

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,
plastische und ästhetische Operationen
der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen

**Veränderungen von mesenchymalen Stammzellen des Fettgewebes
auf DNA- und Chromatidebene während ihrer Expansion in vitro**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Johannes Andreas Mickler
aus Schwäbisch Hall

Würzburg, Februar 2015

Referent: Univ.-Professor Dr. med. Norbert Kleinsasser MHBA

Korreferent: Univ.-Professor Dr. rer. nat. Albrecht Müller

Dekan: Univ.-Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2015

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Stammzellen und ihre Bedeutung für das Tissue Engineering	1
1.1.1	Adulte mesenchymale Stammzellen	4
1.1.2	Fettgewebstammzellen in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde	6
1.1.3	Stabilität von adulten mesenchymalen Stammzellen	8
1.2	Zellzyklus	9
1.3	Chromosomen	11
1.4	DNA-Schädigung	12
1.5	Karzinogenese	13
1.6	Ziele der Arbeit	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Materialien und Geräte	18
2.1.1	Verwendete Zellen	18
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3	Laborgeräte	20
2.2	Versuchsaufbau	21
2.3	Zellkultur	21
2.3.1	Isolierung humaner Fettgewebstammzellen	21
2.3.2	Expansion und Passagierung	24

2.4 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmungen	26
2.5 Comet Assay	27
2.5.1 Grundlagen	27
2.5.2 Puffer und Lösungen	28
2.5.3 Durchführung	29
2.5.4 Auswertung	31
2.6 Chromosomenaberrationstest	32
2.6.1 Allgemeines	32
2.6.2 Puffer und Lösungen	33
2.6.3 Durchführung	34
2.6.4 Auswertung	35
2.7 Mikrokerntest	36
2.7.1 Grundlagen	36
2.7.2 Puffer und Lösungen	37
2.7.3 Etablierung des Tests mit Fettgewebstammzellen	38
2.7.4 Durchführung	39
2.7.5 Auswertung	39
2.8 Statistische Testverfahren	40
3. Ergebnisse	43
3.1 Comet Assay	44
3.2 Chromosomenaberrationstest	45
3.3 Mikrokerntest	50
3.3.1 Vorversuche	50

3.3.2 Hauptversuche	51
---------------------	----

4. Diskussion 52

4.1 Diskussion der Methodik 53

4.1.1 Comet Assay	53
-------------------	----

4.1.2 Chromosomenaberrationstest	54
----------------------------------	----

4.1.3 Mikrokerntest	55
---------------------	----

4.1.4 Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Testverfahren	60
--	----

4.2 Mehr Sicherheit durch weiterführende Untersuchungen 65

4.3 Einfluss des Kultivierungsmediums 66

4.4 Alternativen zum Einsatz von Fettgewebstammzellen 68

5. Zusammenfassung 71

6. Anhang 73

6.1 Abkürzungsverzeichnis 73

6.2 Tabellen 74

6.3 Literaturverzeichnis 79

6.4 Publikation und Kongressbeiträge aus der vorliegenden Arbeit 88

1. Einleitung

1.1 Stammzellen und ihre Bedeutung für das Tissue Engineering

Wie am Beispiel einer Fraktur, einer Schnittwunde oder einer Entzündung deutlich wird, besitzt der menschliche Organismus die Fähigkeit, untergegangenes Gewebe zu regenerieren, sei es vollständig (Restitutio ad integrum) oder auch nur teilweise (Defektheilung). Ist die Läsion jedoch zu groß oder die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen defizient, so sind die regenerativen Kapazitäten nicht ausreichend oder durch externe Faktoren wie Sauerstoff- und Nährstoffmangel limitiert. Dies führt zu einem Untergang des betroffenen Gewebes und im schlimmsten Fall des gesamten Organismus. (Alpert et al. 2000). Beispiele hierfür sind die Leberzirrhose, das akute Koronarsyndrom oder der Apoplex.

Inzwischen steht der Medizin eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung, einen Untergang von Gewebe zu verhindern oder Gewebe zu regenerieren. Im Falle eines akuten Koronarsyndroms beispielsweise kann mit Hilfe einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des betroffenen Myokardareals wieder hergestellt werden. Sind ganze Organe so schwer geschädigt, dass der Körper sie aus eigener Kraft nicht mehr regenerieren kann, so ist es durch medikamentöse Immunsuppression möglich, Organe eines Fremdspenders zu transplantieren (Song et al. 2014).

Trotz all dieser Fortschritte gibt es immer noch viele Fälle, in denen Gewebeverluste nicht suffizient behandelt werden können. Beispiele hierfür sind untergegangenes Myokardgewebe nach einem Herzinfarkt, degenerative Prozesse im Bereich der Gelenkknorpel oder der Ersatz von neuronalem Gewebe. Im Bereich der Organtransplantationen ist der Mangel an transplantationsfähigen Organen weltweit ein großes Problem, das vielen

Menschen auf der Warteliste das Leben kostet (Eurotransplant, Annual Report 2013).

Der möglicherweise entscheidende Lösungsansatz für diese Probleme ist die Erzeugung von Gewebe *in vitro* (Tissue Engineering). Ziel des Tissue Engineering ist die Herstellung von humanen Geweben oder Organen, welche danach einem Patienten transplantiert werden können. Klassischerweise werden zu diesem Zweck Zellen des jeweiligen Zielgewebes entnommen, *in vitro* expandiert und auf ein Trägergerüst aus synthetischen oder biologischen Materialien aufgebracht (siehe Abbildung 1). Die daraus entstehenden Konstrukte können dann dem Patienten implantiert werden und ersetzen auf diese Weise untergegangenes Gewebe (Gomes und Reis 2004).

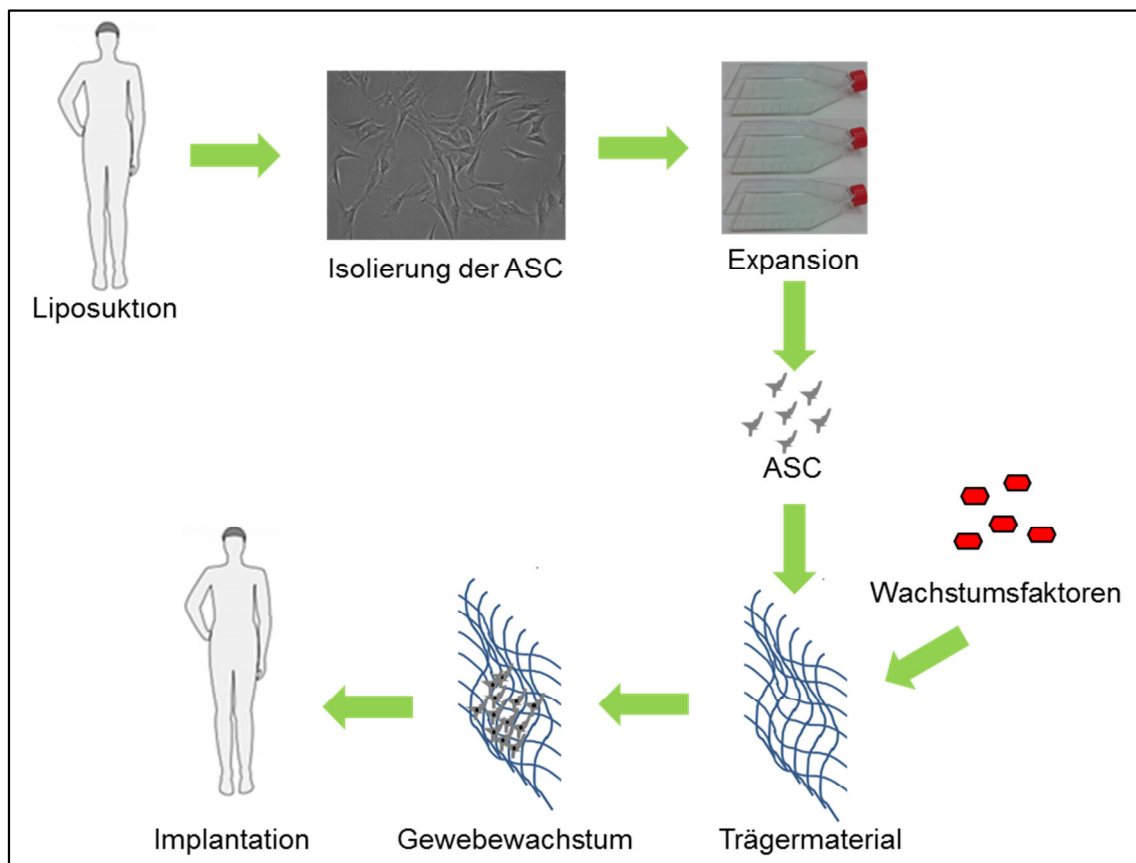


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Vorgänge beim Tissue Engineering mit Stammzellen aus Fettgewebe (adipose-derived stem/stromal cells, ASC). Die durch Liposuktion gewonnenen Zellen werden nach Expansion *in vitro* auf ein Trägermaterial aufgebracht. Durch Inkubation in einer Nährlösung mit bestimmten Wachstumsfaktoren entsteht ein dreidimensionales Gewebestück, welches implantiert werden kann.

In der Praxis treten hierbei vielfältige Herausforderungen auf, die es zu untersuchen bzw. zu lösen gilt. Neben der Wahl des besten Trägermaterials, der idealen Zelldichte, der Frage der richtigen Kulturbedingungen etc. sind vor allem die eingesetzten Zellen selbst von entscheidender Bedeutung für den Erfolg bei der Gewebeherstellung. Ein Ansatz hierbei ist die Entnahme einer Probe des zu ersetzenden Gewebes (z. B. Knorpelgewebe), die Isolation und Kultivierung der darin enthaltenen Zellen *in vitro* und die danach folgende Reimplantation dieser Zellen, evtl. nach Einbringen in ein Trägermaterial. Limitierend für diesen Ansatz ist jedoch neben der Morbidität bei der Entnahme bestimmter Gewebe die Schwierigkeit, spezifische Zellen in ausreichender Menge *in vitro* zu expandieren. Aus diesem Grund sind Stammzellen in den Fokus der regenerativen Medizin gerückt (Olson et al. 2011).

Als Stammzellen werden im Allgemeinen Zellen bezeichnet, die keinen oder nur einen geringen Differenzierungsgrad aufweisen und zur unbegrenzten Selbsterneuerung durch asymmetrische Teilung in der Lage sind. Der Begriff der asymmetrischen Teilung bezeichnet hierbei die Fähigkeit, durch Mitose Tochterzellen zu generieren, die entweder ebenfalls Stammzelleigenschaften besitzen oder zu spezialisierten Zellen ausdifferenzieren (Kolios und Moodley 2013).

Hinsichtlich der Fähigkeit, Zellarten unterschiedlicher Keimblätter zu generieren, kann unterschieden werden zwischen totipotenten, pluripotenten und multipotenten Stammzellen. Totipotente Stammzellen können Zellen aller drei Keimblätter sowie extraembryonales Gewebe hervorbringen und sind somit in der Lage, einen gesamten Organismus zu bilden. Pluripotente Stammzellen können noch zu Zellen aller drei Keimblätter ausdifferenzieren, jedoch nicht mehr zu extraembryonalem Gewebe. Multipotente Stammzellen sind Progenitorzellen bestimmter Gewebearten wie z. B. Haut, Knorpel oder Knochenmark und generieren unter natürlichen Bedingungen keine Zellen fremder Gewebetypen (Kolios und Moodley 2013).

Bezüglich des Zeitpunktes ihres Auftretens während der Entwicklung des Organismus können Stammzellen in embryonale und postnatale bzw. adulte

Stammzellen unterteilt werden. Während in der pränatalen Phase der Entwicklung noch toti- oder pluripotente Stammzellen vorhanden sind, aus denen Plazentagewebe und der Embryo hervorgehen, finden sich postnatal überwiegend multipotente adulte Stammzellen, wie zum Beispiel hämatopoetische Stammzellen, deren Aufgabe die Regeneration von untergegangenen Zellen oder Geweben ist (National Research Council (US) 2002). Für das Tissue Engineering können prinzipiell sowohl embryonale als auch adulte Stammzellen verwendet werden, wobei der Einsatz von embryonalen Stammzellen durch die begrenzte Verfügbarkeit und nicht zuletzt auch durch ethische Bedenken limitiert ist (Czyz et al. 2003).

1.1.1 Adulte mesenchymale Stammzellen

Keinerlei ethische Bedenken bestehen hinsichtlich der Verwendung adulter mesenchymaler Stammzellen (Liras 2010). Aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit sind vor allem adulte mesenchymale Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark und aus Fettgewebe von Bedeutung für das Tissue Engineering und die regenerative Medizin. Durch Knochenmarkspunktionen und Liposuktionen können diese Stammzellen relativ leicht und in großer Zahl gewonnen werden (Strem et al. 2005). Die „International Society for Cellular Therapy“ (ISCT) definiert adulte mesenchymale Stammzellen nach folgenden Kriterien (Dominici et al. 2006):

- 1) Plastikadhärenz.
- 2) Expression der Oberflächenproteine CD73 (Cluster of Differentiation 73), CD90 und CD105 und keine Expression der Oberflächenmarker CD14 oder CD11b, CD19 oder CD79 α , CD34, CD45 und HLA-DR (Human Leukocyte Antigen-DR).
- 3) Fähigkeit zur Differenzierung *in vitro* in Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten.

Diese Kriterien sind minimale Kriterien. Inzwischen ist es auch gelungen, MSC zur Differenzierung in weitere Zelllinien wie Kardiomyozyten und neuronale Zellen bzw. Vorläuferzellen anzuregen (Lazennec und Jorgensen 2008).

Die adulten mesenchymalen Stammzellen des Fettgewebes (adipose-derived stem/stromal cells, Fettgewebstammzellen, ASC, siehe Abbildung 2) wurden erstmals 2001 von Zuk et al. beschrieben (Zuk et al. 2001). In einem gemeinsamen Positionspapier der „International Federation for Adipose Therapeutics and Science“ (IFATS) und der ISCT werden neben den oben angeführten weitere Merkmale genannt, welche eine genauere Phänotypisierung der ASC und insbesondere auch eine Abgrenzung gegenüber den mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks ermöglichen. Demnach sind ASC zu über 80% positiv für CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105 und zu über 98% negativ für CD31, CD45 und CD235a. Im Gegensatz zu MSC des Knochenmarks exprimieren ASC CD36 und zeigen keine Expression von CD106 (Bourin et al. 2013).

ASC erfüllen viele ideale Voraussetzungen für den Einsatz in Klinik und Forschung. Sie finden sich in großer Zahl im Fettgewebe (ca. 1×10^6 / 200ml Fett) (Zhu et al. 2008), welches bei Liposuktionen gewonnen wird. Die Anzahl dieser Operationen steigt als Folge der Zunahme an adipösen Menschen stetig an (Gesellschaft für ästhetische Chirurgie in Deutschland 2011).

Somit stehen Liposuktionsmaterial

als Ausgangspunkt für die Gewinnung von ASC und damit auch die ASC selbst in großen Mengen zur Verfügung. Im Vergleich zu mesenchymalen Knochenmarksstammzellen ist die Gewinnung von ASC mit einer geringeren Hebedefektmorbidität und deutlich höheren Ausbeute verbunden (Strem et al. 2005). Nach der Isolierung aus Liposuktionsmaterial lassen sich die ASC relativ einfach und zuverlässig kultivieren. Durch Zugabe von definierten Wachstumsfaktoren und Zytokinen ist es möglich, sie zur Differenzierung in

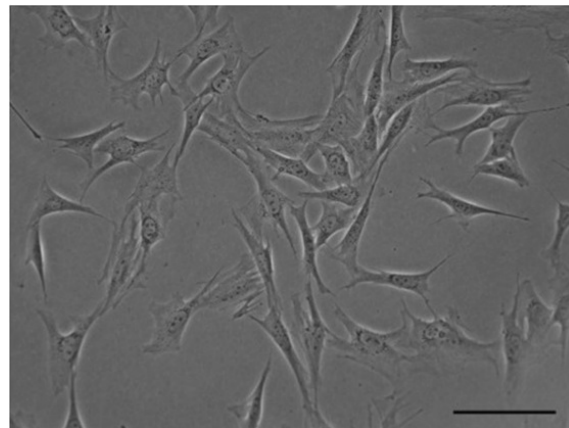


Abbildung 2: Plastik-adhärenente ASC der Passage 2 mit typischem spindelförmigen, fibroblastenartigen Phänotyp. 200-fache Vergrößerung; Schwarzer Balken = 100 μ m (Froelich et al. 2013)

mesodermales Gewebe wie Knochen, Knorpel und Muskeln oder neuronales (ektodermales) Gewebe anzuregen (Zuk et al. 2002). Neben meso- und ektodermalem Gewebe wurde bereits auch die Differenzierung in endodermales Gewebe wie z. B. Hepatozyten beschrieben, sodass die ASC inzwischen sogar als pluripotent betrachtet werden können (Zuk 2010).

Des Weiteren sezernieren ASC eine große Zahl verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren wie z. B. EGF (Endothelial Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) oder TNF- α (Tumornekrosefaktor α) (Tobita et al. 2011). Diese Eigenschaft scheint beispielsweise im Rahmen einer therapeutischen Applikation mesenchymaler Stammzellen nach Myokardinfarkt der wichtigste Wirkmechanismus zu sein, wobei insbesondere die pro-angiogenen Signalmoleküle von großer Bedeutung sind (Doppler et al. 2013). Die potentiellen Verwendungsmöglichkeiten für diese Zellen sind daher mannigfaltig und reichen vom Tissue Engineering über die Diabetestherapie, die Therapie des Morbus Crohn und der koronaren Herzerkrankung bis hin zur Behandlung von Harninkontinenz und erektiler Dysfunktion (Zuk 2010).

1.1.2 Fettgewebstammzellen in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Auch in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde gibt es Krankheitsbilder, die bisher nur unzureichend therapiert werden können, wie zum Beispiel der Verlust des olfaktorischen Epithels, Stimmlippenvernarbungen oder die Regeneration von durch Bestrahlung geschädigten Speicheldrüsen. Stammzellbasierte Verfahren könnten hierfür neue Lösungsansätze bieten. Kim et al. konnten beispielsweise im Tiermodell zeigen, dass sich die systemische Applikation von ASC positiv auf die Regeneration von zerstörtem olfaktorischem Epithel auswirkt (Kim et al. 2009).

Auch bei Stimmlippenvernarbungen, laryngealer Hemiplegie oder anatomischen Defekten wie dem Sulcus vocalis (siehe Abbildung 3) bietet die Anwendung von ASC neue Möglichkeiten. Ein Therapieansatz bei diesen Krankheitsbildern ist die Lipoinjektion (Cantarella et al. 2011). Diese führt hierbei hauptsächlich zu einer Stimmlippenaugmentation, verhindert an sich jedoch nicht den Verlust der viskoelastischen Eigenschaften der Lamina propria.

Diesem entscheidenden Pathomechanismus der Stimmlippenvernarbung versucht man mit einem äußerst erfolgversprechenden neuen Ansatz zu begegnen: Durch die Injektion von ASC anstelle von Fett in die Lamina propria der Stimmlippen kam es im Tiermodell zu einer verbesserten Wundheilung mit reduzierter Kollagenbildung und

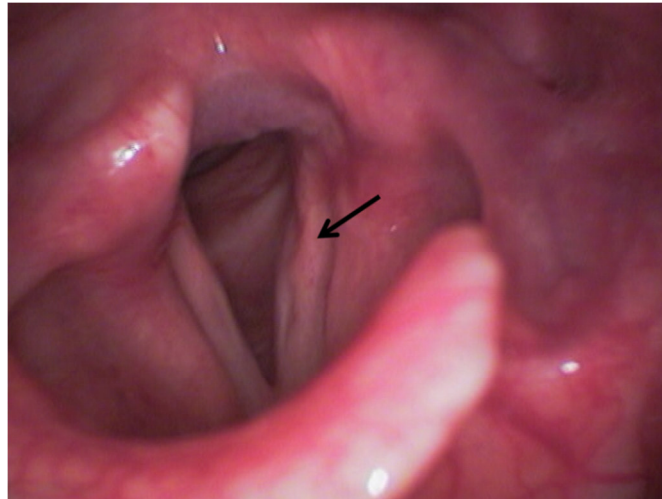


Abbildung 3: Sulcus vocalis (Pfeil). Polyätiologisches Krankheitsbild, bei welchem durch eine Atrophie der Lamina propria die physiologische Stimmlippen-schwingung beeinträchtigt ist.

Atrophie (Hong et al. 2011). Auch Lee et al. konnten an Hunden zeigen, dass ASC-Injektionen zur Prävention von Stimmlippenvernarbungen beitragen können (Lee et al. 2006). Die beschriebene wundheilungsfördernde und antifibrotische Wirkung der ASC ist mutmaßlich durch die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise dem Hepatozyten-Wachstumsfaktor („hepatocyte growth factor“, HGF) bedingt. So konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass die alleinige Injektion von HGF eine deutliche Reduktion der posttraumatischen Kollagenbildung und somit der Narbenbildung bewirken kann (Hirano et al. 2004).

Ein anderer Ansatz ist die Herstellung einer kompletten Stimmlippe *in vitro*. Long et al. stellten zu diesem Zweck aus einer Fibrin-ASC-Mischung ein dreidimensionales Konstrukt her. Dieses wurde in mit EGF angereichertem Nährmedium eingebettet, wobei die apikale Zellschicht nicht überdeckt war und somit Kontakt mit der Umgebungsluft hatte. Durch diese Versuchsanordnung differenzierten die ASC in unterschiedliche Zelllinien und es konnte ein dem Aufbau der Stimmlippe ähnelndes Konstrukt hergestellt werden, welches an der apikalen Oberfläche Epithelzellen und in den tieferen Schichten mesenchymale Zellen aufwies (Long et al. 2010). Ergebnisse der funktionellen Testung dieser

Konstrukte lassen den Schluss zu, dass es in nicht allzu ferner Zukunft möglich sein könnte, eine funktionierende Stimmlippe *in vitro* herzustellen (Long et al. 2010).

Auch für eine weitere, bisher unzureichend therapierbare Erkrankung könnte die lokale und systemische Applikation von ASC eine zukünftige Therapieoption darstellen. Als Folge einer Bestrahlung von Tumoren am Kopf und Hals kann es zu einer Schädigung der Kopfspeicheldrüsen mit konsekutiver Xerostomie kommen. Im Mausmodell konnten bereits die positiven Auswirkungen einer ASC-Gabe auf die Regeneration von bestrahlten Speicheldrüsen nachgewiesen werden (Kojima et al. 2011).

Wie aus diesen Beispielen ersichtlich wird, bieten stammzellbasierte Therapien auch in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde ein nicht zu unterschätzendes Potential an neuen Möglichkeiten in der Behandlung bislang nur unzureichend therapierbarer Erkrankungen.

1.1.3 Stabilität von adulten mesenchymalen Stammzellen

Hinsichtlich der genetischen Stabilität mesenchymaler Stammzellen divergieren die bisherigen Forschungsergebnisse. Einige Daten deuten auf eine gleichbleibend hohe genetische Stabilität über einen langen Kultivierungszeitraum hin (Grimes et al. 2009). In einer weiteren Arbeit zeigte sich darüber hinaus eine fehlende Telomeraseaktivität, welche regelhaft bei malignen Zellen beobachtet werden kann (Bernardo et al. 2007). Meza-Zepeda et al. deckten zwar chromosomale Aberrationen in frühen Passagen von humanen ASC auf, sahen sie aber als vernachlässigbar an, da die überwiegende Zahl der von ihnen verwendeten Zelllinien eine hohe genetische Stabilität aufwies (Meza-Zepeda et al. 2008).

Andere Ergebnisse wiederum weisen auf eine genetische Instabilität hin. In einer Arbeit von Bochkov et al. traten bereits in frühen Passagen von humanen ASC Aneuploidien (Monosomien und Trisomien) auf (Bochkov et al. 2007). Solche quantitativen Veränderungen innerhalb des Chromosomensatzes können auch bei vielen Malignomzellen beobachtet werden. Rosland et al. entdeckten spontan auftretende maligne Transformationen von über einen

langen Zeitraum kultivierten humanen BMSC (bone marrow derived stem/stromal cells, Knochenmarksstammzellen) (Rosland et al. 2009), die später jedoch auf eine Kontaminierung mit Fibrosarkom-, Osteosarkom- und Gliomzellen zurückgeführt wurden (Torsvik et al. 2010). Rubio et al. fiel die spontane Transformation von ASC auf, welche sie später sogar genauer spezifizierten, wobei z. B. eine verstärkte Telomeraseaktivität und eine Inaktivierung des Rb-Proteins genannt wurden (Rubio et al. 2008). Auch für diese Veränderungen wurden später jedoch Kontaminationen mit anderen Zellen verantwortlich gemacht (de la Fuente et al. 2010). Ren et al. veröffentlichten 2011 eine Arbeit über spontane Transformationen im Rahmen der *in vitro* Expansion mesenchymaler Stammzellen von Makakenaffen (Ren et al. 2011). Im Gegensatz zu Rosland et al. sowie Rubio et al. konnte mittels STR-Analyse (Short Tandem Repeat-Analyse) nachgewiesen werden, dass es sich bei den transformierten Zellen tatsächlich um die initial kultivierten MSC von Makakenaffen handelte. Auf diese Weise konnte eine vermutete Kontamination mit anderen Zellen widerlegt werden (Ren et al. 2012). Anhand von murinen BMSC konnten Miura et al. wiederum zeigen, dass bei prolongierter Kultivierung strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen auftreten und dass die so veränderten Zellen *in vivo* Fibrosarkome verursachen können (Miura et al. 2006). Bei einer weiteren Gruppe, die Versuche mit murinen BMSC durchführte, traten bereits bei Passage 4 Chromosomenaberrationen auf. Die mutierten Zellen wurden daraufhin immundefekten Mäusen implantiert, in denen sie maligne Tumore verursachten (Jeong et al. 2011).

1.2 Zellzyklus

Zwischen den einzelnen Zellteilungen lässt sich der Ablauf der Ereignisse in eukaryotischen Zellen in mehrere Phasen einteilen. Dies wird als Zellzyklus bezeichnet. Er besteht aus insgesamt 4 Phasen; der G1-Phase, der S-Phase, der G2-Phase und der M-Phase, wobei G1-, S- und G2-Phase

zusammengefasst auch als Zeit zwischen den Zellteilungen bezeichnet werden (siehe Abbildung 4).

Die G1-Phase (G für Gap [engl.] = Lücke) stellt die Wachstumsphase der Zelle dar. Hier werden RNA und Proteine synthetisiert, die für das Wachstum der Zelle und die Verdopplung des Genoms benötigt werden, wie z. B. die Bausteine der Mikrotubuli. In der darauffolgenden S-Phase (S für Synthese) findet die Replikation, d. h. die Verdopplung der DNA statt. In der nun folgenden G2-Phase wird die Mitose vorbereitet, indem zum einen spezifische, für die Zellteilung benötigte Proteine verstärkt synthetisiert werden und zum anderen die neu synthetisierte DNA auf Fehler untersucht und repariert wird. Nach diesem Vorgang beginnt die Mitose (= M-Phase). Dabei werden in mehreren definierten Phasen die maximal kondensierten Chromosomen durch die Mikrotubuli des Spindelapparates am Kinetochor geteilt und zu den entgegengesetzt liegenden Zellpolen transportiert. In beiden Zellhälften befindet sich danach eine komplette Kopie des Genoms. Daraufhin bildet sich um jeden der beiden Chromosomensätze eine neue Kernmembran. Die Chromosomen dekondensieren wieder und der Spindelapparat löst sich auf. Am Ende der Mitose erfolgt die Zytokinese, bei der die Zelle durch eine Zytoplasmamembran in zwei Tochterzellen aufgeteilt wird.

Viele Zellen des Körpers treten nach der Mitose in eine Art Ruhezustand ein, welcher als G0-Phase bezeichnet wird. In diesem Stadium findet zwar keine Zellteilung, aber trotzdem ein aktiver Stoffwechsel statt,

sodass die G0-Phase auch dauerhaft sein kann. Ob eine Zelle nach der Mitose in die G0- oder G1-Phase eintritt, hängt von der Populationsdichte, der lokalen

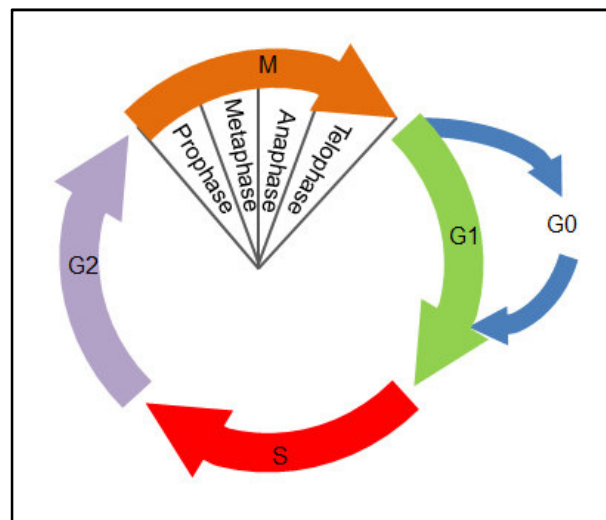


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zellzyklus (nach BD Biosciences 2014)

Konzentration von Wachstumsfaktoren oder dem Erreichen eines bestimmten Differenzierungsgrads ab. Bestimmte Wachstumssignale führen bei manchen Zellen auch zum Wiedereintritt von der G₀- in die G₁-Phase (Alberts 2011).

Der Übertritt von einer Phase in die nächste wird streng überwacht durch Restriktionspunkte, an denen kontrolliert wird, ob die Bedingungen für den Eintritt in die nächste Phase erfüllt sind. Restriktionspunkte befinden sich in der späten G₁-, am Ende der G₂- und in der Metaphase. Es werden zum Beispiel endogene Faktoren wie Größe und Ernährungszustand der Zelle erfasst sowie externe mitogene und antimitogene Faktoren berücksichtigt. Des Weiteren wird die korrekte Replikation der DNA überprüft und damit sichergestellt, dass beide Tochterzellen ein vollständiges Genom erhalten (Tessema et al. 2004). Fehlerhafte Abläufe an den Restriktionspunkten können nicht nur zu einem gestörten Zellzyklus, sondern auch zur malignen Entartung einer Zelle führen. Als Beispiel sei hier das bei einem großen Prozentsatz der Ösophagus- und Mammakarzinome überexprimierte zellzyklusbeeinflussende Zyklin D1 angeführt. Es inaktiviert als Komplex mit der Zyklin-abhängigen Kinase 4 und 6 (CDK4 und 6) das Retinoblastomprotein (Rb-Protein). Dadurch wird der mitogene Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt, welcher dann seine Zielgene aktiviert und auf diese Weise den Zellzyklus vorantreibt (Kumar 2007).

1.3 Chromosomen

Das humane Genom ist auf insgesamt 24 unterschiedliche Chromosomen aufgeteilt, d. h. auf 22 bei beiden Geschlechtern in gleicher Weise vorkommende Autosomen sowie das X- und das nur beim Mann vorhandene Y-Chromosom. Chromosomen bestehen aus 2 komplementären Polynukleotidketten, der eigentlichen DNA, und assoziierten Proteinen, wobei die Gesamtheit von DNA und Proteinen als Chromatin bezeichnet wird. Im Verlauf des Zellzyklus liegen die Chromosomen in unterschiedlichen Zuständen vor. Während der Wachstums- und Replikationsphasen liegen sie als ausgestreckte, lange und dünne Chromatinfäden vor, von denen die Gene abgelesen werden können. In der S-Phase findet die Replikation der DNA statt,

d. h. aus Ein-Chromatid-Chromosomen werden Zwei-Chromatid-Chromosomen, welche am Zentromer miteinander verknüpft sind. Diese werden in der Mitosephase mit Hilfe von Histon-Proteinen in höchstem Maße verdichtet. In diesem Zustand können die Chromosomen am besten sichtbar gemacht und unterschieden werden.

Mit wenigen Ausnahmen wie z. B. haploiden Keimzellen oder kernlosen Erythrozyten besitzen menschliche Zellen 46 Chromosomen, davon 44 Autosomen und 2 Gonosomen. Es handelt sich um einen diploiden Chromosomensatz, wobei 23 Chromosomen vom Vater und 23 von der Mutter stammen. Aus den Autosomen können 22 homologe Paare gebildet werden, die bei beiden Geschlechtern in gleicher Weise vorhanden sind. Die Gonosomen bilden bei Frauen ebenfalls ein homologes (X-Chromosomen-) Paar, während Männer ein X- und ein Y-Chromosom besitzen (Alberts 2011).

1.4 DNA-Schädigung

Voraussetzung für die maligne Transformation einer Zelle ist eine Akkumulation von Mutationen, denen eine Schädigung der DNA zu Grunde liegt. Es gibt endogene Stoffe oder Mechanismen, die eine DNA-Schädigung verursachen oder begünstigen, wie z. B. chronisch inflammatorische Zustände, freie Sauerstoffradikale oder hereditäre Defekte von DNA-Reparaturmechanismen. Darüber hinaus können DNA-Schäden grundsätzlich auf drei verschiedene Arten exogener Karzinogene zurückgeführt werden: chemische Stoffe, Strahlung und Mikroorganismen.

Chemische Karzinogene können unterschieden werden in direkte und indirekte. Die direkten Karzinogene schädigen die DNA, ohne vorher metabolisiert worden zu sein. Beispiele dafür sind alkylierende Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid, Chlorambucil oder Nitrosoharnstoffe. Viele Stoffe entfalten jedoch erst durch Metabolisierung ihre karzinogenen Eigenschaften. Unter diesen indirekten Karzinogenen finden sich polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe, wie die im Tabakrauch enthaltenen Benzopyrene. Ein

weiteres Beispiel sind aromatische Amine, hier insbesondere β -Naphthylamin als Auslöser von Blasenkrebs. Allen diesen chemischen Karzinogenen ist gemein, dass sie stark elektrophile Gruppen besitzen, die Addukte mit DNA, RNA und Proteinen bilden und auf diese Weise die DNA schädigen (Williams 2001). Die metabolische Aktivierung der indirekten Karzinogene erklärt die interindividuelle Suszeptibilität für diese Stoffe, die z. B. durch Polymorphismen in Cytochrom-P-450-Genen begründet werden kann (Hernando-Rodriguez et al. 2011).

Eine andere Art von DNA-Schädigung wird durch Strahlung jeglicher Art wie zum Beispiel UV-, Röntgen- und γ -Strahlung herbeigeführt. Radioaktive Strahlung führt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, Translokationen und Bildung von freien Sauerstoffradikalen, die ebenfalls die DNA schädigen (Cadet und Wagner 2013). UV-Strahlung verursacht eine Pyrimidinbasendimerisierung, welche die korrekte Faltung der DNA und die Genexpression behindert (Ravanat et al. 2001).

Die dritte Art von Karzinogenen ist mikrobiologischer Natur. Beispiele sind das HTLV-1-Virus als Auslöser einer T-Zell-Leukämie (Kannian und Green 2010) und die humanen Papillomaviren 16 und 18, deren Onkoproteine E6 und E7 die Tumorsuppressoren p53- und Rb-Protein blockieren und auf diese Weise u.a. Zervixkarzinome verursachen (Moody und Laimins 2010). Auch in der Ätiologie benigner und maligner Erkrankungen im HNO-Bereich spielen humane Papillomaviren eine Rolle. Während die Subtypen 6 und 11 die Larynxpapillomatose verursachen, kann insbesondere der Hochrisiko-Typ 16 in 25 bis 60% der Oropharynxkarzinome nachgewiesen werden (Wittekindt et al. 2012).

1.5 Karzinogenese

Hanahan et al. postulierten im Jahr 2000 sechs Kennzeichen für ein Malignom. Diese sind die Fähigkeit, das eigene Wachstum zu stimulieren (1), die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen (2), ein unendliches replikatives Potential (3), der Verlust von Apoptosemechanismen (4), die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (5) und zur Angiogenese (6)

(Hanahan und Weinberg 2011). Voraussetzung für das Erlangen dieser Fähigkeiten ist eine Folge mehrerer Mutationen im Genom einer Zelle, verursacht durch genetische Instabilität und/oder durch externe Noxen.

Die Theorie der Karzinogenese geht von der Hypothese aus, dass die meisten Tumore durch die klonale Expansion einer einzigen mutierten Zelle entstehen. Eine solche maligne Transformation einer Zelle ist das Resultat einer Akkumulation multipler, nichtletaler Mutationen im Genom, welche letztendlich zu einem veränderten Phänotyp und unkontrollierter Proliferation führen. Die dabei betroffenen Gene können prinzipiell in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden: wachstumsfördernde Proto-Onkogene, wachstumshemmende Tumorsuppressorgene, apoptoseregulierende Gene und Gene, die in DNA-Reparaturmechanismen involviert sind (Kumar 2007).

Proto-Onkogene werden in ihrer mutierten Form als Onkogene bezeichnet. Die Proteine, für die sie kodieren, nennt man Onkoproteine. Die meisten dieser Onkoproteine sind Bestandteil zellwachstumregulierender Signalkaskaden. Im Falle einer Genmutation sind sie entweder in ihrer Struktur verändert und damit konstitutiv aktiviert oder sie werden überexprimiert, was ebenfalls zu einer gesteigerten Proliferation der Zelle führen kann (Croce 2008).

Damit eine normale Zelle proliferieren kann, bedarf es in der Regel eines externen Signals in Form von Wachstumsfaktoren, welche über ihren jeweiligen Rezeptor eine Signalkaskade in Gang setzen, die zu Wachstum und Zellteilung führt. Mutationen von Proto-Onkogenen können an jeder Stelle dieses Prozesses Auswirkungen haben. So gibt es maligne Zellen, die sich über die Produktion von Wachstumsfaktoren nebst zugehörigem Rezeptor autokrin zur Proliferation anregen. Ein Beispiel hierfür ist das Glioblastom, welches verstärkt sowohl PDGF (platelet-derived growth factor) als auch den zugehörigen Rezeptor produziert (Lokker et al. 2002). Andere Tumore wiederum exprimieren konstitutiv bestimmte Wachstumsfaktorrezeptoren. Ein prominentes Beispiel ist der HER2/NEU-Rezeptor, der in ca. 20% aller Mammakarzinome überexprimiert wird (Gutierrez und Schiff 2011).

Weiterhin findet sich bei vielen Neoplasien eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Ca. 30% aller Tumore weisen beispielsweise eine Mutation

des RAS-Proto-Onkogens auf. RAS kodiert für GTP-bindende Proteine, die als Verbindung zwischen Wachstumsfaktorrezeptor und intrazellulärer Signalkaskade fungieren. Mutationen können dazu führen, dass diese Proteine dauerhaft die nachgeschaltete Signalkaskade aktivieren, ohne dass ein externer Wachstumsfaktor den Rezeptor stimuliert (Takashima und Faller 2013).

Um Mutationen wie die im Vorangegangenen beschriebenen zu unterbinden, besitzen Zellen eine Reihe von Tumorsuppressorgenen. Auch die von ihnen kodierten Proteine spielen eine Rolle in der Zellzyklus- und Apoptoseregulation, jedoch wirken sie proliferationshemmend. Zwei prominente Vertreter sind p53 und das Rb-Protein. Ein Defekt von p53 wird bei ca. der Hälfte aller Tumore nachgewiesen (Toledo und Wahl 2006). P53 wirkt als Transkriptionsfaktor und fördert die Expression von DNA-Reparaturgenen, Zellzyklus-inhibierenden und pro-apoptischen Genen. Im Falle einer DNA-Schädigung steigt der intrazelluläre p53-Spiegel und damit auch die Expression der Zielgene, wodurch die Proliferation der betroffenen Zelle solange verhindert wird, bis die DNA repariert ist. Ist dies nicht mehr möglich, so wird die Apoptose eingeleitet (Smith et al. 2003).

Das Retinoblastomgen hemmt normalerweise den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus und gibt diesen nur durch bestimmte Wachstumsstimuli frei. Kommt es durch Mutationen zur Inaktivierung oder Verlust von Rb, so fehlt ein entscheidender Inhibitor des Zellzyklus, was eine gesteigerte Proliferationskapazität der Zelle zur Folge hat.

Ein weiterer entscheidender Schritt auf dem Weg zur malignen Zelle ist der Verlust der Fähigkeit zur Apoptose, also die Immortalisierung der Zelle, wozu z. B. der Verlust von p53 beiträgt. Ein weiterer grundlegender Mechanismus hierbei ist die Aktivierung von Telomerasen, die der normalen Telomerverkürzung entgegenwirken und somit den natürlichen Alterungsprozess somatischer Zellen ausschalten (Shay und Wright 2011).

Durch die in Kapitel 1.4 angeführten Noxen und durch Fehlpaarungen bei der Replikation kann die DNA geschädigt werden. Die Zelle besitzt jedoch eine Reihe von Reparaturmechanismen, die verhindern, dass diese Schädigungen

vererbt werden. Bekannte Beispiele sind neben p53 das BRCA1- und BRCA2-Gen, deren Produkte zur DNA-Reparatur beitragen. Die Bedeutung dieser Gene wird deutlich, wenn man das Brustkrebsrisiko von Frauen mit BRCA1- bzw. 2-Defekt betrachtet. Diese haben ein Risiko von 65% (BRCA1) bzw. 45% (BRCA2) bis zum 70. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken (Antoniou et al. 2003).

1.6 Ziele der Arbeit

Adulte mesenchymale Stammzellen besitzen ein großes Potential für den Einsatz beim Tissue Engineering und in der regenerativen Medizin. Da für viele Anwendungen zu wenige Zellen auf einmal isoliert werden können, sind Kultivierung und Expansion *in vitro* notwendig. Während dieser Zeit sind die Zellen mit oxidativem Stress, mechanischem Stress und enzymatischer Verdauung konfrontiert (Pallua 2011). Dies könnte zu Schäden am Genom führen und letztendlich Ausgangspunkt für eine maligne Transformation einzelner Zellen sein. Die durch die Expansion entstehende große Zahl an Replikationen begünstigt ebenfalls die Akkumulation von Mutationen.

Eine ähnliche Tumorgenese kann auch *in vivo* beobachtet werden, wo chronische Inflammation oder die anhaltende Exposition durch Noxen wie Alkohol und Nikotin zu einer chronischen Regeneration von Gewebe und damit einer prolongierten Replikationsphase von Stammzellen führt. In einer solchen Phase können Mutationen akkumulieren und bestimmte Signalwege konstitutiv aktiviert werden. Dies kann zur malignen Transformation führen, da Stammzellen darüber hinaus bereits ein Merkmal maligner Zellen, nämlich die Fähigkeit zu unbegrenzter Replikation in sich tragen (Beachy et al. 2004).

Die wenigen Daten, die bisher zur genetischen Stabilität von mesenchymalen Stammzellen während der *in vitro* Expansion erfasst wurden, sind zum Teil widersprüchlich. Bevor Zellen in den humanen Organismus eingebracht werden können, muss jedoch gesichert sein, dass sie nicht der Ausgangspunkt für Malignome sind. Aus diesem Grund ist es wichtig, weitere Daten über die

genetische Stabilität von *in vitro* kultivierten mesenchymalen Stammzellen zu erhalten.

Deshalb wurden in dieser Arbeit frisch aus Liposuktionsmaterial isolierte ASC *in vitro* expandiert und hinsichtlich potentieller Veränderungen auf DNA- und Chromatidebene untersucht. Zur Detektion von Schäden auf DNA-Ebene wurden dafür mit Zellen der Passagen 1, 2, 3, 5 und 10 eine alkalische Einzelzellgelelektrophorese und ein Mikrokerntest durchgeführt. Mit Zellen der selben Passagen erfolgte zudem ein Chromosomenaberrationstest, welcher strukturelle und numerische chromosomale Aberrationen aufdecken kann.

Auf diese Weise sollte die Frage beantwortet werden, ob eine *in vitro* Kultivierung einen negativen Einfluss auf die genetische Stabilität von ASC hat.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Verwendete Zellen

Die bei den Versuchen verwendeten ASC wurden aus Liposuktionsmaterial isoliert, welches bei Operationen an der Universitätsklinik Würzburg (Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie; Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Meffert) entnommen wurde (siehe Abbildung 5).

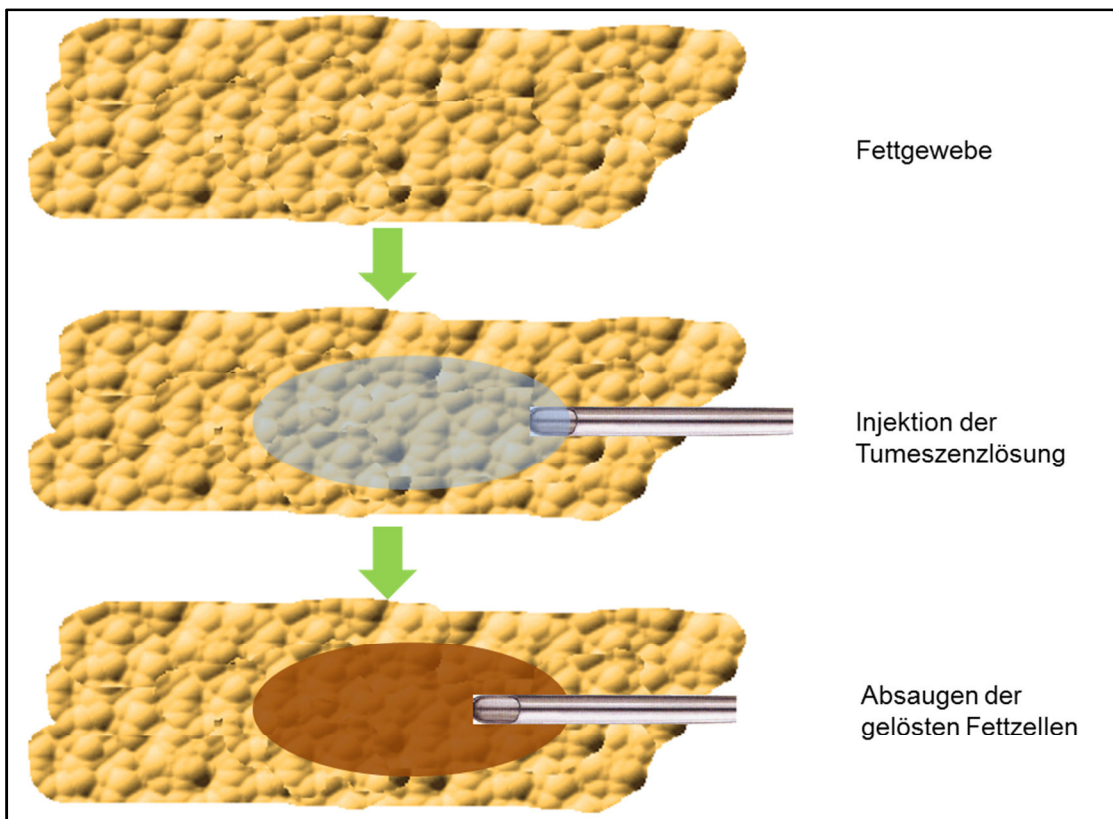


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Liposuktion nach der Tumeszenzmethode: Zunächst erfolgt das Einbringen einer Lösung bestehend aus NaCl, Adrenalin, Bikarbonat und Lokalanästhetikum. Das hierin gelöste Fettgewebe wird in einem weiteren Schritt zusammen mit der Lösung abgesaugt

Es wurden Zellen von 8 verschiedenen Patienten verwendet. Die Patienten wurden zuvor aufgeklärt und ihr schriftliches Einverständnis eingeholt. Die Versuche waren durch die Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Genehmigung Nr. 72/06). Es handelte sich dabei um Liposuktionen im Bereich des Oberschenkels und des Abdomens. Das bei Operationen dieser Art anfallende Liposuktionsmaterial wird normalerweise verworfen. Die Verwendung zu Forschungszwecken stellt keinerlei zusätzliche Beeinträchtigung für den Spender dar, da die Operationen allein aufgrund medizinischer oder kosmetischer Indikationen durchgeführt werden und nicht primär zum Zwecke der ASC-Gewinnung. Aus dem Liposuktionsmaterial wurden auf die in Kapitel 2.3.1 beschriebene Weise die plastikadhärenten ASC isoliert.

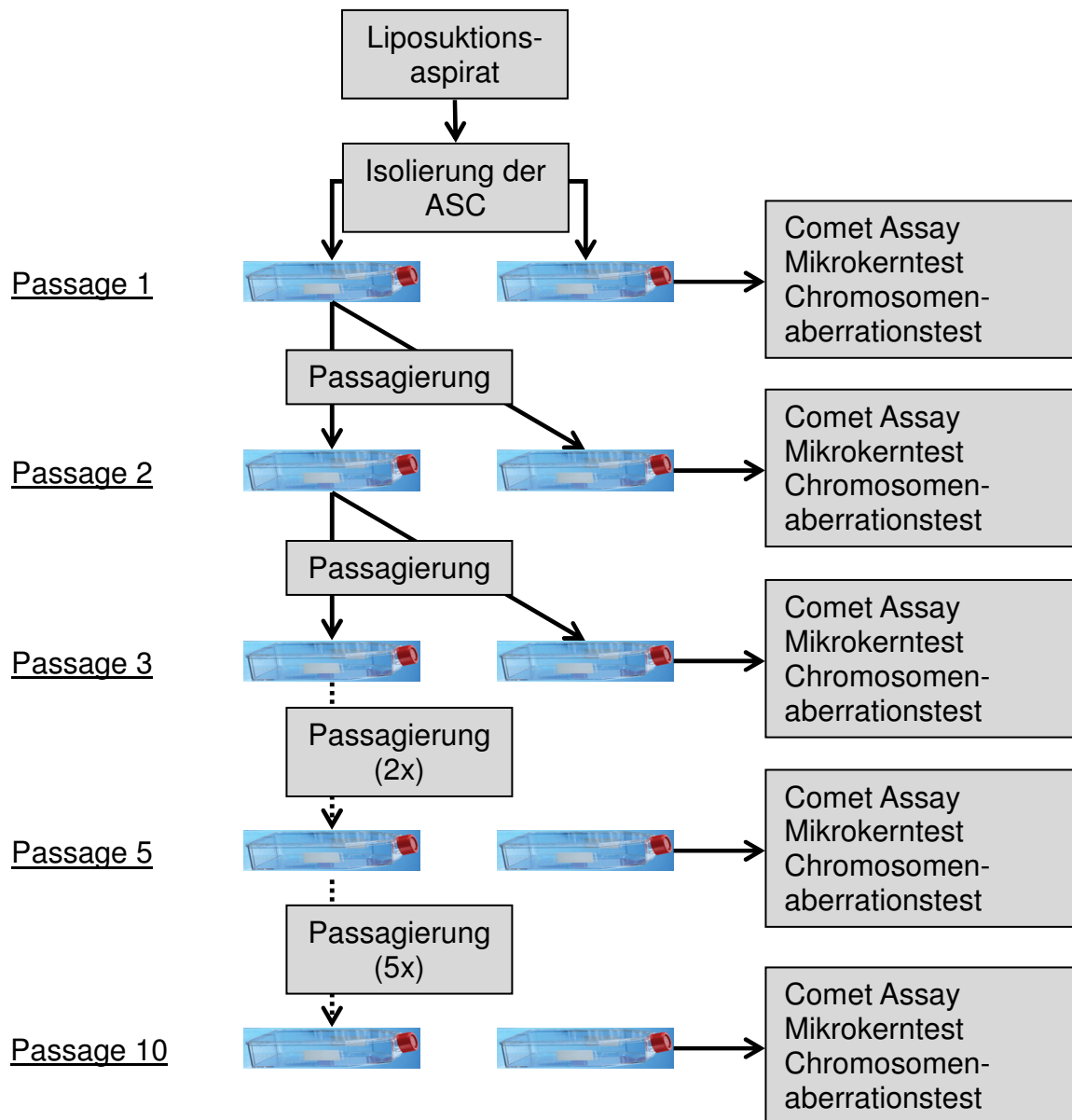
2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Firma, Ort
CASY-Cups	Innovatis AG, Reutlingen
Deckgläser (24x32mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmalpipetten (5,10,25 ml)	Corning Incorporated, New York, USA
Falcon-Röhrchen (15,50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH, Wertheim
Pipettenspitzen (200, 1000µl)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10µl)	A. Hartenstein, Würzburg
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Reaktionsgefäße (0,5ml)	A. Hartenstein, Würzburg
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Reaktionsgefäße braun (1,5ml)	Brand GmbH, Wertheim
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.3 Laborgeräte

Gerät	Firma, Ort
Autoklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel
CO₂ Inkubator NU5500E	NuAire Inc., Plymouth, USA
CO₂ Inkubator mit CB210	Binder GmbH, Tuttlingen
Counter	Karl Hecht KG, Sondheim
Elektrophoresekammern	Renner, Dannstadt
Elektrophoresenetzgerät EV202	Consort, Turnhout, Belgien
Fluoreszenzlampen ebq 100	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Glaspipetten	Brand GmbH, Wertheim
Heizplatte M6	CAT / M. Zipperer GmbH, Staufen
Küvetten	Brand GmbH, Wertheim
Membran-Vakuumpumpe	ABM Greiffenberger GmbH, Marktredwitz
Mikroskop, 473028	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle	Sharp Electronics, Hamburg
Multistepper	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter	Wissensch.-Techn. Werkstätte, Weilheim
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetierhilfe	Brand GmbH, Wertheim
Shaker ELMI S3	Rose Scientific Ltd., Edmonton, Kanada
Sterile Werkbank HERAsafe	Thermo Electron LED, Langenselbold
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waagen	August Sauter, Ebingen
Zellzählgerät CASY INNOVATIS	Innovatis AG, Reutlingen
Zentrifuge UNIVERSAL 16R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg
Zytozentrifuge Cellspin I	Tharmac, Waldsolms

2.2 Versuchsaufbau



2.3 Zellkultur

2.3.1 Isolierung humaner Fettgewebstammzellen

Vor der Isolierung der ASC musste zunächst ein Erythrozytenlysepuffer hergestellt werden. Hierzu wurden 4,1g Ammoniumchlorid (Merck Biosciences, Schwalbach) und 0,5g Kaliumhydrogencarbonat (Merck Biosciences,

Schwalbach) in 100ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) aufgelöst. Dann wurden 700µl 0,2mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, pH 8, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) dazugegeben und die entstandene Lösung mit Aqua dest. auf 500ml aufgefüllt und autoklaviert.

Unmittelbar im Anschluss an eine Operation wurde das Liposuktionsmaterial direkt im Operationssaal vom Auffangbehälter der Absaugpumpe (siehe Abbildung 6) in autoklavierte Glasflaschen umgefüllt und in das Labor gebracht. Dort wurde das Material so auf autoklavierte Glasflaschen verteilt, dass diese jeweils zur Hälfte gefüllt waren. Um den Anteil an Blut zu reduzieren, wurde nun zunächst je nach Blutmenge ein- oder zweimal phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS, Roche Diagnostics, Mannheim) + 10% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Biochrom AG, Berlin) dazugegeben, die Flaschen kräftig geschüttelt und dann kurz stehen gelassen. Auf diese Weise konnten sich Gewebereste und

Fett im oberen Teil der Flaschen absetzen, während sich im unteren Teil der Flaschen ein PBS-Blutgemisch bildete, welches mit einer 25ml Plastikpipette abgesaugt wurde. Daraufhin wurde dem übrig gebliebenen Liposuktionsmaterial (ca. 300ml / Flasche) jeweils 100ml einer Mischung aus PBS + 10% Pen/Strep, Fungizone (Invitrogen (Gibco), Karlsruhe) und Collagenase P

(Roche Diagnostics, Mannheim) zugegeben. Dabei wurden 10mg Collagenase P pro 100ml Liposuktionsmaterial und 1ml Fungizone pro Flasche benötigt. Fungizone zur Verhinderung einer Pilzkontamination enthält 250µg Amphotericin B / ml, sodass die Endkonzentration ca. 0,625 µg/ml betrug.



Abbildung 6: Auffangbehälter für das Liposuktionsmaterial

Danach wurden die Flaschen mit einem Deckel locker verschlossen, dieser mit Parafilm abgedichtet und die Flaschen in einen zuvor mit Ethanol ausgesprühten Schüttler gestellt. Die nun stattfindende Verdauung des Liposuktionsmaterials durch die Collagenase benötigte 3 Stunden bei 37°C.

Nach der Verdauung durch die Collagenase wurde das Liposuktionsmaterial auf 50ml Falcon-Röhrchen verteilt und 10 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Dadurch bildeten sich 3 Phasen: Eine Fettphase, eine Blutphase und ein Zellpellet. Die Fett- und die Blutphase mussten nun vorsichtig dekantiert werden. Im Anschluss daran wurde jedes Zellpellet in 5ml

Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und 10 Minuten bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Falcon-Röhrchen wieder 10 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert und der flüssige Überstand abgesaugt. Das übrige Zellpellet wurde hierauf in 10ml PBS + 10% Pen/Strep resuspendiert, ein weiteres Mal

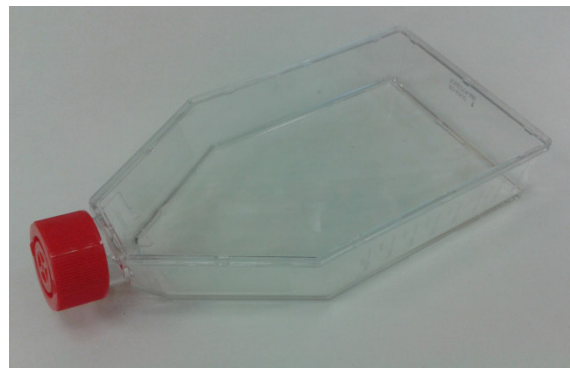


Abbildung 7: Zellkulturflasche

zentrifugiert (10min, 1300rpm) und der flüssige Überstand wieder abgesaugt. Nun wurde das Zellpellet in 10ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen (Gibco), Karlsruhe) + 10% fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS, Linaris, Wertheim) + 1% Pen/Strep resuspendiert und durch Filtersiebe mit Poren von 100µm Größe (BD Bioscience, Bedford, MA, USA) gegossen. Die filtrierte Zellsuspension wurde schließlich in 550ml Zellkulturflaschen (siehe Abbildung 7) gegeben und diese mit DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep auf 20ml Nährmedium aufgefüllt.

Die Flaschen wurden daraufhin in den Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gestellt. Die plastikadhärenten ASC wuchsen am Boden der Zellkulturflaschen an, sodass am darauffolgenden Tag durch Absaugen des Nährmediums alle noch hierin befindlichen nichtadhärenten Zellen und Detritus entfernt werden konnten. Nach

dem Absaugen wurden die Flaschen einmal mit PBS gewaschen und neues Nährmedium eingebracht.

2.3.2 Expansion und Passagierung

Nach dem Isolieren wurden die ASC über mehrere Tage in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep, welches alle 2 Tage gewechselt wurde. Diese Zellen wurden als Passage 0 definiert.

Nachdem ein Konfluenzgrad von ca. 80% erreicht war, wurden die ASC auf folgende Weise passagiert:

Um die Expansion der Zellen fortzuführen und weitere Passagen zu erhalten wurde eine Zellkulturflasche 1:2 gesplittet. Dazu mussten die adhärennten Zellen zunächst in Lösung gebracht werden. Hierfür wurden nach Absaugen des Nährmediums 7ml Trypsin-EDTA 0,25% (Biochrom AG, Berlin) zu der Zellkultur gegeben. Nach drei- bis fünfminütiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche lichtmikroskopisch kontrolliert und durch Zugabe von 10ml DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep gestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde daraufhin in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt und 6 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des flüssigen Überstandes wurde das dadurch entstandene Zellpellet in 20ml DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep resuspendiert. Jeweils 10ml dieser Zellsuspension wurden nun in eine neue Zellkulturflasche gegeben. Zu beiden Flaschen wurden danach noch einmal 10ml DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep gegeben, sodass beide Flaschen 20ml Nährmedium enthielten. Die Flaschen wurden nun erneut im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelagert und das Nährmedium alle 2 Tage gewechselt.

Für die Versuche wurden die Zellen einer zweiten Zellkulturflasche auf die oben beschriebene Weise abgelöst und zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde jetzt jedoch in 30ml DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep resuspendiert. Nun wurde die Zellzahl und Vitalität mit dem CASY-Zellzählgerät gemessen.

Danach wurden die Zellen auf folgende Weise aufgeteilt:

Für den Comet Assay wurden 8ml einer Suspension mit 50 000 Zellen / ml in einem 15ml Falcon-Röhrchen angesetzt und diese Suspension auf 4 Wells einer 6-Well-Zellkulturplatte (siehe Abbildung 8) aufgeteilt (2ml pro Well).

Für den Mikrokern-Test wurden 8ml einer Suspension mit 25 000 Zellen / ml in einem 15ml Falcon-Röhrchen angesetzt und diese Suspension auf 4 Wells einer 6-Well-Zellkulturplatte aufgeteilt (2ml pro Well).

Für den Chromosomenaberrationstest wurden 10ml einer Suspension mit 50000 Zellen / ml in einem 15ml Falcon-Röhrchen angesetzt. Diese Suspension wurde nun auf 8 sterile Objektträger in zwei Zellkulturschalen für Objektträger gegeben. Eine Schale enthielt dabei vier Objektträger. Auf den ersten wurde jeweils 2ml Zellsuspension aufgebracht, auf den zweiten 1ml, auf den dritten 0,5ml und auf den vierten 0,25ml. Davor wurde auf jeden Objektträger so viel DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep gegeben, dass sich nach Zugabe der Zellsuspension über jedem Objektträger 4ml Zellsuspension befanden. Durch diese Verdünnungsreihe konnte sichergestellt werden, immer einen Objektträger mit der für die lichtmikroskopische Auswertung optimalen Zelldichte zu erhalten.

Die nach der Aufteilung der Zellen im 50ml Falcon-Röhrchen verbliebene Zellsuspension wurde mit DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt, die wiederum auf 20ml Nährmedium aufgefüllt wurden.

Die auf die oben beschriebene Weise entstandenen beiden 6-Well-Platten, die beiden Zellkulturschalen mit den Objektträgern und die beiden neuen Zellkulturflaschen wurden nun ebenfalls im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelagert.

Zusammenfassend entstanden durch die im Vorangegangenen beschriebene Art der Passagierung aus 2 Zellkulturflaschen der Passage 0 (n) also vier Zellkulturflaschen, zwei 6-Well-Platten und 2 Zellkulturschalen für Objektträger der Passage 1 (n+1).

Da die Versuche mit ASC der Passagen 1, 2, 3, 5 und 10 durchgeführt werden sollten, wurden die Zellen der Passage 0, 1, 2, 4 und 9 auf diese Art und Weise

passagiert. Bei der Passage 3, 5, 6, 7 und 8 wurden lediglich zwei Zellkulturflaschen wie beschrieben 1:2 gesplittet.

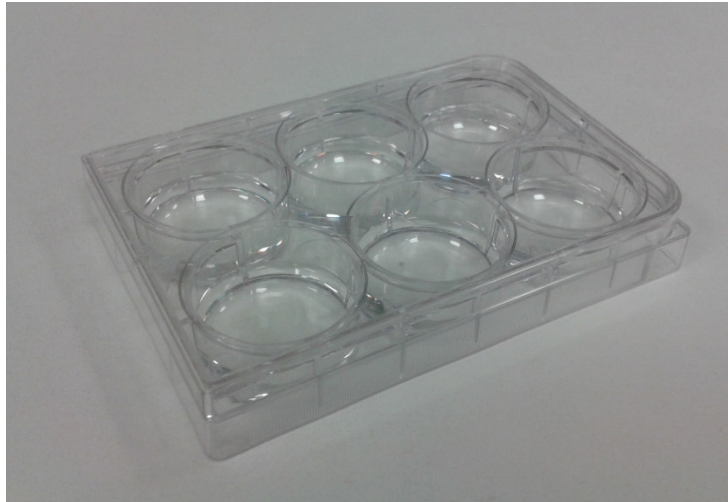


Abbildung 8: 6-Well-Platte

2.4 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmungen

Für die Bestimmung der Zahl und Vitalität der Zellen wurde das Zellzählgerät CASY (cell counter and analysing system) der Firma Innovatis AG verwendet.

Dieses arbeitet nach dem Stromausschlussverfahren, das die Membranintegrität von Zellen misst. Es basiert auf dem Umstand, dass die Zellmembranen vitaler Zellen als elektrische Isolatoren angesehen werden können. Tote Zellen hingegen weisen eine defekte Zellmembran auf, sodass der zytoplasmatische Raum leitfähig wird (siehe Abbildung 9).

Vor der Messung werden 100µl Zellsuspension in 10ml einer schwachen Elektrolytlösung (CasyTon-Lösung) pipettiert. Nach dem Durchmischen saugt das Gerät die Suspension mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Geometrie und mit einer Messpore, über der ein mit 1 MHz getaktetes Niederspannungsfeld anliegt. Beim Durchtreten von Zellen durch die Messpore kommt es zu einer Widerstandserhöhung, durch die das Gerät die Größe der Zelle berechnet. Während bei toten Zellen mit defekter Membran

lediglich das Zellmatrixvolumen erfasst wird, das in etwa der Größe des Zellkerns entspricht, werden vitale Zellen mit ihrer gesamten Größe ermittelt. Durch eine vom Gerät durchgeführte Pulsflächenanalyse (Integral des Messsignals) können auf diese Weise die Anzahl und Vitalität der Zellen in der Probe bestimmt werden (Glauner 2006).

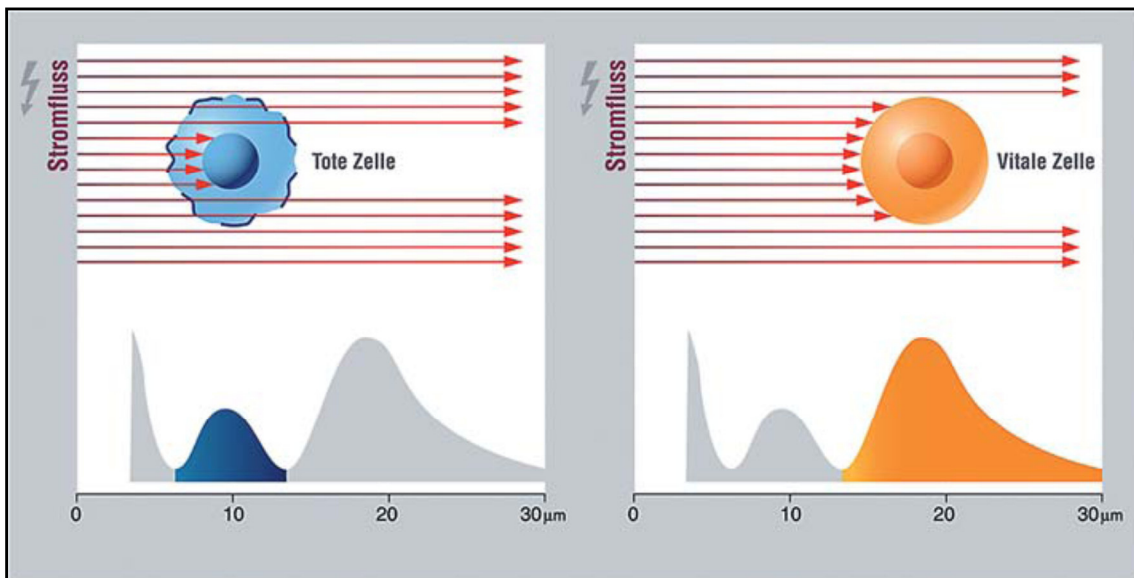


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Stromausschlussverfahrens. Vitale Zellen mit intakter Membran schließen den elektrischen Strom aus, während bei toten Zellen mit defekter Membran der zytoplasmatische Raum leitfähig wird (Glauner 2006).

2.5 Comet Assay

2.5.1 Grundlagen

Die alkalische Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) ist ein sensitiver und einfach durchführbarer Test zur Messung von DNA-Schäden auf Einzelzellebene (Collins 2004). Die Grundlagen der Methode wurden bereits 1984 von Østling und Johanson entwickelt (Ostling und Johanson 1984). Diese führten den Test unter pH-neutralen Bedingungen durch, wodurch hauptsächlich DNA-Doppelstrangbrüche detektiert werden konnten. Singh et al. erweiterten die Bandbreite der erfassbaren DNA-Schäden durch die Verwendung eines alkalischen Elektrophoresepuffers ($\text{pH} > 13$), wodurch auch

DNA-Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen, DNA-DNA- und DNA-Protein-Addukte sowie inkomplette Reparaturschnitte entdeckt werden können (Tice et al. 2000).

Bei der Durchführung des Versuchs werden die in Agaroselösung aufgenommenen Zellen auf einen Objektträger aufgebracht und ihre Zellmembranen unter alkalischen Bedingungen lysiert, sodass danach nur noch die DNA der Zellen vorhanden ist.

Daraufhin wird die DNA dem alkalischen Elektrophoresepuffer ausgesetzt. Dies führt zur Entwindung und Auftrennung der DNA-Doppelhelix, zur Denaturierung noch vorhandener RNA und zur Überführung alkalilabiler Stellen in Einzelstrangbrüche. In der darauf folgenden Elektrophorese wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente von ihrem ursprünglichen Platz im Zellkern in Richtung der Anode. Im Anschluss an die Elektrophorese wird die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt, wodurch sie im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Im Falle einer DNA-Schädigung findet sich dort das Bild eines Kometen, wobei die Länge und Intensität des Schweifes proportional zum Ausmaß der DNA-Schädigung sind (Tice et al. 2000).

2.5.2 Puffer und Lösungen

Im Rahmen der Vorbereitung des Versuchs mussten zunächst die für den Comet Assay benötigten Puffer und Lösungen angesetzt werden. Zur Herstellung einer 5-molaren Natronlauge (NaOH)-Lösung wurden 200g NaOH (Merck Biosciences, Schwalbach) zu 950 ml zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidest.) gegeben und die Lösung dann mit Aqua bidest. auf einen Liter aufgefüllt. Für die EDTA-Stammlösung wurden zuerst 14,89 g EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in 180 ml Aqua bidest. gelöst. Dann wurde mit NaOH-Plättchen ein pH von 10 eingestellt und die Lösung mit Aqua bidest. auf 200 ml aufgefüllt, bevor sie autoklaviert und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert wurde. Die Lyselösung wurde hergestellt, indem 0,75 ml Triton (X 100) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit 7,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) und 66,75 ml Lysepuffer gemischt wurden. Zur Anfertigung des Lysepuffers wurden 67 ml N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz

(Serva, Heidelberg), 292,8 g Natriumchlorid (NaCl, Merck Biosciences, Schwalbach), 2,4 g Trishydroxymethylaminomethan (TRIS, Merck Biosciences, Schwalbach) und 74,4 g EDTA in 1,8 l Aqua bidest. gelöst. Dann wurde unter Zugabe von 5M NaOH-Lösung ein pH von 10 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 2 l aufgefüllt. Für den 0,4-molaren TRIS-Neutralisationspuffer wurden 97 g TRIS mit Aqua bidest. auf 1950 ml aufgefüllt. Unter Zugabe von 10-molarer Salzsäure (HCl) wurde ein pH von 7,5 eingestellt. Danach wurde wieder mit Aqua bidest. auf 2 l aufgefüllt und der Puffer nach dem Autoklavieren bei Raumtemperatur gelagert. Weiterhin musste der Elektrophoresepuffer frisch angesetzt werden. Dafür wurden 120 ml 5-molare NaOH-Lösung mit 10 ml EDTA-Stammlösung gemischt und dann mit Aqua bidest. auf 2 l aufgefüllt.

2.5.3 Durchführung

Zur Herstellung der beschichteten Objektträger wurden zunächst 1,5g 1,5-prozentige Normal-Melting-Point (NMP)-Agarose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in 100ml PBS aufgeköcht. Danach wurden seitlich mattierte Objektträger in die Agaroselösung getaucht, an der Unterseite abgewischt und zum Trocknen ausgelegt. Die auf diese Weise präparierten Objektträger sind mehrere Wochen bei Raumtemperatur haltbar. Weiterhin musste für die Positivkontrolle eine MMS-Lösung hergestellt werden. Hierzu wurde durch Mischen von 8,4 µl Methylmethansulfonat (MMS, 11,8M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit 991,6 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) eine 100mM MMS-Stammlösung angesetzt. Von dieser Stammlösung wiederum wurden 100µl mit 100µl DMSO gemischt, sodass man eine 50mM Lösung erhielt.

Am Tag vor dem jeweiligen Versuch wurden die ASC in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Es wurden lediglich 4 Wells benötigt, in die jeweils 100 000 Zellen eingebracht wurden (2ml Zellsuspension mit 50 000 Zellen/ml, s.o.). Als Nährmedium diente DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep.

Am Tag des Versuchs erfolgte bei zwei der vier Wells zunächst eine 30-minütige Inkubation mit 500 µM Methylmethansulfonat (MMS) (durch Zugabe von 20µl der 50mM MMS-Lösung). Die mit dieser stark genotoxischen Substanz

behandelten Zellen stellten die Positivkontrolle dar. Nach 30 Minuten wurde das Medium in allen vier Wells abgesaugt und jeweils 700µl Trypsin-EDTA 0,25% zugegeben. Nach 3-5 minütiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Ablösen der ASC lichtmikroskopisch kontrolliert, die Reaktion durch Zugabe von 700µl DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep gestoppt und die entstandene Zellsuspension in vier 1,5ml Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden daraufhin 6 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Die so entstandenen Pellets wurden nun nach Absaugen des Überstandes in jeweils 80µl Nährmedium resuspendiert.

Nun wurden 20µl der jeweiligen Zellsuspension zu 120µl 37°C warmer 0,5-prozentiger Low-Melting-Point (LMP)-AgaroseLösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in ein Eppendorfgefäß gegeben und beide Lösungen vermischt. Zur Herstellung der AgaroseLösung wurden davor 50mg LMP-Agarose in 10ml PBS gelöst und im Wasserbad erwärmt. Im Anschluss daran wurden auf zwei beschichtete Objektträger jeweils 60µl der Agarose-Zellsuspension aufgetragen und diese mit einem Deckglas abgedeckt. Aus jeder der vier Zellsuspensionen wurden somit 2 Objektträger angefertigt. Zur Verblindung wurden die Objektträger zuvor mit den Zahlen 1-4 nummeriert.

Nach 3-5 Minuten wurde das Deckglas vorsichtig abgenommen und die Objektträger in eine Küvette mit LyseLösung (Herstellung s.o.) gestellt. Die Zellen wurden nun - lichtgeschützt, um mögliche zusätzliche DNA-Schäden durch UV-Licht zu vermeiden - bei 4°C mindestens 1,5 Stunden lysiert.

Im Anschluss an die Lyse wurden die Objektträger in die Elektrophoresekammer gelegt und mit dem alkalischen Elektrophoresepuffer überschichtet. Die übrigen Plätze wurden mit leeren Objektträgern aufgefüllt. Zur Auftrennung und Entwindung der doppelsträngigen DNA wurden die Präparate zunächst 20 Minuten lichtgeschützt im Elektrophoresepuffer belassen. Die sich anschließende 20-minütige Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 25V und einer Stromstärke von 300mA durchgeführt, wobei die Stromstärke über die Menge des Elektrophoresepuffers eingestellt wurde. Zur pH-Neutralisation wurden die Objektträger danach 5 Minuten in eine Küvette mit Tris-Neutralisationspuffer (pH 7,5) gestellt. Nach dem Abtropfen wurden die

Präparate mit 20µl Ethidiumbromid-DNA-Färbelösung (Merck Biosciences, Schwalbach) beschichtet, mit Deckgläsern versehen und in eine feuchte Kammer gelegt. Auf diese Weise konnten sie bei 4°C und lichtgeschützt bis zu einer Woche gelagert werden.

2.5.4 Auswertung

Die Auswertung wurde mit der Software Komet 5.5 (Kinetic Imaging, jetzt Andor, Belfast, Nord-Irland) an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica bei 200-facher Vergrößerung durchgeführt. Pro Objektträger wurden 50 Zellen ausgewertet.

Bei geschädigter DNA zeigte sich das Bild eines Kometen, wobei sich die intakte DNA im Kopf und die DNA-Fragmente im Schweif befanden. Je stärker das Ausmaß der Schädigung desto größer ist die Zahl und Beweglichkeit der DNA-Fragmente und desto mehr DNA wandert folglich während der Elektrophorese in Richtung der Anode (siehe Abbildung 10).

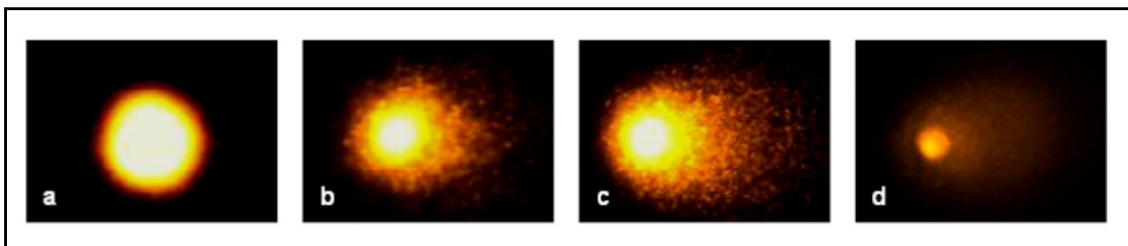


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Zellkerns dargestellt im Comet Assay mit aufsteigender DNA-Fragmentierung als Zeichen einer zunehmenden DNA-Schädigung von a (geringe Fragmentierung) nach d (starke Fragmentierung).

Die DNA-Fragmentierung wurde mit folgenden Werten gemessen: Tail Length (TL), Tail DNA (DT) und Head DNA (DH). Aus diesen Werten lässt sich das Olive Tail Moment berechnen. Dies stellt das dimensionslose Produkt der Länge des Schweifes mit dem relativen Anteil an DNA im Schweif dar und ist ein Maß für die Schädigung der DNA (Olive und Banath 1993).

$$OTM = TL \times \left(\frac{DT}{DH + DT} \right)$$

Die erhaltenen Werte wurden in einer Excel-Tabelle gespeichert.

2.6 Chromosomenaberrationstest

2.6.1 Allgemeines

Beim Chromosomenaberrationstest werden die Chromosomen lichtmikroskopisch auf Veränderungen untersucht, die sowohl struktureller als auch quantitativer Art sein können. Hierzu ist es erforderlich, die Chromosomen in der Metaphaseform zu präparieren. Aus diesem Grund werden die Zellen (evtl. nach Inkubation mit einem mutagenen Agens) mit dem Mitosehemmstoff Colcemid behandelt, welcher die Mikrotubuli in ihrer Funktion beeinträchtigt und so die Ausbildung der Spindelfasern verhindert. Als Folge unterbleibt die Aufteilung der Schwesterchromatiden in der Anaphase und es entstehen eine kernhaltige und eine nicht überlebensfähige kernlose Zelle (siehe Abbildung 11). Nach diesem Vorgang können die Chromosomen der kernhaltigen Zellen angefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt werden.

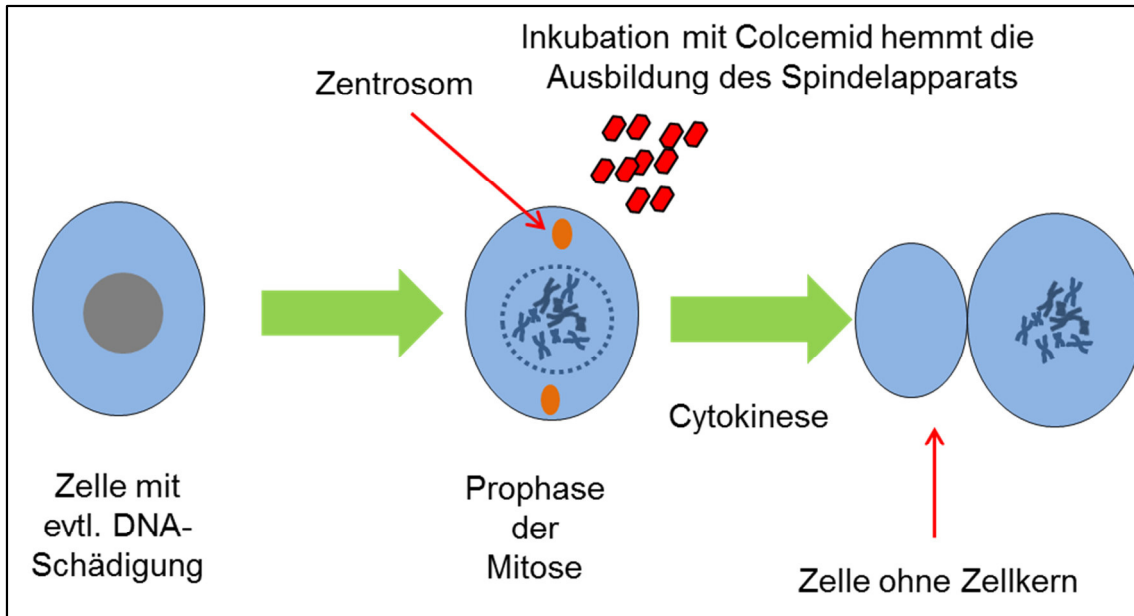


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Grundlagen des Chromosomenaberrationstests. Durch die Behandlung mit Colcemid wird die Ausbildung der von den Zentrosomen ausgehenden Mitosespindel verhindert. Dadurch unterbleibt die Teilung der Schwesterchromatide. Die eigentliche Zellteilung (Cytokinese) wird nicht unterbunden, sodass eine kernlose und eine kernhaltige Zelle entstehen.

2.6.2 Puffer und Lösungen

Vor Durchführung des Versuchs mussten zunächst einige Lösungen vorbereitet werden. Zur Herstellung einer 0,4-prozentigen Kalium-Chlorid (KCl)-Lösung wurden 0,4 g KCl (Merck Biosciences, Schwalbach) in 100 ml Aqua bidest. gelöst und bei 4°C gelagert. Für die Fixierlösung wurden Methanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und Eisessig (J.T. Baker, Griesheim) im Verhältnis 3:1 gemischt und auf -20°C gekühlt. Der Sörensen-Puffer wurde durch Lösen von 11,13 g Natriumdihydrogenphosphat (Na_2HPO_4 , Merck Biosciences, Schwalbach) und 8,5 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , Merck Biosciences, Schwalbach) in 500 ml Aqua bidest. hergestellt. Zum Färben der Chromosomen wurde eine 5-prozentige Giemsa-Lösung angesetzt. Dafür wurden 7 ml Giemsa (Merck Biosciences, Schwalbach) mit 10 ml Sörensen-Puffer und 100 ml Aqua dest. gemischt und filtriert. Schließlich musste für die Positivkontrolle eine 20mM MMS-Lösung bereitgestellt werden,

wofür von der beim Comet Assay beschriebenen MMS-Stammlösung 200µl mit 800µl Dimethylsulfoxid (DMSO) gemischt wurden.

2.6.3 Durchführung

Der Chromosomenaberrationstest wurde in einer modifizierten Version des von Sonoda et al. veröffentlichten Protokolls durchgeführt (Sonoda et al. 1998), welche im Detail auch schon von Hackenberg et. al beschrieben wurde (Hackenberg et al. 2011). Am Tag vor Beginn des Versuchs mussten die Zellen auf 8 sterile Objektträger in zwei Zellkulturschalen für Objektträger aufgebracht werden. Dies wurde im Detail bereits bei Punkt 2.3.2 (Expansion und Passagierung) beschrieben. Nach dem Anwachsen über Nacht wurde am Abend des nächsten Tages zunächst bei allen acht Objektträgern das Nährmedium gewechselt. Daraufhin wurden vier der Objektträger mit 200µM MMS inkubiert (durch Zugabe von 40µl der 20mM MMS-Lösung). Die so behandelten Zellen stellten die Positivkontrolle dar. Danach wurde zu allen acht Objektträgern 10µl der Colcemid-Stammlösung gegeben, was einer Endkonzentration von 25ng/ml entspricht. Die Colcemid-Stammlösung wurde hergestellt, indem jeweils 10 µg Colcemid (Biochrom AG, Berlin) zu einem Milliliter PBS gegeben wurden. Dann wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ 17h im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag folgte die Präparation der Chromosomen. Hierfür wurde zunächst 0,4-prozentige KCl-Lösung im Wasserbad auf 37°C erwärmt und die Fixierlösung auf -20°C gekühlt. Im Anschluss wurde das Nährmedium abgesaugt, die Objektträger mit 4ml KCl-Lösung überschichtet und 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die KCl-Lösung abgegossen und die Objektträger mit jeweils 1ml der Fixierlösung bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Nach Abgießen der Fixierlösung wurden jeweils 5ml frische Fixierlösung zugegeben und die Zellen für 15 min bei -20°C inkubiert. Daraufhin wurde die Fixierlösung abermals abgegossen, wieder jeweils 5ml frische Fixierlösung zugegeben und die Zellen noch einmal für 15 min bei -20°C inkubiert. Nach diesem Schritt wurde der Überstand entfernt und die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie 30 min auf eine 90°C

heiße Heizplatte gelegt wurden. Danach wurden sie über Nacht bei 60°C gelagert.

Am darauffolgenden Tag wurde die Färbung durchgeführt. Hierfür erfolgte zunächst eine 45-sekündige Behandlung mit Trypsin-EDTA 0,25% und danach eine Spülung mit destilliertem Wasser. Daraufhin wurden die Objektträger 2 Minuten in die Giemsa-Färbelösung gestellt, welche dann mit destilliertem Wasser abgewaschen wurde. Das Waschen wurde wiederholt und die Objektträger danach bei Raumtemperatur getrocknet. Nachdem die Objektträger getrocknet waren, wurden einige Tropfen Entellan[®]-Lösung (Merck, Darmstadt) zugegeben und die Zellen mit einem Deckglas abgedeckt.

2.6.4 Auswertung

Die Auswertung des Versuches erfolgte lichtmikroskopisch bei 1000-facher Vergrößerung, wobei die Vorgaben des „International System for Human Cytogenetic Nomenclature“ (ISCN) berücksichtigt wurden (Harnden DG 1985). Dabei wurden bei den mit MMS behandelten Zellen (der Positivkontrolle) und den unbehandelten Zellen jeweils 50 Mitosen ausgewertet. Hierbei wurden die Chromosomen zunächst gezählt und auf diese Weise auf numerische Aberrationen untersucht. Danach erfolgte die Untersuchung auf strukturelle Aberrationen. Dabei wurde zwischen Chromatid- und Chromosomen-Aberrationen unterschieden. Bei Chromatidaberrationen ist nur eines der Schwesterchromosomen von der Veränderung betroffen, bei Chromosomenaberrationen sind beide Schwesterchromosomen an homologen Stellen verändert. Es wurden Chromatidbrüche, Reunionen und Chromosomenbrüche erfasst. Bei Chromatidbrüchen liegt das dislozierte Fragment idealerweise parallel zu seinem homologen Bereich auf dem intakten Schwesterchromosom, bei Chromosomenbrüchen sind die Bruchenden idealerweise offen.

2.7 Mikrokerntest

2.7.1 Grundlagen

Mit dem Mikrokerntest können manifeste DNA-Schäden auf chromosomaler Ebene, Zytostase und Zytotoxizität bei proliferierenden Zellen erfasst werden. Zytostatische Effekte werden dabei über den Anteil mononukleärer Zellen an der Gesamtheit aller ausgezählten Zellen berechnet, zytotoxische Effekte über die Rate an nekrotischen und apoptotischen Zellen (Fenech 2007).

Das Ausmaß der Schädigung wird über die Rate an Mikrokerneln ermittelt. Mikrokerne entstehen, wenn Chromosomenbruchstücke oder auch ganze Chromosomen in der Metaphase der Mitose nicht an den Spindelapparat geheftet werden und auf diese Weise in der Anaphase nicht zusammen mit den übrigen Chromosomen zu den beiden Zellpolen transportiert werden. Dies hat zur Folge, dass die Bruchstücke in der Telophase eine eigene Kernhülle erhalten. Die so entstandenen Kerne sind deutlich kleiner als reguläre Zellkerne und werden als Mikrokerne bezeichnet (siehe Abbildung 12). Die Frequenz ihres Auftretens ist ein Maß für die Schädigung der DNA. Bei der Durchführung des Mikrokerntests werden die zu untersuchenden Zellen mit dem Zytokineseinhibitor Cytochalasin-B behandelt. Dieser verhindert die Ausbildung des kontraktilen Mikrofilament-Rings, der für die endgültige Teilung der Zelle nach Aufteilung der DNA und der Zellorganellen benötigt wird. Auf diese Weise entstehen binukleäre Zellen, die im Falle einer der Mitose vorausgegangenen Chromosomen-Schädigung zusätzlich einen Mikrokerneln enthalten.

Angefärbt werden die Zellen mit dem Nukleinsäurefarbstoff Acridinorange, der durch Anregung mit Blaulicht DNA (im Zellkern) grün und RNA (im Zytoplasma) rot erscheinen lässt (Fenech 2007).

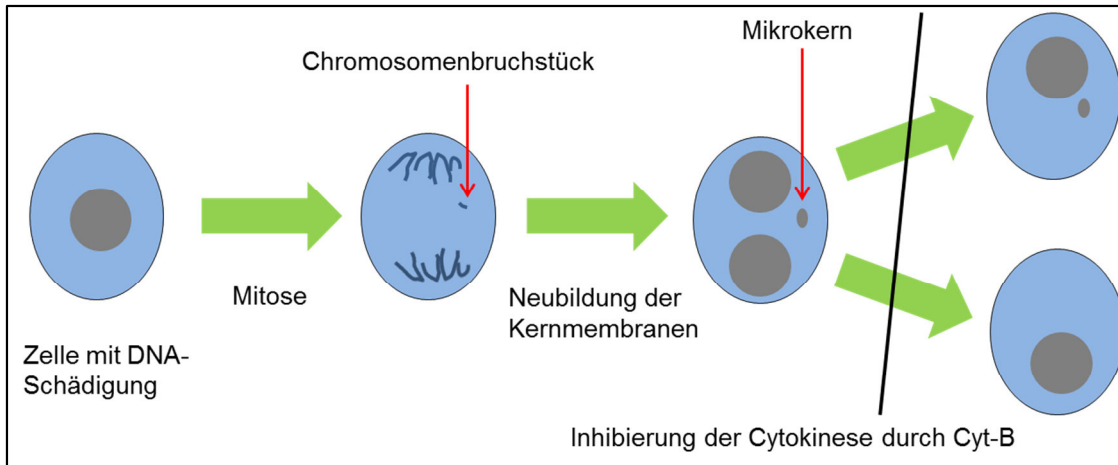


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Mikrokernbildung. Ist die DNA geschädigt, können kleine Chromosomenbruchstücke entstehen. Diese werden von einer eigenen Kernmembran umhüllt. Durch Inhibierung der Cytokinese entsteht auf diese Weise eine doppelkernige Zelle mit einem Mikrokern.

2.7.2 Puffer und Lösungen

Auch für den Mikrokerntest war es notwendig, einige spezielle Lösungen und Puffer vorzubereiten. Die Zusammensetzung der MMS-Lösung wurde bereits weiter oben beschrieben. Für den Mikrokerntest musste zusätzlich noch eine Cytochalasin B-Lösung und ein Sörensen-Puffer angesetzt werden. Die Cytochalasin-Lösung wurde durch Einbringen von 2mg Cytochalasin (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 2ml DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert. Für den Sörensen-Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 wurden 2,92g Natriumdihydrogenphosphat (Na_2HPO_4 , Merck Biosciences, Schwalbach) und 8,5 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , Merck Biosciences, Schwalbach) in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und der fertige Puffer autoklaviert. Zum Färben der Zellen musste des Weiteren eine 0,006-prozentige Acridinorange-Färbelösung hergestellt werden. Hierfür wurde zunächst aus 100mg Acridinorange (Serva, Heidelberg) und 100ml Aqua bidest. eine 0,1-prozentige Stammlösung gewonnen. Von dieser wiederum wurden 4,5ml mit 67,5ml Sörensen-Puffer gemischt, was dann schlussendlich eine 0,006-prozentige Färbelösung ergab.

2.7.3 Etablierung des Tests mit Fettgewebstammzellen

Der Mikrokerntest in seiner ursprünglichen Form wurde von Fenech mit Lymphozyten beschrieben (Fenech 1993). Aus diesem Grund war es zunächst notwendig, ihn mit ASC zu etablieren. Da der Test nur an proliferierenden Zellen durchführbar ist, war es wichtig, zunächst die Proliferation der verwendeten ASC zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wurden jeweils 10^5 ASC der Passage 5 in 14 Zellkulturflaschen eingebracht. Dann wurden die Zellen von jeweils zwei Flaschen nach 4, 8, 12, 24, 28, 36 und 48 Stunden abgelöst und ihre Anzahl mit dem CASY-Zellzählgerät ermittelt.

Des Weiteren wurde der Versuch unternommen, die Proliferationsrate der ASC durch Zugabe von Phytohämagglutinin (PHA) zu steigern. Dieses wird normalerweise zur Stimulation der Proliferation von T-Lymphozyten eingesetzt (Ceuppens et al. 1988). Auch im Mikrokernelprotokoll von Fenech wird PHA eingesetzt, um die mitotische Aktivität der Lymphozyten zu steigern (Fenech 2007). Aus diesem Grund wurde der Mikrokerntest mit ASC der Passagen 1, 3 und 6 parallel mit und ohne PHA-Stimulation ($24\mu\text{g}$ PHA/ml Nährmedium) durchgeführt. Dies führte jedoch nicht zu einer Verbesserung der Proliferationsrate, sodass bei den weiteren Versuchen auf eine PHA-Behandlung verzichtet wurde.

Weiterhin entscheidend war die Frage nach benötigter Menge Cytochalasin-B und Dauer der Inkubation, um eine maximale Anzahl doppelkerniger Zellen zu erhalten. Deshalb wurden zunächst ASC der Passage 3 in 6-Well-Platten ausgesät und mit unterschiedlichen Cyt-B-Konzentrationen inkubiert (0,5, 1, 2, 4, 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Als optimal stellte sich eine Cyt-B-Konzentration von $2\mu\text{g}$ Cyt-B/ml Nährmedium heraus. Daraufhin wurden weitere Zellen der Passage 3 mit dieser Konzentration, jedoch über unterschiedliche Zeiträume behandelt. Als Optimum erwies sich dabei eine Inkubationsdauer von 48 Stunden.

Mit Hilfe dieser Vorversuche konnte eine Rate von 25-30% doppelkernigen Zellen erzielt werden.

2.7.4 Durchführung

Einen Tag vor Beginn des Versuchs wurden wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben 4 Wells einer 6-Well-Platte mit ASC besiedelt, welche dort über Nacht anwuchsen. Am darauffolgenden Tag wurden zwei der vier Wells für 2 Stunden mit 200µM MMS inkubiert (durch Zugabe von 20µl der auf in Kapitel 2.6.2 beschriebenen Weise hergestellten 20mM MMS-Lösung zu 2ml Nährmedium) und danach bei allen vier Wells das Nährmedium gewechselt. Daraufhin wurde zu allen vier Wells 4µl Cytochalasin B (Cyt-B)-Lösung zugegeben, was einer Endkonzentration von 2µg Cyt-B/ml Nährmedium entsprach. Die auf diese Weise behandelten Zellen wurden nun 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium in allen vier Wells abgesaugt und jeweils 700µl Trypsin-EDTA 0,25% zugegeben. Nach 3-5 minütiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Ablösen der ASC lichtmikroskopisch kontrolliert, die Reaktion durch Zugabe von 700µl DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep gestoppt und die entstandene Zellsuspension in vier 1,5ml Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden daraufhin 6 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand durch Absaugen auf ca. 400µl reduziert. Durch Zytozentrifugation wurden nun jeweils 3x10⁴ Zellen auf die Objektträger aufgebracht. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt, sodass aus der Zellsuspension eines Eppendorfgefäßes immer zwei Objektträger angefertigt wurden. Danach wurden die Präparate mindestens 2 Stunden in eisgekühltem Methanol bei -20°C fixiert, bevor die Färbung erfolgen konnte. Für diese wurden die Objektträger zunächst 3-5 Minuten in eine mit Acridinorange-Färbelösung gefüllte Küvette gestellt, dann zweimal 5 Minuten mit Sörensen-Puffer entfärbt und danach mit Sörensen-Puffer eingedeckt und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach der Färbung erfolgte direkt die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop.

2.7.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop unter Blaulicht und 400-facher Vergrößerung. Die Zellen wurden nach den von Fenech beschriebenen Kriterien beurteilt (Fenech 2007). Pro Objektträger wurden zwei

Zähldurchgänge durchgeführt. Im ersten wurden 1000 Zellen gezählt und dabei einkernige und mehrkernige Zellen, Mitosen und Apoptosen erfasst. Auf diese Weise konnten zytostatische und zytotoxische Effekte sowie die Mitoserate gemessen werden. Im zweiten Durchgang wurden 1000 doppelkernige Zellen (mit und ohne Mikrokerne) ausgezählt und so das Ausmaß der DNA-Schädigung erfasst.

2.8 Statistische Testverfahren

Die graphische Darstellung in Form von Boxplots sowie die Analyse der Ergebnisse erfolgten mit Hilfe des Programms SPSS Statistics (IBM Deutschland GmbH, Ehningen).

Boxplots ermöglichen einen raschen visuellen Eindruck über die Lage und Streuung der gemessenen Daten. Grundlegendes Element ist die Box, deren untere bzw. obere Begrenzung die 25. bzw. 75. Perzentile der Werte darstellt. Der Bereich dazwischen wird Interquartilsabstand (interquartile range, IQR) genannt. Hier liegen die mittleren 50 % aller Werte. Die waagerechte Linie innerhalb der Box bezeichnet den Median. Der minimale und maximale Wert, welcher sich innerhalb eines Bereichs von $1,5 \times \text{IQR}$ befindet, wird mit einer T-förmigen Linie dargestellt. Werte zwischen $1,5$ und $3 \times \text{IQR}$ sind in der vorliegenden Arbeit als Ausreißer definiert und als Kreis gekennzeichnet. Werte außerhalb von $3 \times \text{IQR}$ wurden als Extremwerte definiert und durch einen Stern dargestellt (siehe Abbildung 13).

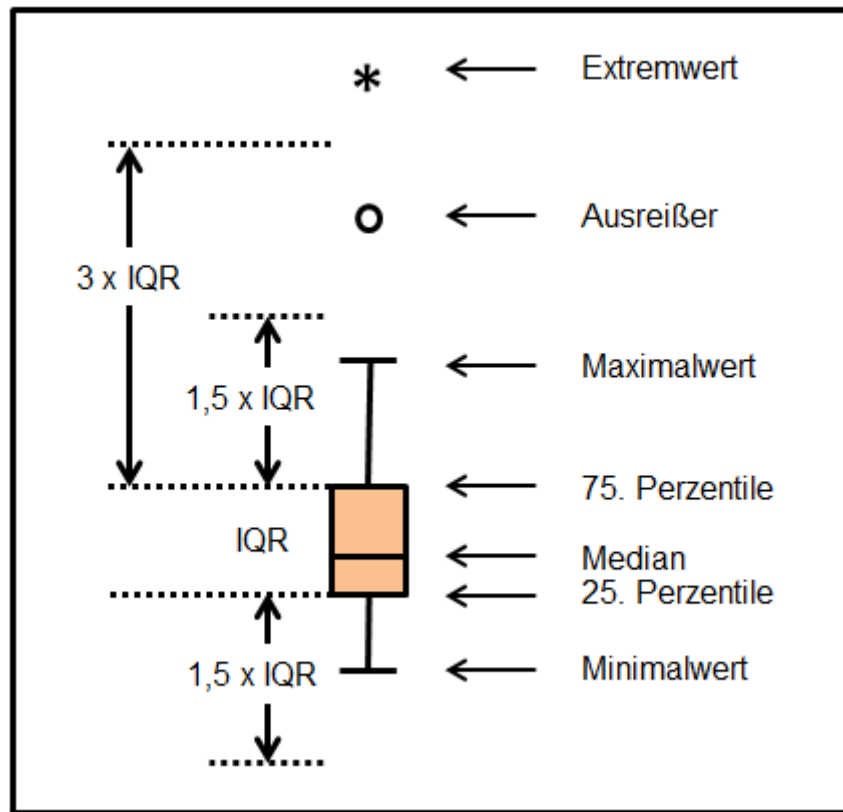


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines Boxplots.
IQR: Interquartile Range (Interquartilsabstand)

Für die statistische Auswertung wurden der Vorzeichenrangtest nach Wilcoxon (Wilcoxon-Test), die Rangvarianzanalyse nach Friedman (Friedman-Test) sowie die Bonferroni-Holm-Korrektur verwendet.

Der Wilcoxon-Test ist ein nicht-parametrischer Test, mit dessen Hilfe zwei abhängige Stichproben daraufhin überprüft werden können, ob sie sich in ihrer zentralen Tendenz unterscheiden. Durch diesen Test wurde für jeden einzelnen Versuch überprüft, ob sich die Ergebnisse der Positivkontrollen signifikant von den Ergebnissen der unbehandelten Zellen unterscheiden. Des Weiteren wurden die Ergebnisse der Passagen 2, 3, 5 und 10 jeweils mit den Ergebnissen der Passage 1 verglichen und auf signifikante Unterschiede überprüft.

Um eine Alphafehler-Kumulierung zu verhindern, wurde dem Wilcoxon-Test eine Bonferroni-Holm-Korrektur angeschlossen.

Dabei wird zunächst ein globales α -Niveau festgelegt, in der vorliegenden Arbeit $\alpha_g = 0,05$. Dann werden die p-Werte aus n Wilcoxon-Tests in einer aufsteigenden Reihenfolge sortiert und lokale α -Niveaus nach folgender Formel berechnet:

$$\alpha_1 = \frac{\alpha_g}{n}$$

$$\alpha_2 = \frac{\alpha_g}{n-1}$$

$$\alpha_3 = \frac{\alpha_g}{n-2}$$

$$\vdots$$

$$\alpha_n = \frac{\alpha_g}{n-(n-1)}$$

Signifikanz ist dann gegeben bei $p_1 < \alpha_1$; $p_2 < \alpha_2$ und weiter bis $p_n < \alpha_n$. Sobald bei einem Test $p_x \geq \alpha_x$ mit $(1 \leq x \leq n)$, gelten dieser sowie alle weiteren Tests als nicht signifikant.

Der Friedman-Test ist ebenfalls ein nicht-parametrischer Test, im Gegensatz zum Wilcoxon-Test können jedoch mehr als zwei abhängige Stichproben hinsichtlich Unterschieden in ihrer zentralen Tendenz untersucht werden. Es handelt sich um einen Rangsummentest, bei dem aus den Versuchsergebnissen der einzelnen Passagen eine gemeinsame Rangreihe gebildet wurde. Aus dem Vergleich der für die jeweiligen Passagen berechneten Rangsummen können Aussagen über eine gegebenenfalls signifikante Veränderung der Messwerte in Abhängigkeit von der Passage getroffen werden.

3. Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse sowie die statistische Auswertung der Versuche dargestellt, mit denen *in vitro* expandierte ASC auf genetische und chromosomale Aberrationen untersucht wurden. Es wurden Zellen von 8 verschiedenen Patienten verwendet.

Die Vitalität der Zellen wurde im Zuge der Passagierung bei Passage 0, 1, 2, 4 und 9 nach dem Ablösen mit dem CASY- Zellzählgerät gemessen. Hierbei betrug der Anteil vitaler Zellen im Durchschnitt 82,78% (siehe Abbildung 14).

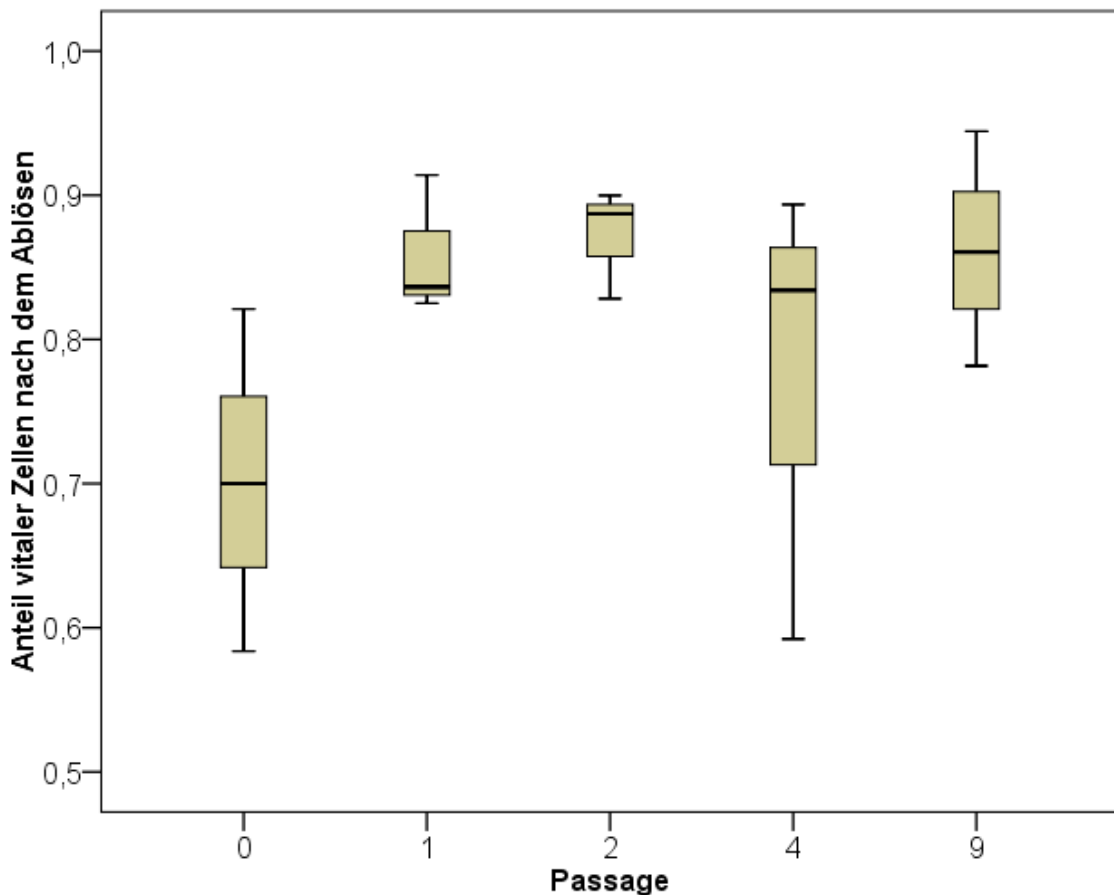


Abbildung 14 : Anteil vitaler Zellen unter allen Zellen einer Passage, gemessen mit dem CASY-Zellzählgerät nach dem Ablösen mit Trypsin-EDTA 0,25% (Inkubationszeit: 5min); n=8; waagrechter Strich: Median; obere/untere Boxbegrenzung: 75./25. Perzentile; T-Linien: min./max. Wert

Tabellen mit den Ergebnissen des Comet Assays, des Chromosomenaberrationstests sowie des Mikrokerntest befinden sich im Anhang unter 6.2.

3.1 Comet Assay

Der Comet Assay wurde mit ASC von 8 verschiedenen Patienten jeweils mit Zellen der Passage 1, 2, 3, 5 und 10 durchgeführt. Das Ausmaß der DNA-Schädigung wurde über das Olive Tail Moment (OTM) bestimmt und in Boxplots dargestellt (siehe Abbildung 15). Der Friedman-Test erfolgte an den OTM-Median-Werten von Passage 1, 2, 3, 5 und 10. Dabei konnte keine signifikante Progression der DNA-Schädigung bei zunehmender Passage festgestellt werden ($p = 0,362$; Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$). Bei fehlendem signifikanten Ergebnis im Friedman-Test wurde in diesem Fall kein anschließender Wilcoxon-Test durchgeführt.

Die Positivkontrollen (500 μM MMS) zeigten jeweils eine deutliche Schädigung mit einem OTM-Median von 6,97 gegenüber 0,81 bei den unbehandelten ASC. Der Wilcoxon-Test ergab hierbei eine signifikante Differenz ($p < 0,001$; Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

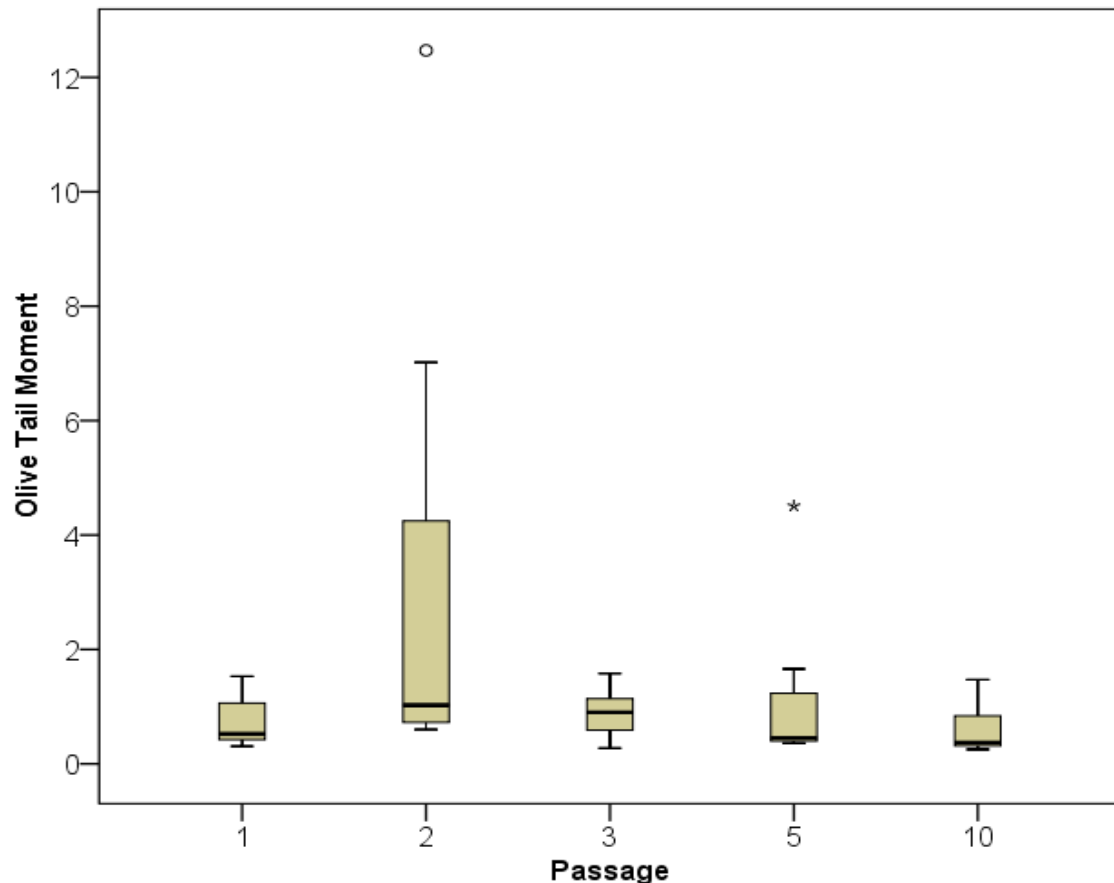


Abbildung 15: Ausmaß der DNA-Schädigung bei ASC in Abhängigkeit von der Passage, nachgewiesen mit der Einzelzellgelelektrophorese; n=8; waagrechter Strich: Median; obere/untere Boxbegrenzung: 75./25. Perzentile; T-Linien: min./max. Wert; ° : Ausreißer; * : Extremwert

3.2 Chromosomenaberrationstest

Der Chromosomenaberrationstest wurde ebenfalls mit ASC der Passage 1, 2, 3, 5 und 10 durchgeführt. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch auf numerische und strukturelle Aberrationen untersucht (siehe Abbildung 16). Aufgrund von Pilzkontaminationen konnten nicht alle Passagen von allen 8 Patienten ausgewertet werden. In Passage 2 und 5 kamen 7 der 8 Patienten zur Auswertung, bei Passage 10 nur 6 von initial 8 Patienten. Pro Patient und Passage wurden jeweils 50 Zellen ausgewertet, insgesamt also $8 \times 5 \times 50 = 2000$ = 1800 Zellen.

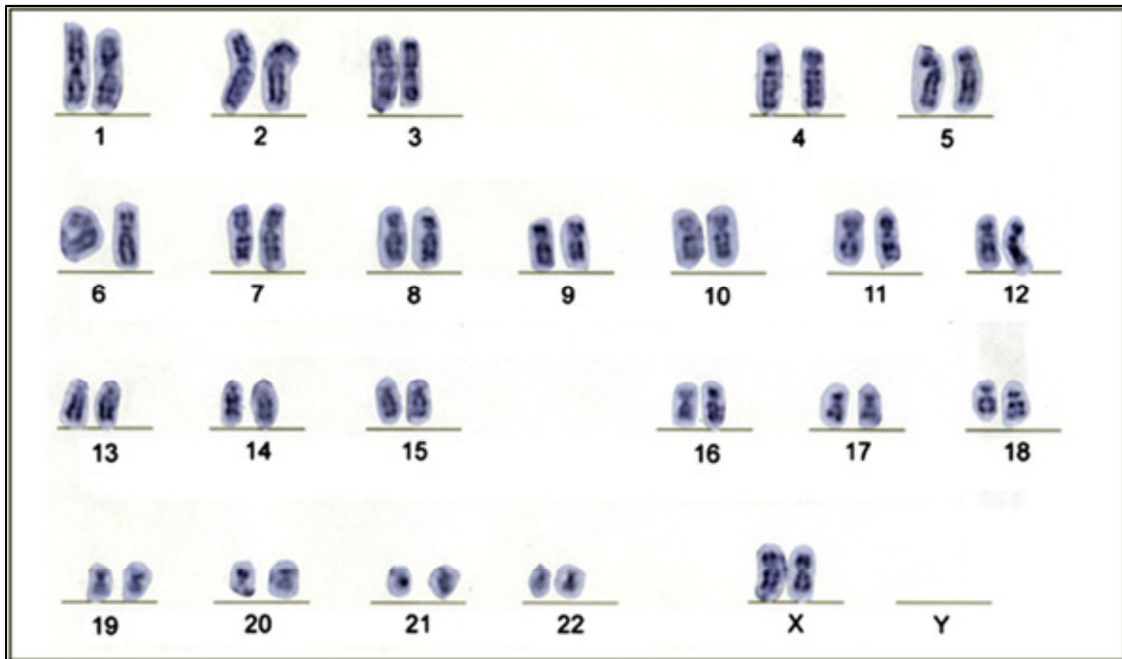


Abbildung 16: Metaphasechromosomen von ASC in Giemsa-Färbung; normaler weiblicher Karyotyp (Froelich et al. 2013).

Numerische Aberrationen (siehe Abbildung 17) konnten lediglich bei drei der untersuchten Zellen nachgewiesen werden, was einer Rate an numerischen Aberrationen von 0,17% entspricht. Bei Passage 2 eine Trisomie 9, bei Passage 5 eine Trisomie 10 und bei Passage 10 eine Trisomie 7. Diese drei Trisomien traten alle bei unterschiedlichen Patienten auf.

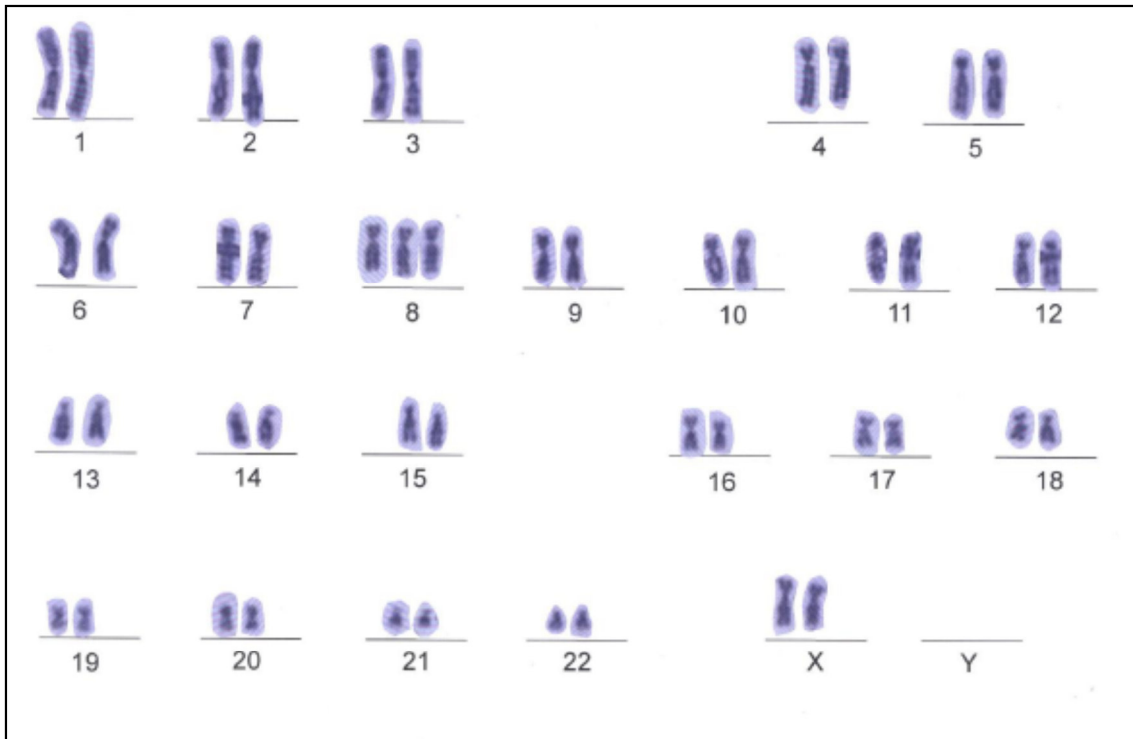


Abbildung 17: Beispiel einer Trisomie: Metaphasechromosomen von mit 200µM MMS behandelten ASC in Giemsa-Färbung mit einer Trisomie 8 (Froelich et al. 2013).

Strukturelle Aberrationen konnten deutlich mehr gefunden werden (siehe Abbildung 18 und 19). Ihre Häufigkeit in Abhängigkeit von der Passage wurde in Boxplots dargestellt (siehe Abbildung 20). Im Friedman-Test zeigte sich eine signifikante Zunahme der strukturellen Aberrationen mit zunehmender Passage ($p < 0,001$; Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

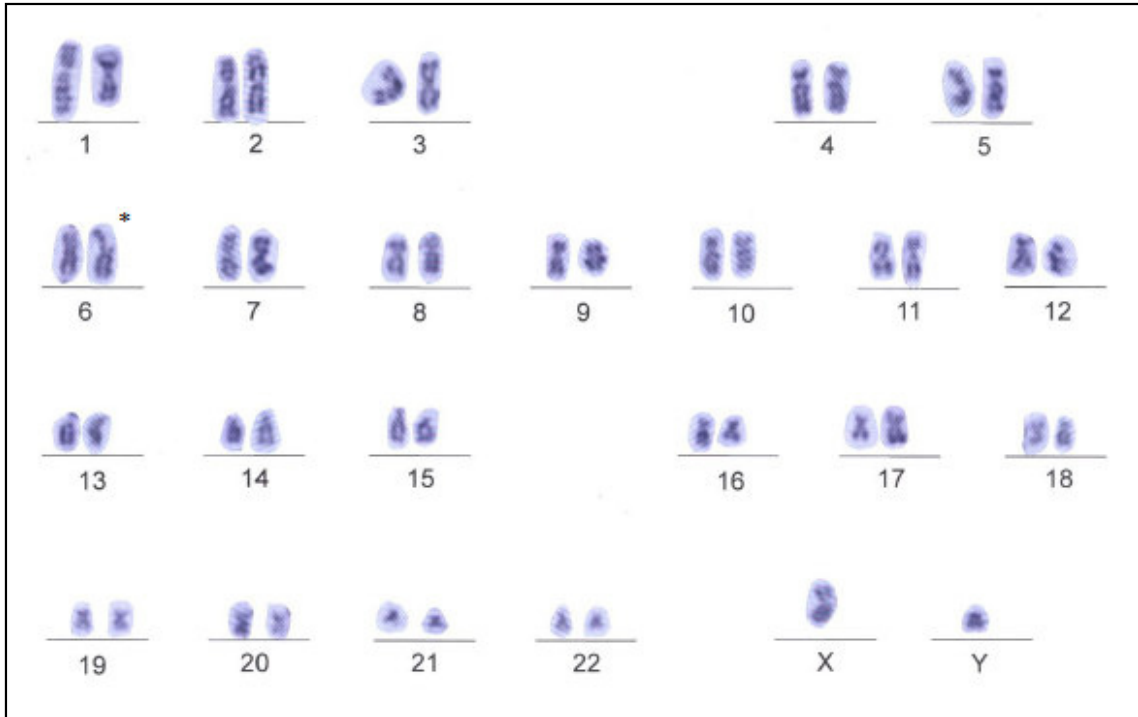


Abbildung 18: Metaphasechromosomen von ASC in Giemsa-Färbung mit Chromatidbruch von Chromosom 6 (*) (Froelich et al. 2013)

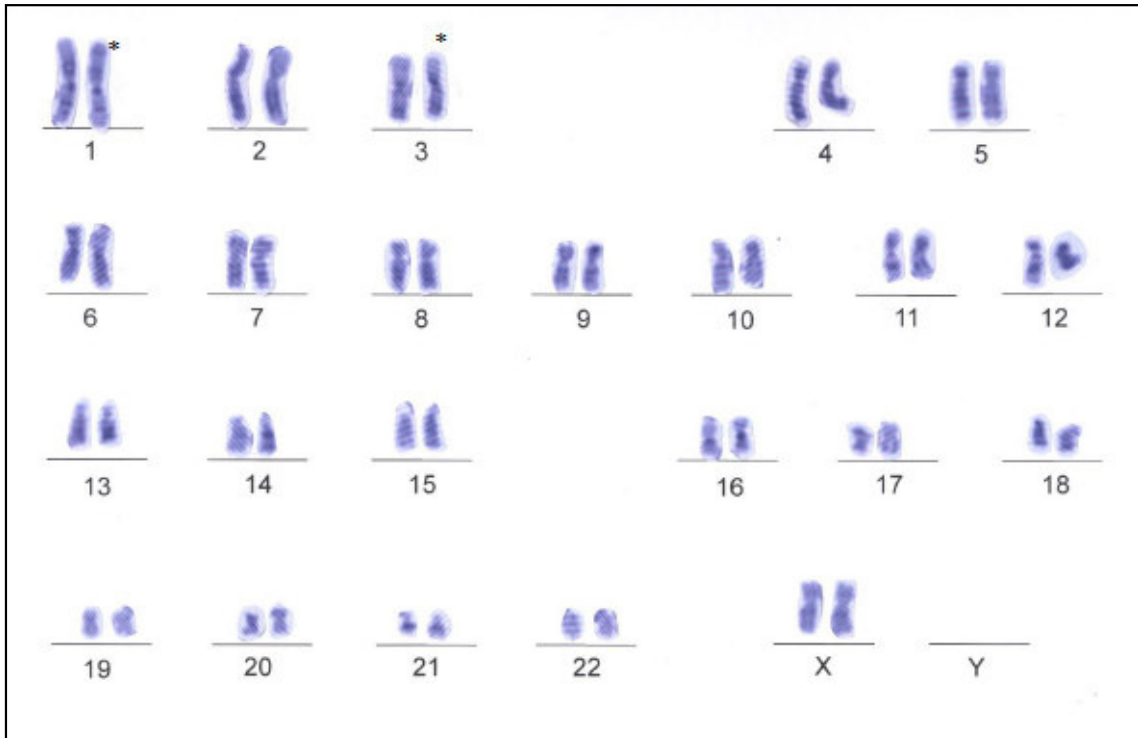


Abbildung 19: Metaphasechromosomen von ASC in Giemsa-Färbung mit Translokation von Chromosom 3 nach 1 (*) (Froelich et al. 2013)

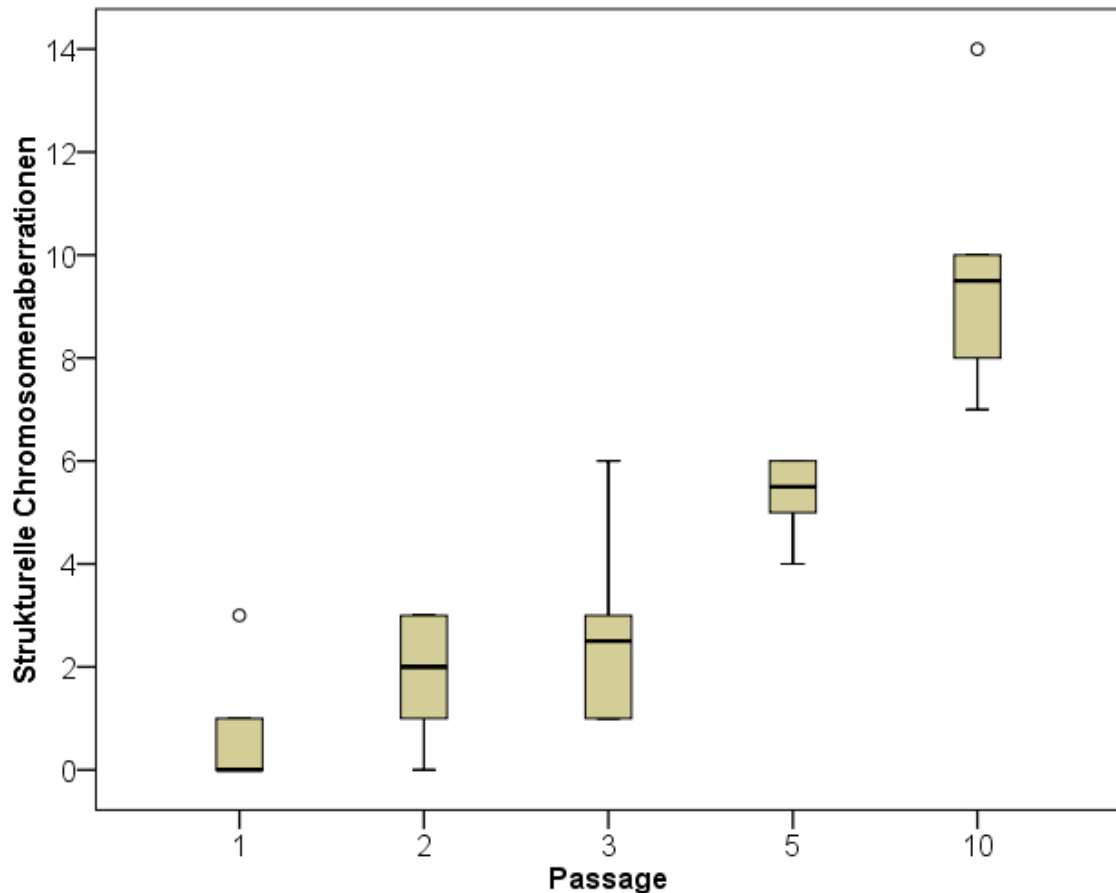


Abbildung 20: Strukturelle Chromosomenaberrationen bei ASC in Abhängigkeit von der Passage; n=8; Waagrechter Strich: Median; obere/untere Boxbegrenzung: 75./25. Perzentile; T-Linien: min./max. Wert; ° : Ausreißer

Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests wurde im Anschluss an den Friedman-Test genauer untersucht, an welcher Stelle es zu einer signifikanten Zunahme der strukturellen Aberrationen kam. Hierfür wurde der Median der Anzahl struktureller Aberrationen bei Passage 1 jeweils paarweise mit dem Median von Passage 2, 3, 5 und 10 verglichen. Das globale Signifikanzniveau α_{glob} wurde mittels Bonferroni-Holm-Korrektur angepasst. Es konnte dabei im Gegensatz zum Friedman-Test kein signifikantes Ergebnis nachgewiesen werden, da $p_1 > \alpha_1$ (siehe Tabelle 1).

Wilcoxon-Test	p-Wert	α lokal	Signifikanz
Passage 1 vs. Passage 2	0,129	0,05	Nein
Passage 1 vs. Passage 3	0,026	0,017	Nein
Passage 1 vs. Passage 5	0,017	0,013	Nein
Passage 1 vs. Passage 10	0,027	0,025	Nein

Tabelle 1: Paarvergleiche der Medianwerte der Anzahl struktureller Chromosomenaberrationen; das globale Signifikanzniveau α_{glob} liegt bei 0,05.

Die Positivkontrollen (200 μ M MMS) zeigten auch hier jeweils eine deutliche Schädigung mit einem Medianwert von 11,5 Aberrationen / 50 Zellen gegenüber 3 Aberrationen / 50 Zellen bei den unbehandelten ASC. Der Wilcoxon-Test ergab dabei eine signifikant erhöhte Aberrationsfrequenz ($p < 0,001$; Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

3.3 Mikrokerntest

3.3.1 Vorversuche

Im Rahmen der Erstellung einer Wachstumskurve zeigte sich nach 48 Stunden eine Verdopplung der absoluten Anzahl vitaler Zellen (siehe Abbildung 21).

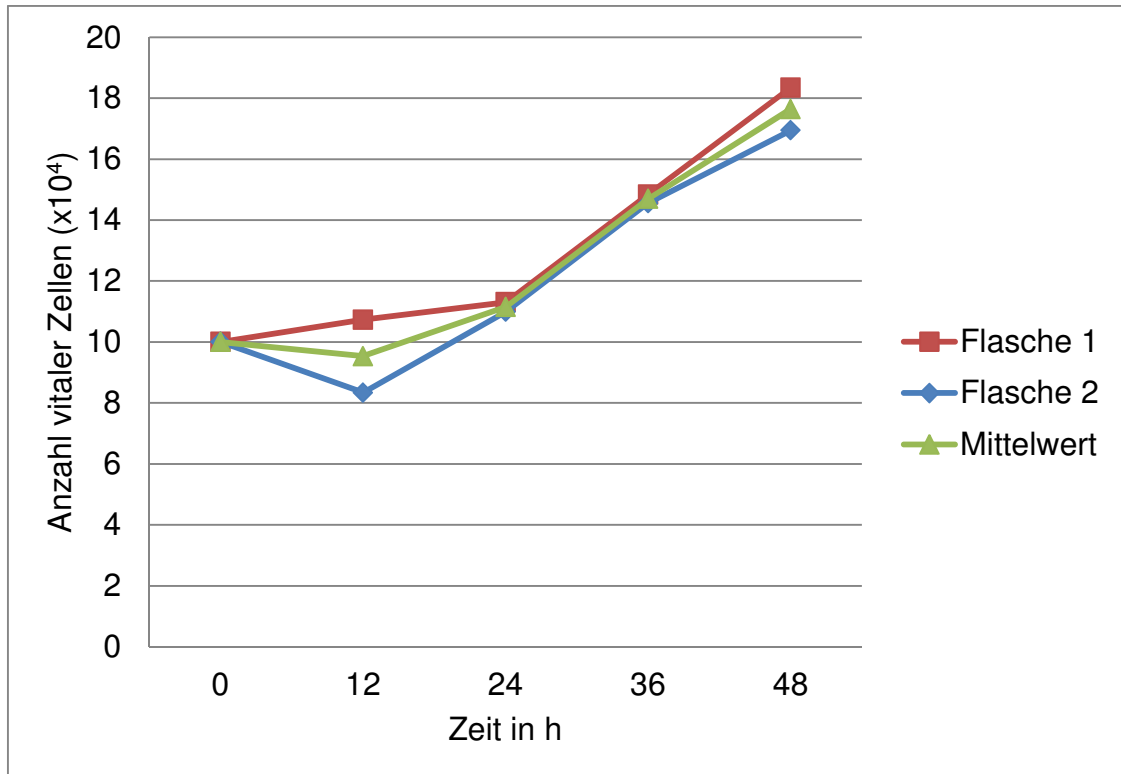


Abbildung 21: Wachstumsverhalten von ASC Passage 5

3.3.2 Hauptversuche

Es wurden auch hier Versuche mit ASC von 8 verschiedenen Patienten, jeweils mit Zellen der Passage 1, 2, 3, 5 und 10 durchgeführt. Aufgrund von Problemen bei der Anfertigung der Objektträger und konsekutiven Schwierigkeiten bei der mikroskopischen Auswertung wurden für die statistische Analyse nur die Ergebnisse von 6 Patienten berücksichtigt. Das Ausmaß der DNA-Schädigung wurde über die Rate an Mikrokernen ermittelt. Mit dem Friedman-Test wurde die Anzahl der Mikrokern in Passage 1, 2, 3, 5 und 10 verglichen. Dabei konnte keine signifikante Progression der DNA-Schädigung bei zunehmender Passage festgestellt werden ($p=0,406$).

Auch die Zellen der Positivkontrollen (200 μ M MMS) zeigten gegenüber den unbehandelten Zellen der jeweiligen Passage keine signifikant erhöhte Mikrokernfrequenz (im Wilcoxon-Test jeweils $p \geq 0,05$).

4. Diskussion

Seit ihrer Erstbeschreibung im Jahr 2001 (Zuk et al. 2001) werden aus Fettgewebe isolierte mesenchymale Stammzellen für die regenerative Medizin eingesetzt (Nicoletti et al. 2015). Ursächlich hierfür sind eine Reihe von Eigenschaften, welche diese Zellpopulation als optimalen Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer stammzellbasierter Therapien erscheinen lassen. Herausragende Merkmale der ASC sind hierbei ihre Pluripotenz und die niedrige Entnahmemorbidität (Lindroos et al. 2011). Insbesondere letztere stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber den mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks da. Die Untersuchung des klinischen Potentials von ASC ist bereits Gegenstand einer Vielzahl von Studien (Lim et al. 2014). Ungeachtet der vielversprechenden Ansätze und Entwicklungen gibt es jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt nur wenige und zum Teil auch widersprüchliche Untersuchungen im Hinblick auf die Sicherheit beim Einsatz von ASC im Menschen (Froelich et al. 2014). Dabei geht es insbesondere um die Frage, ob die zu transplantierenden mesenchymalen Stammzellen ein Wachstum von Neoplasien fördern oder sogar selbst den Ausgangspunkt für die Entwicklung von Malignomen darstellen könnten. Die maligne Transformation einer Zelle entsteht auf dem Boden einer Akkumulation mehrerer nichtletaler Genmutationen, welche durch genetische Instabilität und/oder den Einfluss externer Noxen begünstigt werden (Hanahan und Weinberg 2011). Mit dem Ziel, einen Beitrag für die Sicherheit bei der Anwendung von mesenchymalen Stammzellen im Tissue Engineering zu leisten, wurden in dieser Arbeit über einen Zeitraum von 10 Passagen *in vitro* kultivierte ASC mit drei verschiedenen Methoden hinsichtlich ihrer genetischen Stabilität untersucht.

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Comet Assay

Die alkalische Einzelzellgelelektrophorese ermöglicht die Messung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen, DNA-DNA-Addukten, DNA-Protein-Addukten sowie Reparaturschnitten auf Einzelzellebene (Tice et al. 2000). Sie ist ein sehr sensitiver Test für die Detektion von oben genannten DNA-Schädigungen und wurde in ihrer jetzigen Form bereits 1988 von Singh et al. etabliert (Singh et al. 1988). Vorzüge sind niedrige Kosten der eingesetzten Materialien und eine relativ einfache und rasche Durchführbarkeit. Außerdem kann der Comet Assay mit theoretisch allen eukaryoten Zellen durchgeführt werden, wobei für den einzelnen Versuch jeweils nur eine geringe Menge Zellen benötigt wird (Tice et al. 2000). Dies hat dazu geführt, dass der Comet Assay eine große Verbreitung gefunden hat. Neben Genotoxizitätstestungen, wo er einen der Standardtests darstellt (Hartmann et al. 2003) wird er auch zur Überwachung von Ökosystemen eingesetzt (Dixon et al. 2002). Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet ist das klinische Biomonitoring, wobei beispielsweise die Toxizität von Chemotherapeutika erfasst werden kann (McKenna et al. 2008). Ungeachtet der vielen Vorzüge und Anwendungsgebiete gibt es kritische Punkte, die bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden müssen. Dies betrifft zum Einen die Auswertung des Versuchs. Als Maß für die Schädigung dient das Olive Tail Moment (Olive und Banath 1993). Dieses ist das (dimensionslose) Produkt der Länge des Schweifes mit dem relativen Anteil an DNA im Schweif. Das OTM wird zwar durch die Auswertungssoftware (Komet 5.5, Kinetic Imaging) berechnet, die Werte sind jedoch abhängig von den Einstellungen am Fluoreszenzmikroskop und der Software. Aus diesem Grund können Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen nicht vorbehaltlos miteinander verglichen werden. Auch in der Versuchsdurchführung bestehen Unterschiede zwischen einzelnen Laboren, beispielsweise die Dauer der Elektrophorese und die dabei anliegende Stromstärke betreffend (Faust et al. 2004). Aus diesen Gründen sollten Aussagen zum Ausmaß des Schadens nur mit Vorsicht getroffen und eventuell durch das Mitführen einer Referenzprobe verifiziert werden (Albertini et al.

2000). Nichtsdestotrotz kann anhand der im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Daten, die aus identisch durchgeführten Versuchen stammen, eine valide Aussage über eine eventuelle Progression der DNA-Instabilität getroffen werden.

Selbst wenn jedoch mit dem Comet Assay Schäden an der DNA gefunden werden, so muss dies nicht zwangsläufig negative Auswirkungen auf den Organismus haben. Zellen verfügen über effektive Reparatur- und Kontrollmechanismen wie zum Beispiel das p53-Protein, die eventuelle DNA-Schäden beheben oder, wenn dies nicht möglich ist, die Apoptose einleiten (vgl. hierzu auch Kapitel 1.5 „Karzinogenese“). Deshalb hat nicht automatisch jede Schädigung des Genoms Mutationen wie beispielsweise Chromosomenaberrationen zur Folge. Weiterhin können mit dem Comet Assay keine Aussagen über den Ort der Genschädigung getroffen werden, hierfür werden weiterführende Untersuchungen benötigt.

4.1.2 Chromosomenaberrationstest

Auch der Chromosomenaberrationstest ist ein bewährtes und weit verbreitetes genotoxikologisches Testverfahren (Miller et al. 1998). Dabei werden strukturelle und quantitative Veränderungen der Chromosomen lichtmikroskopisch erfasst. Häufig wird der Test mit Ovarial- und Lungenzellen des chinesischen Hamsters durchgeführt, da diese auf Grund ihrer kurzen Generationszeit, ihrer kleinen Anzahl an Chromosomen und des stabilen Karyotyps gut dafür geeignet sind (Bradley et al. 1981). Auch Lymphozyten werden gerne verwendet, da hier der Vorteil der besseren Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen besteht (Preston et al. 1987). Bei dieser Arbeit wurde der Chromosomenaberrationstest mit humanen ASC durchgeführt. Dabei wurden sowohl das quantitative Ausmaß als auch die Art der Aberrationen als Indikator für genetische Instabilität herangezogen.

Chromosomenaberrationen als Folge genetischer Instabilität, gestörter Reparaturmechanismen oder exogener Noxen können zur malignen Transformation einer Zelle führen. In vielen malignen Tumorzellen können konsequenter Weise strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen

gefunden werden (Pfeiffer et al. 2000). Prominentestes Beispiel ist in diesem Zusammenhang sicherlich das „Philadelphia-Chromosom“, das bei 90-95% der chronisch myeloischen Leukämien gefunden wird. Hier kommt es durch Chromosomenbruch zu einer Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22. Dadurch entsteht auf Chromosom 22 das BCR-ABL-Gen, welches dann für eine konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase kodiert. Diese wiederum beeinflusst verschiedene Signalwege in der Zelle, was zu gesteigerter Proliferation und Tumorprogression führt (Seong et al. 1998). Der Chromosomenaberrationstest ist somit eine gute Möglichkeit, potentiell maligne Zellen zu entdecken. Allerdings werden die zu untersuchenden Zellen nur lichtmikroskopisch beurteilt. Dadurch kann zwar eine eindeutige Aussage über numerische Aberrationen getroffen werden, bei strukturellen Aberrationen sind die Ergebnisse jedoch nicht so eindeutig, da es ohne weiterführende molekularbiologische Untersuchungen nicht möglich ist, maligne Mutationen eindeutig zu identifizieren. Wie auch der Comet Assay eignet sich der Chromosomenaberrationstest also sehr gut als Screeningmethode und gleichermaßen kann eine valide Aussage über eine eventuelle Progression der genetischen Instabilität mit zunehmender Passage getroffen werden. Ob die gefundenen Aberrationen jedoch bereits maligner Natur oder lediglich Indikatoren für ein erhöhtes Risiko für eine maligne Transformation sind, muss mit weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

4.1.3 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest wurde bisher noch nicht mit ASC durchgeführt. Zur Etablierung war es zunächst nötig, eine Wachstumskurve der ASC zu erstellen sowie die optimale Menge und Dauer der Behandlung mit Cytochalasin-B (Cyt-B) zu ermitteln. Es konnte eine Rate an doppelkernigen Zellen von durchschnittlich 30% erreicht werden. Aufgrund der von uns ermittelten Wachstumskurve ist davon auszugehen, dass sich die ASC innerhalb von 48 Stunden verdoppeln und somit durch die Zugabe von Cyt-B über einen Zeitraum von 48 h grundsätzlich ein hoher Prozentsatz doppelkerniger Zellen erreicht werden könnte. Eine relative Anzahl von im Schnitt zwischen 25 und

30% doppelkerniger Zellen lässt jedoch darauf schließen, dass durch die Zugabe von Cyt-B ein zytostatischer Effekt gegeben ist. Da die Rate an nekrotischen Zellen nur sehr gering war, ist davon auszugehen, dass weder Cyt-B noch MMS in den in Kapitel 2 angeführten Konzentrationen einen zytotoxischen Effekt auf die ASC hatten.

Eine höhere Teilungsrate könnte eventuell durch die Wahl eines anderen Nährmediums erreicht werden. So konnte in Untersuchungen von Lindroos et al. durch die Kultivierung mit dem Serum-freien Medium „StemPro® MSC SFM XenoFree“ (Life Technologies GmbH, Darmstadt) eine signifikant höhere Proliferationsrate erzielt werden (Lindroos et al. 2009). Eine weitere, eventuell noch effektivere Modifikation findet sich in einer Arbeit von Cornelio et al., in welcher der Mikrokerntest zum ersten Mal mit mesenchymalen Stammzellen aus Nabelschnurblut durchgeführt wurde. Im Zuge der Kultivierung in 6-Well-Platten zeigte sich hierbei, dass diese Zellen bevorzugt im Zentrum der Platte wuchsen. Dies wiederum hatte zur Folge, dass der Konfluenzgrad dort deutlich anstieg, was die Zellen empfindlicher für die Wirkung von Cyt-B machte. Die Konsequenzen waren morphologische Veränderungen und eine erhöhte Rate an abgestorbenen Zellen. Cornelio et al. kultivierten die Zellen aus diesem Grund in kleinen Zellkulturflaschen, was eine geringere Zelldichte, eine deutlich gesteigerte Proliferationsrate und letztendlich eine signifikant höhere Zahl an doppelkernigen Zellen zur Folge hatte (Cornelio et al. 2013). In unserer Arbeit wurden die ASC für den Mikrokerntest in 6-Well-Platten kultiviert. Dabei waren bei einem Teil der Zellen nach der Cyt-B Inkubation ähnliche morphologische Veränderungen im Sinne eines bäumchenartig verzweigten Aspekts zu sehen wie bei der Arbeit von Cornelio et al. Aus diesem Grund sollte auch für den Mikrokerntest mit ASC die Kultivierung in 25cm²-Zellkulturflaschen anstelle von 6-Well-Platten in Erwägung gezogen werden.

Als größtes Problem bei der Auswertung stellte sich jedoch der Umstand heraus, dass die mit MMS behandelten ASC der Positivkontrolle zum Teil eine ähnliche oder niedrigere Mikrokernrate als die unbehandelten Zellen aufwiesen und nur in einem Teil der Versuche eine signifikant höhere. Sowohl beim Comet Assay als auch beim Chromosomenaberrationstest wies die mit MMS

behandelte Positivkontrolle jeweils eine signifikant höhere Schädigung auf als die Negativkontrolle. Dies beweist das DNA-schädigende Potential von MMS gegenüber den ASC. Die Probleme, welche im Rahmen des Mikrokerntests auftraten, scheinen somit eher in der MMS-Konzentration und Behandlungsdauer begründet zu sein. Beim Comet-Protokoll wurden die Zellen eine halbe Stunde mit MMS in einer Konzentration von 500 μ M inkubiert und danach sofort fixiert, beim Chromosomenaberrationstest 17 Stunden in einer Konzentration von 200 μ M, bevor auch hier sofort die Fixierung erfolgte. Beim Mikrokerntest betrug die MMS-Inkubationsdauer lediglich 2 Stunden bei einer Konzentration von 200 μ M. Nach dieser 2-stündigen Exposition mit dem klastogenen Agens wurde das Nährmedium gewechselt, Cyt-B dazugegeben und die Zellen für 48 Stunden kultiviert. Hierbei ist nun zunächst die MMS-Konzentration zu diskutieren. In einer Arbeit mit Lymphozyten von Speit et al. wurde für den Comet Assay eine signifikante DNA-Migration und somit Schädigung bereits für eine Konzentration von 20 μ M MMS nachgewiesen, während beim Mikrokerntest bis zu einer Konzentration von 240 μ M keine signifikante Zunahme der Mikrokernfrequenz detektierbar war. Ein eindeutiger Mikrokern-induzierender Effekt konnte erst bei einer Konzentration von 420 μ M nachgewiesen werden (Speit et al. 2012). Eine mögliche Erklärung für die nicht signifikant erhöhte Zahl an Mikrokernen in der Positivkontrolle könnte also die zu niedrig gewählte MMS-Konzentration sein.

Bei genauerer Betrachtung und Vergleich der zeitlichen Abstände muss insbesondere auch der lange postexpositionelle Zeitraum kritisch analysiert werden. So konnte in einer Arbeit von Andreoli et al. mit Lymphozyten gezeigt werden, dass eine durch MMS in Konzentrationen zwischen 140 und 210 μ M zugefügte DNA-Schädigung innerhalb von ca. 16 Stunden nahezu vollständig repariert wurde und somit nicht zu einer Mikrokern-Induktion führte. Betrachtet man die Ergebnisse von Andreoli et al. genauer, so zeigt sich, dass hier mit einer Konzentration von 200 μ M MMS eine ähnlich niedrige Rate an Mikrokernen erzielt wurde (Andreoli et al. 1999) wie in unseren Versuchen. Die Berücksichtigung der DNA-Reparatur-Kapazität der ASC ist sicher ein entscheidender Punkt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass diese

bei Stammzellen im Vergleich zu differenzierten Zellen erhöht ist, insbesondere, was die Fähigkeit zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen betrifft (Chen et al. 2006; Fan et al. 2011; Luo et al. 2012; Oliver et al. 2013).

Grundsätzlich muss angesichts der nicht-signifikanten Ergebnisse diskutiert werden, ob in der oben beschriebenen Versuchsanordnung MMS die geeignete Positivkontrolle darstellt. Auch Speit et al. beschreiben in ihrer oben angeführten Arbeit eine Insensitivität des Mikrokerntests gegenüber Klastogenen wie MMS, die vor allem DNA-Addukte, nicht aber direkt Doppelstrangbrüche oder chromosomale Aberrationen verursachen (Speit et al. 2012). Um diesem Problem zu begegnen, empfehlen Fenech et al. eine modifizierte Version des Mikrokerntests (Fenech und Kirsch-Volders 2013). In diesem Protokoll werden die Zellen zusätzlich mit dem Nukleosidanalogon Cytarabin (Ara-C) behandelt, einem Antimetaboliten im Rahmen der DNA-Synthese und gleichzeitig potenten Inhibitor der Basenexzisionsreparatur. Die zusätzliche Inkubation mit Ara-C führt dazu, dass die durch Behandlung mit MMS entstandenen DNA-Läsionen von der Zelle nicht mehr repariert werden können (Preston und Gooch 1981). In der Folge kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Anzahl von Einzelstrangbrüchen. Diese werden im Rahmen der DNA-Synthese in Doppelstrangbrüche und azentrische Chromosomenfragmente überführt. Somit führt die Applikation von Ara-C letztendlich zu einer deutlichen Steigerung der Mikrokernbildung (Fenech 1993).

Als Konsequenz der oben angeführten Überlegungen ist es notwendig, den Mikrokerntest mit ASC weiter zu modifizieren, um eine höhere Rate an doppelkernigen Zellen zu erhalten und insbesondere die Mikrokernfrequenz der Positivkontrolle zu steigern. Möglichkeiten, die Proliferationsrate zu verbessern sind beispielsweise die Verwendung des oben genannten „StemPro® MSC SFM XenoFree“-Mediums, die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen, die in einer Studie von Yamamoto et al. eine signifikant gesteigerte Proliferationsrate zur Folge hatte (Yamamoto et al. 2013) oder die Kombination der beiden Ansätze (Yang et al. 2012). Der einfachste und effektivste Ansatz scheint jedoch der Austausch der 6-Well-Platten gegen 25cm²-Zellkulturflaschen zu sein, weil hier bei entsprechender Wahl der Zellzahl ein

gleichmäßiges Wachstum bei niedrigem Konfluenzgrad gewährleistet werden kann. Zur Verbesserung der Positivkontrolle gibt es im Wesentlichen drei verschiedene Möglichkeiten. Die erste ist die Steigerung der MMS-Konzentration, wobei hier jedoch die potentiell zytostatischen und zytotoxischen Effekte hoher MMS-Konzentrationen berücksichtigt werden müssen. Die zweite Möglichkeit ist die Durchführung des Mikrokerntests unter Hinzunahme von Ara-C gemäß dem von Fenech 2007 vorgeschlagenen Protokoll (Fenech 2007). Eine dritte Möglichkeit ist der Austausch von MMS gegen Mitomycin-C, einem Zytostatikum, welches zur DNA-Quervernetzung führt und einen potenten Induktor von Mikrokernen darstellt (Speit et al. 2012). In der Arbeit von Cornelio et al. führte der Einsatz von Mitomycin-C jedoch nicht zu einer gesteigerten Rate von Mikrokernen, stattdessen zu einer gesteigerten Rate von Nukleoplasmabrücken (Cornelio et al. 2013). Dieser Umstand unterstreicht die These der im Vergleich zu differenzierten Zellen erhöhten DNA-Reparaturkapazität von Stammzellen, insbesondere, was die Reparatur von Doppelstrangbrüchen betrifft. Zieht man die vorangegangenen Überlegungen in Betracht, so scheint der effektivste Ansatz im Hinblick auf die Mikrokernelfrequenz das Ara-C-Protokoll unter Verwendung von Mitomycin-C als Positivkontrolle zu sein. Hierbei werden die zellulären DNA-Reparaturmechanismen effektiv gehemmt, sodass dadurch eine hohe Zahl an Doppelstrangbrüchen als Ausgangspunkt für die Mikrokernelbildung induziert werden kann.

Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnten nur 6 von 8 Zellreihen ausgewertet werden. Bei zwei Zellreihen war die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ab Passage 3 nicht durchführbar. Die Ursache hierfür liegt am ehesten in Problemen bei der Anfertigung der Objektträger und dem zeitlichen Abstand von der Anfertigung bis zur Auswertung. Von jeder zu untersuchenden Passage wurden jeweils 2 Objektträger angefertigt. Nachdem die Zellen mittels Zytocentrifugation auf den ersten Objektträger aufgebracht worden waren, wurden sie unter dem Lichtmikroskop untersucht. Hierdurch konnte eine Beurteilung der Zelldichte und des Zellbildes vorgenommen und die Zellkonzentration für den zweiten Objektträger entsprechend adjustiert werden.

Während jedoch die Zelldichte lichtmikroskopisch gut beurteilt werden kann, ist dies im Hinblick auf die Qualität des später gefärbten Zellbildes nur begrenzt möglich. Ergab sich lichtmikroskopisch bereits das Bild vieler nekrotischer Zellen und Zelldebris, bestand zu diesem Zeitpunkt die Möglichkeit, mit Zellen einer weiteren Flasche der selben Passage einen Mikrokerntest durchzuführen. Immer wieder kam es jedoch zu der Situation, dass die lichtmikroskopische Kontrolle ein hinreichend gutes Ergebnis zeigte, in der Färbung jedoch zu wenige Zellen in ausreichend guter Qualität zu sehen waren. In diesem Fall konnten nicht die im Protokoll geforderten 1000 Zellen und 1000 doppelkernige Zellen ausgezählt werden. Wurde nicht direkt im Anschluss an die Zytozentrifugation sondern erst einige Tage später gefärbt, waren die anderen Zellen schon passagiert. Zurückgehaltene Flaschen der selben Passage wie im fehlgeschlagenen Versuch waren dann in der Regel schon verworfen, da ein zu hoher Konfluenzgrad erreicht worden war. Somit blieb der jeweilige Versuch letztendlich ohne Ergebnis. Als Konsequenz muss in zukünftigen Versuchen die fluoreszenzmikroskopische Auswertung so früh wie möglich erfolgen, damit im Fall einer schlechten Qualität des Zellbildes noch Zellen für einen erneuten Versuch zur Verfügung stehen.

4.1.4 Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Testverfahren

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden diskrepante Ergebnisse im Bezug auf die genetische Stabilität der ASC gefunden. Mit dem Comet Assay und dem Mikrokerntest konnte auch bei Passage 10 keine signifikante Schädigung des Genoms nachgewiesen werden. Beim Chromosomenaberrationstest zeigte sich eine signifikante Zunahme insbesondere an strukturellen Chromosomenaberrationen im Friedman-Test, der Wilcoxon-Test erbrachte kein signifikantes Ergebnis. Dabei muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die jeweiligen Versuche unterschiedliche genetische Endpunkte messen, die wiederum durch zelleigene DNA-Reparaturmechanismen beeinflusst werden. Diese Reparaturmechanismen sind notwendig, weil das Genom von Zellen permanent endogenen und exogenen Noxen ausgesetzt ist. Eines der wichtigsten endogenen Beispiele sind dabei freie Sauerstoffradikale (van Gent et al. 2001).

Als Folge entstehen immer wieder DNA-Schäden wie zum Beispiel Basenfehlpaarungen, Einzel- oder Doppelstrangbrüche. Zur Behebung dieser Schäden besitzen Zellen Mechanismen wie die Nukleotid-Exzisions-Reparatur, die Mismatch-Reparatur oder die Replikationsreparatur.

Stellt man sich nun die Frage, welche Ergebnisse mit dem Chromosomenaberrationstest gefunden werden können, so sind Doppelstrangbrüche und ihre Reparatur von besonderem Interesse, da sie heute als ursächlich für strukturelle Chromosomenaberrationen angesehen werden (Pfeiffer et al. 2004). Doppelstrangbrüche können durch exogene Einflüsse wie zum Beispiel ionisierende Strahlung entstehen. Auch endogene Prozesse wie die DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus sind weitere wichtige Ursachen. Zur Beseitigung von Doppelstrangbrüchen stehen im Wesentlichen zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die homologe Rekombination und die nicht-homologe Endverknüpfung. Bei der homologen Rekombination werden Doppelstrangbrüche mit Hilfe einer homologen Matrize repariert. Sie findet also hauptsächlich in der G2-Phase des Zellzyklus statt, wenn das Genom bereits verdoppelt ist und somit ein intaktes homologes Schwesterchromosom zur Verfügung steht. Die nicht-homologe Endverknüpfung ist in allen Phasen des Zellzyklus möglich, da hierfür keine homologe Matrize benötigt wird. Dabei werden offene DNA-Enden miteinander verknüpft. Da keine homologe Matrize verwendet wird, ist dieses Verfahren jedoch deutlich fehleranfälliger als die homologe Rekombination. Wenn beispielsweise die Enden zweier unterschiedlicher Chromosomen miteinander verknüpft werden, entsteht auf diese Weise eine Chromosomentranslokation (Pfeiffer et al. 2004).

Die oben genannten Reparaturvorgänge laufen permanent in allen eukaryoten Zellen ab, sodass ein hohes Maß an genetischer Stabilität gewährleistet werden kann. Konsequenter Weise bleibt dadurch bei gesunden Zellen die Anzahl parallel vorhandener, nicht-reparierter und somit instabiler DNA-Läsionen über die Zeit gesehen relativ konstant. Dies wiederum hat zur Folge, dass der Comet Assay keine signifikante Progression des genetischen Schadens mit zunehmendem Alter der Zelle beziehungsweise zunehmender Passage anzeigt,

da er nur die jeweils zum Zeitpunkt der Zellfixierung vorhandenen, zu Instabilität führenden Genomläsionen detektiert (Strangbrüche, alkalilabile Stellen, DNA-DNA- und DNA-Protein-Addukte, inkomplette Reparaturschnitte). Voraussetzung ist dabei natürlich, dass die zellulären Reparaturmechanismen auch mit zunehmender Passage intakt bleiben. Selbst wenn es mit zunehmendem Alter bzw. Passage zu einer steigenden Frequenz instabiler DNA-Abschnitte kommt, sind Zellen, deren Reparaturmechanismen intakt sind, in der Lage, diese instabilen Bereiche in einen stabilen Zustand zu überführen. Dies hat zur Folge, dass der Comet-Assay die mit steigendem Alter zunehmend auftretenden Instabilitäten nicht detektiert. Die Ergebnisse des Chromosomenaberrationstests weisen jedoch darauf hin, dass mit zunehmender Reparaturfrequenz auch die Fehlerquote steigt, was eine Erklärung für die gefundenen Ergebnisse darstellt. Hierzu passende Ergebnisse wurden auch von einer anderen Gruppe gefunden, die Fettgewebstammzellen und Knochenmarkstammzellen von Passage 3-11 untersuchten und ebenfalls keine signifikante Veränderung des Olive Tail Moment feststellten (Nikitina et al. 2011). Die Abhängigkeit der Ergebnisse des Comet Assay von zellulären Reparaturmechanismen wurde darüber hinaus bereits von anderen Gruppen beschrieben. Sowohl Singh et al. als auch Giannotti et al. konnten zeigen, dass das Ausmaß der DNA-Migration in der Elektrophorese mit zunehmender postexpositioneller Inkubationszeit abnahm. Die initialen Läsionen wurden also rasch repariert und dann nicht mehr im ursprünglichen Ausmaß vom Comet Assay detektiert (Singh et al. 1988; Giannotti et al. 2002). Ebenso wenig ist der Comet Assay in der Lage, numerische Aberrationen zu entdecken, da die DNA der einzelnen Chromosomen an sich durch numerische Aberrationen nicht instabiler wird. Die Abhängigkeit der Ergebnisse des Comet Assays und des Mikrokerntests von zellulären Reparaturmechanismen ist bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit um so mehr zu berücksichtigen, als es sich dabei um Versuche mit mesenchymalen Stammzellen handelt. Diese weisen gegenüber ausdifferenzierten Zellen eine gesteigerte DNA-Reparaturkapazität auf, welche bereits in Kapitel 4.1.3 erläutert wurde.

Mit dem Chromosomenaberrationstest hingegen können sowohl numerische Aberrationen als auch die Folgen von Fehlreparatur, also Aberrationen und Translokationen, beobachtet werden. Unter Zugrundelegung der gefundenen Ergebnisse ist anzunehmen, dass sowohl durch fehlerhafte Reparatur entstandene DNA-Aberrationen als auch numerische Aberrationen mit steigender Passage zunehmen. Dies kann mit Hilfe des Chromosomenaberrationstests nachgewiesen werden kann.

Die Diskrepanz der gefundenen Ergebnisse spiegelt sich auch in der Literatur wieder. Dabei konnten bei einem Teil der Arbeiten auch nach exzessiver *in vitro* Expansion humaner mesenchymaler Stammzellen keine Anhaltspunkte für genetische Instabilität gefunden werden. Bernardo et al. beispielsweise führten Untersuchungen an humanen Knochenmarksstammzellen durch und fanden weder chromosomale Aberrationen noch eine erhöhte Telomeraseaktivität (Bernardo et al. 2007). Grimes et al. sowie Meza-Zepeda et al. verglichen kultivierte humane ASC mit unkultivierten und fanden keine bzw. ihrer Meinung nach vernachlässigbare Unterschiede in Bezug auf die genetische Stabilität (Meza-Zepeda et al. 2008; Grimes et al. 2009). Andere Arbeitsgruppen hingegen wiesen bei der *in vitro* Kultivierung humaner MSC spontane Aneuploidien nach, beispielsweise von Chromosom 8 (Bochkov et al. 2008; Nikitina et al. 2011). Bei der Untersuchung muriner MSC konnte gezeigt werden, dass es bei *in vitro* kultivierten mesenchymalen Stammzellen ebenfalls zu einer erhöhten Frequenz an chromosomalen Aberrationen kommen kann. Dabei wurden sowohl Aneuploidien als auch Translokationen gefunden. Josse et al. führten Untersuchungen an murinen BMSC durch und fanden eine hohe Rate an chromosomalen Aberrationen (Josse et al. 2010). Auch Miura et al. konnten hochgradige chromosomale Aberrationen bei *in vitro* kultivierten murinen BMSC nachweisen. Des Weiteren fanden sie eine erhöhte Telomerase-Aktivität und eine gesteigerte c-myc-Expression. Die so transformierten Zellen waren *in vivo* in der Lage, Fibrosarkome zu induzieren (Miura et al. 2006). Die im Vorangegangenen angeführten Arbeiten zeigen jedoch auch, dass murine MSC deutlich anfälliger für genetische Aberrationen zu sein scheinen als humane MSC.

Zusammenfassend kann somit anhand unserer Ergebnisse sowie unter Berücksichtigung der Literatur festgehalten werden, dass eine Zunahme der genomischen Instabilität mit steigender Passage bei der *in vitro* Expansion von MSC nicht ausgeschlossen werden kann. Gleichwohl darf genomische Instabilität jedoch nicht mit zwangsläufiger maligner Transformation gleichgesetzt werden. Entscheidend für eine solche Transformation ist hingegen vielmehr, welche Orte des Genoms irreversibel verändert sind. Während viele Aberrationen zum Untergang der betroffenen Zelle führen, können einige wenige, wie beispielsweise der Verlust von Tumorsuppressorgenen, zu malignem Wachstum führen. Vor einem Einsatz von MSC im Menschen ist es also von entscheidender Bedeutung, malignitätsinduzierende oder -fördernde Mutationen ausschließen zu können. Welche Mutationen diesbezüglich besonders beachtet werden müssen, zeigt eine wegweisende Arbeit von Vogelstein et al. In dieser Arbeit wurde eine Metaanalyse der Ergebnisse von Untersuchungen der Genome einer Vielzahl unterschiedlicher Tumore durchgeführt. Mit Hilfe dieser Daten konnten ca. 140 in diesem Zusammenhang entscheidende Gene, sogenannte „Driver“ Gene identifiziert werden. Obwohl unterschiedliche Tumore eine große Zahl an individuellen Mutationen aufweisen, scheinen über alle Tumorentitäten hinweg gesehen nur die ca. 140 „Driver“ Gene entscheidend für die Entstehung eines malignen Tumors zu sein, wobei der typische Tumor nicht mehr als acht dieser entscheidenden Mutationen aufweist (Vogelstein et al. 2013). Unter Zugrundelegung dieses Wissens könnten somit bei Bedenken bezüglich der genetischen Stabilität der eingesetzten Zellen weitere Tests durchgeführt werden, mit Hilfe derer spezifische Mutationen ausgeschlossen werden könnten.

4.2 Mehr Sicherheit durch weiterführende Untersuchungen

Wie bereits beschrieben eignen sich Comet Assay und Chromosomenaberrationstest gut als Screeningmethoden zum Nachweis genetischer Instabilität. Zum sicheren Ausschluss von Malignität sollten die beim Tissue Engineering eingesetzten Zellen jedoch noch genauer auf genetische Aberrationen untersucht werden. Mittels mutationsspezifischer PCR können die Zellen beispielsweise auf bestimmte Mutationen untersucht werden, die bei der Malignomentstehung eine entscheidende Rolle spielen. Da 80-90% aller Tumorzellen eine erhöhte Telomeraseaktivität aufweisen (Chen und Chen 2011), wäre ein weiterer sinnvoller Test beispielsweise die Messung der Telomeraseaktivität in den eingesetzten Zellen. Die relativ grobe, lichtmikroskopische Untersuchung von Chromosomen kann darüber hinaus ergänzt werden durch zytogenetische Methoden wie der spektralen Karyotypisierung. Diese ermöglicht eine feinere Analyse der Chromosomenstruktur und somit die Detektion von Aberrationen, die lichtmikroskopisch nicht erkannt werden können (Imataka und Arisaka 2012). Auch dieses Verfahren ist jedoch in seiner Auflösung begrenzt, sodass weitere Methoden wie die molekulare Karyotypisierung („array comparative genomic hybridization“, array-CGH) eingesetzt werden könnten. Hierbei wird der zu untersuchende Chromosomensatz mit einem Referenzchromosomensatz auf submikroskopischer, molekularer Ebene verglichen, wodurch auch kleine Mikrodeletionen oder Duplikationen entdeckt werden (Tonnie et al. 2001).

Ein anderer Ansatz ist die Durchführung eines „Soft Agar Assays“, einem der wichtigsten Tests auf maligne Transformation. Hierbei werden Zellen hinsichtlich der Fähigkeit untersucht, Kolonien zu bilden. Eine gesteigerte Kolonienbildung wäre ein starker Hinweis auf eine maligne Transformation der expandierten ASC (Ke et al. 2004).

Studien gehen davon aus, dass ein hoher Prozentsatz der in der Forschung eingesetzten Zelllinien mit anderen Zellen kontaminiert sind (Alston-Roberts C 2010). Beispiele hierfür sind die Arbeiten von Rosland et al. und Rubio et al.. Beide berichteten über spontane maligne Transformationen von über einen

längeren Zeitraum kultivierten BMSC (Rosland et al. 2009) bzw. ASC (Rubio et al. 2008). Diese Ergebnisse mussten später aufgrund des Nachweises einer Kontamination mit Fremdzellen zurückgezogen werden (de la Fuente et al. 2010; Torsvik et al. 2010). Deshalb muss sichergestellt werden, dass Ergebnisse, welche auf eine maligne Transformation von ASC hinweisen, nicht durch unentdeckte Verunreinigungen mit Tumorzellen in der Zellkultur verursacht werden. Hierfür eignet sich eine DNA-Fingerabdruck-Untersuchung, welche auf der Analyse von „short tandem repeats“ innerhalb der DNA basiert (STR-Profil). Wird zu Beginn der Expansion ein solches Profil erstellt, so kann im Verlauf kontrolliert werden, ob es sich bei den untersuchten Zellen tatsächlich noch um die initial kultivierten Zellen handelt, oder ob eine Kontamination vorliegt (Ren et al. 2012).

4.3 Einfluss des Kultivierungsmediums

Da das Ziel der vorliegenden Arbeit war, mit Hilfe von Untersuchungen hinsichtlich der genetischen Stabilität von ASC einen Beitrag zur Sicherheit bei zukünftigen stammzellbasierten Therapien zu leisten, muss an dieser Stelle auch die Wahl des Kultivierungsmediums diskutiert werden. Dessen Einfluss darf sowohl im Hinblick auf die Ergebnisse der Versuche als auch wegen einer zukünftigen Einbringung *in vitro* kultivierter Zellen in den menschlichen Organismus nicht außer Acht gelassen werden. Bei unserer Versuchsreihe wurde ausschließlich Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) verwendet, welchem 10% fetales Kälberserum (FBS) zugesetzt wurde. Der Einsatz von FBS ist jedoch problematisch, da er grundsätzlich die Gefahr einer Kontamination der ASC mit xenogenen Faktoren und Krankheiten mit sich bringt. Untersuchungen haben gezeigt, dass 20-50% des auf dem Markt zu erwerbenden FBS Viren wie zum Beispiel das „bovine viral diarrhea virus“ (BVDV) enthält (Bieback 2013). Virale Erkrankungen können vom Tier auf den Menschen übergehen, bekanntestes Beispiel ist sicherlich das Influenza-Virus (Webster et al. 1995). Weiterhin besteht die Gefahr der Übertragung von

Prionenerkrankungen wie beispielsweise der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE).

Darüber hinaus weisen einige Studien darauf hin, dass die Wahl des Kultivierungsmediums auch die Genexpression und die genetische Stabilität von Zellen zu beeinflussen scheint. Shahdadfar et al. konnten beispielsweise zeigen, dass das Transkriptionsmuster von mit autologem humanem Serum kultivierten MSC stabiler war als das von mit FBS expandierten MSC. Es waren hierbei auch Gene betroffen, welche den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung beeinflussen (Shahdadfar et al. 2005). Andere Autoren wie zum Beispiel Bieback et al. wiederum fanden bei ihren vergleichenden Untersuchungen keinen Unterschied hinsichtlich der genetischen Stabilität (Bieback et al. 2009), das Problem einer potentiellen xenogenen Kontamination bleibt jedoch auch hier bestehen.

Aus diesem Grund ist die Entwicklung eines Expansions-Protokolls, welches ohne xenogene Zusätze auskommt, von essentieller Bedeutung für den klinischen Einsatz von ASC. In den letzten Jahren wurden dabei große Fortschritte erzielt. Wichtige Alternativen zu FBS sind autologes Serum, Plättchenlysate und die Verwendung eines komplett serumfreien Mediums ohne xenogene Zusätze. Alle diese Alternativen haben gemeinsam, dass sie ebenso gut oder besser als FBS die Proliferation mesenchymaler Stammzellen fördern, jedoch nicht die Risiken eines xenogenen Produkts mit sich bringen (Perez-Illarbe et al. 2009). Für die Expansion mit Plättchenlysate konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Zellen, verglichen mit den mit FBS kultivierten, eine höhere chromosomale Stabilität aufwiesen (Crespo-Diaz et al. 2011). Da insbesondere autologes Serum, aber auch Plättchenlysate nur in begrenztem Umfang zur Verfügung stehen, ist die zukunftssträchteste und sicherste Alternative sicherlich der Einsatz eines gänzlich serumfreien Mediums, welches darüber hinaus ohne xenogene Zusätze auskommt. Ein Protokoll, welches weder tierisches noch humanes Serum benötigt, ist beispielsweise in einer Arbeit von Patrikoski et al. beschrieben (Patrikoski et al. 2013).

Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse sowie der bereits in anderen Arbeiten nachgewiesenen Tatsache, dass das Kultivierungsmedium einen

großen Einfluss auf Proliferationsverhalten und chromosomale Stabilität der ASC hat, sollten weitere vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der genetischen Stabilität von mit FBS respektive serumfreiem Medium expandierten Zellen durchgeführt werden. Dies wäre einerseits sinnvoll im Hinblick auf die Einordnung der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse. Andererseits könnte auf diese Weise weiteres Wissen bezüglich der Sicherheit bei ASC-basierten Therapieverfahren gewonnen werden.

4.4 Alternativen zum Einsatz von Fettgewebstammzellen

Seit ihrer Erstbeschreibung durch Zuk et al. (Zuk et al. 2001) haben ASC im Hinblick auf potentielle neue Behandlungsmöglichkeiten große Hoffnungen geweckt, sodass die Anzahl der Arbeitsgruppen, die sich mit diesen Zellen befasst, stetig wächst. In der Folge wurden in der experimentellen Forschung beachtliche Fortschritte erzielt. Diese betreffen die Isolierung, die Charakterisierung, standardisierte Expansion, die Differenzierung in verschiedene Gewebsarten sowie das Tissue Engineering. Auch eine große Zahl klinischer Studien aus nahezu allen medizinischen Fachbereichen untersucht direkt den Einsatz von ASC am Patienten. Clinicaltrials.gov listet unter dem Suchbegriff „adipose stem cells“ 144 klinische Studien auf (Stand 04.12.2014). Dies unterstreicht die großen Erwartungen, welche in ASC-basierte Therapien gesetzt werden.

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Ansätze, wie ASC eingesetzt werden können. Der eine ist die Verwendung der Zellen beim Tissue Engineering, das heißt, es wird die Differenzierung und Proliferation eines bestimmten Gewebetyps induziert, um beispielsweise ein Ohrskelett oder Teile des Larynx *in vitro* zu erzeugen und diese dann zu transplantieren. Beim Tissue Engineering sind die Fortschritte im letzten Jahrzehnt jedoch nicht so durchgreifend wie erwartet, eine zuverlässige standardisierte Methode liegt noch in weiter Ferne (Johnstone et al. 2013). Trotzdem liegt hier sicherlich eines der zukünftigen Haupteinsatzgebiete mesenchymaler Stammzellen. Der zweite Ansatz gründet auf der Beobachtung, dass ASC verschiedene Zytokine

sezernieren und dadurch das Proliferationsverhalten des sie umgebenden Gewebes parakrin sowie den Gesamtorganismus endokrin beeinflussen können (Kapur und Katz 2013). Diese Eigenschaft versucht man zu nutzen, indem beispielsweise geschädigtes Myokardgewebe mit mesenchymalen Stammzellen behandelt wird, um so die Regeneration zu verbessern (Gnecchi et al. 2012). Auch in der plastischen Chirurgie erhofft man sich durch die Applikation von ASC bedeutende Fortschritte bei der Behandlung chronischer Wunden oder dem Krankheitsbild der Lipodystrophie (Salibian et al. 2013). Bei der Methode des zellassistierten Lipotransfer (cell-assisted lipotransfer, CAL) wird zunächst eine Liposuktion durchgeführt. Aus der Hälfte des aspirierten Materials werden ASC isoliert, welche dann in die andere Hälfte des aspirierten Fetts eingebracht werden. Auf diese Weise erhält man mit ASC angereichertes Fett, welches an der gewünschten Stelle in den Körper eingespritzt wird, beispielsweise zum Zweck der Mammaaugmentation. Dieses Verfahren scheint der gewöhnlichen Lipoinjektion im Hinblick auf postoperative Atrophie des Implantats überlegen zu sein (Yoshimura et al. 2008).

Zieht man jedoch die Unzulänglichkeiten und Risiken einer Stammzelltransplantation in Betracht, wie beispielsweise die Notwendigkeit einer *in vitro*-Expansion, die Gefahr der Kontamination oder eine eventuelle maligne Entartung, so muss die Frage gestellt werden, in wie weit es sinnvoll ist, ASC ausschließlich mit dem Ziel der parakrinen Gewebestimulation zu transplantieren. Zumindest bei einem Teil der Einsatzgebiete sollte deshalb über sicherere und weniger aufwendige Verfahren nachgedacht werden. Korf-Klingebiel et al. konnten anhand einer Arbeit mit Knochenmarkszellen und peripheren Leukozyten zeigen, dass es für die Behandlung einer Myokardischämie keinen signifikanten Unterschied machte, ob die Zellen an sich oder aber lediglich die von ihnen sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren appliziert wurden (Korf-Klingebiel et al. 2008). Di Santo et al. machten im Rahmen einer Arbeit mit endothelialen Vorläuferzellen die gleiche Beobachtung, indem sie herausfanden, dass es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Revaskularisierungsprozesses machte, ob ein ischämisches Gewebe mit diesen Zellen oder aber lediglich mit von ihnen

sezernierten Faktoren behandelt wurde (Di Santo et al. 2009). Einen noch eleganteren Weg hinsichtlich der Entnahmemorbidität, Expansion und Applikation schlugen Lichtenauer et al. sowie Mildner et al. vor. Anhand von durch venöse Blutentnahmen gewonnenen mononukleären Zellen konnten sie zeigen, dass allein die Applikation der von diesen Zellen sezernierten Proteine einen positiven Effekt sowohl auf Myokardzellen unmittelbar nach einem Infarkt als auch auf die Heilung von Hautwunden hatte (Lichtenauer et al. 2011) (Mildner et al. 2013).

Die oben angeführten Beispiele zeigen deutlich, dass es in einigen Bereichen durchaus lohnenswert ist, trotz des Potentials von mesenchymalen Stammzellen auch Alternativen zu überdenken, insbesondere, wenn man die möglichen Probleme und Risiken einer Transplantation dieser Zellen in Betracht zieht. Der antike Grundsatz „primum non nocere“ sollte auch bei modernen Therapieverfahren nicht außer Acht gelassen werden. Vor einem klinischen Einsatz von ASC muss eine sorgfältige Nutzen-Risiko-Analyse erfolgen. Sollte eine Applikation von ASC keinen signifikanten Nutzen gegenüber der alleinigen Gabe einer Proteinsuspension haben, muss letzterer der Vorzug gegeben werden, da nicht zuletzt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein gewisses Risiko nicht ausgeschlossen werden kann.

5. Zusammenfassung

Stammzellbasierte Therapieverfahren versprechen neue Lösungen für bisher nur unzureichend behandelbare Erkrankungen aus nahezu allen Teilbereichen der Medizin. In der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde ist die Herstellung von Knorpel im Rahmen des Tissue Engineering von besonderem Interesse. Die pluripotenten adulten mesenchymalen Stammzellen des Fettgewebes (ASC) stellen dabei aufgrund ihrer hohen Verfügbarkeit und niedrigen Entnahmemorbidität eine vielversprechende Zellpopulation als Ausgangspunkt für die Erzeugung von Gewebe dar. Um eine adäquate Zahl von Zellen zu erhalten ist eine *in vitro* Expansion der ASC nahezu unvermeidlich. Dabei ist auf Grund der hohen Zahl an Zellteilungen die Gefahr von DNA-Replikationsfehlern erhöht. Darüber hinaus sind die Zellen verstärkt oxidativem und mechanischem Stress sowie enzymatischer Verdauung ausgesetzt, was ein Risiko für DNA-Schäden wie beispielsweise Doppelstrangbrüche oder chromosomale Aberrationen darstellt. Diese können wiederum der Ausgangspunkt für die maligne Transformation einer Zelle sein. Deshalb war das Ziel der vorliegenden Studie, zu zeigen, ob die Expansion und mehrfache Passagierung zu einer zunehmenden genetischen Instabilität der ASC führt.

Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit frische ASC aus Liposuktionsaspirat von insgesamt 8 verschiedenen Patienten isoliert. Diese Zellen wurden jeweils als Passage 0 definiert. Bei einem Konfluenzgrad von ca. 80 % erfolgte die Passagierung. Die Vitalität der Zellen wurde nach dem Ablösen mit dem CASY-Zellzählgerät gemessen. Mit ASC der Passagen 1, 2, 3, 5 und 10 wurde zur Detektion von Schäden auf DNA-Ebene jeweils eine alkalische Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) und ein Mikrokerntest durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein Teil der ASC beim Comet Assay über 30 Minuten mit 500 μ M MMS inkubiert, beim Mikrokerntest mit 200 μ M MMS über 2 Stunden. Zur Erfassung von Schäden auf Chromatidebene erfolgte darüber hinaus mit Zellen der selben Passage ein

Chromosomenaberrationstest. Als Positivkontrolle wurde dabei 200 μ M MMS über 17 Stunden zugegeben.

Der Anteil vitaler Zellen nach dem Ablösen betrug im Schnitt 82,78%. Mit dem Comet Assay konnte keine signifikante Progression der genetischen Instabilität mit zunehmender Passage nachgewiesen werden. Die mit MMS inkubierte Positivkontrolle zeigte gegenüber den unbehandelten Zellen beim Comet Assay stets signifikant höhere OTM-Werte. Mit dem Mikrokernstest konnte ebenfalls keine mit steigendem Alter signifikante Zunahme der DNA-Schädigung detektiert werden. Darüber hinaus ergab sich auch bei der Positivkontrolle keine signifikant erhöhte Mikrokernfrequenz gegenüber den nativen Zellen. Beim Chromosomenaberrationstest zeigte sich im Friedman-Test eine signifikante Zunahme an strukturellen Chromosomenaberrationen mit steigender Passage. Der Wilcoxon-Test hingegen erbrachte kein signifikantes Ergebnis. Die Positivkontrolle wies durchgehend eine signifikant erhöhte Chromosomenaberrationsfrequenz auf.

Eine Erklärung für die Ergebnisse könnte die bereits in der Literatur beschriebene ausgeprägte DNA-Reparaturkapazität mesenchymaler Stammzellen sein, welche insbesondere auch Doppelstrangbrüche betrifft. Nichtsdestotrotz zeigen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass eine zunehmende genetische Instabilität der ASC mit zunehmender Dauer der Expansion und steigender Passage nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen zur genetischen Stabilität und Anwendungssicherheit von ASC notwendig, insbesondere auch hinsichtlich der Interaktion von ASC und Tumorzellen, da einige Arbeiten diesbezüglich über einen proliferationsfördernden Effekt der ASC berichten. Zieht man Erkenntnisse aus anderen Arbeiten mit in Betracht, sollte versucht werden, auf eine prolongierte *in vitro* Expansion zu verzichten. Wo dies auf Grund der benötigten Zellzahlen unmöglich ist, sollten vor einer Transplantation regelhaft Untersuchungen wie beispielsweise ein Chromosomenaberrationstest oder ein Screening auf typische malignitätsfördernde Mutationen erfolgen.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ASC	adipose-derived stem/stromal cell
BMSC	bone marrow derived stem/stromal cell
BRCA	breast cancer
BSE	bovine spongiforme encephalopathie
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin-dependent kinase
Cyt-B	Cytochalasin B
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuclein Acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Endothelial Growth Factor
FCS	Fetal Calf Serum
GVHD	Graft Versus Host Disease
H₂O	Wasser
HCL	Salzsäure
HTLV	Humanes T-Lymphotropes Virus
KCL	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LMP	Low Melting Point
MMS	Methylmethansulfonat
MSC	Mesenchymal Stem Cell
Na₂HPO₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NMP	Normal Melting Point
PBS	Phosphate Buffered Saline
RAS	Rat Sarcoma
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonuclein Acid
rpm	Rounds Per Minute
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

6.2 Tabellen

Tabelle 2: OTM-Werte aus dem Comet Assay mit unbehandelten ASC mit Angabe des Mittelwertes (mean), des Medianwertes (median) und der Standardabweichung (SD). Fehlende Werte aufgrund von Pilzkontamination wurden durch Mittelwerte ersetzt.

Patient	P1	P2	P3	P5	P10
1	1,13	1,03	0,53	0,81	0,58
2	0,85	0,81	1,59	1,12	0,63
3	1,00	12,47	1,58	0,45	0,38
4	1,53	1,48	0,90	0,39	0,25
5	0,51	0,79	0,27	0,41	1,10
6	0,35	0,66	1,14	0,36	0,26
7	0,31	7,02	1,14	4,51	0,37
8	0,52	0,60	0,64	1,66	1,47
mean	0,77	3,11	0,98	1,21	0,63
median	0,68	0,92	1,02	0,63	0,38
SD	0,43	4,36	0,48	1,41	0,47

Tabelle 3: OTM-Werte aus dem Comet Assay mit ASC, welche über 30 Minuten mit 500 μ M MMS inkubiert wurden (Positivkontrolle), mit Angabe des Mittelwertes (mean), des Medianwertes (median) und der Standardabweichung (SD). Fehlende Werte aufgrund von Pilzkontamination wurden durch Mittelwerte ersetzt.

Patient	P1 PK	P2 PK	P3 PK	P5 PK	P10 PK
1	6,02	7,43	3,74	5,65	3,46
2	3,87	6,99	9,87	7,66	8,42
3	9,43	29,96	2,80	3,01	4,26
4	9,03	5,35	4,80	8,24	7,36
5	5,95	2,47	1,97	6,72	13,78
6	6,97	6,69	2,66	20,31	8,47
7	6,79	18,35	10,05	16,86	11,49
8	15,69	25,07	6,72	5,47	10,15
mean	7,97	12,79	5,32	9,24	8,42
median	6,88	7,21	4,27	7,19	8,47
SD	3,59	10,27	3,22	6,05	3,75

Tabelle 4: DT-Werte aus dem Comet Assay mit unbehandelten ASC mit Angabe des Mittelwertes (mean), des Medianwertes (median) und der Standardabweichung (SD). Fehlende Werte aufgrund von Pilzkontamination wurden durch Mittelwerte ersetzt.

Patient	P1	P2	P3	P5	P10
1	3,14	3,12	1,64	2,32	1,90
2	1,94	2,57	1,08	1,40	2,06
3	2,98	25,81	3,66	1,41	1,52
4	3,90	3,72	2,35	1,34	0,99
5	1,94	2,57	1,08	1,40	3,52
6	1,28	2,44	3,46	1,55	1,13
7	1,20	16,62	3,55	11,95	1,57
8	2,08	2,27	2,23	4,16	3,83
Mean	2,31	7,39	2,38	3,19	2,06
Median	2,01	2,85	2,29	1,48	1,57
SD	0,95	8,89	1,08	3,67	1,14

Tabelle 5: DT-Werte aus dem Comet Assay mit ASC, welche über 30 Minuten mit 500 μ M MMS inkubiert wurden (Positivkontrolle), mit Angabe des Mittelwertes (mean), des Medianwertes (median) und der Standardabweichung (SD). Fehlende Werte aufgrund von Pilzkontamination wurden durch Mittelwerte ersetzt.

Patient	P1 PK	P2 PK	P3 PK	P5 PK	P10 PK
1	14,46	20,42	10,22	16,65	10,00
2	15,09	7,07	6,01	17,72	21,56
3	23,52	56,00	7,61	8,33	11,29
4	22,15	13,07	12,60	20,57	18,92
5	15,09	7,07	6,01	17,72	35,08
6	15,49	17,20	7,41	43,88	22,60
7	19,05	40,80	25,08	38,24	29,21
8	36,51	48,84	17,17	13,98	23,85
Mean	20,17	26,31	11,51	22,13	21,56
Median	17,27	18,81	8,92	17,72	22,60
SD	7,46	19,39	6,67	12,31	9,07

Tabelle 6: TL-Werte aus dem Comet Assay mit unbehandelten ASC mit Angabe des Mittelwertes (mean), des Medianwertes (median) und der Standardabweichung (SD). Fehlende Werte aufgrund von Pilzkontamination wurden durch Mittelwerte ersetzt.

Patient	P1	P2	P3	P5	P10
1	54,76	55,66	48,89	48,21	45,17
2	39,94	45,55	37,86	38,85	42,98
3	43,19	91,39	70,26	43,39	38,27
4	65,30	65,64	61,27	38,03	37,99
5	39,94	45,55	37,86	38,85	45,56
6	38,08	40,49	55,10	34,63	33,98
7	34,36	67,87	45,96	61,41	36,86
8	37,93	42,46	45,17	68,73	63,08
Mean	44,19	56,83	50,29	46,51	42,98
Median	39,94	50,60	47,42	41,12	38,27
SD	10,47	17,42	11,33	12,30	9,84

Tabelle 7: TL-Werte aus dem Comet Assay mit ASC, welche über 30 Minuten mit 500 μ M MMS inkubiert wurden (Positivkontrolle), mit Angabe des Mittelwertes (mean), des Medianwertes (median) und der Standardabweichung (SD). Fehlende Werte aufgrund von Pilzkontamination wurden durch Mittelwerte ersetzt.

Patient	P1 PK	P2 PK	P3 PK	P5 PK	P10 PK
1	80,14	74,33	70,19	66,63	62,23
2	73,08	58,89	55,34	70,33	75,05
3	78,76	109,60	67,60	64,44	67,82
4	81,78	77,33	75,47	75,58	72,02
5	73,08	58,89	55,34	70,33	82,52
6	89,47	74,14	64,35	99,97	75,99
7	69,72	93,88	80,51	90,66	81,87
8	100,40	107,46	80,40	72,01	82,94
Mean	80,80	81,81	68,65	76,24	75,05
Median	79,45	75,83	68,89	71,17	75,99
SD	10,05	19,86	10,01	12,48	8,08

Tabelle 8: Anzahl der Chromosomenaberrationen der unbehandelten ASC. Fehlende Werte aufgrund von Pilzkontamination wurden durch Mittelwerte ersetzt.

Patient	P1	P2	P3	P5	P10
1	0	2	1	4	10
2	1	1	1	5	10
3	0	1	1	4	10
4	0	3	1	5	14
5	1	2	3	6	10
6	0	3	6	6	8
7	0	0	2	6	9
8	3	2	3	5	7

Tabelle 9: Anzahl der Chromosomenaberrationen der ASC, welche über 17 Stunden mit 200 μ M MMS inkubiert wurden (Positivkontrolle). Fehlende Werte aufgrund von Pilzkontamination wurden durch Mittelwerte ersetzt.

Patient	P1 PK	P2 PK	P3 PK	P5 PK	P10 PK
1	18	13	6	14	14
2	20	22	12	12	14
3	21	19	9	18	14
4	17	14	11	16	16
5	8	11	10	11	15
6	12	8	10	10	15
7	8	8	8	10	12
8	15	8	7	7	10

Tabelle 10: Absolute Anzahl der Mikrokerne der unbehandelten ASC. Fehlende Werte aufgrund der in der Diskussion erläuterten Probleme bei der Auswertung.

Patient	P1	P2	P3	P5	P10
1		8	17	32	
2	15	30			
3	30	26	17	18	
4	28	28	23	23	28
5	65		30	14	14
6	25	21			

Tabelle 11: Absolute Anzahl der Mikrokerne der ASC, welche über 2 Stunden mit 200 μ M MMS inkubiert wurden (Positivkontrolle). Fehlende Werte aufgrund der in der Diskussion erläuterten Probleme bei der Auswertung.

Patient	P1 PK	P2 PK	P3 PK	P5 PK	P10 PK
1			14	24	
2	12	34	33		23
3	24	19	32	23	
4		39	29	26	
5	52		30		26
6	24				

6.3 Literaturverzeichnis

- Albertini, R. J., Anderson D., Douglas G. R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Aitio A. (2000). "IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety." *Mutat Res*: 111-172.
- Alberts (2011). *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH.
- Alpert, J. S., Thygesen K., Antman E. und Bassand J. P. (2000). "Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol*: 959-969.
- Alston-Roberts C, B. R., Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kerrigan L, Kline MC, Kohara A, Los GV, MacLeod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Steuer AF, Storts DR, Sykes G, Taraporewala Z, Thomson J (2010). "Cell line misidentification: the beginning of the end." *Nat Rev Cancer*: 441-448.
- Andreoli, C., Leopardi P., Rossi S. und Crebelli R. (1999). "Processing of DNA damage induced by hydrogen peroxide and methyl methanesulfonate in human lymphocytes: analysis by alkaline single cell gel electrophoresis and cytogenetic methods." *Mutagenesis*: 497-504.
- Antoniou, A., Pharoah P. D., Narod S., Risch H. A., Eyfjord J. E., Hopper J. L., Easton D. F. (2003). "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." *Am J Hum Genet*: 1117-1130.
- Beachy, P. A., Karhadkar S. S. und Berman D. M. (2004). "Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis." *Nature*: 324-331.
- Bernardo, M. E., Zaffaroni N., Novara F., Cometa A. M., Avanzini M. A., Moretta A., Locatelli F. (2007). "Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms." *Cancer Res*: 9142-9149.
- Bieback, K. (2013). "Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures." *Transfus Med Hemother*: 326-335.
- Bieback, K., Hecker A., Kocaomer A., Lannert H., Schallmoser K., Strunk D. und Kluter H. (2009). "Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow." *Stem Cells*: 2331-2341.
- Bochkov, N. P., Nikitina V. A., Buyanovskaya O. A., Voronina E. S., Goldstein D. V., Kuleshov N. P., Chaushev I. N. (2008). "Aneuploidy of stem cells isolated from human adipose tissue." *Bull Exp Biol Med*: 344-347.

- Bochkov, N. P., Voronina E. S., Kosyakova N. V., Liehr T., Rzhaininova A. A., Katosova L. D., Gol'dshtein D. V. (2007). "Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells." *Bull Exp Biol Med*: 122-126.
- Bourin, P., Bunnell B. A., Casteilla L., Dominici M., Katz A. J., March K. L., Gimble J. M. (2013). "Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)." *Cytotherapy*: 641-648.
- Bradley, M. O., Bhuyan B., Francis M. C., Langenbach R., Peterson A. und Huberman E. (1981). "Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program." *Mutat Res*: 81-142.
- Cadet, J. und Wagner J. R. (2013). "DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation." *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- Cantarella, G., Baracca G., Forti S., Gaffuri M. und Mazzola R. F. (2011). "Outcomes of structural fat grafting for paralytic and non-paralytic dysphonia." *Acta Otorhinolaryngol Ital*: 154-160.
- Ceuppens, J. L., Baroja M. L., Lorre K., Van Damme J. und Billiau A. (1988). "Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal." *J Immunol*: 3868-3874.
- Chen, C. H. und Chen R. J. (2011). "Prevalence of telomerase activity in human cancer." *J Formos Med Assoc*: 275-289.
- Chen, M. F., Lin C. T., Chen W. C., Yang C. T., Chen C. C., Liao S. K., Lee K. D. (2006). "The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation." *Int J Radiat Oncol Biol Phys*: 244-253.
- Collins, A. R. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations." *Mol Biotechnol*: 249-261.
- Cornelio, D. A., Tavares J. C., Pimentel T. V., Cavalcanti Jr G. B. und Batistuzzo de Medeiros S. R. (2013). "Cytokinesis-block micronucleus assay adapted for analysing genomic instability of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells Dev*: 823-838.
- Crespo-Diaz, R., Behfar A., Butler G. W., Padley D. J., Sarr M. G., Bartunek J., Terzic A. (2011). "Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability." *Cell Transplant*: 797-811.
- Croce, C. M. (2008). "Oncogenes and cancer." *N Engl J Med*: 502-511.
- Czyz, J., Wiese C., Rolletschek A., Blyszczuk P., Cross M. und Wobus A. M. (2003). "Potential of embryonic and adult stem cells in vitro." *Biol Chem*: 1391-1409.

- de la Fuente, R., Bernad A., Garcia-Castro J., Martin M. C. und Cigudosa J. C. (2010). "Retraction: Spontaneous human adult stem cell transformation." *Cancer Res*: 6682.
- Di Santo, S., Yang Z., Wyler von Ballmoos M., Voelzmann J., Diehm N., Baumgartner I. und Kalka C. (2009). "Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation." *PLoS One*: e5643.
- Dixon, D. R., Pruski A. M., Dixon L. R. und Jha A. N. (2002). "Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview." *Mutagenesis*: 495-507.
- Dominici, M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Horwitz E. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy*: 315-317.
- Doppler, S. A., Deutsch M. A., Lange R. und Krane M. (2013). "Cardiac regeneration: current therapies-future concepts." *J Thorac Dis*: 683-697.
- Fan, J., Robert C., Jang Y. Y., Liu H., Sharkis S., Baylin S. B. und Rassool F. V. (2011). "Human induced pluripotent cells resemble embryonic stem cells demonstrating enhanced levels of DNA repair and efficacy of nonhomologous end-joining." *Mutat Res*: 8-17.
- Faust, F., Kassie F., Knasmüller S., Boedecker R. H., Mann M. und Mersch-Sundermann V. (2004). "The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies." *Mutat Res*: 209-229.
- Fenech, M. (1993). "The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations." *Environ Health Perspect*: 101-107.
- Fenech, M. (2007). "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay." *Nat Protoc*: 1084-1104.
- Fenech, M. und Kirsch-Volders M. (2013). "RE: Insensitivity of the in vitro cytokinesis-block micronucleus assay with human lymphocytes for the detection of DNA damage present at the start of the cell culture (Mutagenesis, 27, 743-747, 2012)." *Mutagenesis*: 367-369.
- Froelich, K., Mickler J., Steusloff G., Technau A., Ramos Tirado M., Scherzed A., Kleinsasser N. (2013). "Chromosomal aberrations and deoxyribonucleic acid single-strand breaks in adipose-derived stem cells during long-term expansion in vitro." *Cytotherapy*: 767-781.
- Froelich, K., Hagen R. und Kleinsasser N. (2014). "[Adipose-derived stromal cells (ASC) - basics and therapeutic approaches in otorhinolaryngology]." *Laryngorhinootologie*: 369-380.
- Giannotti, E., Vandin L., Repeto P. und Comelli R. (2002). "A comparison of the in vitro Comet assay with the in vitro chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster lung cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals." *Mutagenesis*: 163-170.

- Glauner, B. (2006). "Stromausschlussverfahren - Standardisierung der Vitalitätsbestimmung." *BIOspektrum*.
- Gnecchi, M., Danieli P. und Cervio E. (2012). "Mesenchymal stem cell therapy for heart disease." *Vascul Pharmacol*: 48-55.
- Gomes, M. E. und Reis R. L. (2004). "Tissue engineering: key elements and some trends." *Macromol Biosci*: 737-742.
- Grimes, B. R., Steiner C. M., Merfeld-Clauss S., Traktuev D. O., Smith D., Reese A., March K. L. (2009). "Interphase FISH demonstrates that human adipose stromal cells maintain a high level of genomic stability in long-term culture." *Stem Cells Dev*: 717-724.
- Gutierrez, C. und Schiff R. (2011). "HER2: biology, detection, and clinical implications." *Arch Pathol Lab Med*: 55-62.
- Hackenberg, S., Scherzed A., Kessler M., Hummel S., Technau A., Froelich K., Kleinsasser N. (2011). "Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells." *Toxicol Lett*: 27-33.
- Hanahan, D. und Weinberg R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell*: 646-674.
- Harnden DG, K. H. (1985). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature* Karger.
- Hartmann, A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Tice R. R. (2003). "Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop." *Mutagenesis*: 45-51.
- Hernando-Rodriguez, M., Rey-Barja N., Marichalar-Mendia X., Rodriguez-Tojo M. J., Acha-Sagredo A. und Aguirre-Urizar J. M. (2011). "Role of cytochrome P-450 genetic polymorphisms in oral carcinogenesis." *J Oral Pathol Med*: 1-8.
- Hirano, S., Bless D. M., Nagai H., Rousseau B., Welham N. V., Montequin D. W. und Ford C. N. (2004). "Growth factor therapy for vocal fold scarring in a canine model." *Ann Otol Rhinol Laryngol*: 777-785.
- Hong, S. J., Lee S. H., Jin S. M., Kwon S. Y., Jung K. Y., Kim M. K., Lee K. W. (2011). "Vocal fold wound healing after injection of human adipose-derived stem cells in a rabbit model." *Acta Otolaryngol*: 1198-1204.
- Imataka, G. und Arisaka O. (2012). "Chromosome analysis using spectral karyotyping (SKY)." *Cell Biochem Biophys*: 13-17.
- Jeong, J. O., Han J. W., Kim J. M., Cho H. J., Park C., Lee N., Yoon Y. S. (2011). "Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy." *Circ Res*: 1340-1347.
- Johnstone, B., Alini M., Cucchiari M., Dodge G. R., Eglin D., Guilak F., Stoddart M. J. (2013). "Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art." *Eur Cell Mater*: 248-267.

- Josse, C., Schoemans R., Niessen N. A., Delgaudine M., Hellin A. C., Herens C., Bours V. (2010). "Systematic chromosomal aberrations found in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Stem Cells Dev*: 1167-1173.
- Kannian, P. und Green P. L. (2010). "Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis." *Viruses*: 2037-2077.
- Kapur, S. K. und Katz A. J. (2013). "Review of the adipose derived stem cell secretome." *Biochimie*: 2222-2228.
- Ke, N., Albers A., Claassen G., Yu D. H., Chatterton J. E., Hu X., Li Q. X. (2004). "One-week 96-well soft agar growth assay for cancer target validation." *Biotechniques*: 826-828, 830, 832-833.
- Kim, Y. M., Choi Y. S., Choi J. W., Park Y. H., Koo B. S., Roh H. J. und Rha K. S. (2009). "Effects of systemic transplantation of adipose tissue-derived stem cells on olfactory epithelium regeneration." *Laryngoscope*: 993-999.
- Kojima, T., Kanemaru S., Hirano S., Tateya I., Ohno S., Nakamura T. und Ito J. (2011). "Regeneration of radiation damaged salivary glands with adipose-derived stromal cells." *Laryngoscope*: 1864-1869.
- Kolios, G. und Moodley Y. (2013). "Introduction to stem cells and regenerative medicine." *Respiration*: 3-10.
- Korf-Klingebiel, M., Kempf T., Sauer T., Brinkmann E., Fischer P., Meyer G. P., Wollert K. C. (2008). "Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction." *Eur Heart J*: 2851-2858.
- Kumar, V. (2007). *Robbins Basic Pathology*, Saunders Elsevier.
- Lazennec, G. und Jorgensen C. (2008). "Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit?" *Stem Cells*: 1387-1394.
- Lee, B. J., Wang S. G., Lee J. C., Jung J. S., Bae Y. C., Jeong H. J., Lorenz R. R. (2006). "The prevention of vocal fold scarring using autologous adipose tissue-derived stromal cells." *Cells Tissues Organs*: 198-204.
- Lichtenauer, M., Mildner M., Hoetzenecker K., Zimmermann M., Podesser B. K., Sipos W., Ankersmit H. J. (2011). "Secretome of apoptotic peripheral blood cells (APOSEC) confers cytoprotection to cardiomyocytes and inhibits tissue remodelling after acute myocardial infarction: a preclinical study." *Basic Res Cardiol*: 1283-1297.
- Lim, M. H., Ong W. K. und Sugii S. (2014). "The current landscape of adipose-derived stem cells in clinical applications." *Expert Rev Mol Med*: e8.
- Lindroos, B., Boucher S., Chase L., Kuokkanen H., Huhtala H., Haataja R., Miettinen S. (2009). "Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro." *Cytotherapy*: 958-972.
- Lindroos, B., Suuronen R. und Miettinen S. (2011). "The potential of adipose stem cells in regenerative medicine." *Stem Cell Rev*: 269-291.
- Liras, A. (2010). "Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects." *J Transl Med*: 131.

- Lokker, N. A., Sullivan C. M., Hollenbach S. J., Israel M. A. und Giese N. A. (2002). "Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors." *Cancer Res*: 3729-3735.
- Long, J. L., Neubauer J., Zhang Z., Zuk P., Berke G. S. und Chhetri D. K. (2010). "Functional testing of a tissue-engineered vocal fold cover replacement." *Otolaryngol Head Neck Surg*: 438-440.
- Long, J. L., Zuk P., Berke G. S. und Chhetri D. K. (2010). "Epithelial differentiation of adipose-derived stem cells for laryngeal tissue engineering." *Laryngoscope*: 125-131.
- Luo, L. Z., Gopalakrishna-Pillai S., Nay S. L., Park S. W., Bates S. E., Zeng X., O'Connor T. R. (2012). "DNA repair in human pluripotent stem cells is distinct from that in non-pluripotent human cells." *PLoS One*: e30541.
- McKenna, D. J., McKeown S. R. und McKelvey-Martin V. J. (2008). "Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer." *Mutagenesis*: 183-190.
- Meza-Zepeda, L. A., Noer A., Dahl J. A., Micci F., Myklebost O. und Collas P. (2008). "High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence." *J Cell Mol Med*: 553-563.
- Mildner, M., Hacker S., Haider T., Gschwandtner M., Werba G., Barresi C., Ankersmit H. J. (2013). "Secretome of peripheral blood mononuclear cells enhances wound healing." *PLoS One*: e60103.
- Miller, B., Potter-Locher F., Seelbach A., Stopper H., Utesch D. und Madle S. (1998). "Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung." *Mutat Res*: 81-116.
- Miura, M., Miura Y., Padilla-Nash H. M., Molinolo A. A., Fu B., Patel V., Shi S. (2006). "Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation." *Stem Cells*: 1095-1103.
- Moody, C. A. und Laimins L. A. (2010). "Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation." *Nat Rev Cancer*: 550-560.
- National Research Council (US) (2002). *Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine*. Washington (DC).
- Nicoletti, G. F., De Francesco F., D'Andrea F. und Ferraro G. A. (2015). "Methods and procedures in adipose stem cells: state of the art and perspective for translation medicine." *J Cell Physiol*: 489-495.
- Nikitina, V. A., Chausheva A. I., Zhanataev A. K., Osipova E. Y., Durnev A. D. und Bochkov N. P. (2011). "Assessment of DNA damage in human bone marrow cells and multipotent mesenchymal stromal cells." *Bull Exp Biol Med*: 550-552.

- Nikitina, V. A., Osipova E. Y., Katosova L. D., Rummyantsev S. A., Skorobogatova E. V., Shamanskaya T. V. und Bochkov N. P. (2011). "Study of genetic stability of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells." *Bull Exp Biol Med*: 627-631.
- Olive, P. L. und Banath J. P. (1993). "Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle." *Mutat Res*: 275-283.
- Oliver, L., Hue E., Sery Q., Lafargue A., Pecqueur C., Paris F. und Vallette F. M. (2013). "Differentiation-related response to DNA breaks in human mesenchymal stem cells." *Stem Cells*: 800-807.
- Olson, J. L., Atala A. und Yoo J. J. (2011). "Tissue Engineering: Current Strategies and Future Directions." *Chonnam Med J*: 1-13.
- Ostling, O. und Johanson K. J. (1984). "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells." *Biochem Biophys Res Commun*: 291-298.
- Pallua, N. (2011). *Tissue engineering - from lab to clinic*, Springer.
- Patrikoski, M., Juntunen M., Boucher S., Campbell A., Vemuri M. C., Mannerstrom B. und Miettinen S. (2013). "Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells." *Stem Cell Res Ther*: 27.
- Perez-Illarbe, M., Diez-Campelo M., Aranda P., Tabera S., Lopez T., del Canizo C., Perez-Simon J. A. (2009). "Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy." *Transfusion*: 1901-1910.
- Pfeiffer, P., Goedecke W., Kuhfittig-Kulle S. und Obe G. (2004). "Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations." *Cytogenet Genome Res*: 7-13.
- Pfeiffer, P., Goedecke W. und Obe G. (2000). "Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations." *Mutagenesis*: 289-302.
- Preston, R. J. und Gooch P. C. (1981). "The induction of chromosome-type aberrations in G1 by methyl methanesulfonate and 4-nitroquinoline-N-oxide, and the non-requirement of an S-phase for their production." *Mutat Res*: 395-402.
- Preston, R. J., San Sebastian J. R. und McFee A. F. (1987). "The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents." *Mutat Res*: 175-183.
- Ravanat, J. L., Douki T. und Cadet J. (2001). "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components." *J Photochem Photobiol B*: 88-102.
- Ren, Z., Wang J., Zhu W., Guan Y., Zou C., Chen Z. und Zhang Y. A. (2011). "Spontaneous transformation of adult mesenchymal stem cells from cynomolgus macaques in vitro." *Exp Cell Res*: 2950-2957.

- Ren, Z., Zhang Y. A. und Chen Z. (2012). "Spontaneous transformation of cynomolgus mesenchymal stem cells in vitro: further confirmation by short tandem repeat analysis." *Exp Cell Res*: 435-440.
- Rosland, G. V., Svendsen A., Torsvik A., Sobala E., McCormack E., Immervoll H., Schichor C. (2009). "Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation." *Cancer Res*: 5331-5339.
- Rubio, D., Garcia S., Paz M. F., De la Cueva T., Lopez-Fernandez L. A., Lloyd A. C., Bernad A. (2008). "Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation." *PLoS One*: e1398.
- Salibian, A. A., Widgerow A. D., Abrouk M. und Evans G. R. (2013). "Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications." *Arch Plast Surg*: 666-675.
- Seong, D., Thall P., Kantarjian H. M., Talpaz M., Swantkowski J., Xu J., Siciliano M. J. (1998). "Philadelphia chromosome-positive myeloid cells in the peripheral blood of chronic myelogenous leukemia patients: comparison with the frequency detected in cycling cells of the bone marrow." *Clin Cancer Res*: 861-867.
- Shahdadfar, A., Fronsdal K., Haug T., Reinholt F. P. und Brinchmann J. E. (2005). "In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability." *Stem Cells*: 1357-1366.
- Shay, J. W. und Wright W. E. (2011). "Role of telomeres and telomerase in cancer." *Semin Cancer Biol*: 349-353.
- Singh, N. P., McCoy M. T., Tice R. R. und Schneider E. L. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." *Exp Cell Res*: 184-191.
- Smith, N. D., Rubenstein J. N., Eggener S. E. und Kozlowski J. M. (2003). "The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer." *J Urol*: 1219-1228.
- Song, A. T., Avelino-Silva V. I., Pecora R. A., Pugliese V., D'Albuquerque L. A. und Abdala E. (2014). "Liver transplantation: fifty years of experience." *World J Gastroenterol*: 5363-5374.
- Sonoda, E., Sasaki M. S., Buerstedde J. M., Bezzubova O., Shinohara A., Ogawa H., Takeda S. (1998). "Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death." *EMBO J*: 598-608.
- Speit, G., Linsenmeyer R., Schutz P. und Kuehner S. (2012). "Insensitivity of the in vitro cytokinesis-block micronucleus assay with human lymphocytes for the detection of DNA damage present at the start of the cell culture." *Mutagenesis*: 743-747.
- Strem, B. M., Hicok K. C., Zhu M., Wulur I., Alfonso Z., Schreiber R. E., Hedrick M. H. (2005). "Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells." *Keio J Med*: 132-141.

- Takashima, A. und Faller D. V. (2013). "Targeting the RAS oncogene." *Expert Opin Ther Targets*: 507-531.
- Tessema, M., Lehmann U. und Kreipe H. (2004). "Cell cycle and no end." *Virchows Arch*: 313-323.
- Tice, R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Sasaki Y. F. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." *Environ Mol Mutagen*: 206-221.
- Tobita, M., Orbay H. und Mizuno H. (2011). "Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives." *Discov Med*: 160-170.
- Toledo, F. und Wahl G. M. (2006). "Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas." *Nat Rev Cancer*: 909-923.
- Tonnies, H., Stumm M., Wegner R. D., Chudoba I., Kalscheuer V. und Neitzel H. (2001). "Comparative genomic hybridization based strategy for the analysis of different chromosome imbalances detected in conventional cytogenetic diagnostics." *Cytogenet Cell Genet*: 188-194.
- Torsvik, A., Rosland G. V., Svendsen A., Molven A., Immervoll H., McCormack E., Bjerkvig R. (2010). "Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter." *Cancer Res*: 6393-6396.
- van Gent, D. C., Hoeijmakers J. H. und Kanaar R. (2001). "Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection." *Nat Rev Genet*: 196-206.
- Vogelstein, B., Papadopoulos N., Velculescu V. E., Zhou S., Diaz L. A., Jr. und Kinzler K. W. (2013). "Cancer genome landscapes." *Science*: 1546-1558.
- Webster, R. G., Sharp G. B. und Claas E. C. (1995). "Interspecies transmission of influenza viruses." *Am J Respir Crit Care Med*: S25-30.
- Williams, G. M. (2001). "Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment." *Toxicology*: 3-10.
- Wittekindt, C., Wagner S., Mayer C. S. und Klussmann J. P. (2012). "[Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer]." *Laryngorhinootologie*: S1-26.
- Yamamoto, Y., Fujita M., Tanaka Y., Kojima I., Kanatani Y., Ishihara M. und Tachibana S. (2013). "Low oxygen tension enhances proliferation and maintains stemness of adipose tissue-derived stromal cells." *Biores Open Access*: 199-205.
- Yang, S., Pilgaard L., Chase L. G., Boucher S., Vemuri M. C., Fink T. und Zachar V. (2012). "Defined xenogeneic-free and hypoxic environment provides superior conditions for long-term expansion of human adipose-derived stem cells." *Tissue Eng Part C Methods*: 593-602.
- Yoshimura, K., Sato K., Aoi N., Kurita M., Hirohi T. und Harii K. (2008). "Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells." *Aesthetic Plast Surg*: 48-55; discussion 56-47.

- Zhu, Y., Liu T., Song K., Fan X., Ma X. und Cui Z. (2008). "Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC." *Cell Biochem Funct*: 664-675.
- Zuk, P. A. (2010). "The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead." *Mol Biol Cell*: 1783-1787.
- Zuk, P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Hedrick M. H. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." *Mol Biol Cell*: 4279-4295.
- Zuk, P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Hedrick M. H. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." *Tissue Eng*: 211-228.

6.4 Publikation und Kongressbeiträge aus der vorliegenden Arbeit

- Froelich, K., Mickler J., Steusloff G., Technau A., Ramos Tirado M., Scherzed A., Hackenberg S., Radeloff A., Hagen R., Kleinsasser N. (2013). „Chromosomal aberrations and deoxyribonucleic acid single-strand breaks in adipose-derived stem cells during long-term expansion in vitro.“ *Cytotherapy*: 767-81.
- Froelich, K., Mickler J., Steusloff G., Kleinsasser N. (2011). „Veränderungen von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe (ADSC) auf DNA-Strang- und Chromosomenebene im Verlauf ihrer Passagierung.“ 82. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Freiburg
- Mickler J., Froelich K., Kleinsasser N. (2015). „Veränderungen von mesenchymalen Stammzellen des Fettgewebes auf DNA- und Chromatidebene während ihrer Expansion in vitro.“ 59. Jahreskongress der Österreichischen Gesellschaft für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Innsbruck

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen, Direktor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, plastische und ästhetische Operationen für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit durchführen zu können.

Meinem Doktorvater Herrn Univ.-Professor Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA für die Überlassung des Promotionsthemas, für seine vielen Anregungen und Ratschläge und für seine unerschöpfliche Geduld bei der Erstellung dieser Arbeit.

Meiner Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. med. Katrin Frölich, die mir während der gesamten Zeit freundschaftlich und mit konstruktiver Kritik zur Seite stand und jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte.

Frau Dr. rer. nat. Gudrun Steußloff für die tolle Einarbeitung und Unterstützung bei der experimentellen Arbeit.

Frau Silke Hummel für die große Unterstützung bei der Durchführung der Chromosomenaberrationstests.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, allen voran Dr. Antje Technau, Michael Kessler, Ursula Kepp und Margarete Appelman für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfestellungen bei der Laborarbeit.

Der Abteilung für Plastische und Ästhetische Chirurgie der Chirurgischen Klinik II der Universität Würzburg für die Überlassung von Liposuktionsmaterial.

Ein abschließender Dank gilt meinen Eltern, ohne deren vielfältige Unterstützung das Studium und die Promotion nicht möglich gewesen wären.