

Modulation tumorbiologisch relevanter Zellantworten gynäkologischer Tumorzellen durch nicht-invasives physikalisches Plasma

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Caroline Sander

aus Lübbecke

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Frank Schildberg

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.02.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und gynäkologische Onkologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Gynäkologische Tumoren	7
1.1.1 Das Mammakarzinom.....	7
1.1.2 Das Ovarialkarzinom	11
1.1.3 Das Endometriumkarzinom	12
1.1.4 Das uterine Leiomyosarkom	14
1.2 Physikalisches Plasma.....	16
1.3 Die Zytoplasmamembran eukaryotischer Zellen	18
1.4 Apoptose.....	19
1.5 Zielsetzung.....	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Zelllinien	22
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Chemikalien.....	28
2.1.4 Gase.....	29
2.1.5 Kommerzielle Puffer und Lösungen.....	29
2.1.6 Kits und Reagenzien.....	30
2.1.7 Zellkulturmedien und -zusätze.....	31
2.1.8 Software	32
2.2 Zellbiologische Methoden	32
2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	32
2.2.2 Kultivieren und Passagieren der Zellen	33
2.2.3 Wachstumskinetik nach Behandlung mit NIPP	35
2.2.4 Zellzahlbestimmung.....	37
2.3 Biochemische Methoden.....	38
2.3.1 Farbstoff-Aufnahme-Assay	38
2.3.2 Farbstoff-Verlust-Assay	40
2.3.3 ATP-Freisetzungs-Assay	43
2.3.4 Caspase-3/7-Assay	44

2.3.5 TUNEL-Assay.....	46
2.4 Statistische Auswertung.....	50
3. Ergebnisse.....	51
3.1 Einfluss von NIPP auf das Zellwachstum.....	51
3.2 Einfluss von NIPP auf die Membranfunktionalität	54
3.3 Einfluss von NIPP auf die Apoptose	66
4. Diskussion	71
4.1 NIPP hemmt das Zellwachstum.....	71
4.2 NIPP stört die Membranfunktionalität.....	72
4.3 NIPP induziert Apoptose.....	75
4.4 Klinische Perspektiven.....	78
5. Zusammenfassung	80
6. Abbildungsverzeichnis.....	82
7. Tabellenverzeichnis	83
8. Literaturverzeichnis	85
9. Danksagung.....	106

Abkürzungsverzeichnis

ABC.....	ATP-Binding-Cassette
ADH	Atypische duktale Epithelhyperplasie
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA1	Breast Cancer Gen 1
BRCA2	Breast Cancer Gen 2
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CDK	Cycline-dependent Kinase
DAPI.....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DISC	Death Inducing Signal Complex
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP.....	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
dUTP.....	Desoxyuridintriphosphat
EC	Endometriumkarzinom
EGF.....	Epidermal Growth Factor
EtBr	Ethidiumbromid
F	Fluorescein
FADD	Fas-Associated Death Domain
FBS	Fetales Kälberserum
FDA.....	Fluorescein Diacetat
FEA	Flache Epithelotypie
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FITC-Dextran	Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran
FSC.....	Vorwärtsstreulicht
GLUT	Glucose Transporter

GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
ICAD	Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase
LN	Lobuläre Neoplasie
MC	Mammakarzinom
MFI.....	Mittlere Fluoreszenzintensität
MRP	Multidrug-Resistance-Protein
MRSA.....	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NCI.....	National Cancer Institute
NIPP.....	Nicht-invasives physikalisches Plasma
NST	No Special Type
OC.....	Ovarialkarzinom
PALB2.....	Partner And Localizer of BRCA2
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PCOS.....	Polyzystisches Ovarial Syndrom
rcf.....	Relative Zentrifugalbeschleunigung
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SOD	Superoxiddismutase
SSC.....	Seitenstreulicht
Strep-HRP.....	Streptavidin-Meerrettichperoxidase
TdT.....	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TGF- α	Transforming Growth Factor alpha
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TP53	Tumor Protein 53
TRAIL.....	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
uLMS.....	Uterines Leiomyosarkom
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

1.1 Gynäkologische Tumoren

1.1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom (MC) ist weltweit das häufigste Malignom der Frau und stellt die zweithäufigste Todesursache unter den Tumoren bei Frauen dar (Sung et al., 2021). In Deutschland lag die Inzidenz des Mammakarzinoms bei Frauen im Jahr 2022 bei 148 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner. Auch Männer können am Mammakarzinom erkranken, wobei die Inzidenz mit 2,9 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner deutlich geringer ausfällt (Europäische Union, 2024). Im Folgenden wird primär die Erkrankung der Frau betrachtet. Die Entstehung des Brustkrebses ist multifaktoriell. Die Risikofaktoren sind unter anderem hormoneller und reproduktiver Genese. Dazu zählen eine frühe Menarche und späte Menopause, ein hohes Alter bei der ersten Geburt, wenige Schwangerschaften sowie die Einnahme oraler Kontrazeptiva oder Hormontherapien in der Menopause. Weiterhin spielen aber auch den Lebensstil betreffende Faktoren, wie mangelnde körperliche Aktivität, exzessiver Alkoholkonsum und starkes Übergewicht eine Rolle (Sun et al., 2017; Sung et al., 2021). Zudem ist eine positive Familienanamnese ein wichtiger Risikofaktor für das Mammakarzinom (Brewer et al., 2017; Sun et al., 2017). In diesem Zusammenhang spielen Mutationen der Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *BRCA2* eine wichtige Rolle, wobei Trägerinnen der Risikomutationen ein signifikant höheres Risiko haben, ein Mammakarzinom zu entwickeln (Armstrong et al., 2019; Hawsawi et al., 2019). Das Risiko für *BRCA1*-Mutationsträgerinnen, an Brustkrebs zu erkranken, wird auf 40-87 % geschätzt, das von *BRCA2*-Trägerinnen auf 18-88 % (Engel und Fischer, 2015). Des Weiteren führen Mutationen des *PALB2*-Gens zu einem erhöhten Risiko für ein Mammakarzinom (Antoniou et al., 2014). Das autosomal-dominant vererbte Li-Fraumeni-Syndrom, welches auf eine Mutation des *TP53*-Gens zurückzuführen ist und multiple Tumoren verursachen kann, spielt insbesondere als Risikofaktor für das Auftreten von Brustkrebs bei Frauen unter 31 Jahren eine Rolle (Correa, 2016; Frebourg et al., 2020).

Es sind verschiedene Risikoläsionen bekannt, welche bereits als Neoplasie gewertet werden, jedoch meist klinisch noch unauffällig sind. Diese weisen unterschiedliche

Progressionsraten auf. Dazu zählen das duktales Carcinoma in situ (DCIS), die atypische duktales Epithelhyperplasie (ADH), die lobuläre Neoplasie (LN), das intraduktales Papillom und die flache Epithelatyposie (FEA). Das DCIS nimmt unter diesen eine Sonderstellung ein, da es das höchste Risiko einer Progression zum Mammakarzinom aufweist, wohingegen die anderen Läsionen ein eher unsicheres und heterogenes malignes Potenzial zeigen (Calhoun und Collins, 2016; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Die histologische Klassifikation des Mammakarzinoms erfolgt nach dem Wachstumsmuster in lobuläre und duktales Karzinome. Diese können teils in weitere Subtypen differenziert werden, wobei das häufigste invasive Karzinom keine spezielle Differenzierung aufweist und als „no special type“ (NST) bezeichnet wird (Böcker und Kreipe, 2012; Sinn und Kreipe, 2013). In Bezug auf Therapie und Prognose ist der Rezeptorstatus der Tumorzellen heutzutage von besonderer Relevanz (Böcker und Kreipe, 2012). 70 % der Mammakarzinome sind Hormonrezeptor-positiv und exprimieren Östrogen- und/oder Progesteron-Rezeptoren. Bei diesen Tumoren kann durch die Einführung der Hormontherapie mit Tamoxifen eine deutliche Senkung der Mortalität beobachtet werden (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2011; Lim et al., 2012). Eine Überexpression des Wachstumsfaktorrezeptors *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)* ist hingegen mit einer besonderen Aggressivität des Karzinoms und einer schlechteren Prognose assoziiert (Böcker und Kreipe, 2012; Slamon et al., 1987). Dies gilt auch für das Triple-negative Mammakarzinom, welches weder Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren noch *HER2* exprimiert und in etwa 10-15 % der Fälle vorliegt. Verglichen mit Hormonrezeptor-positiven Karzinomen, tritt diese Form eher bei jüngeren und prämenopausalen Frauen auf (Curigliano und Goldhirsch, 2011; Malorni et al., 2012).

Die Metastasierung erfolgt vor allem auf dem lymphatischen Weg in die axillären Lymphknoten sowie hämatogen, wobei sich die häufigsten hämatogenen Metastasen im Skelett, in der Lunge, in der Leber und im Gehirn absiedeln (Böcker und Kreipe, 2012).

Die Therapie des Mammakarzinoms erfolgt abhängig von der Tumorausbreitung, dem Rezeptorstatus des Tumors sowie dem Menopausenstatus der Patientin. Grundsätzlich stehen an operativen Methoden für die Behandlung eines lokoregionalen Ersttumors die Mastektomie und die Brusterhaltende Therapie (BET) zur Verfügung. Bei entsprechendem nodulären Status kann zudem eine axilläre Dissektion notwendig werden. Im Falle

einer BET erfolgt in der Regel eine adjuvante Strahlentherapie (Sedlmayer et al., 2013). Diese kann das Rezidivrisiko signifikant senken (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005). Weiterhin kommen unterschiedliche systemische adjuvante Behandlungsmaßnahmen zum Einsatz. Hierzu zählen die Chemotherapie, die Hormontherapie sowie die Antikörpertherapie. Die adjuvante Standard-Chemotherapie wird bei Patientinnen mit Triple-negativen Tumoren und *HER2*-positiven Tumoren sowie anderen Risikokonstellationen empfohlen und enthält ein Taxan und ein Anthrazyklin (Francis et al., 2008; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Bei Vorliegen von Hormonrezeptor-positiven Tumoren werden die Patientinnen hingegen mit dem Selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen oder mit Aromatasehemmern adjuvant behandelt (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2015). Die Tamoxifen-Therapie wird für mindestens fünf Jahre empfohlen und zeigt bei Fortführung für zehn Jahre einen Nutzen hinsichtlich der Rezidivrate und Mortalität (Davies et al., 2013; Eisen et al., 2015). Mitunter kann bei prämenopausalen Patientinnen, die schon eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben und ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv aufweisen, zusätzlich eine Suppression der Ovarfunktion sinnvoll sein. Diese kann einerseits medikamentös mittels der Gabe von *GnRH*-Analoga, andererseits aber auch chirurgisch mittels bilateraler Ovariectomie erfolgen (Kim et al., 2020; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Erfolgt eine Therapie mit Aromatasehemmern, ist die zusätzliche Suppression der Ovarfunktion unabdingbar (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Auch eine alleinige Ovarialsuppression kommt für prämenopausale Frauen in Frage, wenn eine Kontraindikation für die Therapie mit Tamoxifen besteht oder andere Therapieoptionen abgelehnt werden (Eisen et al., 2015). Bei Patientinnen mit *HER2*-positivem Mammakarzinom kommt zusätzlich zu den Chemotherapeutika eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab zum Einsatz, die das krankheitsfreie Überleben signifikant verlängern kann (Cameron et al., 2017). In diesem Fall erhalten sie zunächst das Anthrazyklin und im Anschluss eine kombinierte Therapie mit einem Taxan und Trastuzumab (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Auch neoadjuvante Therapiekonzepte kommen in der Behandlung des Mammakarzinoms zum Einsatz und können bei fortgeschrittenen und primär inoperablen Mammakarzinomen im Verlauf zur Operabilität führen oder die Notwendigkeit einer Mastektomie verhindern (Chen et al., 2004; Kaufmann et al., 2006; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021; Wang et al., 2017). Zudem werden inflammatorische Mammakarzinome mittels neoadjuvanter Therapie behandelt. Bezüglich des

Gesamtüberlebens sind die adjuvante und die neoadjuvante Chemotherapie als äquivalent zu betrachten (Mauri et al., 2005). Eine neue Therapieoption beim metastasierten, hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom stellen CDK4/6-Inhibitoren dar. Dazu zählen die Wirkstoffe Abemaciclib, Ribociclib und Palbociclib (Piezzo et al., 2020). Diese Substanzen werden in der Regel mit einem Aromatasehemmer oder Fulvestrant, einem kompetitiven Östrogenrezeptorantagonist, kombiniert (Spring et al., 2019). Des Weiteren kommt für die Behandlung im metastasierten Stadium der *Anti-VEGF*-Antikörper Bevacizumab in Frage, welcher in Kombination mit einer Chemotherapie eingesetzt wird (Garcia et al., 2020; Miller et al., 2007). Für die Behandlung des metastasierten *HER2*-positiven Mammakarzinoms wird eine Kombinationstherapie aus Trastuzumab, Pertuzumab und einem Taxan empfohlen (Giordano et al., 2014).

Das relative 5-Jahres-Überleben liegt bei Frauen bei 88 %, bei Männern nur bei 77 % (Robert Koch-Institut, 2016). Nach einer BET und Radiatio liegt die Rate an Lokalrezidiven nach 5 Jahren bei 8 %. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach Auftreten eines Mammakarzinom-Rezidivs liegt bei 59 % (Haffty et al., 1991). Trotz zahlreicher Therapieoptionen und einem Sinken der Sterbefälle seit Ende der Neunziger-Jahre, limitieren unerwünschte Nebenwirkungen, Resistenzen gegenüber den Medikamenten oder Nicht-Ansprechen des Mammakarzinoms auf die Therapien mitunter den Behandlungserfolg (Gherzi et al., 2015; Lorzio et al., 2012; Murray et al., 2012; Osborne und Schiff, 2011; Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2023).

1.1.2 Das Ovarialkarzinom

Die Inzidenz des Ovarialkarzinoms (OC) lag 2022 in Deutschland bei 14,6 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner (Europäische Union, 2024). Obwohl die Inzidenz des Ovarialkarzinoms in den letzten Jahren insgesamt abnehmend ist, bedingt es immerhin ca. 5 % aller Krebssterbefälle der Frau, da viele Patientinnen erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022a; Sung et al., 2021; Torre et al., 2018). Epitheliale Ovarialkarzinome machen 90 % aller malignen Ovarialtumoren aus und gelten als besonders aggressiv (Torre et al., 2018).

Ätiologisch spielen das Alter sowie Übergewicht eine Rolle für die Entstehung von Ovarialtumoren (Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2023). Weiterhin zählen eine hohe Anzahl an Ovulationen, Endometriose und das Polyzystische Ovarial Syndrom (PCOS) zu den Risikofaktoren (Heidemann et al., 2014; Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2023; Yin et al., 2019). Wie beim Mammakarzinom sind genetische Komponenten von wichtiger Bedeutung. So erhöhen Mutationen in den *BRCA1*- und *BRCA2*-Genen auch das Risiko für die Entstehung von OC (Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2023). Zudem gilt eine Exposition gegenüber Asbest als möglicher Risikofaktor, sodass das OC in bestimmten Fällen auch als Berufskrankheit gewertet werden kann (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022a). Die Einnahme oraler Kontrazeptiva senkt das Erkrankungsrisiko hingegen (Beral et al., 2008).

Die Klassifikation der epithelialen Ovarialtumoren erfolgt histologisch in seröse, muzinöse, seromuzinöse, endometrioid, klarzellige sowie Brenner-Tumoren. Es existieren weitere seltene Subtypen und als hoch-maligne geltende undifferenzierte Karzinome (Kurman et al., 2014). Die Metastasierung erfolgt zum einen lymphogen, bevorzugt in pelvine und paraaortale Lymphknoten. Zum anderen ist eine Metastasierung per continuitatem typisch für das Ovarialkarzinom. Auf diesem Wege kommt es zu einer Peritonealkarzinose (Lax et al., 2012). Die Stadieneinteilung erfolgt abhängig von der Ausbreitung nach den FIGO-Stadien und der TNM-Klassifikation (Berek et al., 2018).

Viele Patientinnen bleiben lange symptomfrei oder weisen nur unspezifische Symptome auf, was dazu führt, dass Ovarialkarzinome häufig erst spät diagnostiziert werden (Fung et al., 2004). In der Regel kann eine endgültige Diagnose erst nach einer Laparotomie bzw. einem operativen Staging gestellt werden (Falchetta et al., 2016; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022a). Dabei erfolgen intraoperativ die Exploration der Abdominalhöhle sowie systematische Biopsien und Biopsien aus makroskopisch auffälligen Bereichen. Gegebenenfalls sind eine Hysterektomie und Adnexexstirpation, eine Omentektomie, eine Lymphonodektomie pelvin und paraaortal und eine Appendektomie in der selben Operation möglich (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022a).

Stadienabhängig erfolgt standardmäßig eine adjuvante Chemotherapie mit Carboplatin (Winter-Roach et al., 2009) oder eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Paclitaxel. Zudem können bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen Bevacizumab, Inhibitoren des Enzyms Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) oder eine Kombination aus beiden als Erhaltungstherapie eingesetzt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022a; Ray-Coquard et al., 2019). Liegt eine Platinresistenz vor, können in der Rezidivtherapie eventuell nicht-platinhaltige Substanzen wie Topotecan, Gemcitabin oder pegyliertes liposomales Doxorubicin als Monotherapie in Erwägung gezogen werden. In einigen Fällen kommt weiterhin eine Strahlentherapie zur Behandlung eines Rezidivs in Frage (Brown et al., 2013).

Obwohl die Mortalität des Ovarialkarzinoms in den letzten Jahrzehnten gesunken ist, ist die Prognose insgesamt nach wie vor als schlecht zu werten. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate aller Ovarialkarzinome bei 47 % (Torre et al., 2018). In den Stadien III und IV ist sie deutlich geringer (Schwartzler und Timmerman, 2018).

1.1.3 Das Endometriumkarzinom

In Deutschland stellt das Endometriumkarzinom (EC) die fünfthäufigste bösartige Tumorerkrankung bei Frauen dar. Die standardisierte Neuerkrankungsrate je 100.000 Einwohner lag im Jahr 2020 in Deutschland bei 15,8 (Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2023). Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 68 Jahre. Die Patientinnen sind häufig postmenopausal und die Erkrankung fällt

oft bereits in frühen Stadien beispielsweise mit irregulären vaginalen Blutungen auf (Amant et al., 2005; Clarke et al., 2018).

Histopathologisch werden klassischerweise Typ-1- und Typ-2-Endometriumkarzinome unterschieden, wobei mittlerweile vermehrt immunhistochemische und molekulare Klassifikationen Anwendung finden. 80 % der Endometriumkarzinome werden dem endometrioiden Subtyp zugeordnet, welcher sich durch eine Östrogenabhängigkeit und -stimulation auszeichnet und zu den Typ-1-Karzinomen zählt (Amant et al., 2005; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022b; Setiawan et al., 2013). Die Atypische Endometriumhyperplasie gilt als Vorläuferläsion. Typ-2-Endometriumkarzinome sind östrogenunabhängig und entstehen in einem atrophischen Endometrium (Lax et al., 2012). Diese können in seröse oder klarzellige Subtypen unterteilt werden (Lax, 2004).

Zu den Risikofaktoren für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms Typ 1 zählt eine Hormontherapie mit Östrogenen ohne Gestagenschutz, insbesondere bei Langzeiteinnahme (Razavi et al., 2010). Auch eine Tamoxifentherapie, wie sie bei Frauen mit Mammakarzinom zum Einsatz kommt, erhöht das Risiko, an einem EC zu erkranken (Fisher et al., 1998; Lee et al., 2020). Analog zu Ovarial- und Mammakarzinomen spielt auch in der Ätiologie des EC eine hohe Anzahl an Ovulationen, beispielsweise bedingt durch eine frühe Menarche, späte Menopause oder Kinderlosigkeit, eine wichtige Rolle. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass übergewichtige Frauen und Patientinnen mit Diabetes mellitus Typ 2 häufiger erkranken (Onstad et al., 2016; Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2023). An Risikofaktoren für das östrogen-unabhängige Typ-2-Endometriumkarzinom sind das Alter sowie Bestrahlungstherapien des Uterus zu nennen. Bislang ist unklar, inwieweit der Lebensstil Einfluss auf diesen Tumor nehmen kann (Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2023). Es konnte gezeigt werden, dass Frauen mit positiver Familienanamnese für Endometriumkarzinome oder Kolonkarzinome ein erhöhtes Risiko haben, selbst zu erkranken (Win et al., 2015).

Die Metastasierung erfolgt zunächst insbesondere per continuitatem in das Myometrium. Des Weiteren kann eine Ausbreitung in die Tuben, Ovarien und die Zervix vorkommen. Metastasierungen in Harnblase und Rektum sind selten. Kommt es zur lymphogenen

Metastasierung, erfolgt diese in der Regel in die pelvinen und anschließend in die paraaortalen Lymphknoten. Eine hämatogene Metastasierung betrifft insbesondere die Lunge (Lax et al., 2012). Die Stadieneinteilung wird nach FIGO bzw. TNM vorgenommen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022b).

Die Standardtherapie des EC ist die totale Hysterektomie mit Adnexektomie. In fortgeschrittenen Stadien und beim Typ-2-Endometriumkarzinom erfolgt eventuell zusätzlich eine Lymphadenektomie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022b). Eine adjuvante perkutane Strahlentherapie bzw. eine vaginale Brachytherapie können das Rezidivrisiko senken (Klopp et al., 2014). Auch eine alleinige Bestrahlung kommt bei Kontraindikationen für eine Operation in Frage (van der Steen-Banasik et al., 2016). Die Radiatio kann jedoch lokale Nebenwirkungen, wie radiogene Proktitis, Zystitis und Vulvovaginitis, Lymphödeme und Vaginalstenosen oder -fibrosen verursachen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022b). Patientinnen in fortgeschrittenen Stadien bzw. mit serösem Endometriumkarzinom oder Typ-1-Karzinom mit *TP53*-Mutation profitieren von einer adjuvanten Chemotherapie, welche nach der aktuellen Leitlinienempfehlung vorzugsweise mit Carboplatin und Paclitaxel durchgeführt werden sollte (Galaal et al., 2014; Leitlinienprogramm Onkologie, 2022b; Matei et al., 2019).

Insgesamt liegt die 5-Jahres Überlebensrate bei 80 %, wobei Unterschiede zwischen den histologischen Typen bestehen (Amant et al., 2005). Die Prognose ist bei einer eher geringen Anzahl an Sterbefällen gut (Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2023). Dennoch ist nicht außer Acht zu lassen, dass Patientinnen mit klarzelligen und serösen Karzinomen bislang eine vergleichsweise hohe Rezidivrate und ein geringes Überleben aufweisen (Bernardini et al., 2016).

1.1.4 Das uterine Leiomyosarkom

Das uterine Leiomyosarkom (uLMS) ist ein seltener Tumor des Uterus, der durch eine sehr schlechte Prognose gekennzeichnet ist (Juhasz-Böss et al., 2018). Es zählt zur Gruppe der uterinen Sarkome und wies von 1978 bis 2007 in Nordeuropa eine Inzidenz von 0,4 pro 100.000 Einwohner auf (Brooks et al., 2004; Koivisto-Korander et al., 2012). Die Inzidenz ist bei Frauen afrikanischer Abstammung höher als bei anderen (Brooks et

al., 2004). Liegt eine Mutation des *TP53*-Gens vor, ist das Risiko, im Rahmen eines Li-Fraumeni-Syndroms an einem Leiomyosarkom zu erkranken, ebenfalls erhöht (Ognjanovic et al., 2012). Darüber hinaus ist die Ätiologie bislang weitgehend unklar (Wen et al., 2016).

Analog zu den oben beschriebenen Malignomen der Genitalorgane erfolgt die Klassifikation nach TNM/FIGO (Wen et al., 2016). Die meisten uterinen Leiomyosarkome finden sich intramural, während 20 % submukös, 10 % subserös und 5 % in der Cervix uteri lokalisiert sind. Histopathologisch lässt sich das Leiomyosarkom in spindelzellige, epitheloide und myxoide Typen unterscheiden (Oliva et al., 2014).

Das Leiomyosarkom metastasiert hämatogen in Lunge und Leber (Duffaud et al., 2015). Zudem ist es das häufigste Sarkom, das Hautmetastasen ausbildet (Wang et al., 2012). Weiterhin kommen Metastasen in Weichteilen und Knochen vor. Eine Lymphknotenmetastasierung ist selten (Duffaud et al., 2015).

Therapeutischer Goldstandard ist die vollständige Hysterektomie, wobei die Vermeidung einer Verletzung des Uterus oder eines Morcellements dabei von hoher Relevanz sind (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. et al., 2021; Wen et al., 2016). Da die Diagnose uLMS häufig erst postoperativ gestellt wird und die Verdachtsdiagnose zunächst häufig als benigne eingestuft wird, ist die En-Bloc-Resektion des Uterus nicht immer gegeben, was die Prognose verschlechtern kann (George et al., 2014; Wen et al., 2016). Insgesamt ist die Rezidivrate nach erfolgter Hysterektomie hoch (Hensley et al., 2014). Eine Adnexektomie kann abhängig vom Menopausenstatus der Patientin erfolgen. Bei prämenopausalen Frauen wird sie in der Regel nicht durchgeführt (Wen et al., 2016). Eine Lymphadenektomie erfolgt lediglich im Falle von suspekt imponierenden Lymphknoten, da eine lymphogene Metastasierung selten ist (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. et al., 2021). Standardmäßig sind keine adjuvante Chemotherapie oder Radiatio vorgesehen. Bei Auftreten von Metastasen erfolgt, wenn möglich, eine komplette Metastasenresektion (George et al., 2018). Im metastasierten Stadium kann zudem eine Chemotherapie mit Doxorubicin in Erwägung gezogen werden (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. et al., 2021). Daneben gilt Ifosfamid aus der Gruppe der Alkylantien als wirksam in der Therapie von Weichteilsarkomen (Duffaud et al., 2015). Die Ansprechraten einer Monotherapie mit Doxorubicin oder

Ifosfamid liegen jedoch unter 20 % (Hensley et al., 2014). Rezidive kommen häufig vor und die Studienlage hinsichtlich adjuvanter Therapien ist insgesamt noch lückenhaft (Friedman und Hensley, 2018).

Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Patientinnen in Stadium I bei ca. 76 %, nimmt jedoch im fortgeschrittenem Stadium IV auf ca. 29 % deutlich ab (Kapp et al., 2008). Bei insgesamt geringen Fortschritten hinsichtlich der Erkennung und Therapie des Leiomyosarkoms in den vergangenen Jahren, werden neue Behandlungsansätze dringend benötigt (Kapp et al., 2008).

1.2 Physikalisches Plasma

Physikalisches Plasma gilt neben den drei Erscheinungsformen fest, flüssig und gasförmig als vierter Aggregatzustand, welcher auftritt, wenn einem Gas Energie zugeführt wird. So entsteht ein ionisiertes Gas, das Ionen, Elektronen und neutrale Komponenten wie Atome, Moleküle und Radikale enthält (Bárdos und Baránková, 2010; Moisan et al., 2001). Ein Beispiel für natürlich vorkommendes physikalisches Plasma sind Gewitterblitze. Hier entstehen Temperaturen von bis zu 30.000 K (Fantz und Lotter, 2002).

In der Medizin findet dagegen nicht-thermisches physikalisches Plasma Anwendung, welches Temperaturen zwischen 25 und 45 °C aufweist (Yan et al., 2016). Dieses auch als Nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP) bezeichnete Plasma unterscheidet sich dahingehend von heißen Plasmen, als dass das Gas nur teilweise ionisiert ist (Haertel et al., 2014). Bei der Erzeugung des NIPP wird unter Atmosphärendruck Argon, Helium, Sauerstoff, Stickstoff, Luft oder Gasgemischen Energie zugeführt (Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 2022; Haertel et al., 2014). Durch Wechselwirkungen der Plasmakomponenten untereinander sowie mit der angrenzenden Luft, Oberflächen oder Flüssigkeiten kommt es zur Bildung reaktiver Spezies, welche unter anderem auch für die Wirkung des physikalischen Plasmas verantwortlich gemacht werden (Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 2022). Des Weiteren entstehen Ultraviolettstrahlung und elektromagnetische Felder (Semmler et al., 2020). NIPP wirkt antiseptisch, antimikrobiell und antiinflammatorisch und fördert zudem die Angiogenese. Bisher wird es insbesondere in der Dermatologie zur Wundbehandlung eingesetzt

(Bernhardt et al., 2019; Haertel et al., 2014; Privat-Maldonado et al., 2019). Aufgrund der antibakteriellen Wirkung von NIPP, eignet es sich zur Therapie chronischer und infizierter Wunden. Auch antibiotika-resistente Keime, wie der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) konnten in kolonisierten Wunden mittels der Behandlung mit NIPP inaktiviert werden (Mohd Nasir et al., 2016). Erst kürzlich wurde die erste S2k-Leitlinie zum therapeutischen Einsatz von physikalischem Plasma veröffentlicht (Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 2022). Neben der Anwendung an Patienten eignet es sich zur Sterilisation hitzesensibler Medizinprodukte und wird auch industriell bereits eingesetzt (Kramer et al., 2015).

Seit einigen Jahren zeigen vielversprechende Forschungsergebnisse ein weiteres potenzielles Anwendungsgebiet von NIPP in der Therapie maligner Tumoren auf. Es konnte nachgewiesen werden, dass NIPP proliferationshemmend auf verschiedene Tumorzellen wirkt (Reiazi et al., 2017; Yan et al., 2016). Eine Wirkung von NIPP wurde unter anderem bereits für Prostatakarzinom-, Pankreaskarzinom- und Lungenkarzinomzellen sowie für skelettale Sarkomzellen und Glioblastomzellen gezeigt (Jacoby et al., 2020; Kim et al., 2011; Köritzer et al., 2013; van Loenhout et al., 2019; Weiss et al., 2015). NIPP scheint in Tumorzellen DNA-Schäden und Dysfunktionen der Zytoplasmamembran zu induzieren und kann die Migrationsfähigkeit dieser Zellen reduzieren (Haralambiev et al., 2020b; Semmler et al., 2020). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass NIPP die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika erhöhen kann (Yan et al., 2016). Beispielsweise führte eine NIPP-Behandlung von Temozolomid-resistenten Glioblastomzellen zu einem erneuten Ansprechen auf Temozolomid (Köritzer et al., 2013). Nitsch et al. konnten weiterhin zeigen, dass eine Kombination aus NIPP und Doxorubicin oder Vincristin im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit diesen Zytostatika die Zellproliferation und Viabilität von Ewing-Sarkom-Zellen reduzieren kann (Nitsch et al., 2023). Zudem gibt es bereits erste Hinweise darauf, dass Tumor-Immuntherapien wie die CAR-T-Zell Therapie durch eine Modulation mit NIPP effektiver werden könnten (Dai et al., 2022; Förster et al., 2023). Von besonderem Interesse hinsichtlich einer möglichen zukünftigen Tumorthherapie mit NIPP sind die Möglichkeit einer gezielten lokalen Anwendung sowie Hinweise darauf, dass NIPP eine Selektivität gegenüber Tumorzellen aufzuweisen scheint und gesunde Zellen weitaus weniger schädigen könnte als die Tumorzellen (Yan et al., 2016).

Dennoch steht die Forschung zu einem möglichen Einsatz der physikalischen Plasmamedizin im Rahmen von onkologischen Therapiekonzepten erst ganz am Anfang, sodass weitere Ergebnisse in *in vitro* und *in vivo* Modellen von besonderem Interesse sind.

1.3 Die Zytoplasmamembran eukaryotischer Zellen

Die Zytoplasmamembran bildet eine Barriere zwischen dem Intra- und dem Extrazellulärraum, weist jedoch eine Permeabilität für bestimmte Substanzen auf und beeinflusst damit den Umfang des Stoffaustausches der Zelle mit der Umgebung (Korbmacher und Brenner, 2014).

Sie besteht einerseits aus Glycerophospholipiden, Sphingolipiden und Cholesterol, die sich in Form einer Lipiddoppelschicht organisieren und andererseits aus Membranproteinen. Dabei befinden sich die polaren Anteile der Lipide in Kontakt mit den umgebenden wässrigen Lösungen, während die apolaren Kohlenwasserstoffreste der Lipide in die hydrophobe Mitte der Zellmembran ragen (Escribá und Nicolson, 2014; Korbmacher und Brenner, 2014; Singer und Nicolson, 1972; Yang und Hinner, 2015). Die Komponenten der Zytoplasmamembran sind im Sinne des Flüssig-Mosaik-Modells entlang der Membran frei beweglich (Goñi, 2014; Singer und Nicolson, 1972).

Kleine Moleküle können die Plasmamembran durch Diffusion passiv überqueren. Neben der Größe spielt dabei die Ladung des Moleküls eine entscheidende Rolle. Apolare Gase wie Sauerstoff (O₂), Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Stickstoff (N₂) können einfach über die Membran diffundieren. Dagegen erfolgt der Transport von Ionen und größeren Verbindungen, wie Zuckern, Aminosäuren und Peptiden mithilfe von Membrantransportproteinen. Dazu zählen u.a. verschiedene Ionenkanäle, die zur elektrischen Leitfähigkeit der Zytoplasmamembran beitragen sowie Aquaporine und Glucose Transporter (GLUT) (Korbmacher und Brenner, 2014; Yang und Hinner, 2015). Transportproteine, welche Ionen unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) über die Membran transportieren, werden auch als Ionenpumpen bezeichnet. Hierzu zählt die Na⁺/K⁺-ATPase, welche durch den Transport von 2 K⁺ in den Intrazellulärraum und 3 Na⁺ aus der Zelle heraus, einen Konzentrationsgradienten für K⁺ über der Membran hervorruft. Dies spielt eine Rolle für das Ruhemembranpotenzial einer Zelle (Korbmacher und Brenner, 2014).

In der Tumorthherapie sind sogenannte Multidrug-Resistance-Proteine (MRP) von Relevanz. Dabei handelt es sich um Membranproteine, die zur Familie der ATP-Binding-Cassette (ABC)-Transporter gehören. Sie sind in der Lage, endogene Verbindungen aber auch exogene Substanzen wie Zytostatika aus Tumorzellen zu transportieren. Auf diese Weise können sie zur Bildung von Resistenzen und zum Nicht-Ansprechen eines Tumors auf eine Chemotherapie beitragen (Chen und Tiwari, 2011).

1.4 Apoptose

Unter Apoptose wird der programmierte Zelltod verstanden. Im Gegensatz zur Nekrose, welche die Antwort auf eine externe irreversible Zellschädigung darstellt und eine Entzündungsreaktion nach sich zieht, kommt es bei der Apoptose zu einem kontrollierten Absterben der Zelle. Dieser Prozess ist physiologisch, kann intrinsisch oder extrinsisch in Gang gesetzt werden und führt zu einer Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins und zum Abbau der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Dabei entstehen Apoptosekörperchen, welche im Anschluss von Makrophagen phagozytiert werden (Elmore, 2007; Heinrich et al., 2014; Xu et al., 2019). Die Apoptose hat eine wichtige Bedeutung für die Entwicklung und Alterung von Zellpopulationen. Zudem gewährleistet sie die Homöostase der Zellzahl in Geweben und kann geschädigte und infizierte Zellen eliminieren (Elmore, 2007; Zhou et al., 2017).

Die Induktion von Apoptose kann mittels verschiedener Signalkaskaden erfolgen. Dazu zählen insbesondere der intrinsische und der extrinsische Signalweg, die in einer gemeinsamen Endstrecke zur Aktivierung von Effektor-Caspasen führen, welche letztendlich durch proteolytische Spaltung den Zelltod herbeiführen (Heinrich et al., 2014).

Die intrinsische Signalkaskade der Apoptose gilt auch als ein mitochondrialer Signalweg (D'Arcy, 2019). Die Regulation erfolgt durch die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x und Bcl-w sowie die pro-apoptotischen Proteine Bax, Bak und Bid (Cory und Adams, 2002). Verschiedene Stimuli wie oxidativer Stress, Hypoxie oder das Fehlen von Wachstumsfaktoren können die Bildung von mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren und Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials herbeiführen. Daraufhin werden die pro-apoptotischen Proteine Cytochrom c, Smac/Diablo und HtrA2/Omi in das

Zytoplasma freigesetzt (D'Arcy, 2019). Cytochrom c bindet an den monomeren Apoptotic Protease Activating Factor 1 (Apaf-1), was zur Konformationsänderung und Bildung eines Multimer-Komplexes, des sogenannten Apoptosoms führt (Zou et al., 1999). Procaspase 9 bindet an das Apoptosom, wodurch die Initiator-Caspase 9 aktiviert wird und wiederum die Effektor-Caspasen 3 und 7 aktivieren kann (Cain et al., 2002).

Der extrinsische Signalweg wird rezeptorvermittelt aktiviert. Dabei binden Liganden an Todesrezeptoren in der Zytoplasmamembran (D'Arcy, 2019). Diese Rezeptoren zählen zur Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-(TNFR)-Superfamilie. Wichtige Vertreter dieser Rezeptoren sind Fas, TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptors (TRAIL-Rezeptoren) und TNFR-1 (Bossen et al., 2006; D'Arcy, 2019). Bei Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor werden Adaptermoleküle an den Rezeptor gebunden. Dabei handelt es sich um Fas-Associated Death Domain (FADD)-Proteine. So entsteht ein Proteinkomplex, der auch als Death-Inducing Signal Complex (DISC) bezeichnet wird und Procaspase 8 binden kann. Es folgt eine Spaltung zu Caspase 8, welche zu den Initiator-Caspasen zählt und eine Aktivierung der Effektor-Caspasen vermitteln kann (D'Arcy, 2019).

Die Effektor-Caspasen rufen durch ihre proteolytische Aktivität und die Vermittlung der Fragmentierung der DNA schlussendlich den Zelltod hervor (Cohen, 1997; Enari et al., 1998).

1.5 Zielsetzung

Resistenzen gegenüber Zytostatika oder Hormonmodulatoren (Murray et al., 2012; Osborne und Schiff, 2011), starke Nebenwirkungen (Gherzi et al., 2015; Lorzio et al., 2012) und mangelnde Therapieoptionen bei fortgeschrittenen Tumorleiden, beispielsweise bei Auftreten einer Peritonealkarzinose (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022a; Lengyel, 2010; Pascual-Antón et al., 2021) sind häufige Behandlungslimitationen und erfordern neue Ansätze in der Therapie gynäkologischer Krebserkrankungen. Dies macht Forschungsarbeiten zu alternativen Therapiemethoden dringend notwendig.

Vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der proliferationshemmenden Wirkung von NIPP auf Tumorzellen haben in den letzten Jahren zu einem steigenden wissenschaftlichen Interesse an NIPP geführt. So könnte NIPP in Zukunft möglicherweise in der Tumorthherapie zum Einsatz kommen (Yan et al., 2016). Vorarbeiten konnten bereits zeigen, dass der wachstumshemmende Effekt von NIPP auch auf gynäkologische Tumorzellen zutrifft (Koensgen et al., 2017; Wang et al., 2013).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung tumorbiologisch relevanter Zellantworten von Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinom-Zellen sowie uterinen Leiomyosarkom-Zellen auf eine Behandlung mit NIPP. Im Mittelpunkt der Analysen standen dabei folgende Fragestellungen:

- Kann ein wachstumshemmender Einfluss von NIPP auf die Tumorzellen bestätigt werden?
- Führt eine Behandlung mit NIPP zur Schädigung der Zytoplasmamembran?
- Erfolgt eine Induktion von Apoptose nach Behandlung der Tumorzellen mit NIPP?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Bei der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 handelt es sich um Zellen eines Adenokarzinoms einer 69-jährigen Frau. Diese wurden aus einem malignen Pleuraerguss gewonnen. Der Tumor ist Östrogen-Rezeptor-positiv und exprimiert das Onkogen *Wnt 7B* (Comşa et al., 2015; Huguet et al., 1994). Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde ebenfalls aus einem Pleuraerguss einer 51-jährigen Patientin mit Adenokarzinom der Mamma isoliert. Auch für diese Zelllinie konnte die Expression von *Wnt 7B* nachgewiesen werden (Huguet et al., 1994). Sie kennzeichnet sich des Weiteren durch die Expression des *Epidermal Growth Factor (EGF)*-Rezeptors sowie des Rezeptors für den *Transforming Growth Factor alpha (TGF- α)* (American Type Culture Collection, 2024). Beide Zelllinien werden im NCI-60-Zelllinienpanel des National Cancer Institute (NCI) geführt (National Cancer Institute, 2015).

Für die Untersuchung von Ovarialkarzinom-Zellen wurden die Zelllinien OVCAR-3 und SK-OV-3 eingesetzt. Die Zelllinie OVCAR-3 wurde aus dem malignen Aszites einer 60-jährigen Frau isoliert und dient als Modell für Adenokarzinome des Ovars. Der Tumor exprimiert Androgen-, Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren (Cytion, 2024a; Hamilton et al., 1983). Die Zelllinie SK-OV-3 wurde aus der Aszitesflüssigkeit einer 64-jährigen Frau, die ebenfalls an einem Adenokarzinom des Ovars erkrankt war, isoliert (Cytion, 2024b). Die Zelllinien wurden ebenfalls in das NCI-60-Panel aufgenommen (National Cancer Institute, 2015).

Als Modell für ein Adenokarzinom des Endometriums (Grad 2) wurde in dieser Arbeit die Zelllinie MFE-296 eingesetzt. Diese stammt aus dem Tumor einer 68-jährigen Frau und exprimiert Androgen-Rezeptoren (Hackenberg et al., 1997).

Ebenfalls untersucht wurde die Zelllinie SK-UT-1, welche aus dem Uterus einer 75 Jahre alten Frau isoliert wurde. Dabei handelt es sich um Zellen eines Leiomyosarkoms (Grad 3) (Cytion, 2024c).

In der folgenden Tabelle (Tab. 1) sind die verwendeten Zelllinien und deren Bezugsquellen aufgeführt.

Tab. 1: Bezugsquellen der Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
MCF- 7	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
MDA-MB-231	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
OVCAR-3	CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Deutschland)
SK-OV-3	CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Deutschland)
MFE-296	Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Braunschweig, Deutschland)
SK-UT-1	CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Deutschland)

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Absaugsystem Integra Vacusip	Integra Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Analog Vortex Mixer	VWR™ (Radnor, USA)
Autoklav VX-150	Systemec GmbH (Linden, Deutschland)
BD FACS canto™	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)
Becherglas 50 ml	Technische Glaswerke Ilmenau (Ilmenau, Deutschland)
CASYcups	OMNI Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland)

CASY Model TT Cell Counter and Analyzer	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Deckgläser 24 x 40 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Laude-Königshofen, Deutschland)
Erlenmeyer-Kolben Simax® 2000 ml	Kavalierglass, a.s. (Sázava, Tschechische Republik)
Feinwaage ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)
Flockeneisbereiter RF 0399 A	Manitowoc Ice (Manitowoc, USA)
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence Corporation (Osaka, Japan)

Gestelle und Racks

Röhrchen-Gestell 4 x 4	Thermo Scientific Nalgene Labware (Waltham, USA)
neoRack® Röhrchen-Gestell 9 x 9	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
neoLab Top-Rack für 80 Reaktionsgefäße	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Glaspasteurpipette

Handtuchpapier Zick-Zack	VWR (Radnor, USA)
Indikatorband für Dampfsterilisation	Heemann OHG (Falkensee, Deutschland)
Inkubationsbad 1003	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)

Inkubationsschränke

CO ₂ Inkubator MCO-18 AIC	Sanyo (Moriguchi, Japan)
Heracell™ VIOS 160i CO ₂ Inkubator	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)

kINPen® Med Plasmajet

	neoplas tools GmbH i.G. (Greifswald, Deutschland)
Kryo-Röhrchen CRYO.S™	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)

Kryo-Aufbewahrungsbox mit Deckel	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
----------------------------------	----------------------------------

Kühlsysteme

4° C Kühlschrank Medline	Liebherr (Bulle, Schweiz)
--------------------------	---------------------------

-20° C Gefrierschrank Comfort NoFrost	Liebherr (Bulle, Schweiz)
---------------------------------------	---------------------------

-30° C Gefrierschrank Biomedical Freezer MDF-U333	Sanyo (Moriguchi, Japan)
--	--------------------------

-80° C Gefrierschrank Ultralow Temperature Freezer MDF-U53V	Sanyo (Moriguchi, Japan)
--	--------------------------

Kryobehälter Arpege 40	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
------------------------	---

Laborglasflaschen Duran 200 ml 500 ml	DWK Life Sciences GmbH (Wert- heim, Deutschland)
---	---

Laborglasfalsche Simax® 2000 ml	Kavalierglass, a.s. (Sázava, Tsche- chische Republik)
---------------------------------	--

Laborspüler G7883 CD	Miele Deutschland (Gütersloh, Deutschland)
----------------------	---

Lagerbehälter ARPEGE 40	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
-------------------------	---

Membran-Vakuumpumpe	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
---------------------	---

Messzylinder 1000 ml	ISOLAB Laborgeräte GmbH (Es- chau, Deutschland)
----------------------	--

Mikroskop Nikon TMS	Nikon Instruments (Düsseldorf, Deutschland)
---------------------	--

Mikrotiter-Platte 96-Well mit U-Boden	Eppendorf™ AG (Hamburg, Deutschland)
---------------------------------------	---

Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
-----------------------------	---

Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik (Lancing, Großbri- tannien)
---------------------	--

Pinzette	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
----------	--

Pipetten 0,5 – 10 µl 10 – 100 µl 20 – 200 µl 100 – 1000 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
<hr/>	
Pipettenspitzen	
SurPhob Spitzen 10 µl, extra lang	Biozym Scientific GmbH (Hessisch-Oldendorf, Deutschland)
Spitzen 10 µl	VWR (Radnor, USA)
Spitzen 200 µl	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Spitzen 1250 µl	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
<hr/>	
Stegeinsatz für Kryoboxen	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
<hr/>	
Reagiergefäße	
1,5 ml 1,0 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
5,0 ml	Eppendorf™ AG (Hamburg, Deutschland)
<hr/>	
Röhrchen	
15 ml 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Rundbodenröhrchen 5 ml	Corning Life Sciences (High Wycombe, USA)
<hr/>	
Rotilabo®-Signal-Timer	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
<hr/>	
Schutzhandschuhe	
Peha-soft nitrile	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
Nitrile Risk-CHEMO-protectLAB	Hansa-Trading HTH GmbH & Co. KG (Hamburg, Deutschland)
<hr/>	

Serologische Pipetten 5 ml 10 ml 25 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Sicherheitswerkbank HERAsafe KS9	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Sicherheitswerkbank Safeflow 1.2	Bioair® S.p.A. (Siziano, Italien)
TC-Flasche T25 T75	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
TC-Platte 24-Well 96-Well	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
TC-Schale 60	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
TECAN infinite M200pro	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
Thermo-Shaker PHMT Grant-bio	Boekel Scientific (Feasterville, USA)
Tischabzug Scala	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG (Wangen, Deutschland)
Vacuum Aspiration System AZ02	Ditabis (Pforzheim, Deutschland)
Vernichtungsbeutel mit Tischständer	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

Tab. 3: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
2-Propanol \geq 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Aceton \geq 99,7 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
4' 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1 mg/ml	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol 96 Vol. %, vergällt mit Methylethylketon	Walter CMP GmbH & Co. KG (Kiel, Deutschland)
Fluorescein Diacetate (FDA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fluorescein isothiocyanate-dextran	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol \geq 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure, rauchend 37 %	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Staurosporine	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Tween®20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.1.4 Gase

Tab. 4: Gase

Gase	Hersteller
Argon	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Kohlenstoffdioxid	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

2.1.5 Kommerzielle Puffer und Lösungen

Tab. 5: Kommerzielle Puffer und Lösungen

Puffer / Lösungen	Hersteller
10 x Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
CASY blue	OMNI Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland)
CASY clean	OMNI Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland)
CASY ton	OMNI Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland)
DPBS + Ca ²⁺ + Mg ²⁺	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
DPBS	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Wasserstoffperoxidlösung 30 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.6 Kits und Reagenzien

Tab. 6: Kits und Reagenzien

Kits / Reagenzien	Hersteller
CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay Cell Titer-Glo® 2.0 Reagent	Promega Corporation (Madison, USA)
TiterTACS™ In Situ Apoptosis Detection Kit 10 x TdT Labeling Buffer 10 x TdT Stop Buffer 50 x Manganese Cation Blue Strep-HRP Diluent Cytonin™ Strep-HRP TACS-Nuclease™ TACS-Nuclease™ Buffer TACS-Sapphire™ TdT dNTP Mix TdT Enzyme	Trevigen® (Maryland, USA)

2.1.7 Zellkulturmedien und -zusätze

Tab. 7: Zellkulturmedien und -zusätze

Produkt	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nährstoffmischung F-12 (DMEM / F12) 1:1	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Medium 199 Earle's	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
RPMI 1640 Medium	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Fetal Bovine Serum (FBS) Standard	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Gentamycin-ratiopharm® 80 mg / 2 ml SF	ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)
Insulin human Actrapid® Penfill® 100 I.E. / ml Injektionslösung	Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Dänemark)
Insulin-Transferrin-Selenium 100 x	Life Technologies Corporation (Grand Island, USA)
Trypsin / EDTA Solution 10 x	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)

2.1.8 Software

Tab. 8: Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva Software Version 8.0.1	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)
BZ-II Analyzer 1.0	Keyence Corporation (Osaka, Japan)
BZ-II Viewer	Keyence Corporation (Osaka, Japan)
Citavi 6	QSR International (Burlington, USA)
FlowJo Software Version 10	Tree Star Inc (Ashland, USA)
GraphPad Prism 9	GraphPad Software (San Diego, USA)
i-control™ 2.0 (for infinite reader)	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
Microsoft (365) Office Version 2303	Microsoft Corporation (Redmond, USA)

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte mittels Kryokonservierung. Um die Zellen für Versuche nutzen zu können, wurden sie entsprechend aufgetaut. Dafür wurde zunächst zelllinienspezifisches Nährmedium auf 37° C erwärmt. Die Kryovate wurden für 30 s in einem Wasserbad (37° C) erwärmt und anschließend mit 10 ml warmen Mediums resuspendiert. Die Suspension wurde für 5 min bei 300 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die sedimentierten Zellen in 1 ml Medium suspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine mit 10 ml Medium gefüllte T75-Kultivierungsflasche gegeben. Die Zellen wurden in einem Inkubationsschrank bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert.

Für das Einfrieren wurden die Zellen nach Entfernung des Nährmediums mit 3 ml DPBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 1xTrypsin versetzt, um sie vom Flaschenboden abzulösen. Es folgte eine Inkubation für ca. 5 min bei 37° C. Der Flaschenboden wurde mit 10 ml einer Lösung aus 90 % DPBS und 10 % FBS gespült und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Bei 300 rcf wurden die Zellen für 5 min zentrifugiert, so dass sich ein Zellpellet am Boden des Röhrchens bildete. Dieses wurde mit 3 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. 10 µl der Suspension wurden dafür mit 90 µl DPBS verdünnt und wiederum 10 µl davon in die Zählkammer pipettiert. In allen vier Quadranten wurden die Zellen ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter konnte anschließend mit der Formel

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4 \times 10^5}$$

berechnet werden. Die Suspension zum Einfrieren wurde daraufhin so hergestellt, dass pro Milliliter 3 Millionen Zellen eingefroren wurden. Das Einfrier-Medium enthielt 5 % DMSO. Die Suspension wurde in Kryo-Röhrchen überführt und zunächst für 24 h in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80° C gelagert. Auf diese Art und Weise konnte gewährleistet werden, dass die Temperatur langsam mit -1° C pro Minute sinkt. Nach 24 h konnten die Kryo-Röhrchen in einen Flüssigstickstoff-Lagerbehälter überführt werden.

2.2.2 Kultivieren und Passagieren der Zellen

Die Kultivierung der Karzinomzellen erfolgte in Kultivierungsflaschen, welche spezifisch für die einzelnen Zelllinien angesetzte Nährmedien enthielten (Tab. 9). Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37° C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert. Die Inkubation erfolgte für drei bis vier Tage. Währenddessen erfolgten regelmäßige lichtmikroskopische Kontrollen hinsichtlich der Morphologie und des Wachstums. Bei Erreichen einer Konfluenz von mindestens 90 % wurden die Zellen umgesetzt. Dafür wurde das Nährmedium aus der Kultivierungsflasche abgesaugt und die Zellen am Flaschenboden anschließend mit 3 ml DPBS gewaschen, welches im Anschluss ebenfalls wieder entfernt wurde. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurden 2 ml 1xTrypsin in die Flasche gegeben und die Flasche für 5 min bei 37° C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden 10 ml einer Lösung aus 90 % DPBS und 10 % FBS in

die Flasche gegeben. Mit dieser Lösung wurde der Boden der Flasche einige Male mittels einer Pipettierhilfe und einer serologischen Pipette gespült, um weitere Zellen abzulösen und das Trypsin zu verdünnen, wodurch die Enzymreaktion gestoppt wurde. Es folgte die Überführung der so entstandenen Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen und die Zentrifugation bei 300 rcf für 5 min. Dies führte zum Absetzen eines Zellpellets am Boden des Röhrchens. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgesaugt und das Pellet mit 1 ml des entsprechenden zelllinienspezifischen Mediums resuspendiert. Die Zusammensetzungen der Nährmedien sowie die Umsetzungsverhältnisse für drei bzw. vier Tage Inkubation sind in Tab. 9 aufgeführt. Das errechnete Volumen wurde anschließend in eine mit 10 ml Nährmedium gefüllte T75-Kultivierungsflasche gegeben, mittels achtförmiger Bewegungen am Flaschenboden verteilt und für drei bis vier Tage inkubiert.

Tab. 9: Übersicht der Zusammensetzung der Vollmedien und Umsetzungsverhältnisse

Zelllinie	Zusammensetzung des Vollmediums	Verhältnis für 3 Tage	Verhältnis für 4 Tage
MCF-7	DMEM / F12 10 % FBS 0,125 % Gentamycin	1:3	1:4
MDA-MB-231	DMEM / F12 10 % FBS 0,125 % Gentamycin	1:3	1:4
OVCAR-3	RPMI 1640 Medium 10 % FBS 0,125 % Gentamycin 0,1 % Insulin	1:3	1:5
SK-OV-3	DMEM / F12 5 % FBS 0,125 % Gentamycin	1:3	1:5
MFE-296	RPMI 1640 Medium + Medium 199 Earle's (1:1) 20 % bei 56°C hitzeinaktiviertes FBS 1 % Insulin-Transferrin-Selenium 0,125 % Gentamycin	1:10	1:12
SK-UT-1	DMEM / F12 10 % FBS 0,125 % Gentamycin	1:10	1:12

2.2.3 Wachstumskinetik nach Behandlung mit NIPP

Für die Erstellung der Wachstumskinetiken nach direkter NIPP-Behandlung wurden die Zellen in 24-Well-Platten ausgesät. Für die Aussaat wurden die Zellen zunächst analog zum Umsetzen bei mindestens 90 % Konfluenz in der Kultivierungsflasche mit DPBS gewaschen und mit Trypsin versetzt und zentrifugiert. Nach Verwerfen des zellfreien Überstandes wurde das Zellpellet mit 1 ml Medium resuspendiert. Danach erfolgte eine Verdünnung mit 3 bzw. 6 ml Medium und die Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter mithilfe

des CASY TT Cell Counters and Analyzers. 100 µl der Suspension wurden in 10 ml CASY ton verdünnt, in einem CASY cup dreimal invertiert und anschließend durch dreimaliges Ansaugen einer Kapillare die Anzahl an Zellen / ml gemessen.

In vorangegangenen Arbeiten wurde zelllinienspezifisch ermittelt, welche Anzahl an Zellen zu Beginn pro Well ausgesät werden mussten, um während einer 120-stündigen Inkubationszeit ein exponentielles Wachstum der Zellen zu erreichen. Für die Zelllinien MDA-MB-232, OVCAR-3 und SK-OV-3 lag die initiale Zellzahl pro Well jeweils bei 3×10^4 , für MCF-7 bei $4,5 \times 10^4$, für SK-UT-1 bei 1×10^4 und für MFE-296 bei 2×10^4 . Es wurden 200 µl Zellsuspension in jedes Well pipettiert.

Daraufhin erfolgte die Behandlung der Zellen mit NIPP in der 24-Well-Platte. Dafür wurde der Atmosphärendruck-Plasmajet kINPen® Med verwendet. Kontrollzellen wurde mit Argon behandelt, um Interaktionen der Zellen mit dem Trägergas auszuschließen. Für die Behandlung wurde die 24-Well-Platte in einem Winkel von ca. 60 bis 70° zum Untergrund gehalten, sodass sich die Flüssigkeit in der unteren Hälfte des Wells sammelte. Der Plasmajet wurde am Rand jedes Wells halbkreisförmig für die in Vorarbeiten definierte Behandlungsdauer bewegt. Diese lag für MCF-7 und MDA-MB-231 bei 20 s und für OVCAR-3, SK-OV-3, MFE-296 und SK-UT-1 bei 10 s. Es wurde mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 3 l Argon pro Minute gearbeitet.

Im Anschluss an die Behandlung wurde die Zellsuspension aus der ursprünglich verwendeten Platte in eine neue 24-Well-Platte überführt, um auszuschließen, dass NIPP Veränderungen am Kunststoff der Platte hervorruft, was Wachstumseigenschaften der Zellen beeinflussen könnte. Jedes Well der ersten Platte wurde anschließend mit 800 µl Medium gespült, um möglicherweise weitere im Well hängen gebliebene Zellen zu erfassen und danach ebenfalls in das entsprechende Well der zweiten Platte gegeben.

Diese 24-Well-Platte wurde für 120 h inkubiert. Zu den Zeitpunkten $t_1 = 4$ h, $t_2 = 24$ h, $t_3 = 48$ h, $t_4 = 72$ h, $t_5 = 96$ h und $t_6 = 120$ h wurden die Zellen vom Boden eines der Wells geerntet, sodass die Zellzahl bestimmt werden konnte. Dafür wurde das Medium zunächst entfernt und die Zellen mit 500 µl 1xDPBS gewaschen. Das DPBS wurde abgesaugt und anschließend wurden 200 µl 1xTrypsin in das Well pipettiert. Die 24-Well-Platte wurde für 1 - 2 min bei 37° C inkubiert, um die Zellen vom Boden zu lösen. Um möglichst alle Zellen

lösen zu können, wurde der Boden mehrmals mit dem Trypsin und nach Überführung in ein Reaktionsgefäß außerdem mit 800 µl DPBS gespült, was anschließend ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben wurde. Es erfolgte ein mehrmaliges Resuspendieren.

2.2.4 Zellzahlbestimmung

Um die Anzahl an Zellen in jedem Well zu bestimmen, wurde der CASY TT Cell Counter and Analyzer (Roche Diagnostics) verwendet. Dieser ist in der Lage die elektrische Leitfähigkeit zwischen 2 Elektroden zu messen. Eine Zelle kann, abhängig von ihrem Volumen, den Widerstand zwischen den Messelektroden verändern. Durch Unterschiede im elektrischen Widerstand kann außerdem zwischen vitalen und toten Zellen sowie Zelldebris differenziert werden. Zudem können Zellaggregate detektiert werden und die darin enthaltenen Zellen dennoch korrekt in die Zellzahlberechnung einbezogen werden (OMNI Life Science, 2024). Aufgrund der sich unterscheidenden Größen der Zellen der sechs untersuchten Zelllinien, wurden die Grenzen für jede Zelllinie individuell eingemessen. Diese sind in Tab. 10 aufgeführt. Der Auswertungscursor gibt die Grenze zwischen den vitalen und den toten Zellen an, während der Normalisierungscursor Debris von toten Zellen abgrenzt.

Aus dem Reaktionsgefäß wurden 100 µl der Probe entnommen und in einem CASY-Cup mit 10 ml 1xCasy-Ton verdünnt und dreimal invertiert. Nach dreimaligem Ansaugen der Suspension durch eine Kapillare wurde die Zellzahl pro Milliliter sowie die Vitalität der Zellen in % berechnet.

Tab. 10: Messparameter für die Zellzahlbestimmung mittels CASY TT 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
OVCAR-3	60	15,75	9,00
SK-OV-3	50	15,13	7,00
MFE-296	50	12,38	7,38
SK-UT-1	50	12,63	6,38

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Farbstoff-Aufnahme-Assay

Zur Analyse der Auswirkungen von NIPP auf die Membranpermeabilität und -funktionalität der Tumorzellen wurden die Zellen mit zwei unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen (Tab.11) angefärbt und anschließend im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Der membrangängige Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wurde dabei für die Färbung der Zellkerne verwendet. So ließen sich die Zellen grundsätzlich sichtbar machen. Bei dem zweiten Farbstoff handelte es sich um Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran). Dieses ist normalerweise nicht membrangängig. Lediglich Zellen, welche Membranschäden aufwiesen, konnten somit diesen Farbstoff aufnehmen.

Tab. 11: Konzentrationen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Konzentration
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gelöst in DPBS	1 µg/ml
Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) gelöst in Aqua demin.	30 mg/ml

Die Zellen wurden 24 h vor der Untersuchung im Mikroskop auf gereinigte Deckgläschen der Größe 24 x 36 mm ausgesät. Nach Waschen mit DPBS, Trypsin-Verdauung und Zentrifugieren der Zellen bei 300 rcf für 5 min, wurde das Zellpellet mit 1 ml zelllinienspezifischen Mediums resuspendiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte je nach Zelllinie in unterschiedlichen Verhältnissen (Tab. 12).

Diese Deckgläschen wurden in TC 60-Schalen, welche mit 3 ml Medium gefüllt waren, für 24 h bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wuchsen auf den Deckgläschen an. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Behandlung mit NIPP, das Anfärben der Zellen sowie die Mikroskopie. Dafür wurde das Deckgläschen zunächst aus der Schale entnommen und mit DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte in einer neuen TC-60 Schale die Behandlung mit NIPP. Dabei wurden die Zellen mit 2 ml DPBS bedeckt, um ein Austrocknen während der Behandlung zu verhindern. Kontrollzellen wurden mit Argon behandelt. Für jede Zelllinie wurden zwei unterschiedliche Behandlungszeiten festgelegt (Tab. 12).

Tab. 12: Übersicht der NIPP-Behandlungszeiten und Aussaat für den Farbstoff-Aufnahme-Assay

Zelllinie	Verhältnis bei Aussaat	NIPP-Behandlungszeiten
MCF-7	1:20	20 s; 60 s
MDA-MB-231	1:20	20 s; 60 s
OVCAR-3	1:20	20 s; 60 s
SK-OV-3	1:20	20 s; 60 s
MFE-296	1:40	10 s; 30 s
SK-UT-1	1:50	10 s; 30 s

Für die Behandlung wurde der Plasmajet in schleifenförmigen Bewegungen über das Deckgläschen geführt. Unmittelbar im Anschluss an die Behandlung wurden 10 µl FITC-Dextran-Lösung und 100 µl DAPI-Lösung auf das Deckgläschen gegeben und die Schale für 1 min bei Raumtemperatur geschwenkt, sodass die Farbstoffe sich gleichmäßig verteilen konnten. Nach einer Inkubationszeit von einer weiteren Minute wurde das Deckgläschen aus der Schale entfernt und in drei aufeinanderfolgenden Waschschritten mit

DPBS gereinigt, sodass überschüssiger Farbstoff entfernt wurde. Es folgte die Fluoreszenzmikroskopie jeweils im DAPI- und GFP-Kanal. Die zelllinienspezifischen Belichtungszeiten in den beiden verwendeten Kanälen können Tab. 13 entnommen werden.

Tab. 13: Übersicht der Belichtungszeiten für den Farbstoff-Aufnahme-Assay

Zelllinie	Belichtungszeit DAPI-Kanal [s]	Belichtungszeit GFP-Kanal [s]
MCF-7	0,5	0,5
MDA-MB-231	0,5	0,667
OVCAR-3	0,5	0,5
SK-OV-3	0,5	0,667
MFE-296	0,33	0,5
SK-UT-1	0,5	0,5

Die Aufnahmen aus den beiden Kanälen wurden mithilfe der zugehörigen Software in einem Overlay zusammengefügt, sodass ein Bild entstand, welches sowohl den durch DAPI blau gefärbten Zellkern als auch gegebenenfalls das durch FITC-Dextran grün gefärbte Zytoplasma zeigte.

Für die Auswertung wurde die Anzahl an Zellen im gewählten Bildausschnitt bestimmt, die Gesamtfläche an grünem Signal in diesem Bereich ermittelt und die Fläche des grünen Signals pro Zelle berechnet. So konnten Vergleiche zwischen NIPP- und Argon-behandelten Zellen hergestellt werden. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede geprüft.

2.3.2 Farbstoff-Verlust-Assay

Die Wirkung von NIPP auf die Membranpermeabilität der Tumorzellen wurde zudem mittels Farbstoff-Verlust-Assay untersucht. Dabei wurde der membrangängige Farbstoff Fluorescein Diacetat (FDA) zur Fluoreszenzfärbung der Zellen verwendet. Der Acetylrest des

FDA wird intrazellulär durch Esterasen abgespalten, was dazu führt, dass das Molekül die Zellmembran im Anschluss nicht mehr passieren kann. Bei intakter Membran reichert sich der Farbstoff somit im Zytoplasma an (Cao et al., 2015). Wird die Membranpermeabilität jedoch durch die Wirkung von NIPP beeinträchtigt, kann das Molekül das Zytoplasma der Zelle verlassen, sodass die Zelle weniger fluoresziert.

FDA wurde in Aceton gelöst (10 mg/ml) und bei Dunkelheit und -20°C gelagert. Um außerdem tote Zellen im Durchflusszytometer identifizieren zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr) der Konzentration 10 mg/ml verwendet. Aus den beiden Farbstoffen wurde eine Gebrauchslösung hergestellt (Tab. 14).

Tab. 14: Farbstoff-Gebrauchslösung für den Farbstoff-Verlust-Assay

Farbstoff	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Fluorescein Diacetat (FDA)	10
Ethidiumbromid (EtBr)	60

Der Farbstoff wurde während des Versuchs vor Licht geschützt aufbewahrt. Jeweils 200 μl Farbstoff-Gebrauchslösung wurden in Rundbodenröhrchen vorgelegt. Die Zellen wurden aus den Kultivierungsflaschen mithilfe von Trypsin geerntet und das nach dem Zentrifugieren entstandene Zellpellet mit 1 ml DPBS resuspendiert. Dazu wurden weitere 3 ml DPBS gegeben. Anschließend erfolgte die Behandlung von 250 μl Zellsuspension mit NIPP in einer 24-Well-Platte. Die Behandlungszeiten wurden analog zum Farbstoff-Aufnahme-Assay gewählt. Im Anschluss wurden 200 μl der behandelten Zellsuspension in die Rundbodenröhrchen mit dem Farbstoff überführt. Vor Licht geschützt folgte eine Inkubation für 15 min auf Eis. Anschließend wurden 2 ml DPBS pro Röhrchen hinzugefügt und die Röhrchen bei 300 rcf und 4°C für 5 min zentrifugiert. Ein Großteil des Überstands wurde abgesaugt, sodass sich lediglich ein ca. 1 cm hoher Flüssigkeitsspiegel am Boden des Röhrchens befand. Vor jeder Messung im Durchflusszytometer wurden die Proben in einem Vortexmixer gemischt. Bei einer mittleren Flussrate wurden die lebenden Singuleten in der Probe gemessen. Die Anzahl zu registrierender Events wurde dabei auf 10.000 festgelegt.

Mithilfe der Software FlowJo erfolgte anschließend das Gating. Dafür wurde im ersten Gating-Schritt zunächst die Zellpopulation definiert und Debris ausgeschlossen. Im Anschluss gelang durch die Analyse der Vorwärts- und Seitenstreuungsparameter die Identifikation von Zelldoubletten. Diese wurden ebenfalls ausgeschlossen. Lebende Zellen wurden als FDA-positive und Ethidiumbromid-negative Events determiniert (Abb. 1).

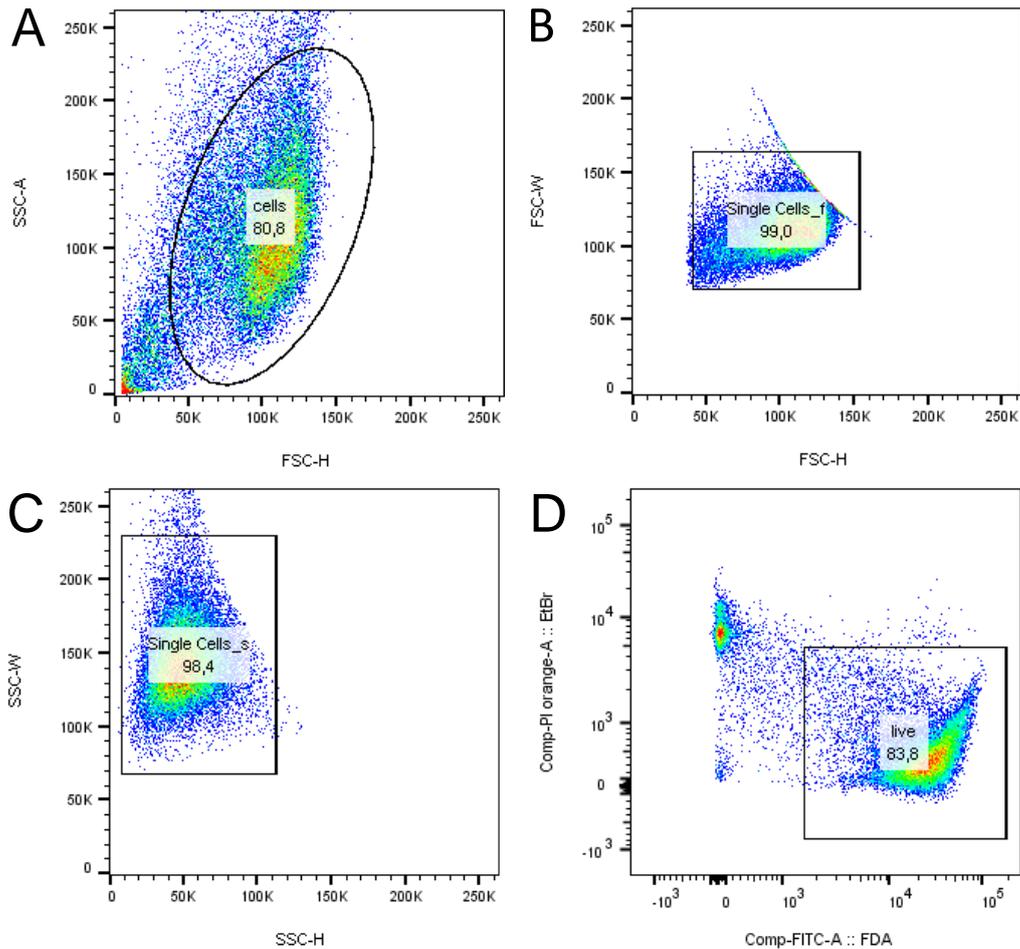


Abb. 1: Gating-Strategie

Nach Definition der Zellpopulation (A), wurden mithilfe der Vorwärts- und Seitenstreuungsparameter Zelldoubletten (B, C) ausgeschlossen. Lebende Zellen wurden als FDA-positiv und Ethidiumbromid (EtBr)-negativ definiert (D).

SSC: Seitenstreulicht, FSC: Vorwärtsstreulicht, A: Fläche, H: Höhe, W: Breite, FDA: Fluorescein Diacetat, EtBr: Ethidiumbromid. (Nach Sander et al., 2021).

Für die Auswertung erfolgte ein Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von FDA für Argon- und NIPP-behandelte Proben (Abb. 2). Eine geringere MFI sprach dabei

für eine Schädigung der Zellmembran, die zu einem Verlust des FDA nach extrazellulär führte. Mittels t-Test wurden die Unterschiede zwischen den mittleren MFIs auf Signifikanz getestet.

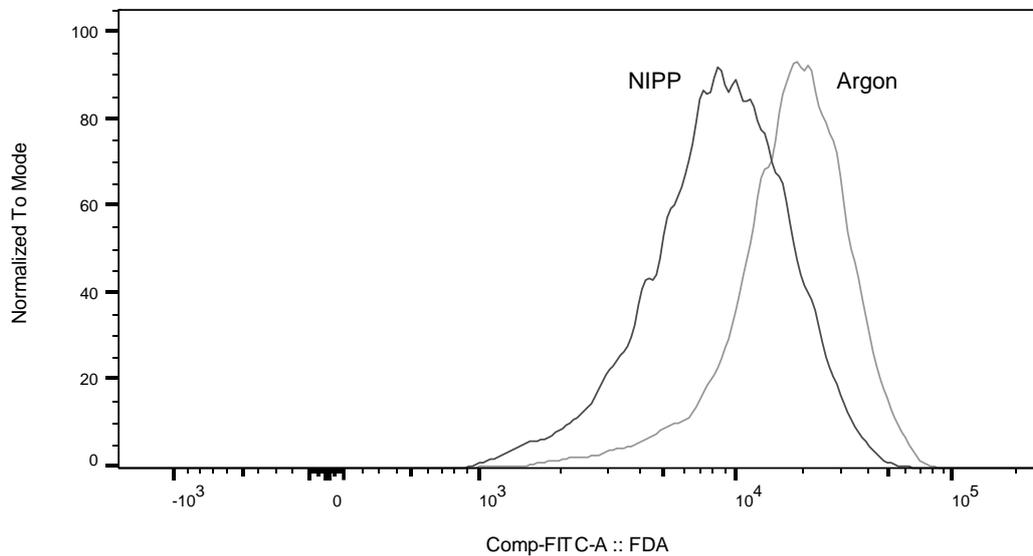


Abb. 2: Auswertungsstrategie

Für die Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von Fluorescein Diacetat der NIPP- und Argon-behandelten Proben verglichen. NIPP: Nicht-invasives physikalisches Plasma, FDA: Fluorescein Diacetat. (Nach Sander et al., 2021).

2.3.3 ATP-Freisetzungs-Assay

Um endogen synthetisiertes und nach extrazellulär freigesetztes Adenosintriphosphat (ATP) nachweisen zu können, wurde der Promega CellTiter-Glo® 2.0 Assay durchgeführt. Bei Vorhandensein von ATP kann Luciferin durch die Ultra-Glo™ Luciferase zu Oxyluciferin umgesetzt werden, welches luminesziert und im Microplate Reader detektiert werden kann (Promega Corporation, 2024).

Die Zellen wurden in Kultivierungsflaschen mit DPBS gewaschen, Trypsin-verdaut und anschließend für 5 min bei 300 rcf zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml DPBS resuspendiert und diese Suspension anschließend mit weiteren 3 ml DPBS verdünnt. Anschließend wurden 200 µl der Zellsuspension pro Well in eine 24-Well-Platte gegeben und in dieser mit Argon bzw. NIPP behandelt. Es wurden 3 verschiedene Behandlungszeiten gewählt (Tab.15).

Tab. 15: NIPP-Behandlungszeiten für den ATP-Freisetzung-Assay

Zelllinie	NIPP-Behandlungszeiten
MCF-7	20 s; 60 s; 120 s
MDA-MB-231	20 s; 60 s; 120 s
OVCAR-3	20 s; 60 s; 120 s
SK-OV-3	20 s; 60 s; 120 s
MFE-296	10 s; 30 s; 60 s
SK-UT-1	10 s; 30 s; 60 s

Auf die Behandlung folgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur in den Wells. Anschließend wurden 150 µl der Suspension in ein Reaktionsgefäß gegeben und bei 3000 rcf für 5 min zentrifugiert. Vom zellfreien Überstand wurden 100 µl in eine weiße 96-Well-Platte überführt. Je Well wurden 100 µl des CellTiter-Glo® Reagenz hinzugegeben. Anschließend wurde im Mikroplatten-Reader die Lumineszenz gemessen. Dies erfolgte in 25 Kinetik-Zyklen alle 30 s ohne Abschwächung bei einer Integrationszeit von 1000 ms.

Da das Verhältnis der Lumineszenzen von NIPP und Argon über die Zeit hinweg nahezu gleichbleibend war, wurden für die Auswertung lediglich die Werte des ersten Zyklus herangezogen.

Die Mittelwerte der Lumineszenz wurden auf die Argon-Kontrolle normiert. Mittels t-Test wurde auf Signifikanz getestet.

2.3.4 Caspase-3/7-Assay

Der Nachweis der Effektorcaspasen 3 und 7, die im Rahmen der Apoptose aktiviert werden, erfolgte mittels des CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent. Dieses fluoresziert, wenn es an die DNA bindet. Der Farbstoff ist an ein Peptid konjugiert, welches die Bindung an die DNA hemmt. Kommt es jedoch während der Apoptose-Kaskade zur Aktivierung der Caspasen 3 und 7, wird dieses Peptid gespalten und der Farbstoff kann eine Bindung mit der DNA eingehen (Thermo Fisher Scientific, 2024a).

Die Zellen wurden in 200 µl Medium in 24-Well-Platten mit NIPP behandelt und anschließend in eine 96-Well-Platte überführt. Tab. 16 gibt einen Überblick über die zelllinienspezifischen Behandlungszeiten mit NIPP sowie die Anzahl an ausgesäten Zellen pro Well. Es erfolgte außerdem die Aussaat un behandelter Zellen als Kontrollen. Des Weiteren wurde eine zweite identische Platte für die Zellzahlbestimmung angelegt, sodass die gemessene Fluoreszenzintensität für die Auswertung auf die Zellzahl normiert werden konnte. Die Durchführung des Caspase-3/7-Assays erfolgte 24 und 48 h nach der Behandlung mit NIPP.

Tab. 16: Übersicht der NIPP-Behandlungszeiten und Aussaat der Zellen für den Caspase-3/7-Assay

Zelllinie	NIPP-Behandlungszeit [s]	Anzahl ausgesä-ter Zellen pro Well 24 h	Anzahl ausgesä-ter Zellen pro Well 48 h
MCF-7	20	8×10^4	4×10^4
MDA-MB-231	20	6×10^4	3×10^4
OVCAR-3	10	6×10^4	3×10^4
SK-OV-3	10	8×10^4 (6×10^4)	6×10^4 (3×10^4)
MFE-296	10	6×10^4	3×10^4
SK-UT-1	10	4×10^4	2×10^4

Das CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent wurde mit DPBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie 5 % FBS zu einer Detektionslösung verdünnt (Tab.17).

Tab. 17: Caspase-3/7-Detektionslösung

Komponente	Volumen pro Well [μl]
CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent	0,25
DPBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}	94,75
FBS (hitzeinaktiviert)	5,00

Die 96-Well-Platte wurde zunächst bei 1000 rcf für 3 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Pro Well wurden 100 μl der Caspase-3/7-Detektionslösung auf die Zellen gegeben. Zur Positiv-Kontrolle wurde zusätzlich 1 μl Staurosporin in das entsprechende Well gegeben, welches Apoptose in den Zellen induzierte. Die Negativ-Kontrolle wurde lediglich mit DPBS bedeckt. Es folgte eine Inkubation bei 37° C und 5 % CO_2 für 45 min. Währenddessen erfolgte die Zellzahlbestimmung auf der parallel angelegten Platte mithilfe der Neubauer-Zählkammer. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff bei einer Exzitationswellenlänge von 495 nm angeregt und die Messung der Emission der Proben bei einer Emissionswellenlänge von 535 nm im Mikroplatten-Reader vorgenommen.

Für jede Probe wurde ein Verhältnis der Fluoreszenzintensität zur entsprechenden Zellzahl in diesem Well gebildet. Es erfolgte eine Normalisierung der Ergebnisse auf die Argon-Kontrollen, sodass ein Vergleich der Werte der NIPP-behandelten Zellen mit denen derjenigen Zellen, die mit Argon behandelt wurden, möglich war. Mittels t-Test wurde auf signifikante Unterschiede geprüft.

2.3.5 TUNEL-Assay

Um die in apoptotischen Zellen stattfindende Fragmentierung von DNA nachzuweisen, wurde der TUNEL-Assay (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) durchgeführt. Hierfür wurde das TiterTACS™ In Situ Apoptosis Detection Kit (Trevigen®) verwendet. Die bei der Fragmentierung freiwerdenden Hydroxylgruppen an den 3'-Enden der DNA wurden dabei mithilfe der Terminalen Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) mit markierten

dUTP-Nukleotiden versehen, deren Absorption im Anschluss gemessen werden konnte (Mirzayans und Murray, 2020).

In Vorbereitung auf den Assay wurden die Zellen in 200 µl Medium in 24-Well-Platten mit NIPP behandelt und anschließend in eine 96-Well-Platte überführt. Tab. 18 gibt einen Überblick über die zelllinienspezifischen Behandlungszeiten mit NIPP sowie die Anzahl der Zellen pro Well zum Zeitpunkt der Aussaat. Diese wurden analog zum Caspase-3/7-Assay gewählt. Auf jeder 96-Well-Platte wurden zudem unbehandelte Zellen, die als Kontrollen dienten, ausgesät. Des Weiteren wurde eine zweite identische Platte für die Zellzahlbestimmung angelegt, sodass die gemessene Absorption für die Auswertung auf die Zellzahl normiert werden konnte. Die Durchführung des TUNEL-Assays erfolgte 24 und 48 h nach der Behandlung mit NIPP.

Tab. 18: Übersicht der NIPP-Behandlungszeiten und Aussaat der Zellen für den TUNEL-Assay

Zelllinie	NIPP-Behandlungszeit [s]	Anzahl ausgesä-ter Zellen pro Well 24 h	Anzahl ausgesä-ter Zellen pro Well 48 h
MCF-7	20	8×10^4	4×10^4
MDA-MB-231	20	6×10^4	3×10^4
OVCAR-3	10	6×10^4	3×10^4
SK-OV-3	10	8×10^4 (6×10^4)	6×10^4 (3×10^4)
MFE-296	10	6×10^4	3×10^4
SK-UT-1	10	4×10^4	2×10^4

Zunächst erfolgte die Zellzahlbestimmung auf der identisch angelegten Platte. Die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und die Gesamtzellzahl für jedes Well bestimmt.

Anschließend wurde die andere 96-Well-Platte bei 1000 rcf für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Sämtliche folgende Zentrifugationen im Rahmen des TUNEL-Assays erfolgten ebenfalls bei diesen Einstellungen. Nach der Zentrifugation wurde das Medium

abgesaugt. Es folgte ein Waschvorgang mit 200 µl DPBS je Well und eine erneute Zentrifugation. Zur Fixierung der Zellen wurden 100 µl einer 3,7 % Buffered Formaldehyde Solution (Tab.19) in jedes Well pipettiert und die Zellen bei 37° C für 7 min inkubiert und daraufhin zentrifugiert.

Tab. 19: Zusammensetzung der 3,7 % Buffered Formaldehyde Solution

Komponente	Menge
Formaldehyd (37 %)	5 ml
Saccharose	10 g
DPBS (10 x)	4 ml
A. bidest.	36 ml
Add. DPBS (1 x)	Auf 50 ml

Nachdem die Formaldehyd-Lösung wieder abgesaugt wurde, wurden die Zellen erneut mit 200 µl DPBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Es wurde ein zweiter Fixierungsschritt mittels 100 % Methanol durchgeführt, von welchem 100 µl in jedes Well gegeben wurden. Bei Raumtemperatur erfolgte eine Inkubation für 20 min und anschließend eine Zentrifugation. Daraufhin folgten zwei Waschvorgänge mit DPBS, an die sich jeweils eine Zentrifugation anschloss.

Nach Absaugen des DPBS erfolgte das Labeling. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden jeweils 50 µl Cytonin™ in die Wells gegeben und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation und Absaugen des Cytonins, wurde mit 200 µl A. demin. gewaschen und erneut zentrifugiert. Währenddessen konnte die TACS™-Nuclease Solution, welche der Herstellung einer Positiv-Kontrolle diente, vorbereitet werden. Dafür wurden pro Positiv-Kontrolle in 50 µl TACS™-Nuclease Buffer 1 µl TACS™-Nuclease gelöst und in das entsprechende Kontroll-Well gegeben. Die Nuklease bewirkte die Spaltung der DNA, sodass am Ende des Assays überprüft werden konnte, ob die Detektion der DNA-Fragmente grundsätzlich funktionierte. In alle anderen Wells wurden jeweils 200 µl DPBS gegeben. Es folgten eine Inkubation für 45 min bei 37° C und anschließend zwei Waschvorgänge mit je 200 µl DPBS, die jeweils eine Zentrifugation

beinhalteten. Danach wurden 100 µl einer 3 % Wasserstoffperoxidlösung in jedes Well gegeben, 1 min inkubiert, die Platte 3 min zentrifugiert und erneut 1 min inkubiert und die Flüssigkeit wieder abgesaugt. Nachdem mit 200 µl DPBS gewaschen wurde, wurden 150 µl 1xTdT Labeling Buffer hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 5 min. Währenddessen wurde ein Labeling Reaction Mix für die Positiv-Kontrolle sowie die zu untersuchenden Proben vorbereitet. Dieser bestand aus dem 1xTdT Labeling Buffer, einem TdT dNTP Mix, Mn^{2+} und TdT Enzymen (Tab. 20). Für die Negativ-Kontrollen wurde ein separater Reaction Mix ohne die TdT Enzyme angesetzt (Tab. 21). Nachdem 50 µl des entsprechenden Labeling Reaction Mix in die Wells gegeben wurden, erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37° C, sodass die Nukleotide an freie 3'OH-Gruppen, die bei Ablauf eines apoptotischen Prozesses durch Fragmentierung der DNA entstehen, binden konnten (Mirzayans und Murray, 2020).

Tab. 20: Zusammensetzung des Labeling Reaction Mix

Komponente	Volumen pro Well [µl]
1x TdT Labeling Buffer	50
TdT dNTP Mix	0,35
TdT Enzyme	0,35
50x Mn^{2+}	1

Tab. 21: Zusammensetzung des Labeling Reaction Mix für die Negativ-Kontrolle

Komponente	Volumen pro Well [µl]
1x TdT Labeling Buffer	50
TdT dNTP Mix	0,35
50x Mn^{2+}	1

Im Anschluss an die Inkubation wurde die Reaktion durch Hinzugabe von 150 µl 1xTdT Stop Buffer abgestoppt. Es folgte eine Inkubation für 5 min und eine Zentrifugation der Platte. Nach 2 darauffolgenden Waschschritten mit 200 µl DPBS wurden 50 µl einer Strep-HRP Solution (Tab. 22) in jedes Well gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Das HRP-konjugierte Streptavidin bindet dabei an die mit Biotin markierten Nukleotide, die sich wiederum an die 3'-Enden der DNA-Fragmente gelagert haben (Thermo Fisher Scientific, 2024b).

Tab. 22: Zusammensetzung der Strep-HRP Solution

Komponente	Volumen pro Well [μl]
Blue Strep-Diluent	50
Strep-HRP	0,04

Die Lösung wurde abgesaugt und die Wells viermal mit je 200 μl 1x DPBS-T (0,1 % Tween 20) gewaschen, wobei nach jedem Waschen zentrifugiert wurde.

Schließlich wurden 100 μl TACS-Sapphire, welches zuvor auf Raumtemperatur erwärmt wurde, in die Wells pipettiert. Dabei handelt es sich um ein chromogenes Substrat, welches durch die HRP zu einem blauen Produkt umgesetzt wird (Bio-Techne, 2024). Unmittelbar im Anschluss wurde die Messung im Mikroplatten-Reader gestartet. Dabei wurde eine Reaktionskinetik im Intervall von einer Minute aufgezeichnet und die Absorption der Proben bei 630 nm Wellenlänge gemessen. Die Absorption stieg dabei zunächst linear an. Bei Verlassen dieser Linearität wurde die Reaktion gestoppt, indem 100 μl einer 0,2 M Salzsäure in jedes Well gegeben wurde. Es kam dabei zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Anschließend wurde erneut die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die Auswertung erfolgte analog zu der des Caspase-3/7-Assays.

2.4 Statistische Auswertung

Für die Auswertung und graphische Darstellung der Daten wurden die Programme Microsoft Excel und GraphPad Prism verwendet. Für jedes Experiment wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Daten wurden mittels Student's t-Test ausgewertet. Die Annahme statistischer Signifikanz erfolgte bei $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (**).

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von NIPP auf das Zellwachstum

Um den Einfluss von NIPP auf das Wachstum von Tumorzellen zu untersuchen, wurden im Anschluss an eine Behandlung der Zellen mit NIPP Wachstumskinetiken durchgeführt. Die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden für 20 s und die Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3, MFE-296 und SK-UT-1 für 10 s mit NIPP bzw. dem Trägergas Argon zur Kontrolle behandelt. Diese Behandlungszeiten wurden in Vorarbeiten ermittelt und sollten annähernd zu einer Reduzierung der Proliferation der Zellen um 50 % führen. Die Anzahl vitaler Tumorzellen wurde nach 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h mittels CASY TT-Cell Counter and Analyzer bestimmt.

Das Wachstum der Zellen konnte durch die Behandlung mit NIPP bei allen sechs Zelllinien wirkungsvoll gehemmt werden (Abb. 3).

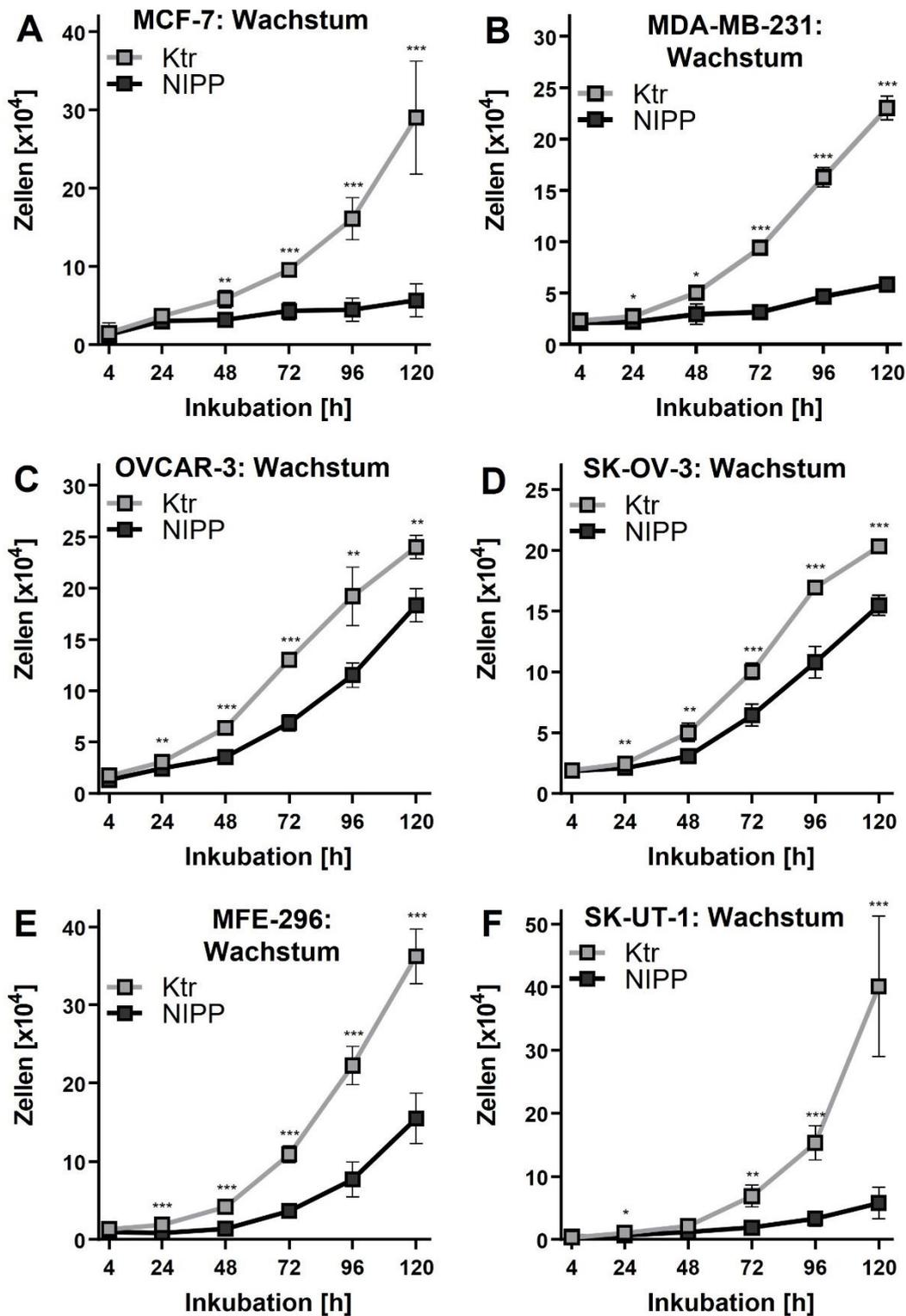


Abb. 3: Einfluss der Behandlung mit NIPP auf das Zellwachstum

Die Zelllinien MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B), OVCAR-3 (C), SK-OV-3 (D), MFE-296 (E) und SK-UT-1 (F) wurden mit nicht-invasivem physikalischen Plasma (NIPP) behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem Trägergas Argon behandelt wurden. Zu den auf der X-Achse angegebenen Zeitpunkten nach Aussaat und Behandlung wurde jeweils die

Anzahl der vitalen Zellen mittels CASY TT-Cell Counter and Analyzer ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung der Anzahl an Zellen. Mittels gepaarten t-Tests wurden die Unterschiede zwischen den mit NIPP und den mit Argon behandelten Zellen auf Signifikanz getestet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). Je Zelllinie wurden mindestens vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. (Nach Stope et al., 2020).

Bei der Zelllinie MCF-7 (Abb. 3 A) zeigten sich ab einer Inkubation von 48 h signifikante Unterschiede in der Proliferation zwischen den mit NIPP behandelten Zellen und der Kontrolle (48 h: $p = 0,0031$, 72 h und 96 h: $p = 0,0003$, 120 h: $p = 0,0008$).

Auch das Wachstum der Zelllinie MDA-MB-231 (Abb. 3 B) konnte durch eine Behandlung mit NIPP effektiv gehemmt werden. Hier konnten bereits nach einer Inkubationszeit von 24 h statistisch signifikante Unterschiede zwischen Zellen, die mit NIPP behandelt wurden, und denjenigen, welche mit Argon behandelt wurden, erzielt werden (24 h: $p = 0,0439$, 48 h: $p = 0,0110$, 72 – 120 h: $p < 0,0001$).

Im Vergleich zu den MC Zellen insgesamt geringer ausgeprägte, aber dennoch statistisch signifikante Unterschiede im Wachstum zeigte auch die Zelllinie OVCAR-3 (Abb. 3 C) ab einer Inkubation von 24 h (24 h: $p = 0,0083$, 48 h: $p = 0,0009$, 72 h: $p < 0,0001$, 96 h: $p = 0,0025$, 120 h: $p = 0,0013$).

Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich bei der Zelllinie SK-OV-3 (Abb. 3 D). Die Zellen zeigten ebenfalls nach einer Inkubationszeit von 24 h ein signifikant geringeres Wachstum, wenn sie mit NIPP behandelt wurden, als die mit Argon behandelten Zellen der Kontrolle (24 h: $p = 0,0034$, 48 h: $p = 0,0026$, 72 h: $p = 0,0006$, 96 h und 120 h: $p = 0,0001$).

Die Proliferation der MFE-296 - Zellen (Abb. 3 E) zeigte bereits nach 24 h Inkubation eine hoch signifikante Inhibierung nach NIPP-Behandlung im Vergleich zur mit Argon behandelten Kontrolle (24 – 72 h: $p < 0,0001$, 96 h und 120 h: $p = 0,0001$).

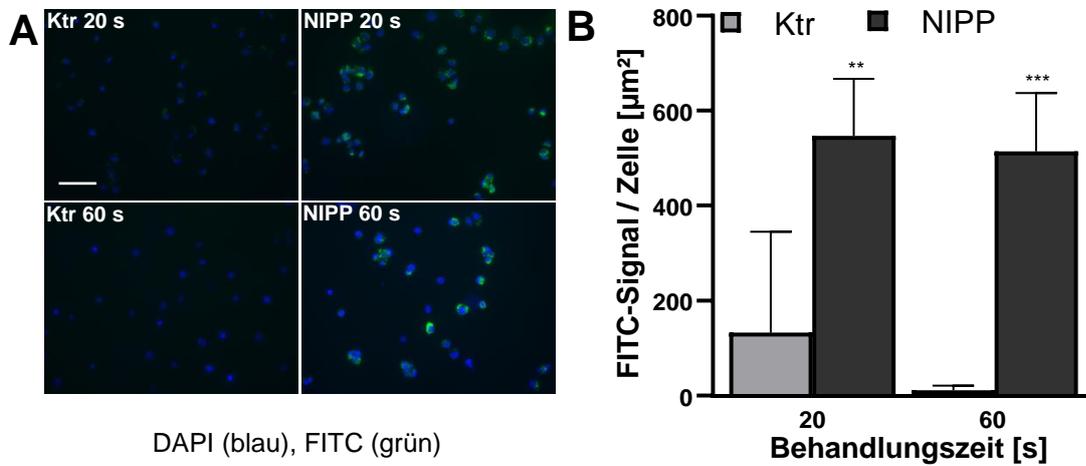
Mit Ausnahme des 4 h - und des 48 h - Wertes ergaben sich auch bei SK-UT-1 - Zellen (Abb. 3 F) statistisch signifikante Unterschiede in der Anzahl zwischen den mit NIPP und den mit Argon behandelten Zellen (24 h: $p = 0,0132$, 72 h: $p = 0,0014$, 96 h: $p = 0,0002$, 120 h: $p = 0,0010$).

3.2 Einfluss von NIPP auf die Membranfunktionalität

Die Zytoplasmamembran ist essenziell für die Vitalität der Zelle, da sie als Barriere gegenüber dem umgebenden Milieu dient und wichtige Transportfunktionen erfüllt (Hauser, 2016). Störungen der Funktionalität der Membran haben daher negative Auswirkungen auf das Überleben der Zelle. Um den Einfluss von NIPP auf die Membranfunktionalität zu untersuchen, wurden die Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231, OVCAR-3, SK-OV-3, MFE-296 und SK-UT-1 mit NIPP behandelt und mit den Fluoreszenzfarbstoffen DAPI und mit an 10-kDa-Dextran gekoppelten FITC gefärbt. Da es sich bei DAPI um einen membrangängigen Farbstoff handelt, sollte dieser in jedem Fall in den Intrazellulärraum gelangen und den Zellkern anfärben. FITC-Dextran hingegen kann eine intakte Zellmembran aufgrund seiner Größe nicht überwinden und erreicht das Innere der Zelle entsprechend nur, wenn die Membran geschädigt ist. Nach einer Inkubation von insgesamt 2 min wurden die überschüssigen Farbstoffe ausgewaschen und die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der intrazellulären Akkumulation von FITC-Dextran untersucht. Zur Auswertung wurde die Zellzahl anhand der mit DAPI angefärbten Zellkerne im Bildausschnitt bestimmt sowie die Fläche des FITC-Dextran-Signals ermittelt. So konnte errechnet werden, wie viel FITC-Dextran gemittelt pro Zelle im Zytoplasma akkumuliert.

Für alle Zelllinien konnte nach einer Behandlung mit NIPP eine stärkere Akkumulation von FITC-Dextran im Zytoplasma festgestellt werden. Das FITC-Signal war von der Fläche her kleiner bei denjenigen Zellen, welche nur dem Trägergas Argon ausgesetzt wurden (Abb. 4 – 6).

MCF-7: Intrazell. FITC-Dextran



MDA-MB-231: Intrazell. FITC-Dextran

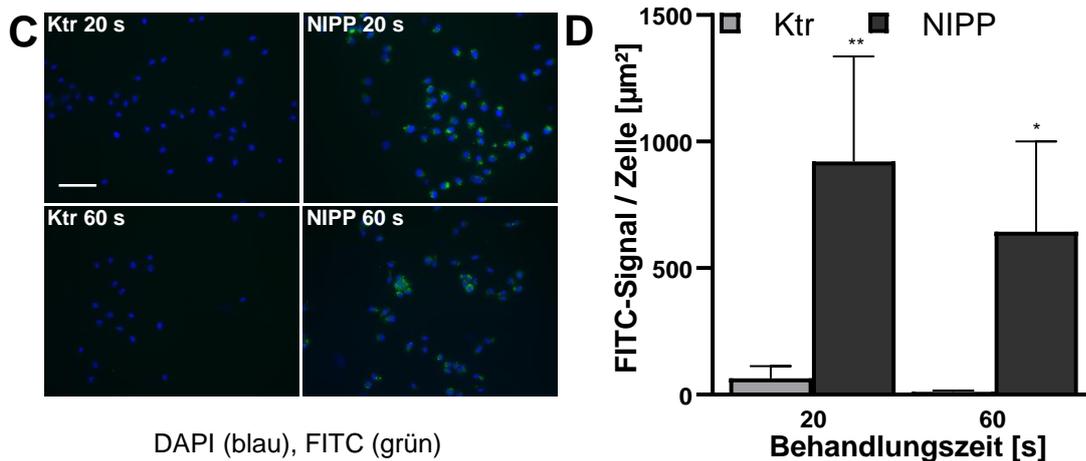


Abb. 4: Intrazelluläre Akkumulation von an 10-kDa-Dextran gekoppelten FITC in Mammakarzinom-Zellen

Die MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen wurden mit nicht-invasivem physikalischem Plasma (NIPP) bzw. dem Trägergas Argon (Ktr) behandelt, anschließend mit den Farbstoffen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000 untersucht (Vergrößerung 100-fach, der Skalierungsbalken zeigt 50 μm an). Dargestellt ist jeweils ein Overlay (DAPI- und GFP-Kanal) der Bildausschnitte der Fluoreszenzmikroskopie der mit NIPP bzw. Argon für 20 und 60 s behandelten Zellen (A und C). DAPI färbt den Zellkern blau an, FITC-Dextran akkumuliert im Zytoplasma und hat ein grünes Signal. In B und D ist der Mittelwert der Fläche des FITC-Signals pro Zelle in $\mu\text{m}^2 \pm$ Standardabweichung angegeben. Mittels gepaarten t-Tests wurden die Unterschiede zwischen den mit NIPP und den mit Argon behandelten Zellen auf Signifikanz getestet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). Es wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. (Nach Sander et al., 2021).

Wie Abb. 4 zeigt, ergaben sich für die Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der intrazellulären Akkumulation von FITC-Dextran. Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in den Flächen des FITC-Signals pro Zelle zwischen den mit NIPP und den mit Argon behandelten Mammakarzinom-Zellen. Dabei war das Signal sowohl nach einer NIPP-Behandlung für 20 s als auch für 60 s größer als in der Kontrolle (MCF-7: 20 s: $p = 0,0052$, 60 s: $p < 0,0010$, MDA-MB-231: 20 s: $p = 0,0064$, 60 s: $p = 0,0374$).

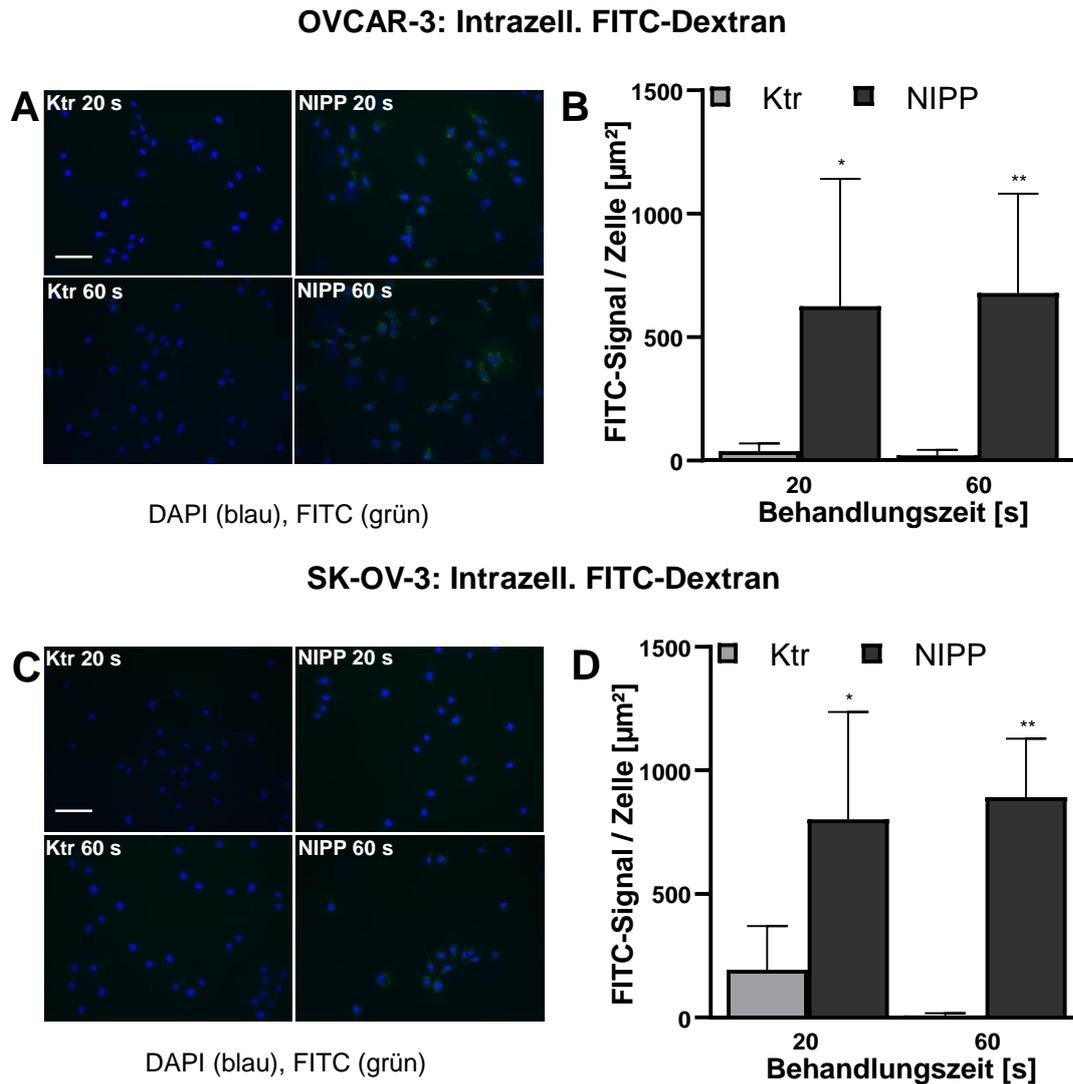


Abb. 5: Intrazelluläre Akkumulation von an 10-kDa-Dextran gekoppelten FITC in Ovarialkarzinom-Zellen

Die OVCAR-3- und SK-OV-3-Zellen wurden mit nicht-invasivem physikalischem Plasma (NIPP) bzw. dem Trägergas Argon (Ktr) behandelt, anschließend mit den Farbstoffen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000 untersucht (Vergrößerung 100-fach, der Skalierungsbalken zeigt 50 μm an). Dargestellt ist jeweils ein Overlay (DAPI- und GFP-Kanal) der Bildausschnitte der Fluoreszenzmikroskopie der mit NIPP bzw. Argon für 20 und 60 s behandelten Zellen (A und C). DAPI färbt den Zellkern blau an, FITC-Dextran akkumuliert im Zytoplasma und hat ein grünes Signal. In B und D ist der Mittelwert der Fläche des FITC-Signals pro Zelle in $\mu\text{m}^2 \pm$ Standardabweichung angegeben. Mittels gepaarten t-Tests wurden die Unterschiede zwischen den mit NIPP und den mit Argon behandelten Zellen auf Signifikanz getestet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). Es wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. (Nach Sander et al., 2021).

Ein Einfluss der Behandlung mit NIPP auf die Membranfunktionalität konnte ebenfalls für Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden (Abb. 5). Auch hier waren die Unterschiede in der Fläche der FITC-Signale zwischen der NIPP- und der Argon-Behandlung für beide Behandlungszeiten signifikant (OVCAR 3: 20 s: $p = 0,0344$, 60 s: $p = 0,0065$, SK-OV-3: 20 s: $p = 0,0409$, 60 s: $p = 0,0030$).

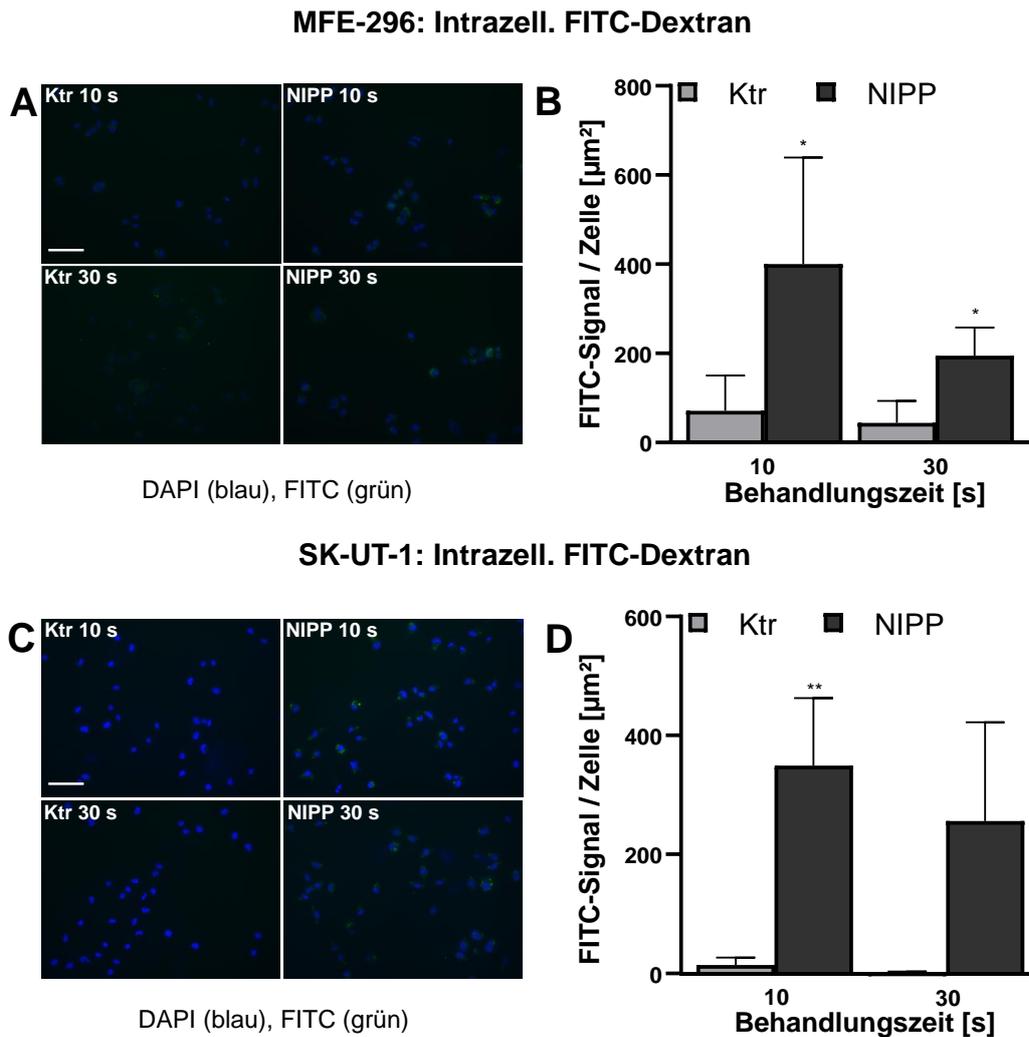


Abb. 6: Intrazelluläre Akkumulation von an 10-kDa-Dextran gekoppelten FITC in Endometriumkarzinom-Zellen und uterinen Leiomyosarkom-Zellen

Die MFE-296- und SK-UT-1-Zellen wurden mit nicht-invasivem physikalischem Plasma (NIPP) bzw. dem Trägergas Argon (Ktr) behandelt, anschließend mit den Farbstoffen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ-9000 untersucht (Vergrößerung 100-fach, der Skalierungsbalken zeigt 50 μm an). Dargestellt ist jeweils ein Overlay (DAPI- und GFP-Kanal) der Bildausschnitte der Fluoreszenzmikroskopie der mit NIPP bzw. Argon für 10 und 30 s behandelten Zellen (A und C). DAPI färbt den Zellkern blau an, FITC-Dextran akkumuliert im Zytoplasma und hat ein grünes Signal. In B und D ist der Mittelwert

der Fläche des FITC-Signals pro Zelle in $\mu\text{m}^2 \pm$ Standardabweichung angegeben. Mittels gepaarten t-Tests wurden die Unterschiede zwischen den mit NIPP und den mit Argon behandelten Zellen auf Signifikanz getestet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). Es wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. (Nach Sander et al., 2021).

Ein im Vergleich geringerer, aber dennoch signifikanter Effekt der NIPP-Behandlung auf die Fläche des FITC-Signals pro Zelle im Vergleich zur Argon-Behandlung zeigte sich für die Endometriumkarzinom-Zelllinie MFE-296 (Abb.6 A und B). Die Behandlungszeiten mit NIPP bzw. Argon lagen hier bei 10 und bei 30 s. Für beide Zeiten zeigte sich ein größeres FITC-Signal je Zelle, nachdem die Zellen mit NIPP behandelt wurden (10 s: $p = 0,0402$, 30 s: $p = 0,0323$).

Im Unterschied zu den bisher dargestellten Zelllinien zeigte sich bei den Leiomyosarkomzellen der Zelllinie SK-UT-1 (Abb. 6 C und D) bei höherer Behandlungszeit ein geringerer Einfluss von NIPP auf die Akkumulation des FITC-Dextran im Intrazellulärraum. Für die Behandlung mit NIPP für 10 s konnte dennoch ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Argon-behandelten Zellen nachgewiesen werden (10 s: $p = 0,0011$, 30 s: $p = 0,0570$).

Um den Einfluss von NIPP auf die Funktionalität der Zytoplasmamembran weiter zu untersuchen und die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zu bestätigen, wurden die Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231, OVCAR-3, SK-OV-3, MFE-296 und SK-UT-1 mit NIPP bzw. dem Trägergas Argon behandelt und zur Durchführung eines Farbstoffverlust-Assays anschließend mit dem membrangängigen Farbstoff Fluorescein Diacetat (FDA) gefärbt. Durch Hydrolyse entsteht aus FDA das fluoreszierende Fluorescein (F). Um später zwischen nicht mehr vitalen Zellen differenzieren zu können, wurde des Weiteren der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Der Acetylrest des FDA wird intrazellulär durch Esterasen abgespalten. Dies führt dazu, dass das Molekül eine intakte Zellmembran nicht passieren und die Zelle somit nicht mehr verlassen kann. Der Farbstoff akkumuliert somit im Zytoplasma. Wird die Membranfunktionalität jedoch durch die Wirkung von NIPP beeinträchtigt, kann das Molekül das Zytoplasma über die defekte Zytoplasmamembran verlassen, sodass die Zelle weniger

fluoresziert (Cao et al., 2015; Nitsch et al., 2019). Im Gegensatz zum Versuch mit FITC-Dextran sprach eine Akkumulation des Farbstoffs im Zytoplasma hier also für eine gute Membranfunktionalität. Für die Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der vitalen Einzelzellen (EtBr negative Zellen) genutzt (Abb. 7).

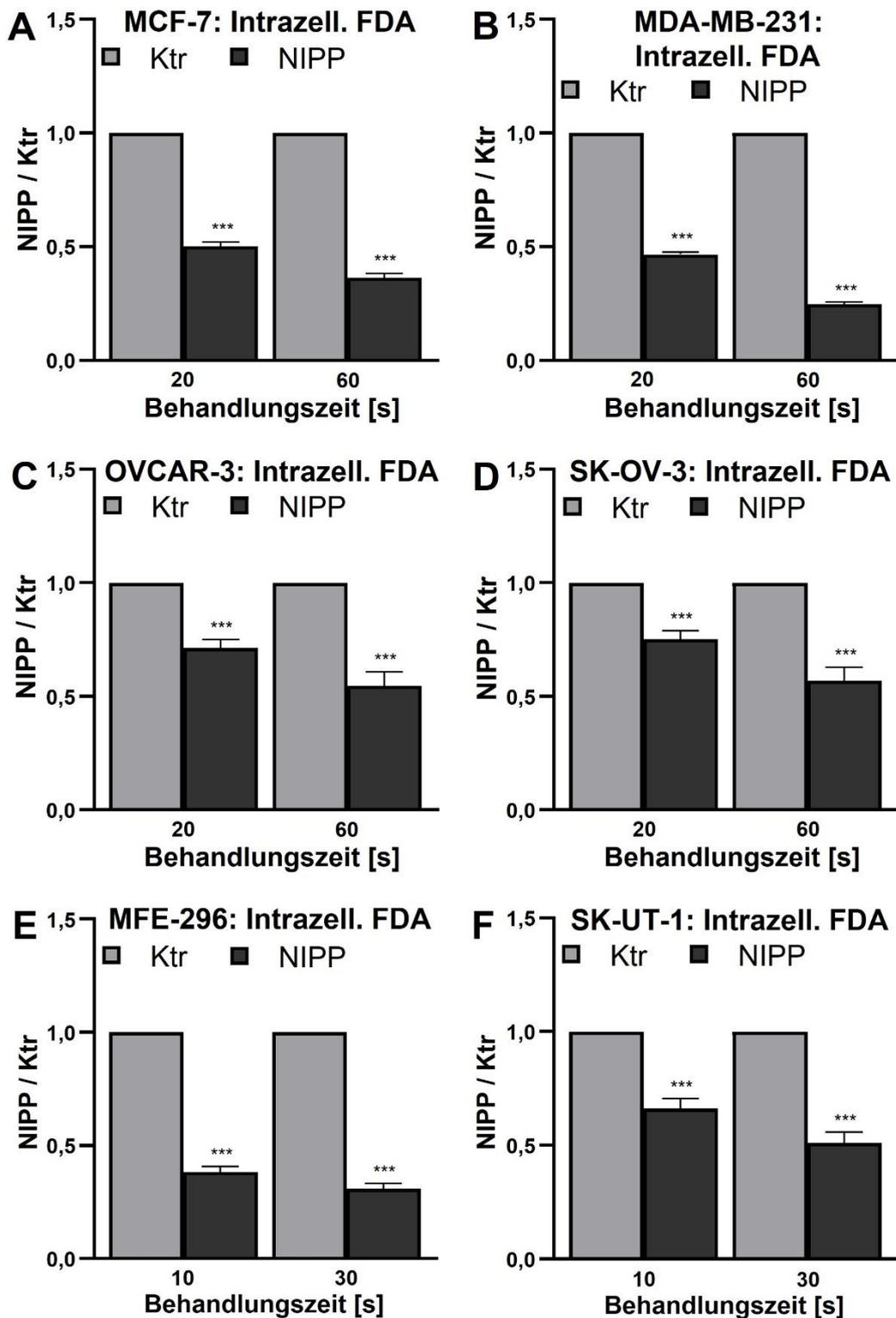


Abb. 7: Farbstoffverlust-Assay mittels Durchflusszytometrie

Die Zelllinien MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B), OVCAR-3 (C), SK-OV-3 (D), MFE-296 (E) und SK-UT-1 (F) wurden jeweils für 2 unterschiedliche Zeiten mit nicht-invasivem physikalischen Plasma (NIPP) und dem Trägergas Argon (Ktr) behandelt. Anschließend wurden sie mit Fluorescein Diacetat (FDA) und Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt und 15 min

inkubiert. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich des FDA-Signals analysiert. Für die Auswertung diente die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der vitalen Einzelzellen. Dargestellt sind die zur Kontrolle normierten Mittelwerte der MFI \pm Standardabweichung. Mittels gepaarten t-Tests wurden die Unterschiede zwischen den mit NIPP und den mit Argon behandelten Zellen auf Signifikanz getestet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). Es wurden für jede Zelllinie mindestens vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Es zeigte sich für alle 6 Zelllinien eine Beeinflussung der MFI durch die Behandlung der Zellen mit NIPP. Es konnte nachgewiesen werden, dass nach der NIPP-Behandlung stets eine geringere Akkumulation des FDAs innerhalb der Zellen stattfand als nach der Behandlung mit dem Trägergas Argon. Dies führte, wie sich auch schon im Vorversuch mittels Fluoreszenzmikroskopie gezeigt hatte, zu der Annahme, dass die Zytoplasmamembran durch den Einfluss des NIPP Schäden nimmt. Die Behandlungszeiten wurden analog zu denen des Vorversuches festgelegt und lagen für die Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231, OVCAR-3 und SK-OV-3 bei 20 s und 60 s und für MFE-296 und SK-UT-1 bei 10 s und 30 s.

Die MFI war in allen Versuchen deutlich geringer, wenn die Zellen zuvor dem NIPP ausgesetzt wurden.

Für die Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zeigten sich sowohl bei der Behandlung mit NIPP für 20 s als auch für 60 s stets hoch signifikante Unterschiede in der MFI im Vergleich zur Kontrolle (20 s: $p < 0,0001$, 60 s: $p < 0,0001$). In der Annahme, dass die mit Argon behandelten Kontrollzellen eine MFI von 100 % aufweisen, konnte in MCF-7-Zellen (Abb. 7 A) die MFI der für 20 s mit NIPP behandelten Zellen auf ca. 50 % reduziert werden. Eine Behandlung für 60 s führte sogar zu einer Abnahme der MFI auf 36 %. Bei der Zelllinie MDA-MB-231 (Abb. 7 B) lag die MFI nach Behandlung mit NIPP für 20 s sogar nur bei etwa 47 % und für 60 s bei 25 % der MFI der mit Argon behandelten Kontrolle.

Im Vergleich dazu war der Einfluss der NIPP-Behandlung auf die MFI der Ovarialkarzinomzellen OVCAR-3 (Abb. 7 C) und SK-OV-3 (Abb. 7 D) etwas geringer. Dennoch waren die Ergebnisse jeweils für beide Behandlungszeiten signifikant (OVCAR-3: 20 s: $p = 0,0005$, 60 s: $p = 0,0006$, SK-OV-3: 20 s: $p = 0,0008$, 60 s: $p = 0,0007$). Die MFI konnte

bei OVCAR-3 nach 20 s Behandlung mit NIPP auf 71 %, bei 60 s Behandlung auf 55 % gegenüber der MFI der Kontrollzellen reduziert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bei SK-OV-3-Zellen erreicht. Hier ergab sich eine MFI der mit NIPP behandelten Zellen von 75 % der MFI der Kontrolle, wenn sie für 20 s dem NIPP ausgesetzt waren und 57 % bei einer NIPP-Behandlung von 60 s.

Auch die Zelllinien MFE-296 und SK-UT-1 zeigten eine geringere Akkumulation von FDA im Zytoplasma nach einer NIPP-Behandlung als nach einer Argon-Behandlung. Die Unterschiede der MFI waren ebenfalls bei beiden Behandlungszeiten signifikant (MFE-296: 10 s: $p < 0,0001$, 30 s: $p < 0,0001$, SK-UT-1: 10 s: $p = 0,0006$, 30 s: $p = 0,0003$). Ein besonders starker Einfluss des NIPP auf die MFI zeigte sich für Endometriumkarzinom-Zellen MFE-296 (Abb. 7 E). Hier gelang bereits bei einer Behandlung mit NIPP für 10 s eine Reduktion der MFI auf 38 % derer mit Argon behandelten Zellen. Wurden die Zellen dem NIPP für 30 s ausgesetzt, lag sie bei 31 %. Die Abhängigkeit von der Behandlungszeit schien hier dementsprechend geringer als bei den zuvor genannten Zelllinien. Die Zelllinie SK-UT-1 (Abb. 7 F) zeigte ebenfalls eine geringere MFI, wenn die Zellen zuvor mit NIPP behandelt wurden, der Einfluss des NIPP war hier jedoch geringer als bei den MFE-296-Zellen. Die MFI lag bei 66 % der MFI von Argon-behandelten Zellen, wenn die Zellen für 10 s mit NIPP behandelt wurden und bei 51 % nach 30 s NIPP-Behandlung.

Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung des Einflusses von NIPP auf die Membranfunktionalität mithilfe des Nachweises einer ATP-Freisetzung der Zellen. Hierzu wurde im Gegensatz zu den anderen beiden Versuchen zur Membranfunktionalität kein Farbstoff in die Zellen eingebracht. Stattdessen wurde hier das extrazelluläre Vorkommen von ATP nach einer Behandlung mit NIPP untersucht. Die Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231, OVCAR-3, SK-OV-3, MFE-296 sowie SK-UT-1 wurden für jeweils 3 unterschiedliche Zeiten mit NIPP bzw. Argon behandelt und für 10 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend sedimentiert. Für die Untersuchung im Microplate Reader wurde lediglich der zellfreie Überstand verwendet. So konnte ATP, welches sich nicht mehr innerhalb der Zellen befand, nachgewiesen werden. Bei allen 6 untersuchten Zelllinien konnte nach der Behandlung mit NIPP mehr ATP nachgewiesen werden als dies bei Argon-behandelten Zellen der Fall war (Abb. 8).

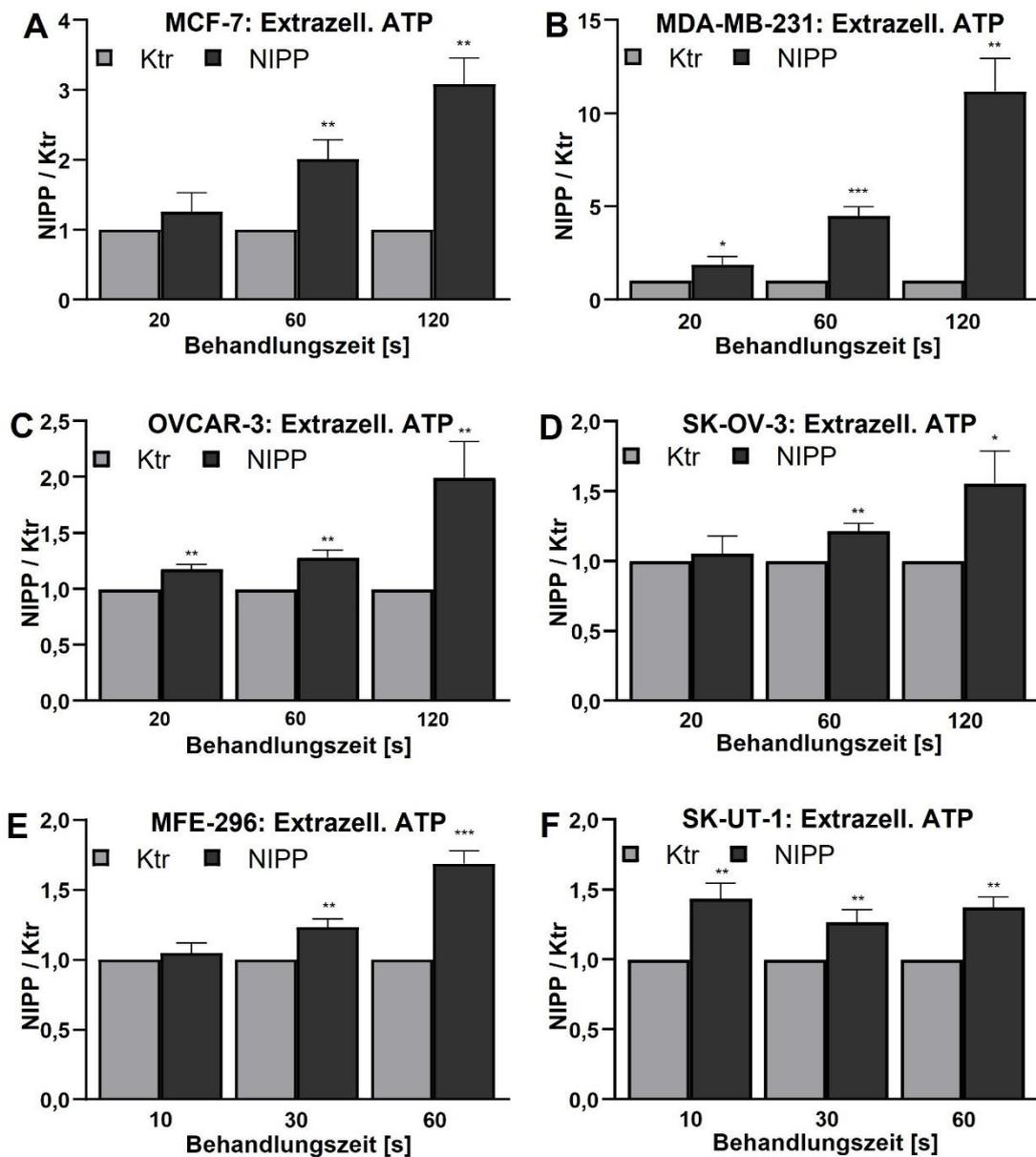


Abb. 8: ATP-Verlust-Assay

Die Zelllinien MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B), OVCAR-3 (C), SK-OV-3 (D), MFE-296 (E) und SK-UT-1 (F) wurden jeweils für 3 unterschiedliche Zeiten mit nicht-invasivem Plasma (NIPP) und dem Trägergas Argon (Ktr) behandelt. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Zellen und der Nachweis von ATP im zellfreien Überstand mittels CellTiter-Glo® Reagenz und Messung der Lumineszenz im Multiplate Reader. Dargestellt sind die zur Kontrolle normierten Mittelwerte der Lumineszenz \pm Standardabweichung. Mittels gepaarten t-Tests wurden die Unterschiede zwischen den mit NIPP und den mit Argon behandelten Zellen auf Signifikanz getestet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). Es wurden für jede Zelllinie mindestens vier voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Die MCF-7-Zellen (Abb. 8 A) wurden jeweils für 20 s, 60 s und 120 s mit NIPP bzw. Argon behandelt. Hier zeigten sich ab 60 s NIPP-Behandlung signifikante Unterschiede im Vorkommen extrazellulären ATPs im Vergleich zu den mit Argon behandelten Zellen (20 s: $p = 0,1660$, 60 s: $p = 0,0054$, 120 s: $p = 0,0016$). Normiert auf die Kontrolle ergab sich bei der Behandlung für 60 s die doppelte Menge und für 120 s sogar die 3-fache Menge an ATP im zellfreien Überstand.

Eine noch größere Wirkung des NIPP auf den extrazellulären Nachweis von ATP zeigte sich in der Zelllinie MDA-MB-231 (Abb. 8 B). Hier wurden für alle 3 Behandlungszeiten signifikante Unterschiede zwischen den mit NIPP und den mit Argon behandelten Zellen erreicht (20 s: $p = 0,0293$, 60 s: $p = 0,0008$, 120 s: $p = 0,0014$). Nach 120 s Behandlung mit NIPP konnte hier sogar das 11-fache an extrazellulärem ATP der Kontrolle nachgewiesen werden.

Auch die Zelllinie OVCAR-3 (Abb. 8 C) zeigte bezüglich der ATP-Freisetzung ein deutliches Ansprechen auf die NIPP-Behandlung. Es ergaben sich für alle durchgeführten Behandlungszeiten signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, die mit dem Trägergas behandelt wurde (20 s: $p = 0,0029$, 60 s: $p = 0,0038$, 120 s: $p = 0,0086$). Behandelte man die Zellen für 120 s mit NIPP, wurde in etwa das doppelte an ATP freigesetzt wie nach einer Behandlung mit Argon.

Auch die Zelllinie SK-OV-3 (Abb. 8 D) wurde für 20 s, 60 s und 120 s mit NIPP behandelt. Hier zeigten sich ebenfalls größere Mengen an ATP im zellfreien Überstand als in der Kontrolle. Die Unterschiede waren für die Behandlung über 60 s und über 120 s signifikant (20 s: $p = 0,4481$, 60 s: $p = 0,0044$, 120 s: $p = 0,0178$). Normiert auf die Kontrolle wurde nach einer Behandlung mit NIPP maximal das 1,5-fache an ATP nach 120 s Behandlung mit NIPP detektiert.

Für MFE-296-Zellen (Abb. 8 E) ergaben sich bei Behandlungszeiten von 30 s und 60 s signifikante Unterschiede im ATP-Gehalt des zellfreien Überstands (10 s: $p = 0,2797$, 30 s: $p = 0,0049$, 60 s: $p = 0,0007$). Hier konnte bei einer Behandlung von 60 s jedoch maximal das 1,7-fache der Kontrolle erreicht werden.

Anders als bei den bisher beschriebenen Zelllinien, zeigte sich bei den SK-UT-1-Zellen (Abb. 8 F) keine Zunahme der ATP-Freisetzung mit steigender Behandlungszeit. Dennoch

wurde im Vergleich zur mit Argon behandelten Kontrolle mehr ATP im zellfreien Überstand nachgewiesen. Diese Ergebnisse waren signifikant für alle 3 Behandlungszeiten (10 s: $p = 0,0044$, 30 s: $p = 0,0098$, 60 s: $p = 0,0025$). Es wurde maximal das 1,4-fache an ATP der Kontrolle freigesetzt. Dies war der Fall nach einer Behandlung mit NIPP für 10 s. Für längere Behandlungszeiten ergaben sich geringere Werte.

3.3 Einfluss von NIPP auf die Apoptose

Nachdem gezeigt werden konnte, dass NIPP sowohl zu einer eingeschränkten Zellproliferation als auch zu einer Störung der Membranfunktionalität führt, wurde weiterhin untersucht, ob NIPP auch Einfluss auf den programmierten Zelltod nehmen kann. Dafür wurden die Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231, OVCAR-3, SK-OV-3, MFE-296 und SK-UT-1 hinsichtlich der apoptotischen Aktivität nach einer Behandlung mit NIPP untersucht. Hierzu wurden zwei verschiedene Nachweismethoden genutzt. Zum einen wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 bestimmt. Diese stellen einen entscheidenden Faktor im Vorgang des programmierten Zelltodes dar. Des Weiteren erfolgte die Untersuchung mittels TUNEL-Assay. Dabei kann die im Rahmen der Apoptose stattfindende Fragmentierung der DNA mittels der Markierung frei gewordener Hydroxylgruppen an den 3'-Enden der DNA nachgewiesen werden. In Anlehnung an den Versuch zum Einfluss von NIPP auf die Zellproliferation wurden die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 für 20 s und die Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3, MFE-296 und SK-UT-1 für 10 s mit NIPP behandelt. Nach einer Inkubation der behandelten Zellen für 24 h und 48 h erfolgte die Durchführung der Apoptose-Nachweis-Assays (Abb. 9 und 10).

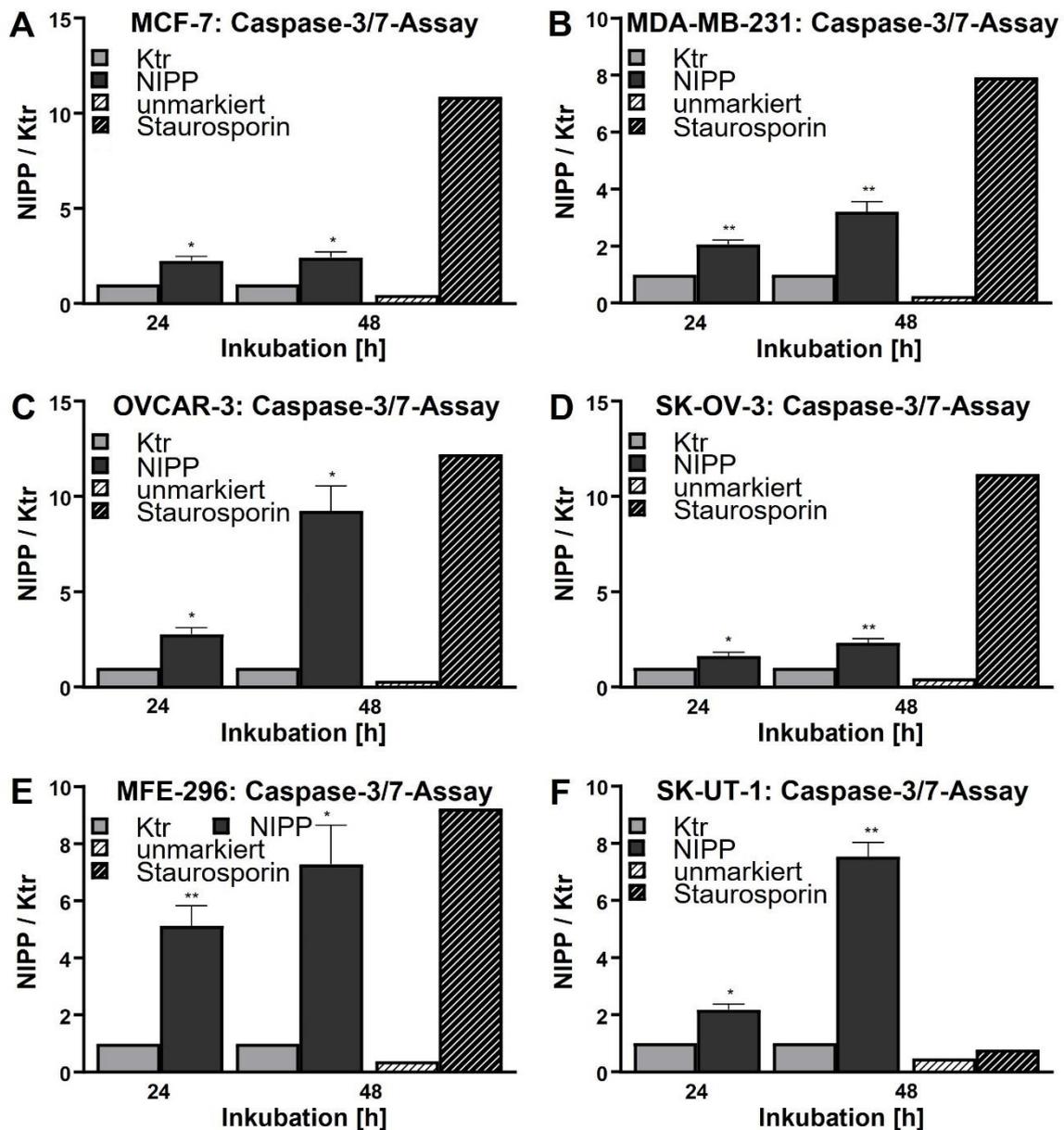


Abb. 9: Caspase-3/7-Assay

Die Zelllinien MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) wurden für 20 s und die Zelllinien OVCAR-3 (C), SK-OV-3 (D), MFE-296 (E) und SK-UT-1 (F) für 10 s mit nicht-invasivem physikalischen Plasma (NIPP) und dem Trägergas Argon (Ktr) behandelt. 24 h und 48 h nach erfolgter Behandlung wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der im Multiplate Reader ermittelten Fluoreszenzintensität pro Zelle normiert auf die Kontrolle. Zusätzlich wurden Positiv- und Negativkontrollen nicht mit NIPP behandelter Zellen durchgeführt. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit Staurosporin behandelt, bei der Negativkontrolle handelt es sich um unmarkierte Zellen. Beide wurden ebenfalls auf die Argon-Kontrolle normiert. Die Daten wurden mithilfe von gepaarten t-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit NIPP und den mit Argon behandelten Zellen getestet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). Es wurden für jede Zelllinie mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. (Nach Stope et al., 2020).

Für die beiden Mammakarzinom-Zelllinien zeigten sich vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Aktivität der Caspasen 3 und 7: Im Vergleich zur Argon-Kontrolle konnte die Caspase-Aktivität in MCF-7-Zellen (Abb. 9 A) sowohl 24 h als auch 48 h nach der Behandlung mit NIPP auf etwas mehr als das Doppelte erhöht werden (24 h: $p = 0,0271$, 48 h: $p = 0,0389$). Auch die Zelllinie MDA-MB-231 (Abb. 9 B) zeigte eine Zunahme der Aktivität der Caspasen 3 und 7, nachdem die Zellen mit NIPP behandelt wurden. 24 h nach der Behandlung wurde in etwa das Doppelte der Aktivität erreicht, nach 48 h sogar mehr als das 3-fache (24 h: $p = 0,0016$, 48 h: $p = 0,0036$).

Ebenso zeigten die OVCAR-3-Zellen (Abb. 9 C) ein ausgeprägtes Ansprechen auf die Behandlung mit NIPP. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 konnte nach einer NIPP-Behandlung nach 24 h Inkubation auf mehr als Doppelte und nach 48 h Inkubation auf das 9-fache der Argon-Kontrolle erhöht werden (24 h: $p = 0,0356$, 48 h: $p = 0,0239$).

Vergleichsweise geringer, aber dennoch signifikant höher als die Kontrolle mit dem Trägergas Argon, war der Effekt des NIPP auf die Caspase-Aktivität von SK-OV-3-Zellen (Abb. 9 D). Hier stieg die Aktivität 24 h nach der NIPP-Behandlung auf das 1,6-fache und 48 h danach auf etwas mehr als das Doppelte (24 h: $p = 0,0361$, 48 h: $p = 0,0054$).

Besonders stark wurde die Caspase-Aktivität der Endometriumkarzinom-Zelllinie MFE-296 (Abb. 9 E) durch NIPP beeinflusst. Hier zeigte sich 24 h nach Behandlung ein Anstieg der Aktivität auf das 5-fache und 48 h danach sogar auf das 7-fache der Argon-Kontrolle (24 h: $p = 0,0044$, 48 h: $p = 0,0105$).

Auch die Caspase-Aktivität der Zelllinie SK-UT-1 (Abb. 9 F) konnte durch NIPP effektiv gesteigert werden. Für diese Zellen konnte nach einer Inkubation für 24 h das Doppelte und 48 h nach der Behandlung das 7,5-fache an Caspase-Aktivität nachgewiesen werden (24 h: $p = 0,0281$, 48 h: $p = 0,0059$).

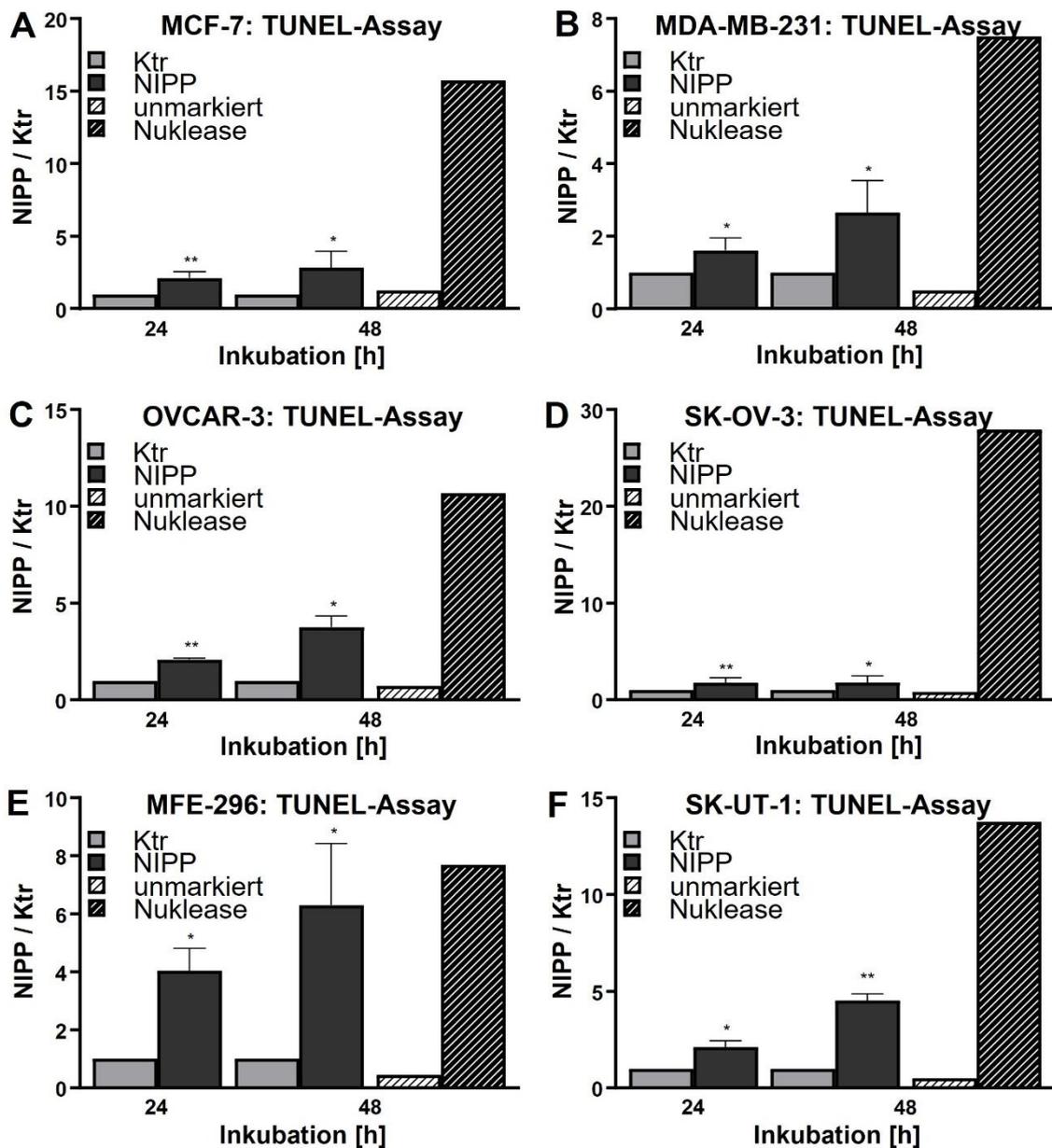


Abb. 10: TUNEL-Assay

Die Zelllinien MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) wurden für 20 s und die Zelllinien OVCAR-3 (C), SK-OV-3 (D), MFE-296 (E) und SK-UT-1 (F) für 10 s mit nicht-invasivem physikalischem Plasma (NIPP) und dem Trägergas Argon (Ktr) behandelt. 24 h und 48 h nach erfolgter Behandlung wurde mittels TUNEL-Assay der Nachweis fragmentierter DNA durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der im Multiplate Reader ermittelten Fluoreszenzintensität pro Zelle normiert auf die Kontrolle. Zusätzlich wurden Positiv- und Negativkontrollen nicht mit NIPP behandelter Zellen durchgeführt. Für die Positivkontrolle diente eine Behandlung mit Nuklease, bei der Negativkontrolle erfolgte keine Markierung. Beide wurden ebenfalls auf die Argon-Kontrolle normiert. Die Daten wurden mithilfe von gepaarten t-Tests auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit NIPP und den mit Argon behandelten Zellen getestet (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$).

$\leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$). Für jede Zelllinie wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. (Nach Stope et al., 2020).

Für die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 (Abb. 10 A) zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie auch die Analyse der Caspase-Aktivität ergeben hatte. Sowohl 24 h als auch 48 h nach der NIPP-Behandlung konnte im Vergleich zur Argon-Kontrolle mehr als das Doppelte an fragmentierter DNA nachgewiesen werden (24 h: $p = 0,0051$, 48 h: $p = 0,0240$). Analog zu den vorherigen Versuchen zeigten die MDA-MB-231-Zellen (Abb. 10 B) ein vergleichbares Verhalten. Sie wiesen hinsichtlich des Nachweises von DNA-Fragmenten ähnliche Unterschiede zwischen NIPP- und Argon-Behandlung auf. Nach 24 h Inkubation konnte hier das 1,6-fache, nach 48 h das 2,6-fache an fragmentierter DNA nachgewiesen werden (24 h: $p = 0,0417$, 48 h: $p = 0,0330$).

Das TUNEL-Signal stieg ebenfalls bei der Zelllinie OVCAR-3 (Abb. 10 C) bedeutend an, wenn die Zellen zuvor mit NIPP behandelt wurden. 24 h nach der Behandlung wurde das Doppelte und 48 h danach mehr als das 3-fache des Signals der Argon-Kontrolle erreicht (24 h: $p = 0,0022$, 48 h: $p = 0,0135$).

Die SK-OV-3-Zellen (Abb. 10 D) zeigten sowohl 24 h als auch 48 h nach der Behandlung mit NIPP einen Anstieg der nachgewiesenen DNA-Fragmente auf etwa das 1,8-fache der mit dem Trägergas behandelten Kontrolle (24 h: $p = 0,0089$, 48 h: $p = 0,0187$).

Analog zum Caspase-Aktivitäts-Nachweis konnte auch mit dem TUNEL-Assay eine ausgeprägte Wirkung des NIPP auf das Apoptose-Verhalten der Zelllinie MFE-296 (Abb. 10 E) gezeigt werden. Hier wurde vergleichend mit der Argon-Kontrolle das 4-fache (nach 24 h Inkubation) und das 6-fache (nach 48 h Inkubation) an DNA-Fragmenten im Multiplate-Reader nachgewiesen. Auch diese Ergebnisse waren signifikant im Unterschied zur Argon-Kontrolle (24 h: $p = 0,0211$, 48 h: $p = 0,0496$).

Die Beeinflussung der Apoptose durch die Behandlung mit NIPP konnte mit dem TUNEL-Assay auch für die Leiomyosarkom-Zelllinie SK-UT-1 (Abb. 10 F) gezeigt werden. Bei dieser Zelllinie kam es 24 h nach der Behandlung zu einem Anstieg auf das Doppelte des TUNEL-Signals der Argon-Kontrolle und nach 48 h auf das 4,5-fache (24 h: $p = 0,0279$, 48 h: $p = 0,0032$).

4. Diskussion

4.1 NIPP hemmt das Zellwachstum

Wie für verschiedene Entitäten gezeigt wurde, hat NIPP einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von Tumorzellen (Reiazi et al., 2017). Die antiproliferative Wirkung konnte in dieser Arbeit für alle sechs untersuchten Tumorzelllinien bestätigt werden.

Von elementarer Bedeutung für einen möglichen zukünftigen Einsatz von NIPP in der klinischen Anwendung sind in diesem Zusammenhang Hinweise, dass NIPP maligne Zellen in deutlich ausgeprägterem Ausmaß zu schädigen scheint als nicht-maligne Zellen. Der Vorteil einer Tumorthherapie mit NIPP gegenüber herkömmlichen Behandlungsmethoden wie Chemo- oder Radiotherapie läge somit darin, dass gesunde Zellen weniger Schaden nähmen (Kim et al., 2011; Yan et al., 2016). Darüber hinaus handelt es sich im Gegensatz zur systemischen Chemotherapie bei einer Therapie mit NIPP um eine gezielte und lokale Anwendung. Diese Aspekte stellen wiederum entsprechend die Grundlage einer nebenwirkungs- und risikoärmeren Therapie dar.

Von großer Bedeutung für den Effekt von NIPP auf die Tumorzellen scheint die Behandlungszeit zu sein, sodass, vergleichbar mit einer Dosierung von Chemotherapeutika, festgelegt werden muss, für welche Behandlungszeit die Zellen dem NIPP ausgesetzt werden müssen. Dabei sind die entitätsspezifischen und je nach Zelllinie individuellen Unterschiede in der Vulnerabilität gegenüber NIPP sowie in den Schutzmechanismen der Zellen gegen oxidativen Stress zu berücksichtigen.

Für die Ovarialkarzinom-Zelllinien OVCAR-3 und SK-OV-3 zeigte sich bei der Betrachtung des Zellwachstums ein geringerer, aber dennoch signifikanter Effekt der Behandlung mit NIPP als dies für die Mammakarzinom-Zelllinien, sowie die Endometriumkarzinom- und Leiomyosarkom-Zelllinie der Fall war. Diese zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen stets eine mehr als fünfzigprozentige Reduktion des Zellwachstums nach NIPP Applikation. Die Ovarialkarzinom-Zellen scheinen also bei einer NIPP-Behandlung für 10 s stärker ausgeprägte Resistenzmechanismen gegenüber NIPP aufzuweisen, als die ebenfalls für 10 s behandelten Endometriumkarzinom- und Leiomyosarkom-Zellen. Das liegt möglicherweise an einer geringeren Entgiftungskapazität der Zellen gegenüber der

Redoxstress-vermittelnden Wirkung von NIPP. Eine wichtige Bedeutung haben dabei Superoxiddismutasen (SOD), welche in der Lage sind, den Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen zu modulieren (Deby und Goutier, 1990; Holley et al., 2012). So wurde gezeigt, dass SK-OV-3-Zellen vermehrt SOD exprimieren (Hu et al., 2005), während die SOD-Aktivität in Adenokarzinomen des Endometriums gegenüber benignen Läsionen und normalen Zellen reduziert war (Pejić et al., 2008).

Ein mit den Daten vergleichbares Verhalten hinsichtlich der proliferationshemmenden Wirkung von NIPP auf OVCAR-3 und SK-OV-3 wurde auch von Koensgen et al. nachgewiesen (Koensgen et al., 2017). In dieser Studie zeigte sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen NIPP- und Argon-behandelten Zellen erst bei 15 s Behandlungszeit, wohingegen dies in den hier vorliegenden Untersuchungen bereits nach 10 s Behandlungszeit der Fall war. Möglicherweise spielen hier anwenderspezifische Unterschiede bei der NIPP-Applikation eine Rolle. Gegebenenfalls könnte die NIPP-Behandlung mittels des Einsatzes weiterer Apparaturen standardisiert werden. Eine andere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Ovarialkarzinomzelllinie konnte hingegen in den Untersuchungen bereits nach 10 s Behandlungszeit deutlich effektiver in ihrem Wachstum inhibiert werden (Koensgen et al., 2017), sodass nicht die Entität allein, sondern vielmehr differenzierungsspezifische oder interindividuelle Faktoren hinsichtlich der Vulnerabilität gegenüber NIPP eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen.

4.2 NIPP stört die Membranfunktionalität

Essenziell für die Vitalität einer Zelle ist die Zytoplasmamembran, welche als Barriere dient sowie den Stoff- und Signaltransport vermittelt (Hauser, 2016). Während NIPP-induzierte Schäden bakterieller Membranen bereits eingehend analysiert wurden (Joshi et al., 2011; Yu et al., 2007), wurde die Wirkung auf Zytoplasmamembranen eukaryotischer Zellen bisher kaum untersucht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass NIPP das Membranpotential von Keratinozyten beeinflussen kann und die Membranpermeabilität von Chondro- und Osteosarkomzellen erhöht (Dezest et al., 2017; Haralambiev et al., 2020a; Haralambiev et al., 2020b). Zudem konnte im Rahmen von Transfektionsversuchen nachgewiesen werden, dass die Membranen von Fibrosarkom-Zellen, Adenokarzinom-Zellen

der Cervix sowie Mammakarzinom-Zellen mit Hilfe von Plasma permeabilisiert werden können (Sakai et al., 2006; Xu et al., 2016).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinom-Zellen sowie uterine Leiomyosarkom-Zellen durch eine Behandlung mit NIPP in ihrer Membranfunktionalität gestört werden, sodass niedermolekulare Verbindungen (≤ 10 kDa) die Zellmembran passieren können.

Die Zellen wurden hinsichtlich der Membranfunktionalität nach Behandlung mit NIPP mittels unterschiedlicher Methoden untersucht. Analysiert wurde einerseits die Aufnahme von an 10 kDa-Dextran gekoppelten FITC in den Intrazellularraum, welche nur dann erfolgen kann, wenn die Zytoplasmamembran geschädigt ist, da eine Permeabilität für das Farbstoffmolekül sonst nicht gegeben ist. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte die Akkumulation des Farbstoffs im Inneren der Zellen nachgewiesen werden (Sander et al., 2021). Es konnte für alle untersuchten Zelllinien gezeigt werden, dass nach einer Behandlung mit NIPP deutlich mehr Farbstoff im Intrazellularraum akkumuliert als dies in Argon-behandelten Kontroll-Zellen der Fall war.

Um Farbstoff-bedingte Limitationen auszuschließen und die Ergebnisse zu bestätigen, wurden die Zellen andererseits mittels Farbstoffverlust-Assay untersucht. Hier kam der membrangängige Farbstoff FDA zum Einsatz. Intrazellulär wird der Acetylrest des FDA durch Esterasen abgespalten, sodass das Molekül eine intakte Zytoplasmamembran im Anschluss nicht mehr passieren kann und im Zytoplasma akkumuliert (Cao et al., 2015). Bei postulierter Schädigung der Membran durch NIPP, verlässt das Molekül die Zelle jedoch wieder, sodass hier eine geringe Akkumulation des Farbstoffs in der Zelle Hinweise auf die Schädigung der Membran liefern konnte (Nitsch et al., 2019). Eine Beeinflussung der Färbung oder der Hydrolyse durch die Behandlung mit NIPP konnte dadurch ausgeschlossen werden, dass die Zellen zuerst mit dem FDA beladen wurden und erst anschließend die Applikation von NIPP erfolgte. Die durch NIPP verursachte Zellmembranschädigung konnte somit in dieser Arbeit in zwei voneinander unabhängigen Versuchen mit zwei verschiedenen Farbstoffen nachgewiesen werden. Auffällig war dabei, dass dieser Effekt bei steigender Behandlungszeit nicht oder nur kaum zunahm und somit weitestgehend unabhängig von der Behandlungszeit mit NIPP war. Dies steht im Kontrast zu dem bereits beschriebenen Verhalten der Osteosarkom-Zellen, für die sich durchaus eine

Konzentrationsabhängigkeit der Membranschädigung zeigte (Haralambiev et al., 2020a). Hieraus ergeben sich erneut Hinweise auf entitätsspezifische Unterschiede in den zellulären Antworten auf eine NIPP-Behandlung. Für die beiden Mammakarzinom-Zelllinien sowie für die Endometriumkarzinom- und die Leiomyosarkom-Zelllinie zeigte sich nach längerer Behandlungszeit überdies eine geringere Akkumulation des an 10 kDa-Dextran gekoppelten FITC intrazellulär als bei kürzerer Applikation des NIPP. Dies könnte jedoch auch darauf zurückzuführen sein, dass die Membran nach 30 s und 60 s Behandlung so stark geschädigt wurde, dass die Permeabilität zwar grundsätzlich erhöht werden und das Dextran in die Zelle gelangen konnte, die Zelle jedoch bei zu starker Schädigung ihrer Membran in nahezu ungehindertem Austausch mit der Umgebung steht, sodass der Farbstoff die Zelle teilweise auch wieder verlassen konnte. Obwohl die Behandlungszeiten für die Ovarialkarzinom-Zellen im Vergleich zum Wachstumsversuch bereits erhöht wurden, zeigte sich der für die anderen Zelllinien beschriebene Effekt der geringeren Akkumulation nach längerer Behandlungszeit hier nicht. Diese Zellen nahmen nach 60 s Behandlung mit NIPP noch geringfügig mehr Dextran auf als dies nach 20 s Behandlung der Fall war, sodass hier nicht von einer höhergradigen Schädigung der Zellen auszugehen war. Dies geht einher mit den Ergebnissen zur Untersuchung der Wachstumshemmung, in denen sich die Ovarialkarzinom-Zellen ebenfalls resistenter gegenüber der NIPP Behandlung als die anderen Zelllinien zeigten.

Darüber hinaus erfolgte eine Untersuchung der Zellantworten von Tumorzellen auf eine Behandlung mit NIPP mit einer farbstoff-unabhängigen Methode. So konnten toxische Effekte der Farbstoffe auf die Zellen, die die Ergebnisse möglicherweise verfälschen könnten, vollends ausgeschlossen werden. Mithilfe des Nachweises von endogen synthetisiertem ATP im zellfreien Überstand ließ sich zeigen, dass die Tumorzellen nach einer Behandlung mit NIPP ATP freisetzen (Sander et al., 2021). Azzariti et al. konnten eine Freisetzung von ATP nach Applikation von Plasma-aktiviertem Medium bereits für Pankreas-karzinom-Zellen sowie Melanom-Zellen nachweisen (Azzariti et al., 2019). Anders als in unseren Untersuchungen führten diese die ATP-Freisetzung jedoch auf NIPP-induzierte Damage-associated molecular patterns (DAMPs) zurück, die eine Aktivierung des Immunsystems und im Verlauf den immunogenen Zelltod herbeiführen können (Azzariti et al., 2019; Kepp et al., 2014). ATP wird also einerseits NIPP-induziert von apoptotischen Tumorzellen ausgeschüttet, was zur Aktivierung von Makrophagen führt (Lin et al., 2017).

Andererseits konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Freisetzung von ATP auch bereits unmittelbar nach der Behandlung mit NIPP stattfindet. Elliott et al. konnten erhöhte ATP-Konzentrationen im Überstand der Zellen erst 2 h nach einer Apoptoseinduktion nachweisen (Elliott et al., 2009). Da die ATP-Freisetzung nach Induktion von Apoptose nicht sofort nach der Behandlung mit NIPP zu erwarten ist, ergeben sich aus den Ergebnissen in dieser Arbeit Hinweise auf einen anderen Mechanismus der ATP-Freisetzung. Als eine weitere mögliche Ursache für die Freisetzung nach extrazellulär kommt wiederum ein Verlust der Membranintegrität der Zellen und damit eine Erhöhung der Permeabilität in Frage. Im Unterschied zu den farbstoffbasierten Untersuchungen der Membrandurchlässigkeit, zeigte sich für die ATP-Freisetzung eine Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit NIPP, sodass mit Ausnahme für die Leiomyosarkom-Zellen mit zunehmender Behandlungszeit mehr ATP extrazellulär nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise spielen Artefakte durch die Inkubation mit Farbstoffen für die Konzentrationsabhängigkeit eine Rolle. Denkbar wäre auch eine Beeinflussung durch die unterschiedlichen chemischen Strukturen, die je nach Methode über die permeabilisierte Membran transportiert wurden. Ein Verlust an Energieträgern könnte auch die Proliferationshemmung der Zellen erklären, die über 120 h nach NIPP-Applikation nachgewiesen werden konnte.

4.3 NIPP induziert Apoptose

Apoptose ist der programmierte Zelltod und hat eine wichtige Bedeutung für die Regulation und Homöostase einer Zellpopulation, die Entwicklung des Immun- und Nervensystems sowie die Beseitigung von durch Noxen oder Krankheiten geschädigten Zellen. Die Dysregulation der Apoptose spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Krebserkrankungen (Elmore, 2007). Um die Apoptose zu verhindern und damit auch indirekt eine ungehinderte Proliferation zu bahnen, können viele Tumorzellen anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 exprimieren und pro-apoptotische Proteine wie Bax inhibieren (Brahmbhatt et al., 2015; Kaufmann und Gores, 2000; Kim et al., 2004). Weiterhin kann es in malignen Zellen zur Herunterregulierung von Todesrezeptoren, wie zum Beispiel Fas kommen (Elmore, 2007; Kaufmann und Gores, 2000). Eine Kombination aus gesteigerter Proliferation von Tumorzellen und reduziertem Zellaustausch führt zur Anhäufung maligner Zellen im

Sinne eines Tumors (Kaufmann und Gores, 2000). Die Wiederherstellung der Apoptoseinduktion in Tumorzellen stellt folglich ein zentrales Ziel für die Behandlung von Krebserkrankungen dar. Auch Chemotherapeutika können die Apoptose in Tumorzellen einleiten (Kaufmann und Earnshaw, 2000).

Es sind verschiedene Faktoren bekannt, die zur Induktion des programmierten Zelltodes führen können. Dazu zählen Schädigungen der DNA, wie zum Beispiel Crosslinking oder Doppelstrangbrüche (Roos und Kaina, 2006) sowie oxidativer Stress (Fiers et al., 1999) und Calciumeinstrom in die Zellen (Nicotera und Orrenius, 1998). Zudem können Störungen der Zellmembran die Regulation und Signalkaskaden der Apoptose beeinflussen (Tekpli et al., 2013).

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass nach einer Behandlung mit NIPP in den Tumorzellen Apoptose induziert wird (Sander et al., 2021; Stope et al., 2020). Zudem zeigte sich eine Aktivitätszunahme der Caspasen 3 und 7. Diese zählen zu den Effektor-Caspasen (D'Arcy, 2019). Im Rahmen der Apoptose kommt es weiterhin zur Fragmentierung der DNA, welche durch Endonukleasen vermittelt wird (Zhang und Xu, 2000). Dazu zählt die Caspase-aktivierte DNase (CAD) (Mirzayans und Murray, 2020). Diese wird in nicht-apoptotischen Zellen durch den Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (ICAD) gebunden und dadurch inaktiviert. Caspasen können ICAD spalten, woraufhin CAD frei wird und zusammen mit der Endonuklease G die Fragmentation der DNA bewirkt (Larsen und Sørensen, 2017; Widlak und Garrard, 2005). Auf diese Weise entstehen freie 3'OH-Enden (Mirzayans und Murray, 2020).

Dieser Mechanismus konnte mittels TUNEL-Assay in den behandelten Tumorzellen nachgewiesen werden. Mittels einer Terminalen Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) können dabei markierte dUTP Nukleotide an die freien 3'OH-Enden gebunden werden, welche sich im Anschluss nachweisen lassen (Mirzayans und Murray, 2020). Obwohl der TUNEL-Assay nicht spezifisch ist für den Nachweis von DNA-Fragmenten, die im Rahmen der Apoptose entstanden sind, sondern generell freie 3'OH-Enden detektieren kann (Mirzayans und Murray, 2020), ist davon auszugehen, dass bei den hoch signifikanten Ergebnissen und einer vorhandenen Kontrolle, welche ohne NIPP-Behandlung ein deutlich geringeres Signal hinsichtlich des Nachweises der Fragmente zeigte, alternative Ursachen für frei vorliegende 3'-Hydroxylgruppen zu vernachlässigen sind (Mirzayans und

Murray, 2020). Die Ergebnisse des Caspase-3 und -7-Nachweises und jene des TUNEL-Assays waren für alle untersuchten Zelllinien vergleichbar. Es zeigte sich größtenteils ein Anstieg des apoptotischen Signals mit zunehmender Inkubationszeit. Für den Caspase-3/-7-Assay wurde jeweils eine Positivkontrolle mitgeführt, für die die Tumorzellen mit Staurosporin behandelt wurden. Es ist bekannt, dass Staurosporin die Apoptose durch die Aktivierung von Caspase 3 in Tumorzellen induzieren kann (Yadav et al., 2015; Zhang et al., 2005). Lediglich für die Leiomyosarkom-Zellen konnte kein erhöhtes Signal in der Staurosporin-Kontrolle nachgewiesen werden. Der Nachweis einer erhöhten Caspase-Aktivität nach NIPP-Behandlung gelang jedoch. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Bcl-2 zu einer Hemmung der Staurosporin-induzierten Apoptose in Melanomzellen führt (Zhang et al., 2004). Da bereits für vier Leiomyosarkom-Zelllinien (LMS04, LMS05, IB133 und IB140) eine erhöhte Expression von Bcl-2 nachgewiesen werden konnte, ist ein Zusammenhang auch für die von uns verwendete Zelllinie SK-UT-1 naheliegend (Graaff et al., 2016). Terefinko et al. konnten mittels alternativer Methoden ebenfalls nachweisen, dass die Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, nachdem sie in mit Physikalischem Plasma behandeltem Zellkulturmedium inkubiert wurden, apoptotisch werden (Terefinko et al., 2021). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die Endometriumkarzinom-Zelllinie HEC50 (Yoshikawa et al., 2020). Apoptose-aktivierende Effekte von NIPP wurden zudem bereits für verschiedene Entitäten, wie das Magenkarzinom (Bauer et al., 2019), das Osteosarkom (Haralambiev et al., 2020c), das Lungenkarzinom (Kim et al., 2011) und das Prostatakarzinom (Weiss et al., 2015) gezeigt. Kim et al. fanden weiterhin Hinweise dafür, dass NIPP in nicht-malignen Fibroblasten weniger intensiv Apoptose induziert als in Tumorzellen (Kim et al., 2011).

Durch den Nachweis der Apoptoseinduktion in den untersuchten Zellen, lässt sich schlussendlich auch die Wachstumsrestriktion der Zellpopulation erklären, die initial gezeigt werden konnte (Sander et al., 2021). Zudem könnten die nachgewiesenen Störungen der Membranintegrität der mit NIPP behandelten Tumorzellen sowie der Verlust des Energieträgers ATP eine Rolle für die Apoptoseinduktion spielen.

4.4 Klinische Perspektiven

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass NIPP das Wachstum von Mammakarzinom-, Ovarialkarzinom- und Endometriumkarzinom-Zellen sowie uterinen Leiomyosarkom-Zellen mittels der Induktion von Apoptose sowie Schädigungen der Zytoplasmamembran wirkungsvoll inhibieren kann. Diese Erkenntnisse geben zur Hoffnung Anlass, dass NIPP zukünftig auch klinische Anwendung finden und zur Behandlung gynäkologischer Tumoren eingesetzt werden könnte.

Insbesondere Ovarialkarzinome sind bekannt für eine peritoneale Metastasierung, welche sich häufig schon bei Diagnosestellung finden lässt. Trotz der Fortschritte in chirurgischer sowie medikamentöser Therapie des Ovarialkarzinoms ist die Peritonealkarzinose schwer zu behandeln (Lengyel, 2010; Pascual-Antón et al., 2021). Erste Untersuchungen in einem Mausmodell zeigen bereits, dass eine intraperitoneale Behandlung mit Plasma-aktiviertem Medium das Überleben von Mäusen, welchen zuvor Klarzellkarzinom-Zellen des Ovars in das Peritoneum injiziert wurden, verlängert (Nakamura et al., 2017). Denkbar wäre somit, dass Patientinnen in Kombination mit einer operativen und zytostatischen Therapie des Ovarialkarzinoms zusätzlich eine intraperitoneale Applikation von Plasma-aktivierten Flüssigkeiten erhalten. Vorstellbar ist auch ein ähnliches Vorgehen wie bei einer Peritoneallavage.

In der Therapie des Mammakarzinoms stellt die operative Therapie eine essentielle Behandlungskomponente dar (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Insbesondere im Rahmen einer brusterhaltenden Operation könnte eine intraoperative lokale NIPP-Behandlung zukünftig von Relevanz sein. So könnten möglicherweise wenige unerkannte verbliebene Tumorzellen mittels NIPP-aktivierter Apoptose zeitnah beseitigt werden und gleichzeitig der wundheilungsfördernde Effekt von NIPP ausgenutzt werden. Ein derartiger Einsatz von NIPP wäre auch zur Therapie solitärer Metastasen denkbar.

Erste Untersuchungen zeigen zudem, dass die Sensitivität von Chemotherapeutika mittels eines kombinierten Einsatzes mit NIPP modifiziert werden könnte (Köritzer et al., 2013; Nitsch et al., 2023).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Therapieoptionen gynäkologischer Krebserkrankungen mithilfe eines klinischen Einsatzes von NIPP potenziell erweitert werden

könnten. Hierzu sind jedoch weitere Untersuchungen, insbesondere in Tiermodellen notwendig, um die Übertragbarkeit der bisher gewonnenen Erkenntnisse auf *in vivo* Modelle und bisher kaum erforschte mögliche Langzeitwirkungen von NIPP beurteilen zu können.

5. Zusammenfassung

Gynäkologische Tumoren sind eine heterogene Gruppe von Krebserkrankungen. Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste Tumorerkrankung bei Frauen. Trotz Therapieansätzen, wie operative Tumorentfernung, Chemotherapie, antihormonelle Therapie, monoklonale Antikörper und Radiatio, ist das Mammakarzinom die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen. Das Ovarialkarzinom ist für die schlecht therapierbare peritoneale Metastasierung bekannt, wird häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und weist eine 5-Jahres-Überlebensrate von 47 % auf. Das Endometriumkarzinom ist in Deutschland die fünfthäufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau. Die Prognose ist für einige histologische Subtypen schlecht. Zudem treten bei Chemo- und Radiotherapie mitunter schwere Nebenwirkungen auf. Das uterine Leiomyosarkom ist selten, weist jedoch eine schlechte Prognose auf. Im Stadium IV liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 29 %. Über diese Faktoren hinaus erfordern Chemoresistenzen und teilweise schwere Nebenwirkungen die Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden für gynäkologische Tumorerkrankungen.

In den letzten Jahren hat sich der Einsatz von Nicht-invasivem physikalischen Plasma (NIPP) als vielversprechende potenzielle Behandlungsoption für Krebserkrankungen herausgestellt. Eine wachstumshemmende Wirkung von NIPP wurde für verschiedene Tumorzelllinien nachgewiesen. Die molekularen Antworten gynäkologischer Tumorzellen auf eine Behandlung mit NIPP sind Gegenstand dieser Forschungsarbeit.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die wachstumshemmende Wirkung von NIPP auf Mammakarzinom-, Ovarialkarzinom- und Endometriumkarzinom-Zellen sowie uterine Leiomyosarkom-Zellen einerseits aus einer Aktivierung von Caspasen und der Fragmentierung von DNA im Rahmen der Apoptose sowie andererseits einer Schädigung der Zytoplasmamembran resultiert. Dabei kommt es bei einer Permeabilitätserhöhung der Zellmembran zudem zu einem Verlust des Energieträgers ATP. Eine damit einhergehende reduzierte Stoffwechselleistung der Zellen erklärt zusätzlich die Proliferationshemmung.

Aus den in dieser Arbeit im Zellkulturmodell gewonnenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass NIPP eine vielversprechende Ergänzung der Therapiemöglichkeiten gynäkologischer Tumoren darstellt.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gating-Strategie	42
Abbildung 2: Auswertungsstrategie	43
Abbildung 3: Einfluss der Behandlung mit NIPP auf das Zellwachstum	52
Abbildung 4: Intrazelluläre Akkumulation von an 10-kDa-Dextran gekoppelten FITC in Mammakarzinom-Zellen	55
Abbildung 5: Intrazelluläre Akkumulation von an 10-kDa-Dextran gekoppelten FITC in Ovariakarzinom-Zellen	57
Abbildung 6: Intrazelluläre Akkumulation von an 10-kDa-Dextran gekoppelten FITC in Endometriumkarzinom-Zellen und uterinen Leiomyosarkom-Zellen	58
Abbildung 7: Farbstoffverlust-Assay mittels Durchflusszytometrie	61
Abbildung 8: ATP-Verlust-Assay	64
Abbildung 9: Caspase-3/7-Assay	67
Abbildung 10: TUNEL-Assay	69

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezugsquellen der Zelllinien	23
Tabelle 2: Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 3: Chemikalien	28
Tabelle 4: Gase	29
Tabelle 5: Kommerzielle Puffer und Lösungen	29
Tabelle 6: Kits und Reagenzien	30
Tabelle 7: Zellkulturmedien und -zusätze	31
Tabelle 8: Software	32
Tabelle 9: Übersicht der Zusammensetzung der Vollmedien und Umsetzungsverhältnisse	35
Tabelle 10: Messparameter für die Zellzahlbestimmung mittels CASY TT Cell Counter and Analyzer	38
Tabelle 11: Konzentrationen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	38
Tabelle 12: Übersicht der NIPP-Behandlungszeiten und Aussaat für den Farbstoff-Aufnahme-Assay	39
Tabelle 13: Übersicht der Belichtungszeiten für den Farbstoff-Aufnahme-Assay	40
Tabelle 14: Farbstoff-Gebrauchslösung für den Farbstoff-Verlust-Assay	41
Tabelle 15: NIPP-Behandlungszeiten für den ATP-Freisetzung-Assay	44
Tabelle 16: Übersicht der NIPP-Behandlungszeiten und Aussaat der Zellen für den Caspase-3/7-Assay	45
Tabelle 17: Caspase-3/7-Detektionslösung	46

Tabelle 18: Übersicht der NIPP-Behandlungszeiten und Aussaat der Zellen für den TUNEL-Assay	47
Tabelle 19: Zusammensetzung der 3,7 % Buffered Formaldehyde Solution	48
Tabelle 20: Zusammensetzung des Labeling Reaction Mix	49
Tabelle 21: Zusammensetzung des Labeling Reaction Mix für die Negativ-Kontrolle	49
Tabelle 22: Zusammensetzung der Strep-HRP Solution	50

8. Literaturverzeichnis

Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet* 2005; 366: 491–505

American Type Culture Collection. 2024. MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). Verfügbar unter https://www.atcc.org/products/htb-26?geo_country=de#characteristics (Zugriffsdatum: 06.07.2024)

Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkäs K, Roberts J, Lee A, Subramanian D, Leeneer K de, Fostira F, Tomiak E, Neuhausen SL, Teo ZL, Khan S, Aittomäki K, Moilanen JS, Turnbull C, Seal S, Mannermaa A, Kallioniemi A, Lindeman GJ, Buys SS, Andrulis IL, Radice P, Tondini C, Manoukian S, Toland AE, Miron P, Weitzel JN, Domchek SM, Poppe B, Claes KBM, Yannoukakos D, Concannon P, Bernstein JL, James PA, Easton DF, Goldgar DE, Hopper JL, Rahman N, Peterlongo P, Nevanlinna H, King M-C, Couch FJ, Southey MC, Winqvist R, Foulkes WD, Tischkowitz M. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med* 2014; 371: 497–506

Armstrong N, Ryder S, Forbes C, Ross J, Quek RG. A systematic review of the international prevalence of BRCA mutation in breast cancer. *Clin Epidemiol* 2019; 11: 543–561

Azzariti A, Iacobazzi RM, Di Fonte R, Porcelli L, Gristina R, Favia P, Fracassi F, Trizio I, Silvestris N, Guida G, Tommasi S, Sardella E. Plasma-activated medium triggers cell death and the presentation of immune activating danger signals in melanoma and pancreatic cancer cells. *Sci Rep* 2019; 9: 4099

Bárdos L, Baránková H. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. *Thin Solid Films* 2010; 518: 6705–6713

Bauer G, Sersenová D, Graves DB, Machala Z. Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Medium Trigger RONS-Based Tumor Cell Apoptosis. *Sci Rep* 2019; 9: 14210

Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet* 2008; 371: 303–314

Berek JS, Kehoe ST, Kumar L, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet* 2018; 143 Suppl 2: 59–78

Bernardini MQ, Gien LT, Lau S, Altman AD, Gilks B, Ferguson SE, Köbel M, Samouëlian V, Wesa M, Cameron A, Nelson G, Han G, Clarke B, Ho TC, Panzarella T, Atenafu EG, McAlpine JN. Treatment related outcomes in high-risk endometrial carcinoma: Canadian high risk endometrial cancer consortium (CHREC). *Gynecol Oncol* 2016; 141: 148–154

Bernhardt T, Semmler ML, Schäfer M, Bekeschus S, Emmert S, Boeckmann L. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 3873928

Bio-Techne. 2024. TACS-Sapphire. Verfügbar unter https://www.bio-techne.com/p/activity-assays/tacs-sapphire_4822-96-08 (Zugriffsdatum: 12.08.2024)

Böcker W, Kreipe H. Mamma. In: Böcker, W, Denk, H, Heitz, PU, Höfler, G, Kreipe, HH, Moch, H, Hrsg. *Pathologie*. München: Elsevier Urban & Fischer 2012: 811–826

Bossen C, Ingold K, Tardivel A, Bodmer J-L, Gaide O, Hertig S, Ambrose C, Tschopp J, Schneider P. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J Biol Chem* 2006; 281: 13964–13971

Brahmbhatt H, Oppermann S, Osterlund EJ, Leber B, Andrews DW. Molecular Pathways: Leveraging the BCL-2 Interactome to Kill Cancer Cells - Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Beyond. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 2671–2676

Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 165: 193–200

Brooks SE, Zhan M, Cote T, Baquet CR. Surveillance, epidemiology, and end results analysis of 2677 cases of uterine sarcoma 1989-1999. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 204–208

Brown AP, Jhingran A, Klopp AH, Schmeler KM, Ramirez PT, Eifel PJ. Involved-field radiation therapy for locoregionally recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2013; 130: 300–305

Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 2002; 84: 203–214

Calhoun BC, Collins LC. Recommendations for excision following core needle biopsy of the breast: a contemporary evaluation of the literature. *Histopathology* 2016; 68: 138–151

Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD, Procter M, Goldhirsch A, Azambuja E de, Castro G, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Al-Sakaff N, Lauer S, McFadden E, Leyland-Jones B, Bell R, Dowsett M, Jackisch C. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet* 2017; 389: 1195–1205

Cao G, Zhang M, Miao J, Li W, Wang J, Lu D, Xia J. Effects of X-ray and carbon ion beam irradiation on membrane permeability and integrity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J Radiat Res* 2015; 56: 294–304

Chen AM, Meric-Bernstam F, Hunt KK, Thames HD, Oswald MJ, Outlaw ED, Strom EA, McNeese MD, Kuerer HM, Ross MI, Singletary SE, Ames FC, Feig BW, Sahin AA, Perkins GH, Schechter NR, Hortobagyi GN, Buchholz TA. Breast conservation after neoadjuvant chemotherapy: the MD Anderson cancer center experience. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2303–2312

Chen Z-S, Tiwari AK. Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J* 2011; 278: 3226–3245

Clarke MA, Long BJ, Del Mar Morillo A, Arbyn M, Bakkum-Gamez JN, Wentzensen N. Association of Endometrial Cancer Risk With Postmenopausal Bleeding in Women: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med* 2018; 178: 1210–1222

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326: 1–16

Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res* 2015; 35: 3147–3154

Correa H. Li-Fraumeni Syndrome. *J Pediatr Genet* 2016; 5: 84–88

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 647–656

Curigliano G, Goldhirsch A. The triple-negative subtype: new ideas for the poorest prognosis breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2011; 2011: 108–110

Cytion. 2024a. OVCAR-3-Zellen. Verfügbar unter <https://www.cytion.com/de/OVCAR3-Zellen/300307> (Zugriffsdatum: 07.07.2024)

Cytion. 2024b. SK-OV-3 Cells. Verfügbar unter <https://www.cytion.com/SK-OV-3-Cells/300342> (Zugriffsdatum: 07.07.2024)

Cytion. 2024c. SK-UT-1 Cells. Verfügbar unter <https://www.cytion.com/SK-UT-1-Cells/300455> (Zugriffsdatum: 07.07.2024)

Dai X, Li J, Chen Y, Ostrikov KK. When Onco-Immunotherapy Meets Cold Atmospheric Plasma: Implications on CAR-T Therapies. *Front Oncol* 2022; 12: 837995

D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 2019; 43: 582–592

Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M, Medeiros Alencar VH, Badran A, Bonfill X, Bradbury J, Clarke M, Collins R, Davis SR, Delmestri A, Forbes JF, Haddad P, Hou M-F, Inbar M, Khaled H, Kielanowska J, Kwan W-H, Mathew BS, Mittra I, Müller B, Nicolucci A, Peralta O, Pernas F, Petruzella L, Pienkowski T, Radhika R, Rajan B, Rubach MT, Tort S, Urrútia G, Valentini M, Wang Y, Peto R. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* 2013; 381: 805–816

Deby C, Goutier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 399–405

Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., Österreichische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., Schweizerische Gesellschaft für

Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. Uterine sarcoma. Guideline of the DGGG and OEGGG (S2k-Level). AWMF online 2021; AWMF-Register-Nr.: 015-074

Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. S2k-Leitlinie - Rationaler therapeutischer Einsatz von kaltem physikalischem Plasma. AWMF online 2022; AWMF-Register-Nr.: 007-107

Dezest M, Chavatte L, Bourdens M, Quinton D, Camus M, Garrigues L, Descargues P, Arbault S, Burlet-Schiltz O, Casteilla L, Clément F, Planat V, Bulteau A-L. Mechanistic insights into the impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on human epithelial cell lines. *Sci Rep* 2017; 7: 41163

Duffaud F, Ray-Coquard I, Salas S, Pautier P. Recent advances in understanding and managing leiomyosarcomas. *F1000Prime Rep* 2015; 7: 55

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 366: 2087–2106

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011; 378: 771–784

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet* 2015; 386: 1341–1352

Eisen A, Fletcher GG, Gandhi S, Mates M, Freedman OC, Dent SF, Trudeau ME. Optimal systemic therapy for early breast cancer in women: a clinical practice guideline. *Curr Oncol* 2015; 22: 67-81

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 2009; 461: 282–286

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43–50

Engel C, Fischer C. Breast cancer risks and risk prediction models. *Breast Care (Basel)* 2015; 10: 7–12

Escribá PV, Nicolson GL. Membrane structure and function: relevance of lipid and protein structures in cellular physiology, pathology and therapy. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1838: 1449–1450

Europäische Union. 2024. ECIS - European Cancer Information System. Verfügbar unter <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/> (Zugriffsdatum: 05.08.2024)

Falcetta FS, Lawrie TA, Medeiros LR, Da Rosa MI, Edelweiss MI, Stein AT, Zelmanowicz A, Moraes AB, Zanini RR, Rosa DD. Laparoscopy versus laparotomy for FIGO stage I ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 10: CD005344

Fantz U, Lotter A. Blitze zum Anfassen: Plasmaphysik. *Physik in unserer Zeit* 2002; 33: 16–19

Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999; 18: 7719–7730

Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1371–1388

Förster S, Niu Y, Eggers B, Nokhbehshaim M, Kramer F-J, Bekeschus S, Mustea A, Stope MB. Modulation of the Tumor-Associated Immuno-Environment by Non-Invasive Physical Plasma. *Cancers (Basel)* 2023; 15: 1073

Francis P, Crown J, Di Leo A, Buyse M, Balil A, Andersson M, Nordenskjöld B, Lang I, Jakesz R, Vorobiof D, Gutiérrez J, van Hazel G, Dolci S, Jamin S, Bendahmane B, Gelber RD, Goldhirsch A, Castiglione-Gertsch M, Piccart-Gebhart M. Adjuvant chemotherapy with sequential or concurrent anthracycline and docetaxel: Breast International Group 02-98 randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 121–133

Frebourg T, Bajalica Lagercrantz S, Oliveira C, Magenheim R, Evans DG. Guidelines for the Li-Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes. *Eur J Hum Genet* 2020; 28: 1379–1386

Friedman CF, Hensley ML. Options for Adjuvant Therapy for Uterine Leiomyosarcoma. *Curr Treat Options Oncol* 2018; 19: 7

Fung MFK, Bryson P, Johnston M, Chambers A. Screening postmenopausal women for ovarian cancer: a systematic review. *J Obstet Gynaecol Can* 2004; 26: 717–728

Galaal K, Al Moundhri M, Bryant A, Lopes AD, Lawrie TA. Adjuvant chemotherapy for advanced endometrial cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 5: CD010681

Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB, Miles D, Coleman RL, Deurloo R, Chinot OL. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat Rev* 2020; 86: 102017

George S, Barysaukas C, Serrano C, Oduyebo T, Rauh-Hain JA, Del Carmen MG, Demetri GD, Muto MG. Retrospective cohort study evaluating the impact of intraperitoneal morcellation on outcomes of localized uterine leiomyosarcoma. *Cancer* 2014; 120: 3154–3158

George S, Serrano C, Hensley ML, Ray-Coquard I. Soft Tissue and Uterine Leiomyosarcoma. *J Clin Oncol* 2018; 36: 144–150

Gherzi D, Willson ML, Chan MMK, Simes J, Donoghue E, Wilcken N. Taxane-containing regimens for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 6: CD003366

Giordano SH, Temin S, Kirshner JJ, Chandarlapaty S, Crews JR, Davidson NE, Esteva FJ, Gonzalez-Angulo AM, Krop I, Levinson J, Lin NU, Modi S, Patt DA, Perez EA,

Perlmutter J, Ramakrishna N, Winer EP. Systemic therapy for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 2014; 32: 2078–2099

Goñi FM. The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1838: 1467–1476

Graaff MA de, Rooij MAJ de, van den Akker BEWM, Gelderblom H, Chibon F, Coindre J-M, Marino-Enriquez A, Fletcher JA, Cleton-Jansen A-M, Bovée JV. Inhibition of Bcl-2 family members sensitises soft tissue leiomyosarcomas to chemotherapy. *Br J Cancer* 2016; 114: 1219–1226

Hackenberg R, Hawighorst T, Hild F, Schulz KD. Establishment of new epithelial carcinoma cell lines by blocking monolayer formation. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 669–673

Haertel B, Woedtke T von, Weltmann KD, Lindequist U. Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma Possible Application in Wound Healing. *Biomol Ther (Seoul)* 2014; 22: 477–490

Haffty BG, Fischer D, Beinfield M, McKhann C. Prognosis following local recurrence in the conservatively treated breast cancer patient. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21: 293–298

Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* 1983; 43: 5379–5389

Haralambiev L, Nitsch A, Eienkel R, Muzzio DO, Gelbrich N, Burchardt M, Zygmunt M, Ekkernkamp A, Stope MB, Gumbel D. The Effect of Cold Atmospheric Plasma on the Membrane Permeability of Human Osteosarcoma Cells. *Anticancer Res* 2020a; 40: 841–846

Haralambiev L, Nitsch A, Jacoby JM, Strakeljahn S, Bekeschus S, Mustea A, Ekkernkamp A, Stope MB. Cold Atmospheric Plasma Treatment of Chondrosarcoma Cells Affects Proliferation and Cell Membrane Permeability. *Int J Mol Sci* 2020b; 21: 2291

Haralambiev L, Wien L, Gelbrich N, Lange J, Bakir S, Kramer A, Burchardt M, Ekkernkamp A, Gümbel D, Stope MB. Cold atmospheric plasma inhibits the growth of osteosarcoma cells by inducing apoptosis, independent of the device used. *Oncol Lett* 2020c; 19: 283–290

Hauser K. Aufbau und Synthese biologischer Membranen. In: Rassow, J, Hauser, K, Netzker, R, Deutzmann, R, Hrsg. *Biochemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2016: 345–362

Hawsawi YM, Al-Numair NS, Sobahy TM, Al-Ajmi AM, Al-Harbi RM, Baghdadi MA, Oyouni AA, Alamer OM. The role of BRCA1/2 in hereditary and familial breast and ovarian cancers. *Mol Genet Genomic Med* 2019; 7: e879

Heidemann LN, Hartwell D, Heidemann CH, Jochumsen KM. The relation between endometriosis and ovarian cancer - a review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2014; 93: 20–31

Heinrich PC, Koch H-G, Brix J. Apoptose – Der programmierte Zelltod. In: Heinrich, PC, Müller, M, Graeve, L, Hrsg. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2014: 633–637

Hensley ML, Barrette BA, Baumann K, Gaffney D, Hamilton AL, Kim J-W, Maenpaa JU, Pautier P, Siddiqui NA, Westermann AM, Ray-Coquard I. Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) consensus review: uterine and ovarian leiomyosarcomas. *Int J Gynecol Cancer* 2014; 24: 61-66

Holley AK, Dhar SK, Xu Y, St Clair DK. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino acids* 2012; 42: 139–158

Hu Y, Rosen DG, Zhou Y, Feng L, Yang G, Liu J, Huang P. Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2005; 280: 39485–39492

Huguet EL, McMahon JA, McMahon AP, Bicknell R, Harris AL. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res* 1994; 54: 2615–2621

Jacoby JM, Strakeljahn S, Nitsch A, Bekeschus S, Hinz P, Mustea A, Ekkernkamp A, Tzvetkov MV, Haralambiev L, Stope MB. An Innovative Therapeutic Option for the Treatment of Skeletal Sarcomas: Elimination of Osteo- and Ewing's Sarcoma Cells Using Physical Gas Plasma. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 4460

Joshi SG, Cooper M, Yost A, Paff M, Ercan UK, Fridman G, Friedman G, Fridman A, Brooks AD. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 1053–1062

Juhasz-Böss I, Gabriel L, Bohle RM, Horn LC, Solomayer E-F, Breitbach G-P. Uterine Leiomyosarcoma. *Oncol Res Treat* 2018; 41: 680–686

Kapp DS, Shin JY, Chan JK. Prognostic factors and survival in 1396 patients with uterine leiomyosarcomas: emphasis on impact of lymphadenectomy and oophorectomy. *Cancer* 2008; 112: 820–830

Kaufmann M, Hortobagyi GN, Goldhirsch A, Scholl S, Makris A, Valagussa P, Blohmer J-U, Eiermann W, Jackesz R, Jonat W, Lebeau A, Loibl S, Miller W, Seeber S, Semiglazov V, Smith R, Souchon R, Stearns V, Untch M, Minckwitz G von. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1940–1949

Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256: 42–49

Kaufmann SH, Gores GJ. Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* 2000; 22: 1007–1017

Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, Apetoh L, Aranda F, Barnaba V, Bloy N, Bracci L, Breckpot K, Brough D, Buqué A, Castro MG, Cirone M,

Colombo MI, Cremer I, Demaria S, Dini L, Eliopoulos AG, Faggioni A, Formenti SC, Fučíková J, Gabriele L, Gaipl US, Galon J, Garg A, Ghiringhelli F, Giese NA, Guo ZS, Hemminki A, Herrmann M, Hodge JW, Holdenrieder S, Honeychurch J, Hu H-M, Huang X, Illidge TM, Kono K, Korbelik M, Krysko DV, Loi S, Lowenstein PR, Lugli E, Ma Y, Madeo F, Manfredi AA, Martins I, Mavilio D, Menger L, Merendino N, Michaud M, Mignot G, Mossman KL, Multhoff G, Oehler R, Palombo F, Panaretakis T, Pol J, Proietti E, Ricci J-E, Riganti C, Rovere-Querini P, Rubartelli A, Sistigu A, Smyth MJ, Sonnemann J, Spisek R, Stagg J, Sukkurwala AQ, Tartour E, Thorburn A, Thorne SH, Vandenabeele P, Velotti F, Workenhe ST, Yang H, Zong W-X, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 2014; 3: e955691

Kim H-A, Lee JW, Nam SJ, Park B-W, Im S-A, Lee ES, Jung YS, Yoon JH, Kang SS, Lee S-J, Park KH, Jeong J, Cho S-H, Kim SY, Kim LS, Moon B-I, Lee MH, Kim TH, Park C, Jung SH, Gwak G, Kim J, Kang SH, Jin YW, Kim HJ, Han S-H, Han W, Hur MH, Noh WC. Adding Ovarian Suppression to Tamoxifen for Premenopausal Breast Cancer: A Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol* 2020; 38: 434–443

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

Kim R, Emi M, Tanabe K, Toge T. Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. *Cancer* 2004; 101: 2491–2502

Klopp A, Smith BD, Alektiar K, Cabrera A, Damato AL, Erickson B, Fleming G, Gaffney D, Greven K, Lu K, Miller D, Moore D, Petereit D, Schefter T, Small W, Yashar C, Viswanathan AN. The role of postoperative radiation therapy for endometrial cancer: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology evidence-based guideline. *Pract Radiat Oncol* 2014; 4: 137–144

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

Koivisto-Korander R, Martinsen JI, Weiderpass E, Leminen A, Pukkala E. Incidence of uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma in Nordic countries: results from NORDCAN and NOCCA databases. *Maturitas* 2012; 72: 56–60

Korbmacher C, Brenner B. Funktion und Interaktion von Zellen. In: Pape, H-C, Kurtz, A, Silbernagl, S, Hrsg. *Physiologie*. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag 2014: 39–82

Köritzer J, Boxhammer V, Schäfer A, Shimizu T, Klämpfl TG, Li Y-F, Welz C, Schwenk-Zieger S, Morfill GE, Zimmermann JL, Schlegel J. Restoration of sensitivity in chemo-resistant glioma cells by cold atmospheric plasma. *PloS one* 2013; 8: e64498

Kramer A, Bekeschus S, Matthes R, Bender C, Stope MB, Napp M, Lademann O, Lademann J, Weltmann K-D, Schauer F. Cold Physical Plasmas in the Field of Hygiene-Relevance, Significance, and Future Applications. *Plasma Process Polym* 2015; 12: 1410–1422

Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, Young RH. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2014

Larsen BD, Sørensen CS. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *FEBS J* 2017; 284: 1160–1170

Lax S, Dietel M, Löning T, Hauptmann S. Weibliche Geschlechtsorgane. In: Böcker, W, Denk, H, Heitz, PU, Höfler, G, Kreipe, HH, Moch, H, Hrsg. *Pathologie*. München: Elsevier Urban & Fischer 2012: 751–786

Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch* 2004; 444: 213–223

Lee M, Piao J, Jeon MJ. Risk Factors Associated with Endometrial Pathology in Premenopausal Breast Cancer Patients Treated with Tamoxifen. *Yonsei Med J* 2020; 61: 317–322

Leitlinienprogramm Onkologie. (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Version 4.4. AWMF online 2021; AWMF-Register-Nr.: 032-045OL

Leitlinienprogramm Onkologie. (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren Langversion 5.1. AWMF online 2022a; AWMF-Register-Nr.: 032/035OL

Leitlinienprogramm Onkologie. (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF). S3-Leitlinie Endometriumkarzinom, Langversion 2.0. AWMF online 2022b; AWMF-Register-Nr.: 032/034-OL

Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol* 2010; 177: 1053–1064

Lim E, Metzger-Filho O, Winer EP. The natural history of hormone receptor-positive breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 2012; 26: 688-694, 696

Lin A, Truong B, Patel S, Kaushik N, Choi EH, Fridman G, Fridman A, Miller V. Nanosecond-Pulsed DBD Plasma-Generated Reactive Oxygen Species Trigger Immunogenic Cell Death in A549 Lung Carcinoma Cells through Intracellular Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 966

Lorizio W, Wu AHB, Beattie MS, Rugo H, Tchu S, Kerlikowske K, Ziv E. Clinical and biomarker predictors of side effects from tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: 1107–1118

Malorni L, Shetty PB, Angelis C de, Hilsenbeck S, Rimawi MF, Elledge R, Osborne CK, Placido S de, Arpino G. Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 136: 795–804

Matei D, Filiaci V, Randall ME, Mutch D, Steinhoff MM, DiSilvestro PA, Moxley KM, Kim YM, Powell MA, O'Malley DM, Spirtos NM, Small W, Tewari KS, Richards WE, Nakayama J, Matulonis UA, Huang HQ, Miller DS. Adjuvant Chemotherapy plus Radiation for Locally Advanced Endometrial Cancer. *N Engl J Med* 2019; 380: 2317–2326

Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JPA. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 188–194

Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 2666–2676

Mirzayans R, Murray D. Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies? *Int J Mol Sci* 2020; 21: 9090

Mohd Nasir N, Lee BK, Yap SS, Thong KL, Yap SL. Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria. *Arch Biochem Biophys* 2016; 605: 76–85

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

Murray S, Briasoulis E, Linardou H, Bafaloukos D, Papadimitriou C. Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat Rev* 2012; 38: 890–903

Nakamura K, Peng Y, Utsumi F, Tanaka H, Mizuno M, Toyokuni S, Hori M, Kikkawa F, Kajiyama H. Novel Intraperitoneal Treatment With Non-Thermal Plasma-Activated Medium Inhibits Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. *Sci Rep* 2017; 7: 6085

National Cancer Institute. 2015. Cell Lines in the In Vitro Screen. Verfügbar unter https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/cell_list.htm (Zugriffsdatum: 20.03.2024)

Nicotera P, Orrenius S. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 1998; 23: 173–180

Nitsch A, Haralambiev L, Einkenkel R, Muzzio DO, Zygmunt MT, Ekkernkamp A, Burchardt M, Stope MB. Determination of In Vitro Membrane Permeability by Analysis of Intracellular and Extracellular Fluorescein Signals in Renal Cells. *In Vivo* 2019; 33: 1767–1771

Nitsch A, Qarqash S, Römer S, Schoon J, Ekkernkamp A, Niethard M, Reichert JC, Wasilew GI, Tzvetkov MV, Haralambiev L. Enhancing the Impact of Chemotherapy on Ewing Sarcoma Cells through Combination with Cold Physical Plasma. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 8669

Ognjanovic S, Olivier M, Bergemann TL, Hainaut P. Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: a review of the IARC TP53 database. *Cancer* 2012; 118: 1387–1396

Oliva E, Carcangiu ML, Carinelli SG, Ip P, Loening T, Longacre TA, Nucci MR, Prat J, Zaloudek CJ. Tumours of the uterine corpus - Mesenchymal tumours. In: Kurman, RJ, Carcangiu, ML, Herrington, S, Young, RH, Hrsg. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2014: 135–147

OMNI Life Science. 2024. Cell Counter CASY Cell counting & quality control with no limits. Verfügbar unter <https://www.ols-bio.de/products/cell-counter-casy> (Zugriffsdatum: 19.08.2024)

Onstad MA, Schmandt RE, Lu KH. Addressing the Role of Obesity in Endometrial Cancer Risk, Prevention, and Treatment. *J Clin Oncol* 2016; 34: 4225–4230

Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med* 2011; 62: 233–247

Pascual-Antón L, Cardeñes B, La Sainz de Cuesta R, González-Cortijo L, López-Cabrera M, Cabañas C, Sandoval P. Mesothelial-to-Mesenchymal Transition and Exosomes in Peritoneal Metastasis of Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 11496

Pejić S, Todorović A, Stojiljković V, Cvetković D, Lucić N, Radojčić RM, Sačić ZS, Pajović SB. Superoxide dismutase and lipid hydroperoxides in blood and endometrial tissue of patients with benign, hyperplastic and malignant endometrium. *An Acad Bras Cienc* 2008; 80: 515–522

Piezzo M, Chiodini P, Riemma M, Cocco S, Caputo R, Cianniello D, Di Gioia G, Di Lauro V, Di Rella F, Fusco G, Iodice G, Nuzzo F, Pacilio C, Pensabene M, Laurentiis M de. Progression-Free Survival and Overall Survival of CDK 4/6 Inhibitors Plus Endocrine Therapy in Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 6400

Privat-Maldonado A, Schmidt A, Lin A, Weltmann K-D, Wende K, Bogaerts A, Bekeschus S. ROS from Physical Plasmas: Redox Chemistry for Biomedical Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 9062098

Promega Corporation. 2024. CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability Assay. Verfügbar unter https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-2_0-assay/?tabset0=0 (Zugriffsdatum: 12.08.2024)

Ray-Coquard I, Pautier P, Pignata S, Pérol D, González-Martín A, Berger R, Fujiwara K, Vergote I, Colombo N, Mäenpää J, Selle F, Sehouli J, Lorusso D, Guerra Alía EM, Reint-haller A, Nagao S, Lefeuvre-Plesse C, Canzler U, Scambia G, Lortholary A, Marmé F, Combe P, Gregorio N de, Rodrigues M, Buderath P, Dubot C, Burges A, You B, Pujade-Lauraine E, Harter P. Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2019; 381: 2416–2428

Razavi P, Pike MC, Horn-Ross PL, Templeman C, Bernstein L, Ursin G. Long-term post-menopausal hormone therapy and endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 475–483

Reiazi R, Akbari ME, Norozi A, Etedadialiabadi M. Application of Cold Atmospheric Plasma (CAP) in Cancer Therapy: A Review. *Int J Cancer Manag* 2017; 10: e8728

Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin: Robert Koch-Institut 2016

Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland für 2019/2020 14. Ausgabe. Berlin: 2023

Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006; 12: 440–450

Sakai Y, Khajoe V, Ogawa Y, Kusuhara K, Katayama Y, Hara T. A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma. *J Biotechnol* 2006; 121: 299–308

Sander C, Nitsch A, Erb HHH, Egger EK, Haralambiev L, Eggers B, Kramer F-J, Weiss M, Mustea A, Stope MB. Non-Invasive Physical Plasma Enhances the Membrane

Permeability to Low Molecular Weight Compounds and Subsequently Leads to the Loss of Cellular ATP and the Devitalization of Epithelial Cancer Cells. *Appl Sci* 2021; 11: 9801

Schwärzler P, Timmerman D. IOTA-Modelle zur Beurteilung von Adnexbefunden. *Der Gynäkologe* 2018; 51: 178–187

Sedlmayer F, Sautter-Bihl M-L, Budach W, Dunst J, Fastner G, Feyer P, Fietkau R, Haase W, Harms W, Souchon R, Wenz F, Sauer R. DEGRO practical guidelines: radiotherapy of breast cancer I: radiotherapy following breast conserving therapy for invasive breast cancer. *Strahlenther Onkol* 2013; 189: 825–833

Semmler ML, Bekeschus S, Schäfer M, Bernhardt T, Fischer T, Witzke K, Seebauer C, Rebl H, Grambow E, Vollmar B, Nebe JB, Metelmann HR, Woedtke TV, Emmert S, Boeckmann L. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* 2020; 12: 269

Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang Y-B, Wolk A, Wentzensen N, Weiss NS, Webb PM, van den Brandt PA, van de Vijver K, Thompson PJ, Australian National Endometrial Cancer Study Group, Strom BL, Spurdle AB, Soslow RA, Shu X, Schairer C, Sacerdote C, Rohan TE, Robien K, Risch HA, Ricceri F, Rebbeck TR, Rastogi R, Prescott J, Polidoro S, Park Y, Olson SH, Moysich KB, Miller AB, McCullough ML, Matsuno RK, Magliocco AM, Lurie G, Lu L, Lissowska J, Liang X, Lacey JV, Kolonel LN, Henderson BE, Hankinson SE, Håkansson N, Goodman MT, Gaudet MM, Garcia-Closas M, Friedenreich CM, Freudenheim JL, Doherty J, Vivo I de, Courneya KS, Cook LS, Chen C, Cerhan JR, Cai H, Brinton LA, Bernstein L, Anderson KE, Anton-Culver H, Schouten LJ, Horn-Ross PL. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *J Clin Oncol* 2013; 31: 2607–2618

Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175: 720–731

Sinn H-P, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)* 2013; 8: 149–154

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177–182

Spring LM, Wander SA, Zangardi M, Bardia A. CDK 4/6 Inhibitors in Breast Cancer: Current Controversies and Future Directions. *Curr Oncol Rep* 2019; 21: 25

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

Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, Shi W, Jiang J, Yao P-P, Zhu H-P. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci* 2017; 13: 1387–1397

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209–249

Tekpli X, Holme JA, Sergent O, Lagadic-Gossmann D. Role for membrane remodeling in cell death: implication for health and disease. *Toxicology* 2013; 304: 141–157

Terefinko D, Dzimitrowicz A, Bielawska-Pohl A, Klimczak A, Pohl P, Jamroz P. The Influence of Cold Atmospheric Pressure Plasma-Treated Media on the Cell Viability, Motility, and Induction of Apoptosis in Human Non-Metastatic (MCF7) and Metastatic (MDA-MB-231) Breast Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 3855

Thermo Fisher Scientific. 2024a. CellEvent™ Caspase-3/7 Detection Reagents. Verfügbar unter https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10423?gclid=EAlaIQob-ChMIquOaw7zvhwMVwj4GAB1WJhciEAAYASAAEgKQHfD_BwE&ef_id=EAlaIQob-ChMIquOaw7zvhwMVwj4GAB1WJhciEAAYASAAEg-KQHfD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!447292198772!!!g!!!10506731179!109642167771&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con&gad_source=1 (Zugriffsdatum: 12.08.2024)

Thermo Fisher Scientific. 2024b. HRP-konjugiertes Streptavidin. Verfügbar unter https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N100?gclid=EAlaIQob-ChMIha614MbvhwMVkERBAh2ZBwx9EAAYASAAEglz4vD_BwE&ef_id=EAlaIQob-ChMIha614MbvhwMVkERBAh2ZBwx9EAAYASAAEglz4vD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!656675997051!!!g!!!13557419460!151059204200&cid=bid_pca_iel_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con&gad_source=1 (Zugriffsdatum: 12.08.2024)

Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, Gaudet MM, Jemal A, Siegel RL. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 284–296

van der Steen-Banasik E, Christiaens M, Shash E, Coens C, Casado A, Herrera FG, Ottevanger PB. Systemic review: Radiation therapy alone in medical non-operable endometrial carcinoma. *Eur J Cancer* 2016; 65: 172–181

van Loenhout J, Flieswasser T, Freire Boullosa L, Waele J de, van Audenaerde J, Marcq E, Jacobs J, Lin A, Lion E, Dewitte H, Peeters M, Dewilde S, Lardon F, Bogaerts A, Deben C, Smits E. Cold Atmospheric Plasma-Treated PBS Eliminates Immunosuppressive Pancreatic Stellate Cells and Induces Immunogenic Cell Death of Pancreatic Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 2019; 11: 1597

Wang M, Holmes B, Cheng X, Zhu W, Keidar M, Zhang LG. Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells. *PloS one* 2013; 8: e73741

Wang M, Hou L, Chen M, Zhou Y, Liang Y, Wang S, Jiang J, Zhang Y. Neoadjuvant Chemotherapy Creates Surgery Opportunities For Inoperable Locally Advanced Breast Cancer. *Sci Rep* 2017; 7: 44673

Wang W-L, Bones-Valentin RA, Prieto VG, Pollock RE, Lev DC, Lazar AJ. Sarcoma metastases to the skin: a clinicopathologic study of 65 patients. *Cancer* 2012; 118: 2900–2904

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

Wen K-C, Horng H-C, Wang P-H, Chen Y-J, Yen M-S, Ng H-T. Uterine sarcoma Part I - Uterine leiomyosarcoma: The Topic Advisory Group systematic review. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2016; 55: 463–471

Widlak P, Garrard WT. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 2005; 94: 1078–1087

Win AK, Reece JC, Ryan S. Family history and risk of endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2015; 125: 89–98

Winter-Roach BA, Kitchener HC, Dickinson HO. Adjuvant (post-surgery) chemotherapy for early stage epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 3: CD004706

Xu D, Wang B, Xu Y, Chen Z, Cui Q, Yang Y, Chen H, Kong MG. Intracellular ROS mediates gas plasma-facilitated cellular transfection in 2D and 3D cultures. *Sci Rep* 2016; 6: 27872

Xu X, Lai Y, Hua Z-C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep* 2019; 39: BSR20180992

Yadav SS, Prasad CB, Prasad SB, Pandey LK, Singh S, Pradhan S, Narayan G. Anti-tumor activity of staurosporine in the tumor microenvironment of cervical cancer: An in vitro study. *Life Sci* 2015; 133: 21–28

Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* 2016; 8: 15977–15995

Yang NJ, Hinner MJ. Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. *Methods Mol Biol* 2015; 1266: 29–53

Yin W, Falconer H, Yin L, Xu L, Ye W. Association Between Polycystic Ovary Syndrome and Cancer Risk. *JAMA Oncol* 2019; 5: 106–107

Yoshikawa N, Liu W, Nakamura K, Yoshida K, Ikeda Y, Tanaka H, Mizuno M, Toyokuni S, Hori M, Kikkawa F, Kajiyama H. Plasma-activated medium promotes autophagic cell death along with alteration of the mTOR pathway. *Sci Rep* 2020; 10: 1614

Yu QS, Huang C, Hsieh F-H, Huff H, Duan Y. Bacterial inactivation using a low-temperature atmospheric plasma brush sustained with argon gas. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 80: 211–219

Zhang JH, Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* 2000; 10: 205–211

Zhang XD, Gillespie SK, Hersey P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 187–197

Zhang Y, Yu S, Ou-Yang J, Xia D, Wang M, Li J. Effect of protein kinase C alpha, caspase-3, and survivin on apoptosis of oral cancer cells induced by staurosporine. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 1365–1372

Zhou X, Jiang W, Liu Z, Liu S, Liang X. Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Viruses* 2017; 9: 316

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274: 11549–11556

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben, meinen Dank aussprechen:

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung. Er hat mich zu jeder Zeit unterstützt, motiviert und mit seiner außerordentlich großen Erfahrung und wegweisenden Anregungen das Vorankommen meiner Arbeit maßgeblich beeinflusst. Sehr dankbar bin außerdem auch dafür, dass ich die initial in der Universitätsmedizin Greifswald begonnene Arbeit an der medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn fortsetzen konnte.

Zudem bedanke ich mich bei dem Direktor der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie des Universitätsklinikums Bonn Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea, der mir die Anfertigung dieser Arbeit, ebenfalls zunächst im gynäkologischen Forschungslabor der Universitätsmedizin Greifswald und anschließend an der Universität Bonn ermöglicht hat. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Schildberg danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin möchte ich mich bei dem Habilitanden Herrn Dr. med. Andreas Nitsch für seine exzellente Unterstützung und die vielen Ratschläge bedanken.

Ein großer Dank gilt auch den Mitarbeitenden des gynäkologischen Forschungslabors der Universitätsmedizin Greifswald unter der Leitung von Herrn Dr. rer. med. Damián Muzzio. Hier haben mich Herr Jens Ehrhardt und Frau Dr. rer. nat. Rebekka Eienkel engagiert eingewiesen und standen mir bei aufkommenden Schwierigkeiten unterstützend zur Seite. Frau Anja Choinowski danke ich für die Einarbeitung in die Zellkulturarbeiten.

Meinen Kommilitonen und Kollegen im Labor, die zu Freunden geworden sind, möchte ich für die intensive Zusammenarbeit und die gegenseitige Hilfsbereitschaft danken.

Von ganzem Herzen danke ich abschließend meinen Eltern und meiner Schwester, die mich ermutigt haben, diese Arbeit anzufertigen, mich auf meinem Weg in jeder Hinsicht unterstützt haben und immer für mich da waren.

Veröffentlichungen

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. 2023, 15: 481. doi: 10.3390/cancers15020481.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Sander C, Nitsch A, Erb HHH, Egger EK, Haralambiev L, Eggers B, Kramer F-J, Weiss M, Mustea A, Stope MB.

Non-Invasive Physical Plasma Enhances the Membrane Permeability to Low Molecular Weight Compounds and Subsequently Leads to the Loss of Cellular ATP and the Devitalization of Epithelial Cancer Cells.

Applied Sciences. 2021, 11: 9801. doi: 10.3390/app11219801.

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. doi: 10.21873/anticancerres.14640.