

Zelluläre und molekulare Effekte nicht-invasiven physikalischen Plasmas auf hormonell regulierte Karzinomzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Daniela Ulrike Jantschek, geb. Schwarte

aus Bonn

2022

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank Anton Giordano

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.10.2022

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	11
1.1 Steroidhormonrezeptoren.....	14
1.2 Physikalisches Plasma.....	17
1.2.1 Physikalische Plasma Quellen	18
1.2.2 Physikalisches Plasma in medizinischen Anwendungen.....	19
1.3 Fragestellung	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen.....	22
2.1.3 Puffer und Lösungen	23
2.1.4 Antikörper	24
2.1.5 Zelllinien	24
2.1.6 Zellkultur: Medien und Zusätze	25
2.2 Zellbiologische Methoden.....	25
2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	25
2.2.2 Kultivierung und Normalpassage von Zellen	26
2.2.3 Antikörpertitration /Rezeptorstatus	26
2.2.4 Aussaat/ Ernte von Zellen und Bestimmung der Zellzahl	27
2.2.5 Aussaat von Zellen und NIPP-Behandlung	28
2.2.6 Protein-Isolierung	28
2.2.7 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
2.2.8 Western Blotting	30

2.2.9	Statistische Auswertung	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Einfluss der NIPP Behandlung auf die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP	32
3.1.1	Proteinanalyse der AR Expression in LNCaP Zellen.....	33
3.1.2	Proteinanalyse der ER α Expression in LNCaP Zellen.....	34
3.2	Einfluss der NIPP Behandlung auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7	34
3.2.1	Proteinanalyse der ER β Expression in MCF-7 Zellen	35
3.2.2	Einfluss von Estradiol auf die Zellproliferation von MCF-7 Zellen	36
3.2.2.1	Einfluss der NIPP Behandlung auf MCF-7 Zellen nach E2 Vorinkubation.....	38
3.2.2.2	Proteinanalyse der ER α Expression in mit 100 nM E2 vorinkubierten MCF-7 Zellen	38
3.2.3	Einfluss von Progesteron auf die Proliferation von MCF-7 Zellen	39
3.2.3.1	Einfluss der NIPP Behandlung auf MCF-7 Zellen mit P4 Inkubation	40
3.2.3.2	Proteinanalyse der PR-A Expression in mit 100 μ M P4 inkubierten MCF-7 Zellen	41
3.2.3.3	Proteinanalyse der PR-B Expression in mit 100 μ M P4 inkubierten MCF-7 Zellen	42
3.3	Einfluss der NIPP Behandlung auf die Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3...	43
3.3.1	Einfluss von Progesteron auf die Proliferation von OVCAR-3 Zellen	43
3.3.2	Einfluss der NIPP Behandlung auf OVCAR-3 Zellen mit P4 Inkubation	44
3.3.2.1	Proteinanalyse der PR-A Expression in mit 100 μ M P4 inkubierten OVCAR-3 Zellen	45
3.3.2.2	Proteinanalyse der PR-B Expression in mit 100 μ M P4 inkubierten OVCAR-3 Zellen	46
4.	Diskussion	48
4.1	Androgenrezeptor	49
4.2	Östrogenrezeptor	52

4.3	Progesteronrezeptor.....	54
5.	Zusammenfassung.....	59
6.	Abbildungsverzeichnis.....	60
7.	Tabellenverzeichnis.....	62
8.	Literaturverzeichnis	63
9.	Danksagung	83

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APPJ	Atmosphärendruck-Plasma-Jet
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
AR-V	Spleißvariante des Androgenrezeptors
BSA	Bovine Serum Albumin
CA(P)P	Cold Atmospheric (Pressure) Plasma
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DBD	dielektrische Barriereentladung
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DHT	Dihydrotestosteron
DRU	digital-rektale Untersuchung
E ₂	Estradiol
ER (α ; β)	Östrogenrezeptor
Fab	(engl. fragment antigen binding) Antigen-bindende Fragment eines AKs
Fc	(engl. crystalline) fragmentkristallisierbare Region eines AKs
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HRE	Hormone-Response-Element
HRP	(engl. Horseradish Peroxidase) Meerrettichperoxidase

HSP	Hitzeschockprotein
Klin.	klinisch
Konz.	Konzentration
LNCaP	Prostatakarzinomzelllinie
LOH	(engl. Loss of heterozygoty) Verlust der normalen Funktion des Allels eines Gens in einer Zelle, in der das andere Allel bereits inaktiviert war
MC	Mammakarzinom
MCF-7	Mammakarzinomzelllinie
ms	(engl.mouse) Maus
NIPP	Nicht invasives physikalisches Plasma
NO	Stickstoffmonoxid
NTPP	nicht-thermisches physikalisches Plasma
OC	Ovarialkarziom
OVCAR-3	Ovarialkarziomzelllinie
p	Signifikanz mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***)
P4	Progesteron
PC	Prostatakarzinom
PR (-A; -B)	Progesteronrezeptor
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
rb	(engl. rabbit) Hase
RONS	reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
SD	(engl. standard deviation) Standardabweichung

SDS	(engl. sodium dodecyl sulfate) Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	(engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese
slm	Standard- Liter pro Minute
Tab.	Tabelle
TBS-T	(engl. Tris-buffered saline with Tween) Wasch-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TTP	Tissue-Tolerable Plasma
VE H2O	Vollentsalztes Wasser
x <i>g</i>	Zentrifugalkraft

1. Einleitung

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Das Statistische Bundesamt zählt etwa 231.000 Menschen, die 2019 an Krebs starben. Damit steht diese Todesursache in Deutschland an zweiter Stelle nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Statistisches Bundesamt, 03.02.2021). Forschung auf dem Gebiet der Onkologie, insbesondere auf molekularbiologischer Ebene, führte zu positiven Entwicklungen in der Therapie, so dass Behandlungskonzepte besser an Tumorcharakteristika angepasst werden können. Insbesondere die Entdeckung spezifischer Rezeptoren und Proteine auf der Tumorzelloberfläche und in den Tumorzellen führte zur Entwicklung endokriner und Target-spezifischer Therapien. Diese bieten Patienten oftmals eine verträglichere Alternative zu Bestrahlung und systemischen zytotoxischen Therapie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der mögliche Einfluss einer nicht-invasiven physikalischen Plasma (NIPP) Behandlung auf die Expressionsrate der Steroidhormonrezeptoren in hormonsensitiven Prostata-, Mamma- und Ovarialkarzinomzelllinien (LNCaP, MCF-7 und OVCAR-3) auf Proteinebene untersucht.

Das Prostatakarzinom (PC) ist die häufigste maligne Tumorerkrankung des Mannes in den westlichen Industrienationen. Laut Robert-Koch-Institut werden in Deutschland jährlich etwa 60.000 Neuerkrankungen verzeichnet. Obwohl die indolenten Formen der Erkrankung eine gute Prognose aufweisen, zählt das PC neben dem Bronchial- und dem kolorektalen Karzinom zu den drei am häufigsten zum Tode führenden Krebserkrankungen des Mannes. Das Risiko für eine Erkrankung ist altersabhängig. So ist die Wahrscheinlichkeit einer Neuerkrankung für einen 45-jährigen Mann geringer als 0,1 %. Im Gegensatz dazu steigt das Risiko eines 75-jährigen Mannes innerhalb der nächsten 10 Jahre zu erkranken auf ca. 5 % an.

Etwa zwei Drittel der Tumoren werden in einem frühen Stadium diagnostiziert. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für PC liegt bei 89 % (Robert Koch-Institut, 17.08.2020).

Das Mammakarzinom (MC) ist mit rund 69.000 Neuerkrankungen jährlich die mit Abstand häufigste Krebserkrankung der Frau. Nur etwa 1 % aller Betroffenen sind männlich. Im

Gegensatz zum PC sind bei Diagnosestellung drei von zehn betroffenen Frauen jünger als 55 Jahre alt. Fortschritte in der Therapie führen zu einem Rückgang der Sterberaten. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für MC liegt bei 87 % (Robert Koch-Institut, 17.08.2020).

Laut RKI erkranken in Deutschland jährlich ca. 7400 Frauen am Ovarialkarzinom (OC). Auch wenn die Inzidenz im Vergleich mit anderen Krebsarten niedrig ist, ist das OC die sechsthäufigste Krebserkrankung der Frau und mit einer hohen Sterblichkeit verbunden (Kanzow et al., 2018). Das Auftreten von OC wird mehrheitlich bei Frauen im postmenopausalen Alter beobachtet. Ähnlich wie beim PC steigt das Risiko für eine Erkrankung mit zunehmendem Alter kontinuierlich an. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 68 Jahren. Auch aufgrund der überwiegend späten Diagnosestellung sind die Überlebensaussichten von Patientinnen mit OC relativ schlecht. Das relative 5-Jahres-Überleben liegt derzeit bei 43 %. (Robert Koch-Institut, 17.08.2020).

In der Regel weisen PC in frühen Stadien keine spezifischen Symptome auf. Die Diagnose wird daher häufig im Rahmen der jährlichen Vorsorgeuntersuchung gestellt. Hierbei findet eine körperliche Begutachtung, die sogenannte digital-rektale Untersuchung (DRU) statt. Das PC bildet sich meist in der peripheren Zone des Organs und ist somit häufig von dorsal in der DRU tastbar. Die Aussagekraft des Tastbefundes variiert hierbei in Abhängigkeit von Untersucher und Tumorstadium (Tauber und Jung, 2015). Im Rahmen der Vorsorge kann zudem der PSA-Werts bestimmt werden, wobei die Aussagekraft des Wertes limitiert ist, da auch harmlose Veränderungen der Prostata zu einer Erhöhung führen können. Bei einem erhöhten PSA-Wert können Gewebeproben zur Verifizierung der Diagnose entnommen werden (Holtkamp, 2020). Späte Stadien fallen hingegen häufig durch Symptome wie Ischurie, Hämaturie, Inkontinenz, Impotenz, Knochenschmerzen oder begleitende B-Symptomatik auf (Tauber und Jung, 2015).

Beim MC und seinen Vorstufen ist zunächst eine Gewebeverdickung innerhalb der Brustdrüse zu beobachten, die im weiteren Verlauf an Größe zunimmt, die zu Hautveränderungen im Bereich der Brust oder zu Schwellungen der Lymphknoten in der Achselhöhle führen kann. Im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung kann ein Tumor der

Mamma durch Palpation, mittels bildgebender Verfahren (Mammographie, Ultraschalluntersuchung, Magnetresonanztomographie) oder anhand einer Gewebeprobe diagnostiziert werden. Das derzeit genaueste und am häufigsten angewendete bildgebende Verfahren ist die Mammographie (Holtkamp, 2020). Die Mortalität wird durch die Teilnahme an Mammographie-Screenings um mindestens 20 % reduziert, verglichen mit Patientinnen, die diese Vorsorgeuntersuchung nicht wahrnehmen (Løberg et al., 2015). Alle bildgebenden Verfahren können aber nur Hinweise auf eine Krebserkrankung liefern, sodass ein verdächtiger Befund mit einer Gewebeprobe weiter abgeklärt werden muss. Das Risiko an einem MC zu erkranken liegt für Patientinnen mit BRCA1 oder BRCA2 Mutation zwischen 45 % und 75 % (King et al., 2003). Aufgrund dieses besonders hohen Risikos umfasst die Vorsorgeuntersuchung neben einer jährlichen Mammographie ab dem 30. Lebensjahr, die halbjährliche ärztliche Tastuntersuchung der Brust mit Sonographie sowie die jährliche Magnetresonanztomographie der Mamma bis zum 55. Lebensjahr (Holtkamp, 2020).

Im Gegensatz zum MC fehlt beim OC eine verlässliche Methode der Früherkennung und des Screenings. Das gilt auch für die BRCA Mutationsträgerinnen, deren Risiko für eine Erkrankung bei 18 % bis 40 % liegt (King et al., 2003). So führte die Kombination aus transvaginalem Ultraschall und CA125-Bestimmung bisher zur keiner Reduktion der OC bedingten Mortalität (Buys et al., 2011). Beim Tumormarker CA125 handelt es sich um ein transmembranes Glykoprotein, welches vom serösen OC gebildet wird. CA125 ist bei mehr als 80 % der Patientinnen mit einer fortgeschrittenen Erkrankung erhöht, ist in Frühstadien aber nur bei der Hälfte der Patientinnen nachweisbar. Zudem ist eine Erhöhung auch bei einer Reihe benignen Erkrankungen zu beobachten (Schmalfeldt und Seck, 2013).

Ähnlich wie beim PC ist die klinische Symptomatik des OC vielfältig und unspezifisch. Als häufige Symptome sind diffuse Abdominalbeschwerden wie Völlegefühl, Blähungen oder unklare abdominelle Schmerzen zu nennen. Seltener kommt es zu einer Bauchumfangszunahme, die aszites- oder tumorbedingt sein kann. Zudem beobachtet man auch thromboembolische Ereignisse, Pleuraergüsse, Harntransportstörungen und Kachexie.

Erste diagnostische Maßnahmen sind gynäkologische Spiegel- und Tastuntersuchung in Kombination mit einer Transvaginalsonographie. Hierbei kann Dopplersonographie die diagnostische Sicherheit erhöhen. Zudem werden Computertomographie, Magnetresonanztomographie und Positronenemissionstomographie zur Ausbreitungsdiagnostik und zur differenzialdiagnostischen Abklärung eingesetzt (Kanzow et al., 2018).

Steroidhormone sind maßgeblich an der Pathogenese des PCs, MCs und OCs beteiligt. Die durch sie vermittelte Signaltransduktion kann beispielsweise zu einer gesteigerten Mitose- sowie Proliferationsrate führen (Beckmann et al., 1997). Hierbei nehmen Steroidhormonrezeptoren eine zentrale Rolle ein. In dieser Arbeit wurden ausschließlich hormonsensitive Malignitäten untersucht, deren gemeinsames Merkmal die Expression von Steroidhormonrezeptoren ist.

1.1 Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren und wirken als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren indem sie die Expression verschiedener Gene regulieren (Mangelsdorf et al., 1995). Sie vermitteln die Signaltransduktion der Steroidhormone. Diese können aufgrund ihrer Lipophilie frei durch die Zellmembran diffundieren, so dass sie an ihre intrazellulären Rezeptoren binden können. Nach Ligandenbindung binden die Rezeptoren an spezifische Sequenzen der DNA, den sogenannten Hormone-Response-Elementen (HREs). Dies führt zur Regulation der Transkription verschiedener Zielgene. Die positive Modulation der Transkription wird als Transaktivierung bezeichnet. Hierbei rekrutiert der mit der DNA interagierende Rezeptor Transaktivatoren. Durch Modulation von Chromatinstrukturen wird die Promoterregion zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie. Unter Transrepression versteht man die negative Regulation der Transkription. Sie wird durch monomere Steroidrezeptoren vermittelt, die an andere, nicht als Aktivatoren wirkende, Transkriptionsfaktoren binden (Beato et al., 1995). Zusätzlich kann die Transrepression durch negative HREs vermittelt werden, indem die Rezeptoren als Monomere, Dimere oder Trimere an diese binden (Malkoski et al., 1997; Drouin et al., 1993). Bei der Transaktivierung binden die Rezeptoren als Dimere an die HREs (Strähle et al., 1987). Inaktiv, d.h. ohne gebundenen Liganden, liegen die Rezeptoren als Monomere vor. Hierbei bilden sie ein vor

lysosomalem Abbau schützenden Komplex mit Hitzeschockproteinen (HSP) wie HSP40, HSP 70, HSP 90 α/β sowie dem HSP70/90-organizing-Protein (Pratt und Toft, 2003).

Die Topologie der Steroidhormonrezeptoren definiert verschiedene funktionelle Proteindomänen: die DNA-Bindungsdomäne, bestehend aus zwei konservierten Zinkfingern und einer variablen Hinge-Region, befindet sich im mittleren Segment des Moleküls (Berg, 1989). C-terminal liegt die konservierte Ligandenbindungsdomäne, sowie das für die Translokation des Rezeptors notwendige nukleäre Lokalisationssignal (NLS) (Mangelsdorf et al., 1995; Tsai und O'Malley, 1994). Zudem besitzt der Rezeptor zwei Aktivierungsdomänen, die unabhängig voneinander die Transkription beeinflussen können (Giguère et al., 1986; Truss et al., 1995). Die AF-1 Domäne (AF: engl. activation function) befindet sich am N-Terminus, die AF-2 Domäne befindet sich C-terminal (Evans, 1988).

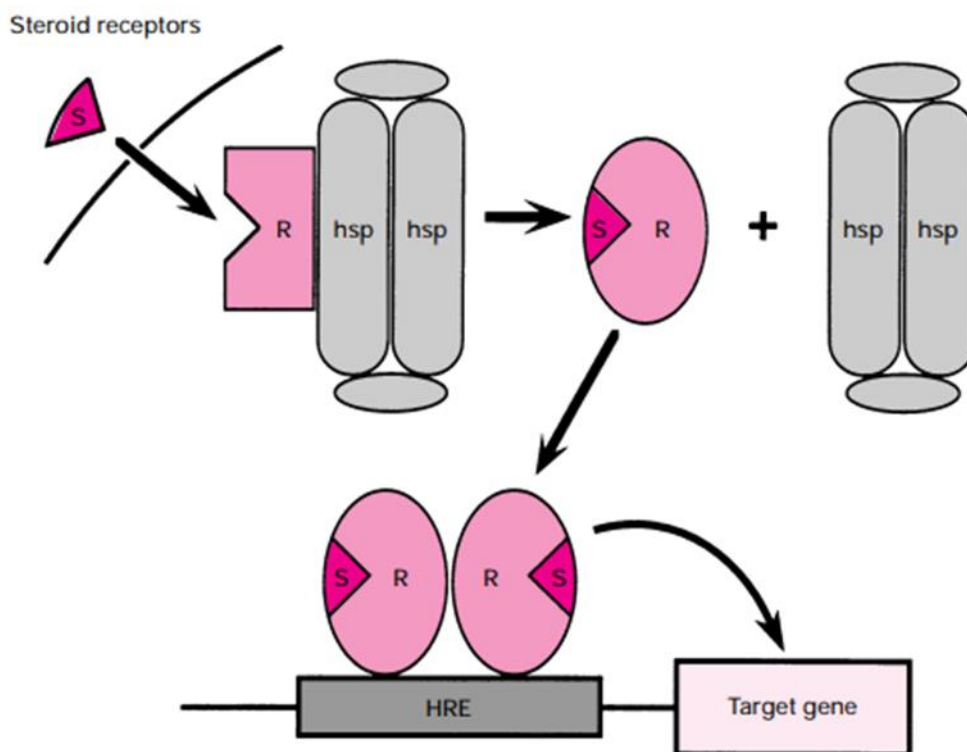


Abb. 1: Aktivierung des Steroidhormonrezeptors (Weigel, 1996). (S) Steroid, (R) Rezeptor, (hsp) Hitzeschockprotein, (HRE) Hormon-Response Element

Zu den Steroidhormonrezeptoren zählen der Androgen- (AR), Progesteron- (PR), und Östrogenrezeptor (ER), sowie ihre Isoformen (ER α , ER β , PR-A, PR-B). Sie unterscheiden sich in ihrer Ligandenbindungsdomäne, DNA-Bindungsdomäne und den Aktivierungsdomänen, so dass jeder Rezeptor einerseits spezifische Affinitäten für unterschiedliche Liganden und andererseits für regulatorische Elemente der DNA besitzt, sowie verschiedene Coregulatoren rekrutiert. Die Spezifität der Rezeptoren für Liganden ist teilweise überlappend (Eick et al., 2012).

In den letzten Jahrzehnten wurde der Fokus auf die Etablierung personalisierter, Target-spezifischer Therapien gelegt. Dabei sind Steroidhormonrezeptoren häufig Ziel der medikamentösen Therapie, deren Einsatz bereits bei PC und MC etabliert ist. Im Gegensatz dazu wird die endokrine Therapie bzw. Antihormontherapie bislang jedoch nicht standardmäßig bei der Behandlung des OCs eingesetzt. Studien zeigten eine geringe Ansprechrate von 18 % auf eine anti-östrogene Therapie mit selektiven Östrogenrezeptormodulatoren wie Tamoxifen bei Patientinnen mit persistierendem oder rezidiviertem Karzinom (Hatch et al., 1991). Lindemann et al. publizierte 2017 die Ergebnisse der ersten randomisierten Phase-III-Studie zur Wirksamkeit einer endokrinen Therapie mit Tamoxifen im Vergleich zur Chemotherapie bei platinresistenten Rezidiven. Hierbei betrug das mediane progressionsfreie Überleben unter Tamoxifen 8,3 Wochen und 12,7 Wochen unter Chemotherapie, bei gleichem Gesamtüberleben. Zudem beobachtete man bei der Tamoxifen-Gruppe geringere Nebenwirkungen bei erhöhter gesundheitsbezogener Lebensqualität. Daher könnte die endokrine Therapie mit Tamoxifen eine zu erwägende Therapieoption bei platinresistenten OC darstellen. (Lindemann et al., 2017) . Für die Therapie mit Aromatase-Inhibitoren wurden ähnliche Ergebnisse veröffentlicht. In einer klinischen Phase-II-Studie konnte bei 17% der ER-positiven Patientinnen eine Tumorabnahme über 50 % beobachtet werden und bei weiteren 26% stagnierte die Tumorprogression (Smyth et al., 2007).

Endokrine Therapie bzw. Antihormontherapie sind bei der Behandlung einiger Malignitäten bereits etabliert und bieten zudem vielversprechende Therapieoptionen. Steroidrezeptoren sind hierbei wichtige Zielstrukturen, deren Regulation und Modulation Gegenstand molekularbiologischer Forschung für die Entwicklung neuer Therapien sind. So werden auch onkologische Therapieansätze immer wichtigere Forschungsfelder der

Plasmamedizin. Effekte einer nicht-invasiven physikalischen Plasma (NIPP) Therapie auf die Expressionsrate von Steroidhormonrezeptoren könnten mögliche Therapieansätze liefern und zu einem besseren Verständnis der Plasmamedizin auf molekularer Ebene führen.

1.2 Physikalisches Plasma

Physikalisches Plasma ist ein ionisiertes, hochreaktives Gasgemisch. Es setzt sich aus geladenen Teilchen (Ionen), elektrisch neutralen Teilchen (Atomen, Molekülen), freien Elektronen sowie Photonen, Radikalen und elektromagnetischer Strahlung zusammen (Lendeckel et al., 2015). Diese Komponenten befinden sich in ständiger Wechselwirkung sowohl untereinander als auch mit ihrer Umgebung (Moisan et al., 2001). Neben fest, flüssig und gasförmig wird Plasma häufig als vierter Aggregatzustand bezeichnet, obwohl dieser, im Vergleich zu klassischen Aggregatzuständen, nicht nur von Temperatur und Druck abhängig ist (Vajenine, 2010). Plasma entsteht durch Anregung von Atomen und Molekülen eines Gases durch Energiezufuhr. Hierbei werden zunächst Elektronen angeregt, die dann aus der Atomhülle der Gasatome oder -moleküle dissoziieren. Plasma besitzt aufgrund frei beweglicher Elektronen und ionisierter Atome eine erhöhte Reaktivität sowie elektrische Leitfähigkeit (Gerling und Weltmann, 2016). Das für Plasma charakteristische Leuchten entsteht indem die angeregten Teilchen unter Emission von Photonen in ihren Grundzustand zurückkehren. Neben sichtbarem Licht und Wärmestrahlung als Formen elektromagnetischer Wellen emittiert Plasma auch UV-Strahlung, hauptsächlich UVB-Strahlen (Woedtke et al., 2013). Plasmen findet man in der Natur beispielsweise in Form von Himmelskörpern, Sternen oder Gewitterblitzen. Hierbei handelt es sich um heiße Plasmen mit Temperaturen bis zu mehreren Millionen Grad Celsius (Hoffmann et al., 2013). In Bezug auf Temperatur und Druck des Trägergases unterscheiden sich physikalische Plasmen. Man differenziert Hochdruck-, Normaldruck- bzw. Atmosphärendruck- und Niederdruckplasmen wie auch heiße (thermische) und kalte (nicht-thermische) Plasmen (Rehman et al., 2016; Weiss et al., 2015). Nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP) erzeugt Temperaturen unter 40 °C. Daher wird es als besonders gewebeverträglich beschrieben (Woedtke und Weltmann, 2016).

Die Bezeichnung dieser Plasmen variieren in der Literatur. Neben der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzung NIPP existieren als weitere Begriffe Tissue-Tolerable Plasma

(TTP), Cold Atmospheric (Pressure) Plasma (CA(P)P) sowie nicht-thermisches physikalisches Plasma (NTPP).

1.2.1 Physikalische Plasma Quellen

NIPP kann durch unterschiedliche physikalische Methoden erzeugt werden. Zum einen durch dielektrische Barriereentladung (DBD) zum anderen durch den Atmosphärendruck-Plasma-Jet (APPJ). Hierfür können verschiedene Trägergase wie Argon, Helium, Stickstoff, Heliox (Helium-Sauerstoff-Gemisch) und Luft verwendet werden (Hoffmann et al., 2013).

Die DBD besteht aus zwei flachen Metallelektroden: eine Hochspannungselektrode und eine geerdete Elektrode. Diese sind mit dielektrischem Material bedeckt. Zwischen den beiden Elektroden bewegt sich ein Trägergas, welches durch Ionisierung NIPP erzeugt. Hierfür sind hohe Spannungen erforderlich. Mit Wechselstrom erzeugte Hochspannungen treiben im Allgemeinen DBDs mit Frequenzen im kHz-Bereich an. Die Leistung liegt hierbei zwischen 10 und 100 W (Eliasson und Kogelschatz, 1991; Kogelschatz, 2003; Pietsch, 2001).

Der APPJ, der als Plasmanadel und Plasmastift im medizinischen Bereich eingesetzt wird, besteht aus zwei coaxialen Elektroden, zwischen denen ein Trägergas mit hoher Geschwindigkeit fließt. Die äußere Elektrode ist geerdet, während an der inneren Elektrode eine Hochfrequenzleistung (50-100 W) bei 13,56 MHz angelegt wird, die eine Entladung erzeugt (Hoffmann et al., 2013).

Der kINPen®MED (neoplas tools GmbH, Greifswald, Deutschland), der in dieser Arbeit als Plasma Quelle verwendet wurde, setzt sich aus einem Handinstrument, einem Hochfrequenzgenerator sowie einem Gaszufuhrsystem zusammen. NIPP wird unter Anlage von 2 - 6 kV Spannung mit einer Frequenz von 2,5 kHz generiert. Unter Verwendung von Argon als Trägergas wird bei einem Gasmengenstrom von 3 - 5 slm ein stabiler NIPP-Effluent von 9 – 13 mm Länge erzeugt. Die hierbei entstehenden Temperaturen von 35 - 38 °C ermöglichen eine schmerzfreie und gewebeschonende Anwendung am Menschen (Bekeschus et al., 2016; Reuter et al., 2018).

1.2.2 Physikalisches Plasma in medizinischen Anwendungen

In den letzten Jahren wurde NIPP hauptsächlich auf dem Gebiet der Wundheilung und der Behandlung infektiöser Hautkrankheiten eingesetzt (Weltmann und Woedtke, 2017). NIPP stimuliert bei kurzer Behandlungszeit und geringer Behandlungsintensität die Wundheilung (Chuangsuwanich et al., 2016; Schmidt et al., 2017). Hierbei spielt vermutlich die antibakterielle Aktivität von NIPP eine entscheidende Rolle. Sie wird durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) verursacht, welche ein hohes Reduktionspotenzial besitzen (Vatansever et al., 2013). Durch NIPP erzeugte RONS, insbesondere atomarer Sauerstoff, Ozon, Hydroxyl-Radikale und Wasserstoffperoxid, können die Phospholipid-Doppelschicht sowie Proteine innerhalb der Plasmamembran wie auch intrazellulärer Strukturen, z.B. Nukleinsäure, innerhalb der Bakterienzelle schädigen und so zum Zelltod führen (Dobrynin et al., 2009; Weidinger und Kozlov, 2015). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das im Plasma produzierte Stickstoffmonoxid (NO)-Radikal die Wundheilung und Geweberegeneration stimuliert (Shekhter et al., 2005). NO kann das Immunsystem beeinflussen und die Zellproliferation, die Angiogenese und die Kollagensynthese anregen. Dies führt zur Regeneration geschädigter Haut (Suschek und Opländer, 2016). Zudem wurde nachgewiesen, dass es kein erhöhtes Risiko bei der Anwendung von NIPP gibt. So gibt es keine Hinweise auf genotoxische Wirkungen. Der Einsatz von NIPP in der Zahnmedizin und die Anwendung in der Krebsbehandlung werden immer wichtigere Forschungsfelder der Plasmamedizin (Weltmann und Woedtke, 2017).

Onkologische Studien haben gezeigt, dass die Anwendung von NIPP zu einer selektiven Tötung von Krebszellen *in vitro* sowie Reduktion der Tumorgröße *in vivo* führte, wohingegen die Wirkung auf normale Zellen deutlich geringer war (Schlegel et al., 2013; Keidar et al., 2013; Vandamme et al., 2010). Der antiproliferative Effekt von NIPP auf verschiedene Krebszelllinien konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden (Yan et al., 2017). So auch für Brust- (Kim et al., 2010), Ovarial- (Koensgen et al., 2017) Haut- (Xia et al., 2019) und Lungenkrebszellen (Kim et al., 2011). Neben diesem antiproliferativen Effekt konnte nach NIPP Behandlung zudem eine gesteigerte Sensitivität von chemoresistenten Krebszellen gegenüber bestimmten Medikamenten beobachtet werden. So führte die NIPP-Behandlung Zytostatika-resistenter kolorektaler

Karzinomzellen zu einem verbesserten Ansprechen auf eine Chemotherapie (Ishaq et al., 2014).

Die zellulären und molekularen Mechanismen der antiproliferativen Wirkung von NIPP sind noch unklar und Gegenstand aktueller Studien (Yan et al., 2017). Die Induktion der Apoptose, Störung des Zellstoffwechsels sowie der Membranintegrität spielen hierbei eine entscheidende Rolle (Partecke et al., 2012). Vergleichbar mit den beschriebenen Mechanismen der bakteriziden Wirkung von NIPP, ist die Induktion der Apoptose durch den intrazellulären Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies zu erklären (Yan et al., 2015).

1.3 Fragestellung

Steroidhormone sind relevante onkogene Faktoren bei der Pathogenese hormonsensitiver Karzinome. So kann die durch sie vermittelte Signaltransduktion beispielsweise zu einer gesteigerten Proliferations- sowie Mitoserate führen. Steroidhormonrezeptoren nehmen dabei eine zentrale Rolle ein. Sie sind wichtige Biomarker zur klinischen Beurteilung von Tumoren und etablierte Zielstrukturen für die medikamentöse Therapie. Bei der Entwicklung neuer Therapien sind Steroidrezeptoren daher wichtige Zielstrukturen. Auch wenn die klinische Relevanz der Expression der verschiedenen Rezeptoren für die untersuchten Tumorentitäten PC, MC und OC kontrovers diskutiert wird, gilt die Modulation der Steroidhormonrezeptor-Expression als vielversprechende potentielle Therapiemöglichkeit.

NIPP-Behandlungen eröffnen neue Therapieansätze in der Onkologie. Die Fragestellung dieser Arbeit ist ob und wie eine NIPP Behandlung die Expressionsrate der Steroidhormonrezeptoren moduliert. Hierfür wurde zunächst der Rezeptorstatus in den hormonsensitiven Zelllinien LNCaP, MCF-7 und OVCAR-3 auf Proteinebene charakterisiert und geeignete Antikörper etabliert. Im Anschluss wurde der Einfluss einer NIPP Behandlung auf die Expressionsrate der Rezeptoren untersucht. Mögliche Effekte einer NIPP Therapie auf die Expressionsrate von Steroidhormonrezeptoren könnten potentielle Therapieansätze bedeuten und darüber hinaus zu einem besseren Verständnis der Plasmamedizin auf molekularer Ebene führen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
15ml Röhrchen	Corning Science Mexico (Reynosa, Mexiko)
50ml Falcon	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Absaugvorrichtung Integra Vacusafe	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
CASY Model TT – Cell counter and Analyzer	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN® Tetrasystem	Bio-Rad Laboratories (München)
Feinwaage ABS 120-4	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Filterpapier	Whatman (Dassel)
Filterspitzen SafeSeal Tips Professional	VWR (Leuven, Belgien)
Gewebekulturflasche 75 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht)
Glaspasteurpipette	VWR International (Darmstadt)
Heizblock QBT 1	CLF Laborgeräte (Emersacker)
Inkubator Heracell 240	Heraeus (Hanau)
Inkubator MCO-170 AICD-PE	PHCbi (AZ Etten-Leur, Niederlande)
Magnetrührer IKA RH basic 2	VWR International (Darmstadt)
Mikroskop AE31E	Motic (Wetzlar)
Mikrozentrifuge	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Molekulares Imaging-System Azure 300	Azure biosystems (Dublin, Irland)
Nitrozellulose-Membran PROTEAN®	Whatman (Dassel)
pH-Meter FiveEasy™ FE20	Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Schweiz)

Pipettensatz, 0,5-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand (Wertheim)
Plasmajet kINPen®MED	neoplas med (Greifswald)
PowerPack™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories (München)
Reagiergefäß 0,5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 2ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Rollmischer RS-TR 5	Phoenix Instruments (Garbsen)
SDS-PAGE Zubehör Mini-PROTEAN® System	Bio-Rad Laboratories (München)
Serologische Pipette 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilbank HERA safe	Heraeus Instruments (Hanau)
Sterilbank safe 2020	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
Thermocycler Personal Cycler	Biometra (Göttingen)
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories (München)
Vortex Mixer RS-VA10	Phoenix Instrument (Garbsen)
Waage EMB 2000-2	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Wasserbad	Memmert (Büchenbach)
Zellkulturplatte CELL + 6 well	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatte CELL + 24 well	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)

2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Feinchemie K.-H. Kallies KG (Sebnitz)
Coomassie® Brilliant Blue G 250	Fluka (Buchs, Schweiz)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)

Essigäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Milchpulver, fettarm	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Parafilm M®	Bemis (Wisconsin, USA)
Ponceau-S	Carl Roth (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trichloressigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween® 20	Sigma -Aldrich (Steinheim)

Kommerzielle Lösung	Hersteller
CASYblue	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
CASYclean	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
CASYton	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
DNase I	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Roti®-Block, 10xKonzentrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese®NF/Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	Carl Roth, Karlsruhe
SuperSignal™ West Dura	Thermo Scientific (Rockford, USA)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Herstellung
BSA-Antikörperlösung 5%; 50ml	2,5g BSA in 50ml TBS-T
Lämmli-puffer 5x; 5ml	1,25ml Glycerol, 0,25ml SDS(10%), 620µl β-Mercaptoethanol, 0,01mg Bromphenol, mit Lysispuffer (pH 6,8) auf 5ml auffüllen
Laufpuffer 10x; pH 8,3; 1l	144,13g Glycin (1,92 M), 29,04g Tris (0,24M) in 1000ml VE H ₂ O
Laufpuffer 1x, 1l	70ml 10x-Laufpuffer, 630ml VE H ₂ O, 700µl 10x-SDS
Lysispuffer; pH 6,8; 100ml	1,88g Tris (156 mM) in 100ml VE H ₂ O
Milchblock 5%; 50ml	2,5g Milchpulver in 50ml TBS-T
Ponceau-S	0,2% w/v Ponceau S; 3% v/v Trichloressigsäure
Roti®-Block-Antikörperlösung; 50ml	5ml Roti®-Block, 45ml TBS-T
Sammelgelpuffer; pH 6,8; 100ml	6,05g Tris (1,5M) in 100ml VE H ₂ O

SDS 10x; 50ml	50g SDS in 50ml VE H ₂ O
Transferpuffer; 1l	200ml Ethanol, 100ml 10x-Laufpuffer, 700ml VE H ₂ O
Trenngelpuffer; pH 8,8; 500ml	90,85g Tris (1,5M) in 500ml VE H ₂ O
Waschpuffer/TBS-Puffer 10x; pH 7,6; 1l	24,22g Tris (0,2M), 87,66g NaCl (1,5M) in 1000ml VE H ₂ O
Waschpuffer/TBS-T 1x; 1l	100ml 10x-TBS, 900ml VE H ₂ O, 1ml Tween

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper	Gebrauchsverdünnung	Hersteller
Anti-AR-XP™ rabbit	1:10.0000	Cell Signaling Technology, (Danvers, USA)
Anti-ERα mouse	1:10.0000	Cell Signaling Technology, (Danvers, USA)
Anti-ERβ mouse	1:10.0000	Thermo Fisher Scientific, (Massachusetts, USA)
Anti-GAPDH rabbit	1:10.0000	Cell Signaling Technology, (Danvers, USA)
Anti-PR mouse	1:10.0000	Cell Signaling Technology, (Danvers, USA)

Sekundärantikörper	Gebrauchsverdünnung	Hersteller
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	1:5000	Cell Signaling Technology, (Danvers, USA)
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:10.000	Cell Signaling Technology, (Danvers, USA)

2.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
LNCaP	CLS Cell Lines Service (Eppelheim)
MCF-7	CLS Cell Lines Service (Eppelheim)
MDA-MB-231	CLS Cell Lines Service (Eppelheim)
OVCAR-3	CLS Cell Lines Service (Eppelheim)
PC-3	CLS Cell Lines Service (Eppelheim)
SK-OV-3	CLS Cell Lines Service (Eppelheim)

2.1.6 Zellkultur: Medien und Zusätze

Produkt	Hersteller/Herstellung
DMEM/F12	PAN Biotech (Aidenbach)
DPBS	PAN Biotech (Aidenbach)
Fetales Rinderserum FBS	PAN Biotech (Aidenbach)
Gentamycin	PAN Biotech (Aidenbach)
Insulin-Transferrin-Selenium-Ethanolamine (ITS-X)	Gibco® Life Technologies (Carlsbad, USA)
RPMI 1640	PAN Biotech (Aidenbach)
Trypsin 10x	PAN Biotech (Aidenbach)
Trypsin 1x	5ml 10x-Trypsin, 45ml DPBS

Zelllinie	Medium und Zusätze
LNCaP	RPMI 1640, 50ml FBS, 620µl Genatmycin
MCF-7	DMEM/F12, 50ml FBS, 620µl Genatmycin
MDA-MB-231	DMEM/F12, 50ml FBS, 620µl Genatmycin
OVCAR-3	RPMI 1640, 50ml FBS, 620µl Genatmycin, 500µl Insulin
PC-3	RPMI 1640, 50ml FBS, 620µl Genatmycin
SK-OV-3	DMEM/F12, 25ml FBS, 620µl Genatmycin

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung werden Zellen schonend eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden die adhärenen Zellen mittels 2 ml 1xTrypsin vom Boden der Kultivierungsflasche gelöst und anschließend mit 4 ml Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden sie bei 300 x g für 3 min zentrifugiert. Das hierbei entstandene Zellsediment wurde in 2 ml Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurde je 1 ml dieser Suspension pro Kryovot in mit Isopropanol aufgefüllte Behälter bei -80 °C für 24 h tiefgekühlt. Die permanente Lagerung der Zellen erfolgte bei -196 °C im Stickstofftank.

Für das Wiederauftauen der Zellen stellte man die Kryovats für 30 s in ein 37 °C warmes Wasserbad. Danach wurden die Zellen mit 5-10 ml Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden sie bei 300 x g für 3 min zentrifugiert. Das so entstandene Sediment wurde nach Absaugen des Überstandes mit 1 ml Medium resuspendiert und anschließend in eine T75er Zellkulturflasche, in die bereits 10 ml Medium vorgelegt waren, überführt. Die

Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

2.2.2 Kultivierung und Normalpassage von Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 80-90 %, die zuvor lichtmikroskopisch abgeschätzt wurde. Nachdem das Zellmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt wurde, wurden diese mit 5 ml DPBS gewaschen, um nicht anhaftende Zellreste zu entfernen. Die adhärenenten Zellen wurden mittels 2 ml 1xTrypsin und 5-minütiger Inkubation bei 37 °C vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml Medium vollständig vom Boden der Kultivierungsflasche gelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt und bei 21 °C, 300 x g für 3 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt sowie das Zellsediment mit 1 ml Medium resuspendiert. Das anschließende Umsetzen erfolgte im Verhältnis von 1:2 bis 1:10, je nach Zelllinie und Bedarf, in T75 Flaschen, in die bereits 10 ml Medium vorgelegt waren.

2.2.3 Antikörpertitration /Rezeptorstatus

Um den Einfluss der NIPP Behandlung auf die Expressionsrate der Steroidhormonrezeptoren untersuchen zu können, musste zunächst der Steroidhormonrezeptorstatus in den hormonsensitiven Karzinomzelllinien LNCaP, MCF-7 und OVCAR-3 bestimmt werden. Zur Etablierung geeigneter Antikörper (AK) wurden zunächst Antikörper verschiedener Hersteller sowohl in den hormonsensitiven Zelllinien LNCaP, MCF-7 und OVCAR-3, wie auch in den hormonnegativen Zelllinien PC-3, MDA-MB-231 und SK-OV-3 getestet, welche als negativ-Kontrolle dienten. Hierbei variierten die Antikörperkonzentrationen (1:1000-1:10.000), die Lysatvolumina, die Blockierungsreagenzien (5% Milch-TBS-T, 3% BSA-TBS-T, 10% Roti®-Block-TBS-T) und die Gelkonzentrationen (8%, 10%, kommerzielle Gradientengele der Firma Bio-Rad). Zusätzlich wurde versucht durch hormonelle Stimulation mit Estradiol (E₂) bzw. mit Progesteron (P₄) die Expression der Steroidrezeptoren zu erhöhen.

Nach Etablierung ergaben sich folgende Parameter:

Tab. 1: Western Blot Parameter

AK	Spezies	Zelllinie	Hormonelle (Vor)Inkubation	Gel Konz.	Block	1.AK Konz.	2.AK Konz.
AR	rb	LNCaP	-	10%	5% Milch	1:10.000	1:10.000
ER α	ms	LNCaP	-	10%	5% Milch	1:10.000	1:5000
ER α	ms	MCF-7	48h Vorinkubation mit 100nM E ₂	10%	5% Milch	1:10.000	1:5000
Er β	ms	MCF-7	-	10%	10% Roti@Block	1:10.000	1:5000
PR-A/B	ms	MCF-7	Inkubation mit 100 μ M P4	8%	10% Roti@Block	1:10.000	1:5000
PR-A/B	ms	OVCAR-3	Inkubation mit 100 μ M P4	8%	10% Roti@Block	1:10.000	1:5000

2.2.4 Aussaat/ Ernte von Zellen und Bestimmung der Zellzahl

Für die verschiedenen Zellversuche wurden unterschiedliche Zellkulturgefäße verwendet. Dabei wurden 6-Well-Zellkultur-Platten für die 72 h-Wachstumskinetiken (3 Messzeiten) und 24-Well-Zellkultur-Platten für die 140 h bzw. 40 h-Wachstumskinetiken (6 bzw. 5 Messzeiten) verwendet. Da die Zellen unterschiedliche Wachstumsraten besitzen, die zusätzlich durch hormonelle Vor- bzw. Inkubation modifiziert wurden, wurde für jede Zelllinie eine bestimmte Anfangszellzahl pro Well ermittelt, so dass ein exponentielles Wachstum innerhalb der entsprechend vorgesehenen Inkubationszeit möglich war. Die Ernte erfolgte alle 24 h. Lediglich bei den mit 100 μ M Progesteron (P4) inkubierten Zellen (MCF-7, OVCAR-3) erfolgte die Ernte in einem anderen Rhythmus (4 h, 16 h 21 h, 27 h, 40 h). Die zeitliche Verkürzung der Messintervalle war aufgrund der P4-induzierten Inhibition des Zellwachstums notwendig. Um die Zellen zu ernten wurde zunächst das Medium aus den Wells abgesaugt. Im Anschluss wurden die Wells mit 3 ml DPBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 500 μ l 1xTrypsin für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml Medium resuspendiert und in ein Reagiergefäß überführt. Von der entstandenen Zellsuspension wurden 50 μ l in 10 ml CASYton suspendiert. Vor der Zellzählung wurde das CASY Cup fünfmal invertiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch das Gerät CASY Cell Counter + Analyser System Model TT. Die Messung bezieht sich hierbei auf vitale Zellen, die sich im elektrischen

Widerstand von toten Zellen bzw. von Zelltrümmern unterscheiden. Das Gerät wurde im Vorfeld auf die verwendeten Zelllinien kalibriert.

2.2.5 Aussaat von Zellen und NIPP-Behandlung

Aufgrund unterschiedlicher Wachstumseigenschaften der Zelllinien, die zusätzlich durch hormonelle Vor- bzw. Inkubation modifiziert wurden, wurde für jede Zelllinie eine individuelle Anfangszellzahl pro Well ermittelt, so dass sie innerhalb der entsprechend vorgesehenen Inkubationszeit exponentiell wachsen konnten. So wurden für LNCaP 300.000 Zellen, für MCF-7 200.000 Zellen, für MCF-7+100 nM E₂ (nach 48-stündiger - Estradiol Vorinkubation) 150.000 Zellen, für MCF-7+100 µM P4 300.000 Zellen und für OVCAR-3+100 µM P4 300.000 Zellen zu Beginn in je ein Well ausgesät. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels CASY Cell Counter. Mit der so ermittelten Zellzahl pro ml, konnte nun der Mastermix für die entsprechend benötigte Anzahl an Wells berechnet werden. Der Mastermix, der die exakte Menge Zellsuspension und Medium enthält, wurde für die NIPP Behandlung mit 200 µl/Well zunächst auf 24-Well-Zellkultur-Platten verteilt. Die NIPP Behandlung erfolgte mit dem kINPen®MED für 30 s mit kreisenden Bewegungen. Im Anschluss an die NIPP-Behandlung wurde die Zellsuspension in eine 6-Well-Zellkultur-Platte überführt. Diese wurde mit 3 ml Medium aufgefüllt und zusammen mit unbehandelter Zellsuspension, welche als Kontrolle diente, im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.2.6 Protein-Isolierung

Für die Versuche wurden 6-Well-Zellkultur-Platten verwendet. Pro Well wurden für LNCaP 300.000 Zellen, für MCF-7 200.000 Zellen, für MCF-7+100 nM E₂ 150.000 Zellen, für MCF-7+100 µM P4 300.000 Zellen und für OVCAR-3+100 µM P4 300.000 Zellen ausgesät. Nach 24 h, 48 h und 72 h bzw. nach 4 h, 16 h und 21 h (bei den mit 100 µM P4 inkubierten MCF-7 und OVCAR-3 Zellen) erfolgte die Ernte der Zellen. Zur Lysat-Herstellung wurden hierbei zwei Verfahren angewendet. Nach Absaugen des Mediums und DPBS Waschung wurden die Zellen für 10 min mit 100 µl bzw. mit 75 µl (bei den mit 100 µM P4 inkubierten MCF-7 und OVCAR-3 Zellen) Lysispuffer, der zuvor mit DNase versetzt wurde, auf Eis inkubiert. Im Anschluss konnte das Zell-Lysat mit einem Zellschaber aus dem Well gelöst und in ein Reagiergefäß überführt werden. Bei dem

anderen Verfahren wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums und DPBS Waschung mittels 500 µl 1xTrypsin vom Boden gelöst. Diese Enzymreaktion wurde nach 5 min mit 1 ml serum-haltigen Medium abgestoppt. Die so entstandene Zellsuspension wurde bei 21 °C, 300 x g, 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment wurde mit DPBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 75 µl-100 µl DNase-haltigen Lysispuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gelagert. Nach erneutem Resuspendieren wurden die Lysate bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.7 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht ein Auftrennen von Proteinen nach Gewicht und Ladung in einem elektrischen Feld. Das im Laufpuffer enthaltene SDS führt zu einer Linearisierung der Proteine und verleiht allen Proteinen eine negative Ladung. Damit wird der mögliche Einfluss von Protein-Eigenladung bei dem Lauf durch das Gel verhindert und die Proteine werden nach ihrer Molmasse aufgetrennt (Rehm und Letzel, 2016).

Für die SDS-PAGE wurde ein Gelsystem aus 6 % Sammelgel und 8 % (PR-A, PR-B) bzw. 10 % (AR, ER α , ER β) Trenngel verwendet. Die Gele wurden nach in Tabelle 2 dargestelltem Pipettierschema mit Hilfe einer Apparatur des Bio-Rad Gel Systems gegossen. Nach ihrer Herstellung wurden die Gele direkt verwendet oder in feuchtem Zellstoff bei 4 °C für max. eine Woche gelagert.

Die Lysate wurden vor dem Laden mit 5x Lämmli-Puffer versetzt und anschließend bei 95 °C für 10 min denaturiert. Im Anschluss wurden die Proben kurz abzentrifugiert und auf Eis abgekühlt.

Als Proteinmarker wurden 3,5 µl Page-Ruler verwendet. In die anderen Taschen wurden 20-25 µl der jeweiligen Proben pipettiert. Anschließend lief die Probe zunächst für 20-30 min bei 80 V in das Sammelgel, danach erfolgte die Auftrennung bei 120 V für 60-70 min im Trenngel.

Tab. 2: Pipettierschema für ein SDS-Gel

Reagenzien	Sammelgel 6%	Trenngel 8%	Trenngel 10%
ddH ₂ O	2,6 ml	3,7ml	3,2ml ddH ₂ O
30% Acrylamide	1ml	2,13ml	2,67ml
Sammelgelpuffer	1,25ml	-	-
Trenngelpuffer	-	2ml	2ml
10% SDS	50µl	80µl	80µl
10% APS	50µl	80µl	80µl
TEMED	5µl	8µl	8µl

2.2.8 Western Blotting

Beim Western Blotting werden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nitrozellulosemembran, Filterpapiere und Polyacrylamidgel wurden mittels Sandwich-Technik in Transferpuffer überführt. Der Transfer erfolgte im Semi-Dry-Verfahren im Transfer Blot Turbo. Die Proteine binden hierbei aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an die Nitrozellulosemembran. Der Proteintransfer wurde anschließend mit Ponceau-S-Färbelösung kontrolliert. Nach erfolgreicher Transfer-Kontrolle erfolgte die einstündige Blockierung freier Proteinbindungsstellen auf der Membran mit 5 % Magermilch (AR, ER α) oder mit Roti®-Block-Lösung (ER β , PR-A, PR-B). So wurde verhindert, dass Antikörper (AK) unspezifisch an freie Bindungsstellen anlagerten. Die Inkubation des ersten AKs erfolgte über Nacht bei einer Konzentration von 1:10.000. Die AK wurden hierfür entweder in 5 %-BSA (AR, ER α) oder in Roti®-Block-Lösung (ER β , PR-A, PR-B) gelöst. Um ungebundene Antikörper zu entfernen wurden die Membranen am folgenden Morgen 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h mit dem Sekundär-AK inkubiert. Die Konzentration variierte dabei zwischen 1:10.000 (rb) und 1:5.000 (ms). Anschließend wurden die Membranen erneut 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen. Der enzymgekoppelte Sekundärantikörper bindet mit seiner Fab-Region an die Fc-Region des primären Antikörpers. Bei diesem an den sekundären Antikörper gekoppelten Enzym handelt es sich um die horseradish peroxidase (dt. Meerrettichperoxidase) (HRP). HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol bzw. dessen Derivate in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann (Rehm und Letzel, 2016). Für die Detektion wurde die kommerzielle Detektionslösung SuperSignal™ West Dura verwendet. Sie erfolgte mit Hilfe des Molekularen Imaging-System für Western Blot Azure 300.

Abschließend wurde als Ladekontrolle die Proteinexpression der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) in einer Konzentration von 1:10.000 detektiert. Für die Quantifizierung wurde die Software Image J-win64 benutzt.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Analyse der Daten erfolgten mittels Microsoft Excel 2019. Alle Daten verstehen sich als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD), normiert auf die Kontrolle (=1) nach Durchführung von mindestens drei unabhängigen Versuchen pro Experiment. Für die Auswertung mit Microsoft Excel 2019 wurde der Student's t-Test verwendet, wobei die Signifikanzen wie folgt festgelegt wurden: $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) .

3. Ergebnisse

Wachstumsanalysen zeigten eine NIPP induzierte Inhibition der Zellproliferation. Für alle untersuchten Zelllinien (LNCaP, MCF-7, MCF-7+E₂, MCF-7+P4, OVCAR-3+P4) konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum ein signifikanter Unterschied der Proliferation zwischen NIPP- und unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde der Einfluss von NIPP auf die Expressionsrate von Steroidhormonrezeptoren (AR, ER α , ER β , PR-A und PR-B) als maßgeblicher Faktor des Zellwachstums in hormonabhängigen Zellen untersucht.

3.1 Einfluss der NIPP Behandlung auf die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP

Während unbehandelte Zellen, welche als Kontrolle dienten, ein annähernd exponentielles Wachstum aufwiesen (24 h: $3,8 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^4$; 48 h: $7,7 \times 10^5 \pm 6,2 \times 10^4$; 72 h: $1,4 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^5$), konnte nach NIPP Behandlung eine statistisch signifikante Inhibition des Zellwachstums nachgewiesen werden (24 h: $1,5 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4$, $p=0,0004$; 48 h: $2,4 \times 10^5 \pm 6,5 \times 10^4$, $p=0,0005$; 72 h: $3,7 \times 10^5 \pm 5,7 \times 10^4$, $p=0,0001$) (Abb. 2).

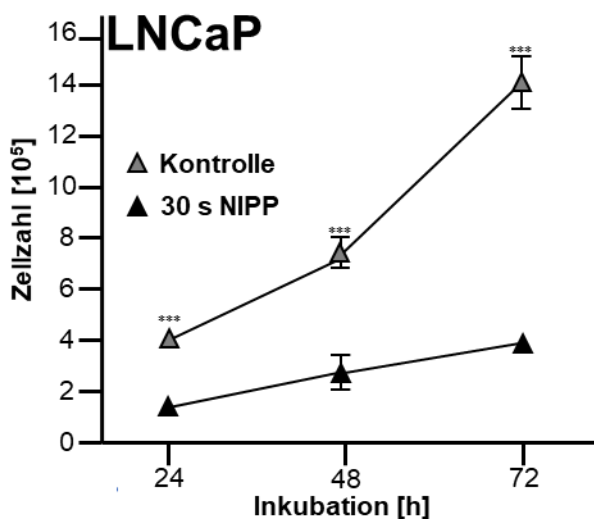


Abb. 2: Wachstumskinetik von LNCaP Zellen nach 30 s NIPP Behandlung

Inhibition des Zellwachstums von LNCaP Zellen nach 30 s Behandlung mit NIPP. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum

von 72 h bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

Nachdem der signifikante antiproliferative Effekt von NIPP auf LNCaP Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden der Einfluss von NIPP auf die Expressionsrate der Steroidhormonrezeptoren AR und ER α in LNCaP Zellen untersucht. Da weder ER β noch PR-A und PR-B zweifelsfrei in LNCaP Zellen nachgewiesen werden konnten, entfiel die Proteinanalyse dieser Rezeptoren für diese Zelllinie.

3.1.1 Proteinanalyse der AR Expression in LNCaP Zellen

In LNCaP Zellen zeigte sich keine signifikante Modulation der AR-Expression durch die Behandlung mit NIPP (Abb. 3).

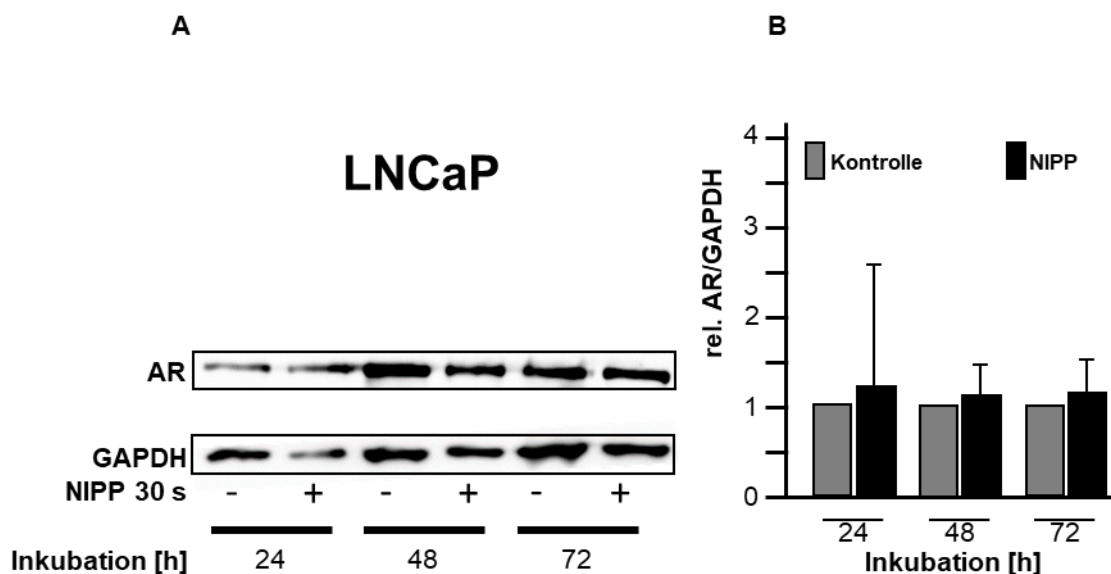


Abb. 3: Protein-Analysen von AR in LNCaP Zellen nach 30 s NIPP Behandlung

LNCaP Zellen unbehandelt und nach 30 s NIPP Behandlung über 72 h. Western Blot Analyse (A) und Quantifizierung (B) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle =1,0.

Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

3.1.2 Proteinanalyse der ER α Expression in LNCaP Zellen

Die ER α Expression in LNCaP Zellen (Abb. 4) zeigte nach 30 s NIPP Behandlung und anschließender Inkubation zunächst keine Modulation der Expression. Nach 48 h war eine signifikante Induktion zu beobachten, welche jedoch nach 72 h nicht mehr signifikant war (24 h: $2,6 \pm 1,9$, $p = 0,0998$; 48 h: $4,1 \pm 2,8$, $p = 0,0415$; 72 h: $2,3 \pm 1,4$, $p = 0,1075$).

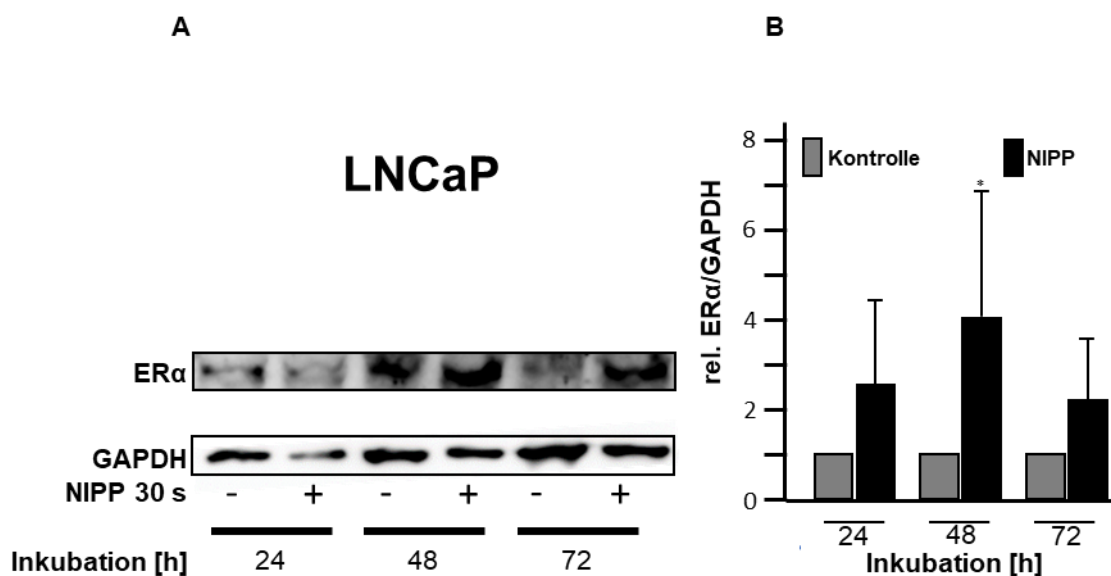


Abb. 4: Protein-Analysen von ER α in LNCaP Zellen nach 30 s NIPP Behandlung

LNCaP Zellen unbehandelt und nach 30 s NIPP Behandlung über 72 h. Western Blot Analyse (A) und Quantifizierung (B) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle = 1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

3.2 Einfluss der NIPP Behandlung auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7

Der antiproliferative Effekt von NIPP auf MCF-7 Zellen ist in Abb. 5 gezeigt. Während die unbehandelten Zellen ein annähernd exponentielles Wachstum zeigten (24 h: $1,90 \times 10^5 \pm 2,45 \times 10^4$; 48 h: $2,74 \times 10^5 \pm 2,86 \times 10^4$; 72 h: $4,81 \times 10^5 \pm 1,23 \times 10^5$), führte die Behandlung mit NIPP für 30 s ab 24 h zu einer statistisch signifikanten

Wachstumshemmung (24 h: $6,8 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^4$, $p=0,0047$; 48 h: $8,4 \times 10^4 \pm 2,6 \times 10^4$, $p=0,0011$; 72 h: $1,5 \times 10^5 \pm 3,6 \times 10^4$, $p=0,0109$).

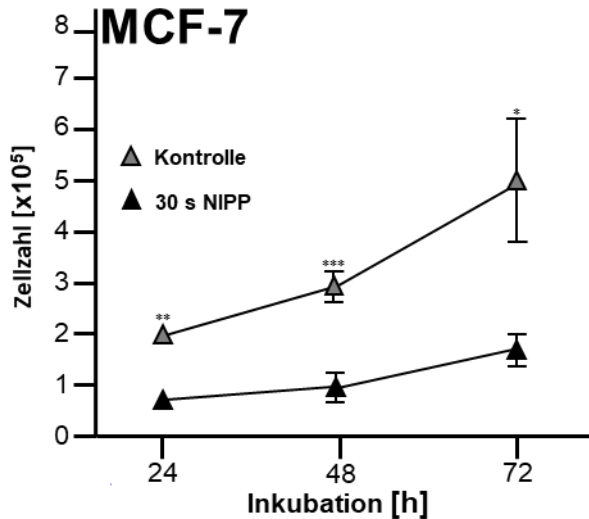


Abb. 5: Wachstumskinetik von MCF-7 Zellen nach 30 s NIPP Behandlung

Zellzahlreduktion von MCF-7 Zellen nach 30 s Behandlung mit NIPP. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 72 h bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

Nachdem der signifikant antiproliferative Effekt von NIPP auf MCF-7 Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden der Einfluss von NIPP auf die Expressionsrate der Steroidhormonrezeptoren ER α , ER β , PR-A und PR-B untersucht. Sowohl für den Nachweis von ER α als auch für PR-A und PR-B war eine hormonelle Vor- bzw. Inkubation der Zellen mit 17- β Östradiol (E₂) bzw. Progesteron (P4) notwendig. AR war nicht zweifelsfrei in MCF-7 Zellen nachweisbar. Somit entfiel die Proteinanalyse dieses Rezeptors für diese Zelllinie.

3.2.1 Proteinanalyse der ER β Expression in MCF-7 Zellen

In MCF-7 Zellen zeigte sich zunächst keine signifikante Beeinflussung der ER β -Expression nach 30 s NIPP Behandlung (Abb. 6). Die ER β Expression nahm im zeitlichen

Verlauf zu und zeigte nach 48 h und 72 h eine signifikante Induktion (24 h: $1,2 \pm 0,5$, $p=0,3764$; 48 h: $2,7 \pm 1,4$, $p=0,0324$; 72 h: $4,1 \pm 2,2$, $p=0,0332$).

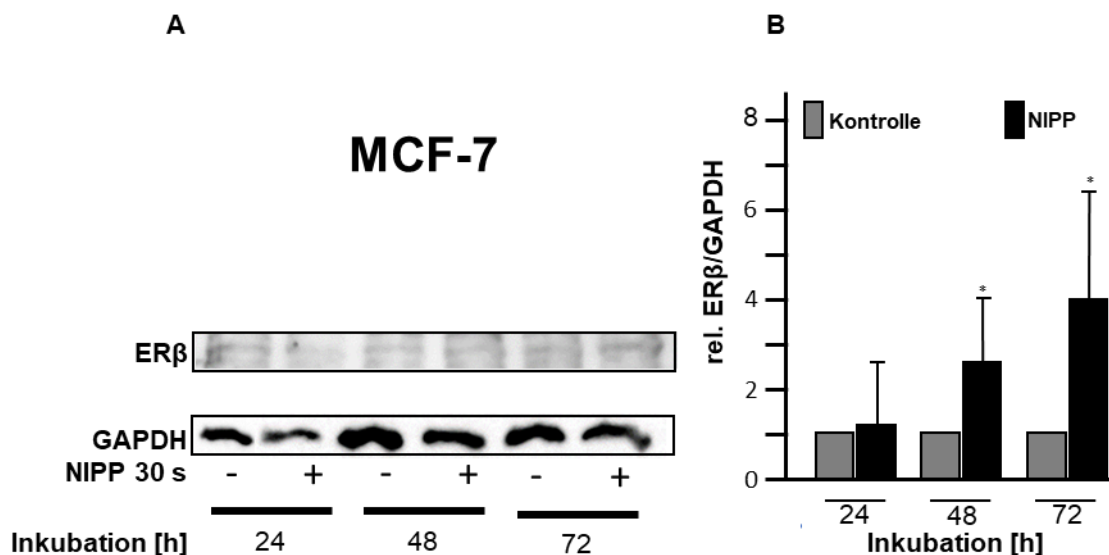


Abb. 6: Protein-Analysen von ERβ in MCF-7 Zellen nach 30 s NIPP Behandlung

MCF-7 Zellen unbehandelt und nach 30 s NIPP Behandlung über 72 h. Western Blot Analyse (A) und Quantifizierung (B) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle = 1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

3.2.2 Einfluss von Estradiol auf die Zellproliferation von MCF-7 Zellen

E_2 nimmt maßgeblich Einfluss auf die Zellproliferation. Zum einen führt eine Stimulation der intrazellulären ERs über die gesteigerte transkriptionelle Aktivität zu einer Zunahme der Zellproliferation (Hall und McDonnell, 1999; Osborne und Schiff, 2005; Beato et al., 1995; Mangelsdorf et al., 1995), zum anderen wird die Stimulation eines membranständigen Rezeptors und anschließender Aktivierung einer nicht-genomischen MAPK-vermittelten Signalkaskade diskutiert (Kelly und Levin, 2001; Migliaccio et al., 1996; Song und Santen, 2006).

Auf Proteinebene war ERα in MCF-7 Zellen ohne 48-stündige E_2 Vorinkubation nicht zweifelsfrei nachweisbar. Die E_2 vermittelte Stimulation der ERα Expression machte

aufgrund der proliferativen Wirkung eine Anpassung der Zellzahl in diesem Experiment notwendig.

Die folgende Wachstumskinetik zeigt die E₂ induzierte Induktion der Zellproliferation. MCF-7 Zellen ohne E₂ Inkubation zeigten ein beinahe exponentielles Wachstum (24 h: $1,1 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^3$; 48 h: $4,0 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^3$; 72 h: $1,0 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^4$; 96 h: $2,5 \times 10^5 \pm 4,4 \times 10^4$; 120 h: $2,9 \times 10^5 \pm 5,1 \times 10^4$; 144 h: $4,2 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$). Bei E₂ Inkubation hingegen war eine tendenzielle, z.T. signifikante Induktion der Proliferation zu beobachten (24 h: $1,6 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^3$, $p=0,0098$; 48 h: $4,0 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$, $p=0,7699$; 72 h: $1,1 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4$, $p=0,4534$; 96 h: $3,1 \times 10^5 \pm 7,1 \times 10^4$, $p=0,265$; 120 h: $4,5 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^4$, $p=0,0069$; 144 h: $7,6 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$, $p=0,0256$).

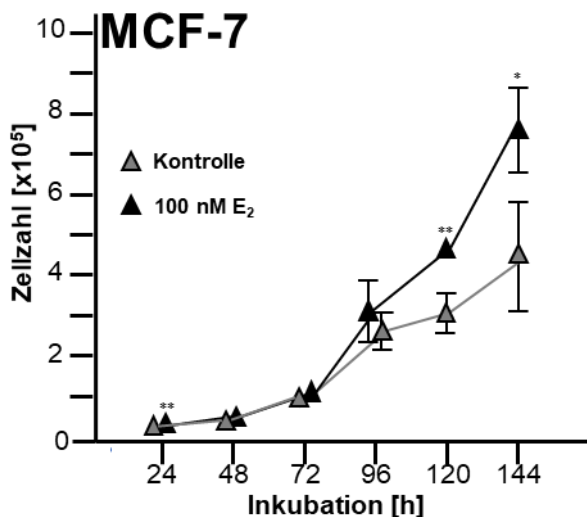


Abb. 7: Wachstumskinetik von MCF-7 Zellen mit E₂ Inkubation

Wachstumsförderung von MCF-7 Zellen durch Inkubation mit 100 nM E₂. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 144 h bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***)).

3.2.2.1 Einfluss der NIPP Behandlung auf MCF-7 Zellen nach E₂ Vorinkubation

Unbehandelte Zellen, die als Kontrolle dienten, zeigten in Anwesenheit von E₂ ein annähernd exponentielles Wachstum (24 h: $1,6 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^4$; 48 h: $3,5 \times 10^5 \pm 6,0 \times 10^4$; 72 h: $6,5 \times 10^5 \pm 9,4 \times 10^3$), wohingegen nach NIPP Behandlung eine statistisch signifikante Hemmung der E₂ stimulierten Proliferation nachgewiesen werden konnte (24 h: $9,4 \times 10^4 \pm 6,2 \times 10^3$, $p=0,0002$; 48 h: $1,1 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^4$, $p=0,0003$; 72 h: $1,4 \times 10^5 \pm 8,3 \times 10^3$, $p=0,0000$) (Abb. 8).

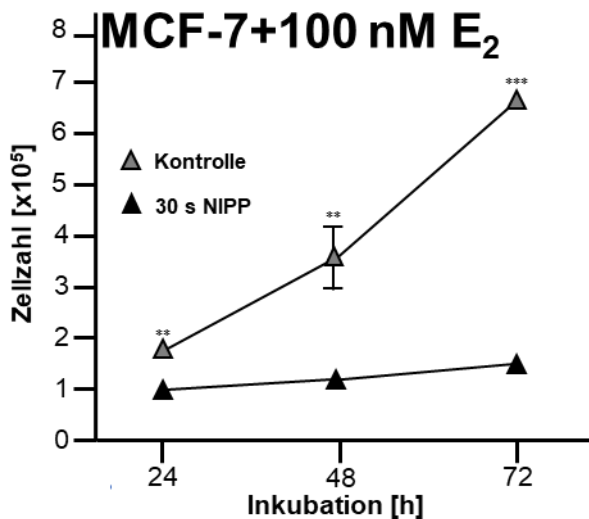


Abb. 8: Wachstumskinetik von MCF-7 Zellen nach E₂ Vorinkubation und nach 30 s NIPP Behandlung

Inhibition von MCF-7 Zellen+100 nM E₂ nach 30 s Behandlung mit NIPP. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 72 h bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert ± SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (**).

3.2.2.2 Proteinanalyse der ER α Expression in mit 100 nM E₂ vorinkubierten MCF-7 Zellen

Die ER α Expression in mit E₂ vorinkubierten MCF-7 Zellen (Abb. 9) zeigte nach 30 s NIPP Behandlung eine zunächst signifikante Induktion von ER α (24 h: $2,5 \pm 1,4$, $p=0,0437$; 48 h:

$1,6 \pm 0,6$, $p=0,0569$). Diese Induktion nahm im zeitlichen Verlauf ab und war nach 72 h nicht mehr signifikant (72 h: $0,8 \pm 0,5$, $p=0,3234$).

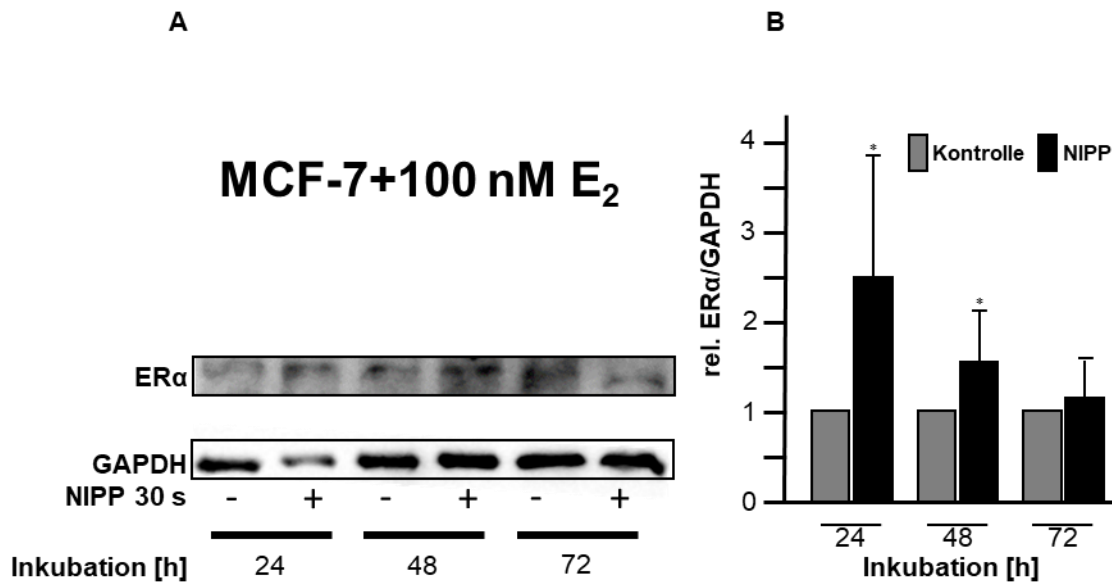


Abb. 9: Protein-Analysen von ERα in MCF-7 Zellen nach E₂ Vorinkubation und nach 30 s NIPP Behandlung

MCF-7 Zellen nach Vorinkubation mit 100 nM E₂ unbehandelt und nach 30 s NIPP Behandlung über 72 h. Western Blot Analyse (A) und Quantifizierung (B) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle =1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

3.2.3 Einfluss von Progesteron auf die Proliferation von MCF-7 Zellen

Wie einleitend angeführt war für den Nachweis von PR-A und PR-B eine hormonelle Inkubation der MCF-7 Zellen mit 100 μ M Progesteron (P4) notwendig. In Mammakarzinom Zellen ist der Mechanismus der Progesteron-Wirkung noch unklar (Henderson, 1991). Auf zellulärer Ebene werden sowohl wachstumshemmende als auch wachstumsfördernde Effekte beschrieben (Howell und Wakeling, 1987). Antiproliferative Effekte, die im Tierversuch oder klinisch beobachtet wurden, scheinen P4-dosisabhängig zu sein (Horwitz et al., 1985; Key und Pike, 1988).

Aufgrund der beobachteten inhibitorischen Wirkung der P4 Inkubation auf MCF-7 Zellen wurde Inkubationszeit in diesem Experiment angepasst.

Die folgende Wachstumskinetik zeigt die P4 induzierte Reduktion der Zellproliferation. MCF-7 Zellen ohne P4 Inkubation zeigten ein deutliches Wachstum (4 h: $1,4 \times 10^4 \pm 2,9 \times 10^3$; 16 h: $1,4 \times 10^4 \pm 4,0 \times 10^3$; 21 h: $3,7 \times 10^4 \pm 3,0 \times 10^4$; 27 h: $4,0 \times 10^4 \pm 2,9 \times 10^3$; 40 h: $4,8 \times 10^4 \pm 4,5 \times 10^3$). Bei P4 Inkubation hingegen war eine tendenzielle, z.T. signifikante Inhibition der Proliferation zu beobachten (4 h: $1,3 \times 10^4 \pm 6,5 \times 10^3$, $p=0,7944$ 16 h: $1,4 \times 10^4 \pm 9,2 \times 10^3$, $p=0,9289$; 21 h: $1,9 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$, $p=0,3914$; 27 h: $2,3 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$, $p=0,0788$; 40 h: $1,2 \times 10^4 \pm 9,1 \times 10^3$, $p=0,0036$). Im Folgendem wurden die Zellen für die Analyse der Rezeptoren für 4 h, 16 h und 21 h inkubiert.

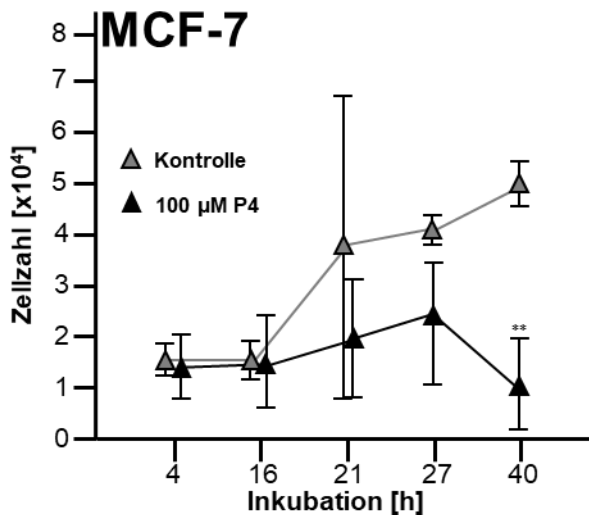


Abb. 10: Wachstumskinetik von MCF-7 Zellen unter P4 Inkubation

Inhibition von MCF-7 Zellen durch Inkubation mit 100 µM P4. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 40 h bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***)

3.2.3.1 Einfluss der NIPP Behandlung auf MCF-7 Zellen mit P4 Inkubation

Während unbehandelte Zellen, die als Kontrolle dienen, ein annähernd exponentielles Wachstum zeigten (4 h: $3,5 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^4$; 16 h: $4,8 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4$; 21 h: $5,8 \times 10^5 \pm 4,0 \times 10^4$),

konnte nach NIPP Behandlung eine statistisch signifikante Reduktion der Proliferation nachgewiesen werden (4 h: $1,6 \times 10^5 \pm 4,1 \times 10^3$, $p=0,0018$; 16 h: $2,8 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^4$, $p=0,0115$; 21 h: $2,6 \times 10^5 \pm 6,6 \times 10^3$, $p=0,0081$) (Abb. 11).

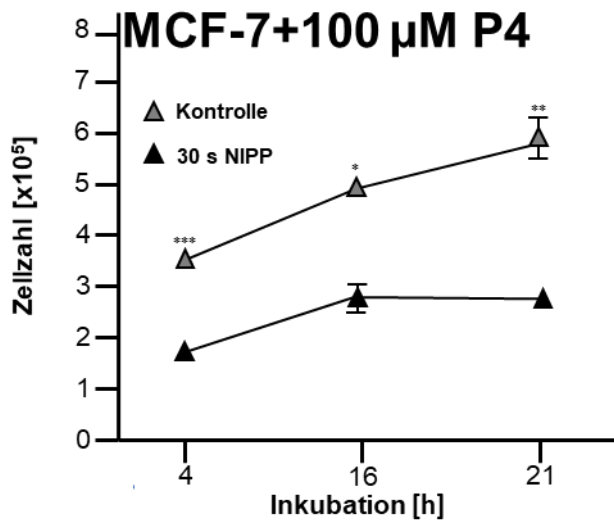


Abb. 11: Wachstumskinetik von MCF-7 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung

Inhibition von MCF-7 Zellen+100 µM P4 nach 30 s Behandlung mit NIPP. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 21 h bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***)).

3.2.3.2 Proteinanalyse der PR-A Expression in mit 100 µM P4 inkubierten MCF-7 Zellen

Die PR-A Expression in mit P4 inkubierten MCF-7 Zellen (Abb. 12) zeigte nach 30 s NIPP Behandlung eine signifikante Induktion für den gesamten Beobachtungszeitraum (4 h: $1,7 \pm 0,7$, $p=0,0187$; 16 h: $1,8 \pm 1,0$, $p=0,0146$; 21 h: $1,7 \pm 0,8$, $p=0,162$).

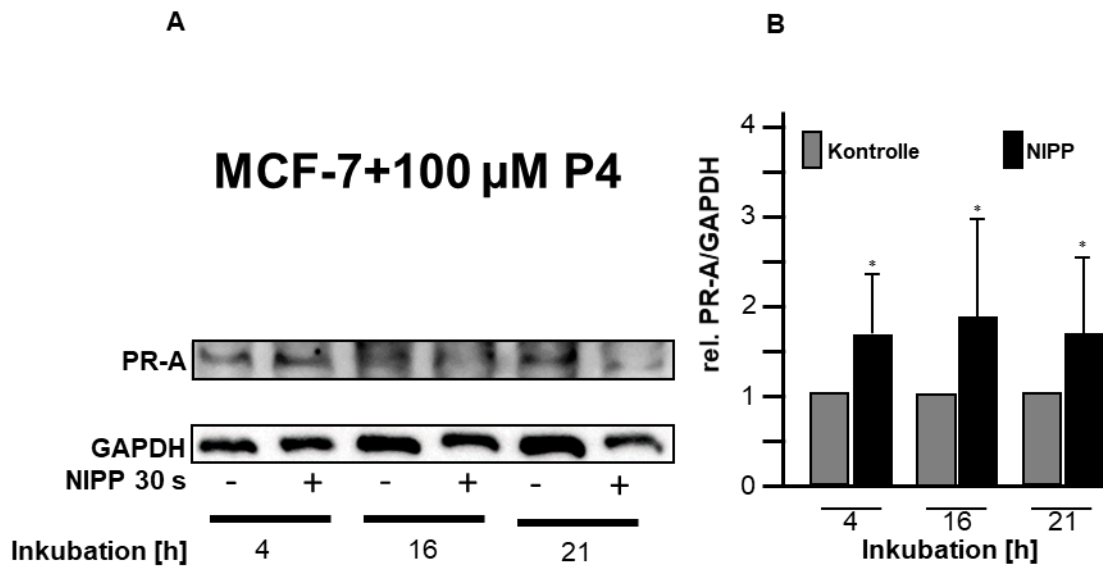


Abb. 12: Protein-Analysen von PR-A in MCF-7 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung

MCF-7 Zellen unter Inkubation mit 100 μ M P4 unbehandelt und nach 30 s NIPP Behandlung über 21 h. Western Blot Analyse (A) und Quantifizierung (B) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle =1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) .

3.2.3.3 Proteinanalyse der PR-B Expression in mit 100 μ M P4 inkubierten MCF-7 Zellen

Die PR-B Expression in mit P4 inkubierten MCF-7 Zellen (Abb. 13) zeigte nach 30 s NIPP Behandlung zunächst keine Modulation der Proliferation. Nach 21 h war jedoch auch hier eine signifikante Induktion zu beobachten (4 h: $0,9 \pm 0,4$, $p = 0,3818$; 16 h: $1,2 \pm 0,5$, $p = 0,4611$; 21 h: $2,2 \pm 0,9$, $p = 0,0323$).

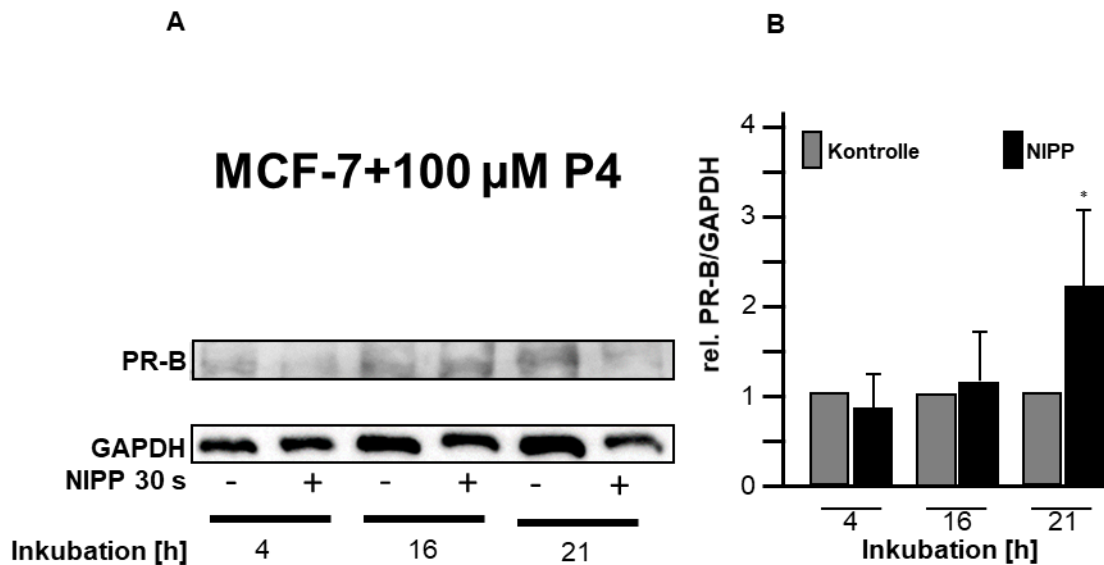


Abb. 13: Protein-Analysen von PR-B in MCF-7 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung

MCF-7 Zellen unter Inkubation mit 100 μ M P4 unbehandelt und nach 30 s NIPP Behandlung über 21 h. Western Blot Analyse (A) und Quantifizierung (B) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle =1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***)

3.3 Einfluss der NIPP Behandlung auf die Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3

Ähnlich wie bei MCF-7 Zellen war für den Nachweis von PR-A und PR-B in OVCAR-3 Zellen eine hormonelle Stimulation mit P4 notwendig. Die anderen zu untersuchenden Rezeptoren (AR, ER α , ER β) konnten nicht zweifelsfrei in OVCAR-3 Zellen nachgewiesen werden. Daher entfiel die Proteinanalyse dieser Rezeptoren für OVCAR-3 Zellen.

3.3.1 Einfluss von Progesteron auf die Proliferation von OVCAR-3 Zellen

Auch in Bezug auf die Proliferation von Ovarialkarzinomen wird die Wirkung des Progesterons in der Literatur kontrovers beschrieben (Modugno et al., 2012). Schwangerschaften und die längerfristige Einnahme oraler, Progesteron-haltiger Kontrazeptiva senken das Risiko für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms (Hunn und Rodriguez, 2012; McGowan et al., 1979). So scheinen hohe Progesteron-Spiegel einen protektiven Effekt auf die Entstehung eines Ovarialkarzinoms auszuüben.

Aufgrund der beobachteten inhibitorischen Wirkung der P4 Inkubation auf OVCAR-3 Zellen wurde die Inkubationszeit in diesem Experiment angepasst.

Die folgende Wachstumskinetik zeigt die P4 induzierte Reduktion der Zellproliferation. OVCAR-3 Zellen ohne P4 Inkubation zeigten ein beinahe exponentielles Wachstum (4 h: $7,4 \times 10^3 \pm 8,6 \times 10^2$; 16 h: $8,5 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$; 21 h: $2,0 \times 10^4 \pm 4,0 \times 10^3$; 27 h: $2,3 \times 10^4 \pm 7,0 \times 10^3$; 40 h: $2,4 \times 10^4 \pm 4,6 \times 10^3$). Bei P4 Inkubation hingegen war eine tendenzielle, z.T. signifikante Inhibition der Proliferation zu beobachten (4 h: $7,4 \times 10^3 \pm 3,6 \times 10^3$, $p=0,9998$ 16 h: $4,6 \times 10^3 \pm 3,1 \times 10^3$, $p=0,1149$; 21 h: $7,9 \times 10^3 \pm 2,3 \times 10^3$, $p=0,0140$; 27h: $1,0 \times 10^4 \pm 5,0 \times 10^3$, $p=0,0561$; 40 h: $5,6 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^3$, $p=0,0043$). Für die folgenden Rezeptoranalysen wurden Inkubationszeiten von 4 h, 16 h und 21 h gewählt.

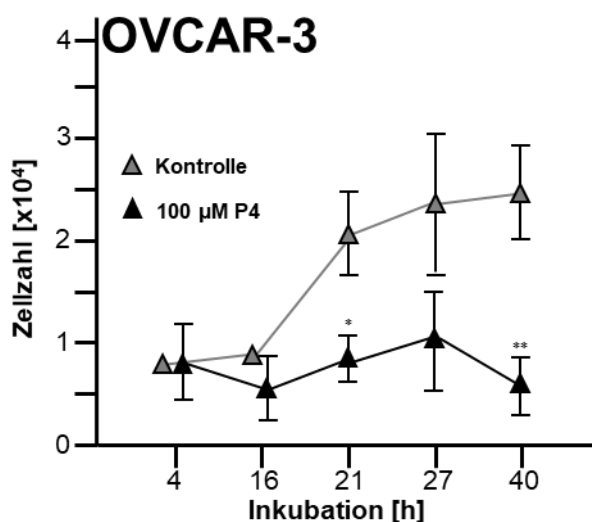


Abb. 14: Wachstumskinetik von OVCAR-3 Zellen unter P4 Inkubation

Inhibition von OVCAR-3 Zellen durch Inkubation mit 100 µM P4. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 40 h bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***)).

3.3.2 Einfluss der NIPP Behandlung auf OVCAR-3 Zellen mit P4 Inkubation

Unbehandelte Zellen, die als Kontrolle dienten, zeigten ein annähernd exponentielles Wachstum (4 h: $1,6 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^4$; 16 h: $1,7 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$; 21 h: $1,3 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^4$),

während nach NIPP Behandlung eine statistisch signifikante Inhibition der Proliferation nachgewiesen werden konnte (4 h: $8,2 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^4$, $p=0,0269$; 16 h: $1,0 \times 10^5 \pm 4,1 \times 10^3$, $p=0,0148$; 21 h: $8,1 \times 10^4 \pm 8,6 \times 10^2$, $p=0,0546$) (Abb. 15).

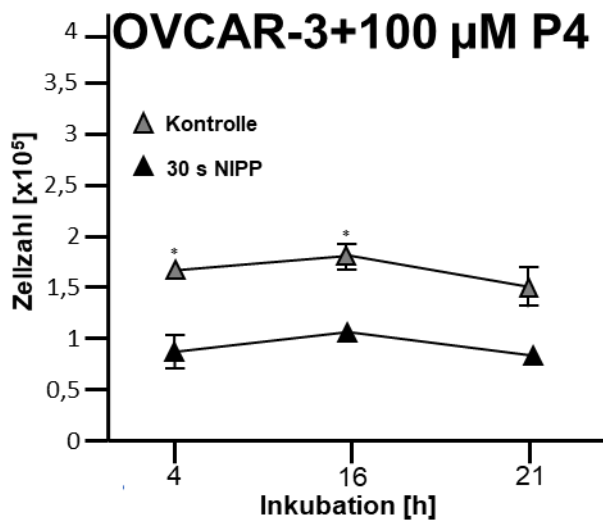


Abb. 15: Wachstumskinetik von OVCAR-3 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung

Inhibition von OVCAR-3 Zellen+100 µM P4 nach 30 s Behandlung mit NIPP. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 21 h bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) .

3.3.2.1 Proteinanalyse der PR-A Expression in mit 100 µM P4 inkubierten OVCAR-3 Zellen

In OVCAR-3 Zellen zeigte sich keine signifikante Modulation der PR-A-Expression nach Behandlung mit NIPP (Abb. 16).

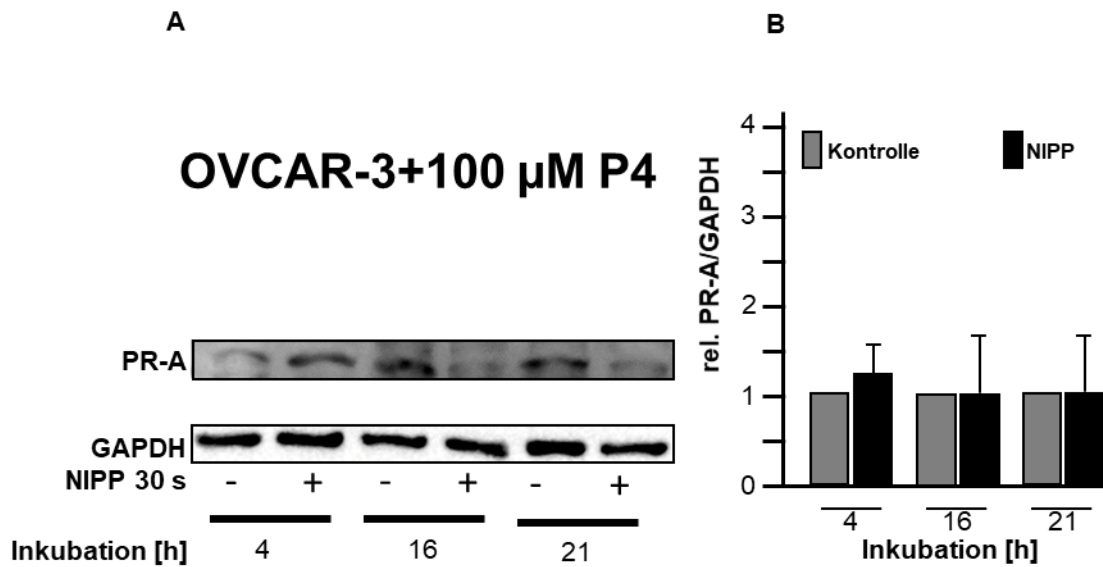


Abb. 16: Protein-Analysen von PR-A in OVCAR-3 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung

OVCAR-3 Zellen unter Inkubation mit 100 μ M P4 unbehandelt und nach 30 s NIPP Behandlung über 21 h. Western Blot Analyse (A) und Quantifizierung (B) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle =1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***)

3.3.2.2 Proteinanalyse der PR-B Expression in mit 100 μ M P4 inkubierten OVCAR-3 Zellen

Die PR-B Expression in mit P4 inkubierten OVCAR-3 Zellen (Abb. 17) zeigte nach 30 s NIPP Behandlung zunächst keine Modulation der Proliferation. Nach 21 h war jedoch eine signifikante Inhibition der PR-B Expression zu beobachten (4 h: $1,0 \pm 0,2$, $p = 0,6357$; 16 h: $1,0 \pm 0,7$, $p = 0,8804$; 21 h: $0,7 \pm 0,2$, $p = 0,0120$).

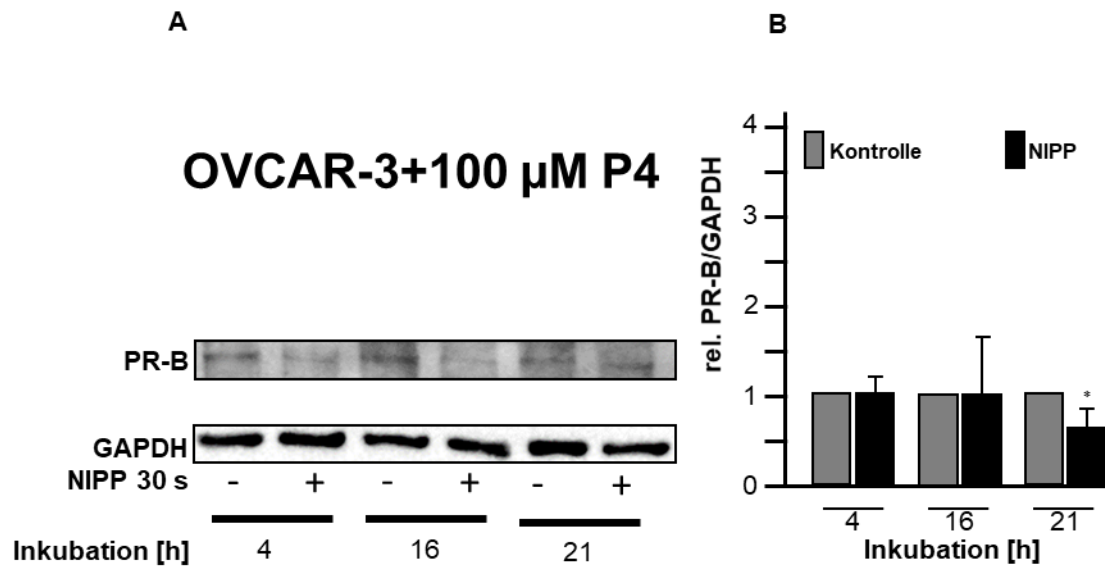


Abb. 17: Protein-Analysen von PR-B in OVCAR-3 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung

OVCAR-3 Zellen unter Inkubation mit 100 μ M P4 unbehandelt und nach 30 s NIPP Behandlung über 21 h. Western Blot Analyse (A) und Quantifizierung (B) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle =1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (**).

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den Steroidhormonrezeptorstatus in den hormonsensitiven Karzinomzelllinien LNCaP, MCF-7 und OVCAR-3 auf Proteinebene zu bestimmen, um im Anschluss den Einfluss einer NIPP Behandlung auf die Expressionsrate der Rezeptoren zu untersuchen. Der zweifelsfreie Nachweis der Rezeptoren gestaltete sich schwierig, da nur wenige monoklonale Antikörper kommerziell erhältlich sind. Antikörper, die in publizierten Arbeiten verwendet wurden, wurden zum Teil nicht näher beschrieben oder waren teilweise nicht mehr auf dem Markt verfügbar. Zur Etablierung geeigneter Antikörper wurden daher zunächst Antikörper verschiedener Hersteller sowohl in den hormonsensitiven Zelllinien LNCaP, MCF-7 und OVCAR-3, wie auch in den hormoninsensitiven Zelllinien PC-3, MDA-MB-231 und SK-OV-3 getestet, welche als negativ-Kontrolle dienten. Hierbei variierten Antikörperkonzentration, Lysatvolumen, Blockierung und Gelkonzentration. Zusätzlich wurde versucht durch hormonelle Inkubation bzw. Vorinkubation die Expression der Rezeptoren zu induzieren.

Nach Etablierung und Optimierung der Steroidrezeptordetektion ergab sich folgender Rezeptorstatus:

Tab. 3: Steroidhormonrezeptorstatus

Zelllinie	Malignität	Steroidhormonrezeptor
LNCaP	PC	AR, ER α
MCF-7	MC	ER β
MCF-7 + 100 nM E ₂	MC	ER α
MCF-7 + 100 μ M P4	MC	PR-A, PR-B
OVCAR-3 + 100 μ M P4	OC	PR-A, PR- B

Diesbezügliche Angaben in der Literatur variieren, besonders, wenn man Arbeiten mit verschiedenen labordiagnostischen Methoden miteinschließt. Vergleiche mit Studien auf Proteinebene zeigten, dass in LNCaP Zellen sowohl AR, als auch ER α und ER β exprimiert werden (Abazid et al., 2019). LNCaP gilt als PR negativ. In diesem Zusammenhang konnte bei der Literaturrecherche nur eine OC-Zell-Studie gefunden

werden, die LNCaP beim Western Blot als negativ-Kontrolle u.a. für PR verwendet (McCormick et al., 2017). Hier wurde keine Differenzierung zwischen den PR Isoformen vorgenommen. In MCF-7 Zellen konnte die Expression von AR (Amicis et al., 2019) und ER α sowie ER β (Song et al., 2019) nachgewiesen werden. Die Expression von PR in MCF-7 Zellen wird kontrovers beschrieben. Neben dem völligen Fehlen des PRs (Tao DD et al., 2004) wurde in anderen Studien eine Induktion des PRs durch hormonelle Inkubation möglich (M F Press et al., 1989; Eckert und Katzenellenbogen, 1982). Diese Studien unterschieden nicht zwischen den PR Isoformen. Der Rezeptorstatus für OVCAR-3 Zellen wird in der vergleichenden Literatur sowohl als ER α und ER β (Schüler-Toprak et al., 2017), AR (Ahonen et al., 2000), wie auch PR (Peluso et al., 2008) positiv beschrieben. Die Isoformen PR-A und PR-B wurden hierbei nicht unterschieden. Der Hersteller CLS beschreibt LNCaP als AR und ER positiv, MCF-7 als ER und PR positiv und OVCAR-3 als AR, ER und PR positiv.

Nach Untersuchung des Steroidhormonrezeptorstatus in den hormonsensitiven Karzinomzelllinien LNCaP, MCF-7 und OVCAR-3 wurde der Einfluss der NIPP Behandlung auf die Expressionsrate der Steroidhormonrezeptoren untersucht. Steroidhormonrezeptoren sind wichtige Biomarker zur klinischen Beurteilung von Tumoren und etablierte Zielstrukturen für die medikamentöse Therapie. Sie sind zentrale onkogene Faktoren bei der Progression maligner Gewebe. Wachstum und Regulation hormon-abhängiger Gewebe hängen maßgeblich von der Kontrolle durch Steroidhormonrezeptoren ab. Die klinische Relevanz der Expression der verschiedenen Rezeptoren wird jedoch für die untersuchten Tumorentitäten PC, OC und MC kontrovers diskutiert und ist noch nicht abschließend geklärt. Dennoch gilt die Modulation der Steroidhormonrezeptor-Expression als vielversprechende potentielle Therapiemöglichkeit.

4.1 Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein klassischer Steroidhormonrezeptor und verantwortlich für die Entwicklung der männlichen Geschlechtsorgane, des männlichen Erscheinungsbildes und der männlichen Verhaltensweisen. Zudem ist er unverzichtbar für die physiologische Funktionsleistung der Prostata (Dehm und Tindall, 2006). Auch in der weiblichen Biologie spielt der AR eine wichtige Rolle. Er wird bei beiden

Geschlechtern in verschiedenen Geweben exprimiert. So auch in der Brust (Zhou, 2010). Weiterhin konnte in Versuchen mit AR-Knockout-Mäusen ein gestörter Eisprung und ein beeinträchtigt Follikelwachstum beobachtet werden. Das zeigt, dass AR für eine normale Fruchtbarkeit von Frauen unerlässlich ist (Walters et al., 2010). Auch bei der Entwicklung der weiblichen Brust sind Androgene beteiligt. Testosteron wird bei Frauen in den Eierstöcken und Nebennieren synthetisiert. Im Brustgewebe wird Testosteron in Dihydrotestosteron (DHT) oder E_2 umgewandelt und bindet an AR oder $ER\alpha$. Dies führt dann entweder zu einer Hemmung oder einer Stimulierung der Zellproliferation (Dimitrakakis et al., 2003; Zhou et al., 2000). Die Entwicklung und das Wachstum von PC werden durch Testosteron und DHT gesteuert, die ihre biologische Wirkung durch Bindung an den AR entfalten. Der AR fungiert nach Liganden-Bindung als Transkriptionsfaktor und nimmt so Einfluss auf die Zellproliferation und die Hemmung der Apoptose (Heinlein und Chang, 2004; Dehm und Tindall, 2006; Gelmann, 2002). Eine AR-Expression wurde bei fast allen primären und metastasierten PC gefunden, unabhängig von ihrem Stadium und Grad. Die AR-Signalübertragung bleibt aktiv und unterstützt das Überleben und Wachstum von PC-Zellen (Crnalic et al., 2010). Studien lieferten kontroverse Ergebnisse in Bezug auf den prognostischen Wert der AR-Expression bei primären PC. Hierbei zeigten 20 % der Studien einen Zusammenhang zwischen hoher AR-Expression und guter Prognose und 26 % einen Zusammenhang mit schlechter Prognose. Die restlichen Studien konnten keinen Zusammenhang zeigen (Tamburrino et al., 2012).

Die Expression von AR konnte bei der Untersuchung der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP gezeigt werden. Nach NIPP Behandlung konnte keine Modulation der Expressionsrate von AR festgestellt werden. In der Vergangenheit haben mehrere Studien zur Androgenresistenz AR-Spleißvarianten (AR-V) als Mechanismus für die Androgensignalübertragung identifiziert (Dehm et al., 2008; Hu et al., 2009). Aufgrund alternativer Spleißvorgänge fehlt den AR-Vs die C-terminal gelegene Ligandenbindungsdomäne (Thelen et al., 2020; Wadosky und Koochekpour, 2017). Dadurch verlieren sowohl Androgensyntheseinhibitoren, wie auch Antiandrogene ihren therapeutischen Nutzen (Li et al., 2013; Hu et al., 2012). Einige AR-Vs, auch die häufigste Spleißvariante AR-V7, sind konstitutiv aktiv. Sie können, unabhängig von einer

Ligandenbindung, mit sich selbst oder dem vollständigen AR dimerisieren, in den Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsfaktoren fungieren und somit proliferative Prozesse fördern (Dehm et al., 2008). Möglicherweise könnten solche AR-Spleißvarianten auch an der Resistenzvermittlung von LNCaP Zellen gegenüber einer NIPP Behandlung beteiligt sein.

Im Vergleich zu der PC-Zelllinie LNCaP war in der untersuchten MC-Zelllinie MCF-7 der Nachweis von AR auf Proteinebene nur möglich, wenn sehr hohe Lysatmengen verwendet wurden. Aufgrund der geringen AK Sensitivität und suboptimaler Detektionsmöglichkeiten wurde auf die Untersuchung der AR Expressionrate in MCF-7 Zellen nach NIPP Behandlung verzichtet.

Laut Literatur wird der AR in ca. 70 % aller MC exprimiert und korreliert dort mit einem positiven ER-Status (Witzel et al., 2010). Unabhängig von der Koexpression des ERs ist die Expression des ARs bei MC mit einem besseren Gesamtüberleben und einem besseren krankheitsfreien Überleben assoziiert (Vera-Badillo et al., 2014). Dennoch ist der Wert von AR als Biomarker und therapeutisches Ziel beim MC noch nicht vollständig geklärt. Man führt die widersprüchlichen Ergebnisse auf die Heterogenität der Krankheit sowie auf die Tatsache zurück, dass es keinen genau definierten Grenzwert für die AR-Positivität gibt (Anestis et al., 2020). AR kann in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit von Östrogenen als Suppressor oder Auslöser der Tumorprogression fungieren (Need et al., 2012). Diese Tatsache ermöglicht den Einsatz von Androgenen und Antiandrogenen in potenziellen Therapieregimen.

AR wird in vielen Zelltypen exprimiert. Die Androgen/AR-Signalübertragung fördert die Tumorentstehung und Metastasierung bei verschiedenen Krebsarten, einschließlich des OCs (Chang et al., 2014; Modugno et al., 2012). Eine Überexpression des ARs beim OC wurde vielfach belegt. In immunhistochemischen Studien konnte eine AR-Expression in 43,5-86 % der epithelialen OC nachgewiesen werden (Cardillo MR, 1998; Chadha et al., 1993; Sheach et al., 2009) . Demnach spielt AR eine zentrale Rolle bei der Progression von OC und stellt ein potenzielles therapeutisches Ziel für die Behandlung von OC dar (Chung et al., 2021).

In der untersuchten Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 war der Nachweis von AR auf Proteinebene nicht möglich. Auch die vergleichende Literatur konnte keinen AR Nachweis auf Proteinebene in OVCAR-3 Zellen zeigen.

4.2 Östrogenrezeptor

Man unterscheidet verschiedene Östrogenrezeptoren (ER). ER α und ER β sind die bekanntesten Isoformen. Zusätzlich sind ER β -Isoformen (ER β 1-5) bekannt, die sich durch eine jeweils spezifische Sequenz in Exon 8 unterscheiden (Speirs und Shaaban, 2009). Sie sind klassische Steroidhormonrezeptoren. Weiterhin existieren noch neben dem G protein-coupled estrogen receptor sogenannte estrogen-related receptors.

ER- α und ER- β weisen eine vergleichbare Bindungsaffinität zu E₂ auf (Kuiper et al., 1997). Ihre Expression ist gewebespezifisch. Beide werden in der Mamma, im Ovar und im Zentralnervensystem exprimiert. ER α wird überwiegend in Uterus, Mamma und Leber exprimiert (Couse et al., 1997). ER β hingegen wird besonders in den Ovarien und in der Prostata exprimiert. Konnte aber auch im Uterus, Hoden, Brust und Colon gefunden werden (Foley et al., 2000; Kuiper et al., 1997; Kuiper et al., 1996).

Bei der Untersuchung der PC-Zelllinie LNCaP konnte von den beiden ER Isoformen nur ER α spezifisch nachgewiesen werden. Nach NIPP Behandlung war nach 48 h eine signifikante Steigerung der ER α Expression zu beobachten. Laut Literatur werden beide ER-Isoformen im PC exprimiert (Grindstad et al., 2016). Die Funktionen von ER α und ER β bei der Karzinogenese des PCs sind noch nicht gänzlich verstanden. Beim PC wird ER α , bei dessen Expression nach 48 h eine signifikante Zunahme beobachtet werden konnte, eine onkogene Rolle und ER β eine eher antiproliferative Funktion zugesprochen. (Attia und Ederveen, 2012; Ricke et al., 2008).

Im Vergleich zu der PC-Zelllinie LNCaP, konnte in der untersuchten MC-Zelllinie MCF-7 die Expression beider ER Isoformen mittels Western Blot nachgewiesen werden. Sowohl bei ER α als auch bei ER β war eine signifikante Induktion der Expression nach NIPP Behandlung zu beobachten. Interessanterweise werden den beiden Isoformen gegensätzliche Eigenschaften bei der Tumorgenese des MCs zugeschrieben. Beim MC werden beide Isoformen des ERs exprimiert (Enmark et al., 1997; Palmieri et al., 2004). Hierbei wurde bei ER α eine proliferative und anti-apoptotische Wirkung nachgewiesen

(Doisneau-Sixou et al., 2003; Peng und Jordan, 2008). Es wird angenommen, dass ER α maßgeblich an der Pathogenese von MC beteiligt ist (Rachel Schiff et al., 2003). Nach NIPP Behandlung konnte für die Expression von ER α nach 24 h und 48 h eine signifikante Zunahme beobachtet werden. Allerdings war für den Nachweis von ER α in MCF-7 Zellen eine 48-stündige Vorinkubation mit E₂ notwendig. Weiterhin wird vermutet, dass ER β die ER α vermittelte Östrogenwirkung antagonisieren kann. Die Bindung von E₂ an ER β wirkt sowohl antiproliferativ als auch pro-apoptotisch (Mitter et al., 2005). Während ER α als Aktivator der Transkription fungiert, kann ER- β die Transkription reprimieren (Gustafsson, 1999). ER β wird als Tumorsuppressor mit anti-proliferativen Eigenschaften diskutiert (Lazennec et al., 2001). Auch für die Expression von ER β konnte nach NIPP Behandlung und Inkubation für 48 h und 72 h eine Zunahme beobachtet werden. Die Tatsache, dass die Expression beider Isoformen nach NIPP Behandlung anstieg, ER β aber im Gegensatz zu ER α auch noch nach 72 h signifikant erhöht war und seine Eigenschaft als Tumorsuppressor sowie Antagonist der ER α vermittelten E₂-Wirkung, lassen es sinnvoll erscheinen, den Beobachtungszeitraum nach NIPP Behandlung zu verlängern.

Im Vergleich zu nicht malignen Mammazellen, konnte man in MC-Zellen eine veränderte Expression des ERs beobachten. Dabei kommt es im Verlauf der Karzinogenese zu einer Zunahme der ER α - und einer Abnahme der ER β -Expression (Leygue et al., 1998; Roger et al., 2001). Zudem wird im MC eine ER α -Isoform mit gesteigerter Sensitivität gegenüber E₂ exprimiert (Fuqua et al., 2000). Veränderungen der Hormonrezeptor-Expression spielen demnach eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese des MCs.

Eine ähnliche Bedeutung hat der ER bei der Karzinogenese des OCs. Die ER-Isoformen ER- α und ER- β sind unterschiedlich in tumorösem Gewebe des Ovars exprimiert (Chan et al., 2008). Die Rolle des ER, insbesondere des ER α , in der Tumorgenese und Progression des OCs ist noch nicht vollständig geklärt. Beide ER Isoformen ähneln sich in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren. Jedoch unterscheiden sie sich signifikant bezogen auf ihre klinische Bedeutung (Burges et al., 2010). Hierbei gilt ER α als potentieller Faktor in der Genese des Ovarialkarzinoms. In-vitro Studien konnten eine gesteigerte Proliferation durch die Bindung von E₂ an ER α für Ovarialkarzinome zeigen (O'Donnell et al., 2005). Andere Studien beschreiben eine günstige Prognose bei Expression von ER α (Burges et al., 2010; Sieh et al., 2013). Im Vergleich wird ER β in

den meisten Studien als proliferationssuppressiv und somit prognostisch günstig beschrieben (Bossard et al., 2012; Schüler-Toprak et al., 2018). Gesunde Ovarial Zellen weisen eine höhere ER β -Expression auf als OC Zellen. Dies könnte eine mögliche Ursache für die Entstehung des OCs sein (Lazennec, 2006). Eine höhere ER β -Expression korreliert mit einer längeren krankheitsfreien Überlebensrate sowie mit einem höheren Gesamtüberleben (Rutherford, 2000). Im Laufe der Tumorgenese ist eine Verschiebung der ER α /ER β -Ratio zu Gunsten des ER α zu beobachten (Pujol et al., 1998).

In der untersuchten Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3 war der Nachweis von ER α und ER β auf Proteinebene nicht zweifelsfrei möglich.

4.3 Progesteronrezeptor

Auch der Progesteronrezeptor (PR) ist ebenfalls ein klassischer Vertreter der Familie der Steroidhormonrezeptoren. Der Transduktionsmechanismus verläuft analog zu dem oben beschriebenen Mechanismus für Steroidhormonrezeptoren (Diep et al., 2015). Der PR weist drei Isoformen auf: PR-A, PR-B und der kleinere PR-C. PR-A und PR-B sind auf einem gemeinsamen Gen kodiert. Verantwortlich für ihre jeweilige Expression ist der Translationsstartpunkt an zwei unterschiedlichen AUG-Startsignalen und der Promoter an dem die Translation beginnt. (Conneely et al., 1987). Es konnte beobachtet werden, dass die Expression der Isoformen sowohl vom Hormon- und Wachstumsstatus als auch vom Verlauf der Karzinogenese abhängig ist (Conneely et al., 2001). PR-A spielt hierbei eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Reproduktionsfunktionen und für die Entwicklung des Uterus. PR-B hingegen ist essentiell für die Entwicklung der Mamma (Conneely et al., 2001).

Bis heute ist der prognostische und therapeutische Wert von PR-A und PR-B beim PC noch nicht definiert und wird kontrovers diskutiert. In einer Studie von 2018 mit einer großen multizentrischen Kohorte (n = 535) und einer langen Nachbeobachtungszeit (durchschnittlich 12,4 Jahre) konnte die PR-A-Expression ausschließlich im Stromagewebe von PCs nachgewiesen werden. PR-B wurde sowohl in Stroma- als auch in Epithelzellen exprimiert. Das gleiche Expressionsmuster wurde hierbei auch bei gesunden Kontrollproben festgestellt. Diese Studie konnte einen negativen prognostischen Effekt hoher PR-B-Spiegel beim PC beobachten (Grindstad et al., 2018).

Auf Proteinebene war die Expression beider PR Isoformen in der untersuchten PC-Zelllinie LNCaP nicht nachweisbar. Da es sich bei LNCaP Zellen um Epithelzellen handelt und diese laut Grindstad et al. lediglich PR-B exprimieren, könnte das zumindest die fehlende Expression von PR-A in LNCaP Zellen erklären.

Im Gegensatz zu der Studie von Grindstad et al. wurde in anderen Studien eine antiproliferative Funktion beider PR-Isoformen durch Hemmung der Expression von CyclinA, CyclinB und cdc25c und der daraus resultierenden Verzögerung des Zellzyklus beobachtet (Yu et al., 2013). Auch Chen et al. beschrieben eine hemmende Wirkung des PRs auf die benigne Prostatahyperplasie, die Entwicklung eines reaktiven Stromas und das Fortschreiten des PCs (Chen et al., 2017).

Im Gegensatz zum PC, ist die Rolle der PR Isoformen im MC besser beschrieben. Das Verhältnis von PR-A zu PR-B ist ein entscheidender Faktor für die physiologische Reaktion auf Progesteron (P4) in Brustkrebszellmodellen und in klinischen Studien (Mote et al., 2008). In gesunden Geweben werden PR-A und PR-B in der Regel zu gleichen Verhältnissen exprimiert. Bei Frauen mit hohem Brustkrebsrisiko findet man meist eine unausgewogene PR-A- und PR-B-Expression der gesunden Brust vor. Zudem konnten auch veränderte Verhältnisse in Brusttumoren mit endokriner Resistenz in Verbindung gebracht werden (Mote et al., 2004; Venkitaraman, 2002). PR-B gilt als die stärker proliferative Isoform und könnte als solche in erster Linie für die dysplastischen Phänotypen in diesen Tumoren verantwortlich sein (Faivre und Lange, 2007). Die Expression von PR-A und PR-B konnte bei der Untersuchung der MC-Zelllinie MCF-7 unter Inkubation mit 100 μ M P4 gezeigt werden. Nach NIPP Behandlung und 21-stündiger Inkubation stieg die PR-B Expression signifikant an. PR-A gilt als repressive Isoform. Er reprimiert die PR-B- und ER α -Transkriptionsaktivitäten (Kraus et al., 1995; Tung et al., 1993). Der Verlust von PR-A führt über die Methylierung des Promotors zum Verlust seiner schützenden Wirkung (Pathiraja et al., 2011). Nach NIPP konnte eine signifikante Zunahme der PR-A Expression nach 4 h, 16 h und 21 h beobachtet werden. Auch hier zeigte sich, dass ein längerer Beobachtungszeitraum nach NIPP Behandlung interessant gewesen wäre, da die Expression des als repressiv beschriebenen PR-A konstant signifikant erhöht war. Wohingegen die Expression seines proliferativen Gegenspielers PR-B erst nach 21 h zunahm. Da die Detektion der AK nur unter P4 Inkubation möglich

war und P4 eine Inhibition des Zellwachstums induzierte, war es nicht möglich den Beobachtungszeitraum entsprechend zu verlängern.

Auch bei der Untersuchung der OC-Zelllinie OVCAR-3 konnte unter Inkubation mit 100 mM P4 die Expression von PR-A und PR-B gezeigt werden. Nach NIPP Behandlung konnte eine signifikante Reduktion der PR-B Expression nach 21 h beobachtet werden, wohingegen die NIPP Behandlung keinen Einfluss auf die Expressionsrate von PR-A hatte. Beiden Isoformen werden gegensätzliche Eigenschaften in der Karzinogenese des OCs zugesprochen. PR-B gilt hierbei im Gegensatz zu seiner Funktion im MC als prognostisch günstiger Faktor. Die unterschiedliche Auswirkung der NIPP Behandlung auf die Expressionsrate beider Isoformen, macht deutlich, dass auch hier ein längerer Beobachtungszeitraum interessant gewesen wäre.

Zahlreiche epidemiologische Daten deuten darauf hin, dass P4 eine schützende Rolle bei der Krebsentstehung in den Ovarien spielt. So führt ein P4-Mangel aufgrund von zunehmendem Alter, Unfruchtbarkeit oder einem genetischen loss of heterozygosity (LOH) am PR-Genlocus zu einem erhöhten Risiko für Ovarialkrebs (Edmondson und Monaghan, 2001; Gabra et al., 1996). Im Gegensatz dazu sollen hohe P4-Spiegel einen protektiven Effekt auf die Entstehung eines OCs haben. So wurde bereits beschrieben, dass Schwangerschaften und die längerfristige Einnahme oraler, Progesteron-haltiger Kontrazeptiva das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, senken (Hunn und Rodriguez, 2012; McGowan et al., 1979). Auch in dieser Arbeit konnte ein antiproliferativer Effekt unter Inkubation mit 100 μ M P4 sowohl auf MCF-7 als auch auf OVCAR-3 Zellen beobachtet werden. Darüber hinaus ist die PR-Expression, insbesondere PR-B, in Ovarialtumoren ein günstiger prognostischer Marker, der mit einem längeren progressionsfreien Überleben einhergeht (Akahira et al., 2000; Akahira et al., 2002; Lenhard et al., 2012). Nur wenige Studien betrachteten eine unterschiedliche Expression der PR-Isoformen in Ovarialtumoren. Diese Studien beobachteten eine Dominanz der PR-B-Expression in Ovarialtumoren bei allen Subtypen. Hierbei wurde PR-B häufig im serösen OC exprimiert. Zudem konnte eine schwache Expression von PR-A in muzinösen und serösen OC beobachtet werden. Der Vergleich von normalem mit malignem Ovarialgewebe ergab eine reduzierte bis fehlende Expression von PR-A in malignen

Tumoren im Vergleich zu PR-B (Lenhard et al., 2012; Akahira et al., 2000; Akahira et al., 2002).

Tab. 4: Zusammenfassung Ergebnisse/klin.Relevanz

Zelllinie	Malignität	Rezeptor (WB)	Expression nach NIPP	Klin.Relevanz der Rezeptoren
LNCaP	PC	AR	=	AR proliferativ
LNCaP	PC	ER α	↑	ER α proliferativ
MCF-7	MC	ER β	↑	ER β antiproliferativ
MCF-7 + 100nM E ₂	MC	ER α	↑	ER α proliferativ
MCF-7 + 100 μ M P4	MC	PR-A	↑	PR-A antiproliferativ
MCF-7 + 100 μ M P4	MC	PR-B	↑	PR-B proliferativ
OVCAR-3 + 100 μ M P4	OC	PR-A	=	PR-A proliferativ
OVCAR-3 + 100 μ M P4	OC	PR-B	↓	PR-B antiproliferativ

Wie bereits einleitend erwähnt, wird die Expression sowie die klinische Relevanz der verschiedenen Steroidhormonrezeptoren sehr kontrovers diskutiert. Bei dieser Diskussion der klinischen Relevanz wurden nur die einzelnen Rezeptoren isoliert betrachtet. Komplexe Signalwege zwischen den Rezeptoren, wie beispielsweise der „receptor-cross-talk“, wurden hierbei vernachlässigt. Der Crosstalk zwischen verschiedenen Rezeptortypen ermöglicht es den Rezeptoren die Signal- und Transkriptionsreaktionen auf nicht erkannte Liganden zu modulieren. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Steroidhormonrezeptoren, einschließlich PR, ER, und AR, in viel stärkerem Maße als bisher angenommen an Komplexen miteinander beteiligt sind (Daniel et al., 2015; Giulianelli et al., 2012; Peters et al., 2009; Need et al., 2012).

Die hier nur beispielhaft angeführten Mechanismen der „Spleißvarianten“ und des „receptor-cross-talk“ verdeutlichen die noch wesentlich komplexeren Zusammenhänge, die zum vollständigen Verständnis dieses Themas unverzichtbar sind. Daher ist es schwierig die molekularbiologisch erhobenen Daten in den klinischen Kontext einzuordnen, zumal für jede Malignität nur eine Zelllinie verwendet wurde.

Nach NIPP Behandlung konnten unterschiedliche und zum Teil sogar gegensätzliche Effekte auf die Expressionsrate der Steroidhormonrezeptoren beobachtet werden, auch wenn anhand der Hemm-Kinetiken eine signifikante Inhibition des Zellwachstums nach NIPP Behandlung bei allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden konnte.

Die unveränderte Expression von AR und die gesteigerte Expression von ER α in LNCaP Zellen würden eine Resistenz gegenüber der NIPP Behandlung bedeuten. Der gleiche Effekt ist für die Expression von ER α in MCF-7 Zellen zu beobachten, wohingegen die vermehrte Expression des als antiproliferativ geltenden ER β einen potentiellen Wirkmechanismus liefern könnte. Ähnlich verhält es sich mit der Expressionsrate des PRs in MCF-7 Zellen. Beide Isoformen werden nach NIPP Behandlung vermehrt exprimiert. Hierbei würde der Anstieg des proliferativen PR-B die Entwicklung eines Resistenzmechanismus bedeuten, während die gesteigerte Expression des antiproliferativen PR-A eine mögliche Erklärung für eine protherapeutische Wirkung bedeuten würde. Im Gegensatz dazu führt die NIPP-Behandlung in OVCAR-3 Zellen zu einer Abnahme des antiproliferativen PR-Bs. Gleichzeitig findet keine Modulation des proliferativen PR-As statt. Auch hier würde sich eine Resistenz negativ auf mögliche Therapieansätze auswirken.

Steroidhormonrezeptoren nehmen jedoch nicht nur Einfluss auf die Proliferationsrate. Die Bindung des Ligand-Rezeptor-Komplexes führt beispielsweise zur Stimulation steroidhormonabhängiger Gene sowie zur Steigerung der Mitoserate. Als weitere Effekte sind Transformation von präkanzerösen Zellen in Krebszellen, Stimulation sowie Transformation von (Proto)-Onkogenen (c-myc, c-fos, c-jun, ras, c-erbB2, EGF-R), Inhibition der Apoptose (Fragmentation und kontrollierter Tod) von Karzinomzellen, Synthese von Wachstumsfaktoren (EGF, TGF α , TGF β , IGF-1, FGF, PDGF, CSF-1, NGF), Bildung von freien Radikalen sowie Stimulation der Enzymsynthese (DNA Polymerase, Thymidylate-Synthese, Thymidinkinase, Dihydrofolatereduktase, CathepsinD, Plasminogen-Aktivator) zu nennen (Beckmann et al., 1997).

5. Zusammenfassung

NIPP-Behandlungen bieten neue Therapieansätze in der Onkologie. Die Effekte einer NIPP Behandlung konnten bereits bei verschiedenen Malignitäten nachgewiesen werden. Hierbei beobachtete man hauptsächlich eine Hemmung der Proliferation. In dieser Arbeit konnte der antiproliferative Effekt von NIPP nach einer Behandlungsdauer von 30 s auf PC-, MC- und OC-Zellen gezeigt werden. Weiterhin wurde nach NIPP- Behandlung eine Modulation der Expressionsrate der Steroidhormonrezeptoren auf Proteinebene in diesen Zellen nachgewiesen. Dabei waren unterschiedliche und zum Teil sogar gegensätzliche Effekte zu beobachten.

Steroidhormone sind maßgeblich an der Pathogenese des PCs, MCs und OCs beteiligt. Die durch sie vermittelte Signaltransduktion kann zu einer gesteigerten Mitose- sowie Proliferationsrate führen. Hierbei nehmen Steroidhormonrezeptoren eine zentrale Funktion ein. Ihre Regulation und Modulation sind dabei wichtige Ziele der endokrinen Therapie bzw. Antihormontherapie, die bei der Behandlung einiger Malignitäten bereits etabliert sind. Bei der Entwicklung neuer Therapien sind Steroidrezeptoren daher wichtige Zielstrukturen.

Diese in-vitro gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass NIPP neben der Wachstumshemmung von Karzinomzellen auch das Potential hat, die bestehenden Therapieoptionen bei einigen Steroidrezeptorpositiven Karzinomen zu erweitern bzw. zu ergänzen. Vorbehaltlich weiterer Untersuchungen, insbesondere der Evaluierung der NIPP-Behandlung im klinischen Kontext ist ein Einsatz von NIPP in der gynäkologischen Onkologie sehr vielversprechend. Hierbei wäre eine direkte intraoperative NIPP-Behandlung von Tumorgewebe denkbar.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aktivierung des Steroidhormonrezeptors	15
Abbildung 2:	Wachstumskinetik von LNCaP Zellen nach 30 s NIPP Behandlung	32
Abbildung 3:	Protein-Analysen von AR in LNCaP Zellen nach 30 s NIPP Behandlung	33
Abbildung 4:	Protein-Analysen von ER α in LNCaP Zellen nach 30 s NIPP Behandlung	34
Abbildung 5:	Wachstumskinetik von MCF-7 Zellen nach 30 s NIPP Behandlung	35
Abbildung 6:	Protein-Analysen von ER β in MCF-7 Zellen nach 30 s NIPP Behandlung	36
Abbildung 7:	Wachstumskinetik von MCF-7 Zellen mit E2 Inkubation	37
Abbildung 8:	Wachstumskinetik von MCF-7 Zellen nach E2 Vorinkubation und nach 30 s NIPP Behandlung	38
Abbildung 9:	Protein-Analysen von ER α in MCF-7 Zellen nach E2 Vorinkubation und nach 30 s NIPP Behandlung	39
Abbildung 10:	Wachstumskinetik von MCF-7 Zellen unter P4 Inkubation	40
Abbildung 11:	Wachstumskinetik von MCF-7 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung	41
Abbildung 12:	Protein-Analysen von PR-A in MCF-7 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung	42

Abbildung 13:	Protein-Analysen von PR-B in MCF-7 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung	43
Abbildung 14:	Wachstumskinetik von OVCAR-3 Zellen unter P4 Inkubation	44
Abbildung 15:	Wachstumskinetik von OVCAR-3 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung	45
Abbildung 16:	Protein-Analysen von PR-A in OVCAR-3 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung	46
Abbildung 17:	Protein-Analysen von PR-B in OVCAR-3 Zellen unter P4 Inkubation und nach 30 s NIPP Behandlung	47

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Western Blot Parameter	27
Tabelle 2:	Pipettierschema für ein SDS-Gel	30
Tabelle 3:	Steroidhormonrezeptorstatus	48
Tabelle 4:	Zusammenfassung Ergebnisse/klin.Relevanz	57

8. Literaturverzeichnis

Abazid A, Martin B, Choinowski A, McNeill RV, Brandenburg L-O, Ziegler P, Zimmermann U, Burchardt M, Erb H, Stope MB. The androgen receptor antagonist enzalutamide induces apoptosis, dysregulates the heat shock protein system, and diminishes the androgen receptor and estrogen receptor β 1 expression in prostate cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 2019; 120: 16711–16722

Ahonen MH, Zhuang Y-H, Aine R, Ylikomi T, Tuohimaa P. Androgen receptor and vitamin D receptor in human ovarian cancer: Growth stimulation and inhibition by ligands. *Int. J. Cancer* 2000; 86: 40–46

Akahira J, Inoue T, Suzuki T, Ito K, Konno R, Sato S, Moriya T, Okamura K, Yajima A, Sasano H. Progesterone receptor isoforms A and B in human epithelial ovarian carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR studies. *Br J Cancer* 2000; 83: 1488–1494

Akahira J, Suzuki T, Ito K, Kaneko C, Darnel AD, Moriya T, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H. Differential expression of progesterone receptor isoforms A and B in the normal ovary, and in benign, borderline, and malignant ovarian tumors. *Japanese Journal of Cancer Research* 2002; 93: 807–815

Amicis F de, Chiodo C, Morelli C, Casaburi I, Marsico S, Bruno R, Sisci D, Andò S, Lanzino M. AIB1 sequestration by androgen receptor inhibits estrogen-dependent cyclin D1 expression in breast cancer cells. *BMC Cancer* 2019; 19: 1038

Anestis A, Zoi I, Papavassiliou AG, Karamouzis MV. Androgen Receptor in Breast Cancer-Clinical and Preclinical Research Insights. *Molecules* 2020; 25: 358

Attia DMA, Ederveen AGH. Opposing roles of ER α and ER β in the genesis and progression of adenocarcinoma in the rat ventral prostate. *Prostate* 2012; 72: 1013–1022

Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: Many Actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83: 851–857

Beckmann MW, Mohrmann T, Niederacher D. Wirkungsmechanismen von Steroidhormonen und Steroidhormonantagonisten und ihre Bedeutung für die Tumorkarzinogenese. *Gynäkologie* 1997; 30: 617–623

Bekeschus S, Schmidt A, Weltmann K-D, Woedtke T von. The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing. *Clinical Plasma Medicine* 2016; 4: 19–28

Berg JM. DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 1989; 57: 1065–1068

Bossard C, Busson M, Vindrieux D, Gaudin F, Machelon V, Brigitte M, Jacquard C, Pillon A, Balaguer P, Balabanian K, Lazennec G. Potential role of estrogen receptor beta as a tumor suppressor of epithelial ovarian cancer. *PLoS ONE* 2012; 7: e44787

Burges A, Brüning A, Dannenmann C, Blankenstein T, Jeschke U, Shabani N, Friese K, Mylonas I. Prognostic significance of estrogen receptor alpha and beta expression in human serous carcinomas of the ovary. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 281: 511–517

Buys SS, Partridge E, Black A, Johnson CC, Lamerato L, Isaacs C, Reding DJ, Greenlee RT, Yokochi LA, Kessel B, Crawford ED, Church TR, Andriole GL, Weissfeld JL, Fouad MN, Chia D, O'Brien B, Ragard LR, Clapp JD, Rathmell JM, Riley TL, Hartge P, Pinsky PF, Zhu CS, Izmirlian G, Kramer BS, Miller AB, Xu J-L, Prorok PC, Gohagan JK, Berg CD. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2011; 305: 2295–2303

Cardillo MR. Androgen receptors in ovarian tumors: correlation with oestrogen and progesterone receptors in an immunohistochemical and semiquantitative image analysis study 1998

Chadha S, Rao BR, Slotman BJ, van Vroonhoven C, van der Kwast T. An immunohistochemical evaluation of androgen and progesterone receptors in ovarian tumors. *Human Pathology* 1993; 24: 90–95

Chan KKL, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HYS. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstetrics & Gynecology* 2008; 111: 144–151

Chang C, Lee SO, Yeh S, Chang TM. Androgen receptor (AR) differential roles in hormone-related tumors including prostate, bladder, kidney, lung, breast and liver. *Oncogene* 2014; 33: 3225–3234

Chen R, Yu Y, Dong X. Progesterone receptor in the prostate: A potential suppressor for benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2017; 166: 91–96

Chuangsuwanich A, Assadamongkol T, Boonyawan D. The Healing Effect of Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasma in Pressure Ulcer: A Randomized Controlled Trial. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* 2016; 15: 313–319

Chung W-M, Chen L, Chang W-C, Su S-Y, Hung Y-C, Ma W-L. Androgen/Androgen Receptor Signaling in Ovarian Cancer: Molecular Regulation and Therapeutic Potentials. *IJMS* 2021; 22: 7748

Conneely OM, Maxwell BL, Toft DO, Schrader WT, O'Malley BW. The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1987; 149: 493–501

Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP, Mayo FJ de. Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2001; 179: 97–103

Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 1997; 138: 4613–4621

Crnalic S, Hörnberg E, Wikström P, Lerner UH, Tieva A, Svensson O, Widmark A, Bergh A. Nuclear androgen receptor staining in bone metastases is related to a poor outcome in prostate cancer patients. *Endocrine-Related Cancer* 2010; 17: 885–895

Daniel AR, Gaviglio AL, Knutson TP, Ostrander JH, D'Assoro AB, Ravindranathan P, Peng Y, Raj GV, Yee D, Lange CA. Progesterone receptor-B enhances estrogen responsiveness of breast cancer cells via scaffolding PELP1- and estrogen receptor-containing transcription complexes. *Oncogene* 2015; 34: 506–515

Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res* 2008; 68: 5469–5477

Dehm SM, Tindall DJ. Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* 2006; 99: 333–344

Diep CH, Daniel AR, Mauro LJ, Knutson TP, Lange CA. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *Journal of Molecular Endocrinology* 2015; 54: R31-53

Dimitrakakis C, Zhou J, Wang J, Belanger A, Labrie F, Cheng C, Powell D, Bondy C. A physiologic role for testosterone in limiting estrogenic stimulation of the breast. *Menopause* 2003; 10: 292–298

Dobrynin D, Fridman G, Friedman G, Fridman A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J. Phys.* 2009; 11: 115020

Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer* 2003; 10: 179–186

Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, Léan A de, Nemer M, Schmidt TJ. Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *The EMBO Journal* 1993; 12: 145–156

Eckert RL, Katzenellenbogen BS. Effects of estrogens and antiestrogens on estrogen receptor dynamics and the induction of progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1982; 42: 139–144

Edmondson RJ, Monaghan JM. The epidemiology of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11: 423–429

Eick GN, Colucci JK, Harms MJ, Ortlund EA, Thornton JW. Evolution of minimal specificity and promiscuity in steroid hormone receptors. *PLoS genetics* 2012; 8: e1003072

Eliasson B, Kogelschatz U. Nonequilibrium volume plasma chemical processing. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 1991; 19: 1063–1077

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1997; 82: 4258–4265

Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science (New York, N.Y.)* 1988; 240: 889–895

Faivre EJ, Lange CA. Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 466–480

Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res* 2000; 60: 245–248

Fuqua SA, Wiltschke C, Zhang QX, Borg A, Castles CG, Friedrichs WE, Hopp T, Hilsenbeck S, Mohsin S, O'Connell P, Allred DC. A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions. *Cancer Res* 2000; 60: 4026–4029

Gabra H, Watson JE, Taylor KJ, Mackay J, Leonard RC, Steel CM, Porteous DJ, Smyth JF. Definition and refinement of a region of loss of heterozygosity at 11q23.3-q24.3 in epithelial ovarian cancer associated with poor prognosis. *Cancer Res* 1996; 56: 950–954

Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *JCO* 2002; 20: 3001–3015

Gerling T, Weltmann KD. Einführung in Atmosphärendruck-Plasmaquellen für plasmamedizinische Anwendungen *Plasmamedizin*: Springer, Berlin, Heidelberg, 2016: 3–15

Giguère V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1986; 46: 645–652

Giulianelli S, Vaqué JP, Soldati R, Wargon V, Vanzulli SI, Martins R, Zeitlin E, Molinolo AA, Helguero LA, Lamb CA, Gutkind JS, Lanari C. Estrogen receptor alpha mediates progestin-induced mammary tumor growth by interacting with progesterone receptors at the cyclin D1/MYC promoters. *Cancer Res* 2012; 72: 2416–2427

Grindstad T, Richardsen E, Andersen S, Skjefstad K, Rakae khanehenari M, Donnem T, Ness N, Nordby Y, Bremnes RM, Al-Saad S, Busund L-T. Progesterone Receptors in Prostate Cancer: Progesterone receptor B is the isoform associated with disease progression. *Sci Rep* 2018; 8: 11358

Grindstad T, Skjefstad K, Andersen S, Ness N, Nordby Y, Al-Saad S, Fismen S, Donnem T, Khanehenari MR, Busund L-T, Bremnes RM, Richardsen E. Estrogen receptors α and

β and aromatase as independent predictors for prostate cancer outcome. *Sci Rep* 2016; 6: 33114

Gustafsson JA. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *Journal of Endocrinology* 1999; 163: 379–383

Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999; 140: 5566–5578

Hatch KD, Beecham JB, Blessing JA, Creasman WT. Responsiveness of patients with advanced ovarian carcinoma to tamoxifen. A gynecologic oncology group study of second-line therapy in 105 patients. *Cancer* 1991; 68: 269–271

Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 276–308

Henderson I. Endocrine therapy of metastatic breast cancer. *Breast Diseases* 1991: 559–603

Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Med Gas Res* 2013; 3: 21

Holtkamp W. Krebs rechtzeitig erkennen. In: Holtkamp W, Hrsg. *Krebs*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint Springer, 2020: 29–59

Horn F. *Biochemie des Menschen* 2009: 347–348

Horwitz KB, Wei LL, Sedlacek SM, D'Arville CN. Progestin Action and Progesterone Receptor Structure in Human Breast Cancer: A Review. In: Greep RO, Hrsg. *Recent Progress in Hormone Research*. Burlington: Elsevier Science, 1985: 249–316

Howell A, Wakeling AE. Steroid and peptide hormones and growth factors. *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers* 1987; 9: 121–133

Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, Han M, Partin AW, Vessella RL, Isaacs WB, Bova GS, Luo J. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 16–22

Hu R, Lu C, Mostaghel EA, Yegnasubramanian S, Gurel M, Tannahill C, Edwards J, Isaacs WB, Nelson PS, Bluemn E, Plymate SR, Luo J. Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2012; 72: 3457–3462

Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clinical obstetrics and gynecology* 2012; 55: 3–23

Ishaq M, Evans MDM, Ostrikov KK. Atmospheric pressure gas plasma-induced colorectal cancer cell death is mediated by Nox2-ASK1 apoptosis pathways and oxidative stress is mitigated by Srx-Nrf2 anti-oxidant system. *Biochimica et biophysica acta* 2014; 1843: 2827–2837

Kanzow M, van Mackelenbergh M, Maass N, Bauerschlag D. Diagnostik und Therapie des Ovarialkarzinoms. *Onkologe* 2018; 24: 343–356

Katzenellenbogen BS, Kendra KL, Norman MJ, Berthois Y. Proliferation, hormonal responsiveness, and estrogen receptor content of MCF-7 human breast cancer cells grown in the short-term and long-term absence of estrogens. *Cancer Res* 1987; 47: 4355–4360

Keidar M, Shashurin A, Volotskova O, Ann Stepp M, Srinivasan P, Sandler A, Trink B. Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Physics of Plasmas* 2013; 20: 57101

Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2001; 12: 152–156

Key T, Pike MC. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 1988; 24: 29–43

Kim JY, Ballato J, Foy P, Hawkins T, Wei Y, Li J, Kim S-O. Apoptosis of lung carcinoma cells induced by a flexible optical fiber-based cold microplasma. *Biosensors & bioelectronics* 2011; 28: 333–338

Kim SJ, Chung TH, Bae SH, Leem SH. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet. *Appl. Phys. Lett.* 2010; 97: 23702

King M-C, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003; 302: 643–646

King R. A discussion of the roles of oestrogen and progestin in human mammary carcinogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1991; 39: 811–818

Koensgen D, Besic I, Gumbel D, Kaul A, Weiss M, Diesing K, Kramer A, Bekeschus S, Mustea A, Stope MB. Cold Atmospheric Plasma (CAP) and CAP-Stimulated Cell Culture Media Suppress Ovarian Cancer Cell Growth - A Putative Treatment Option in Ovarian Cancer Therapy. *Anticancer Research* 2017; 37: 6739–6744

Kogelschatz U. Dielectric-Barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 2003; 23: 1–46

Kraus WL, Weis KE, Katzenellenbogen BS. Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied progestin receptors. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1847–1857

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997; 138: 863–870

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93: 5925–5930

Lazennec G. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Letters* 2006; 231: 151–157

Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 2001; 142: 4120–4130

Lendeckel D, Eymann C, Emicke P, Daeschlein G, Darm K, O'Neil S, Beule AG, Woedtke T von, Völker U, Weltmann K-D, Jünger M, Hosemann W, Scharf C. Proteomic Changes of Tissue-Tolerable Plasma Treated Airway Epithelial Cells and Their Relation to Wound Healing. *BioMed Research International* 2015; 2015: 506059

Lenhard M, Tereza L, Heublein S, Ditsch N, Himsl I, Mayr D, Friese K, Jeschke U. Steroid hormone receptor expression in ovarian cancer: progesterone receptor B as prognostic marker for patient survival. *BMC Cancer* 2012; 12: 553

Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 3197–3201

Li Y, Chan SC, Brand LJ, Hwang TH, Silverstein KAT, Dehm SM. Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 2013; 73: 483–489

Lindemann K, Gibbs E, Åvall-Lundqvist E, dePont Christensen R, Woie K, Kalling M, Auranen A, Grenman S, Hoegberg T, Rosenberg P, Skeie-Jensen T, Hjerpe E, Dørum A,

Gebski V, Kristensen G. Chemotherapy vs tamoxifen in platinum-resistant ovarian cancer: a phase III, randomised, multicentre trial (Ovaresist). *Br J Cancer* 2017; 116: 455–463

Løberg M, Lousdal ML, Bretthauer M, Kalager M. Benefits and harms of mammography screening. *Breast cancer research : BCR* 2015; 17: 63

M F Press, S H Xu, J D Wang, G L Greene. Subcellular distribution of estrogen receptor and progesterone receptor with and without specific ligand 1989

Malkoski SP, Handanos CM, Dorin RI. Localization of a negative glucocorticoid response element of the human corticotropin releasing hormone gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1997; 127: 189–199

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 1995; 83: 835–839

McCormick A, Earp E, Elliot K, Cuthbert G, O'Donnell R, Wilson BT, Sutton R, Leeson C, Thomas HD, Blair H, Fordham S, Lunec J, Allan J, Edmondson RJ. Functional characterisation of a novel ovarian cancer cell line, NUOC-1. *Oncotarget* 2017; 8: 26832–26844

McGowan L, Parent L, Lednar W, Norris HJ. The woman at risk for developing ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 1979; 7: 325–344

Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, Falco A de, Bontempo P, Nola E, Auricchio F. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *The EMBO Journal* 1996; 15: 1292–1300

Mitter D, Ortmann O, Treeck O. Östrogenrezeptor-beta-Isoformen--Funktionen und klinische Bedeutung bei Brustkrebs. *Zentralbl Gynakol* 2005; 127: 228–234

Modugno F, Laskey R, Smith AL, Andersen CL, Haluska P, Oesterreich S. Hormone response in ovarian cancer: time to reconsider as a clinical target? *Endocrine-Related Cancer* 2012; 19: R255-79

Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia L. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 226: 1–21

Molino A, Turazza M, Bonetti A, Biondani P, Griso C, Adami L, Corgnati A, Nortilli R, Pollini GP, Modena S. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer: correlation with clinical and pathological features and with prognosis. *Oncology* 1992; 49: 82–88

Mote PA, Graham JD, Clarke CL. *Progesterone Receptor Isoforms in Normal and Malignant Breast Progestins and the Mammary Gland*: Springer, Berlin, Heidelberg, 2008: 190–207

Mote PA, Leary JA, Avery KA, Sandelin K, Chenevix-Trench G, Kirk JA, Clarke CL. Germ-line mutations in BRCA1 or BRCA2 in the normal breast are associated with altered expression of estrogen-responsive proteins and the predominance of progesterone receptor A. *Genes Chromosom. Cancer* 2004; 39: 236–248

Need EF, Selth LA, Harris TJ, Birrell SN, Tilley WD, Buchanan G. Research resource: interplay between the genomic and transcriptional networks of androgen receptor and estrogen receptor α in luminal breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* 2012; 26: 1941–1952

O'Donnell AJM, Macleod KG, Burns DJ, Smyth JF, Langdon SP. Estrogen receptor-alpha mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocrine-Related Cancer* 2005; 12: 851–866

Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *JCO* 2005; 23: 1616–1622

Palmieri C, Lam EW-F, Mansi J, MacDonald C, Shousha S, Madden P, Omoto Y, Sunter A, Warner M, Gustafsson J-A, Coombes RC. The expression of ER beta cx in human breast cancer and the relationship to endocrine therapy and survival. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2421–2428

Partecke LI, Evert K, Haugk J, Doering F, Normann L, Diedrich S, Weiss F-U, Evert M, Huebner NO, Guenther C, Heidecke CD, Kramer A, Bussiahn R, Weltmann K-D, Pati O, Bender C, Bernstorff W von. Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 2012; 12: 473

Pathiraja TN, Shetty PB, Jelinek J, He R, Hartmaier R, Margossian AL, Hilsenbeck SG, Issa J-PJ, Oesterreich S. Progesterone receptor isoform-specific promoter methylation: association of PRA promoter methylation with worse outcome in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 4177–4186

Peluso JJ, Liu X, Saunders MM, Claffey KP, Phoenix K. Regulation of ovarian cancer cell viability and sensitivity to cisplatin by progesterone receptor membrane component-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1592–1599

Peng J, Jordan VC. Estrogen Receptor Pathways and Breast Cancer Principles of Molecular Oncology: Humana Press, 2008: 189–206

Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Centenera MM, Harris JM, Jindal S, Segara D, Jia L, Moore NL, Henshall SM, Birrell SN, Coetzee GA, Sutherland RL, Butler LM, Tilley WD. Androgen receptor inhibits estrogen receptor-alpha activity and is prognostic in breast cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 6131–6140

Petz LN, Nardulli AM. Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter. *Molecular Endocrinology* 2000; 14: 972–985

Pietsch GJ. Peculiarities of Dielectric Barrier Discharges. *Contrib. Plasma Phys.* 2001; 41: 620–628

Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 2003; 228: 111–133

Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, Rochefort H, Maudelonde T. Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 5367–5373

Rachel Schiff, Suleiman Massarweh, Jiang Shou, C. Kent Osborne. Breast Cancer Endocrine Resistance. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 447s-454s

Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum 2016

Rehman MU, Jawaid P, Uchiyama H, Kondo T. Comparison of free radicals formation induced by cold atmospheric plasma, ultrasound, and ionizing radiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2016; 605: 19–25

Reuter S, Woedtke T von, Weltmann K-D. The kINPen—a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2018; 51: 233001

Ricke WA, McPherson SJ, Bianco JJ, Cunha GR, Wang Y, Risbridger GP. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *FASEB j.* 2008; 22: 1512–1520

Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_

2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile
07.11.2021)

(Zugriffsdatum:

Roger P, Sahla ME, Mäkelä S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 2537–2541

Rutherford T. Absence of estrogen receptor- β expression in metastatic ovarian cancer. *Obstetrics & Gynecology* 2000; 96: 417–421

Schlegel J, Köritzer J, Boxhammer V. Plasma in cancer treatment. *Clinical Plasma Medicine* 2013; 1: 2–7

Schmalfeldt B, Seck K. Ovarialkarzinom. *Gynäkologe* 2013; 46: 531–535

Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Vollmar B, Woedtke T von. A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. *Exp Dermatol* 2017; 26: 156–162

Schüler-Toprak S, Moehle C, Skrzypczak M, Ortmann O, Treeck O. Effect of estrogen receptor β agonists on proliferation and gene expression of ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 2017; 17: 319

Schüler-Toprak S, Weber F, Treeck O, Ortmann O. Östrogenrezeptor β ist mit der Expression tumorassoziierter Gene und dem Überleben von Ovarialkarzinompatientinnen assoziiert 92. Kongress BGGF 2018: Georg Thieme Verlag KG, 2018

Schultz JR, Petz LN, Nardulli AM. Estrogen receptor α and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003; 201: 165–175

Sheach LA, Adeney EM, Kucukmetin A, Wilkinson SJ, Fisher AD, Elattar A, Robson CN, Edmondson RJ. Androgen-related expression of G-proteins in ovarian cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 498–503

Shekhter AB, Serezhenkov VA, Rudenko TG, Pekshev AV, Vanin AF. Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds. *Nitric Oxide* 2005; 12: 210–219

Sieh W, Köbel M, Longacre TA, Bowtell DD, deFazio A, Goodman MT, Høgdall E, Deen S, Wentzensen N, Moysich KB, Brenton JD, Clarke BA, Menon U, Gilks CB, Kim A, Madore J, Fereday S, George J, Galletta L, Lurie G, Wilkens LR, Carney ME, Thompson PJ, Matsuno RK, Kjær SK, Jensen A, Høgdall C, Kalli KR, Fridley BL, Keeney GL, Vierkant RA, Cunningham JM, Brinton LA, Yang HP, Sherman ME, García-Closas M, Lissowska J, Odunsi K, Morrison C, Lele S, Bshara W, Sucheston L, Jimenez-Linan M, Driver K, Alsop J, Mack M, McGuire V, Rothstein JH, Rosen BP, Bernardini MQ, Mackay H, Oza A, Wozniak EL, Benjamin E, Gentry-Maharaj A, Gayther SA, Tinker AV, Prentice LM, Chow C, Anglesio MS, Johnatty SE, Chenevix-Trench G, Whittemore AS, Pharoah PDP, Goode EL, Huntsman DG, Ramus SJ. Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *The Lancet Oncology* 2013; 14: 853–862

Smyth JF, Gourley C, Walker G, MacKean MJ, Stevenson A, Williams ARW, Nafussi AA, Rye T, Rye R, Stewart M, McCurdy J, Mano M, Reed N, McMahan T, Vasey P, Gabra H, Langdon SP. Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor-positive patients. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3617–3622

Song P, Li Y, Dong Y, Liang Y, Qu H, Da Qi, Lu Y, Jin X, Guo Y, Jia Y, Wang X, Xu W, Quan C. Estrogen receptor β inhibits breast cancer cells migration and invasion through CLDN6-mediated autophagy. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38: 354

Song RX-D, Santen RJ. Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer. *Biology of Reproduction* 2006; 75: 9–16

Speirs V, Shaaban AM. Role of ER β in Clinical Breast Cancer 2009; 147: 1–20

Statistisches Bundesamt. Pressemitteilung Nr. N 010 vom 3. Februar 2021. Verfügbar unter

https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21_N010_231.html

(Zugriffsdatum: 07.11.21)

Strähle U, Klock G, Schütz G. A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987; 84: 7871–7875

Suschek CV, Opländer C. The application of cold atmospheric plasma in medicine: The potential role of nitric oxide in plasma-induced effects. *Clinical Plasma Medicine* 2016; 4: 1–8

Tamburrino L, Salvianti F, Marchiani S, Pinzani P, Nesi G, Serni S, Forti G, Baldi E. Androgen receptor (AR) expression in prostate cancer and progression of the tumor: Lessons from cell lines, animal models and human specimens. *Steroids* 2012; 77: 996–1001

Tao DD, Jiang M, Wu JH, Feng YD, Gong JP. Western blot analysis and flow cytometric analysis of estrogen and progesterone receptors in fixed breast cancer cells 2004

Tauber R, Jung C. *Urologie in Frage und Antwort* 2015: 12–14

Thelen P, Taubert H, Duensing S, Kristiansen G, Merseburger AS, Cronauer MV. Bedeutung der Androgenrezeptor-Spleißvariante AR-V7 für Prognose und Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms. *Aktuelle Urol* 2020; 51: 582–592

Truss M, Bartsch J, Schelbert A, Haché RJ, Beato M. Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *The EMBO Journal* 1995; 14: 1737–1751

Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual review of biochemistry* 1994; 63: 451–486

Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horwitz KB. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Molecular Endocrinology* 1993; 7: 1256–1265

Vajenine GV. Use of plasma-activated gases in synthesis of solid-state nitrides. *Dalton Trans.* 2010; 39: 6013–6017

Vandamme M, Robert E, Pesnel S, Barbosa E, Dozias S, Sobilo J, Lerondel S, Le Pape A, Pouvesle J-M. Antitumor Effect of Plasma Treatment on U87 Glioma Xenografts: Preliminary Results. *Plasma Processes Polym.* 2010; 7: 264–273

Vatansever F, Melo WCMA de, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, Chandran R, Karimi M, Parizotto NA, Yin R, Tegos GP, Hamblin MR. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 2013; 37: 955–989

Venkitaraman AR. Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002; 108: 171–182

Vera-Badillo FE, Templeton AJ, Gouveia P de, Diaz-Padilla I, Bedard PL, Al-Mubarak M, Seruga B, Tannock IF, Ocana A, Amir E. Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2014; 106: djt319

Wadosky KM, Koochekpour S. Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. *Oncotarget* 2017; 8: 18550–18576

Walters KA, Simanainen U, Handelsman DJ. Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Human Reproduction Update* 2010; 16: 543–558

Weidinger A, Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* 2015; 5: 472–484

Weigel NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *The Biochemical journal* 1996; 319 (Pt 3): 657–667

Weiss M, Gümbel D, Hanschmann E-M, Mandelkow R, Gelbrich N, Zimmermann U, Walther R, Ekkernkamp A, Sckell A, Kramer A, Burchardt M, Lillig CH, Stope MB. Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways. *PLoS ONE* 2015; 10: e0130350

Weltmann K-D, Woedtke T von. Plasma medicine—current state of research and medical application. *Plasma Phys. Control. Fusion* 2017; 59: 14031

Witzel I, Milde-Langosch K, Wirtz RM, Jänicke F, Müller V. Prognostischer Wert der mRNA-Expression des Androgenrezeptors und seiner Isoformen bei Patientinnen mit Mammakarzinom. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* 2010; 7

Woedtke T von, Reuter S, Masur K, Weltmann K-D. Plasmas for medicine. *Physics Reports* 2013; 530: 291–320

Woedtke T von, Weltmann K-D. Grundlagen der Plasmamedizin. *MKG-Chirurg* 2016; 9: 246–254

Xia J, Zeng W, Xia Y, Wang B, Xu D, Liu D, Kong MG, Dong Y. Cold atmospheric plasma induces apoptosis of melanoma cells via Sestrin2-mediated nitric oxide synthase signaling. *Journal of Biophotonics* 2019; 12: e201800046

Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* 2017; 8: 15977–15995

Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Cheng X, Canady J, Sherman J, Keidar M. Principles of using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment. *Sci Rep* 2015; 5: 18339

Yu Y, Liu L, Xie N, Xue H, Fazli L, Buttyan R, Wang Y, Gleave M, Dong X. Expression and function of the progesterone receptor in human prostate stroma provide novel insights to cell proliferation control. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013; 98: 2887–2896

Zhou J, Ng S, Adesanya-Famuiya O, Anderson K, Bondy CA. Testosterone inhibits estrogen-induced mammary epithelial proliferation and suppresses estrogen receptor expression. *FASEB j.* 2000; 14: 1725–1730

Zhou X. Roles of androgen receptor in male and female reproduction: lessons from global and cell-specific androgen receptor knockout (ARKO) mice. *Journal of Andrology* 2010; 31: 235–243

9. Danksagung

Abschließend möchte ich denjenigen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea, Direktor der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie Bonn, danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut im molekular-biologischen Forschungslabor diese experimentelle Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.

Mein großer Dank gebührt meinem Betreuer und Laborleiter Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope. Für seine uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchführung, Planung und der Auswahl des Themas für dieses Projekt. Außerdem danke ich ihm für seine Geduld, seine Diskussionsbereitschaft und die kritische Durchsicht meiner schriftlichen Arbeit.

Zudem gilt mein Dank dem Labor der Pädiatrischen Hämatologie und Onkologie, unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Dagmar Dilloo. Ebenso wie dem Labor für translationale und experimentelle Prostata- und Urothologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Glen Kristiansen, sowie Herrn PD Dr. rer. nat. Marcus V. Cronauer und Frau Anika Kremer. Beiden Laboren danke ich, dass sie mir Teile ihrer Infrastruktur unkompliziert zur Mitbenutzung zur Verfügung gestellt haben.

Frau Subedi und Frau Kaspari sowie allen Kommilitonen im Forschungslabor danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität während unserer gemeinsamen Zeit im Labor.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Mann Max. Ihr standet mir während der Anfertigung der Doktorarbeit jederzeit unterstützend zur Seite.