

Modulation des Hitzeschockprotein 27 durch Nicht-Invasives Physikalisches Plasma in Mamma-, Endometrium- und uterinen Leiomyosarkomzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Theresa Grüter

aus Münster

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Matthias Bernhard Stope
2. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Peter Bourauel

Tag der Mündlichen Prüfung: 25.07.2024

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

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	- 6 -
1.	Einleitung	- 10 -
1.1	Gynäkologische Tumore	- 10 -
1.1.1	Epidemiologie	- 10 -
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	- 11 -
1.1.3	Klinik	- 12 -
1.1.4	Klassifikation und Histologie	- 13 -
1.1.5	Aktuelle Therapiekonzepte	- 15 -
1.1.6	Prognose	- 17 -
1.2	Hitzeschockprotein 27 (Hsp27)	- 18 -
1.2.1	Hitzeschockproteine	- 18 -
1.2.2	Hsp27 – Aufbau und Funktion	- 19 -
1.2.3	Hsp27 als Regulator der Apoptose	- 20 -
1.2.4	Sekretiertes Hsp27	- 22 -
1.2.5	Hsp27 in malignen Zellen	- 22 -
1.3	Nicht-Invasives Physikalisches Plasma (NIPP)	- 24 -
1.4	Zielsetzung	- 26 -
2.	Material und Methoden	- 28 -
2.1	Material	- 28 -
2.1.1	Zelllinien	- 28 -
2.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	- 29 -
2.1.3	Chemikalien	- 33 -
2.1.4	Puffer und Lösungen	- 35 -
2.1.5	Kommerzielle Kits und Reagenzien	- 37 -
2.1.6	Zellkulturmedien und -zusätze	- 38 -
2.1.7	Gase	- 35 -
2.1.8	Antikörper	- 37 -
2.1.9	Enzyme und Primer	- 38 -
2.1.10	Software	- 39 -

2.2	Zellbiologische Methoden	- 40 -
2.2.1	Kultivierung, Ernte und Passage von Zellen	- 40 -
2.2.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	- 41 -
2.2.3	Zellzahlbestimmung	- 41 -
2.2.4	NIPP-Behandlung mit dem kINPen® MED	- 42 -
2.2.5	Wachstumskinetik nach NIPP-Behandlung	- 43 -
2.2.6	Analyse der Hsp27-Konzentration nach NIPP-Behandlung	- 44 -
2.3	Biochemische Methoden	- 44 -
2.3.1	Proteinisolation	- 44 -
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	- 45 -
2.3.3	Western Blot	- 46 -
2.3.4	Immundetektion	- 47 -
2.3.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	- 47 -
2.4	Molekularbiologische Methoden	- 48 -
2.4.1	RNA-Isolation	- 48 -
2.4.2	Reverse Transkription	- 49 -
2.4.3	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (PCR)	- 50 -
2.5	Statistische Auswertung	- 51 -
3.	Ergebnisse	- 53 -
3.1	Einfluss des NIPP auf die Zellproliferation	- 53 -
3.2	Einfluss des NIPP auf die Transkription der Hsp27 mRNA	- 55 -
3.3	Einfluss des NIPP auf die intrazelluläre Hsp27-Konzentration	- 56 -
3.4	Einfluss des NIPP auf die extrazelluläre Hsp27-Konzentration	- 58 -
4.	Diskussion	- 61 -
4.1	NIPP hemmt die Zellproliferation	- 61 -
4.2	NIPP und der Einfluss auf die Transkription von Hsp27	- 63 -
4.3	NIPP reduziert die intrazelluläre Hsp27-Konzentration	- 65 -
4.4	NIPP steigert die extrazelluläre Hsp27-Konzentration	- 68 -
4.5	Hsp27 als potenzieller Biomarker	- 70 -
4.6	Klinische Bedeutung und Ausblick	- 71 -
5.	Zusammenfassung	- 74 -
6.	Abbildungsverzeichnis	- 76 -

7.	Tabellenverzeichnis	- 77 -
8.	Literaturverzeichnis	- 78 -
9.	Danksagung	- 94 -

Abkürzungsverzeichnis

Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1 (Apoptose-auslösender Faktor 1)
BMI	Body-Mass-Index (Körpermasseindex)
<i>BRCA1</i>	Breast Cancer Gene 1 (Brustkrebsgen 1)
<i>BRCA2</i>	Breast Cancer Gene 2 (Brustkrebsgen 2)
CASY	CASY Modell TT-Cell Counter and Analyzer
CDK	Cyclin-dependent Kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CpG-Insel	Erhöhte Dichte von Cytosin und Guanin Dinukleotiden
Cyt. C	Cytochrom C
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EC	Endometrial Cancer (Endometriumkarzinom)
ECL	Enhanced chemiluminescence (gesteigerte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Enzym-gekoppeltes immunologisches Nachweisverfahren)

ER	Estrogenrezeptor (Östrogenrezeptor)
FBS	Fötales Kälberserum
Fe	Ferrum (Eisen)
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GAPDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCC	Hepatocellular carcinoma (Hepatozelluläres Karzinom)
HER2	Human epidermal growth factor receptor (humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor)
HSE	Heat shock-response element (Hitzeschock empfindliches Element)
HSF	Heat shock transcription factor (Hitzeschock Transkriptionsfaktor)
Hsp	Heat shock protein (Hitzeschockprotein)
IgA	Immunglobuline A
IL	Interleukin
Ipsilat.	ipsilateral
IκB	Inhibitor des NF-κB
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
Ktr.	Kontrolle
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MC	Mamma carcinoma (Mammakarzinom)
miRNA	MicroRNA
mRNA	Messenger-RNA (Boten-RNA)
NCI	National Cancer Institute

NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (Nukleärer Faktor κ B)
NIPP	Nicht-Invasives Physikalisches Plasma
OP	Operation
P53	Protein p53
<i>PALP2</i>	Partner and localizer of <i>BRCA2</i>
PBS	Phosphate-Bufferd Saline
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
p-Wert	Signifikanzwert (p lateinisch für probabilitas, Wahrscheinlichkeit)
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNS	Reactive nitrogen species (reaktive Stickstoffspezies)
RONS	Reactive oxygen and nitrogen species (reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies)
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT-PCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction (Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
Streptavidin-HRP	Streptavidin-horseradish peroxidase (Streptavidin-Meerrettichperoxidase)
TLR-3	Toll-like Rezeptor 3

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNM	Tumor, Nodus und Metastasen
U/min	Umdrehungen/Minute
UICC	Union for International Cancer Control
ULMS	Uterine Leiomyosarcoma (uterines Leiomyosarkom)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
yH2AX	Phosphorylierte Form des Histon 2AX

1. Einleitung

1.1 Gynäkologische Tumore

1.1.1 Epidemiologie

Bösartige Neoplasien gehören nach den Herz-Kreislaufkrankungen zu den zweithäufigsten Todesursachen in Deutschland (Das Statistische Bundesamt, 2022). Nach Angaben des Robert Koch-Instituts (RKI) waren bösartige Tumore der Brustdrüse mit einer Inzidenz von 70.550 im Jahr 2020 die häufigste maligne Erkrankung bei Frauen in Deutschland. Anteilig macht der Brustkrebs etwa 30 % alle Krebsneuerkrankungen (ohne Einbeziehung des nicht-melanotischen Hautkrebs) bei Frauen in Deutschland aus. Der Brustkrebs betrifft statistisch nach aktuellen Inzidenzraten etwa jede achte Frau (Ronckers et al., 2023). Nachdem 2005 das Mammografie-Screening zur Früherkennung von Mammakarzinomen (MC) eingeführt wurde, war zunächst eine Prävalenzspitze zu beobachten. Hier waren anteilig vermehrt MC im Frühstadium diagnostiziert worden (Katalinic et al., 2020). Im Mittel erkranken Frauen im Alter von 65 Jahren an Brustkrebs. Ein Mortalitätsrückgang konnte bereits seit 1990 beobachtet werden (Ronckers et al., 2023). Jedoch war das MC 2022 immer noch die häufigste Krebstodesursache von Frauen in Deutschland (Das Statistische Bundesamt, 2022). Laut den Daten des RKI von 2020 macht das MC bei Männern einen Anteil von etwa 1 % der Neuerkrankungen der Brustdrüse in Deutschland aus (Ronckers et al., 2023).

Die zweithäufigste maligne gynäkologische Erkrankung ist das Endometriumkarzinom (EC, Corpus uteri Karzinom). In 2020 entfielen etwa 4,7 % der Krebsneuerkrankungen in Deutschland auf das EC, es ist die fünfthäufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 67 Jahre (Ronckers et al., 2023).

Eine weitere Krebsentität bilden die uterinen Leiomyosarkome (uLMS). Diese machen zwar lediglich 1 % der malignen Tumore des Uterus aus, zeigen aber häufig ein hoch aggressives Tumorverhalten (D'Angelo und Prat, 2010). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 50 Jahren (Kurman et al., 2011).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Lebensstilfaktoren, wie ungesunde Ernährung, geringe körperliche Aktivität, erhöhter BMI und übermäßiger Alkohol- sowie Nikotinkonsum spielen als Risikofaktoren für die Entstehung von malignen Tumoren eine entscheidende Rolle (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).

Speziell das Risiko an einem MC und EC zu erkranken, erhöht sich mit einer frühen Menarche, einer späten Menopause sowie einer späten Gravität und ist auch bei Frauen, die keine Kinder geboren haben, erhöht. Ferner kann das Risiko mit der Einnahme oraler Kontrazeptiva oder einer postmenopausalen Hormonersatztherapie aufgrund des vermehrten Einflusses von Östrogenen erhöht sein (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).

Für das MC sind auch Umweltfaktoren, wie halogenierte Kohlenwasserstoffe, die in vielen Teilen der Umwelt und in Nahrungsketten angereichert sind, als Risikofaktoren beschrieben. Durch eine mögliche östrogene Wirkung stehen sie damit im Verdacht, ein MC zu begünstigen (Kreienberg et al., 2006). Protektiver Faktor gegenüber einem MC kann eine durch Schwangerschaft und Stillzeit hervorgerufene Veränderung der Brustdrüse sein (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016).

Etwa 5 % der Neuerkrankungen sind genetisch bedingt. Hierbei haben Patientinnen mit Mutationen in Tumorsuppressorgenen *BRCA1* oder *-2*, sowie im *PALP2*-Gen ein erhöhtes Risiko, an einem MC zu erkranken (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Patientinnen mit *BRCA*-Mutationen haben ein 60 % erhöhtes Risiko für die Entstehung eines MC sowie ein 16 - 55 % erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Des Weiteren werden Mutationen in anderen Tumorsuppressorgenen, wie dem seltenen Cowden-Syndrom (Mutation *PTEN*-Gen) oder Li-Fraumeni-Syndrom (Mutation *p53*-Gen), mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (Böcker et al., 2012).

Für das EC werden Gestagene als protektiv beschrieben. Die Einnahme von Tamoxifen, welches in der Therapie eines hormonsensitiven MC eine bedeutsame Rolle hat, kann das Risiko für ein EC erhöhen (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016). Zu den erblichen Tumorsyndromen, die mit einem erhöhten Risiko für ein EC einhergehen, gehört das Lynch-Syndrom. Hier sind Mutation in DNA-Mismatch-Reparaturgenen *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* mit folgender Mikrosatteliteninstabilität ursächlich. Auch das Cowden-

Syndrom, verursacht unter anderem durch *PTEN*-Mutationen, erhöht das Risiko. EC Typ 2 stehen auch im Zusammenhang mit p53- und HER2-Mutationen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Was die Entstehung eines uLMS begünstigt, ist noch nicht eindeutig geklärt. So wird diskutiert, ob uLMS *de novo* oder aus bestehenden benignen Leiomyomen oder aus atypischen Leiomyomen entstehen (Mittal und Joutovsky, 2007). Ip und Cheung (2011) halten vor dem Hintergrund, dass 1 von 800 glattmuskulären uterinen Tumoren maligne sei (Leibsohn et al., 1990), die Entstehung aus benignen Leiomyomen für sehr unwahrscheinlich. Spezifische Risikofaktoren, die eine Entstehung eines uLMS begünstigen, sind nicht klar definiert. Es wird der Einfluss radiologischer Strahlung sowie eine Tamoxifen-Einnahme diskutiert (Leitlinienprogramm Gynäkologie und Geburtshilfe, 2021; American Society of Clinical Oncology, 2023). Das Risiko an einem Sarkom zu erkranken ist beim Li-Fraumeni-Syndrom, hereditärem Retinoblastom, familiärer adenomatöser Polyposis oder einer Neurofibromatose erhöht (American Society of Clinical Oncology, 2023).

1.1.3 Klinik

Klinisch stellen sich MC als unscharf begrenzte, derbe, nicht verschiebliche Knoten, häufig im oberen äußeren Quadranten lokalisiert, dar. Auch Hautveränderungen können auftreten (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016). Die Metastasierung erfolgt lymphogen vor allem in axilläre, interpectorale und Lymphknoten (LK) entlang der A. mammaria interna, sowie hämatogen bevorzugt in das Skelettsystem, Lunge, Pleura, Leber, Thoraxwand und Gehirn (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Frühe Symptome eines EC oder eines uLMS sind postmenopausale vaginale Blutungen. Jedoch können sich die Karzinome auch über eine längere Zeit asymptomatisch zeigen. Die Metastasierung erfolgt lokal, in die Lunge, die Leber, die Knochen und das Gehirn (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2016). Als Zufallsbefunde können uLMS nach Hysteroskopien, Hysterektomien oder Myom-Enukleationen diagnostiziert werden (Leitlinienprogramm Gynäkologie und Geburtshilfe, 2021).

1.1.4 Klassifikation und Histologie

Invasive MC sind epitheliale Tumore, die häufig aus einer nicht invasiven Vorstufe (Carcinoma in situ) entstehen. Nach der WHO wird histologisch das invasiv duktales MC als nicht-spezifischer Typ (NST, 60 %) und das invasiv lobuläre MC (10 - 15 %) unterschieden. Sonderformen des duktales MC sind das medulläre, tubuläre, papilläre, muzinöse und das inflammatorische Karzinom (Böcker et al., 2012). Die Einteilung der Stadien erfolgt nach UICC-Stadien, die auch als Grundlage für Therapieempfehlungen dienen, und der TNM-Klassifikation, eine klinische Einteilung, die in Tab. 1 dargestellt sind.

Tab. 1: UICC- und TNM-Klassifikation des MC (8. Auflage), modifiziert nach (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021)

N0: keine regionären LK-Metastasen

N1: bewegliche ipsilat. LK der Level I (LK lateral des M. pectoralis minor) und II (LK zwischen lateralem und medialem Rand des M. pectoralis und interpectorale LK), N1mi: Mikrometastasen

N2: fixierte ipsilat. axilläre LK der Level I und II, ipsilat. LK entlang der A. mammaria interna

N3: ipsilat. infra- oder supraklavikuläre LK (Level III) mit/ohne Beteiligung der axillären LK oder ipsilat. LK entlang der A. mammaria interna

M0: keine Fernmetastasen

M1: Fernmetastasen

UICC	Größe des Primärtumors (T)	LK-Status (N)	Fernmetastasen (M)
0	Tis (Carcinoma in situ)	N0	M0
IA	T1 (≤ 2 cm)	N0	M0
IB	T0, T1	N1mi	M0
IIA	T0, T1	N1	M0
	T2 (2-5 cm)	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3 (> 5 cm)	N0	M0
IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IIB	T4 (jede Größe + Infiltration Brustwand u./o. Haut oder inflammatorisches MC)	N0, N1, N2	M0
IIIC	alle T	N3	M0
IV	alle T	alle N	M1

Außerdem können MC immunhistochemisch anhand der Expression von Östrogenrezeptoren (ER+), Progesteronrezeptoren (PR+) und des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2+), sowie dem Ki-67 Proliferationsindex spezifiziert werden. Anhand dessen kann eine adäquate Therapie ermittelt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Etwa 70 % der MC exprimieren einen ER (Böcker et al., 2012). Im Gegensatz hierzu sind Karzinome von Patientinnen mit *BRCA1* Mutationen häufig steroidrezeptornegativ (Ahrens und Kreipe, 2009).

Für EC vom Typ 1 (85 - 90 %) gilt die nicht-atypische Endometriumhyperplasie als Risikoläsion, die atypische Endometriumhyperplasie jedoch als eine Präkanzerose. Histologisch imponiert das EC häufig als endometrioides Adenokarzinom. Es wird nach dem Vorhandensein solider plattenepithelialer Anteile als low-grade oder high-grade gekennzeichnet. EC vom Typ 2 (10 - 15 %) entwickeln sich unabhängig einer Endometriumhyperplasie, histologisch, sind diese vermehrt serös oder klarzellig und werden als high-grade klassifiziert. Seröse EC weisen in 25 - 30 % eine HER2-Überexpression auf. Die Einteilung erfolgt anhand der in Tab. 2 angegebenen TNM-Klassifikation und FIGO-Stadien (Böcker et al., 2012; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Tab. 2: FIGO/TNM-Klassifikation des EC (2020), modifiziert nach Leitlinienprogramm Onkologie (2022)

TNM	FIGO	Definition
T0		Kein Anhalt für Primärtumor
T1	I	Begrenzt auf das Corpus uteri
T1a	IA	Begrenzt auf das Endometrium/Infiltration ≤ 50 % des Myometriums
T1b	IB	Infiltration ≥ 50 % des Myometriums
T2	II	Infiltration des Cervix uteri Stroma
T3 u/o N1/N2	III	Lokale u./o. regionäre Ausbreitung wie nachfolgend beschrieben
T3a	IIIA	Befall der Serosa u./o. Adnexe (direkt/Metastase)
T3b	IIIB	Befall der Vagina u./o. Parametrien (direkt/Metastase)
N1	IIIC1	Metastasen in Becken-LK
N2	IIIC2	Metastasen in paraaortalen LK
T4	IVA	Infiltration von Blasen- und/oder Rektumschleimhaut
M1	IVB	Fernmetastasen

Die WHO klassifiziert das mesenchymale uLMS histologisch in das klassisch spindelzellige, das epitheloide und das myxoide uLMS. ER, PR und Androgenrezeptoren sind nach Studienergebnissen in 30 - 40 % der uLMS exprimiert (Leitlinienprogramm Gynäkologie und Geburtshilfe, 2021; Mittal und Demopoulos, 2001).

1.1.5 Aktuelle Therapiekonzepte

Die Wahl der entsprechenden Therapie ist abhängig von verschiedenen Faktoren, unter anderem der Risikokonstellation, dem Grading, dem Patientenalter, dem immunhistochemischen Befund sowie der Beteiligung von Lymphknoten (Leitlinienprogramm Gynäkologie und Geburtshilfe, 2021; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022, 2021).

Zur Planung der Therapie von Patientinnen mit MC wird zunächst eine Stanzbiopsie durchgeführt, die pathomorphologisch aufgearbeitet wird. Bei einer Sentinel-Node-Biopsie wird untersucht, ob axilläre Lymphknoten infiltriert sind und eine Lymphonodektomie durchgeführt werden sollte. Ein kurativer Therapieansatz wird bei lokal begrenzten und bei fortgeschrittenen Tumoren ohne Fernmetastasierung gewählt. Hierbei kann eine chirurgische Tumorresektion mit evt. nachfolgender Radiotherapie und/oder Systemtherapie erfolgen. Die Tumorresektion kann brusterhaltend oder als vollständige Mastektomie erfolgen. Systemische Therapien beinhalten eine Antihormon-, Antikörper- oder Chemotherapie. Wird in Tumoren immunhistochemisch ein hormonsensitiver Rezeptor nachgewiesen, sollen diese Patientinnen für mindestens fünf Jahre eine endokrine Therapie mit einem selektivem Östrogenrezeptormodulator (z. B. Tamoxifen), GnRH-Analoga oder Aromatasehemmer erhalten. Eine adjuvante Chemotherapie (mit Taxanen und Anthracyclinen) ist bei HER2+ Tumoren (auch neoadjuvant, aber in Kombination mit Trastuzumab), triple-negativen oder Luminal-B-Tumoren (Ki-67 hoch, G3, high risk multigen assay, junges Erkrankungsalter, Lymphknotenbefall) indiziert. Der monoklonale Antikörper Trastuzumab wird in der Therapie von HER2+ Tumoren eingesetzt. Eine neoadjuvante Hormon- oder Chemotherapie kann bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem, primär inoperablem oder inflammatorischem MC eingesetzt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Ein fernmetastasiertes MC gilt aktuell als nicht heilbar. In dieser palliativen Situation stehen Lebensqualität mit einer möglichst nebenwirkungsarmen Verbesserung der Symptomatik im Vordergrund. Bei einem positiven Hormonrezeptorstatus wird auch in der palliativen Versorgung als Erstlinientherapie eine Hormontherapie empfohlen. Eine systemische Chemotherapie wird nur bei weiter fortschreitendem Progress oder einer stark fortgeschrittenen Metastasierung empfohlen. Eine Kombination mit einer Immuntherapie kann bei einer HER2+ Immunhistochemie erfolgen (Sayer et al., 2002).

Grundpfeiler in der Therapie eines uterinen EC oder LMS ist die Hysterektomie sowie die bilaterale Adnexexstirpation. Von einer Parametrienresektion kann abgesehen werden, wenn kein klinischer Verdacht auf eine Infiltration besteht. Außerdem gehen die molekulare Klassifikation und Lymphgefäßinvasion in die Wahl der Therapie mit ein. Auffällige suspekten Lymphknoten sollen entfernt werden. Eine postoperative adjuvante Strahlentherapie wird bei EC Typ 1 im Stadium I und II sowie bei EC Typ 2 empfohlen. Eine Ausnahme stellt hier das Stadium pT1a des EC Typ 1 dar. Eine Strahlentherapie wird Stadien abhängig als vaginale Brachytherapie oder perkutane Bestrahlung durchgeführt. In Stadium III und IV des EC Typ 1 wird eine adjuvante perkutane Radiotherapie mit gleichzeitiger Chemotherapie gefolgt von einer Chemotherapie empfohlen. Eine Chemotherapie kann mit Carboplatin und Paclitaxel durchgeführt werden. Bei lokal fortgeschrittenem serösen EC mit positivem HER2-Status kann eine Chemotherapie in Kombination mit Trastuzumab erwogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Bei Patienten mit einem auf den Uterus begrenzten LMS ist die Hysterektomie die Therapie der Wahl. Suspekten Lymphknoten sollten entfernt werden. Eine Chemotherapie kann nach Nutzen- und Risikoabschätzung, vorzugsweise in höheren Stadien, durchgeführt werden. Hier wurde ein Nachweis über ein signifikant verbessertes Überleben jedoch bisher nicht gezeigt. Bei metastasiertem uLMS wird das Anthracyclin Doxorubicin als Erstlinientherapie empfohlen. Eine Radiotherapie nach einer Komplettresektion wird nicht empfohlen (Leitlinienprogramm Gynäkologie und Geburtshilfe, 2021). Als Zweitlinientherapie werden Pazopanib, ein Multityrosinkinaseinhibitor und Trabectedin eingesetzt. Hier waren in Phase II bzw. Phase III-Studien geringe Remissionsraten beobachtet worden. Die Erkrankung stabilisierte sich in bis zu 50 % (Demetri et al., 2009; van der Graaf et al., 2012).

In einer aktuellen Studie wurde die Wirksamkeit Trabectedin in Kombination mit Doxorubicin untersucht. Es zeigte sich bei der Kombination von Doxorubicin mit Trabectedin als Erstlinientherapie bei einem nicht resektablen oder metastasierten Leiomyosarkom im Vergleich zur Monotherapie mit Doxorubicin ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben, verbunden zwar mit erhöhten Kosten, aber beherrschbarer Toxizität (Pautier et al., 2021).

1.1.6 Prognose

Patientinnen mit einem MC haben eine verhältnismäßig gute Heilungschance. Nach den Angaben des RKI lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate 2020 in Deutschland bei 88 %. Gründe hierfür können das Früherkennungsprogramm und die in den letzten Jahren verbesserten Therapien sein (Ronckers et al., 2023). Eine Datenerhebung von 1998 bis 2003 des Schwedischen Krebsinstituts in Seattle (USA), analysierte jährlich das Wiederauftreten von Mammakarzinomen nach Hormonstatus. Die Datenerhebung ergab eine 5-Jahres-Überlebensrate für Patientinnen mit ER+ und PR+ MC von 94 % und für triple-positive (ER+, PR+, HER2+) Karzinome von 91 %. Patientinnen mit HER2+ Karzinomen sowie triple-negativen (ER-, PR-, HER2-) MC zeigten eine etwas schlechtere Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 81 % (Kaplan und Malmgren, 2008). Die U.S. Food and Drug Administration (FDA) ließ 1998 das Trastuzumab für metastasierte Krebserkrankungen zu, als adjuvante Therapie jedoch erst im Jahr 2006.

Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland lag für Patientinnen mit einem EC in 2020 bei 78 % (Ronckers et al., 2023).

Patientinnen mit einem uLMS haben eine deutlich schlechtere Prognose. Hier wird das durchschnittliche 5-Jahres-Gesamtüberleben mit 40 - 50 % mit einer hohen Rezidivrate angegeben (Iasonos et al., 2013). Signifikante prognostische Faktoren sind hierbei vor allem das Tumorstadium, die Tumorgröße und der Mitoseindex (Abeler et al., 2009).

1.2 Hitzeschockprotein 27 (Hsp27)

1.2.1 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (Hsp) wurden erstmals 1962 in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Diese wurden, wie der Name impliziert, durch Hitzeschock induziert (Ritossa, 1962). Hsp dienen dem Schutz der Zelle vor toxischen Effekten in verschiedenen Stresssituationen. Zu finden sind Hsp in allen Organismen. Die Einteilung der Hsp erfolgt nach ihrem Molekulargewicht in Hsp20-30 kDa (small Hsp), Hsp50-60 kDa, Hsp70 kDa, Hsp90 kDa und Hsp100-110 kDa (Kampinga et al., 2009). Bis heute wurde gezeigt, dass nicht nur thermischer, sondern auch oxidativer, akuter oder chronischer Stress zu einer vermehrten Expression der Hsp führen kann. Hsp fungieren intrazellulär als molekulare Chaperone, in dem sie andere Proteine bei der Bildung und Erhaltung ihrer Sekundärstruktur unterstützen, die Proteinaggregation vermeiden und die Löslichkeit und Umfaltung bereits aggregierter Proteine fördern (Schmitt et al., 2007).

Werden in der Zelle veränderte Umweltbedingungen, wie Hypoxie, verminderter pH, Hyperthermie, osmotischer Stress oder ischämische Verletzungen registriert, reagiert die Zelle mit der vermehrten Bildung von Hsp. Sie wirken protektiv gegen Zellschäden, tragen zur Homöostase bei und wirken sich damit positiv auf das Überleben der Zelle aus (Arrigo et al., 2005). Außerdem nehmen einige Hsp eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Apoptose ein, indem sie als starke antiapoptotische Proteine an verschiedenen Angriffspunkten im apoptotischen Pathway wirken (Garrido et al., 2003; Schmitt et al., 2007).

Veränderte Konzentrationen von Hsp sind unter anderem in neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit (Renkawek et al., 1994), bei Atherosklerose (Xu et al., 2000) oder bei chronischer Herzinsuffizienz (Genth-Zotz et al., 2004) beschrieben. Zudem konnten viele Studien eine erhöhte Expression von Hsp in malignen Zellen nachweisen (Ciocca und Calderwood, 2005; Zhao et al., 2014).

1.2.2 Hsp27 – Aufbau und Funktion

Hsp27 ist ein ATP-unabhängiges Hsp, das zur Gruppe der kleinen Hsp gehört. Es ist aus einer am C-Terminus befindlichen α -Kristalline-Domäne aufgebaut. Über die flexible Region des COOH-Endes erfolgt die Interaktion mit target-Proteinen. Der C-Terminus befähigt das Hsp27 außerdem zur Chaperonfunktion. Der N-terminale Teil mit der dort lokalisierten WDPF-Domäne ist für die Bildung großer Oligomere sowie die Bindung verschiedener Substrate entscheidend (Gusev et al., 2002; Lelj-Garolla und Mauk, 2012). Small Hsp können große oligomere Strukturen bilden, die als wichtiger Faktor die Aktivität der Hsp kontrollieren. An den Serinresten 15 und 78 sowie 82 kann Hsp27 phosphoryliert werden. Hierbei nehmen die MAPK-aktivierten Proteinkinasen (MAPKAP Kinasen) und Proteinkinase D eine entscheidende Rolle ein. Diese Phosphorylierung kann die molekulare Konfiguration des Hsp27 bestimmen. *In vitro* führt die Phosphorylierung des Hsp27 neben der Abnahme der Größe der Oligomere auch zu einer Reduktion der Funktion als molekulares Chaperon. Im Gegensatz hierzu bildet unphosphoryliertes Hsp27 große Multimere, ist primär im Zytoplasma lokalisiert und erfüllt vor allem seine Funktion als Chaperon (Gusev et al., 2002; Rogalla et al., 1999). In Abb. 1 ist die Struktur des Hsp27 schematisch dargestellt.

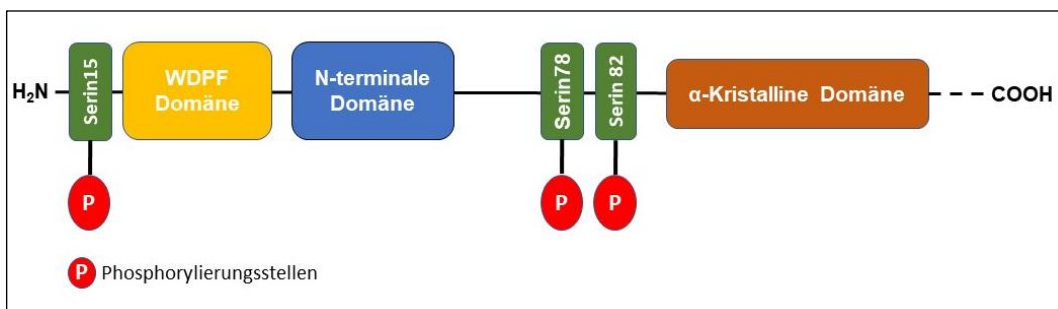


Abb. 1: Struktur von Hsp27, modifiziert nach Gusev et al. (2002)

Das Hsp27 erfüllt im Organismus anti-apoptotische und zytoprotektive Aufgaben. Über verschiedene Mechanismen fördert es die Zellproliferation sowie Migration und Invasion. Über die Interaktion mit dem Protein p53, ein Tumorsuppressor, kann Hsp27 den Zellzyklus beeinflussen. Der p53-Pathway moduliert das „Altern“ der Zelle. In gesunden Zellen induziert p53 den Zellzyklusinhibitor p21, wodurch es zum Zellwachstumsarrest und Apoptose kommt. Dies schützt vor übermäßiger Zellproliferation (Heinrich et al., 2014). Hohe Level der Hsp inhibieren das p53 und erlauben der Zelle die weitere Proliferation.

Somit können erhöhte Hsp27-Konzentrationen den Prozess des Alterns einer Zelle umgehen und so Tumore bilden (Sherman et al., 2007).

Desweiteren wirkt das Hsp27 antioxidativ. Es verleiht der Zelle die Eigenschaft intrazelluläre Glutathionspiegel hochzuhalten und damit adäquat unter anderem auf reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu reagieren. Außerdem kommt es zur Reduktion intrazellulärer Eisenspiegel. Eisen begünstigt die Bildung von Hydroxylradikalen. Diese Mechanismen schützen die Zelle vor einem frühen oxidativen Zelltod und steigern das Überleben der Zelle. Schlüsselenzyme sind hierbei die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und die Glutathionreduktase (Arrigo et al., 2005). Die Überexpression von Hsp27 in der Zelle verleiht einer Zelle erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress (Rogalla et al., 1999). Eine erhöhte Expression des Hsp27 wird auch von einer Stabilisierung des F-Aktin Zytoskeletts begleitet (Schmitt et al., 2007).

Außerdem kann das Hsp27 Einfluss auf die DNA-Reparatur und auf das Splicing der mRNA als grundlegender Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression nehmen (Katsogiannou et al., 2014). Ferner kann das Hsp27 die Translation einiger mRNA's beeinflussen. Über die Bindung des Hsp27 an den eIF4G-Faktor (CAP-binding initiation-complex) kann während eines Hitzeschocks die Translation inhibiert werden (Cuesta et al., 2000).

1.2.3 Hsp27 als Regulator der Apoptose

Das Hsp27 nimmt in der Regulation der Apoptose eine bedeutsame Schlüsselrolle ein. Apoptose als programmierter Zelltod dient der Sicherstellung der Zellhomöostase. Erhöhte zelluläre Level an Hsp27 wirken einem apoptotischen Zelltod entgegen. Das Hsp27 kann an verschiedenen Angriffspunkten im intrinsischen und extrinsischen Pathway auf die Apoptose wirken.

Im intrinsischen Pathway kann Hsp27 über den Schutz des F-Aktin die Interaktion von Caspase 8 und dem proapoptischen Molekül Bid inhibieren. Des Weiteren bindet Hsp27 Cytochrom C, nachdem dieses aus dem Intermembranraum des Mitochondriums freigesetzt wurde. Außerdem inhibiert es die Caspase 3 sowie die Bildung des Apoptosom aus Cytochrom C, Apaf 1 und Procaspase 9 (Garrido et al., 2003).

Der extrinsische apoptotische Weg wird durch die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren vermittelt. Hierzu zählt der FAS-Rezeptor, der nach Bindung des FAS-Liganden die Initiatorcaspase 8 aktiviert (Heinrich et al., 2014). Phosphoryliertes Hsp27 inhibiert direkt das Protein DAXX, das während der FAS-vermittelten Apoptose in die Zellmembran transloziert und damit den Weg über JNK (c-Jun N-terminale Kinasen = Unterfamilie der MAPK-Superfamilie) vermittelt (Garrido et al., 2003; Schmitt et al., 2007).

Außerdem wurde gezeigt, dass Hsp27 mit der Proteinkinase Akt interagiert. Akt phosphoryliert und inhibiert unter anderem proapoptische Proteine der Bcl-2 Familie und Caspase 9 (Schmitt et al., 2007). Des Weiteren kann die Kinase Akt die I κ B-Kinase phosphorylieren und damit über den NF- κ B-Signalweg die Apoptose inhibieren (Ozes et al., 1999). Unter Stressbedingungen wird die Hsp27 induzierte proteosomale Degradation von ubiquitinierten Proteinen, wie dem I κ B α , gesteigert, wodurch die NF- κ B-Aktivität verbessert und das Überleben der Zelle begünstigt wird (Schmitt et al., 2007).

Das Hsp27 hat somit die Fähigkeit die Apoptose zu verhindern, indem mit unterschiedlichen Partnern an verschiedenen Stellen des Apoptose-Pathways eine Interaktion erfolgt.

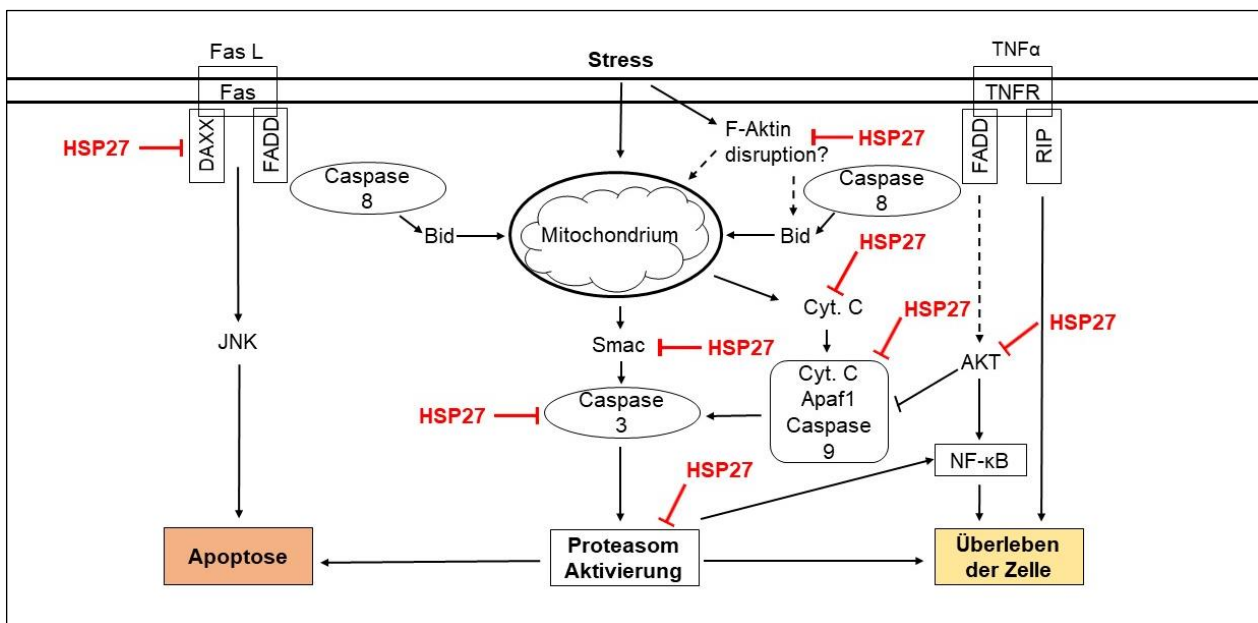


Abb. 2: Die Rolle des Hsp27 in der Apoptose, modifiziert nach Garrido et al. (2003), Schmitt et al. (2007)

1.2.4 Sekretiertes Hsp27

Der Mechanismus der Hsp27-Freisetzung aus den Zellen ist noch weitgehend unerforscht. Stope et al. (2017) beschrieben einen Sekretionsmechanismus abhängig von der intrazellulären Hsp27-Konzentration, aber unabhängig vom Sekretionsweg über das endoplasmatische Retikulum.

Extrazelluläres Hsp27 spielt in der Modulation immunologischer Prozesse eine entscheidende Rolle. Es wird vermutet, dass das Hsp27 die Immunantwort über pro- und antiinflammatorische Zytokine beeinflusst (Salari et al., 2013). Eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs kann über die Bindung des Hsp27 an den TLR-3 induziert werden. In diesen Zusammenhang steht auch die Förderung der Angiogenese (Thuringer et al., 2013).

1.2.5 Hsp27 in malignen Zellen

Es wurde bereits in vielen Studien beschrieben, dass Hsp27 in malignen Zellen, wie dem MC (Kang et al., 2008), dem Ovarial- (Zhao et al., 2014) und dem Prostatakarzinom, (Cornford et al., 2000) hoch reguliert ist. Ferner wurde gezeigt, dass eine vermehrte Expression des Hsp27 unter anderem im hepatozellulären Karzinom (HCC) und im Prostatakarzinom mit einer schlechteren Prognose, in HCC auch mit einer vermehrten Metastasierung, vermittelt durch eine erhöhte Zellmotilität, einhergehen kann (Ciocca und Calderwood, 2005). Eine erhöhte Serumkonzentration von Hsp27 ist auch in Ovarialkarzinomzellen mit einer peritonealen Metastasierung assoziiert (Zhao et al., 2014).

Neben der erhöhten Expression von Hsp27 in Karzinomzellen der Mamma, kann eine Zunahme der Expression des Hsp27 über die Progression von einer normalen über proliferative Brustläsionen bis zum invasiven Mammakarzinom beobachtet werden. Dabei wurde in ER+ Zelllinien eine signifikant höhere Expression von Hsp27 als in ER- Zelllinien nachgewiesen. Hsp27 wird in diesem Zusammenhang als östrogen-rezeptor-assoziiertes Protein bezeichnet (O'Neill et al., 2004; Porter et al., 1996).

Auch in EC-Zellen und assoziierter Endometriumhyperplasie ist eine Überexpression des Hsp27 beobachtet worden (Wataba et al., 2001). Jedoch ist die Hsp27-Konzentration insbesondere auch in der proliferativen Phase von endometrialen Drüsenzellen erhöht (Padwick et al., 1994).

Außerdem kann das Hsp27 Einfluss auf die Resistenz von Karzinomzellen gegenüber einigen Chemotherapeutika nehmen. Eine erhöhte Hsp27-Konzentration ist mit einer verringerten Sensitivität gegenüber Arzneimitteln assoziiert (Hansen et al., 1999). Die Inhibition des p53, als Schlüsselmolekül der Zellzykluskontrolle, scheint hierbei eine Rolle zu spielen (O'Callaghan-Sunol et al., 2007). Wichtige Eigenschaften einer Zelle bei einer Hsp27 Überexpression im Rahmen einer malignen Erkrankung sind in Abb. 3 dargestellt.

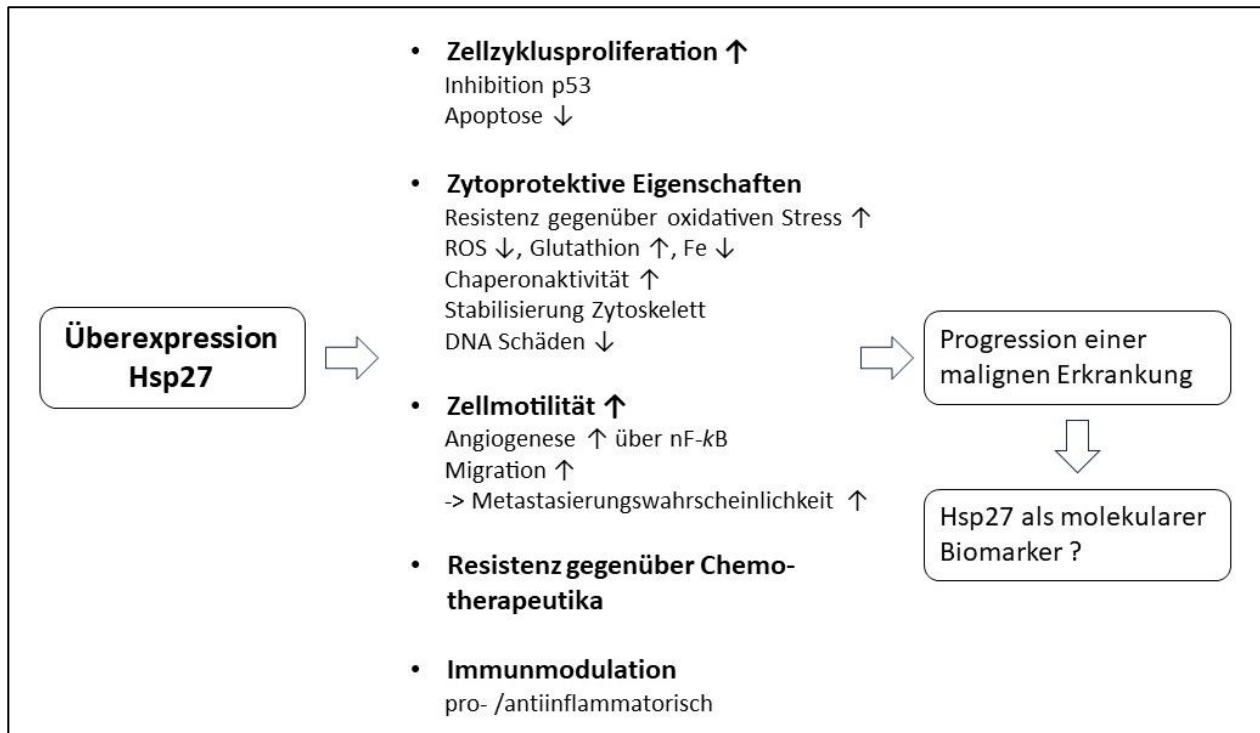


Abb. 3: Hsp27 Überexpression in malignen Zellen

Eine Bestimmung der Serumkonzentration von Hsp27 wird aktuell mit der Frage nach einem möglichen Biomarker im Hinblick auf die Früherkennung von Malignomen bei Patientinnen und Patienten diskutiert. Patientinnen mit der Diagnose eines MC hatten im Mittelwert eine höhere Serumkonzentration des Hsp27 als die Kontrollpatientinnen (Fanelli et al., 1998). Ferner ist auch eine erhöhte Serumkonzentration von Hsp27 bei Patientinnen mit einem epithelialen Ovarialkarzinom mit peritonealen Metastasen im Vergleich mit Patientinnen mit benignen ovariellen Veränderungen oder gesunden Frauen beobachtet worden (Zhao et al., 2014).

1.3 Nicht-Invasives Physikalisches Plasma (NIPP)

Physikalisches Plasma ist ein teilweise ionisiertes, elektrisch leitendes Gas, welches als vierter Aggregatzustand bezeichnet wird. Es ist zusammengesetzt aus Ionen, Elektronen, Photonen, Neutronen, freien Radikalen, angeregten Atomen und Molekülen sowie elektromagnetischer Strahlung (Lendeckel et al., 2015). Plasma entsteht, wenn freie Elektronen im elektromagnetischen Feld beschleunigt werden, sodass die kinetische Energie zur Ionisation von Atomen führt. Freie Elektronen sind einerseits in der Atmosphäre vorhanden oder entstehen andererseits durch Anlegen einer Spannung (Kletschkus et al., 2020a).

Im verwendeten Atmospheric Pressure Plasma jet kINPen[®] MED wird ein hochfrequentes Wechselfeld erzeugt. Die Ionisation erhöht die Anzahl geladener Teilchen, sodass diese im elektrischen Feld immer häufiger zusammenstoßen und die Freisetzung weiterer geladener Teilchen begünstigen. Als Trägergas wird das Edelgas Argon verwendet. Die Teilchen im physikalischen Plasma und das Trägergas Argon stehen permanent in Wechselwirkung untereinander und mit der Umgebung (Kletschkus et al., 2020a). Dies führt zur Entstehung von reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS), welche wahrscheinlich eine bedeutsame Rolle in der Wirkung des Plasmas haben (Woedtke et al., 2019).

Charakteristisch ist das Leuchten des Plasmas, was durch Emission von sichtbarer Strahlung entsteht. In der Natur findet sich Plasma im Universum: in der Sonne, in den Sternen oder in Blitzen. Künstlich hergestellt gibt es Plasma unter anderem in Displays und Energiesparlampen (Friedman, 2020; Weiss et al., 2015).

Es wird thermisches und nicht-thermisches Plasma sowie Niederdruck-, atmosphärisches und Hochdruckplasma unterschieden (Heinlin et al., 2011). Thermisches Plasma (Temperatur > 80 °C) findet in der Chirurgie Anwendung in der Plasmakoagulation. Hier kann es z. B. zur endoskopischen Blutstillung bei gastroenterologischen Krankheitsbildern, wie Angiodysplasien, einem blutenden Magenulcus oder nach Polypektomie verwendet werden (Canard und Védrenne, 2001). Nicht-thermisches Plasma (25 - 45 °C) wird bereits zur Sterilisation hitze-empfindlicher Materialien eingesetzt. Es führt innerhalb von Sekunden zur Inaktivierung von Bakterien, Pilzen, Sporen, verschiedener Parasiten und anderen Pathogenen (Friedman, 2020). Nicht-thermisches Plasma hat die besondere Eigenschaft, gewebeschonend auf der Körperoberfläche zu wirken. Aus diesem Grund

wird nicht-thermisches Plasma auch als Nicht-Invasives Physikalisches Plasma (NIPP) bezeichnet (Wang et al., 2023). NIPP wird in der Dermatologie aufgrund seiner antibakteriellen Wirkung zur Sterilisation von Wunden, zur Verbesserung der Wundheilung und zur Behandlung von chronischen Wunden mit mikrobieller Besiedlung eingesetzt (Friedman, 2020).

Die Wirkmechanismen von NIPP sind noch nicht vollständig verstanden. RONS scheinen in der Wirkung des NIPP eine Schlüsselrolle zu haben. Die Wirkungen von NIPP auf Säugerzellen sind vielfältig. NIPP zeigt antiproliferative Effekte und kann zur Induktion von Apoptose und zum Zellzyklusarrest führen (Vandamme et al., 2012). Außerdem kann es auf die Zellmigration und Angiogenese einwirken sowie Einfluss auf die Expression von Oberflächenproteinen, Zelladhäsionsmolekülen oder Stress-induzierten Hsp nehmen. Es zeigt reversible Effekte auf die DNA und die Membranpermeabilität (Keidar et al., 2013; Woedtke et al., 2014). Über Aktivierung des Immunsystems kann wahrscheinlich ein immunogener Zelltod durch NIPP induziert werden (Khalili et al., 2019).

Die NIPP-Behandlung maligner Zellen ist Gegenstand aktueller Forschungen. Bis heute haben bereits einige Arbeiten antiproliferative Effekte von NIPP auf Tumorzellen nachgewiesen. Anti-neoplastische Effekte wurden unter anderem im Mamma- (Kim et al., 2010), Ovarial- (Koensgen et al., 2017) und Prostatakarzinomen (Weiss et al., 2015) beschrieben. Interessanterweise wird NIPP auch eine Rolle bei der Sensibilisierung von Medikamenten wie Zytostatika zugesprochen (Murillo et al., 2023).

In dieser Arbeit wurde der Atmospheric Pressure Plasma jet kINPen® MED der Firma neoplas tools GmbH Greifswald verwendet. Dieser wurde als Medizinprodukt zur Behandlung von chronischen Wunden beim Menschen CE-zertifiziert. Aufgebaut ist der Pen aus einer Radiofrequenzelektrode, einer Kapillare und einem Gaszuflusssystem, dargestellt in Abb. 4. Es handelt sich um NIPP, welches durch die geringe Temperatur und präzise Anwendungsmöglichkeit gewebeschonend ist.

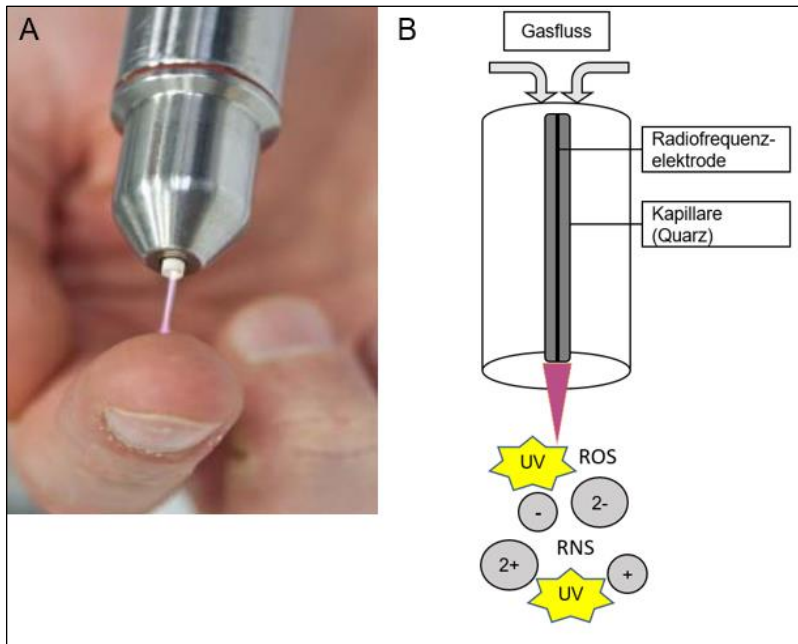


Abb. 4: Aufbau des Atmospheric Pressure Plasma jet kINPen® MED
A: INP, Greifswald/neoplas tools GmbH Greifswald Germany (Woedtke et al., 2019)
B: modifiziert nach Weiss et al. (2015)

1.4 Zielsetzung

Während Patientinnen, die an einem hormonsensitiven MC erkranken, eine verhältnismäßig gute Prognose haben, stellt die Behandlung triple-negativer MC eine besondere Herausforderung dar. Vor allem junge Patientinnen mit *BRCA*-Mutationen zeigen in 85 - 90 % einen ER- und PG-Rezeptorstatus (Ahrens und Kreipe, 2009). Patientinnen mit uterinen Karzinomen, besonders uLMS, haben bei den aktuellen Therapiemöglichkeiten deutlich geringere Überlebenschancen (Iasonos et al., 2013). Ein neuer Ansatz für eine erfolgreiche Tumorthherapie könnte die intrazelluläre Reduktion des antiapoptotisch wirksamen Hsp27 darstellen.

Die Behandlung mit NIPP in der Tumorthherapie ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Keidar et al., 2013). Durch die antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen und den Einfluss auf das Hsp27 könnte die NIPP-Behandlung zukünftig als eine vielversprechende Therapiemöglichkeit etabliert werden. Auch kann das Hsp27 als potenzieller Biomarker für maligne Tumore oder ein individuelles Therapieansprechen diskutiert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von NIPP auf die Hsp27-Expression in MC-, EC- und uLMS-Zellen zu untersuchen. Im Zentrum der Untersuchungen standen folgende Fragestellungen:

- Welchen Einfluss hat eine direkte NIPP-Behandlung auf die Proliferation von MC-, EC- und uLMS-Zellen?
- Beeinflusst NIPP die Transkription des Hsp27?
- Führt die NIPP-Behandlung zur Reduktion der intrazellulären Hsp27-Konzentration?
- Kann die NIPP Behandlung die Sekretion des Hsp27 stimulieren und Einfluss auf die extrazelluläre Hsp27-Konzentration nehmen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden für die Untersuchung der Wirkung von NIPP auf das MC ausgewählt. Die Zelllinien sind Teil des NCL-60-Zelllinienpanel des National Cancer Institute (NCI) und werden in der Forschung zu MC häufig verwendet.

MCF-7-Zellen wurden aus einem Pleuraerguss einer 69-jährigen Patientin mit metastasiertem Adenokarzinom der Mamma isoliert und kultiviert. MCF-7-Zellen sind hormonsensitive Zellen, immunhistochemisch ER+ und HER2+. Die Zellen sind durch einen niedrigen Ki-67 Proliferationsindex sowie ein gutes Ansprechen auf Chemotherapien charakterisiert (DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, 2023; Holliday und Speirs, 2011).

MDA-MB-231 wurden aus einem malignen Pleuraerguss einer 51-jährigen Patientin, die an einem epithelialen Adenokarzinom der Mamma erkrankte, isoliert und werden als triple-negativ klassifiziert (American Type Culture Collection, 2023; Holliday und Speirs, 2011).

Für die Analyse der Wirkung von NIPP auf EC wurden MFE-296-Zellen verwendet. Diese stammen aus einem primären endometrialen Adenokarzinom (G2) einer 68-jährigen Frau und zeichnen sich durch einen Androgenrezeptor aus (DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, 2023).

SK-UT-1 Zellen stammen aus einem primären uLMS (Grad III) einer 75-jährigen Patientin und wurden für die Untersuchung der Effekte von NIPP auf uLMS ausgewählt. Hierbei handelt es sich um einen gemischten mesodermalen Tumor (CLS-Cell Lines Service, 2023).

In der folgenden Tabelle sind verwendete Kultivierungsmedien und Bezugsquellen angegeben.

Tab. 3: Kultivierungsmedien und Bezugsquellen der Zelllinien

Zelllinien		Kultivierung		
Entität	Zelllinie	Medium	Zusätze	Bezugsquelle
MC	MCF-7	DMEM/F12	10 % FBS 0,125 % Gentamycin	DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Braunschweig, DE)
MC	MDA-MB-231	DMEM/F12	10 % FBS 0,125 % Gentamycin	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
EC	MFE-296	40 % RPMI 1640 40 % MEM (Earle's)	20 % h.i. FBS 1x ITS-G 0,125 % Gentamycin	DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Braunschweig, DE)
uLMS	SK-UT-1	DMEM/F12	10 % FBS 1x ITS-G 0,125 % Gentamycin	Cell Lines Service (Eppelheim, DE)

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien (Tab. 4 und Tab. 5) wurden für die Versuchsreihen eingesetzt.

Tab. 4: Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Vacuum Aspiration System	Ditabis (Pforzheim, DE)
accu-jet pro	BRAND GmbH (Wertheim, DE)
Autoklav VX-150	Systec (Wettenberg, DE)
CASY® Cell Counter and Analyzer Modell TT	Roche Innovatis AG (Bielefeld, DE)
CFX96 Touch Real -Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
CO ₂ -Inkubator MCO-18 AIC	Sanyo (Moriguchi, JP)
Crush-Eis Bereiter	Manitowoc, Manitowoc (USA)

Tab. 4: Geräte Fortsetzung

Gerät	Hersteller
Inkubationsbad 1003	GFL (Burgwedel, DE)
Kühlsysteme:	
-4°C Laborkühlschrank medline LKv 3910	Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß, DE)
-4°C Premiere VKS 25046	Premiere Hausgerätetechnik (Ascheberg)
-20°C MDF-U333	Sanyo (Moriguchi, Japan)
-80°C MDF-U53V	Sanyo (Moriguchi, Japan)
-80°C Tiefkälte-Lagerschrank Kryotec	Kryotec-Kryosafe GmbH (Hamburg, DE)
-14°C Ultra-Low Temperature Freezer ULT10140-9-M22	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Laborspüler G 7883 CD	Miele Professional (Gütersloh, DE)
Magnetrührer	VWR International (Darmstadt, DE)
Mehrkanalpipette	BRAND GmbH (Wertheim, DE)
Mikroplatten Waschgerät Asys Atlantis	Biochrom Asys (Salzburg, AT)
Mikroskop Nikon TMS	Nikon Instruments (Düsseldorf, DE)
Nanophotometer Pearl	Implen GmbH (München, DE)
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik (Lancing, GB)
pH-Meter FE20 FiveEasy™ pH	Mettler-Toledo (Gießen, DE)
Pipettensatz	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Pipetus®	Hirschmann (Eberstadt, DE)
Plasmajet – kIN-Pen® MED	Neoplas tools (Greifswald, DE)
Präzisionswaage PCB	KERN & Sohn (Balingen-Frommern, DE)
Reinstwassersystem Synergy	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Rollmischer RS-TR 5	Phoenix Instruments (Garbsen, DE)
Schüttelinkubator KS-15 CONTROL	Edmund Bühler BmbH (Hechingen, DE)
Sicherheitswerkbank HERAsafe KS9	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Stromversorgungsgerät PowerPack™	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
T3000 Thermocycler biometra	Analytik Jena (Jena, DE)
Thermocycler, peqSTAR 96X Universal	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, DE)

Tab. 4: Geräte Fortsetzung

Gerät	Hersteller
Thermomixer 5437	Eppendorf (Hamburg, DE)
Tischabzug Scala	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG (Wangen, DE)
Trans Blot Turbo SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
VWR™ Analog Vortex Mixer	VWR (Radnor, PA, USA)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, DE)
Zentrifugen:	
5810R	Eppendorf (Hamburg, DE)
5415R	Eppendorf (Hamburg, DE)

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Abdeckfolie für ELISA SealPlate: 676 070	Excel Scientific (Victorville, CA, USA)
Amersham™ Protran™ 0,2µm NC	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, DE)
Becherglas 250 ml, 500 ml	VWR (Radnor, PA, USA)
BZO Seal Film Adhesive Optical Film	Biozym (Hessisch Oldendorf, DE)
CASY-Röhrchen	Roche Innovatis AG (Bielefeld, DE)
ELISA Mikrotiterplatte	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Etikettenklebebänder	PRECISION DYNAMICS CORPORATION (San Fernando, CA, USA)
Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Leser FLU-Ostar OPTIMA	BMG LABTECH (Ortenberg, DE)
Gestelle und Racks:	
Acrylglasgestell 4x12	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
neoRack-Röhrchen-Gestell 3x3	Thermo Scientific Nalgene Labware (Waltham, MA, USA)
Handtuchpapier Zick-Zack Handtücher	Heemann OHG (Falkensee, DE)
Indikatorband für Dampfsterilisation	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Kapillarspitze MultiFlex Round Tip	Carl Roth (Karlsruhe, DE)

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien Fortsetzung

Material	Hersteller
Kryo-Aufbewahrungsbox mit Deckel	neoLab (Heidelberg, DE)
Kryo-Einfrierröhrchen	Greiner bio-one (Frickenhausen, DE)
Lab Marker	VWR (Radnor, PA, USA)
Laborglasflaschen: 50 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml	DURAN Group GmbH (Wertheim/Main, DE)
Messzylinder	
100 ml	BRAND GmbH und CO KG (Wertheim, DE)
500ml	Isolab Laborgeräte GmbH (Wertheim, DE)
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Mini PROTEAN Comb, 10-Well	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Mini PROTEAN Gaskets	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Mini PROTEAN Glass Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
PCR 96-Well TM-MT-Platte, weiß	Biozym (Hessisch Oldendorf, DE)
Pinzette	neoLab (Heidelberg, DE)
Pipettenspitzen	
10 µl SurPhob	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
10µl	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, DE)
200 µl	VWR (Radnor, PA, USA)
1275 µl	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Schutzhandschuhe:	
Peha-soft nitrile	Paul Hartmann AG (Heidenheim, DE)
Nitrile Risk-CHEMO-protectLAB	HANSA-TRADING HTH GmbH & Co (Hamburg, DE)
Cryo-Gloves	TEMPSHIELD (Maine, USA)
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Stegeinsatz für Kryoboxen	Carl Roth (Karlsruhe, DE)

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien Fortsetzung

Material	Hersteller
TC-Flasche T75	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
TC-Platte 6-Well, 24-Well, 96-Well	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell, Western Blot System	Bio-Rad Laboratories (München, DE)
Vernichtungsbeutel mit Tischständer	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Whatmann Chromotography Paper 20x20	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Zentrifugationsröhrchen: 15ml, 50ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)

2.1.3 Chemikalien

Die in Tab. 6 aufgeführten Chemikalien wurden für die Versuchsreihen verwendet.

Tab. 6: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid (30 %)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Bovine serum albumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
CASY-Ton®	OMNI Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, DE)
CASY-blue®	OMNI Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, DE)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Coomassie Blue G250	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München, DE)
ECL-Homemade Detektionslösung	Solution A; Solution B; 30 % H ₂ O ₂
Ethanol 75 %, unvergällt	TH. GEYER (Renningen, DE)
Ethanol 96 %	Universitätsapotheker (Greifswald, DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)

Tab. 6: Chemikalien Fortsetzung

Chemikalie	Hersteller
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Glycerol	Merck (Darmstadt, DE)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Händedesinfektion sensiva	Schülke GmbH (Norderstedt, DE)
Insulin human Actrapid® Penfill 100 IE/ml Injektionslösung	Novo Nordisk (Bagsvaerd, DK)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Methanol ≥ 99,5 %	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Milchpulver	Holle (Riehen, CH)
M-MLV 5x Puffer	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumchlorid (NaHCO ₃)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis (Heidelberg, DE)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
PageRuler Prestaned Protein Ladder	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Phosphate-buffered Saline (PBS) -Ca ²⁺ -Mg ²⁺	Biochrom AG (Berlin, DE)
PBS Trockensubstanz	Biochrom AG (Berlin, DE)
Ponceau S	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Reaktionspuffer	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Roti-Block, 10x Konzentrat	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Salzsäure (HCl), rauchend 37 %	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich (München, DE)
Subtrat Reagent Pack - Color A (Wasserstoffperoxid) - Color B (Tetramethylbenzidine)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Trichloressigsäure	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe, DE)

Tab. 6: Chemikalien Fortsetzung

Chemikalie	Hersteller
Tris-HCl	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Trizol, peqGOLD TriFast™	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, DE)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (München, DE)

2.1.4 Gase

Das Edelgas Argon dient als Trägergas im verwendeten kINPen® MED. Reinheit und Herstellerangaben sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 7: Gase

Gas	Reinheit	Hersteller
Argon	≥ 99,999 %	Air Liquide (Düsseldorf, DE)

2.1.5 Puffer und Lösungen

Nachfolgend ist die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

Tab. 8: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
10 % APS	10 % APS ad. A. demin.
10 % SDS	10 % SDS-Pellets ad. A. demin
10x Laufpuffer	24,8 M Tris 0,192 M Glycin ad. A. demin. pH 8,3
10x TBS	0,2 M Tris 1,5 M NaCl pH 7,6
1x Lämmli-Puffer	50 % 2x Lämmli 45 % A. bidest 5 % β-Mercaptoethanol

Tab. 8: Puffer und Lösungen Fortsetzung

Puffer	Zusammensetzung
1x SDS-Laufpuffer	35,75 g Tris 180 g Glycin 12,5 g SDS 1:10 Verdünnung des 10x Laufpuffers mit A. demin.
1x TBS-T	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20 ad. A. demin.
2x Lämmli-Puffer	100 mM Tris/HCl 20 % Glycerol 4 % SDS 0,02 % Bromphenolblau
5x Proteinladepuffer	156 mM Tris/HCl, pH 6,8 25 % Glycerol 12,5 % β -Mercaptoethanol 5 % SDS 0,2 % Bromphenolblau
CASY Ton	154 mM Tris-HCl 0,1 mM EDTA
DEPC-behandeltes Wasser	0,1 % DEPC autoklaviert
ELISA Reagent Diluent Blockierpuffer	1 % BSA in PBS
ELISA-Stopplösung	2 N Schwefelsäure
ELISA-Waschpuffer	0,05 % Tween® 20 in PBS
Milchpulver-Block	0,25 g Milchpulver 5 ml TBS-T
Ponceau S Lösung	0,2 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure
Primärantikörperlösung (1:10.000)	5 % BSA ad TBS-T
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,0 ad. A. demin.
Sekundärantikörperlösung (1:5.000)	1x Roti®-Block ad. A. demin
Solution A	0,1 M Tris, pH 8,6; 50 mg Luminol
Solution B	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure 10 ml DMSO

Tab. 8: Puffer und Lösungen Fortsetzung

Puffer	Zusammensetzung
Substrat	Substrat A und Substrat B im Verhältnis 1:1
Transferpuffer	20 % Methanol 10 % 10x Laufpuffer
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8 ad. A. demin.

2.1.6 Kommerzielle Kits und Reagenzien

Für die Versuchsreihen wurden folgende kommerzielle Kits und Reagenzien eingesetzt.

Tab. 9: Kommerzielle Kits und Reagenzien

Produkte	Hersteller
dNTP-Mix 10 mM	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Human Total Hsp27 DuoSet IC ELISA	R&D Systems (Minneapolis, USA)
SensiMix™ SYBR Hi-ROX	Bioline GmbH (Luckenwalde, DE)

2.1.7 Antikörper

In Tab. 10 sind die für den Western Blot verwendeten Primär- und Sekundärantikörper mit Herstellerangaben, Spezies und Gebrauchsverdünnung abgebildet.

Tab. 10: Antikörper Western Blot

Antigen	Art.-Nr./Hersteller	Spezies	Gebrauchsverdünnung
Primärantikörper			
Anti-GAPDH mAb	#2118, Cell Signaling (Danvers, USA)	Kaninchen	1:10.000
Anti-Hsp27 mAb	#2402, Cell Signaling (Danvers, USA)	Maus	1:10.000

Tab. 10: Antikörper Western Blot Fortsetzung

Antigen	Art.-Nr./Hersteller	Spezies	Gebrauchsverdünnung
Sekundärantikörper			
α-Maus	#7411, Cell Signaling (Danbers, USA)	Pferd	1:5.000
α-Kaninchen	#7075, Cell Signaling (Danbers, USA)	Ziege	1:5.000

2.1.8 Enzyme und Primer

Nachfolgend sind in Tab. 11 die für die Versuche mittels Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Enzyme-linkend Immunosorbent Assay (ELISA) verwendeten Enzyme aufgeführt. Außerdem sind in Tab. 12 die im Rahmen der RT-PCR verwendeten Forward- und Reverse-Primer dargestellt.

Tab. 11: Enzyme

Produkt	Hersteller
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega (Madison, WI, USA)
RiboLock™ RNase-Inhibitor	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase	R&D Systems (Minneapolis, USA)

Tab. 12: Primer RT-PCR

Primer	Sequenz
Hsp27 FOR	5'-GCTGACGGTCAAGACCAAGGATG-3'
Hsp27 REV	5'-GGATGGTGATCTCGTTGGACTGC-3'
RPLP0 FOR	5'-CAATGGCAGCATCTACAACC-3'
RPLP0 REV	5'-ACTCTTCCTTGGCTTCAACC-3'

2.1.9 Zellkulturmedien und -zusätze

Tab. 13 zeigt die für die Zellkulturarbeiten eingesetzten Medien und Zusätze.

Tab. 13: Zellkulturmedien und -zusätze

Produkt	Hersteller
DMEM/F12	Gibco Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA)
Einfriermedium	95 % Vollmedium 5 % DMSO
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG (Berlin, DE)
Gentamycin-ratiopharm® 80 mg / 2 ml SF	Ratiopharm (Ulm, DE)
ITS-G (Gibco® Insulin-Transferrin-Sele- nium)	Gibco Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA)
MEM (Earle´s)	Biochrom AG (Berlin, DE)
RPMI 1640	Biochrom AG (Berlin, DE)
Trypsin/EDTA Solution (10x) 0,5 %/0,2 %	Merc Millipore (Billerica, MA, USA)

2.1.10 Software

In der Arbeit wurden die in Tab. 14 genannten Programme für die Datenauswertung und -darstellung genutzt.

Tab. 14: Software

Programm	Verwendung	Hersteller
Bio-Rad CFX-Manger	Datenerhebung RT-PCR	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
GraphPad Prism 5	Statistikprogramm	GraphPad Software (LA Jolla, USA)
Image Lab 3.0	Datenerhebung Western Blot	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Microsoft Excel 2019	Datenverarbeitung	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft Power Point 2019	Bildbearbeitung	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft Word 2019	Textverarbeitung	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
NanoDrop 2000/2000c	UV-Analyse	Thermo Scientific (Waltham, USA)

Tab. 14: Software Fortsetzung

Programm	Verwendung	Hersteller
OPTIMA Software	Datenerhebung ELISA	BMG Labtech GmbH (Ortenberg, DE)

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung, Ernte und Passage von Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231, MFE-296 und SK-UT-1 verwendet. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit sterilen Materialien und sterilen Reagenzien.

Die Zellen wurden bei optimalen Bedingungen für Wachstum und Vermehrung bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in TC-Flaschen T75 kultiviert. Nachdem lichtmikroskopisch eine Konfluenz von 70 - 80 % der Zellen in den Kultivierungsflaschen beobachtet wurde, wurden die Zellen passagiert oder für Versuche verwendet. Hierzu wurde das überstehende Medium aus den TC-Flaschen T75 abgesaugt und zur Entfernung des Zelldetritus mit 3 ml PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden erfolgte die Zugabe von 2 ml 1x Trypsin/EDTA-Lösung. Nach einer Inkubationszeit von 3 - 5 min bei 37 °C wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgeklopft und mit der Stopplösung (10 % FBS in PBS) gespült. Die Stopplösung und darin enthaltene Zellen wurden in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und bei 300 rcf 5 min in der Zentrifuge pelletiert. Nach Abtragen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Vollmedium gelöst. Das Umsetzungsverhältnis der Zelllinien ist in Tab. 15 angegeben. Die berechnete Menge an Zellsuspension wurde in die mit 10 ml Vollmedium gefüllte T75 Flasche gegeben und erneut bis zur nächsten Umsetzung oder bis zum Einsatz im Versuch inkubiert. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden die Passagen 4 bis 30 eingesetzt.

Tab. 15: Übersicht des Umsetzungsverhältnisses

Zelllinie	3 Tage	4 Tage
MCF-7	1:3	1:4
MDA-MB-231	1:3	1:4
MFE-296	1:10	1:12
SK-UT-1	1:10	1:12

2.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die dauerhafte Konservierung der Zellen erfolgte in einem Tank mit flüssigem Stickstoff. Dazu wurde wie bei der Kultivierung von Zellen (Abschnitt 3.1.1) vorgegangen. Nachdem zum Zellpellet 3 ml Einfriermedium gegeben wurde, wurde mit der Neubauer-Zählkammer oder mit dem CASY Modell TT-Cell Counter and Analyzer (CASY) die Zellzahl bestimmt (Messprinzip s. 3.1.3). In jedem Kryovot wurden 3×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium eingefroren. In den ersten 24 h wurde die Suspension in Kryo-Röhrchen bei -80 °C in Isopropanol gelagert und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die Rekultivierung der Zellen wurden die Kryovate vorsichtig aus dem Tank mit flüssigem Stickstoff entnommen und kurz im Wasserbad erwärmt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Zellen aus dem Kryovot mit 10 ml erwärmtem Medium in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und bei 300 rcf für 5 min in der Zentrifuge pelletiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgetragen wurde, wurde das Zellpellet in 1 ml Vollmedium gelöst. Die Zellsuspension wurde in eine mit 10 ml erwärmtem Vollmedium gefüllte TC-Flasche T75 gegeben und bis zum Passagieren inkubiert. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen eingesetzt, die mindestens dreimal passagiert wurden.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Für die Kultivierung, Kryokonservierung und für den Einsatz der Zellen in den Versuchen wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Hierdurch wurde gewährleistet, dass für jeden Versuch die gleiche Zellzahl verwendet wurde.

Für die Bestimmung mit der Neubauer-Zählkammer wurde das Deckgläschen auf die Zählkammer gelegt, sodass diese fest aufeinander haften. 10 μl Zellsuspension wurden in einer 96-Wellplatte mit 90 μl PBS verdünnt und hiervon 10 μl in die Zählkammer gegeben. Im Lichtmikroskop wurde die Zellzahl in den vier Quadranten bestimmt und die Zellzahl pro ml ($(\text{gezählte Zellen}/4) \times 10^5$) berechnet. Die Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer wurde in Vorbereitung für den Western Blot, den ELISA und die RT-PCR verwendet.

Die Ermittlung der Zellzahl für die Kultivierung der Zellen und die Erstellung der Wachstumskinetiken erfolgten mit dem CASY. Mithilfe des CASY können die vitalen Zellen in

einer Zellsuspension bestimmt werden. Das Prinzip beruht auf einer Widerstandsmessung. Während des Messvorgangs wird ein Niederspannungsfeld über zwei Elektroden an der Messpore angelegt. Intakte Zellen wirken als Isolatoren, sodass sich ein erhöhter Widerstand über der Messpore ergibt. Der Widerstand korreliert mit dem Volumen der Zellen. Tote Zellen, deren Membran nicht mehr als elektrische Barriere wirkt, werden über die Größe ihres Zellkerns erfasst. Hierüber findet die Unterscheidung vitaler und toter Zellen statt. Anhand eines standardisierten Verfahrens wird das Integral des Messsignals ausgewertet und analysiert, sodass die Zellgröße sowie die Zellzahl bestimmt werden können. Die Zellgrößen unterscheiden sich in den verwendeten Zelllinien, sodass diese zelllinienspezifisch im Gerät gespeichert wurden (Tab. 16). Die Festlegung der Grenzen erfolgte mit CASY-blue® nach Herstellerangaben. Dabei gibt der Normalisierungscursor die Grenze zwischen Zelltrümmern und toten Zellen an. Der Auswertungscursor legt die Grenze zwischen toten und vitalen Zellen fest (OLS Omni Life Science).

Tab. 16: Messparameter CASY Cell Counter and Analyzer

Zelllinie	x-Achse [μm]	Auswertungscursor [μm]	Normalisierungscursor [μm]
MCF-7	60	14,55	6,60
MDA-MB-231	60	12,00	6,90
MFE-296	50	12,38	7,38
SK-UT-1	50	12,63	6,38

Für die Zellzahlbestimmung wurden zu 100 μl der Zellsuspension 10 ml CASY-Ton® hinzugegeben und die Lösung damit verdünnt. Die Zellzahl wurde in drei Messzyklen mit einem Probenvolumen von jeweils 400 μl erfasst. Für die Messung wurde eine 150 μl Messkapillare genutzt.

2.2.4 NIPP-Behandlung mit dem kINPen® MED

Nach der Zellzahlbestimmung und der Aussaat der Zellen in 24-Wellplatten zur Erstellung der Wachstumskinetiken sowie in 6-Wellplatten zur Vorbereitung auf den Western Blot, ELISA und die RT-PCR, wurde die Zellsuspension in der Wellplatte mit NIPP behandelt. Die NIPP-Behandlung erfolgte mit dem Plasma-Jet kINPen® MED. Dabei wurde die Wellplatte etwa 45° nach vorne geneigt und der kINPen® MED gleichmäßig, bogenförmig und

1 cm oberhalb der Zellsuspension mehrfach von links nach rechts bewegt. Für die Flussrate des Trägergases Argon wurde 3 slm festgelegt. Die Untersuchungsgruppen wurden mit NIPP und die Kontrollgruppen mit dem Trägergas Argon behandelt. Dabei wurden MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen jeweils 20 s und MFE-296- und SK-UT-1-Zellen jeweils 10 s behandelt. Um auszuschließen, dass NIPP Veränderungen an der Wellplatte hervorruft, wurde die Zellsuspension mit Vollmedium nach der Behandlung auf neue Wellplatten übertragen.

2.2.5 Wachstumskinetik nach NIPP-Behandlung

Zur Ermittlung der antiproliferativen Effekte des NIPP wurden nach der Zellzahlbestimmung Zellsuspensionen mit $4,5 \times 10^4$ (MCF-7), 3×10^4 (MDA-MB-231), 2×10^4 (MFE-296) und 1×10^4 (SK-UT-1) Zellen pro ml in 24-Wellplatten gegeben. Insgesamt befanden sich in jedem Well 200 μ l der Zellsuspension. Die Zellzahlen waren aus einem vorangegangenen Projekt bekannt und stellten sicher, dass ein exponentielles Wachstum über 120 h mit ausreichender Wachstumsfläche und Nährstoffen gewährleistet war. Nach der NIPP/Argon-Behandlung wurden zusätzlich 800 μ l Vollmedium hinzugegeben und die Zellsuspension sowie das Vollmedium zusammen auf eine neue Wellplatte übertragen. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Zellen für 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. An diesen sechs Analysezeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die absolute Zellzahl mittels CASY bestimmt. Zur Ernte wurde der Zellkulturüberstand in jedem Well abgesaugt und das Well mit 500 μ l PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Wellboden wurde 200 μ l 1x Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben und zur Beschleunigung der Enzymreaktion bei 37 °C für 1 - 2 min inkubiert. Nach mehrfachem Auf- und Abpipettieren wurde das Trypsin mit den enthaltenden Zellen in vorbeschriftete Mikroreaktionsgefäße gegeben. Das Well wurde erneut mit 800 μ l PBS gespült und dann zum Zellgemisch in das Mikroreaktionsgefäß gegeben. Nun erfolgte die Bestimmung der absoluten Zellzahl mit dem CASY.

Mittels eines gepaarten t-Test wurden die ermittelten Zellzahlen auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht.

2.2.6 Analyse der Hsp27-Konzentration nach NIPP-Behandlung

In dieser Arbeit wurden für die Analyse der Hsp27-Konzentration die Verfahren des Western Blots, ELISA und der RT-PCR eingesetzt. Hierzu wurde nach der Zellzahlbestimmung mittels der Neubauer-Zählkammer eine Zellsuspension mit den in Tab. 17 angegebenen Zellzahlen hergestellt.

Hierbei wurde die Zellzahl in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit zunehmender Zeit reduziert.

Tab. 17: Zellzahlen Western Blot, ELISA und RT-PCR

Zelllinie	24 h	48 h	72 h
MCF-7	$1,2 \times 10^5$	6×10^4	3×10^4
MDA-MB-231	$1,2 \times 10^5$	6×10^4	3×10^4
MFE-296	8×10^4	4×10^4	2×10^4
SK-UT-1	4×10^4	2×10^4	1×10^4

Insgesamt wurden 200 µl Zellsuspension in die Wells der 24-Wellplatte gegeben. Da auch die Versuche zur antiproliferativen Wirkung von NIPP in 200 µl Zellsuspension durchgeführt wurden, wurde sichergestellt, dass Unterschiede in der Behandlungsweise mit NIPP möglichst klein gehalten werden und eine gute Vergleichbarkeit besteht. Um eine ausreichende Proteinmenge für die Versuche zu erhalten, wurden vier Wells der 24-Wellplatte mit je 800 µl Vollmedium in ein Well der 6-Wellplatte überführt. Die Übertragung auf eine neue Wellplatte dient dem Ausschluss von Veränderungen, die durch NIPP an der Wellplatte entstehen könnten. Insgesamt war ein 6-Well mit 800 µl behandelte Zellsuspension und 3200 µl Vollmedium gefüllt.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinisolation

Zur Proteinisolation, als Vorbereitung für die Analyse im Western Blot, wurden die mit NIPP bzw. Argon behandelten Zellen zunächst für maximal drei Tage im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit) kultiviert. An den drei Analysezeitpunkten (nach 24 h, 48 h und 72 h) wurden die Proben vorbereitet und hierfür, um einen vorzeitigen Pro-

teinabbau zu verhindern, zunächst auf Eis gelagert. Der Zellkulturüberstand wurde abgetragen. Hiervon wurden 750 µl für die Proteinanalyse im ELISA in Mikroreaktionsgefäße gegeben und bei -80 °C eingefroren. Nach dem Waschen mit 100 µl PBS wurden 500 µl 1x Trypsin/EDTA-Lösung auf den Zellrasen im 6-Well gegeben und zur Beschleunigung der Enzymreaktion für 1 - 2 min bei 37 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren des Trypsins wurde die Trypsin/EDTA-Lösung mit den vom Wellboden gelösten Zellen und 1500 µl PBS in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min. Das entstandene Zellpellet wurde in Lämmli-Puffer gelöst (MDA-MB-231: 100 µl, SK-UT-1: 150 µl und MCF-7, MFE-296: 200 µl). Zur Denaturierung der Proteine erfolgte eine Inkubation über 5 min im Schüttelinkubator bei 95 °C. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die Suspension ein weiteres Mal kurz zentrifugiert. Bis zur Durchführung der folgenden Gelelektrophorese wurden die Proben bei -20 °C deponiert.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und ihrer Ladung (Laemmli, 1970). Hierfür wurden die zuvor eingefrorenen Proben langsam auf Eis aufgetaut und 2 min bei 95 °C im Thermoschüttler inkubiert. 17,5 µl der Probe wurden mit 3,5 µl 5x Proteinladepuffer gemischt und erneut 5 min im Thermoschüttler bei 95 °C und 1200 U/min inkubiert. Die Herstellung der Polyacrylamidgels ist in Tab. 18 angegeben. Diese wurden in das System von Bio-Rad eingespannt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden 14 µl des Gemisches aus Probe und 5x Proteinladepuffer in die vorgefertigten Taschen des Polyacrylamidgels gegeben. Der Proteinladepuffer führt zur Denaturierung der Tertiär- und Quartärstruktur, indem das enthaltene β -Mercaptoethanol zur Reduzierung von Disulfidbrücken führt. Außerdem maskiert der Ladepuffer die Eigenladung der Proteine und seine hohe Dichte begünstigt das Sinken der Probe in die Taschen des Polyacrylamidgels. Als Größenstandard wurde der Page-Ruler in eine Geltasche aufgetragen. Das im Ladepuffer enthaltene SDS verleiht den Proben eine negative Nettoladung, sodass diese nach Anlegen der Spannung zur Anode wandern und es zur Auftrennung der Proteine kommt. Zunächst liefen die Proben bei 80 V 15 min durch das Sammelgel und danach weiter 1,5 h bei 120 V durch das Trenngel.

Tab. 18: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

Reagenzien	5 % Sammelgel	15 % Trenngel
A. demin.	2,1 ml	1,38 ml
Trenngelpuffer	-	1,5 ml
Sammelgelpuffer	0,375 ml	-
Acrylamid (30 %)	0,5 ml	3 ml
SDS (10 %)	30 µl	60 µl
APS (10 %)	30 µl	60 µl
TEMED	3 µl	6 µl

2.3.3 Western Blot

Western Blot bezeichnet den Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Trägermembran, hier eine Nitrocellulosemembran. Der quantitative Nachweis von Proteinen erfolgt über immunologische Verfahren (Towbin et al., 1979). Für den Transfer wurde das Semidry-Blot-System (Trans-Blot®, Bio-Rad) verwendet. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern und dem Chemidox XRS System (Bio-Rad).

Zum Blotting wurden Whatman-Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran in eine Schale mit Transferpuffer gelegt und auf dem Blotting-Gerät platziert. Von beiden Seiten war die Nitrocellulosemembran mit dem darauf liegenden Polyacrylamidgel von vier Lagen Filterpapier bedeckt. Es wurde für 1 h eine Stromstärke von 60 mA angelegt.

Damit Proteinbanden sichtbar werden, wurde die Nitrocellulosemembran 2 - 3 min mit Ponceau S gefärbt und daraufhin mit Aqua bidest sowie 1x TBS-T gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen folgte ein 1-stündiger Milchblock. Nach einem erneuten Waschschrift mit 1x TBS-T und der Zugabe des Primärantikörpers wurde die Membran bei 4 °C über Nacht auf dem Rollmischer inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal in 1x TBS-T gewaschen und erneut für 1 h mit dem sekundären Antikörper bei 4 °C auf dem Rollmischer inkubiert.

Nach der Proteindetektion des Hsp27 folgte zur Überprüfung des korrekten Blottings, nach erneuter Blockierung mittels 1x Roti-Block und erneuter Inkubationszeit, die Zugabe des Primärantikörpers Anti-GAPDH. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist als Enzym der Glykolyse in allen Zellen ubiquitär vorhanden.

2.3.4 Immundetektion

Zur Detektion der Proteinbanden wurde die Nitrocellulosemembran dreimal in 1x TBS-T gewaschen. Mittels Chemilumineszenz und des Chemidoc XRS System (Bio-Rad) wurden die Proteinbanden, die durch Antikörper markiert waren, detektiert. Hierfür wurde die ECL-Homemade-Detektionslösung gleichmäßig auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Reagenzien der ECL-Homemade-Detektionslösung binden an den sekundären Antikörper, welcher an den Primärantikörper gebunden ist, welcher wiederum das target-Protein bindet. Die nachfolgende Auswertung erfolgte mit der Software Image Lab 3.0 (Bio-Rad). Die relative Hsp27-Konzentration wurde gegen GAPDH normalisiert und die statistische Signifikanz mit einem gepaarten t-Test untersucht.

2.3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA ist ein Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Antigenen. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion und wird als Sandwich-ELISA durchgeführt. Dazu wird das Antigen an verschiedenen Epitopen vom Capture-Antibody und vom Detection-Antibody gebunden. Die Streptavidin-HRP katalysiert einen Farbumschlag, der proportional zur Antigenmenge ist und mittels Absorptionsmessung quantifiziert wird (Engvall und Perlmann, 1971; van Weemen und Schuurs, 1971).

Für die Probengewinnung wurde nach der NIPP- bzw. Argon-Behandlung der Zellkulturüberstand nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit abgenommen. Dieser wurde in Mikroreaktionsgefäße gegeben, für 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Für den ELISA wurden zunächst 100 µl des Capture-Antibodys, verdünnt mit PBS 1:180, in die benötigten Wells der Mikrotiterplatte gegeben, wo diese fest am Boden der Platte gebunden werden. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Wells dreimal mit Puffer gewaschen, um ungebundene Bestandteile zu entfernen. Es wurden 200 µl Reagent Diluent hinzugefügt und erneut für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Herstellung einer Verdünnungsreihe diente der Standardisierung der Ergebnisse. Hierfür wurde eine Ausgangslösung mit 695 µl Reagent Diluent und 5 µl Standard Lösung hergestellt sowie eine Standardreihe mit den Konzentrationen von 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml in die Wells der

Mikrotiterplatte gegeben. Je 100 µl der Standardreihe und je 100 µl der Proben wurden als Doublets in die Wells aufgetragen. Die Proben wurden zuvor langsam auf Eis aufgetaut. Bei 4 °C wurde die Mikroplatte über Nacht gekühlt.

Am Folgetag wurden die Wells erneut dreimal mit dem Puffer gewaschen und je 100 µl des Detection-Antibody (Verdünnung: 1:180 in Reagent Diluent) in die Wells gegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur wurden die Wells erneut gewaschen, um unspezifische Bestandteile zu entfernen. Nach der Zugabe von 100 µl Streptavidin-HRP (Verdünnung in Reagent Diluent 1:200) wurde die Mikrotiterplatte 20 min lichtgeschützt inkubiert. Nach erneutem Waschen und der Zugabe von 100 µl Reagenz A (H₂O₂) und Reagenz B (Tetramethylbenzidine) wurde die Wellplatte weiter bis zum dunkelblauen Farbumschlag vor Licht geschützt. Streptavidin-HRP dient der Reduktion von H₂O₂ und führt durch die Oxidation des Farbstoffsubstrats zu einem farbigen Endprodukt. Tetramethylbenzidine führt zur Bildung eines blauen Endprodukts. Die Zugabe von 50 µl 2 N Schwefelsäure stoppte die Farbreaktion und es entstand ein stabiler gelber Farbkomplex. Im Photometer wurde bei 450 nm Wellenlänge und mit der OPTIMA Software v2.10 mittels Absorptionsöffnung quantitativ die Menge des Antigens bestimmt. Die Intensität des Signals war proportional zur Proteinmenge.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolation

Um mögliche Einflüsse des NIPP auf die Transkription von Hsp27 zu untersuchen, wurde mit dem Verfahren der RT-PCR der quantitative Anteil der Hsp27 mRNA nach NIPP- und Argon-Behandlung bestimmt.

Hierfür wurde zunächst die RNA isoliert. An den drei Analysezeitpunkten (nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit bei 37 °C, 5 % CO₂, gesättigter Luftfeuchtigkeit) wurden die mit NIPP bzw. Argon behandelten Zellen mit PBS gewaschen und für die Extraktion der RNA 500 µl peqGOLD TriFast™ hinzugegeben. PeqGOLD TriFast™ enthält Isothiocyanat, welches zur Lyse der Zellen und zur Inaktivierung der RNasen sowie anderer Enzyme führt. Im Phenol können sich DNA und Proteine lösen. Es erfolgte eine kurze Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Zellen mit der Pipettenspitze vorsichtig vom

Boden des Wells getrennt und in sterile Mikroreaktionsgefäße gegeben. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren Analyse bei -80 °C.

Für die weiteren Schritte der RNA-Isolation wurden die Proben langsam aufgetaut und zu jeder Probe 100 µl Chloroform hinzugegeben, daraufhin im Vortexmischer gemischt und zentrifugiert (4 °C und 12.000 rcf). Dies führt zur Auftrennung der Suspension in drei Phasen. Die oberste farblose und wässrige Phase enthält die RNA und wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen und in sterile Mikroreaktionsgefäße überführt. Die zweite (DNA) und dritte Phase (Chloroform) wurde verworfen.

Zur wässrigen Phase wurden 250 µl Isopropanol hinzugefügt und nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Zentrifugation (4 °C und 12.000 rcf) für weitere 10 min. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und zwei Waschschrte mit 75 %-Ethanol durchgeführt. Dazu wurden 500 µl Ethanol zum RNA-Pellet hinzugegeben, kurz im Vortexmischer gemischt und für 7 min zentrifugiert (12.000 rcf).

Zum Lösen der RNA wurde das Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in 20 - 25 µl Reinstwasser (RNase-frei) resuspendiert. Die Proben wurden 30 min auf Eis gelagert und in der Zwischenzeit immer wieder leicht angeschnipst. Daraufhin folgte für 10 min eine Inkubation bei 55 °C im Thermoschüttler.

2.4.2 Reverse Transkription

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde die isolierte RNA zunächst mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (Spiegelman et al., 1971). Mithilfe des Spektralphotometer Nano-Drop 2000c wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm die RNA-Konzentration (ng/µl) photometrisch analysiert. Der Leerwert wurde mit Reinstwasser bestimmt.

Zu 1 µg RNA wurden 1 µl Oligo dT 100 µM Primer und DEPC-H₂O hinzugegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von 13,7 µl ergab. Es folgte eine Inkubation der Proben bei 65 °C für 5 min im Thermocycler. Nach der Zugabe von 6,3 µl des Reverse-Transkriptase-Mix (Tab. 19) wurden die Proben erneut für 60 min bei 42 °C und weitere 10 min bei 72 °C in den Thermocycler gegeben. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben auf Eis gelagert oder bei -20 °C eingefroren.

Tab. 19: Reverse-Transkriptase-Mix

Komponente	Volumen
M-MLV 5x Puffer	4,0 µl
10 mM dNTP-Mix	1,0 µl
M-MLV Transkriptase	0,8 µl
RiboLock 40 U/µl	0,5 µl
Gesamtvolumen	6,3 µl

2.4.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zum quantitativen Nachweis der cDNA. Hierbei wird während der PCR in Echtzeit anhand von Fluoreszenz-Signalen ein gezieltes DNA-Molekül bestimmt. Grundlage ist die zyklische Amplifikation der doppelsträngigen DNA. Diese teilt sich in die Denaturierung der Doppelstränge, das Annealing der sequenzspezifischen Forward- und Reverse-Primer (Hsp27) und die Elongation der DNA-Stränge (Tab. 20, Schritte 2-4). Dieser Zyklus wiederholt sich 45-mal. Dabei kommt es zur Interkalation des SYBR-Green zwischen die DNA-Doppelstränge, wodurch ein Fluoreszenz-Signal entsteht. Die Fluoreszenzintensität steigt proportional mit der Erhöhung der DNA-Moleküle und wird in jedem Zyklus gemessen (Mullis et al., 1986; Wilkening und Bader, 2004).

Für die PCR wurden die Proben 1:15 verdünnt und je 3 µl DNA in jedes Well der 96-Wellplatte vorgelegt. Anschließend wurde zu jeder Probe 17 µl des RT-PCR Mastermix (Tab. 21) hinzugegeben. Als Referenz wurde das housekeeping-gene (Haushaltsgen) RPLP0 verwendet. Um Kontaminationen auszuschließen und zu erkennen, wurde jeder cDNA-Ansatz als Duplikat aufgetragen und Millipore-H₂O als Kontrollprobe auf jeder Wellplatte analysiert.

Tab. 20: Protokoll einer PCR

PCR-Schritte	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
2. Denaturierung	95 °C	10 s
3. Annealing der Primer	60,1 °C	15 s
4. Elongation	72 °C	10 s
44x (Schritte 2-4)		
5. Denaturierung	95 °C	10 s
6. Schmelzkurvenanalyse	65 °C bis 95 °C in 0,5 °C Schritten	

Tab. 21: PCR Mastermix

Komponente	Volumen
Millipore-H ₂ O	5 µl
10 µM Primer FOR	1 µl
10 µM Primer REV	1 µl
2x SensiMix™ SYBR®	10 µl
Gesamtvolumen	17 µl

Die Software CFX-Manager™ 2.0 (Bio-Rad) wurde für die Auswertung der PCR verwendet. Die Schmelzkurvenanalyse dient der Erkennung von Sequenzabweichungen. Waren Duplikate und Schmelzkurvenanalyse ohne Diskrepanz, wurde die PCR gewertet und der Anteil der Hsp27-DNA auf den Anteil des RPLP0 normiert. Anschließend wurden die Ergebnisse mit einem gepaarten t-Test auf statistische Signifikanz geprüft.

2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Microsoft Excel 2019 verwendet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± Standardabweichung (SD), normiert auf die Kontrolle (Ktr. = 0) grafisch dargestellt. Dabei gingen mindestens vier unabhängige Versuche in die Datenauswertung ein. Die Grafen wurden mittels GraphPad Prism 5 erstellt.

Die Ergebnisse wurden mittels gepaartem t-Test ausgewertet. Hierbei wurden $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) für statistisch signifikante Unterschiede angegeben.

3. Ergebnisse

Die Auswirkungen des NIPP auf das Zellwachstum und die Expressionsveränderungen von Hsp27 wurden in malignen MC- (MCF-7, MDA-MB-231), EC- (MFE-296) und uLMS-Zelllinien (SK-UT-1) untersucht. Hierfür wurde die Untersuchungsgruppe mit NIPP und die Kontrollgruppe mit dem Trägergas Argon behandelt. Dabei wurden MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen jeweils 20 s, MFE-296- und SK-UT-1-Zellen jeweils 10 s behandelt. Bei der Definition der Behandlungszeiten wurde auf die Erkenntnisse aus anderen NIPP-Projekten zurückgegriffen, in denen die halbmaximale Wirkung des NIPP auf die Proliferationsrate der Zellen nachgewiesen wurde (Stope et al., 2020).

Die Experimente hatten das Ziel, den modulierenden Einfluss des NIPP auf die Hsp27-Expression zu untersuchen.

3.1 Einfluss des NIPP auf die Zellproliferation

Zur Charakterisierung der antiproliferativen Effekte des NIPP auf die Karzinomzellen wurden zunächst Wachstumskinetiken erstellt. Dazu wurde die absolute Zellzahl der vitalen Zellen nach der NIPP-Behandlung mit der absoluten Zellzahl nach der Argon-Behandlung verglichen. Hierfür wurde ein Untersuchungszeitraum von 4 h bis 120 h festgelegt.

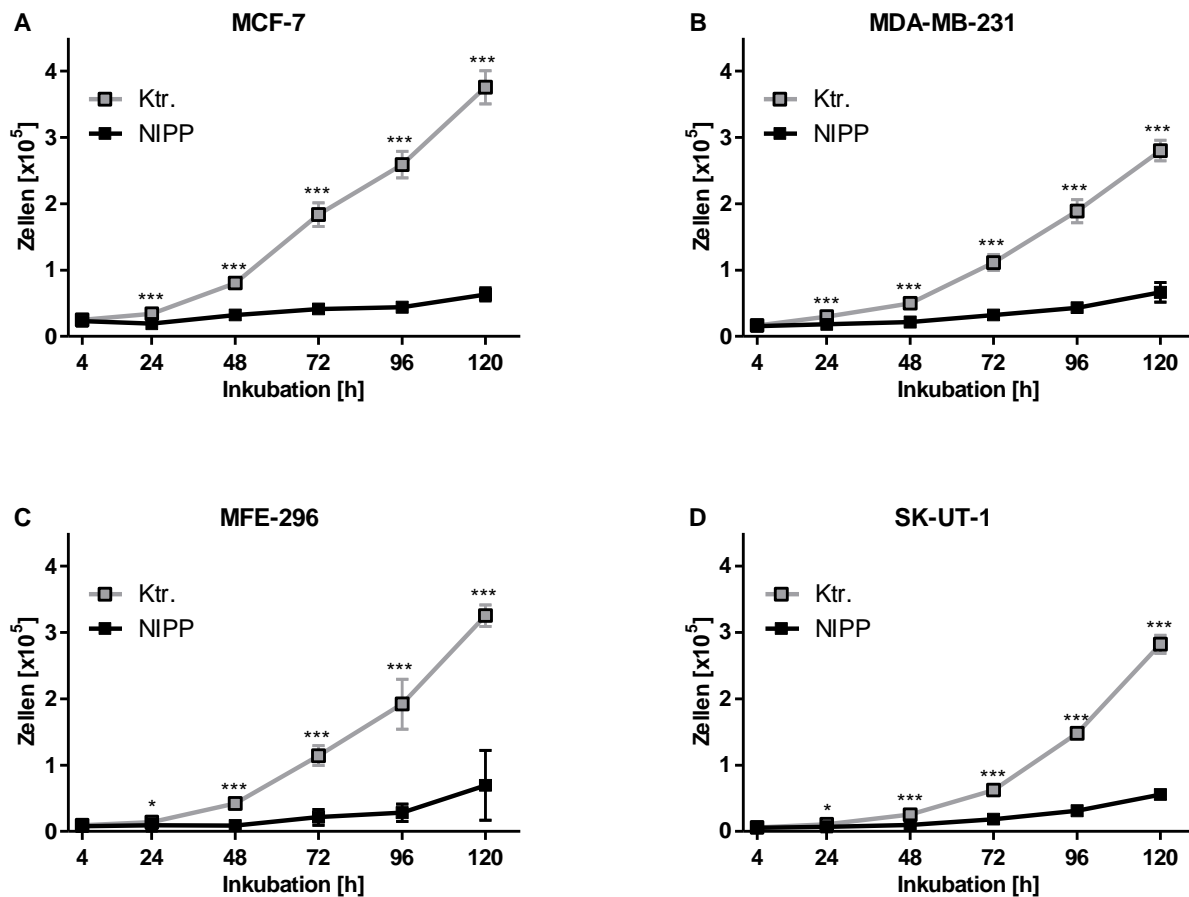


Abb. 5: Einfluss von NIPP auf die Proliferationsrate von Tumorzellen

Nach der Behandlung der Zellen mit NIPP bzw. Argon wurden die Zellzahlen nach 4 h, 24 h, 48 h, 72 h und 120 h mittels CASY Cell Counter bestimmt. Es wurden folgende Zelllinien betrachtet MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B), MFE-296 (C), SK-UT-1 (D). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD der absoluten Zellzahl. In die Auswertung gingen mindestens vier unabhängige Versuche ein. Ein gepaarter t-Test mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) wurde für die statistische Auswertung verwendet.

Die NIPP-Behandlung führte in allen untersuchten Zelllinien im Beobachtungszeitraum von 24 h bis 120 h zu einer statistisch signifikanten Inhibition der Proliferation. Die Steigung der Wachstumskurve nach der NIPP-Behandlung war in allen Zelllinien geringer als nach der Argon-Behandlung. Die Differenz der beiden Kurven nahm im Beobachtungszeitraum kontinuierlich zu.

Eine maximale Hemmung der Proliferation durch die NIPP-Behandlung war in MCF-7-Zellen zu beobachten. Hier reduzierte sich die Zellzahl nach 120 h auf 17 % im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Vergleichbare Effekte zeigte die NIPP-Behandlung auch in MDA-MB-231-Zellen. Nach 120 h Inkubationszeit war hier eine

Reduktion der Zellzahl auf 24 % nachgewiesen ($p < 0,0001$). Eine deutliche Wachstumsinhibition zeigten auch MFE-296-Zellen mit einer Reduktion der Zellzahl auf 21 % nach der NIPP-Behandlung im Vergleich zur Argon-Behandlung ($p = 0,0001$). Mit einer auf 20 % reduzierten Zellzahl konnte zudem auch in SK-UT-1 eine starke antiproliferative Wirkung des NIPP beobachtet werden ($p < 0,0001$).

3.2 Einfluss des NIPP auf die Transkription der Hsp27 mRNA

Änderungen der Genexpression lassen sich indirekt auf der mRNA-Ebene zeigen. Im Folgenden wurde untersucht, wie sich der Anteil der mRNA, die für das Hsp27 codiert, durch die NIPP-Behandlung verändert. Dazu wurde das Verfahren der RT-PCR verwendet. Die Kontrollgruppe wurde wie in 4.1 mit Argon behandelt.

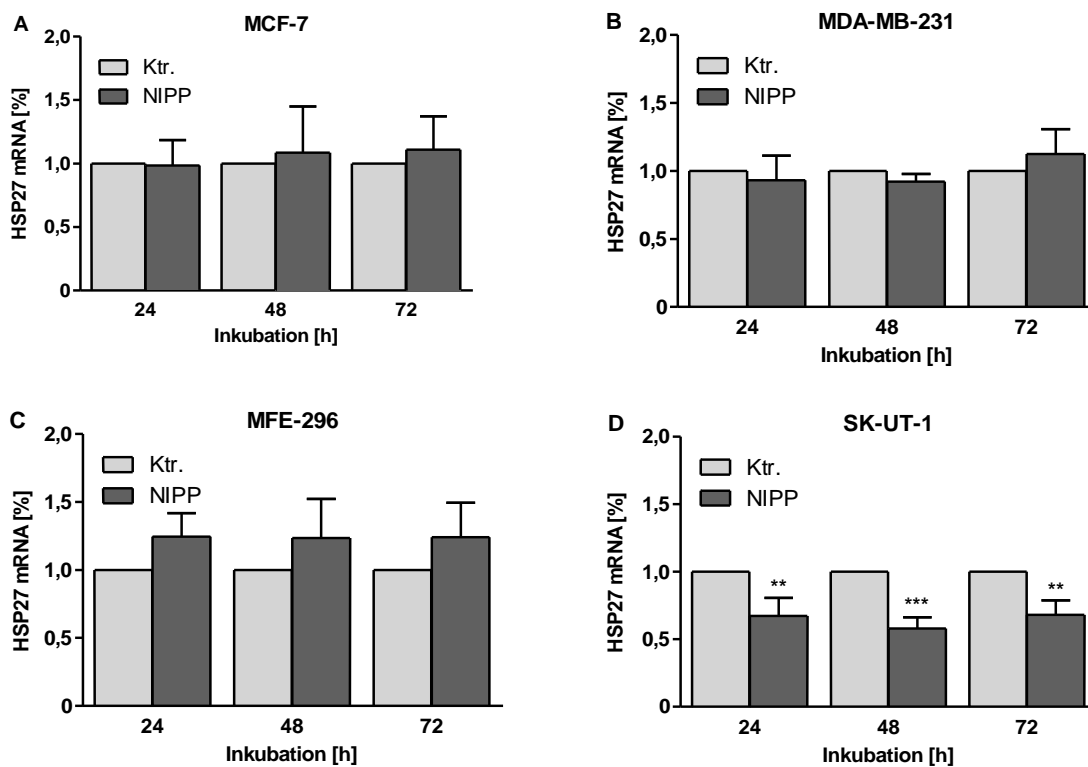


Abb. 6: Einfluss von NIPP auf die Hsp27 mRNA-Synthese

Nach der NIPP- bzw. Argon-Behandlung wurden die Zellen 72 h bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die RNA-Isolation und die RT-PCR durchgeführt. Dabei wurde das housekeeping-gene RPLP0 als Referenz verwendet. Untersucht wurden Zellen der Linien: MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B), MFE-296 (C) und SK-UT-1 (D). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der Hsp27 mRNA in %, normiert auf die Kontrolle = 1. In die Auswertung gingen mindestens vier unabhängige Versuche je Zelllinie ein. Ein gepaarter t-Test mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) wurde für die statistische Auswertung verwendet.

In MC-Zellen der Linie MCF-7 (A) war nach der NIPP-Behandlung keine signifikante Veränderung der Transkription (24 h: $0,98 \pm 0,18$ mit $p = 0,8719$; 48 h: $1,09 \pm 0,32$ mit $p = 0,6691$; 72 h: $1,11 \pm 0,23$ mit $p = 0,3946$) zu beobachten. Auch MDA-MB-231-Zellen (B) zeigten keine signifikante Reaktion auf die NIPP-Behandlung (24 h: $0,93 \pm 0,16$, $p = 0,5067$; 48 h: $0,92 \pm 0,05$, $p = 0,0745$; 72 h: $1,12 \pm 0,16$, $p = 0,2737$). Im Gegensatz hierzu war in MFE-296-Zellen (C) nach der NIPP-Behandlung zu den drei Analysezeitpunkten ein quantitativ erhöhter Anteil der Hsp27 mRNA um etwa 25 % zu beobachten. Jedoch waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant (24 h: $1,25 \pm 0,14$, $p = 0,1273$; 48 h: $1,24 \pm 0,26$, $p = 0,1393$; 72 h: $1,24 \pm 0,23$, $p = 0,1053$).

Lediglich bei SK-UT-1-Zellen wurde die Transkription durch die NIPP-Behandlung statistisch signifikant beeinflusst. Hier wurde ein um 33 % (24 h), 43 % (48 h) und 32 % (72 h) reduzierter Hsp27 mRNA Anteil im Vergleich zu den mit Argon behandelten Kontrollzellen nachgewiesen (24 h: $0,67 \pm 0,12$, $p = 0,0055$; 48 h: $0,58 \pm 0,07$, $p = 0,0003$; 72 h: $0,68 \pm 0,09$, $p = 0,0097$). Diese Suppression der Transkription konnte bei SK-UT-1-Zellen somit unabhängig von der Dauer der Inkubationszeit beobachtet werden.

3.3 Einfluss des NIPP auf die intrazelluläre Hsp27-Konzentration

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit nach Herabregulation der Hsp27-Transkription in SK-UT-1-Zellen auch intrazellulär eine Reduktion der Hsp27 Konzentration beeinflusst werden kann. Außerdem sollte gezeigt werden, dass auch in MC- und EC-Zellen durch die NIPP-Behandlung die intrazelluläre Hsp27-Konzentration beeinflusst werden. Reduzierte intrazelluläre Hsp27-Konzentrationen in Tumorzellen können den Tumorprogress hemmen. Zur Analyse der intrazellulären Konzentration des Hsp27 wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Proteinkonzentrationen nach NIPP- und Argon-Behandlung ermittelt und verglichen.

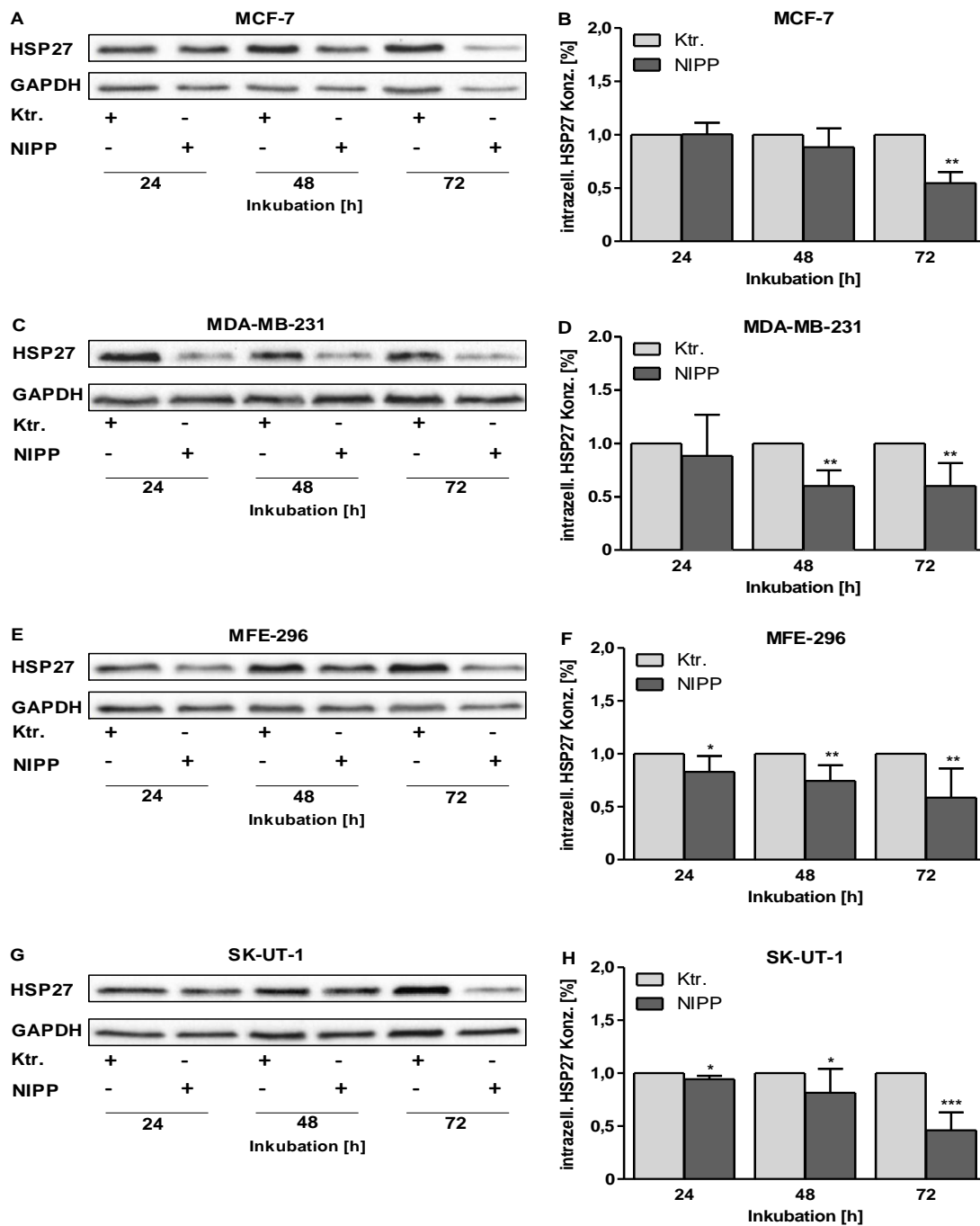


Abb. 7: Modulation der intrazellulären Hsp27-Konzentration durch NIPP

MCF-7- (A, B), MDA-MB-231- (C, D), MFE-296- (E, F) und SK-UT-1-Zellen (G, H) wurden nach der NIPP- bzw. Argon-Behandlung bei 37 °C für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Das GAPDH galt als Referenz. Analysiert wurde die relative Expression Hsp27/GAPDH. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der intrazellulären Hsp27-Konzentration, normiert auf die Kontrolle = 1. In die Auswertung gingen mindestens vier unabhängige Versuche je Zelllinie ein. Ein gepaarter t-Test mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) wurde für die statische Auswertung verwendet. Die dargestellten Blots (A, C, E, G) stehen repräsentativ für mindestens vier unabhängige Versuche.

Die NIPP-Behandlung beeinflusste die Proteinsynthese in allen untersuchten Zelllinien und reduzierte die intrazelluläre Hsp27-Konzentration im Vergleich zu den mit Argon behandelten Kontrollzellen. Während in MCF-7-Zellen (A, B) nach der NIPP-Behandlung und nachfolgender 24- bzw. 48-stündiger Inkubationszeit kein bzw. nur ein leichter Abfall der intrazellulären Hsp27-Konzentration zu beobachten war (48 h: NIPP: $0,88 \pm 0,16$; Ktr.: 1,00; $p = 0,1696$), wurde nach 72 h Inkubationszeit eine statistisch signifikante Reduktion um 0,45 nachgewiesen (72 h: NIPP: $0,55 \pm 0,09$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0032$).

Nach 24-stündiger Inkubationszeit war in MDA-MB-231-Zellen (C, D) nach der NIPP-Behandlung zunächst nur eine Tendenz zur intrazellulären Reduktion des Hsp27 zu beobachten (24 h: NIPP: $0,88 \pm 0,33$; Ktr.: 1,00; $p = 0,5908$). Statistisch signifikant reduzierte die NIPP-Behandlung die intrazelluläre Hsp27-Konzentration um 0,4 nach 48 h und 72 h Inkubationszeit (48 h: NIPP: $0,60 \pm 0,13$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0037$; 72 h: NIPP: $0,60 \pm 0,20$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0010$).

Bei MFE-296-Zellen (E, F) wurde nach der NIPP-Behandlung bereits nach 24 h Inkubationszeit eine statistisch signifikante Veränderung der intrazellulären Hsp27-Konzentration nachgewiesen. Während der reduzierte Anteil des Hsp27 nach 24 h Inkubationszeit noch relativ klein war (24 h: NIPP: $0,86 \pm 0,14$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0373$), nahm die intrazelluläre Konzentration mit zunehmender Inkubationszeit weiter ab. Nach 72 h konnte eine Reduktion um 0,4 im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (48 h: NIPP: $0,75 \pm 0,13$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0079$; 72 h: NIPP: $0,60 \pm 0,26$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0072$).

Auch in SK-UT-1-Zellen (G, H) nahm der Anteil der intrazellulären Hsp27-Konzentration nach der NIPP-Behandlung mit zunehmender Inkubationszeit ab. Nach 24 h Inkubationszeit wurde eine statistisch signifikante Reduktion um 0,06 (24 h: NIPP: $0,94 \pm 0,03$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0157$), nach 48 h um 0,19 (NIPP: $0,81 \pm 0,21$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0382$) und nach 72 h um 0,48 (NIPP: $0,52 \pm 0,09$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0005$) zur Kontrolle ermittelt.

3.4 Einfluss des NIPP auf die extrazelluläre Hsp27-Konzentration

Um den Zusammenhang zwischen der intrazellulären und der extrazellulären Hsp27-Konzentration zu untersuchen, wurde mittels ELISA im Zellkulturüberstand die extrazelluläre Hsp27-Konzentration bestimmt. Extrazelluläres Hsp27 steht im Zusammenhang mit der

Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Zytokine und der Wirkung auf das Immunsystem. Wie in den vorherigen Versuchen, wurden die Zellen mit NIPP bzw. Argon behandelt und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert.

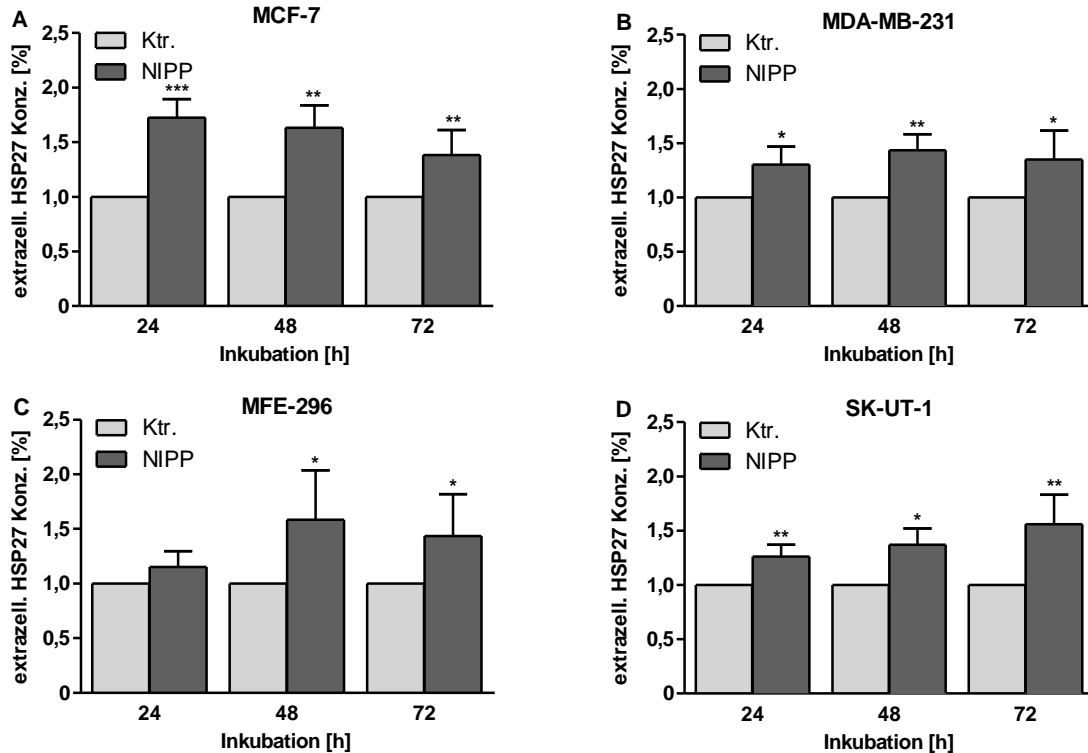


Abb. 8: Modulation der extrazellulären Hsp27-Konzentration durch NIPP

Nach der NIPP- bzw. Argon-Behandlung wurden die Zellen 24 h, 48 h oder 72 h bei 37 °C inkubiert und mit dem ELISA-Verfahren die extrazelluläre Hsp27-Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Untersucht wurden Zellen der Linien MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B), MFE-296 (C) und SK-UT-1 (D). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der extrazellulären Hsp27-Konzentration in %, normiert auf die Kontrolle = 1. In die Auswertung gingen mindestens vier unabhängige Versuche je Zelllinie ein. Ein gepaarter t-Test mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) wurde für die statistische Auswertung verwendet.

Abb. 8 zeigt, dass die NIPP-Behandlung in allen untersuchten Zelllinien zu einem Anstieg der extrazellulären Hsp27-Konzentration führte. Dies lässt vermuten, dass die NIPP-Behandlung die Freisetzung des Hsp27 stimuliert.

Die Analyse der extrazellulären Hsp27-Konzentration in MCF-7-Zellen (A) ergab nach der NIPP-Behandlung statistisch signifikant erhöhte Werte zu allen drei Untersuchungszeitpunkten. Nach 24-stündiger Inkubationszeit war extrazellulär eine um das 1,7-fach erhöhte Konzentration des Hsp27 im Vergleich zur Argon-Behandlung ermittelt worden (24 h: NIPP: $1,73 \pm 0,15$, Ktr.: 1,00; $p = 0,0007$). Mit zunehmender Inkubationszeit war

eine leichte Abnahme der übermäßigen Hsp27-Sekretion auf das 1,6- bzw. 1,4-fache im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten (48 h: NIPP: $1,63 \pm 0,19$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0024$; 72 h: NIPP: $1,38 \pm 0,21$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0206$). In MDA-MB-231-Zellen (B) stieg die extrazelluläre Hsp27-Konzentration im Beobachtungszeitraum ebenfalls statistisch signifikant um das 1,3- bis 1,4-fache der Konzentration nach der Argon-Behandlung an (24 h: NIPP: $1,31 \pm 0,15$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0147$; 48 h: NIPP: $1,43 \pm 0,13$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0028$; 72 h: NIPP: $1,35 \pm 0,24$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0428$).

Nach 48-stündiger Inkubationszeit konnte in MFE-296-Zellen (C) die maximale extrazelluläre Hsp27-Konzentration, erhöht auf das 1,6-fache zur Kontrolle, statistisch signifikant nachgewiesen werden (24 h: NIPP: $1,15 \pm 0,13$; Ktr.: 1,00; $p = 0,1250$; 48 h: NIPP: $1,59 \pm 0,41$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0252$). Mit zunehmender Inkubationszeit (72 h) nahm die extrazelluläre Konzentration auf das 1,4-fache zur Kontrolle wieder leicht ab (72 h: NIPP: $1,44 \pm 0,35$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0377$). Ferner war in SK-UT-1 Zellen (D) mit zunehmender Inkubationszeit eine ansteigende extrazelluläre Hsp27-Konzentration zu beobachten. Statistisch signifikant stieg die Hsp27-Konzentration extrazellulär nach 24 h Inkubationszeit auf das 1,3-fache, nach 48 h auf das 1,4-fache und nach 72 h maximal auf das 1,6-fache im Vergleich zu den Kontrollzellen (24 h: NIPP: $1,26 \pm 0,10$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0053$; 48 h: NIPP: $1,37 \pm 0,13$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0175$; 72 h: NIPP: $1,56 \pm 0,25$; Ktr.: 1,00; $p = 0,0104$).

Somit verhielt sich die extrazelluläre Hsp27-Konzentration entgegengesetzt zur intrazellulären Proteinkonzentration. Während intrazelluläre Hsp27-Konzentrationen durch die NIPP-Behandlung vermindert wurden, führte die NIPP-Behandlung extrazellulär zu einem Anstieg der Hsp27-Konzentration. Jede Zelllinie hatte ihren spezifischen Zeitpunkt, an dem die Hsp27-Freisetzung ein Maximum erreichte.

4. Diskussion

4.1 NIPP hemmt die Zellproliferation

Es wurde bereits in vielen Tumorentitäten beschrieben, dass NIPP einen inhibierenden Einfluss auf die Proliferation maligner Zellen hat. Gezeigt wurde dies unter anderem in Mamma- (Kim et al., 2010), Ovarial- (Koensgen et al., 2017) und Prostatakarzinomzellen (Weiss et al., 2015). In dieser Arbeit wurde die antiproliferative Wirkung des NIPP in EC- und uLMS-Zellen nachgewiesen. In hormonrezeptorpositiven (MCF-7) und -negativen (MDA-MB-231) MC-Zellen wurde der inhibierende Einfluss des NIPP bestätigt. In den untersuchten Zelllinien konnte nach 120 h eine Reduktion der Zellzahl um mindestens 75 % im Vergleich zu den mit Argon behandelten Kontrollzellen beobachtet werden. Hier konnte eine deutlich über die halbmaximale antiproliferative Wirkung hinausgehende Wirkung nachgewiesen werden. Stope et al. (2020) hatten für die angewendeten Behandlungszeiten eine Reduktion des Zellwachstums um 50 % beobachtet. Dies könnte auf den Abstand der Plasmaquelle zum Zellmedium oder auf die Handhabung des kIN Pen® MED, die zum Teil vom Behandler abhängig ist, zurückgeführt werden. Die Nähe der Plasmaquelle zum Medium werden auch von Yan et al. (2015) als eine Möglichkeit zur Steigerung der antiproliferativen Effekte des NIPP beschrieben.

In der Dermatologie wird NIPP zur Verbesserung der Wundheilung mit dem Ziel der Aktivierung der Zellproliferation eingesetzt (Friedman, 2020; Woedtke et al., 2014). Hier macht man sich den Effekt zunutze, dass NIPP dosisabhängig die Zellproliferation aktiviert bzw. inhibiert (Kalghatgi et al., 2011). Kurze Behandlungszeiten werden zur Förderung der Wundheilung eingesetzt und begünstigen durch erhöhte Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren die Migration von Fibroblasten (Arndt et al., 2013; Haralambiev et al., 2020). Diese Effekte sollten in der Tumorthherapie so gering wie möglich gehalten werden, könnten aber bei optimaler Therapiedauer postoperativ die Wundheilung verbessern und postoperative Komplikationen reduzieren. Die Wirkungen des NIPP auf den Zellzyklus, -apoptose und -nekrose sind somit abhängig von der Dosis des NIPP, aber auch vom Gerätetyp und vermutlich auch vom Zelltyp.

Die gegensätzlichen Wirkungen des NIPP lassen sich am ehesten durch den Einfluss von ROS erklären. Zellzyklusprogression und die damit positive Wirkung auf das Überleben

einer Zelle wird durch geringe ROS-Konzentrationen erreicht. Im Gegensatz dazu können hohe ROS-Konzentrationen einen Zellzyklusarrest und Zelltod begünstigen. Vor diesem Hintergrund könnte NIPP zu einer wichtigen Komponente der Tumorthherapie werden (Woedtke et al., 2019). Die Behandlungszeiten des NIPP, wie in dieser Arbeit zugrunde gelegt, sind in der Therapie von malignen Zellen gut anwendbar. NIPP konnte in den Versuchen das Wachstum der malignen Zellen signifikant reduzieren, so dass ausgeschlossen werden kann, dass es durch die gewählte Behandlungszeit zu proliferations-aktivierenden Mechanismen kommt. Die Beobachtungen dieser Arbeit bestätigen die Ergebnisse verschiedener Studien, in denen bereits eine durch NIPP induzierte Hemmung der Zellproliferation in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben wurde (Weiss et al., 2015; Kim et al., 2010; Koensgen et al., 2017).

Neben der nach einer Behandlung mit NIPP erhöhten Konzentration von ROS, wiesen Yan et al. (2015) eine Wechselwirkung zwischen ROS und Aminosäuren nach. Durch die Schädigung von Aminosäuren, die im Medium enthalten sind, könnte der Metabolismus der Zelle negativ beeinflusst werden und damit das NIPP eine antiproliferative Wirkung erzeugen. Auch Bekeschus et al. (2019) konnten eine Reduktion der metabolischen Aktivität nach einer Behandlung mit NIPP nachweisen.

In Tumorzellen wurden verschiedene Abwehrmechanismen gegenüber ROS beschrieben, die für einige Zellen eine längere Behandlungsdauer erfordern. Das Antioxidans Glutathion kann mit einer erhöhten intrazellulären Konzentration die Wirkung der ROS reduzieren. Außerdem scheinen die membrangebundene Katalase und die Superoxid-Dismutase als weitere Abwehrmechanismen zu fungieren (Bauer und Graves, 2016; Bekeschus et al., 2019; Heinzelmänn und Bauer, 2010).

Als eine besondere Eigenschaft des NIPP konnten jüngste Studien zeigen, dass NIPP einen immunogenen Zelltod initiieren kann. Über die Induktion vermehrter RONS konnte eine systemische tumorspezifische Immunität erzeugt werden. Eine schützende Immunantwort könnte deutliche Vorteile gegenüber anderen Tumortherapien haben (Khalili et al., 2019). Des Weiteren könnten Immuntherapien bei aktiviertem Immunsystem eine deutlich bessere Wirksamkeit zeigen (Almeida et al., 2019).

Die selektive Wirkung des NIPP nur auf maligne Zellen ist nicht endgültig erforscht. In einem Mausmodell hatte NIPP lediglich einen Einfluss auf die Tumorzellen, während das

umliegende Gewebe unbeschadet blieb (Keidar et al., 2013). In einer 2022 veröffentlichten Studie konnten Kim et al. (2022) zeigen, dass Melanomzellen, im Gegensatz zu nicht-malignen Hautfibroblasten, auf eine NIPP-Behandlung mit einer höheren Konzentration von RONS und einem erhöhten intrazellulären H_2O_2 -Gehalt reagierten. Hier wurde als möglicher Grund für die Selektivität der Behandlung mit NIPP auf Tumorzellen die Funktion der Aquaporine in malignen Zellen vermutet. Andere Hypothesen erklären die Selektivität von NIPP in Tumorzellen durch die vermehrte aerobe Glykolyse und oxidativen Stress, wodurch Tumorzellen anfälliger auf Schäden durch ROS reagieren (Trachootham et al., 2009). In diesem Zusammenhang wird die Selektivität auch durch eine hohe Teilungsrates von Tumorzellen und einer erhöhten Vulnerabilität in der S- und M-Phase des Zellzyklus gegenüber NIPP diskutiert (Volotskova et al., 2012). Jedoch ist die Selektivität von NIPP gegenüber malignen und nicht malignen Zellen nach wie vor umstritten. Im Hinblick auf die Zellproliferation konnten Nitsch et al. (2023) lediglich in malignen renalen Zellen eine signifikante Inhibition zeigen, in nicht-malignen renalen Zellen wurde dies nicht beobachtet. Auch wurde in nicht-malignen renalen Zellen eine geringere und spätere Apoptose-Antwort auf NIPP beobachtet. Jedoch zeigten sich kaum signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Zellmotilität, Invasivität und Membrandurchlässigkeit zwischen malignen und nicht-malignen Zellen. Permanente Zelllinien können aufgrund unphysiologischer Zellreaktionen in vivo gewonnene Zellen nicht vollständig repräsentieren. Zur Beurteilung der Selektivität auf Tumorzellen müssen dementsprechend weitere Studien durchgeführt werden.

4.2 NIPP und der Einfluss auf die Transkription von Hsp27

Viele Studien konnten zeigen, dass in malignen Zellen häufig eine Überexpression von Hsp27 vorliegt (Ciocca und Calderwood, 2005). Hsp27 erfüllt regulatorische Funktionen in der Apoptose, induziert diese und begünstigt das Überleben der Zelle. Intrazellulär fungiert es als Chaperon (Garrido et al., 2003; Schmitt et al., 2007). Interessanterweise konnte durch eine NIPP-Behandlung lediglich in uLMS-Zellen (SK-UT-1-Zellen) signifikant eine Herunterregulation der Transkription von Hsp27 beobachtet werden. In MC-Zellen (MCF-7, MDA-MB-231) und EC-Zellen (MFE-296) konnte die mRNA-Synthese von Hsp27 nicht signifikant beeinflusst werden.

Die Transkription von Genen kann auf vielfältige Weise reguliert werden. In Eukaryoten können Gene durch Inaktivierung, wie z. B. durch Methylierung an CG-Paaren, durch Hemmung des Imports von Transkriptionsfaktoren in den Kern oder durch Blockierung der Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA herunterreguliert werden. Auch die Prozessierung der prä-mRNA wie RNA-Editing oder alternatives Spleißen kann zu Änderungen der Genexpression führen (Heinrich et al., 2014).

Die Methylierung von CpG-Inseln im Promotor reguliert die Genaktivität, indem Tumorsuppressoren oder Onkogene während der Tumorgenese hyper- oder hypomethyliert werden. Eine Hypermethylierung ist mit einem transkriptionsrepressiven Heterochromatin assoziiert (Heinrich et al., 2014). So ist bekannt, dass verschiedene Formen der Strahlung zu einer Methylierung in Tumor-regulierenden Genen führen (Aypar et al., 2011; Ye et al., 2014). Im Hinblick auf ROS, als einer der wichtigsten Bestandteile des NIPP und des in vielen Studien beschriebenen entscheidenden Einflusses des ROS auf den epigenetischen Methylierungsstatus, könnte man vermuten, dass NIPP auf ähnliche Weise wirkt (Jha et al., 2014; Wu und Ni, 2015). Park et al. (2015) zeigten, dass Plasma potenziell über Änderungen des Methylierungsstatus die Gen-Aktivität reguliert. Dabei ist die Änderung des Methylierungsstatus zelllinienspezifisch und auch CpG-Insel spezifisch. Ob durch die NIPP-Behandlung auch die epigenetische Regulation von Hsp27 über den Methylierungsstatus erfolgt, ist aktuell noch nicht ausreichend erforscht.

Hitzeschock induzierte Transkription wird vom Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 (HSF1) und Hitzeschock-response Elementen (HSE), die im proximalen Promotor lokalisiert sind, kontrolliert. Cooper et al. (2000) zeigten in Osteosarkomzellen, dass das Vorhandensein des HSE mit einer reduzierten Transkription des Hsp27 assoziiert ist. Im Gegensatz hierzu beschrieben Lamoureux et al. (2011), dass HSF eine erhöhte Expression der Hsp begünstigt. NIPP könnte auf bisher unbekannt Weise Einfluss auf das HSE oder HSF nehmen.

Des Weiteren gibt es Studien, die einen Einfluss von ROS auf das Chromatin-Remodeling durch Modulation der Histondeacetylase-Aktivität beschreiben (Rahman et al., 2004).

Auch eine mögliche endokrine Regulation über östrogenresponse Elemente (ERE), die in der regulatorischen Region des Hsp27-Gens lokalisiert sind, ist denkbar (Klein-Hitpaß et al., 1986).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der Hsp27-Expression besteht über miRNAs. MiRNAs modulieren posttranskriptional die Genexpression und sind in der Entwicklung von Tumoren beteiligt (Benna et al., 2019). Es konnte in Bronchialkarzinomzellen gezeigt werden, dass die Translation von Hsp27 durch die miRNA-541 unterdrückt wurde (Shen et al., 2020). Außerdem beschrieben Lee et al. (2016) einen Einfluss von NIPP auf miRNAs, so dass ein möglicher Zusammenhang zwischen einer NIPP-Behandlung und der Hsp27-Regulation über miRNAs vorstellbar ist.

Insgesamt scheinen SK-UT-1-Zellen vulnerabler als die anderen untersuchten Zelllinien auf die NIPP-Behandlung in Bezug auf die Suppression der Hsp27 Transkription zu reagieren. Dies lässt vermuten, dass die Mechanismen der Suppression der Hsp27-Expression zelllinienspezifisch sind.

4.3 NIPP reduziert die intrazelluläre Hsp27-Konzentration

Wir konnten zeigen, dass es nach der NIPP-Behandlung von MCF-7-, MDA-MB-231-, MFE-296- und SK-UT-1-Zellen intrazellulär zu einer reduzierten Hsp27-Konzentration kommt. Ein reduzierender Einfluss auf die intrazelluläre Hsp27-Konzentration durch NIPP konnte bereits in Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden (Stope et al., 2018).

Die genauen Mechanismen, wie die NIPP-Behandlung zur Reduktion der intrazellulären Hsp27-Konzentration führt, sind noch nicht ausreichend erforscht.

Stope et al. (2017) konnten eine Abhängigkeit der extrazellulären Hsp27-Konzentration von der intrazellulären Hsp27-Konzentration zeigen. So lässt sich andersherum vermuten, dass reduzierende intrazelluläre Hsp27-Konzentrationen durch gesteigerte Freisetzung des Hsp27, wie in 3.4 nachgewiesen, zu erklären sind.

Wie im vorangegangenen Teil der Arbeit beschrieben, beeinflusst NIPP in SK-UT-1-Zellen die Transkription des Hsp27, welche dann zu einer verringerten intrazellulären Hsp27-Konzentration führen kann.

Oxidativer Stress führt in der Zelle zu einer vermehrten Phosphorylierung von Hsp27 (Rogalla et al., 1999). So konnten Schmidt et al. (2019) eine Korrelation zwischen dem Hsp27-Phosphorylierungslevel und der NIPP-Behandlungszeit nachweisen. Die NIPP-

Behandlung aktiviert den Signalweg der MAP-Kinase, die zu einer Hsp27 Phosphorylierung führen kann. Hsp27 befindet sich vorzugsweise im Zytoplasma und eine Phosphorylierung von Hsp27 kann dessen Translokation in den Nucleus begünstigen (Wong et al., 2000). Jedoch ist hier zu vermerken, dass ein signifikant höheres Phosphorylierungslevel des Hsp27 in Keratinozyten erst nach einer Behandlungszeit von 180 s nachgewiesen wurde. Außerdem zeigen die Studien von Schmidt et al. (2019), dass der Phosphorylierungsstatus sechs Wochen nach der NIPP-Behandlung seinen Höhepunkt erreicht und daraufhin wieder abnimmt. Hier sind jedoch weitere Experimente notwendig, um zu klären, ob die in dieser Arbeit verwendeten relativ kurzen Behandlungszeiten von 20 s und 30 s bereits zu diesem Effekt führen.

Stope et al. (2014) zeigten einen Zusammenhang zwischen einer sofortigen oder vorübergehenden Phosphorylierung von Hsp27 und einer Chemoresistenz von Docetaxel in Prostatakarzinomzellen. In der Tumorthherapie wäre eine Phosphorylierung von Hsp27 daher wahrscheinlich eher nachteilig.

In MC-Zellen der Linie MDA-MB-231 wurde eine Überexpression von Hsp27 mit einer vermehrten Resistenz gegenüber Doxorubicin beschrieben und mit einem geringen Level der Topoisomerasen II α und β assoziiert. So scheint die Topoisomerase II Expression entscheidend für die Arzneimittelempfindlichkeit und auch für die Initiation der Apoptose zu sein (Hansen et al., 1999). In diesem Zusammenhang zeigten Choi et al. (2023) in einem Lungenkarzinom Mausmodell, dass das Tumorstadium bei gleichzeitiger Verabreichung von NK16, einem Hsp27 Crosslinker, zusammen mit Paclitaxel stärker inhibiert wird als bei alleiniger Gabe von Paclitaxel. Klinisch ist die Suppression des intrazellulären Hsp27 relevant, da das Therapieregime bei Patientinnen mit fortgeschrittenem MC, EC und uLMS eine Chemotherapie mit Taxanen, wie Paclitaxel oder Anthracyclinen, wie Doxorubicin vorsehen. Die simultane Applikation von NIPP und Chemotherapeutika könnte auf diesem Weg einer Resistenzentwicklung entgegenwirken und Zellen sensibler für Chemotherapeutika machen.

Trastuzumab ist ein wichtiger Bestandteil der Therapie von HER2+ MC. Eine erhöhte Chaperonaktivität durch verstärkte Phosphorylierung des Hsp27 und damit vermittelte HER2-Stabilität kann einen Mechanismus der Resistenz gegenüber Trastuzumab darstellen. In diesem Zusammenhang zeigten Hwang et al. (2020), dass nach Zugabe eines

Hsp27-Inhibitors die Phosphorylierung des Hsp27 abnahm und die nachgeschalteten HER2-Signalwege herunterreguliert werden. Die Zellen wurden so für die Therapie mit Trastuzumab sensibilisiert. Vor diesem Hintergrund und der in dieser Arbeit nachgewiesenen Reduktion von Hsp27 nach einer Behandlung mit NIPP könnte die kombinierte Therapie mit NIPP und Trastuzumab ein vielversprechendes Mittel in der Tumorthherapie werden und die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung reduzieren. Unterstützend hierzu beschrieben Lee et al. (2017) die Wiederherstellung der Empfindlichkeit gegenüber Tamoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptormodulator, nach einer NIPP-Behandlung. Hier muss in Zukunft der Zusammenhang zwischen der Tamoxifenempfindlichkeit, der NIPP-Behandlung und des Hsp27 noch näher charakterisiert werden.

Außerdem wird nach einem „Knock out“ von Hsp27 in Tumorzellen eine reduzierte Migration der Tumorzellen beschrieben (Owen et al., 2016). So könnten auch Patientinnen mit Tumoren in fortgeschrittenen Stadien, womöglich auch nach der Diagnose von Metastasen, von einer NIPP-Behandlung profitieren. Die Herunterregulation von Hsp27 in MC-Zellen MDA-MB-453 und MCF-7 geht mit einer verringerten Rate von Tumorformation einher und führt in den Zellen zur Induktion der Apoptose (Liu et al., 2018).

Langdon et al. (1995) zeigten in einer Studie, dass Konzentrationen von Hsp27 mit einer Östrogenempfindlichkeit korrelieren. Auch O'Neill et al. (2004) beschrieben eine Assoziation zwischen der Hsp27-Expression und dem Östrogenrezeptor- α -Expression. Es ist noch nicht ausreichend untersucht, in welcher Form Östrogene und Hsp27 wechselwirken. In Prostatakarzinomzellen beispielsweise war ein „Knock-Down“ von Hsp27 mit einer verringerten Transkription des Androgenrezeptors und einer niedrigeren Androgenrezeptor-Proteinexpression verbunden (Stope et al., 2012). In dieser Arbeit wurde sowohl in hormonrezeptorpositiven als auch -negativen Zelllinien eine durch NIPP-induzierte Reduktion von intrazellulären Hsp27 nachgewiesen.

Eine Herunterregulation von Hsp27 steht im Zusammenhang mit der Aktivierung des p53-Signalweges und der Induktion des Zellzyklusinhibitors p21 (O'Callaghan-Sunol et al., 2007). P53 ist ein Tumorsuppressor, der die Tumorentstehung und Tumorprogression inhibiert. Die Modulation von p53 im Rahmen einer Tumorthherapie ist seit einigen Jahren in den Fokus geraten. Bislang zeigten Behandlungen dieser Art aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen und einer schnellen Resistenzentwicklung nur mäßigen Erfolg (Hassin

und Oren, 2023). Therapien auf Basis von p53 sind jedoch auf dem Weg ein effektives Mittel in der Tumortherapie zu werden. Shi et al. (2017) zeigten, dass p53-zugeordnete Genexpression in Tumorzellen nach einer NIPP-Behandlung des Mediums stark aktiviert wird. Auch Schmidt et al. (2019) konnten einen Einfluss von NIPP auf p53 nachweisen.

4.4 NIPP steigert die extrazelluläre Hsp27-Konzentration

Während eine Behandlung mit NIPP intrazellulär zu einer Reduktion der Hsp27-Konzentration in den untersuchten malignen Zelllinien führt, wurde entgegengesetzt hierzu in dieser Arbeit ein Anstieg der extrazellulären Hsp27-Konzentration nachgewiesen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die NIPP-Behandlung die Sekretion von Hsp27 stimuliert.

Die Abhängigkeit der Hsp27 Sekretion von der intrazellulären Hsp27-Konzentration, wie in MCF-7-, MDA-MB-231-, MFE-296- und SK-UT-1-Zellen beobachtet, bestätigen die Ergebnisse von Stope et al. (2017) in Ovarialkarzinomzellen. Stope et al. (2017) beschrieben außerdem eine Unabhängigkeit vom Pathway über das endoplasmatische Retikulum und die Unabhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus des Hsp27 in Ovarialkarzinomzellen. Es konnte jedoch eine konzentrationsabhängige Aufnahme des Hsp27 in Exosomen nachgewiesen werden.

Andererseits gibt es Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Sekretion von Hsp27 und dessen Phosphorylierungsstatus aufzeigen. So zeigten Tokuda et al. (2015), dass es nach Kontakt zu Kollagen zur vermehrten Freisetzung von phosphoryliertem Hsp27 aus menschlichen Thrombozyten kommt. Vor diesem Hintergrund ist die Rolle des Phosphorylierungsstatus bei der Sekretion von Hsp27 noch nicht vollständig untersucht, möglicherweise ist die Phosphorylierung des Hsp27 auch zellspezifisch.

Extrazelluläres Hsp27 moduliert u. a. Immunreaktionen. Singer et al. (2022b) zeigten einen immunmodulierenden Effekt des Hsp27 auf humane Monozyten *in vitro*, nachdem sie eine erhöhte extrazelluläre Konzentration des Hsp27 nach einer Behandlung mit NIPP in Ovarialkarzinomzellen nachweisen konnten. Zudem konnte in der untersuchten humanen Monozyten-Zelllinie nach Inkubation mit Hsp27 eine verringerte Stoffwechselaktivität, verringerte Proliferation, eine Veränderung der Oberflächenmarker sowie eine reduzierte Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-18 beobachtet werden. Diese Veränderungen waren jedoch lediglich moderat. Insgesamt sind Monozyten und Makrophagen

in Ovarialkarzinomen häufig mit einer Tumorprogression assoziiert. Die gleichzeitig beobachtete Reduktion der mitochondrialen ROS Produktion deutet auch auf antioxidative Eigenschaften des Hsp27 hin (Singer et al., 2022b). Die immunmodulierenden Effekte des Hsp27 wurden auch im Zusammenspiel zwischen Prostatakarzinomzellen und myeloiden Zellen nach einer NIPP-Behandlung beobachtet. Es zeigten sich pro- und antiinflammatorische Effekte, insgesamt aber eher die Tendenz zur Differenzierung der myeloiden Zellen (Singer et al., 2022a). Genauso zeigten Salari et al. (2013), dass die Aktivierung von NF- κ B in Makrophagen durch das Hsp27 mit einer erhöhten Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen assoziiert ist. Im Gegensatz hierzu, konnte in Bezug auf die Lungenerkrankung COPD gezeigt werden, dass ein erhöhter Serumgehalt von Hsp27 als immunsuppressiver Versuch angesehen wird, übermäßige Entzündungen der Lunge zu reduzieren (Hacker et al., 2009). Vor diesem Hintergrund sind die immunmodulatorischen Effekte des Hsp27 in Karzinomzellen vor allem *in vivo* weiter zu untersuchen. Vermutlich spielt die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen hierbei eine bedeutsame Rolle.

Über die Bindung von extrazellulärem Hsp27 an den TLR-3 wird die Aktivierung des NF- κ B induziert. Dies kann zur VEGF-vermittelten Zellmigration und Angiogenese führen (Thuringer et al., 2013). Dieser Effekt des extrazellulären Hsp27 wäre mit einer optimalen Tumorthherapie nicht vereinbar. Jedoch wurde bei gleichzeitiger Untersuchung von myeloiden Zellen und Prostatakarzinomzellen, nach Inkubation mit Hsp27, Gegenteiliges gezeigt. Hier wurde eine Reduktion der VEGF-Freisetzung nachgewiesen (Singer et al., 2022a). Außerdem wurde nach einer NIPP-Behandlung von Osteosarkomzellen eine Suppression des VEGF-A Faktors, ein Signalmolekül der VEGF-Familie, auf mRNA-Ebene beschrieben (Haralambiev et al., 2019). Eine Reduktion des VEGF könnte einen bedeutsamen Effekt in der Tumorregression haben. Bei differenten Untersuchungsergebnissen sind hier jedoch weitere Versuche notwendig, um eine VEGF-vermittelte Zellmigration durch eine NIPP-Behandlung auszuschließen.

Nach der Behandlung mit NIPP wurde eine signifikant erhöhte Expression der entzündungshemmenden Hämoxygenase 1 (HMOX1) und des IL-8 beobachtet (Arndt et al., 2015; Bekeschus et al., 2016). Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass das IL-8 zwar als

Entzündungsmediator die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten vermittelt, allerdings auch im Hinblick auf den Einfluss auf eine mögliche Tumorgenese aktuell Gegenstand der Forschung ist.

Eine intraoperative Verwendung des NIPP könnte dennoch inflammatorische Prozesse reduzieren. Dies könnte einerseits durch die Erhöhung der extrazellulären Hsp27-Konzentration, aber auch über andere Signalwege nach einer NIPP-Behandlung erreicht werden.

4.5 Hsp27 als potenzieller Biomarker

In vielen Tumorentitäten ist eine erhöhte Expression von Hsp27 mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einer vermehrten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika sowie einer schlechteren Prognose assoziiert (Ciocca und Calderwood, 2005; Hansen et al., 1999; Zhao et al., 2014). In diesem Zusammenhang wurde schon häufig über die Einführung von Hsp27 als Biomarker diskutiert. Stope et al. (2017) und Zhao et al. (2014) beschrieben sekretiertes Hsp27 bzw. Serum Hsp27 als potenziellen Biomarker für Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Sekretiertes Hsp27 könnte Bedeutung für die Diagnose, Prognose und das Ansprechen der durchgeführten Behandlung haben.

Fanelli et al. (1998) hatten in ihrer Studie ebenfalls eine im Mittelwert erhöhte Serumkonzentration von Hsp27 bei Patientinnen mit MC festgestellt. Jedoch lagen die Werte der Hsp27-Serumkonzentration bei 66 % der Patientinnen mit MC im Normbereich, sodass das Hsp27 als möglicher Biomarker eine geringe Sensitivität aufweist. Zusätzlich dazu unterschieden sich die Serumspiegel zwischen Patientinnen mit und ohne Metastasen in dieser Studie nicht signifikant. Im Gegensatz hierzu war die Serum Hsp27-Konzentration bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom nur bei peritonealer Metastasierung und einem damit fortgeschrittenem Tumorstadium erhöht (Zhao et al., 2014).

In diesem Zusammenhang ist auch zu bedenken, dass eine erhöhte Hsp27-Konzentration in anderen Tumortypen, wie dem Neuroblastom, mit einem günstigen Outcome assoziiert ist und somit Unterschiede in Tumorentitäten bestehen (Zanini et al., 2008).

Vor dem Hintergrund, dass sich die Studienergebnisse zu erhöhten Hsp27-Serumkonzentrationen je nach Tumorentität unterscheiden und die Funktion des extrazellulären

Hsp27 bzgl. pro- und antiinflammatorischer wie auch Angiogenese fördernder Eigenschaften noch unklar ist, sind in Zukunft weitere klinische Studien erforderlich. Das Hsp27 könnte sich vor allem im Hinblick auf das Ansprechen einer Therapie zu einem prognosebestimmenden Biomarker entwickeln. Hierbei könnte eine Bestimmung des Hsp27 z. B. hinsichtlich einer möglichen Resistenzentwicklung gegenüber einer Chemotherapie bedeutsam sein. Die Korrelation von intra- und extrazellulären Hsp27-Spiegeln sollte bei Behandlungen, die Hsp27 induzieren, bedacht werden.

4.6 Klinische Bedeutung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten die antiproliferative Wirkung des NIPP und konnten die intrazelluläre Suppression des Hsp27 sowie die Stimulation der Sekretion des Hsp27 durch NIPP nachweisen. Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe des NIPP eine hoffnungsvolle Therapiemöglichkeit in der Tumorbehandlung entwickelt werden könnte.

Nicht nur die antiproliferativen Effekte, sondern auch die Reduktion des in malignen Zellen häufig überexprimierten Hsp27 stellen einen bedeutsamen Ansatzpunkt in der Tumorthherapie dar. Eine Herunterregulation des Hsp27 geht *in vitro* mit einer verringerten Rate an Tumorformation einher und fördert die Induktion der Apoptose in den Zellen (Liu et al., 2018).

Die vorliegenden Daten sind *in vitro* gewonnenen, jedoch könnte sich das NIPP durch seine vielfältigen biologischen Wirkungen auch *in vivo* zu einem vielversprechenden therapeutischen Verfahren in der Tumorthherapie entwickeln.

Den größten Nutzen hat das NIPP vermutlich in der Kombination mit bereits etablierten Therapieverfahren in der Tumorthherapie. Die Verwendung des NIPP nach chirurgischer Resektion des Tumors könnte zur Behandlung von Mikrometastasen im Bereich des OP-Gebietes eingesetzt werden und damit das Rezidivrisiko senken. Postoperative Komplikationen könnten durch die zusätzlichen protherapeutischen Effekte, wie die antimikrobielle Wirkung, die Stimulation des Immunsystems und die Förderung der Wundheilung vermindert werden. In diesem Zusammenhang zeigten auch Metelmann et al. (2018) in einer klinischen Studie, dass Patientinnen und Patienten mit Kopf- und Halstumoren nach einer NIPP-Behandlung einen verringerten Schmerzmittelbedarf hatten. Diesen Nutzen sollte

man auch im Hinblick darauf betrachten, dass Schmerzen und postoperative Komplikationen häufig auch psychosoziale Auswirkungen haben können.

Eine Herausforderung könnte jedoch die Applikation von NIPP direkt auf die malignen Zellen darstellen. In der Behandlung des MC kann die NIPP-Behandlung direkt intraoperativ im OP-Gebiet erfolgen, bei EC oder uLMS ist ein vaginaler oder laparoskopischer Zugangsweg denkbar. Auffällig ist, dass Wataba et al. (2001) und Padwick et al. (1994) auch in Endometriumhyperplasien und benignen Drüsenzellen des Endometriums während der proliferativen Phase eine erhöhte Hsp27-Expression beobachtet haben. Vor dem Hintergrund, dass für die Selektivität von NIPP auf maligne Zellen eine hohe Teilungsrate und eine erhöhte Vulnerabilität von NIPP in der S- und M-Phase des Zellzyklus diskutiert wird (Volotskova et al., 2012), ist bei prämenopausalen Frauen wahrscheinlich eine zyklusabgestimmte NIPP-Behandlung notwendig. Hier sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um den Einfluss von NIPP auf benigne endometriale Drüsenzellen zu erfassen.

NIPP könnte auch in der Therapie von hormon-resistenten MC mit dem Ziel der Verbesserung sowie der Wiederherstellung der Trastuzumab- oder Tamoxifenempfindlichkeit eingesetzt werden. Mehr als 50 % der Patientinnen mit HER2+ MC sprechen schlecht auf die Therapie mit Trastuzumab an (Vogel et al., 2023). Patientinnen, die eine Tamoxifen Therapie erhielten, entwickeln auch bei zunächst gutem Ansprechen, häufig nach einiger Therapiezeit eine Resistenz gegenüber Tamoxifen (Dorssers et al., 2001).

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die HER2-Analyse bei Patientinnen mit einem serösen EC nach der aktuellen S3-Leitlinie von 2022 nun mehr im Mittelpunkt steht. Patientinnen, die an einem serösen EC mit positivem HER2-Status erkrankt sind und eine Kombinationstherapie aus Chemotherapie und HER2-Inhibition erhalten, könnten von einer synergistischen Wirkung des NIPP profitieren (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Außerdem könnte eine Kombination des NIPP mit einer Chemotherapie eine vielversprechende Möglichkeit sein, Resistenzentwicklungen zu vermindern, synergistische Effekte zu erzielen und damit Krankheitsprogression zu verhindern.

Patientinnen mit einem EC erhalten aktuell leitliniengerecht eine postoperative Strahlentherapie. Die Behandlung mit NIPP könnte hier eine alternative Therapie darstellen. NIPP geht im Gegensatz zur Strahlentherapie nicht mit einer Nekrose oder Inflammation einher

(Ishaq et al., 2014). Voraussetzung hierfür ist, dass die malignen Zellen gut für das NIPP zugänglich sind.

Für den zukünftigen klinischen Gebrauch des NIPP ist es wichtig, dass standardisierte Protokolle entwickelt werden. Dies führt zu einem optimalen Nutzen für die jeweilige Tumorentität. Die Kombination mit konventionellen Therapiemöglichkeiten könnte die Effektivität der einzelnen therapeutischen Komponenten deutlich steigern.

Das mutagene Potenzial des NIPP und der Einfluss auf gesunde Körperzellen müssen in Zukunft noch weiter erforscht werden. Bisher wurde kein mutagenes Potenzial des NIPP beschrieben. Maisch et al. (2017) untersuchten dies im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) Assay auf Keratinozyten und Fibroblasten. Auch Bekeschus et al. (2019) stellten bei der Phosphorylierung von H2AX, einem Marker für durch ionisierende Strahlung verursachte DNA-Doppelstrangbrüche, kein mutagenes Potenzial fest. Es ist aber in Betracht zu ziehen, dass eine NIPP-Therapie je nach Gerätetyp mit der Emission von potenziell gesundheitsschädlichen Noxen, wie toxischen Stickoxiden, einhergehen kann. Dies ist in die Überlegungen zur Behandlungshäufigkeit und -dauer mit einzubeziehen (Kletschkus et al., 2020b). In einer aktuellen klinischen Studie der Gynäkologie des Universitätsklinikum Tübingen wurden 63 Patientinnen mit einer CIN I und II einmalig mit NIPP behandelt. Akute Dosis-limitierende Toxizitäten traten nicht auf. Es wurden milde unerwünschte Ereignisse (Abstrichblutungen, vermehrter Vaginalausfluss oder leichte lokale Schmerzen) beobachtet. Keine dieser Nebenwirkungen erforderte eine Therapie (Weiss et al., 2023).

Vorteile bietet das NIPP außerdem durch seinen geringen apparativen Aufwand und die geringen Kosten (Ishaq et al., 2014).

Zusammenfassend hat das NIPP zahlreiche positive Effekte, die einen vielversprechenden Ansatz in der Tumorthherapie darstellen. Um NIPP in der Tumorthherapie *in vivo* einsetzen zu können, bedarf es weiterer Forschung und Entwicklung. Dies dient unter anderem dazu, die Sicherheit des NIPP zu belegen und den Einfluss des NIPP auf gesunde Körperzellen näher zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom (MC) ist in Deutschland die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Es ist auch die Krebsart, die den Tod am häufigsten zur Folge hat. Durch das Mammografie-Screening und die Entwicklung der Antikörpertherapie konnte in den letzten Jahren eine Verbesserung der Überlebensrate der Patientinnen mit einem MC erreicht werden. Jedoch muss die Therapie insbesondere von MC-Typen, die eine Resistenz gegenüber Chemo- oder Hormontherapien entwickelt haben, weiterhin deutlich verbessert werden. Dies gilt auch für MC mit hormonnegativen Eigenschaften. Bei der zweithäufigsten gynäkologischen Krebserkrankung, dem Endometriumkarzinom (EC) mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 78 % in 2020 und dem uterinen Leiomyosarkom (uLMS) mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 30 - 40 %, besteht ebenfalls weiterhin erheblicher Bedarf zur Weiterentwicklung der aktuell nach Leitlinien empfohlenen Therapiemöglichkeiten.

Nicht-Invasives Physikalisches Plasma (NIPP) ist durch die stark antiproliferative Wirkung auf dem Weg, sich zu einem vielversprechenden Mittel im Einsatz in der Tumorthherapie zu entwickeln. Diese proliferationshemmende Wirkung des NIPP wurde bereits in vielen Tumorentitäten beschrieben. Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung des NIPP spezifisch auf das Hitzeschockprotein 27 (Hsp27). Das Hsp27 ist in vielen Tumorentitäten überexprimiert und nimmt eine bedeutsame Rolle in der Kontrolle der Apoptose ein. Erhöhte intrazelluläre Hsp27-Konzentrationen sind in malignen Zellen mit einer schlechteren Prognose, vermehrten Metastasierung und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine Resistenzentwicklung gegenüber Chemo- und Hormontherapien assoziiert

In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass NIPP das Wachstum der MC- sowie EC- und uLMS-Zellen inhibiert. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit NIPP die intrazelluläre Hsp27-Konzentration signifikant reduziert und die extrazelluläre Hsp27-Konzentration gesteigert wird. Geringere intrazelluläre Hsp27-Konzentrationen führen zu einer vermehrten Apoptoseinduktion in den Tumorzellen und können zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Chemo- und Hormontherapien beitragen.

Diese *in vitro* gewonnenen Ergebnisse deuten auf einen hoffnungsvollen und innovativen Einsatz des NIPP in der Tumorthherapie hin. Die bereits etablierten Therapieverfahren

könnten in Zukunft erfolgsversprechend um das NIPP erweitert werden und damit zu einer weiteren Verbesserung der Überlebenschancen führen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur von Hsp27, modifiziert nach Gusev et al. (2002)	- 19 -
Abb. 2: Die Rolle des Hsp27 in der Apoptose, modifiziert nach Garrido et al. (2003), Schmitt et al. (2007)	- 21 -
Abb. 3: Hsp27 Überexpression in malignen Zellen	- 23 -
Abb. 4: Aufbau des Atmospheric Pressure Plasma jet kINPen® MED	- 26 -
Abb. 5: Einfluss von NIPP auf die Proliferationsrate von Tumorzellen	- 54 -
Abb. 6: Einfluss von NIPP auf die Hsp27 mRNA-Synthese	- 55 -
Abb. 7: Modulation der intrazellulären Hsp27-Konzentration durch NIPP	- 57 -
Abb. 8: Modulation der extrazellulären Hsp27-Konzentration durch NIPP	- 59 -

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: UICC- und TNM-Klassifikation des MC (8. Auflage), modifiziert nach (Leitlinien-programm Onkologie, 2021)	- 13 -
Tab. 2: FIGO/TNM-Klassifikation des EC (2020), modifiziert nach Leitlinienprogramm	- 14 -
Tab. 3: Kultivierungsmedien und Bezugsquellen der Zelllinien	- 29 -
Tab. 4: Geräte	- 29 -
Tab. 5: Verbrauchsmaterialien	- 31 -
Tab. 6: Chemikalien	- 33 -
Tab. 7: Gase	- 35 -
Tab. 8: Puffer und Lösungen	- 35 -
Tab. 9: Kommerzielle Kits und Reagenzien	- 37 -
Tab. 10: Antikörper Western Blot	- 37 -
Tab. 11: Enzyme	- 38 -
Tab. 12: Primer RT-PCR	- 38 -
Tab. 13: Zellkulturmedien und -zusätze	- 39 -
Tab. 14: Software	- 39 -
Tab. 15: Übersicht des Umsetzungsverhältnisses	- 40 -
Tab. 16: Messparameter CASY Cell Counter and Analyzer	- 42 -
Tab. 17: Zellzahlen Western Blot, ELISA und RT-PCR	- 44 -
Tab. 18: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele	- 46 -
Tab. 19: Reverse-Transkriptase-Mix	- 50 -
Tab. 20: Protokoll einer PCR	- 51 -
Tab. 21: PCR Mastermix	- 51 -

8. Literaturverzeichnis

Abeler VM, Røyne O, Thoresen S, Danielsen HE, Nesland JM, Kristensen GB. Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients. *Histopathology* 2009; 54: 355–364

Ahrens P, Kreipe HH. *BRCA1*- und *BRCA2*-assoziierte Mammakarzinome. *Pathologe* 2009; 30 Suppl 2: 207–209

Almeida ND, Klein AL, Hogan EA, Terhaar SJ, Kedda J, Uppal P, Sack K, Keidar M, Sherman JH. Cold Atmospheric Plasma as an Adjunct to Immunotherapy for Glioblastoma Multiforme. *World neurosurg* 2019; 130: 369–376

American Society of Clinical Oncology. 2023. Soft Tissue Sarcoma Causes, Risk, Factors, and Prevention. Verfügbar unter <https://www.cancer.org/cancer/soft-tissue-sarcoma/causes-risks-prevention/risk-factors.html> (Zugriffsdatum: 26.03.2023)

American Type Culture Collection. 2023. MDA-MB-231 (ATCC®HTB-26™) Product Sheet. Verfügbar unter <https://www.lgcstandards-atcc.org> (Zugriffsdatum: 28.03.2023)

Arndt S, Landthaler M, Zimmermann JL, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Li Y-F, Morfill GE, Bosserhoff A-K, Karrer S. Effects of cold atmospheric plasma (CAP) on β -defensins, inflammatory cytokines, and apoptosis-related molecules in keratinocytes *in vitro* and *in vivo*. *PloS one* 2015; 10: 1–16

Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li Y-F, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL, Bosserhoff A-K, Karrer S. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing *in vitro* and *in vivo*. *PloS one* 2013; 8: 1–9

Arrigo A-P, Viot S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid redox Signal* 2005; 7: 414–422

Aypar U, Morgan WF, Baulch JE. Radiation-induced epigenetic alterations after low and high LET irradiations. *Mutation research* 2011; 707: 24–33

Bauer G, Graves DB. Mechanisms of Selective Antitumor Action of Cold Atmospheric Plasma-Derived Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Plasma Process. Polym.* 2016; 13: 1157–1178

Bekeschus S, Schmidt A, Bethge L, Masur K, Woedtke T von, Hasse S, Wende K. Redox Stimulation of Human THP-1 Monocytes in Response to Cold Physical Plasma. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 1–11

Bekeschus S, Schütz CS, Nießner F, Wende K, Weltmann K-D, Gelbrich N, Woedtke T von, Schmidt A, Stope MB. Elevated H2AX Phosphorylation Observed with kINPen Plasma Treatment Is Not Caused by ROS-Mediated DNA Damage but Is the Consequence of Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 8535163

Benna C, Rajendran S, Rastrelli M, Mocellin S. miRNA deregulation targets specific pathways in leiomyosarcoma development: an in silico analysis. *J Transl Med* 2019; 2017: 153

Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe HH, Moch H, Böcker-Denk-Heitz-Moch. *Pathologie: Das Lehrbuch*. München: Urban & Fischer in Elsevier 2012

Canard JM, Védrenne B. Clinical application of argon plasma coagulation in gastrointestinal endoscopy: has the time come to replace the laser? *Endoscopy* 2001; 33: 353–357

Choi S-K, Hwang S-Y, Jeon S, Yoo H, Lee J, Shin J-H, Na Y, Kwon Y, Lee Y-S. Design, synthesis, and biological evaluation of novel HSP27 inhibitors to sensitize lung cancer cells to clinically available anticancer agents. *Bioorganic chemistry* 2023; 130: 106260

Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005; 10: 86–103

CLS-Cell Lines Service. 2023. SK-UT-1, Product Sheet. Verfügbar unter <https://www.cls-gmbh.de> (Zugriffsdatum: 27.03.2023)

Cooper LF, Uoshima K, Guo Z. Transcriptional regulation involving the intronic heat shock element of the rat hsp27 gene. *Biochim biophys Acta - Gene Structure and Expression* 2000; 1490: 348–354

Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, Neoptolemos JP, Ke Y, Foster CS. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 7099–7105

Cuesta R, Laroia G, Schneider RJ. Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev* 2000; 14: 1460–1470

D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. *Gynecol Oncol* 2010; 116: 131–139

Das Statistische Bundesamt. 2022. Todesursachenstatistik für Deutschland. Verfügbar unter https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html (Zugriffsdatum: 30.12.2023)

Demetri GD, Chawla SP, Mehren M von, Ritch P, Baker LH, Blay JY, Hande KR, Keohan ML, Samuels BL, Schuetze S, Lebedinsky C, Elsayed YA, Izquierdo MA, Gómez J, Park YC, Le Cesne A. Efficacy and safety of trabectedin in patients with advanced or metastatic liposarcoma or leiomyosarcoma after failure of prior anthracyclines and ifosfamide: results of a randomized phase II study of two different schedules. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4188–4196

Deutsche Krebsgesellschaft e.V... Gynäkologische Tumoren. Philadelphia: Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG 2016

Dorssers LC, van der Flier S, Brinkman A, van Agthoven T, Veldscholte J, Berns EM, Klijn JG, Beex LV, Foekens JA. Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms. *Drugs* 2001; 61: 1721–1733

DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. 2023. Catalogue of human and animal cell lines, MCF-7, MFE-296 Data sheet. Verfügbar unter <https://www.dsmz.de> (Zugriffsdatum: 27.03.2023)

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8: 871–874

Fanelli MA, Cuello Carrión FD, Dekker J, Schoemaker J, Ciocca DR. Serological detection of heat shock protein hsp27 in normal and breast cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 791–795

Friedman PC. Cold atmospheric pressure (physical) plasma in dermatology: where are we today? *Int J Dermatol* 2020; 59: 1171–1184

Garrido C, Schmitt E, Candé C, Vahsen N, Parcellier A, Kroemer G. HSP27 and HSP70: Potentially Oncogenic Apoptosis Inhibitors. *Cell Cycle* 2003; 2: 578–583

Genth-Zotz S, Bolger AP, Kalra PR, Haehling S von, Doehner W, Coats AJS, Volk H-D, Anker SD. Heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure: relation to disease severity and survival. *In J Cardiol* 2004; 96: 397–401

Gusev NB, Bogatcheva NV, Marston SB. Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67: 511–519

Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, Pollreisz A, Aigner C, Lichtenauer M, Mangold A, Niederpold T, Zimmermann M, Taghavi S, Klepetko W, Ankersmit HJ. Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 alpha in chronic obstructive pulmonary disease: markers for immune activation and tissue destruction. *Clin Lab* 2009; 55: 31–40

Hansen RK, Parra I, Lemieux P, Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Fuqua SA. Hsp27 overexpression inhibits doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1999; 56: 187–196

Haralambiev L, Bandyopadhyay A, Suchy B, Weiss M, Kramer A, Bekeschus S, Ekkernkamp A, Mustea A, Kaderali L, Stope MB. Determination of Immediate vs. Kinetic Growth Retardation in Physically Plasma-treated Cells by Experimental and Modelling Data. *Anticancer Res* 2020; 40: 3743–3749

Haralambiev L, Wien L, Gelbrich N, Kramer A, Mustea A, Burchardt M, Ekkernkamp A, Stope MB, Gümbel D. Effects of Cold Atmospheric Plasma on the Expression of Chemokines, Growth Factors, TNF Superfamily Members, Interleukins, and Cytokines in Human Osteosarcoma Cells. *Anticancer Res* 2019; 39: 151–157

Hassin O, Oren M. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2023; 22: 127–144

Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Morfill G, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, Nosenko T, Zimmermann J, Karrer S. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 1–11

Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie.* Berlin: Springer 2014

Heinzelmann S, Bauer G. Multiple protective functions of catalase against intercellular apoptosis-inducing ROS signaling of human tumor cells. *Biol Chem.* 2010; 391: 675–693

Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 2011; 13: 215

Hwang S-Y, Choi S-K, Seo SH, Jo H, Shin J-H, Na Y, Lee Y-S, Kwon Y. Specific Roles of HSP27 S15 Phosphorylation Augmenting the Nuclear Function of HER2 to Promote Trastuzumab Resistance. *Cancers (Basel)* 2020; 12

Iasonos A, Keung EZ, Zivanovic O, Mancari R, Peiretti M, Nucci M, George S, Colombo N, Carinelli S, Hensley ML, Raut CP. External validation of a prognostic nomogram for overall survival in women with uterine leiomyosarcoma. *Cancer* 2013; 119: 1816–1822

Ip PPC, Cheung ANY. Pathology of uterine leiomyosarcomas and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011; 25: 691–704

Ishaq M, Evans MM, Ostrikov KK. Effect of atmospheric gas plasmas on cancer cell signaling. *Int J Cancer* 2014; 134: 1517–1528

Jha P, Pia Patric IR, Shukla S, Pathak P, Pal J, Sharma V, Thinagararanjan S, Santosh V, Suri V, Sharma MC, Arivazhagan A, Suri A, Gupta D, Somasundaram K, Sarkar C. Genome-wide methylation profiling identifies an essential role of reactive oxygen species in pediatric glioblastoma multiforme and validates a methylome specific for H3 histone family 3A with absence of G-CIMP/isocitrate dehydrogenase 1 mutation. *Neuro Oncol* 2014; 16: 1607–1617

Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, Friedman G, Azizkhan-Clifford J. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PloS one* 2011; 6: e16270

Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14: 105–111

Kang SH, Kang KW, Kim K-H, Kwon B, Kim S-K, Lee H-Y, Kong S-Y, Lee ES, Jang S-G, Yoo BC. Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability. *BMC cancer* 2008; 8: 286

Kaplan HG, Malmgren JA. Impact of triple negative phenotype on breast cancer prognosis. *Breast J* 2008; 14: 456–463

Katalinic A, Eisemann N, Kraywinkel K, Noftz MR, Hübner J. Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German mammography screening program. *Int J Cancer* 2020; 147: 709–718

Katsogiannou M, Andrieu C, Baylot V, Baudot A, Dusetti NJ, Gayet O, Finetti P, Garrido C, Birnbaum D, Bertucci F, Brun C, Rocchi P. The functional landscape of Hsp27 reveals new cellular processes such as DNA repair and alternative splicing and proposes novel anticancer targets. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13: 3585–3601

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

Khalili M, Daniels L, Lin A, Krebs FC, Snook AE, Bekeschus S, Bowne WB, Miller V. Non-Thermal Plasma-Induced Immunogenic Cell Death in Cancer: A Topical Review. *J Phys D Appl Phys* 2019; 52

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* 2010; 97: 23702

Kim S-J, Seong M-J, Mun J-J, Bae J-H, Joh H-M, Chung T-H. Differential Sensitivity of Melanoma Cells and Their Non-Cancerous Counterpart to Cold Atmospheric Plasma-Induced Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Int J Mol Sci* 2022; 23

Klein-Hitpaß L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* 1986; 46: 1053–1061

Kletschkus K, Haralambiev L, Mustea A, Bekeschus S, Stope MB. Review of Innovative Physical Therapy Methods: Introduction to the Principles of Cold Physical Plasma. *In vivo (Athens, Greece)* 2020a; 34: 3103–3107

Kletschkus K, Haralambiev L, Nitsch A, Pfister F, Klinkmann G, Kramer A, Bekeschus S, Mustea A, Stope MB. The Application of a Low-temperature Physical Plasma Device Operating Under Atmospheric Pressure Leads to the Production of Toxic NO₂. *Anti-cancer Res* 2020b; 40: 2591–2599

Koensgen D, Besic I, Gümbel 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 Res* 2017; 37: 6739–6744

Kreienberg R, Alt D, Jonat W, Möbus V, Volm T. Management des Mammakarzinoms. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006

Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract. Boston, MA: Springer US 2011

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685

Lamoureux F, Thomas C, Yin M-J, Kuruma H, Beraldi E, Fazli L, Zoubeidi A, Gleave ME. Clusterin inhibition using OGX-011 synergistically enhances Hsp90 inhibitor activity by suppressing the heat shock response in castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 5838–5849

Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, King RJ, Hawkins RA, Smyth JF, Miller WR. Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1603–1609

Lee S, Lee H, Bae H, Choi EH, Kim SJ. Epigenetic silencing of miR-19a-3p by cold atmospheric plasma contributes to proliferation inhibition of the MCF-7 breast cancer cell. *Sci Rep* 2016; 6: 30005

Lee S, Lee H, Jeong D, Ham J, Park S, Choi EH, Kim SJ. Cold atmospheric plasma restores tamoxifen sensitivity in resistant MCF-7 breast cancer cell. *Free Radic Biol Med* 2017; 110: 280–290

Leibsohn S, d'Ablaing G, Mishell DR, Schlaerth JB. Leiomyosarcoma in a series of hysterectomies performed for presumed uterine leiomyomas. *AJOG* 1990; 162: 968–976

Leitlinienprogramm Gynäkologie und Geburtshilfe. 2021. Uterine Sarkome. Verfügbar unter <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-074.html> (Zugriffsdatum: 20.03.2021)

Leitlinienprogramm Onkologie. 2021. Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Verfügbar unter <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom> (Zugriffsdatum: 03.12.2023)

Leitlinienprogramm Onkologie. 2022. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom. Verfügbar unter <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/endometriumkarzinom> (Zugriffsdatum: 03.12.2023)

Leij-Garolla B, Mauk AG. Roles of the N- and C-terminal sequences in Hsp27 self-association and chaperone activity. *Protein Sci* 2012; 21: 122–133

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 Res Int* 2015; 2015: 506059

Liu X, Feng C, Liu J, Cao L, Xiang G, Liu F, Wang S, Jiao J, Niu Y. Androgen receptor and heat shock protein 27 co-regulate the malignant potential of molecular apocrine breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2018; 37: 90

Maisch T, Bosserhoff AK, Unger P, Heider J, Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill GE, Landthaler M, Karrer S. Investigation of toxicity and mutagenicity of cold atmospheric argon plasma. *Environ Mol Mutagen* 2017; 58: 172–177

Metelmann H-R, Seebauer C, Miller V, Fridman A, Bauer G, Graves DB, Pouvesle J-M, Rutkowski R, Schuster M, Bekeschus S, Wende K, Masur K, Hasse S, Gerling T, Hori M, Tanaka H, Ha Choi E, Weltmann K-D, Metelmann PH, Hoff DD von, Woedtke T von. Clinical experience with cold plasma in the treatment of locally advanced head and neck cancer. *Clinical Plasma Medicine* 2018; 9: 6–13

Mittal K, Demopoulos RI. MIB-1 (Ki-67), p53, estrogen receptor, and progesterone receptor expression in uterine smooth muscle tumors. *Human Pathol* 2001; 32: 984–987

Mittal K, Joutovsky A. Areas with benign morphologic and immunohistochemical features are associated with some uterine leiomyosarcomas. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 362–365

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 1986; 51 Pt 1: 263–273

Murillo D, Huergo C, Gallego B, Rodríguez R, Tornín J. Exploring the Use of Cold Atmospheric Plasma to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Biomedicines* 2023; 11

Nitsch A, Sander C, Eggers B, Weiss M, Egger E, Kramer F-J, Erb HHH, Mustea A, Stope MB. Pleiotropic Devitalization of Renal Cancer Cells by Non-Invasive Physical Plasma: Characterization of Molecular and Cellular Efficacy. *Cancers (Basel)* 2023; 15

O'Callaghan-Sunol C, Gabai VL, Sherman MY. Hsp27 modulates p53 signaling and suppresses cellular senescence. *Cancer Res* 2007; 67: 11779–11788

OLS Omni Life Science. Measuring Principle. CASY Cell Counter and Analyzer Operators Guide 2018: 13–15

O'Neill PA, Shaaban AM, West CR, Dodson A, Jarvis C, Moore P, Davies MPA, Sibson DR, Foster CS. Increased risk of malignant progression in benign proliferating breast lesions defined by expression of heat shock protein 27. *Br J Cancer* 2004; 90: 182–188

Owen S, Zhao H, Dart A, Wang Y, Ruge F, Gao Y, Wei C, Wu Y, Jiang WG. Heat shock protein 27 is a potential indicator for response to YangZheng XiaoJi and chemotherapy agents in cancer cells. *Int J Oncol* 2016; 49: 1839–1847

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999; 401: 82–85

Padwick ML, Whitehead M, King R. Hormonal regulation of HSP27 expression in human endometrial epithelial and stromal cells. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 102: 9–14

Park S-B, Kim B, Bae H, Lee H, Lee S, Choi EH, Kim SJ. Differential Epigenetic Effects of Atmospheric Cold Plasma on MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *PLoS one* 2015; 10: e0129931

Pautier P, Italiano A, Piperno-Neumann S, Chevreau CM, Penel N, Cupissol D, Boudou Rouquette P, Bertucci F, Balleyguier C, Lebrun-Ly V, Blay J-Y, Kalbacher E, Delcambre C, Bompas E, Collard O, Isambert N, Guillemet C, Rios M, Sundqvist M, Duffaud F. LBA59 LMS-04 study: A randomised, multicenter, phase III study comparing doxorubicin

alone versus doxorubicin with trabectedin followed by trabectedin in non-progressive patients as first-line therapy, in patients with metastatic or unresectable leiomyosarcoma - A French Sarcoma Group study. *Annals of Oncology* 2021; 32: S1335-S1336

Porter W, Wang F, Wang W, Duan R, Safe S. Role of estrogen receptor/Sp1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1371–1378

Rahman I, Marwick J, Kirkham P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1255–1267

Renkawek K, Bosman GJ, Jong WW de. Expression of small heat-shock protein hsp 27 in reactive gliosis in Alzheimer disease and other types of dementia. *Acta Neuropathol* 1994; 87: 511–519

Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 1962; 18: 571–573

Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* 1999; 274: 18947–18956

Ronckers C, Spix C, Trübenbach C, Katalinic A, Christ M, Cicero A, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Kunz Beatrice, Manegold Katrin, zum Meyer Büschenfelde U, Penzkofer, Andrea, Vollmer G, Weg-Remers S, Barnes B, Buttman-Schweiger, Nina, Dahm S, Franke M, Schönfeld I, Kraywinkel K, Wienecke A. *Krebs in Deutschland für 2019/2020*. Robert Koch-Institut, Berlin 2023

Salari S, Seibert T, Chen Y-X, Hu T, Shi C, Zhao X, Cuerrier CM, Raizman JE, O'Brien ER. Extracellular HSP27 acts as a signaling molecule to activate NF-κB in macrophages. *Cell Stress Chaperones* 2013; 18: 53–63

Sayer HG, Claßen J, Budach W, Höffken K. Therapie des metastasierten Mammakarzinoms. *Der Onkologe* 2002; 8: 874–879

Schmidt A, Bekeschus S, Jarick K, Hasse S, Woedtke T von, Wende K. Cold Physical Plasma Modulates p53 and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Keratinocytes. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 7017363

Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 15–27

Shen C, Liu W, Zhang S, Pu L, Deng B, Zeng Q, Chen Z, Wang X. Downregulation of miR-541 induced by heat stress contributes to malignant transformation of human bronchial epithelial cells via HSP27. *Environmental research* 2020; 184: 108954

Sherman MY, Sherman M, Gabai V, O'Callaghan C, Yaglom J. Molecular chaperones regulate p53 and suppress senescence programs. *FEBS Lett* 2007; 581: 3711–3715

Shi L, Yu L, Zou F, Hu H, Liu K, Lin Z. Gene expression profiling and functional analysis reveals that p53 pathway-related gene expression is highly activated in cancer cells treated by cold atmospheric plasma-activated medium. *PeerJ* 2017; 5: Seiten: 1-19

Singer D, Ressel V, Stope MB, Bekeschus S. Heat Shock Protein 27 Affects Myeloid Cell Activation and Interaction with Prostate Cancer Cells. *Biomedicines* 2022a; 10

Singer D, Wulff CP, Stope MB, Bekeschus S. Extracellular Heat Shock Protein 27 Is Released by Plasma-Treated Ovarian Cancer Cells and Affects THP-1 Monocyte Activity. *Plasma* 2022b; 5: 569–578

Spiegelman S, Watson KF, Kacian DL. Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1971; 68: 2843–2845

Stope MB, Benouahi R, Sander C, Haralambiev L, Nitsch A, Egger E, Mustea A. Protherapeutic Effects and Inactivation of Mammary Carcinoma Cells by a Medical Argon Plasma Device. *Anticancer Res* 2020; 40: 6205–6212

Stope MB, Klinkmann G, Diesing K, Koensgen D, Burchardt M, Mustea A. Heat Shock Protein HSP27 Secretion by Ovarian Cancer Cells Is Linked to Intracellular Expression Levels, Occurs Independently of the Endoplasmic Reticulum Pathway and HSP27's Phosphorylation Status, and Is Mediated by Exosome Liberation. *Dis Markeres* 2017; 2017: 1575374

Stope MB, Koensgen D, Wulff C, Besic I, Gumbel D, Kaul A, Weiss M, Diesing K, Kramer A, Mustea A, Bekeschus S. Cold Atmospheric Plasma Suppresses Ovarian Cancer Cell Activity With Concurrent Secretion Of Heat Shock Protein 27 Affecting Monocyte Fate. *Clinical Plasma Medicine* 2018; 9: 25–26

Stope MB, Schubert T, Staar D, Rönnau C, Streitböcker A, Kroeger N, Kubisch C, Zimmermann U, Walther R, Burchardt M. Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells. *World J Urol* 2012; 30: 327–331

Stope MB, Weiss M, Preuss M, Streitböcker A, Ritter CA, Zimmermann U, Walther R, Burchardt M. Immediate and transient phosphorylation of the heat shock protein 27 initiates chemoresistance in prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2014; 32: 2380–2386

Thuringer D, Jago G, Wettstein G, Terrier O, Cronier L, Yousfi N, Hébrard S, Bouchot A, Hazoumé A, Joly A-L, Gleave M, Rosa-Calatrava M, Solary E, Garrido C. Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB J* 2013; 27: 4169–4183

Tokuda H, Kuroyanagi G, Tsujimoto M, Enomoto Y, Matsushima-Nishiwaki R, Onuma T, Kojima A, Doi T, Tanabe K, Akamatsu S, Iida H, Ogura S, Otsuka T, Iwama T, Tanikawa T, Ishikawa K, Kojima K, Kozawa O. Release of Phosphorylated HSP27 (HSPB1) from Platelets Is Accompanied with the Acceleration of Aggregation in Diabetic Patients. *PLoS one* 2015; 10: e0128977

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979; 76: 4350–4354

Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 579–591

van der Graaf WTA, Blay J-Y, Chawla SP, Kim D-W, Bui-Nguyen B, Casali PG, Schöffski P, Aglietta M, Staddon AP, Beppu Y, Le Cesne A, Gelderblom H, Judson IR, Araki N, Ouali M, Marreaud S, Hodge R, Dewji MR, Coens C, Demetri GD, Fletcher CD, Dei Tos AP, Hohenberger P. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012; 379: 1879–1886

van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1971; 15: 232–236

Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S, Sobilo J, Gosset D, Kieda C, Legrain B, Pouvesle J-M, Le Pape A. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *Int J Cancer* 2012; 130: 2185–2194

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and Safety of Trastuzumab as a Single Agent in First-Line Treatment of HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2023; 41: 1638–1645

Volotskova O, Hawley TS, Stepp MA, Keidar M. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. *Sci Rep* 2012; 2: 636

Wang Y, Abazid A, Badendieck S, Mustea A, Stope MB. Impact of Non-Invasive Physical Plasma on Heat Shock Protein Functionality in Eukaryotic Cells. *Biomedicines* 2023; 11

Wataba K, Saito T, Fukunaka K, Ashihara K, Nishimura M, Kudo R. Over-expression of heat shock proteins in carcinogenic endometrium. *Int J Cancer* 2001; 91: 448–456

Weiss M, Arnholdt M, Hißnauer A, Fischer I, Schönfisch B, Andress J, Gerstner S, Dannehl D, Bösmüller H, Staebler A, Brucker SY, Henes M. Tissue-preserving treatment with non-invasive physical plasma of cervical intraepithelial neoplasia-a prospective controlled clinical trial. *Frontiers in medicine* 2023; 10: 1242732

Weiss M, Gumbel 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

Wilkening S, Bader A. Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model. *Journal of biomolecular techniques : JBT* 2004; 15: 107–111

Woedtke T von, Metelmann H-R, Weltmann K-D. Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of in Vivo Application of Cold Atmospheric Plasma. *Contrib. Plasma Phys.* 2014; 54: 104–117

Woedtke T von, Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Weltmann K-D. Plasma Medicine: A Field of Applied Redox Biology. *In Vivo* 2019; 33: 1011–1026

Wong JW, Shi B, Farboud B, McClaren M, Shibamoto T, Cross CE, Isseroff RR. Ultraviolet B-mediated phosphorylation of the small heat shock protein HSP27 in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 427–434

Wu Q, Ni X. ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Current drug targets* 2015; 16: 13–19

Xu Q, Schett G, Perschinka H, Mayr M, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J, Kiechl S, Wick G. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation* 2000; 102: 14–20

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

Ye S, Yuan D, Xie Y, Pan Y, Shao C. Role of DNA methylation in the adaptive responses induced in a human B lymphoblast cell line by long-term low-dose exposures to γ -rays and cadmium. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014; 773: 34–38

Zanini C, Pulerà F, Carta F, Giribaldi G, Mandili G, Maule MM, Forni M, Turrini F. Proteomic identification of heat shock protein 27 as a differentiation and prognostic marker in neuroblastoma but not in Ewing's sarcoma. *Virchows Arch* 2008; 452: 157–167

Zhao M, Ding JX, Zeng K, Zhao J, Shen F, Yin YX, Chen Q. Heat shock protein 27: a potential biomarker of peritoneal metastasis in epithelial ovarian cancer? *Tumour Biol* 2014; 35: 1051–1056

9. Danksagung

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und wissenschaftlichen Betreuer PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Matthias Stope, der mir ermöglicht hat, die Daten für meine experimentelle Doktorarbeit im gynäkologischen Forschungslabor in Greifswald zu erheben. Vielen Dank für deine tolle Unterstützung. Danke, dass deine „Tür“ jederzeit offenstand und dass du auch nach deinem Hochschulwechsel an die Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für mich immer erreichbar warst. Danke für die angeregten Diskussionen, die konstruktiven Gespräche und das Begutachten meiner Arbeit auch in deiner Freizeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea, Direktor der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologischen Onkologie des Universitätsklinikum Bonn unter dessen Leitung ich die Erhebung meiner Daten an der Universität Greifswald begonnen habe.

Der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn danke ich für die unkomplizierte Immatrikulation und problemlose Fortführung meiner Dissertation nach dem Hochschulwechsel meines Doktorvaters.

Herrn Prof. Dr. Christoph Peter Bourauel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei dem gesamten Team des gynäkologischen und urologischen Forschungslabors des Universitätsklinikum Greifswald auf der Etage 5 bedanken. Dieser Dank gilt vor allem auch Dr. med. Andreas Nitsch, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein besonderer Dank gilt zudem meinen Eltern Stefan und Cornelia Grüter sowie meinem Bruder Maximilian. Danke für eure Unterstützung, eure guten Ratschläge, euer Korrekturlesen und dass ihr immer an mich geglaubt habt. Danke, dass ihr mir dieses Studium ermöglicht habt.

Auch möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, besonders bei Caroline Sander und Marie-Luise Henze. Mit euch sind die Stunden im Labor in Sekundenschnelle verfliegen. Außerdem danke ich euch, Meggy Rache, Laura Kuhn, Jule Vicari und Tabea Knoblauch, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet und mich immer bestmöglich unterstützt habt. An unsere gemeinsame Zeit werde ich mich immer wieder gerne erinnern.