Expressionsmodulation der Hitzeschockproteine HSP27 und HSP70 in malignen Zellen nach Exposition gegenüber nicht-invasivem physikalischem Plasma

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Tabea Hebgen

aus Koblenz

2025

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea
2. Gutachterin: PD Dr. rer. nat. Gudrun Ulrich-Merzenich

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.07.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	**Einleitung**	8
1.1	Korrelierende maligne Erkrankungen zu den betrachteten Zelllinien	8
1.2	Hitzeschockproteine (HSP)	12
1.3	Grundlagen des NIPP	14
1.3.1	Physikalische Plasmaquellen: dielektrische Barriereentladung (DBD) und Atmosphären-Druck Plasma Jet (APPJ)	15
1.3.2	Nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP) in der Medizin	16
1.4	Zielsetzung der Arbeit	18
2.	**Material und Methoden**	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2	Chemikalien und kommerzielle Lösungen	21
2.1.3	Puffer und Lösungen	23
2.1.4	Antikörper	24
2.1.5	Zelllinien	25
2.1.6	Zellkultur: Medien und Zusätze	26
2.2	Zellbiologische Methoden	27
2.2.1	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	27
2.2.2	Kultivierung und Normalpassage von Zellen	28
2.2.3	Aussaat und Ernte von Zellen und Bestimmung der Zellzahl	28
2.2.4	Aussaat von Zellen und NIPP-Behandlung	29
2.2.5	Protein-Isolierung	31
2.2.6	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32

2.2.7	Western Blotting	34
2.2.8	Statistische Auswertung	35
3.	**Ergebnisse**	36
3.1	Nachweis des antiproliferativen Effekts von NIPP	36
3.2	Zeitabhängigkeit der NIPP-Effekte im 6-Well-Maßstab	40
3.2.1	OVCAR-3-Zellen	41
3.2.2	MCF-7-Zellen	44
3.2.3	LNCaP-Zellen	46
3.3	Analyse der Steroidrezeptor-assoziierten Hitzeschock-Proteine HSP27 und HSP70	48
3.3.1	OVCAR-3-Zellen	49
3.3.2	MCF-7-Zellen	51
3.3.3	LNCaP-Zellen	53
4.	**Diskussion**	55
5.	**Zusammenfassung**	67
6.	**Abbildungsverzeichnis**	68
7.	**Tabellenverzeichnis**	69
8.	**Literaturverzeichnis**	70
9.	**Erklärung zum Eigenanteil**	87
10.	**Danksagung**	88

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APPJ	Atmosphärendruck-Plasma-Jet
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
BSA	Bovine Serum Albumin
CA(P)P	Cold Atmospheric (Pressure) Plasma
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DBD	dielektrische Barriereentladung
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
engl.	englisch
ER	(engl. estrogen receptor) Östrogenrezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HOP	HSP70/90-Stabilizing Protein
HSP	Hitzeschockprotein
kHz	Kilohertz
Kinpen	kINPen® MED
klin.	klinisch

Konz.	Konzentration
LNCaP	Prostatakarzinomzelllinie LNCaP
max.	maximal
MC	Mammakarzinom
MCF-7	Mammakarzinomzelllinie MCF-7
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP)
NIPP	Nicht-invasives physikalisches Plasma
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NTPP	nicht-thermisches physikalisches Plasma
OC	Ovarialkarzinom
OVCAR-3	Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3
p	Signifikanz mit $p<0,05$ (*), $p\leq0,01$ (**) und $p\leq0,001$ (***)
PC	Prostatakarzinom
PR	Progesteronrezeptor
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RONS	reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

rpm	(engl. revolutions per minute) Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SDS	(engl. sodium dodecyl sulfate) Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	(engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese
slm	Standardliter pro Minute
Tab.	Tabelle
TBS-T	(engl. Tris-buffered saline with Tween) Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TEMED	(engl. tetramethylethylenediamine) N,N,N′,N′-Tetramethylethylendiamin
TTP	Tissue-Tolerable Plasma
V	Volt
v/v	(engl. volume per volume) Volumenprozent
VE	H_2O Vollentsalztes Wasser
W	Watt
w/v	(engl. weight per volume) Gewichtsprozent
x *g*	Zentrifugalkraft

1. Einleitung

1.1 Korrelierende maligne Erkrankungen zu den betrachteten Zelllinien

Nach Herzkreislauferkrankungen stellen Krebserkrankungen im Jahre 2020 die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt, 2022).
In den letzten Jahren konnten mit Target-spezifischen und Immuntherapien Alternativen zu den etablierten Methoden der (alleinigen) operativen Tumorentfernung, Radiatio und Chemotherapie erforscht und bei verschiedenen Indikationen in die Behandlungskonzepte integriert werden.
In dieser Arbeit wurde der mögliche expressionsregulierende Effekt einer Behandlung mit nicht-invasivem physikalischem Plasma (NIPP) auf Hitzeschockproteine (HSP) in hormonsensitiven Prostata-, Mamma- und Ovarialkarzinomzelllinien (LNCaP, MCF-7 und OVCAR-3) auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht.

Der häufigste bösartige Tumor des Mannes in Deutschland ist das Prostatakarzinom. Unter den tödlich verlaufenden Krebserkrankungen des männlichen Geschlechts stellt es die dritthäufigste Entität dar (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2021b). Der Tumor ist hierbei eine Alterserkrankung, die meist nach dem 50. Lebensjahr auftritt. Das Risiko eines 35-jährigen Mannes für eine Erkrankung liegt bei unter 0,1 %, steigt jedoch bei einem 75-jährigen auf ca. 6 % an (Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021c). Demnach wird in den kommenden Jahrzehnten aufgrund des demographischen Wandels die Inzidenz und Prävalenz des Prostatakarzinoms deutlich zunehmen.
Zwei Drittel der Tumoren werden in einem frühen Stadium diagnostiziert, was auf die Früherkennung mittels PSA-Bestimmung zurückgeführt werden kann. Die 5-Jahres-Überlebensrate der Betroffenen beträgt etwa 89 % (Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021c).
Als Risikofaktoren gelten hauptsächlich das Alter sowie eine positive Familienanamnese. Zudem erkranken Männer subsahara-afrikanischen Ursprungs weltweit am häufigsten. Zur Früherkennung ab 45 Jahren gehört eine Anamnese sowie die digital-rektale Untersuchung. Weiterhin kann eine PSA-Wert-Bestimmung angeboten werden

(Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2021b; Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021c). Hintergrund hierzu ist, dass eine kurative Behandlung des Prostatakarzinoms nur im organbegrenzten Stadium möglich ist und durch die Früherkennung eben solche organbegrenzte, aggressive Tumore bei asymptomatischen Männern mit einer Lebenserwartung von mindestens zehn Jahren erkannt werden sollen. Kritisch zu betrachten ist jedoch, dass hierbei auch Karzinome entdeckt werden, die einen asymptomatischen Verlauf genommen hätten (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2021b).
Das Staging erfolgt mittels UICC-Klassifikation (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2021b).

Analog dazu ist das Mammakarzinom die mit Abstand häufigste Krebserkrankung der Frau. Bei im Jahr 2018 über 70.000 Neuerkrankungen waren zu 99 % Frauen betroffen. Während etwa eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt, liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen bei 88 % und für Männer bei 84 % und ist damit vergleichbar hoch, wie bei den Prostatakarzinomen des Mannes. Anders als beim Prostatakarzinom sind jedoch etwa 30 % der betroffenen Frauen bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre (Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021a).
Trotzdem gilt als einer der wichtigsten Risikofaktoren das fortgeschrittene Alter. Als weitere Risikofaktoren gelten laut RKI vor allem hormonelle Faktoren, wie eine frühe erste und späte letzte Regelblutung, Kinderlosigkeit, oder ein hohes Alter zum Zeitpunkt der ersten Geburt. Auch eine Hormonersatztherapie zählt genauso zu den Risikofaktoren, wie Veränderungen des Brustgewebes. Der Lebensstil scheint ebenfalls Einfluss auf das Brustkrebsrisiko zu haben (Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021a). Es wurden bei familiärer Häufung auch genetische Risikofaktoren identifiziert. So konnte die Assoziation von BRCA1-Mutationen hauptsächlich mit dem Triple-negativem Subtyp des Mammakarzinoms gezeigt werden, während BRCA2-Mutationen vor allem mit dem Luminal-B Subtyp assoziiert ist (Ha et al., 2017). Frauen mit einer BRCA1- oder BRCA2-Tumorsuppressorgen-Mutation erkranken ca. 20 Jahre früher als Frauen ohne familiäres Risiko. Ihr Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, liegt bei ca. 60 %, das für ein kontralaterales Mammakarzinom bei 40 % und ihr Risiko für das Auftreten eines

Ovarialkarzinoms liegt bei 16-55 % (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2017). Für Frauen mit familiärer Belastung kann eine genetische Untersuchung zur Identifikation relevanter Mutationen infrage kommen, um eventuell risikoreduzierende Operationen wie z. B. eine prophylaktische Mastektomie diskutieren zu können.
Mittlerweile wurden weitere Risikogene für Brustkrebs identifiziert. Hierbei scheinen vor allem Mutationen von DNA-Reparaturgenen wie CHEK2, ATM, BRIP1 (FANCJ), PALB2 (FANCN) und RAD51C (FANCO) mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einherzugehen (Filippini und Vega, 2013).
Die gesetzliche Früherkennung umfasst für Frauen ab 30 Jahren eine jährliche klinische Untersuchung durch Inspektion, Palpation und Beurteilung des Lymphabflusses. Für Frauen zwischen 50 und 69 Jahren wird die Teilnahme am Nationalen Mammographie-Screening-Programm empfohlen. Auch die Sonographie kann zur zusätzlichen Diagnostik eingesetzt werden (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2017; Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021a).

Nach dem Mammakarzinom ist das Ovarialkarzinom die häufigste tödliche gynäkologische Krebserkrankung. Bis zum 85. Lebensjahr steigen die Erkrankungsraten kontinuierlich an. Dabei handelt es sich meist um seröse Adenokarzinome. Bei jüngeren Frauen unter 45 Jahren findet sich dagegen häufig ein Keimzelltumor. Das relative 5-Jahres-Überleben liegt bei 42 % und ist damit deutlich geringer als die des Mammakarzinoms und des Prostatakarzinoms. Eine günstigere Prognose haben die Patienten, wenn die Diagnose in einem früheren Krankheitsstadium erfolgt (Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021b).
Als Risikofaktoren gelten laut RKI vor allem das Alter, Übergewicht und hormonelle Faktoren, wie Kinderlosigkeit und Unfruchtbarkeit (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2021a; Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021b). Berufliche Exposition gegenüber Asbest sollte ebenfalls erfragt werden. Erbliche Tumorsyndrome begünstigen das Auftreten eines Ovarialkarzinoms. So finden sich beim familiären Brust- und Eierstockkrebssyndrom („hereditary breast ovarian cancer syndrome“, HBOC) vermehrt Mutationen in BRCA1 und BRCA2. Das familiäre nichtpolypöse Kolonkarzinomsyndrom (HNPCC, „hereditary non-

polyposis colorectal carcinoma syndrome“, Lynch-Syndrom) ist ebenfalls mit vermehrtem Auftreten von Ovarialkarzinomen assoziiert (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2021a). Außer BRCA1 und BRCA2 gelten unter anderem Mutationen in BRIP1 und RAD51C als Risikofaktoren für das Erkranken an einem Ovarial- und Mammakarzinom (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2021a; Moyer et al., 2020; Yang et al., 2020). Im Gegensatz dazu senkt die Einnahme oraler Kontrazeptive das Erkrankungsrisiko (Huber et al., 2020). Auch Parität und Laktation wirken protektiv.
Es steht bisher, anders als beim Mamma- und Prostatakarzinom, keine Screening-Untersuchung zur Verfügung, die die Mortalität nachweislich senkt (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2021a).

Als Therapieoptionen steht für alle drei Entitäten die operative Entfernung des Tumors bzw. des gesamten betroffenen Organs im Vordergrund. Des Weiteren werden Chemotherapie und Radiatio verwendet. Ergänzend können antihormonelle Therapien beim PC sowie beim MC eingesetzt werden. Für die Therapie des OC werden PARP-Inhibitoren verwendet (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2017, 2021a, 2021b). PARP-Inhibitoren inhibieren selektiv Tumorzellen mit BRCA1 und BRCA2 Mutationen. Dabei kommt das Prinzip der synthetischen Letalität zu tragen, bei dem der simultane Funktionalitätsverlust in BRCA und PARP1 zum Zelltod führt. Daher wird auch die Möglichkeit einer erfolgreichen Therapie nicht nur gegen das Ovarialkarzinom, sondern auch gegen Mammakarzinome bei BRCA-Mutationsträgerinnen diskutiert und erforscht (D'Andrea, 2018; Dréan et al., 2016).

1.2 Hitzeschockproteine (HSP)

HSP erfüllen physiologisch Funktionen bei der Faltung und Re-Faltung (fehlgefalteter) Proteine. Auch an der Stabilisierung, am Transport sowie an der Transkriptionsaktivität von Rezeptoren sind sie beteiligt (Culig und Santer, 2014; Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Mayer und Bukau, 2005; Pratt et al., 1996; Pratt und Toft, 1997; Pratt und Toft, 2003).

Die in dieser Arbeit betrachteten malignen Zelllinien entstammen Steroidhormonrezeptor-positiven Geweben. LNCaP ist AR-positiv (Culig und Santer, 2014), in MCF-7 können ER und PR nachgewiesen werden (Comşa et al., 2015; Horwitz et al., 1975) und in OVCAR-3 sowohl ER, PR, als auch AR (Akahira et al., 2002; Hamilton et al., 1983; Lin et al., 2021). Der AR spielt eine essentielle Rolle für die Progression und Metastasierung des Prostatakarzinoms (Culig und Santer, 2014; Heinlein und Chang, 2004; Singh und Kumar, 2005). Das Wachstum von Brustkrebs wird durch den ER stimuliert (Cheng und Balk, 2003; Singh und Kumar, 2005) und auch Ovarialkarzinome werden durch Steroidhormonrezeptoren stimuliert (Singh und Kumar, 2005).

Die Bindung von Liganden an die Liganden-bindende Domäne des Rezeptors führt bei Steroidhormonrezeptoren zu einer Dimerisierung des Hormon-Rezeptor-Komplexes. Der Komplex migriert in den Nucleus und bindet im Zellkern über Zinkfinger-Strukturen an palindromische Nucleotidsequenzen (hormone responsive element, HRE), wo er als Transkriptionsfaktor die Expression hormonsensitiver Gene reguliert (Beato, 1987; Beato et al., 1989; Cheng und Balk, 2003; Cole et al., 2019; Deutzmann, 2016; Kato, 1979; Singh und Kumar, 2005).

Rezeptor-HSP-Komplexe schützen die Rezeptoren vor proteolytischem Abbau (Erb et al., 2021; Pratt und Toft, 1997; Pratt et al., 2004). Insbesondere HSP27, HSP70 und HSP90 sind hierbei wichtige Faktoren. HSP70 liegt mit HSP90, HSP70/90-Stabilizing Protein (HOP) und den Co-Chaperonen HSP40 und p23 in einem Rezeptor-HSP-Komplex vor (Erb et al., 2021; Pratt und Toft, 2003). Auch HSP27 interagiert mit dem Rezeptor-HSP-Komplex. So stabilisiert es unter anderem den AR, vermittelt seinen Transport in den Nucleus und unterstützt bei dessen transkriptioneller Aktivität (Culig und Santer, 2014; Li et al., 2018; Zoubeidi et al., 2007).

Auf Basis dieser Interaktion mit den für die Tumorentitäten unerlässlichen

Steroidhormonrezeptoren ist eine mögliche Expressionskontrolle der HSP durch NIPP-Behandlung als Therapieprinzip in Betracht zu ziehen und genauer zu untersuchen.

Aber auch unabhängig von ihrer Funktion im Rezeptor-HSP-Komplex präsentieren sich die HSP als essentieller Faktor im Verständnis der molekularen Wirkweise von NIPP. In Tumorzellen konnten verglichen mit gesunden Zellen erhöhte Spiegel sowohl von HSP70, als auch von HSP27 nachgewiesen werden (Vostakolaei et al., 2019; Yun et al., 2019).

Verschiedene Studien weisen Zusammenhänge zwischen vermehrter Expression von HSP70 bzw. HSP27 und dem Stadium der Erkrankung sowie der Prognose nach (Bodzek et al., 2021; Lee et al., 2015; Sherman und Gabai, 2015; Voll et al., 2014). Eine direkte Beteiligung von HSP70 an den sogenannten „Hallmarks of Cancer“, den für das Überleben des Tumors erforderlichen Prozessen, konnte mehrfach gezeigt werden (Albakova et al., 2020; Sherman und Gabai, 2015; Wang et al., 2014). HSP tragen zur Karzinogenese, zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung von Tumoren bei (Wang et al., 2014; Wu et al., 2017; Yun et al., 2019). Auch Therapieresistenz ist mit einer erhöhten Expression von HSP vergesellschaftet (Wang et al., 2014).

Mehrere Therapieansätze zur Inhibition der HSP-Expression sind aktuelle Gegenstand der Forschung (Albakova et al., 2020; McConnell und McAlpine, 2013; Shevtsov et al., 2019; Wang et al., 2014).

Eine erhöhte Expression von HSP nach verschiedenen Therapien kann, laut verschiedenen in-vitro und in-vivo-Modellversuchen, als Resistenzmechanismus bewertet werden (Eyermann et al., 2021; Freund et al., 2019; Fuqua et al., 1994; Kimura et al., 2017; Li, 2008; Muschter et al., 2018; Rajesh et al., 2020; Sliutz et al., 1996; Stope et al., 2014; Stope et al., 2016; Tang et al., 2018; Tracz-Gaszewska et al., 2017; Vargas-Roig et al., 1998).

1.3 Grundlagen des NIPP

Plasma beschreibt ein ionisiertes, hochreaktives Gemisch aus neutralen Atomen und Molekülen, Ionen, Elektronen, reaktiven Molekülen, elektrischen Feldern und elektromagnetischer Strahlung (Isbary et al., 2013). Neben fest, flüssig und gasförmig bildet Plasma den vierten Aggregatzustand in der Physik. Erzeugt werden kann es durch verschiedene Methoden, zum Beispiel Mikrowellen, Strahlung oder hohe elektrische Spannung (Kong et al., 2009).

Um es für die medizinische Nutzung zu erzeugen, werden Elektronen in einem elektrischen Feld beschleunigt, sodass sie über die entstehende kinetische Energie Atome ionisieren können. Es werden Elektronen aus den Atomen frei, welche wiederum von dem elektrischen oder elektromagnetischen Feld angeregt werden und den Prozess so fortsetzen (Kletschkus et al., 2020). Energiegeladene Atome und Elektronen interagieren mit weiteren Bestandteilen des Plasmas sowie mit der Umgebung, sodass reaktive Spezies entstehen. Auch elektromagnetische Strahlung im sichtbaren und unsichtbaren Bereich wird emittiert. So ist einerseits ein Leuchten des Plasmas sichtbar, andererseits entstehen aber auch nicht-sichtbare Bestandteile wie UV-Licht (Woedtke et al., 2019). Genauer zu charakterisieren sind hierbei die emittierte UV-Strahlung in einem Wellenlängenbereich, der hauptsächlich UV-B-Strahlung (280-320 nm), aber auch UV-A- (320-400 nm) und UV-C-Strahlung (180–280 nm) umfasst, und die Infrarot-Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 700 nm bis 950 nm (Woedtke et al., 2013). Auch Wärme entsteht bei den beschriebenen Prozessen (Woedtke et al., 2019). Während sich die Medizin die entstehende Hitze in verschiedenen Bereichen für die Sterilisierung, Kauterisation und Koagulation zunutze macht, sind für die Anwendung am Patienten niedrigere Temperaturen erforderlich (Isbary et al., 2013). Hierfür kommt das sogenannte kalte oder nicht-thermische physikalische Plasma zum Einsatz. Bei dem Prozess der Ionisierung in kaltem physikalischem Plasma wird wenig kinetische Energie an die Atome oder Moleküle selbst übertragen, sodass die Temperatur des Plasmas sich nur leicht über die Körpertemperatur erhöht (Kletschkus et al., 2020). Alternativ können ungeladenen Atome durch Gas oder umgebende Luft gekühlt werden. Die so generierten Plasmen erreichen Temperaturen von unter 40 °C (Isbary et al., 2013).

Die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung „nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP)“ wird synonym zu den Begriffen „Tissue-Tolerable Plasma (TTP)“, „Cold Atmospheric (Pressure) Plasma (CA(P)P)“ sowie „nicht-thermisches physikalisches Plasma (NTPP)“ verwendet.

Kalte Plasmen können im Wesentlichen durch drei unterschiedliche Verfahren generiert werden.
Direktem Plasma dient das Gewebe als Elektrode und das Plasma entsteht zwischen der Gerätesonde und der Körperoberfläche. Die am häufigsten verwendete Plasmaquelle dieser Art ist die dielektrische Barriereentladung (DBD).
Indirekte Plasmen werden zwischen zwei Elektroden produziert und in einem Gasstrom zu ihrem Applikationsort geleitet. Hierzu zählt unter anderem der Atmosphären-Druck Plasma Jet (APPJ).
Hybride Plasmen kombinieren beide Techniken (Isbary et al., 2013; Kong et al., 2009).

1.3.1 Physikalische Plasmaquellen: dielektrische Barriereentladung (DBD) und Atmosphären-Druck Plasma Jet (APPJ)

DBD besteht aus zwei Metallelektroden, welche mit einem dielektrischen Material beschichtet sind. Bei klassischen DBD-Plasmaquellen ist eine Elektrode die Erdungselektrode, während die andere die Hochspannungselektrode darstellt. Zwischen den Elektroden befindet sich das Trägergas. In diesem Bereich finden die Ionisierungsprozesse und damit die Plasmabildung statt. Die erforderliche Energie wird durch eine an die Elektroden angelegte hohe Wechselspannung zwischen 10 W und 100 W erzeugt. So können DBDs mit Frequenzen im hohen kHz-Bereich betrieben werden (Hoffmann et al., 2013; Kogelschatz, 2003; Pietsch, 2001).

Die zwei koaxialen Elektroden des APPJ werden von einer äußeren, geerdeten Elektrode und einer zentralen Elektrode gebildet. An die zentrale Elektrode wird Radiofrequenzspannung zwischen 50-100 W angelegt bei einer Frequenz von 13,56 MHz angelegt. Zwischen den Elektroden fließt das Trägergas (Hoffmann et al., 2013).

Der für diese Arbeit als Plasmaquelle verwendete Plasmajet kINPen® MED (Kinpen; neoplas tools GmbH, Greifswald, Deutschland) besteht aus einem Handinstrument, dessen Form an einen Stift erinnert, einem Gaszufuhrsystem mit Argon als Trägergas und einem Hochfrequenzgenerator für die elektrische Spannung. Das Trägergas fließt mit 3-5 slm durch eine Kapillare, in deren Zentrum sich eine Elektrode befindet. Umgeben wird die Kapillare von der geerdeten Elektrode. Der Pen produzierte einen etwa 10 mm langen Plasma-Effluent. Je nach Modell werden Frequenzen um 1 MHz bei einer Spannung von 2-6 kV für den Betrieb des Kinpen verwendet. Die Temperatur des so erzeugten NIPP bewegt sich laut Literaturangaben zwischen 35-38 °C (Reuter et al., 2018; Woedtke et al., 2019).

1.3.2 Nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP) in der Medizin

In den letzten Jahren konnte sich NIPP zunehmend als therapeutisches Agens in der Medizin etablieren. Beispielsweise sind neben dem Kinpen zwei weitere Geräte, welche auf APPJ- bzw. DBD-Technik basieren, für die klinische Anwendung in der Therapie von Wunden zugelassen: PlasmaDerm® VU-2010 (CINOGY GmbH plasma technology for health, Duderstadt, Germany) und SteriPlas (Adtec Ltd., London, United Kingdom) (Bernhardt et al., 2019).

Dabei werden sich verschiedene Wirkungen des NIPP zunutze gemacht. Hauptsächlich finden drei Eigenschaften des Plasmas Anwendung in der Medizin: seine bakterieninaktivierende Wirkung, welche auch bei multiresistenten Keimen wirksam ist, die Stimulation der Zellproliferation und Angiogenese bei niedriger Intensität und die Induktion des Zelltodes, vor allem von Krebszellen, bei höherer Intensität (Woedtke et al., 2019).

Schon 1996 konnte Laroussi feststellen, dass Plasma in einem Medium enthaltene Mikroorganismen tötet, ohne dabei das Medium zu zerstören (M. Laroussi, 1996). Verschiedene Studien weisen Wirkungen von NIPP unter anderem gegen Pilze, Parasiten, *Escherichia coli*, Gruppe A Streptokokken (u.a. *Streptococcus pyogenes*),

Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) und *Pseudomonas aeruginosa* nach (Bernhardt et al., 2019; Daeschlein et al., 2012; Kramer et al., 2015).
Die Kombination von antimikrobiellen mit heilungsfördernden Prozesse legt vor allem eine Anwendung in der Therapie chronischer Wunden nahe. Hier konnten in klinischen Studien bereits Erfolge mit schnelleren Wundheilungszeiten und verringerten Kontaminationen der Wunden verzeichnet werden (Bernhardt et al., 2019; Chuangsuwanich et al., 2016; Ulrich et al., 2015; Woedtke et al., 2013; Woedtke et al., 2019).
Auch der Hintergrund eines proliferations- und angiogenesefördernden Effekts von NIPP wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen (Arndt et al., 2013; Haertel et al., 2014a; Haertel et al., 2014b; Kalghatgi et al., 2010).

Die molekulare Wirkung von NIPP gegen Krebszellen ist nicht abschließend geklärt, basiert nach den Erkenntnissen verschiedener Studien jedoch vermutlich auf mehreren Mechanismen. Wie auch für den antimikrobiellen Effekt, scheint in vitro für den wachstumsinhibierenden Effekt auf Krebszellen hauptsächlich die Produktion von RONS durch NIPP und der damit einhergehend Redoxstress für die Zelle verantwortlich zu sein (Ahn et al., 2014; Girard et al., 2016; Woedtke et al., 2019; Yan et al., 2017; Zhao et al., 2013). Der erhöhte Redoxstress betrifft dabei maligne Zellen stärker als physiologische, da hier das basale Niveau an RONS bereits erhöht ist (Trachootham et al., 2009; Yan et al., 2017). Dies erklärt möglicherweise die Beobachtung, dass NIPP einen stärkeren Effekt auf Krebszellen, als auf gesundes Gewebe zeigt (Yan et al., 2015; Yan et al., 2017). Zu dieser relativen Selektivität trägt möglicherweise auch eine veränderte Expression von Aquaporinen in Krebszellen bei, welche die Aufnahme von RONS in die Zelle steigern (Semmler et al., 2020; Yan et al., 2017). Als weitere Faktor für die Wirkung des NIPP gegen entartete Zellen wurden eine Veränderung der Membranzusammensetzung und -durchlässigkeit sowie eine Schädigung der DNA mit folgender Auslösung der Apoptose festgestellt (Yan et al., 2015). Weitere beobachtete Wirkungen der NIPP-Applikation sind die Veränderung des Tumormikroenvironments sowie eine induzierte Immunantwort nach Behandlung (Semmler et al., 2020).
Insgesamt weisen zahlreiche Studien in vitro und in vivo eine wachstumshemmende und zytozide Wirkung des NIPP auf unterschiedliche maligne Zellen nach (Gay-Mimbrera et al., 2016; Koensgen et al., 2017; Partecke et al., 2012; Stope et al., 2020; Weiss et al., 2015a; Yan et al., 2017).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

NIPP kommt als neue Therapieoption bei verschiedenen Karzinomen infrage. Um eine sichere Anwendung am Patienten zu garantieren und die Risiken und Nebenwirkungen einer Therapie abschätzen zu können, muss ein genaueres Verständnis der molekularen Wirkung des NIPP erreicht werden.
Eine HSP-Expressionshemmung erscheint aufgrund der umfassenden Beteiligung der HSP an der Krebsprogression eine mögliche Wirkweise des NIPP darzustellen.
Im Gegensatz dazu kann eine gesteigerte HSP-Expression nach NIPP-Behandlung ein Hinweis auf induzierte Resistenzen sein.
Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Wirkung einer NIPP-Exposition auf die Expression von HSP70 und HSP27 zu charakterisieren.
Hierzu wurde zunächst der wachstumsinhibierende Effekt von NIPP auf OVCAR-3-, MCF-7- und LNCaP-Zellen nachgewiesen und anschließend mittels Western Blot die Expression der HSP ermittelt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	**Hersteller**
15 ml Röhrchen	Corning Science Mexico (Reynosa, Mexiko)
50 ml Falcon	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Absaugvorrichtung Integra Vacusafe	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
CASY Model TT – Cell counter and Analyzer	OMNI Life Science (Bremen)
CASYcup	OMNI Life Science (Bremen)
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN® Tetrasystem	Bio-Rad Laboratories (München)
Feinwaage ABS 120-4	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Filterpapier	Whatman (Dassel)
Filterspitzen SafeSeal Tips Professional	VWR (Leuven, Belgien)
Gewebekulturflasche 25 cm^2	Sarstedt (Nümbrecht)
Gewebekulturflasche 75 cm^2	Sarstedt (Nümbrecht)
Glaspasteurpipette	VWR International (Darmstadt)
Heizblock QBT 1	CLF Laborgeräte (Emersacker)

Inkubator Heracell 240	Heraeus (Hanau)
Inkubator MCO-170 AICD-PE	PHCbi (AZ Etten-Leur, Niederlande)
KL2 Schüttel-Misch-Gerät	Edmund Bühler GmbH (Bodelshausen)
Magnetrührer IKA RH basic 2	VWR International (Darmstadt)
Mikroskop AE31E	Motic (Wetzlar)
Mikrozentrifuge	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Molekulares Imaging-System Azure 300	Azure biosystems (Dublin, Irland)
Nitrozellulose-Membran PROTEAN®	Whatman (Dassel)
pH-Meter FiveEasyTM FE20	Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Schweiz)
Pipettensatz, 0,5-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand (Wertheim)
Plasmajet kINPen®MED	neoplas med (Greifswald)
PowerPackTM Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories (München)
Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Rollmischer RS-TR 5	Phoenix Instruments (Garbsen)
SDS-PAGE Zubehör Mini-PROTEAN® System	Bio-Rad Laboratories (München)
Serologische Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt (Nümbrecht)

Sterilbank HERA safe	Heraeus Instruments (Hanau)
Sterilbank safe 2020	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
Thermocycler Personal Cycler	Biometra (Göttingen)
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories (München)
Vortex Mixer RS-VA10	Phoenix Instrument (Garbsen)
Waage EMB 2000-2	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Wasserbad	Memmert (Büchenbach)
Zellkulturplatte CELL + 6 well	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)

2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

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

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

Kommerzielle Lösung	**Hersteller**
CASYblue	OMNI Life Science (Bremen)
CASYclean	OMNI Life Science (Bremen)
CASYton	OMNI Life Science (Bremen)

DNase I (260 U/µl)	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Prestained protein marker	PAN Biotech (Aidenbach)
Roti®-Block, 10x Konzentrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese®NF/Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1)	Carl Roth, Karlsruhe
SuperBlock™ (PBS) Blockierpuffer	Thermo Scientific (Rockford, USA)
SuperSignal™ West Dura	Thermo Scientific (Rockford, USA)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	**Herstellung**
BSA-Antikörperlösung 5 % für 1. Antikörper; 50 ml	2,5 g BSA in 50 ml TBS-T
BSA-Antikörperlösung 5 % für 2. Antikörper; 50 ml	2,5 g BSA in 50 ml TBS-T, 0,01g SDS
Lämmlipuffer 2x; 10 ml	1 ml Tris-HCl (100 mM) (pH 6,8), 0,4 g SDS, 0,2 ml Glycerol, 0,002 g Bromphenolblau, mit VE H_2O auf 10 ml auffüllen
Laufpuffer 10x; pH 8,3; 2 l	75,5 g Tris (0,31 M), 360 g Glycin (2,4 M), 25 g SDS (43 mM), in 2000 ml VE H_20
Laufpuffer 1x, 1 l	70 ml 10x-Laufpuffer, 630 ml VE H_2O
Milchblock 5 %; 100 ml	5 g Milchpulver in 100 ml TBS-T

Ponceau-S	0,1 % w/v Ponceau S; 5 % v/v Essigsäure
Roti®-Block-Antikörperlösung; 50 ml	5 ml Roti®-Block, 45 ml TBS-T
Sammelgelpuffer; pH 6,0; 250 ml	15,52 g Tris (0,5 M) in 250 ml VE H_20
SDS 10x; 50 ml	50 g SDS in 50 ml VE H_2O
Transferpuffer 20x; 1 l	109 g Tris (0,9 M), 58,5 g Glycin (0,78 M), 75 ml 10 % SDS (0,75 %), in 1 l VE H_2O
Transferpuffer 1x; 2 l	100 ml 20x Transferpuffer, 400 ml Ethanol, 1500 ml VE H_2O
Trenngelpuffer; pH 8,8; 1 l	181,71 g Tris (1,5 M) in 1 l VE H_2O
Tris-HCl, pH 6,8, 1 l	121,1 g Tris in 900 ml VE H_2O, mit HCl pH einstellen, mit VE H_2O auf 1 l auffülllen
Waschpuffer/TBS-Puffer 10x; pH 7,6; 1 l	46,6 g Tris (385 mM), 87,7 g NaCl (1,5 M), in 1 l VE H_2O
Waschpuffer/TBS-T 1x; 1 l	100 ml 10x-TBS, 900 ml VE H_2O, 1ml Tween

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper	**Gebrauchsverdünnung**	**Hersteller**
Anti-HSP70 rat	1:10.000	Cell Signaling Technology, (Danvers, USA)
Anti-HSP27 mouse	1:10.000	Cell Signaling Technology, (Danvers, USA)

Anti-GAPDH rabbit	1:10.000	Cell Signaling Technology, (Danvers, USA)

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

2.1.5 Zelllinien

Zelllinie	**Hersteller**
LNCaP (Cytion Katalognummer 300265), Klon FGC, Donor: 50-jähriger kaukasischer Mann, 1977 aus Lymphknotenmetastase bei metastasierendem Prostatakarzinom entnommen, laut Produktblatt positiv für AR und ER	CLS Cell Lines Service (Eppelheim)
MCF-7 (Cytion Katalognummer 300273), Subtyp Luminal A des Mammakarzinoms, Donor: 69-jährige kaukasische Frau mit metastasierendem Adenokarzinom, 1970 entnommen, laut Produktblatt positiv für PR und Wildtyp und Variante des ER	CLS Cell Lines Service (Eppelheim)

OVCAR-3 (Cytion Katalognummer 300307), Donor: 60-jährigen kaukasische Frau, 1982 aus malignem Aszites bei progressivem Adenokarzinom des Eierstocks gewonnen, laut Produktblatt positiv für AR, ER und PR	CLS Cell Lines Service (Eppelheim)

2.1.6 Zellkultur: Medien und Zusätze

Produkt	**Hersteller/Herstellung**
DMEM/F12	PAN Biotech (Aidenbach)
DPBS	PAN Biotech (Aidenbach)
Einfriermedium	Kulturmedium der jeweiligen Zelllinie, 40 % FBS, 10 % DMSO
Fetales Rinderserum FBS	PAN Biotech (Aidenbach)
Gentamycin	PAN Biotech (Aidenbach)
Insulin-Transferrin-Selenium Ethanolamine (ITS-X)	Gibco® Life Technologies (Carlsbad, USA)
RPMI 1640	PAN Biotech (Aidenbach)
Trypsin/EDTA 10x	PAN Biotech (Aidenbach), enthält 0,5 % Trypsin / 0,2 % EDTA
Trypsin 1x	5 ml 10x Trypsin, 45 ml DPBS

Zellinie	**Medium und Zusätze**
LNCaP	RPMI 1640, 10 % FBS (hitzeinaktiviert), 0,125 % Gentamycin
MCF-7	DMEM/F12, 10 % FBS (hitzeinaktiviert), 0,125 % Gentamycin
OVCAR-3	RPMI 1640, 10 % FBS (hitzeinaktiviert), 0,125 % Gentamycin, 0,1 % Insulin

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden zur dauerhaften Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dafür wurden Zellen niedriger Passage durch Inkubation mit 2 ml 1x Trypsin (0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA) aus der Kulturflasche (75 cm^2) gelöst. Nach Resuspension mit 4 ml Medium wurde die Zellsuspension für 3 min bei 300 x *g* zentrifugiert, um das Zellsediment vom Überstand zu trennen. Dieses Zellsediment wurde in 2 ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryo-Röhrchen gegeben und für 24 h in Isopropanol bei -80 °C gelagert, bevor die Zellen im flüssigen Stickstoff bei einer Temperatur von -196 °C eingefroren wurden.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch vorsichtiges Erwärmen der Kryo-Röhrchen für 30 s im 37 °C warmen Wasserbad mit anschließender Resuspension in 10 ml angewärmtem Zellkulturmedium. Die Suspension wurde bei 300 x *g* für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine Zellkulturflasche (75 cm^2) mit 10 ml Medium überführt. Die Zellen wurden im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.2 Kultivierung und Normalpassage von Zellen

Vor der Passage wurden zunächst lichtmikroskopisch Konfluenz, Morphologie und Vitalität der Zellen beurteilt. Ab einer Konfluenz von etwa 80 % wurde passagiert. Hierzu wurde das Zellmedium abgesaugt und die Zellen anschließend mit DPBS gespült, um tote Zellen sowie Rückstände des Mediums zu entfernen. Die adhärenten Zellen wurden mit 2 ml 1x Trypsin (0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA) bei 37 °C für bis zu 5 min inkubiert und so aus dem Zellverband und vom Flaschenboden abgelöst. Durch Resuspension mit 4 ml Zellmedium wurden weiterhin anhaftende Zellen ebenfalls gelöst und die so entstandene Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon pipettiert. Durch dreiminütige Zentrifugation bei 300 x *g* wurden die Zellen vom Überstand separiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in 1 ml Medium resuspendiert. Das Umsetzen in eine T75-Zellkulturflasche mit 10 ml frischem Medium erfolgte, je nach Zelllinie und aktuellem Bedarf, in Verhältnissen zwischen 1:2 bis 1:10.
Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 2 bis 30 verwendet.

2.2.3 Aussaat und Ernte von Zellen und Bestimmung der Zellzahl

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden 6-Well-Zellkulturplatten verwendet. Wie beim Passagieren der Zellen, wurden diese mit 1x Trypsin (0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA) und Medium aus der Zellkulturflasche gelöst und das entstandene Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. 50 µl wurden in 10 ml CASYton resuspendiert und der CASYcup vor der Messung 5-mal invertiert. Für die Zellzählung verwendet wurde das CASY Cell Counter + Analyser System Model TT. Dieses wurde auf die verschiedenen verwendeten Zelllinien kalibriert. Anhand der unterschiedlichen elektrischen Signale von Zelldebris, toten und vitalen Zellen, kann die Zahl vitaler Zellen in 1 ml Zellsuspension berechnet werden. Auf Basis dieses Werts wurde die Menge an Zellsuspension berechnet, die mit frischem Medium vermischt und anschließend in den Wells verteilt werden musste, um in jedes Well 200 µl Medium-Zellsuspensionsmischung mit der gewünschten Zellzahl auszusäen. Jedes Well wurde anschließend mit 5 ml reinem

Medium aufgefüllt.
Für den Nachweis des antiproliferativen Effekts von NIPP wurden 50.000 Zellen pro Well ausgesät und die Zellzahlen nach 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h bestimmt. Bei der Darstellung der Zeitabhängigkeit der NIPP-Effekte im 6-Well-Maßstab und anschließender Proteinisolation wurden je 200.000 Zellen der jeweiligen Zelllinie pro Well ausgesät und die Zellzahl nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmt.
Nach den definierten Zeiträumen wurde das Medium aus den Wells entfernt und die adhärenten Zellen mit 2 ml DPBS gespült. Anschließend wurden sie mit 200 µl 1x Trypsin (0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA) bei 37 °C inkubiert und danach mit zusätzlichen 800 µl Medium resuspendiert. 50 µl dieser Suspension wurden in 10 ml CASYton resuspendiert und die Zellzahl per CASY bestimmt.

2.2.4 Aussaat von Zellen und NIPP-Behandlung

Für die Versuche verwendete Zellen wurden vor den Versuchen wie folgt vorbereitet. Bei 90 % Konfluenz wurden die Zelllinien OVCAR-3 und LNCaP 1:2 gesplittet. MCF-7, welches die niedrigste Verdopplungszeit aufweist, wurde ab 80 % Konfluenz 1:2 gesplittet. OVCAR-3 und MCF-7-Zellen zeigten daraufhin am zweiten Tag erneut eine Konfluenz von 95 % und waren damit bereit, für die Versuche ausgesät zu werden. LNCaP, welches die höchste Verdopplungszeit der drei Zelllinien aufweist, zeigte am dritten Tag eine Konfluenz von 95 % und wurde dann für die Versuche verwendet. Beim Aussäen wurden definierte Zellzahlen auf die Wells verteilt, sodass jedes Well 200 µl Medium-Zellsuspensionsmischung enthielt. Direkt nach dem Aussäen wurde die Zellsuspension in der Hälfte der Wells mit dem Kinpen je nach Versuch für 15 s, 30 s oder 60 s in kreisenden Bewegungen behandelt, die andere Hälfte diente als Kontrolle. Das Vorgehen der Behandlung noch in Suspension wurde gewählt, um zu verhindern, dass die Zellen bereits adhäriert sind und somit nur die oberflächlichen Zellen des Zellrasens behandelt werden, oder der Zellrasen sogar durch die mechanische Belastung bei Behandlung freiliegender Zellen aufbricht. Auch könnte ein anderes Vorgehen mit adhärierten Zellen und ohne Medium dazu führen, dass alleine das Fehlen von Medium während der Behandlung den

Zellen schadet. Derartige Komplikationen wurden in vorangegangen orientierenden Versuchen und Arbeiten beobachtet, weshalb eine Behandlung in Suspension etabliert wurde. Eine Behandlung in 200 µl Medium-Zellsuspensionsmischung stellt so eine Exposition der gesamten ausgesäten Zellen durch Verwirbelungen und Durchmischung bei Kinpen-Applikation sicher. Bei einer Behandlung der adhärierten Zellen mit voller Menge Medium bestünde dagegen die Gefahr, dass Medium und Zellen über die Wells hinaus aufgewirbelt werden und die Zellzahl bei Behandlung durch diesen Effekt gegenüber der Kontrolle fälschlicherweise reduziert würde. Anschließend an die Kinpen-Exposition wurde jedes Well mit je 5 ml Medium aufgefüllt. Die 6-Well-Platten wurden im Inkubator bei 37 °C inkubiert.

Abb. 1: Das Gerät
Der kINPen® MED (Kinpen) besteht aus einem stiftförmigen Handinstrument (Bildmitte), einem Gaszufuhrsystem mit Argon als Trägergas (rechte Bildseite) und einem Hochfrequenzgenerator für die elektrische Spannung (linke Bildseite). Der Gasfluss wird am Gerät kontrolliert und angezeigt (hier zu Demonstrationszwecken 4,4 slm; linke Bildseite). Am Ende des Handinstruments ist der 10 mm lange Plasmafluss sichtbar.

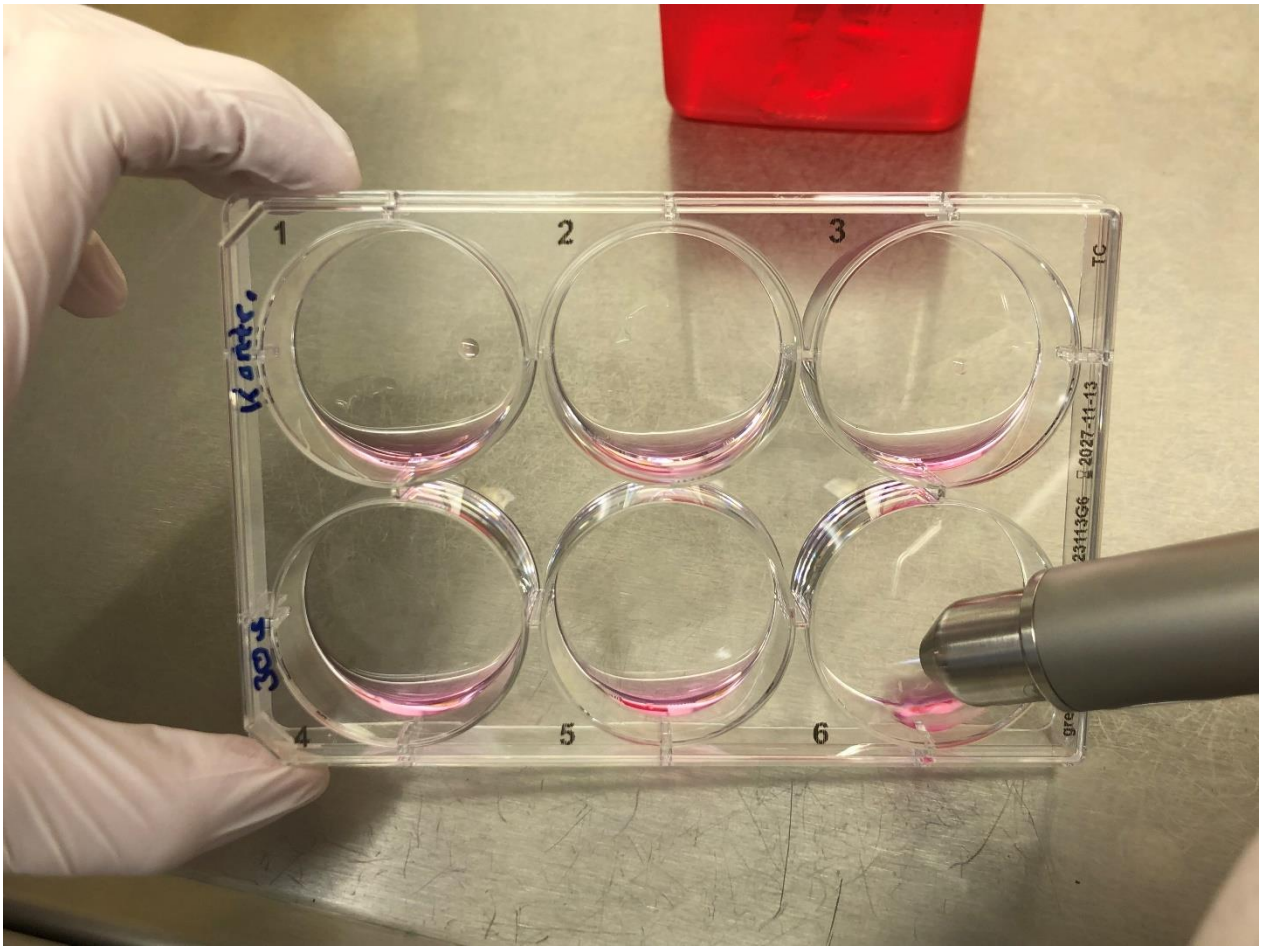

Abb. 2: Behandlung der Zellen mit dem Kinpen
Die unteren drei Wells mit 200 µl Medium-Zellsuspension werden in kreisenden Bewegungen behandelt. Die oberen drei Wells enthalten ebenfalls 200 µl Medium-Zellsuspension und dienen dabei als Kontrolle. In Well 1 befindet sich die Kontrolle für den Messzeitpunkt 24 h, in Well 2 die Kontrolle für 48 h und in Well 3 die Kontrolle für 72 h. In der unteren, mit NIPP behandelten Reihe findet in Well 4 die Zellzahlbestimmung nach 24 h statt, in Well 5 nach 48 h und in Well 6 nach 72 h.

2.2.5 Protein-Isolierung

Die Protein-Isolierung erfolgte aus im vorangegangenen Versuch generierten Proben. In diesem wurden 200.000 Zellen pro Well ausgesät und eine 30 s Kinpen-Exposition durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h wie beschrieben geerntet und die Zellsuspension nach Bestimmung der Zellzahl für 3 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment mit 1 ml DPBS gewaschen. Nach

erneuter Zentrifugation wurde das DPBS ebenfalls abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 1x Lämmlipuffer für 10 min bei 95 °C im Thermocycler inkubiert. Sowohl vor, als auch nach dieser Inkubation wurde die Probe resuspendiert und durchmischt. Anschließend wurden die Proben für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 1 µl DNAse (260 U/µl) versetzt. Die Menge des zugesetzten Lämmlipuffers wurde dabei der Zellzahl und Zelllinie und damit an die erwarteten, korrelierenden Proteinmengen angepasst. Zunächst wurden in orientierenden Voruntersuchungen die Signalstärken von GAPDH der jeweiligen Zelllinien für verschiedene Zellzahlen bestimmt. Dabei konnte eine Korrelation zwischen Proteinmenge und Zellzahl hergestellt werden, da bei steigender Zellzahl auch die Gesamtproteinmenge zunahm. Auch Gallo-Oller et al. (2018) konnten eine Korrelation der per Bicinchoninsäure Assay (BCA) bestimmten Proteinmenge mit den in der Densitometrie bestimmten Signalen herstellen (Gallo-Oller et al., 2018). Im Lämmlipuffer, welcher zur Lyse diente, wurde durch Berechnung der gleiche Zelltiter in Kontrolle und Behandlung für den jeweiligen Messzeitpunkt eingestellt, um so vorab einen möglichst gleichen Gesamtproteingehalt der Proben einzustellen. Durch anschließende Betrachtung des Verhältnisses der HSP-Signale zum zugehörigen GAPDH-Signal wurden mögliche verbleibende Schwankungen der Gesamtproteinmenge kompensiert. Die Lysate wurden zur kurzzeitigen Lagerung bei -20 °C eingefroren, zur Lagerung länger als fünf Tage bei -80 °C.

2.2.6 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht ein Auftrennen von Molekülen nach ihrem Molekulargewicht. Die Kombination aus SDS, Mercaptoethanol und Hitze denaturiert dabei die Proteine. Zusätzlich wird durch eine Bindung von SDS die ursprüngliche Ladung der Proteine überlagert und der negativ geladene SDS-Protein-Komplex migriert im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Die Menge an gebundenem SDS ist dabei meist proportional zum molekularen Gewicht der Proteine. Dadurch und durch den Molekularsiebeffekt im Gel trennt die Elektrophorese die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht auf (Kielkopf et al., 2021b; Rehm und Letzel, 2016).

Für die hier durchgeführten Versuche wurden Gele aus 5 % Sammelgel und 10 % Trenngel verwendet, die nach dem untenstehenden Schema hergestellt wurden (siehe Tab. 1). Für die Herstellung der Gele wurde eine Apparatur der Bio-Rad Gel Systems verwendet. Zwischen die Glasscheiben wurde zunächst das Trenngel pipettiert und im Anschluss die entstandenen Luftblasen mit VE H_2O entfernt. Dieses konnte nach Aushärtung der Gele abgegossen werden. Anschließend wurde das Sammelgel hinzugefügt und ein Kamm darin platziert, der Aussparungen im Sammelgel formte, welche für das spätere Einbringen der Probe genutzt werden konnten. Nach der Herstellung wurde das Polyacrylamidgel sofort verwendet oder in feuchtem Zellstoff bei 4 °C für maximal 4 Tage gelagert.

Tab. 1: Pipettierschema für ein SDS-Gel

Reagenz	**Sammelgel 5 %**	**Trenngel 10 %**
VE H_2O	2,1 ml	2,4 ml
Sammelgelpuffer	0,375 ml	-
Trenngelpuffer	-	1,5 ml
Acrylamid (30 %)	0,5 ml	2 ml
SDS (10 %)	30 µl	60 µl
APS (10 %)	30 µl	60 µl
TEMED	3 µl	6 µl

Für die Elektrophorese wurden die Glasplatten mit den Gelen in ein Elektrophorese-System eingespannt und die so entstandenen Kammern mit 1x Laufpuffer gefüllt. Die Kämme wurden entfernt und die Taschen, in die im Anschluss die Proben geladen werden sollten, wurden mehrfach mit Laufpuffer gespült, um Gelrückstände zu entfernen. Die Proben wurden aufgetaut und für 10 min bei 95 °C denaturiert, anschließend noch einmal per Vortex gemischt und für wenige Sekunden zentrifugiert, um Rückstände aus dem Deckel der Reagiergefäße zu entfernen. Die Proben wurden auf Eis zwischengelagert und schließlich in die Taschen geladen.

In jede Tasche wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl geladen; bei geringerem Volumen der Probe wurde die Probe mit VE H_2O vermischt, um das Volumen zu erreichen. Das Volumen an verwendetem Protein-Lysat richtete sich dabei nach der Menge an Protein in der jeweiligen Probe. Freie Taschen wurden mit 20 µl 1x Lämmlipuffer beladen, um ein

besseres Laufverhalten zu erzielen. Es wurden 5 µl Protein-Marker „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ von Thermo Scientific (Rockford, USA) verwendet. Die ersten 20 min der Elektrophorese wurden 80 V angelegt, für die restliche Laufzeit 120 V.

2.2.7 Western Blotting

Die durch die Elektrophorese nach ihrer Molekülmasse aufgetrennten Proteine wurden durch Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dafür wurden das Gel aus dem Elektrophoresesystem sowie aus den Glasscheiben gelöst und in Transferpuffer gespült. Auch Filterpapier und Nitrozellulosemembran wurden in Transferpuffer gelegt, bevor alles in folgender Reihenfolge im Transfergerät angeordnet wurde: zum Schutz der Membran wurden unten drei Filterpapiere gelegt, es folgte die Membran, darüber das Gel und zum Schutz erneut drei Filterpapiere. Der Transfer erfolgte im Semi-Dry-Verfahren mit dem TransBlot Turbo. Nitrozellulose bindet die Proteine dabei über hydrophile und elektrostatische Wechselwirkungen (Goldman et al., 2015). Der erfolgreiche Proteintransfer wurde durch Färbung mit Ponceau-S-Lösung kontrolliert. Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Magermilchpulver in TBST blockiert. Im Anschluss wurde die Membran kurz in TBST gewaschen und der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 zur Inkubation über Nacht zugegeben. Der Primärantikörper bindet dabei an das jeweilige Protein (z. B. HSP70). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 15 min mit TBST gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Der 1:10.000 verdünnte Sekundärantikörper wurde hinzugegeben und die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit diesem inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet an den Antigen-Antikörperkomplex. Das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym Meerrettichphosphatase (HRP) oxidiert bei Zugabe von ECL Luminal und emittiert dabei detektionsfähiges Licht (Kielkopf et al., 2021a; Mülhardt, 2013; Ni et al., 2017). Auf ein erneutes dreimaliges Waschen mit TBST folgte die auf diesem Prinzip basierende Detektion der Proteine in Imaging-System Azure 300. Als Detektionslösung wurde SuperSignal™ West Dura verwendet.

Zur Normierung der Proteinmengen und als Ladekontrolle wurde die Expression der

Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) kontrolliert. Hierzu wurde die Membran erneut mit einem Primärantikörper, der dieses Mal gegen GAPDH gerichtet war, in einer Konzentration von 1:10.000 inkubiert und das Signal abschließend wie beschrieben ausgewertet. Für die Quantifizierung wurde die Software Image J-win64 benutzt.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Analyse der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel 2016. Alle Daten wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus mehreren Replikaten angegeben. Für die Western Blot Analysen wurde die Expression nach Kinpen-Behandlung mit der jeweils zugehörigen Kontrolle des Replikats verglichen. Damit stellen die nach Behandlung dargestellten Werte der HSP-Expression relative Werte bezogen auf die entsprechenden Kontrollen dar. Dafür wurde bestimmt, um welchen Faktor sich die Expression der HSP geteilt durch GAPDH nach Behandlung im Vergleich zur Expression der HSP geteilt durch GAPDH der Kontrolle ändert. Somit nimmt die Kontrolle den Wert eins an. Im Anschluss wurden Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus allen Replikaten bestimmt und in den gezeigten Abbildungen dargestellt. Für jedes Experiment wurden mindestens drei unabhängige Replikate mit jeweiligen Kontrollen durchgeführt. Für die Auswertung mit Microsoft Excel 2016 wurde der Student‘s t-Test verwendet. Die Signifikanzen wurden wie folgt festgelegt: $p \leq 0{,}0500$ (*), $p \leq 0{,}0100$ (**) und $p \leq 0{,}0010$ (***).

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis des antiproliferativen Effekts von NIPP

Zur Bestätigung eines antiproliferativen Effekts bei NIPP-Behandlung der betrachteten Zelllinien wurden Wachstumskinetiken über einen Zeitraum von 4 h bis 120 h erstellt. Ausgesät wurden 50.000 Zellen pro Well in 6-Well-Zellkulturplatten. Die NIPP-Behandlungszeit betrug 30 s.

Für alle drei Zelllinien wurde in den ersten 24 h nach dem Aussäen die Zahl der adhärenten Zellen bestimmt. Hierzu wurden Messungen nach 4 h und nach 24 h durchgeführt.

OVCAR-3-Zellen wiesen nach 48 h eine deutlich sichtbare Zunahme der Zellzahl auf. Ab diesem Zeitpunkt stieg die Zahl vitaler Zellen von Tag zu Tag weiter an. Die Wachstumskurve der unbehandelten Zellen stieg zwischen 72 h und 96 h am steilsten an. Jedoch flachte die Kurve, aufgrund des hohen Medium-Verbrauchs in dieser Phase, nach 96 h bereits wieder ab. Die NIPP-behandelten Zellen zeigten erst später, zwischen 96 h und 120 h, ähnlich steiles Wachstum wie die Kontrollgruppe (Abb. 3).

Über die gesamte Inkubationszeit hinweg war das Wachstum der NIPP-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen signifikant gehemmt (4 h: p=0,0072; 24 h: p=0,0003; 48 h: p=0,0022; 72 h: p=0,0184; 96 h: p=0,0002; 120 h: p=0,0012) (Abb. 3).

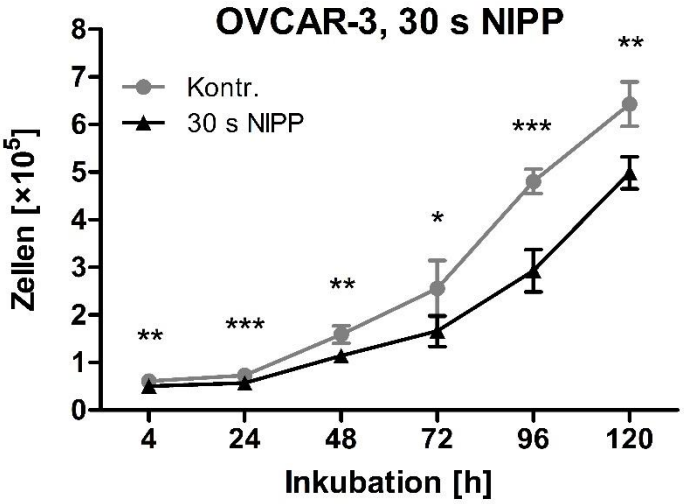

Abb. 3: Wachstumskinetik der Zelllinie OVCAR-3 nach 30 s Behandlung mit NIPP Es zeigt sich eine Inhibition des Wachstums durch die Kinpen-Exposition. Die Behandlungsdauer betrug 30 s.
Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 120 h bestimmt. Es wurden je vier unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit p≤0,0500 (*), p≤0,0100 (**) und p≤0,0010 (***).

Sowohl behandelte, als auch unbehandelte MCF-7-Zellen zeigten eine Verminderung der Zellzahl in der Zeit zwischen der ersten Messung nach 4 h bis zu zweiten Messung nach 24 h. Nach 48 h hatten beide Gruppen die nach 4 h gemessene Zellzahl wieder erreicht. Danach begann für die Kontrollgruppe der Zellen die exponentielle Wachstumsphase (Abb. 4). Bereits nach 72 h war jedoch ein deutliches Abflachen der Kurve und damit ein Übergang in die stationäre Phase erkennbar. Das Medium war für diese große Zahl von Zellen demnach nicht ausreichend und das Wachstum wurde dadurch limitiert (Abb. 4). Bei den behandelten Zellen war dagegen kein Übergang in eine exponentielle Wachstumsphase ersichtlich.

Wie auch auf OVCAR-3-Zellen, hatte die Behandlung mit NIPP über die gesamte Inkubationszeit einen signifikanten antiproliferativen Effekt auf MCF-7-Zellen (4 h: p=0,0438; 24 h: p=0,0024; 48 h: p=0,0034; 72 h: p=0,0045; 96 h: p=0,0184; 120 h: p=0,0118) (Abb. 4).

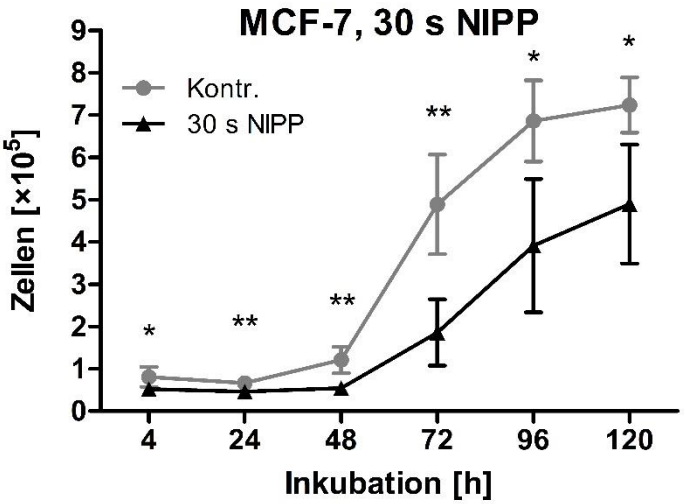

Abb. 4: Wachstumskinetik der Zelllinie MCF-7 nach 30 s Behandlung mit NIPP
Es zeigt sich eine Inhibition des Wachstums durch die Kinpen-Exposition. Die Behandlungsdauer betrug 30 s.
Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 120 h bestimmt. Es wurden je vier unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit p≤0,0500 (*), p≤0,0100 (**) und p≤0,0010 (***).

Nach 4 h wurde bei LNCaP-Zellen zunächst eine niedrigere Zellzahl als die erwarteten mindestens 50.000 Zellen pro Well gemessen (Kontr.: $2{,}23\times10^4\pm3{,}76\times10^3$; 30 s NIPP: $1{,}62\times10^4\pm3{,}27\times10^3$). Sie zeigten jedoch sofort langsames Wachstum, bevor die unbehandelten Zellen ab 72 h bis 120 h in eine steile Wachstumsphase eintraten (Abb. 5).

Die NIPP-exponierten Zellen waren von allen drei malignen Zelltypen am meisten in ihrem Wachstum gehemmt. Auch sie zeigten nach 72 h gesteigerte Wachstumsaktivität, die Kurve war jedoch deutlich flacher als die der unbehandelten Zellen (Abb. 5). Die Wachstumsinhibition war zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant (4 h: p=0,0246; 24 h: p=0,0023; 48 h: p=0,0035; 72 h: p=0,0005; 96 h: p=0,0002; 120 h: p<0,0001) (Abb. 5).

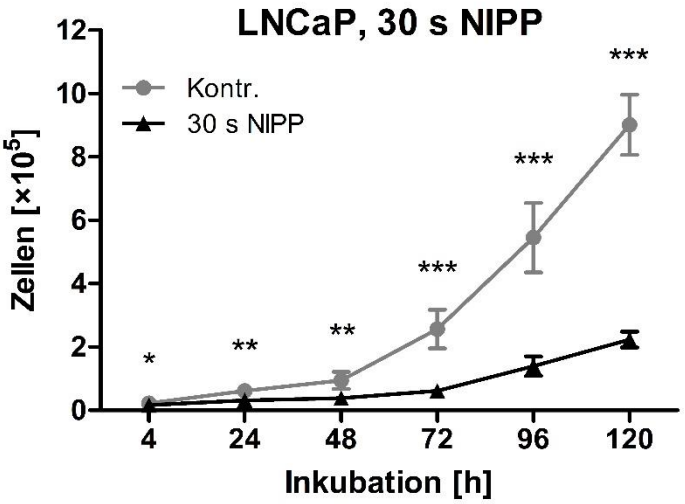

Abb. 5: Wachstumskinetik der Zelllinie LNCaP nach 30 s Behandlung mit NIPP
Es zeigt sich eine Inhibition des Wachstums durch die Kinpen-Exposition. Die Behandlungsdauer betrug 30 s.
Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 120 h bestimmt. Es wurden je vier unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit p≤0,0500 (*), p≤0,0100 (**) und p≤0,0010 (***).

3.2 Zeitabhängigkeit der NIPP-Effekte im 6-Well-Maßstab

Zur Charakterisierung der NIPP-Effekte wurde der Zeitraum zwischen 24 h und 72 h in 6-Wells erneut betrachtet. Die Zellzahl wurde hierbei auf 200.000 Zellen pro Well erhöht, da im Vergleich zur ersten Versuchsreihe mit 50.000 Zellen pro Well ein verkürzter Zeitraum betrachtet wurde und somit mehr Zellen mit der gleichen Menge Medium diese geringere Zeitspanne überleben konnten.
Die Proben, welche aus mehreren Replikaten mit je 200.000 Zellen pro Well generiert wurden, wurden zudem anschließend für die Protein-Analyse verwendet, für welche eine höhere Menge an Material benötigt wurde. Durch die direkte Weiterverwendung für die Protein-Analyse konnte sichergestellt werden, dass Proben mit nachgewiesenem antiproliferativen Effekt analysiert wurden. Verglichen wurde das Wachstum der NIPP-behandelten Zellen mit dem Wachstum unbehandelter Zellen.

3.2.1 OVCAR-3-Zellen

Bereits mikroskopisch zeigte sich nach einer Behandlung über 30 s in den Wells eine verminderte Zahl vitaler und eine erhöhte Zahl toter Zellen (Abb. 6).

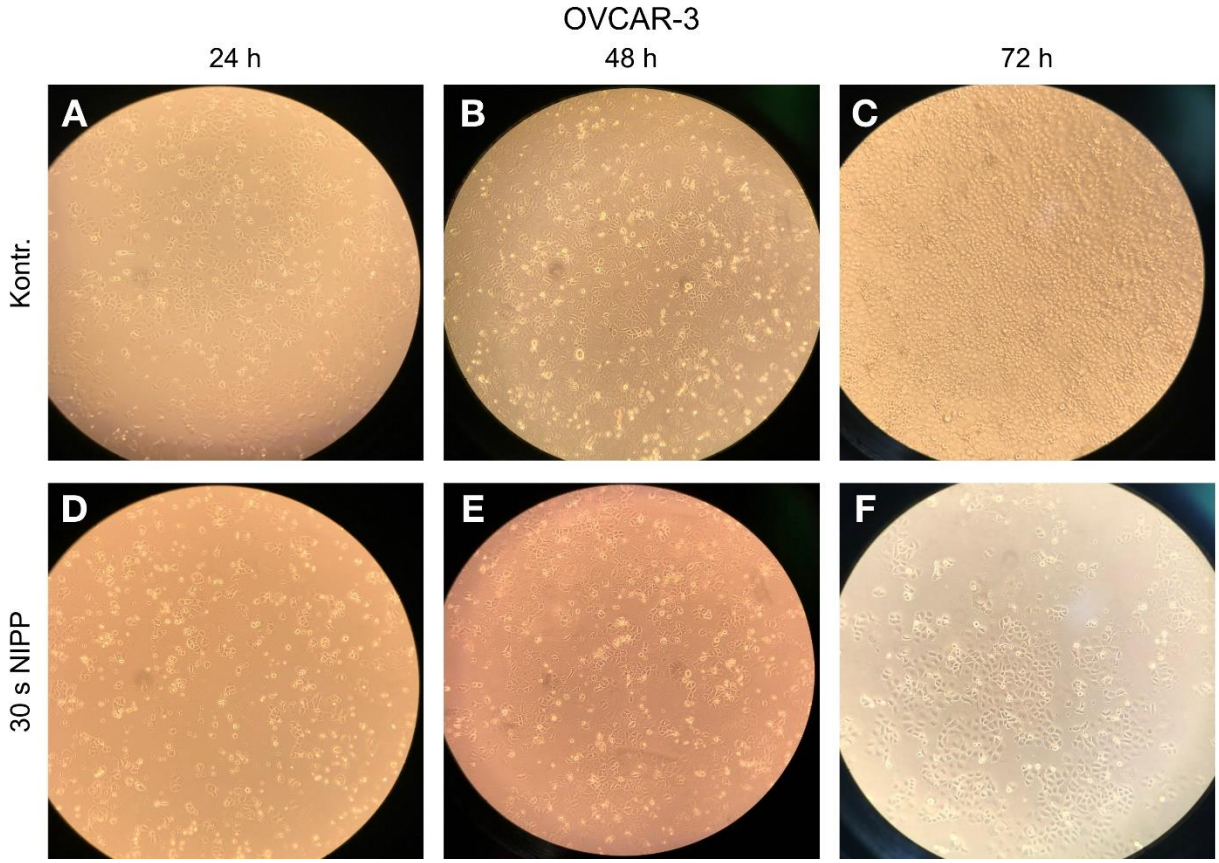

Abb. 6: OVCAR-3-Zellen mit und ohne 30 s NIPP-Behandlung nach 24 h, 48 h und 72 h Es wurde ein zehnfach vergrößerndes Objektiv verwendet. Oben ist die Kontrolle zu sehen, unten 30 s NIPP behandelte Zellen. Abb. 6A zeigt die Kontrolle nach 24 h, Abb. 6B die Kontrolle nach 48 h und Abb. 6C die Kontrolle nach 72 h. In der unteren Reihe zu sehen sind: Abb. 6D nach 30 s NIPP und 24 h, Abb. 6E nach 30 s NIPP zum Messzeitpunkt 48 h und Abb. 6F nach 30 s NIPP-Behandlung und 72 h. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der Zellzahl nach Behandlung.

In einer Abstufung von drei Behandlungszeiten (15 s, 30 s, 60 s) wurden die Effekte auf 200.000 ausgesäte Zellen pro Well mittels Lebendzellzahlbestimmung analysiert.

Für OVCAR-3-Zellen zeigte sich bei 15 s NIPP-Behandlung keine signifikante Verringerung der Anzahl vitaler Zellen (Abb. 7A). Bei einer Behandlungszeit von 30 s war dagegen ab 24 h Inkubation eine statistisch signifikante (24 h: $p=0,0003$; 48 h: $p=0,0001$; 72 h: $p=0,0004$) Verringerung der Zellzahl zu sehen (Abb. 7B). 60 s Behandlung erzielten einen noch stärkeren wachstumsinhibierenden Effekt (24 h: $p=0,0005$; 48 h: $p=0,0001$; 72 h: $p<0,0001$) (Abb. 7C).
Die Behandlungszeit bestimmt somit den antiproliferativen Effekt und entspricht damit der pharmakologischen Dosierung.

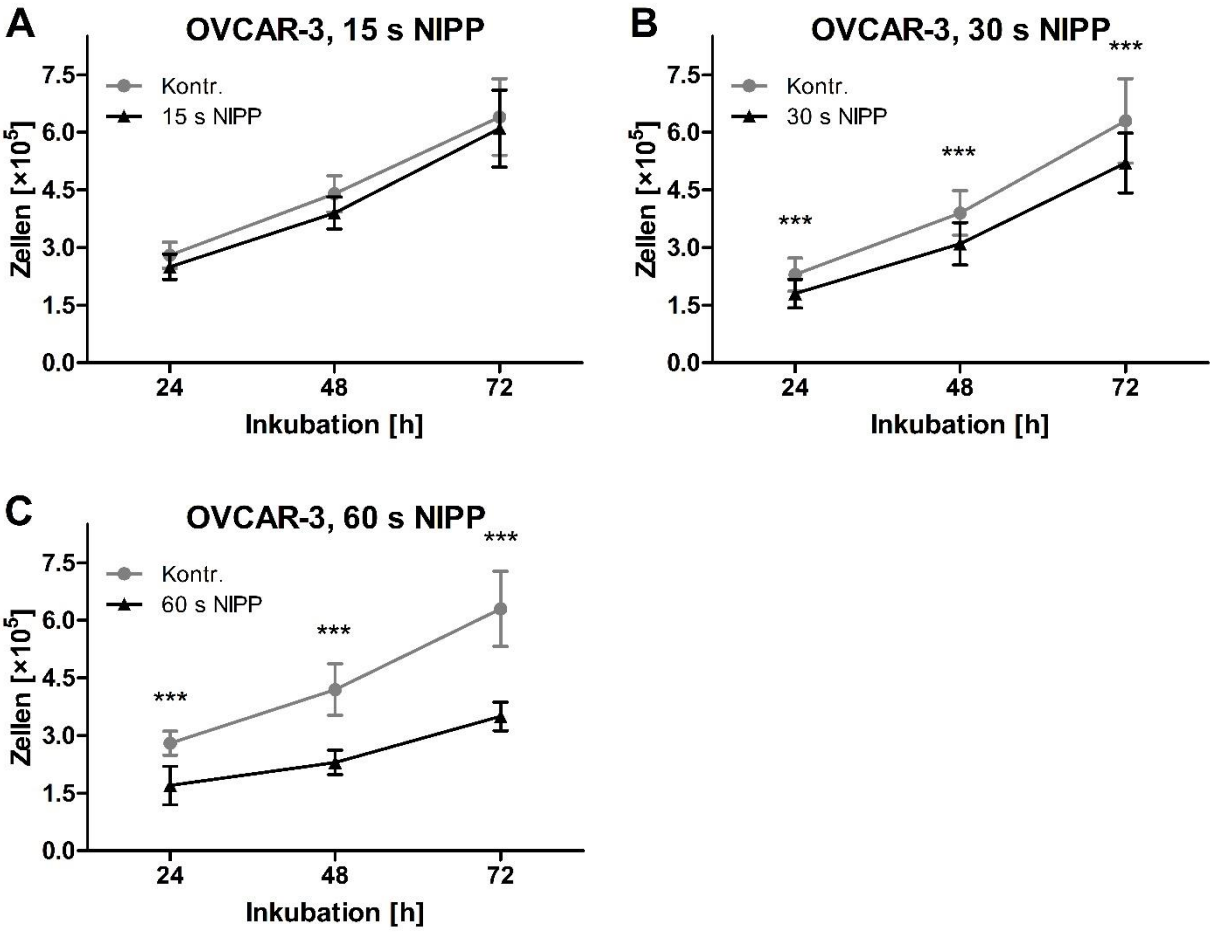

Abb. 7: Wachstumskinetik der Zelllinie OVCAR-3 nach verschiedener Expositionsdauer gegenüber NIPP
Abb. 7A zeigt die Wachstumskurve nach 15 s NIPP-Exposition, Abb. 7B nach 30 s und Abb. 7C nach 60 s NIPP, jeweils im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Es zeigt sich eine Inhibition des Wachstums ab einer Behandlungsdauer von mind. 30 s. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 72 h bestimmt. Es wurden je mindestens fünf unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0{,}0500$ (*), $p \leq 0{,}0100$ (**) und $p \leq 0{,}0010$ (***).

3.2.2 MCF-7-Zellen

Auch für MCF-7 waren antiproliferative Effekte nach 30 s NIPP-Exposition mikroskopisch bereits ersichtlich (Abb. 8)

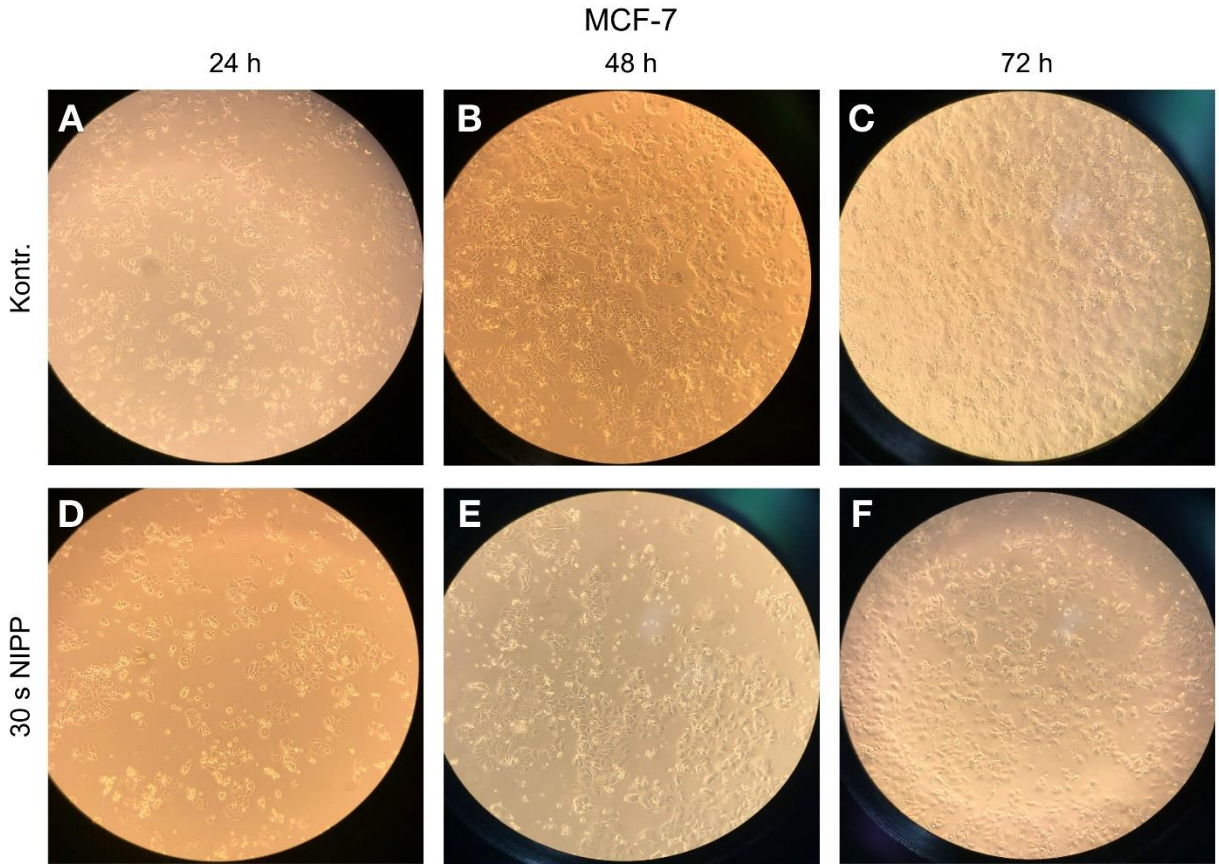

Abb. 8: MCF-7-Zellen mit und ohne 30 s NIPP-Behandlung nach 24 h, 48 h und 72 h Es wurde ein zehnfach vergrößerndes Objektiv verwendet. Oben ist die Kontrolle zu sehen, unten 30 s NIPP behandelte Zellen. Abb. 8A zeigt die Kontrolle nach 24 h, Abb. 8B die Kontrolle nach 48 h und Abb. 8C die Kontrolle nach 72 h. In der unteren Reihe zu sehen sind: Abb. 8D nach 30 s NIPP und 24 h, Abb. 8E nach 30 s NIPP zum Messzeitpunkt 48 h und Abb. 8F nach 30 s NIPP-Behandlung und 72 h. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der Zellzahl nach Behandlung.

MCF-7-Zellen zeigten nach 15 s Exposition gegenüber NIPP keine signifikanten antiproliferativen Effekte (Abb. 9A). Bei einer Behandlungszeit von 30 s beobachtete man dagegen ein signifikant gehemmtes Wachstum über den gesamten Inkubationszeitraum (24 h: $p<0{,}0001$; 48 h: $p=0{,}0030$; 72 h: $p=0{,}0005$) (Abb. 9B). Eine längere Behandlung über 60 s mit NIPP führte, wie auch bei OVCAR-3-Zellen, zu einer noch größeren Verringerung der absoluten Zellzahl (24 h: $p=0{,}0194$; 48 h: $p=0{,}00107$; 72 h: $p=0{,}0001$) (Abb. 9C).

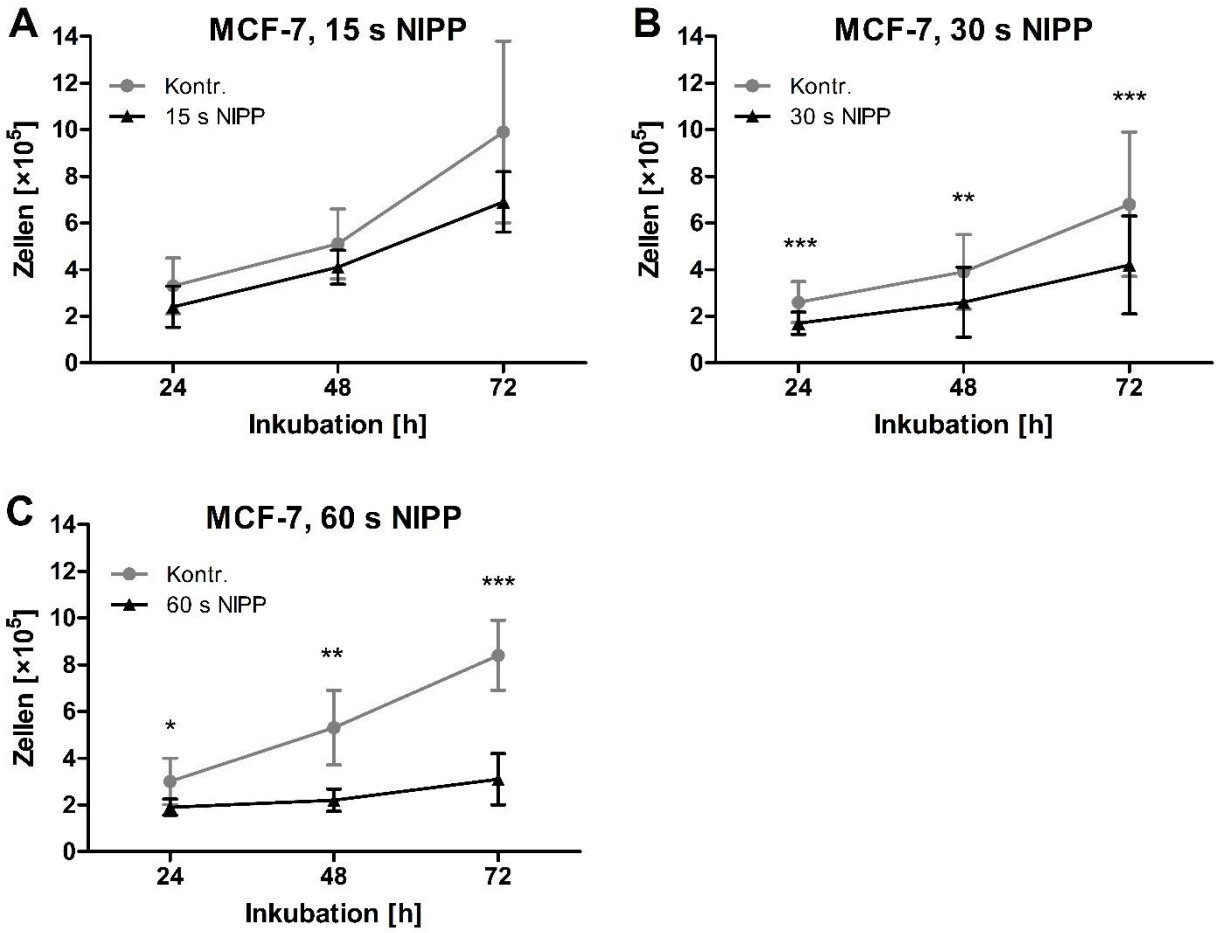

Abb. 9: Wachstumskinetik der Zelllinie MCF-7 nach verschiedener Expositionsdauer gegenüber NIPP
Abb. 9A zeigt die Wachstumskurven nach 15 s NIPP-Exposition, Abb. 9B nach 30 s und Abb. 9C nach 60 s NIPP, jeweils im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Es zeigt sich eine Inhibition des Wachstums ab einer Behandlungsdauer von mind. 30 s. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 72 h bestimmt. Es wurden je mindestens fünf unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p\leq0{,}0500$ (*), $p\leq0{,}0100$ (**) und $p\leq0{,}0010$ (***).

3.2.3 LNCaP-Zellen

Wie bei den anderen beiden Zelllinien zeigte sich auch bei LNCaP-Zellen im mikroskopischen Bild eine Zellzahl-vermindernde Wirkung der NIPP-Behandlung (Abb. 10).

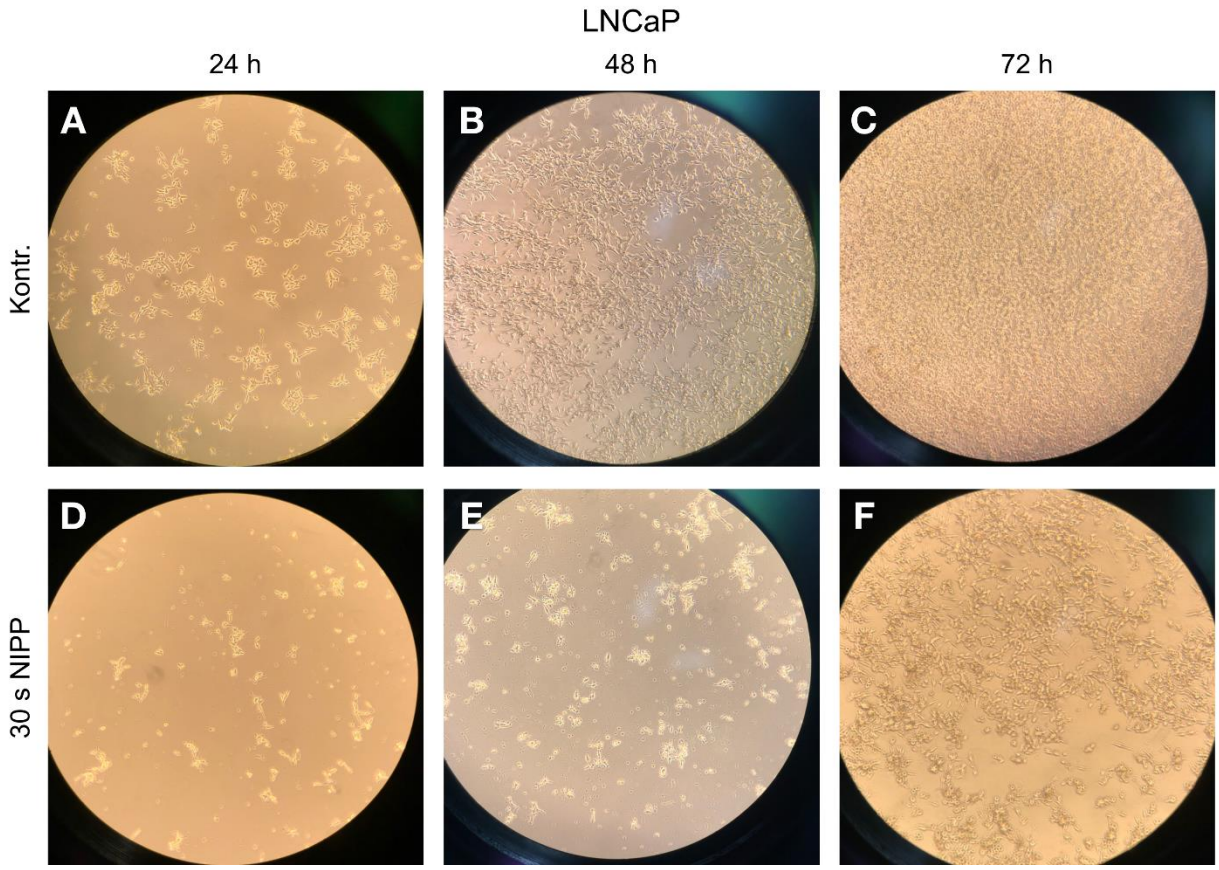

Abb. 10: LNCaP-Zellen mit und ohne 30 s NIPP-Behandlung nach 24 h, 48 h und 72 h Es wurde ein zehnfach vergrößerndes Objektiv verwendet. Oben ist die Kontrolle zu sehen, unten 30 s NIPP behandelte Zellen. Abb. 10A zeigt die Kontrolle nach 24 h, Abb. 10B die Kontrolle nach 48 h und Abb. 10C die Kontrolle nach 72 h. In der unteren Reihe zu sehen sind: Abb. 10D nach 30 s NIPP und 24 h, Abb. 10E nach 30 s NIPP zum Messzeitpunkt 48 h und Abb. 10F nach 30 s NIPP-Behandlung und 72 h. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der Zellzahl nach Behandlung.

LNCaP-Zellen reagierten sensibler auf die NIPP-Exposition als die beiden anderen Zelllinien. Bei ihnen wirkte schon eine 15-sekündige Behandlung statistisch signifikant antiproliferativ (24 h: p=0,0404; 48 h: p=0,0010; 72 h: p=0,0010) (Abb. 11A). Auch hier

führte eine Steigerung der NIPP-Exposition zu entsprechend stärkerer Verminderung der vitalen Zellen, statistische Signifikanz lag auch bei einer Behandlungszeit von 30 s (24 h, 48 h und 72: p<0,0001) (Abb. 11B) sowie 60 s (24 h: p=0,0020; 48 h: p<0,0001; 72 h: p<0,0001) (Abb. 11C) vor.

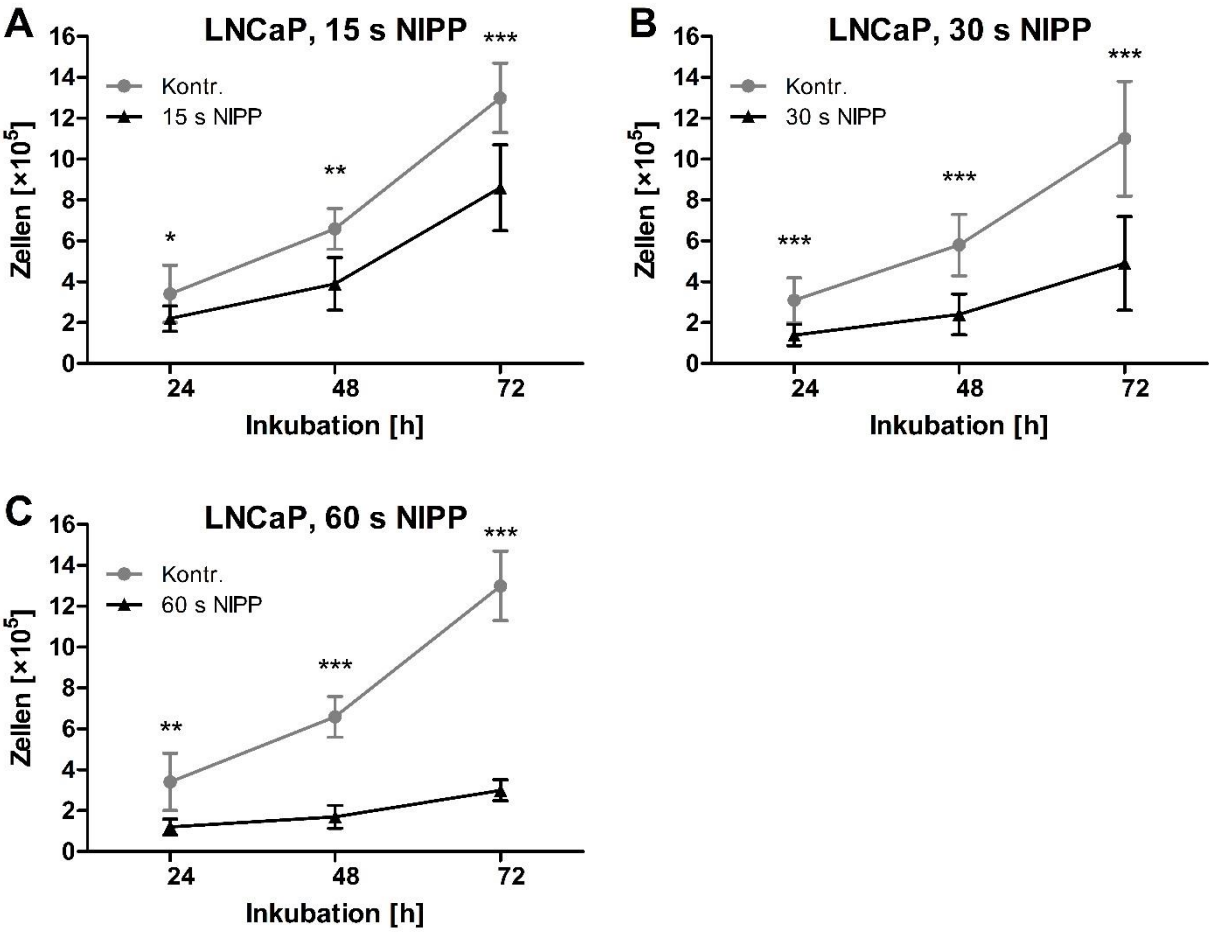

Abb. 11: Wachstumskinetik der Zelllinie LNCaP nach verschiedener Expositionsdauer gegenüber NIPP
Abb. 11A zeigt die Wachstumskurve nach 15 s NIPP-Exposition, Abb. 11B nach 30 s und Abb. 11C nach 60 s NIPP, jeweils im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Es zeigte sich eine Inhibition des Wachstums ab einer Behandlungsdauer von mind. 15 s. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 72 h bestimmt. Es wurden je mindestens fünf unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit p≤0,0500 (*), p≤0,0100 (**) und p≤0,0010 (***).

3.3 Analyse der Steroidrezeptor-assoziierten Hitzeschock-Proteine HSP27 und HSP70

HSP27 ist ein Chaperon und Antioxidans, dessen Bildung bei Zellstress induziert wird (Acunzo et al., 2014). Seine antioxidative Wirkung wird dabei auf eine Beteiligung an der Aktivierung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) zurückgeführt. Dieses ist als reaktionsgeschwindigkeitsbestimmendes Enzym am Pentose-Phosphat-Weg beteiligt, welcher über NADPH-Synthese die Reduktion von Glutathiondisulfid ermöglicht. Das dabei entstehende Glutathion stellt ein wichtiges antioxidatives System im Körper dar, indem es seinerseits reaktive Sauerstoffverbindungen reduziert (Matsuo et al., 2021).

HSP27 wird in vielen Karzinomen vermehrt exprimiert. Seine Apoptose-hemmende Funktion führt dabei zu einer ungünstigeren Prognose und Therapieresistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Therapien (Acunzo et al., 2014).

HSP70 spielt eine essentielle Rolle für eine geregelte Proteostase (Fernández-Fernández und Valpuesta, 2018). In Tumorzellen findet sich eine vermehrte HPS70-Expression, was zur Unterdrückung apoptotischer Prozesse sowie zu weiteren Selektionsvorteilen für die Tumorzellen führt (Albakova et al., 2020).

Nachfolgend wird die Analyse der Expression von HSP70 sowie HSP27 mittels Western Blot beschrieben.

Für die Quantifizierung wurde die Expression der jeweiligen HSP bei unbehandelten Zellen auf 1,0 normiert.

3.3.1 OVCAR-3-Zellen

Bei OVCAR-3-Zellen war für HSP27 keine Tendenz einer Modulation erkennbar (Abb. 12A+B). Die Mittelwerte lagen nach einer Inkubationszeit von 24 h und 48 h bei ungefähr eins (24 h: 1,02±1,02, p=0,9738; 48 h: 1,08±0,45, p=0,6999). Die Analyse nach 72 h Inkubation zeigte mit einer relativen Expression von 0,79±0,49 eine tendenzielle Reduktion des HSP27-Spiegels, die jedoch statistisch nicht signifikant war (p=0,3604) (Abb. 12B).

Die Expression von HSP70 zeigte ein ähnliches Bild mit Mittelwerten gleich 1,00 bei 48 h und 1,01 bei 72 h Inkubation. Die sehr hohe Standardabweichung nach 24 h kam, wie auch bei HSP27 nach 24 h Inkubation, erneut durch große Varianz der relativen Expression zwischen den einzelnen unabhängigen Experimenten zustande. Auch hier lag zu keinem Zeitpunkt eine statistisch signifikante Modulation vor (24 h: 1,37±1,06, p=0,4617; 48 h: 1,00±0,30, p=0,9782; 72 h: 1,01±0,60, p=0,9625) (Abb. 12C+D).

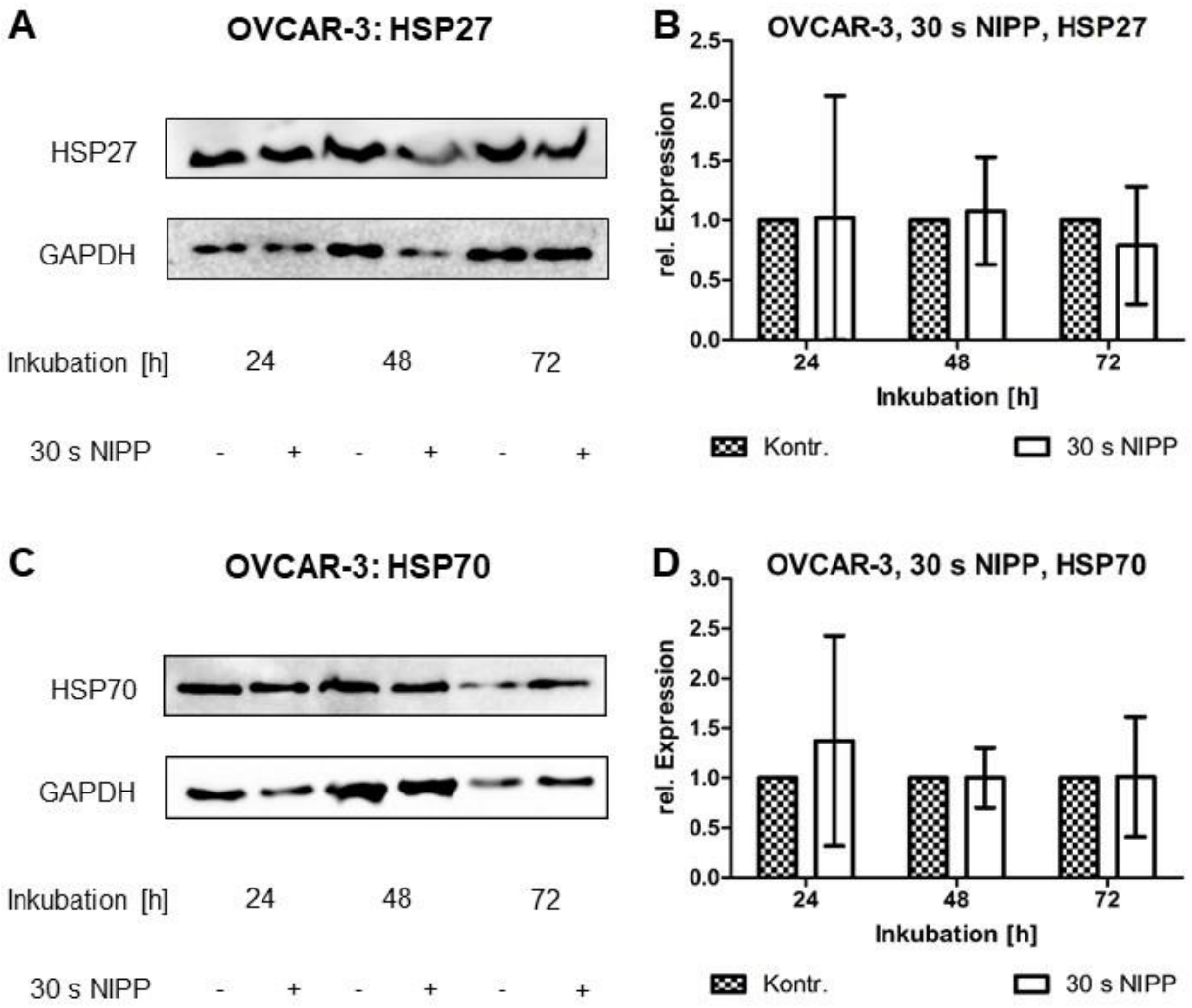

Abb. 12: Western Blot-Analysen (Abb. 12A) und Quantifizierung (Abb. 12B) von HSP27 sowie Analyse (Abb. 12C) und Quantifizierung (Abb. 12D) von HSP70 in OVCAR-3-Zellen nach 30 s NIPP-Behandlung
Es wurden jeweils mindestens fünf unabhängige Experimente durchgeführt.
Betrachtet wird die Expression nach 24 h, 48 h und 72 h.
Dargestellt sind Mittelwert ± SD der relativen Expression, bezogen auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen mit dem Wert=1,0.
Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0{,}0500$ (*), $p \leq 0{,}0100$ (**) und $p \leq 0{,}0010$ (***).
Bei den dargestellten Western Blots handelt es sich um für das Gesamtergebnis repräsentative Bilder.

3.3.2 MCF-7-Zellen

Auch MCF-7-Zellen reagierten auf 30 s NIPP-Exposition nicht mit signifikanten Veränderungen der Expression von HSP27 (Abb. 13A+B) und HSP70 (Abb. 13C+D). Sowohl der Mittelwert der HSP27-, als auch der HSP70-Expression stieg nach NIPP-Behandlung tendenziell an. Überall zeigte sich jedoch sehr große Standardabweichungen und der beobachtete Anstieg war zu keinem Inkubationszeitpunkt signifikant (HSP27: 24 h: 1,16±0,54, p=0,4704; 48 h: 1,30±0,70, p=0,3149; 72 h: 1,18±1,03, p=0,6992) (HSP70: 24 h: 1,47±1,10, p=0,2833; 48 h: 1,21±0,67, p=0,4677; 72 h: 1,51±1,23, p=0,3750) (Abb. 13B+D).

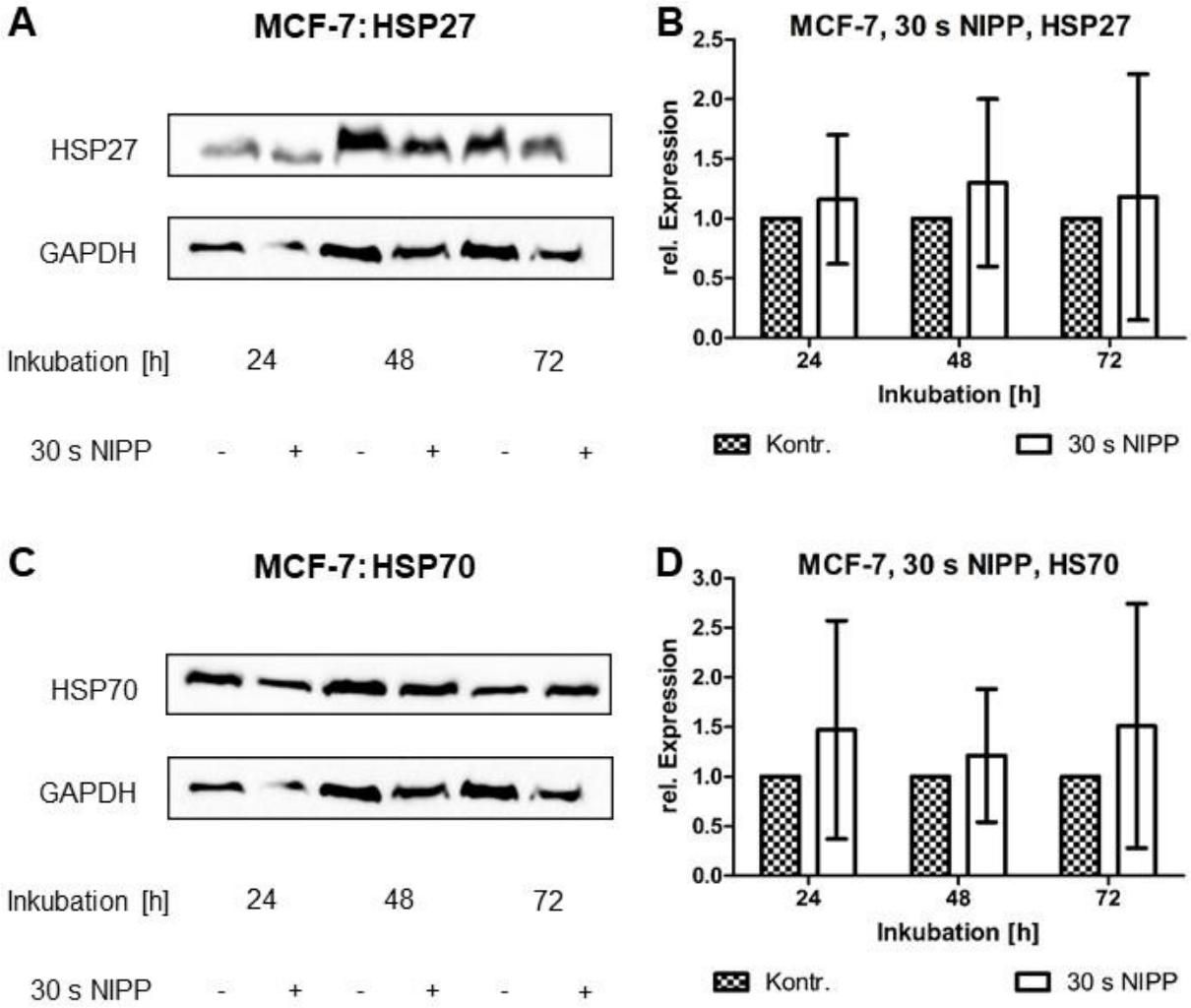

Abb. 13: Western Blot-Analysen (Abb. 13A) und Quantifizierung (Abb. 13B) von HSP27 sowie Analyse (Abb. 13C) und Quantifizierung (Abb. 13D) von HSP70 in MCF-7-Zellen nach 30 s NIPP-Behandlung
Es wurden jeweils mindestens fünf unabhängige Experimente durchgeführt. Betrachtet wird die Expression nach 24 h, 48 h und 72 h.
Dargestellt sind Mittelwert ± SD der relativen Expression, bezogen auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen mit dem Wert=1,0.
Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0{,}0500$ (*), $p \leq 0{,}0100$ (**) und $p \leq 0{,}0010$ (***).
Bei den dargestellten Western Blots handelt es sich um für das Gesamtergebnis repräsentative Bilder.

3.3.3 LNCaP-Zellen

Die Expression von HSP27 veränderte sich durch 30 s NIPP-Behandlung in LNCaP-Zellen nicht signifikant (Abb. 14A+B). Es zeigten sich große Standardabweichungen bei 24 h und 48 h Inkubation (24 h: 1,48±1,16, p= 0,3289; 48 h: 1,32±1,02, p= 0,4555). Bei 72 h war diese deutlich geringer, jedoch lag hier der Mittelwert der relativen Expression bei 0,93±0,45 und unterschied sich nicht signifikant von Kontrolle (p=0,6690) (Abb. 14B).

Dagegen zeigte sich für HSP70 eine signifikante Induktion der Expression zu allen drei betrachteten Zeitpunkten (24 h: 2,38±1,38, p=0,0055; 48 h: 1,98±0,34, p<0,0001; 72 h: 1,96±0,91, p=0,0167) (Abb. 14D). Es war ein Anstieg der relativen Expression von HSP70 nach 30 s NIPP-Behandlung bei allen Inkubationszeiten erkennbar (Abb. 14C+D). Bei 24 h und 72 h Inkubationszeit waren zwar hohe Standardabweichungen erkennbar; diese widersprachen jedoch nicht dem nachgewiesenen Effekt, sondern spiegelten lediglich die unterschiedliche Stärke des Anstiegs von HSP70 zwischen den einzelnen Wiederholungen wider.

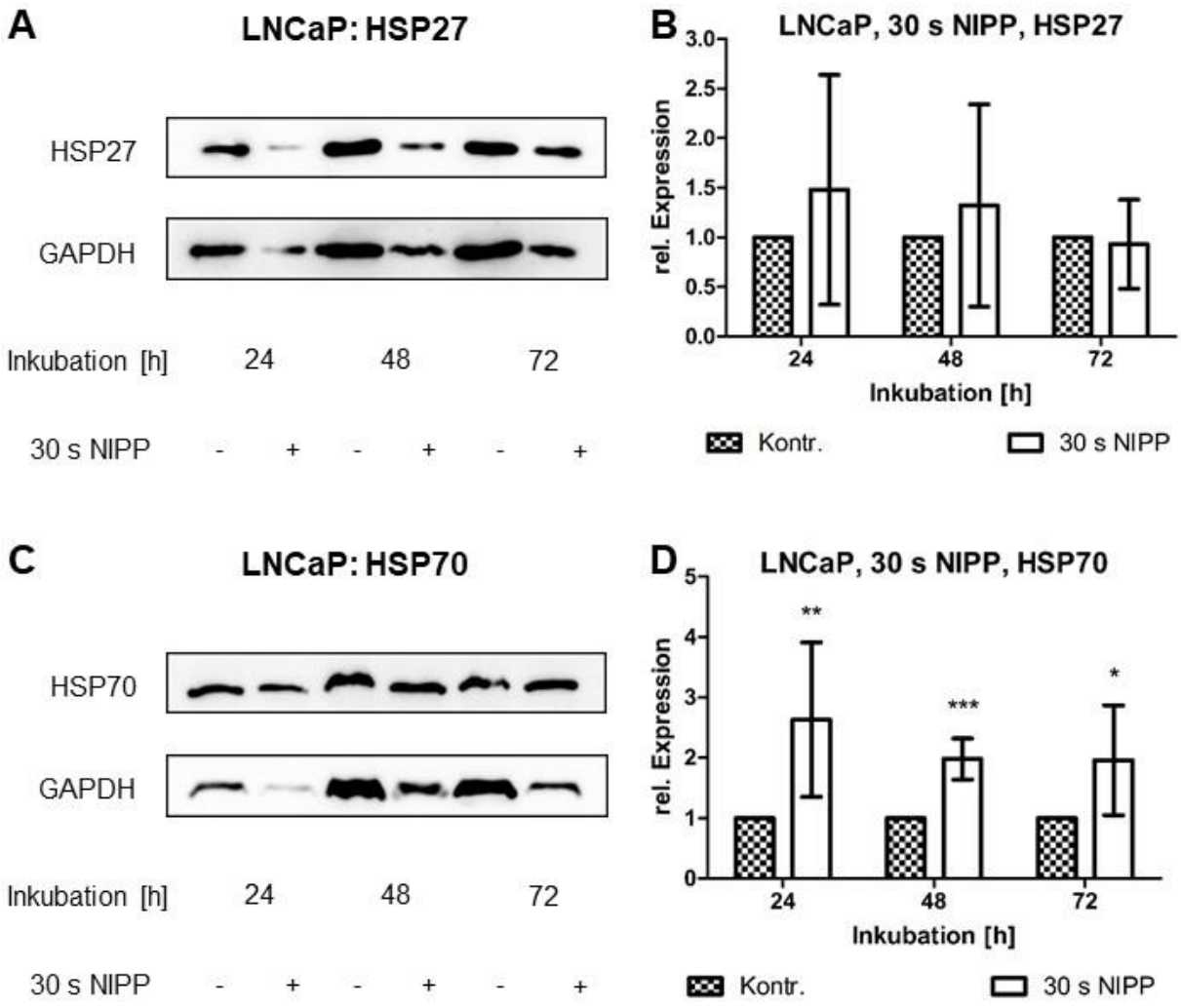

Abb. 14: Western Blot-Analysen (Abb. 14A) und Quantifizierung (Abb. 14B) von HSP27 sowie Analyse (Abb. 14C) und Quantifizierung (Abb. 14D) von HSP70 in LNCaP-Zellen nach 30 s NIPP-Behandlung
Es wurden jeweils mindestens fünf unabhängige Experimente durchgeführt. Betrachtet wird die Expression nach 24 h, 48 h und 72 h.
Dargestellt sind Mittelwert ± SD der relativen Expression, bezogen auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen mit dem Wert=1,0.
Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0{,}0500$ (*), $p \leq 0{,}0100$ (**) und $p \leq 0{,}0010$ (***).
Bei den dargestellten Western Blots handelt es sich um für das Gesamtergebnis repräsentative Bilder.

4. Diskussion

Der in dieser Arbeit nachgewiesene wachstumsinhibierende Effekt von NIPP stimmt mit den Ergebnissen zahlreicher in vitro und in vivo Studien mit Blick auf unterschiedlichste Malignitäten überein. Beispielhaft zu nennen sind hierbei Triple-negative Brustkrebszellen und weitere Mammakarzinom-Subtypen, verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien, Osteosarkomzellen, Glioblastomzellen sowie Hautkrebszellen und -gewebe (Bekeschus et al., 2019; Ermakov et al., 2021; Gay-Mimbrera et al., 2016; Koensgen et al., 2017; Liu et al., 2024; Siu et al., 2015; Xiang et al., 2018). Insbesondere die von uns untersuchte Wirkung auf LNCaP- (Weiss et al., 2015a; Weiss et al., 2015b), MCF-7- (Stope et al., 2020) und OVCAR-3-Zellen (Koensgen et al., 2017) konnte auch in vorangegangenen Publikationen gezeigt werden. Bereits eine indirekte Applikationsform mittels Plasma-Aktivierung des Kulturmediums erzielt antiproliferative Effekte in Paclitaxel/Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinomzellen in vitro und in vivo im Mausmodell (Utsumi et al., 2013). Bei einer längeren Inkubationszeit bis zu 120 h stellten Koensgen et al. (2017) in vitro bei 96 h und 120 h einen signifikanten antiproliferativen Effekt bereits nach 15 s Exposition fest. Bei kürzeren Inkubationszeiten der OC-Zellen wurde bei nur 15 s NIPP-Behandlung noch keine signifikante Inhibition beobachtet (Koensgen et al., 2017). Somit findet sich auch hier eine Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen einer Wachstumshemmung ab 30 s NIPP-Behandlung bei einer Inkubationszeit unter 96 h. LNCaP-Zellen reagieren laut In-vitro-Studien bereits ab einer noch geringeren Behandlungszeit von 10 s mit signifikanter Wachstumsreduktion (Weiss et al., 2015a; Weiss et al., 2015b). Effekte auf Mammakarzinomzellen wurden auch in vivo im Tiermodell nachgewiesen (Mirpour et al., 2016).

Neben der Wachstumshemmung durch alleinige Applikation von NIPP wurde in verschiedenen Studien festgestellt, dass diese Behandlung in für andere Interventionen therapierefraktären Malignitäten die Sensibilität für die ursprüngliche Therapie erneut induzieren kann. In Tamoxifen-resistenten MCF-7-Zellen konnte in vitro eine Wiederherstellung der Sensibilität auf bis zu 50 % nach NIPP-Exposition gezeigt werden. Diese wurde durch Regulation der Expression verschiedener an der Resistenzbildung beteiligter Gene induziert (Lee et al., 2017). Auch eine Resistenz gegen Paclitaxel konnte

in vitro in MCF-7-Zellen durch genregulierende Effekte der NIPP-Behandlung teilweise aufgehoben werden. Hier konnten bis zu 73 % der Sensibilität verglichen mit sensiblen Zellen wiederhergestellt werden (Park et al., 2019).
Dieser Effekt des NIPP wurde jedoch nicht nur in MCF-7-Zellen beobachtet. Im Glioblastom konnte, ebenfalls in vitro, eine Sensibilitätserhöhung bei Resistenzen gegen das alkylierende Zytostatikum Temozolomid nachgewiesen werden (Köritzer et al., 2013).

Dieser Aspekt bietet in der klinischen Anwendung Vorteile für die Patienten, da der Tumor nicht nur durch die von uns gezeigten antiproliferativen Effekte in seinem Wachstum gehemmt wird, sondern bei einer Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika auch eventuellen Resistenzen durch die NIPP-Applikation entgegengewirkt werden könnte.

Anders als bei der Chemotherapie reagieren Krebszellen deutlich sensitiver als nicht-maligne Zellen auf die Behandlung mit NIPP. Dieser Effekt wird darauf zurückgeführt, dass in Krebszellen bereits vor der Behandlung eine höhere Konzentration an reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies herrscht. Die Reserve an anti-oxidativen Mechanismen, wie z. B. Glutathion, ist bei zusätzlicher Induktion reaktiver Spezies durch NIPP in entarteten Zellen demnach schneller erschöpft, als in gesunden (Dai et al., 2020; Yan et al., 2017).
Diesen Effekt der Selektivität zeigten auch Ermakov et al. (2021) in vitro. Mesenchymale Stammzellen reagierten in ihrer Studie auf NIPP mit vermehrtem Wachstum und einer Induktion von proliferationsfördernden Genen. Dagegen wurde das Wachstum humaner Osteosarkomzellen bei derselben Dosis NIPP durch Nekrose und Zellzyklus-Arrest auf 41 % gehemmt. Auch die Transkription proliferativer Gene war vermindert (Ermakov et al., 2021).
Weitere in-vitro-Studien bestätigten, dass NIPP selektiv auf Brustkrebszellen wirkt, während gesunde mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks intakt bleiben (Wang et al., 2013). Diese Feststellung ist besonders interessant, um eine sichere Behandlung der bei Mammakarzinomen häufigen Knochenmetastasen zu gewährleisten.
Im Gegensatz dazu wird in anderen Studien, sowohl in vitro, als auch in vivo, eine modulierende und damit die Tumorgenese verlangsamende Auswirkung der ROS-Konzentration auf Tumorstammzellen diskutiert (Dai et al., 2020).
Studien zeigen in vitro, dass NIPP zudem möglicherweise die Angiogenese unterdrückt,

indem VEGF-A gehemmt wird (Haralambiev et al., 2019).
Park et al. (2015) behandelten in vitro Östrogenrezeptor-negative MDA-MB-231-Zellen und hierfür positive MCF-7-Zellen jeweils mit NIPP und analysierten anschließend das Methylierungsmuster der DNA. Hierbei zeigte sich reaktiv eine Hypomethylierung von CpG-Inseln in der Region Alu nur bei MDA-MB-231-Zellen, deren Wachstum durch NIPP deutlich stärker gehemmt wurde, als das von MCF-7. Die Autoren schlussfolgerten, dass epigenetische Einflüsse und damit die Wirksamkeit von NIPP zelllinienspezifisch seien (Park et al., 2015).
Zu beachten ist außerdem die Dosisabhängigkeit der NIPP-Wirkung in vitro. So führen niedrigere Dosen zur Wachstumshemmung, während gesteigerte Exposition zunächst Apoptose und anschließend Nekrose induziert (Dai et al., 2020).

Die Dosisabhängigkeit der NIPP-Wirkung zeigt sich auch in den unterschiedlichen Anwendungsgebieten der Behandlung neben jener als potentielle Therapie onkologischer Erkrankungen. So wirkt eine niedrige applizierte Intensität angiogenese- und proliferationsfördernd. Bei den für die Applikation auf Krebszellen verwendeten höheren Intensitäten finden sich jedoch die von uns beobachteten proliferationshemmenden Effekte wieder. Diese Effekte wurden in in-vitro- und in-vivo-Studien gezeigt (Woedtke et al., 2019).
Mesenchymale Stammzellen werden von NIPP in in vitro Experimenten unter Erhalt ihrer Vitalität zur Proliferation angeregt (Ermakov et al., 2021; Park et al., 2016). Neben dem Potential, dadurch regenerative Prozesse zu unterstützen oder gar zu induzieren, ist diese Erkenntnis unerlässlich, um eine Tumortherapie anzustreben, ohne die Funktionalität eventuell räumlich nahe gelegener Stammzellen einzuschränken.
In mehreren klinischen Studien wurde die Anwendung von NIPP zur Unterstützung von Wundheilung exploriert (Braný et al., 2020). So konnte eine signifikant beschleunigte Wundheilung bei chronischen ulzerierenden Wunden bei diabetischem Fußsyndrom in einer randomisierten klinischen Studie nachgewiesen werden (Stratmann et al., 2020). Weitere Studien konzentrierten sich auf die Reduktion von Bakterien im Gebiet der chronischen Wunde. Dabei wurden randomisiert einzelne Wunden der Patienten zur Standardbehandlung plus NIPP-Behandlung ausgewählt, während andere Wunden der jeweils selben Patienten nur standardmäßig versorgt wurden. Bei zusätzlicher Applikation

von NIPP konnte die Menge verschiedener bakterieller Erreger reduziert werden (Isbary et al., 2012). Auch bei akuten Wunden konnte die Wundheilung durch NIPP-Applikation verbessert werden. Van Welzen et al. (2021) quantifizierten die Wundheilung über mehrere Parameter: Sauerstoffsättigung im tiefen Gewebe, Hämoglobinverteilung und Verteilung von Wasser im Gewebe. Auch das subjektive Schmerzempfinden der Patienten wurde erfragt. Insgesamt verbesserten sich alle Parameter in der mit NIPP behandelten Patientengruppe (van Welzen et al., 2021). Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden in vitro sowie in vivo am Mausmodell untersucht. In vitro wurde eine Modulation von mit der Wundheilung assoziierten Genen festgestellt. So wurde beispielsweise in Fibroblasten mehr IL-1 ra (IL-1F3), IL-6, IL-8, MCP-1 (CCL2), TGF-ß1 und TGF-ß2 exprimiert. Eine Apoptose wurde, anders als bei Tumorzellen, in Fibroblasten durch NIPP nicht induziert. Die Fibroblastenmigration wurde durch NIPP induziert, während ihre Proliferation unbeeinflusst blieb. Die Autoren der Studie konnten mehr Alpha-Actin-2-mRNA (alpha smooth muscle actin, alpha-SMA) nachweisen. Dieses kann in aktivierten Fibroblasten, sog. Myofibroblasten, nachgewiesen werden. Auch die Kollagen-Typ-I-Produktion wurde induziert, was insgesamt auf eine Fibroblastenaktivierung schließen ließ. Die in vivo Kontrollen bestätigten die Annahmen der Autoren (Arndt et al., 2013). In den hier zitierten Studien wurde die Therapie gut vertragen und keine relevanten unerwünschten Wirkungen festgestellt.
Kleineidam et al. (2019) konnten für orale Wunden einen wundheilungsbeschleunigenden Effekt in vitro feststellen. In ihrer Studie wurden Proliferationsmarker vermehrt und apoptotische Marker vermindert nachgewiesen (Kleineidam et al., 2019).
In der Zahnheilkunde bestehen noch weitere Optionen für den Einsatz von NIPP. So kann die Anwendung von Implantaten durch den in vitro nachgewiesenen antibakteriellen Effekt von NIPP sowie durch die gesteigerte Proliferation und Adhäsionsfähigkeit NIPP-behandelter Zellen verbessert werden (Wagner et al., 2022).

Insgesamt präsentiert sich NIPP als sichere Therapie für unterschiedlichste Indikationen (Dai et al., 2020; Yan et al., 2017). Der Einsatz als Therapie bei onkologischen Erkrankungen bietet verglichen mit herkömmlichen Therapien viele Vorteile. So wurden in klinischen Studien zur Wundheilung keine unerwünschten Nebenwirkungen beobachtet. Die Applikationsform kann sehr gezielt und punktuell oder großflächiger gewählt werden. Dabei werden gesunde Zellen nicht in ihrem Wachstum gehemmt und

auch Stammzellen nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt. Neben der direkten Wachstumshemmung der drei malignen Zelltypen durch NIPP kann eine Wiederherstellung der Sensibilität bei therapieresistenten Karzinomen infrage kommen. Gerade für die Steroidhormon-abhängigen Karzinome stellt NIPP eine Behandlungsmöglichkeit dar, die für die Patienten eine Alternative ohne den mit massiven Beeinträchtigungen verbundenen Hormonentzug sein kann.
In dieser Arbeit konnte der inhibierende Effekt von NIPP auf die malignen Zelllinien LNCaP, MCF-7 und OVCAR-3 signifikant nachgewiesen werden.

Hitzeschockproteine unterstützen bei der Faltung von Proteinen in ihre funktionelle Konfiguration und vermitteln bei Fehlfaltung die erneute Konfigurationsänderung der betroffenen Proteine, wodurch eine Proteinaggregation verhindert wird (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Mayer und Bukau, 2005).

Neben dieser physiologischen Funktion tragen HSP in entarteten Zellen über mehrere, im Folgenden genauer erläuterte Mechanismen zur Krebsprogression bei.
Die Rolle von HSP in malignen Zellen zeigt sich bereits darin, dass mehrere Arbeiten in vitro und in vivo erhöhte Spiegel von HSP70 und HSP27 in Tumorzellen verglichen mit gesunden Zellen nachweisen konnten (Voll et al., 2014; Vostakolaei et al., 2019; Yun et al., 2019). Auch Zusammenhänge zwischen der vermehrten Expression der o. g. Hitzeschockproteine mit dem Erkrankungsstadium und der Prognose für die Patienten zeigen sich (Bodzek et al., 2021; Lee et al., 2015; Sherman und Gabai, 2015; Voll et al., 2014).

Vor allem HSP70 treibt über verschiedenste Mechanismen die Progression des Tumors in verschiedenen malignen Zellen voran. Dabei ist es an fast allen sog. „Hallmarks of Cancer“, also den für die malignen Zellen überlebenswichtigen pathologischen Prozessen, beteiligt (Albakova et al., 2020; Sherman und Gabai, 2015; Wang et al., 2014; Wu et al., 2017; Yun et al., 2019). So hemmt HSP70 sowohl den extrinsischen, als auch den intrinsischen Weg der Apoptose, stabilisiert lysosomale Membranen, um eine Nekrose der Zelle zu verhindern und verhindert möglicherweise die Seneszenz der malignen Zellen (Albakova et al., 2020). Auch die Inaktivierung des Tumorsuppressors

p53 durch HSP70 und seinen Komplex mit HSP90, HSP40 und HOP, mit welchem auch HSP27 interagiert, konnte gezeigt werden (Albakova et al., 2020; Culig und Santer, 2014; Li et al., 2018; Zoubeidi et al., 2007). Zudem erhöht es das Potential zur Metastasierung und die Invasivität (Albakova et al., 2020).
All dies macht die in dieser Arbeit erfolgte Betrachtung der HSP-Expression im Kontext der Krebstherapie interessant. Hierbei ist sowohl eine mögliche Regulation der HSP-Spiegel als therapeutische Möglichkeit denkbar, als auch die Beurteilung von Resistenzmechanismen durch reaktiv erhöhte Expressionslevel.

HSP70 übt seine Funktionen als Hitzeschockprotein ATP-abhängig aus (Albakova et al., 2020). Es hat eine C-terminale Peptidbindungsstelle und eine N-terminale ATPase Domäne. Durch HSP70-Vermittlung gefaltete Proteine werden mithilfe der bei hydrolytischer Spaltung von ATP genutzten intrinsischen Aktivität freigesetzt (Calderwood und Gong, 2016).
Während gesunde Zellen kaum HSP70 exprimieren, zeigen verschiedenen maligne Zelllinien eine vermehrte Expression (Vostakolaei et al., 2019). Hierbei korreliert ein hohes HSP70-Expressionslevel mit Fortschreiten der Erkrankung und weist auf eine verschlechterte Prognose für die Patienten hin (Sherman und Gabai, 2015). Vor allem in Radiatio-resistenten Malignitäten wurden hohe Expressionsraten von HSP70 festgestellt (Yun et al., 2019). Auch eine Resistenz gegen andere Therapien ist unter vermehrter HSP70-Expression wahrscheinlich (Vostakolaei et al., 2019). HSP70 verhindert apoptotische Prozesse, unterdrückt die physiologische immunologische Tumorantwort und fördert die für die Progression des tumorösen Wachstums sowie der Metastasierung unerlässliche Angiogenese (Albakova et al., 2020; Sherman und Gabai, 2015). HSP70 ist im Stande, in fast allen Phasen die Apoptose zu unterdrücken. Beispielsweise ist hier seine Fähigkeit, den TNF-α-vermittelten Weg der Apoptose zu hemmen, hervorzuheben (Wang et al., 2014). Die Beteiligung von HSP70 an beinahe allen Hallmarks of Cancer lässt auf eine direkte Abhängigkeit der Krebszellen von HSP70 schließen. Auch die Tatsache, dass Tumorzellen aufgrund ihrer erhöhten Teilungsrate im Vergleich zu gesunden Zellen konstant mehr Stress durch Hypoxie und Nährstoffmangel ausgesetzt sind, führt zu einem Bedarf der Zelle an Apoptose-unterdrückenden Mechanismen. Vor allem HSP70 eignet sich hierfür, da es nicht nur die Apoptose hemmt, sondern auch dazu beiträgt, dass bei Stress vermehrt entstehende fehlgefaltete, für die Zelle toxische,

Proteine in geringerem Maße akkumulieren (Sherman und Gabai, 2015; Murphy, 2013). Mehrere Studien bestätigen, dass Überleben und Wachstum von Krebszellen im Gegensatz zu dem gesunder Zellen von HSP70 abhängig sind (Murphy, 2013; Sherman und Gabai, 2015). Entscheidend hierbei ist wohl, dass HSP70 einen Übergang der entarteten Zellen in die Seneszenz zu verhindern scheint (Sherman und Gabai, 2015).

Die vielseitige Beteiligung von HSP70 bei diesen pathologischen Prozessen unterstreicht die Relevanz der Untersuchung der HSP70-Expression bei der Implementierung neuer möglicher Krebstherapien.
So wurde in dieser Arbeit eine signifikante Steigerung der HSP70-Expression in LNCaP-Zellen nach NIPP-Behandlung beobachtet.

NIPP beschädigt die Zellwand durch Bildung freier Sauerstoffradikale (He et al., 2020). Somit wäre es denkbar, dass die HSP70-Expression zwar gesteigert wird, jedoch aufgrund des ATP-Verlusts bei defekter Zellmembran das ATP-abhängige HSP funktionsunfähig bleibe und somit nicht aktiv zur weiteren Progression des Wachstums von LNCaP trotz eigentlich erzielter Wachstumsminderung durch NIPP beiträgt. Sherman und Gabai (2015) berichteten jedoch auf Basis von in vitro Daten von einer von der Faltungs-Funktion unabhängige Unterdrückung der Apoptose (Gabai et al., 2002; Sherman und Gabai, 2015;).
Auf Basis dieser die Tumorprogression unterstützenden Mechanismen, welche auch bei möglichem Verlust der ATP-abhängigen Faltungs-Funktion aktiv bleiben, könnte die von uns beobachtete gesteigerte Expression von HSP70 in LNCaP-Zellen als Induktion eines Resistenzmechanismus gegen NIPP-Behandlung bewertet werden. Während des 72 h Beobachtungszeitraums in dieser Arbeit konnte eine Erholung von den wachstums-inhibierenden Effekten des NIPP trotz dieser Expressionssteigerung nicht festgestellt werden.
Die von uns angenommene Theorie der Resistenzentwicklung über erhöhte HSP70-Level wird durch mehrere Studien unterstützt. Zum Beispiel behandelten Sliutz et al. (1996) Fibrosarkomzellen in vitro mit Gemcitabin und Topotecan. Zellen mit HSP70 Überexpression konnten höheren Konzentrationen der Medikamente ausgesetzt werden, als Zellen mit niedrigeren Expressionslevels (Sliutz et al., 1996), was für einen Resistenzmechanismus spricht.

Auch wurde der Beitrag von HSP27 zu Therapieresistenzen in Ovarial- und Prostatakarzinomzellen in vitro bereits beschrieben (Stope et al., 2014; Stope et al., 2016) und macht so die Möglichkeit eines ähnlichen Mechanismus unter HSP70-Vermittlung wahrscheinlich. Ein Beitrag von HSP70 zur Cisplatin-Resistenz von Ovarialkarzinom-zellen wurde in vitro beschrieben (Yang et al., 2012).

Ein weiteres Indiz für einen Resistenzmechanismus durch Hochregulation von HSP27 liefern die Ergebnisse von Weiss et al. (2015). Diese in-vitro-Studie weist die Induktion von Redoxstress durch Behandlung mit NIPP nach. Der NIPP-Effekt ließ sich dabei durch die Zugabe von N-Acetylcystein, aus welchem das Antioxidans Glutathion synthetisiert werden kann, aufheben (Weiss et al., 2015b). Einen ähnlichen Effekt könnte die antioxidative Wirkung von HSP27 vermitteln. Dieses trägt über eine Aktivierung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD), welches im Pentose-Phosphat-Weg beteiligt ist, indirekt über eine NADPH-Synthese zur Reduktion von Glutathiondisulfid bei (Matsuo et al., 2021).

Obwohl HSP70 die Progression maligner Prozesse an vielen Stellen unterstützt, konnte in vitro auch gezeigt werden, dass eine erhöhte Konzentration an HSP70 in manchen Fällen eine immunologische Tumorantwort mittels Antigen-präsentierender Zellen induziert (Vostakolaei et al., 2019). Eine Stimulation von NK-Zellen und regulatorischen T-Zellen konnte ebenfalls beobachtet werden (Albakova et al., 2020). Während sich die von uns beobachtete Induktion von HSP70 in LNCaP also zunächst als prognostisch ungünstig darstellt, wäre es möglicherweise denkbar, bei tieferem Verständnis dieses Effekts auch eine antikanzeröse Immunantwort hierauf zu induzieren. Hierfür liegen jedoch aktuell noch keine ausreichenden Belege vor.

In MCF-7- und OVCAR-3-Zellen veränderte sich der HSP70-Spiegel nicht signifikant. Daher scheint eine mögliche Induktion HSP70-vermittelter Resistenzen nicht wahrscheinlich.

Im Gegensatz zu HSP70 übt HSP27 seine physiologische Funktion als Hitzeschockprotein ATP-unabhängig aus (Katsogiannou et al., 2014; Yun et al., 2019).

Doch genau wie HSP70 trägt es über weitere Funktionen erheblich zur Tumorgenese bei. So ist es an apoptotischen Signalwegen beteiligt und nimmt Einfluss auf die Homöostase des Zytoskeletts. Eine in Tumorzellen beobachtete Überexpression von HSP27 trägt zu Tumorgenese, zu invasivem Wachstum und zur Metastasierung bei (Wang et al., 2014; Yun et al., 2019). Pathomechanistisch bedeutend ist hierbei vermutlich die in vitro nachgewiesene Funktion des HSP27 als wichtiger Regulator des Salvador-Warts-Hippo-Signalwegs, der zahlreiche onkogene Signalwege aktiviert. Über diesen Mechanismus trägt HSP27 auch zur kanzerogenen Funktion von Tumor-Stammzellen bei (Yun et al., 2019).

Auch für Androgen-abhängige Tumoren scheint HSP27 unerlässlich, da es den Transport des AR in den Nukleus vermittelt (Culig und Santer, 2014; Li et al., 2018; Zoubeidi et al., 2007). Eine modulierte HSP27-Expression hätte demnach direkten Einfluss auf die Funktion des AR. Somit könnte ein weiterer wachstumsinhibierender Effekt durch eine gestörte Funktion des Rezeptors erzielt werden, was zu einem funktionellen Hormonentzug für den Tumor führen würde. Dies wäre für die von uns betrachteten androgenabhängigen Prostatakarzinomzellen relevant. In dieser Arbeit konnte jedoch keine verminderte HSP27 Expression in LNCaP-Zellen gezeigt werden.

Für hepatozelluläre Karzinome wurde in vitro eine verminderte Proliferations- sowie Invasionsfähigkeit nach HSP27-Knockdown festgestellt (Ge et al., 2017).
Auch in Patientinnen mit Ovarialkarzinomen besteht eine positive Korrelation zwischen erhöhtem Serum-HSP27 und Tumorprogression sowie dem klinischen Stadium nach FIGO-Klassifikation (Bodzek et al., 2021). Ein ähnlicher Zusammenhang wurde auch für das Prostatakarzinom nachgewiesen. HSP27 steht auch hier im Zusammenhang mit Aggressivität und Metastasierungsstatus der Erkrankung (Voll et al., 2014). Übertragen auf die klinische Praxis besteht hier eine Korrelation zwischen HSP27-Spiegel und einem hohen Wert im Gleason-Score (Lee et al., 2015).
Aufgrund seines Beitrags zur Tumorgenese sowie der erwiesenen Korrelation mit klinischen Stadien bietet HSP27 das Potential, als klinischer Marker eingesetzt zu werden.

Die hier beobachtete unveränderte HSP27-Expression nach Behandlung mittels NIPP war insgesamt positiv zu bewerten, denn sie sprach möglicherweise gegen einen Resistenzmechanismus.

Insgesamt induzierte in dieser Versuchsreihe eine Behandlung mit NIPP folglich keine potentiellen Resistenzen über HSP70- oder HSP27-Induktion in OVCAR-3- und MCF-7-Zellen. Lediglich in LNCaP-Zellen konnte ein möglicher Resistenzmechanismus mittels gesteigerter HSP70-Expression identifiziert werden.

Im Vergleich dazu weisen zahlreiche Studien nach Chemotherapie Resistenz-mechanismen der behandelten Tumoren über eine veränderte Konzentration an verschiedenen HSP nach (Eyermann et al., 2021; Kimura et al., 2017; Li, 2008; Tang et al., 2018; Tracz-Gaszewska et al., 2017).

Für die von uns betrachteten MCF-7-Zellen finden sich Angaben zur HSP27-vermittelten Resistenz gegen Doxorubicin (Fuqua et al., 1994) sowie HSP27- und HSP70-vermittelte Resistenzen nach Induktionschemotherapie (Vargas-Roig et al., 1998) in vitro und in vivo der Literatur. Den Beitrag einer gesteigerten HSP27-Expression zu Therapieresistenzen in Prostatakarzinomzellen legen vorangegangene in vitro Studien nahe (Stope et al., 2014; Stope et al., 2016).

Auch nach Bestrahlung ist eine gesteigerte HSP27- bzw. HSP70-Expression in verschiedenen Malignitäten in vitro zu beobachten und wird als Mechanismus einer Resistenz interpretiert (Muschter et al., 2018; Rajesh et al., 2020).

Die von uns beobachtete geringe Neigung der Tumorzellen, auf NIPP-Behandlung mit gesteigerter HSP-Expression zu reagieren, präsentiert sich hierbei demnach als prognostisch günstig und könnte ein Hinweis auf eine niedrigere Resistenzrate verglichen mit konventioneller chemotherapeutischer Behandlung bzw. Radiatio sein. Auch bei im Therapieverlauf auftretenden, HSP-induzierten Resistenzen gegen etablierte Therapien stellte NIPP eine alternative Behandlungsstrategie für die Patienten dar, da unseren Ergebnissen nach bei OVCAR3- und MCF-7 nicht von einer analog vermittelten Resistenz auszugehen ist.

Während die beobachtete erhöhte Expression von HSP70 in LNCaP-Zellen auf einen Resistenzmechanismus gegen NIPP schließen lässt, untersuchten Ciocca et al. (1998) die Assoziation von HSP27 und HSP70 mit Resistenzen gegen Tamoxifen. Dabei konnte keine Korrelation zwischen erhöhten HSP27- und HSP70-Konzentrationen mit einer Therapieresistenz festgestellt werden (Ciocca et al., 1998). Eine Untersuchung weiterer Resistenzmechanismen scheint daher auch für NIPP sinnvoll.

Umgekehrt zu Resistenzen durch HSP-Expressionssteigerung wurde die Verringerung der HSP-Expression als zur Wirkung des Cabazitaxel beitragende Wirkweise in vitro identifizert (Rottach et al., 2019). Analog hierzu werden auch Kombinationstherapien etablierter Behandlungsoptionen mit HSP-Inhibitoren sowohl vitro, als auch in vivo (Shevtsov et al., 2019) sowie Therapien basierend auf dem alleinigen Einsatz verschiedener Kombinationen von HSP-Inhibitoren, ebenfalls in vitro und in vivo (Albakova et al., 2020; McConnell und McAlpine, 2013; Wang et al., 2014), in Studien untersucht. Eine Reduktion der HSP-Spiegel als möglicher molekularer Wirkmechanismus der Wachstumssuppression durch NIPP konnte von uns nicht nachgewiesen werden.
Interessant ist jedoch eine Kombination von Chemotherapeutika und NIPP unter dem Aspekt einer kombinierten Wachstumshemmung bei möglicher reduzierter Dosis an Chemotherapeutikum.

Ebenfalls denkbar ist eine allgemeine Überwachung des Therapieerfolgs mittels HSP27 und HSP70. Die Nutzung zur Kontrolle der Tumorprogression wird bereits in Studien diskutiert (Dimas et al., 2018; Fahim et al., 2021; Saini und Sharma, 2018), aber auch eine Überwachung von Resistenzentwicklungen mittels HSP erscheint sinnvoll.

Alle in dieser Arbeit betrachteten Malignitäten sind hormonabhängig. Steroidrezeptoren werden durch das HSP90/HSP70-System vor proteolytischem Abbau durch das Proteasom-System geschützt (Pratt und Toft, 1997; Pratt et al., 2004). Grundsätzlich würde eine durch NIPP induzierte Verminderung der HSP70-Expression vermutlich zu einem erhöhten Abbau der Steroidhormonrezeptoren führen und den Tumoren folglich die stimulierenden Hormone entziehen. Eine solche Inhibition von HSP70 wurde jedoch nicht gezeigt.

NIPP könnte zu den bei Prostatakarzinomen bereits etablierten Methoden als alternative Behandlungsmethode infrage kommen. LNCaP-Zellen zeigten in den durchgeführten Versuchen schon nach 15 s NIPP-Behandlung wachstumsinhibierende Effekte und waren damit sensibler für die Behandlung als die anderen beiden Zelllinien.
Bei Enzalutamid-Behandlung konnte in einer vorangegangenen in vitro Studie eine

Veränderung des HSP-Systems festgestellt werden. Die Studie stellte auch eine verminderte Expression des AR fest. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass die antiproliferative Wirkung von Enzalutamid zum Teil auf Modulation von mit Steroidrezeptoren-assoziierten HSP basiert. Hierbei reagierten die auch in dieser Arbeit betrachteten LNCaP-Zellen sensitiver auf Enzalutamid als die AR-negativen PC-3-Zellen. Unterstützend wurden Studien zitiert, in denen weitere hormonsensitive maligne Zelllinien eine höhere Sensibilität auf Enzalutamid aufwiesen als hormonunabhängige. Unter anderem wurde eine höhere Sensibilität von für ER und PR positiven und HER-2/neu-negativen MCF-7-Zellen verglichen mit für ER und PR negativen MDA-MB-231-Zellen festgestellt. Postuliert wurde folglich, dass die durch Enzalutamid gehemmte HSP-Expression zu verminderter Steroidhormonrezeptor-Expression führt und über diesen Mechanismus zur Wachstumshemmung beiträgt (Abazid et al., 2019).

Ein ähnlicher Zusammenhang könnte demnach auch bei einer Regulation der HSP-Expression durch NIPP vermutet werden. Folglich könnte eine gesteigerte Expression von HSP70 in LNCaP-Zellen die Expression der Steroidhormonrezeptoren beeinflussen. Abazid et al. (2019) beobachteten jedoch keine signifikante Modulation von HSP70, sondern stützen ihre Annahme vor allem auf die Herunterregulation von HSP27, HSP40 und HSP90β nach Enzalutamid-Exposition. Dagegen spricht zudem, dass die von uns beobachtete gesteigerte Expression von HSP70 auch eher mit einem gesteigerten Vorliegen von Steroidhormonrezeptoren einhergehen würde und somit einen proliferativen, statt einen antiproliferativen Effekt des NIPP auf die Zellen begünstigen würde. Hier könnte sich jedoch die Theorie eines Resistenzmechanismus durch gesteigerte HSP70-Expression mit einem erst deutlich später auftretenden Effekt auf die Steroidhormonrezeptor-Konzentration und damit auf die Proliferation wiederfinden. Zudem ist HSP70 gleichermaßen wie HSP90 und HSP40 an der Stabilisierung der Steroidrezeptoren beteiligt und könnte somit Einfluss auf die Steroidhormonrezeptor-Konzentration nehmen (Li et al., 2018; Pratt und Toft, 2003).

5. Zusammenfassung

Nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP) gilt als vielversprechender Therapieansatz in der Onkologie. Eine Wachstumshemmung in verschiedenen Malignitäten konnte in der Vergangenheit ebenso nachgewiesen werden, wie eine höhere Sensitivität der malignen Zellen gegenüber dem NIPP verglichen mit regulären, physiologischen Zellen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der Hitzeschockproteine (HSP) HSP70 und HSP27 nach NIPP-Behandlung in Zellen, deren Wachstum durch die Behandlung gehemmt wurde, zu charakterisieren.

Im Zuge dessen konnte die Wachstumsinhibition auf MCF-7-, OVCAR-3- und LNCaP-Zellen nach unterschiedlicher NIPP-Applikationsdauer gezeigt werden. LNCaP präsentierte sich dabei als die für die Behandlung sensibelste der drei betrachteten Zelllinien und zeigte eine signifikante Wachstumsreduktion bereits nach 15 s NIPP-Applikation.
MCF-7- und OVCAR-3-Zellen reagierten nach 30 s Behandlung mit einer signifikanten Wachstumsinhibition.

Eine mögliche HSP-Suppression von HSP27 oder HSP70 als Wirkmechanismus des NIPP konnte in keiner der untersuchten Zelllinien bestätigt werden.

Im Gegensatz zu etablierten Therapien konnte keine mögliche Resistenzinduktion durch HSP70- oder HSP27-Expressionssteigerung in MCF-7- und OVCAR-3-Zellen beobachtet werden. LNCaP zeigte eine signifikant gesteigerte Expression von HSP70 und damit einen potentiellen Resistenzmechanismus gegen NIPP.

Diese Erkenntnisse legen eine Anwendung von NIPP nicht nur als alleinige Therapie, sondern auch als Kombinationstherapie bei Resistenzen gegen herkömmliche Verfahren wie Chemotherapie und Radiatio nahe.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Das Gerät	30
Abbildung 2:	Behandlung der Zellen mit dem Kinpen	31
Abbildung 3:	Wachstumskinetik der Zelllinie OVCAR-3 nach 30 s Behandlung mit NIPP	37
Abbildung 4:	Wachstumskinetik der Zelllinie MCF-7 nach 30 s Behandlung mit NIPP	38
Abbildung 5:	Wachstumskinetik der Zelllinie LNCaP nach 30 s Behandlung mit NIPP	39
Abbildung 6:	OVCAR-3-Zellen mit und ohne 30 s NIPP-Behandlung nach 24 h, 48 h und 72 h	41
Abbildung 7:	Wachstumskinetik der Zelllinie OVCAR-3 nach verschiedener Expositionsdauer gegenüber NIPP	43
Abbildung 8:	MCF-7-Zellen mit und ohne 30 s NIPP-Behandlung nach 24 h, 48 h und 72 h	44
Abbildung 9:	Wachstumskinetik der Zelllinie MCF-7 nach verschiedener Expositionsdauer gegenüber NIPP	45
Abbildung 10:	LNCaP-Zellen mit und ohne 30 s NIPP-Behandlung nach 24 h, 48 h und 72 h	46
Abbildung 11:	Wachstumskinetik der Zelllinie LNCaP nach verschiedener Expositionsdauer gegenüber NIPP	47
Abbildung 12:	Western Blot-Analysen (Abb. 12A) und Quantifizierung (Abb. 12B) von HSP27 sowie Analyse (Abb. 12C) und Quantifizierung (Abb. 12D) von HSP70 in OVCAR-3-Zellen nach 30 s NIPP-Behandlung	50
Abbildung 13:	Western Blot-Analysen (Abb. 13A) und Quantifizierung (Abb. 13B) von HSP27 sowie Analyse (Abb. 13C) und Quantifizierung (Abb. 13D) von HSP70 in MCF-7-Zellen nach 30 s NIPP-Behandlung	52
Abbildung 14:	Western Blot-Analysen (Abb. 14A) und Quantifizierung (Abb. 14B) von HSP27 sowie Analyse (Abb. 14C) und Quantifizierung (Abb. 14D) von HSP70 in LNCaP-Zellen nach 30 s NIPP-Behandlung	54

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema für ein SDS-Gel 33

8. Literaturverzeichnis

Abazid A, Martin B, Choinowski A, McNeill RV, Brandenburg L-O, Ziegler P, Zimmermann U, Burchardt M, Erb H, Stope MB. The androgen receptor antagonist enzalutamide induces apoptosis, dysregulates the heat shock protein system, and diminishes the androgen receptor and estrogen receptor β1 expression in prostate cancer cells. J Cell Biochem 2019; 120: 16711–16722

Acunzo J, Andrieu C, Baylot V, So A, Rocchi P. Hsp27 as a therapeutic target in cancers. Curr Drug Targets 2014; 15: 423–431

Ahn HJ, Kim KI, Hoan NN, Kim CH, Moon E, Choi KS, Yang SS, Lee J-S. Targeting cancer cells with reactive oxygen and nitrogen species generated by atmospheric-pressure air plasma. PLoS One 2014; 9: e86173

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

Albakova Z, Armeev GA, Kanevskiy LM, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM. HSP70 Multi-Functionality in Cancer. Cells 2020; 9: 587

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2017: Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Langversion 4.4 – Juni 2021. https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/032-045OL.html (Zugriffsdatum: 15.05.2022)

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2021a: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Version 5.0 - September 2021. https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/032-035OL.html (Zugriffsdatum: 16.05.2022)

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2021b: S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Version 6.2 – Oktober 2021. https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/043-022OL.html (Zugriffsdatum: 14.05.2022)

Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li Y-F, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL, Bosserhoff A-K, Karrer S. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. PLoS One 2013; 8: e79325

Beato M. Induction of transcription by steroid hormones. Biochim Biophys Acta 1987; 910: 95–102

Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP. DNA regulatory elements for steroid hormones. J Steroid Biochem 1989; 32: 737–747

Bekeschus S, Freund E, Spadola C, Privat-Maldonado A, Hackbarth C, Bogaerts A, Schmidt A, Wende K, Weltmann K-D, Woedtke T von, Heidecke C-D, Partecke L-I, Käding A. Risk Assessment of kINPen Plasma Treatment of Four Human Pancreatic Cancer Cell Lines with Respect to Metastasis. Cancers (Basel) 2019; 11: 1237

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

Bodzek P, Damasiewicz-Bodzek A, Janosz I, Witek L, Olejek A. Heat shock protein 27 (HSP27) in patients with ovarian cancer. Ginekol Pol 2021; 92: 837–843

Braný D, Dvorská D, Halašová E, Škovierová H. Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. Int J Mol Sci 2020; 21: 2932

Calderwood SK, Gong J. Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. Trends Biochem Sci 2016; 41: 311–323

Cheng S, Balk SP. Steroid hormone receptor signaling in cancer. Cancer Treat Res 2003; 115: 293–318

Chuangsuwanich A, Assadamongkol T, Boonyawan D. The Healing Effect of Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasma in Pressure Ulcer: A Randomized Controlled Trial. Int J Low Extrem Wounds 2016; 15: 313–319

Ciocca DR, Green S, Elledge RM, Clark GM, Pugh R, Ravdin P, Lew D, Martino S, Osborne CK. Heat shock proteins hsp27 and hsp70: lack of correlation with response to tamoxifen and clinical course of disease in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer (a Southwest Oncology Group Study). Clin Cancer Res 1998; 4: 1263–1266

Cole TJ, Short KL, Hooper SB. The science of steroids. Semin Fetal Neonatal Med 2019; 24: 170–175

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

Culig Z, Santer FR. Androgen receptor signaling in prostate cancer. Cancer Metastasis Rev 2014; 33: 413–427

Daeschlein G, Scholz S, Arnold A, Podewils S von, Haase H, Emmert S, Woedtke T von, Weltmann K-D, Jünger M. In Vitro Susceptibility of Important Skin and Wound Pathogens Against Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) and Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBD). Plasma Process Polym 2012; 9: 380–389

Dai X, Bazaka K, Thompson EW, Ostrikov KK. Cold Atmospheric Plasma: A Promising Controller of Cancer Cell States. Cancers (Basel) 2020; 12: 3360

Deutzmann R. Steroidhormonrezeptoren. In: Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R, Hrsg. Duale Reihe Biochemie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2016: 580–581

Dimas DT, Perlepe CD, Sergentanis TN, Misitzis I, Kontzoglou K, Patsouris E, Kouraklis G, Psaltopoulou T, Nonni A. The Prognostic Significance of Hsp70/Hsp90 Expression in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. Anticancer Res 2018; 38: 1551–1562

Erb HHH, Oster MA, Gelbrich N, Cammann C, Thomas C, Mustea A, Stope MB. Enzalutamide-induced Proteolytic Degradation of the Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells Is Mediated Only to a Limited Extent by the Proteasome System. Anticancer Res 2021; 41: 3271–3279

Ermakov AM, Ermakova ON, Afanasyeva VA, Popov AL. Dose-Dependent Effects of Cold Atmospheric Argon Plasma on the Mesenchymal Stem and Osteosarcoma Cells In Vitro. Int J Mol Sci 2021; 22: 6797

Eyermann CE, Haley JD, Alexandrova EM. The HSP-RTK-Akt axis mediates acquired resistance to Ganetespib in HER2-positive breast cancer. Cell Death Dis 2021; 12: 126

Fahim HH, Mohamed G, Safwat G, Abo-Bakr A, Ibraheem MH, Al-Mofty S, Kamel MM, Abdel-Moneim AS, Gameel AM. HSP70 as a Diagnostic and Prognostic Marker in Egyptian Women With Breast Cancer. Clin Breast Cancer 2021; 21: e177-e188

Fernández-Fernández MR, Valpuesta JM. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. F1000Res 2018; 7: F1000 Faculty Rev-1497

Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. Front Biosci (Landmark Ed) 2013; 18: 1358–1372

Freund E, Liedtke KR, van der Linde J, Metelmann H-R, Heidecke C-D, Partecke L-I, Bekeschus S. Physical plasma-treated saline promotes an immunogenic phenotype in CT26 colon cancer cells in vitro and in vivo. Sci Rep 2019; 9: 634

Fuqua SA, Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Hoff DD von, Eckardt J, Osborne CK. Heat shock proteins and drug resistance. Breast Cancer Res Treat 1994; 32: 67–71

Gabai VL, Mabuchi K, Mosser DD, Sherman MY. Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. Mol Cell Biol 2002; 22: 3415–3424

Gallo-Oller G, Ordoñez R, Dotor J. A new background subtraction method for Western blot densitometry band quantification through image analysis software. J Immunol Methods 2018; 457: 1–5

Gay-Mimbrera J, García MC, Isla-Tejera B, Rodero-Serrano A, García-Nieto AV, Ruano J. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. Adv Ther 2016; 33: 894–909

Ge H, Du J, Xu J, Meng X, Tian J, Yang J, Liang H. SUMOylation of HSP27 by small ubiquitin-like modifier 2/3 promotes proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells. Cancer Biol Ther 2017; 18: 552–559

Girard P-M, Arbabian A, Fleury M, Bauville G, Puech V, Dutreix M, Sousa JS. Synergistic Effect of H2O2 and NO2 in Cell Death Induced by Cold Atmospheric He Plasma. Sci Rep 2016; 6: 29098

Goldman A, Ursitti JA, Mozdzanowski J, Speicher DW. Electroblotting from Polyacrylamide Gels. Curr Protoc Protein Sci 2015; 82: 10.7.1-10.7.16

Ha SM, Chae EY, Cha JH, Kim HH, Shin HJ, Choi WJ. Association of BRCA Mutation Types, Imaging Features, and Pathologic Findings in Patients With Breast Cancer With BRCA1 and BRCA2 Mutations. AJR Am J Roentgenol 2017; 209: 920–928

Haertel B, Eiden K, Deuter A, Wende K, Woedtke T von, Lindequist U. Differential effect of non-thermal atmospheric-pressure plasma on angiogenesis. Lett Appl NanoBioSci 2014a; 3: 159–166

Haertel B, Woedtke T von, Weltmann K-D, Lindequist U. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. Biomol Ther (Seoul) 2014b; 22: 477–490

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

Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science 2002; 295: 1852–1858

He Z, Liu K, Scally L, Manaloto E, Gunes S, Ng SW, Maher M, Tiwari B, Byrne HJ, Bourke P, Tian F, Cullen PJ, Curtin JF. Cold Atmospheric Plasma Stimulates Clathrin-Dependent Endocytosis to Repair Oxidised Membrane and Enhance Uptake of Nanomaterial in Glioblastoma Multiforme Cells. Sci Rep 2020; 10: 6985

Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. Endocr Rev 2004; 25: 276–308

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

Horwitz KB, Costlow ME, McGuire WL. MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. Steroids 1975; 26: 785–795

Huber D, Seitz S, Kast K, Emons G, Ortmann O. Use of oral contraceptives in BRCA mutation carriers and risk for ovarian and breast cancer: a systematic review. Arch Gynecol Obstet 2020; 301: 875–884

Isbary G, Heinlin J, Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill G, Schmidt H-U, Monetti R, Steffes B, Bunk W, Li Y, Klaempfl T, Karrer S, Landthaler M, Stolz W. Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial. Br J Dermatol 2012; 167: 404–410

Isbary G, Shimizu T, Li Y-F, Stolz W, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. Expert Rev Med Devices 2013; 10: 367–377

Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. Ann Biomed Eng 2010; 38: 748–757

Kato J. Action mechanism of sex steroid hormones. Nihon Rinsho 1979; 37: 1218–1226

Katsogiannou M, Andrieu C, Rocchi P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. Front Genet 2014; 5: 346

Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Analysis of Proteins by Immunoblotting. Cold Spring Harb Protoc 2021a; 2021

Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. Cold Spring Harb Protoc 2021b; 2021

Kimura A, Ogata K, Altan B, Yokobori T, Mochiki E, Yanai M, Kogure N, Yanoma T, Suzuki M, Bai T, Kuwano H. Nuclear heat shock protein 110 expression is associated with poor prognosis and hyperthermo-chemotherapy resistance in gastric cancer patients with peritoneal metastasis. World J Gastroenterol 2017; 23: 7541–7550

Kleineidam B, Nokhbehsaim M, Deschner J, Wahl G. Effect of cold plasma on periodontal wound healing-an in vitro study. Clin Oral Investig 2019; 23: 1941–1950

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

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

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

Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, van Dijk J, Zimmermann JL. Plasma medicine: an introductory review. New J Phys 2009; 11: 115012

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

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

Lee SW, Cho JM, Cho HJ, Kang JY, Kim EK, Yoo TK. Expression levels of heat shock protein 27 and cellular FLICE-like inhibitory protein in prostate cancer correlate with Gleason score sum and pathologic stage. Korean J Urol 2015; 56: 505–514

Li H. Expression of COP9, JAK2, HSP and NADH in ovarian carcinoma tissues after taxol-chemotherapy and their significance. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 2008; 43: 528–532

Li J, Fu X, Cao S, Li J, Xing S, Li D, Dong Y, Cardin D, Park H-W, Mauvais-Jarvis F, Zhang H. Membrane-associated androgen receptor (AR) potentiates its transcriptional activities by activating heat shock protein 27 (HSP27). J Biol Chem 2018; 293: 12719–12729

Lin H, Lan K-C, Ou Y-C, Wu C-H, Kang H-Y, Chuang I-C, Fu H-C. Highly Expressed Progesterone Receptor B Isoform Increases Platinum Sensitivity and Survival of Ovarian High-Grade Serous Carcinoma. Cancers (Basel) 2021; 13

Liu C, Zha J, Sun T, Kong L, Zhang X, Wang D, Ni G. Cold atmospheric plasma attenuates skin cancer via ROS induced apoptosis. Mol Biol Rep 2024; 51: 518

M. Laroussi. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. IEEE Trans Plasma Sci IEEE Nucl Plasma Sci Soc 1996; 24: 1188–1191

Matsuo K, Hosoda K, Tanaka J, Yamamoto Y, Imahori T, Nakai T, Irino Y, Shinohara M, Sasayama T, Kohmura E. Geranylgeranylacetone attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through the augmentation of HSP 27 phosphorylation: a preliminary study. BMC Neurosci 2021; 22: 9

Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cell Mol Life Sci 2005; 62: 670–684

McConnell JR, McAlpine SR. Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets. Bioorg Med Chem Lett 2013; 23: 1923–1928

Mirpour S, Piroozmand S, Soleimani N, Jalali Faharani N, Ghomi H, Fotovat Eskandari H, Sharifi AM, Mirpour S, Eftekhari M, Nikkhah M. Utilizing the micron sized non-thermal atmospheric pressure plasma inside the animal body for the tumor treatment application. Sci Rep 2016; 6: 29048

Moyer CL, Ivanovich J, Gillespie JL, Doberstein R, Radke MR, Richardson ME, Kaufmann SH, Swisher EM, Goodfellow PJ. Rare BRIP1 Missense Alleles Confer Risk for Ovarian and Breast Cancer. Cancer Res 2020; 80: 857–867

Mülhardt C. Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013

Murphy ME. The HSP70 family and cancer. Carcinogenesis 2013; 34: 1181–1188

Muschter D, Geyer F, Bauer R, Ettl T, Schreml S, Haubner F. A comparison of cell survival and heat shock protein expression after radiation in normal dermal fibroblasts, microvascular endothelial cells, and different head and neck squamous carcinoma cell lines. Clin Oral Investig 2018; 22: 2251–2262

Ni D, Xu P, Gallagher S. Immunoblotting and Immunodetection. Curr Protoc Cell Biol 2017; 74: 6.2.1-6.2.37

Park J, Lee H, Lee HJ, Kim GC, Kim DY, Han S, Song K. Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Efficiently Promotes the Proliferation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells by Activating NO-Response Pathways. Sci Rep 2016; 6: 39298

Park S, Kim H, Ji HW, Kim HW, Yun SH, Choi EH, Kim SJ. Cold Atmospheric Plasma Restores Paclitaxel Sensitivity to Paclitaxel-Resistant Breast Cancer Cells by Reversing Expression of Resistance-Related Genes. Cancers (Basel) 2019; 11: 2011

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

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

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

Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJM. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. Essays Biochem 2004; 40: 41–58

Pratt WB, Gehring U, Toft DO. Molecular chaperoning of steroid hormone receptors. EXS 1996; 77: 79–95

Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. Endocr Rev 1997; 18: 306–360

Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. Exp Biol Med (Maywood) 2003; 228: 111–133

Rajesh Y, Biswas A, Banik P, Pal I, Das S, Borkar SA, Sardana H, Saha A, Das SK, Emdad L, Fisher PB, Mandal M. Transcriptional regulation of HSPB1 by Friend leukemia integration-1 factor modulates radiation and temozolomide resistance in glioblastoma. Oncotarget 2020; 11: 1097–1108

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

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

Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021a: Brustkrebs (Mammakarzinom). https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html (Zugriffsdatum: 15.05.2022)

Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021b: Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom). https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Eierstockkrebs/eierstockkrebs.html (Zugriffsdatum: 16.05.2022)

Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021c: Prostatakrebs (Prostatakarzinom). https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html (Zugriffsdatum: 14.05.2022)

Rottach A-M, Ahrend H, Martin B, Walther R, Zimmermann U, Burchardt M, Stope MB. Cabazitaxel inhibits prostate cancer cell growth by inhibition of androgen receptor and heat shock protein expression. World J Urol 2019; 37: 2137–2145

Saini J, Sharma PK. Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer. Curr Drug Targets 2018; 19: 1478–1490

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

Sherman MY, Gabai VL. Hsp70 in cancer: back to the future. Oncogene 2015; 34: 4153–4161

Shevtsov M, Multhoff G, Mikhaylova E, Shibata A, Guzhova I, Margulis B. Combination of Anti-Cancer Drugs with Molecular Chaperone Inhibitors. Int J Mol Sci 2019; 20: 5284

Singh RR, Kumar R. Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. J Cell Biochem 2005; 96: 490–505

Siu A, Volotskova O, Cheng X, Khalsa SS, Bian K, Murad F, Keidar M, Sherman JH. Differential Effects of Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Malignant Glioma. PLoS One 2015; 10: e0126313

Sliutz G, Karlseder J, Tempfer C, Orel L, Holzer G, Simon MM. Drug resistance against gemcitabine and topotecan mediated by constitutive hsp70 overexpression in vitro: implication of quercetin as sensitiser in chemotherapy. Br J Cancer 1996; 74: 172–177

Statistisches Bundesamt, 2022: Todesursachen 2020. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#235880 (Zugriffsdatum: 30.10.2022)

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

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

Stope MB, Wiegank L, Weiss M, Diesing K, Koensgen D, Burchardt M, Zygmunt M, Mustea A. Drug-induced Modulation of Heat Shock Protein HSPB1 in an Ovarian Cancer Cell Model. Anticancer Res 2016; 36: 3321–3327

Stratmann B, Costea T-C, Nolte C, Hiller J, Schmidt J, Reindel J, Masur K, Motz W, Timm J, Kerner W, Tschoepe D. Effect of Cold Atmospheric Plasma Therapy vs Standard Therapy Placebo on Wound Healing in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. JAMA Netw Open 2020; 3: e2010411

Tang Q, Yuan Q, Li H, Wang W, Xie G, Zhu K, Li D. miR-223/Hsp70/JNK/JUN/miR-223 feedback loop modulates the chemoresistance of osteosarcoma to cisplatin. Biochem Biophys Res Commun 2018; 497: 827–834

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

Tracz-Gaszewska Z, Klimczak M, Biecek P, Herok M, Kosinski M, Olszewski MB, Czerwińska P, Wiech M, Wiznerowicz M, Zylicz A, Zylicz M, Wawrzynow B. Molecular chaperones in the acquisition of cancer cell chemoresistance with mutated TP53 and MDM2 up-regulation. Oncotarget 2017; 8: 82123–82143

Ulrich C, Kluschke F, Patzelt A, Vandersee S, Czaika VA, Richter H, Bob A, Hutten J von, Painsi C, Hüge R, Kramer A, Assadian O, Lademann J, Lange-Asschenfeldt B. Clinical use of cold atmospheric pressure argon plasma in chronic leg ulcers: A pilot study. J Wound Care 2015; 24: 196, 198-200, 202-203

Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Kondo H, Kano H, Hori M, Kikkawa F. Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo. PLoS One 2013; 8: e81576

van Welzen A, Hoch M, Wahl P, Weber F, Rode S, Tietze JK, Boeckmann L, Emmert S, Thiem A. The Response and Tolerability of a Novel Cold Atmospheric Plasma Wound Dressing for the Healing of Split Skin Graft Donor Sites: A Controlled Pilot Study. Skin Pharmacol Physiol 2021; 34: 328–336

Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. Int J Cancer 1998; 79: 468–475

Voll EA, Ogden IM, Pavese JM, Huang X, Xu L, Jovanovic BD, Bergan RC. Heat shock protein 27 regulates human prostate cancer cell motility and metastatic progression. Oncotarget 2014; 5: 2648–2663

Vostakolaei MA, Abdolalizadeh J, Hejazi MS, Kordi S, Molavi O. Hsp70 in Cancer: Partner or Traitor to Immune System. Iran J Allergy Asthma Immunol 2019; 18: 589–604

Wagner G, Eggers B, Duddeck D, Kramer F-J, Bourauel C, Jepsen S, Deschner J, Nokhbehsaim M. Influence of cold atmospheric plasma on dental implant materials - an in vitro analysis. Clin Oral Investig 2022; 26: 2949–2963

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 X, Chen M, Zhou J, Zhang X. HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (Review). Int J Oncol 2014; 45: 18–30

Weiss M, Gümbel D, Gelbrich N, Brandenburg L-O, Mandelkow R, ZIMMERMANN UW, Ziegler P, Burchardt M, Stope MB. Inhibition of Cell Growth of the Prostate Cancer Cell Model LNCaP by Cold Atmospheric Plasma. In Vivo 2015a; 29: 611

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 2015b; 10: e0130350

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

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

Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. Trends Pharmacol Sci 2017; 38: 226–256

Xiang L, Xu X, Zhang S, Cai D, Dai X. Cold atmospheric plasma conveys selectivity on triple negative breast cancer cells both in vitro and in vivo. Free Radic Biol Med 2018; 124: 205–213

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

Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Sherman JH, Cheng X, Keidar M. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma--a model based on aquaporins (Review). Biointerphases 2015; 10: 40801

Yang X, Song H, Leslie G, Engel C, Hahnen E, Auber B, Horváth J, Kast K, Niederacher D, Turnbull C, Houlston R, Hanson H, Loveday C, Dolinsky JS, LaDuca H, Ramus SJ, Menon U, Rosenthal AN, Jacobs I, Gayther SA, Dicks E, Nevanlinna H, Aittomäki K, Pelttari LM, Ehrencrona H, Borg Å, Kvist A, Rivera B, Hansen TVO, Djursby M, Lee A, Dennis J, Bowtell DD, Traficante N, Diez O, Balmaña J, Gruber SB, Chenevix-Trench G, Investigators k, Jensen A, Kjær SK, Høgdall E, Castéra L, Garber J, Janavicius R, Osorio A, Golmard L, Vega A, Couch FJ, Robson M, Gronwald J, Domchek SM, Culver JO, La Hoya M de, Easton DF, Foulkes WD, Tischkowitz M, Meindl A, Schmutzler RK, Pharoah PDP, Antoniou AC. Ovarian and Breast Cancer Risks Associated With Pathogenic Variants in RAD51C and RAD51D. J Natl Cancer Inst 2020; 112: 1242–1250

Yang X, Wang J, Zhou Y, Wang Y, Wang S, Zhang W. Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. Cancer Lett 2012; 321: 137–143

Yun CW, Kim HJ, Lim JH, Lee SH. Heat Shock Proteins: Agents of Cancer Development and Therapeutic Targets in Anti-Cancer Therapy. Cells 2019; 9: 60

Zhao S, Xiong Z, Mao X, Meng D, Lei Q, Li Y, Deng P, Chen M, Tu M, Lu X, Yang G, He G. Atmospheric pressure room temperature plasma jets facilitate oxidative and nitrative stress and lead to endoplasmic reticulum stress dependent apoptosis in HepG2 cells. PLoS One 2013; 8: e73665

Zoubeidi A, Zardan A, Beraldi E, Fazli L, Sowery R, Rennie P, Nelson C, Gleave M. Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. Cancer Res 2007; 67: 10455–10465

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea und Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope durchgeführt.

Die Idee, die Expression der HSP in malignen Zelllinien nach NIPP-Exposition zu betrachten, stammte von Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope. Die Konzeption der Arbeit und Planung der erforderlichen Schritte erfolgte in Zusammenarbeit mit ihm.

Alle Experimente wurden nach Einarbeitung durch die Forschungsassistentin Frau Rachana Subedi selbstständig von mir durchgeführt. Alle zur Auswertung verwendeten Daten wurden von mir selbst generiert.

Auch die Auswertung der Daten mittels Image J-win64, die statistische Auswertung durch Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen sowie finale die Bewertung der Signifikanz mit Student’s t-Test wurden von mir vorgenommen. Die Auswahl der statistischen Testverfahren basierten dabei auf im Studium gelernten und in Eigenrecherche vertieften Kenntnissen und wurden mit meinem Betreuer rückgesprochen.

Aus den Ergebnissen erstellte ich alle verwendeten Abbildungen und Tabellen selbst, hierfür wurden die Programme GraphPad Prism 5 und, für die Beschriftung der Fotografien, Pixelmator verwendet.

Die Literaturrecherche wurde eigenständig durchgeführt und die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext bestehender Publikationen wurde von mir verfasst.

Der vollständige Text der Dissertation wurde von mir persönlich geschrieben.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

10. Danksagung

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

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

Danke an meinen Betreuer und Laborleiter Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope für die Auswahl des Themas dieses Projekts, seine Beratung und die konstruktive Kritik.

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

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, und Hannes. Ihr habt mich stets unterstützt und wart in jeder Situation meine Ansprechpartner.