

Aus der Frauenklinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Marc Sütterlin)

Einfluss einer intraoperativen Radiotherapie des
Mammakarzinoms auf immunologische Faktoren im
Tumorbett

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von

Anne Wuhrer

aus
Bad Saulgau
2020

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Erstgutachter: Prof. Dr. med. Sebastian Berlit

VORWORT

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Uhlig, S., Wuhler, A., Berlit, S., Tuschy, B., Sütterlin, M., and Bieback, K. (2020). Intraoperative radiotherapy for breast cancer treatment efficiently targets the tumor bed preventing breast adipose stromal cell outgrowth. *Strahlenther Onkol* 196, 398-404.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG	1
1.1 Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.3 Therapeutische Prinzipien	3
1.2 Radiotherapie nach brusterhaltender Chirurgie.....	7
1.2.1 Stellenwert der adjuvanten Radiatio nach brusterhaltender Operation	7
1.2.2 Intraoperative Radiotherapie (IORT) des Mammakarzinoms	7
1.3 Das Tumorbett.....	11
1.3.1 Das Tumorbett als immunologischer Knotenpunkt.....	11
1.3.2 Wundheilung als Unterstützung der Tumorgenese	15
1.3.3 Einfluss ionisierender Strahlung auf das Tumorbett.....	18
2. ZIELSETZUNG	22
3. PATIENTINNEN UND METHODEN	24
3.1 Rekrutierung	24
3.2 Probengewinnung und Asservierung.....	26
3.2.1 Isolation von MSC aus Brustgewebe.....	26
3.2.2 Gewinnung, Prozessierung und Asservierung der Wundflüssigkeit.....	26
3.2.3 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	27
3.3 Charakterisierung der MSC aus Brustgewebe.....	28
3.3.1 Qualitative Differenzierungs-Assays (DA)	28
3.3.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der MSC	29

3.4	Analyse der Wundflüssigkeit (WF).....	30
3.4.1	Durchflusszytometrische Analyse	30
3.4.2	Multiplex-Zytokin-Analyse und ELISA.....	36
3.5	<i>Live Cell Imaging</i> -Experimente mit WF als Kulturzusatz	41
3.5.1	Allgemeine Zellkultur	41
3.5.2	<i>Live Cell Imaging</i> mittels IncuCyte ZOOM®	43
3.5.3	Proliferations-Assay.....	44
3.5.4	Wundheilungs-Assay	45
3.5.5	Migration/Chemotaxis-Assay.....	47
3.6	Statistik.....	50
4.	ERGEBNISSE.....	51
4.1	Isolation und Charakterisierung der Mamma-MSc.....	51
4.1.1	Isolation aus Brustgewebe	51
4.1.2	Qualitative Differenzierungs-Assays (DA)	53
4.1.3	Durchflusszytometrische Charakterisierung unbestrahlter Mamma-MSc.....	55
4.2	Untersuchung der WF	57
4.2.1	Durchflusszytometrische Analyse	57
4.2.2	Multiplex-Zytokin-Analyse und ELISA.....	63
4.3	Einfluss der WF auf die Zellfunktion.....	67
4.3.1	Einfluss der WF auf Mamma-MSc	67
4.3.2	Einfluss der WF auf MDA-MB 231	75
5.	DISKUSSION.....	78
5.1	Direkter Einfluss einer IORT auf zelluläre Komponenten des Immunsystems.....	78
5.1.1	Einfluss auf MSc im Tumorbett.....	78
5.1.2	Einfluss auf zelluläre Komponenten der WF.....	81

5.1.3 Einfluss der WF auf zelluläre Funktionen	82
5.2 Einfluss einer IORT auf das lokale Zytokinprofil.....	85
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	91
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	93
8. TABELLARISCHER ANHANG.....	105
9. LEBENS LAUF.....	119
10. DANKSAGUNG.....	120
11. PUBLIKATIONEN	121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7-AAD	Aminoactinomycin
A. dest.	Aqua destillata
AB	Serum von Spendern der Blutgruppe AB
Abb.	Abbildung
ADM	adipogenic differentiation medium
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
Ang-1	Angiopoietin 1
ANOVA	analysis of variance
APBI	accelerated partial breast irradiation
APC	Allophycocyanin
ASC	adipose tissue-derived MSC
ATM	ataxia-telangiectasia mutated kinase
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
bASC	breast adipose tissue-derived MSC
BET	Brusterhaltende Therapie
bFGF	basic fibroblast growth factor
BRCA1/2	Mutation zweier Tumorsuppressorgene (breast cancer)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CD	cluster of differentiation
CDU	colony digestion unit
CHEK-2	checkpoint kinase 2
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRL	Calreticulin
CXCL	CXC-Ligand
d. h.	das heißt
DA	Differenzierungs-Assay
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
DEGRO	Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonucleic acid
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group
EBRT	external beam radiotherapy
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EZM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER α	Östrogenrezeptor α

et al.	et alia
FACS	fluorescence-activated cell sorting
F _c	konstante Region eines Antikörpers
F _c R	F _c -Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FMO	fluorescence minus one
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	forward scatter
g	Fallbeschleunigung der Erde
ggf.	gegebenenfalls
GRO α	growth-regulated oncogene alpha
Gy	Gray
h	Stunden
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HGF	hepatocyte growth factor
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HMGB1	high-mobility group box 1
HRP	horse radish peroxidase
IFN	Interferon
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
IOERT	intraoperative electron radiation therapy
IORT	intraoperative radiation therapy
ISCT	International Society for Cell and Gene Therapy
JAK3	Januskinase 3
KoopG	Kooperationsgemeinschaft Mammographie Berlin
kV	Kilovolt
LASER	light amplification by stimulated emission of radiation
MAK	Mamillen-Areola-Komplex
MEK/ERK	Bestandteil des MAP-Kinase-Signalweges
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
Min.	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloprotease
MRM	modifiziert-radikale Mastektomie
MSC	mesenchymale Stromazellen
μ L	Mikroliter
μ m	Mikrometer
NKG2D	natural killer group 2D
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
NST	Mammakarzinom „no special type“
OD	optical density
ODM	osteogenic differentiation medium
OSM	Oncostatin-M

PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin-chlorophyll-protein complex
PG	Prostaglandin
PGE2	Prostaglandin E2
PI	Propidiumiodid
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RANTES	regulated and normal T cell expressed and secreted, Synonym: CCL5
RKI	Robert-Koch-Institut
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
RWD	relative wound density
SNB	sentinel lymph node biopsy
SSC	side scatter
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
STK11	serine/threonine kinase 11
TAD	targeted axillary dissection
TAM	tumor associated macrophages
TARGIT	targeted intraoperative radiotherapy
TC	tissue culture
TGF	tumor growth factor
TLR4	toll-like receptor 4
TNBC	triple-negative breast cancer
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
u. a.	unter anderem
UICC	Union International Contre le Cancer
uPA	urokinase-type plasminogen activator
v. a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WF	Wundflüssigkeit
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist laut Angaben der World Health Organisation (WHO, vertreten durch Bray et al.) bei Frauen die Krebserkrankung mit der höchsten Inzidenz sowie Mortalität. Weltweit liegt das Lebenszeitrisiko einer Erkrankung bei ca. 12 %. Die Inzidenzraten sind in den Industrienationen höher; die Mortalitätsraten – als Ausdruck mangelnden Zuganges zu diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen – in zentralafrikanischen und südostasiatischen Ländern am höchsten (Bray et al., 2018).

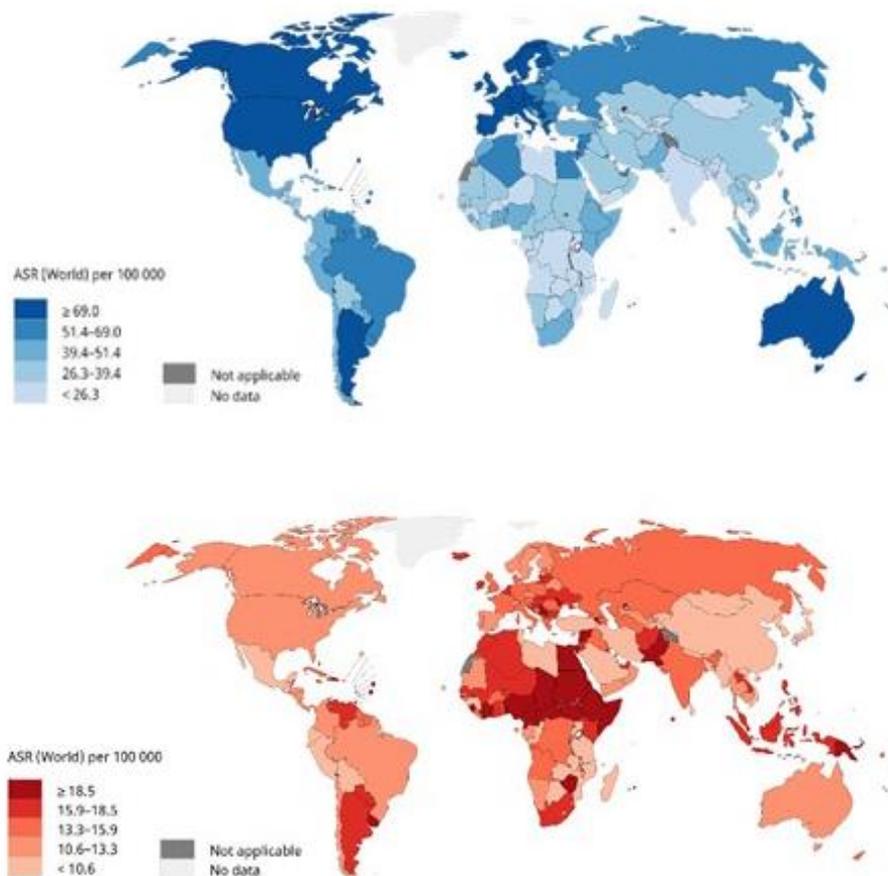


Abb. 1.1:

Flächenkartogramme bzgl. der geschätzten weltweiten altersstandardisierten Inzidenzraten (oben) sowie der weltweiten Mortalitätsraten (unten) des Mammakarzinoms für Frauen aller Altersgruppen für das Jahr 2018.

Bildquelle: © International Agency for Research on Cancer 2019, WHO

Datenquelle: GLOBOCAN (Bray et al., 2018)

In Deutschland erkrankt laut Zahlen des Robert-Koch-Institutes (RKI, vertreten durch Barnes et al.) jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs, entsprechend einer Inzidenzrate von 170 Fällen pro 100 000 Einwohnerinnen, mit altersabhängiger Zunahme. Männer sind mit einem Lebenszeitrisiko von 1:800 deutlich seltener betroffen. In Deutschland ist die Inzidenz der Erkrankung seit den Siebzigerjahren bis zum Jahr 2002 kontinuierlich angestiegen. Dies wird u. a. mit Veränderungen der Ernährungs- und Bewegungsgewohnheiten erklärt (siehe Kapitel 1.1.2); zusätzlich mit einem zunehmenden Anteil kinderloser Frauen, dem gestiegenen Durchschnittsalter der Erstgebärenden, kürzeren Stillzeiten sowie einem bis zur Jahrtausendwende vermehrten Einsatz der Hormonersatztherapie bzw. hormoneller Kontrazeption. Ebenfalls ist anzunehmen, dass die zunehmende Inanspruchnahme der Früherkennungsmaßnahmen dazu beitragen (Barnes et al., 2016). Zwischen den Jahren 2005 und 2009 wurde in Deutschland das flächendeckende Mammographie-Screening für Frauen zwischen 50 und 69 Jahren eingeführt. Diese führte zur Erkennung von Tumoren in früheren Stadien. Nachdem schon seit Anfang der 1990er-Jahre durch effektivere Therapieformen die Mortalitätsraten des Mammakarzinoms rückläufig sind, wird für die kommende Jahre noch ein zusätzlicher Effekt des Mammographie-Screenings erwartet (Barnes et al., 2016; KoopG, 2011).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Der Begriff „Brustkrebs“ beschreibt eine heterogene Erkrankung, die Entartung verschiedener Zelltypen des Brustgewebes. Verschiedene histologische Subtypen korrelieren dabei mit der genetischen Belastung und dem Risiko für Präkanzerosen (Goldhirsch et al., 2013). Dabei wird zwischen vom Milchgangsepithel (duktalen) und von den Milchdrüsenläppchen (lobulären) ausgehenden Neoplasien unterschieden. Nach Klassifikation der WHO stellen die invasiven Karzinome ohne speziellen Typ (*no special type*, NST) den überwiegenden Anteil von 75 % aller Brusttumore, während die restlichen 25 % den invasiven Karzinomen vom speziellen Typ zuzuordnen sind (Sinn and Kreipe, 2013). Das Mammakarzinom entwickelt sich dabei biphasisch über intraepitheliale *in-situ*-Stadien, die nach einer vermutlich mehrjährigen Latenzzeit in ein invasives Karzinom übergehen.

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist weitestgehend unbekannt, jedoch haben sowohl endogene als auch exogene Faktoren Einfluss auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit. Eine Übersicht der wichtigsten bekannten Risikofaktoren zeigt Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1:

Übersicht über die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms (AGO, 2018; AWMF, 2018).

<ul style="list-style-type: none"> • endokrin 	<ul style="list-style-type: none"> - Langer hormonell aktiver Zeitraum, z. B. durch: <ul style="list-style-type: none"> ○ Frühe Menarche ○ Späte Menopause ○ Keine, wenige oder späte Schwangerschaften ○ Keine oder kurze Stillzeiten - Adipositas / postmenopausale Gewichtszunahme - Postmenopausale Hormonersatztherapie
<ul style="list-style-type: none"> • hereditär 	<ul style="list-style-type: none"> - Anamnestisch familiäre Belastung - Definierte genetische Krankheitsbilder: <ul style="list-style-type: none"> ○ Hohes Risiko: Keimbahnmutationen in BRCA1-, BRCA2- oder RAD51C-Genen ○ Mittleres und niedriges Risiko, z. B. Keimbahnmutationen in den STK11, ATM-, PTEN- CHEK-2 oder anderen Genen
<ul style="list-style-type: none"> • toxisch 	<ul style="list-style-type: none"> - Strahlenexposition der Brust im Kindes-, Jugend- und frühen Erwachsenenalter - Nikotinabusus - Hoher Alkoholkonsum
<ul style="list-style-type: none"> • kontralaterales Mammakarzinom 	
<ul style="list-style-type: none"> • hohes Lebensalter 	

1.1.3 Therapeutische Prinzipien

Aktuelle Leitlinien empfehlen eine Festlegung des individuellen Therapieregimes im Rahmen interdisziplinärer Tumorkonferenzen. In die Entscheidung fließen ein: Tumorgröße, Nodalstatus, Fernmetastasen, histologisches Grading, Hormonrezeptor- und HER2/neu-Status, Lebensalter, Menopausenstatus sowie Komorbiditäten der Patientin. Diese Parameter korrelieren eng mit dem Krankheitsverlauf und der brustkrebsbezogenen Mortalität (Janni et al., 2017).

Grundsätzlich richtet sich die leitlinienbasierte Entscheidung danach, ob ein lokoregional begrenztes oder ein fernmetastasiertes Brustkrebsleiden vorliegt. Bei lokal begrenztem (\leq UICC-Stadium IIa) oder lokal fortgeschrittenem Mammakarzinom (\geq UICC-Stadium IIb) wird ein kurativer Therapieansatz verfolgt, bei einem fernmetastasierten Brustkrebsleiden in der Regel eine palliative Zielsetzung. In unserer hier vorgestellten Untersuchung wurden

Patientinnen mit einem primären und lokoregional begrenzten Mammakarzinom behandelt. Die Grundzüge dieser Therapie werden in den zum Zeitpunkt der Therapiestudie gültigen „S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ vorgestellt, die als Quelle der folgenden Kapitel 1.1.3.1 und 1.1.3.2 dienen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

1.1.3.1 Operative Therapie des primären, lokoregionär begrenzten Mammakarzinoms

Voraussetzung für ein niedriges Lokalrezidivrisiko ist die Entfernung des Primarius in sano. Die sogenannte R0-Resektion ist entscheidend für die Wirksamkeit der nachfolgenden systemischen Therapie sowie der Bestrahlung. Bei invasiven Tumoren ist es ausreichend, wenn am Resektionsrand kein Tumorgewebe („no ink on tumor“) nachweisbar ist (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

Die operative Therapie des Mammakarzinoms kann als brusterhaltender Eingriff oder Mastektomie erfolgen. Die brusterhaltende Chirurgie zeigt dabei – unter Berücksichtigung bestimmter klinischer und histologischer Parameter – hinsichtlich des Überlebens gleichwertige Ergebnisse. Aufgrund der von vielen Patientinnen angegebenen psychischen Belastung nach Mastektomie wird eher die brusterhaltende Therapie (BET) angestrebt. Bei einem günstigen Verhältnis zwischen Tumorgröße und Brustvolumen, sowie lokal begrenzten, nicht-invasiven Karzinomen (Duktales Carcinoma in situ, DCIS) ist sie prinzipiell möglich. Gegen das brusterhaltende Vorgehen sprechen eine ungünstige Brust-Tumor-Relation, ein inflammatorisches Mammakarzinom, Kontraindikationen gegen die nach einer BET obligate Bestrahlung oder das fehlende Einverständnis der Patientin (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

Zusätzlich erfolgt die Entfernung der axillären Lymphknoten, sowohl als lokoregionäre Tumorthherapie als auch für das axilläre Staging. Die Entfernung sogenannter Wächterlymphknoten bei klinisch negativem Lymphknotenbefund (Sentinel-Lymphonodektomie, SNB) stellt hierbei eine zielgerichtete operative Maßnahme zur repräsentativen Erfassung des axillären Lymphknotenstatus mit einer im Vergleich zur systematischen Axilladisektion deutlich geringeren Morbidität (Lymphödeme, Nervenläsionen) bei gleichwertig hoher diagnostischer Sicherheit dar. Im Rahmen der Axilladisektion werden die axillären Lymphknoten der Level I (lateral des Randes des M. pectoralis minor) und II (zwischen lateralem und medialem Rand des M. pectoralis minor) entfernt. Bei Patientinnen mit klinisch suspektem Lymphknotenstatus ist dagegen zunächst die pathologische Abklärung via Biopsie nötig, bei Positivität erfolgt anschließend

die Axilladisektion bzw. *targeted axillary dissection* (TAD). Sollte der pathologische Befund unauffällig sein, soll der klinisch suspekten Lymphknoten im Rahmen der SNB entfernt werden. Bei gesichertem primärem Lymphknotenbefall wird die Axilladisektion nach Durchführung einer primären Systemtherapie empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

1.1.3.2 Systemische Therapie des primären, lokoregionär begrenzten Mammakarzinoms

Die systemische Therapie stellt einen integralen Bestandteil der Primärtherapie des Mammakarzinoms dar. Eine von der *Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group* im Jahr 2005 durchgeführte Metaanalyse aus 194 randomisierten Studien ergab, dass das Mortalitätsrisiko durch Polychemotherapie bei Frauen bis zum 50. Lebensjahr um 38 % und für Frauen im 50. bis 69. Lebensjahr um 20 % gesenkt wurde. Weiterhin reduzierte die adjuvante Therapie mit Tamoxifen die Mortalität um 31 %. Dieser Überlebensvorteil zeigte sich unabhängig vom axillären Lymphknotenstatus sowohl für das rezidivfreie als auch das Gesamtüberleben (EBCTCG, 2005).

Die aktuellen therapeutischen Optionen bestehen in einer Polychemotherapie sowie, abhängig vom Rezeptorstatus, einer Antikörpertherapie und/oder antihormonellen Therapie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018). Es wird zwischen einem adjuvanten und einem neoadjuvanten Vorgehen unterschieden. Die neoadjuvante Therapie kann die Operabilität bis hin zur histopathologischen Komplettremission ermöglichen sowie den Anteil brusterhaltender, operabler Karzinome erhöhen. Zudem kann evaluiert werden, ob der Tumor auf die Therapeutika anspricht, die dann weiter adjuvant appliziert werden können. Der zitierten S3-Leitlinie zufolge zeigen die Verfahren der neoadjuvanten und der adjuvanten Chemotherapie gleichwertige Raten des Gesamtüberlebens. Ein Expertenkonsens bevorzugt die neoadjuvante, systemische Therapie, wenn prä- und postoperativ das gleiche Chemotherapieschema indiziert ist. Eine neoadjuvante, antihormonelle Therapie wird nicht standardmäßig durchgeführt; sie kann bei älteren und/oder multimorbiden Patientinnen erwogen werden, bei denen eine Operation oder Chemotherapie nicht möglich oder nicht gewünscht ist (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

Die systemische Therapie wird nach Risiko-Nutzen-Abwägung anhand des Tumorstadiums, Gradings und des Alters der Patientin ausgewählt; der Hormonrezeptorstatus, der HER2-Status sowie der Menopausenstatus sind entscheidend für die Frage einer endokrinen oder antikörperbasierten Therapie.

Bei Mammatumoren mit hohem Rezidivrisiko ist eine Polychemotherapie indiziert, häufig in Form von Anthrazyklinen kombiniert mit einem Taxan. Bei prämenopausalen Frauen erfolgt zumeist die Anwendung von Tamoxifen mit dem Ziel der Östrogenrezeptoren-Blockade und eventueller zusätzlicher Suppression der ovariellen Hormonproduktion. Postmenopausale Patientinnen, bei denen neben der Östrogenrezeptoren-Blockade die extraovarielle Hormonproduktion supprimiert werden soll, erhalten in der Regel einen Aromatasehemmer; dies eventuell mit nachfolgender zweijähriger Gabe von Tamoxifen. Bei HER2-positiven Karzinomen und einem Tumordurchmesser ≥ 1 cm ist zudem eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab indiziert, einem monoklonalen Antikörper gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2) (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

1.2 Radiotherapie nach brusterhaltender Chirurgie

1.2.1 Stellenwert der adjuvanten Radiatio nach brusterhaltender Operation

Trotz des gut belegten Effekts der (neo-)adjuvanten Systemtherapie auf die Lokalrezidivrate kann noch nicht auf eine postoperative Bestrahlung verzichtet werden. Im Therapiekonzept ist die postoperative Strahlentherapie weiterhin die „wichtigste und effektivste Maßnahme, um das Risiko für ein intramammäres Rezidiv zu senken“ (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018). In Metaanalysen randomisierter Studien wurden reduzierte lokoregionale und distante Rezidivraten nach adjuvanter Radiatio beschrieben. Die verbesserte lokale Tumorkontrolle führt zur Reduktion der brustkrebspezifischen Mortalität (Clarke et al., 2005; Darby et al., 2011), zusätzlich zu dem Effekt der standardisierten Operationstechniken und verbesserter histopathologischer Verfahren (Darby et al., 2011; Fyles et al., 2004; Hughes et al., 2004; Kunkler et al., 2015). Nach BET wegen eines invasiven Karzinoms oder eines DCIS ist die adjuvante Radiatio daher obligat; standardmäßig als perkutane, adjuvante Ganzbrustbestrahlung (*external beam radiotherapy*, EBRT). Kontraindikationen der Bestrahlung sind damit auch Kontraindikationen eines brusterhaltenden Vorgehens. Nur in Ausnahmefällen kann bei bestimmten Bedingungen unter Anwendung einer adjuvanten antihormonellen Therapie individuell der Verzicht auf die postoperative Bestrahlung erwogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

Zudem besteht die Möglichkeit einer sogenannten Boost-Bestrahlung zur lokalen Dosisaufsättigung des Tumorbettes. Diese kann die Rezidivrate nach brusterhaltender Operation noch weiter verringern (Antonini et al., 2007; Bartelink et al., 2015; Romestaing et al., 1997). Jedoch reduziert sie nicht die Mortalitätsrate. Bei Patientinnen bis zum 50. Lebensjahr wird die Boost-Bestrahlung generell empfohlen; bei einem höheren Lebensalter sollte sie auf Grund der häufiger auftretenden Spätfolgen nur bei erhöhtem lokalen Rückfallrisiko durchgeführt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018).

1.2.2 Intraoperative Radiotherapie (IORT) des Mammakarzinoms

Der größte Anteil der intramammären Rezidivtumoren kommt in unmittelbarer Nähe des initialen Tumors vor (Kurtz et al., 1989). So wurde in den letzten Jahren diskutiert, ob hinsichtlich der lokalen Tumorkontrolle die Bestrahlung der ganzen Brust oder die höher dosierte, aber auf den betroffenen Brustteil begrenzte Bestrahlung vergleichbare Ergebnisse erzielen. Parallel zur Entwicklung dahingehender Bestrahlungsverfahren

wurde die akzelerierte Teilbrustbestrahlung (*accelerated partial breast irradiation*, APBI) als Methode zur intraoperativen Radiatio eingeführt. Ihre Anwendung ist sowohl als Nutzung niederenergetischer Röntgenstrahlung aus einer mobilen Bestrahlungseinheit (INTRABEAM®-System) als auch Anwendung von Elektronenstrahlen (z. B. Mobetron, Novac 7) als sogenannte IOERT (*intraoperative electron radiation therapy*) möglich.

Der Hauptvorteil beider Methoden liegt in der unmittelbaren Anwendung nach der Tumorexzision und damit der zielgerichteten Anwendung der Strahlen. Die Anwendung der adjuvanten, perkutanen Boost-Bestrahlung birgt dagegen die Gefahr eines Verfehlens des Tumorbettes (sogenannter „*geographic miss*“) in sich, da im Rahmen der BET oftmals eine Gewebemobilisation zur chirurgischen Defektdeckung stattfindet, um das entstandenen Volumendefizit auszugleichen und sich dadurch das Tumorbett verschiebt. Der zweite Vorteil der IORT liegt in der zeitlich direkten Anwendung mit Vermeidung des „*temporal miss*“: Zwischen der Operation und der ersten perkutanen Radiatio kann es zu einer Vermehrung residueller Tumorzellen kommen (Sütterlin et al., 2015). Als Letztes besteht die Möglichkeit, die Radiotherapie abhängig vom individuellen Risiko zu intensivieren oder zu deeskalieren. Bei Patientinnen mit höherem Rezidivrisiko kann die IORT additiv zur adjuvanten Ganzbrustbestrahlung angewendet werden, bei niedrigen Rezidivrisiken als alleinige akzelerierte Teilbrustbestrahlung (Vaidya et al., 2014). Die häufigste Anwendungsform der IORT und inzwischen fester Bestandteil der Standardbehandlung des frühen Mammakarzinoms ist der intraoperative Boost.

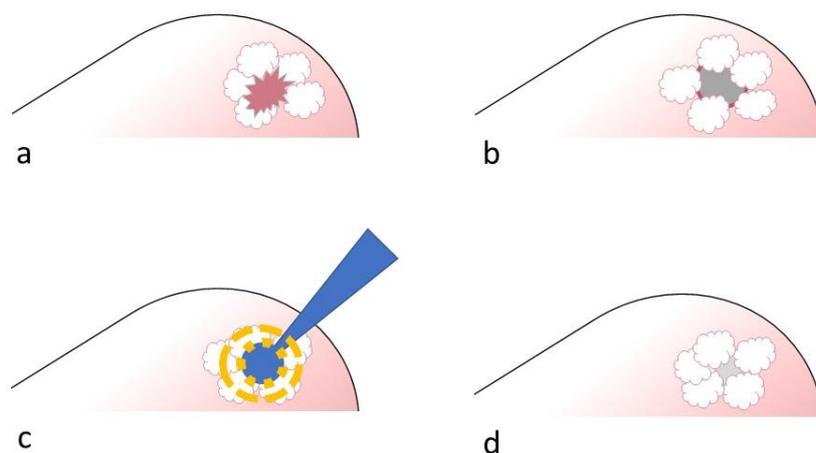


Abb. 1.2:

Schematische Darstellung des Ablaufes einer IORT mittels INTRABEAM®-System.

a) Ermittlung der Lokalisation des Tumors, b) Brusterhaltende Therapie mit Exzision des Tumors, c) Platzierung des INTRABEAM®-Applikators in geeigneter Größe in der Wundhöhle und Bestrahlung des Tumorbettes mit 20 Gy, d) Entfernung des Applikators und Wundverschluss.

1.2.2.1 Anwendung der IORT als intraoperative Tumorbettaufsättigung

In mehreren Studien wurden niedrige Lokalrezidivraten zwischen 2,5 und 1,5 % innerhalb von 5 Jahren nach intraoperativer Boost-Bestrahlung beschrieben (Blank et al., 2010; Vaidya et al., 2011; Wenz et al., 2010). Die postoperative Bestrahlungsdauer wird um fünf bis acht Tage verkürzt (Wenz et al., 2010). Zudem wird die Therapie von den Patientinnen sehr gut vertragen, indiziert durch ausgezeichnete kosmetische Ergebnisse und eine geringe Akut- und Langzeittoxizität (Kraus-Tiefenbacher et al., 2006a; Kraus-Tiefenbacher et al., 2006b). Aufgrund dieser Vorteile wird die IORT mit Boost als geeignete Alternative zur postoperativen Boost-Bestrahlung des Tumorbettes erachtet (Sedlmayer et al., 2013; Sütterlin et al., 2015).

1.2.2.2 Anwendung der IORT als alleinige akzelerierte Teilbrustbestrahlung

Neben der Anwendung der IORT zur Boost-Bestrahlung ist unter bestimmten Voraussetzungen bei Patientinnen mit niedrigem Rezidivrisiko auch eine alleinige Anwendung anstatt der konventionellen EBRT möglich. Ebenso kann eine einmalige, auf den Primärtumorbereich beschränkte Radiatio bei Patientinnen mit höherem Lokalrezidivrisiko in Betracht gezogen werden, wenn eine Ganzbrustbestrahlung (z. B. aufgrund Vorbestrahlung, Alter, Komorbidität) nicht durchführbar ist (Leitlinienprogramm Onkologie, 2018). Im „TARGIT A Trial“, einer internationalen, randomisierten Studie, wurde die Wirksamkeit eines „risikoadaptierten Konzeptes“ bei alleiniger Anwendung der IORT untersucht (Vaidya et al., 2014). Als Einschlusskriterien wurden sowohl das Alter als auch biologische und klinische Determinanten des Tumors berücksichtigt (siehe Tabelle 1.2). Im Behandlungskollektiv wurde eine alleinige IORT appliziert, im Kontrollkollektiv eine konventionelle adjuvante Ganzbrustbestrahlung. Innerhalb des Behandlungskollektives erfolgte eine weitere Aufteilung in 2 Gruppen: Im „Prepathology Stratum“ wurde die IORT innerhalb derselben Operation unmittelbar nach der Tumorexzision angewendet, während im „Postpathology Stratum“ ein zweizeitiges Vorgehen erfolgte. Hier wurde zunächst die BET durchgeführt, und nach Erhalt der histologischen Auswertung, ungefähr drei bis vier Wochen später, die IORT. Die Patientinnen wurden anhand ihrer Risikofaktoren stratifiziert (siehe Tabelle 1.2). Wurde bei einer Patientin des Behandlungsarmes einer der Risikofaktoren festgestellt, fand bei Patientinnen des „Prepathology Stratum“ zusätzlich zur IORT eine konventionelle Ganzbrustbestrahlung statt. Beide Strata wurden einzeln sowie gemeinsam untersucht und ausgewertet.

Tabelle 1.2:

International gültige Einschlusskriterien des „TARGIT A Trials“ sowie Risikofaktoren, welche die Durchführung einer adjuvanten Ganzbrustbestrahlung indizierten.

	Einschlusskriterien	Risikofaktoren
Alter	> 45 Jahre	
Ausbreitung	monozentrisches Karzinom	
Histologischer Subtyp	invasiv-duktales Karzinom keine präinvasive Komponente	anderer histologischer Subtyp
Tumorgröße	< 3,5 cm	≥ 3,5 cm
Nodalstatus	N0	
Metastasierung	M0	
Resektionsstatus		freier Resektionsrand < 1 mm

Die Ergebnisse der Studie spiegeln die zeit- und lokalisationskritische Wirksamkeit einer IORT wider: Die 5-Jahres-Lokalrezidivraten der Patientinnen im „*Prepathology Stratum*“ zeigten gegenüber der Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede, die im „*Postpathology Stratum*“ waren gegenüber der zugeteilten Kontrollgruppe signifikant erhöht. Auch im Gesamtkollektiv lagen die Lokalrezidivraten im Behandlungsarm signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Diese Befunde hatten jedoch im Gruppenvergleich keinen Einfluss auf die Gesamtmortalität sowie die brustkrebspezifische Mortalität. Bei mittels IORT bestrahlten Patientinnen wurden zudem signifikant weniger nicht-brustkrebsassoziierte Todesfälle sowie weniger postradiogene Hautirritationen festgestellt.

Der Wirksamkeitsunterschied zwischen den beiden Strata, der sich auf die Theorien des „*temporal miss*“ und „*geographic miss*“ stützt, wirft die Frage auf, welche Prozesse durch die IORT angesteuert werden.

1.3 Das Tumorbett

Der Effekt der IORT oder postoperativen perkutanen Radiatio ist auf die Eliminierung der nach Tumorexzision verbliebenen malignen Zellen zurückzuführen. Diese wird v. a. durch deren im Vergleich zum umliegenden Gewebe erhöhte Radiosensitivität erklärt, u. a. aufgrund eingeschränkter DNA-Reparaturmechanismen. Jedoch gibt es Gründe zur Annahme, dass zusätzlich eine Alteration des lokalen Milieus dazu beiträgt.

1.3.1 Das Tumorbett als immunologischer Knotenpunkt

Die Bezeichnung „Tumorbett“ ist ein Sammelbegriff für das gesamte tumorumgebende Mikromilieu inklusive tumorumgebendem Stroma, diversen Effektorzellen des Immunsystems, Thrombozyten, Hormonen und Wachstumsfaktoren (Goubran et al., 2014). Die physiologische Gewebshomöostase entsteht durch eine stabile Gewebestruktur, streng kontrollierte Proliferation sowie regulierten Zelltod. Die Zellen interagieren mit und kommunizieren über die extrazelluläre Matrix (EZM), die u. a. von Fibroblasten gebildet wird. Diese reguliert die Zelldifferenzierung und beeinflusst die Immunantwort im Mikromilieu (Kalluri and Zeisberg, 2006). Weiter spielt die Angiogenese und die Verfügbarkeit der dafür nötigen Wachstumsfaktoren, die z. B. von Thrombozyten bereitgestellt werden (Burnouf et al., 2014; Goubran et al., 2013), eine wesentliche Rolle für die adäquate Nährstoffversorgung der Tumorzellen.

Eine Tumorentstehung und -ausbreitung ist nur in einer entsprechenden Umgebung möglich. Folglich bestehen Wechselwirkungen zwischen den malignen Zellen und ihrem Milieu, die den Grad der Tumorprogression und -proliferation, die Invasivität, das Metastasierungspotenzial und die Gesamtprognose wesentlich beeinflussen (Joyce and Pollard, 2009). Der Prozess der *Immunosurveillance*, der Elimination beschädigter, seneszenten oder maligner Zellen durch das Immunsystem, spielt hier eine wesentliche Rolle. Zahlreiche Beobachtungen weisen darauf hin, dass Fehler in immunologisch regulierten, molekularen Regelkreisen mit der Krebsentstehung und deren Progression assoziiert sind (Senovilla et al., 2013). Beispielsweise steigt die Rate an Malignomen unter einer Immunsuppression deutlich an (Mutz and Coukos, 2013).

Zusätzlich modifizieren die Tumorzellen unter diesem immunologischen Druck selbst häufig ihren Phänotyp (*Immunoediting*). Im Verlauf einer Krebserkrankung führt das zum Verlust spezifischer Oberflächenmarker oder anderer Erkennungsmoleküle (Dunn et al., 2002). Daten weisen darauf hin, dass der für die Tumorprogression essenzielle Prozess der

epithelial-mesenchymalen Transition (EMT, siehe 1.3.2.1) das Resultat dieses Immunoeditings sein könnte (Knutson et al., 2006).

1.3.1.1 Funktion der Leukozyten des Tumorbetts

Auch myeloide und lymphatische Immunzellpopulationen des Tumorbetts spielen spezifische Rollen im Zusammenspiel tumorfördernder und -hemmender Prozesse (Goubran et al., 2014). Tumoren werden in großem Maß von myeloiden Zellen des Knochenmarks (Monozyten/Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen, Mastzellen und dendritischen Zellen) infiltriert. Diese werden durch Zyto- und Chemokine aus dem Gefäßsystem heraus ins Tumorstroma hinein rekrutiert. Sie sind an der Regulation von Entzündungsprozessen und zahlreichen Immunmechanismen sowie an der Tumor- und Angiogenese beteiligt (Murdoch et al., 2008). Die dendritischen Zellen tragen den Hauptteil zur Antigenpräsentation im Tumorbett bei, einem essenziellen Bestandteil des Surveillance-Prozesses. Im Tumorbett vorliegende Mastzellen agieren zudem als Speicher für tumorfördernde Zytokine. Die Funktion eosinophiler und neutrophiler Granulozyten ist Diskussion aktueller Forschung (Murdoch et al., 2008).

Eine besondere Bedeutung in der Konditionierung des lokalen Milieus kommt den residenten Makrophagen des Tumorbettes (*tumor associated macrophages*, TAM) zu. Nach

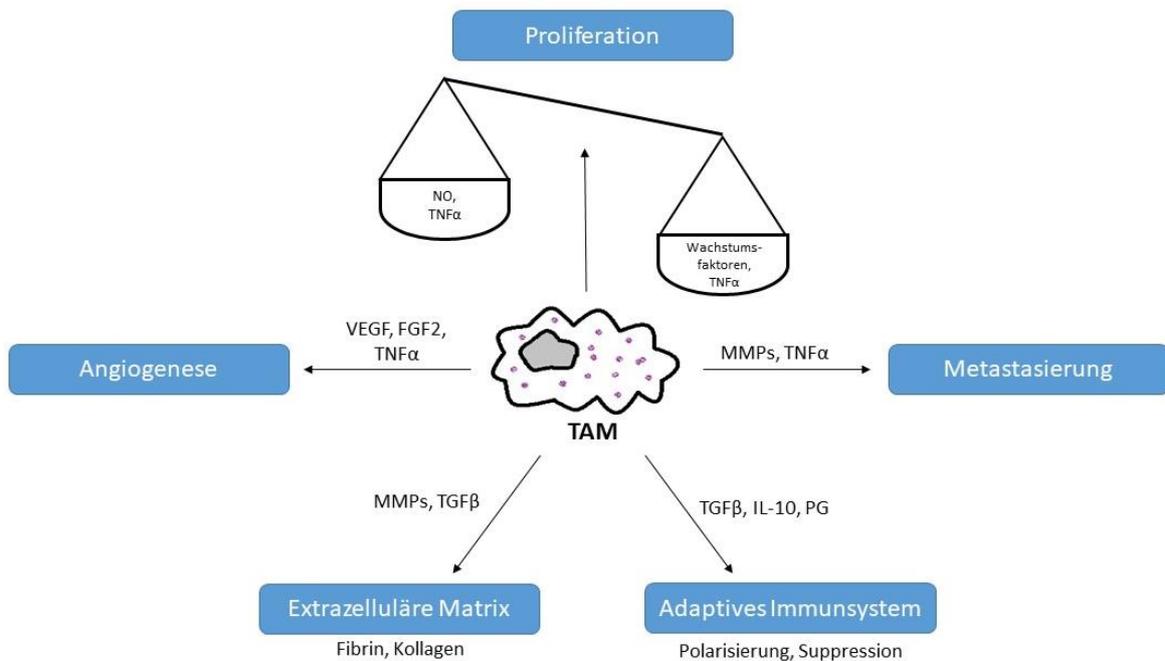


Abb. 1.3:

Schematische Darstellung der Rolle tumorassoziierter Makrophagen (TAM) in der Tumorimmunobiologie.

Abkürzungen: FGF = fibroblast growth factor, IL = Interleukin, MMP = Matrix-Metalloproteinase, NO = Stickstoffmonoxid, PG = Prostaglandin, TNF- α = Tumornekrosefaktor α , TGF = transforming growth factor, VEGF = vascular endothelial growth factor. Modifizierte Darstellung nach Mantovani et al., 2002

aktuellem Kenntnisstand wäre es zu stark vereinfacht, diese nur als Makrophagen der M2-Polarisierung zu bezeichnen (Mantovani and Locati, 2013), wenn auch diese Assoziation für das generelle Verständnis der Zellfunktionen (siehe Abb. 1.3) hilfreich sein mag.

Vielschichtig stellt sich auch die Rolle der ins Tumorbett rekrutierten Lymphozyten dar. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bilden den zentralen Bestandteil der tumoriziden, lymphozytären Immunabwehr. Sie induzieren den Zelltod vorgeschädigter Zellen unabhängig von deren *major histocompatibility complex*-Status durch hochwirksame Perforine. Weiterhin wirken sie durch wechselseitige Interaktion mit dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Zellen regulatorisch.

Die Einflussnahme des lokalen Milieus auf die Tumorprogression erfolgt T-Zell-vermittelt. Die T-Helferzellen (CD3+/CD4+) lassen sich in zwei Subpopulationen kategorisieren: die als Entzündungsmediatoren fungierenden Th1-Zellen und die Th2-Zellen. Erstere sind für die Vermittlung einer tumorsupprimierenden Inflammationsreaktion bekannt, Letztere sind potenzielle Mediatoren einer tumorfördernden Reaktion (Coussens et al., 2013; Stuelten et al., 2008). Außerdem erkennen die ins Tumorbett rekrutierten zytotoxischen T-Zellen (CD3+/CD8+) tumorassoziierte Antigene auf den MHC-Rezeptoren der Krebszellen als Trigger der Mechanismen, die zur Apoptose der erkannten Krebszellen führen (Smyth et al., 2005).

Als zentrale Steuerinstanz der T- und B-Lymphozyten für die tumorassoziierte Immunosurveillance sind regulatorische T-Zellen (T_{reg}) bedeutend. Ihre Rolle im Rahmen der Tumorgenese ist nicht abschließend geklärt. Bei zahlreichen Krebserkrankungen ist die durch T_{reg} geförderte Immunevasion mit einem negativen Outcome assoziiert. Jedoch zeigt sich bei Malignomen mit dominierender inflammatorischer Komponente wie dem Mammakarzinom, dass T_{reg} eine protektive Wirkung hinsichtlich Inflammation und damit einhergehender Tumorprogression aufweisen. Ihre Rolle für die Tumorgenese scheint in hohem Maße durch Faktoren des Mikromilieus beeinflusst zu sein (Whiteside, 2014).

1.3.1.2 Rolle mesenchymaler Stromazellen (MSC) im Tumorbett

Der Sammelbegriff mesenchymale Stromazellen (MSC) umfasst verschiedene, aus einer Vielzahl von Geweben isolierbare, Typen multipotenter Stammzellen bzw. Stromazellen. Die *International Society for Cell and Gene Therapy* (ISCT) definiert MSC anhand folgender Eigenschaften: Plastikadhärenz, mesodermales Differenzierungspotenzial (Entwicklung v. a. zu Fett-, Knochen- und Knorpelgewebe) sowie Expression eines spezifischen Profils an

Oberflächenmarkern, genauer die Präsenz von CD73, CD90 und CD105 bei Abwesenheit hämatopoetischer Marker (Bourin et al., 2013; Dominici et al., 2006).

MSC können primärer Bestandteil des Tumorstromas sein oder ins Tumorbett rekrutiert werden (Hall et al., 2007; Karnoub et al., 2007). Als sogenannte „*ambulatory cells*“ beeinflussen sie die Immunmodulation im Tumorbett, mit Wirkung sowohl auf die Wundheilung als auch die Tumorgenese. MSC zeigen die Eigenschaft, durch die Induktion von Stammzeleigenschaften in Tumorzellen ein höheres Malignitätspotenzial hervorzurufen (Chang et al., 2015). Im Mausmodell steigern MSC das metastatische Potenzial gewöhnlich schwach maligner Brustkrebszellen. Dabei stimulieren die Tumorzellen die MSC zur Sekretion des Zytokins RANTES (CCL5), das dann wiederum parakrin eine gesteigerte Motilität und Invasivität sowie ein erhöhtes metastatisches Potenzial der Tumorzellen bewirkt (Karnoub et al., 2007). MSC verstärken die Tumorentstehung und -progression durch eine Suppression der Immunantwort via Inhibition von B-, T- und NK-Zellen (Lee and Hong, 2017). Weiterhin fördern sie die Tumorangiogenese, indem sie zu endothelartigen Zellen oder Perizyten differenzieren, die pro-angiogenetische Faktoren (z. B. Ang-1, VEGF, PDGF, FGF) bilden können (Rhee et al., 2015). Durch die vermehrte Sekretion der Zytokine HGF, EGF, PDGF und TGF- β wird zusätzlich die EMT (siehe 1.3.2.1) verstärkt (Chang et al., 2015; Karnoub et al., 2007; Rhee et al., 2015). In Zusammenschau der aktuellen Datenlage beschreiben die Studien überwiegend eine tumorfördernde Wirkung der MSC (Lee and Hong, 2017). Es wurden aber auch anti-onkogene Funktionen beschrieben (Grisendi et al., 2016; Hong et al., 2014; Norozi et al., 2016). Die Rolle der MSC für die Tumorprogression steht im Mittelpunkt wissenschaftlicher Debatten und die molekularen Mechanismen sind noch nicht vollkommen ergründet.

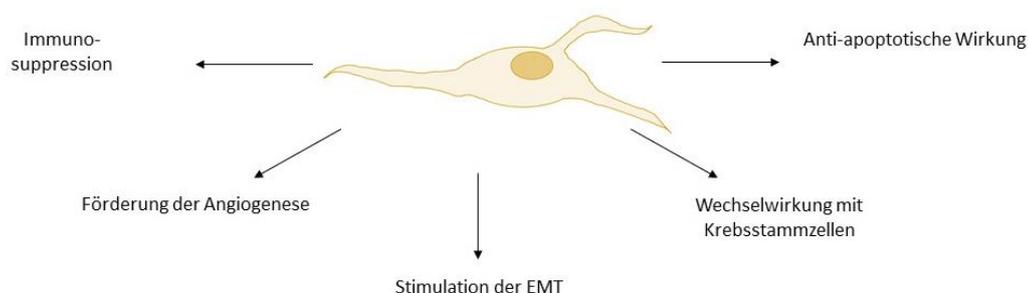


Abb. 1.4:

Übersicht über die pro-onkogenen Funktionen von MSC.

Zwar existieren Quellen, die den MSC neben den genannten pro-onkogenen Funktionen auch anti-onkogene Eigenschaften zuschreiben; jedoch ist im Zusammenspiel mit nach einer chirurgischen Intervention ablaufenden Prozessen (siehe 1.3.2) von einem Überwiegen der tumorpromovierenden Wirkung auszugehen, welche die MSC als „*ambulatory cells*“ im Rahmen der Wundheilung charakteristischerweise ausüben.

1.3.2 Wundheilung als Unterstützung der Tumorgenese

Die Wundheilung kann in die Stadien der Exsudation, Resorption, Proliferation und Reparatur eingeteilt werden. Sie findet durch eine Interaktion von Epithel-, Endothel- und Entzündungszellen, Thrombozyten und Fibroblasten sowie mittels einer Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren statt. In die Wundheilung involviert sind die Inflammation, Chemotaxis, Angiogenese, das Remodelling sowie die Produktion der EZM. Während der Tumorgenese laufen ähnliche Prozesse ab, jedoch unterliegen diese einer abweichenden Regulation, die durch eine Dysbalance wachstumsfördernder und -hemmender Faktoren zu anhaltender Zellaktivität und exzessiver Stromagenerierung führt (Hofer et al., 1999).

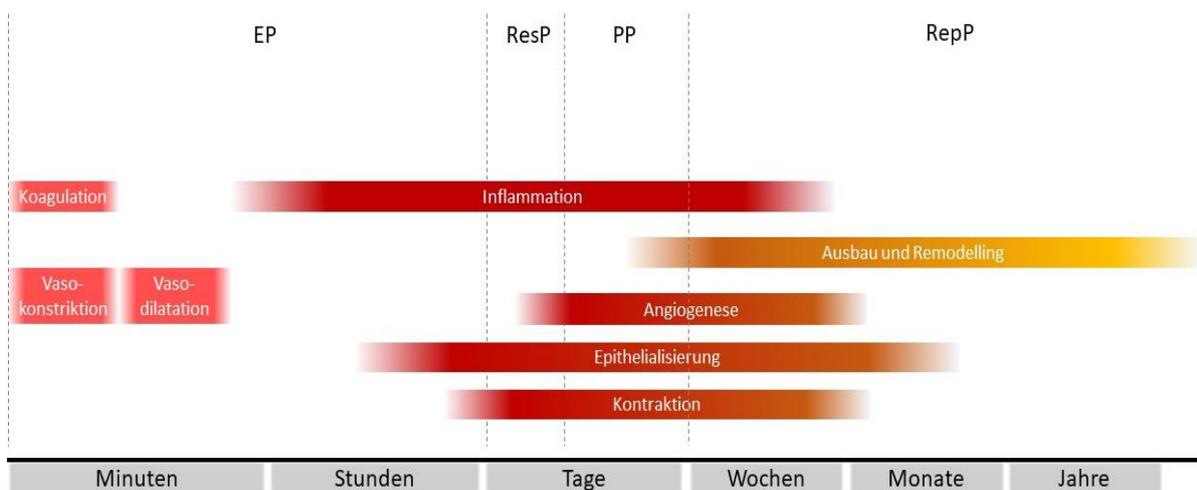


Abb. 1.5:

Schematische Darstellung der im Rahmen der Wundheilung ablaufenden Prozesse über die Zeit.

EP = Exsudationsphase, ResP = Resorptionsphase, PP = Proliferationsphase, RepP = Reparationsphase. Viele der im Rahmen der Wundheilung ablaufenden Prozesse (wie beispielsweise Angiogenese, Inflammation, Remodelling) sind auch der Tumorgenese zuträglich, unterliegen hierbei jedoch einer entkoppelten Regulation (Hofer et al., 1999).

1889 veröffentlichte Paget in seiner „seed-and-soil“-Hypothese die Auffassung, dass ein Tumor erst entstehen kann, wenn einzelne maligne Zellen („the seed“) auf ein für ihr weiteres Wachstum zuträgliches Mikromilieu („the soil“) treffen (Paget, 1889). Die Wundhöhle mit den in ihr ablaufenden, oben dargelegten Prozessen der Wundheilung bietet dieser Theorie folgend ideale Bedingungen, sowohl für nachwachsendes, gesundes Gewebe als auch für residuale Tumorzellen. Die dem Tumorwachstum zuträgliche Wirkung der chirurgischen Exzision konnte sowohl klinisch als auch experimentell belegt werden (Ceelen et al., 2014; Coffey et al., 2003). Lokalrezidive eines Mammakarzinoms entstehen in bis zu 90 % der Fälle in unmittelbarer Nähe der ehemaligen Lokalisation des exzidierten Primarius (Kurtz et al., 1989), was eine Beteiligung der im lokalen Milieu ablaufenden

Wundheilungsprozesse impliziert. In einer retrospektiven Studie ergab die grafische Analyse der zeitbezogenen Sterblichkeitsrate bei Patientinnen nach Mastektomie einen doppelgipfeligen Verlauf, die der unbehandelten Patientinnen nur einen singulären Peak. Daraus wurde geschlossen, dass der „natürliche Verlauf“ der Krebserkrankung durch die chirurgische Intervention advers verändert wird (Demicheli et al., 2001). Auch in experimentellen Ansätzen zeigte sich der stimulierende Einfluss wundassoziierter Faktoren auf die Tumorentstehung: Bei Mäusen bewirkt eine lokale Verwundung ein verstärktes Wachstum subkutan injizierter Brustkrebszellen. Der Effekt lokaler Verwundung auf das Tumorwachstum zeigte sich nicht bei immundefizienten Mäusen, sodass ein T-Zell-vermittelter Mechanismus vermutet wurde (Stuelten et al., 2008). Auch für andere Tumorentitäten zeigten sich vergleichbare Beobachtungen (Abramovitch et al., 1999; Hofer et al., 1998).

Ebenso ist der Zeitpunkt des Zusammentreffens von residualen Tumorzellen mit dem modifizierten Mikromilieu ein entscheidender Faktor: Zeamari et al. untersuchten bei Mäusen das Wachstum von Krebszellen innerhalb von Granulationsgewebe zu mehreren Zeitpunkten, um das tumorigene Potenzial verschiedener Phasen der Wundheilung zu analysieren. Der Inokulation von Krebszellen 8 Stunden bis 3 Tage nach dem Beginn des Wundheilungsvorganges folgte laut ihren Ergebnissen ein signifikant höheres Tumorwachstum, verglichen mit einer Einbringung der Tumorzellen im Zeitraum von 10 bis 28 Tagen nach Wundgenerierung (Zeamari et al., 2004).

Nach konventionellem Verständnis sind für den beobachteten Effekt in erster Linie zwei Mechanismen verantwortlich. Zum einen generieren in die Wundhöhle einwandernde Immunzellen und deren Entzündungsmediatoren nach einem chirurgischen Trauma einen Inflammationszustand. Dabei ist die Infiltration des Tumorgewebes mit Lymphozyten mit einer günstigeren Prognose assoziiert (de Visser et al., 2006), während eine Prädominanz von Makrophagen aufgrund deren starker, vielseitiger Mediatorenausschüttung mit einem gesteigerten Risiko für das Tumorwachstum einhergeht (Chen et al., 2005; Hagemann et al., 2005).

Zum anderen existiert die Theorie, dass der noch nicht entfernte Primarius die Sekundärfoci mit anti-angiogenen und anti-proliferativen Faktoren in einem Stadium der sogenannten „Dormanz“ hält. Ein Wegfall dieser hemmenden Faktoren durch Entfernung des Primärtumors würde dann eine Reaktivierung der Filiae induzieren (Ceelen et al., 2007). Dies kann für das Auftreten von Frührezidiven bei Brustkrebspatientinnen mit alleiniger Operation verantwortlich sein (Baum et al., 2005).

Aus den obigen Ausführungen wird ersichtlich, dass ein chirurgischer Eingriff im Tumorbett das Risiko sowohl für die Entstehung von Lokalrezidiven als auch von Fernmetastasen erhöhen kann. Die zunehmende Abhängigkeit von Blutgefäßen stellt dabei für maligne Zellen einen relevanten Grund dar, den Primärtumor zu verlassen und sich über die systemische Zirkulation umzusiedeln. Die wenigsten Zellen des Primarius weisen primär metastatisches Potenzial auf (Fidler, 2003; Weiss, 1986). Zur Erlangung entsprechender Eigenschaften spielt die EMT eine entscheidende Rolle.

1.3.2.1 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) im Rahmen der Wundheilung

Physiologisch findet die EMT im Rahmen der Gastrulation und der Wundheilung statt. Dabei erlangen epitheliale Zellen sowohl die Morphologie als auch die funktionellen Charakteristika von Fibroblasten. Dieselben komplexen, zellulären Mechanismen, die die Zellmigration und -invasion bei der Embryogenese und der physiologischen Wundheilung ermöglichen, werden bei der Tumormetastasierung wieder durchlaufen. Dies legt nahe, dass ein vorbestehendes genetisches Programm an einem gewissen Punkt des Verlaufes einer Krebserkrankung wieder aktiviert wird (Formenti and Demaria, 2008).

Der im Rahmen der Wundheilung ablaufende Prozess der EMT stellt eine Möglichkeit dar, epithelialen Tumorzellen invasive Eigenschaften eines mesenchymalen Phänotyps sowie Stammzellcharakteristika zu vermitteln (Chang et al., 2015; Formenti and Demaria, 2008). Durch eine Modifikation des DNA-Expressionsprofils diverser Transkriptionsfaktoren verlieren die Tumorzellen ihren epithelialen Charakter und erlangen eine dedifferenzierte, motile, spindelförmige Morphologie (Bolos et al., 2003). Wie bereits im Kapitel 1.3.1.2 vorweggenommen, können MSC die EMT von Tumorzellen in entscheidendem Maße fördern (Chang et al., 2015). Beispielsweise kann das durch Neoplasien und chirurgische Trauma vorliegende inflammatorische Milieu die MSC zu einer Sekretion bestimmter Zytokine (wie TGF- β) anregen, die die EMT in Tumorzellen direkt induzieren (Trivanovic et al., 2016; Zhou et al., 2016). Zudem können MSC zur Degradierung der EZM beitragen (Zhang et al., 2014), was zu einer Reorganisation des Tumormikromilieus führen und die Verfügbarkeit EMT-fördernder Wachstumsfaktoren steigern kann (Trivanovic et al., 2018). Auf diesen oben beschriebenen vielfältigen Interaktionen gründet sich die Theorie, dass eine Unterbindung der EMT von Tumorzellen eine Möglichkeit darstellt, die Wirksamkeit bereits im klinischen Alltag eingesetzter systemischer Therapien zu verbessern und die Bildung therapieresistenter Krebszellen zu reduzieren (Trivanovic et al., 2018).

1.3.3 Einfluss ionisierender Strahlung auf das Tumorbett

Über Jahrzehnte wurde die Effektivität einer lokalen Radiotherapie mit ionisierender Strahlung in erster Linie auf die direkte biologische Wirkung auf die Tumorzellen reduziert. Der Tumorbetteffekt, der die proliferationshemmende Wirkung einer Radiatio auf ein bestrahltes Gewebe beschreibt, ist direkt nach der Bestrahlung am höchsten und nimmt im weiteren Verlauf stetig ab (Haveman et al., 2007). Deswegen führt der Einfluss einer Radiatio zu einem möglichst frühen Zeitpunkt nach chirurgischer Intervention zu einer wesentlich stärkeren Hemmung des Tumorwachstums. Die Modifikation des Mikromilieus stellt in diesem Zusammenspiel wohl eine entscheidende Rolle (vgl. Abb. 1.6).

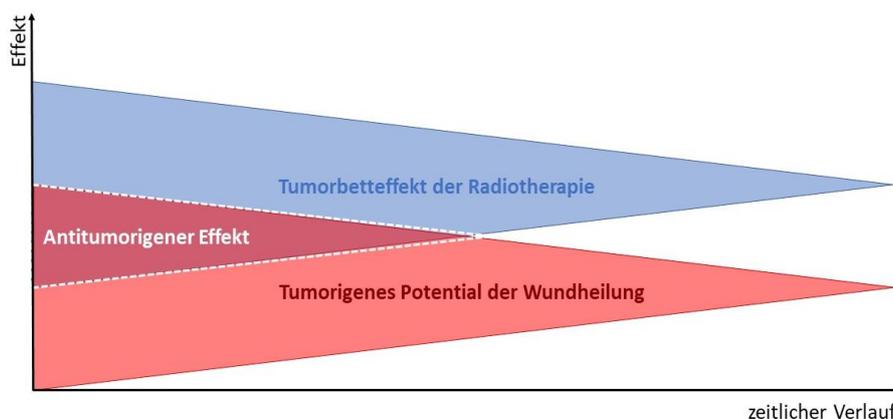


Abb. 1.6:
 Visualisierung des Zusammenspiels der Effekte chirurgischer und radiotherapeutischer Interventionen und des daraus resultierenden antitumorigenen Effektes über die Zeit.

In jüngster Zeit wuchs die Erkenntnis, dass auch Wirkungen auf das Tumorbett eine entscheidende Rolle bei der Beeinflussung der Krebserkrankung spielen. Der Begriff des „abscopalen Effektes“ beschreibt die Reduktion des Tumorwachstums außerhalb des Bestrahlungsfeldes. Bereits zuvor wurde dargelegt, dass die verbesserte lokale Tumorkontrolle zur Reduktion der brustkrebspezifischen Mortalität führt (Clarke et al., 2005; Darby et al., 2011). Eine Radiatio bei Mäusen mit in beide Flanken implantierten Mammakarzinomen verringert nicht nur das Wachstum des bestrahlten, sondern auch des unbestrahlten Herdes, wenn zuvor die Zahl dendritischer Zellen durch die Gabe von Flt3-Ligand erhöht wurde (Demaria et al., 2004). Dies verdeutlicht die Relevanz des Immunsystems für den abscopalen Effekt. Formenti und Demaria entwickelten hieraus, dass eine Beteiligung des Immunsystems mit dem Tumorbett als zentrales Steuerelement die systemische Wirkung einer lokalen Bestrahlung vermittelt (Formenti and Demaria, 2009). Der Großteil bisher publizierter Daten bezüglich der lokalen Auswirkungen einer Bestrahlung bezieht sich dabei auf die konventionelle, perkutane Radiotherapie (EBRT).

1.3.3.1 Immunologische Aspekte lokaler Tumorkontrolle durch Radiotherapie

Die immunmodulatorischen Effekte auf Zellebene scheinen abhängig von der applizierten Strahlendosis zu sein. Niedrige Strahlendosen bewirken eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems, führen jedoch nicht zum Zelltod. Unter dem Einfluss diverser Immunzellpopulationen des Mikromilieus kann diese Situation der Entstehung von Neoplasien sogar zuträglich sein (Coates et al., 2008; Wright and Coates, 2006). Hohe Strahlendosen hingegen scheinen einen T-Zell-vermittelten, antineoplastischen Effekt zu haben. Zudem beeinflusste die Fraktionierung der Gesamtstrahlendosis in einer präklinischen Studie die Wirkung, sodass diese anti-tumorogene Immunantwort einer hochdosierten Strahlentherapie durch deren Fraktionierung aufgehoben wurde (Lee et al., 2009).

Den radiobiologischen Ansatz zur Erklärung der Effekte einer Strahlentherapie liefern die durch ionisierende Strahlung verursachten DNA-Schäden, als „die 5 Rs der Radiobiologie“ zusammengefasst: **R**adiosensitivität, **R**eoxygenierung, **R**edistribution innerhalb des Zellzyklus, **DNA-R**eparatur und **R**epopulation (Steel et al., 1989). Diesem Modell zufolge entsteht die Strahlenwirkung durch direkte Schädigung der DNA der Tumorzellen oder durch die Generierung freier Radikale wie ROS (*reactive oxygen species*), die zum Zelltod führen (de la Cruz-Merino et al., 2014).

Essenziell für eine erfolgreiche Radiotherapie ist jedoch ebenso die Fähigkeit des gesunden Gewebes, Kollateralschäden zu überstehen. Dafür sind überlebende Zellen nötig, die über Zwischenschritte die Bildung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und Oberflächenmarkern im Tumorbett induzieren. Diese Modulation des lokalen Milieus liefert letztendlich die benötigten molekularen Signale zur Induktion einer effektiven Immunantwort (Demaria and Formenti, 2007). Nach aktuellen Erkenntnissen sind in diese Reaktion sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem involviert. Die dafür bedeutende Aktivierung unterschiedlicher T-Zell-Typen kann durch diverse molekulare Mechanismen herbeigeführt werden (de la Cruz-Merino et al., 2014; Shiao and Coussens, 2010). Auch die Abfolge physikalischer Ereignisse ist entscheidend für die immunvermittelte Effektivität einer Radiotherapie. Über das Lymphsystem wandern mit Tumorantigenen beladene dendritische Zellen in lokale Lymphknoten, wo sie T-Zellen aktivieren. Diese T-Effektorzellen erreichen das Tumorbett durch den bei stattfindender Bestrahlung aufgebauten Gradienten bestimmter Zytokine (z. B. CXCL16), was in einer verstärkten lokalen Immunantwort resultiert (Matsumura and Demaria, 2010). Anschließend können die Immunzellen leichter zu den Tumorzellen durchdringen, was vor

der Radiatio durch die neoplastisch bedingte, gestörte Zellarchitektur schwer möglich war (Lugade et al., 2005; Lugade et al., 2008). Wenn die zytotoxischen Lymphozyten bereits im Tumorbett sind, wird die Immunantwort durch eine zusätzlich gesteigerte Expression von Todesrezeptoren (z. B. Fas-Rezeptor) verstärkt (Chakraborty et al., 2004; Sheard, 2001). So lässt sich zusammenfassen, dass eine Bestrahlung die Eigenschaften des Mikromilieus verändert und die Zugänglichkeit für das Immunsystem vereinfacht. Das kann die Auswirkungen einer Radiatio durch direkte und indirekte Gewebeschädigung sowie durch immunomodulatorische Mechanismen unterstützen (de la Cruz-Merino et al., 2014).

1.3.3.2 Einfluss ionisierender Strahlung auf MSC

Aufgrund der bereits dargelegten Relevanz der MSC für die Tumorgenese ist deren Verhalten bei ionisierender Strahlung von zentralem Interesse. Der Großteil bisheriger Studien untersucht das Verhalten der MSC bei postoperativer Radiatio, wie sie z. B. bei einer Knochenmarksablation zum Einsatz kommt. Studien über die Auswirkung einer *in-vivo*-Bestrahlung mit 20 Gy auf MSC, wie es bei der IORT der Fall ist, sind bislang nicht veröffentlicht. Aufgrund ihres regenerativen Potenzials werden die MSC als vielversprechende Kandidaten in der klinischen Anwendung betrachtet, beispielsweise in der Stammzelltransplantation bei hämatoonkologischen Erkrankungen. Dabei zeigte sich, dass sie der Regeneration von bestrahltem Gewebe zuträgliche, radioprotektive und teilweise auch radioresistente Eigenschaften aufweisen (Chapel et al., 2013; Chen et al., 2006; D'Andrea et al., 2012; Nicolay et al., 2015a; Nicolay et al., 2013). Was als Nutzen bei einer erfolgreichen Geweberegeneration betrachtet wird, kann von Nachteil bei der therapeutischen Radiatio des Mammakarzinoms sein, sollten sich die schützenden Eigenschaften der MSC neben physiologischem Gewebe auch auf residuale Tumorzellen auswirken. Allerdings zeigten sich die genannten Beobachtungen bei deutlich geringeren Strahlendosen als jene einer IORT. Zudem fand die Radiatio in vielen Fällen nicht *in vivo*, sondern isoliert *in vitro* statt, sodass Interaktionen mit dem Tumorbett sowie dem durch die Bestrahlung aktivierten Immunsystem unberücksichtigt blieben. Die Auswirkung einer Radiatio im Setting einer IORT auf das Verhalten der MSC ist daher relevant im Hinblick auf eine mögliche Verbesserung des onkologischen Outcomes durch die Veränderung lokaler immunologischer Faktoren.

1.3.3.3 Einfluss einer IORT auf lokale immunologische Faktoren

Die Effektivität der IORT konnte, wie im Kapitel 1.2.2 ausgeführt, in klinischer Evidenz belegt werden. Bisher publizierte Erkenntnisse begründen die Wirkung einer IORT v. a. mit der Inaktivierung residualer Tumorzellen durch eine Überlastung ihrer DNA-Reparationsmechanismen und daraus resultierender genomischer Instabilität. Außerdem findet die Elimination verbliebener maligner Zellen bereits intraoperativ statt, was folglich deren Kontakt mit dem proliferationsfördernden Milieu der heilenden Wundhöhle in entscheidendem Maß unterbindet (Herskind et al., 2017).

Wenige experimentelle Arbeiten beschreiben den Effekt einer IORT auf das lokale Milieu bzw. den Tumorbetteffekt. Einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis lokaler Wirkungsmechanismen der IORT leistete die Arbeit von Belletti et al.: In ihrer Studie untersuchten sie repräsentativ für das lokale Milieu der Wundhöhle die funktionellen und proteomischen Eigenschaften der Wundflüssigkeit (im Folgenden WF), die 24 Stunden nach BET mit und ohne IORT aus den im Tumorbett einliegenden Drainagen der Brustkrebspatientinnen gewonnen wurde. Die IORT veränderte die molekulare Zusammensetzung sowie die biologische Aktivität der WF und damit die Wachstumsbedingungen im Tumorbett, tendenziell zu Ungunsten einer Rezidivbildung (Belletti et al., 2008): Wachstum, Migration sowie Invasion der Brustkrebszellen wurden durch die Applikation bestrahlter WF signifikant eingeschränkt. Die Autoren nannten veränderte Konzentrationen der Faktoren HGF, IL-10, IL-13, IL-5, IL-1 β sowie Leptin in intraoperativ bestrahlter WF als potenzielle Mediatoren ihrer veränderten Wirksamkeit. Jedoch können nur für zwei getestete Faktoren (IL-10 und IL-13) signifikanzindizierende *p*-Werte genannt werden; die restlichen *p*-Werte liegen über dem gewählten Signifikanzniveau von 0,05 (bei HGF der Fall) oder werden nicht angegeben. Weitere Studien, die den Einfluss einer IORT auf ein vergleichbar breites Spektrum an Zytokinen und Wachstumsfaktoren untersuchen, existieren bisher nicht. Wir entwarfen unsere Arbeit, um die genannten Ergebnisse nachzuvollziehen und durch komplett individualisierte Analyse veränderter Faktoren eine hohe statistische Genauigkeit der Daten zu gewährleisten. Weiterhin untersuchten wir den Einfluss auf funktionelle Eigenschaften von MSC, welche als zentrale Vermittler im Tumorbett Einfluss auf zahlreiche immunologische Vorgänge ausüben und damit das Potential zu einer tumorfördernden Konditionierung des Mikromilieus aufweisen.

2. ZIELSETZUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss der IORT auf diverse Komponenten des lokalen Immunsystems im Tumorbett zu untersuchen. Hierbei wurden Aspekte der zellulären sowie der humoralen Abwehr betrachtet. Neben MSC aus dem Gewebe, wurden Immunzellen und sezernierte Faktoren aus der Wundflüssigkeit analysiert. Wir adressierten auch, ob die humoralen Faktoren zu einer veränderten Funktion von MSC beitragen.

Die Analyse **zellulärer Immunfaktoren** des Tumorbettes umfasst folgende Komponenten:

- Ein Ziel der Studie war es festzustellen, ob eine IORT die Zusammensetzung von MSC im Wundbett verändert. Hierfür wurden MSC aus Gewebebiopsaten des Tumorbettes von IORT und Nicht-IORT Patientinnen isoliert. Es wurde neben der Bestimmung der Vitalität, des Wachstumspotenziales sowie des Immunphänotyps auch eine Analyse des MSC- Differenzierungspotenziales durchgeführt.
- Eine zweite Frage war, ob sich die zelluläre Zusammensetzung der Immunzellen im Wundbett durch eine IORT verändert. Mittels Durchflusszytometrie, erfolgten Vitalitätsbestimmungen, Messungen des Aktivierungszustandes und Untersuchungen der Komposition der leukozytären Fraktion der postoperativ gewonnenen WF im Vergleich zu jener des peripheren Blutes hinsichtlich der mengenmäßigen Alteration sowohl der **myeloiden Reihe** (beinhaltend Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen) als auch der **lymphoiden Reihe** (bestehend aus diversen T-Zell-Subpopulationen inkl. regulatorischer T-Zellen sowie NK-Zellen) unter der Anwendung einer IORT.

Die Analyse der lokalen **humoralen Antwort** erfolgte durch Zytokin-Analysen und funktionale Untersuchungen der postoperativ gewonnenen WF:

- Um den Einfluss einer IORT auf die Zytokinprofile der WF zu erforschen, wurden zunächst alterierte Faktoren durch ein Screeningverfahren identifiziert und die Veränderung anschließend selektiv quantifiziert.
- Der Einfluss dieser Alterationen auf das Verhalten von MSC und Brustkrebszellen wurde durch die Verwendung der WF als Medienzusatz funktional analysiert.

ZIELSETZUNG

Hierzu wurden die genannten Zelltypen auf Veränderungen der Zellproliferation, der Wundheilungsfähigkeit sowie des Migrationsverhaltens untersucht.

- Zusätzlich wurde untersucht, ob auch das Sekretom der MSC des Tumorbetts durch den Zusatz der WF zum Kulturmedium beeinflusst wird.

3. PATIENTINNEN UND METHODEN

3.1 Rekrutierung

Insgesamt wurden 42 Patientinnen, die zwischen Mai 2015 und April 2018 in der Frauenklinik der Universitätsmedizin Mannheim eine BET erhielten, in die Studie eingeschlossen. Einschlusskriterien der Studie waren:

- Weibliches Geschlecht
- Erstdiagnose eines Mammakarzinoms ipsilateral
- Nachweis eines invasiven Karzinoms in der präoperativ durchgeführten Stanzbiopsie
- Durchführung einer primär operativen, brusterhaltenden Therapie, ggf. mit IORT.

Alle Patientinnen wurden im Vorfeld über die im Rahmen der Studie erfolgenden Maßnahmen sowie bestehenden Risiken und Komplikationen informiert und bestätigten mit ihrer Unterschrift ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie. Im Vorfeld stimmte die Ethikkommission II der Universität Heidelberg der Initiierung der Studie (Ethikvotum Nr. 2013-589N-MA) zu.

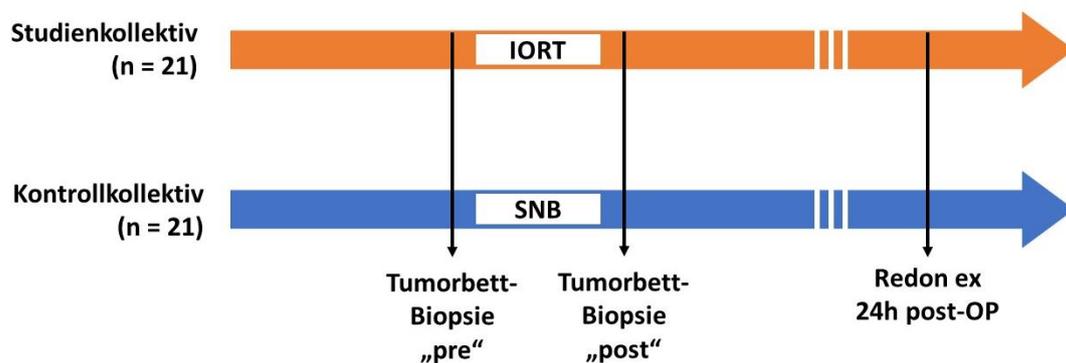


Abb. 3.1:

Schematische Darstellung des Studienablaufs.

Patientinnen des Studienkollektivs erhielten eine IORT, während bei Patientinnen des Kontrollkollektivs eine entsprechende Latenzzeit durch die in der Zwischenzeit durchgeführte Sentinellymphonodektomie (*sentinel node biopsy*, SNB) eingehalten wurde. Allen Patientinnen wurden jeweils vor und nach IORT bzw. SNB eine Gewebeprobe des Tumorbettes entnommen (vgl. Kapitel 3.2.1). Zusätzlich wurde 24 Stunden nach der Operation eine EDTA-Blutprobe und WF aus den Redon-Drainagen gewonnen (vgl. Kapitel 3.2.2).

Es erfolgte eine Aufteilung in zwei Gruppen: Die Patientinnen der IORT-Gruppe (n = 21) erfuhren unmittelbar nach der Exzision des Tumors eine IORT mit dem INTRABEAM®-System, während die Patientinnen der Kontrollgruppe (n = 21) intraoperativ unbestrahlt blieben. Ein Überblick über den allgemeinen Studienablauf inkl. der Zeitpunkte der Probenentnahmen verschafft Abb. 3.1. Die Diagramme 3.1 und 3.2 bestätigen die Vergleichbarkeit der Kontroll- und IORT-Gruppe.

Das Alter der Patientinnen der IORT-Gruppe lag zum OP-Zeitpunkt im Bereich von 47 bis 85 Jahren (Medianwert 64 Jahre), jenes der Patientinnen der Kontrollgruppe zwischen 34 und 78 Jahren (Medianwert 56 Jahre); hier lag kein signifikanter Unterschied vor. Die beiden Gruppen sind hinsichtlich der Verteilung der histologischen Subtypen und der molekularen Phänotypen vergleichbar (siehe Diagramme 3.2 und 3.3).

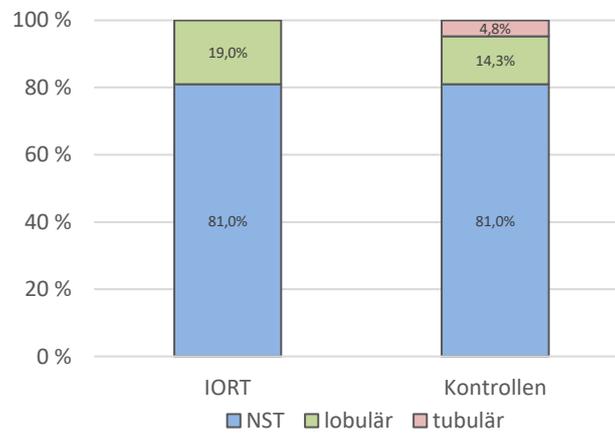


Diagramm 3.1:

Verteilung der histologischen Subtypen des Mammakarzinoms innerhalb der IORT-Gruppe sowie der Kontrollgruppe, n = 42 (21 IORT, 21 Kontrollen).

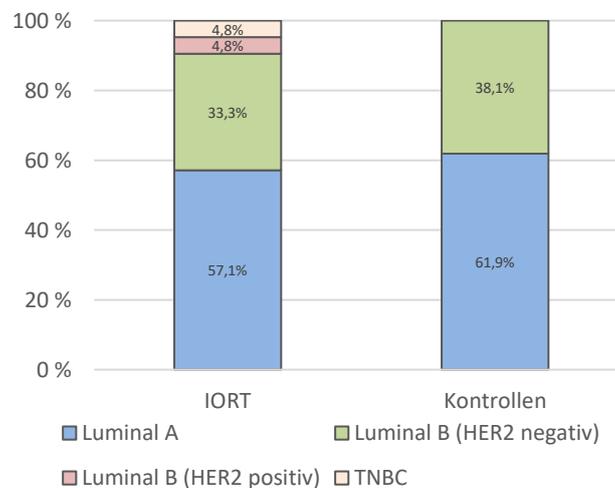


Diagramm 3.2:

Verteilung der molekularen Phänotypen des Mammakarzinoms innerhalb der IORT-Gruppe sowie der Kontrollgruppe, n = 42 (21 IORT, 21 Kontrollen). HER2 = *human epidermal growth factor receptor 2*, TNBC = *triple negative breast cancer*.

3.2 Probengewinnung und Asservierung

3.2.1 Isolation von MSC aus Brustgewebe

Die unter sterilen Kautelen entnommenen Tumorbett-Biopsate wurden bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Die Isolation der MSC erfolgte mittels Kollagenaseverdau (Collagenase I 0,075 %, Sigma-Aldrich) gemäß etablierten Protokollen (Kocaoemer et al., 2007). Im Verlauf erfolgte die Kultivierung (siehe 3.5.1.1) sowie die Charakterisierung (siehe 3.3) der MSC entsprechend folgendem Ablaufschema hinsichtlich der Passagierung der Zellen:

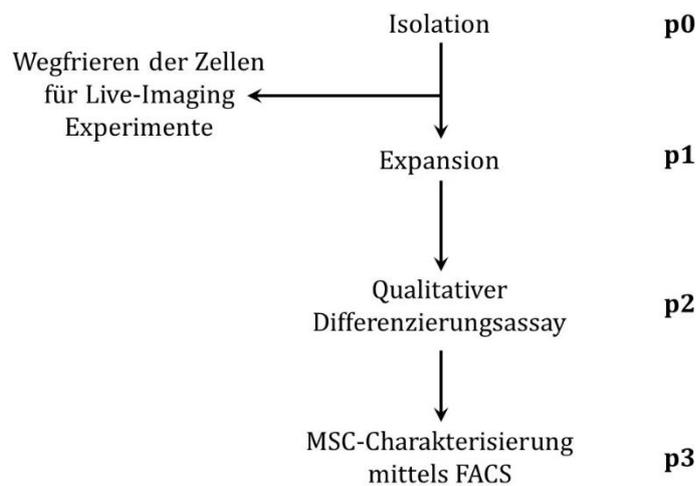


Abb. 3.2:

Übersicht über den Ablauf der für die Charakterisierung der MSC durchgeführten Experimente entsprechend der Generation (p = Passage) der primär isolierten MSC. Um die frisch isolierten MSC (p0) zu vermehren und zu konservieren, erfolgte zunächst ein Expansionschritt zu p1, bei dem die Zellen in niedriger Passage für zukünftige Zellkultur-Experimente (siehe 3.5) weggefroren wurden. In den darauffolgenden Generationen fanden qualitative Differenzierungsassays (DA, siehe 3.3.1) in p2 sowie die FACS-Charakterisierung anhand der Oberflächenmarker (siehe 3.3.2) in p3 statt.

3.2.2 Gewinnung, Prozessierung und Asservierung der Wundflüssigkeit

24 Stunden nach der Operation wurde die Flasche der Redon-Drainage entfernt und deren Inhalt unter sterilen Bedingungen in ein 50 mL-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation und Lyse der Erythrozyten folgte eine Zellzählung mithilfe des CASY® Systems und eine Einstellung einer definierten Zellzahl. Der Anteil der Zellen, der nicht direkt für durchflusszytometrische Analysen (siehe 3.4.1) weiterverwendet wurde, wurde in Einfriermedium aufgenommen und in der Gasphase flüssigen Stickstoffs bei -173° C asserviert.

3.2.3 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Unter PBMC (= *peripheral blood mononuclear cells*) versteht man die Fraktion der einkernigen Zellen im peripheren Blut (v. a. Lymphozyten und Monozyten), die einen runden Zellkern besitzen und wichtige Funktionen des Immunsystems übernehmen. Für deren Isolation wurde den Patientinnen am ersten postoperativen Tag eine Probe peripheren Blutes in einem EDTA-Röhrchen abgenommen und parallel zum Inhalt der Redon-Drainage mitprozessiert. Zunächst erfolgte – analog zur Vorgehensweise mit den Zellen der WF – eine Lyse der Erythrozyten mit einer anschließenden Zellzählung. Nach der Einstellung einer definierten Zellzahl wurde auch bei den PBMC der Anteil der Zellen, welcher nicht umgehend in der Durchflusszytometrie Verwendung fand, in Einfriermedium überführt und im Stickstofftank bei -173°C gelagert.

3.3 Charakterisierung der MSC aus Brustgewebe

Nach der Zellisolation aus den Brustgewebebiopsaten (siehe 3.2.1) wurde verifiziert, dass es sich bei der isolierten Zellfraktion tatsächlich um MSC mit Multilinen-Differenzierungspotential und typischem Oberflächen-Markerprofil entsprechend der im Kapitel 1.3.1.2 beschriebenen Kriterien der ISCT handelte. Anschließend wurden Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen herausgearbeitet. Wir erfassten die grundsätzliche Kultivierbarkeit, das qualitative Differenzierungspotential sowie die Expression der entsprechenden Oberflächenmarker.

3.3.1 Qualitative Differenzierungs-Assays (DA)

In diesem Versuch wurde untersucht, ob sich die isolierten MSC unter Inkubation mit entsprechenden Differenzierungsmedien zu Fett- bzw. Knochengewebe differenzieren. Da sich in Vorversuchen der Nachweis der chondrogenen Differenzierung als schwer reproduzierbar erwiesen hatte, wurde auf diesen Nachweis verzichtet.

3.3.1.1 Adipogener DA und Ölrot O-Färbung

Für die adipogene Differenzierung wurden die MSC gemäß etablierter Protokolle (Bieback et al., 2010; Bieback et al., 2009) für eine Gesamtkultivierungsdauer von 14-21 Tagen in adipogenem Differenzierungsmedium (ADM, PromoCell) kultiviert. Eine entsprechende Negativkontrolle unter Kultivierung in DMEM-FCS wurde mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen der Ölrot O-Färbung unterzogen. Dabei wurden die Zellen zunächst in Formalin fixiert und durch Zugabe von Isopropanol entwässert, danach wurden die im Rahmen der Differenzierung entstandenen Fettvakuolen mit Ölrot O-Lösung angefärbt. Daraufhin erfolgte die mikroskopische Beurteilung und Auswertung mittels Phasenkontrastfotografie.

3.3.1.2 Osteogener DA und Von-Kossa-Färbung

Analog zum Ansatz der adipogenen Differenzierung wurden die MSC gemäß etablierter Protokolle (Bieback et al., 2010; Bieback et al., 2009) für eine Gesamtkultivierungsdauer von 14-21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium (ODM) kultiviert. Auch hier wurde eine entsprechende Negativkontrolle unter Kultivierung in DMEM-FCS mitgeführt. Dann wurden die Zellen der Von-Kossa-Färbung unterzogen. Dabei wurden sie nach initialer Fixation zunächst mit 5 % Silbernitratlösung und anschließend mit 1 % Pyrogallol-

Lösung inkubiert. Nach erneuter Fixation mit Natriumthiosulfat konnte die mikroskopische Beurteilung mit Fotodokumentation vorgenommen werden.

3.3.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der MSC

Die Kriterien der ISCT (Dominici et al., 2006) umfassen u. a. die zwingende Expression der Oberflächenmarker CD29, CD73, CD90, CD105 und HLA-ABC. Gleichzeitig beinhaltete das von uns verwendete MSC-Panel eine Untersuchung auf hämatopoetische Marker, die laut den Vorgaben des ISCT bei den MSC abwesend sein müssen (siehe Tabelle 8.1). Zusätzlich wurde gemäß dem angewendeten Protokoll der Lebend/Tot-Farbstoff 7-Aminoactinomycin (7-AAD) verwendet, der nach nur in tote Zellen eindringen kann und der nach Interkalierung sein Fluoreszenzemissionsspektrum verändert und damit eine Quantifizierung ermöglicht.

Vorgehen:

In 5 FACS-Tubes wurden jeweils 5×10^4 – 1×10^5 der zu untersuchenden MSC (p3) in 100 μ L FACS-Puffer transferiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden erfolgte zunächst eine Inkubation mit 10 μ L F_cR Blocking Reagent pro Tube (5 Min., RT). Anschließend wurden vortitrierte der in Tabelle 8.1 genannten Antikörper dazugegeben, mit einer darauffolgenden lichtgeschützten Inkubation für 20 Min. bei 4° C inkubiert. Dann wurden pro FACS-Tube 2 mL CellWASH pipettiert und die Mischung wurde bei RT für 4 Min. und 420 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes folgte ein weiterer Waschschriff mit 2 mL CellWASH pro Tube mit anschließender Zentrifugation (4 Min., 420 g). Bis zur Analyse der Zellen wurden die Tubes bei 4° C gelagert. Die Analyse mit dem FACS Canto II fand nach der Zugabe von 0,5 μ L 7-AAD und einer Inkubationszeit von 10-30 Min. bei RT statt. Eine schematische Darstellung des Panels mit allen verwendeten Antikörpern inkl. entsprechender Fluorochrome findet sich im tabellarischen Anhang (Tabelle 8.1). Zur Auswertung wurde zunächst die typische Zellpopulation anhand ihrer Größe und Granularität erfasst. Am Ende erfolgte gemäß des etablierten MSC-Panels die Detektion der Antigene CD29, CD73, CD90, CD45, CD105, CD31, HLA-DR und HLA-ABC. Zur Identifikation der MSC fand ebenso die Überprüfung auf hämatopoetische Marker statt (vgl. Tabelle 8.1), die bei den MSC nicht vorhanden sein dürfen.

3.4 Analyse der Wundflüssigkeit (WF)

3.4.1 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie erfolgte unmittelbar nach der Probengewinnung, d. h. am ersten postoperativen Tag, unter Verwendung der aus der Redon-WF sowie der EDTA-Blutprobe gewonnenen Zellisolate in einer Zellkonzentration von 1×10^7 /mL (siehe 3.2.2). Waren zu wenig Zellen isolierbar, konnte die Probe nicht durchflusszytometrisch analysiert werden. Besondere Bedeutung kommt hier der Subkategorisierung der NK-Zellen zu, welche den zentralen Bestandteil der tumoriziden, lymphozytären Immunabwehr bilden. Von entscheidender Wichtigkeit für deren Tumorzellen-eliminierende Wirkung sind die Oberflächenmarker CD56 sowie CD16, denn eine hohe Expression dieser (entsprechend einem CD16⁺/CD56^{bright}-Phänotyp) ist mit einer gesteigerten Elimination von Tumorzellen assoziiert. Der CD56^{bright}-Phänotyp ist in erster Linie zur Produktion von Zytokinen befähigt, während der CD56^{dim}-Phänotyp v. a. im peripheren Blut vorkommt und vorrangig zytotoxisch wirkt (Takahashi et al., 2007).

3.4.1.1 Detektion und Aktivitätsbestimmung myeloider und T-lymphoider Zellen

Mittels FACS wurden die Zelltypen myeloiden und lymphoiden Ursprungs aus den WF der Redon-Drainagen sowie die aus den EDTA-Blutproben isolierten PBMC analysiert.

Um Interferenzen der Fluorochrome bei der mehrfarb-Analyse auszuschließen, wurden sogenannte FMO- („fluorescence minus one“) Kontrollen mitgeführt. Das Prinzip der FMO-Kontrollen beruht darauf, den kompletten Ansatz eines Tubes abzüglich des Fluorochromgekoppelten Antikörpers von Interesse zu prozessieren. Damit wird berücksichtigt, dass die anderen Fluorochrome in diesem Ansatz interferenzbedingt auch Wellenlängen außerhalb ihres Emissionsspektrums abgeben könnten, was im Detektionsprozess zu einem falsch-positiven Wert für den Antikörper von Interesse führt. Mithilfe der FMO-Kontrollen kann diese Hintergrundfluoreszenz erkannt und im Setzen der Gates für die entsprechenden Antikörper berücksichtigt werden.

Eine tabellarische Übersicht der, für die durchflusszytometrische Analyse der WF und PBMC verwendeten, Panels inkl. der beinhalteten Antikörper befindet sich im tabellarischen Anhang (Tabelle 8.2).

In unserer Arbeit fungierten das Tube 3 (hinsichtlich anti-CD69) und das Tube 4 (hinsichtlich anti-CD154) als FMO-Kontrollen für die beiden Aktivitätsmarker im Tube 2.

Vorgehen:

Nach Überführung der Zellsuspension in die FACS-Tubes wurde diese zunächst mit F_cR Blocking Reagent inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verringern. Daraufhin erfolgte das Pipettieren der Antikörper entsprechend der oben aufgeführten Einteilung (Volumina abhängig von der Farbstoffstärke) mit einer anschließenden lichtgeschützten Inkubation von 15 Min. bei 4° C. Nach der folgenden Zugabe von FACS-Puffer fand die Messung und die Auswertung mittels der Erfassungssoftware FACS Diva sowie Microsoft Excel statt.

Der in Tube 1 durchgeführte Versuchsansatz wird im Folgenden als „Myeloides Panel“ bezeichnet, obwohl auch NK-Zellen mitbestimmt werden. Folgende Gates wurden für die Analyse des myeloiden Panels gesetzt:

- Monozyten:** CD45+ → CD14+
- Neutrophile Granulozyten:** CD45+ → CD15+, CD16+
- NK-Zellen:** FSC/SSC (Lymphozyten) → CD45+, CD64+
Subtypisierung: CD56 vs. CD16
- Reife myeloische Zellen:** CD45+, CD64+

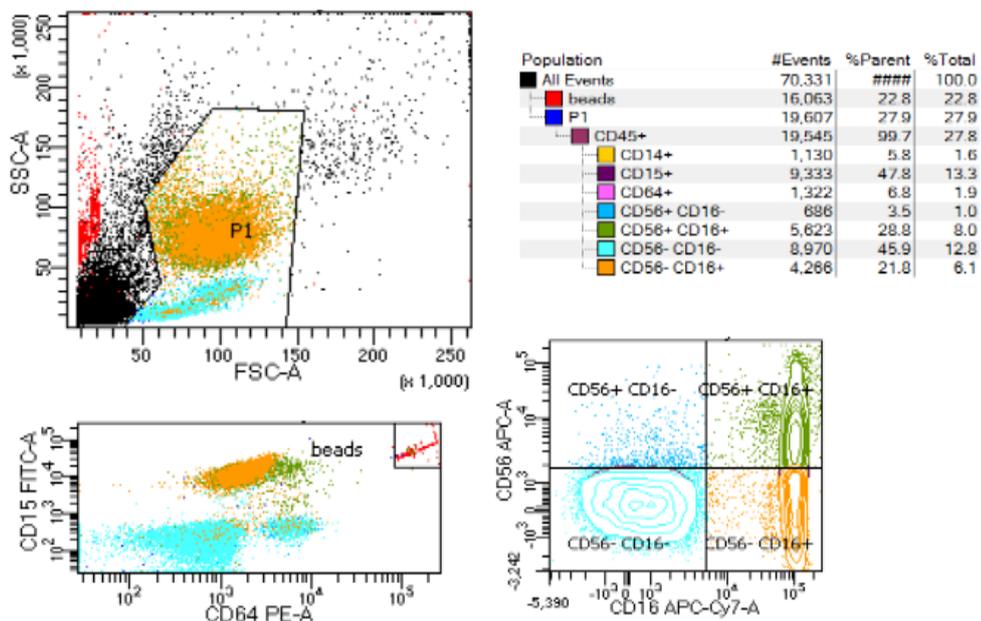


Abb. 3.3: Identifikation myeloider Zellen in der Wundflüssigkeit. Nach dem Anlegen eines allgemeinen Gates P1 zur Vorselektion einer Population passender Größe und Granularität erfolgte die weitere Charakterisierung anhand vorliegender Oberflächenantigene durch eine Darstellung in DotPlots und Histogrammen. Die Bedeutung der einzelnen Marker wird u. a. in der schematischen Darstellung der Panels im tabellarischen Anhang (Tabelle 8.2) erläutert.

Für die Identifikation der lymphoiden Zellen wurde folgendes Gatingprofil benutzt:

- T-Lymphozyten:** CD45+ → CD3+
- **T-Helferzellen:** CD45+ → CD3+ → CD4+
 - **Zytotoxische T-Zellen:** CD45+ → CD3+ → CD8+

Aktivierungsmarker:

- **Früh:** CD45+ → CD3+ → CD69+
- **Spät:** CD45+ → CD3+ → CD154+

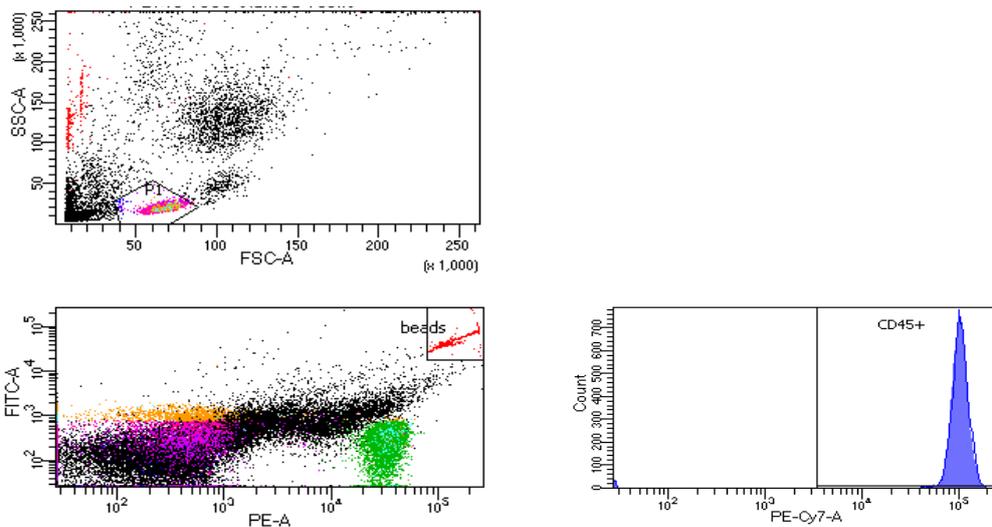


Abb. 3.4:

Identifikation lymphoider Zellen in der Wundflüssigkeit. Nach dem Anlegen eines allgemeinen Gates P1 zur Vorselektion einer Population passender Größe und Granularität erfolgte die Selektion der CD45-positiven Leukozyten und anschließend der CD3-positiven Lymphozyten. Danach wird die Ausprägung weiterer Marker nach deren einzelner Darstellung in Histogrammen quantifiziert. Die Bedeutung der einzelnen Marker wird u. a. in der schematischen Darstellung der Panels im tabellarischen Anhang (Tabelle 8.2) erläutert.

3.4.1.2 Detektion und Aktivitätsbestimmung regulatorischer T-Zellen

Des Weiteren interessierte uns der Anteil regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) in der Gewebeflüssigkeit in Relation zu deren Vorkommen im peripheren Blut. Für deren Nachweis nutzten wir zwei Mechanismen:

- Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD4, CD25, CD127 und CD196 (Konstellation bei T_{reg}: CD4+, CD25+, CD127-, CD196+)
- Nachweis des spezifisch in T_{reg} vorkommenden Transkriptionsfaktors FoxP3.

Vorgehen:

Zunächst wurde eine geeignete Menge der aus dem Redon- bzw. EDTA-Blut isolierten Zellen in FACS-Tubes transferiert. Für jede Probe wurde ein Versuchsansatz mit („*stained*“) und einer ohne Antikörper („*unstained*“) als Reagenzienleerwert durchgeführt, um die gegebene Hintergrundaktivität zu erfassen. Um die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen zu verringern, wurden die Zellen auch hier zunächst mit FcR Blocking Reagent inkubiert. Anschließend wurden, abhängig von der Farbstoffstärke, die Antikörper CD4-FITC, CD25-APC, CD127-PE-Cy7 und CD196-PerCPCy5.5 in die „*stained*“-Tubes überführt. Nach deren Inkubation und der Permeabilisierung der Zellen durch die Anwendung von FoxP3 Buffer A und FoxP3 Buffer C wurden die Zellen mit dem Antikörper gegen intrazellulär exprimiertes FoxP3-PE behandelt. Nach dessen Inkubation erfolgte nach einem Waschschrift die sofortige Messung. Für die Datenerfassung wurde die in Abb. 3.5 ersichtliche Gating-Strategie angewendet.

Nach der Datenerfassung wurden die prozentualen Zellanteile innerhalb der jeweiligen Gates in Excel exportiert. Dort fand die gruppenbezogene Analyse statt, indem die Häufigkeiten der Marker für IORT und Kontrollgruppe verglichen wurden. Eine Signifikanztestung erfolgt mithilfe eines doppelseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben, wobei signifikante Unterschiede bei p -Werten unter 0,05 und hochsignifikante Unterschiede bei p -Werten unter 0,01 angenommen wurden.

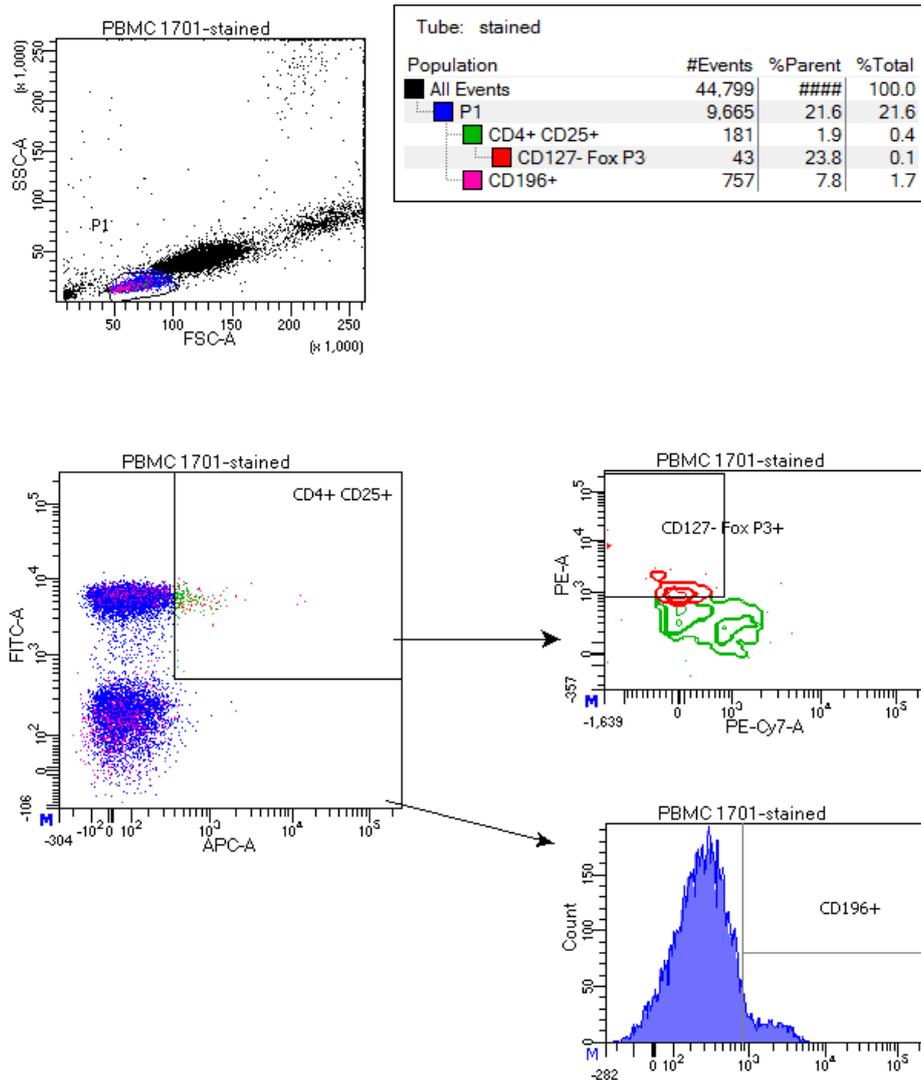


Abb. 3.5:

Gating-Strategie zur Identifikation regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) in der WF. Charakteristisch für T_{reg} ist die Antigen-Konstellation CD4+, CD25+, CD127-, CD196+. Nach dem Anlegen eines allgemeinen Gates P1 zur Vorselection einer Population passender Größe und Granularität erfolgte zunächst die Selektion der CD4-positiven und CD25-positiven Zellen. Von diesen wurden wiederum die CD127-negativen, jedoch Fox P3-positiven Zellen identifiziert und quantifiziert. Außerdem fand direkt aus P1 die Selektion aller CD196-positiven Zellen statt. Nach Darstellung in Histogrammen erfolgte die Quantifizierung der Antigenausprägung. Die Bedeutung der einzelnen Marker wird u. a. in der Beschreibung der Versuchsdurchführung (Kapitel 3.4.1.3) erläutert.

3.4.1.3 Detektion apoptotischer Zellen mittels Annexin V-Färbung

In diesem Versuch sollte der Anteil apoptotischer Zellen in den zuvor aus WF und EDTA-Blut gewonnenen Zellisolaten bestimmt werden. Das Prinzip beruht auf der Detektion des Phospholipids Phosphatidylserin, welches im frühapoptotischen Zustand einer Zelle von der Intra- auf die Extrazellulärseite der Zellmembran transloziert wird und so als leicht zugänglicher Apoptosemarker genutzt werden kann. Das Protein Annexin V bindet calciumabhängig an dieses extrazellulär präsentierte Phosphatidylserin und kann,

gekoppelt an das Fluorochrome Allophycocyanin (APC), für die durchflusszytometrische Detektion apoptotischer Zellen genutzt werden.

Der Translokation des Phosphatidylserin auf die Extrazellulärseite folgt der Verlust der Integrität der Zellmembran und damit der Prozess des Zelltodes. Um Apoptose und Nekrose zu unterscheiden wird zudem der Vitalfarbstoff Propidiumiodid (PI) hinzugefügt, der die Zellmembranen toter und spätapoptotischer, nicht aber vitaler und frühapoptotischer Zellen durchdringt. So lassen sich folgende Zustände der Zellen aus der Anfärbbarkeit mit Annexin V bzw. PI ableiten:

Tabelle 3.1:

Interpretation der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Annexin V-Färbung zur Detektion apoptotischer Zellen.

Annexin V	Propidiumiodid	Zustand der Zellen
negativ	negativ	vital
positiv	negativ	frühapoptotisch
positiv	positiv	spätapoptotisch bzw. tot (keine Differenzierung zwischen apoptotischem oder nekrotischem Prozess als Auslöser für den Zelltod)

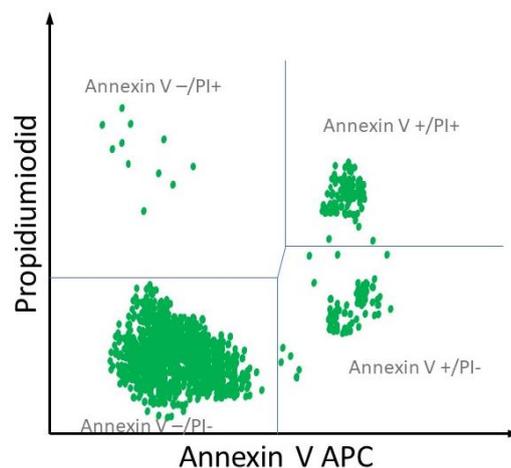


Abb. 3.6:

Schematische Darstellung eines DotPlots in der Auswertung der Annexin V-Färbung im CD45-positiven Gate. Folgende Viabilitätsstadien können anhand der Grafik differenziert werden: Annexin V-/PI- (u. l.) = vitale Zellen; Annexin V+/PI- (u. r.) = frühapoptotische Zellen; Annexin V+/PI+ (o. r.) = spätapoptotische bzw. tote Zellen.

Nachdem eine adäquate Menge aus WF und EDTA-Blut isolierter Zellen in FACS-Tubes überführt und mit FcR Blocking Reagent inkubiert worden war, führten wir die Annexin V-Färbung gemäß den etablierten Protokollen durch (van Engeland et al., 1996). Es wurden jeweils die Zellen aus der Redon-Drainage und die PBMC gefärbt“. Zusätzlich wurde die Annexin-V Bindung kontrolliert indem in einem zweiten Röhrchen vor der Zugabe des Fluorochrom-gekoppelten Annexin V-APC unmarkiertes Annexin V pure als Blocker zugegeben wurde.

Zusätzlich verwendeten wir den Pan-Lymphozytenmarker CD45, um zwischen Lymphozyten und anderen Zellpopulationen unterscheiden zu können.

Nach der Messwerterfassung wurden die Ergebnisse als DotPlots dargestellt, indem zunächst auf die CD45-positiven Zellen gated und das Fluoreszenzsignal für Annexin V-APC auf der x-Achse und jene für das PI auf der y-Achse repräsentiert wurde. Somit wurden die Zellen anhand ihrer Vitalitätsstadien (siehe Tabelle 3.1, Abb. 3.5) grafisch in unterschiedliche Populationen aufgegliedert, was das Setzen von entsprechenden Gates ermöglicht. Nach dem Gating wurden die erfassten Zellen quantifiziert und die Messwerte in eine Excel-Tabelle übertragen. Indem durch die Totalzellzahl geteilt wurde, konnte für die WF jeder Patientin der prozentuale Anteil der Zellen in den verschiedenen Viabilitätsstadien errechnet werden. Die statistische Testung zwischen IORT- und Kontrollgruppe fand als doppelseitiger t-Test für unabhängige Stichproben statt, wobei signifikante Unterschiede bei p -Werten unter 0,05 angenommen wurden.

3.4.2 Multiplex-Zytokin-Analyse und ELISA

3.4.2.1 Humaner Zytokin-Array

Die erste Analyse der in der WF vorliegenden / alterierten Zytokine erfolgte als Screen mit einem semiquantitativen antikörperbasierten Zytokin-Array. Die Faktoren mit unterschiedlichen Ergebnissen zwischen den Behandlungsgruppen wurden anschließend gezielt und quantitativ mittels ELISA (siehe 3.4.2.2) analysiert.

Der zum Screening verwendete antikörperbasierte *Human Cytokine Array C5* (Fa. RayBiotech) ermöglicht unter geringem Probenverbrauch den simultanen Nachweis von 80 humanen Zytokinen. Die Fängerantikörper sind mit ihrem F_c -Anteil auf einer Trägermembran verankert, sodass die variablen Regionen als Bindungsstellen für in der Probenflüssigkeit vorhandene Zytokinmoleküle fungieren. Jedes Zytokin ist durch einen

Punkt auf der Membran repräsentiert, in dem sich die entsprechenden Antikörper befinden (siehe Tabelle 8.3 im tabellarischen Anhang).

Die an ihre korrespondierenden Antikörper gebundenen Zytokine werden durch bindungsspezifische, biotinylierte Detektionsantikörper markiert. Die Chemilumineszenz wird über die Reaktion des an HRP (*horse radish peroxidase*) konjugierten Streptavidins erzeugt. Vom Hersteller wurden zusätzlich Positiv- und Negativkontrollen mit auf die Membran aufgetragen. Die Positivkontrolle (biotinylierte Antikörper anstatt der Zytokin-spezifischen Antikörper) liefert eine Orientierung und Normalisierung im Rahmen der Auswertung, während die Negativkontrolle (ohne Antikörper) der Detektion des durch unspezifische Bindungen entstehenden Hintergrundsignals dient.

In diesem Versuch wurden aus Rationalisierungsgründen die zellfreien Anteile der WF der ersten 15 eingeschlossenen Patientinnen verwendet und individualisiert untersucht, d. h. pro Probe bzw. Patientin wurde eine Arraymembran verwendet. Es wurden einmal sechs und einmal neun Membranen zeitgleich bearbeitet. Der Versuch wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die WF beider Gruppen wurden – wie für die Analyse von Blutserum empfohlen – im Verhältnis von 1:2 mit dem mitgelieferten Block-Puffer verdünnt. Die optischen Signalstärken wurden mithilfe des Chemilumineszenz-Detektionssystems Epi Chem II Darkroom erfasst.

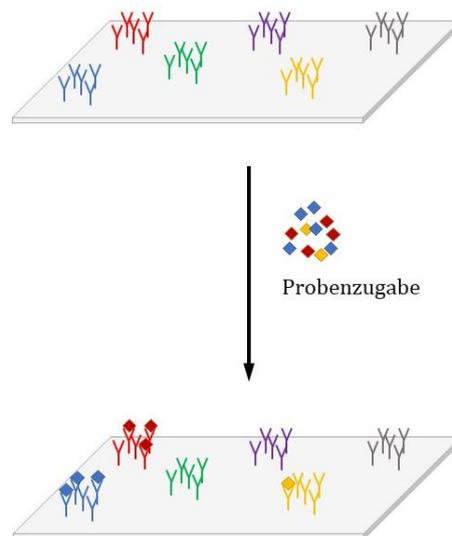


Abb. 3.7:

Schematische Darstellung der auf der Trägermembran des *Human Cytokine Array* immobilisierten Fängerantikörper. Jede Farbe repräsentiert ein Zytokin in der zu analysierenden Probe bzw. den hierzu korrespondierenden Antikörper auf der Arraymembran. Die in den weiteren Schritten zugegebenen Detektionsantikörper binden ausschließlich an die durch die Fängerantikörper gebundenen Zytokine, da die ungebundenen Zytokinmoleküle durch Waschschrte eliminiert werden. So entsteht während der Detektion ein chemilumineszentes Signal in den Lokalisationen, in welchen das korrespondierende Zytokin in der Probe präsent war.

Um die optischen Signale der zu einem bestimmten Zytokin korrespondierenden Punkte auf den Membranen zu quantifizieren, verwendeten wir das etablierte Open-Source-Programm ImageJ (Rueden et al., 2017) in Kombination mit dem Protein Array Analyzer Tool (Carpentier and Henault, 2010). Die Signalintensitäten wurden anschließend in ein Excel-Sheet eingetragen. Es erfolgte eine Normalisierung, indem die Werte der Negativkontrollen von den einzelnen Messwerten abgezogen wurden, um die Hintergrundaktivität des Tests zu berücksichtigen. Es folgte die gruppenbezogene Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen der von jedem getesteten Zytokin entsprechenden Signalstärken. Diese wurden in einem gemeinsamen Balkendiagramm als Übersicht grafisch dargestellt (siehe 4.2.2). Zusätzlich wurden die Messwerte in das Statistikprogramm JMP exportiert und einem doppelseitigen t-Test unterzogen, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Kollektiven (IORT- vs. Kontrollgruppe) zu ermitteln. Dabei wurden signifikante Unterschiede bei p -Werten unter 0,05 angenommen.

3.4.2.2 ELISA

Die anstehende Quantifizierung der zwischen den beiden Gruppen differierenden Zytokinspiegel erfolgte mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Auch hier bedient man sich eines Enzyms (z. B. HRP) als Marker, das korrelierend zu der Konzentration des Analyten ein Substrat zu einem detektierbarem Fluorochrom umsetzt. Durch Interpolation kann dabei die absolute Konzentration des Analyten (in unserem Fall des betreffenden Zytokins) in der WF bestimmt werden, indem die Signalstärken der Proben mit jenen einer Standardreihe definierter Konzentration des jeweiligen Zytokins verglichen werden.

Den von uns genutzten Kits lag das Prinzip des Sandwich-ELISA zugrunde, mit im Vergleich zu anderen ELISA-Typen besonders hoher Sensitivität. Die zu quantifizierenden Proteine werden dabei sowohl von auf der Platte fixierten Primärantikörpern als auch von im Überstand zugegebenen, biotinylierten Sekundärantikörpern gebunden. Durch die hohe Affinität binden Biotin und HRP-konjugiertes Streptavidin spezifisch; hiermit wird die enzymvermittelte Detektionsreaktion ermöglicht und der Analyt quantitativ nachgewiesen. Abb. 3.8 verdeutlicht die im Rahmen eines Sandwich-ELISA ablaufenden Vorgänge.

Nach der Auswertung der Ergebnisse des Zytokin-Array entschlossen wir uns, den jeweiligen Gehalt der Faktoren Oncostatin-M, GRO α , IL-1 β , RANTES, Leptin, VEGF, HGF, PDGF-BB, I-309 und uPA in der WF mittels ELISA zu quantifizieren. Hierfür nutzten wir fertige ELISA-Kits der Firma R&D / Bio-Techne. Diese beinhalteten Zytokin-spezifische Primär- und Sekundärantikörper, den entsprechenden Standard sowie das HRP-Streptavidin. Die Antikörper und der Standard wurden nach Herstellerangaben rekonstituiert, in praktikablen Volumina aliquotiert und unter Einhaltung der Haltbarkeitsfristen (8-12 Wochen) bei -80° C bis zur Verwendung gelagert.

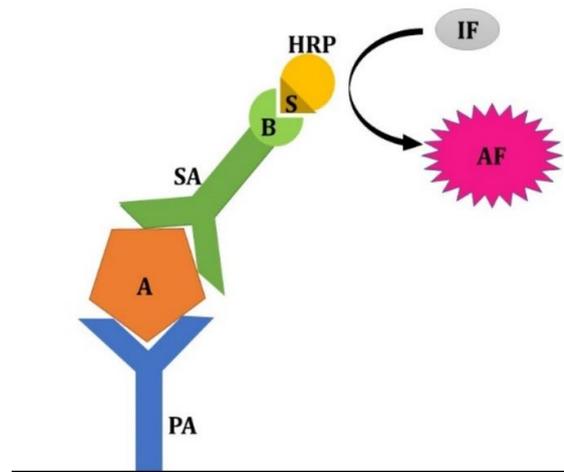


Abb. 3.8:

Schematische Darstellung des Prinzips eines Sandwich-ELISA. PA = Primärantikörper, A = Analyt, SA = Sekundärantikörper, B = Biotinanteil, S = Streptavidin, HRP = Horse Radish Peroxidase, IF = inaktiver Farbstoff, AF = aktiver Farbstoff.

Um zu evaluieren, in welcher Verdünnung die Proben der WF in den einzelnen ELISA-Kits eingesetzt werden müssen sodass die Werte innerhalb der Standardkurve liegen und damit eine Konzentrationsberechnung möglich ist, wurde zunächst mit jedem Kit ein Vorexperiment durchgeführt. Es wurde eine Verdünnungsreihe einer gepoolten WF von 6 Patientinnen (jeweils 3 aus jeder Behandlungsgruppe) in den jeweilig verwendeten Kits evaluiert. Die Verdünnung der Proben erfolgt hierbei nach Herstelleranweisungen mit Reagent Diluent oder A. dest. In der Hauptanalyse wurden die individuellen Proben in der zuvor evaluierten Verdünnung jeweils in Dreifachbestimmung analysiert und mit der mitgeführten Standardreihe (ebenfalls in Dreifachbestimmung) verglichen. Die ELISA-Tests wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Die mithilfe eines Microplate Readers registrierten optischen Signale (Messung bei 450 nm, Wellenlängenkorrektur [Referenz] bei 570 nm) wurden zunächst in eine Excel-Tabelle exportiert. Dort erfolgte eine primäre Datenprozessierung, indem der Mittelwert der Reagenzienleerwerte (*blanks*) gebildet und von allen registrierten Messwerten abgezogen

wurde. Anschließend wurden die Messwerte in das Statistikprogramm JMP exportiert und einem doppelten t-Test unterzogen, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Kollektiven (IORT- vs. Kontrollgruppe) zu ermitteln. Dabei wurden signifikante Unterschiede bei p -Werten unter 0,05 angenommen.

Eine Auflistung der getesteten Zytokine/Faktoren mit den im Ansatz eingesetzten Verdünnungsfaktoren findet sich im tabellarischen Anhang (Tabelle 8.4). Die Faktoren I-309 und PDGF-BB waren im Vorexperiment in keiner Verdünnungsstufe nachweisbar. Da die Methode des ELISA jener des Zytokin-Array hinsichtlich der Sensitivität überlegen ist, gingen wir deshalb von einer sehr niedrigen Basalkonzentration der beiden Stoffe aus. In der Hauptanalyse wurden deshalb keine ELISA für I-309 und PDGF-BB durchgeführt, da kein optimaler Verdünnungsfaktor eruiert werden konnte und eine verlässliche Aussage hinsichtlich eines gruppenbezogenen Konzentrationsunterschiedes nicht möglich erschien.

3.5 *Live Cell Imaging*-Experimente mit WF als Kulturzusatz

Im letzten Teil der Experimente wurde der Einfluss der WF auf das Wachstum verschiedener Zelltypen innerhalb des Tumorbetts untersucht. Dabei war vorrangig von Interesse, ob die als Kulturzusatz verwendete WF im Vergleich der Behandlungsgruppen in den Zellkulturen Unterschiede im Wachstums- und Migrationsverhalten induzierte. Die WF wurden anstatt der standardmäßig verwendeten Seren (z. B. humanes AB-Serum für MSC, FCS für MDA-MB 231) als Kultursupplement verwendet, wie es in bereits bekannten Publikationen praktiziert wurde (Belletti et al., 2008; Wang et al., 2015). Da hierbei die Untersuchung des Einflusses der WF jeder einzelnen Patientin nicht praktikabel gewesen wäre, wurde je ein WF-Pool für die IORT- und die Kontrollgruppe angelegt, indem die WF von jeweils 16 Patientinnen pro Gruppe zu gleichen Anteilen gemischt, aliquotiert und wiederum bei -80°C gelagert wurde. Experimente wurden mehrfach wiederholt, um einen statistischen Vergleich zu ermöglichen.

3.5.1 Allgemeine Zellkultur

3.5.1.1 MSC aus Brustgewebe (*Mamma-MS*C)

Den Einfluss der WF untersuchten wir an MSC, die wir aus dem Brustgewebe der Kontroll-Patientinnen isoliert haben (eine dauerhafte Kultivierung von MSC aus intraoperativ bestrahltem Brustgewebe war nicht möglich, siehe 4.1.1). Um homogene und repräsentative Ergebnisse zu gewährleisten, verwendeten wir einen Zellpool bestehend aus den MSC von fünf Patientinnen mit repräsentativem Markerprofil. Für die Generierung des MSC-Pools wurden die Individualproben in p1 (siehe 3.2.1 und Abb. 3.2) aufgetaut, gepoolt, über vier Tage expandiert und als Pool in p2 aliquotiert und wieder eingefroren. Die Mamma-MS C wurden in DMEM + 10 % AB bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Subkultivierungen („splitten“) erfolgten einmal wöchentlich bei einer Konfluenz von 70-80 %, außerdem fand dazwischen ein einmaliger Medienwechsel statt. Da es sich bei den Mamma-MS C um eine nicht immortalisierte Primärkultur handelt, war die Kulturdauer auf 6 Generationen begrenzt und für Experimente verwendbar.

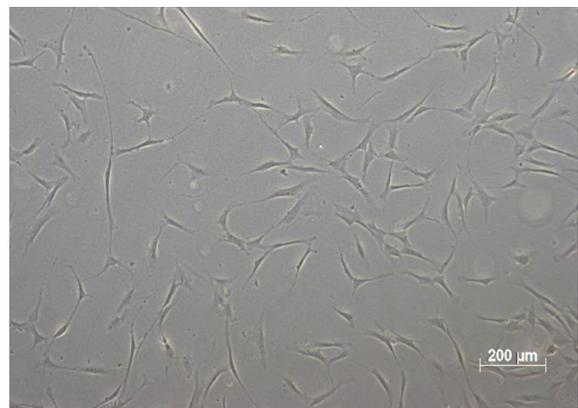


Abb. 3.9: Mamma-MS C-Pool in p2.

Auftauen und Subkultivierung

Die Zellen wurden aufgetaut und in eine Zellkulturflasche (TC-Flasche) geeigneter Größe ausgesät. Für das Splitten der MSC-Kulturen wurde Trypsin/EDTA zugegeben. Nachdem die Zellen vollständig abgelöst waren wurde die Reaktion durch die Zugabe von DMEM-AB abgestoppt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und die Suspension in ein 15 mL-Röhrchen überführt. Während der Bestimmung der Zellzahl mit dem CASY®-System wurden die Zellen abzentrifugiert (420 g, 5 Min., RT) und in einem definierten Volumen an Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen ausgesät. Alle für die Subkultivierung eingesetzten Volumina und Zellzahlen finden sich im tabellarischen Anhang (Tabelle 8.5).

3.5.1.2 MDA-MB 231

Neben den MSC verwendeten wir die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB 231, entwickelt aus der pleuralen Effusion einer 51-jährigen Kaukasierin, die unter einem metastasierten Adenokarzinom der Brustdrüse litt. Sie stellt eine der meistgenutzten Brustkrebszelllinien in Forschungslaboratorien dar. Bei den fibroblastoid wachsenden Zellen handelt es sich um hochinvasive, wenig differenzierte Tumorzellen mit tripel-negativem Rezeptorstatus, d. h. die Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron sowie der Rezeptor für den Wachstumsfaktor HER2 werden kaum bis gar nicht exprimiert. Die Invasivität wird bedingt durch die Fähigkeit der Zellen, EZM proteolytisch zu degradieren (ECACC, 2017). Die von uns verwendeten Zellen sind zusätzlich mit dem Fluoreszenzmarker *NucLight Green* gelabelt, indem in deren Genom durch Transfektion die Information des grün fluoreszierenden Proteins eingebracht wurde (Essen Bioscience). Diese Markierung

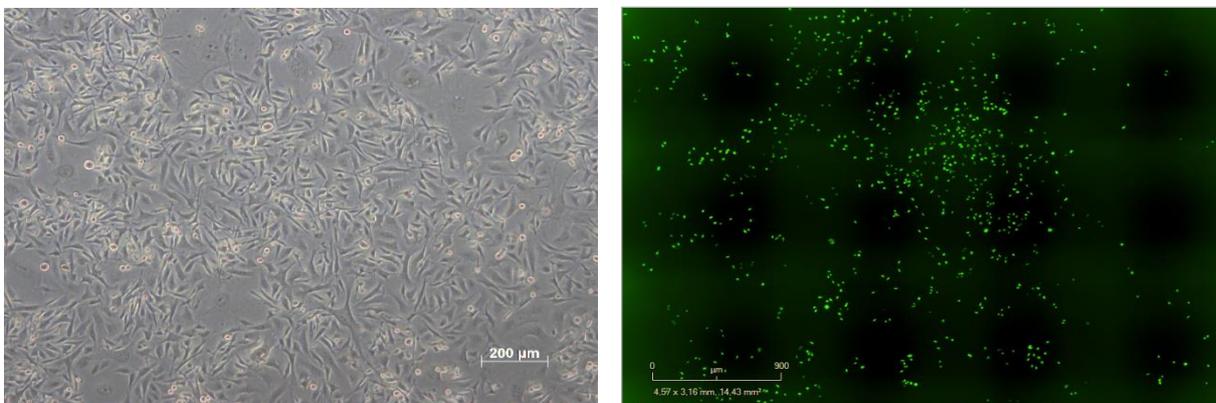


Abb. 3.10:

Links: MDA-MB 231 in der Phasenkontrast-Mikroskopie. **Rechts:** MDA-MB 231 in Fluoreszenz-Mikroskopie mit IncuCyte ZOOM®.

ermöglicht es, nur das Wachstum der MDA-MB 231 in Kultur zu erfassen, auch wenn sie in direkter Kokultur mit anderen Zellen kultiviert würden.

Die MDA-MB 231-Zellen wurden in DMEM + 10 % FCS bei 37° C und 5 % CO₂ in T25-Zellkulturflaschen kultiviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen über 19 Passagen in den unten beschriebenen *Live Cell Imaging*-Assays eingesetzt. Subkultivierungen der Zellen erfolgten zweimal wöchentlich bei einer Konfluenz von 70-80 %, wobei pro T25-Flasche 1×10^5 Zellen ausgesät wurden. Die Subkultivierung fand analog zu jener der Mamma-MSK statt (siehe 3.5.1.1). Da die Passage der eingefrorenen Zellen nicht bekannt ist, ist zu beachten, dass die innerhalb dieser Arbeit angegebenen Passagenangaben stets in Addition zu der unbekanntem, ursprünglichen Passagenanzahl zu erachten sind.

3.5.2 *Live Cell Imaging* mittels IncuCyte ZOOM®

Um den Einfluss der WF auf Kulturen der beiden Zelltypen zu untersuchen nutzten wir den Live Cell Imager IncuCyte ZOOM® und die zugehörige IncuCyte Basic Software der Firma Essen Bioscience. Dabei handelt es sich um ein in einen Inkubator integriertes Mikroskop, das in festgelegten Zeitintervallen mikroskopische Bilder der zu untersuchenden Zellkulturen liefert. Auf diese Weise ist es möglich, kinetische Messungen zur Visualisierung und Quantifizierung zellulärer Prozesse in Echtzeit durchzuführen. Da sowohl die Phasenkontrast- als auch die Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden können, ist es möglich, die Kinetik verschiedener Zelltypen innerhalb derselben Kultur zu unterscheiden, wenn diese unterschiedlich Fluoreszenz-gelabelt sind.

Die Analysesoftware des Gerätes nutzt diverse Analysemasken für die Quantifizierung. Das erlaubt die Verfolgung unterschiedlicher Endpunkte. Diese sind neben der Detektion der Konfluenz im Proliferations-Assay beispielsweise die Errechnung der relativen Wunddicke im Wundheilungs-Assay oder der *Bottom/Top-Ratio* im Migration/Chemotaxis-Assay. Die Analysemasken können entsprechend den Eigenschaften der untersuchten Zellen modifiziert werden, sodass sichergestellt wird, dass nur die Zellsomata von der Analysemaske erfasst und Zelltrümmer weitestgehend ausgeschlossen wurden. Der Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie stellt eine weitere Möglichkeit dar, diesen Störfaktor auszuschließen.

3.5.3 Proliferations-Assay

Im Proliferations-Assay wurde der Einfluss der WF, vergleichend für die IORT- und die Kontrollgruppe, auf Mamma-MSc sowie auf MDA-MB 231 evaluiert.

Am ersten Tag des Versuchsansatzes wurden die Zellen in einer Zellzahl von 3000 pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät (100 μ L Zellsuspension pro Well). Während bei den Mamma-MSc der Wechsel zum WF-haltigen Medium schon am nächsten Tag stattfinden konnte, wurden die MDA-MB 231 am Tag nach der Aussaat noch für 24 Stunden in serumfreies Medium kultiviert. Durch dieses Hungern sollte sichergestellt werden, dass die MDA-MB 231 alle Wachstumsfaktoren, die sie in ihrer Eigenschaft als Tumorzellen selbst produzieren können, aufgebraucht und die Zellen damit weitestgehend abhängig von externer Nährstoffzugabe sind.

Am Tag des Wechsels zu WF-haltigem Kulturmedium wurden die Aliquots des WF-Pools zunächst für 10 Min. bei 12000 g zentrifugiert und nur mit dem Überstand weitergearbeitet, um in der WF enthaltenen Debris zu eliminieren. Anschließend wurde der WF-Pool (jeweils für die IORT- und die Kontrollgruppe) in serumfreiem Kulturmedium verdünnt, um die gewünschten Konzentrationen (0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 % WF) zu erreichen. Die WF-Verdünnungen wurden entsprechend eines zuvor festgelegten Plattenschemas zu den Zellen pipettiert. Als Positivkontrolle fungierte DMEM + 10 % AB, während als Negativkontrolle serumfreies DMEM verwendet wurde. Die Zellkultur-Platte wurde im IncuCyte-System platziert und das Scan-Intervall auf zwei Stunden festgelegt. Während die Proliferation der Mamma-MSc mittels Phasenkontrast gemessen wurde, wurde jene der NuLight-Green-markierten MDA-MB 231 durch eine entsprechende Konfluenzmaske für grüne Fluoreszenz erfasst. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Versuchsansätze durchgeführt.

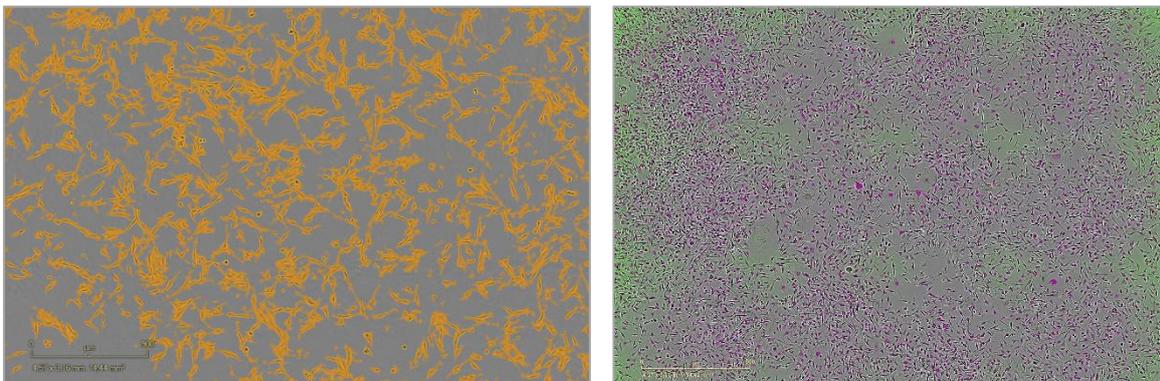


Abb. 3.11:

Analysemaske des IncuCyte ZOOM® im Proliferations-Assay. Links: Proliferations-Assay mit Mamma-MSc. Die orange Farbe markiert die von der Analysemaske quantifizierte Zellkonfluenz. Rechts: Proliferations-Assay mit MDA-MB 231. Die lila gefärbten Areale entsprechen den grün fluoreszierenden Vakuolen der MDA-MB 231, deren Konfluenz bei den MDA-MB 231 als Endpunkt für den Proliferations-Assay verwendet wurde.

3.5.3.1 ELISA-Analyse der konditionierten Medien

Um festzustellen, ob die Mamma-MSK unter der Einwirkung von 0,5 % WF im Kulturmedium zur Bildung bestimmter Zytokine angeregt werden bzw. ob die Zytokinspiegel zwischen IORT- und Kontroll-WF-behandelten MSK-Kulturen abweichen und dadurch die verzögerte Divergenz der Wachstumskurven der beiden Kollektive im Proliferations-Assay (siehe 4.3.1.1) begründet sein könnte, führten wir weitere ELISA mit den konditionierten Medien aus dem MSK-Proliferations-Assay durch. Dazu wurden zunächst die Medien aus den Original-Versuchsansätzen im Rahmen von Vorexperimenten mit den ELISA-Kits untersucht, die auch schon für die Analyse der WF benutzt wurden (d. h. für die Zytokine VEGF, IL-1 β , GRO α , Leptin, RANTES, OSM, HGF, PDGF-BB, I-309 und uPA). Hier wurde evaluiert, dass die Faktoren HGF, GRO α , RANTES und VEGF in den konditionierten Medien vorlagen und eine Verdünnung von 1:2 geeignet ist. Um ausreichend konditioniertes Medium zu generieren, wurden die Versuche im 12-Well-Platten-Format repliziert und die konditionierten Medien bei -80° C asserviert. Somit lagen je 15 technische Replikate für die IORT- und die Kontrollgruppe (0,5 % WF) vor. Anschließend folgte die Durchführung der ELISA-Tests auf HGF, GRO α , RANTES und VEGF entsprechend der Ausführungen unter 3.4.2.2.

3.5.4 Wundheilungs-Assay

In diesem Versuch wurde untersucht, ob die WF der IORT- und Kontrollgruppe unterschiedliche Wirkungen hinsichtlich der Wundheilung bei Mamma-MSK und MDA-MB 231-Zellen haben. Am ersten Tag des Versuchsansatzes wurden die Zellen im jeweiligen serumhaltigen Kulturmedium ausgesät, so dass die Zellzahl am Tag des Setzens der Wunde ca. 90 % betragen würde. Dabei hat sich für die Mamma-MSK eine Zellzahl von 20000 pro Well und für die MDA-MB 231 eine Zellzahl von 18000 pro Well als geeignet erwiesen. Während bei den Mamma-MSK das Setzen der Wunden direkt am Folgetag geschehen konnte, wurden die MDA-MB 231 zuvor noch 24 Stunden in serumfreiem Kulturmedium hungrig gehalten, um den Stoffwechsel der Krebszellen weitestgehend abhängig von externer Nährstoffzufuhr zu machen. Anschließend erfolgte die Verwundung des Zellrasens durch das Setzen eines Kratzers (sogenannter „Scratch“). Um repräsentative Ergebnisse zu erzielen verwendeten wir hierzu den WoundMaker™ (Essen Biosciences), welcher die Generierung von Wunden definierter Länge und Breite in jedem Well der Platte ermöglicht („scratch wound assay“). Nach zweimaligem Waschen mit Kulturmedium folgte die Inkubation mit in (serumfreiem) Kulturmedium verdünnter WF, wobei die

Behandlungsgruppen verglichen wurden. Analog zum Proliferations-Assay wurde der Einfluss der WF in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht sowie entsprechende Positiv- und Negativkontrollen (serumhaltiges bzw. serumfreies Kulturmedium) mitgeführt. Anschließend wurde die Wundheilung mithilfe des IncuCyte ZOOM® und der entsprechenden Analysesoftware untersucht. Die speziell für diesen Versuch verwendeten Zellkulturplatten (IncuCyte ImageLock Plates, Fa. Essen Biosciences) ermöglichen dabei innerhalb der Messwiederholungen das Wiederauffinden einer definierten Position des Sichtfeldes, sodass eine Vergleichbarkeit der Einzelmessungen gewährleistet war. Der Wundheilungsfortschritt, repräsentiert durch gerichtete Zellmigration, wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden durch automatisierte Bildaufnahmen dokumentiert und durch die Anwendung spezieller Analysemasken ausgewertet.

Auch für den Wundheilungs-Assay wurden die Messwerte – sowohl für die Mamma-MSK als auch für die MDA-MB 231 Zelllinie – in drei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen erhoben.

Endpunkt ist die relative Wunddichte (*relative wound density*, RWD) im Phasenkontrast sowohl bei Mamma-MSK als auch bei MDA-MB 231. Dabei verwendet die Software einen Algorithmus, der die Migrationsbewegung der Zellen in Richtung des Wundspaltes berücksichtigt. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die im Rahmen des Wundverschlusses erhobenen Daten auf gerichteter Zellmigration und nicht auf einfacher Proliferation basieren.

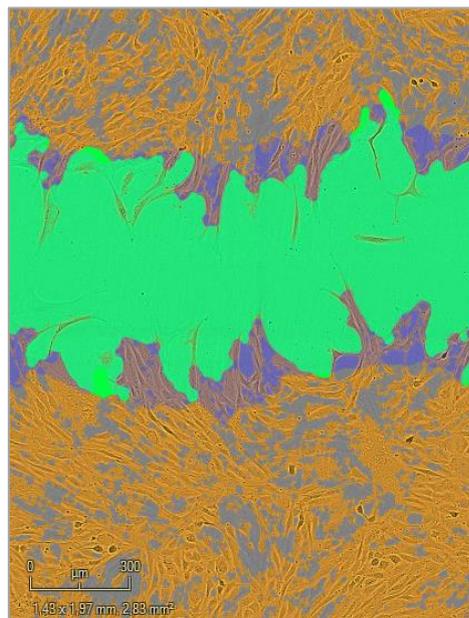


Abb. 3.12:

Analysemaske des IncuCyte ZOOM® im Wundheilungs-Assay mit Mamma-MSK, 4 h nach Verletzung. grün = verbleibender Wundspalt; blau = im Rahmen der Wundheilung in den Wundspalt migrierte Zellen; orange = unverwundete Einzelzellschicht.

3.5.5 Migration/Chemotaxis-Assay

Dieser Versuch soll zeigen, ob die WF von Patientinnen der IORT- und Kontrollgruppe unterschiedliche chemotaktische Wirkungen auf Mamma-MSK und MDA-MB 231-Zellen vermitteln. Hierzu nutzten wir die im IncuCyte ZOOM® verwendbaren ClearView Plates, welche Versuche im sogenannten Transwell-Prinzip ermöglichen. Dabei bestand der Versuchsaufbau aus zwei übereinander liegenden Kammern, die durch eine poröse Membran getrennt waren. Die untere Kammer (*Reservoir*) enthielt die zu testende Chemoattraktans, während in die obere Kammer (*Insert*) die Zellen ausgesät wurden. Zudem bestand die Möglichkeit, die Trennmembran im Vorfeld mit EZM zu beschichten, um sicherzustellen, dass die Zellen tatsächlich aktiv in die untere Kammer migrieren und nicht einfach durch die Poren fallen. In unserem Fall entschieden wir uns sowohl bei den Mamma-MSK als auch bei den MDA-MB 231 für eine Beschichtung mit Fibronektin, da keiner der beiden getesteten Zelltypen hierfür eine erhöhte Migrationsaffinität zeigte, sodass allein die Chemoattraktivität der Stoffe in der unteren Kammer Einfluss auf deren Migrationsverhalten hatte.

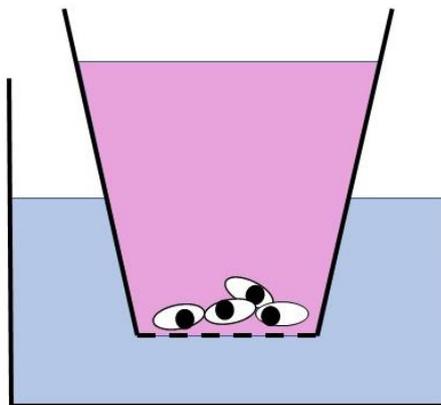


Abb. 3.13:

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus im Migration/Chemotaxis-Assay. Rosa = obere Kammer (*Insert*) mit darin ausgesäten Zellen; blau = untere Kammer (*Reservoir*). Dazwischen liegt die poröse, mit Fibronektin beschichtete Trennmembran.

Der erste Schritt der Versuchsdurchführung bestand in der Beschichtung der Trennmembran mit Fibronektin. Dazu wurden zunächst auf eine 96-Well-*Reservoir*-Platte pro Well 150 µL Fibronektin-Lösung (10 µg/mL, PromoCell) gegeben und die *Insert*-Platte hinzugefügt. Auch in diese wurden 20 µL Fibronektin-Lösung pro Well gegeben, sodass die Beschichtung von beiden Seiten der Membran erfolgt. Anschließend musste der Aufbau für mindestens 45 Min. erschütterungsfrei bei RT stehen, bevor beide Platten zweimalig mit

PBS gewaschen wurden. Daraufhin wurden die Zellen auf der *Insert*-Platte ausgesät. Dabei wurde jedes Well mit 1000 Zellen in 60 μ L serumhaltigem Kulturmedium beschickt. Da die Mamma-MSc für den Versuch nicht hungrig gehalten werden mussten, konnte die mit ihnen bestückte *Insert*-Platte direkt nach einer einstündigen Adhäsionsperiode in die *Reservoir*-Platte gestellt werden, welche die Testsubstanzen enthielt. Dabei verwendeten wir Konzentrationen der WF und Kontrollmedien wie beim Proliferations- und Wundheilungs-Assay, dies entsprach 200 μ L pro Well der *Reservoir*-Platte. Da die MDA-MB 231 hingegen auch für diesen Versuch hungrig gehalten werden mussten, erfolgte am Tag nach der Aussaat zunächst noch ein Wechsel zu serumfreiem Medium. Nach einer Hungerperiode von 24 Stunden konnte dann auch deren *Insert*-Platte mit der mit den Testsubstanzen beschickten *Reservoir*-Platte verbunden und die Datenerfassung mittels IncuCyte ZOOM® gestartet werden. Durch eine spezielle Analysemaske erfasst das Gerät dabei, wie viele Zellen innerhalb von 24 Stunden von der oberen in die untere Kammer migrierten. Die Auswertung fand anhand einer hieraus berechneten *Bottom/Initial-Top-Value-Ratio* statt.

Die Messwerte des Migration/Chemotaxis-Assays wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchsdurchläufen erhoben.

Das Gerät erfasst mithilfe der zugehörigen Software die Konfluenz im Phasenkontrast (für Mamma-MSc und MDA-MB 231) jeweils der oberen und der unteren Kammer der Transwell-Platte. Durch die Berechnung der *Bottom/Initialized-Top-Value-Ratio* wird für jeden Messzeitpunkt die Zellkonfluenz in der unteren Kammer in Bezug zur ursprünglichen Konfluenz in der oberen Kammer gesetzt. Auf diese Weise sind die Werte zwischen den Wells auch vergleichbar, wenn die ausgesäte Zellzahl zufallsbedingt schwankt.

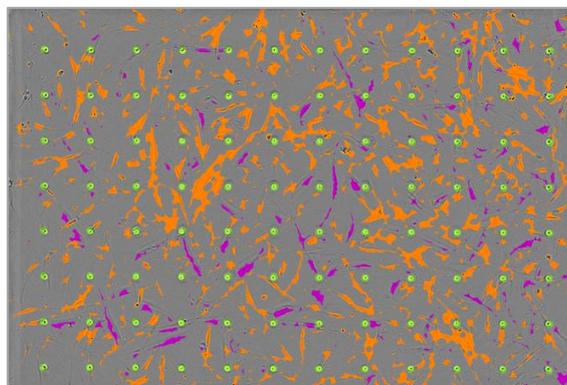


Abb. 3.14:
Analysemaske des IncuCyte ZOOM® im Migration/Chemotaxis-Assay mit Mamma-MSc, 10 h nach Assaybeginn. Vertikaler Blick auf die Trennmembran. Grün = Poren der mit Fibronektin beschichteten Trennmembran; orange = noch nicht durch die Membran migrierte Zellen der oberen Kammer; pink = bereits in die untere Kammer migrierte Zellen.

Auswertung der *Live Cell Imaging*-Experimente

Bei allen IncuCyte-Assays wurden die Rohdaten in ein Excel-Sheet-exportiert sowie unter Betrachtung der Einzelbilder korrigiert, d. h. bei Vorliegen eines der folgenden Gründe wurden Messwerte von der weiteren Analyse ausgeschlossen:

- Fokusverlust des IncuCyte ZOOM® mit resultierender Bildunschärfe
- Verunreinigung des Wells (z. B. durch Zellschrott, Luftblasen)
- Versagen des Wound Makers bei der Verwundung der Einzelzellschicht
- deutlicher Plattenrandeffekt.

Anschließend wurden die Messwerte aller technischen Replikate eines jeden Zeitpunktes zu einem Mittelwert mit der entsprechenden Standardabweichung verrechnet. Aus diesen Werten erfolgte die grafische Darstellung der entsprechenden Kinetik (x-Achse = Zeit / y-Achse = Mittelwerte der oben genannten Endpunkte). Mithilfe des Statistikprogrammes JMP fand die statistische Testung durch eine multivariate Varianzanalyse (MANOVA) für wiederholte Messungen statt. Die Daten wurden zuvor mittels des Mauchly-Testes auf Sphärizität überprüft; lag diese nicht vor, wurde eine Greenhouse-Geisser-Korrektur im MANOVA vorgenommen. Beim Proliferations-Assay erfolgte zudem für jeden Messzeitpunkt eine Regressionsanalyse mit der Methode kleinster gewöhnlicher Quadrate, um zu analysieren, zu welchen Einzelzeitpunkten die Kurven sich signifikant voneinander unterscheiden. Signifikante Unterschiede wurden bei p -Werten unter 0,05 angenommen.

3.6 Statistik

Im Folgenden werden die für die statistischen Auswertungen verwendeten Programme und Tests zusammengefasst. Die in dieser Arbeit durchgeführten Signifikanztests beziehen sich allesamt auf die Analyse quantitativer Daten.

- **Vergleich der Brustbiopsatgewichte (siehe 3.2.1 / 4.1.1)**
Innerhalb der Behandlungsgruppen (preIORT vs. postIORT bzw. preSNB vs. postSNB) erfolgte ein Signifikanztest mittels gepaartem t-Test. Der gruppenübergreifende Vergleich wurde mittels doppelseitigem t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Wir verwendeten hierfür Microsoft Excel.
- **Durchflusszytometrische Analyse der WF (siehe 3.4.1 / 4.2.1)**
Für die Signifikanzanalyse der Zellzahlen bzw. Viabilitätszustände der genannten Populationen erfolgten doppelseitige t-Tests für unverbundene Stichproben mittels Microsoft Excel.
- **Multiplex-Zytokin-Analyse und ELISA (3.4.2 / 4.2.2)**
Zum gruppenbezogenen Vergleich der gemessenen Zytokinspiegel erfolgten Signifikanzanalysen mittels doppelseitigem t-Test für unverbundene Stichproben mittels JMP Software (SAS Institute).
- **Live Cell Imaging-Experimente mit WF als Kulturmedium (siehe 3.5 / 4.3)**
Mithilfe von JMP erfolgte die Signifikanzanalyse durch MANOVA für wiederholte Messungen, nachdem die Daten mittels Mauchly-Testes auf Sphärizität überprüft wurden. Lag diese nicht vor, wurde eine Greenhouse-Geisser-Korrektur im MANOVA durchgeführt. Beim Proliferations-Assay wurde zudem für jeden Messzeitpunkt eine Regressionsanalyse mit der Methode kleinster gewöhnlicher Quadrate durchgeführt, um zu analysieren, zu welchen Einzelzeitpunkten die Kurven sich signifikant voneinander unterscheiden.

4. ERGEBNISSE

4.1 Isolation und Charakterisierung der Mamma-MSC

4.1.1 Isolation aus Brustgewebe

Die MSC wurden mittels eines Kollagenase-Verdaus aus den Brustgewebebiopsien vor und nach IORT (bei Patientinnen des Kontrollkollektives vor und nach SNB) isoliert. In der Kontrollgruppe ließen sich aus 57 % der vor (preSNB) bzw. 66 % der nach SNB (postSNB) entnommenen Gewebeproben MSC isolieren und über mehrere Passagen weiterkultivieren. In der IORT-Gruppe konnten aus 95 % der vor einer IORT (preIORT) entnommenen Gewebeproben MSC isoliert und kultiviert werden, jedoch nur aus 1 von 20 (5 %) der nach einer IORT (postIORT) entnommenen Gewebebiopsien. Auch diese einmalig nach einer IORT isolierbaren Zellen (siehe Abb. 4.1, rechts) wiesen schon nach wenigen Tagen suboptimale Eigenschaften auf: Sie waren in der Proliferation eingeschränkt und zeigten Charakteristika eines Zustandes fortgeschrittenen Zellalters, welcher u. a. durch das Auftreten von Stressfilamenten gekennzeichnet ist (Bieback, Hecker et al. 2012).

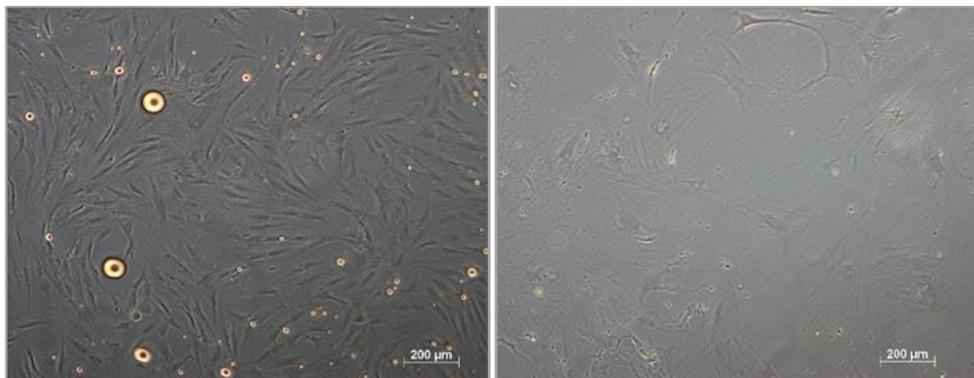


Abb. 4.1:

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme vor (links) und nach (rechts) IORT isolierter MSC in p0. Gezeigt ist der eine Fall, in welchem sowohl aus pre- als auch aus postIORT-Biopsien MSC isoliert werden konnten: Die aus der preIORT-Biopsie isolierten Zellen zeigen eine MSC-typische Morphologie, während die aus der postIORT-Biopsie gewonnenen Zellen einen hochseneszenten Phänotyp widerspiegeln. In den Gewebeproben der restlichen 19 IORT-Patientinnen gelang eine MSC-Isolation nur für die vor der Bestrahlung entnommenen Gewebeproben.

ERGEBNISSE

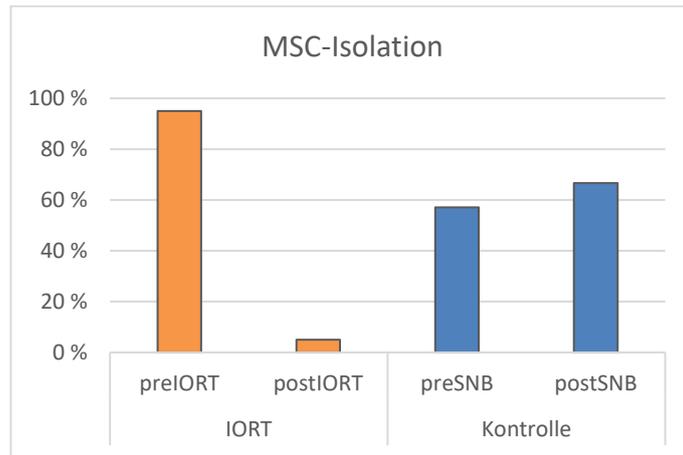


Diagramm 4.1:

MSC-Isolation aus Tumorbettbiopsien des mit einer IORT behandelten und des Kontrollkollektives, jeweils vor (pre) und nach (post) IORT respektive SNB. Angaben als Prozent der bearbeiteten Gewebeproben; n = 41 (20 IORT, 21 Kontrollen).

Die Gewichte der Gewebeproben zeigten innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen keinen signifikanten Unterschied. Dieser war auch gruppenübergreifend im Vergleich der Biopsatgewichte hinsichtlich der Entnahmezeitpunkte (preIORT vs. preSNB und postIORT vs. postSNB) nicht nachweisbar.

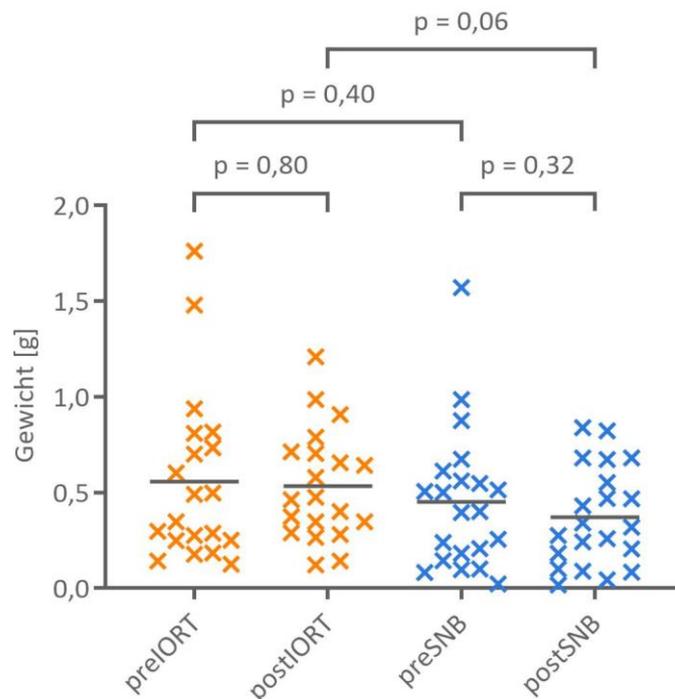


Diagramm 4.2:

Verteilung der Gewichte der Biopsien der IORT- (orange) und der Kontrollgruppe (blau), jeweils vor (pre) und nach (post) IORT respektive SNB; n = 41 (20 IORT, 21 Kontrollen). Darstellung der MW als Balken. Signifikanztests auf Gewichtsunterschiede der Biopsate innerhalb einer Behandlungsgruppe mittels gepaartem t-Test; gruppenübergreifender Vergleich durch doppelseitigen t-Test für unverbundene Stichproben.

4.1.2 Qualitative Differenzierungs-Assays (DA)

Für die Untersuchung des adipogenen und osteogenen Differenzierungspotentials der isolierten Zellen konnten für die IORT-Gruppe nur die MSC der preIORT-Biopsien analysiert werden. Da eine Isolation aus postIORT-Biopsien nur einmal erfolgreich war, die Zellen jedoch nicht weiter kultivierbar waren, erreichten sie nie die für die DA vorgesehene Passagenzahl p2. Für das Kontrollkollektiv konnten die DA für aus preSNB- und aus postSNB-Biopsien isolierten Zellen durchgeführt werden.

Im adipogenen DA zeigten 90 % der MSC aus den preIORT-Biopsien der IORT-Gruppe Differenzierungspotential zu Fettgewebe; im Kontrollkollektiv 90 % der MSC aus preSNB-Biopsien und 55 % der aus postSNB-Biopsien.

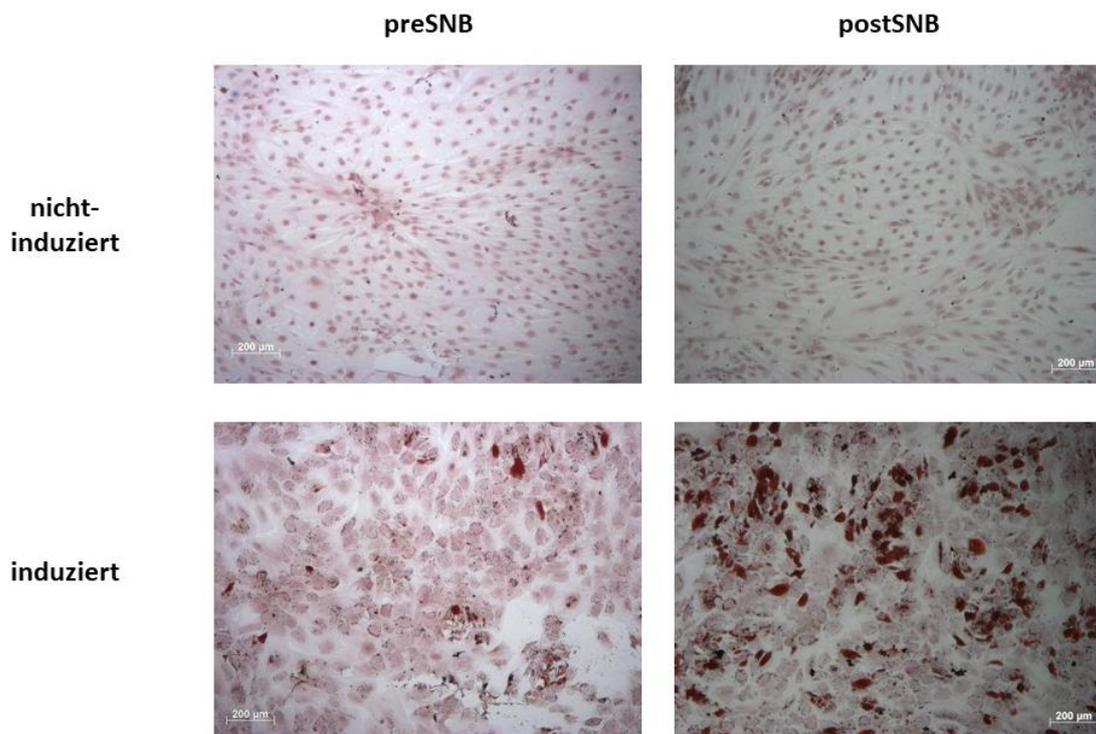


Abb. 4.2:

Exemplarische, phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Ergebnisse des adipogenen DA nach Ölrot O-Färbung. Dargestellt sind die nicht-induzierten Negativkontrollen in der oberen Reihe sowie die mit ADM induzierten MSC in der unteren Reihe, jeweils mit aus preIORT- und postIORT-Biopsien isolierten MSC.

In der Analyse des osteogenen Differenzierungspotenzials zeigten 100 % der aus den preIORT-Biopsien isolierten MSC Differenzierungsfähigkeit zu Knochengewebe; im Kontrollkollektiv 100 % der MSC aus preSNB-Biopsien und 77 % der MSC aus postSNB-Biopsien.

ERGEBNISSE

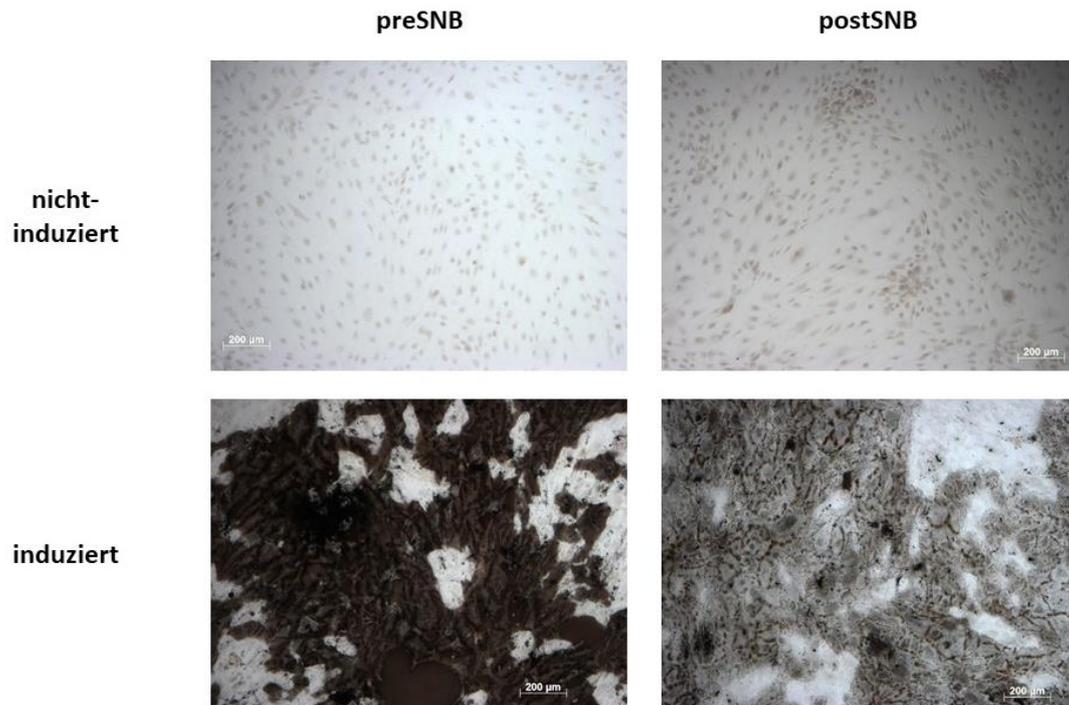


Abb. 4.3:
Exemplarische, phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Ergebnisse des osteogenen DA nach Von-Kossa-Färbung.
Dargestellt sind die nicht-induzierten Negativkontrollen in der oberen Reihe sowie die mit ODM induzierten MSC in der unteren Reihe, jeweils mit aus preIORT- und postIORT-Biopsien isolierten MSC.

4.1.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung unbestrahlter Mamma-MSC

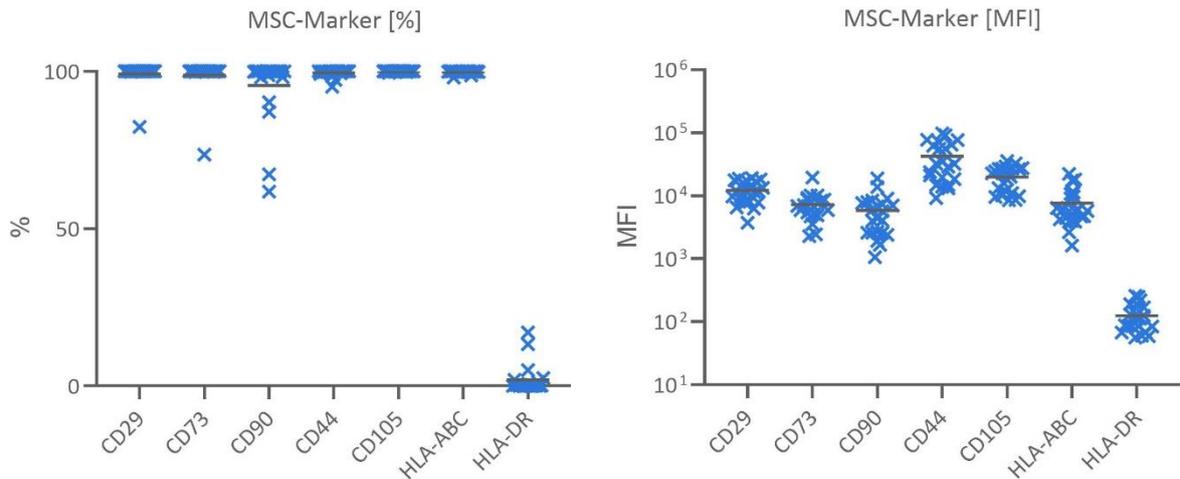


Diagramme 4.3:
Ergebnisse der Durchflusszytometrie der MSC. Links: Häufigkeit MSC-typischer Oberflächenmarker in Prozent; rechts: Darstellung der MFI = *mean fluorescence intensity*; n = 22. MW als Balken.

Aufgrund der limitierten Datenlage zu Charakteristika der MSC aus Brustgewebe sind für diese Analyse alle Daten naiver, unbestrahlter MSC (d. h. preIORT, preSNB und post SNB) zusammengefasst worden, um zu evaluieren ob die isolierten mammären Zellen. Grundsätzlich den Kriterien der ISCT entsprechen und welche zusätzlichen Eigenschaften zu verzeichnen sind. Anhand der dargestellten Oberflächenmarkerkonstellation der aus dem Brustgewebe isolierten Zellen stellte sich ein für ASC in p2 typischer Immunphänotyp dar. Mit Ausnahme einer einzigen Gewebeprobe zeigten alle isolierten Zellen ein MSC-typisches Markerprofil mit vergleichbaren Fluoreszenzintensitäten (siehe Diagramme 4.3).

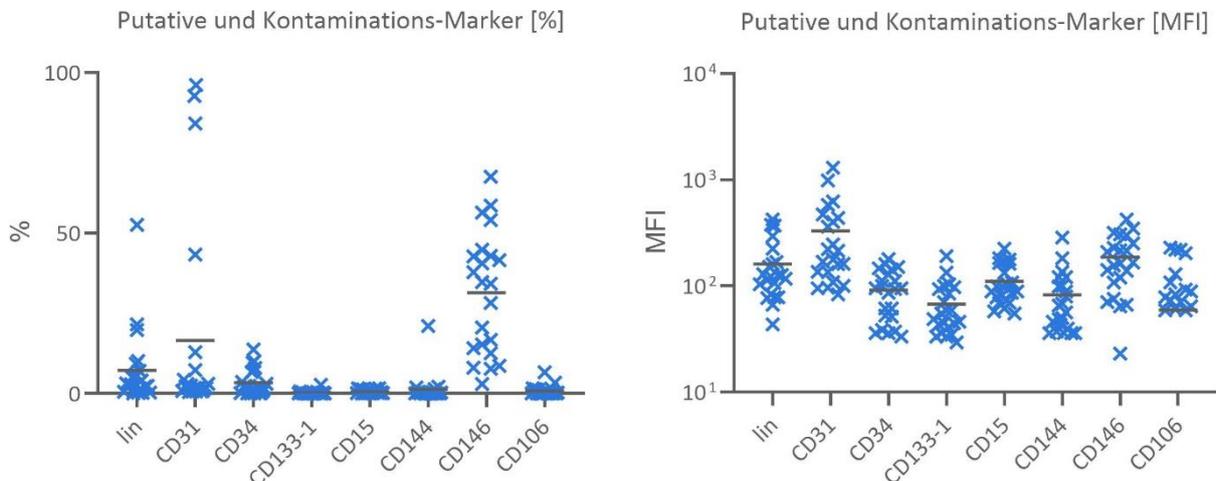


Diagramme 4.4:
Streudiagramm zur Darstellung der Verteilung putativer und kontaminationsassoziierter Oberflächenmarker. Links: Darstellung in Prozent; rechts: Darstellung in MFI; n = 22

Kontaminationsassoziierte Oberflächenmoleküle (vgl. Diagramme 4.4) wurden in nur wenigen Gewebeproben detektiert, hier v. a. CD31 als endothelialer Marker; andere endotheliale Marker wie CD144 und CD106 wurden jedoch nicht koexprimiert. Eine Expression von CD34 als Marker hämatopoetischer Vorläuferzellen wurde in den isolierten Zellen nicht gefunden. Auch CD15 als Marker für neutrophile Granulozyten konnte auf den von uns untersuchten bASC nicht detektiert werden.

Der prozentuale Anteil CD146-exprimierender Zellen (typischer Marker für Endothelzellen) zeigte in unserer Analyse eine hohe Variabilität. Dies kann das Vorliegen verschiedener bASC-Subpopulationen anzeigen. Aufgrund der geringen Expressionsdichte zeigte sich jedoch die entsprechende mittlere Fluoreszenzaktivität der untersuchten Zellen homogener und vergleichbar mit dem Niveau der anderen Marker.

4.2 Untersuchung der WF

4.2.1 Durchflusszytometrische Analyse

4.2.1.1 Myeloides Panel inklusive NK-Zellen

Im Rahmen der Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse des myeloiden Panels wurden die errechneten relativen Zellzahlen der jeweiligen Oberflächenmarker als Prozentangabe in Relation zu allen CD45-positiven Zellen (d. h. zu allen detektierten Leukozyten) gesetzt. Im Gruppenvergleich zeigte sich in keiner der Untergruppen der myeloiden Zellen ein signifikanter Effekt der IORT auf die prozentuale Häufigkeit (siehe Tabelle 4.1). Bei neun Patientinnen konnten nicht genügend Zellen aus der WF bzw. dem EDTA-Blut isoliert werden, sodass diese nicht für die FACS-Analyse zur Verfügung standen.

Tabelle 4.1:

Zellzahlen der untersuchten Zellpopulationen des myeloiden Panels in Relation zur Gesamtzellzahl innerhalb des CD45-positiven Gates in der WF in Prozent. Angaben als MW ± SD; statistische Testung mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT (n = 21)	Kontrolle (n = 12)	p-Wert
Monozyten (CD14+)	0,91 ± 0,72 %	0,64 ± 0,78 %	0,36
Neutrophile (CD15+ CD16+)	93,19 ± 7,11 %	87,66 ± 14,08 %	0,14
NK-Zellen			
– CD56+/CD16-	5,76 ± 6,72 %	7,31 ± 12,09 %	0,64
– CD56+/CD16+	1,31 ± 1,98 %	1,78 ± 1,87 %	0,51
– CD56-/CD16-	11,59 ± 15,38 %	4,71 ± 4,07 %	0,14
– CD56-/CD16+	29,06 ± 36,78 %	17,70 ± 24,07 %	0,35
Reife myeloische Zellen (CD64+)	58,61 ± 35,80 %	75,86 ± 28,11 %	0,16

ERGEBNISSE

Auch in der Untersuchung der PBMC zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Zellzahlen der analysierten Zellpopulationen des myeloiden Panels (siehe Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2:

Zellzahlen der untersuchten Zellpopulationen des myeloiden Panels der mononukleären Zellen im peripheren Blut in Relation zur Gesamtzellzahl innerhalb des CD45-positiven Gates in Prozent. Angaben als MW ± SD; statistische Testung mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT (n = 15)	Kontrolle (n = 7)	p-Wert
Monozyten (CD14+)	8,04 ± 1,12 %	10,55 ± 5,38 %	0,15
Neutrophile (CD15+ CD16+)	62,22 ± 13,28 %	50,63 ± 26,59 %	0,19
NK-Zellen			
– CD56+/CD16-	6,79 ± 3,35 %	9,49 ± 7,01 %	0,23
– CD56+/CD16+	2,75 ± 1,55 %	2,48 ± 1,49 %	0,71
– CD56-/CD16-	29,78 ± 19,38 %	12,81 ± 19,08 %	0,07
– CD56-/CD16+	38,43 ± 22,67 %	46,87 ± 24,40 %	0,44
Reife myeloische Zellen (CD64+)	32,74 ± 21,24 %	39,72 ± 29,41 %	0,53

4.2.1.2 Lymphoides Panel

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Zellzahlen der untersuchten Zellpopulationen des lymphoiden Panels nach einer IORT im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Tabelle 4.3). Auch hier wurden die errechneten Zellzahlen in Relation zu allen CD45-positiven Zellen gesetzt. Bei neun Patientinnen konnten nicht genügend Zellen aus der WF bzw. dem EDTA-Blut isoliert werden, sodass diese nicht für die FACS-Analyse zur Verfügung standen.

Tabelle 4.3:

Zellzahlen der untersuchten Zellpopulationen des lymphoiden Panels in Relation zur Gesamtzellzahl innerhalb des CD45-positiven Gates in der WF in Prozent. Angaben als MW ± SD; statistische Testung mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT (n = 21)	Kontrolle (n = 12)	p-Wert
T-Lymphozyten (CD3+)	63,71 ± 19,77 %	53,95 ± 18,52 %	0,17
- T-Helferzellen (CD4+)	6,91 ± 13,15 %	6,66 ± 10,57 %	0,95
- Zytotoxische T-Zellen (CD8+)	39,72 ± 16,79 %	31,91 ± 19,02 %	0,25
Aktivierung			
- Früh (CD69+)	14,70 ± 11,44 %	11,43 ± 8,13 %	0,35
- Spät (CD154+)	3,41 ± 3,98 %	3,26 ± 5,45 %	0,93

Weiterhin ergab auch die quantitative Analyse der lymphoiden Zellen im peripheren Blut keine signifikante Differenz zwischen den beiden Behandlungsgruppen (siehe Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4:

Zellzahlen der untersuchten Zellpopulationen des lymphoiden Panels der mononukleären Zellen im peripheren Blut in Relation zur Gesamtzellzahl innerhalb des CD45-positiven Gates in Prozent. Angaben als MW ± SD; statistische Testung mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT (n = 15)	Kontrolle (n = 7)	p-Wert
T-Lymphozyten (CD3+)	69,16 ± 15,44 %	80,45 ± 4,42 %	0,08
- T-Helferzellen (CD4+)	13,43 ± 24,38 %	11,22 ± 21,69 %	0,84
- Zytotoxische T-Zellen (CD8+)	38,18 ± 23,23 %	51,71 ± 20,04 %	0,20
Aktivierung			
- Früh (CD69+)	11,91 ± 8,38 %	14,73 ± 7,31 %	0,45
- Spät (CD154+)	4,92 ± 7,60 %	2,71 ± 2,36 %	0,46

4.2.1.3 Panel für regulatorische T-Zellen

Die Ermittlung der relativen Zellzahl der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) in der WF aus Redon-Drainagen sowie die Detektion des Chemokin-Rezeptors CD196, welcher die T_{reg} zur Migration in entzündetes Gewebe befähigt, ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen IORT- und Kontrollgruppe. Bei neun Patientinnen konnten nicht genügend Zellen aus der WF bzw. dem EDTA-Blut isoliert werden, sodass diese nicht für die FACS-Analyse zur Verfügung standen.

Tabelle 4.5:

Zellzahlen der in der Redon-WF detektierten regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Zunächst wurde im Lymphozyten-Gate ein weiteres Gate um die CD4+/CD25+ Zellen gesetzt und ausgewertet, um anschließend Gates noch spezifischer auf FoxP3-positive Zellen mit niedriger CD127-Expression zu gaten. Ebenso wurden die Zahlen der Zellen mit unterschiedlichen Expressionsmustern für CD4/CD196 ausgewertet. Angaben in Prozent und als MW \pm SD; statistische Testung mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT (n = 14)	Kontrolle (n = 10)	p-Wert
Unspezifische T_{reg}-Marker (CD4+, CD25+):	23,92 \pm 28,08 %	10,70 \pm 9,82 %,	0,17
- Spezifischere T_{reg}-Marker in diesem Gate (CD127low, FoxP3+):	12,38 \pm 14,73 %	8,20 \pm 8,19 %	0,64
Expression von CD196:			
- CD4-, CD196+:	10,40 \pm 8,92 %	12,74 \pm 14,99 %	0,64
- CD4+, CD196+:	7,25 \pm 5,53 %	6,66 \pm 5,47 %	0,80
- CD4-, CD196-:	22,30 \pm 13,86 %	28,58 \pm 17,86 %	0,34
- CD4+, CD196-:	60,06 \pm 11,43 %	52,02 \pm 11,91 %	0,11

ERGEBNISSE

Desweiteren ergab auch die durchflusszytometrische Analyse des peripheren Blutes hinsichtlich der genannten Gates für regulatorische T-Zellen sowie für die Expression von CD196 keine gruppenbezogenen, signifikanten Unterschiede:

Tabelle 4.6:

Zellzahlen der im peripheren Blut detektierten T_{reg}. Zunächst wurde ein Gate um die CD4+/CD25+ Zellen gesetzt und ausgewertet, um anschließend innerhalb dieses Gates noch spezifischer auf FoxP3-positive Zellen mit niedriger CD127-Expression zu gaten. Ebenso wurden die Zahlen der Zellen mit unterschiedlichen Expressionsmustern für CD4/CD196 ausgewertet. Angaben in Prozent und als MW ± SD; statistische Analyse mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT (n = 11)	Kontrolle (n = 5)	p-Wert
Unspezifische T_{reg}-Marker (CD4+, CD25+):	9,64 ± 22,19 %	4,80 ± 3,96 %	0,64
- Spezifischere T_{reg}-Marker in diesem Gate (CD127low, FoxP3+):	9,00 ± 22,05 %	3,20 ± 2,95 %	0,57
Expression von CD196:			
- CD4-, CD196+:	9,38 ± 5,78 %	9,58 ± 3,29 %	0,94
- CD4+, CD196+:	3,27 ± 2,28 %	4,21 ± 2,81 %	0,49
- CD4-, CD196-:	32,01 ± 18,26 %	47,76 ± 8,21 %	0,09
- CD4+, CD196-:	55,34 ± 18,63 %	38,44 ± 8,10 %	0,08

4.2.1.4 Apoptosebestimmung mit Annexin V-Färbung

Im Rahmen der Apoptosebestimmung mittels Annexin V-Färbung wurden die CD45-positiven Zellen entsprechend ihres Viabilitätszustandes kategorisiert (siehe Tabelle 3.1, Abb. 3.6). Im Vergleich der beiden Kollektive zeigte sich in keinem der beschriebenen Viabilitätszustände ein signifikanter Unterschied bei den aus der Redon-WF isolierten CD45-positiven Zellen:

Tabelle 4.7:

Kategorisierung der Viabilitätszustände der aus der WF isolierten CD45-positiven Zellen, Angaben in Prozent und als MW ± SD; statistische Analyse mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT (n = 20)	Kontrolle (n = 10)	p-Wert
Frühapoptotische Zellen (Annexin V+, PI-):	8,00 ± 6,41 %	5,04 ± 4,97 %	0,21
Spätapoptotische und nekrotische Zellen (Annexin V+/PI+):	4,17 ± 4,97 %	4,47 ± 6,80 %	0,89
Vitale Zellen (Annexin V-/PI-):	87,83 ± 9,70 %	90,49 ± 10,83 %	0,50

Auch die CD45-positiven PMBC zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrem Viabilitätszustand im Vergleich der IORT- mit der Kontrollgruppe:

Tabelle 4.8:

Kategorisierung der Viabilitätszustände der aus dem peripheren Blut isolierten CD45-positiven Zellen. Angaben in Prozent und als MW ± SD; statistische Analyse mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT (n = 14)	Kontrolle (n = 7)	p-Wert
Frühapoptotische Zellen (Annexin V+, PI-):	5,02 ± 5,40 %	1,69 ± 1,65 %	0,13
Spätapoptotische und nekrotische Zellen (Annexin V+/PI+):	5,55 ± 9,66 %	1,45 ± 4,16 %	0,30
Vitale Zellen (Annexin V-/PI-):	89,43 ± 11,02 %	96,86 ± 3,18 %	0,10

Bei einigen Patientinnen konnten nicht genügend Zellen aus der WF bzw. dem EDTA-Blut isoliert werden, sodass diese nicht für die FACS-Analyse zur Verfügung standen.

4.2.2 Multiplex-Zytokin-Analyse und ELISA

Um sich zunächst eine Übersicht zu verschaffen, welche Faktoren in der WF vorliegen und inwiefern deren Spiegel im Rahmen einer intraoperativen Bestrahlung verändert werden, führten wir zunächst den *Human Cytokine Array* für 80 Zytokine mit den WF von 15 Patientinnen durch (7 IORT- vs. 8 Kontroll-Patientinnen). Die Ergebnisse sind im folgenden Balkendiagramm grafisch dargestellt.

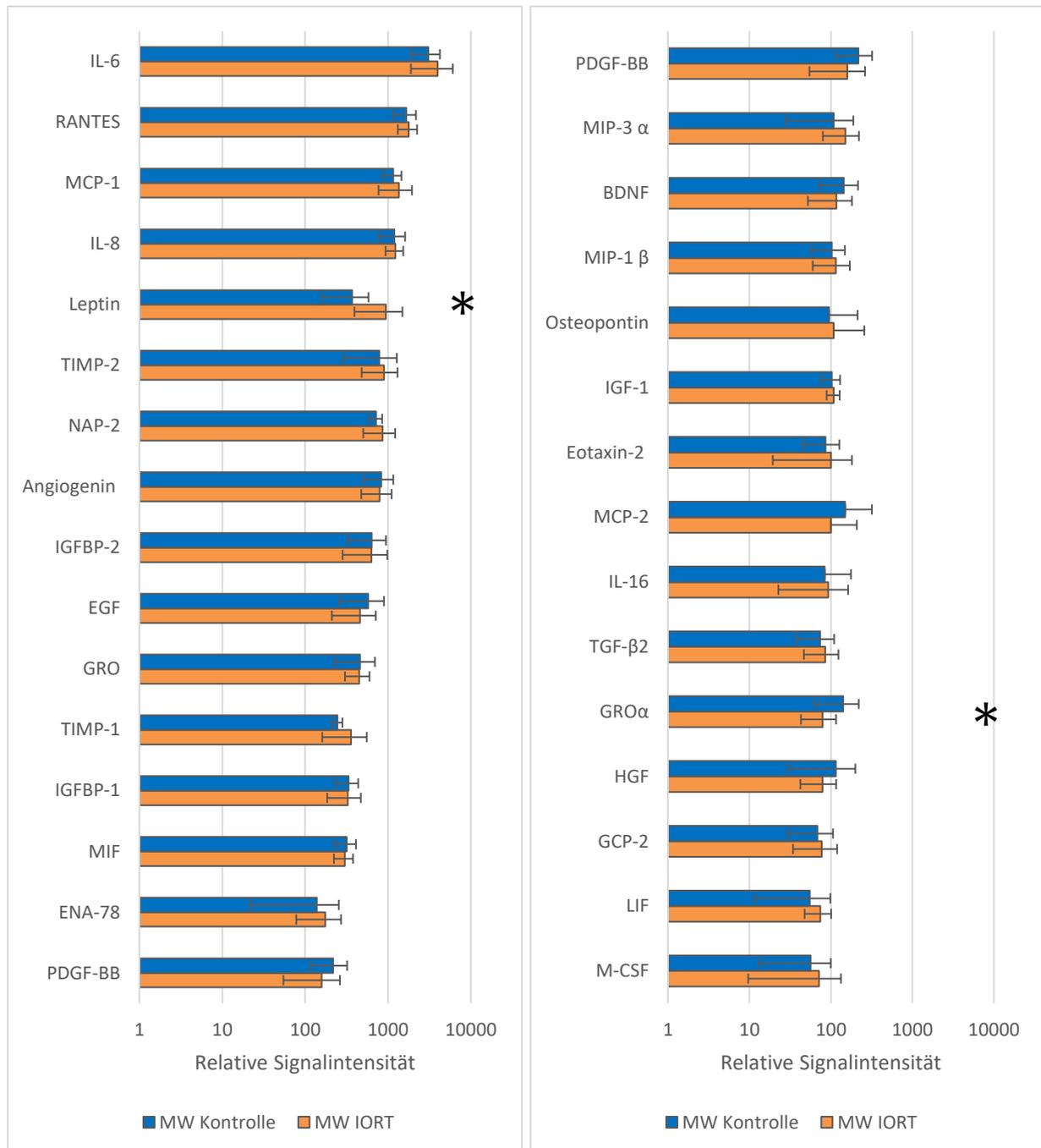
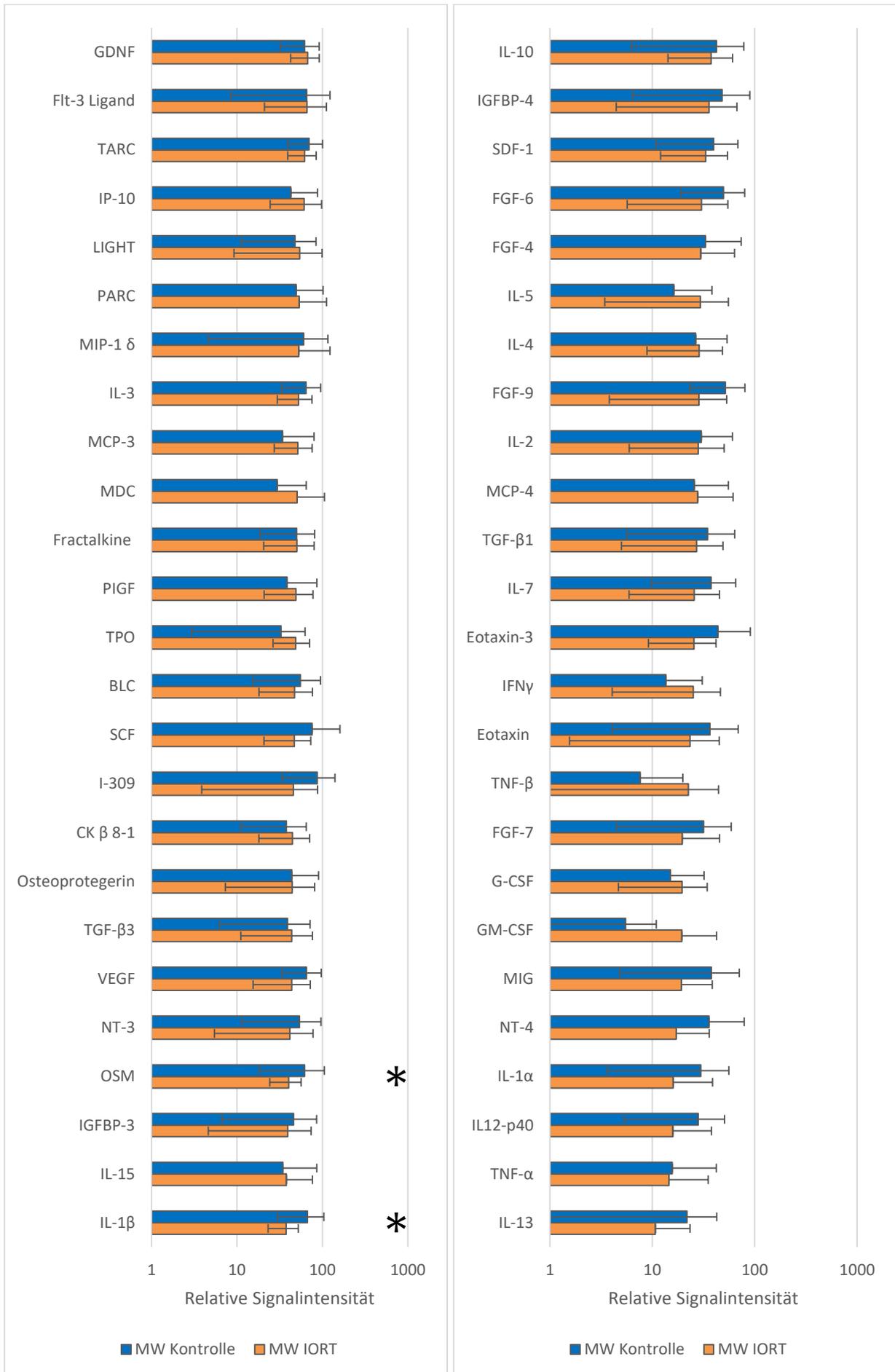


Diagramm 4.5:

Chemilumineszenz-Signalintensitäten der mittels Zytokin-Array in den WF nachgewiesenen 80 Zytokine und Faktoren (n = 15; 7 IORT vs. 8 Kontroll-Patientinnen). Angaben als MW ± SD. Statistische Analyse durch doppelseitigen t-Test; * p < 0,05. Fortsetzung auf der nächsten Seite.

ERGEBNISSE



ERGEBNISSE

Es fanden sich im Gruppenvergleich signifikante Unterschiede der gemessenen Chemilumineszenz-Signalintensitäten der Faktoren Leptin, Oncostatin-M (OSM), IL-1 β und GRO α (siehe Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9:

Chemilumineszenz-Signalintensitäten im Zytokin-Array der Faktoren mit signifikantem, gruppenassoziiertem Unterschied. Angaben als MW \pm SD; statistische Analyse mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT (n = 7)	Kontrolle (n = 8)	p-Wert
Leptin	941 \pm 549	370 \pm 211	0,01
Oncostatin-M (OSM)	40 \pm 16	62 \pm 44	0,01
IL-1β	38 \pm 15	67 \pm 37	0,04
GROα	79 \pm 36	141 \pm 79	0,05

Aufgrund dieser Ergebnisse beschlossen wir, die jeweiligen Konzentrationen in den WF aller eingeschlossenen Patientinnen mittels ELISA zu quantifizieren. Aufgrund eines zu geringen Probenvolumens konnte für 4 Patientinnen (davon 2 IORT- und 2 Kontroll-Patientinnen) keine ELISA-Analyse durchgeführt werden, sodass hierfür letztendlich 36 individuelle Proben (18 IORT- vs. 18 Kontroll-Patientinnen) zur Verfügung standen. Die Zytokinspiegel der WF zeigten im Vergleich beider Kollektive eine signifikante Differenz für die Zytokine OSM, IL-1 β sowie Leptin. Die Konzentration des Faktors GRO α hingegen war im Vergleich der beiden Kollektive nicht signifikant unterschiedlich (siehe Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10:

Konzentrationen der explizit in den WF der einzelnen Patientinnen per ELISA nachgemessenen Faktoren. Angaben in pg/mL und als MW \pm SD; statistische Analyse mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT (n = 18)	Kontrolle (n = 18)	p-Wert
Leptin	5275,09 \pm 3891,75	2949,02 \pm 3470,62	0,02
Oncostatin-M (OSM)	179,06 \pm 133,26	287,47 \pm 224,83	0,04
IL-1β	23,27 \pm 16,80	13,97 \pm 8,88	0,04
GROα	1219,98 \pm 886,12	1110,15 \pm 750,45	0,69

ERGEBNISSE

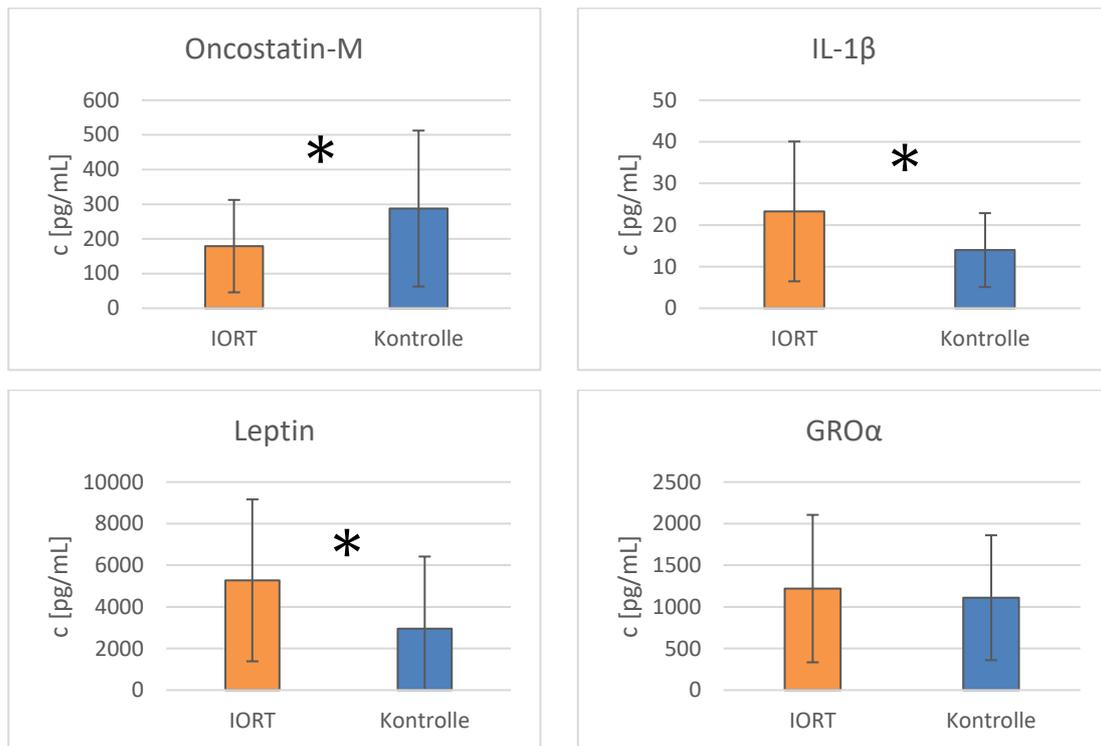


Diagramme 4.6:

Konzentrationen der explizit in den WF der einzelnen Patientinnen per ELISA nachgemessenen Faktoren (n = 36; 18 IORT- vs. 18 Kontroll-Patientinnen). Angaben als MW ± SD. * $p < 0,05$ im doppelseitigen t-Test.

Des Weiteren führten wir ELISA auch für die Faktoren VEGF, RANTES, HGF sowie uPA aus, dies im Kontext veröffentlichter Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die eine Rolle dieser Faktoren für das Lokalmilieu im Rahmen einer IORT nahelegen. Als Bestätigung der Daten des Zytokin-Array ergaben auch die ELISA keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen der genannten Faktoren in den WF der beiden Gruppen (siehe Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11:

Konzentrationen weiterer in den WF der einzelnen Patientinnen per ELISA nachgemessenen Faktoren. Angaben in pg/mL und als MW ± SD; statistische Analyse mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT (n = 18)	Kontrolle (n = 18)	p-Wert
VEGF	547,57 ± 335,45	280,97 ± 429,27	0,08
RANTES	8316,54 ± 9609,54	6070,72 ± 2830,92	0,45
HGF	17604,44 ± 14686,87	4803,69 ± 8202,66	0,19
uPA	120,37 ± 114,58	117,58 ± 109,04	0,88

4.3 Einfluss der WF auf die Zellfunktion

Wir untersuchten den Einfluss der WF, als Repräsentant des lokalen Milieus im Tumorbett, auf Mamma-MSK und auf die Brustkrebszelllinie MDA-MB 231. Hierfür wurden verschiedene *Live Cell Imaging*-Versuche durchgeführt: Proliferations- und Wundheilungs-Assays sowie chemotaxisbedingte Migration.

4.3.1 Einfluss der WF auf Mamma-MSK

4.3.1.1 Proliferations-Assay

Experimentell wurde zunächst analysiert, ab welcher Konzentration die WF einen Einfluss auf die MSK-Proliferation hat. Weiterhin wurde untersucht, ob dafür der Zusatz von WF zum Kulturmedium ausreichend ist oder ob Zusatz von Serum als Supplement nötig ist. WF für diese Versuche bestand aus einem Pool der WF von 16 Patientinnen mit IORT bzw. 16 Kontrollen. Kontroll-WF in den Konzentrationen 0,5 % / 1,0 % / 5,0 % / 10,0 % wurde verglichen mit normalem MSK-Medium (+ 10 % AB-Serum) bzw. serumfreiem Kulturmedium. Es zeigte sich, dass die WF, abhängig von der zugesetzten Konzentration, die Zellproliferation ebenso unterstütze wie das normale Zellkulturmedium und sich deutlich von dem serumfreien Medium unterschied. Aufgrund dieser Erkenntnisse entschieden wir uns dazu, dass für die folgenden Experimente kein Zusatz von Serum zum WF notwendig ist.

Bei den darauffolgenden Versuchsansätzen wurden die jeweils für die IORT- und die Kontrollgruppe gepoolten WF eingesetzt. Getestet wurde vergleichend deren Einfluss auf die Proliferation der Mamma-MSK. Der WF-Pool jeder Gruppe wurde in den Konzentrationen 0,1 % / 0,5 % / 1,0 % / 5,0 % / 10 % im Kulturmedium der MSK eingesetzt. Nachdem man sich auf diese Weise zunächst Orientierung verschaffte, in welchen Konzentrationsbereichen ein Unterschied zwischen den Gruppen zu verzeichnen war, wurden die folgenden Versuchsansätze nur noch mit wirkstarken WF-Konzentrationen durchgeführt. Diese gebräuchliche Beschränkung verhinderte einen übermäßigen Verbrauch technischer Replikate. Die Resultate sind im Folgenden dargestellt.

ERGEBNISSE

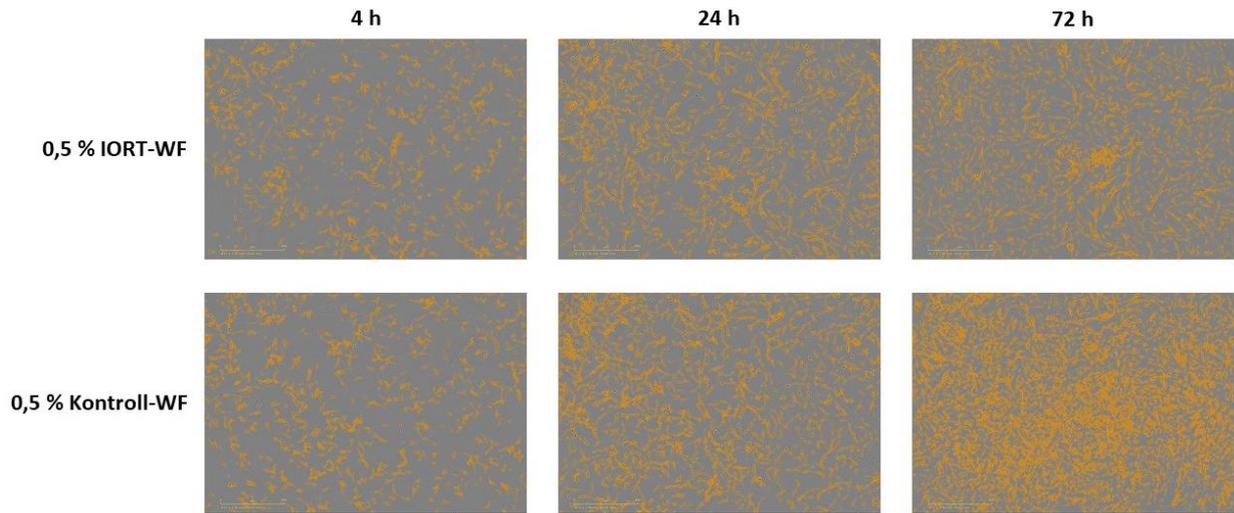


Abb. 4.4:
Proliferation der Mamma-MSC unter dem Einfluss von 0,5 % IORT-WF (obere Reihe) und 0,5 % Kontroll-WF (untere Reihe) nach 4 h, 24 h und 72 h. Aufnahmen des IncuCyte Zoom® unter Phasenkontrast, unter Einblendung der Konfluenzmaske für Mamma-MSC (orange).

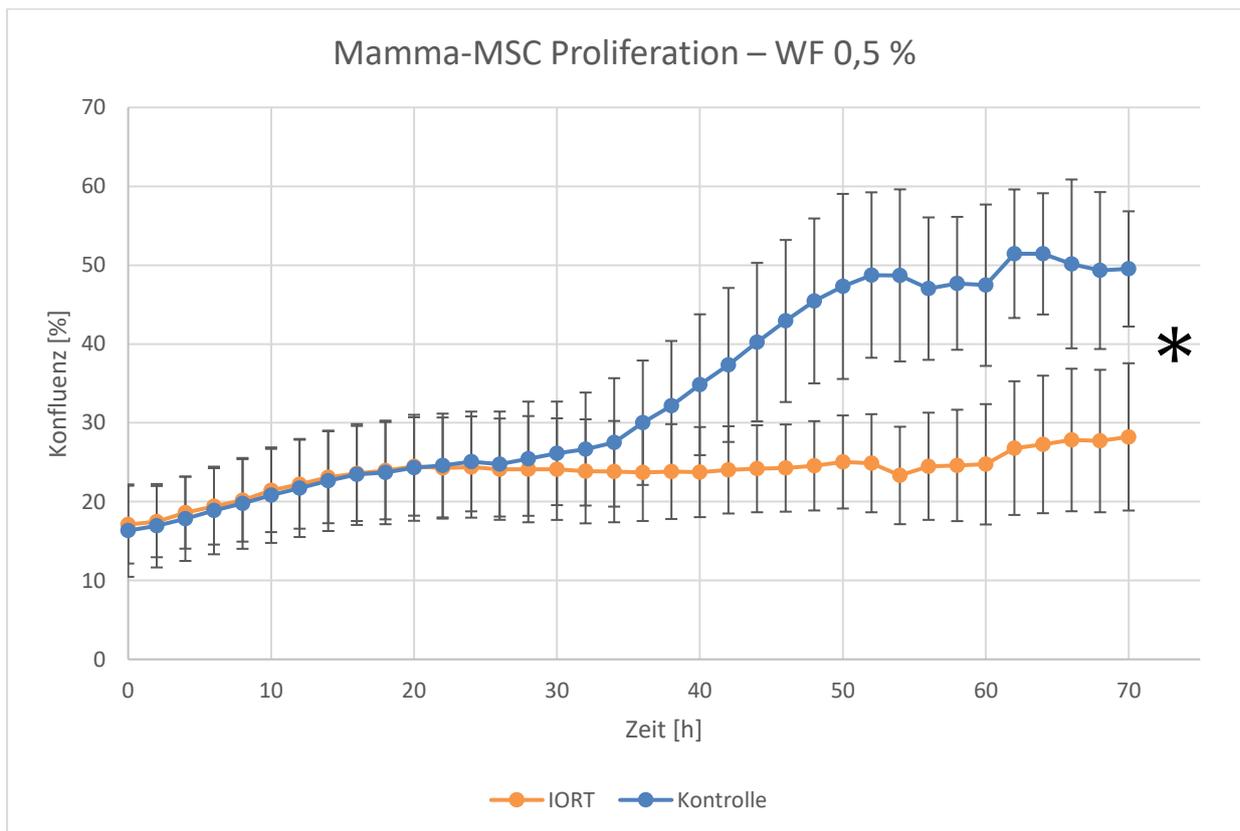


Diagramm 4.7:
Proliferation der Mamma-MSC mit 0,5 % WF der IORT- vs. der Kontrollgruppe als Medienzusatz. Anzahl der technischen Replikate: 72 (36 IORT, 36 Kontrollen). Angaben der Konfluenz in Prozent über die Zeit in 2 h-Intervallen als MW ± SD. $p < 0,0001$ in MANOVA.

ERGEBNISSE

Der Proliferationskurven für 0,5 % WF verlaufen zunächst nahezu gleich, ehe sie sich ab einem Zeitpunkt von 34 Stunden auftrennen. Die mit der WF der Kontroll-Patientinnen behandelten Zellen zeigen ein vermehrtes Wachstum und erreichen nach 70 Stunden eine höhere Konfluenz (MW \pm SD der Konfluenz bei t = 70 h: 49,52 \pm 7,31 %), während das Wachstum der mit WF von mit IORT behandelten Patientinnen im direkten Vergleich zur Kontrollgruppe gehemmt ist (bei t = 70 h: 28,21 \pm 9,34 %). Die multivariate Varianzanalyse ergab einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,0001$) im Vergleich der Gesamtverläufe beider Kurven. Eine für jeden Zeitpunkt durchgeführte Regressionsanalyse (KQ-Methode) ergab, dass ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,04$) ab dem Zeitpunkt t = 34 h nachweisbar ist.

Für die Konzentration von 1,0 % WF als Kulturmedienzusatz zeigt sich folgendes Verhalten:

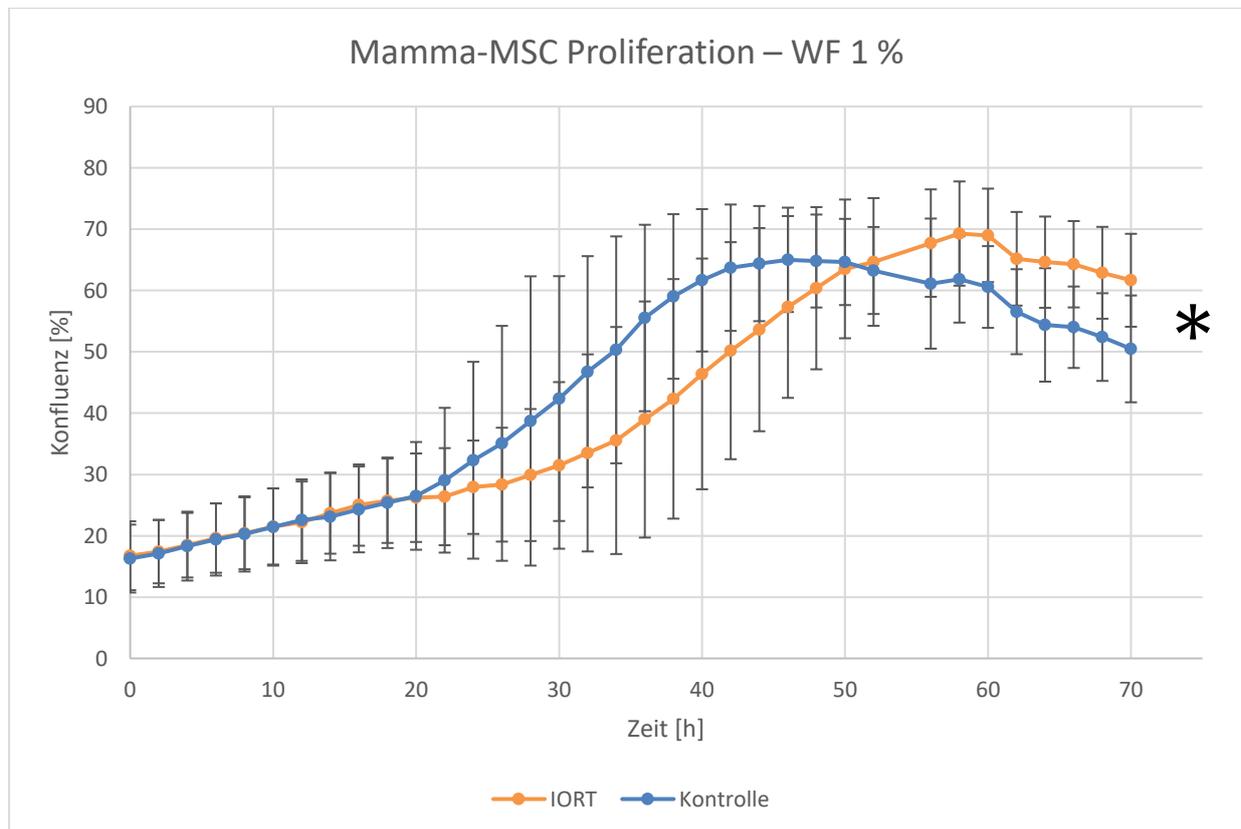


Diagramm 4.8:

Proliferation der Mamma-MSK mit 1,0 % WF der IORT- vs. der Kontrollgruppe als Medienzusatz. Zusammenfassung von drei Einzelexperimenten mit jeweils 24 technischen Replikaten (12 IORT, 12 Kontrollen). Angaben der Konfluenz in Prozent über die Zeit in 2 h-Intervallen als MW \pm SD. $p < 0,0001$ in MANOVA.

Die Kurven der IORT- und der Kontrollgruppe weisen einen ähnlichen Kurvenverlauf auf, nur die orangefarbene Kurve (Behandlung mit WF von IORT-behandelten Patientinnen) scheint um ca. zwölf Stunden zeitversetzt im Vergleich zu jener der Kontrollgruppe. Dabei

erreichen die mit 1 % IORT-WF behandelten MSC eine etwas höhere maximale Konfluenz ($64,02 \pm 2,71$ % nach 60 h) als die mit 1 % Kontroll-WF behandelten Zellen ($61,68 \pm 2,14$ % nach 48 h). Auch in diesem Fall ergab die MANOVA-Analyse einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Kurven der beiden Behandlungsgruppen ($p < 0,0001$). Der Zusatz von 0,1 % / 5 % / 10 % der WF von IORT- vs. Kontroll-Patientinnen in MSC-Kulturen ergab keinen signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten der Zellen.

4.3.1.1.1 ELISA-Analyse der konditionierten Medien

Nachdem wir deutliche Unterschiede im Proliferationsverhalten der MSC unter IORT- bzw. Kontroll-WF beobachtet hatten, interessierte uns die Zusammensetzung der Wachstumsfaktoren in den konditionierten Medien der entsprechenden MSC-Kulturen. Die ELISA-Analyse der konditionierten Medien aus den Replikaten des Proliferations-Assays mit Mamma-MSC unter Einfluss von 0,5 % WF (IORT vs. Kontrolle) ergab unter Verwendung von 15 Replikaten pro Gruppe folgende Ergebnisse: Die Zytokinspiegel der konditionierten Medien zeigten im Vergleich zwischen mit IORT-WF und Kontroll-WF behandelten MSC-Kulturen eine signifikante Differenz für die Zytokine GRO α , VEGF sowie RANTES. Die Konzentration des Faktors HGF hingegen war im Vergleich der beiden Kollektive nicht signifikant unterschiedlich (siehe Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12:

Per ELISA in den mit 0,5 % WF konditionierten MSC-Kulturmedien ermittelte Konzentrationen verschiedener Faktoren. Angaben in pg/dL und als MW \pm SD. Anzahl technischer Replikate: 15 IORT, 15 Kontrollen; statistische Analyse mittels doppelseitigem t-Test.

	IORT	Kontrolle	p-Wert
GROα	5,66 \pm 2,58	11,10 \pm 7,83	< 0,01
VEGF	76,47 \pm 19,92	93,26 \pm 21,37	0,03
RANTES	99,61 \pm 22,01	127,45 \pm 18,25	< 0,01
HGF	31,31 \pm 11,32	37,26 \pm 14,35	0,20

ERGEBNISSE

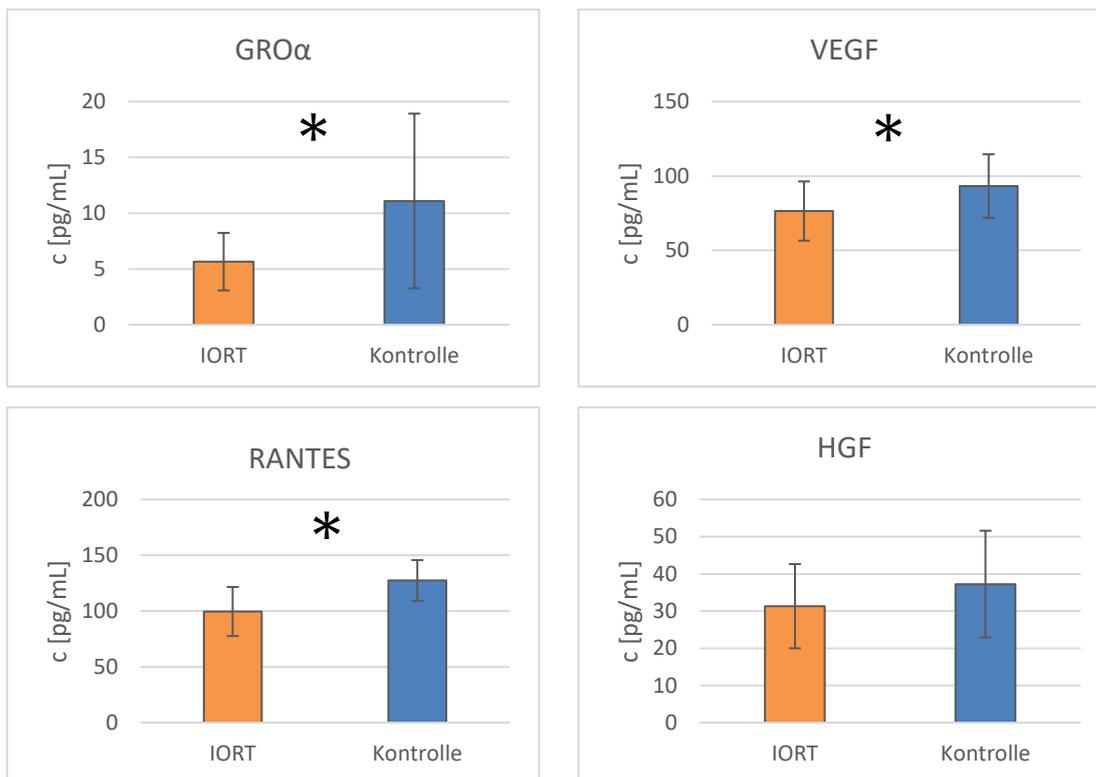


Diagramme 4.9:

Per ELISA in den mit 0,5 % WF konditionierten MSC-Kulturmedien ermittelte Konzentrationen verschiedener Faktoren. Angaben als MW \pm SD. Anzahl technischer Replikate: 15 IORT, 15 Kontrollen. * $p < 0,05$ im doppelseitigen t-Test.

4.3.1.2 Wundheilungs-Assay

WF kann das Wundheilungspotenzial von Zellen beeinflussen. Als ersten Indikator analysierten wir das Migrationsverhalten der MSC im Wundheilungs-Assay. Analog zur Vorgehensweise im Proliferations-Assay erfolgte auch hier zunächst ein Versuchsansatz mit allen zuvor genannten Konzentrationsstufen (0,1 % / 0,5 % / 1,0 % / 5,0 % / 10 % WF, jeweils IORT vs. Kontrolle), um in den darauf folgenden beiden Versuchsansätzen den Schwerpunkt auf die Generierung technischer Replikate in den Konzentrationsstufen mit auffälligen Ergebnissen zu legen. Angestrebt wurde hierbei die Anzahl von 40 technischen Replikaten pro Kollektiv.

Im Wundheilungs-Assay war allein bei Einsatz von 1 % WF im Kulturmedium ein Unterschied zwischen beiden Kollektiven zu messen, sodass im Folgenden allein diese Ergebnisse grafisch dargestellt sind. Da in vier Wells (1 IORT, 3 Kontrollen) die „Pins“ des WoundMaker™ keinen bzw. keinen ausreichenden „Scratch“ in der MSC-Einzelzellschicht erzeugten, wurden abzüglich dieser Anzahl 39 technische Replikate für die IORT-Gruppe und 37 für die Kontrollgruppe erzeugt.

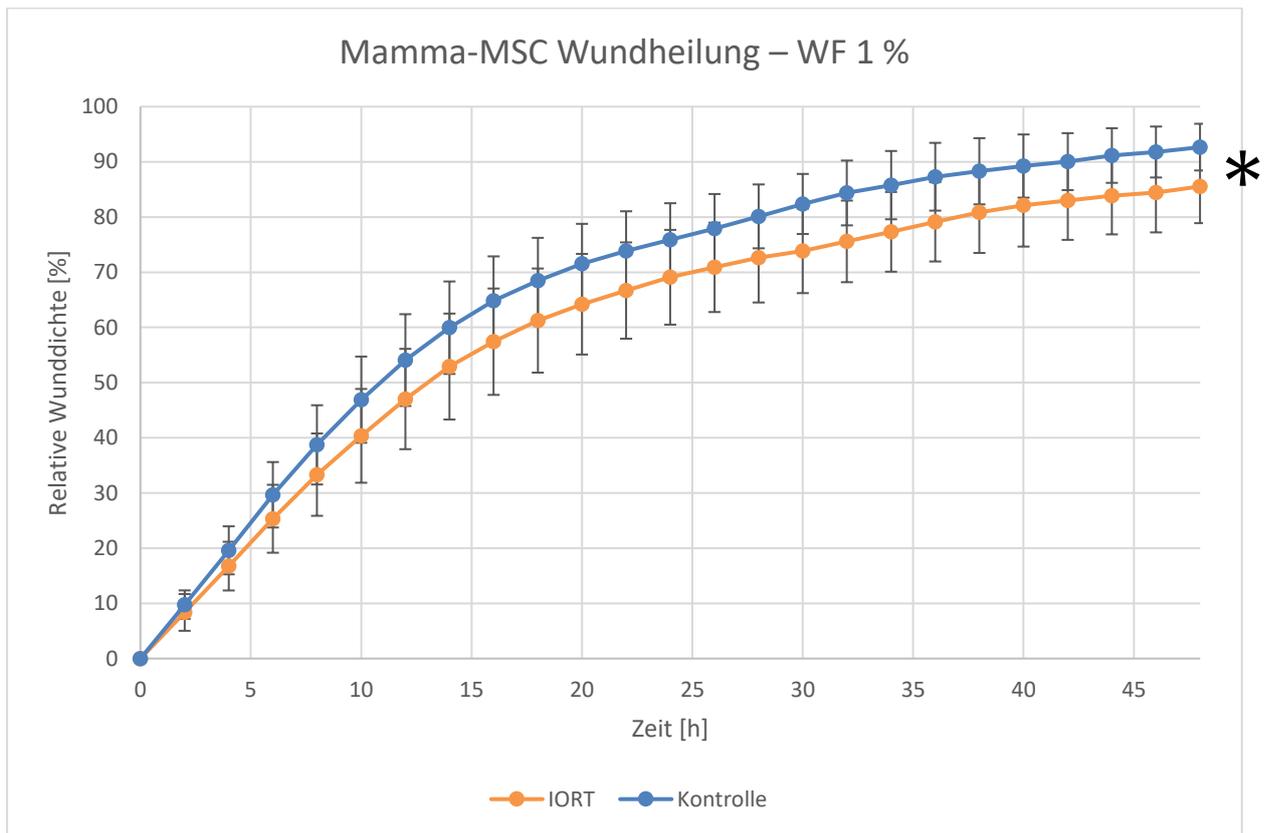


Diagramm 4.10:

Wundheilung der Mamma-MSC mit 1 % WF der IORT- vs. der Kontrollgruppe als Medienzusatz. Anzahl der technischen Replikate: 39 IORT, 37 Kontrollen. Angaben als RWD in Prozent über die Zeit in 2 h-Intervallen als MW ± SD. $p = 0,01$ in MANOVA.

Die mit der WF der IORT-Patientinnen behandelten MSC zeigten zeitbezogen eine verminderte Wunddichte (RWD bei $t = 48$ h: $85,53 \pm 6,63$ %), im Vergleich zu den mit Kontroll-WF behandelten Zellen, welche zum selben Zeitpunkt eine RWD von $92,67 \pm 4,2$ % aufwiesen. Die MANOVA-Analyse ergab einen signifikanten Unterschied ($p = 0,01$) im Vergleich der Gesamtverläufe beider Kurven. Eine für jeden Zeitpunkt durchgeführte Regressionsanalyse (KQ-Methode) ergab, dass ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,04$) ab dem Zeitpunkt $t = 2$ h nachweisbar ist.

Der Zusatz von 0,1 % / 0,5 % / 5 % / 10 % der WF von IORT- vs. Kontroll-Patientinnen in MSC-Kulturen ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Wundheilungsgeschwindigkeit.

4.3.1.3 Migration/Chemotaxis-Assay

Auch in diesem Transwell-basierten Assayformat zur Evaluation der Chemotaxis-bedingten Migration mit WF als Chemoattraktans in MSC-Zellkulturen erfolgte der erste Versuchsansatz mit allen zuvor genannten Konzentrationsstufen (0,1 % / 0,5 % / 1,0 % / 5,0 % / 10 % WF, jeweils IORT vs. Kontrolle), um in den beiden darauf folgenden Versuchsansätzen den Schwerpunkt auf die Generierung technischer Replikate in den Konzentrationsstufen mit auffälligen Ergebnissen zu legen. Angestrebt wurde hierbei die Anzahl von 28 technischen Replikaten pro Kollektiv.

Im Migrations/Chemotaxis-Assay mit MSC war ein Unterschied zwischen beiden Kollektiven allein im Einsatz von 0,5 % WF als Chemoattraktans zu verzeichnen, sodass im Folgenden allein die Ergebnisse dieser Konzentrationsstufe grafisch dargestellt sind. Für die IORT-Gruppe konnten nur 27 der 28 angestrebten technischen Replikate erzeugt werden, da in einem Well das Vorliegen von Luftblasen eine Quantifizierung der migrierenden Zellen durch die Analysemaske verhinderte.

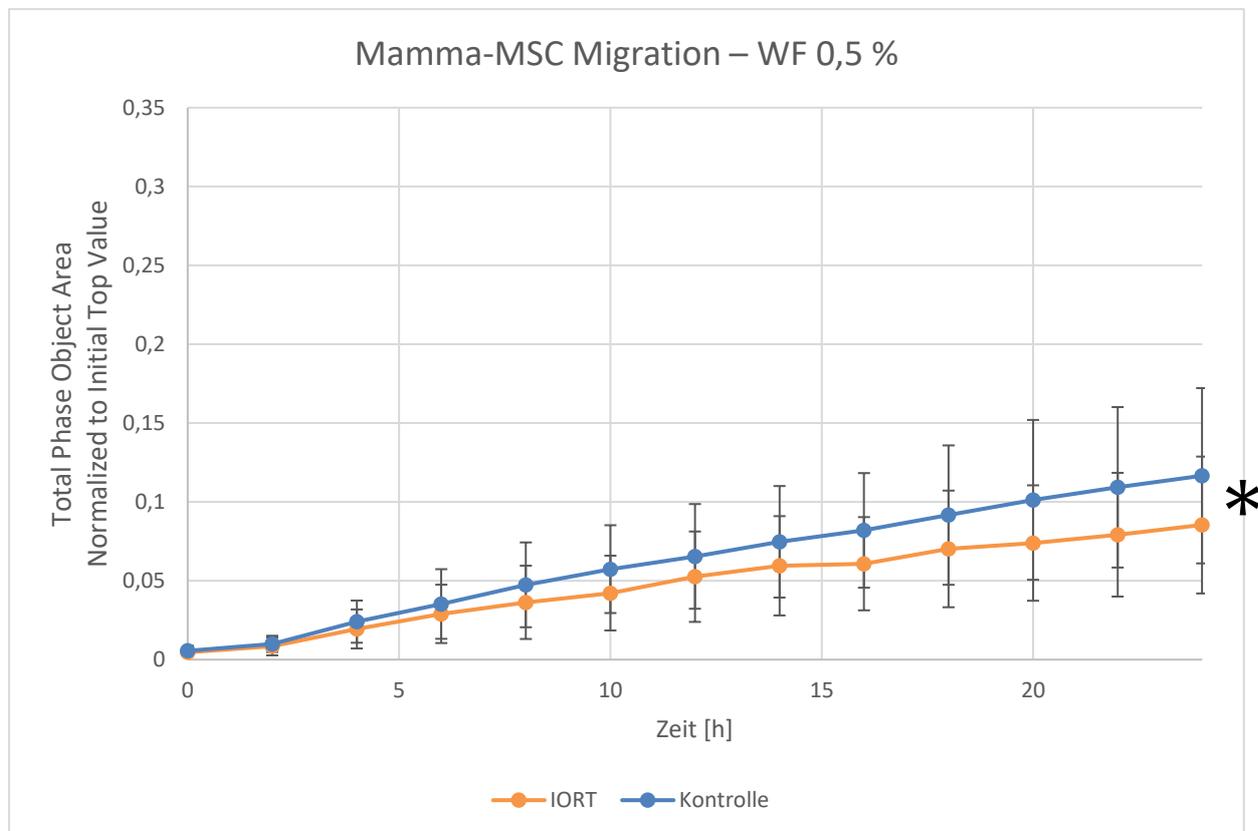


Diagramm 4.11:

Chemotaxis-bedingte Migration der Mamma-MSc mit 0,5 % WF der IORT- vs. der Kontrollgruppe als Chemoattraktans. Anzahl der technischen Replikate: 27 IORT, 28 Kontrollen. Angaben als dimensionslose *Bottom/Top-Ratio* über die Zeit in 2 h-Intervallen als MW ± SD. $p = 0,02$ in MANOVA.

ERGEBNISSE

Unsere Ergebnisse zeigen zeitbezogen eine verminderte Migration der MSC in die gepoolte WF der IORT-Patientinnen (*Bottom/Top-Ratio* bei $t = 24$ h: $0,10 \pm 0,03$) im Vergleich zu den Kammern mit gepoolter WF der Kontrollgruppen-Patientinnen (*Bottom/Top-Ratio* bei $t = 24$ h: $0,15 \pm 0,04$). Die MANOVA-Analyse ergab einen signifikanten Unterschied ($p = 0,02$) im Vergleich der Gesamtverläufe beider Kurven. Eine für jeden Zeitpunkt durchgeführte Regressionsanalyse (KQ-Methode) ergab, dass ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,04$) ab dem Zeitpunkt $t = 10$ h nachweisbar ist.

Der Einsatz der WF von IORT- vs. Kontroll-Patientinnen als Chemoattraktantien ergab hinsichtlich der hierdurch induzierten MSC-Migration in den Konzentrationen von 0,1 % / 1 % / 5 % / 10 % keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kollektiven.

4.3.2 Einfluss der WF auf MDA-MB 231

4.3.2.1 Proliferations-Assay

Der Zusatz von 0,1 % / 0,5 % / 1 % / 5 % / 10 % der WF von IORT- vs. Kontrollpatientinnen in MDA-MB 231-Zellkulturen ergab hinsichtlich des Proliferationsverhaltens keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kollektiven. Exemplarisch für alle Konzentrationsstufen sind untenstehend die Daten für die Konzentration von 0,5 % WF im Kulturmedium grafisch dargestellt.

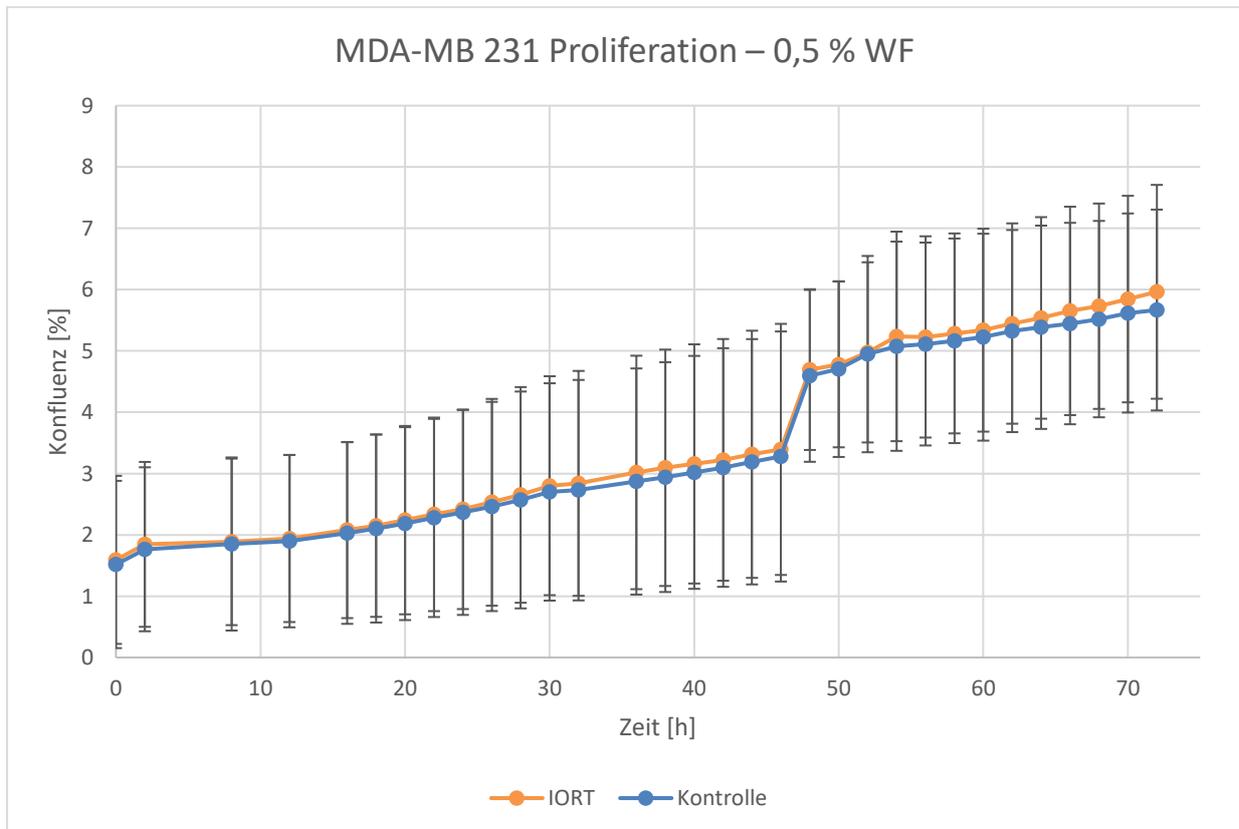


Diagramm 4.12:

Proliferation der MDA-MB 231 mit 0,5 % WF der IORT- vs. der Kontrollgruppe als Medienzusatz. Anzahl der technischen Replikate: 48 (24 IORT, 24 Kontrollen). Angaben als Konfluenz in Prozent über die Zeit in 2 h-Intervallen als MW ± SD. Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Verlauf der Kurven beider Kollektive.

4.3.2.2 Wundheilungs-Assay

Der Zusatz von 0,1 % / 0,5 % / 1 % / 5 % / 10 % der WF von IORT- vs. Kontroll-Patientinnen in MDA-MB 231-Zellkulturen ergab hinsichtlich der Geschwindigkeit der Wundheilung keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kollektiven. Exemplarisch für alle Konzentrationsstufen sind untenstehend die Daten für die Konzentration von 0,5 % WF im Kulturmedium grafisch dargestellt.

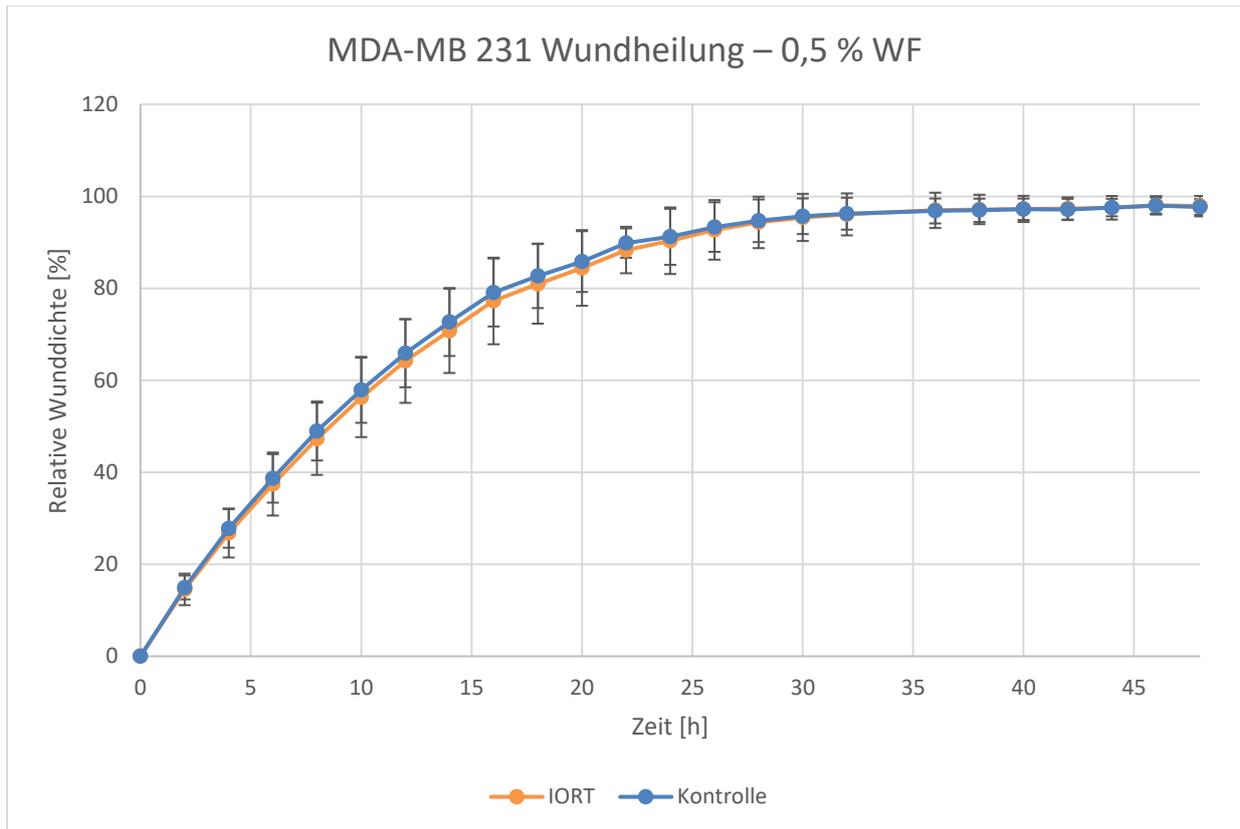


Diagramm 4.13:

Wundheilung der MDA-MB 231 mit 0,5 % WF der IORT- vs. der Kontrollgruppe als Medienzusatz. Anzahl der technischen Replikate: 40 IORT, 40 Kontrollen. Angaben als RWD in Prozent über die Zeit in 2 h-Intervallen als MW ± SD. Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Verlauf der Kurven beider Kollektive.

4.3.2.3 Migration/Chemotaxis-Assay

Der Einsatz von 0,1 % / 0,5 % / 1 % / 5 % / 10 % WF von IORT- vs. Kontroll-Patientinnen als Chemoattraktans in MDA-MB 231-Zellkulturen ergab hinsichtlich des Chemotaxis-bedingten Migrationsverhaltens keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kollektiven. Exemplarisch für alle Konzentrationsstufen sind untenstehend die Daten für die Konzentration von 0,5 % WF im Kulturmedium grafisch dargestellt.

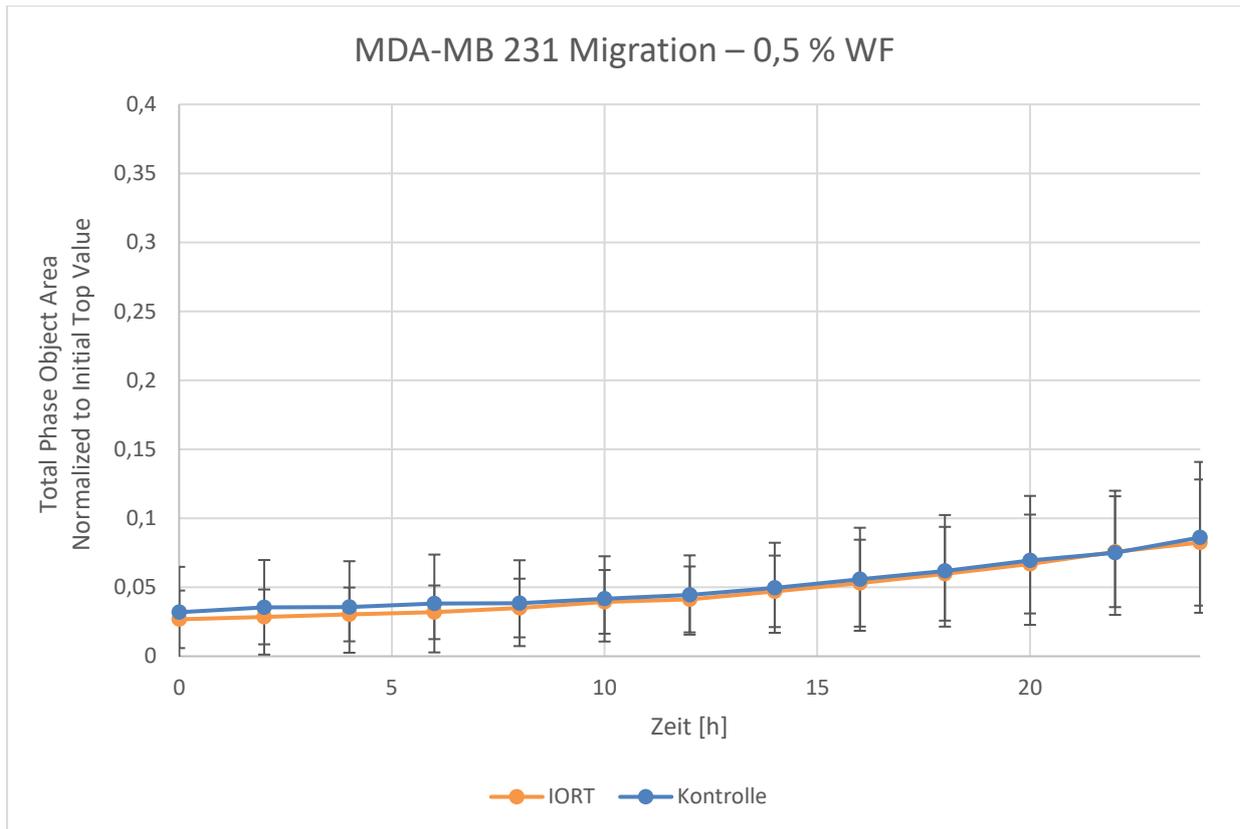


Diagramm 4.14:

Chemotaxis-bedingte Migration der MDA-MB 231 mit 0,5 % WF der IORT- vs. der Kontrollgruppe als Chemoattraktans. Anzahl der technischen Replikate: 48 IORT, 48 Kontrollen. Angabe als dimensionslose *Bottom/Top-Ratio* über die Zeit in 2 h -Intervallen als $MW \pm SD$. Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Verlauf der Kurven beider Kollektive.

5. DISKUSSION

Unsere Ergebnisse unterstützen die anfangs aufgestellte Hypothese, dass eine IORT einen messbaren Einfluss auf das lokale Zell- und Immunsystem des Tumorbettes hat. Das Wachstum der MSC im Tumorbett wird negativ beeinflusst, wobei wir sowohl einen direkt radiotoxischen Aspekt als auch eine Konditionierung des Mikromilieus im Sinne einer Alteration des Zytokinprofils beobachten konnten. Ebenso scheint das Sekretom der MSC durch den Einfluss der Bestrahlung auf das lokale Milieu modifiziert zu werden. Eine Veränderung der zellulären Zusammensetzung der Wundflüssigkeit konnten wir jedoch nicht belegen. Zusammengenommen könnte dies zur Generierung eines für die Entstehung von Lokalrezidiven weniger vorteilhaften Milieus führen und somit einen Anteil zu der Wirkung der IORT auf das Tumorbett beitragen.

5.1 Direkter Einfluss einer IORT auf zelluläre Komponenten des Immunsystems

5.1.1 Einfluss auf MSC im Tumorbett

Im größten Teil der Literatur wird v. a. der hemmende Einfluss der IORT im Rahmen einer Antitumorthherapie auf das Wachstum residualer Tumorzellen beschrieben (Herskind et al., 2017). Arbeiten über die Auswirkungen einer Bestrahlung auf MSC, differenziert nach verwendeter Strahlendosis, sind hauptsächlich die Ergebnisse aus *in-vitro*-Versuchen. Viele Daten legen nahe, dass MSC radioresistent seien. Uns interessierte daher, ob die IORT einen radiotoxischen Effekt auf MSC hat, oder ob MSC der intraoperativen Hochdosisbestrahlung entkommen können. Bei unseren Ergebnissen handelt es sich somit erstmals um erhobene Daten bezüglich des Verhaltens von MSC nach einer IORT unter *in-vivo*-Bedingungen. Wir konnten nach der IORT nur aus einer von zwanzig Gewebebiopsien vitale MSC isolieren. Diese waren jedoch nicht über die Ursprungspassage hinaus kultivierbar, zeigten ein verringertes Zellvolumen und wiesen zahlreiche Stressfilamente auf. Damit entsprachen sie in ihrer Erscheinung einem seneszenten Phänotyp (Bieback et al., 2012). Wir deuten unsere Ergebnisse als direkte Radiotoxizität der IORT auf die MSC des Tumorbettes. Die Daten dieses Projektes sind bereits publiziert (Uhlig, Wuhrer et al., 2020).

In den letzten Jahren wurden in diversen Arbeiten v. a. die radioresistenten Eigenschaften der MSC hervorgehoben. Auch eine bezüglich dieser Thematik durchgeführte systematische Übersichtsarbeit schlussfolgert die Existenz eines vornehmlich radioresistenten Phänotyps der MSC: Dieser käme u. a. durch bestrahlungsinduzierte, verstärkte Erkennung von DNA-Schäden und DNA-Reparaturmechanismen sowie der Ausschüttung anti-apoptotischer Proteine zur Ausprägung (Nicolay et al., 2015b). Der Großteil der in die genannte Übersichtsarbeit einbezogenen Studien beschäftigt sich jedoch mit einer *in-vitro*-Bestrahlung bereits im Vorfeld isolierter MSC. Unserer Meinung nach ist hier die Vergleichbarkeit der Daten mit einer *in-vivo*-Radiatio wie der IORT nur eingeschränkt möglich. Die einzige in der Arbeit genannte Publikation, welche sich mit dem Einfluss einer Bestrahlung unter *in-vivo*-Bedingungen beschäftigt, beschreibt eine Resistenz von aus porkinen Mandibulae isolierten MSC nach einer Radiatio mit 18 Gy. Eine *in-vivo*-Bestrahlung von MSC mit 20 Gy – entsprechend einer Strahlendosis im Rahmen der IORT – wurde bis dato nicht untersucht. Ebenso wurde in keiner der genannten Studien, in denen eine *in-vitro*-Radiatio untersucht wurde, eine entsprechende Dosis von 20 Gy erreicht. Bezieht man weitere Publikationen in die Recherche mit ein, in denen der Einfluss höherer Strahlendosen *in vitro* untersucht worden war, zeigt sich eine Abhängigkeit der Radiosensitivität der MSC von der Strahlendosis: Bei Überschreitung einer Strahlendosis von 10 Gy wird in mehreren Untersuchungen eine entsprechende Proliferationseinschränkung der MSC beschrieben (D'Andrea et al., 2012; de Andrade et al., 2014; Fekete et al., 2015).

Eine IORT mit 20 Gy schränkt unseren Ergebnissen zufolge die klonale Kapazität von MSC hochgradig ein. Es muss entsprechend unserer Ergebnisse von einer Radiosensitivität der Mamma-MSC ausgegangen werden. Die Daten stützen die Hypothese, dass das Verfahren einen lokalen, ablativen Effekt nicht nur auf verbliebene Tumorzellen, sondern auch auf weitere Komponenten des Tumorbett-Stromas hat.

Bei den von uns aus einer Gewebeprobe nach IORT isolierbaren MSC handelte es sich in Anbetracht der begrenzten Passagefähigkeit und des charakteristischen Erscheinungsbildes um eine bestrahlungsinduziert-selektierte, seneszente MSC-Subpopulation mit eingeschränktem klonogenen Potenzial (Alessio et al., 2015). Andere Arbeitsgruppen beschrieben neben der eingeschränkten klonalen Expansion ein erhaltenes Differenzierungspotenzial der überlebenden Klone (Fekete et al., 2015). Da unser Differenzierungsassay (DA) ein Wachstum der Zellen über 2 bis 3 Wochen voraussetzt, war eine Untersuchung der IORT-überlebenden MSC hinsichtlich ihres

Differenzierungspotenziales nicht möglich, sodass diesbezüglich keine Aussage getroffen werden kann.

Unsere Daten erweitern das Konzept der Schädigung residualer maligner Zellen im Tumorbett durch die IORT (Vaidya et al., 2014) um Befunde eines zusätzlichen Einflusses auf MSC.

Das Ergebnis einer deutlich geringeren Erfolgsrate der MSC-Isolation aus den Biopsien der Kontrollgruppe gegenüber der vor der IORT entnommenen Biopsien des Studienkollektives ist in seiner Interpretation nicht eindeutig. Möglich wäre eine bindegewebsreichere Zusammensetzung der Proben der Kontrollgruppe, der die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen MSC-Isolation verringert. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich um einen Selektions-Bias handelt, im Sinne einer höheren Zuordnungswahrscheinlichkeit zur Kontrollgruppe bei kleinerer Brustgröße, da ein zu geringer Haut-Applikator-Abstand bei der IORT als Kontraindikation gewertet wird (Tuschy et al., 2013). Diese Mammae zeigen einen höheren Anteil an Bindegewebe und einen geringeren Anteil an Fettgewebe im Vergleich zu größeren Mammae.

Weiterhin kann die zur intraoperativen Blutstillung durchgeführte Thermokoagulation die Zahl vitaler MSC negativ beeinflussen. Hier fand sich jedoch im Gruppenvergleich kein Unterschied der Häufigkeit angewandter Thermokoagulation.

Mehrere Studien konstatieren, dass ein inflammatorisches Milieu die MSC-Differenzierung beeinflusst, wobei speziell der durch die MSC mitregulierten Makrophagen-Polarisation eine essenzielle Funktion zukommt (Gong et al., 2016; Luz-Crawford et al., 2017; Zhang et al., 2017). So werden beispielsweise in Kokultur mit anti-inflammatorisch wirkenden M2-Makrophagen gehaltene MSC vermehrt zur osteogenen Differenzierung stimuliert (Zhang et al., 2017). In unseren Analysen fanden wir in den Proben des Kontrollkollektivs – alleinig durch die im Rahmen der SNB entstehenden 30-minütigen Wartezeit – zwischen den pre- und post-Probenentnahmen in letzteren ein eingeschränktes Differenzierungspotential sowohl zu Fett- als auch zu Knochengewebe, allerdings ohne negative Beeinflussung der klonogenen Kapazität der MSC. Wir interpretieren diese Befunde als Einfluss der durch das chirurgische Trauma bedingten pro-inflammatorischen Konditionierung des lokalen Milieus auf das Differenzierungspotential der MSC. Diese Schlussfolgerung widerspricht nicht den genannten Erkenntnissen zum MSC-Differenzierungsverhalten in Abhängigkeit des lokalen Inflammationsstatus. Wie oben beschrieben, konnten wir keine Daten hinsichtlich des zusätzlichen Einflusses der IORT auf die Differenzierungsfähigkeit der MSC erheben.

5.1.2 Einfluss auf zelluläre Komponenten der WF

Initial stellten wir die Hypothese auf, dass die IORT lokale immunologische Prozesse beeinflusst, sodass unterschiedliche Immunzellen angelockt werden. Wir konnten jedoch für keine der untersuchten Zellpopulationen myeloischen und lymphatischen Ursprunges einen Unterschied in der Zellzahl, der Aktivität sowie im Apoptoseverhalten in der WF nachweisen. Dies entsprach nicht den bisher veröffentlichten Daten, die über diverse Mechanismen einen verstärkenden Einfluss der Radiatio auf die lokale Immunantwort des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems beschreiben, u. a. durch eine Infiltration von Entzündungszellen (de la Cruz-Merino et al., 2014; Demaria and Formenti, 2007; Shiao and Coussens, 2010).

Eine Erklärung für die diskrepanten Daten könnte mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme zusammenhängen. Während in unserer Studie die WF sowie die peripheren Blutproben nach 24 Stunden analysiert wurden, wurden in den vorausgegangenen Studien Veränderungen nach 7 Tagen beobachtet (Lugade et al., 2008). Möglicherweise hätte also eine Analyse zu einem späteren Zeitpunkt Unterschiede aufzeigen können.

Die zeitliche Abfolge physikalischer Ereignisse ist entscheidend für die immunvermittelte Effektivität einer Radiotherapie. Wie in Kapitel 1.3.3.1 ausgeführt spielt für die Formation einer effektiven lokalen Immunantwort der Aufbau eines vom Tumorbett ausgehenden Gradienten bestimmter Zytokine wie beispielsweise CXCL16 eine wichtige Rolle. Dadurch werden in den regionalen Lymphknoten aktivierte T-Effektorzellen rekrutiert, die eine verstärkte lokale Immunantwort bewirken (Matsumura and Demaria, 2010). Leider ist nicht bekannt, in welcher Zeitspanne sich der genannte Gradient entwickelt und wie lange es dauert, bis er eine verstärkte Infiltration genannter Effektorzellen in das Tumorbett bewirkt. In einer Arbeit von Lugade et al. führte eine Einzelbestrahlung mit 15 Gy bei Mäusen mit B16-Melanom im Vergleich zu einer fraktionierten Radiatio mit 5×3 Gy zu einer verstärkten Infiltration des Tumors mit T-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und einer CD8⁺/CD3⁻ Zellpopulation, welche als NK-Zellpopulation gedeutet werden kann. Diese Differenz war allerdings erst sieben Tage nach der Bestrahlung zu detektieren (Lugade et al., 2008). Um die Einwanderung diverser Immunzelltypen genauer zu untersuchen, wäre es interessant, verschiedene Untersuchungsintervalle in zukünftigen Studien aufzusetzen; z. B. auf 6 bis 8, 12, 24 Stunden, sowie auf mehrere Tage postoperativ. Dies scheint jedoch logistisch sehr aufwendig, da die Patientinnen in der Regel am zweiten

oder dritten postoperativen Tag bereits entlassen werden. In diesem Setting könnten nur Analysen des peripheren Blutes Aufschluss bieten.

Eine Limitation unserer Studie ist, dass für eine optimale Identifikation der NK-Zellen die Abwesenheit von CD3 auf deren Oberfläche relevant gewesen wäre. Aufgrund der technischen Gegebenheit konnte anti-CD3 dem myeloiden Panel jedoch nicht zugegeben werden. Anti-CD3 wurde ausschließlich in unserem lymphoiden Panel verwendet. Folglich erlaubt die alleinige Charakterisierung mittels Positivität für CD45, CD16 und CD64 (ggf. in Kombination mit Negativität für CD56) nicht die letztendliche Differenzierung zwischen neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen. Da jedoch in keinem Falle eine signifikante Änderung der Zusammensetzung zu beobachten war, ist diese Limitation möglicherweise nicht bedeutend. In zukünftigen Untersuchungen sollte CD3 jedoch zur eindeutigen Identifizierung von NK-Zellen verwendet werden.

5.1.3 Einfluss der WF auf zelluläre Funktionen

Unsere Daten zeigen, dass der Zusatz unbestrahlter WF die Proliferation, die Wundheilung sowie die Migration unbestrahlter MSC fördert. Die Effekte von IORT-WF sind signifikant geringer.

Wir beobachteten, dass die wachstumsfördernden Eigenschaften der WF weitestgehend jenen von Serum entsprechen. Dies erscheint insofern plausibel, als dass sich unmittelbar postoperativ Blut, Lymphe und Fibrin in der Wundhöhle ansammelt, wie es für die Exsudativphase im Rahmen der Wundheilung typisch ist. Es liegt nahe, dass sich diese proliferationsfördernden Komponenten in der WF wiederfinden. Der dem Wachstum und natürlicher Funktionen der MSC zuträgliche Effekt von WF wurde auch in anderen Forschungsarbeiten beobachtet: Cerny et al. zeigten, dass WF, gewonnen aus okkludierenden Verbänden nach Fingerverletzungen, die Proliferation sowie das Migrationsverhalten von MSC stärker fördert als die Blutseren der entsprechenden Probanden (Cerny et al., 2018). Weiterhin wurde beschrieben, dass das Sekret akuter Wunden die Proliferation fettgewebsassoziiierter Stromazellen steigert, während das Sekret chronischer Wunden das Wachstum und die Funktion der ASC hemmt (Koenen et al., 2015). Unsere Erkenntnisse hinsichtlich der Wirkung unbestrahlter WF auf das Verhalten von MSC stimmt mit den oben genannten Beobachtungen überein.

Wir konnten erstmals zeigen, dass eine IORT den positiven Effekt der WF auf die Proliferation, die Wundheilung und die Migration von MSC reduziert. Da diesbezüglich

noch keine experimentellen Arbeiten durchgeführt wurden, ist es sinnvoll die Beobachtung vor dem Hintergrund der klinischen Evidenz zu evaluieren. Die IORT ist tendenziell mit einem gewissen Anteil postoperativ auftretender Wundheilungsstörungen assoziiert. Diese sind tolerabel, aufgrund des geringen Risikos und in Anbetracht des relativen Nutzens hinsichtlich der Reduktion der lokalen Tumorrezidivrate (Jacobs et al., 2018; Kraus-Tiefenbacher et al., 2006a). Angesichts der unter Kapitel 1.3.1.2 erläuterten Funktionen der MSC im Rahmen der Geweberegeneration erscheint es schlüssig, dass ihre Proliferation und Funktion in einem Milieu der verzögerten Wundheilung eingeschränkt sind. In Zusammenhang mit der zuvor zitierten Arbeit von Koenen et al. könnte diese unerwünschte Wirkung auch als Induktion einer gewissen Chronifizierung der Wundheilung betrachtet werden, welche in einer Modifikation lokaler Prozesse durch die lokal applizierte Bestrahlung begründet ist. Der Einfluss unterschiedlicher Verdünnungen der WF auf die Verläufe der MSC-Proliferationskurven (siehe Diagramme 4.7 und 4.8) ist u. a. mit dem Vorliegen unterschiedlicher Konzentrationen an Wachstumsfaktoren zu erklären. Da IORT-WF durch die stattgefundenene Bestrahlung nachweislich um diverse Zytokine und Wachstumsfaktoren reduziert ist, zeigen die entsprechenden Kurvenverläufe gehemmtes oder verlangsamtes Wachstum.

Neben der direkten Wirkung des durch IORT alterierten Zytokinprofils in der WF auf funktionelle Eigenschaften der MSC kommen jedoch noch weitere, indirekt herbeigeführte Einflüsse in Betracht. In Bezug auf die Wachstumskurve der MSC unter Einfluss von 0,5 % WF im Medium (siehe Diagramm 4.7) fällt auf, dass die Kurven der beiden Kollektive erst ab einem Zeitpunkt von ca. 34 Stunden nach WF-Zugabe ins Medium einen getrennten Verlauf einschlagen. Zu diesem Zeitpunkt wird sich vermutlich die Zusammensetzung des Kulturmediums so verändern, dass das Wachstum von MSC mit unbestrahlter anstatt bestrahlter WF behandelt stärker vorangetrieben wird. Dabei kommt einerseits die Möglichkeit in Betracht, dass ein wachstumsfördernder Faktor gebildet wird, und zwar in den Ansätzen der Kontrollgruppe in stärkerer Ausprägung als in jenen der IORT-Gruppe. Andererseits, dass die Wirkung eines Inhibitors in den Versuchsansätzen der mit Kontroll-WF behandelten Zellen wegfällt, während er in den mit IORT-WF behandelten MSC weiterhin agiert.

Entgegen unserer Erwartungen zeigten mit IORT-WF behandelte MDA-MB 231-Kulturen keine eingeschränkten Zellfunktionen. Möglicherweise sind diese Tumorzellen bereits so unabhängig gegenüber extrinsisch zugeführten Faktoren, dass sich Effekte nicht mehr beobachten lassen. Dies berücksichtigend, haben wir die Tumorzellen bereits extra für 24

Stunden in serumfreiem Medium kultiviert, ohne jedoch eine erhöhte Suszeptibilität generieren zu können. Darüber hinaus haben Belletti et al. evaluiert, dass das Wachstum der Brustkrebszellen entscheidend vom Trägermaterial abhängig ist und erst eine dreidimensionale Zellkultivierung zu signifikanten Unterschieden führt, was den Einfluss der IORT-WF auf Proliferation, Migrations- und Invasionsverhalten angeht (Anderson et al., 2006; Belletti et al., 2008; Debnath and Brugge, 2005). Es wäre also denkbar, zukünftige Experimente entweder mit 3D-kultivierten Zelllinien oder primär isolierten primären Tumorzellen zu rekapitulieren.

5.2 Einfluss einer IORT auf das lokale Zytokinprofil

Auf Basis der unterschiedlichen Effekte der WF auf das MSC-Verhalten, gingen wir davon aus, dass die Zusammensetzung an Wachstumsfaktoren verändert sein müsste. In der Tat waren drei der 80 im Zytokin-Array getesteten Faktoren nach einer IORT signifikant verändert: zum einen Oncostatin-M in erniedrigter Konzentration, zum anderen Leptin und IL-1 β in erhöhter Konzentration in IORT-WF.

Wenige Arbeiten haben sich bislang mit dem Einfluss einer IORT auf die proteomischen Charakteristika der WF beschäftigt. Lediglich Belletti et al. führten eine umfangreiche Analyse der durch eine IORT veränderten Zytokinkonzentrationen. Belletti et al. führten eine umfangreiche Analyse der durch eine IORT veränderten Zytokinkonzentrationen (HGF, IL-10, IL-13, IL-5, IL-1 β) im lokalen Milieu durch. Die Konzentration von IL-10 verringerte sich, jene von IL-13 erhöhte sich signifikant (Belletti et al., 2008). Eine weitere Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit der Frage, ob eine IORT in veränderten Konzentrationen des Zytokins TGF- β 1 in der WF assoziiert ist, welches das Auftreten von Ödemen sowie radioinduzierter Fibrose bedingen könnte. Hinsichtlich der Konzentration von TGF- β 1 in der WF bestrahlter Patientinnen konnte keine IORT-bedingte Veränderung festgestellt werden (Scherer et al., 2016). Die Stärke unserer Arbeit ist folglich darin zu sehen, dass wir ein breites Spektrum komplett individualisiert untersuchter Zytokine nach IORT analysiert haben. Besonders hervorzuheben ist die statistische Genauigkeit der Daten, erworben durch die separate Analyse einzelner Patientinnenproben, Mehrfachbestimmungen sowie die vollständige Angabe relevanter statistischer Parameter. Unsere Ergebnisse zeigen, dass im zeitlichen Zusammenhang zu einer IORT im Rahmen einer BET des Mammakarzinoms die Spiegel einiger Zytokine in der WF modifiziert werden. Für die Faktoren und Zytokine, deren Konzentration durch eine IORT als verändert nachgewiesen werden konnte, sind verschiedene Funktionen im Rahmen der Onkogenese bekannt.

- ***Oncostatin-M***

Unsere Daten zeigen, dass das Zytokin Oncostatin-M durch eine IORT in der WF intraoperativ bestrahlter Patientinnen in verminderter Konzentration vorliegt. Oncostatin-M wird hauptsächlich in der stromal-vaskulären Fraktion des Fettgewebes produziert. Seine parakrine Sekretion durch Makrophagen und tumorassoziiertes Fettgewebe konnte als relevanter Faktor der Brustkrebsprogression identifiziert werden. Eine selektive Hemmung von

Oncostatin-M resultierte in einer verminderten peritumoralen Angiogenese sowie einer Inhibition des STAT3-Signalweges (Lapeire et al., 2014). In einer weiteren Untersuchung unterdrückte rekombinantes Oncostatin-M die Expression des Östrogenrezeptors α (ER α) der zwei östrogenrezeptorpositiven Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D hochwirksam und dosisabhängig (West et al., 2012). Dadurch fällt der Hormonrezeptor als ein wichtiges Target für die antihormonelle Therapie des Mammakarzinoms weg, was die Gesamtprognose entscheidend verschlechtern kann. Zum schlechteren Outcome trägt Oncostatin-M ebenso über eine Erhöhung des metastatischen Potenzials und der Invasivität bei. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es eine Lösung von Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakten bei Brustkrebszellen fördert (Holzer et al., 2004). Darüber hinaus wirkt es synergistisch zu den MSC, indem es einen externen Stimulus für die epithelial-mesenchymale Transition darstellt und als Induktor für Krebsstammzellen agieren kann (Junk et al., 2017; West et al., 2014). Schlussfolgernd kann das Zytokin Oncostatin-M als prognoseverschlechternder Faktor erachtet werden. Dass die Konzentration in der WF von Patientinnen nach IORT signifikant reduziert ist, erscheint vor dem Hintergrund der hohen Effektivität einer IORT hinsichtlich der Verbesserung des Lokalrezidivrisikos als mindestens stimmig und stützt die Hypothese einer positiven Wirkung der IORT über die Modifikation lokaler immunologischer Faktoren.

- ***Leptin***

Das Signalmolekül Leptin wird hauptsächlich in Adipozyten gebildet, zu geringem Anteil auch in anderen Organen wie z. B. der Skelettmuskulatur, dem Knochenmark oder der Hypophyse. Neben seiner allgemein zugeschriebenen Wirkung als „Antihungerhormon“ konnten zusätzliche Funktionen in der Beeinflussung der Hämatopoese, Thermogenese, Reproduktion und Angiogenese aufgezeigt werden. Als Zytokin aus der Gruppe der Adipokine vermittelt es eine geringe proinflammatorische Wirkung und moduliert die angeborene und erworbene Immunantwort, sodass es als Bindeglied zwischen Stoffwechsel und Immunsystem verstanden werden kann (La Cava, 2017; Procaccini et al., 2012).

In einer Übersichtsarbeit thematisieren Grossmann et al. die Funktion des Leptins als Mediator in der positiven Korrelation zwischen Fettleibigkeit und einem erhöhtem Brustkrebsrisiko, einer beschleunigten Tumorprogression sowie einer

schlechteren Gesamtprognose (Grossmann et al., 2010). Insgesamt beschreiben die Autoren die Rolle unterschiedlich hoher Serum-Leptinspiegel in der Pathogenese des Mammakarzinoms als komplex. In einigen Studien bei Brustkrebs-Patientinnen zeigte es sich erhöht, in anderen hingegen unverändert oder gar erniedrigt, wobei in diesen Untersuchungen auch die Faktoren Menopausenstatus und Krankheitsstadium einen Einfluss auf die gemessenen Leptin-Konzentrationen hatten (Hancke et al., 2010; Stattin et al., 2004; Woo et al., 2006; Wu et al., 2009). Es ist zusätzlich wahrscheinlich, dass Leptin nach einer Radiatio mit Desintegration auch aus Adipozyten freigesetzt wird. Dies wurde im Rahmen interstitieller Brachytherapien mit einer im Vergleich zu einer externen Radiatio inhomogeneren Strahlendosisverteilung beobachtet (Sauer et al., 2006) Zusätzlich scheint der Serumspiegel des Leptin-Rezeptors in Kombination mit jenen von Östrogen, Insulin und IGF-1 in der durch Adipositas geförderten Krebsentstehung eine Rolle zu spielen (Garofalo et al., 2006; Miyoshi et al., 2006).

Unsere Beobachtung, dass Leptin nach einer IORT in erhöhter Konzentration in der WF vorliegt, lässt sich somit vor dem Hintergrund bestehender Literatur nicht klar einordnen. Unsere Ergebnisse liefern hinsichtlich eines potenziellen Wirkmechanismus auf die Effektivität der Bestrahlung eine weiter zu verfolgende Forschungsgrundlage.

- ***IL-1 β***

Ebenso unspezifisch zeigt sich die Rolle des Zytokins IL-1 β innerhalb der Pathogenese des Mammakarzinoms, das in der WF im Gruppenvergleich nach IORT ebenfalls in erhöhter Konzentration nachweisbar war. Die Anzahl publizierter Arbeiten zu diesem Thema ist überschaubar. Eine aktuelle Übersichtsarbeit schreibt dem im Rahmen von Entzündungsprozessen ubiquitär vorkommenden Zytokin eine Triggerfunktion für die Entstehung ossärer Metastasen zu (Tulotta and Ottewell, 2018), während andere Arbeiten dessen Vorkommen im Zusammenhang mit einem verbesserten Gesamtüberleben sehen, da IL-1 β die Kolonisation metastaseninduzierender Tumorzellen hemmen kann (Castano et al., 2018).

Dass eine Bestrahlung die Induktion lokaler entzündlicher Prozesse bewirkt, ist allgemein bekannt. Insofern erscheint es plausibel, dass wir erhöhte Spiegel eines pro-inflammatorischen Zytokins wie IL-1 β gemessen haben. Wie in Kapitel 1.3.3.1 dargelegt, wird durch eine Radiatio die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine

induziert. Diese fungieren als Stresssignal und aktivieren das lokale Immunsystem (Skoberne et al., 2004). Dieser Effekt kann einen Beitrag zu dem lokalen Effekt der IORT leisten.

Die charakteristischen Kurvenverläufe der MSC-Proliferations-Assays veranlassten uns dazu, die konditionierten Medien ebenfalls auf vorliegende Zytokine zu testen, um eine Information über eine eventuelle Alteration des Sekretoms der untersuchten MSC zu gewinnen. Die hier unter Wirkung von IORT-WF in veränderter Konzentration vorliegenden Zytokine haben interessanterweise entscheidenden Einfluss auf die Prozesse der Tumorentstehung, -progression und Metastasierung im Rahmen einer Brustkrebskrankung.

- **RANTES**

Das Chemokin RANTES (*Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted*, auch CCL5) wird von MSC sezerniert (Zimmerlin et al., 2013), kann jedoch auch von zytotoxischen T-Zellen sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten produziert werden. Neben seiner Funktion der Chemotaxis von NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten wurde seine der Fortschreitung von Brustkrebsleiden zuträgliche Rolle durch direkten Einfluss auf Tumorzellen in mehreren experimentellen Studien und Übersichtsarbeiten thematisiert (Khalid et al., 2015). Eine weitere Publikation belegt jedoch auch, dass RANTES eine tragende Rolle in der Interaktion der MSC mit dem Tumorstroma spielt und dadurch den Mechanismus der Metastasierung eines Brustkrebsleidens in bedeutendem Maße unterstützen kann. Eine subkutan injizierte Mischung aus MSC und Brustkrebszellen niedrigen Metastasierungspotenzials bildete ein Xenotransplantat eines Tumors mit entschieden höherer Fähigkeit, Metastasen zu bilden. Ein grundlegender Mechanismus ist hierbei die Stimulation der MSC durch die Tumorzellen zur Bildung von RANTES, das parakrin die Motilität und Invasion der Krebszellen fördert und deren metastatisches Potenzial erhöht (Karnoub et al., 2007).

- **VEGF**

Die Gruppe der VEGF-Signalmoleküle sind wichtige Mediatoren in den Prozessen der Angiogenese und Vaskularisation, welche für die Fortschreitung einer Tumorerkrankung essenziell sind. In der Therapie diverser Tumorentitäten, wie

z. B. jener des Ovarialkarzinoms oder des kolorektalen Karzinoms, werden gegen VEGF gerichtete Antikörper als sogenannte „*targeted therapy*“ eingesetzt, um den Signalweg der Gefäßneubildung gezielt zu inhibieren und das Tumorwachstum damit einzuschränken. Auch MSC sind dafür bekannt, VEGF in erster Linie bei Wundheilungsvorgängen zu produzieren (Zimmerlin et al., 2013).

▪ ***GRO α***

Ebenso unter Einwirkung der IORT-WF vermindert ist die Sekretion von *GRO α* (auch CXCL1) aus MSC. Es wird in erster Linie von Makrophagen, Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten gebildet. Neben einem chemotaktischen Effekt hat dieser Faktor auch Wirkungen auf die Angiogenese und Wundheilung, die die Krebsentstehung und -progression fördern können (Devalaraja et al., 2000; Haghnegahdar et al., 2000). Bezüglich einer Interaktion dieses Zytokins mit MSC wurden bislang keine Erkenntnisse publiziert. Eine *in-vitro*-Analyse von Bhat et al. hinsichtlich des Einflusses von *GRO α* in tripel-negativen Brustzelllinien (TNBC) zeigte jedoch, dass eine Überexpression des Faktors in mehr als der Hälfte der 17 untersuchten TNBC-Linien nachzuweisen war. Eine Stimulation mit dem Faktor erhöhte das Migrationsverhalten sowie die Invasivität, ein *GRO α* -Knockdown verminderte es in verschiedenen TNBC-Zelllinien. Zudem konnte ein Unterschied im Phänotyp der Zellen sowie eine entsprechende Veränderung von Markern der EMT nachgewiesen werden (Bhat et al., 2017).

Im Anbetracht dieser Beobachtungen und Hintergründe scheint die IORT nicht nur die unter Kapitel 5.1.1 beschriebene Wirkung eines unmittelbar radiotoxischen Einflusses auf MSC im Tumorbett zu haben. Indirekt verändert sie immunologisch das Mikromilieu, was zu einem veränderten Zytokinprofil in der WF führt, das deren fördernden Einfluss auf das Wachstum, die Wundheilung und das Migrationsverhalten unbestrahlter MSC einschränken kann. Neben der Konzentrationserhöhung der Zytokine IL-1 β und VEGF bietet besonders die Erniedrigung von Oncostatin-M, dessen übermäßige Präsenz mit einer Prognoseverschlechterung einer Brustkrebserkrankung assoziiert ist, eine plausible Erklärung für die lokal modulierende Wirkung einer IORT. Dieser Aspekt ist v. a. für jene MSC von Relevanz, welche erst nach der chirurgischen Intervention im Rahmen von Wundheilungsvorgängen ins Tumorbett rekrutiert wurden und damit nicht von der IORT betroffen waren, wodurch deren Funktion durch das alterierte Mikromilieu beeinflusst wird. Der Einfluss einer IORT macht sich auch in einer Modifikation des Sekretoms unbestrahlter MSC bemerkbar, sodass unter Einfluss bestrahlter WF als Repräsentant des lokalen Milieus signifikant geringere Konzentrationen der Faktoren RANTES, VEGF und GRO α in den konditionierten Medien nachgewiesen werden können. Wie obenstehend dargelegt nehmen diese Faktoren entscheidende Funktionen im Rahmen der Krebsentstehung und -fortschreitung ein. Ihre Reduktion mittels IORT stellt einen weiteren Mosaikstein in der Klärung der Wirkungsweise und der daraus resultierenden Effektivität dieser Behandlung dar.

Darüber hinaus legen unsere Erkenntnisse den Grundstein für weiterführende Forschung zum Einfluss einer IORT auf das lokale Immunsystem. So kann in Zukunft die Entwicklung und Optimierung der *Live Cell Imaging*-Experimente mit Brustkrebszellen angestrebt werden. Die Etablierung eines entsprechenden Versuchsprotokolls für den Einsatz einer *Live Cell Imaging*-Analyse in dreidimensionalen Kulturen birgt die Aussicht, bereits genannte, publizierte Daten nachzuvollziehen. Vielmehr bietet sie auch die Möglichkeit, das in dieser Arbeit erlangte Wissen tiefergehender zu untersuchen, um die Funktion von MSC als Bindeglied zwischen Tumorstroma und lokalem Immunsystem noch genauer darzulegen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund:

Für die Effektivität der zunehmend eingesetzten intraoperativen Radiotherapie (IORT) wird neben der bekannten radiobiologischen Wirkung eine Alteration des lokalen Milieus der bestrahlten Wundhöhle vermutet. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ihren Einfluss auf die zelluläre und humorale Komponente des lokalen Immunsystems im Tumorbett zu untersuchen.

Patientinnen und Methoden:

Eingeschlossen wurden 42 Brustkrebs-Patientinnen nach brusterhaltender Therapie. 21 Patientinnen erfuhren eine IORT (IORT-Gruppe), 21 blieben intraoperativ unbestrahlt (Kontrollgruppe). Bei den Patientinnen beider Gruppen wurden intraoperativ 2 Gewebeproben des Tumorbetts zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, um MSC zu isolieren und diese mittels FACS und eines qualitativen Differenzierungsassays zu charakterisieren. In der IORT-Gruppe erfolgten die Biopsien vor und nach der IORT, wohingegen im Kontrollkollektiv eine vergleichbare Latenzzeit durch die in der Zwischenzeit durchgeführte Sentinel-Lymphonodektomie (SNB) eingehalten wurde. Zusätzlich wurde Wundflüssigkeit (WF) beider Gruppen über 24 Stunden postoperativ aus Redon-Drainagen gesammelt und einer durchflusszytometrischen und Multiplex-Zytokin-Analyse sowie ELISA unterzogen. Die WF beider Gruppen wurde als Medienzusatz in Kulturen der Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 sowie unbestrahlter MSC verwendet, um den Einfluss auf Proliferation, Wundheilung und Migration mittels Live-Cell Imaging zu untersuchen. Die konditionierten Medien des Proliferationsassays der MSC wurden asserviert, um Konzentrationen bestimmter Zytokine mittels ELISA zu ermitteln. Es erfolgte die statistische Auswertung mittels MANOVA-Analysen sowie doppelseitigen t-Tests.

Ergebnisse:

Nach IORT-Anwendung waren lediglich aus einer von 20 Gewebeproben MSC isolierbar, während die Isolationsrate aus unbestrahlten Tumorbett-Biopsien wesentlich höher lag (95 % bei pre-IORT-Biopsien sowie im Kontrollkollektiv 57 % bzw. 66 % vor bzw. nach einer äquivalenten Latenzphase). Die durchflusszytometrische Analyse der postoperativ

gewonnenen WF zeigte für keine der analysierten leukozytären Subpopulationen der myeloischen und lymphoiden Reihe einen gruppenassoziierten, signifikanten Unterschied hinsichtlich Zellzahl, Aktivierungszustand oder Vitalität. Die Zytokin-Analyse der WF beider Gruppen ergab signifikant unterschiedliche Zytokinspiegel für Oncostatin-M ($p = 0,04$), Leptin ($p = 0,02$) und IL-1 β ($p = 0,04$). Als Zusatz in Kulturmedien unbestrahlter MSC bewirkte die WF der bestrahlten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Einschränkung der Proliferation ($p < 0,0001$), der Wundheilungsfähigkeit ($p = 0,01$) und des Migrationsverhaltens ($p = 0,02$). Die aus den Proliferations-Assays gewonnenen konditionierten Kulturmedien wiesen gruppenbezogen signifikant unterschiedliche Konzentrationen der Zytokine GRO α ($p < 0,01$), RANTES ($p < 0,01$) und VEGF ($p = 0,03$) auf, was eine Modifikation des Sekretoms der MSC unter der WF intraoperativ bestrahlter Patientinnen indiziert. Unter Zusatz der WF in Kulturmedien der Brustkrebszelllinie MDA MB-231 zeigte sich im Vergleich beider Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Proliferation, der Wundheilung und im Migrationsverhalten der Zellen.

Schlussfolgerung

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine IORT Faktoren des lokalen Immunsystems im Tumorbett beeinflusst. Einerseits scheint das Wachstum der MSC sowohl durch eine direkt radiotoxische Wirkung als auch durch die Konditionierung des Mikromilieus im Sinne einer Alteration des Zytokinprofils negativ beeinflusst zu werden. Auch das Sekretom der MSC scheint durch den Einfluss der Bestrahlung auf das lokale Milieu modifiziert zu werden. Zusammengefasst unterstreichen unsere Daten, dass eine IORT zu einer Veränderung des Tumorbettes führt und so möglicherweise zur Generierung eines für die Entstehung von Lokalrezidiven weniger vorteilhaften Milieus beiträgt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abramovitch, R., Marikovsky, M., Meir, G., and Neeman, M. (1999). Stimulation of tumour growth by wound-derived growth factors. *British journal of cancer* 79, 1392-1398.

AGO, A.G.O. (2018): Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs - Brustkrebsrisiko und Prävention. Online: https://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/2018-03/AGO_2018_PDF_Deutsch/2018D%2002_Brustkrebsrisiko%20und%20Praevention.pdf, Stand: 11.02.2020

Alessio, N., Del Gaudio, S., Capasso, S., Di Bernardo, G., Cappabianca, S., Cipollaro, M., Peluso, G., and Galderisi, U. (2015). Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process. *Oncotarget* 6, 8155-8166.

Anderson, A.R., Weaver, A.M., Cummings, P.T., and Quaranta, V. (2006). Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell* 127, 905-915.

Antonini, N., Jones, H., Horiot, J.C., Poortmans, P., Struikmans, H., Van den Bogaert, W., Barillot, I., Fourquet, A., Jager, J., Hoogenraad, W., *et al.* (2007). Effect of age and radiation dose on local control after breast conserving treatment: EORTC trial 22881-10882. *Radiother Oncol* 82, 265-271.

AWMF, A.d.W.M.F. (2018): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Online: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0450Lk_S3_Mammakarzinom_2018-09.pdf, Stand: 11.02.2020

Barnes, B., Kraywinkel, K., Nowossadeck, E., Schönfeld, I., Starker, A., Wienecke, A., and Wolf, U. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 (Robert Koch-Institut).

Bartelink, H., Maingon, P., Poortmans, P., Weltens, C., Fourquet, A., Jager, J., Schinagl, D., Oei, B., Rodenhuis, C., Horiot, J.C., *et al.* (2015). Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 16, 47-56.

Baum, M., Demicheli, R., Hrushesky, W., and Retsky, M. (2005). Does surgery unfavourably perturb the "natural history" of early breast cancer by accelerating the appearance of distant metastases? *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 41, 508-515.

Belletti, B., Vaidya, J.S., D'Andrea, S., Entschladen, F., Roncadin, M., Lovat, F., Berton, S., Perin, T., Candiani, E., Reccanello, S., *et al.* (2008). Targeted intraoperative radiotherapy impairs the stimulation of breast cancer cell proliferation and invasion caused by surgical wounding. *Clin Cancer Res* 14, 1325-1332.

Bhat, K., Sarkissyan, M., Wu, Y., and Vadgama, J.V. (2017). GROalpha overexpression drives cell migration and invasion in triple negative breast cancer cells. *Oncology reports* 38, 21-30.

- Bieback, K., Ha, V.A., Hecker, A., Grassl, M., Kinzebach, S., Solz, H., Sticht, C., Kluter, H., and Bugert, P. (2010). Altered gene expression in human adipose stem cells cultured with fetal bovine serum compared to human supplements. *Tissue engineering Part A* *16*, 3467-3484.
- Bieback, K., Hecker, A., Kocaomer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., and Kluter, H. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem cells (Dayton, Ohio)* *27*, 2331-2341.
- Bieback, K., Hecker, A., Schlechter, T., Hofmann, I., Brousos, N., Redmer, T., Besser, D., Kluter, H., Muller, A.M., and Becker, M. (2012). Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy* *14*, 570-583.
- Blank, E., Kraus-Tiefenbacher, U., Welzel, G., Keller, A., Bohrer, M., Sutterlin, M., and Wenz, F. (2010). Single-center long-term follow-up after intraoperative radiotherapy as a boost during breast-conserving surgery using low-kilovoltage x-rays. *Ann Surg Oncol* *17 Suppl 3*, 352-358.
- Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M.A., Fraga, M.F., Esteller, M., and Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of cell science* *116*, 499-511.
- Bourin, P., Bunnell, B.A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A.J., March, K.L., Redl, H., Rubin, J.P., Yoshimura, K., and 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* *15*, 641-648.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* *68*, 394-424.
- Burnouf, T., Goubran, H.A., Chou, M.L., Devos, D., and Radosevic, M. (2014). Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev* *28*, 155-166.
- Carpentier, G., and Henault, E. (2010). Proceedings of the ImageJ User and Developer Conference - Protein Array Analyzer for ImageJ.
- Castano, Z., San Juan, B.P., Spiegel, A., Pant, A., DeCristo, M.J., Laszewski, T., Ubellacker, J.M., Janssen, S.R., Dongre, A., Reinhardt, F., *et al.* (2018). IL-1beta inflammatory response driven by primary breast cancer prevents metastasis-initiating cell colonization. *Nat Cell Biol* *20*, 1084-1097.
- Ceelen, W., Pattyn, P., and Mareel, M. (2014). Surgery, wound healing, and metastasis: recent insights and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol* *89*, 16-26.
- Ceelen, W.P., Morris, S., Paraskeva, P., and Pattyn, P. (2007). Surgical trauma, minimal residual disease and locoregional cancer recurrence. *Cancer Treat Res* *134*, 51-69.

- Cerny, M.K., Hopfner, U., Kirsch, M., Haas, E.M., Wu, F., Giunta, R., Machens, H.G., Duscher, D., Erne, H., and Schilling, A.F. (2018). Occlusive dressing-induced secretomes influence the migration and proliferation of mesenchymal stem cells and fibroblasts differently. *European journal of medical research* 23, 60.
- Chakraborty, M., Abrams, S.I., Coleman, C.N., Camphausen, K., Schlom, J., and Hodge, J.W. (2004). External beam radiation of tumors alters phenotype of tumor cells to render them susceptible to vaccine-mediated T-cell killing. *Cancer Res* 64, 4328-4337.
- Chang, A.I., Schwertschkow, A.H., Nolta, J.A., and Wu, J. (2015). Involvement of mesenchymal stem cells in cancer progression and metastases. *Curr Cancer Drug Targets* 15, 88-98.
- Chapel, A., Francois, S., Douay, L., Benderitter, M., and Voswinkel, J. (2013). New insights for pelvic radiation disease treatment: Multipotent stromal cell is a promise mainstay treatment for the restoration of abdominopelvic severe chronic damages induced by radiotherapy. *World J Stem Cells* 5, 106-111.
- Chen, J.J., Lin, Y.C., Yao, P.L., Yuan, A., Chen, H.Y., Shun, C.T., Tsai, M.F., Chen, C.H., and Yang, P.C. (2005). Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol* 23, 953-964.
- Chen, M.F., Lin, C.T., Chen, W.C., Yang, C.T., Chen, C.C., Liao, S.K., Liu, J.M., Lu, C.H., and Lee, K.D. (2006). The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66, 244-253.
- Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, V., Godwin, J., Gray, R., Hicks, C., James, S., *et al.* (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 366, 2087-2106.
- Coates, P.J., Rundle, J.K., Lorimore, S.A., and Wright, E.G. (2008). Indirect macrophage responses to ionizing radiation: implications for genotype-dependent bystander signaling. *Cancer Res* 68, 450-456.
- Coffey, J.C., Wang, J.H., Smith, M.J., Bouchier-Hayes, D., Cotter, T.G., and Redmond, H.P. (2003). Excisional surgery for cancer cure: therapy at a cost. *Lancet Oncol* 4, 760-768.
- Coussens, L.M., Zitvogel, L., and Palucka, A.K. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science (New York, NY)* 339, 286-291.
- D'Andrea, F.P., Horsman, M.R., Kassem, M., Overgaard, J., and Safwat, A. (2012). Tumorigenicity and radiation resistance of mesenchymal stem cells. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 51, 669-679.
- Darby, S., McGale, P., Correa, C., Taylor, C., Arriagada, R., Clarke, M., Cutter, D., Davies, C., Ewertz, M., Godwin, J., *et al.* (2011). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 378, 1707-1716.

- de Andrade, A.V., Riewaldt, J., Wehner, R., Schmitz, M., Odendahl, M., Bornhauser, M., and Tonn, T. (2014). Gamma irradiation preserves immunosuppressive potential and inhibits clonogenic capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Journal of cellular and molecular medicine* 18, 1184-1193.
- de la Cruz-Merino, L., Illescas-Vacas, A., Grueso-Lopez, A., Barco-Sanchez, A., and Miguez-Sanchez, C. (2014). Radiation for Awakening the Dormant Immune System, a Promising Challenge to be Explored. *Front Immunol* 5, 102.
- de Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6, 24-37.
- Debnath, J., and Brugge, J.S. (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* 5, 675-688.
- Demaria, S., and Formenti, S.C. (2007). Sensors of ionizing radiation effects on the immunological microenvironment of cancer. *Int J Radiat Biol* 83, 819-825.
- Demaria, S., Ng, B., Devitt, M.L., Babb, J.S., Kawashima, N., Liebes, L., and Formenti, S.C. (2004). Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 862-870.
- Demicheli, R., Valagussa, P., and Bonadonna, G. (2001). Does surgery modify growth kinetics of breast cancer micrometastases? *British journal of cancer* 85, 490-492.
- Devalaraja, R.M., Nanney, L.B., Du, J., Qian, Q., Yu, Y., Devalaraja, M.N., and Richmond, A. (2000). Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol* 115, 234-244.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 3, 991-998.
- EBCTCG, E.B.C.T.C.G. (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365, 1687-1717.
- ECACC, E.C.o.A.C.C.-. (2017). Online: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>, Stand: 11.02.2020
- Fekete, N., Erle, A., Amann, E.M., Furst, D., Rojewski, M.T., Langonne, A., Sensebe, L., Schrezenmeier, H., and Schmidtke-Schrezenmeier, G. (2015). Effect of high-dose irradiation on human bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Tissue engineering Part C, Methods* 21, 112-122.

- Fidler, I.J. (1970). Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *Journal of the National Cancer Institute* 45, 773-782.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-458.
- Formenti, S.C., and Demaria, S. (2008). Local control by radiotherapy: is that all there is? *Breast Cancer Res* 10, 215.
- Formenti, S.C., and Demaria, S. (2009). Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol* 10, 718-726.
- Fyles, A.W., McCready, D.R., Manchul, L.A., Trudeau, M.E., Merante, P., Pintilie, M., Weir, L.M., and Olivotto, I.A. (2004). Tamoxifen with or without breast irradiation in women 50 years of age or older with early breast cancer. *N Engl J Med* 351, 963-970.
- Garofalo, C., Koda, M., Cascio, S., Sulkowska, M., Kanczuga-Koda, L., Golaszewska, J., Russo, A., Sulkowski, S., and Surmacz, E. (2006). Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res* 12, 1447-1453.
- Goldhirsch, A., Winer, E.P., Coates, A.S., Gelber, R.D., Piccart-Gebhart, M., Thurlimann, B., and Senn, H.J. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 24, 2206-2223.
- Gong, L., Zhao, Y., Zhang, Y., and Ruan, Z. (2016). The Macrophage Polarization Regulates MSC Osteoblast Differentiation in vitro. *Annals of clinical and laboratory science* 46, 65-71.
- Goubran, H.A., Burnouf, T., Radosevic, M., and El-Ekiaby, M. (2013). The platelet-cancer loop. *Eur J Intern Med* 24, 393-400.
- Goubran, H.A., Kotb, R.R., Stakiw, J., Emara, M.E., and Burnouf, T. (2014). Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. *Cancer growth and metastasis* 7, 9-18.
- Grisendi, G., Spano, C., Rossignoli, F., N, D.S., Golinelli, G., Fiori, A., Horwitz, E.M., Guarneri, V., Piacentini, F., Paolucci, P., *et al.* (2016). Tumor Stroma Manipulation By MSC. *Current drug targets* 17, 1111-1126.
- Grossmann, M.E., Ray, A., Nkhata, K.J., Malakhov, D.A., Rogozina, O.P., Dogan, S., and Cleary, M.P. (2010). Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes. *Cancer metastasis reviews* 29, 641-653.
- Hagemann, T., Wilson, J., Kulbe, H., Li, N.F., Leinster, D.A., Charles, K., Klemm, F., Pukrop, T., Binder, C., and Balkwill, F.R. (2005). Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J Immunol* 175, 1197-1205.

- Haghnegahdar, H., Du, J., Wang, D., Strieter, R.M., Burdick, M.D., Nanne, L.B., Cardwell, N., Luan, J., Shattuck-Brandt, R., and Richmond, A. (2000). The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J Leukoc Biol* 67, 53-62.
- Hall, B., Andreeff, M., and Marini, F. (2007). The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol*, 263-283.
- Hancke, K., Grubeck, D., Hauser, N., Kreienberg, R., and Weiss, J.M. (2010). Adipocyte fatty acid-binding protein as a novel prognostic factor in obese breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment* 119, 367-367.
- Haveman, J., Rodermond, H., van Bree, C., Wondergem, J., and Franken, N.A. (2007). Residual late radiation damage in mouse stromal tissue assessed by the tumor bed effect. *Journal of radiation research* 48, 107-112.
- Herskind, C., Ma, L., Liu, Q., Zhang, B., Schneider, F., Veldwijk, M.R., and Wenz, F. (2017). Biology of high single doses of IORT: RBE, 5 R's, and other biological aspects. *Radiat Oncol* 12, 24.
- Hofer, S.O., Molema, G., Hermens, R.A., Wanebo, H.J., Reichner, J.S., and Hoekstra, H.J. (1999). The effect of surgical wounding on tumour development. *Eur J Surg Oncol* 25, 231-243.
- Hofer, S.O., Shryer, D., Reichner, J.S., Hoekstra, H.J., and Wanebo, H.J. (1998). Wound-induced tumor progression: a probable role in recurrence after tumor resection. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* 133, 383-389.
- Holzer, R.G., Ryan, R.E., Tommack, M., Schlekeway, E., and Jorcyk, C.L. (2004). Oncostatin M stimulates the detachment of a reservoir of invasive mammary carcinoma cells: role of cyclooxygenase-2. *Clinical & experimental metastasis* 21, 167-176.
- Hong, I.S., Lee, H.Y., and Kang, K.S. (2014). Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies? *Mutat Res* 768, 98-106.
- Hughes, K.S., Schnaper, L.A., Berry, D., Cirrincione, C., McCormick, B., Shank, B., Wheeler, J., Champion, L.A., Smith, T.J., Smith, B.L., *et al.* (2004). Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women 70 years of age or older with early breast cancer. *N Engl J Med* 351, 971-977.
- Jacobs, D.H.M., Speijer, G., Petoukhova, A.L., Roeloffzen, E.M.A., Straver, M., Marinelli, A., Fisscher, U., Zwanenburg, A.G., Merkus, J., Marijnen, C.A.M., *et al.* (2018). Acute toxicity of intraoperative radiotherapy and external beam-accelerated partial breast irradiation in elderly breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment* 169, 549-559.
- Janni, W., Hancke, K., Fehm, T., Scholz, C., and Rack, B. (2017). *Facharztwissen Gynäkologie*, 2. Aufl. edn (Elsevier, Urban & Fischer Verlag).
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9, 239-252.

- Junk, D.J., Bryson, B.L., Smigiel, J.M., Parameswaran, N., Bartel, C.A., and Jackson, M.W. (2017). Oncostatin M promotes cancer cell plasticity through cooperative STAT3-SMAD3 signaling. *Oncogene* 36, 4001-4013.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 392-401.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-563.
- Khalid, A., Wolfram, J., Ferrari, I., Mu, C., Mai, J., Yang, Z., Zhao, Y., Ferrari, M., Ma, X., and Shen, H. (2015). Recent Advances in Discovering the Role of CCL5 in Metastatic Breast Cancer. *Mini reviews in medicinal chemistry* 15, 1063-1072.
- Knutson, K.L., Lu, H., Stone, B., Reiman, J.M., Behrens, M.D., Prosperi, C.M., Gad, E.A., Smorlesi, A., and Disis, M.L. (2006). Immunoediting of cancers may lead to epithelial to mesenchymal transition. *J Immunol* 177, 1526-1533.
- Kocaoemer, A., Kern, S., Kluter, H., and Bieback, K. (2007). Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 1270-1278.
- Koenen, P., Spanholtz, T.A., Maegele, M., Sturmer, E., Brockamp, T., Neugebauer, E., and Thamm, O.C. (2015). Acute and chronic wound fluids inversely influence adipose-derived stem cell function: molecular insights into impaired wound healing. *International wound journal* 12, 10-16.
- KoopG, W.G.d. (2011): Verfahren zur Bewertung der Wirksamkeit des Deutschen Mammographie-Screening-Programms auf die Senkung der Sterblichkeit durch Brustkrebs. Stellungnahme des wissenschaftlichen Gremiums des Beirates der Kooperationsgemeinschaft Mammographie vom 17.10.2011.
Online: https://fachservice.mammo-programm.de/download/Stellungnahme_des_Wissenschaftlichen_Gremiums.pdf, Stand: 11.02.2020
- Kraus-Tiefenbacher, U., Bauer, L., Kehrer, T., Hermann, B., Melchert, F., and Wenz, F. (2006a). Intraoperative radiotherapy (IORT) as a boost in patients with early-stage breast cancer -- acute toxicity. *Onkologie* 29, 77-82.
- Kraus-Tiefenbacher, U., Bauer, L., Scheda, A., Fleckenstein, K., Keller, A., Herskind, C., Steil, V., Melchert, F., and Wenz, F. (2006b). Long-term toxicity of an intraoperative radiotherapy boost using low energy X-rays during breast-conserving surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66, 377-381.
- Kunkler, I.H., Williams, L.J., Jack, W.J., Cameron, D.A., Dixon, J.M., and investigators, P.I. (2015). Breast-conserving surgery with or without irradiation in women aged 65 years or older with early breast cancer (PRIME II): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 16, 266-273.
- Kurtz, J.M., Amalric, R., Brandone, H., Ayme, Y., Jacquemier, J., Pietra, J.C., Hans, D., Pollet, J.F., Bressac, C., and Spitalier, J.M. (1989). Local recurrence after breast-conserving surgery and radiotherapy. Frequency, time course, and prognosis. *Cancer* 63, 1912-1917.

La Cava, A. (2017). Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine* 98, 51-58.

Lapeire, L., Hendrix, A., Lambein, K., Van Bockstal, M., Braems, G., Van Den Broecke, R., Limame, R., Mestdagh, P., Vandesompele, J., Vanhove, C., *et al.* (2014). Cancer-associated adipose tissue promotes breast cancer progression by paracrine oncostatin M and Jak/STAT3 signaling. *Cancer Res* 74, 6806-6819.

Lee, H.Y., and Hong, I.S. (2017). Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential. *Cancer science* 108, 1939-1946.

Lee, Y., Auh, S.L., Wang, Y., Burnette, B., Wang, Y., Meng, Y., Beckett, M., Sharma, R., Chin, R., Tu, T., *et al.* (2009). Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood* 114, 589-595.

Leitlinienprogramm Onkologie, D.K., Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2018): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Online: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>, Stand: 11.02.2020

Lugade, A.A., Moran, J.P., Gerber, S.A., Rose, R.C., Frelinger, J.G., and Lord, E.M. (2005). Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. *J Immunol* 174, 7516-7523.

Lugade, A.A., Sorensen, E.W., Gerber, S.A., Moran, J.P., Frelinger, J.G., and Lord, E.M. (2008). Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. *J Immunol* 180, 3132-3139.

Luz-Crawford, P., Jorgensen, C., and Djouad, F. (2017). Mesenchymal Stem Cells Direct the Immunological Fate of Macrophages. *Results and problems in cell differentiation* 62, 61-72.

Mantovani, A., and Locati, M. (2013). Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33, 1478-1483.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* 23, 549-555.

Matsumura, S., and Demaria, S. (2010). Up-regulation of the pro-inflammatory chemokine CXCL16 is a common response of tumor cells to ionizing radiation. *Radiat Res* 173, 418-425.

Miyoshi, Y., Funahashi, T., Tanaka, S., Taguchi, T., Tamaki, Y., Shimomura, I., and Noguchi, S. (2006). High expression of leptin receptor mRNA in breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels. *Int J Cancer* 118, 1414-1419.

Motz, G.T., and Coukos, G. (2013). Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* 39, 61-73.

- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8, 618-631.
- Nicolay, N.H., Lopez Perez, R., Debus, J., and Huber, P.E. (2015a). Mesenchymal stem cells - A new hope for radiotherapy-induced tissue damage? *Cancer Lett* 366, 133-140.
- Nicolay, N.H., Lopez Perez, R., Saffrich, R., and Huber, P.E. (2015b). Radio-resistant mesenchymal stem cells: mechanisms of resistance and potential implications for the clinic. *Oncotarget* 6, 19366-19380.
- Nicolay, N.H., Sommer, E., Lopez, R., Wirkner, U., Trinh, T., Sisombath, S., Debus, J., Ho, A.D., Saffrich, R., and Huber, P.E. (2013). Mesenchymal stem cells retain their defining stem cell characteristics after exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 87, 1171-1178.
- Norozi, F., Ahmadzadeh, A., Shahrabi, S., Vosoughi, T., and Saki, N. (2016). Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in suppression or progression of solid tumor cells. *Tumour Biol* 37, 11679-11689.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer metastasis reviews* 8, 98-101.
- Procaccini, C., Jirillo, E., and Matarese, G. (2012). Leptin as an immunomodulator. *Molecular aspects of medicine* 33, 35-45.
- Rhee, K.J., Lee, J.I., and Eom, Y.W. (2015). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Effects of Tumor Support or Suppression. *Int J Mol Sci* 16, 30015-30033.
- Romestaing, P., Lehingue, Y., Carrie, C., Coquard, R., Montbarbon, X., Ardiet, J.M., Mamelle, N., and Gerard, J.P. (1997). Role of a 10-Gy boost in the conservative treatment of early breast cancer: results of a randomized clinical trial in Lyon, France. *J Clin Oncol* 15, 963-968.
- Rueden, C.T., Schindelin, J., Hiner, M.C., DeZonia, B.E., Walter, A.E., Arena, E.T., and Eliceiri, K.W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC bioinformatics* 18, 529.
- Sauer, R., Wenz, F., Haase, W., Souchon, R., and Sautter-Bihl, M.-L. (2006). Brustkrebs: Teilbrustbestrahlung nach brusterhaltender Operation. *Dtsch Arztebl International* 103, 539-.
- Scherer, S.D., Bauer, J., Schmaus, A., Neumaier, C., Herskind, C., Veldwijk, M.R., Wenz, F., and Sleeman, J.P. (2016). TGF-beta1 Is Present at High Levels in Wound Fluid from Breast Cancer Patients Immediately Post-Surgery, and Is Not Increased by Intraoperative Radiation Therapy (IORT). *PLoS One* 11, e0162221.
- Sedlmayer, F., Sautter-Bihl, M.L., Budach, W., Dunst, J., Fastner, G., Feyer, P., Fietkau, R., Haase, W., Harms, W., Souchon, R., *et al.* (2013). DEGRO practical guidelines: radiotherapy of breast cancer I: radiotherapy following breast conserving therapy for invasive breast cancer. *Strahlenther Onkol* 189, 825-833.

- Senovilla, L., Galluzzi, L., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2013). Immunosurveillance as a regulator of tissue homeostasis. *Trends in immunology* *34*, 471-481.
- Sheard, M.A. (2001). Ionizing radiation as a response-enhancing agent for CD95-mediated apoptosis. *Int J Cancer* *96*, 213-220.
- Shiao, S.L., and Coussens, L.M. (2010). The tumor-immune microenvironment and response to radiation therapy. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* *15*, 411-421.
- Sinn, H.P., and Kreipe, H. (2013). A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast care (Basel, Switzerland)* *8*, 149-154.
- Skoberne, M., Beignon, A.S., and Bhardwaj, N. (2004). Danger signals: a time and space continuum. *Trends in molecular medicine* *10*, 251-257.
- Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S.L., Degli-Esposti, M.A., and Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* *42*, 501-510.
- Stattin, P., Soderberg, S., Biessy, C., Lenner, P., Hallmans, G., Kaaks, R., and Olsson, T. (2004). Plasma leptin and breast cancer risk: a prospective study in northern Sweden. *Breast cancer research and treatment* *86*, 191-196.
- Steel, G.G., McMillan, T.J., and Peacock, J.H. (1989). The 5Rs of radiobiology. *Int J Radiat Biol* *56*, 1045-1048.
- Stuelten, C.H., Barbul, A., Busch, J.I., Sutton, E., Katz, R., Sato, M., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., and Niederhuber, J.E. (2008). Acute wounds accelerate tumorigenesis by a T cell-dependent mechanism. *Cancer Res* *68*, 7278-7282.
- Sütterlin, M., Sperk, E., Berlit, S., Wenz, F., and Tuschy, B. (2015). Intraoperative Strahlentherapie beim Mammakarzinom mit niederenergetischen Röntgenstrahlen. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* *12*, 150-154.
- Takahashi, E., Kuranaga, N., Satoh, K., Habu, Y., Shinomiya, N., Asano, T., Seki, S., and Hayakawa, M. (2007). Induction of CD16⁺ CD56^{bright} NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16⁻ CD56^{bright} NK Cells but also from CD16⁻ CD56^{dim} NK cells. *Scandinavian journal of immunology* *65*, 126-138.
- Trivanovic, D., Jaukovic, A., Krstic, J., Nikolic, S., Okic Djordjevic, I., Kukolj, T., Obradovic, H., Mojsilovic, S., Ilic, V., Santibanez, J.F., *et al.* (2016). Inflammatory cytokines prime adipose tissue mesenchymal stem cells to enhance malignancy of MCF-7 breast cancer cells via transforming growth factor-beta1. *IUBMB Life* *68*, 190-200.
- Trivanovic, D., Krstic, J., Jaukovic, A., Bugarski, D., and Santibanez, J.F. (2018). Mesenchymal stromal cell engagement in cancer cell epithelial to mesenchymal transition. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* *247*, 359-367.

- Tulotta, C., and Ottewell, P. (2018). The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. *Endocrine-related cancer* 25, R421-r434.
- Tuschy, B., Berlit, S., Nasterlack, C., Tome, K., Blank, E., Wenz, F., and Sutterlin, M. (2013). Intraoperative radiotherapy of early breast cancer using low-kilovoltage x-rays-reasons for omission of planned intraoperative irradiation. *The breast journal* 19, 325-328.
- Uhlig, S., Wuhrer, A., Berlit, S., Tuschy, B., Sütterlin, M., and Bieback, K. (2020). Intraoperative radiotherapy for breast cancer treatment efficiently targets the tumor bed preventing breast adipose stromal cell outgrowth. *Strahlenther Onkol* 196, 398-404.
- Vaidya, J.S., Baum, M., Tobias, J.S., Wenz, F., Massarut, S., Keshtgar, M., Hilaris, B., Saunders, C., Williams, N.R., Brew-Graves, C., *et al.* (2011). Long-term results of targeted intraoperative radiotherapy (Targit) boost during breast-conserving surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 81, 1091-1097.
- Vaidya, J.S., Wenz, F., Bulsara, M., Tobias, J.S., Joseph, D.J., Keshtgar, M., Flyger, H.L., Massarut, S., Alvarado, M., Saunders, C., *et al.* (2014). Risk-adapted targeted intraoperative radiotherapy versus whole-breast radiotherapy for breast cancer: 5-year results for local control and overall survival from the TARGIT-A randomised trial. *Lancet* 383, 603-613.
- van Engeland, M., Ramaekers, F.C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C.P. (1996). A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24, 131-139.
- Wang, D., Hu, K., Gao, N., Zhang, H., Jiang, Y., Liu, C., Wang, S., and Zhao, Z. (2015). High throughput screening of cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases in wound fluid induced by mammary surgery. *Oncotarget* 6, 29296-29310.
- Weiss, L. (1986). Metastatic inefficiency : causes and consequences. *Cancer Rev* 3, 1-24.
- Wenz, F., Welzel, G., Blank, E., Hermann, B., Steil, V., Sutterlin, M., and Kraus-Tiefenbacher, U. (2010). Intraoperative radiotherapy as a boost during breast-conserving surgery using low-kilovoltage X-rays: the first 5 years of experience with a novel approach. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 77, 1309-1314.
- West, N.R., Murphy, L.C., and Watson, P.H. (2012). Oncostatin M suppresses oestrogen receptor-alpha expression and is associated with poor outcome in human breast cancer. *Endocrine-related cancer* 19, 181-195.
- West, N.R., Murray, J.I., and Watson, P.H. (2014). Oncostatin-M promotes phenotypic changes associated with mesenchymal and stem cell-like differentiation in breast cancer. *Oncogene* 33, 1485-1494.
- Whiteside, T.L. (2014). Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 63, 67-72.
- Woo, H.Y., Park, H., Ki, C.S., Park, Y.L., and Bae, W.G. (2006). Relationships among serum leptin, leptin receptor gene polymorphisms, and breast cancer in Korea. *Cancer Lett* 237, 137-142.

- Wright, E.G., and Coates, P.J. (2006). Untargeted effects of ionizing radiation: implications for radiation pathology. *Mutat Res* 597, 119-132.
- Wu, M.H., Chou, Y.C., Chou, W.Y., Hsu, G.C., Chu, C.H., Yu, C.P., Yu, J.C., and Sun, C.A. (2009). Circulating levels of leptin, adiposity and breast cancer risk. *British journal of cancer* 100, 578-582.
- Zeamari, S., Roos, E., and Stewart, F.A. (2004). Tumour seeding in peritoneal wound sites in relation to growth-factor expression in early granulation tissue. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 40, 1431-1440.
- Zhang, L., Sun, J., Liu, Z., Dai, Y., Luo, Z., Jiang, X., Li, Z., Li, Y., Cao, P., Zhou, Y., *et al.* (2014). Mesenchymal stem cells regulate cytoskeletal dynamics and promote cancer cell invasion through low dose nitric oxide. *Current molecular medicine* 14, 749-761.
- Zhang, Y., Bose, T., Unger, R.E., Jansen, J.A., Kirkpatrick, C.J., and van den Beucken, J. (2017). Macrophage type modulates osteogenic differentiation of adipose tissue MSCs. *Cell and tissue research* 369, 273-286.
- Zhou, H.S., Su, X.F., Fu, X.L., Wu, G.Z., Luo, K.L., Fang, Z., Yu, F., Liu, H., Hu, H.J., Chen, L.S., *et al.* (2016). Mesenchymal stem cells promote pancreatic adenocarcinoma cells invasion by transforming growth factor-beta1 induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget* 7, 41294-41305.
- Zimmerlin, L., Park, T.S., Zambidis, E.T., Donnenberg, V.S., and Donnenberg, A.D. (2013). Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. *Biochimie* 95, 2235-2245.

8. TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 8.1:

Tabellarische Auflistung der für die MSC-Charakterisierung verwendeten Antikörper eines in der Arbeitsgruppe etablierten Panels. Die fett markierten Antikörper dienen der MSC-Charakterisierung an sich, während die restlichen Antikörper zur Detektion kontaminierender Zelltypen verwendet wurden.

	Antikörper/Fluorochrom
Tube 0 (Leerwert)	Versuchsansatz ohne Antikörper
Tube 1	CD29-AlexaFluor 488
	CD73-PE
	CD90-APC
Tube 2	CD106-FITC
	CD146-PE
	CD44-APC
Tube 3	CD3-FITC
	CD14-FITC
	CD235a-FITC
	CD19-FITC
	CD34-PE
	CD45-FITC
	CD105-APC
Tube 4	CD15-FITC
	CD31-APC
Tube 5	HLA-DR-FITC
	CD144-PE
	HLA-ABC-APC

TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 8.2:

Übersicht über die für die durchflusszytometrische Analyse der WF und PBMC verwendeten Panels inkl. der beinhalteten Antikörper.

	Antikörper/ Fluorochrom	Funktion
Tube 0:		
Versuchsansatz ohne Antikörper		Leerwert
Tube 1:	CD45-PE-Cy7	Pan-Leukozytenmarker
myeloides Panel	CD14-PerCP-Cy5.5	Marker v. a. für Monozyten
	CD15-FITC	Marker für neutrophile Granulozyten
	CD16-APC-Cy7	Marker für NK-Zellen, Phagozyten
	CD64-PE	Marker für reife myeloische Zellen (Makrophagen/Monozyten)
	CD56-APC	Marker für NK-Zellen
Tube 2:	CD3-APC-Cy7	Marker für T-Zellen
T-lymphoides Panel	CD4-PE	Marker für T-Helferzellen
	CD8-FITC	Marker für zytotoxische T-Zellen
	CD69-PerCP	Früher Aktivierungsmarker
	CD154-APC	Aktivierungsmarker (CD40-Ligand)
	Tube 3:	CD3-APC-Cy7
	CD4-PE	
	CD8-FITC	
	CD154-APC	
Tube 4:	CD3-APC-Cy7	FMO-Kontrolle für CD154
	CD4-PE	
	CD8-FITC	
	CD69-PerCP	

TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 8.3:

Lokalisation der 80 Faktoren auf der Trägermembran des Human Cytokine Array C5 (RayBiotech). Pos = Positivkontrolle, Neg = Negativkontrolle.

Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	G-CSF	GM-CSF	GRO	GRO α
I-309	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
IL-12 p40/70	IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1 β
MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-1	ANG
OSM	THPO	VEGF	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC	CCL23	Eotaxin 1	Eotaxin 2	Eotaxin 3
FGF 4	FGF 6	FGF 7	FGF 9	Flt-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	HGF	IGFBP 1	IGFBP2
IGFBP3	IFGBP4	IL-16	IL-10	LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3 α	NAP-2	NT-3
NT-4	OPN	OPG	PARC	PLGF	TGF- β 2	TGF- β 3	TIMP-1	TIMP-2	Pos	Pos

Tabelle 8.4:

Auflistung der im ELISA getesteten Zytokine/Faktoren mit den im Ansatz eingesetzten Verdünnungsfaktoren. I-309 und PDGF-BB konnten, im Gegensatz zu den Ergebnissen des Human Cytokine Array, nicht in der WF nachgewiesen werden.

Kit	Verdünnungsfaktor für WF
VEGF	1:10
GRO α	1:4
IL-1 β	1:10
Leptin	1:50
RANTES	1:10
OSM	1:2
HGF	1:10
uPA	1:10
I-309	nicht nachweisbar
PDGF-BB	nicht nachweisbar

Tabelle 8.5:

Übersicht der für die Subkultivierung verwendeten Volumina einzelner Reagenzien und Zellzahlen entsprechend der Fläche der verwendeten TC-Flaschen. Die für die Aussaat genannten Zellzahlen ergeben sich aus der Aussaatdichte von 200/cm².

Fläche TC-Flasche	Vol. PBS	Vol. Trypsin- EDTA	Vol. DMEM-AB zum Abstoppen	Vol. DMEM-AB zur Aussaat	Zellzahl für Aussaat
25 cm ²	5 mL	1 mL	2 mL	5 mL	5,0×10 ³
75 cm ²	10 mL	3 mL	4 mL	10 mL	1,5×10 ⁴
175 cm ²	20 mL	5 mL	6 mL	20 mL	3,5×10 ⁴

Tabelle 8.6:

Materialauflistung

8.6.1 Zellen

Bezeichnung	Kürzel	Hersteller
Mesenchymale Stromazellen aus Brustgewebe	Mamma-MSc	Eigene Isolation
Tripel-negative Brustkrebs-Zelllinie MDA- MB 231, fluoreszenzmarkiert (MDA-MB 231 IncuCyte® NucLight Green Cells)	MDA-MB 231	Essen Bioscience (Hertfordshire/UK)

8.6.2 Medien

Bezeichnung	Kürzel	Zusammensetzung	Hersteller
Adipogenic Differentiation Medium	ADM		PromoCell (High Point/USA)
DMEM, serumfrei	DMEM empty	- Dulbecco's Modified Eagle's Medium - L-Glutamin, 4 mM - Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech (Aidenbach/DE) Thermo Fisher (Waltham/USA) Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)

TABELLARISCHER ANHANG

DMEM-AB 10 %	DMEM-AB	- Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PAN Biotech (Aidenbach/DE)
		- Humanes AB-Serum 10 %	Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen GmbH/DE
		- L-Glutamin, 4mM	Thermo Fisher (Waltham/USA)
		- Penicillin (100U/ mL)/ Streptomycin (0,1mg/ mL)	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
DMEM-FBS 10 %	DMEM-FBS	- Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PAN Biotech (Aidenbach/DE)
		- Fetales Kälberserum (FBS) 10 %	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
		- L-Glutamin, 4 mM	Thermo Fisher (Waltham/USA)
		- Penicillin (100U/ mL)/ Streptomycin (0,1mg/ mL)	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Einfriermedium		- Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
		- Dimethylsulfoxid (DMSO), 10 %	WAK Chemie Medical (Steinbach/DE)
Osteogenic Differentiation Medium	ODM		PromoCell (High Point/USA)

8.6.3 Chemikalien

Bezeichnung	Kürzel	Hersteller
Alconox Detergent		Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	Carl Roth (Karlsruhe/DE)
Annexin V-APC		BD Biosciences (San José/USA)

TABELLARISCHER ANHANG

Annexin V-pure		BD Biosciences (San José/USA)
Aqua destillata	A. dest.	Eigene Herstellung
Bovines Serumalbumin (Albumin Fraction V)	BSA	AppliChem (Darmstadt/DE)
Collagenase from Clostridium histolyticum (125 CDU/mg)	Collagenase I	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Ethanol		Carl Roth (Karlsruhe/DE)
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	AppliChem (Darmstadt/DE)
F _c R Blocking Reagent	F _c R-Block	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach/DE)
Fibronectin		PromoCell (High Point/USA)
Formalin		Carl Roth (Karlsruhe/DE)
Fetales Kälberserum	FBS, FCS	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Harris Hematoxylin		Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Isopropanol		Carl Roth (Karlsruhe/DE)
L-Glutamin	L-Glut	Thermo Fisher (Waltham/USA)
Natriumazid	NaN ₃	Alfa Aesar (Haverhill/USA)
Natriumhydrogencarbonat	NH ₄ HCO ₃	Carl Roth (Karlsruhe/DE)
Natriumthiosulfat	Na ₂ S ₂ O ₃	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Ölrot O		Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Penicillin/Streptomycin	Pen/Strep	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
Propidiumiodid, 100x	PI	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)

TABELLARISCHER ANHANG

Pursept A		Schülke (Norderstedt/DE)
Pyrogallol		Merck (Darmstadt/DE)
Schwefelsäure	NaSO ₄ , 2M	Carl Roth (Karlsruhe/DE)
Silbernitrat	AgNO ₃	Merck (Darmstadt/DE)
Sytox Blue		Thermo Fisher (Waltham/USA)
Trypsin-EDTA		PAA (Cambridge/UK)
Tween-20		Serva (Heidelberg/DE)
Virkon S Desinfektionsmittel		DuPont (Wilmington/USA)

8.6.4 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
1 % Pyrogallol-Lösung	- Pyrogallol - Aqua dest.	Merck (Darmstadt/DE) Eigene Herstellung
5 % Natriumthiosulfat-Lösung (Na ₂ S ₂ O ₃ 5 %)	- Na ₂ S ₂ O ₃ - Aqua dest.	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA) Eigene Herstellung
5 % Silbernitrat-Lösung (AgNO ₃ 5 %)	- AgNO ₃ - Aqua dest.	Merck (Darmstadt/DE) Eigene Herstellung
7-Aminoactinomycin (7-AAD)		Beckman Coulter (Brea/USA)
Annexin Binding Buffer (10x)	- HEPES, 0,1 M - NaCl, 1,4 M - CaCl ₂ , 25 mM	BD Biosciences (San José/USA)
CASY-TON		OMNI Life Science (Bremen/DE)
CellWASH		BD Biosciences (San José/USA)
ELISA Reagent Diluent	- PBS - BSA, 1 %	Thermo Fisher (Waltham/USA) AppliChem (Darmstadt/DE)

TABELLARISCHER ANHANG

ELISA-Waschpuffer	- PBS	Thermo Fisher (Waltham/USA)
	- Tween-20, 0,05 %	Serva (Heidelberg/DE)
Erythrozyten-Lysepuffer	- NH ₄ Cl, 0,155 M	Carl Roth (Karlsruhe/DE)
	- NH ₄ HCO ₃ , 0,01 M	Carl Roth (Karlsruhe/DE)
	- EDTA, 0,1 mM	AppliChem (Darmstadt/DE)
FACSFlow		BD Biosciences (San José/USA)
FACS-Puffer	- PBS	Thermo Fisher (Waltham/USA)
	- BSA, 0,4 %	AppliChem (Darmstadt/DE)
	- NaN ₃ , 0,02 %	Alfa Aesar (Haverhill/USA)
Formalin 10 %	- Aqua dest.	Eigene Herstellung
	- Formalin 35 %	Carl Roth (Karlsruhe/DE)
Isopropanol 60 %	- Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe/DE)
	- Aqua dest.	Eigene Herstellung
Ölrot O-Färbelösung	- Ölrot O	Sigma-Aldrich (St. Louis/USA)
	- Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe/DE)
	- Aqua dest.	Eigene Herstellung
PBS + 2mM EDTA	- DPBS	Thermo Fisher (Waltham/USA)
	- EDTA, 2 mM	AppliChem (Darmstadt/DE)

8.6.5 Antikörper

Antigen	Klon	Fluorochrom	Hersteller
CD3	UCHT1	APC/Cy7	BioLegend (San Diego/USA)
CD3	UCHT1	FITC	BioLegend (San Diego/USA)
CD4	RPA-T4	FITC	BD Biosciences (San José/USA)
CD4	RPA-T4	PE	BD Biosciences (San José/USA)

TABELLARISCHER ANHANG

CD8	RPA-T8	FITC	BD Biosciences (San José/USA)
CD14	M5E2	FITC	BD Biosciences (San José/USA)
CD14	MφP9	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences (San José/USA)
CD15	HI98	FITC	BD Biosciences (San José/USA)
CD16	3G8	APC-Cy7	BD Biosciences (San José/USA)
CD19	HIB19	FITC	BD Biosciences (San José/USA)
CD25	M-A251	APC	BD Biosciences (San José/USA)
CD29	TS2/16	AlexaFluor 488	BioLegend (San Diego/USA)
CD31	WM59	APC	eBioscience (Waltham/USA)
CD34	8G12	PE	BD Biosciences (San José/USA)
CD44	IM7	APC	BioLegend (San Diego/USA)
CD45	HI30	FITC	BD Biosciences (San José/USA)
CD45	HI30	PE-Cy7	BD Biosciences (San José/USA)
CD56	NCAM16.2	APC	BD Biosciences (San José/USA)
CD64	10.1	PE	BD Biosciences (San José/USA)
CD69	FN50	PerCP	BioLegend (San Diego/USA)
CD73	AD2	PE	BD Biosciences (San José/USA)

TABELLARISCHER ANHANG

CD90	5E10	APC	BD Biosciences (San José/USA)
CD105	SN6	APC	BD Biosciences (San José/USA)
CD106	VCAM-1	FITC	BD Biosciences (San José/USA)
CD127	HIL-7R-M21	PE-Cy7	BD Biosciences (San José/USA)
CD154	TRAP1	APC	BD Biosciences (San José/USA)
CD144	TEA1/31	PE	Beckman Coulter (Brea/USA)
CD146	TEA1/34	PE	Beckman Coulter (Brea/USA)
CD196	11A9	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences (San José/USA)
CD235a	GA-R2	FITC	BD Biosciences (San José/USA)
FoxP3	259D/C7	PE	BD Biosciences (San José/USA)
HLA-ABC	G46-2.6	APC	BD Biosciences (San José/USA)
HLA-DR	L243	FITC	BD Biosciences (San José/USA)

8.6.6 Kits

Bezeichnung	Komponenten	Hersteller
ELISA Substrate Reagent Pack	<ul style="list-style-type: none"> - Color Reagent A (stabilized hydrogen peroxide) - Color Reagent B (stabilized tetramethylbenzidine) 	Bio-Techne (Minneapolis/USA)
Human Cytokine Antibody Array C5	<ul style="list-style-type: none"> - Antibody Array Membranes - Blocking Buffer - Biotinylated Antibody Cocktail 	RayBiotech (Norcross/USA)

TABELLARISCHER ANHANG

	<ul style="list-style-type: none"> - HRP-Streptavidin Concentrate (1000x) - Wash Buffer I Concentrate, 20x - Wash Buffer II Concentrate, 20x - Cell Lysis Buffer Concentrate, 2x - Detection Buffer C - Detection Buffer D - 8-Well Incubation Tray 	
Human Fox P3 Buffer Set	<ul style="list-style-type: none"> - Buffer A, 10x - Buffer B, 50x 	BD Bioscience (San José/USA)
Human GRO α DuoSet ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - GROα Capture Antibody - GROα Detection Antibody - GROα Recombinant Standard - Streptavidin-HRP, 40x 	Bio-Techne (Minneapolis/USA)
Human HGF DuoSet ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - HGF Capture Antibody - HGF Detection Antibody - HGF Recombinant Standard - Streptavidin-HRP, 200x 	Bio-Techne (Minneapolis/USA)
Human I-309 DuoSet ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - I-309 Capture Antibody - I-309 Detection Antibody - I-309 Recombinant Standard - Streptavidin-HRP, 200x 	Bio-Techne (Minneapolis/USA)
Human IL-1 β DuoSet ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - IL-1β Capture Antibody - IL-1β Detection Antibody - IL-1β Recombinant Standard - Streptavidin-HRP, 40x 	Bio-Techne (Minneapolis/USA)
Human Leptin DuoSet ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - Leptin Capture Antibody - Leptin Detection Antibody - Leptin Recombinant Standard - Streptavidin-HRP, 40x 	Bio-Techne (Minneapolis/USA)
Human Oncostatin M (OSM) DuoSet ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - OSM Capture Antibody - OSM Detection Antibody - OSM Recombinant Standard - Streptavidin-HRP, 200x 	Bio-Techne (Minneapolis/USA)

TABELLARISCHER ANHANG

Human PDGF-BB DuoSet ELISA	- PDGF-BB Capture Antibody - PDGF-BB Detection Antibody - PDGF-BB Recombinant Standard - Streptavidin-HRP, 200x	Bio-Techne (Minneapolis/USA)
Human RANTES DuoSet ELISA	- RANTES Capture Antibody - RANTES Detection Antibody - RANTES Recombinant Standard - Streptavidin-HRP, 40x	Bio-Techne (Minneapolis/USA)
Human uPA DuoSet ELISA	- uPA Capture Antibody - uPA Detection Antibody - uPA Recombinant Standard - Streptavidin-HRP, 200x	Bio-Techne (Minneapolis/USA)
Human VEGF DuoSet ELISA	- VEGF Capture Antibody - VEGF Detection Antibody - VEGF Recombinant Standard - Streptavidin-HRP, 40x	Bio-Techne (Minneapolis/USA)

8.6.7 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
12-Well Zellkultur Platte	Thermo Fisher (Waltham/USA)
96-Well ELISA-Platten aus Polystyrol	Bio-Techne (Minneapolis/USA)
96-Well Zellkultur-Platte	Eppendorf (Hamburg/DE)
CASYCups	OMNI Life Sciences (Bremen/DE)
CombiTips, div. Größen	Brand (Wertheim/DE)
Cryotubes	Greiner (Kremsmünster/AUT)
Einmalhandschuhe	Hartmann (Heidenheim/DE)
FACS TruCOUNT™-Tubes	BD Biosciences (San José/USA)
FACS-Röhrchen	BD Biosciences (San José/USA)
IncuCyte ClearView 96-well Chemotaxis Plates	Essen Bioscience (Hertfordshire/UK)
IncuCyte ImageLock 96-well Plates	Essen Bioscience (Hertfordshire/UK)
Nunc EasYFlask 25-175 cm ²	Thermo Scientific (Roskilde/DNK)
PCR-Tubes, 200 µL	neoLab (Heidelberg/DE)
Petrischale ø 35 mm	Falcon (Durham/USA)

TABELLARISCHER ANHANG

Pipettenspitzen, 5-1000 µL	StarLab (Hamburg/DE)
Pipettenspitzen, gefiltert, 5-1000 µL	StarLab (Hamburg/DE)
Reaktionsgefäße 1,5 mL/2,0 mL	Eppendorf (Hamburg/DE)
serologische Pipetten, 5-25 mL	StarLab (Hamburg/DE)
Surgical Disposable Scalpel	Braun (Tuttlingen/DE)
Tubes 15 mL/50 mL	Greiner (Kremsmünster/AUT)
Zellsieb, 100 µm	Falcon (Durham/USA)

8.6.8 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav VX-12	Systec (Linden/DE)
Brutschrank CB210	Binder (Tuttlingen/DE)
CASY Cell Counter	OMNI Life Sciences (Bremen/DE)
Chemolumineszenz-Detektor Epi Chemi II Darkroom	UVP (Upland/USA)
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences (San José/USA)
elektrische Pipettierhilfe Accu-Jet pro	Brand (Wertheim/DE)
Eppendorf Research Pipette, 10 µL	Eppendorf (Hamburg/DE)
Eppendorf Research Pipette, 100 µL	Eppendorf (Hamburg/DE)
Eppendorf Research Pipette, 1000 µL	Eppendorf (Hamburg/DE)
Eppendorf Research Pipette, 20 µL	Eppendorf (Hamburg/DE)
Eppendorf Research Pipette, 5 µL	Eppendorf (Hamburg/DE)
Flaschendispenser Dispensette, 1-10 mL	Brand (Wertheim/DE)
Gefrierschrank (-30° C)	Kirsch (Offenburg/DE)
Gefrierschrank (-80° C) HERAfreeze	Thermo Fisher (Waltham/USA)
HandyStep Dispenser	Brand (Wertheim/DE)
Heißluft-Sterilisator ED 115	Binder (Tuttlingen/DE)
IncuCyte Zoom@Live-Imager	Essen Bioscience (Hertfordshire/UK)
INTRABEAM Bestrahlungssystem	Carl Zeiss Meditec (Oberkochen/DE)
Kühlschrank (+4° C)	Liebherr (Kirchdorf/DE)
Laminar Flow Heraeus HeraSafe KS 12	Thermo Fisher (Waltham/USA)
Microplate Reader Infinite M200	Tecan Group (Männedorf/CH)
Microplate Washer TECAN hydro flex	Tecan Group (Männedorf/CH)
Microprocessor pH-Meter pH 211	Hanna Instruments (Vöhringen/DE)

TABELLARISCHER ANHANG

Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss Microscopy (Göttingen/DE)
Mikroskop Axiovert 40 C	Carl Zeiss Microscopy (Göttingen/DE)
Mikroskop-Kamera AxioCam MRc	Carl Zeiss Microscopy (Göttingen/DE)
Millipore-Anlage MQ Advantage A10	Merck (Darmstadt/DE)
Orbital Shaker KS-15	Edmund Bühler (Hechingen/DE)
Stickstoff-Tank BIOSAFE	Cryotherm (Kirchen/DE)
Tischzentrifuge Eppendorf miniSpin	Eppendorf (Hamburg/DE)
VacuSafe comfort Absauger	Integra Bioscience (Zizers/CH)
Vortexer Lab Dancer	IKA (Staufen/DE)
Waage ABJ 220-4M (10 mg – 220 g)	Kern (Balingen/DE)
Wasserbad WNE 14	Memmert (Schwabach/DE)
WoundMaker™ (96-well Plate)	Essen Bioscience (Hertfordshire/UK)
Zentrifuge Eppendorf 5415 R	Eppendorf (Hamburg/DE)
Zentrifuge Rotina 420	Hettich (Tuttlingen/DE)
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich (Tuttlingen/DE)
Zentrifuge Universal 320	Hettich (Tuttlingen/DE)

8.6.9 Software

Bezeichnung	Provider
FACSDiva	BD Biosciences (San José/USA)
FlowJo	Flow Jo LLC (Ashland/USA)
GraphPad Prism	GraphPad (San Diego/USA)
ImageJ	imagej.net (developed by Wayne Rasband)
IncuCyte Basic Software	Essen Bioscience (Hertfordshire/UK)
JMP	SAS Institute (Cary/USA)
Microsoft Office	Microsoft (Readmond/USA)
Protein Assay Analyzer	Gilles Carpentier
SAS	SAS Institute (Cary/USA)
TECAN Infinite M200	Tecan Group Ltd. (Männedorf/CH)

9. LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name: Anne Wuhrer
 Anschrift: Cambridgestraße 6, 69115 Heidelberg
 Geburtsdatum: 04. März 1990
 Geburtsort: Bad Saulgau
 Familienstand: ledig

SCHULISCHER WERDEGANG / AUSBILDUNG

2000 – 2009 Störck-Gymnasium Bad Saulgau
 Juni 2009 Abitur
 2009 – 2012 Berufsausbildung zur Biologielaborantin bei der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH und Co. KG, Biberach a. d. Riß

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

Okt 2012 Beginn des Medizinstudiums an der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
 Aug/Sept 2014 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
 Okt 2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
 Mai 2019 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)
 Juni 2019 Approbation als Ärztin
 seit Aug 2019 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Universitätsfrauenklinik Mannheim

10. DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation entstand aus einem Kooperationsprojekt der Frauenklinik mit dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg in der Zeit von Juli 2016 bis Januar 2020.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Sebastian Berlit sowie meinem Betreuer Prof. Dr. med. Benjamin Tuschy für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen. Ebenso danke ich dem Klinikdirektor der Frauenklinik der Universitätsmedizin Mannheim, Univ.-Prof. Dr. med. Marc Sütterlin, für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas.

Mein herzlichster Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Karen Bieback für die Bereitstellung ihrer Expertise und des Arbeitsplatzes mit optimalen Arbeitsbedingungen. Insbesondere gilt ihr mein Dank für die immerwährende Unterstützung, die vielen förderlichen Ratschläge sowie die stets geöffnete Tür.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bieback danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und das überaus angenehme Arbeitsklima. Besonders möchte ich an dieser Stelle Stefanie Uhlig hervorheben, welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein ausdrücklicher Dank geht an Dr. med. Stefan Betge für die Durchsicht meiner Arbeit, die konstruktiven Hinweise sowie die fruchtbaren Diskussionen.

Ich danke meiner Familie und Freunden für ihr stets offenes Ohr, die auch in schwierigen Zeiten anhaltende, bedingungslose Unterstützung – und noch vielmehr für die Bereitschaft, Freude zu teilen.

Schlussendlich möchte ich meinem Freund Fynn Betge danken. Für seine stets zuversichtliche und ermutigende Art, für sein unermüdliches und geduldiges Zuhören, für seine Rücksichtnahme sowie für jede einzelne Umarmung in der schwierigen Endphase dieser Arbeit bin ich von ganzem Herzen dankbar.

11. PUBLIKATIONEN

Themenassoziiert:

Uhlig, S.*, Wuhler, A.*, Berlit, S., Tuschy, B., Sütterlin, M., and Bieback, K. (2020). Intraoperative radiotherapy for breast cancer treatment efficiently targets the tumor bed preventing breast adipose stromal cell outgrowth. *Strahlenther Onkol* 196, 398-404.

* geteilte Erstautorenschaft

Kongressbeiträge:

- Vorträge:

52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V. (DGTI) 2019, VS-6-4: Intraoperative radiotherapy of breast cancer—influence on mesenchymal stromal cells and the tumor bed's micromilieu. *Transfus Med Hemother* 2019; 46 (suppl 1): 1–87.

- Poster:

39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie 2019: Einfluss einer intraoperativen Strahlentherapie des Mammakarzinoms auf das Mikromilieu im Tumorbett. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*. 16. 10.1055/s-0039-1688063.

62. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) 2018, P501: Einfluss einer intraoperativen Strahlentherapie des Mammakarzinoms auf das Mikromilieu im Tumorbett.

50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V. (DGTI) 2017, P09-17: Intraoperative radiotherapy for breast cancer treatment efficiently prevents breast adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells outgrowth. *Transfus Med Hemother* 2017; 44 (suppl 1): 1–94

Nicht themenassoziiert:

Berlit, S., Tuschy, B., Wuhler, A., Jurgens, S., Buchweitz, O., Kircher, A.T., Sutterlin, M., Lis, S., and Hornemann, A. (2018). Sexual functioning after total versus subtotal laparoscopic hysterectomy. *Archives of gynecology and obstetrics* 298, 337-344.

Tuschy, B., Gabbert, M., Weiss, C., Hornemann, A., Wuhler, A., Sutterlin, M., and Berlit, S. (2018). Changes in sexuality during ulipristal acetate treatment in women with symptomatic uterine fibroids. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 228, 106-110.