADSCs, as already demonstrated in BMSCs [26].

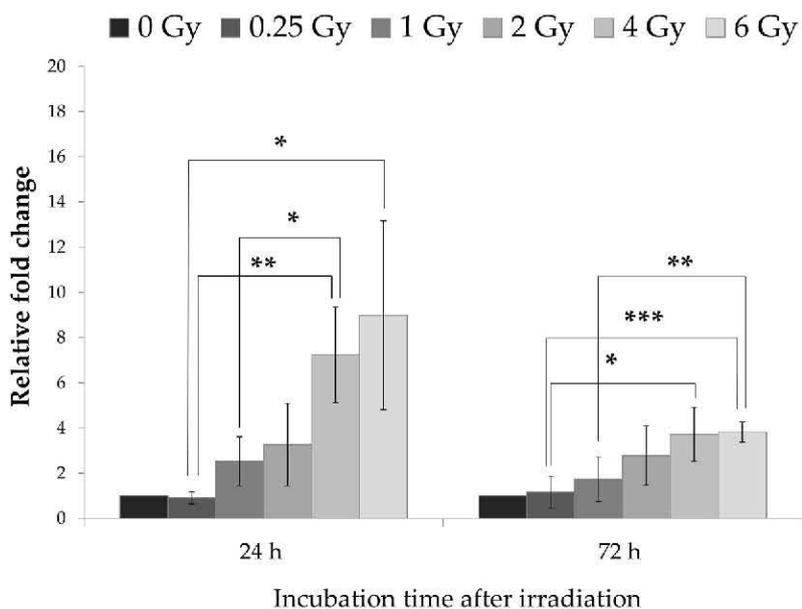


Figure 5. Influence of irradiation on gene expression of p21 in ADSC cells at different time points. Using the $\Delta\Delta C_t$ method, data from three independent experiments were presented as mean of the relative expression values \pm standard deviation. Asterisks illustrate significance: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2.4. pADSCs Possess a High Repair Capacity of DNA Double-Strand Breaks

As observed here, pADSCs exhibit intermediate radiation sensitivity. Subsequent analysis of proliferation rate, cell cycle progression, and p21 expression suggest that relatively early repair mechanisms are introduced into these cells. To further investigate this hypothesis, IR-induced DNA damage was verified in the frequency of DSBs, both shortly after irradiation, to detect DNA damage, and after an incubation time of 24 h after IR, to analyze their repair.

IR induced DSBs in pADSCs, whereby their occurrence increased in a linear way with increasing radiation dose (Figure 6). After an incubation time of 24 h, the level of DSBs in pADSCs decreased extremely, so that differences among unirradiated and 0.5 Gy-irradiated cells were not detectable. Even the 6 Gy IR-induced γ H2AX foci decreased in number from 48 to 6 per cell nucleus after 24 h incubation. These findings implicate that the repair mechanisms of IR-induced DNA damage are functional in pADSCs within a dose range of 0.5 to 6 Gy.

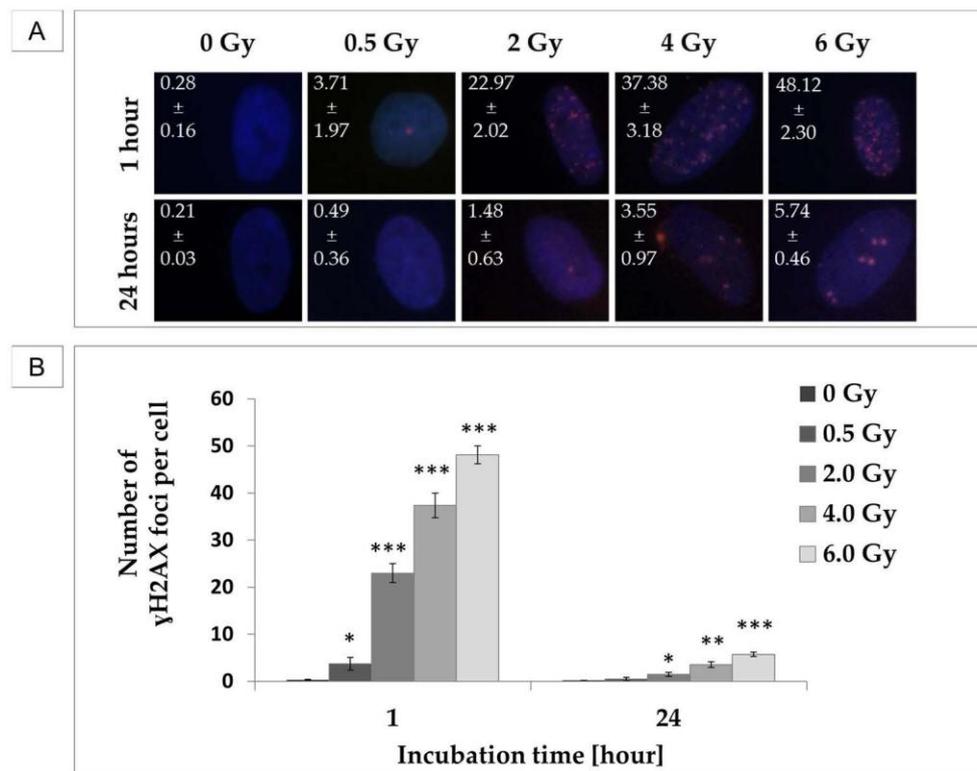


Figure 6. dsDNA-damaging effects of irradiation (IR) on pADSCs and their repair capacity within 24 h. Phosphorylated H2AX (γ H2AX) was used as a marker for DNA double-strand breaks (DSBs). To determine γ H2AX foci, cells were fixed 1 h or 24 h after IR and incubated with anti- γ H2AX antibody and IgG1 (red); DNA counterstaining with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). **(A)** Exemplary images of immunocytochemistry staining at different time points after IR. On the left corner of each image, results are illustrated as mean \pm standard deviation (SD, $n = 3$); **(B)** Graphical illustration of mean number of γ H2AX foci per cell; asterisks illustrate significant differences to unirradiated cells (control): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3. Discussion

In the present study, we demonstrate that ADSCs isolated from the breast adipose tissue exhibit intermediate radiation sensitivity, as a result of early cell cycle arrest associated with increased p21 expression and fast DNA damage repair.

These results correspond to the hypothesis that adult stem cells are more resistant to IR than embryonic stem cells. Nevertheless, tissue-specific differences exist, probably caused by disparities in the expression of pro-apoptotic or anti-apoptotic proteins as well as cell cycle duration and p53 dynamics [27]. Whereas stem cells from the bone marrow are well characterized for their radiation sensitivity [16], studies on ADSCs are lacking or are carried out with mice as the host [17]. In addition, there are characteristic differences between adult stem cells isolated from adipose tissues of different origins, including growth kinetics [28,29]—a factor that may be responsible for tissue-specific radiation sensitivities [27]. From this reasoning, extensive analyses of underlying IR-induced mechanisms in ADSCs from different origins have to be performed in the future to engineer reliable cellular therapy options in radiation oncology.

To our knowledge, this is the first work that investigates the radiation response of ADSCs isolated from the breast and thus provides the first insights into unwanted side effects of radiation therapy that could result from damaged stem cells. Minimizing stem cell damage should be the aim of modern radiotherapy in order to reduce undesirable side effects. Here, we detected a full repair of DSBs only 24 h after an irradiation dose of 0.5 Gy. Due to higher IR doses, a small number of residual DSBs were

observed. Whether repetitions of this IR procedure in the course of fractionated radiation therapy could be critical for the appropriate tissue is questionable. However, in BMSCs, fractionated doses of IR seem to be rather protective [30].

Altogether, further investigations are needed to determine the long-term effects of IR on ADSCs and especially the repeated IR procedure in the course of fractionated radiation therapy. Nevertheless, this study highlights the intermediate resistance of ADSCs isolated from the breast and their functional repair mechanism for IR-dependent damage.

In conclusion, ADSCs isolated from the breast seem to be capable for cellular therapy options in radiation oncology and regenerative medicine before radiation therapy.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture

4.1.1. Isolation of ADSCs

The isolation of ADSCs was performed with human reduction mammoplasties from healthy female donors. This work was approved by the ethics committee at the University of Rostock, Germany (registration-number: A201008). The protocol for the isolation of fat tissue has been developed and optimized from previously described work [23,31]. Tissue samples were mechanically minced and adipose tissue was washed three times with phosphate-buffered saline (PBS, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) and centrifuged ($250\times g$). After each centrifugation, the infranatant and resultant pellet were removed. Samples were digested with 0.1% collagenase type I (100 U/mL, Gibco Life Technologies, Darmstadt, Germany) and supplemented with penicillin/streptomycin (P/S, 1%; $100\times$ penicillin 10,000 U/mL, streptomycin 10,000 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) on a shaker at a low setting for 18 h at 37 °C. After complete dissociation, the tissue samples were washed with an equal volume of Dulbecco's modified Eagle medium and Kaighn's modification of Ham's F12 (DMEM-F12 media, Life Technologies) and filtered through 100 μm strainers (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). This was followed by a centrifugation step ($190\times g$, 10 min, 37 °C) to obtain the ADSC fraction. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in ADSC culture medium containing DMEM-F12 supplemented with 10% fetal bovine serum Superior (FBS, Biochrom AG, Berlin, Germany) and 1% P/S. Cells were cultured at 37 °C in the presence of 5% CO₂ for 48 h in order to enable them to adhere. Afterwards, the non-adherent fraction was removed and the remaining cells were washed twice with PBS before seeding. The medium was replaced once every three days. When cells reached between 80% confluence, the medium was discarded, and cells were washed twice with PBS and trypsinized with 0.25% trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Cölbe, Germany). The cell count was determined using a Coulter Z2 automated cell counter (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Germany). The cells (passage 1) were cryopreserved in ADSC culture medium containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Darmstadt, Germany) and 20% FBS. Experiments were performed in passages three to five.

To avoid donor depending effects of primary human cells, ADSCs of 10 different patients were cultured and pooled. Therefor the abbreviation pADSCs (pooled ADSCs) is used in the following.

4.1.2. Cell Lines

For comparative purposes, two human breast cancer cell lines (MCF-7 and ZR-75-1) and the non-tumorigenic epithelial breast cell line (MCF10A) were tested parallel to the radiation biologic analyzes of pADSCs. The MCF-7 cells (HTB-22™) as well as the MCF10A cells (CRL-10317™) were purchased from the ATCC and the ZR-75-1 cells from ECACC. MCF-7 cells were cultured in DMEM (Lonza BioWhittaker, Verviers, Belgium) containing 1% P/S and 10% FBS at 37 °C with 5% CO₂. MCF10A cells were provided by Prof. Kevin Prise, Queen's University Belfast, Ireland, and cultivated using DMEM/F12 supplemented with 0.01% cholera toxin, 0.1% insulin, 0.05% hydrocortisone

(all Sigma-Aldrich), and 1% P/S, 0.02% epidermal growth factor (EGF; Gibco/Life Technologies), and 5% horse serum (Fisher Scientific, Schwerte, Germany) under 5% CO₂ and at 37 °C. ZR-75-1 cells were cultured in RPMI 1640 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) containing 10% FBS, 1% P/S, and 0.2% sodium pyruvate (Gibco Life Technologies, Darmstadt, Germany).

4.1.3. Cell Maintenance

When cells reached between 80% confluence, the medium was discarded and cells were washed twice with PBS. Afterwards, ADSCs and ZR-75-1 cells were detached by using 0.25% trypsin/EDTA; MCF-7 and MCF10A cells by using 0.05% trypsin/EDTA.

4.2. Irradiation

The cells were irradiated 24 h after seeding using the Linac Siemens Oncor Expression (Healthcare Sector Siemens AG, Erlangen, Germany) at a dose rate of 3.75 Gy/min. Used IR doses were 0.25, 0.5, 2, 4, 6, and 8 Gy, where 0 Gy was utilized as the control.

4.3. Expression Panel of Characteristical Surface Proteins

For analysis of mesenchymal surface markers, ADSCs in passages three to five were trypsinized, washed with staining buffer (BD Pharmingen, BD Biosciences, Heidelberg, Germany), and stained with the following antibodies: CD29-PE, CD34-PE, CD90-FITC (all BD Biosciences), CD31-PE, CD45-PE, and CD106-PE (all Biolegend, London, UK) on ice and in the dark for 20 min. Fluorochrome-conjugated isotype control antibodies (BD Biosciences) were used to determine the level of nonspecific binding. Samples were washed (300 × g, 4 °C, 5 min) and resuspended with staining buffer. The cells were analyzed by flow cytometry directly after incubation with 7-aminoactinomycin (7-AAD, Biolegend) for 10 min on ice and protected by light (Cytomics FC 500, Beckmann Coulter, Krefeld, Germany). Positive and negative events were calculated using the CXP™ software (Beckman Coulter) and gated for living cells (negative for 7-AAD).

4.4. Cytotoxic Effects of Radiation

4.4.1. Cell Proliferation Assay

Changes in the cell proliferation rate after IR were assessed by intracellular bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (Cell Proliferation ELISA, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). For this purpose, 2000 pADSCs as well as 1500 MCF-7 cells and 2500 MCF10A cells were seeded in quintuplicate into 96-well plates (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland). Those cell type-specific seeding densities were determined previously in order to avoid influencing the proliferative behaviour of cells by contact inhibition.

Radiation doses of 2, 4, 6, and 8 Gy were applied. After an incubation time of 48 h, which corresponds approximately to the determined doubling time of pADSCs, the colorimetric cell proliferation ELISA was performed according to the manufacturer's instructions. In order to calculate the relative BrdU incorporation, the measurements of unirradiated cells were defined as 100% BrdU incorporation.

4.4.2. Colony-Forming Units Assay

To determine the long-term effect of IR on the cell survival, the colony-forming units assay was performed. Therefore, pADSCs (1000 cells), MCF-7 (500 cells), MCF10A (1000 cells), and ZR-75-1 cells (8000 cells) were seeded in triplicates in T₂₅ flasks or 6-well plates (Greiner Bio One) and treated with the radiation doses ranging from 0 Gy to 6 Gy. A full medium exchange with culture medium was performed every three (ADSCs) or seven days (MCF-7, MCF10A, ZR-75-1). On day 7 (MCF10A), day 21 (ZR-75-1 cells), day 15 (MCF-7 cells), or on day 20 (pADSCs), the cells were stained by 1% crystal violet (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) to visualize formed colonies. Colonies consisting

of at least 50 cells were counted by microscopy. The calculated plating efficiency (PE) and survival fractions (SF) were evaluated using the data analysis and graphics software Origin 8.6.

4.5. Effects of Irradiation on Cell Cycle

4.5.1. Flow Cytometry

In order to analyze changes in cell cycle progression after IR, the DNA content in the cells was determined by flow cytometry. Twenty-four hours after IR (0, 2, 4, 6, and 8 Gy), pADSCs were harvested and fixed in 70% ice-cold ethanol at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. Afterwards, the cells were incubated in 1 mL RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min and stained with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. Using Cytomic FC 500 flow cytometer and CXP analysis software, the DNA content was determined and analyzed.

4.5.2. Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR

400,000 of pADSCs were seeded in T₇₅-flasks and irradiated 24 h later. Total RNA was isolated 24, 48, and 72 h after IR using a NucleoSpin[®] RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). For cDNA synthesis, the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Schwerte, Germany) was used. The following Taq Man assays (Applied Biosystems[®], Darmstadt, Germany) were used for the gene expression analysis: tumour protein p21 (TP21; Hs01040810_m1) as gene of interest and TATA-Box-Binding Protein (TBP; Hs00427620_m1) as internal control. Real-time quantitative reverse transcription PCR was performed using a PCR cycler AB7300 (Applied Biosystems[®], Life Technologies, Darmstadt, Germany) under specific cycling conditions (1. $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min, 1 cycle; 2. $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, 1 cycle; 3. $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s to $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, 40 cycles). Every sample was tested in triplicate for three independent experiments. A normalization of the relative quantitative values of mRNA for tumor protein p21 (TP21) was performed to the endogenous control TBP via the $\Delta\Delta\text{C}_t$ method.

4.6. DNA Damaging Effects: Measurement of DNA Double-Strand Breaks (γH2AX Assay)

Twenty-four hours before IR, 35,000 pADSCs were seeded in duplicate in chamber slides (LabTek[®], Nunc, Roskilde, Denmark). After fixation with 2% formaldehyde and permeabilisation with 0.25% Triton X-100 (both Sigma Aldrich Chemie GmbH), the cells were consecutively incubated 60 min with anti- γH2AX antibody (1:500, clone JBW301, Merck Millipore) and Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG1 (1:400, Molecular Probes[®]/Life Technologies, Darmstadt, Germany) for 30 min. The slides were mounted with Vectashield[®] containing anti-4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). The foci were visualised with an Eclipse TE300 inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan). At a magnification of $1000\times$, the foci of 50 cells per chamber were counted; two chambers per IR dose.

4.7. Statistical Analysis

All data was presented as the mean \pm standard deviation (SD) or standard error of mean (SEM). The normality of the distribution of each parameter was assessed using the Anderson–Darling test. Where normality assumptions were not met, data were logarithmically transformed. To identify differences between data sets, the two-tailed Student's *t*-test was performed. To compare a variable under different conditions, the two-way ANOVA was performed, followed by a Bonferroni post-hoc test performed with SigmaPlot (Version 13.0, Systat Software GmbH). Significance was assessed at $p < 0.05$ (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$). For comparative analysis of one dataset to a fixed value, the one-sample *t*-test was used. Here, a *p* value of <0.02 was considered a significant difference (*: $p < 0.02$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.002$).

Author Contributions: G.H. and A.B. designed the study. F.S., T.R., and B.D.K. provided human breast tissue for cell isolation. A.B., F.M., D.B., and J.B. performed all experiments, as well as acquiring and analyzing the

data. A.B. wrote and drafted the manuscript. D.B., F.M., J.B. and G.H. critically revised the manuscript. G.H. contributed to materials and tools. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments: Human breast tissue from cosmetic reduction mammoplasties was very kindly provided by the Department of Obstetrics and Gynecology, University Medical Center Rostock, the Clinic of Aesthetics of the Academy for Transdermal Delivery Research e.V., Rostock, the St. Marien Hospital, Berlin and the UKSH, Luebeck. We acknowledge financial support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Universität Rostock/Universitätsmedizin Rostock within the funding programme Open Access Publishing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AT	adipose tissue
ADSCs	adipose-derived stem cells
BMSCs	bone marrow-derived stem cells
CDK	cyclin-dependent kinase
DSBs	double-strand breaks
ESCs	embryonic stem cells
iPSCs	induced pluripotent stem cells
IR	irradiation
MMP-2	matrix metalloprotenase-2
pADSCs	pooled adipose-derived stem cells
PE	plating efficiency
γ H2AX	phosphorylated H2AX
SD	standard deviation
SF	survival fraction
VEGF	vascular endothelial growth factor

Appendix A

Table A1. Comparison of pADSC survival fractions for each dose with those of MCF-7, MCF10A, and ZR-75-1 cells.

	Irradiation Dose (Gy)	Survival Fraction \pm Standard Deviation	<i>p</i> Value ¹
pADSCs	0.5	0.88 \pm 0.09	
	1	0.79 \pm 0.07	
	2	0.64 \pm 0.05	
	4	0.26 \pm 0.08	
	6	0.05 \pm 0.01	
MCF-7 cells	2	0.52 \pm 0.06	0.01811 *
	4	0.21 \pm 0.05	0.29717
	6	0.06 \pm 0.02	0.51909
MCF10A cells	2	0.85 \pm 0.05	0.00722 **
	4	0.61 \pm 0.04	0.00165 **
	6	0.23 \pm 0.01	0.00244 **
ZR-75-1 cells	2	0.48 \pm 0.19	0.19339
	4	0.10 \pm 0.05	0.01072 *
	6	0.01 \pm 0.01	0.00069 ***

¹ Student's *t*-test was used to compare survival fractions of pADSCs for each dose with survival fractions of MCF-7, MCF10A, and ZR-75-1 cells; bolded datasets represent significant differences to the dataset of pADSCs, asterisks illustrate significance: * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001.

Table A2. Population doubling times (PDT) of ADSCs within an incubation time of 48 to 240 h with special emphasis on the PDT of pooled cells and pooled data (bolded).

PDT (48–240 h) ± Standard Deviation	
pooled cells	96.5 ± 8.0 h
donor 1	110.7 ± 33.1 h
donor 2	73.4 ± 7.3 h
donor 3	79.2 ± 19.0 h
donor 4	82.2 ± 20.4 h
donor 5	104.1 ± 27.2 h
donor 6	107.9 ± 23.3 h
donor 7	75.6 ± 9.2 h
donor 8	97.3 ± 18.9 h
donor 9	113.0 ± 12.2 h
donor 10	179.6 ± 75.8 h
pooled data	102.3 ± 29.5 h

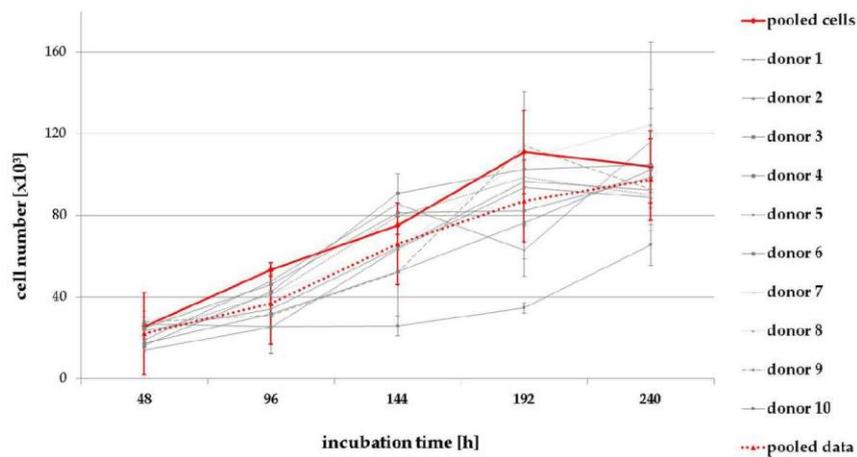


Figure A1. Donor-specific differences in the growth rate of ADSCs, isolated from ten different donors: comparison of pooled cells and pooled data. Results are illustrated as mean ± standard deviation (SD, $n = 2$).

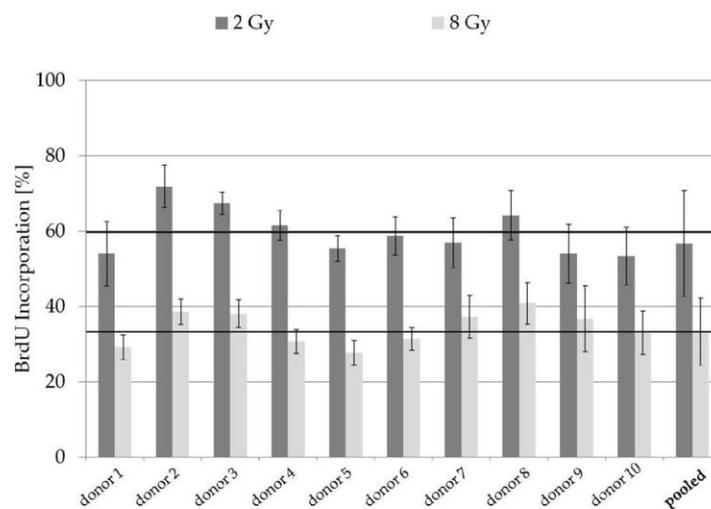


Figure A2. Donor-specific differences in the proliferation rate of irradiated ADSCs: comparison of pooled cells and pooled data of ten different donors. Cell proliferation was measured using a BrdU ELISA colorimetric assay. Black lines illustrate the mean value of all individual donors. Results are illustrated as mean ± standard deviation (SD, $n = 3$).

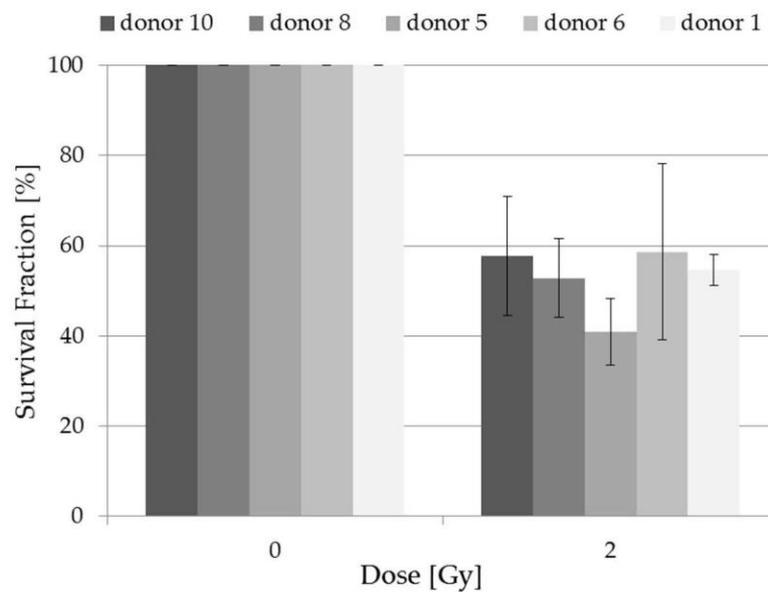


Figure A3. Donor-specific differences in the survival fraction of irradiated adipose-derived stem cells. The cells were seeded 24 h before the IR procedure and stained 20 days later by crystal violet to visualize formed colonies. The cell survival fractions (SF) of the different experimental approaches were normalized to those of unirradiated cells; $n = 3$ presented as mean \pm standard deviation (one sample t -test).

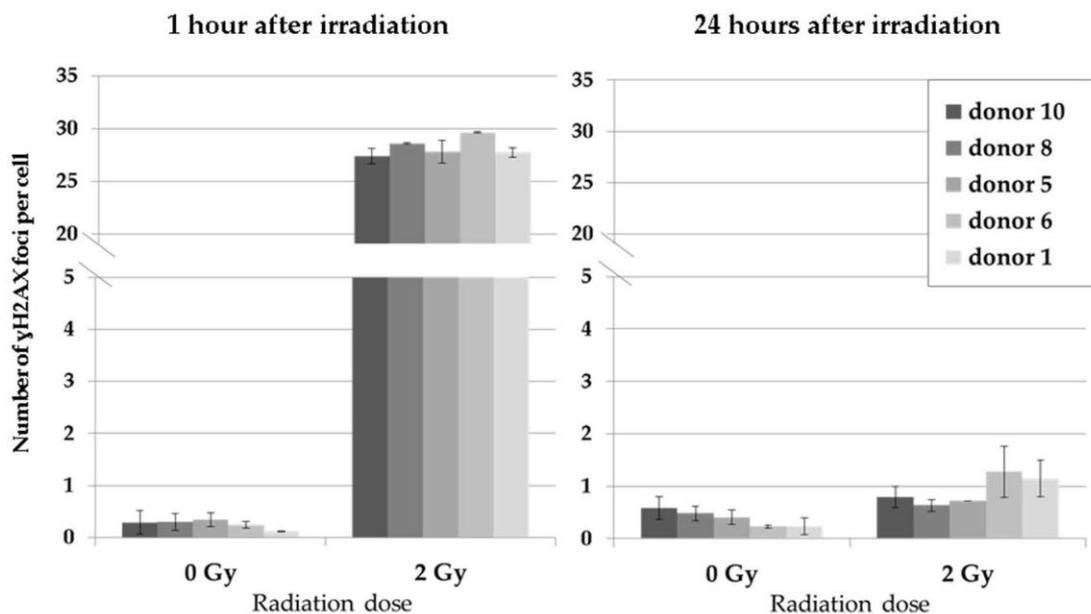


Figure A4. dsDNA-damaging effects of irradiation (IR) on ADSCs of individual donors and their repair capacity within 24 h. Results are illustrated as mean \pm standard deviation (SD, $n = 2$).

References

- Zuk, P.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. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 4279–4295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. 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. 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* **2013**, *15*, 641–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rodbell, M. Metabolism of Isolated Fat Cells: I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 375–380. [[PubMed](#)]
4. Strioga, M.; Viswanathan, S.; Darinskas, A.; Slaby, O.; Michalek, J. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem Cells Dev.* **2012**, *21*, 2724–2752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. De Ugarte, D.A.; Morizono, K.; Elbarbary, A.; Alfonso, Z.; Zuk, P.A.; Zhu, M.; Drago, J.L.; Ashjian, P.; Thomas, B.; Benhaim, P.; et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* **2003**, *174*, 101–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Zuk, P.A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **2001**, *7*, 211–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Shingyochi, Y.; Orbay, H.; Mizuno, H. Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15*, 1285–1292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Gir, P.; Oni, G.; Brown, S.A.; Mojallal, A.; Rohrich, R.J. Human adipose stem cells: Current clinical applications. *Plast. Reconstr. Surg.* **2012**, *129*, 1277–1290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Illouz, Y.G.; Sterodimas, A. Autologous fat transplantation to the breast: A personal technique with 25 years of experience. *Aesthetic Plast. Surg.* **2009**, *33*, 706–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Tremolada, C.; Palmieri, G.; Ricordi, C. Adipocyte transplantation and stem cells: Plastic surgery meets regenerative medicine. *Cell Transplant.* **2010**, *19*, 1217–1223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Adachi, N.; Kubota, Y.; Kosaka, K.; Akita, S.; Sasahara, Y.; Kira, T.; Kuroda, M.; Mitsukawa, N.; Bujo, H.; Satoh, K. Low-dose radiation pretreatment improves survival of human ceiling culture-derived proliferative adipocytes (ccDPAs) under hypoxia via HIF-1 alpha and MMP-2 induction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *463*, 1176–1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Goodhead, D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: Clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, *65*, 7–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Riley, T.; Sontag, E.; Chen, P.; Levine, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 402–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Morgan, D.O. Cyclin-dependent kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 261–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Meijne, E.I.; van der Winden-van Groenewegen, R.J.; Ploemacher, R.E.; Vos, O.; David, J.A.; Huiskamp, R. The effects of x-irradiation on hematopoietic stem cell compartments in the mouse. *Exp. Hematol.* **1991**, *19*, 617–623. [[PubMed](#)]
16. 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.D. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2006**, *66*, 244–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Maria, O.M.; Kumala, S.; Heravi, M.; Syme, A.; Eliopoulos, N.; Muanza, T. Adipose mesenchymal stromal cells response to ionizing radiation. *Cytotherapy* **2016**, *18*, 384–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Miranville, A.; Heeschen, C.; Sengenès, C.; Curat, C.A.; Busse, R.; Bouloumié, A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* **2004**, *110*, 349–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Cao, Y.; Sun, Z.; Liao, L.; Meng, Y.; Han, Q.; Zhao, R.C. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *332*, 370–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Eto, H.; Suga, H.; Inoue, K.; Aoi, N.; Kato, H.; Araki, J.; Doi, K.; Higashino, T.; Yoshimura, K. Adipose injury-associated factors mitigate hypoxia in ischemic tissues through activation of adipose-derived stem/progenitor/stromal cells and induction of angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **2011**, *178*, 2322–2332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Baaße, A.; Juerß, D.; Reape, E.; Manda, K.; Hildebrandt, G. Promoting effects of adipose-derived stem cells on breast cancer cells are reversed by radiation therapy. *Cytotechnology* **2018**, *70*, 701–711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Matthews, J.H.; Meeker, B.E.; Chapman, J.D. Response of human tumor cell lines in vitro to fractionated irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1989**, *16*, 133–138. [[CrossRef](#)]
23. Yang, H.Y.; Qu, R.M.; Lin, X.S.; Liu, T.X.; Sun, Q.Q.; Yang, C.; Li, X.H.; Lu, W.; Hu, X.F.; Dai, J.X.; et al. IGF-1 from adipose-derived mesenchymal stem cells promotes radioresistance of breast cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 10115–10119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. El-Deiry, W.S.; Tokino, T.; Velculescu, V.E.; Levy, D.B.; Parsons, R.; Trent, J.M.; Lin, D.; Mercer, W.E.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. p53, a Potential Mediator of ~53 Tumor Suppression. *Cell* **1993**, *75*, 817–825. [[CrossRef](#)]
25. Waldman, T.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. p21 Is Necessary for the p53-mediated G₁ Arrest in Human Cancer Cells. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 5187–5190. [[PubMed](#)]
26. Mehrara, B.J.; Avraham, T.; Soares, M.; Fernandez, J.G.; Yan, A.; Zampell, J.C.; Andrade, V.P.; Cordeiro, A.P.; Sorrento, C.M. p21cip/WAF is a key regulator of long-term radiation damage in mesenchyme-derived tissues. *FASEB J.* **2010**, *24*, 4877–4888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Liu, J.C.; Lerou, P.H.; Lahav, G. Stem cells: Balancing resistance and sensitivity to DNA damage. *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 268–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Guneta, V.; Tan, N.S.; Sugii, S.; Lim, T.C.; Wong, T.C.M.; Choong, C. Comparative Study of Adipose-Derived Stem Cells From Abdomen and Breast. *Ann. Plast. Surg.* **2016**, *76*, 569–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hanson, S.E.; Kim, J.; Hematti, P. Comparative analysis of adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from abdominal and breast tissue. *Aesthet. Surg. J.* **2013**, *33*, 888–898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Clavin, N.W.; Fernandez, J.; Schonmeyer, B.H.; Soares, M.A.; Mehrara, B.J. Fractionated doses of ionizing radiation confer protection to mesenchymal stem cell pluripotency. *Plast. Reconstr. Surg.* **2008**, *122*, 739–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Xiong, L.; Sun, J.; Hirche, C.; Yang, J.; Yang, Y.; Xia, Y.; Lehnhardt, M.; Wang, R.; Fu, X. In vitro N-acetyl-L-cysteine promotes proliferation and suppresses interleukin-8 expression in adipose-derived stem cells. *Aesthetic Plast. Surg.* **2012**, *36*, 1260–1265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



5.3 Publikation 3: First Insights into the Effect of Low-Dose X-Ray Irradiation in Adipose-Derived Stem Cells

Schröder, A.; Kriesen, S.; Hildebrandt, G.; Manda, K.

Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 1988, doi:10.3390/ijms19071988.

Kurze Zusammenfassung

Während Gammastrahlung im moderaten Dosisbereich eingesetzt wird, um DNS-Schädigungen in Karzinomzellen auszulösen, die zum Zelltod führen sollen, kann diese im Niedrigdosenbereich ($\leq 0,1$ Gy) angewandt werden, um nahezu nebenwirkungsarm eine immunmodulierende Wirkung in Form eines anti-inflammatorischen Effektes im humanen Körper auszulösen. Dieser Effekt wird in Deutschland beispielsweise routinemäßig für die Behandlung des Fersensporns und der Arthrose eingesetzt. Inwieweit die Niedrigdosenbestrahlung ebenso eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation von Adipose-derived stem cells hat, war Gegenstand dieser Studie. Ebenso wurde eine mögliche Induktion strahleninduzierter Zellschäden als Folge dieser Behandlung untersucht.

Als Ergebnis dieser Studie konnten weder geno- noch zytotoxische Schädigungen in Folge der Niedrigdosenbestrahlung in Adipose-derived stem cells detektiert werden, gleichzeitig stieg das klonogene Zellüberleben und die Proliferation. Diese Untersuchung könnte initial sein, um die Anwendung adulter Stammzellen innerhalb regenerativer Therapieansätze weiter zu optimieren.



Article

First Insights into the Effect of Low-Dose X-Ray Irradiation in Adipose-Derived Stem Cells

Annemarie Schröder * , Stephan Kriesen, Guido Hildebrandt and Katrin Manda

Department of Radiotherapy and Radiation Oncology, University Medical Centre Rostock, Suedring 75, 18059 Rostock, Germany; stephan.kriesen@uni-rostock.de (S.K.); guido.hildebrandt@uni-rostock.de (G.H.); katrin.manda@uni-rostock.de (K.M.)

* Correspondence: annemarie.baasse2@uni-rostock.de

Received: 1 November 2019; Accepted: 28 November 2019; Published: 2 December 2019



Abstract: (1) Background: Emerging interest of physicians to use adipose-derived stem cells (ADSCs) for regenerative therapies and the fact that low-dose irradiation (LD-IR ≤ 0.1 Gy) has been reported to enhance the proliferation of several human normal and bone-marrow stem cells, but not that of tumor cells, lead to the idea of improving stem cell therapies via low-dose radiation. Therefore, the aim of this study was to investigate unwanted side effects, as well as proliferation-stimulating mechanisms of LD-IR on ADSCs. (2) Methods: To avoid donor specific effects, ADSCs isolated from mamma reductions of 10 donors were pooled and used for the radiobiological analysis. The clonogenic survival assay was used to classify the long-term effects of low-dose radiation in ADSCs. Afterwards, cytotoxicity and genotoxicity, as well as the effect of irradiation on proliferation of ADSCs were investigated. (3) Results: LD (≤ 0.1 Gy) of ionizing radiation promoted the proliferation and survival of ADSCs. Within this dose range neither geno- nor cytotoxic effects were detectable. In contrast, greater doses within the dose range of >0.1 – 2.0 Gy induced residual double-strand breaks and reduced the long-term survival, as well as the proliferation rate of ADSCs. (4) Conclusions: Our data suggest that ADSCs are resistant to LD-IR. Furthermore, LD-IR could be a possible mediator to improve approaches of stem cells in the field of regenerative medicine.

Keywords: adipose-derived stem cells; low-dose radiation; mesenchymal stem cells; radiation therapy; regenerative medicine; X-ray

1. Introduction

In Germany, low-dose radiation therapy (LD-RT) is an approved and commonly used option in the treatment of degenerative bone and inflammatory diseases [1], such as heel spur and osteoarthritis [2–4]. The success of this therapy is due to the anti-inflammatory and immune modulatory response in humans to LD-RT [5–7] mediated by the inhibition of the inflammatory cascade. In detail, LD-RT lead to an increased apoptosis rate of monocytes and granulocytes [8,9], as well as the suppression of adhesion processes of those immune cells to the location of inflammation [10,11], whereupon inflammatory reactions are prevented. The newest epidemiological studies and *in vitro* analyses confirmed the most effective dose at 0.5 Gy [2,12,13]. Likewise, according to current mathematical models, the carcinogenic risk of radiation treatment in this dose range of 0.5 to 1.0 Gy can be disregarded, as it is far below that of spontaneously occurring carcinogenesis [14].

However, further analysis of Jiang et al. (2008) on much lower radiation doses revealed that radiation in the range below 0.1 Gy can act as growth-promoting stimuli in several normal human cell lines but not in leukemia and solid tumor cell lines *in vitro* and *in vivo* [15]. Liang et al. (2016) and Truong et al. (2018) confirmed those trends in fibroblasts and lung cancer cell lines later on [16,17]. Those findings lead to an important question for scientists in the field of regenerative medicine: Could

we also induce the proliferation of mesenchymal stem cells by LD-RT below 0.1 Gy to enhance the success of several regenerative therapies? Liang et al. (2011) and Yang et al. (2017) were the first who detected proliferation stimulating effects in human and rat bone-marrow stem cells (BMSCs) after X-ray treatment with low doses only below 0.1 Gy [18,19]. Therefore, in the following this particular dose range below 0.1 Gy is referred to as low-dose (LD).

Within the last few decades, stem cell research has focused more and more on the use of multipotent stem cells isolated from fat tissue, called adipose-derived stem cells (ADSCs) [20,21]. The reasons are obvious. ADSCs and BMSCs bear similar phenotypes, but ADSCs are more easily accessible from fat tissue compared to the more invasive and severe pain-associated bone marrow harvesting [22–24]. Today, fat grafts are commonly used in a broad variety of applications in the field of regenerative medicine [20,25]. However, the low survival rate of 10% to 30% of transplanted cells is one of the most challenging problems and the main reason why fat grafting procedures need to be repeated several times, until the result is satisfactory [26–28]. An improvement of this technique has already been achieved by enriching the stem cell fraction in the lipograft, called cell-assisted lipotransfer (CAL), but a sufficient result has not yet been achieved [29–31]. Promoting effects on the proliferation of tissue-specific stem cells by LD radiation could counteract this debacle. Therefore, the aim of this study was to analyse the proliferation-enhancing effect of low-dose irradiation (LD-IR) in adipose-derived stem cells. Likewise, various unwanted cytotoxic and genotoxic side effects are to be investigated. Since there is no consistent definition of low doses in the literature, for this study using exposure with X-rays LD-IR was defined using doses of ≤ 0.1 Gy, according to the Strategic Research Agenda of the Multidisciplinary European Low Dose Initiative (MELODI) when considering cancer risks [32].

2. Results

For this study, ADSCs of 10 different healthy female donors were obtained from human reduction mammoplasties and pooled to avoid donor-specific effects, as well as to enhance the experimental reproducibility. In our previous work we have already demonstrated that the endpoints of radiobiological investigations in pooled ADSCs (pADSCs; $N = 10$) are comparable to the average of the single analysis of each donor [33]. Due to slight differences in the growth rate of ADSCs of different donors, a relatively high number of 10 donors were chosen for pooling and experiments were performed only a few doubling times after cell pooling as described before [33]. Moreover, the isolated cells were characterized by the minimal criteria for the declaration of multipotent mesenchymal stromal cells [33,34], defined by the position statement of The International Society for Cellular Therapy in 2006 [33–35].

2.1. Low-Dose Radiation Does Not Induce Cell Damage

Several research groups have already demonstrated that medium (>2 Gy) and moderate radiation doses (0.5 Gy) induce negative side-effects in ADSCs regarding the cell proliferation and survival fraction [33,36,37], but to date the impact of low radiation doses (≤ 0.1 Gy) remain unclear. For this reason, we first examined the side-effects in ADSCs after LD-IR.

2.1.1. X-Ray Irradiation Effects the Long-Term Survival of pADSCs Discontinuously

The effect of LD-IR on the long-term survival of pADSCs was determined by the colony forming assay and compared to the values due to low and moderate irradiation (IR) (Figure 1). In general, we could detect 87 ± 7 colonies formed from 1000 originally seed cells. This results in a plating efficiency of $7.83\% \pm 0.51\%$. While higher IR doses (>0.1 Gy) lead to a dose-dependent decrease in the survival fraction of the pADSCs (Figure 1a), discontinuous effects occur after LD-IR values (Figure 1b). Moreover, the exposure to low IR doses of 0.05 Gy resulted in an increasing trend of pADSCs survival by about 6%, whereas doses at 0.1 and 0.5 Gy already reduced this value by 9% and 15%. Furthermore, exposure to medium IR resulted in a strong reduction of the surviving fraction of 60% (1.0 Gy) and 80% (2.0 Gy). These results are comparable to further studies analysing the effect of IR on ADSCs,

which however, used only 0.5 Gy as the smallest dose [33,37]. In contrast to IR in the high dose range with a clear dose-response relationship, after irradiation in the low and medium dose range non-linear dose-response relationships are already known from a lot of studies [38].

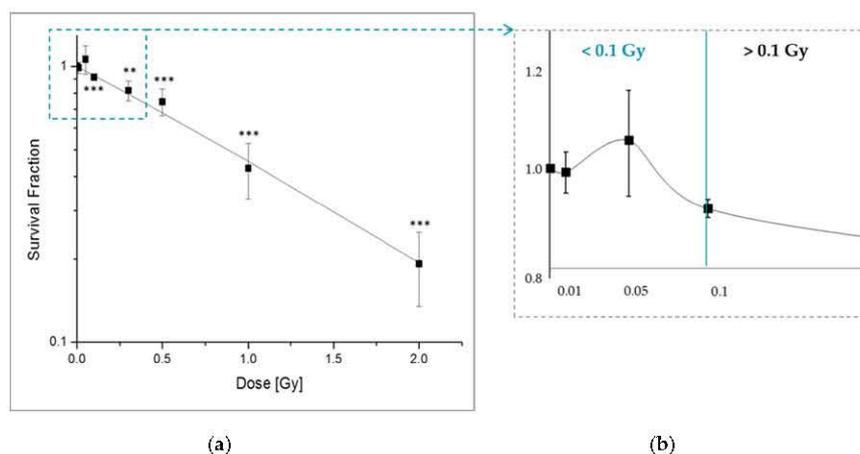


Figure 1. Clonogenic survival of pooled adipose-derived stem cells (pADSCs) after X-ray irradiation. pADSCs of 10 different donors were exposed to low (0.01, 0.05, and 0.1 Gy) and moderate (0.5, 1.0, and 2.0 Gy) doses of X-rays. Twenty days later, the cells were stained by crystal violet to visualize formed colonies. The cell survival fractions were normalized to those of sham irradiated cells. (a) Data from five independent experiments are presented as mean values \pm SEM of the survival fraction. The significances refer to the 0 Gy control. Asterisks illustrate significances: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.002$ (one sample t -test). (b) enlarged view of the low-dose area.

In the range of LD, we detected slight hyposensitizing trends—Also called increased radioresistance (IRR). Typically, IRR is observed in mammalian cells at a dose range between 0.3 and 0.6 Gy [39]. Here, we observed this in cells exposed to 0.05 Gy (Figure 1b). Reflecting the current state of science, IRR is associated with the transition from increased radiosensitivity (IRS) to IRR when a certain cell damage threshold is reached to activate DNA repair mechanisms [39]. However, this explanation, referred to as the Joiners-induced repair model [40], cannot be used in this case, because no previous dose range with hypersensitivity occurs. In addition, we detected increases in the survival fraction in ADSCs after LD irradiation, whereas previous descriptions of IRR within the literature took place in the low-dose range starting at 0.3 Gy. Rather, the data support the theory of low-dose induced hormetic responses in human cells describing beneficial low-dose effects of an agent that is harmful in high doses. Examples for such hormetic responses are the observed proliferation increasing effects of IR doses below 0.1 Gy in different non-carcinogen cell types [15,17,18,41].

Overall, however, in the low-dose range we did not detect any unwanted long-term effect on the survival rate of pADSCs after 0.05 Gy and only a small (9%) reduction after 0.1 Gy.

2.1.2. No Cytotoxic Effects after IR with a Maximal Dose of 2 Gy

In the further study, short-term effects of low and moderate irradiation doses were investigated. For this purpose the activity of Lactate dehydrogenase as a marker for cytotoxicity was measured in the culture supernatant of pADSCs, 24 and 48 h after irradiation procedure. No cytotoxic effects were detectable in pADSCs after exposure to LD-IR, whereas slight not statistically significant increase of approximately 5% was detected 48 h after exposure to moderate IR in comparison to the value 24 h after irradiation (Figure 2).

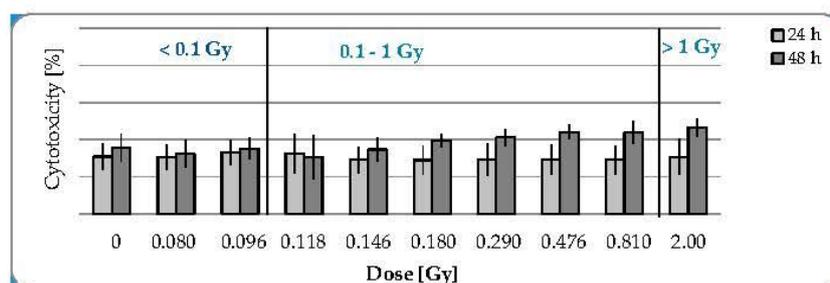


Figure 2. Lactate dehydrogenase (LDH) release as marker for cytotoxicity in pADSCs 24 and 48 h after X-ray irradiation. LDH activity was measured using the colorimetric LDH assay. The LDH release was normalized to this of the positive control. Data from three independent experiments are presented as mean values \pm SEM (Mann–Whitney U Test).

2.1.3. LD-IR Neither Induces Residual nor Persistent DNA Double Strand Breaks in pADSCs

To assess IR-induced DNA damage within low and moderate doses, the frequency of DNA double strand breaks (DSBs) was verified, on the one hand, shortly after irradiation (0.5 h), to detect DNA damage, and on the other hand after an incubation time of 24 h after irradiation to analyze their repair.

In the range of doses < 0.1 Gy neither residual nor persistent DNA DSBs were detected (Figure 3). Within this dose range the incubation time did not have an impact on the effect of radiation dose on the number of DNA DSBs (ANOVA: $p > 0.05$). Whereas low and moderate radiation doses led to a short-term accumulation of DNA DSBs (0.1 Gy: 7.76 ± 2.53 , 0.3 Gy: 14.25 ± 2.92 , 0.5 Gy: 8.02 ± 5.38), which in turn were repaired after a 24 h incubation period. From a radiation dose of 1 Gy, not only the induction of 37.96 ± 2.23 DNA DSBs was recorded, but also a rate of 6.39 ± 2.92 persistent DSBs. Therefore, from an IR dose of 0.1 Gy the number of DSBs increases significantly after a repair time of 24 h after irradiation (ANOVA: $p < 0.01$).

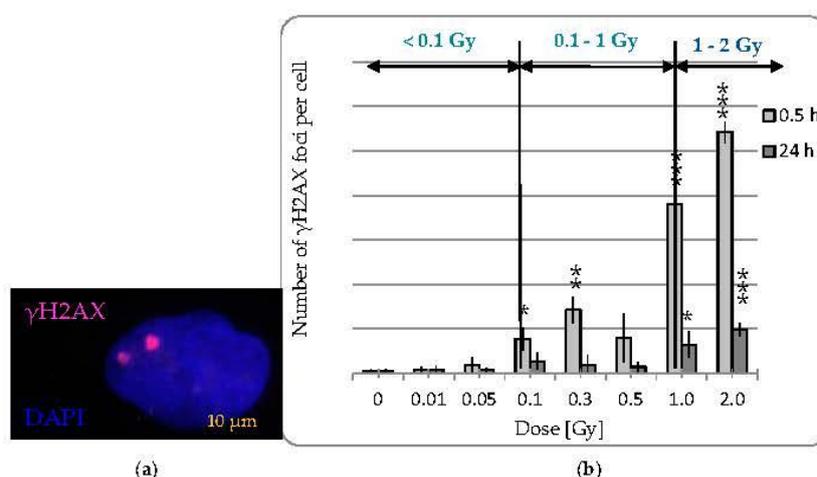


Figure 3. Capacity of pADSCs to repair DNA double strand breaks induced by irradiation (IR). The number of phosphorylated H2AX per nucleus was used to determine the corresponding number of DNA double strand breaks. To identify the DNA damaging effect of IR and the capacity of pADSCs to repair them, the cells were fixed 0.5 and 24 h after IR and incubated thereafter with anti- γ H2AX antibody and IgG1 (red), as well as the DNA counterstaining with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue). (a) Exemplary images of immune-cytochemistry staining after IR. (b) Results are illustrated as the mean number of γ H2AX foci per cell \pm standard deviation (SD) of three independent experiments; asterisks illustrate significant differences to * sham irradiated cells (control): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (two-tailed t -test and two-way ANOVA with Bonferroni post-test).

All in all, we could neither detect cytotoxic nor genotoxic effects in pADSCs after low doses <0.1 Gy.

2.2. Functional Changes

2.2.1. Low Doses of X-Ray Enhances the Proliferation of pADSCs

As mentioned before, several studies have shown proliferation stimulating effects in different non-carcinogen cell types [15,17,18,41,42], but no data exist on those trends in ADSCs. Therefore, we also investigated the short-term effect of different radiation ranges in ADSCs.

As early as an irradiation dose of 0.29 Gy the proliferation rate was significantly reduced of about 14%. In contrast, LD irradiation 0.096 Gy and below increased this rate up to 15% (Figure 4). Medium doses even lead to a halving of proliferating cells. Those effects were not detected 24 h, but 48 h after irradiation. This time-dependency was only significant for the radiation dose of 0.096 Gy (ANOVA: $p < 0.05$). The growth kinetic of ADSCs is characterized by a relatively high population doubling time of about 60 to 90 h [33,43], depending on various donor factors such as age, body mass index (BMI), and others reviewed in [44]. Accordingly, the cell cycle was not completely traversed within these time periods of 24 and 48 h. Likewise, it can be assumed that the cell seeding procedure 24 h before IR has synchronized the pADSCs in the cell cycle to a certain extent. Therefore, one possible explanation could be that cells are affected by LD RT only in early cell cycle phases, whereas pADSCs of later phases that have already divided within the first incubation time of 24 h after IR are not affected. On the other hand, the reason for this time-depending variation could also be a time-depending amplification of the effect, so that during the first measurement period the experimental standard deviations are larger than the effects.

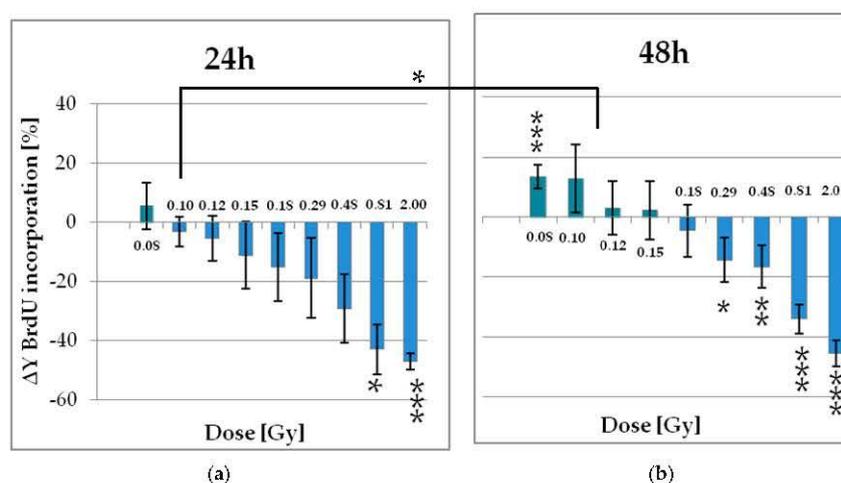


Figure 4. Alteration of the proliferation rate in pADSCs within 24 (a) and 48 h (b) following the irradiation procedure. Proliferation was determined by a colorimetric BrdU ELISA assay. Results are illustrated as mean \pm standard deviation (SD) of five independent experiments. Asterisks illustrate significant differences referring to sham irradiated cells: * $p < 0.02$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.002$ (one sample t -test and two-way ANOVA with Bonferroni post-test).

In general, however, it can be concluded that proliferation supporting effects are visible 48 h after IR, which relate to the population of irradiated cells, since the population doubling time has not yet been exceeded. As recognized before for the surviving fraction of ADSCs, ionizing radiation also induced hormetic effects within the LD range.

2.2.2. MMP-2 Secretion of pADSCs is Enhanced after Low Dose X-Ray Therapy with 0.5 Gy

ADSCs secretom plays a major role in angiogenesis, wound healing, tissue regeneration, and immunomodulation. Therefore, next to the proliferation capacity, we investigated the impact of LD-IR on the release of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) by ADSCs as it is an important mediator of the wound healing process in tissue repair. For this purpose, Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) were used. Overall, pADSCs tend to a linear release of MMP-2 of approximately 6 pg/mL per day (Figure 5, ANOVA $p < 0001$). This rate (6 h: 3.75 ng/mL, 24 h: 6.81 ng/mL, 48 h: 11.56 ng/mL) was influenced neither by LD (6 h: 3.98 ng/mL, 24 h: 6.78 ng/mL, 48 h: 11.33 ng/mL) nor medium doses of 1 or 2 Gy ionizing radiation (6 h: 3.16/3.41 ng/mL, 24 h: 7.18/7.03 ng/mL, 48 h: 11.03/11.18 ng/mL), but increased by about 20% 24 and 48 h after 0.5 Gy irradiation treatment (6 h: 3.63 ng/mL, 24 h: 8.7 ng/mL, 48 h: 13.61 ng/mL). These data suggest that RT with 0.5 Gy that is typically used in an anti-inflammatory manner could also improve the tissue repair mechanisms induced by ADSCs. However, LD-IR did not reduce the release of MMP2 as a mediator for wound healing as its linear release was not disturbed.

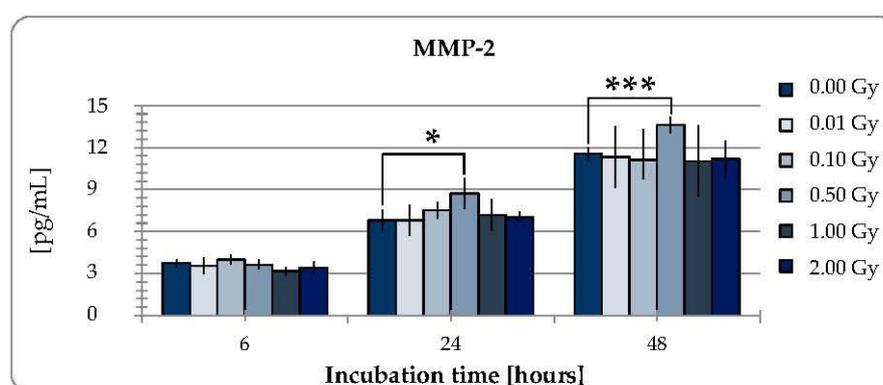


Figure 5. Content of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the supernatant of adipose-derived stem cells (ADSCs) 6, 24, and 48 h after irradiation. Results are illustrated as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. Asterisks illustrate significant differences referring to sham irradiated cells: * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$ (two-tailed t -test and two-way ANOVA with Bonferroni post-test).

3. Discussion

In the study presented here, the impact of low-dose of ionizing radiation (LD-IR) in adipose-derived stem cells (ADSCs) with respect to cyto- and genotoxic effects, as well as induced functional changes was investigated. Since there is no general definition of LD-IR in the literature, for this study LD-IR was defined using doses of 0.1 Gy or less. Since ADSCs are an easily accessible source of stem cells, the research has increasingly focused on them to improve the approaches of stem cells in the field of regenerative medicine. One aspect is to find a possible mediator to enhance the success of stem cells therapy. Here, we showed for the first time, that LD-IR promotes the proliferation of ADSCs. At the same time, we could exclude both cytotoxic and genotoxic side effects in those cells. We, therefore, propose LD-IR as a possible mediator to improve approaches of stem cells in the field of regenerative medicine.

In Germany, low-dose radiation therapy (LD-RT) is a commonly used option in the treatment of degenerative bone and inflammatory diseases [1] with most an effective dose at 0.5 Gy [2,12,13]. Previous cohort studies confirmed the positive effect of low-dose radiation on the well-being of patients, while at the same time an increased radiation carcinogenesis risk can be excluded [4,45–47]. For example, Zwicker et al. (2019) observed no additional cancer risk of female patients after radiotherapy of non-malignant disorders of the shoulder in comparison with the estimated spontaneous incidence of mammary carcinoma for this cohort [47]. Within this study the weekly single dose was 1 Gy and

the median maximum dose 6 Gy [47]. According to the linear no-threshold (LNT) model, it can be assumed that the carcinogenic potential of those single doses of 1 Gy compared to doses smaller than 0.1 Gy is many times lower and can be neglected. Nevertheless, each hit of an 100 kV X-ray (1 mGy) brings about 150 reactive oxygen species as well as two DNA alterations, of which are about 10^{-2} double-strand breaks, and of 10^{-4} chromosomal aberrations [48]. As fundamental for the LNT-model, those rates increase proportional with rising radiation doses, as well as the resulting carcinogenic potential. Nevertheless, the calculated DNA damage induced by VLD is much less than the damage caused by the oxidative processes of normal metabolism [49,50]. However, the present data presented here of cell response to ionizing doses beyond 0.1 Gy does not fit into this model as cell damage is not increased in with LD irradiated cells and at the same time the proliferation is increased compared to sham irradiated cells. Those trends have also been recognized before in different non-carcinogen cell types [15,17,18,41] supporting the model of low-dose induced hormetic response. For example, in lung derived fibroblasts the exposure to radiation of 0.05 Gy stimulates the cell proliferation through transient activation of Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) and Akt (Protein kinase B) [41]. We detected the same proliferation stimulating trends in pADSCs, but after exposure of very small doses with 0.08 Gy. Furthermore, in our study we were able to determine for the first time increasing trends of the clonogenic survival of the ADSCs after LD-IR using 0.05 Gy.

In contrast, secretion of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) in pADSCs was increased only by the low-dose radiation of 0.5 Gy, whereas LD radiation resulted in no change. MMP-2 is an important mediator for wound healing processes of tissue repair reviewed in [47] suggesting that wound healing processes are enhanced after LD-IR. However, the group around Guo et al. (2010) have also observed positive effects on the wound healing of repeated low-dose radiation exposure of 0.075 Gy in a diabetic rat model, whereby an associated increase in bone marrow and circulating stem cells, vessel regeneration and cell proliferation in the wound tissue, and matrix metalloproteinase -2 and -9 expression was reported [42]. Therefore, despite our data, it cannot be ruled out that repeated exposure with LD has a positive effect on wound healing. Rather, this discrepancy shows the enormous need for research in this area and the enormous potential of LD-IR in the improvement of current stem cell therapies. We hypothesize that the increased proliferation of pADSCs may improve the success of regenerative therapies. However, this should first be examined in more detail. There are no in vivo studies on the effect of irradiating ADSCs below 0.1 Gy on the success of regenerative therapies. Guo et al. have already yielded promising results [42]. The underlying pathways and regulatory factors, however, remain misunderstood and should be subject of future investigations.

Taking into account that to date no negative side-effects were detected in cells after the exposure to radiation doses smaller than 0.1 Gy, relatively low-cost and harmless therapies could be conducted. For example, the success rate of autologous fat transplantation could be improved by promoting the proliferation of tissue-specific stem cells by LD radiation.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture

Isolation of ADSCs

Human reduction mammoplasties were used to isolate ADSCs. The donors were healthy and female. This isolation was approved by the ethics committee at the University of Rostock, Germany (registration-number: A201008). The protocol used here has already been published in our previous work [34]. The ADSCs were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium and Kaighn's modification of Ham's F12 (DMEM/F12) supplemented with 10% fetal bovine serum Superior (FBS, Biochrom AG, Berlin, Germany) and 1% penicillin/streptomycin (P/S, 1%; 100 × penicillin 10,000 U/mL, streptomycin 10,000 µg/mL, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Reaching 80% confluence, the cells were washed twice with PBS and detached from the plastic surface of the culture flask with Trypsin/Ethylenediaminetetraacetic acid (Trypsin/EDTA, PAA Laboratories, Cölbe,

Germany). A defined number of 500,000 cells in passage 1 were cryopreserved in DMEM/F12 containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck, Darmstadt, Germany) and 20% FBS.

4.2. Irradiation Procedure

The cells were irradiated with X-rays 24 h after seeding using the Xstrahl 200 therapy system (Xstrahl Ltd., Surrey, United Kingdom) at a dose rate of 0.52 Gy/min. Used single doses were 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 Gy, whereas 0 Gy was utilized as the control and 2 Gy as positive control. To analyze a broad range of low doses within a single irradiation treatment, a shielding system was established using a MCP96-block (consisting of about 40% lead, 40% bismuth, and 20% tin) and a brass wedge. While the MCP96-block shielded the incident radiation to 100%, the brass wedge caused a shielding gradient with decreasing thickness from 96 to 50.5%. This arrangement was placed between the irradiation device and the cells cultured in a 96-well plate. At the single dose of 2 Gy applied here, the plate rows were thus irradiated between 0.08 and 2 Gy (Table 1).

Table 1. Shielding of the irradiation dose by the used plumb block and the brass wedge.

Shielding by	Block	Brass Wedge									
Shielding [%]	100	96.0	95.2	94.1	92.7	91.0	85.5	76.2	59.5	0.0	
Incoming radiation [Gy]	0	0.080	0.096	0.118	0.146	0.180	0.290	0.476	0.810	2.000	

4.3. Effects at the Cellular Level

4.3.1. Colony-Forming Units Assay

The colony-forming units assay was used to analyze the long-term effect of IR on pADSCs cell survival. A number of 1000 pADSCs were cultured in T₂₅ flasks (triplicates) and irradiated with different radiation doses (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 Gy). Every three days, the medium was discarded and replaced by a fresh medium. After 20 days the cells were stained with crystal violet (1%, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). Visible colonies that contain at least 50 cells were counted using microscopy. The clonogenic survival fraction was calculated as follows:

$$\text{Plating Efficiency (PE)} = \frac{\text{number of counted colonies}}{\text{number of seeded cells}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Survival Fraction} = \frac{\text{number of counted colonies}}{\text{number of seeded cells} \times \left(\frac{\text{PE of sham irradiated cells}}{100} \right)} \quad (2)$$

The calculated plating efficiency (PE) and survival fractions (SF) were evaluated using the data analysis and graphics software Origin 8.6.

4.3.2. LDH Cytotoxicity Assay

The Lactate dehydrogenase (LDH) is a cytosolic enzyme present in mammalian cells. During the early phase of cell death, damaged plasma membranes release LDH into the cell culture media. Therefore, the LDH level in the cell culture supernatant is useful as a marker for cellular toxicity. Here, the LDH release after low-dose IR was measured by the colorimetric assay kit Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). In brief, 24 h before irradiation treatment, 4000 pADSCs were seeded in quintuplicate into 96-well plates (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland). At the time points of 24 and 48 h after IR, fifty microlitres of each sample or standard was mixed with 50 microlitres of reaction mix. For evaluating the positive control of 100% dead cells a triplicate of cells were treated with 10× Lysis Buffer 45 min before measurement procedure. Within an incubation period of 30 min at room temperature, the LDH present in the samples catalyzed the conversion of lactate to pyruvate via Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) reduction to NAD-Hydrogen (NADH). Subsequently, this NADH was then used by diaphorase to

reduce tetrazolium salt to red formazan product, which in turn was measurable at 490 nm. Optical densities were read using Anthos Zenyth 340 Plate Reader (Biochrom Ltd., Cambridge, UK).

$$\text{Cytotoxicity [\%]} = \frac{\text{IR treated LDH activity} - \text{spontaneous LDH activity}}{\text{Maximum LDH activity} - \text{Spontaneous activity}} \times 100 \quad (3)$$

4.3.3. Cell Proliferation Assay

To determine changes in the number of proliferating cells, pADSCs were incubated with bromodeoxyuridine (BrdU, Cell Proliferation ELISA, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) at 30 min prior to the IR procedure. BrdU is a synthetic nucleoside that incorporates into newly synthesized DNA of replicating cells, because of its similarity to thymidine. Therefore, the rate of incorporated BrdU can be used to assess the proliferation rate of cells. To analyze one generation of cells, incubation times that are lower than one population doubling time were chosen (96.5 ± 8.0 h [33]) of pADSCs.

24 h before IR 2000 cells were seeded in quintuplicate into 96-well plates. 1 h before irradiation, BrdU was added to the cells. After incubation times of 24 and 48 h the assay was performed according to the manufacturer's instructions. Optical densities were read using Anthos Zenyth 340 Plate Reader. In order to calculate the relative BrdU incorporation, the measurement of unirradiated cells were defined as 100% BrdU incorporation. The BrdU incorporation as a direct marker for proliferation was calculated as follows:

$$\text{BrdU incorporation [\%]} = \frac{\text{OD (sample)} - \text{OD (culture medium)}}{\text{OD (control)} - \text{OD (culture medium)}} \times 100 \quad (4)$$

$$\Delta Y \text{ BrdU incorporation [\%]} = \text{BrdU incorporation (control)} - \text{BrdU incorporation (sample)} \quad (5)$$

4.4. DNA Damaging Effects—Measurement of DNA Doublestrand Breaks (γ H2AX Assay)

The DNA damaging effect of IR procedure on pADSCs was analyzed using the γ H2AX assay that visualize DNA double strand breaks within the nucleus. 24 h before IR, 35,000 pADSCs were seeded as duplicate in chamber slides (LabTek[®], Nunc, Roskilde, Denmark), and treated according to the protocol already described [33].

4.5. MMP-2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA)

10,000 pADSCs were seeded into each well of a 24-well plate and irradiated 24 h later. At the end points of 6, 24, and 48 h after irradiation, culture medium samples were collected, centrifuged, shock-frozen by means of nitrogen and stored at -80 °C until assayed. Concentration of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) was assayed using Human Quantikine ELISA Kit (R & D Systems, USA). Optical densities were read using Anthos Zenyth 340 Plate Reader.

4.6. Statistical Analysis

All data are presented as mean \pm standard deviation (SD) or standard error of mean (SEM). The normality of the distribution of each parameter was assessed using the Shapiro–Wilk test. Non-normally distributed records were statistically evaluated by the Mann–Whitney U Test (LDH cytotoxicity assay). To identify differences between data sets, the two tailed students t-test was performed. To compare a variable under different conditions, here incubation time and irradiation dose (Cell proliferation assay, γ H2AX Assay, and MMP-2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay) the two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-test with SigmaPlot (Version 13.0 from Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) was utilized. Significance was assessed at $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). For comparative analysis of one dataset to a fixed value, as the survival fraction, the proliferation rate and cytotoxicity rate, the one-sample t-test was used. Here, a $p < 0.02$ was considered a significant difference (*: $p < 0.02$, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.002$).

5. Conclusions

Within the literature, there is a discrepancy in the definition of low radiation doses. Here, it has been shown that radiation treatment of ADSCs below 0.1 Gy leads to neither cytotoxic nor genotoxic changes. Rather, this radiation dose leads to increased proliferation, as well as elevated survival in ADSCs. The same was observed in several normal human cell lines, fibroblasts, as well as human and rat bone-marrow stem cells supporting the low-dose induced response model [15–19]. Therefore LD-IR could be a possible mediator to improve approaches of stem cells in the field of regenerative medicine as it supports the proliferation and survival.

Author Contributions: Conceptualization, A.S.; Methodology, A.S.; Formal analysis, A.S.; Investigation, A.S.; Development of cell radiation setup S.K.; Dosimetry S.K.; Resources K.M. and G.H.; Data curation, A.S.; Writing—Original draft preparation, A.S.; Writing—review and editing, K.M. and G.H.; Visualization, A.S.; Supervision, K.M.; Project administration, A.S.; Funding acquisition, A.S.

Funding: This research was funded by the B. Braun Stiftung, BBST-2018-D-18-00030 and the Open Access and Article Processing Charge was financially supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Universität Rostock within the funding program Open Access Publishing.

Acknowledgments: Human breast tissue from cosmetic reduction mammoplasties were very kindly provided by Bernd Gerber and Toralf Reimer at the Department of Obstetrics and Gynecology, University Medical Center Rostock and Jürgen Weber at the Clinic of Aesthetics of the Academy for Transdermal Delivery Research e.V., Rostock, as well as Björn Dirk Krapohl, specialist in plastic and hand surgery of the St. Marien Hospital, Berlin and Peter Mailänder, head of plastic surgery at the University Hospital, Lübeck.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

ADSCs	adipose-derived stem cells
Akt	Protein kinase B
BMSCs	bone-marrow stem cells
BrdU	bromodeoxyuridine
CAL	cell-assisted lipotransfer
DMEM/F12	Dulbecco's modified Eagle medium and Kaighn's modification of Ham's F12
DMSO	dimethyl sulfoxide
DSBs	doublestrand breaks
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	fetal bovine serum
IR	Irradiation
LDH	lactate dehydrogenase
LD	low dose
LD-IR	Low-dose irradiation
LD-RT	low-dose radiation therapy
MMP 2	metalloproteinase-2
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide-Hydrogen
pADSCs	pooled adipose-derived stem cells
PBS	phosphate-buffered saline
P/S	penicillin/streptomycin
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
SD	standard deviation
VLD	very low-dose

References

1. Richter, E.; Feyerabend, T.; Richter, E.; Feyerabend, T. Strahlentherapie gutartiger Erkrankungen. In *Grundlagen der Strahlentherapie*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012; pp. 396–400. [[CrossRef](#)]
2. Niewald, M.; Holtmann, H.; Prokein, B.; Hautmann, M.G.; Rösler, H.P.; Graeber, S.; Dzierma, Y.; Ruebe, C.; Fleckenstein, J. Randomized multicenter follow-up trial on the effect of radiotherapy on painful heel spur (plantar fasciitis) comparing two fractionation schedules with uniform total dose: First results after three months' follow-up. *Radiat. Oncol.* **2015**, *10*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Uysal, B.; Beyzadeoglu, M.; Sager, O.; Demiral, S.; Gamsız, H.; Dincoglan, F.; Akın, M.; Dirican, B. Role of radiotherapy in the management of heel spur. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* **2015**, *25*, 387–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Seegenschmiedt, M.H.; Micke, O.; Willich, N. Radiation therapy for nonmalignant diseases in Germany: Current concepts and future perspectives. *Strahlenther. Onkol.* **2004**, *180*, 718–730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Frey, B.; Hehlhans, S.; Rödel, F.; Gaipf, U.S. Modulation of inflammation by low and high doses of ionizing radiation: Implications for benign and malign diseases. *Cancer Lett.* **2015**, *368*, 230–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cui, J.; Yang, G.; Pan, Z.; Zhao, Y.; Liang, X.; Li, W.; Cai, L. Hormetic response to low-dose radiation: Focus on the immune system and its clinical implications. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Hildebrandt, J.; Jahns, M.; Hindemith, G. Effects of low dose radiation therapy on adjuvant induced arthritis in rats. *Int. J. Radiat. Biol.* **2002**, *76*, 1143–1153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Lödermann, B.; Frey, B.; Kern, P.M.; Fietkau, R.; Rödel, F.; Gaipf, U.S.; Herrmann, M.; Meister, S. Activation-induced cell death and total Akt content of granulocytes show a biphasic course after low-dose radiation. *Autoimmunity* **2009**, *42*, 340–342.
9. Kern, P.; Keilholz, L.; Forster, C.; Seegenschmiedt, M.H.; Sauer, R.; Herrmann, M. In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. *Int. J. Radiat. Biol.* **1999**, *75*, 995–1003.
10. Hildebrandt, G.; Maggiorella, L.; Rödel, F.; Rödel, V.; Willis, D.; Trott, K.R. Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* **2002**, *78*, 315–325. [[CrossRef](#)]
11. Kern, P.M.; Keilholz, L.; Forster, C.; Hallmann, R.; Herrmann, M.; Seegenschmiedt, M.H. Low-dose radiotherapy selectively reduces adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro. *Radiother. Oncol.* **2000**, *54*, 273–282. [[CrossRef](#)]
12. Ott, O.J.; Jeremias, C.; Gaipf, U.S.; Frey, B.; Schmidt, M.; Fietkau, R. Radiotherapy for calcaneodynia: Results of a single center prospective randomized dose optimization trial. *Strahlenther. Onkol.* **2013**, *189*, 329–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ott, O.J.; Jeremias, C.; Gaipf, U.S.; Frey, B.; Schmidt, M.; Fietkau, R. Radiotherapy for benign calcaneodynia. Long-term results of the Erlangen Dose Optimization (EDO) trial. *Strahlenther. Onkol.* **2014**, *190*, 671–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sautter-Bihl, M.-L.; Liebermeister, E.; Scheurig, H.; Heinze, H.-G. Analgetische Bestrahlung degenerativentzündlicher Skeletterkrankungen: Nutzen und Risiko. *DMW-Dtsch. Med. Wochenschr.* **2008**, *118*, 493–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Jiang, H.; Xu, Y.; Li, W.; Jiang, H.; Wang, G.; Cai, L.; Ma, K. Low-Dose Radiation Does Not Induce Proliferation in Tumor Cells In Vitro and In Vivo. *Radiat. Res.* **2008**, *170*, 477–487. [[CrossRef](#)]
16. Liang, X.; Gu, J.; Yu, D.; Wang, G.; Zhou, L.; Zhang, X.; Zhao, Y.; Chen, X.; Zheng, S.; Liu, Q.; et al. Low-dose radiation induces cell proliferation in human embryonic lung fibroblasts but not in lung cancer cells: Importance of ERK1/2 and AKT signaling pathways. *Dose-Response* **2016**, *14*, 1–10. [[CrossRef](#)]
17. Truong, K.; Bradley, S.; Baginski, B.; Wilson, J.R.; Medlin, D.; Zheng, L.; Wilson, R.K.; Rusin, M.; Takacs, E.; Dean, D. The effect of well-characterized, very low-dose X-ray radiation on fibroblasts. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190330. [[CrossRef](#)]
18. Liang, X.; So, Y.H.; Cui, J.; Ma, K.; Xu, X.; Zhao, Y.; Cai, L.; Lu, W. The Low-dose Ionizing Radiation Stimulates Cell Proliferation via Activation of the MAPK/ERK Pathway in Rat Cultured Mesenchymal Stem Cells. *J. Radiat. Res.* **2011**, *52*, 380–386. [[CrossRef](#)]
19. Yang, L.; Liu, Z.; Chen, C.; Cong, X.; Li, Z.; Zhao, S.; Ren, M. Low-dose radiation modulates human mesenchymal stem cell proliferation through regulating CDK and Rb. *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 1914–1921.

38. Rodel, F.; Frey, B.; Gaipf, U.; Keilholz, L.; Fournier, C.; Manda, K.; Schollnberger, H.; Hildebrandt, G.; Rodel, C. Modulation of Inflammatory Immune Reactions by Low-Dose Ionizing Radiation: Molecular Mechanisms and Clinical Application. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1741–1750. [[CrossRef](#)]
39. Marples, B.M.; Spencer, C. Low-Dose Hyper-Radiosensitivity: Past, Present, and Future. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2008**, *70*, 1310–1318. [[CrossRef](#)]
40. Joiner, M.C.; Lambin, P.; Malaise, E.P.; Robson, T.; Arrand, J.E.; Skov, K.A.; Marples, B. Hypersensitivity to very-low single radiation doses: Its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1996**, *358*, 171–183. [[CrossRef](#)]
41. Kim, C.S.; Kim, J.K.; Nam, S.Y.; Yang, K.H.; Jeong, M.; Kim, H.S.; Kim, C.S.; Jin, Y.W.; Kim, J. Low-dose radiation stimulates the proliferation of normal human lung fibroblasts via a transient activation of Raf and Akt. *Mol. Cells* **2007**, *24*, 424–430.
42. Guo, W.-Y.; Wang, G.-J.; Wang, P.; Chen, Q.; Tan, Y.; Cai, L. Acceleration of Diabetic Wound Healing by Low-Dose Radiation is Associated with Peripheral Mobilization of Bone Marrow Stem Cells. *Radiat. Res.* **2010**, *174*, 467–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zuk, P.A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; De Ugarte, D.A.; Huang, J.I.; Mizuno, H.; Alfonso, Z.C.; Fraser, J.K. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 4279–4295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Varghese, J.; Griffin, M.; Mosahebi, A.; Butler, P. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: Implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Micke, O.; Seegenschmiedt, M.H. Radiotherapy in painful heel spurs (plantar fasciitis)—Results of a national patterns of care study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2004**, *58*, 828–843. [[CrossRef](#)]
46. Kriz, J.; Seegenschmiedt, H.M.; Bartels, A.; Micke, O.; Muecke, R. Updated strategies in the treatment of benign diseases—A patterns of care study of the german cooperative group on benign diseases. *Adv. Radiat. Oncol.* **2018**, *3*, 240–244. [[CrossRef](#)]
47. Zwicker, F.; Kirchner, C.; Huber, P.E.; Debus, J.; Zwicker, H.; Klepper, R. Breast cancer occurrence after low dose radiotherapy of non-malignant disorders of the shoulder. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–8. [[CrossRef](#)]
48. Feinendegen, L.E.; Pollycove, M.; Neumann, R.D. Whole-body responses to low-level radiation exposure: New concepts in mammalian radiobiology. *Exp. Hematol.* **2007**, *35*, 37–46. [[CrossRef](#)]
49. Sedelnikova, O.A.; Horikawa, I.; Zimonjic, D.B.; Popescu, N.C.; Bonner, W.M.; Barrett, J.C. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 168–171. [[CrossRef](#)]
50. Rothkamm, K.; Lo, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5057–5062. [[CrossRef](#)]



Erklärung über den Eigenanteil an den Publikationen

1. Artikel: Baaße, A.; Juerß, D.; Reape, E.; Manda, K.; Hildebrandt, G. **Promoting effects of adipose-derived stem cells on breast cancer cells are reversed by radiation therapy.** *Cytotechnology* **70**, 701–711 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0172-6>.

Konzeptbildung und Versuchsplanung: 70 %

Die Konzeptbildung und Versuchsplanung wurde von Frau Schröder selbstständig erstellt, wobei sowohl durch Frau Juerß als auch Frau Dr. Manda und Prof. Hildebrandt eine Überarbeitung erfolgte.

Durchführung der Experimente: 80 %

Die Experimente innerhalb dieser Publikation wurden von Frau Schröder selbstständig durchgeführt, wobei Frau Elaine Reape und Frau Schröder sich die Aufgabe der Isolation von Fettgewebstammzellen im gleichen Maße teilten.

Schreiben der Veröffentlichung: 90 %

Das Manuskript wurde von Frau Schröder selbstständig entworfen und geschrieben. Eine anschließende kritische Überarbeitung erfolgte durch Frau Juerß, Frau Reape, Frau Dr. Manda und Prof. Hildebrandt.

2. Artikel: Baaße, A.; Machoy, F.; Juerß, D.; Baake, J.; Stang, F.; Reimer, T.; Krapohl, B.; Hildebrandt, G. **Radiation Sensitivity of Adipose-Derived Stem Cells Isolated from Breast Tissue.** *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1988 doi:10.3390/ijms19071988. (2018)

Konzeptbildung und Versuchsplanung: 90 %

Die Konzeptbildung und Versuchsplanung wurde von Frau Schröder selbstständig erstellt, wobei Prof. Hildebrandt beratend zur Seite stand.

Durchführung der Experimente: 85 %

Die Experimente wurden im überwiegenden Teil von Frau Schröder durchgeführt, folgende Arbeiten erfolgten durch die genannten Ko-Autoren:

- Genexpressionsanalyse (s. Publikation 2, Abb. 5, Frau Juerß), wobei Frau Schröder das zu untersuchende Zellmaterial zuvor isolierte
- Koloniebildungstest (s. Publikation 2, Abb. 2) von ZR-75-1 Zellen, MCF10A Zellen (Frau Baake) und ADSCs (Frau Machoy)
- Proliferationsanalyse von ADSCs (s. Publikation, Abb. 3, Frau Machoy)
- Zellzyklusanalyse von ADSCs 24h nach Bestrahlung (Frau Machoy), wobei Frau Schröder den Zellzyklus 72 Stunden nach Bestrahlung untersuchte

Herr Dr. Stang, Herr Prof. Reimer und Herr Prof. Krapohl stellten das humane Brustgewebe zur Verfügung, wobei sie ebenfalls die Patientenaufklärung zur Verwendung des zur Verfügung gestellten Materials übernahmen.

Schreiben der Veröffentlichung: 90 %

Das Manuskript wurde von Frau Schröder selbständig entworfen und geschrieben. Eine anschließende kritische Überarbeitung erfolgte im Anschluss durch alle aufgelisteten Ko-Autoren.

3. Artikel: Schröder, A.; Kriesen, S.; Hildebrandt, G.; Manda, K. **First Insights into the Effect of Low-Dose X-Ray Irradiation in Adipose-Derived Stem Cells.** *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 6075 (2019).

Konzeptbildung und Versuchsplanung: 80 %

Die Konzeptbildung und Versuchsplanung wurde von Frau Schröder selbstständig erstellt, wobei Frau Dr. Manda und Herr Prof. Hildebrandt beratend zur Seite standen. Herr Dr. Kriesen erstellte das zugrundeliegende Bestrahlungssetup.

Durchführung der Experimente: 100 %

Die Experimente innerhalb dieser Publikation wurden Frau Schröder selbstständig durchgeführt.

Schreiben der Veröffentlichung: 90 %

Das Manuskript wurde von Frau Schröder selbständig entworfen und geschrieben. Eine anschließende kritische Überarbeitung erfolgte im Anschluss durch alle aufgelisteten Ko-Autoren.

Literaturverzeichnis

- Adachi, Naoki et al. 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): 1176–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.079>.
- Beral, Valerie. 2007. "Ovarian Cancer and Hormone Replacement Therapy in the Million Women Study." *Lancet*.
- Blazquez-Martinez, A. et al. 2014. "C-Kit Identifies a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells in Adipose Tissue with Higher Telomerase Expression and Differentiation Potential." *Differentiation*.
- Bourin, Philippe et al. 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): 641–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>.
- Briskin, Cathrin, and Stephan Duss. 2007. "Stem Cells and the Stem Cell Niche in the Breast : An Integrated Hormonal and Developmental Perspective." : 147–56.
- Brooks, Anna E. S. et al. 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. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.01695/full>.
- Brugger, W. et al. 1993. "Ex Vivo Expansion of Enriched Peripheral Blood CD34+ Progenitor Cells by Stem Cell Factor, Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-3, Interferon- γ , and Erythropoietin." *Blood* 81(10): 2579–84.
- Buschmann, Johanna et al. 2013. "Yield and Proliferation Rate of Adipose-Derived Stromal Cells as a Function of Age, Body Mass Index and Harvest Site-Increasing the Yield by Use of Adherent and Supernatant Fractions?" *Cytotherapy*.
- Cable, Jennifer et al. 2020. "Adult Stem Cells and Regenerative Medicine—a Symposium Report." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1462(1): 27–36.
- Chen, Miao-Fen et al. 2006. "The Sensitivity of Human Mesenchymal Stem Cells to Ionizing Radiation." *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* 66(1): 244–53. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360301606006833>.
- Cho, Jung Ah, Ho Park, Eun Hye Lim, and Kyo Won Lee. 2012. "Exosomes from Breast Cancer Cells Can Convert Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells into Myofibroblast-like Cells." *International Journal of Oncology*.
- Cieślár-Pobuda, Artur et al. 2017. "Transdifferentiation and Reprogramming: Overview of the Processes, Their Similarities and Differences." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.
- Clavin, Nicholas W. et al. 2008. "Fractionated Doses of Ionizing Radiation Confer Protection to Mesenchymal Stem Cell Pluripotency." *Plastic and Reconstructive Surgery*.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, . 2002. "Breast Cancer and Breastfeeding: Collaborative Reanalysis of Individual Data from 47 Epidemiological Studies in 30 Countries, Including 50 302 Women with Breast Cancer and 96 973 Women without the Disease." *The Lancet* 360(9328): 187–95. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673602094540>.
- Crisan, Mihaela et al. 2008. "A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs." *Cell Stem Cell*.
- Cui, Jiuwei et al. 2017. "Hormetic Response to Low-Dose Radiation: Focus on the Immune System and Its Clinical Implications." *International Journal of Molecular Sciences* 18(2).

- Dominici, M et al. 2006. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8(4): 315–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>.
- Donnelly, Hannah, Manuel Salmeron-Sanchez, and Matthew J. Dalby. 2018. "Designing Stem Cell Niches for Differentiation and Self-Renewal." *Journal of the Royal Society Interface* 15(145).
- Eccles, Laura J., Peter O'Neill, and Martine E. Lomax. 2011. "Delayed Repair of Radiation Induced Clustered DNA Damage: Friend or Foe?" *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711(1–2): 134–41. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510710003076>.
- Eterno, Vincenzo et al. 2015. "Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ASCs) May Favour Breast Cancer Recurrence via HGF/c-Met Signaling." *Oncotarget* 5(3).
- Feinendegen, Ludwig E, Myron Pollycove, and Ronald D Neumann. 2007. "Whole-Body Responses to Low-Level Radiation Exposure: New Concepts in Mammalian Radiobiology." 35: 37–46.
- Frey, Benjamin, Stephanie Hehlhans, Franz Rödel, and Udo S. Gaipl. 2015. "Modulation of Inflammation by Low and High Doses of Ionizing Radiation: Implications for Benign and Malign Diseases." *Cancer Letters* 368(2): 230–37.
- Gimble, Jeffrey M., and F. Guilak. 2003. "Adipose-Derived Adult Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation Potential." *Cytotherapy*.
- Goldberg, Zelanna, and Bruce E. Lehnert. 2002. "Radiation-Induced Effects in Unirradiated Cells: A Review and Implications in Cancer." *International journal of oncology*.
- Good, J. S., and K. J. Harrington. 2013. "The Hallmarks of Cancer and the Radiation Oncologist: Updating the 5Rs of Radiobiology." *Clinical Oncology*.
- Goodhead, D. T. 1994. "Initial Events in the Cellular Effects of Ionizing Radiations: Clustered Damage in DNA." *International Journal of Radiation Biology*.
- Goto, Hideaki et al. 2019. "Adipose-Derived Stem Cells Enhance Human Breast Cancer Growth and Cancer Stem Cell-like Properties through Adipsin." *Oncogene* 38(6): 767–79. <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-018-0477-8>.
- Guneta, Vipra et al. 2016. "Comparative Study of Adipose-Derived Stem Cells From Abdomen and Breast." *Annals of Plastic Surgery* 76(5): 569–75. <http://journals.lww.com/00000637-201605000-00022>.
- Guo, Wei-Ying et al. 2010. "Acceleration of Diabetic Wound Healing by Low-Dose Radiation Is Associated with Peripheral Mobilization of Bone Marrow Stem Cells." *Radiation Research* 174(4): 467–79.
- Hanson, Summer E., Jaehyup Kim, and Peiman Hematti. 2013. "Comparative Analysis of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Isolated from Abdominal and Breast Tissue." *Aesthetic Surgery Journal*.
- Hildebrandt, J. Jahns, M. Hindemith, G. 2002. "Effects of Low Dose Radiation Therapy on Adjuvant Induced Arthritis in Rats." *International Journal of Radiation Biology* 76(8): 1143–53.
- Hildebrandt, G. et al. 2002. "Mononuclear Cell Adhesion and Cell Adhesion Molecule Liberation after X-Irradiation of Activated Endothelial Cells in Vitro." *International Journal of Radiation Biology* 78(4): 315–25.
- Hüttermann, Jürgen et al. 1984. "Specific Formation of Electron Gain and Loss Centres in X-Irradiated Oriented Fibres of DNA at Low Temperatures." *Faraday Discussions of the Chemical Society*.
- Illouz, Yves Gérard, and Aris Sterodimas. 2009. "Autologous Fat Transplantation to the Breast: A Personal Technique with 25 Years of Experience." *Aesthetic Plastic Surgery* 33(5): 706–15.
- Iminitoff, Megan et al. 2020. "MicroRNAs in Ex Vivo Human Adipose Tissue Derived

- Mesenchymal Stromal Cells (ASC) Undergo Rapid Culture-induced Changes in Expression, Including Mir-378 Which Promotes Adipogenesis.” *International Journal of Molecular Sciences*.
- Ismail, Yehea et al. 2016. “Adipose Stem Cells Display Higher Regenerative Capacities and More Adaptable Electro-Kinetic Properties Compared to Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells.” *Scientific Reports* 6(1).
- Jiang, Hongyu et al. 2008. “Low-Dose Radiation Does Not Induce Proliferation in Tumor Cells In Vitro and In Vivo.” *Radiation Research* 170(4): 477–87.
- Kaewsuwan, Sireewan, Seung Yong Song, Ji Hye Kim, and Jong Hyuk Sung. 2012. “Mimicking the Functional Niche of Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine.” *Expert Opinion on Biological Therapy*.
- Kapur, Sahil K., and Adam J. Katz. 2013. “Review of the Adipose Derived Stem Cell Secretome.” *Biochimie* 95(12): 2222–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.001>.
- Kern, P. et al. 1999. “In Vitro Apoptosis in Peripheral Blood Mononuclear Cells Induced by Low- Dose Radiotherapy Displays a Discontinuous Dose-Dependence.” *International Journal of Radiation Biology* 75(8): 995–1003.
- Kern, Peter M. et al. 2000. “Low-Dose Radiotherapy Selectively Reduces Adhesion of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Endothelium in Vitro.” *Radiotherapy and Oncology* 54(3): 273–82.
- Kim, Cha Soon et al. 2007. “Low-Dose Radiation Stimulates the Proliferation of Normal Human Lung Fibroblasts via a Transient Activation of Raf and Akt.” *Molecules and Cells* 24(3): 424–30.
- Kim, Jaehyup et al. 2013. “Comparison of Breast and Abdominal Adipose Tissue Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Support of Proliferation of Breast Cancer Cells.” *Cancer Investigation* 31(8): 550–54. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07357907.2013.830737>.
- Kim, Seong Muk et al. 2010. “Irradiation Enhances the Tumor Tropism and Therapeutic Potential of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Secreting Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Glioma Therapy.” *Stem Cells*.
- Kim, Won-serk, Juhee Han, Sung-joo Hwang, and Jong-hyuk Sung. 2014. “An Update on Niche Composition , Signaling and Functional Regulation of the Adipose-Derived Stem Cells.” : 1–12.
- Kindts, Isabelle, Annouschka Laenen, Tom Depuydt, and Caroline Weltens. 2017. “Tumour Bed Boost Radiotherapy for Women after Breast-Conserving Surgery.” *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Klopp, Ann H. et al. 2007. “Tumor Irradiation Increases the Recruitment of Circulating Mesenchymal Stem Cells into the Tumor Microenvironment.” *Cancer Research*.
- Kokai, Lauren E., Kacey Marra, and J. Peter Rubin. 2014. “Adipose Stem Cells: Biology and Clinical Applications for Tissue Repair and Regeneration.” *Translational Research* 163(4): 399–408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.009>.
- Kucerova, Lucia et al. 2007. “Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Mediated Prodrug Cancer Gene Therapy.” *Cancer Research* 67(13): 6304–13.
- Kuhbier, Jörn W. et al. 2010. “Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells.” *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*.
- Kurita, Masakazu et al. 2008. “Influences of Centrifugation on Cells and Tissues in Liposuction Aspirates: Optimized Centrifugation for Lipotransfer and Cell Isolation.” *Plastic and Reconstructive Surgery*.
- Lahmann, Petra H. et al. 2004. “Body Size and Breast Cancer Risk: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC).” *International Journal of Cancer*.

- Li, Han et al. 2011. "Adipogenic Potential of Adipose Stem Cell Subpopulations." *Plastic and Reconstructive Surgery*.
- Li, Xu et al. 2019. "Enrichment of CD146+ Adipose-Derived Stem Cells in Combination with Articular Cartilage Extracellular Matrix Scaffold Promotes Cartilage Regeneration." *Theranostics*.
- Liang, Xinyue et al. 2011. "The Low-Dose Ionizing Radiation Stimulates Cell Proliferation via Activation of the MAPK/ERK Pathway in Rat Cultured Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Radiation Research* 52(3): 380–86.
- Liang, Xinyue et al. 2016. "Low-Dose Radiation Induces Cell Proliferation in Human Embryonic Lung Fibroblasts but Not in Lung Cancer Cells: Importance of ERK1/2 and AKT Signaling Pathways." *Dose-Response* 14(1): 1–10. <https://doi.org/10.1177/1559325815622174>.
- Liu, Julia C., Paul H. Lerou, and Galit Lahav. 2014. "Stem Cells: Balancing Resistance and Sensitivity to DNA Damage." *Trends in Cell Biology* 24(5): 268–74.
- Locke, Michelle, John Windsor, and P. Rod Dunbar. 2009. "Human Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Characterization and Applications in Surgery." *ANZ Journal of Surgery* 79(4): 235–44.
- Lödermann, B. et al. 2009. "Activation-Induced Cell Death and Total Akt Content of Granulocytes Show a Biphasic Course after Low-Dose Radiation." *Autoimmunity* 42(4): 340–42.
- M.R., Borrelli et al. 2019. "CD146+ Adipose-Derived Stromal Cells Have Proangiogenic Qualities and Enhance the Regenerative Potential of Grafted Fat." *Journal of the American College of Surgeons*.
- Maria, Osama Muhammad et al. 2016. "Adipose Mesenchymal Stromal Cells Response to Ionizing Radiation." *Cytotherapy*.
- Martin, Ulrich, ed. 2009. *Engineering of Stem Cells*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-88806-2>.
- Massagué, Joan. 2012. "TGF β Signalling in Context." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(10): 616–30. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3434>.
- Mcculloch, E.A., J.E. Till, and A.J. Becker. 1963. "Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells." *Nature* 197(4866): 452–54.
- Miana, Vanesa Verónica, and Elio A. Prieto González. 2018. "Adipose Tissue Stem Cells in Regenerative Medicine." *ecancermedicalscience* 12.
- Mohammadpour, Hemn, Ali Akbar Pourfathollah, Mahin Nikougoftar Zarif, and Amir Ali Shahbazfar. 2016. "Irradiation Enhances Susceptibility of Tumor Cells to the Antitumor Effects of TNF- α Activated Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells in Breast Cancer Model." *Scientific Reports*.
- Molofsky, Anna V., Ricardo Pardal, and Sean J. Morrison. 2004. "Diverse Mechanisms Regulate Stem Cell Self-Renewal." *Current Opinion in Cell Biology*.
- Morgan, William F. 2003. "Is There a Common Mechanism Underlying Genomic Instability, Bystander Effects and Other Nontargeted Effects of Exposure to Ionizing Radiation?" *Oncogene* 22(45 REV. ISS. 5): 7094–99.
- Morrison, Sean J., and Allan C. Spradling. 2008. "Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life." *Cell* 132(4): 598–611.
- Mothersill, Carmel, and Colin B. Seymour. 2004. "Radiation-Induced Bystander Effects - Implications for Cancer." *Nature Reviews Cancer*.
- Muehlberg, Fabian L. et al. 2009. "Tissue-Resident Stem Cells Promote Breast Cancer Growth and Metastasis." *Carcinogenesis*.
- Niewald, Marcus et al. 2015. "Randomized Multicenter Follow-up Trial on the Effect of Radiotherapy on Painful Heel Spur (Plantar Fasciitis) Comparing Two Fractionation

- Schedules with Uniform Total Dose: First Results after Three Months' Follow-Up." *Radiation Oncology* 10(1): 1–7. <http://dx.doi.org/10.1186/s13014-015-0471-z>.
- Nigam, Anjana. 2013. "Breast Cancer Stem Cells, Pathways and Therapeutic Perspectives 2011." *Indian Journal of Surgery*.
- Nikjoo, H., P. O'Neill, D. T. Goodhead, and M. Terrissol. 1997. "Computational Modelling of Low-Energy Electron-Induced DNA Damage by Early Physical and Chemical Events." *International Journal of Radiation Biology*.
- Ohlstein, Benjamin, Toshie Kai, Eva Decotto, and Allan Spradling. 2004. "The Stem Cell Niche: Theme and Variations." *Current Opinion in Cell Biology* 16(6): 693–99.
- Ott, O. J. et al. 2013. "Radiotherapy for Calcaneodynia: Results of a Single Center Prospective Randomized Dose Optimization Trial." *Strahlentherapie und Onkologie* 189(4): 329–34.
- Ott, Oliver J. et al. 2014. "Radiotherapy for Benign Calcaneodynia. Long-Term Results of the Erlangen Dose Optimization (EDO) Trial." *Strahlentherapie und Onkologie* 190(7): 671–75.
- P.A., Van Den Brandt et al. 2000. "Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk." *American Journal of Epidemiology*.
- Pennings, Sari, Karen J. Liu, and Hong Qian. 2018. "The Stem Cell Niche: Interactions between Stem Cells and Their Environment." *Stem Cells International* 2018: 10–13.
- Prise, Kevin M, and Joe M O Sullivan. 2009. "Europe PMC Funders Group Radiation-Induced Bystander Signalling in Cancer Therapy." *Nat Rev Cancer*.
- Prochazkova, Michaela et al. 2015. "Embryonic Versus Adult Stem Cells." In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, Elsevier, 249–62. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971579000205>.
- Rehman, Jalees et al. 2004. "Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells." *Circulation* 109(10): 1292–98.
- Richter, Eckart, Thomas Feyerabend, Eckart Richter, and Thomas Feyerabend. 2012. "Strahlentherapie Gutartiger Erkrankungen." *Grundlagen der Strahlentherapie*: 396–400.
- Ritter, Andreas et al. 2015. "Characterization of Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous and Visceral Adipose Tissues and Their Function in Breast Cancer Cells." *Oncotarget*.
- RODBELL, M. 1964. "LOCALIZATION OF LIPOPROTEIN LIPASE IN FAT CELLS OF RAT ADIPOSE TISSUE." *The Journal of biological chemistry* 239: 753–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14154450>.
- Röntgen, W. C. 1898. "Ueber Eine Neue Art von Strahlen." *Annalen der Physik*.
- Rothkamm, Kai, and Markus Lo. 2003. "Evidence for a Lack of DNA Double-Strand Break Repair in Human Cells Exposed to Very Low x-Ray Doses." 100(9): 5057–62.
- Sage, Evelyne, and Lynn Harrison. 2011. "Clustered DNA Lesion Repair in Eukaryotes: Relevance to Mutagenesis and Cell Survival." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711(1–2): 123–33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- Sauer, Hansjörg. 1999. "Tumorzentrum Munchen: Erstellung Und Verbreitung von Empfehlungen Zur Diagnostik, Therapie Und Nachsorge." *Zentralblatt fur Gynakologie*.
- Schettino, Giuseppe, Melvyn Folkard, Barry D. Michael, and Kevin M. Prise. 2005. "Low-Dose Binary Behavior of Bystander Cell Killing after Microbeam Irradiation of a Single Cell with Focused C K X Rays ." *Radiation Research*.
- Schofield, R. 1978. "The Relationship between the Spleen Colony-Forming Cell and the Haemopoietic Stem Cell. A Hypothesis." *Blood Cells*.
- Sedelnikova, Olga A et al. 2004. "Senescing Human Cells and Ageing Mice Accumulate DNA Lesions with Unrepairable Double-Strand Breaks." 6(2): 168–71.

- Shah, Khalid. 2012. "Mesenchymal Stem Cells Engineered for Cancer Therapy." *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- Shahriyari, Leili, and Natalia L. Komarova. 2013. "Symmetric vs. Asymmetric Stem Cell Divisions: An Adaptation against Cancer?" *PloS one*.
- Song, No Joon et al. 2016. "Small Molecule-Induced Complement Factor D (Adipsin) Promotes Lipid Accumulation and Adipocyte Differentiation." *PLoS ONE*.
- Strioga, Marius et al. 2012. "Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells." *Stem Cells and Development* 21: 2724–52.
- Strong, Amy L., Jeffrey M. Gimble, and Bruce A. Bunnell. 2015. "Analysis of the Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines Secreted by Adult Stem Cells during Differentiation." *Stem Cells International* 2015: 1–12.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell*.
- THOMAS, E. D., H. L. LOCHTE, W. C. LU, and J. W. FERREBEE. 1957. "Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy." *The New England journal of medicine*.
- Thomson, James A. 1998. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science* 282(5391): 1145–47.
- Traktuev, Dmitry O. et al. 2008. "A Population of Multipotent CD34-Positive Adipose Stromal Cells Share Pericyte and Mesenchymal Surface Markers, Reside in a Periendothelial Location, and Stabilize Endothelial Networks." *Circulation Research*.
- Traktuev, Dmitry O. et al. 2009. "Robust Functional Vascular Network Formation in Vivo by Cooperation of Adipose Progenitor and Endothelial Cells." *Circulation Research*.
- Tran, Khanh Van et al. 2012. "The Vascular Endothelium of the Adipose Tissue Gives Rise to Both White and Brown Fat Cells." *Cell Metabolism*.
- Tremolada, Carlo, Giancarlo Palmieri, and Camillo Ricordi. 2010. "Adipocyte Transplantation and Stem Cells: Plastic Surgery Meets Regenerative Medicine." *Cell Transplantation* 19(10): 1217–23.
- Trichopoulos, Dimitrios, Brian Macmahon, and Philip Cole. 1972. "Menopause and Breast Cancer Risk." *Journal of the National Cancer Institute* 48(3): 605–13.
- Trivanović, Drenka et al. 2016. "Inflammatory Cytokines Prime Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells to Enhance Malignancy of MCF-7 Breast Cancer Cells via Transforming Growth Factor-B1." *IUBMB Life* 68(3): 190–200.
- Truong, Katelyn et al. 2018. "The Effect of Well-Characterized, Very Low-Dose x-Ray Radiation on Fibroblasts." *PloS one* 13(1): e0190330. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29300773>.
- De Ugarte, Daniel a. et al. 2003. "Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow." *Cells Tissues Organs* 174(3): 101–9.
- Wang, Yuan et al. 2017. "Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell-Secreted CXCL1 and CXCL8 Facilitate Breast Tumor Growth By Promoting Angiogenesis." *Stem Cells*.
- Wasik, Agata M. et al. 2014. "Reprogramming and Carcinogenesis-Parallels and Distinctions." In *International Review of Cell and Molecular Biology*.
- Watt, Fiona M., and Brigid L.M. Hogan. 2000. "Out of Eden: Stem Cells and Their Niches." *Science* 287(5457): 1427–30.
- De Wert, Guido, and Christine Mummery. 2003. "Human Embryonic Stem Cells: Research, Ethics and Policy." *Human Reproduction*.
- Wu, Lingyun et al. 2019. "The Therapeutic Potential of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells to Enhance Radiotherapy Effects on Hepatocellular Carcinoma." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7(November): 1–16.
- Zakrzewski, Wojciech, Maciej Dobrzyński, Maria Szymonowicz, and Zbigniew Rybak. 2019.

- “Stem Cells: Past, Present, and Future.” *Stem Cell Research & Therapy* 10(1): 68.
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/ieejfms/128.329?from=CrossRef>.
- Zannettino, A. C.W. et al. 2008. “Multipotential Human Adipose-Derived Stromal Stem Cells Exhibit a Perivascular Phenotype in Vitro and in Vivo.” *Journal of Cellular Physiology*.
- Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts. 2019. *Krebs in Deutschland: 3.17 Brustdrüse*.
- Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. 2016. “Bericht Zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.” : 274.
- Zimmerlin, Ludovic et al. 2011. “Regenerative Therapy and Cancer: In Vitro and in Vivo Studies of the Interaction between Adipose-Derived Stem Cells and Breast Cancer Cells from Clinical Isolates.” *Tissue Engineering - Part A*.
- Zuk, P. A. et al. 2001. “Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies.” In *Tissue Engineering*,.
- Zuk, Patricia A. et al. 2002. “Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent.” *Molecular Biology of the Cell*.
- Zwicker, Felix et al. 2019. “Breast Cancer Occurrence after Low Dose Radiotherapy of Non-Malignant Disorders of the Shoulder.” *Scientific Reports* 9(1): 1–8.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Bei Prof. Hildebrandt und Frau Dr. Manda möchte ich mich für die freundliche und intensive Betreuung während der Dissertation bedanken.

Mein Dank gilt im Weiteren dem gesamten Laborteam für die stets freundliche Hilfsbereitschaft, die mir entgegen gebracht wurde. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Schröder für die Bereitschaft, diese Promotion als universitärer Betreuer der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu begleiten.

Und schließlich gebühren besonderer Dank Anke Baaße und Alexander Schröder, ohne deren persönliche Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihr habt mir stets den Rücken frei gehalten. Ebenso möchte ich mich bei meinen Schwestern bedanken, die mich nicht nur während der Promotion, sondern während meines gesamten Studiums tatkräftig unterstützt und ermutigt haben.

Förderung

Die Projekte und Publikationen dieser Doktorarbeit wurden im Folgenden unterstützt und gefördert:

- Durch die Sachmittelförderung (02/17 – 05/17) und Finanzierung einer Studentischen Hilfskraft (11/17 – 12/17) im Rahmen des Professorinnenprogramms I und II der Universität Rostock
- Durch Fördermittel der B. Braun-Stiftung im Rahmen des Projektes: „Effekt der Bestrahlung auf das regenerative Potenzial von adipose derived stem cells innerhalb neovaskulärer Prozesse hypoxischer Eigenfett-Transplantate“ unterstützt (04/18 – 10/19).
- Durch Fördermittel der Universitätsmedizin Rostock über das FORUN-Programm 2017 (01/17 – 12/17) und 2019 (01/19 – 12/19)

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführte Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sowie alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte beruhen, als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, den 14. Juli 2020

Annemarie Schröder, MSc

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Baaße, A., Juerß, D., Reape, E. *et al.* Promoting effects of adipose-derived stem cells on breast cancer cells are reversed by radiation therapy. *Cytotechnology* 70, 701–711 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0172-6>

Baaße, A.; Machoy, F.; Juerß, D.; Baake, J.; Stang, F.; Reimer, T.; Krapohl, B.; Hildebrandt, G. Radiation Sensitivity of Adipose-Derived Stem Cells Isolated from Breast Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1988, doi:10.3390/ijms19071988.

Schröder, A.; Kriesen, S.; Hildebrandt, G.; Manda, K. First Insights into the Effect of Low-Dose X-Ray Irradiation in Adipose-Derived Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 6075.

Kongressbeiträge

Baaße, A., Buttler, D., Reape, E., Hildebrandt G. and Manda K.: Radiation-induced bystander effects of adipose-derived stem cells on human breast cancer cells (GBS) 2016, Erlangen, Sept 26.-28.2016, Abstract Book, p. 87 (2016)

Baaße, A., Machoy, F., Juerß, D., Reape, E., Manda, K., Hildebrandt, G.: Radiation response of adipose-derived stem cells isolated from the female breast with Specials emphasis on interactions with breast cancer cells. 51st Miami Winter Symposium, Stem Cells: Today's Research Tomorrow's Therapies, Jan 28.-31.2018

Baaße, A., Machoy, F., Juerß, D., Reape, E., Hildebrandt, G., Manda, K.: Untersuchung der Strahlenwirkung auf humane Adipose-derived stem cells aus der Brust und deren Einfluss auf Brustkrebszellen. 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Juni 21.-24.2018

Baaße, A., Hildebrandt, G., Manda, K.: Adipose-derived stem cells as vehicle for Epothilone B. 6th Annual GSCN Conference, Sept 19.-21. 2018

CURRICULUM VITAE

Annemarie Schröder, geb. Baaße**PERSÖNLICHE DATEN**

Geburtsdatum: 09.11.1989
Kind(er): Tochter, geboren am 17.05.2014
Adresse: Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie,
Labor für Strahlenbiologie, Südring 75, 18059 Rostock
Kontakt: annemarie.baasse2@uni-rostock.de
0381 - 494 9112

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

- seit 01/2016 Promotion im Strahlenbiologischen Labor der Klinik für Strahlentherapie, Rostock, Thema: „*In-vitro*-Analyse zur Wirkung ionisierender Strahlung auf *Adipose-derived stem cells* der weiblichen Brust“
- seit 05/2015 **Medizinisch-Technische Angestellte im Strahlenbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Rostock**
Aufgabenbereich: - Analyse von Patientenmaterial (kleines Blutbild)
- Isolation von Primärzellen aus Mammareduktionsgewebe
- Routinearbeiten in der Zellkultur
- Geräteverantwortlichkeiten (Durchflusszytometer, Tiefkühlschränke, Datenmanagement, Zellzählgerät)
- 03/2013 - 02/2014 **Wissenschaftliche Hilfskraft an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Strahlenbiologisches Labor, Rostock**
Aufgabenbereich: - Durchführung strahlenbiologischer Standardmethoden (u.a. Koloniebildungs- und Zytotoxizitätstest)
- Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der Wirkung von niedrig dosierter Strahlung auf Normalgewebszellen
- 07/2012 - 08/2012 **Wissenschaftliche Hilfskraft bei der Cytocentrics Bioscience GmbH, Rostock**
Aufgabenbereich: - Mitarbeit beim Screening von Zellen im Labor am MPC sowie am Cytopatch
- Erstellung von Datenblättern
- Erstellung von Wachstumskurven
- 10/2011 - 06/2012 **Studentische Hilfskraft bei der Patent- und Verwertungsagentur (PVA) M-V AG, Rostock**
Aufgabenbereich: - Erstellung von Voten zur Patentierbarkeit und zum wirtschaftlichen Potenzial von Erfindungen
- Durchführung von Schutzrechts-, Technologie- und Marktrecherchen

- 04/2011 - 07/2011 **Studentische Hilfskraft am FBN Dummerstorf im Fachbereich Verhaltensphysiologie, Dummerstorf**
 Aufgabenbereich: - Durchführung von Verhaltenstests (z.Bsp.: Backtest)
 - Assistenz bei der Entnahme von Gewebeprobe aus dem Gehirn
 sowie
 06/2010 - 11/2010
 - Systematische Auswertung von Videos (z.Bsp. Verhaltenstests, Dominanzbeobachtung)
 - Bearbeitung physiologischer Daten (telemetrische EKG-Daten)

STUDIUM

- 10/2013 - 04/2015 Masterstudium Diversität und Evolution mit der Spezialisierung Zoologie / Entwicklungsgenetik
 Externe Masterarbeit im Strahlenbiologischen Labor der Klinik für Strahlentherapie Rostock zum Thema: „Einfluss von Adipose-derived cells auf die Strahlenantwort von MCF-7 Brustkrebszellen“
- 10/2008 - 03/2012 Studium der Biowissenschaften (B.Sc.) an der Universität Rostock
 Externe Bachelor-Arbeit am Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf zum Thema: „Verhaltensphysiologische Konsequenzen aktiver und passiver Copingstrategien beim juvenilen Schwein“

LEHRTÄTIGKEITEN

- SS 2019 Medizinische Fakultät der Universität Rostock, QB11: Bildgebende Verfahren, Strahlenbehandlung, Strahlenschutz: Leitung des Praktikums, Station 4: Vorstellung der Forschungsschwerpunkte des Strahlenbiologischen Labores (1SWS)
- SS 2018 Medizinische Fakultät der Universität Rostock, QB11: Bildgebende Verfahren, Strahlenbehandlung, Strahlenschutz: Leitung des Praktikums, Station 4: Vorstellung der Forschungsschwerpunkte des Strahlenbiologischen Labores (1SWS)
- SS 2017 Medizinische Fakultät der Universität Rostock, QB11: Bildgebende Verfahren, Strahlenbehandlung, Strahlenschutz: Leitung des Praktikums, Station 3: Experimentelle Untersuchungen in der Strahlentherapie (1SWS)
- SS 2016 Medizinische Fakultät der Universität Rostock, QB11: Bildgebende Verfahren, Strahlenbehandlung, Strahlenschutz: Leitung des Praktikums, Station 4: Quantitative Real-Time PCR und Durchflusszytometrie (1SWS)
- SS 2015 Medizinische Fakultät der Universität Rostock, QB11: Bildgebende Verfahren, Strahlenbehandlung, Strahlenschutz: Vertretung der Vorlesung Strahlenbiologie Grundlagen; Leitung des Praktikums, Station 4

WEITERE TÄTIGKEITEN UND WEITERBILDUNGEN

- Teilnahme am Mentorenprogramm für Doktoranden der Universität Rostock
- Teilnahme an „Einführung in die Kollegiale Beratung und in das Peer-Mentoring“ (Juli, 2017)
- Teilnahme am Seminar „Kommunikation & Konflikt“, Referentin: Dr. Dieta Kuchenbrandt (April, 2018)
- Teilnahme am Qualifizierungskurs der Graduiertenakademie "Grundlagen Betriebswirtschaft in Finanzen und Controlling für Wissenschaftler*innen" (Juni, 2018)
- Qualifizierungskurs der Graduiertenakademie „Career Development through Research Funding“, Referent: Dr. Beate Scholz (Juni, 2018)
- Qualifizierungskurs der Graduiertenakademie "Datenmanagement in der Wissenschaft", Referenten: Dr. Dagmar Waltemath, Dr. Frank Krüger und Andreas Budig (Juli, 2018)

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

a) Arbeiten, die in Publikationsorganen mit einer wissenschaftlichen Qualitätssicherung zum Zeitpunkt der Antragstellung erschienen oder endgültig angenommen sind

- **Baaße, A.,** Buttler, D., Reape, E., Hildebrandt G. and Manda K.: How promoting effects of adipose-derived stem cells are reversed by radiation therapy. *Cytotechnology* (2017). <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0172-6>
- **Baaße, A.;** Machoy, F.; Juerß, D.; Baake, J.; Stang, F.; Reimer, T.; Krapohl, B.; Hildebrandt, G. Radiation Sensitivity of Adipose-Derived Stem Cells Isolated from Breast Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, 1988, doi:10.3390/ijms19071988.
- **Schröder, A.;** Kriesen, S.; Hildebrandt, G.; Manda, K. First Insights into the Effect of Low-Dose X-Ray Irradiation in Adipose-Derived Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 6075.

b) Andere Veröffentlichungen

Poster:

- **Baaße, A.,** Buttler, D., Reape, E., Hildebrandt G. and Manda K.: Radiation-induced bystander effects of adipose-derived stem cells on human breast cancer cells (GBS) **2016**, Erlangen, Sept 26.-28.2016, Abstract Book, p. 87 (2016)
- **Baaße, A.,** Machoy, F., Juerß, D., Reape, E., Manda, K., Hildebrandt, G.: Radiation response of adipose-derived stem cells isolated from the female breast with Specials emphasis on interactions with breast cancer cells. 51st Miami Winter Symposium, Stem Cells: Today's Research Tomorrow's Therapies, Jan 28.-31.2018
- **Baaße, A.,** Machoy, F., Juerß, D., Reape, E., Hildebrandt, G., Manda, K.: Untersuchung der Strahlenwirkung auf humane Adipose-derived stem cells aus der Brust und deren Einfluss auf Brustkrebszellen. 24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, Juni 21.-24.2018

VORTRÄGE

- 19.10.2016 – Ärztliche Weiterbildung der UMR in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie

Titel: Bedeutung von Fettstammzellen in der Strahlenantwort von MCF-7 Brustkrebszellen

BISHERIGE FÖRDERUNGEN

- Sachmittelförderung durch das Professorinnenprogramm der Universität Rostock im Umfang von 1.000 Euro (02/17 – 05/17)
- Förderung durch das Professorinnenprogramm II, Förderlinie SHK-Fonds durch Finanzierung einer Studentischen Hilfskraft
- Forschungsförderung der Universitätsmedizin Rostock über das FORUN-Programm 2017 im Umfang von 13.850 Euro (01/17 – 12/17)
- Reisestipendium vom GermanStemCellNetwork zur Teilnahme am "51st Miami Winter Symposium: Stem Cells –Today's Research Tomorrow's Therapies"
- Forschungsförderung der Universitätsmedizin Rostock über das FORUN-Programm 2019 im Umfang von 17.830 Euro (01/19 – 12/19)
- Young Investigator Award der European Radiation Research Society (ERRS), Juni 2020

DRITTMITTELEINWERBUNG

- Förderung der B. Braun Stiftung für das Projekt „Untersuchung zum Effekt der Bestrahlung auf das regenerative Potenzial von adipose derived stem cells innerhalb neovaskulärer Prozesse hypoxischer Eigenfett-Transplantate" (Förderkennzeichen: BBST-D-18-00030) im Rahmen einer Sachmittelförderung von 25.000 Euro (04/18 – 10/19)

MITGLIEDSCHAFTEN

- Graduiertenakademie der Universität Rostock
- Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. (GBS)
- German Stem Cell Network (GSCN)
- Junge DEGRO (Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie e.V.)
- European Radiation Research Society (ERRS)

GUTACHTERTÄTIGKEITEN

- Ad hoc Reviewer für wissenschaftliche Fachzeitschriften:
Stem Cells (Wiley), Oncotarget, Journal of Stem Cell Research and Medicine,
Materials (MDPI), Journal of Clinical Medicine (MDPI), Genes (MDPI)
Referenz: www.publons.com, Profil: a1212347
- Abstract-Begutachtung für 25. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie, e.V.

Annemarie Schröder, M. Sc.

Rostock, 14.07.2020