

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE UND VENEROLOGIE
PROF. DR. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Molekulare- und zelluläre Effekte von kaltem atmosphärischem
Plasma (KAP) auf Plattenepithelkarzinom Zelllinien *in vitro***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sabrina Hehenberger

2024

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE UND VENEROLOGIE
PROF. DR. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Molekulare- und zelluläre Effekte von kaltem atmosphärischem
Plasma (KAP) auf Plattenepithelkarzinom Zelllinien *in vitro***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sabrina Hehenberger

2024

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Sigrid Karrer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Richard Bauer

Tag der mündlichen Prüfung:

07.11.2024

Inhalt

1. Einleitung	7
1.1. Plattenepithelkarzinom	7
1.1.1. Inzidenz	7
1.1.2. Ätiologie	8
1.1.3. Klassifikation	10
1.1.4. Klinik und Diagnostik.....	10
1.1.5. Therapien.....	11
1.2. Plasma	13
1.2.1. Grundlagen	13
1.2.2. Kaltes atmosphärisches Plasma (KAP)	14
1.2.3. Anwendung von KAP in der Medizin.....	15
1.3. Verwendete Plasmaquelle: plasma care® Prototyp	19
1.4. Oxidativer Stress	21
1.5. Apoptose, Seneszenz und Nekrose	22
1.6. Zielsetzung der Studie.....	23
2. Material	25
2.1. Verbrauchsmaterialien.....	25
2.2. Substanzen	26
2.3. Geräte	26
2.4. Kits	28
2.5. Primer.....	28
2.6. Zelllinien	29
2.6.1. A-431 (ATCC CRL-1555™)	30
2.6.2. SCC-9 (ATCC CRL-1629™).....	30
2.6.3. SCC-15 (ATCC CRL-1623™).....	30
2.6.4. Mel Im	30

2.7.	Zellkulturmedium	30
2.8.	Software	31
3.	Methoden	32
3.1.	Kultivierung der Zellen.....	32
3.2.	Auftauen der Zellen	32
3.3.	Einfrieren der Zellen	33
3.4.	Zellzahlbestimmung.....	33
3.5.	Überprüfung der Wirkleistung der verwendeten Plasmaelektrode.....	33
3.6.	Morphologische Zellanalyse am Durchlichtmikroskop	35
3.7.	Horizontale Migration am Spalt	35
3.7.1.	Erwartung	36
3.7.2.	Etablierung des Versuchs für Live-Cell-Imaging	36
3.7.3.	Etablierung des Versuchs für die manuelle Durchlichtmikroskopie.....	37
3.7.4.	Versuchsaufbau	38
3.7.5.	Auswertung	39
3.8.	Boyden-Kammer Assay.....	40
3.8.1.	Gerichtete Zellmigration und -invasion.....	41
3.8.2.	Erwartung	42
3.8.3.	Versuchsablauf	43
3.8.4.	Auswertung	44
3.9.	Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse	44
3.9.1.	Erwartung	44
3.9.2.	Versuchsablauf	44
3.9.3.	Auswertung	45
3.10.	Molekularbiologische Analyse der RNA	46
3.10.1.	Erwartung	48
3.10.2.	RNA-Isolierung	48

3.10.3.	Reverse Transkription.....	49
3.10.4.	Quantitative Real-Time PCR	50
4.	Ergebnisse	52
4.1.	Morphologie der Zellen und Wachstumsmuster	52
4.2.	Horizontale Migration am Spalt	54
4.2.1.	Analyse mittels Durchlichtmikroskop.....	54
4.2.2.	Auswertung der horizontalen Migration am Spalt.....	58
4.2.3.	Effekte der horizontalen Migration am Spalt	58
4.3.	Migrations- und Invasionsanalyse mittels Boyden-Kammer Assay	61
4.3.1.	Mikroskopische Dokumentation der Membranen.....	61
4.3.2.	Auswertung der Migrations- und Invasionsanalyse.....	64
4.4.	Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse nach KAP-Behandlung.....	66
4.4.1.	Auswertung FACS	66
4.5.	Molekularbiologische Analyse der RNA.....	72
4.5.1.	Expressionsanalyse Apoptose-assoziiierter Gene nach KAP	72
4.5.2.	Expressionsanalyse Seneszenz-assoziiierter Gene nach KAP	73
4.5.3.	Expressionsanalyse bezüglich DNA-Schäden nach KAP	74
5.	Diskussion.....	76
5.1.	<i>In vitro</i> Untersuchung an PEK-Zellen	76
5.2.	plasma care® Prototyp in medizinischer Anwendung	76
5.3.	Durch KAP-Behandlung vermittelte Effekte	78
5.3.1.	Veränderungen in Morphologie und Wachstumsmuster	78
5.3.2.	Hemmung der horizontalen Migration	79
5.3.3.	Abnahme der gerichteten Migration/Invasion.....	79
5.3.4.	Apoptoseinduktion	79
5.3.5.	Molekularbiologische Veränderungen.....	80
5.4.	Klinische Relevanz und Perspektiven.....	82

6. Zusammenfassung.....	85
7. Abkürzungsverzeichnis	87
8. Abbildungsverzeichnis	90
9. Tabellenverzeichnis	91
10. Literatur	92

1. Einleitung

In der Onkologie ist die Anwendung von kaltem atmosphärischem Plasma (KAP) relativ neu und gegenwärtig noch nicht als kurative Therapieoption verfügbar, jedoch ist es Untersuchungsgegenstand vieler aktueller Studien (1–3). Vielfach konnten spezifische Anti-Tumor-Effekte von KAP beispielsweise auf Darmtumorzellen oder Melanomzellen nachgewiesen werden (4–6). Auch in zwei kleineren klinischen Studien in der Behandlung aktinischer Keratosen (AK), die als Vorstufen des invasiven kutanen Plattenepithelkarzinoms (PEK) gelten, hat sich KAP bei Patienten als wirksam erwiesen (7, 8). Die AK tritt typischerweise als singuläre Läsion bei chronisch sonnenexponierten, hellhäutigen Menschen mit einer Prävalenz von 11-26 % auf (9). Diese intraepidermale keratinozytäre Dysplasie kann sich in bis zu 20 % innerhalb von 10-25 Jahren in ein invasives Plattenepithelkarzinom (PEK = engl. SCC, „squamous cell carcinoma“) entwickeln (10). Daher werden in dieser Studie molekulare sowie zelluläre Effekte von KAP auf Plattenepithelzellen *in vitro* untersucht.

1.1. Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom wird auch als spinozelluläres Karzinom oder Spinaliom bezeichnet und gehört zur Gruppe der nichtmelanozytären Hauttumoren (NMSC). Es handelt sich um bösartige Tumoren, die von den Epithelzellen der Haut und der Schleimhaut ausgehen. Dementsprechend unterteilt man die Tumoren in kutane PEK, welche von verhornendem Plattenepithel der Epidermis ausgehen sowie in Mundhöhlen-PEK, welche von nicht verhornendem Plattenepithel der Schleimhaut ausgehen (11).

1.1.1. Inzidenz

Das PEK befindet sich aktuell direkt nach dem Basalzellkarzinom auf Platz 2 der häufigsten Hauttumoren und macht ein Fünftel der NMSC aus (11). In Deutschland liegt die Inzidenz bei etwa 40 aus 100 000 Einwohnern während in sonnenexponierteren Regionen wie dem Südwesten der USA oder in Australien 300-600 aus 100 000 Einwohnern betroffen sind (12). Das kutane PEK macht 20 % aller Hauttumoren aus, was jedes Jahr zu 1 Million Fälle und geschätzt bis zu 9000 Todesfällen in den Vereinigten Staaten führt (13). Weltweit wurde in den letzten Jahren ein kontinuierlicher Anstieg der Fälle von NMSC beobachtet, was eng mit der aktuellen demographischen Entwicklung, also der Zunahme der Lebenserwartung und somit der

Alterung der Population verknüpft ist. Dabei sind mehr Männer als Frauen betroffen und das Durchschnittsalter liegt bei 70 Jahren. Außerdem fällt auf, dass Regionen mit hellhäutiger Population erhöhte Fallzahlen aufweisen (14, 15).

Die Heilungschancen beim NMSC haben sich sehr positiv entwickelt. In den Jahren 2011-2015 gab es kaum Schwankungen in der Mortalität, sie lag für Frauen bei 0,3 und für Männer bei 0,65 (16).

1.1.2. Ätiologie

Für das PEK gibt es viele Ursachen, es werden sowohl genetische als auch immunologische Faktoren in Betracht gezogen. Allerdings stehen heute vor allem Vorschädigungen durch (UV) Strahlung, die auch von der WHO als etabliertes Karzinogen aufgenommen wurde, im Fokus. Besonders gefährlich ist die UVB-Strahlung mit Wellenlängen zwischen 290 und 320 nm (11). Wie in Abbildung 1 dargestellt, kann die UV-Strahlung Genmutationen induzieren oder die immunologische Abwehr derart beeinträchtigen, dass die Bekämpfung entarteter Keratinozyten reduziert ist. Beides führt zu unkontrolliertem Wachstum mutierter Keratinozyten. Folglich ist das Vorhandensein von aktinischen Keratosen an der UV-exponierten Epidermis, also der intraepithelialen Proliferation atypischer Keratinozyten, ein besonders wichtiger ätiologischer Faktor, da diese mit dem Risiko der Progression zum kutanen Plattenepithelkarzinom einhergehen. Die Schleimhäute hingegen haben Leukoplakien als Krebsvorläufer die durch tumorauslösende Noxen wie Rauchen oder Alkohol begünstigt werden (12). Eine Mutation des p53-Gens hat das Ausbleiben der Apoptose von entarteten Zellen zur Folge, während eine Mutation des RAS-Onkogen H-Ras zur dauerhaften Aktivierung des Signalweges, also zu einer gesteigerten Zellproliferation führt (12, 16, 17). Der Übergang zum invasiven Plattenepithelkarzinom erfolgt, sobald veränderte Keratinozyten die Basalmembran durchdringen (18).

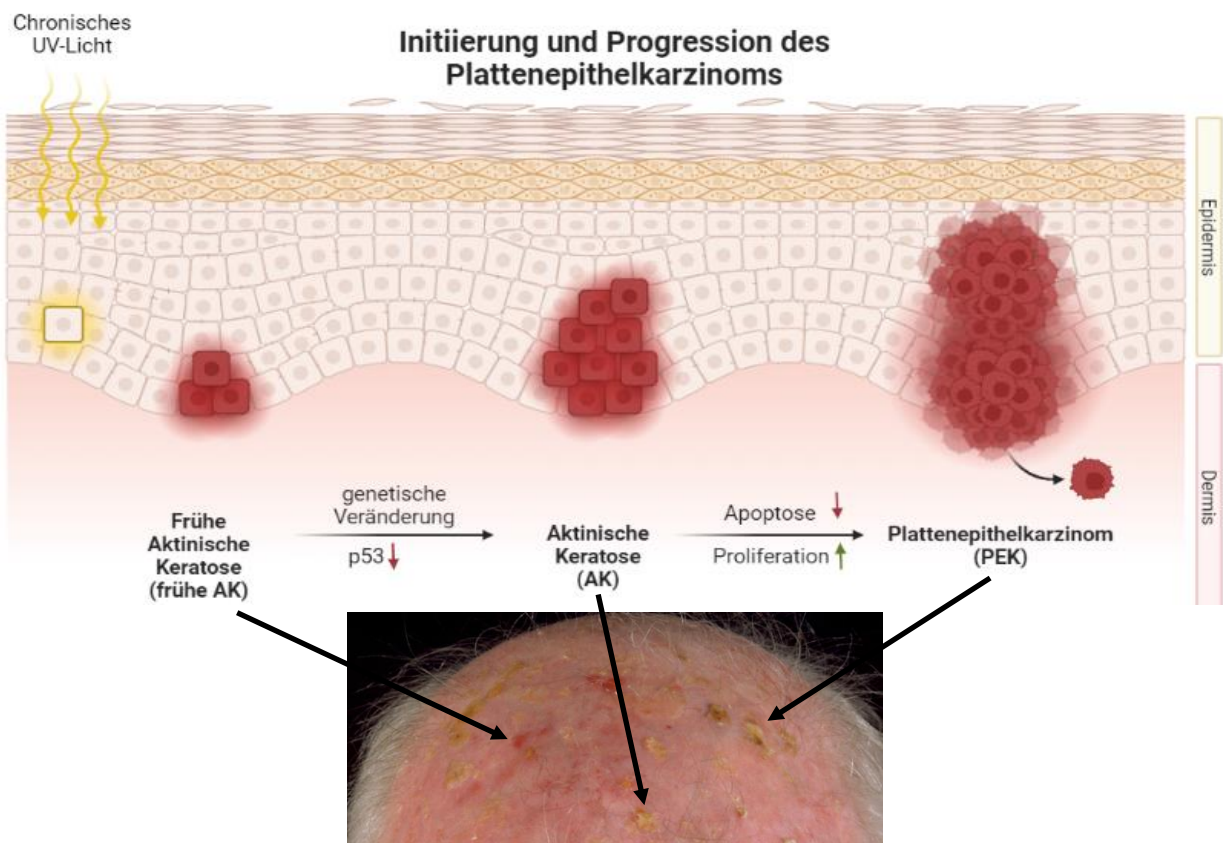


Abbildung 1: Progression von AK zum PEK

Die Einwirkung von UV-Licht kann zur Initiierung einer frühen AK führen. Liegt dann eine genetische Veränderung wie z.B. die Mutation des p53-Gens vor, dann bleibt die Apoptose aus, während die Proliferation derartiger Zellen angekurbelt wird. Sobald die veränderten Keratinozyten die Basalmembran durchbrechen handelt es sich um ein PEK. Der Prozess wird am Beispiel einer Feldkanzerisierung der Stirnhaut, also der Existenz präneoplastischer Prozesse mit karzinogener Potenz an mehreren Stellen eines Areals, dargestellt. (Arndt S. erstellt mit BioRender.com unveröffentlicht)

Darüber hinaus gibt es auch Erkrankungen, die das PEK-Risiko steigern. Dazu zählen:

- chronische Narbenbildung (Verbrennung, Strahlendermatitis)
- genetisch determinierte Syndrome (Xeroderma pigmentosum, Albinismus)
- chronische Hautinfektionen (Lupus vulgaris)
- chronisch entzündliche Erkrankungen (chronisch diskoider Lupus erythematoses, Lichen ruber mucosae) (19)

Regelmäßiger Kontakt mit Arsen oder Röntgenstrahlung kann maligne Veränderungen triggern. Auch Immunsuppression steigert das Erkrankungsrisiko und führt zu ungünstigeren Krankheitsverläufen (16). Untersuchungen zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen dem kanzerogenen Humanen Papillom Virus (HPV), das gehäuft bei Immunsupprimierten auftritt, und PEK gibt. Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung sind PEK-Patienten deutlich häufiger HPV-Seropositiv (20).

Das PEK trägt eine der höchsten Mutationslasten aller Tumorarten. Neben p53 und H-Ras sind NOTCH und CDKN2A bekannte Treibermutationen beim PEK.

Es ist wahrscheinlich, dass es weitere Treibermutationen beim PEK gibt, die noch nicht entdeckt wurden (21).

1.1.3. Klassifikation

Die Klassifikation des PEK sollte laut aktueller S3-Leitlinie „Aktinische Keratose und Plattenepithelkarzinom der Haut“ anhand klinischer und histologischer Parameter entsprechend der aktuell gültigen TNM-Systeme der UICC (Union for International Cancer Control) oder der AJCC (American Joint Committee on Cancer) erfolgen (16). Beide teilen nach klinischen und radiologischen Parametern in verschiedene Stadien, welche die Entwicklungsstufen des Tumors beschreiben, ein. Dabei sind sowohl Größe und Ausbreitung des Primärtumors, als auch das Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen sowie die Existenz von Fernmetastasen maßgebende Gesichtspunkte. Allerdings kann diese Einteilung in Stadien nur bei wenigen, also vor allem bei klinisch sehr großen Tumoren eine differenzierende Auskunft geben. Es kann damit keine Prognose bezüglich Metastasierungs- oder Überlebensrate gegeben werden. Daher wird traditionell noch oft in „high-risk“ und „low-risk“ Tumoren eingeteilt (16).

Als High-risk-Plattenepithelkarzinom wird ein Befund von der AJCC Klassifikation (2017) bezeichnet, wenn er einen der folgenden histologischen Parameter erfüllt: (16)

- Tumordicke > 6 mm (vertikal)
- Tumordurchmesser > 2 cm
- Eindringtiefe ab Clark-Level 4
- Histologische Differenzierung ab Grad III
- Perineurale Invasion
- Lokalisation an Ohr und Unterlippe
- Immunsuppression
- Desmoplasie

1.1.4. Klinik und Diagnostik

Ein Carcinoma in situ ist die Vorstufe eines jeden Plattenepithelkarzinoms und gibt beispielsweise durch seine Lokalisation Auskunft über die Ätiologie des Karzinoms.

Oft kann im Randbereich der Läsion ein In-situ-Karzinom nachgewiesen werden. Besonders hoch ist das Risiko bei unzähligen aktinischen Keratosen, bei Plantarwarzen oder der knotigen Umwandlung eines Ulkusrandes. Auffällig sind dabei das rasche Wachstum, die Induration, Ulzeration und Blutungsneigung. Klinisch findet man in fortgeschrittenen Stadien meist einen derben, exophytisch wachsenden, zur Blutung neigenden, oft entzündlichen, aber schmerzlosen Tumor mit zentraler Ulzeration. Durch subkutane Infiltration bzw. seitliches Wachstum können Verhärtungen oder Erytheme entstehen. Das Wachstum erfolgt lokal destruktiv, also ein Einwachsen in Knochen, Muskeln und Sehnen ist möglich. Zur Metastasierung kommt es eher selten und hauptsächlich lymphogen. Die Diagnose erfolgt meist basierend auf der Klinik nach Einbeziehen der Anamnese und final der Probenentnahme zur histologischen Sicherung. Bei auffälligem Palpationsbefund der Lymphknoten sollte zur Sicherheit auch noch eine Lymphknotenultraschalluntersuchung erfolgen (12).

1.1.5. Therapien

Die Auswahl der Behandlung erfolgt nach Kriterien wie beispielsweise der Größe des Tumors, seiner Lokalisation und Invasivität, sowie dem Vorliegen von Risikofaktoren wie Alter und Allgemeinzustand des Patienten (12). Haben die atypischen Keratinozytenverbände die Basalmembran noch nicht durchbrochen, spricht man von einer aktinischen Keratose. Diese gilt als In-situ-Plattenepithelkarzinom und kann laut aktueller S3-Leitlinie zu AK und PEK der Haut unter anderem mit konventioneller topischer photodynamischer Therapie (PDT) mit rotem Licht unter Zuhilfenahme der Photosensibilisatoren 5-Aminolävulinsäure (ALA) oder Methylaminolävulinat (MAL) behandelt werden (18, 22, 23). Daneben gibt es auch noch andere Therapiemöglichkeiten, wobei Größe, Ort oder Anzahl der Läsionen die Wirksamkeit und/oder Akzeptanz chirurgischer und chemischer Therapien stark einschränken. Bei multiplen Tumoren, größeren Flächen und insbesondere bei Patienten mit Feldkanzerisierung sind nicht-invasive Ansätze wie Kryotherapie, topisches 5-Fluorouracil, Imiquimod, Diclofenac, topische Retinoide, chemische Peelings und PDT die Behandlungen der Wahl. Doch sind diese häufig mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden (9). Unter ihnen ist die PDT aktuell die vielversprechendste Behandlungsmethode (24). Die konventionelle PDT wird momentan mehr und mehr durch die PDT mit Tageslicht ersetzt, da Untersuchungen

eine weitgehende Schmerzfreiheit dieser Therapieform zeigen (18, 22, 23). Daneben wird auch an einer lasergestützten PDT geforscht, also der Kombination mit einer Laserbehandlung, die vorab für eine gesteigerte Penetration des Photosensibilisators sorgt und so die Therapie effektiver macht (22, 25).

Bei invasiven Plattenepithelkarzinomen gilt laut aktueller S3 Leitlinie „Aktinische Keratose und Plattenepithelkarzinom der Haut“ die chirurgische Therapie, also die Exzision mit histologischer Kontrolle als Standard. Ziel ist dabei eine histologisch abgeklärte R0-Exzision, also das Entfernen des Tumors mit Schnitträndern in gesundem Gewebe (19). Im chirurgischen Vorgehen sollten auch Faktoren wie Tumordurchmesser, Tumordicke, Infiltrationstiefe, Entdifferenzierung, perineurale Infiltration, Lokalisation und Immunsuppression beachtet werden, da diese ausschlaggebend für die Prognose bezüglich lokaler Rezidive und regionärer Metastasierung sind. Ist der operative Eingriff zur Entfernung des Tumors nicht möglich oder konnte nicht in sano reseziert werden, wird Strahlentherapie empfohlen (16). Bei metastasierten oder lokal fortgeschrittenen PEK die nicht chirurgisch oder mittels Radiatio behandelt werden können, sind systemische Therapien gefragt (26). PEK sprechen zu über 50 % auf Chemotherapien an, allerdings im Mittel nur für 10,5 Monate und unter starken Nebenwirkungen. Außerdem gibt es kein etabliertes Behandlungsschema. Im Jahr 2011 kam die zielgerichtete Therapie gegen den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), die jedoch nur in wenigen Fällen Wirkung zeigte und eine kurze Ansprechdauer aufwies (19). Wenn man die Effektivität und die Sicherheit von chemotherapeutischen Agenzien und EGFR-Inhibitoren vergleicht, kann für keine der systemischen Therapien eine finale Empfehlung getroffen werden (26). Im Jahr 2019 erfolgte die Zulassung des Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) Antikörpers Cemiplimab mit langer Ansprechdauer und hoher Ansprechrate. Der unterstützende Einsatz von PD-1-Inhibitoren hat sich in retrospektiven Studien mittlerweile als effektive systemische Therapie beim kutanen PEK erwiesen (11, 27). Das aktuell größte Ziel der Dermatoonkologie ist es, neue verträgliche und wirkungsvolle Therapieansätze zu entwickeln (19).

1.2. Plasma

Plasma bezeichnet einerseits den nicht-zellulären Anteil des Blutes, zugleich aber auch einen besonders angeregten Zustand eines Gases. Dieser entsteht, wenn man einem Gas in Form von Wärme oder elektrischen Feldern Energie zuführt, sodass die Moleküle ionisiert und Elektronen aus Atomen gelöst werden (28). Daher kann man Plasma auch als ionisiertes Gas bezeichnen und wie in Abbildung 2 dargestellt als vierten energiereichsten Aggregatzustand neben fest, flüssig und gasförmig einordnen (29). Irving Langmuir führte den Begriff Plasma 1928 ein, weil ihn die Zusammensetzung des stark ionisierten Gases an Blutplasma erinnerte. Die Übersetzung des griechischen Wortes „plassein“, wovon das Wort Plasma abgeleitet wird, ist „formen“ (30).

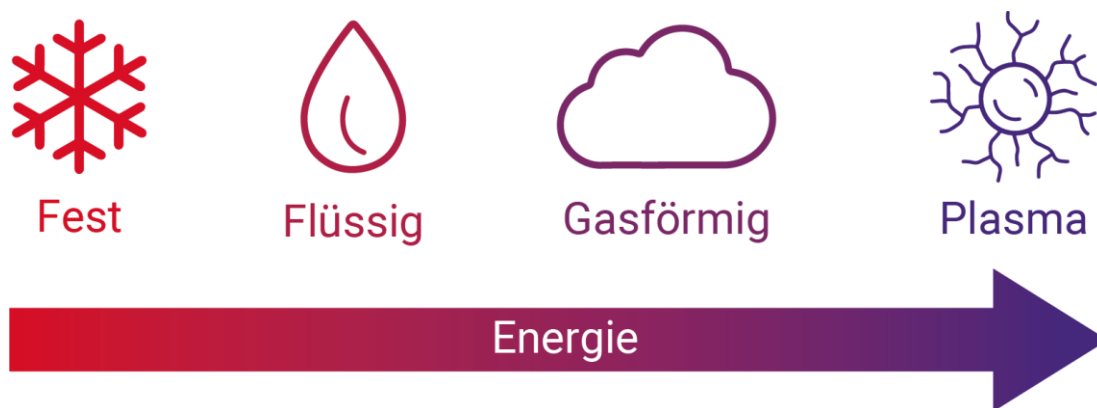


Abbildung 2: Einordnung von Plasma als vierter Aggregatzustand

Aggregatzustände unterscheiden sich durch ihr Energielevel, das von fest über flüssig bis gasförmig zunimmt. Plasma entsteht, wenn gasförmige Materie weiter Energie aufnimmt. (www.terraplasma.com)

1.2.1. Grundlagen

Es gibt vier grundlegende Zustände der Materie: fest, flüssig, gasförmig und Plasma. Wenn die Energie, die auf Atome ausgeübt wird, zunimmt, verstärkt sich die thermische Bewegung der Atome im Festkörper. Schließlich werden restriktive Wechselwirkungen zwischen Atomen wie beispielsweise ionische Bindungen überwunden und aus dem Festkörper wird eine Flüssigkeit. Wenn die Atome einer Flüssigkeit ausreichend Energie erhalten, um die restriktiven Van-der-Waals-Kräfte von umgebenden Atomen zu überwinden, gehen flüssige Atome in Gasatome über. Dabei ist die Translationsenergie von Atomen in Gas deutlich größer als die in Flüssigkeiten oder Feststoffen. Wenn die Energie ausreicht, dass das Elektron die elektrostatische Potentialbarriere überwinden kann, wird das Elektron entfernt.

Dadurch entstehen ein freies Elektron und ein positiv geladenes Ion. Dieser Prozess wird Ionisation genannt. Plasma ist also ein neutrales ionisiertes Gas, das aus positiv geladenen Ionen, Elektronen und neutralen Teilchen besteht (31). Im Vergleich zu „normalem“ Gas, in dem sich ganze Moleküle oder Atome frei bewegen, befindet sich das Plasma also in einem höheren Energiezustand, in dem Atome ihre Elektronen verlieren, sie werden also ionisiert. Die entstehenden Elektronen und Ionen bewegen sich frei und unabhängig voneinander und sorgen für erhöhte Reaktivität des Plasmas (29). Ganz allgemein steigt die Temperatur, wenn sich Materie von fest zu flüssig, weiter zu Gas und schließlich zu Plasma umwandelt. Die Temperatur des Plasmas wird durch thermische Bewegungen von Elektronen und schweren Teilchen wie Atomen und Ionen bestimmt (31). Wenn sich alle Teilchen (Elektronen und Ionen) im Energiegleichgewicht befinden, also die gleiche sehr hohe Temperatur haben, erhalten wir heißes Plasma wie zum Beispiel im Entladungslichtbogen einer Schweißlampe. Wenn nur die Elektronen heiß sind, aber der Rest der Teilchen, die die Hauptmasse des Gases darstellen, eine niedrigere Temperatur haben, erhalten wir kaltes Plasma mit Temperaturen unter 40°C. Das Plasma befindet sich dabei im Energiegleichgewicht (29).

1.2.2. Kaltes atmosphärisches Plasma (KAP)

Während früher hohe Temperaturen und hoher Druck notwendig waren, um Plasma zu erzeugen, kann es heute bei Atmosphärendruck erzeugt werden und unter Raumtemperatur arbeiten (32). Kurz gefasst handelt es sich bei kaltem atmosphärischem Plasma also um ein teilionisiertes Gas, welches entsteht, indem Gase wie Argon, Helium oder Sauerstoff durch verschiedene Methoden teilweise ionisiert und energetisiert werden (33). KAP hat keine einheitliche Zusammensetzung, sondern hängt von dem Gas ab, in dem es entstanden ist und von der Art und Weise, wie es geschaffen wurde. Es besteht aus einer komplexen Mischung biologisch aktiver Komponenten, welche in der Abbildung 3 graphisch gegenübergestellt werden. Diese wirken synergistisch auf die behandelten Materialien und Gewebe ein und können eine Vielzahl unterschiedlicher Wirkungen haben. Die wichtigsten aktiven Komponenten des Plasmas sind reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, aber auch andere reaktive Spezies, geladene Teilchen, sein elektrisches Feld und teilweise sogar die UV-Photonen und das Ozon, die während der Plasmaproduktion erzeugt werden, können eine Rolle bei seinen komplexen Auswirkungen auf lebendes Gewebe spielen

(29, 34–37). Hauptverantwortlich für die biologische Wirkung von KAP ist die Vielzahl der mittels KAP gebildeten gasförmigen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (engl. Reactive oxide and nitrogen species = RONS). Diese werden anschließend zu Zellen und Geweben transportiert, wo RONS zu redoxbasierten Veränderungen in Lipid- und Proteinstrukturen führen, redoxgesteuerte Zellwege stimulieren und schließlich biologische Reaktionen hervorrufen. Darüber hinaus deuten neuere Studien darauf hin, dass KAP das Potenzial hat, die perkutane Absorption von transdermalen Arzneimitteln zu verbessern (38).

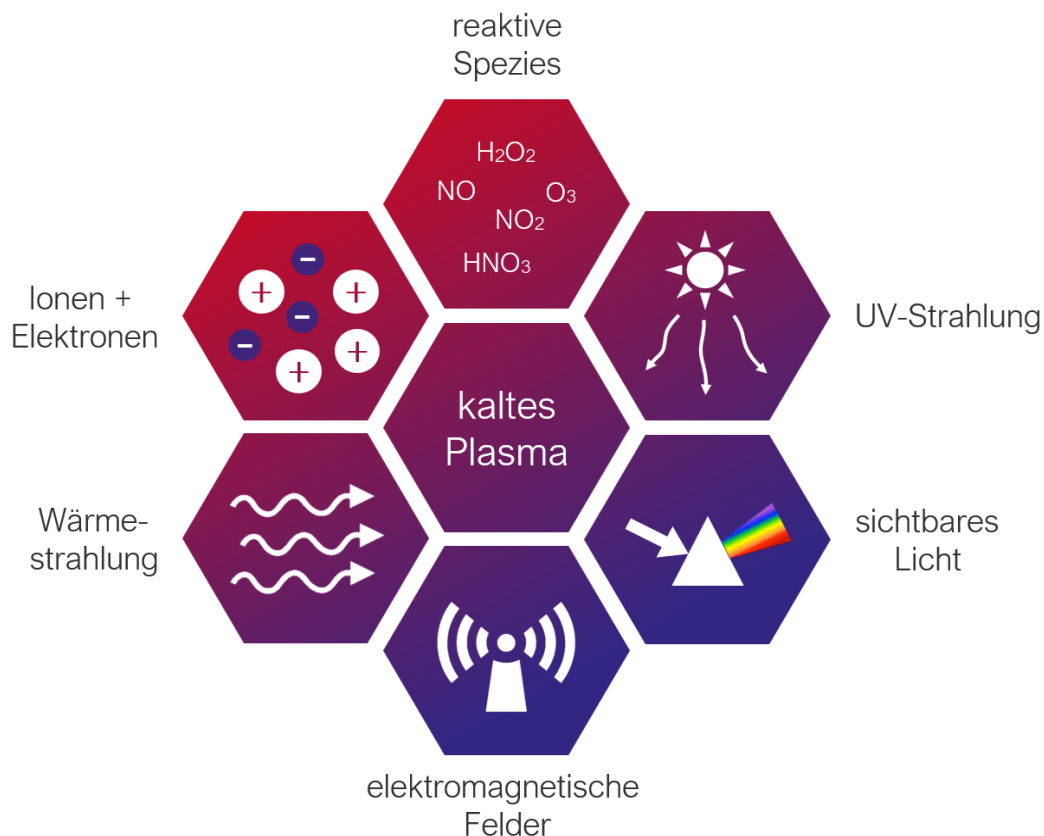


Abbildung 3: Wirkkomponenten von KAP

KAP ist ein Konglomerat verschiedener biologisch wirksamer Komponenten wie UV-Strahlung, sichtbares Licht, elektromagnetische Felder, Wärmestrahlung, Ionen, Elektronen oder reaktive Spezies. (www.terraplasma.com)

1.2.3. Anwendung von KAP in der Medizin

Schon lange wird Plasma zur Sterilisation medizinischer Geräte oder auch in der Lebensmittelindustrie zur sterilen Verpackung angewendet. Doch in den letzten Jahren eröffneten sich neue Horizonte, indem Quellen für KAP entwickelt wurden, die es ermöglichen, auch lebendes Gewebe zu behandeln. (39). Plasmamedizin, ein neu geprägter Begriff, impliziert ein interdisziplinäres Fach, das Physik, Chemie, Biowissenschaften und Medizin umfasst. Die Anwendungen der Plasmamedizin

können grob in „direkte Methoden“ und „indirekte Methoden“ unterteilt werden. Ersteres bezieht sich auf die Exposition eines lebenden Empfängers mittels einer gasförmigen Plasmafahne. Letzteres setzt einen Zwischenträger voraus, der die reaktiven Spezies, welche durch KAP vermittelt wurden, an einen lebenden Empfänger abgibt. Dabei kann es sich entweder um ein festes Objekt wie beispielsweise ein chirurgisches Implantat oder ein flüssiges Objekt wie beispielsweise ein plasmaaktiviertes Medium handeln (32, 40, 41). KAP wird bereits seit mehreren Jahren erfolgreich für die direkte Behandlung von infizierten akuten und chronischen Wunden, sowie zur Vorbeugung von Wundinfektionen eingesetzt. Das teilweise ionisierte Gas hat wie in Abbildung 4 zusammengefasst, eine starke bakterizide Wirkung – auch gegen multi-resistente Erreger – und besitzt zudem viruzide, fungizide und sporizide Eigenschaften. Außerdem aktiviert es Zellwachstum, Durchblutung und Zellstoffwechsel (34, 35, 37). KAP ermöglicht also eine berührungslose Desinfektion in Sekundenschnelle, die sogar mikroskopisch kleine Öffnungen und zerklüftete Oberflächen erreicht (39).



Abbildung 4: Wirkung von KAP

KAP inaktiviert einerseits Bakterien, multiresistente Erreger, Pilze und Keime, während es andererseits das Zellwachstum, die Durchblutung und den Zellstoffwechsel aktiviert. (www.terraplasma-medical.com)

Auch in der onkologischen Behandlung steigt das Interesse an einer Therapie mit KAP an, allerdings gibt es für diesen Anwendungsbereich bislang noch keine zugelassenen Plasmageräte. Präklinische Beobachtungen deuten allerdings auf ein anti-tumorales Potenzial hin, zum Beispiel bei Melanom-, Gliom- und kolorektalen Karzinomzellen (3, 6, 42–44). Die Antitumorwirkung kann entweder durch direkte Behandlung oder durch eine KAP-behandelte Lösung erfolgen. Dazu wurden *in vitro* Untersuchungen durchgeführt, in denen behandeltes Standard-Zellkulturmedium, welches verschiedene Aminosäuren, organische Salze, Vitamine und andere Substanzen enthält, angewendet wurde. Die aktiven Komponenten im behandelten Medium bzw. die molekularen und zellulären Mechanismen sind dabei noch nicht vollständig verstanden (45). Jedoch ist bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffspezies (RONS), die Auswirkungen der KAP-Behandlung auf die Zellen vermitteln (46, 47). Die Zusammensetzung der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies hängt von der verwendeten Plasmaquelle, den Betriebsparametern und der angewendeten Gaszusammensetzung ab. Somit können Plasmazusammensetzung und daraus resultierende Auswirkungen enorm variieren (45, 48–50). Bislang wurden keine schädlichen Wirkungen von KAP berichtet. *In vitro* Studien zeigten keine erhöhte Toxizität in kultivierten Zellen nach wiederholter KAP-Behandlung und Resistenzen sowie Resistenzentwicklungen sind unwahrscheinlich (35, 49, 50). In Abbildung 5 werden die Reaktionen einer Tumorzelle nach Einwirkung von KAP graphisch dargestellt. Neben der Verstärkung zum Zelltod führender Mechanismen wie Apoptose und Nekrose steigt durch den Einfluss von KAP auch die Anzahl in Seneszenz gehender Zellen. Bei der Tumorbehandlung mit KAP konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass zusätzlich auch noch die Zellmigration und -invasion sowie die Zellproliferation unterdrückt werden (38, 51). Für das Auslösen der verschiedenen zellulären Reaktionen durch KAP wird allen voran die Zunahme reaktiver Spezies verantwortlich gemacht. Spezifische molekular- und zellbiologische Reaktionen sind dabei Apoptose, Wachstumshemmung, Zellzyklusstillstand, DNA- und mitochondriale Schäden sowie immunogener Zelltod (52, 53).

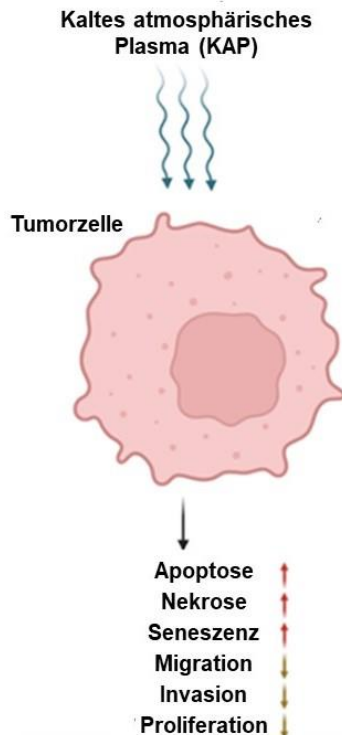


Abbildung 5: Auswirkungen von KAP auf Tumorzellen

Wirkt KAP auf eine Tumorzelle ein, werden zum Zelltod führende Mechanismen wie Apoptose und Nekrose, daneben auch die Seneszenz gesteigert, während Prozesse wie Migration, Invasion und Proliferation abgeschwächt werden. (modifiziert nach Arndt S. erstellt mit BioRender.com unveröffentlicht)

Das tatsächliche Behandlungsergebnis ist jedoch wie bei fast jeder medizinischen Therapie auch bei Plasma dosisabhängig (53–55). Das Gas aus chemisch aktiven Spezies induziert nachweislich physikalische und chemische Veränderungen auf biologischen Oberflächen, welche in den letzten Jahren in vielen Studien Gegenstand der Forschung waren. Dementsprechend ist die Aufklärung des Schlüsselmechanismus hinter den Auswirkungen von KAP in Tumorzellen entscheidend, um die optimale Dosis von KAP für den klinischen Einsatz zu bestimmen (56).

Also nicht nur der Prozess der Plasmapenetration ist komplex, sondern auch die richtige Plasmadosierung. Diese Abhängigkeit der Ergebnisse von der Expositionsdauer wurde in einem Experiment, das die Apoptose-induzierende Wirkung von KAP-behandeltem Medium auf Melanomzellen untersucht, gezeigt (57). In vielen Studien konnte immer wieder ein Anti-Tumor-Mechanismus der KAP-Behandlung nachgewiesen werden. Betrachtet und vergleicht man diese allerdings genauer, fällt auf, dass sich eine große Variabilität in Bezug auf die KAP-Anwendungsbedingungen wie beispielsweise die Verwendung unterschiedlicher

Plasmaquellen ergibt. Um die Wirksamkeit von Plasmabehandlungen bewerten und vergleichen zu können, wäre dringend eine Standardisierung von Protokollen erforderlich (58). Denn im Gegensatz zu bisher gängigen Tumortherapien weist KAP den Vorteil der Selektivität gegenüber Tumorzellen auf, was im Zeitalter zielgerichteter Therapien ein wesentliches Merkmal ist (2).

1.3. Verwendete Plasmaquelle: plasma care® Prototyp

Momentan werden für die Forschung verschiedene KAP-Geräte vor allem für die Anwendung in der Wundbehandlung und -desinfektion entwickelt und getestet. Diese lassen sich in Direktentladungsvorrichtungen, Indirektentladungsvorrichtungen und Hybridplasmaquellen einteilen. Indirektes Plasma wird zwischen zwei Elektroden innerhalb eines Gerätes, wie beispielsweise dem Atmosphärendruck-Plasmajet (APPJ), erzeugt und anschließend über Trägergas oder durch Diffusion an das biologische Ziel transportiert. Auf diese Weise erzeugte Plasmen sind weniger kontrollierbar und haben tendenziell eine niedrigere Konzentration der im Plasma erzeugten Spezies als bei direkten Plasmen (35, 59).

Direktes Plasma wird im Spalt zwischen einer isolierten (dielektrischen) Hochspannungselektrode und der zu behandelnden Oberfläche gezündet. Dabei dient die behandelte biologische Probe oder das lebende Gewebe als die für die Plasmazündung notwendige Gegenelektrode. Sein bestimmendes Merkmal ist das Vorhandensein von dielektrischem Material zwischen den Elektroden. Basierend auf diesen Prinzipien wurden zwei KAP-Vorrichtungen entwickelt, der Plasmastrahl und die dielektrische Barriereentladung (DBD = Dielectric Barrier Discharge), welche in der Plasmamedizin weit verbreitet verwendet werden (38). Eine Einschränkung dieser Technologie ist die Erforderlichkeit eines konstanten Abstandes zum Behandlungsbereich, was am menschlichen Körper oft nicht umsetzbar ist (35).

Hybride Plasmaquellen versuchen, die Vorteile von direktem und indirektem Plasma zusammenzuführen. Ein Beispiel dafür sind die Oberflächenmikroentladungsgeräte (engl.: SMD = surface micro-discharge), die über eine Vielzahl von Nano- und Mikroentladungen an einer geerdeten Drahtgeflechtelektrode ein Plasma erzeugen. Wegen des geringeren elektrischen Widerstandes im Drahtgitternetz fließt dabei der Strom nicht durch das Zielobjekt (35, 60).

Das für die Untersuchungen der molekularen- und zellulären Effekte von KAP auf Plattenepithelkarzinom Zelllinien *in vitro* verwendete Plasmagerät entstand aus der Weiterentwicklung der Oberflächenmikroentladungstechnologie (engl.: Surface Micro-Discharge Technology, SMD). Es handelt sich um einen Prototyp welcher von der terraplasma Medical GmbH (Garching, Deutschland) entwickelt wurde und zur plasma care® Produktlinie gehört. Die plasma care® Produktlinie wird wie in Abbildung 6 zusammengefasst bereits erfolgreich in der Behandlung akuter und chronischer Wunden der Human- und Veterinärmedizin, sowie der Desinfektion von künstlichen Eintrittsstellen in den menschlichen Organismus wie Katheter eingesetzt. Außerdem erfolgt die Anwendung bei verschiedenen dermatologischen Erkrankungen und zur Infektionsvermeidung bei künstlicher Beatmung. Des Weiteren wird momentan eine Anwendung bei akuten respiratorischen Infektionen sowie zur verbesserten Aufnahme topischer Arzneimittel untersucht. Auch in der Zahnmedizin und der Onkologie wird am Einsatz des plasma care® Prototyps geforscht. Dieser Prototyp ermöglicht Frequenzwechsel zwischen 4 kHz (Sauerstoffmodus) und 8 kHz (Stickstoffmodus) (61). Kaltes atmosphärisches Plasma wird durch die patentierte Dünnschichttechnologie aus der Umgebungsluft gewonnen. Dafür braucht es eine Hochspannungselektrode, ein Dielektrikum und eine geerdete strukturierte Elektrode die zusammen die sogenannte Plasma Source Unit bilden. Wird eine Hochspannung von 3,5 kV angelegt, kommt es in der in Quadraten strukturierten Elektrode zu Mikroentladungen, welche in einer Ausdehnung von wenigen Millimetern das Gas ionisieren und so Plasma erzeugen (62). Dieses kann durch Frequenz und Spannung beliebig verändert werden (61). Für die aktuell bereits zugelassene Anwendung in der Wundbehandlung wurden die Betriebsparameter des plasma care® (4 kHz, 3,5 kV) so ausgelotet, dass ohne Gewebeschädigung ein möglichst hoher bakterizider Effekt erzielt wird. So können ohne Einfluss des Resistenzlevels gegenüber Antibiotika höchst effizient Bakterien und humanpathogene Pilze unschädlich gemacht werden (34, 35). Bisher konnten dabei keine Entwicklungen von Resistenzen, keine Allergien oder Nebenwirkungen nach Anwendung des plasma care® festgestellt werden. Das Gerät ist wie in Abbildung 6 ersichtlich mit Dimensionen eines Telefonhörers bezüglich Größe und Gewicht recht handlich gestaltet, es besteht aus einem Gehäuse, welches die Elektrik verkleidet und einer aufgesteckten Elektrode, welche hauchdünne Keramikplatten sowie empfindliche Elektro-Kontakte enthält, die durch Mikroentladung das Plasma erzeugt (62). Um die vorgesehene Distanz zwischen dem Gerät und der

Petrischale für die Zellanwendung zu gewährleisten und diese auch bei jeder erneuten Behandlung reproduzieren zu können, wurde ein Abstandhalter auf das Gerät gesteckt. Dieser sorgte gleichzeitig für einen isolierten Behandlungsbereich (61).

Dass durch verschiedene Forschungsgruppen unterschiedliche Geräte die wiederum Modifikationen bezüglich der Einstellungen aufweisen verwendet werden, stellt aktuell eine Herausforderung hinsichtlich der Vergleichbarkeit dar. Der Versuch, die langfristige Sicherheit und Wirksamkeit von Plasmageräten vergleichbar und standardisiert zu definieren, führt somit zu Schwierigkeiten (59).

Für alle im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen wird der plasma care® Prototyp im 4 kHz Modus bei einer angelegten Spannung von 3,5 kV angewendet. Die Dosis wird dabei über die Behandlungszeit reguliert.



Abbildung 6: Anwendungsgebiete des plasma care®

Das mittig dargestellte plasma care® Gerät ist mit der Größe die einem Telefonhörer entspricht recht handlich gestaltet und wird bereits in verschiedenen medizinischen Fachdisziplinen wie der HNO oder der Dermatologie angewendet. Gerade akute oder chronische Wunden sowie andere dermatologische Erkrankungen sind aktuell die Hauptanwendungsgebiete. Daneben ist die präventive Anwendung zur Vermeidung von Infektionen sowohl intraoperativ und postoperativ als auch bei Eintrittsstellen von Kathetern oder Beatmungstuben von großer Bedeutung. Die Anwendung in der Dermatoonkologie zeichnet sich momentan in der Forschung als sehr vielversprechend ab. (www.terraplasma-medical.com)

1.4. Oxidativer Stress

Der Spiegel intrazellulärer ROS und RNS (RONS) wird durch kleine antioxidative Moleküle und Auffangenzyme streng reguliert. Bei niedrigen Konzentrationen sind RONS an verschiedenen biologischen Prozessen wie der bakteriellen Zerstörung

durch Makrophagen und der endothelialen stickoxidvermittelten Vasodilatation beteiligt. Wenn ihre Werte jedoch die Kapazität des Redox-Gleichgewicht-Kontrollsystems überschreiten, also ein Zustand eintritt, welcher als oxidativer Stress bezeichnet wird, können sie zytotoxisch sein und den Zelltod verursachen (63). Oxidativer Stress ist an der Entwicklung verschiedener Krankheiten wie Psoriasis, chronischen Geschwüren oder malignen Tumorerkrankungen beteiligt. Tumorzellen zeigen im Vergleich zu normalen Zellen schwächere antioxidative Mechanismen. Diese Eigenschaft ermöglicht auch den selektiven Angriff von Tumorzellen durch KAP, vermittelt durch die extrazellulären RONS, was zu schweren oxidativen Schäden und in Folge zum Zelltod führt (36, 56). Schmidt et al. beobachteten, dass Änderungen im Redoxzustand aufgrund der KAP-Behandlung auch Veränderungen in der Zellmorphologie und Zellmobilität, nicht aber in der Zellviabilität verursachen. Durch KAP induzierter oxidativer Stress kann die Expression von beinahe 3000 Genen modifizieren. Diese kodieren für Strukturproteine und Entzündungsmediatoren wie Wachstumsfaktoren und Zytokine (64). Neben der Dauer und Intensität der Plasmabehandlung hängt das Ausmaß der Reaktion auf KAP auch vom genetischen Hintergrund, dem Zelltyp, der Tumormikroumgebung sowie den verschiedenen Klassen der erzeugten RONS ab (36).

1.5. Apoptose, Seneszenz und Nekrose

Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod, also einen komplexen biochemischen Prozess der kontrollierten Selbstzerstörung einer Zelle in einem mehrzelligen Organismus (65). Es handelt sich um einen genetisch kontrollierten physiologischen Prozess der eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase spielt (66). Dabei wirken Mitochondrien als Hauptregulator des Prozesses (56). Während der Apoptose werden zelluläre Makromoleküle kontrolliert in kleinere Fragmente verdaut. Schließlich kollabiert die Zelle in kleinere intakte Fragmente, die durch Phagozytose entfernt werden können, ohne umliegende Zellen zu schädigen oder Entzündungen zu verursachen (57, 67). Durch den mittels KAP ausgelösten oxidativen Stress kommt es zu verschiedenen intrazellulären und extrazellulären Signalen, die in den Mitochondrien zusammenlaufen. Sie erhöhen das Transmembranpotenzial sowie die Ausschüttung proapoptotischer Faktoren einschließlich Cytochrom-C. Dieser Prozess wird von der Bcl-2-Protein-Familie reguliert und führt schlussendlich zur Aktivierung der Caspasen Kaskade (68).

Der Zellzyklus ist eine periodische Abfolge verschiedener Aktivitätsphasen in einer Zelle zwischen zwei Zellteilungen, was final zum Zellersatz im Gewebe führt. RONS, die nach hochdosierter Anwendung von KAP produziert werden, können den Zellzyklus verändern, was typischerweise zur Apoptose führt. Niedrigere KAP-Dosen können jedoch auch die Zellproliferation hemmen, indem sie die Zellseneszenz induzieren. Vor allem wenn sich die meisten Zellen im Gewebe in der proliferativen Phase befinden, wie dies bei den meisten Tumoren beobachtet wird (43). Die zelluläre Seneszenz ist ein hochstabiler Zellzyklus-Arrest, der als Reaktion auf verschiedene Belastungen ausgelöst wird. Durch die Auferlegung eines Wachstumsstopps begrenzt die Seneszenz die Replikation alter oder beschädigter Zellen (69).

Bei der Nekrose platzt im Gegensatz zur Apoptose die Zelle und der Zellinhalt gelangt in den extrazellulären Raum, was zu Entzündungen führen kann. Nekrose wird durch zelluläre Verletzungen induziert, z.B. extreme Veränderungen des osmotischen Drucks oder Hitze, die zu einem Abbau des Adenosintriphosphats (ATP) der Zelle führen. Die Tumorzellen lernen, die Apoptose als einen der Prozesse, die sie anwenden, um dem Immunsystem zu entgehen auszuschalten und so zu überleben. Daher gibt es Studien, die versuchen, nach niedrigen Dosen mit nicht-thermischem Plasma, die nicht ausreichen, um die Zellen zu zerstören, das apoptotische Verhalten in Melanomzellen zu fördern (57, 67).

Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse basiert auf der extrazellulären Exposition von Phosphatidylserin in apoptotischen Zellen, denn daran kann eine spezifische Bindung zu Annexin V erfolgen, die in ein Lumineszenzsignal umgewandelt wird. Daneben kann die Nekrose ermittelt werden, indem zusätzlich eine membranundurchlässige DNA-Färbung mittels Propidium Iodid erfolgt, denn die Färbung erfolgt nur bei nicht intakter Membran, also bei Nekrose (70).

Außerdem kann die Apoptose durch die Detektion Apoptose-induzierter-Moleküle wie die Caspasen auf molekularbiologischer Ebene untersucht werden. Bisher wurden 11 Isoenzyme von Caspasen beim Menschen beschrieben, von denen sieben (Caspase 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) an der Apoptose teilnehmen (71).

1.6. Zielsetzung der Studie

Die Forschung beschäftigte sich bislang vielfältig mit der Anwendung von KAP in der Behandlung von Malignomen und konnte bereits eine antiproliferative Wirkung auf

verschiedene Krebszelllinien bestätigen (31, 72, 73). Außerdem wurde für KAP auch die klinische Wirksamkeit in der Behandlung von AK, die als Vorstufe des PEK gelten, bestätigt (7). Die molekularen- und zellbiologischen Auswirkungen von KAP auf PEK wurden bisher allerdings nur unzureichend analysiert.

Die Aufgabe dieser Promotionsarbeit liegt daher in der Analyse der Auswirkungen einer KAP-Behandlung mit dem plasma care® Prototyp an verschiedenen oralen und kutanen Plattenepithelkarzinom Zelllinien. Die KAP-Dosis wird dabei über die Behandlungszeit variiert. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten werden die oralen PEK-Zelllinien SCC-9 und SCC-15 sowie die kutane PEK-Zelllinie A-431 exemplarisch im Hinblick auf molekulare und zelluläre Veränderungen nach KAP-Behandlung untersucht. Im Mittelpunkt steht dabei die Analyse des horizontalen Migrationsverhaltens der Tumorzellen nach KAP-Behandlung am Spalt. Überdies wird mittels Boyden-Kammer Assay das vertikale Migrationsverhalten untersucht. Die Beurteilung der Apoptose erfolgt mittels FACS-Analyse und zusätzlich auf molekularbiologischer Ebene mit Hilfe von mRNA Expressionsanalysen proapoptotischer Marker. Der Nachweis von Seneszenz wird molekularbiologisch durch die Induktion der p16 und p21 mRNA Expression als Seneszenz-Marker beurteilt.

Ein besonderes Augenmerk liegt im Allgemeinen auf den KAP-Dosis abhängigen Veränderungen der PEK-Zellen, um die optimale KAP-Behandlungsdauer zu bestimmen. Dabei wird der Anstieg der dosisabhängigen Effekte teils auch im zeitlichen Verlauf bis 46 Stunden nach KAP-Behandlung evaluiert. Des Weiteren werden die Unterschiede im Migrationsverhalten, sowie die Aktivierung von Apoptose- und Seneszenz-Mechanismen zwischen den untersuchten PEK-Zelllinien betrachtet.

Mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten sollen Forschungslücken gefüllt werden, um langfristig die Entwicklung neuer Therapieansätze für die Behandlung des PEK voranzutreiben.

2. Material

2.1. Verbrauchsmaterialien

Artikelbezeichnung	Hersteller
µ-Slide 8 Well	Ibidi, Martinsried, Deutschland
12-Well Zellkulturplatten	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
24-Well Zellkulturplatten	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
6-Well Zellkulturplatten	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Combitips advanced®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Deckgläser 24*60 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FACS Tube 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Falcon® 75 cm ² Flasche	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Falcon® Cell Culture Inserts 12-well	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Falcon® Cell Culture Inserts 24-well	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Luna™ Cell Counting Slides	Logos Biosystems, Anyang, South Korea
Parafilm®	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Tube 0,5 ml	Nolato Treff AG, Degersheim, Schweiz
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Primaria™ Easy Grip Cell Culture Dish 35*10 mm Surface Modified Polystyrene	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Superfrost™ Plus Adhesion Microscope Slides	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Tube 15 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Tube 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 1: Allgemeine Materialien

2.2. Substanzen

Artikelbezeichnung	Hersteller
Acridine Orange (AO)/ Propidium Iodide (PI) Stain	Logos Biosystems, Anyang, South Korea
Amphotericin-B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland
CM-1-Einfriermedium	CLS, Höltzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, Deutschland
Dulbecco Phosphate Buffered Saline, (DPBS) (1x)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ethanol denaturiert	Chemikalienausgabe Universität Regensburg
FastStart Essential DNA Green Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
FKS	Anprotec, Bruckberg, Deutschland
L-Glutamine solution	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Neo-Mount®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Primer (p16, p21, Caspase-3 /-7 /-9, γ H2AX, β -Aktin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich St. Louis, USA

Tabelle 2: Substanzen

2.3. Geräte

Gerät	Artikelbezeichnung	Hersteller
Brutschränke	HERAcell CO2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
FACS-Gerät	FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Heiz- & Kühlblöcke	Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

LightCycler	LightCycler® 96	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Live-Cell-Imaging	Büchseninkubator	ibidi® GmbH, Martinsried, Deutschland
	Leica DFC9000 Kamera	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
	Leica DMI8-Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
	pE-4000 Lichtquelle	CoolLED, SP10 5NY, Andover, England
Mikroskope	Leitz Mikroskop Labovert FS mit Leica Kameraaufsatz MC 170HD	Leica microsystems, Wetzlar, Deutschland
	Zeiss Lichtmikroskop axiostar plus mit AxioCam ICc 1 Kameraaufsatz	Carl Zeiss, Micro Imaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Pipetten	PIPETMAN® Classic P1000 Pipette	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
	PIPETMAN® Classic P200 Pipette	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettierhilfe	INTEGRA Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
	Multipette® E3x	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Plasmagerät	plasma care® Prototyp	Terraplasma GmbH, Garching, Deutschland
Sterilwerkbänke	Sterilbank Heraeus Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Thermocycler	MJ Research PTC-200 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules/Kalifornien, USA
Vakuumpumpe	vacuubrand	VACUUBRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland

Vortexer	Lab dancer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany
	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Zellzähler	Luna-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter	Logos Biosystems, Anyang, South Korea
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge Tisch	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Mini Star Zentrifuge	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA

Tabelle 3: Geräte

2.4. Kits

- NucleoSpin® RNA Plus Kit, Macherey-Nagel, Mannheim, Deutschland
- Super Script™ II, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, USA
- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI, BioLegend, San Diego, USA
- Hemacolor® Schnellfärbung von Blutaussstrichen, Sigma-Aldrich St. Louis, USA

2.5. Primer

Forward-Primer				
Primername	Sequenz (5' – 3')	Annealing-Temperatur	Schmelz-Temperaturen	Größe bp
β-Aktin forward	CTACGTCGCCCTGGACTT CGAGC	60°C	88-89°C	385
Caspase-3 forward	CTGCCGTGGTACAGAACT GG	60°C	82-83°C	165
Caspase-7 forward	GACCGGTCCTCGTTTGTA CC	60°C	81-82°C	190

Caspase-9 forward	TGAACTTCTGCCGTGAGT CC	60°C	87°C	146
p16 forward	GGAGCAGCATGGAGCCT TCGGC	60°C	91°C	270
p21 forward	CGAGGCACCGAGGCACT CAGAGG	60°C	90-91°C	287
γH2AX forward	TACCTCACCGCTGAGATC CT	60°C	88°C	119
Reverse Primer				
Primername	Sequenz (3' – 5')	Annealing- Temperatur	Schmelz- Temperaturen	Größe bp
β-Aktin reverse	GATGGAGCCCGCCGATCC ACACGG	60°C	88-89°C	385
Caspase-3 reverse	TGGATGAACCAGGAGCC ATC	60°C	82-83°C	165
Caspase-7 reverse	TTCCGTTTCGAACGCCCA TA	60°C	81-82°C	190
Caspase-9 reverse	CAGCAAAGCCAGCACCAT TT	60°C	87°C	146
p16 reverse	CCACCAGCGTGTCCAGG AAGC	60°C	91°C	270
p21 reverse	CCTGCCTCCTCCCAACTC ATCCC	60°C	90-91°C	287
γH2AX reverse	AGCTTGTTGAGCTCCTCG TC	60°C	88°C	119

Tabelle 4: Primerdesign

2.6. Zelllinien

Alle verwendeten Zellen haben adhärenente Wachstumseigenschaften und es wird vom Hersteller eine Inkubation bei einer Temperatur von 37°C in einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO₂ empfohlen. Die Plattenepithelkarzinomzelllinien stammen alle von der American Type Culture Collection (ATCC).

2.6.1. A-431 (ATCC CRL-1555™)

Es handelt sich um ein Epidermoidkarzinom (Plattenepithelkarzinom), das aus der Epidermis einer 85-jährigen Patientin isoliert wurde, also um ein kutanes Plattenepithelkarzinom. Dieses wurde als Teil einer Zelllinienreihe aus einem soliden Tumor von D.J. Giard, et al. für die Krebs-, Toxikologie- und Immunonkologieforschung eingelagert.

2.6.2. SCC-9 (ATCC CRL-1629™)

Es handelt sich um orale Plattenepithelkarzinomzellen, die aus der Zunge eines 25-jährigen männlichen Patienten isoliert wurden und von JG Rheinwald für die Krebsforschung dort eingelagert wurden.

2.6.3. SCC-15 (ATCC CRL-1623™)

Es handelt sich um orale Plattenepithelkarzinomzellen, die aus der Zunge eines 55-jährigen männlichen Patienten isoliert wurden und von JG Rheinwald für die Krebsforschung dort eingelagert wurden.

2.6.4. Mel Im

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane Melanomzellen, die aus einer Melanommetastase isoliert wurden. Die Zelllinie wurde von Dr. M. Hadem (Universität Hanover, DE) etabliert. Weitere Charakterisierung erfolgte durch Dr. J.P. Johnson (Institut für Immunologie, München, DE) (74).

2.7. Zellkulturmedium

500 ml DMEM mit Pyruvat, low Glucose (1 g/L), ohne Glutamin und Phenolrot

+ 50 ml fötales Kälberserum (10 % FKS)

+ 5 ml Amphotericin-B (1 % Ampho-B)

+ 5 ml Penicillin-Streptomycin (1 % PS)

+ 5 ml L-Glutamin (1 % LG)

2.8. Software

Software	Entwickler
GraphPad Prism 9	Graphpad Software Inc., San Diego, USA
Image-Pro 10	Media Cybernetics, Rockville, Maryland USA
CellQuest Pro	Version 5.2, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
LightCycler 96 SW 1.1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
AxioVision SE64 Rel.4.9	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Citavi 6	Citavi, Wändenswil (Switzerland)
Excel 2019	Microsoft Corporation, Remond, USA
PowerPoint 2019	Microsoft Corporation, Remond, USA
Word 2019	Microsoft Corporation, Remond, USA
Leica Application Suite 3.4.2.18368 Softwareplattform Leica Application Suite X	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Imaris	Version 9.0.2, Bitplane, Zürich, Schweiz
FlowJo	Version 10.7.1, FlowJo LLC, Ashland, OR, USA

Tabelle 5: Software

3. Methoden

3.1. Kultivierung der Zellen

Die Plattenepithelkarzinomzelllinien SCC-9, SCC-15 und A-431 sowie die Melanomzelllinie Mel Im wurden in einem Medium auf Basis von DMEM, mit Pyruvat, low Glucose (1 g/L) aber ohne Glutamin und Phenolrot, welches mit entsprechenden Zusätzen versetzt wurde (siehe 2.7. Zellkulturmedium), gezüchtet. Die Zellen wurden in einem Brutschrank mit 5 % CO₂ bei 37°C in T75-Flaschen mit 10 ml Medium kultiviert. Es erfolgten regelmäßige lichtmikroskopische Kontrollen bezüglich des Wachstumsstatus der Zellen. Sobald der komplette Flaschenboden mit einem Zellrasen überzogen war, die Flasche somit voll war, wurden die Zellen passagiert, also auf mehrere neue Zellkulturflaschen gesplittet. Dafür wurde zuerst mit einer Pasteur-Pipette das Medium abgesaugt und im Anschluss erfolgte eine Waschung der Zellen mit 10 ml PBS. Das Ablösen von der Zellkulturflasche erfolgt, indem 2 ml Trypsinlösung zugegeben wurden. Für die Trypsinlösung wurden zuvor 2 ml Trypsin 1:5 mit PBS verdünnt. Nach circa 5 min Inkubationszeit wurden zum Abstoppen der Enzymaktivität mittels FKS pro T75-Flasche 8 ml Medium zugegeben. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und für 5 min bei Raumtemperatur mit 1200 rounds per minute (rpm) zentrifugiert. Vom entstandenen Zellpellet wurde mittels Pasteur-Pipette der Überstand abgesaugt, bevor es in Medium resuspendiert und durch Verdünnung auf die gebrauchte Zellzahl abgestimmt in neue T75-Flaschen eingebracht wurde. Mediumwechsel erfolgte dann unter Sterilbänken der Zellkultur alle 2-3 Tage.

3.2. Auftauen der Zellen

Nach Entnahme des Kryoröhrchens aus dem Stickstofftank wurde der Inhalt möglichst schnell bei Raumtemperatur bzw. unter warmem Wasser aufgetaut, bis die Zellsuspension wieder flüssig war. Diese wurde dann nach Vorlegen von 8 ml Medium in ein Falcon gekippt und im Anschluss für 5 min bei 1200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und in eine T75-Flasche überführt. Nach 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel.

3.3. Einfrieren der Zellen

Zuerst erfolgte das Ablösen der Zellen aus der Zellkulturflasche wie in Kapitel 3.1. beschrieben. Dann wurden die Zellen in 1 ml CM-1-Einfriermedium pro Tube resuspendiert. Für einen langsamen gleichmäßigen Abkühlprozess erfolgte zumindest für eine Nacht die Zwischenlagerung im Gefrierschrank bei -80°C in einem Kryoeinfrierbehälter, der mit Isopropanol gefüllt war. Für die längerfristige Aufbewahrung wurden die Zellen dann in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.4. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung beispielsweise vor Zellaussaat erfolgte mit Hilfe des LUNA-FL™ Zellzählgeräts. Dafür wurden aus der zu bestimmenden Zellsuspension 18 µl entnommen und mit 2 µl Acridine Orange Propidium Iodide Lösung vermischt. Aus der entstandenen Mischung wurden wiederum 10 µl entnommen und in eine Kammer eines Cell counting Slides pipettiert. Das Gerät wurde auf den Modus „Fluorescence Cell Counting“ gestellt und das Cell counting Slide in die dafür vorgesehene Öffnung geschoben. Das Gerät hat dann die durch das Acridin Orange abgegebene Fluoreszenz gemessen und hat die Anzahl der toten sowie lebenden Zellen pro ml der verwendeten Zellsuspension angegeben. So konnte berechnet werden, wie viel von der vorliegenden Zellsuspension für die gewünschte Zellzahl verwendet werden musste.

3.5. Überprüfung der Wirkleistung der verwendeten Plasmaelektrode

Um eine konstante Wirkleistung der verwendeten Plasmaelektrode beim plasma care® Prototyp sicherzustellen und so durch den Elektrodenwechsel bedingte Schwankungen bei den Untersuchungsergebnissen auszuschließen, wurde die Wirkintensität im Rahmen der Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse engmaschig kontrolliert. Dafür wurden bei diesen Untersuchungen alle Zellproben doppelt vorbereitet. Während die eine Gruppe mit einer extra für die geplanten Untersuchungen angeschafften, somit komplett neuwertigen Elektrode behandelt wurde, wurde für die zweite Gruppe eine Elektrode verwendet, die bereits seit einem ganzen Jahr regelmäßig für verschiedene Untersuchungen im Einsatz war. In Abbildung 7 werden die Gesamtauswertungen der Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse für die Zelllinien A-431, SCC-9 und SCC-15 gegenübergestellt. Dabei wird für die vier Probegruppen, die jeweils unterschiedlichen Plasmabehandlungen

unterzogen wurden, die Vitalität, die frühe/späte Apoptose und die Nekrose in relativen Anteilen aufgezeigt. Wenn man am Beispiel dieser Gesamtauswertungen den Fokus alleine auf den Vergleich der für 2 min mit KAP behandelten Proben legt, kann man unabhängig von der Zelllinie keine wesentlichen Unterschiede in der Vitalität, in der frühen/späten Apoptose oder der Nekrose feststellen. In Folge dessen wurden in der finalen Auswertung der Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse alle Werte die aus einer Plasmabehandlung für 2 min resultierten unabhängig von der verwendeten Elektrode zusammengefasst. Somit konnte im Rahmen dieser Untersuchung die konstante Wirkleistung der Plasmaelektrode beim plasma care® Prototyp nachgewiesen werden.

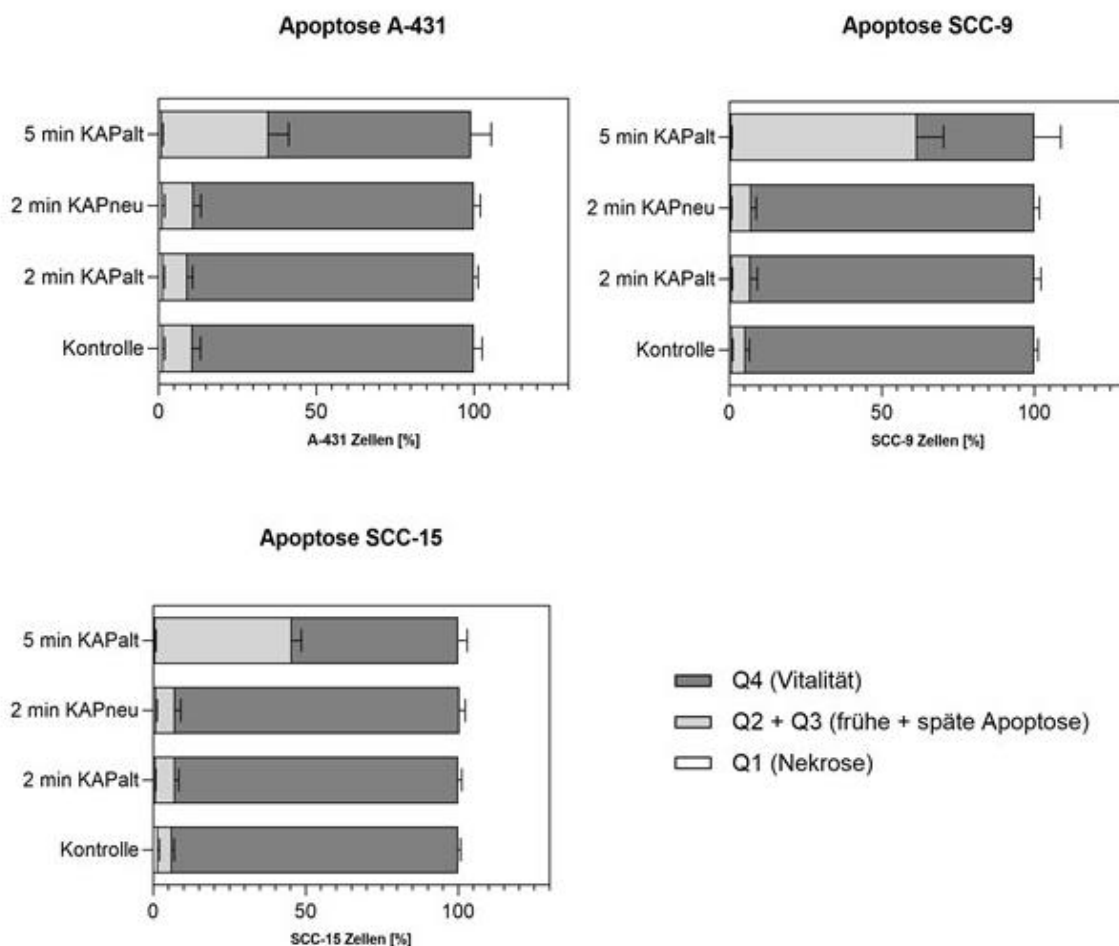


Abbildung 7: Wirkleistungsüberprüfung der Plasmaelektrode

Die Gesamtauswertungen für die Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse der Zelllinien A-431, SCC-9 und SCC-15 werden gegenübergestellt. Dabei wird für 4 Probegruppen die unterschiedlichen Plasmabehandlungen unterzogen wurden die Vitalität, die frühe/späte Apoptose und die Nekrose in relativen Anteilen aufgezeigt. Neben der unbehandelten Kontrolle wird eine Gruppe für 5 min und zwei Gruppen für 2 min mit Plasma behandelt. Der Fokus liegt auf den für 2 min behandelten Gruppen, die sich durch das Alter der verwendeten Elektrode unterscheiden. Unabhängig von der Zelllinie kann bei Anwendung einer neuen Elektrode, gegenüber der Anwendung einer alten Elektrode für 2 min kein gesteigerter Anteil apoptotischer Zellen nachgewiesen werden.

3.6. Morphologische Zellanalyse am Durchlichtmikroskop

Die morphologische Analyse, also die Untersuchung der Form und Struktur von Organismen, kann viele Informationen über den Metabolismus und die Differenzierung der Zellen liefern (75). Im Rahmen der Untersuchungen dieser Dissertation wird der Fokus primär auf Plattenepithelkarzinomzellen gelegt. Jedoch zeigen dabei Zellen unterschiedlicher Herkunft unterschiedliche Morphologie. Daher werden bewusst epitheliale Tumorzelllinien, die sich durch ihren Ursprung differenzieren, analysiert. Während die Zellen der Zelllinie A-431 von einem kutanen (epidermalen) Plattenepithelkarzinom stammen, werden daneben auch noch Zellen zweier Mundhöhlenkarzinome (Schleimhaut der Zunge) am Beispiel der Zelllinien SCC-9 und SCC-15 untersucht. Zusätzlich wird im Rahmen der Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse auch noch die Melanomzelllinie Mel Im hinzugezogen, da sich die Plasmadosierung in der Etablierungsphase auf die Dosierung von Arndt et al. in „Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells“ stützte, die alle Analysen an der Zelllinie Mel Im mit einer Anwendung von KAP für 2 min durchführten und dabei vermutlich aufgrund einer anderen Plasmaquelle bereits sehr deutlich Apoptose induzieren konnten (43).

Für die Analyse wurden je 200 000 Zellen in ein 35 mm Zellkulturschälchen ausgesät und anschließend für 24 h inkubiert. Dann erfolgte die Plasmabehandlung der dafür vorgesehenen Proben mit den jeweils festgelegten Dosen und eine weitere Inkubation für 24 h. Im Anschluss wurden exemplarisch Aufnahmen der Zellproben am Durchlichtmikroskop angefertigt und der unbehandelten Kontrolle gegenübergestellt.

3.7. Horizontale Migration am Spalt

Die Migration ist eine Schlüsseleigenschaft lebender Zellen, welche auf der aktiven Bewegung von Zellen basiert (76). Eine genauere Beschreibung zu den Hintergründen des Vorganges „Migration“ folgt in Kapitel 3.8.1.

In diesem Projekt erfolgte die Beobachtung des Migrationsverhaltens in horizontale Richtung an einer zuvor generierten zellfreien Spalte mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie. Dafür wurden den einzelnen Versuchsgruppen in Etablierungsversuchen festgelegte Dosen an KAP verabreicht. Zum Vergleich wurde auch eine unbehandelte Kontrollgruppe beobachtet. Zu besonders aussagekräftigen Zeitpunkten, die im Rahmen der Etablierungsversuche bestimmt wurden, wurden

Kontrollaufnahmen bis zum Spaltschluss angefertigt. Die Spalten wurden durch Ibidi-Culture Inserts generiert, in die pro Abteil 24 h vor KAP-Behandlung je 20 000 Zellen ausgesät wurden. Die KAP-Behandlung erfolgte mit dem plasma care[®] Prototyp (4 kHz; 3,5 kV).

3.7.1. Erwartung

In den Etablierungsversuchen wurde wiederholt beobachtet, dass bei allen in den Untersuchungen verwendeten PEK-Zelllinien nach dem Entfernen der Culture Inserts bei Inkubation unter den in Kapitel 2.6. beschriebenen Idealbedingungen die Spalte mit einer Breite von 0,5 mm innerhalb weniger Stunden durch Wachstum und Proliferation der angrenzenden Zellen geschlossen wird. Da verschiedene Untersuchungen beispielsweise von Yan et al. eine antiproliferative, also wachstumshemmende Wirkung von KAP bestätigen, wurde angenommen, dass mit zunehmender angewendeter Dosis der Spaltschluss verzögert oder verhindert wird (31, 77, 78).

3.7.2. Etablierung des Versuchs für Live-Cell-Imaging

Live-Cell-Imaging ist eine analytische Methode zum Beobachten und Verstehen zellulärer Dynamiken (79). Dabei werden nach festgelegten Voreinstellungen automatisch in diesem Fall in stündlichen Abständen für 96 Stunden mikroskopische Aufnahmen verschiedener reproduzierbarer Positionen angefertigt. Die zu untersuchenden Zellen befindet sich dabei wie in Abbildung 8 dargestellt auf einem Ibidi-8-Well Slide, worauf sie mit Hilfe von Culture Insert für die Generierung der Spalten in den Zellfeldern ausgesät und anschließend in Doppelbestimmung mit unterschiedlichen Dosen an KAP behandelt wurden. Diese Slides kommen beim Live-Cell-Imaging in eine geschlossene Kammer mit einem für die untersuchten Zellen wachstumsfördernden Klima, also einer Temperatur von 35°C bei 50 % Luftfeuchtigkeit und 5 Volumen-% CO₂.

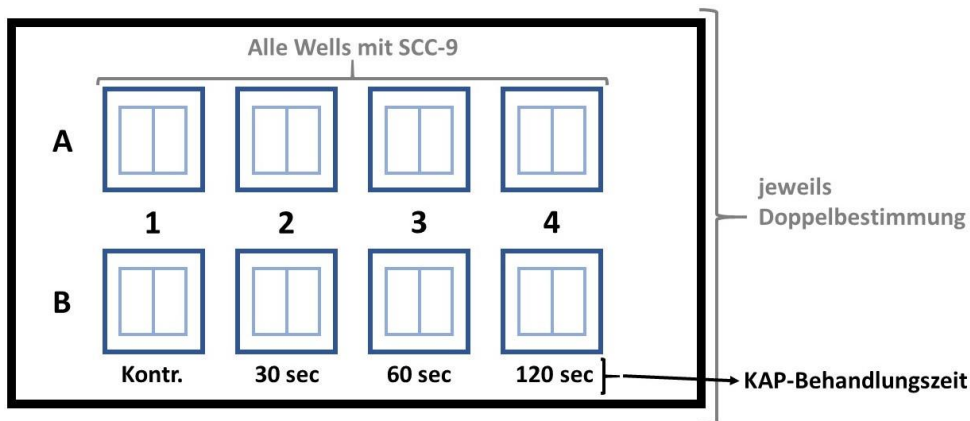


Abbildung 8: Ibidi-8-Well-Slide für KAP-Zeitreihe in Doppelbestimmung

Es wird eine schematische Zeichnung eines Ibidi-8-Well-Slides besetzt mit 8 Culture Inserts, welches für die Versuche zur horizontalen Migration am Spalt mittels Live-Cell-Imaging ursprünglich angewendet werden sollten, dargestellt. Die geplanten Behandlungszeiten für die einzelnen Wells, welche mit Zellen der Zelllinie SCC-9 gefüllt werden sollten sind ebenfalls eingetragen. Jede KAP-Behandlungszeit wird dabei jeweils in Doppelbestimmung geführt.

Die ursprünglich vorgesehene KAP-Behandlung für 2 min zeigte dabei überraschenderweise eine derartige Zellschädigung, bei der die Zellen größtenteils kein Wachstumspotenzial mehr aufwiesen. Zur Bestimmung der optimalen KAP-Dosis wurde dann eine KAP-Zeitreihe mit den in Abbildung 8 dargestellten Behandlungszeiten durchgeführt. Unabhängig von der KAP-Dosis stieß auch diese Methode mit stark geschädigten Zellen an ihre Grenzen. Nach Adjustierungen an der Distanz zwischen Zellrasen und Elektrode, mit immer gleichen Ergebnissen erfolgte ein Wechsel zur manuellen Durchlichtmikroskopie mit Inkubation im Brutschrank unter den in 3.1. beschriebenen Bedingungen. Um die Beschichtung der Ibidi-8-Well Slides als Störfaktor auszuschließen, wurden Versuche mit KAP vorbehandelten Slides sowie Glasslides durchgeführt. So konnte final der Schluss gezogen werden, dass Live-Cell-Imaging für die in diesem Projekt untersuchten Zellen wegen einem unpassenden Klima am Objektisch nicht geeignet ist.

3.7.3. Etablierung des Versuchs für die manuelle Durchlichtmikroskopie

An diesem Punkt wurde an die beim Ausschluss der Methode des Live-Cell-Imaging gewonnenen Erkenntnisse angeknüpft. Alle Faktoren, die gutes Zellwachstum und die Beobachtung des Spaltschlusses ermöglichten, wurden zusammengetragen. Demzufolge wurde wie in Abbildung 9 dargestellt in 35 mm Zellkulturschälchen ausgesät, mit der entsprechenden Plasmadosis behandelt und im Brutschrank inkubiert. Für die Doppelbestimmung gab es jedes Schälchen in doppelter Ausführung.

Durch die manuelle Anfertigung von Kontrollaufnahmen erfolgte die Beobachtung des Spaltschlusses. Um dabei Spiegelungen durch den Rand der Schälchen zu vermeiden, wurde nach dem Ausprobieren verschiedener Anordnungsmöglichkeiten eine zentrale Positionierung von vier Culture-Inserts wie in Abbildung 9 dargestellt festgelegt. Außerdem erfolgte die Prüfung verschiedenster Zeitabstände für die Kontrollaufnahmen.

3.7.4. Versuchsaufbau

Die horizontale Migration am Spalt wurde mit den Zelllinien A-431, SCC-9 und SCC-15 untersucht. In jeder Versuchsreihe wurde eine Zelllinie verwendet, allerdings wurden dafür 3-4 voneinander unabhängig hergestellte Zellsuspensionen bei der Aussaat verwendet. Es wurden zwölf 35 mm Zellkulturschälchen wie in Abbildung 9 dargestellt für die Plasmabehandlung in einer Zeitreihe in Doppelbestimmung (0 s, 30 s, 60 s, 120 s, 180 s, 300 s) vorbereitet, in die die Culture-Inserts geklebt wurden. In jedes Abteil der Culture Inserts wurden je 20 000 Zellen in 70 µl Medium ausgesät, um durch eine 0,5 mm breite Spalte abgetrennte Zellfelder zu generieren.

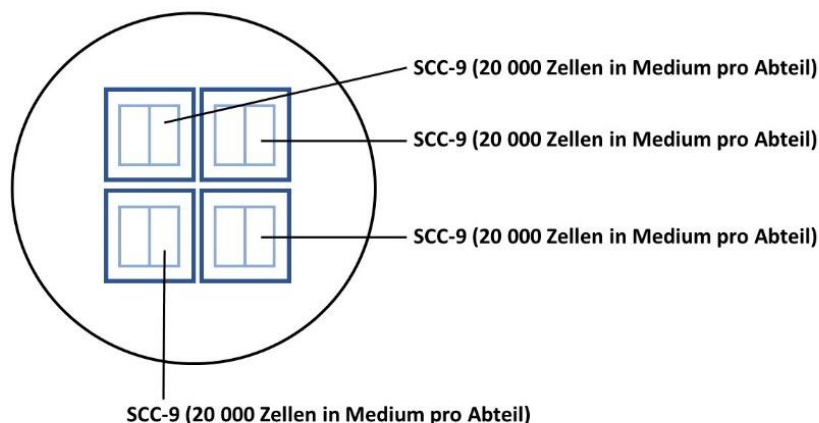


Abbildung 9: Positionierung der Culture Inserts im Zellkulturschälchen

Es wird eine schematische Zeichnung eines 35 mm Zellkulturschälchens besetzt mit 4 Culture Inserts, wie es final für die Versuche zur horizontalen Migration am Spalt angewendet wurde, dargestellt. Die Culture Inserts wurden zentral in das Zellkulturschälchen gesetzt und mit Zellen einer Zelllinie, in der Abbildung beispielhaft SCC-9, befüllt.

Nach 24 h Inkubation wurden die Culture Inserts entfernt, das Medium wurde in allen Schälchen gewechselt und die Anfertigung von Kontrollaufnahmen in unbehandeltem Zustand erfolgte. Dabei wurden die Lokalisationsplatten für die folgenden Aufnahmen hergestellt. Die Schälchen wurden auf transparente Kunststoffplatten gestellt, welche am Objektisch in einer reproduzierbaren Position befestigt wurden. Für jedes

Schälchen wurde eine Platte beschriftet. Für jede Spalte wurden 2 Aufnahmepositionen markiert, indem eine Linie um das Schälchen gezogen wurde, sodass die Aufnahmepositionen für spätere Aufnahmen möglichst genau reproduziert werden konnte. Im Anschluss erfolgte die Plasmabehandlung. Bei allen Schalen wurde vor Behandlung das Medium abgekippt und nach der Behandlung erfolgte die Zugabe von 2,5 ml neuem Medium. Die Behandlung erfolgte je nach Schale für 0 s / 30 s / 60 s / 120 s / 180 s / 300 s mit dem plasma care® Prototyp mit den zuvor in Kapitel 1.3. beschriebenen Betriebsparametern und einer Distanz von 16 mm zwischen Zellrasen und Elektrode. Direkt nach der Plasmabehandlung wurden an jeder Spalte 2 Aufnahmen am Durchlichtmikroskop (\cong 0 h Zeitpunkt) 0 h nach KAP angefertigt. Dafür wurden die Schälchen auf die zuvor festgehaltene Position auf die Lokalisationsplatte gestellt. Weitere Aufnahmen wurden in der gleichen Vorgehensweise nach 10 h, nach 22 h, nach 24 h, nach 26 h und nach 46 h angefertigt.

3.7.5. Auswertung

Zuerst erfolgte eine rein visuelle Auswertung, für die die Bilder wie in Abbildung 10 am Beispiel der Kontrollreihe der Zelllinie SCC-9 im Zeitverlauf mit zunehmender Beobachtungszeit also gleichzeitig auch mit zunehmendem Spaltschluss gegenübergestellt wurden. Dafür wurden die Aufnahmen vorab nach vorgenommener KAP-Behandlungsdauer in Gruppen eingeteilt und anschließend mit der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

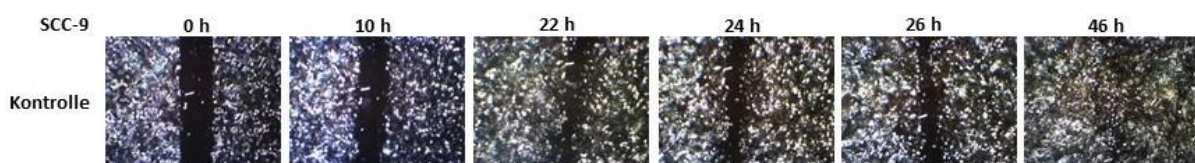


Abbildung 10: Kontrollreihe Spaltschluss im Zeitverlauf

Gegenüberstellung von durchlichtmikroskopischen Aufnahmen einer unbehandelten Kontrollprobe im Rahmen der Versuche zur horizontalen Migration am Spalt am Beispiel der Zelllinie SCC-9 im zeitlichen Verlauf. Von der Probe bei der die KAP-Behandlung unterlassen wurde, wurde nach 0 h, nach 10 h, nach 22 h, nach 24 h, nach 26 h und nach 46 h eine Aufnahme von einer reproduzierbaren Stelle an der Spalte angefertigt.

Die numerische Auswertung erfolgte wie in Abbildung 11 dargestellt mit Hilfe der Image-Pro-Software. Damit wurden die Bilder zuerst kalibriert, indem an einem unbehandelten Bild die Spaltbreite der unbehandelten Spalte auf 500 μ m festgelegt wurde. Diese Breite war durch die Maße der Culture-Inserts bekannt. Die Spalten aller Aufnahmen wurden mit Image-Pro auf Basis von hell-dunkel Kontrasten ausgewählt und deren Flächen berechnet.

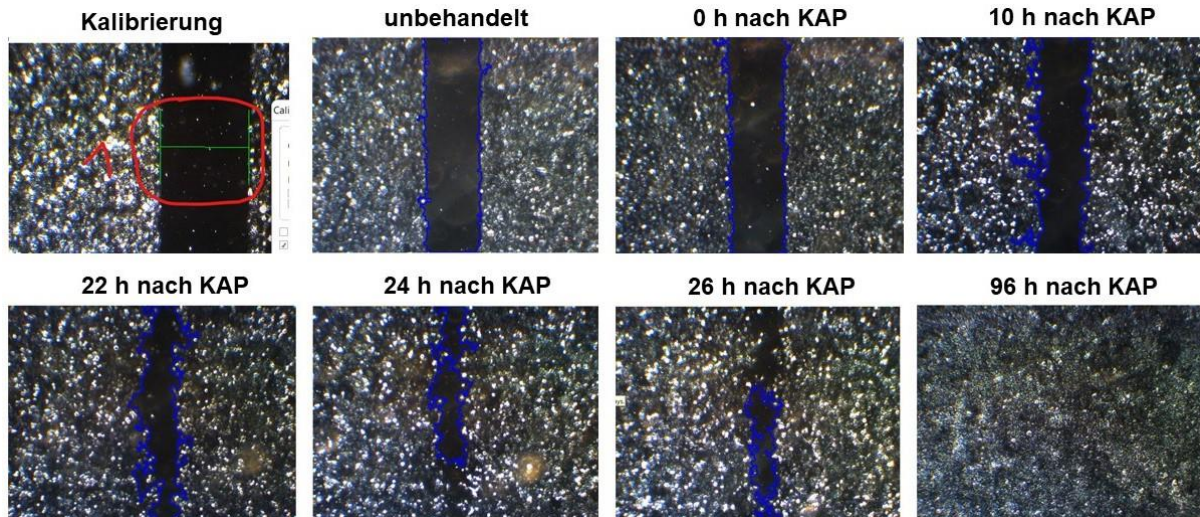


Abbildung 11: Vorgehen bei der Auswertung der horizontalen Migration am Spalt

Mit Hilfe der Image-Pro-Software erfolgt die numerische Auswertung der durchlichtmikroskopischen Aufnahmen aus den Versuchen zur horizontalen Migration am Spalt. Dafür erfolgt im ersten Schritt die Kalibrierung der Software mittels eines Bildes einer unbehandelten Probe direkt nach Entfernung des Culture-Inserts auf die bekannte Spaltbreite von 500 μm . Dann wird die restliche Zeitreihe an Bildern von der entsprechenden Probe geladen und die Software kann automatisch die Spalte erkennen und ihre Fläche berechnen. Im Anschluss können auch die Spaltflächen mit KAP behandelter Proben in Bezug auf die Kontrolle berechnet werden.

3.8. Boyden-Kammer Assay

In der Progression und Metastasierung von Tumoren zählen Invasion und Migration von Tumorzellen zu bedeutenden und kritischen Schritten (80). Daher sollte in diesem Versuch das Ausbreitungsverhalten von Plattenepithelkarzinomzellen nach 2 min Plasmabehandlung oder in der Kontrolle ohne Plasmabehandlung untersucht werden. Die ursprünglich von Boyden zur Analyse der Leukozyten-Chemotaxis eingeführte Methode eignet sich ideal für die quantitative Analyse verschiedener Migrationsreaktionen speziell von Tumorzellen (81). Auch invasive Eigenschaften von Tumorzellen können mit Hilfe einer angepassten Boyden-Kammer untersucht werden, indem die Membran mit verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen beschichtet wird (82). Genau diese Fähigkeiten, also Migration und Invasion, tragen bei Tumorerkrankungen hauptsächlich zum Fortschreiten sowie Wiederauftreten von Tumorerkrankungen bei (83). Das für den Boyden-Kammer Assay verwendete System basiert wie in Abbildung 12 dargestellt auf einer Kammer aus zwei mit Medium gefüllten Kompartimenten, die durch eine mikroporöse Membran mit Poren in der Größe von 8 μm , welche eine physikalische Barriere darstellt und von Zellen nur durch aktive Migration überwunden werden kann, getrennt sind. Zellen werden in das obere Kompartiment gegeben und können durch die Poren der Membran in das untere

Kompartiment wandern, in dem chemotaktische Mittel, also in diesem Fall konditioniertes Fibroblastenmedium vorhanden sind.

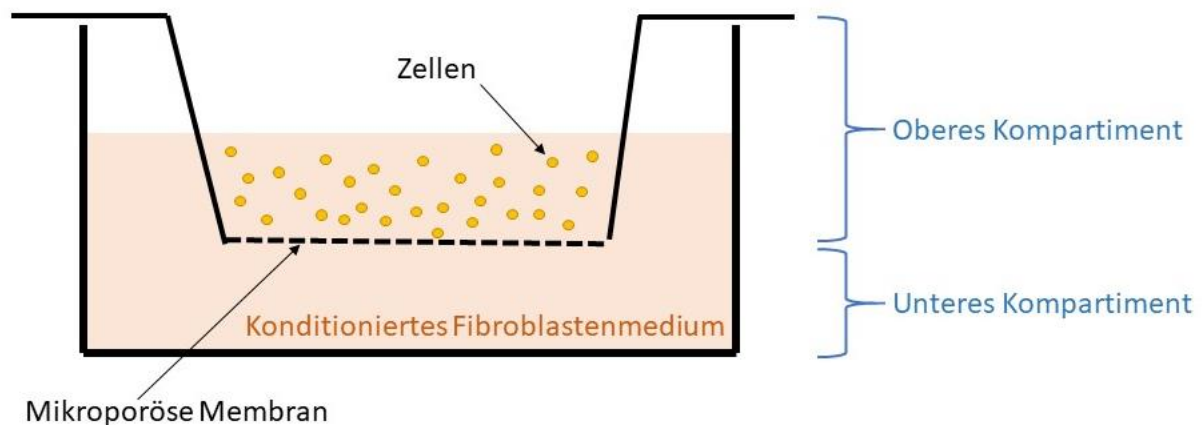


Abbildung 12: Aufbau Boyden-Kammer

Es wird eine schematische Darstellung einer Boyden-Kammer, wie sie in den Versuchen zur Untersuchung der gerichteten Zellmigration und -invasion angewendet wurde, dargestellt. Diese besteht aus einem oberen Kompartiment in das die Zellen gesetzt wurden und davon abgetrennt durch eine mikroporöse Membran einem unteren Kompartiment, welches mit konditioniertem Fibroblastenmedium gefüllt wurde.

Nach einer mittels Etablierungsversuchen festgelegten Inkubationszeit wird die Membran zwischen den beiden Kompartimenten fixiert, gefärbt, mikroskopiert und die Anzahl der auf die Membranunterseite gewanderten Zellen bestimmt. Daher wurde der Boyden-Kammer basierte Zellmigrationsassay auch als Filtermembran-Migrationsassay, Transwell-Migrationsassay oder Chemotaxis-Assay bezeichnet. Eine Reihe unterschiedlicher Boyden-Kammer-Vorrichtungen sind im Handel erhältlich (82). Die beschriebene Apparatur, die sogenannte Boyden-Kammer dient also der Untersuchung der Zellmotilität und Invasivität gegenüber einem Chemo-Lockstoff-Gradienten (84).

3.8.1. Gerichtete Zellmigration und -invasion

Eine ganz wesentliche Eigenschaft von lebenden Zellen ist ihre Beweglichkeit. Die Zellmigration ist ein Prozess der an der Empfängnis des Lebens, der Embryonalentwicklung, der Immunantwort und vielen pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum und Entzündungen mitwirkt. Methoden zur Untersuchung der Zellmigration sind sehr nützlich und wichtig für ein breites Spektrum biomedizinischer Forschung wie Tumorbilogie, Immunologie, Gefäßbiologie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie. Genau dieser Faktor macht Methoden zur Untersuchung des Zellmigrationsverhaltens zu sehr nützlichen Forschungswerkzeugen für eine Vielzahl von Disziplinen in den biomedizinischen Wissenschaften. Gerade in der

Krebsforschung ist es von besonderem Interesse, die Zellmigration zu untersuchen, da die Haupttodesursache bei Krebspatienten mit dem Fortschreiten von Metastasen zusammenhängt. Zur Ausbreitung von Tumorerkrankungen im ganzen Körper müssen Tumorzellen migrieren. Sie müssen durch die extrazelluläre Matrix und in den Blutkreislauf eindringen, sich an einer entfernten Stelle anheften und schließlich extravadiieren, um entfernte Herde zu bilden. Verschiedene biologische Methoden können verwendet werden, um diese Ereignisse im Detail zu untersuchen. Im Kapitel 3.7. wurde bereits die spontane horizontale Migration am Spalt beschrieben und im Folgenden wird die Vorgehensweise der mittels Boyden-Kammer bezüglich der Reaktion der Zellen auf einen Chemo-Lockstoff durchgeführten Untersuchungen, somit der gerichteten Migration erläutert (84–87). Die Boyden-Kammer stellt außerdem auch noch ein *in-vitro*-System zur Untersuchung der Zellinvasion dar, die als Motilität durch eine Art physikalische Barriere definiert ist. Dazu muss die Membran zusätzlich mit einem Matrigel beschichtet werden (88). Während also die Migration die reguläre Zellbewegung beschreibt, ahmt der Invasionsassay die Migration von Zellen durch die Basalmembran nach. Eine dünne extrazelluläre Matrix die im Gewebe Epithelien und Endothelien zugrunde liegt und sie vom Stroma trennt. Tumorzellen durchqueren diese Membran, um in das Stroma einzudringen und Fernmetastasen zu bilden. Sie tun dies, indem sie Proteasen produzieren, die die Matrix abbauen. Von mehreren *in-vitro*-Modellen sind diejenigen, die Matrigel verwenden, die zuverlässigsten, reproduzierbarsten und repräsentativsten in Bezug auf die In-vivo-Invasion (89). Das für die Invasion verwendete Matrigel stellt also die Basalmembran dar (90).

3.8.2. Erwartung

In Bezug auf die Untersuchungen der Effekte von KAP auf kolorektale Karzinomzellen durch Kim et al., welche unter Anwendung von Transwell-Kammern und Matrigel zu dem Schluss kamen, dass KAP mit steigender Intensität die Zellmigration bzw. Zellinvasion reduziert, wird erwartet, dass auch mit Plasma behandelte PEK Zellen die unbeschichtete Membran der Boyden-Kammer ($\hat{=}$ Migration) bzw. die mit Matrigel beschichtete Membran ($\hat{=}$ Invasion) langsamer passieren und dass im Vergleich zu unbehandelten Zellen weniger Zellen die Membran passieren (80).

3.8.3. Versuchsablauf

In zwei 35 mm Zellkulturschälchen wurden jeweils 400 000 Zellen für ausreichend Probenmaterial ausgesät und für 24 h inkubiert. Für den Boyden-Kammer Assay wurden bei der Zelllinie A-431 12-Well Platten vorbereitet und bei den SCC-9 bzw. SCC-15 24-Well-Platten. Denn die A-431 neigen dazu, sich nach Durchwandern der Poren nur am Rand der Kammer anzusiedeln. Dieser Effekt kann durch Verwendung größerer Inserts verringert werden. Die entsprechenden Inserts wurden in die Platte gesetzt und für die Invasion mit Matrigel beschichtet. Dieses wurde zuvor auf Eis aufgetaut und 1:3,7 mit Wasser verdünnt. Dann wurden die Invasionsinserts je mit 30 µl Matrigel beschichtet und für 30 min zum Gelieren in den Brutschrank gestellt. Während der 30 min erfolgte die Plasmabehandlung der entsprechenden Proben für 2 min. Dafür wurde vor Behandlung das Medium abgekippt, danach wurden die Proben mit KAP unter einer Distanz von 16 mm zwischen Zellrasen und Elektrode behandelt und abschließend wurde noch neues Medium zugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen in allen Schälchen abtrypsiniert. Zellsuspensionen gleich behandelter Schälchen wurden in ein Falcon zusammengefügt und bei Raumtemperatur und 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets wurden mit je 1 ml Medium ohne FKS resuspendiert. In allen Falkons erfolgt eine Zellzählung und anschließend die Verdünnung, sodass in den Proben für die Invasion 100 000 Zellen in 500 µl enthalten waren und für die Migration 150 000 Zellen in 500 µl.

In jedes Well einer 24-Well-Platte wurden 500 µl konditioniertes Fibroblastenmedium unter das Insert pipettiert, bei einer 12-Well Platte waren es 750 µl.

Bei der Migration und Invasion der A-431 und der Invasion der SCC-15 erfolgt dann eine Inkubation von 18 h. Bei der Migration der SCC-9, bei der Invasion der SCC-9 und bei der Migration der SCC-15 erfolgte eine Inkubation von 4 Stunden.

Für die Hemacolor-Färbung mussten erst alle Wells und Inserts abgesaugt werden. Die Oberseite der Inserts wurde je 4 Mal mit Hilfe eines Wattestäbchens mit PBS abgewaschen. Alle Inserts durchliefen dann einen dreistufigen Färbeverlauf nach Herstellerangaben, der mit einer PBS Waschung abschloss.

Die Membranen der Inserts wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit der Oberseite nach unten auf den Objektträger gelegt. Auf einen Objektträger kamen

jeweils 3 Membranen der in einem Versuch identisch behandelten Zellen. Abschließend wurden sie mit Neomount eingedeckelt.

3.8.4. Auswertung

Unter 40-facher Vergrößerung wurden unter dem Mikroskop pro Objektträger 12 Aufnahmen angefertigt, also 4 pro Membran. Die durch die Membran gewanderten Zellen wurden gezählt und ein Mittelwert für die 4 Aufnahmen ermittelt.

3.9. Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse

FACS steht für fluorescence activated cell scanning und beschreibt die Analyse fluoreszenz markierter Zellen bei einer Durchflusszytometrie. Es handelt sich dabei um eine laserbasierte, biophysikalische Technologie, die eine simultane multiparametrische Analyse ermöglicht. Für die Analyse sterbender Zellen sind fluoreszierend markiertes Annexin V und Propidiumiodid die am häufigsten verwendeten Reagenzien (91). Damit sollte in diesem Versuch die Apoptose- bzw. Nekroseneigung nach einer Plasmabehandlung untersucht werden. Die Analysen wurden neben den Plattenepithelkarzinom Zelllinien A-431, SCC-9 und SCC-15 auch noch mit Melanomzellen durchgeführt.

3.9.1. Erwartung

Verschiedene Untersuchungen wie beispielsweise die von Chang et al. konnten bereits zeigen, dass nicht-thermisches Atmosphärendruckplasma Apoptose induziert (92). Daher wird mit steigender Plasmadosis (wird über die Behandlungszeit reguliert), ein Anstieg in der Apoptose bzw. Nekrose erwartet.

3.9.2. Versuchsablauf

Jede Form der Plasmabehandlung erfolgte in Doppelbestimmung, was die Aussaat in je 2 Zellkulturschälchen bedeutete. Pro Schale wurden 1,5 ml Medium vorgelegt und 1 ml Zellsuspension mit 200 000 Zellen zugegeben. Nach einer Inkubation für 24 h erfolgte die Plasmabehandlung. Dafür wurde vor der Behandlung das Medium abgekippt und nach der Behandlung wurden 2,5 ml neues Medium zugegeben. Die Behandlung mit KAP erfolgte für 2 min oder für 5 min. Daneben wurde noch die Kontrolle ohne Plasmabehandlung mitgeführt.

Nach 48 h Inkubation wurden alle Proben mit dem Bio Legend Annexin Kit mit Propidium Iodide für die FACS-Analyse vorbereitet. Dafür wurden die Zellen in allen Schälchen folgendermaßen abtrypsinisiert:

- Spülen mit 1 ml PBS
- Zugabe von 500 µl Trypsin (1:5 mit PBS verdünnt)
- Inkubation für 5 min
- Zugabe von 500 µl Medium zum Abstoppen der Enzymreaktion

Die Zellsuspensionen wurden aus den Schälchen in FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei Raumtemperatur und 1200 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgekippt. In jedes Röhrchen wurden 50 µl Annexin-V-Binding Buffer, 2,5 µl Annexin-V und 2,5 µl PI-Staining-Solution zugegeben. Alle Proben werden gevortext und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wurden noch 200 µl Binding Buffer in alle Röhrchen zugegeben, bevor jedes Röhrchen gevortext und am FACS-Gerät gemessen wurde.

3.9.3. Auswertung

In einem Layout wurden für jeden Versuch separat mit Hilfe von Dot Blots Zellpopulationen identifiziert. Die Zellpopulationen lassen sich dabei graphisch einer der folgenden vier Gruppen: Vitalität, frühe Apoptose, späte Apoptose und Nekrose zuordnen. In Abbildung 13 wird an einem exemplarischen Dot Blot gezeigt, wie die graphische Identifizierung von apoptotischen und nekrotischen gegenüber vitalen Zellen funktioniert. Auf der X-Achse werden zunehmend Annexin-V-bindende Zellen dargestellt. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, welches nur während der frühen Apoptose für eine Bindung zugänglich ist. Auf der Y-Achse werden zunehmend Propidiumiodid-bindende-Zellen aufgezeigt. Propidiumiodid bindet nur an der DNA nekrotischer Zellen sowie Zellen in der späten Apoptose. Die im Dot Blot dargestellten Zellpopulationen werden entsprechend ihrer Einordnung bezüglich der beschriebenen Achsen in 4 Quadranten eingeteilt. Dabei werden vitale Zellen, die weder Propidiumiodid noch Annexin-V binden im Ursprung des Koordinatensystems eingeordnet und als vierter Quadrant (Q4) bezeichnet. Die Nummerierung der Quadranten erfolgt gegen den Uhrzeigersinn, somit folgt im dritten Quadranten (Q3) die frühe Apoptose, im zweiten Quadranten (Q2) die späte Apoptose und im ersten

Quadranten (Q1) die Nekrose. Die Werte für die prozentualen Anteile der Zellgruppen aller Versuche wurden getrennt nach Zelllinie in einer Statistik zusammengefasst.

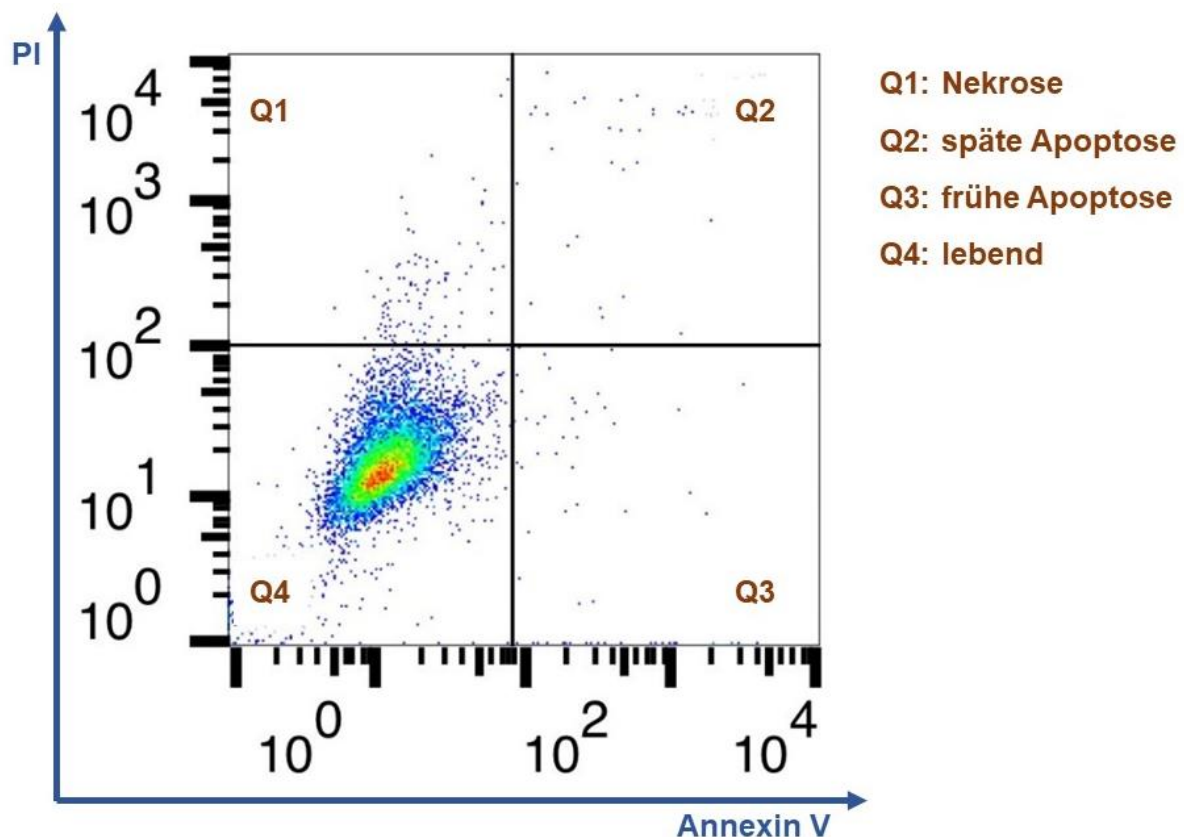


Abbildung 13: Beispiel-Layout FACS-Analyse

Exemplarischer Dot Plot aus der FACS-Analyse, der die Zellen der untersuchten Probe graphisch nach ihrer Menge an gebundenem PI und Annexin V an der entsprechenden Position in einem Koordinatensystem abbildet. Dabei beschreibt die Y-Achse zunehmend die Menge an gebundenem PI und die X-Achse zunehmend die Menge an gebundenem Annexin V. Weiters wird das Koordinatensystem in 4 Quadranten (Q1-Q4) eingeteilt, wobei in Q1 nekrotische Zellen, in Q2 Zellen in der späten Apoptose, in Q3 Zellen in der frühen Apoptose und in Q4 lebende Zellen abgebildet werden. Q4 befindet sich dabei im Koordinatenursprung, da normale lebende Zellen weder eine bedeutende Menge PI, noch Annexin V binden. Während PI die Nekrose markiert und Annexin V die frühe Apoptose, so steht das Binden von beiden für die späte Apoptose.

3.10. Molekularbiologische Analyse der RNA

Die Molekularbiologie beschäftigt sich mit Genstrukturen und Funktionen auf molekularer Ebene, also der Weitergabe genetischer Informationen von der DNA zur RNA und zu Proteinen (93). Durch Entschlüsselung dieser Prozesse entstanden molekularbiologische Labormethoden wie die reverse Transkription oder die Real-Time-PCR, deren Anwendung in diesem Projekt zur Quantifizierung von Genexpressionen erfolgte. Diese bezeichnen einen Vorgang, in dem Informationen der DNA in funktionelle Moleküle also RNA und Proteine umgesetzt werden (94). Dafür wurde RNA plasmabehandelte sowie als Kontrolle auch unbehandelte Zellen isoliert. Mittels reverser Transkription wurde die isolierte RNA in die stabilere cDNA

umgeschrieben. In der Real-Time-PCR wurden für den Nachweis der Genexpressionen verschiedener Moleküle entsprechende Primer eingesetzt. Es erfolgte die Analyse folgender tumorrelevanter Marker:

p16 und p21 als Seneszenz-Marker

Die zelluläre Seneszenz reguliert einerseits physiologische und homöostatische Prozesse vor allem während der Embryogenese und Wundheilung, andererseits kann sie aber auch ein pathologischer Prozess sein, der zum Altern, zu verschiedenen Krankheiten und Stoffwechselstörungen beiträgt. Es kommt dabei zum permanenten Stillstand des Zellzyklus, was als Schutzmechanismus gilt, um zu verhindern, dass sich gealterte oder abnormale Zellen weiter ausbreiten. Neben dem Austritt aus dem Zellzyklus erfolgt die Freisetzung von entzündlichen Zytokinen mit autokrinen, parakrinen und endokrinen Aktivitäten. Seneszente Zellen zeigen auch morphologische Veränderungen und haben eine erhöhte sekretorische Aktivität, die als Seneszenz-assoziiertes sekretorisches Phänotyp (SASP) bekannt ist. Die durch reaktive Sauerstoffspezies induzierte Seneszenz in Tumorzellen geht mit einem Anstieg von p16 und p21 einher. Seneszenz-induzierter Zellzyklus-Arrest kann verhindern, dass Mutationen an die nächste Generation von Zellen weitergegeben werden. Auf der anderen Seite kann der Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp, der zu einer entzündungsfördernden und wachstumsstimulierenden Mikroumgebung führt, die Tumorentwicklung jedoch auch fördern. Der Anstieg der Genexpression von p16 und p21 zeigt, dass die angewendeten KAP-Dosen eine Seneszenz in den verwendeten Plattenepithelkarzinomzellen induzieren (69, 95, 96).

Caspase-3/-7/-9 als Apoptose-Marker

Apoptose ist wie in Kapitel 1.5. beschrieben eine Form des programmierten Zelltods, der durch die Bcl-2-Familie und die Caspase-Proteinfamilie reguliert wird. Die Caspasen-Kaskade, die für die Ausführung des Zelltods nach Cytochrom-c-Freisetzung verantwortlich ist, ist gut beschrieben. Die unterschiedlichen Rollen der Caspasen -3, -7 und -9 während dieses Prozesses sind jedoch nicht vollständig definiert (97, 98). Brentnall et al. veröffentlichten Daten, welche darauf hinweisen, dass Caspase-9 für die mitochondrialen, morphologischen Veränderungen und die ROS-Produktion benötigt wird, indem der BH3 interacting-domain death agonist (Bid) in truncated Bid gespalten und aktiviert wird. Nach der Aktivierung durch Caspase-9

hemmt Caspase-3 die ROS-Produktion und wird für eine effiziente Ausführung der Apoptose benötigt, während Effektor Caspase-7 für die apoptotische Zellablösung benötigt wird. Der Nachweis bzw. die Induktion der Caspase-3, -7 oder -9 nach KAP-Behandlung spricht also für eine Apoptoseinduktion (97).

Gamma-H2AX als Marker für DNA-Schäden

DNA-schädigende Mittel, die bereits viele Jahrzehnte klinisch in der Tumorthherapie eingesetzt werden, greifen die DNA an und verursachen irreparable DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs). Schließlich verursachen diese DSBs einen Zellzyklusstillstand, Apoptose und einen schnell zunehmenden tumorspezifischen Zelltod. Innerhalb von 30 min nach DSB-Bildung wird die Core-Histon-Proteinvariante γ H2AX phosphoryliert und lokalisiert DNA-geschädigte Stellen. Das γ H2AX-Signal ist daher ein spezifischer Marker, der auf DNA-Schäden hinweist (43, 99).

β -Aktin als Housekeeper

β -Aktin wurde als Housekeeper eingesetzt. Es wird amplifiziert, um die Integrität der cDNA sicherzustellen und die Expression zu normalisieren. Die PCR-Analyse kann schwierig zu interpretieren sein, wenn parallel keine Referenzzielsequenz amplifiziert wird. Diese Kontrollreaktion ist notwendig, um zu beurteilen, ob in der untersuchten Probe eine ausreichende Menge an amplifizierbarem Material vorhanden ist. Als Referenzsequenzen für die RT-PCR werden sogenannte Housekeeping-Gene verwendet, da sie konstitutionell von allen Zelltypen exprimiert werden. β -Aktin ist ein attraktiver Kandidat für eine Referenzkoamplifikation, da es nur geringe intraindividuelle kinetische Veränderungen aufweist (100).

3.10.1. Erwartung

Je höher die Plasmadosis, umso mehr Veränderungen auf mRNA-Ebene werden erwartet. Denn bereits Gelbrich et al. konnten in molekularbiologischen Analysen Effekte von KAP auf das Prostatakarzinom nachweisen (101).

3.10.2. RNA-Isolierung

48 Stunden vor der Isolierung wurden in 35 mm Zellkulturschälchen je 200 000 Zellen ausgesät. Nach 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ wurde jedes Schälchen für die dafür vorgesehene Zeit mit KAP behandelt. Zur Isolation mit dem „NucleoSpin RNA Plus Kit“ mussten erst alle Schalen einzeln abtrypsiniert werden. Dafür wurde in

jeder Schale erst das Medium abgesaugt, mit 1 ml DPBS gespült und 500 µl Trypsin (1:5 verdünnt mit PBS) zugegeben. Die Schalen wurden für 5 min inkubiert bevor in jede Schale 500 µl Medium zum Abstoppen hinzugefügt wurde und die Zellsuspensionen im Anschluss jeweils in ein dafür vorgesehenes Eppi pipettiert wurden. Diese wurden dann für 5 min bei 3000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand an Medium wurde abgekippt und das entstandene Zellpellet wurde entsprechend des Protokolls vom „Nukleo Spin RNA Plus Kit“ mit 350 µl LBP homogenisiert und lysiert. Um die gDNA zu entfernen, wurde die Probe auf einen Filter in einem Collectiontube pipettiert und bei 11 000 g für 30 s zentrifugiert. Die eingesetzten Filter wurden entsorgt und 100 µl Binding Solution (BS) zugegeben um RNA-Bindebedingungen anzupassen. Die Proben wurden wieder in Tubes mit Filtern pipettiert und bei 11 000 g für 30 s zentrifugiert. Dann erfolgte das Waschen, dafür wurden 200 µl Waschpuffer-1 (engl. wash buffer 1 = WB1) zugegeben, dann für 30 s mit 11 000 g zentrifugiert. Der Filter wurde in ein neues Collection Tube gesteckt, bevor zuerst 600 µl Waschpuffer-2 (engl. wash buffer 2 = WB2) zugegeben wurden und bei 11 000 g für 30 s zentrifugiert wurde. Dann wurde der Durchfluss ausgeleert und es wurden nochmal 250 µl WB2 zugegeben, bevor wieder mit 11 000 g für 2 min zentrifugiert wurde. Zum Schluss wurde der Filter in einen Endbehälter gesteckt und die RNA eluiert, indem zweimal 30 µl DEPC-Wasser zugegeben wurden und für 1 min mit 11 000 g zentrifugiert wurde. Erfolgt die Umwandlung in die stabilere cDNA mittels Reverser Transkription nicht direkt im Anschluss können die Proben bei -20°C gelagert werden.

3.10.3. Reverse Transkription

Wie die Bedeutung des Wortes „Transkription“ bereits verrät, handelt es sich dabei um einen Umschreibungsprozess von der DNA in eine mRNA mit deren Hilfe folglich in der Translation Proteine synthetisiert werden können. Bei der reversen Transkription erfolgt dieser Prozess genau umgekehrt, eine zuvor isolierte RNA wird also in eine komplementäre, stabilere DNA (cDNA) übersetzt. Als Katalysator für die Reaktion wird ein Enzym zugegeben (102).

Zuerst wird ein Mastermix aus folgenden zuvor aufgetauten Komponenten vorbereitet:

Substanz	Menge für einen Ansatz
Random Primer	1 µl
5*Puffer	4 µl
dNTP's (Nukleotide)	1 µl
DTT (Reduktionsmittel)	1 µl
DEPC-Wasser	2 µl

Tabelle 6: Reverse Transkription Mastermix Zusammensetzung

Pro Well wurden 9 µl Mastermix vorgelegt und 10 µl RNA zugegeben. Die so entstandenen Proben wurden zentrifugiert und durchlaufen dann den in drei Etappen gegliederten Prozess der reversen Transkription. Zu Beginn findet das „Primer annealing“ statt, wofür die Proben für 10 min auf 70°C erhitzt und im Anschluss auf 4°C abgekühlt wurden. „Annealing“ beschreibt die Vereinigung zweier komplementärer Nucleinsäureketten zu den entsprechenden Doppelsträngen durch gemeinsames Erhitzen und langsames Abkühlen der Lösungen. Dann wurde in jedes Well 1 µl Enzym (Superscript von Gibco) zugegeben und zentrifugiert. Die Proben wurden erneut für 45 min auf 42°C zur DNA Polymerisation und im Anschluss für 10 min auf 70°C zur Enzymdeaktivierung erhitzt. Danach erfolgte die Lagerung der cDNA bei 4°C im Kühlschrank (103).

3.10.4. Quantitative Real-Time PCR

Die dafür benötigte cDNA entstand, wird wie im Abschnitt 3.10.3. beschrieben, durch reverse Transkription aus der isolierten RNA deren Gewinnung im Abschnitt 3.10.2. beschrieben wurde. PCR steht für Polymerase-Kettenreaktion und beschreibt eine Labormethode, die es ermöglicht, *in vitro* Gensequenzen zu amplifizieren (104). Die quantitative Real-Time-PCR verwendet Fluoreszenzsignale von interkalierenden Farbstoffen, um die Amplifikation in Echtzeit während der verschiedenen thermischen Zyklen wie Denaturierungs-, „Annealing“- und Verlängerungsphasen zu beobachten. SYBR-Green ist ein doppelsträngiger DNA-bindender Farbstoff, der sich während der Expansionsphase in DNA-Sequenzen einlagert und für einen Anstieg des Fluoreszenzsignals sorgt. Um fälschlicherweise die Fluoreszenz von Primer-Dimeren nachzuweisen, wird die Reaktionsspezifität durch eine Schmelzkurvenanalyse

überprüft. Final wird bei der relativen Quantifizierung das Verhältnis zwischen der Menge der Ziel-DNA und einem Referenzamplikon ermittelt (105). Für die Expressionsanalyse wurden entsprechende Primer eingesetzt, die zuvor aufgetaut und 1:5 mit Wasser auf 20 µM verdünnt werden mussten. Es erfolgte die Analyse folgender tumorrelevanter Marker und einem Housekeeper zur Normalisierung:

- p16, p21 (Seneszenz-Marker)
- Caspase-3/-7/-9 (Apoptose-Marker)
- γH2AX (Marker für DNA-Schäden)

Für die qRT-PCR mit dem LightCycler von Roche wurden zuerst 18,5 µl Mastermix und dazu 1,5 µl cDNA in das vorgesehene Well einer 96-Well Platte pipettiert. In 2 untereinander liegende Wells wurde jeweils die gleiche Probe pipettiert, so liegt immer jeweils ein Duplikat vor.

Substanz	Menge für einen Ansatz
SYBR Green	10 µl
Primer „forward“	0,5 µl
Primer „reverse“	0,5 µl
Wasser	7,5 µl

Tabelle 7: qRT-PCR Mastermix Zusammensetzung

Um die Proben vor dem Verdampfen zu schützen, wurde die 96-Well-Platte mit einer Klebefolie abgedichtet. Bevor die Platte in den LightCycler kam, wurde sie nochmal für 1 min bei 1200 rpm zentrifugiert.

Das Annealing erfolgt bei allen verwendeten Primern bei 60°C. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green interkaliert in doppelsträngige DNA, damit nimmt die Fluoreszenz mit der amplifizierten cDNA-Menge zu.

Die Schmelztemperatur von Forward- und Reverse-Primern sollte aufeinander abgestimmt sein (106).

4. Ergebnisse

4.1. Morphologie der Zellen und Wachstumsmuster

Alle verwendeten Zelllinien weisen ein adhärentes Wachstumsmuster auf. Allgemein haften adhärente Zellen über Membranrezeptoren und zelladhäsive Proteine an Kulturoberflächen. Im Normalfall ist die Zellmorphologie derart gestaltet, dass die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Zellen optimiert werden können, sie haben also ein verzweigtes ausgebreitetes Erscheinungsbild (107). Diesbezüglich hebt sich die Zelllinie A-431 (PEK der Haut) durch den Zusammenschluss der einzelnen Zellen in Zellclustern von den SCC-9 und SCC-15 Zellen (PEK der Schleimhaut), die sich in einem gleichmäßigen Zellrasen ansiedeln, ab. Das clusterartige Wachstum der A-431 Zelllinie scheint eine spenderabhängige Eigenart zu sein, da in der Arbeitsgruppe der Dermatologie am Uniklinikum Regensburg auch noch weitere kutane SCC-Zelllinien untersucht werden, die anders als die Zelllinie A-431 in einem gleichmäßigen Zellrasen wachsen. Die Ansammlung von Zellinseln, wie es bei der SCC-Zelllinie A-431 beobachtet wird (Abbildung 14), könnte durch vermehrte Expression von Zelladhäsionsmolekülen oder bestimmten Zell-Zellkontakten bedingt sein, wurde aber im Rahmen dieser Studie nicht näher untersucht. Das Clusterwachstum kann allerdings zu Schwierigkeiten in der Auswertung und Vergleichbarkeit bestimmter funktioneller Assays führen. Beispielsweise könnten im Rahmen der Boydenkammer Migrations- und Invasionsanalysen bei der Auswertung der zufällig ausgewählten Gesichtsfelder nur sehr wenige Zellcluster vorhanden sein, während in der Folgeaufnahme die Abbildung eines großen Zellclusters inmitten des Gesichtsfeldes fälschlicherweise eine hohe Zellzahl annehmen lassen würde. Aus diesem Grund wird gerade bei der Analyse der horizontalen Migration am Spalt und bei der Auswertung der Boydenkammer Versuche besonders auf die Reproduzierbarkeit der Gesichtsfelder geachtet. Richtet man ein Augenmerk auf die Unterschiede zwischen den Aufnahmen in Abbildung 14, welche durch die Verabreichung unterschiedlicher Dosen von KAP erzielt wurden, fällt auf, dass sich die Morphologie der Zellen mit zunehmender Behandlungsdauer verändert. Nach 5 Minuten Behandlungszeit erscheinen die Zellen klein sowie rundlich und schmiegen sich nicht mehr so eng

aneinander.

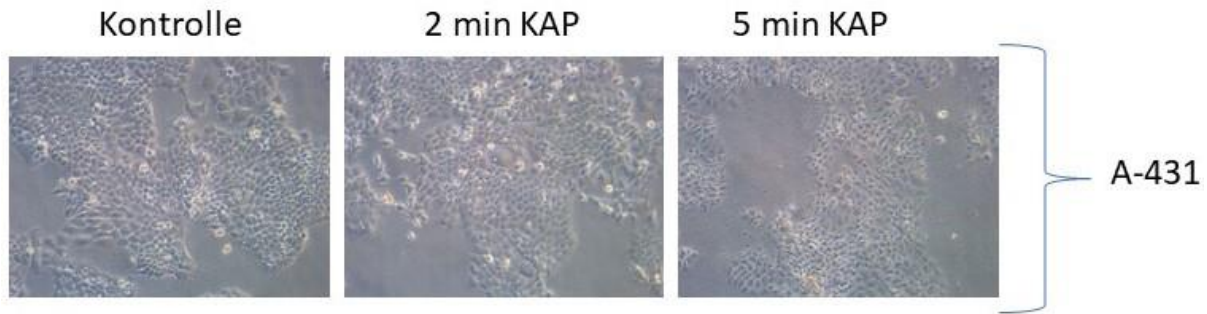


Abbildung 14: Zellmorphologie der A-431 nach KAP-Behandlung

Gegenüberstellung durchlichtmikroskopischer Aufnahmen von 3 Proben der Zelllinie A-431 die entweder für 2 min, für 5 min oder in der Kontrolle für 0 min mit KAP behandelt wurden. Dabei fällt deutlich auf, dass sich die Morphologie und das Wachstumsmuster der Zellen mit zunehmender Behandlungsdauer verändern, sie werden zunehmend kleiner und die zellfreien Flächen zwischen den Zellansammlungen werden größer.

Bei den Zelllinien SCC-9 und SCC-15 lässt sich durch das sehr gleichmäßige Wachstumsmuster die Auswertung der einzelnen Gesichtsfelder recht einfach reproduzieren. Die einzelnen Zellen bilden dabei wie in Abbildung 15 exemplarisch an der Zelllinie SCC-9 in der Kontrolle dargestellt, einen gleichmäßigen Zellrasen und sind gut miteinander vernetzt. Beim Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen von den für 2 Minuten mit Plasma behandelten Proben und der Kontrolle kann kein Unterschied beobachtet werden. Erst nach 5-minütiger Plasmabehandlung zeigen sich deutlich morphologische Veränderungen. Die Zellen erscheinen klein und punktförmig, verlieren somit ihr vernetztes Erscheinungsbild.

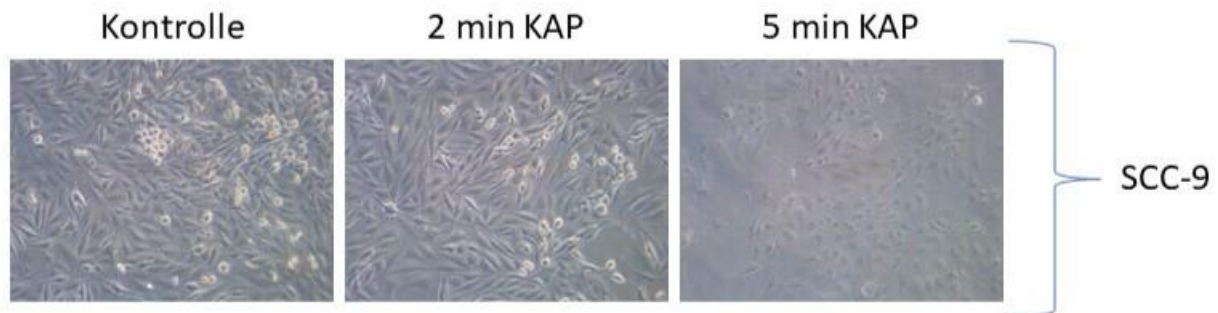


Abbildung 15: Zellmorphologie der SCC-9 nach KAP-Behandlung

Gegenüberstellung durchlichtmikroskopischer Aufnahmen von 3 Proben der Zelllinie SCC-9 die entweder für 2 min, für 5 min oder in der Kontrolle für 0 min mit KAP behandelt wurden. Dabei fällt deutlich auf, dass sich die Morphologie und das Wachstumsmuster der Zellen mit zunehmender Behandlungsdauer verändern, sie werden zunehmend kleiner und die zellfreien Flächen zwischen den Zellen werden größer.

Recht ähnliche morphologische Merkmale liegen auch bei der Melanomzelllinie Mel Im vor. Die Aufnahmereihe in Abbildung 16 zeigt exemplarisch die morphologischen Veränderungen der Zellen nach einer KAP-Behandlungsdauer von 2 bzw. 5 Minuten

im Vergleich zur Kontrolle. Während die Kontrollaufnahmen einen gleichmäßigen Zellrasen aus gut vernetzten Mel Im Zellen mit typischem äußerem Erscheinungsbild zeigen, sind nach Behandlung mit KAP deutliche Ablösungen zu sehen. Nach 2 Minuten KAP-Behandlung nimmt die Zelldichte stark ab und einzelne Zellen verändern ihr Erscheinungsbild hin zu sehr kleinen kugeligen Zellen. Nach 5 Minuten KAP-Behandlung sind nur mehr einzelne, in ihrem Erscheinungsbild stark veränderte Zellen zu erkennen. Die Zellen erscheinen vereinzelt als kleine Punkte. Die Abstände zwischen den einzelnen Zellen sind dabei so groß, dass keine Vernetzung der einzelnen Zellen mehr besteht.

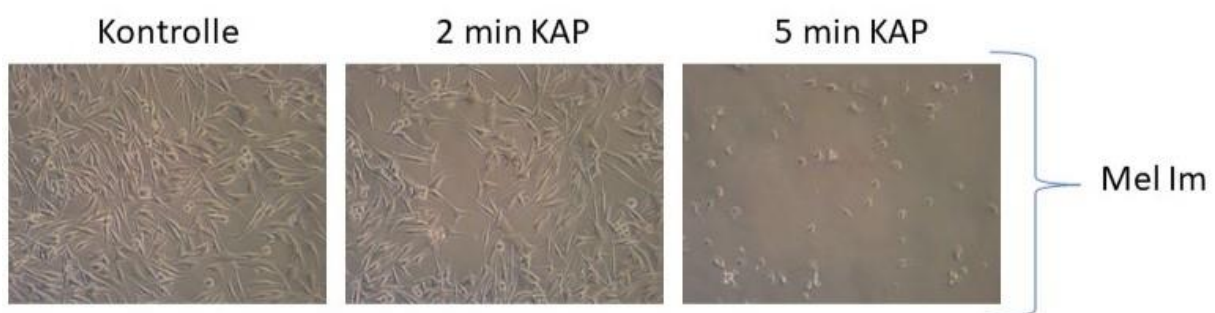


Abbildung 16: Zellmorphologie der Mel Im nach KAP-Behandlung

Gegenüberstellung durchlichtmikroskopischer Aufnahmen von 3 Proben der Zelllinie Mel Im, die entweder für 2 min, für 5 min oder in der Kontrolle für 0 min mit KAP behandelt wurden. Dabei fällt deutlich auf, dass sich die Morphologie und das Wachstumsmuster der Zellen mit zunehmender Behandlungsdauer verändern, sie werden zunehmend kleiner und die zellfreien Flächen zwischen den Zellen nehmen besonders nach 5 min KAP überhand.

Mittels Durchlichtmikroskopie sind also unabhängig von der Zelllinie deutliche Auswirkungen auf die Zellmorphologie abhängig von der verabreichten Dosis zu beobachten. Ganz charakteristisch für eine Behandlung mit KAP ist dabei das vorübergehende Abkugeln der Zellen.

4.2. Horizontale Migration am Spalt

4.2.1. Analyse mittels Durchlichtmikroskop

Beim Betrachten der am Durchlichtmikroskop angefertigten Aufnahmen im zeitlichen Verlauf, welche in Abbildung 17 für die Zelllinie SCC-15, in Abbildung 18 für die Zelllinie A-431 und in Abbildung 19 für die Zelllinie SCC-9 dargestellt werden, ist ganz klar eine Reduktion der dunklen, anfangs auch sehr glatt begrenzten Spaltfläche, welche von einem gleichmäßigen, in diesem Fall in der Farbe Weiß erscheinenden Zellrasen begrenzt wird, zu erkennen. Vergleicht man unterschiedliche Plasma-

Behandlungszeiten, fällt auf, dass sich die Spalten mit zunehmender Behandlungszeit langsamer und unvollständiger verschließen. Der Vorgang des Spaltschlusses verläuft nicht konstant im zeitlichen Verlauf. Beim Beobachten des Spaltschlusses in Bezug auf die Aufnahmezeitpunkte, hebt sich ab, dass in den ersten 10 Stunden nach KAP-Behandlung kollektiv kaum eine Reduktion der Spaltfläche wahrzunehmen ist, während nach weiteren 12 Stunden, also 22 Stunden nach KAP-Behandlung, plötzlich ein deutlicher Proliferationsschub zu beobachten ist. Legt man ein Augenmerk auf die unmittelbaren Veränderungen nach KAP-Behandlung in Bezug auf die Kontrolle, dann kann unabhängig von der Zelllinie erst ab Behandlungszeiten von 300 s eine deutlich sichtbare Veränderung in der Anordnung und Anzahl der Zellen wahrgenommen werden. Diese Veränderungen werden auch in Abbildung 20 nochmal exemplarisch an der Zelllinie SCC-9 dargestellt. Man kann klar erkennen, wie direkt nach Behandlung mit KAP aus einem dichten gleichmäßigen Zellrasen eine eher löchrige Ansammlung von kleinen dichter gedrängten Zellgruppen wird. Die einzelnen Zellen erhalten ein kugeliges Erscheinungsbild und nehmen in ihrer Größe ab.

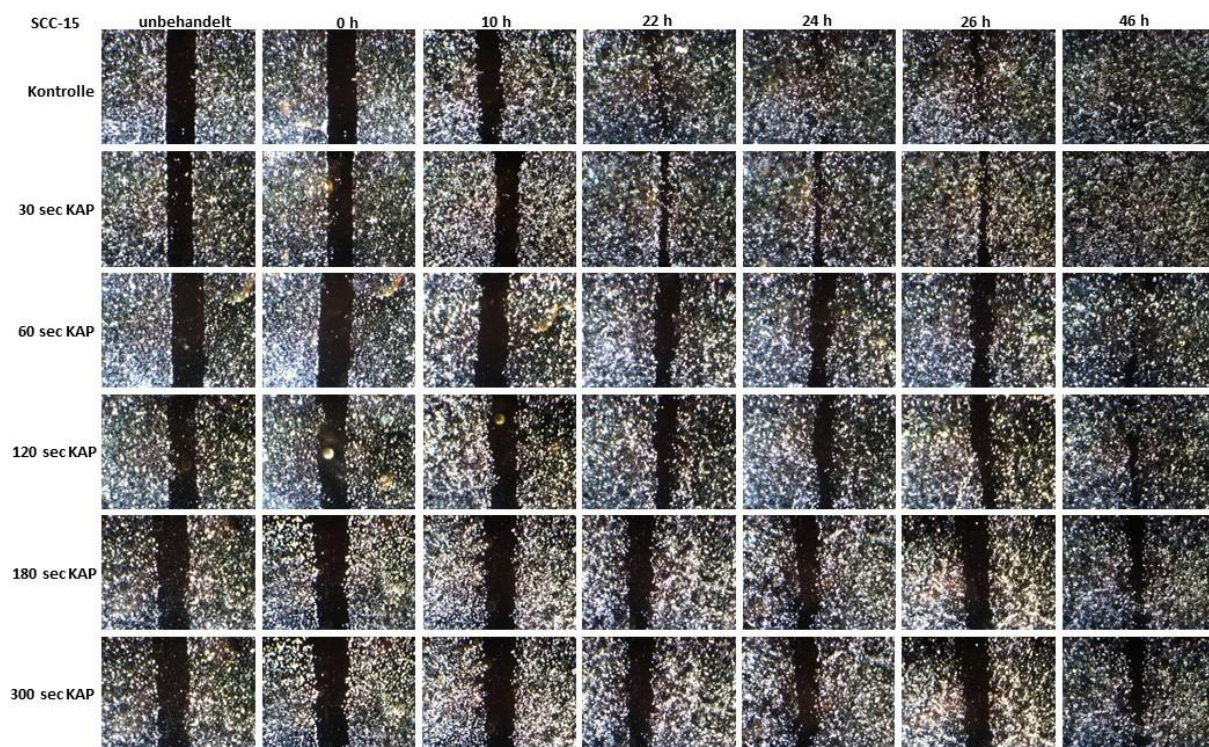


Abbildung 17: Durchlichtmikroskopieaufnahmen Migration am Spalt der SCC-15

Gegenüberstellung von Abbildungsreihen im zeitlichen Verlauf mit zunehmender KAP-Behandlungsdauer. Betrachtet man die Flächen der dunkel erscheinenden vor KAP-Behandlung mit hellen Zellen sehr glatt berandeten Spalten im zeitlichen Verlauf zu den Aufnahmezeitpunkten 0 h, 10 h, 22 h, 24 h, 26 h und 46 h fällt auf, dass es sich beim Spaltschluss nicht um einen linear konstant verlaufenden Prozess handelt. Aufgrund eines Proliferationsschubes nach ca. 20 h wurden auch die Aufnahmezeiten in diesem Bereich engmaschiger gewählt. Vergleicht man die Spaltflächen mit dem Fokus auf die Dauer der erfolgten KAP-Behandlung, zeichnet sich ab, dass sich die Spalten mit zunehmender Behandlungsdauer langsamer und unvollständiger schließen.

Bei der Zelllinie A-431 hat die Eigenschaft der Aggregation der einzelnen Zellcluster die exakte Flächenbestimmung der Spalten nach hell-dunkel Kontrasten deutlich erschwert, da wie in Abbildung 18 zu sehen, keine komplett glatt berandeten Spalten generiert werden konnten. Der Zellrasen erhielt ein sehr zerklüftetes Erscheinungsbild, was dazu führte, dass bereits zum unbehandelten Zeitpunkt eine größere Spaltfläche errechnet wurde, als durch die Culture-Inserts generiert werden sollte. Das liegt daran, dass Klüfte, die an die Spalte angrenzen mit in die Spaltfläche einberechnet wurden. Diese Eigenschaft war mitunter auch entscheidend dafür, dass für den besseren Vergleich jeweils die relative Spaltfläche in Bezug auf die unbehandelte Spalte zum Zeitpunkt Null ermittelt wurde, um die Veränderungen der Spaltflächen im Laufe der Zeit zu untersuchen.

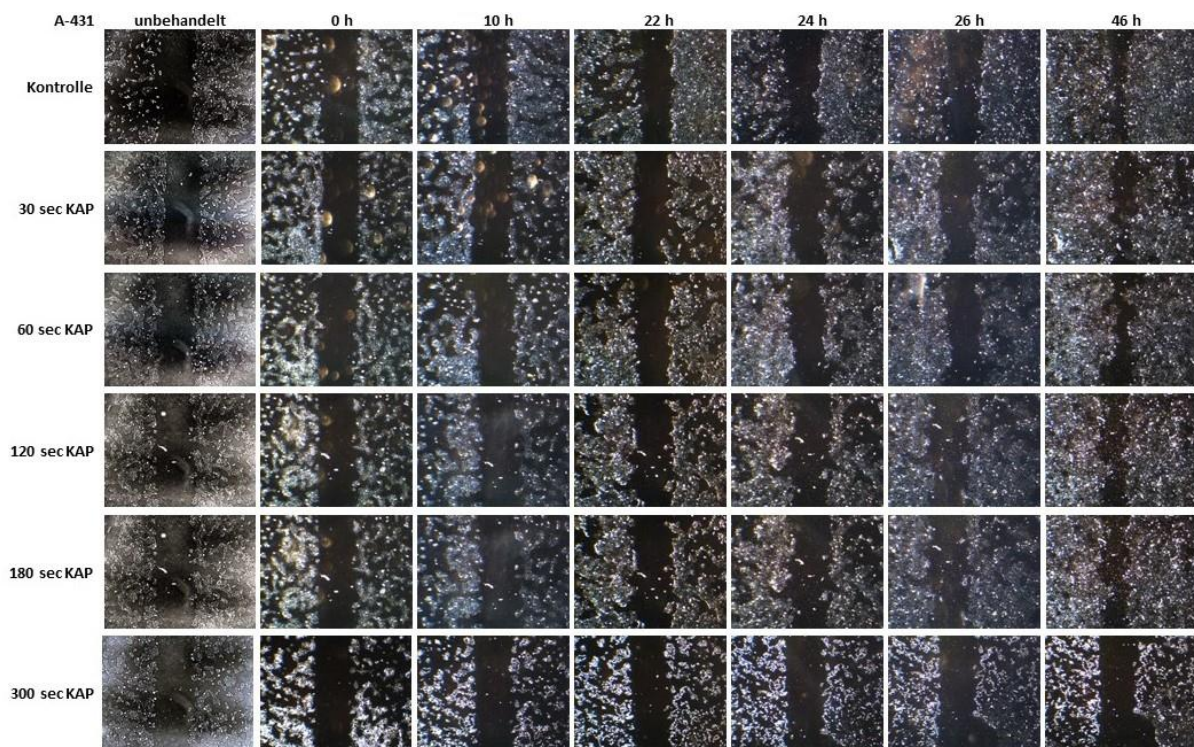


Abbildung 18: Durchlichtmikroskopieaufnahmen Migration am Spalt der A-431

Gegenüberstellung von Abbildungsreihen im zeitlichen Verlauf mit zunehmender KAP-Behandlungsdauer. Betrachtet man die Flächen der dunkel erscheinenden mit hellen Zellen berandeten Spalten im zeitlichen Verlauf zu den Aufnahmezeitpunkten 0 h, 10 h, 22 h, 24 h, 26 h und 46 h fällt auf, dass es sich beim Spaltschluss nicht um einen linear konstant verlaufenden Prozess handelt. Aufgrund eines Proliferationsschubes nach ca. 20 h wurden auch die Aufnahmezeiten in diesem Bereich engmaschiger gewählt. Vergleicht man die Spaltflächen mit dem Fokus auf die Dauer der erfolgten KAP-Behandlung, zeichnet sich ab, dass sich die Spalten mit zunehmender Behandlungsdauer langsamer und unvollständiger schließen. Die Zelllinie A-431 zeichnet sich besonders durch ihr Wachstumsmuster in Zellgruppen ab, was zu zerklüfteten eher undeutlicheren Spaltbegrenzungen führt.

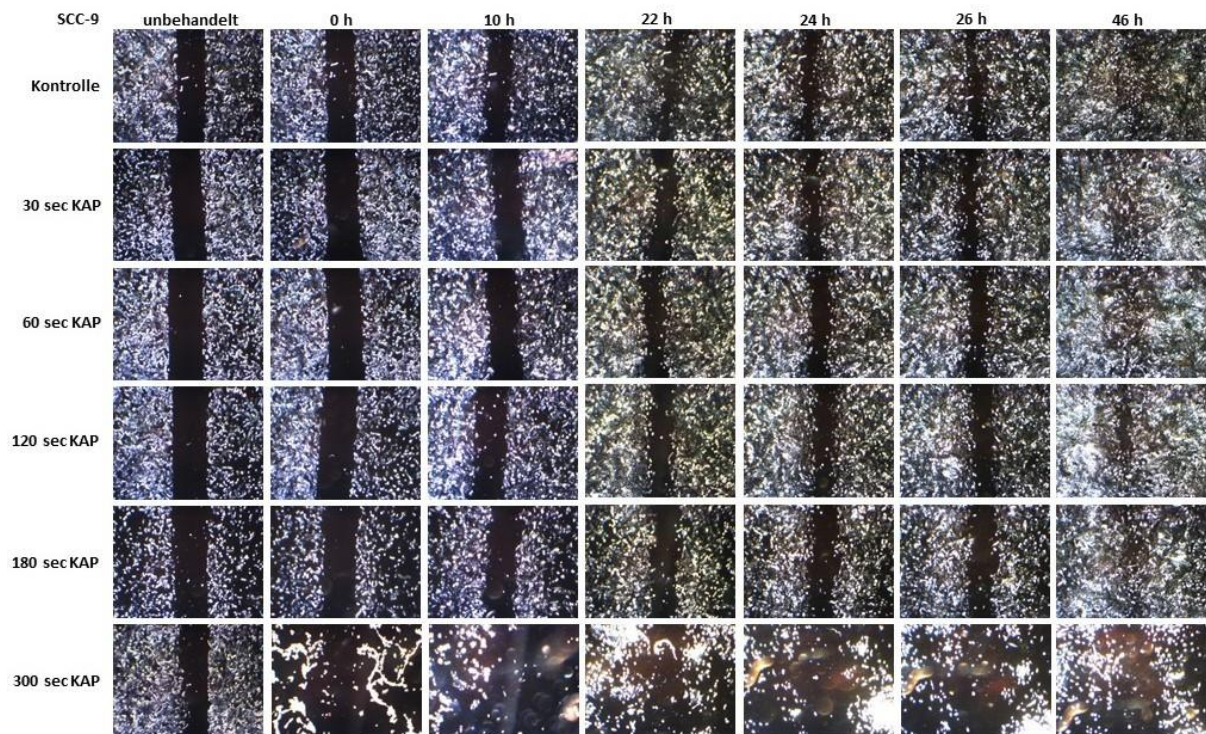


Abbildung 19: Durchlichtmikroskopieaufnahmen Migration am Spalt der SCC-9

Gegenüberstellung von Abbildungsreihen im zeitlichen Verlauf mit zunehmender KAP-Behandlungsdauer. Betrachtet man die Flächen der dunkel erscheinenden vor KAP-Behandlung mit hellen Zellen sehr glatt berandeten Spalten im zeitlichen Verlauf zu den Aufnahmezeitpunkten 0 h, 10 h, 22 h, 24 h, 26 h und 46 h fällt auf, dass es sich beim Spaltschluss nicht um einen linear konstant verlaufenden Prozess handelt. Aufgrund eines Proliferationsschubes nach ca. 20 h wurden auch die Aufnahmezeiten in diesem Bereich engmaschiger gewählt. Vergleicht man die Spaltflächen mit dem Fokus auf die Dauer der erfolgten KAP-Behandlung, zeichnet sich ab, dass sich die Spalten mit zunehmender Behandlungsdauer langsamer und unvollständiger schließen. Die Zelllinie SCC-9 zeichnet sich dadurch ab, dass nach KAP-Behandlung für 300 s kaum noch eine Spalte als solche identifiziert werden kann, da die Zellen größtenteils abgeschwommen sind.

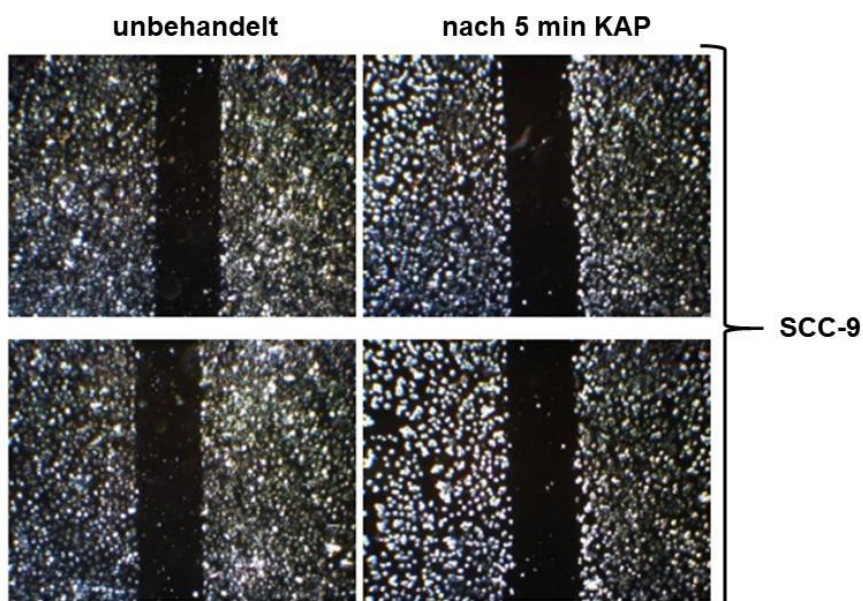


Abbildung 20: Veränderung der Zellmorphologie direkt nach KAP-Behandlung

Gegenüberstellung durchlichtmikroskopischer Aufnahmen nach KAP-Behandlung für 5 min gegenüber der unbehandelten Kontrolle am Beispiel der Zelllinie SCC-9. Es fällt auf, dass sich das morphologische Erscheinungsbild durch die KAP-Behandlung sofort ändert. Die Zellen werden kleiner und rundlicher, dadurch entsteht mehr dunkel erscheinender Freiraum zwischen den Zellen und die Begrenzung der Spaltfläche erscheint weniger glatt und deutlich.

4.2.2. Auswertung der horizontalen Migration am Spalt

Zuerst wurden mit Hilfe der Image Pro Software die absoluten Flächenmaße aller Spalten eruiert. Dann wurde in jeder Zeitreihe die Fläche der Spalte in der ersten Aufnahme in unbehandeltem Zustand auf 100 % normiert und für die weiteren Flächenmaße in den entsprechenden Zeitreihen der relative Anteil davon berechnet. Die Ergebnisse wurden für jede Zelllinie separat und dabei wiederum unterteilt nach Beobachtungszeitpunkt also in einer Zeitreihe und nach Behandlungsdauer mit KAP als Mittelwert ausgedrückt. Die Mittelwerte für die unterschiedlichen Behandlungsdosen wurden dann in einer Zeitreihe graphisch aufgetragen.

4.2.3. Effekte der horizontalen Migration am Spalt

Interessanter Weise lässt sich beobachten (Abb. 21), dass unabhängig von der verwendeten Zelllinie die Spaltfläche direkt nach erfolgter Plasmabehandlung in den überwiegenden Fällen erst einmal zunimmt. Bei der primären Zunahme der Spaltfläche lässt sich auch eine klare Abhängigkeit von der Behandlungszeit beobachten. Bei einer Behandlungszeit von 300 Sekunden mit Plasma ist die ursprünglich mit Culture Inserts generierte und dadurch genormte Spaltfläche bei allen verwendeten Zelllinien direkt nach erfolgter KAP-Behandlung mit Abstand am stärksten erweitert. Mit Ausnahme der Zelllinie SCC-9, welche nur bis 22 Stunden nach erfolgter Behandlung bei einer Behandlungsdauer von 300 Sekunden eine deutlich vergrößerte Spaltfläche gegenüber allen anderen angewendeten Behandlungsdosen aufweist, hebt sich die Plasmabehandlung für 300 Sekunden bei allen Zelllinien mit den größten Spaltflächen zu allen Beobachtungszeitpunkten hervor.

Wie bereits in Kapitel 4.1. beschrieben, unterscheidet sich die Zelllinie A-431 in ihrem morphologischen Erscheinungsbild von den anderen verwendeten Zelllinien. Der unvermeidbare Einschluss von Zellzwischenräumen bei der Berechnung der Spaltflächen kann mitunter dafür verantwortlich gemacht werden, dass unabhängig von der Behandlungsdosis mit KAP auch nach 46 h kein kompletter Spaltschluss erzielt werden kann.

Die Zelllinie SCC-9 hebt sich dadurch von den anderen ab, dass sie am Ende des Beobachtungszeitraumes unabhängig von der Behandlungszeit mit KAP im Mittel einen kompletten Spaltschluss aufweist.

Beim Vergleich der Kontrolle mit unterschiedlich langer KAP-Behandlung fällt auf, dass sowohl bei der Zelllinie A-431 als auch bei der Zelllinie SCC-9 die Kontrolle zu allen Behandlungszeiten nicht wie erwartet jeweils die geringste Spaltfläche und damit die stärkste Migration aufweist. Geringe Behandlungsdosen, also KAP-Behandlungen für maximal 120 s haben in den Versuchen gegenüber der Kontrolle oft zu einer verstärkten Migration, also einer Verringerung der Spaltfläche geführt. Somit kann geringen KAP-Dosen auch eine Verstärkung der Zellproliferation nachgesagt werden.

Bei der Zelllinie SCC-15 weist die Kontrolle ausgenommen vom Zeitpunkt 0 Stunden nach KAP immer die geringste Spaltfläche und damit die höchste Migration auf.

Bei allen verwendeten Zelllinien ist die klare Tendenz ersichtlich, dass eine Behandlung mit KAP zu einem unvollständigeren Spaltschluss, also einem verringerten Migrationsdrang der einzelnen Zellen am Spalt führt. Dabei ist die Behandlungsdauer meist direkt proportional zur Verringerung des Migrationsdrangs.

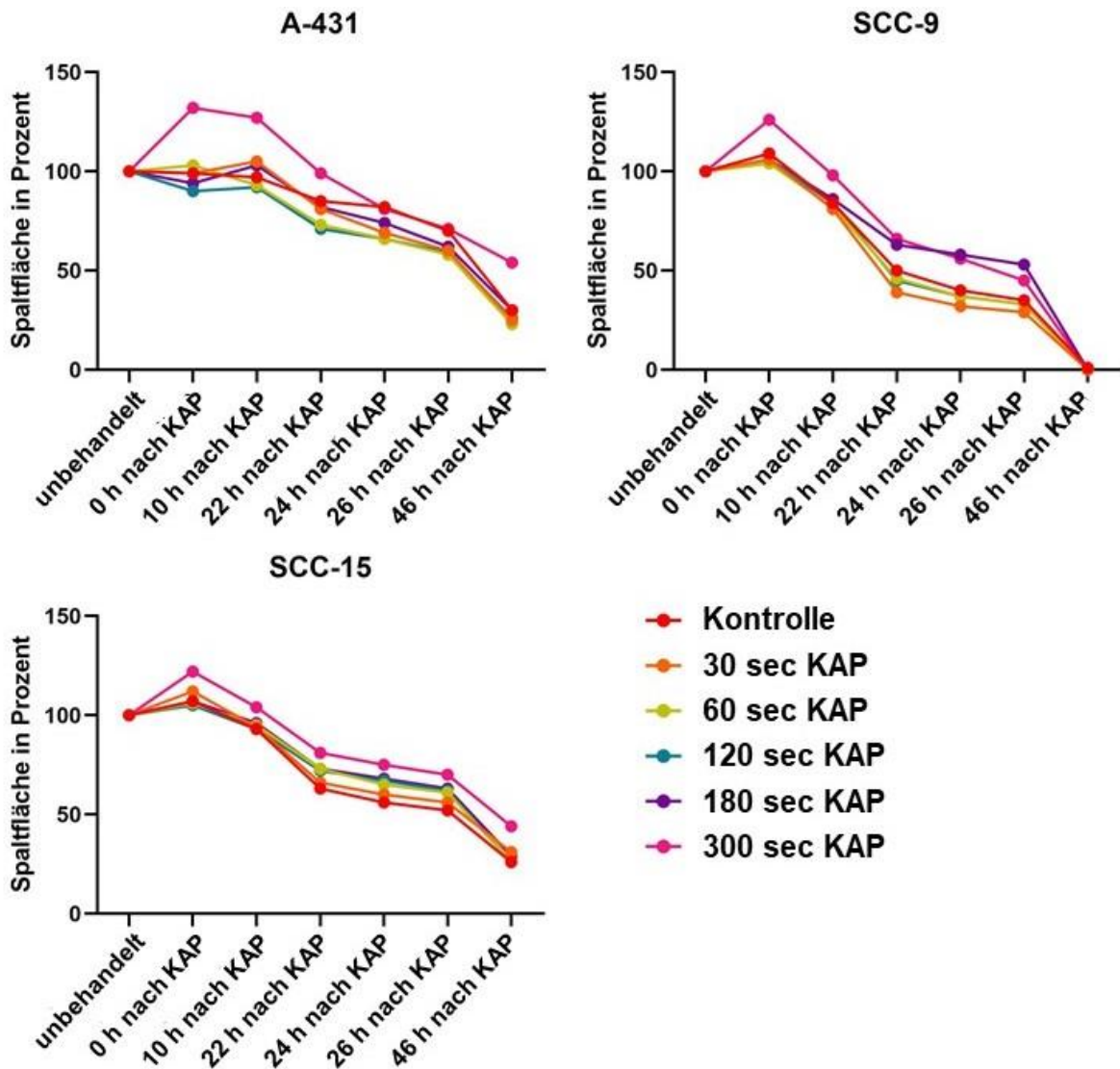


Abbildung 21: Graphische Darstellung der horizontalen Migration

Die Grafik stellt in 3 Koordinatensystemen für die untersuchten Zelllinien A-431, SCC-9 und SCC-15 im zeitlichen Verlauf also zu den festgelegten Beobachtungszeitpunkten vor KAP-Behandlung in unbehandeltem Zustand, 0 h, 10 h, 22 h, 24 h, 26 h und 46 h nach KAP die Spaltfläche in Prozent in Bezug auf die ursprünglich erzeugte Spaltfläche dar. In jedem Koordinatensystem wird für die jeweilige Zelllinie neben der Entwicklung einer unbehandelten Kontrolle auch die Entwicklung der Proben, die für 30 s, für 60 s, für 120 s, für 180 s und für 300 s behandelt wurden aufgezeichnet. Dabei lässt sich bei allen Zelllinien beobachten, dass die Spaltfläche direkt nach erfolgter Plasmabehandlung unabhängig von der Behandlungszeit in den überwiegenden Fällen erst einmal zunimmt und dann ab 10 h nach KAP eine abnehmende Tendenz aufweist. Außerdem zeigt die Gegenüberstellung, dass KAP mit zunehmender Behandlungsdauer zu einem langsameren und unvollständigeren Spaltschluss also einem verringerten Migrationsdrang führt.

4.3. Migrations- und Invasionsanalyse mittels Boyden-Kammer Assay

4.3.1. Mikroskopische Dokumentation der Membranen

Innerhalb jeder Zelllinie sowohl für die Invasions- als auch für die Migrationsversuche wird je eine repräsentative mikroskopische Aufnahme aus der Kontrollprobe einer repräsentativen mikroskopischen Aufnahme nach 2-minütiger KAP-Behandlung gegenübergestellt. Die Abbildungen zeigen exemplarisch die fixierten und gefärbten Membranen der Boyden-Kammer Migrations- (Abbildung 22) und Invasionsversuche (Abbildung 23).

Bei der Analyse der Aufnahmen von den fixierten und gefärbten Filtern der Boyden-Kammer Migrationsversuche in Abbildung 22 zeichnet sich ab, dass bei Gegenüberstellung der für 2 min mit Plasma behandelten Proben mit der unbehandelten Kontrolle für alle untersuchten Zelllinien eine Abnahme des Migrationsdrangs nachgewiesen werden kann. Ganz allgemein fällt vor allem auch im Rahmen der Migrationsversuche mittels Boyden-Kammer Assay wieder auf, dass sich die Zelllinie A-431 in ihrem Wachstumsmuster von den anderen verwendeten Zelllinien unterscheidet. Die Zellen wachsen dabei nicht nur in Gruppen, was zum Erscheinungsbild der Zellinseln mit zellfreien Zwischenräumen führt, sondern auch der Vorgang der Migration erfolgt jeweils in Gruppen, sodass auf der fixierten Membran keine einzelnen migrierten Zellen, sondern jeweils kleine Zellcluster ersichtlich sind. An der Morphologie der Tumorzellen ist auch für die anderen verwendeten Zelllinien nach Plasmabehandlung also kein Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle zu erkennen.

Migration

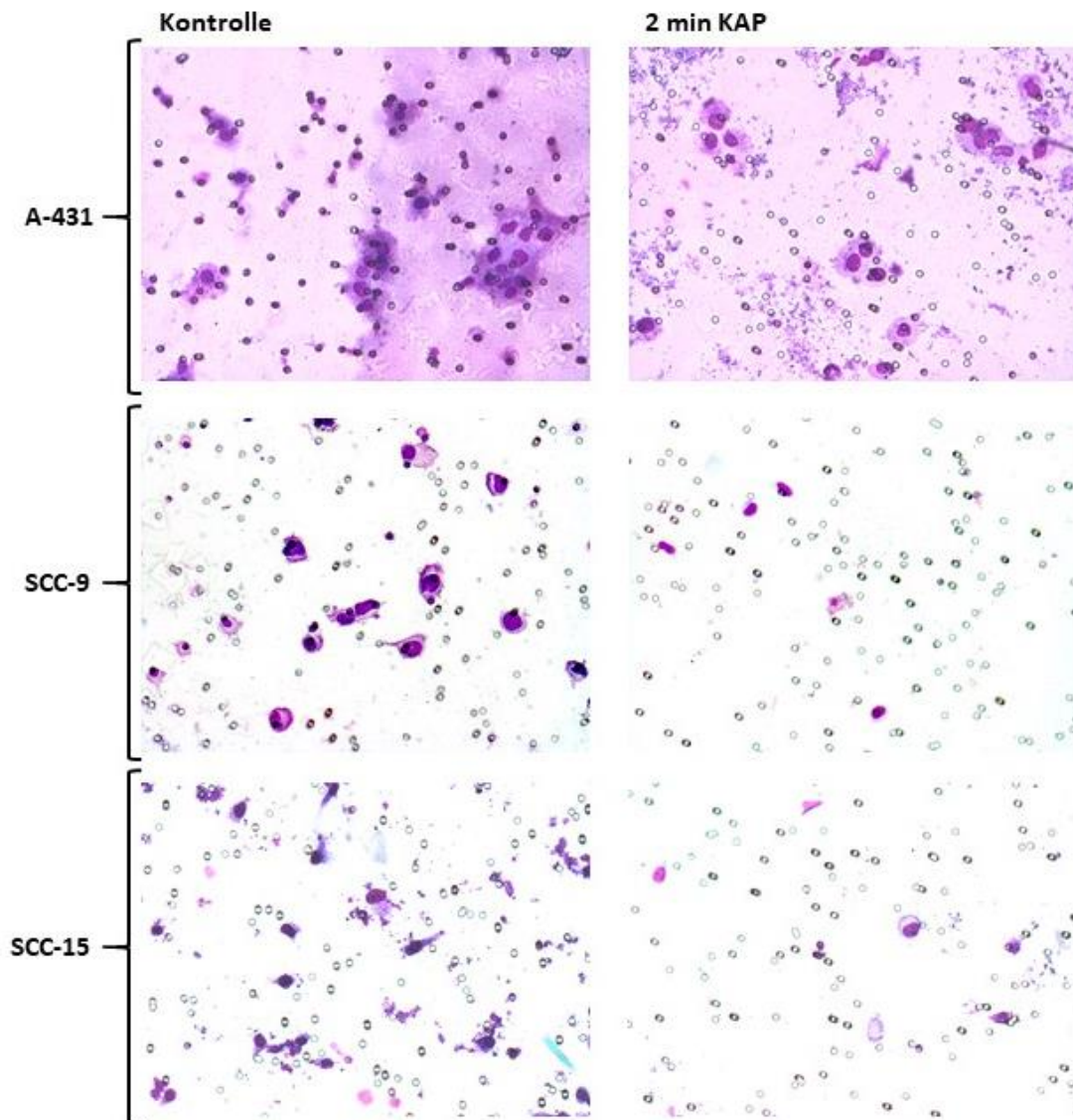


Abbildung 22: Aufnahmen aus den Boyden-Kammer Migrationsversuchen

In der Grafik wird eine Gegenüberstellung beispielhafter durchlichtmikroskopischer Aufnahmen fixierter und gefärbter Filter aus den Boyden-Kammer Migrationsversuchen nach Plasmabehandlung für 2 min bzw. in der Kontrolle ohne Plasmabehandlung von den Zelllinien A-431, SCC-9 und SCC-15 gezeigt. Legt man dabei den Fokus auf die Zellzahl pro Aufnahme fällt auf, dass die KAP-Behandlung für 2 min im Vergleich zur Kontrolle zu einer deutlichen Reduktion des Migrationsdrangs und damit der Anzahl sichtbarer Zellen führt.

Bei der Analyse der lichtmikroskopischen Aufnahmen der fixierten und gefärbten Filter der Boyden-Kammer Invasionsversuche fällt auf, dass die Zelllinie A-431 genauso wie die Zelllinie SCC-9 bei direktem Vergleich mit der Zelllinie SCC-15 eine schlechtere Invasionsfähigkeit aufweist. Während in den Kontrollproben noch vereinzelt Tumorzellen durch die mit Matrigel beschichteten Poren der Membran gewandert sind, zeigen sich die Membranen, welche von plasmabehandelten A-431-Zellen durchwandert werden hätten sollen, auch nach 18 Stunden Inkubationszeit fast

gänzlich zellfrei. Die unbehandelte Probe der Zelllinie SCC-15 zeigt bei der Invasionsanalyse mit Abstand das größte Wanderungsbestreben, sodass das gesamte Blickfeld gleichmäßig mit fixierten und angefärbten Tumorzellen übersät ist. Bei Gegenüberstellung der Kontrollproben mit den für 2 min mit KAP behandelten Proben haben alle Aufnahmen unabhängig von der Zelllinie gemeinsam, dass eine Abnahme der Anzahl an durch die mit Matrigel beschichtete Membran gewanderten Zellen zu sehen ist.

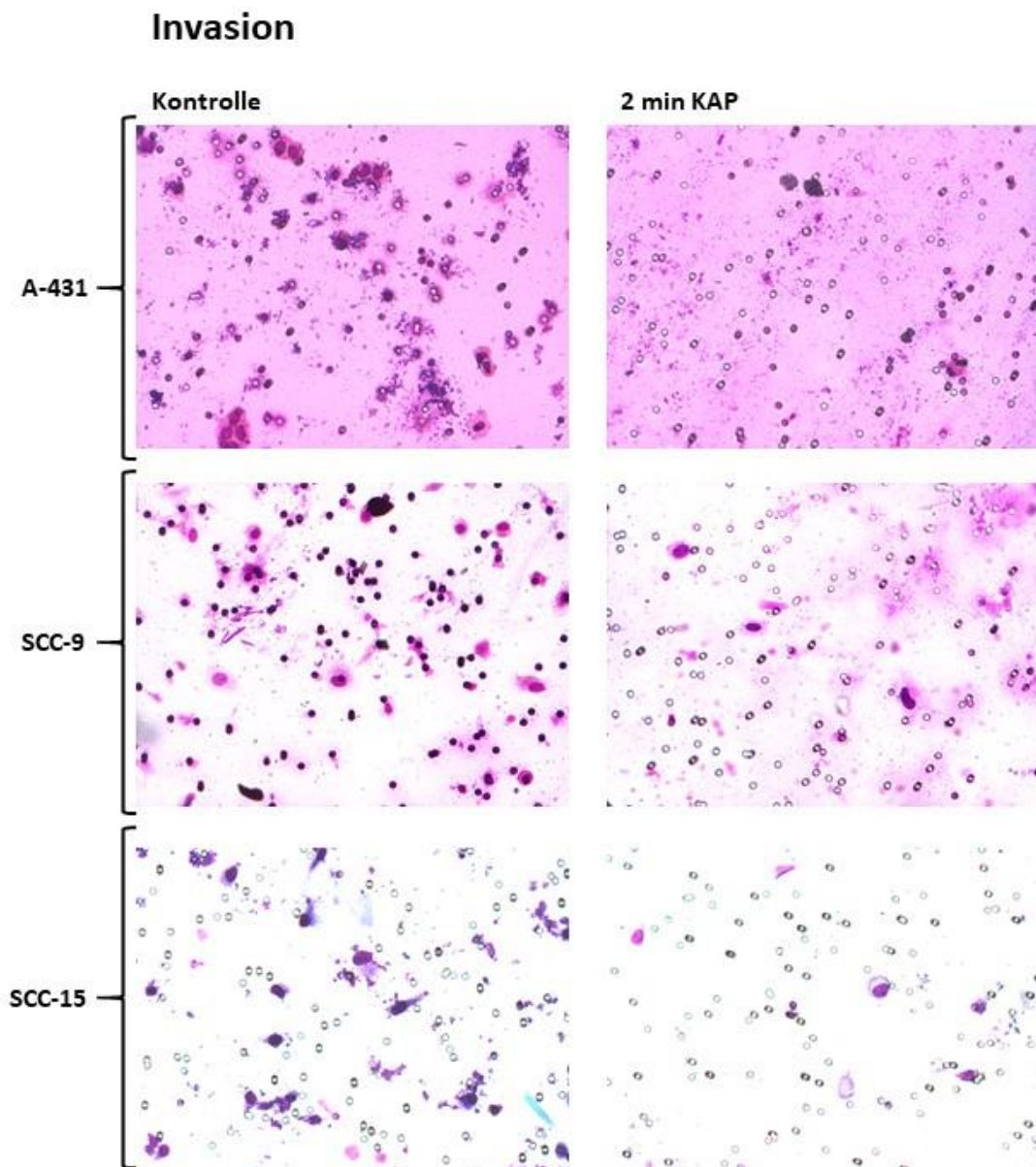


Abbildung 23: Aufnahmen aus den Boyden-Kammer Invasionsversuchen

In der Grafik wird eine Gegenüberstellung beispielhafter durchlichtmikroskopischer Aufnahmen fixierter und gefärbter Filter aus den Boyden-Kammer Invasionsversuchen nach Plasmabehandlung für 2 min bzw. in der Kontrolle ohne Plasmabehandlung von den Zelllinien A-431, SCC-9 und SCC-15 gezeigt. Legt man dabei den Fokus auf die Zellzahl pro Aufnahme fällt auf, dass die KAP-Behandlung für 2 min im Vergleich zur Kontrolle zu einer deutlichen Reduktion des Invasionsdrangs und damit der Anzahl sichtbarer Zellen führt.

4.3.2. Auswertung der Migrations- und Invasionsanalyse

Die Ergebnisse werden für jede Zelllinie separat und dabei wiederum unterteilt nach Untersuchungsgegenstand also Invasion und Migration als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Dabei wird jeweils die absolute Anzahl an Zellen pro Gesichtsfeld nach 2 min KAP-Behandlung der Kontrolle gegenübergestellt. Vergleiche zwischen Kontrolle und der für 2 min mit KAP behandelten Gruppe wurden mit dem ungepaarten t-Test durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,005$ wurde als statistisch signifikant angesehen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Alle Berechnungen wurden mit dem Softwarepaket GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt.

Bei der Etablierung der Untersuchung der dosisabhängigen Auswirkungen der KAP-Behandlung auf das Migrations- bzw. Invasionsverhalten der Plattenepithelkarzinomzellen wurden die Untersuchungsparameter auf Erfahrungswerte aus der Studie „Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells“ gestützt. Arndt et al. konnten darin beobachten, dass bei Melanomzellen bereits nach 2 min KAP-Behandlung jedoch mit einer sich vom plasma care® Prototypen unterscheidenden Plasmaquelle, eine irreversible Zellinaktivierung auftritt (43). Daher wurde eine Behandlungszeit von 2 min festgelegt, um sicherzustellen, dass die Zellen nach Behandlung noch vital genug sind, um durch die Poren der Membran zu wandern und so möglicherweise Effekte der KAP-Behandlung aufzuzeigen. Die KAP-Behandlung für 2 min wurde nach der Etablierung beibehalten, da sowohl beim Migrations- als auch beim Invasionsassay nach 2 min KAP im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bereits deutliche Effekte erkennbar waren und nach höheren Plasmadosen so gut wie keine gerichtete Invasion bzw. Migration mehr erkennbar sowie messbar wäre.

Wirft man einen Blick auf die Gegenüberstellung von Invasions- und Migrationsverhalten der Zelllinien A-431, SCC-9 und SCC-15 nach 2-minütiger Plasmabehandlung bzw. in der Kontrolle ohne Plasmabehandlung in der Abbildung 24, so kann für alle verwendeten Zelllinien zusammenfassend nach einer Plasmabehandlung für 2 Minuten eine signifikante Reduktion der Invasions- und Migrationsfähigkeit der Tumorzellen festgestellt werden. Beim Vergleich der Tumorzelllinien, die den Migrationsversuchen unterzogen wurden, zeichnet sich die Zelllinie A-431 mit der größten Abnahme der Migration durch 2-minütige

Plasmabehandlung aus. Gleichzeitig weist die Zelllinie A-431 sowohl mit als auch ohne Plasmabehandlung die höchste absolute Anzahl migrierter Tumorzellen pro Gesichtsfeld auf. Die Zelllinie SCC-9 folgt mit der zweithöchsten absoluten Anzahl migrierter Tumorzellen pro Gesichtsfeld. Am wenigsten wurde das Migrationsverhalten durch Plasmabehandlung bei der Zelllinie SCC-15 beeinflusst. Bei der Zelllinie SCC-15 lag die kleinste absolute migrierte Zellzahl sowohl mit als auch ohne Plasmabehandlung vor. Betrachtet man ausschließlich die Gegenüberstellung der Invasionsfähigkeit der untersuchten Zelllinien, dann ist die Minderung durch Behandlung mit KAP bei den Zelllinien A-431 und SCC-15 höchst signifikant, während bei der Zelllinie SCC-9 nur eine moderate Abnahme vorliegt. Die Invasion der Zelllinie SCC-15 zeigt im direkten Vergleich mit Abstand im Mittel die höchste durch die Kontrollmembran gewanderte absolute Zellzahl. Bei Gegenüberstellung der Zellzahl pro Gesichtsfeld in der Kontrolle also ohne Plasmabehandlung fällt auf, dass die Anzahl der invadierten Zellen bei der Zelllinie A-431 weniger als ein Viertel der migrierten Zellen ausmacht. Man könnte die Ursache dafür mit einer eventuell zu kurz gewählten Inkubationszeit begründen, allerdings war diese mit 18 Stunden schon recht großzügig bemessen. Außerdem wurde in der Etablierungsphase des Boyden-Kammer Assays der Versuch unter gleichen Rahmenbedingungen ausgenommen der A-431-Zellen, die damals aus einer anderen Population entnommen wurden, und der Inkubationszeit, die auf nur 4 Stunden festgelegt war, durchgeführt. Trotz der viel geringeren Inkubationszeit zeigten alle mikroskopischen Aufnahmen der fixierten Kontrollmembranen ein viel höheres Invasionsaufkommen der Zelllinie A-431. Daraus lässt sich schließen, dass es selbst innerhalb einer Zelllinie deutliche Differenzen geben kann.

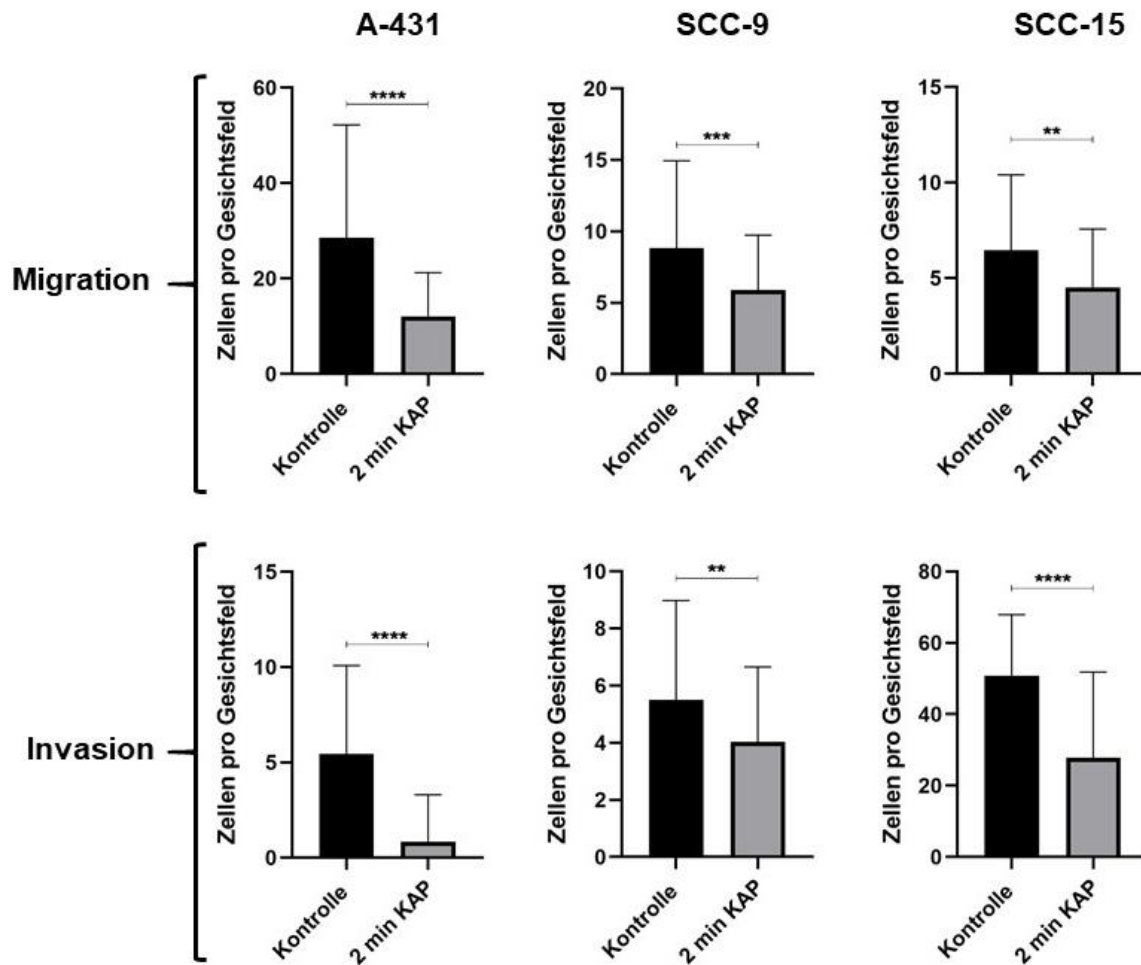


Abbildung 24: Gegenüberstellung von Invasions- und Migrationsverhalten

Die Abbildung stellt für die Zelllinien A-431, SCC-9 und SCC-15 sowohl für die Invasion als auch für die Migration jeweils die Veränderung bezüglich der Zellzahl pro Gesichtsfeld zwischen der unbehandelten Kontrollprobe und der für 2 min mit KAP behandelten Probe dar. Dabei ist unabhängig von der Zelllinie nach 2 min KAP gegenüber der Kontrolle eine signifikante Reduktion der Invasions- und Migrationsfähigkeit der Tumorzellen zu sehen. Statistische Analyse: ungepaarter-t-Test (**p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

4.4. Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse nach KAP-Behandlung

4.4.1. Auswertung FACS

Die Ergebnisse werden für jede Zelllinie separat mittels exemplarischer Dot Blot Darstellungen der Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse nach Plasmabehandlung für 2 bzw. 5 min gegenüber der unbehandelten Kontrolle und zusätzlich mit einer Gesamtauswertung der FACS-Analyse gegenübergestellt. In der Gesamtauswertung stellen die mit unterschiedlichen Plasmadosen behandelten Zellgruppen jeweils eine vollständige Zellpopulation, also 100 Prozent dar. Diese Zellen werden dann im Rahmen der FACS-Analyse anteilig entsprechend ihrer Eigenschaften den Populationsgruppen Vitalität, Apoptose und Nekrose zugeteilt. Für die Gegenüberstellung werden all diese Anteile als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Ein p-

Wert $< 0,005$ wurde dabei als statistisch signifikant angesehen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Alle Berechnungen wurden mit dem Softwarepaket GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt.

Die Behandlungszeit von 2 min wurde gestützt auf die Ergebnisse der Studie „Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells“ von Arndt et al. gewählt (43). Hier wurde allerdings eine andere Plasmaquelle (Miniflatplaster) mit modifizierter Plasmakonzentration verwendet. Nach Auswertung der Ergebnisse mit dem hier verwendeten plasma care® Prototypen unter den Betriebsparametern 4 kHz/ 3,5 kV zeigte sich sowohl für die besonders im Fokus stehenden Plattenepithelkarzinomzellen als auch für die später zur Überprüfung der von Arndt et al. übernommenen Rahmenbedingungen hinzugezogenen Mel Im Zellen nach einer Behandlungszeit von 2 min kaum eine Veränderung im Apoptoseverhalten. So konnten die ausbleibenden Veränderungen nach KAP-Behandlung mit der Anwendung einer weniger intensiven Plasmaquelle begründet werden, denn der Einsatz unterschiedlicher KAP-Geräte und Plasmaparameter führt zu unterschiedlicher Zusammensetzung und Konzentration von Plasmaprodukten. Im Rahmen dieser Untersuchungen erfolgte daher auch eine Behandlung für 5 min.

Vergleicht man bei den untersuchten Zelllinien A-431, SCC-9, SCC-15 und Mel Im in den Abbildungen 25-28 die Ergebnisse der Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse nach KAP-Behandlung für 2 min bzw. für 5 min mit der Kontrolle lässt sich zusammenfassend sagen, dass eine 5-minütige KAP-Behandlung unabhängig von der Zelllinie einen signifikanten Anstieg in der Apoptose und gleichzeitig eine signifikante Abnahme der Vitalität gegenüber der Kontrolle nach sich zieht. Bei einer KAP-Behandlung von nur 2 min lässt sich hingegen kaum eine Veränderung detektieren. Das führt dazu, dass auch zwischen den für 2 min mit KAP behandelten und für 5 min mit KAP behandelten Gruppen jeweils eine signifikante Steigerung der Apoptose und parallel ein signifikanter Abfall der Vitalität vorliegt.

Betrachtet man in Abbildung 25 die Ergebnisse für die Zelllinie A-431, fällt auf, dass sich diese im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien mit der geringfügigsten

Apoptoserate nach 5-minütiger Plasmabehandlung und gleichzeitig mit der höchsten Apoptoserate nach 2-minütiger Plasmabehandlung hervorhebt.

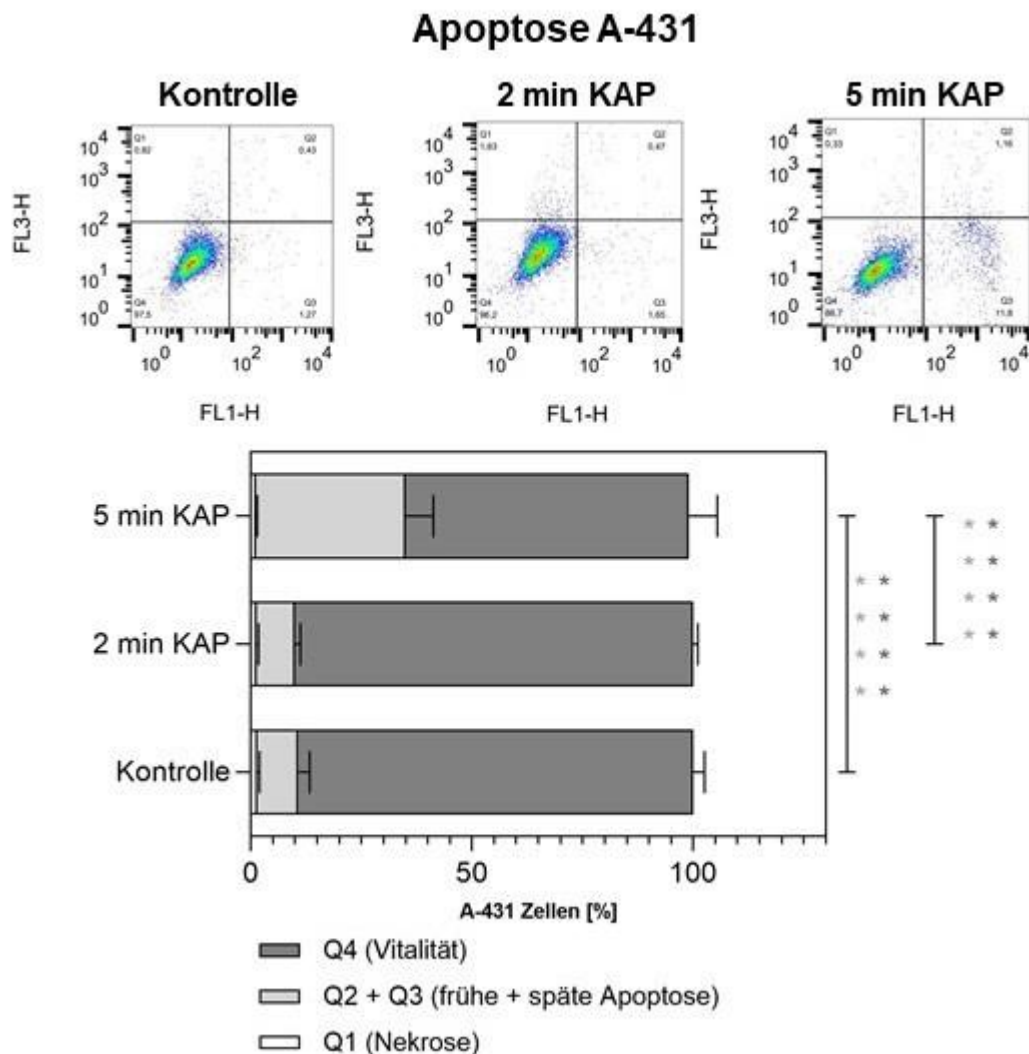


Abbildung 25: Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie A-431

Die Abbildung zeigt im oberen Abschnitt exemplarische Dot Plot Darstellungen der Apoptosedetektion für die Zelllinie A-431 mittels FACS-Analyse. Von links nach rechts werden Dot Plot Darstellungen erst einer unbehandelten Kontrollprobe und dann ansteigend erst die für 2 min mit KAP behandelte Probe und abschließend die für 5 min mit KAP behandelte Probe dargestellt. Im unteren Abschnitt der Abbildung wird eine Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie A-431 dargestellt. Darin werden mit unterschiedlichen Plasmadosen behandelte Zellgruppen, also für 5 min, für 2 min oder in der Kontrolle für 0 min mit KAP behandelte Proben gegenübergestellt und als vollständige Zellpopulation also 100 Prozent betrachtet. Entsprechend ihrer Eigenschaften werden diese dann anteilig den Populationsgruppen Vitalität, Apoptose und Nekrose zugeteilt. Für die Gegenüberstellung werden all diese Anteile als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Ein p-Wert $< 0,005$ wurde dabei als statistisch signifikant angesehen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Somit zeigt uns **** in der Grafik, dass nach 5 min KAP gegenüber der Kontrolle bzw. gegenüber 2 min KAP eine sehr signifikante Zunahme der frühen und späten Apoptose erfolgt. Die Vitalität, dargestellt mit **** nimmt nach 5 min KAP gegenüber 2 min KAP oder gegenüber der Kontrolle mit starker Signifikanz ab.

Die Zelllinie SCC-9 dargestellt in Abbildung 26 weist nach 5-minütiger Plasmabehandlung mit ca. 60 % mit Abstand die höchste Apoptoserate aller untersuchten Zelllinien auf.

Apoptose SCC-9

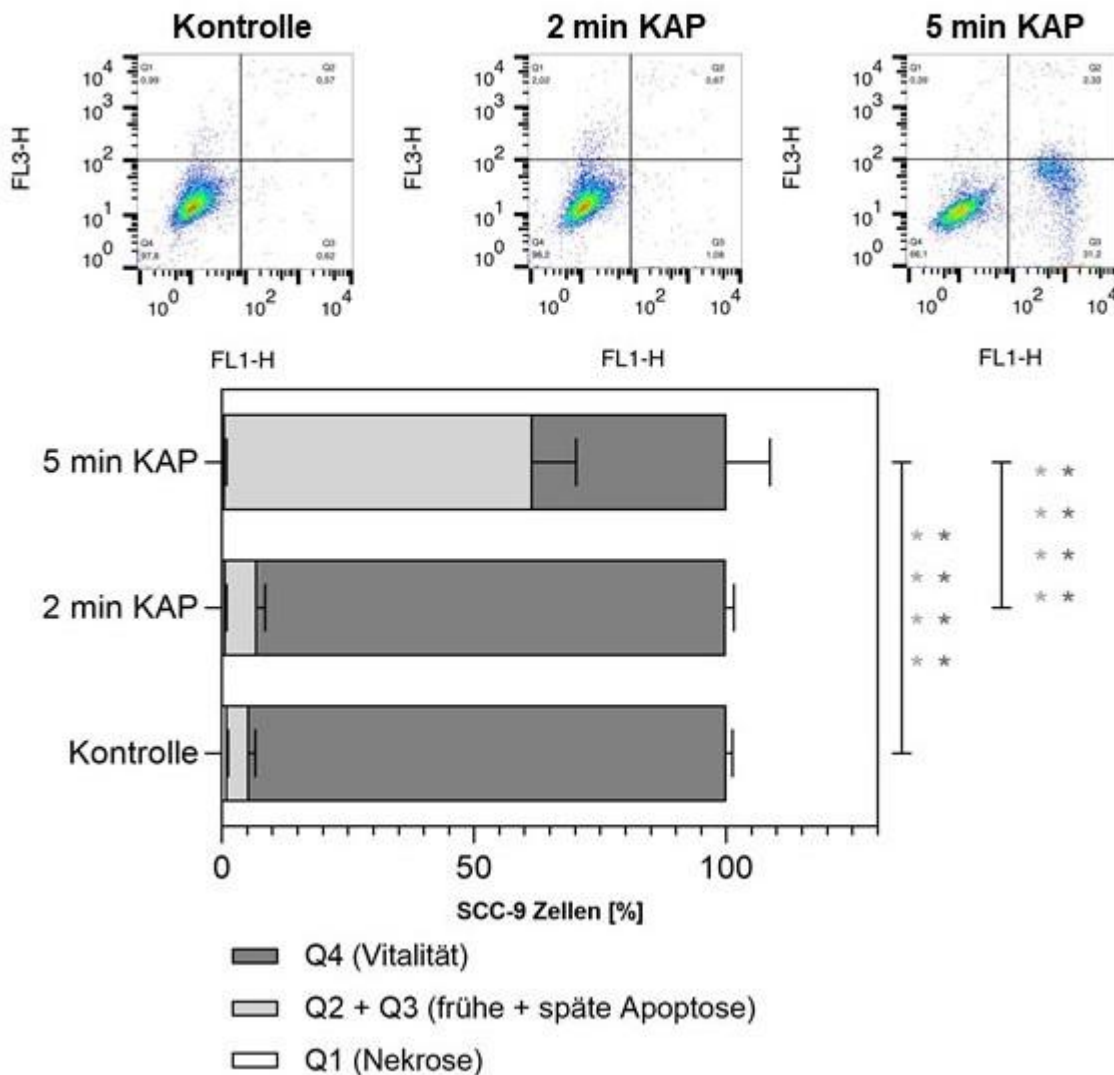


Abbildung 26: Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie SCC-9

Die Abbildung zeigt im oberen Abschnitt exemplarische Dot Plot Darstellungen der Apoptosedetektion für die Zelllinie SCC-9 mittels FACS-Analyse. Von links nach rechts werden Dot Plot Darstellungen erst einer unbehandelten Kontrollprobe und dann ansteigend erst die für 2 min mit KAP behandelte Probe und abschließend die für 5 min mit KAP behandelte Probe dargestellt. Im unteren Abschnitt der Abbildung wird eine Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie SCC-9 dargestellt. Darin werden mit unterschiedlichen Plasmadosen behandelte Zellgruppen, also für 5 min, für 2 min oder in der Kontrolle für 0 min mit KAP behandelte Proben gegenübergestellt und als vollständige Zellpopulation also 100 Prozent betrachtet. Entsprechend ihrer Eigenschaften werden diese dann anteilig den Populationsgruppen Vitalität, Apoptose und Nekrose zugeteilt. Für die Gegenüberstellung werden all diese Anteile als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Ein p-Wert $< 0,005$ wurde dabei als statistisch signifikant angesehen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Somit zeigt uns **** in der Grafik, dass nach 5 min KAP gegenüber der Kontrolle bzw. gegenüber 2 min KAP eine sehr signifikante Zunahme der frühen und späten Apoptose erfolgt. Die Vitalität, dargestellt mit **** nimmt nach 5 min KAP gegenüber 2 min KAP oder gegenüber der Kontrolle mit starker Signifikanz ab.

Apoptose SCC-15

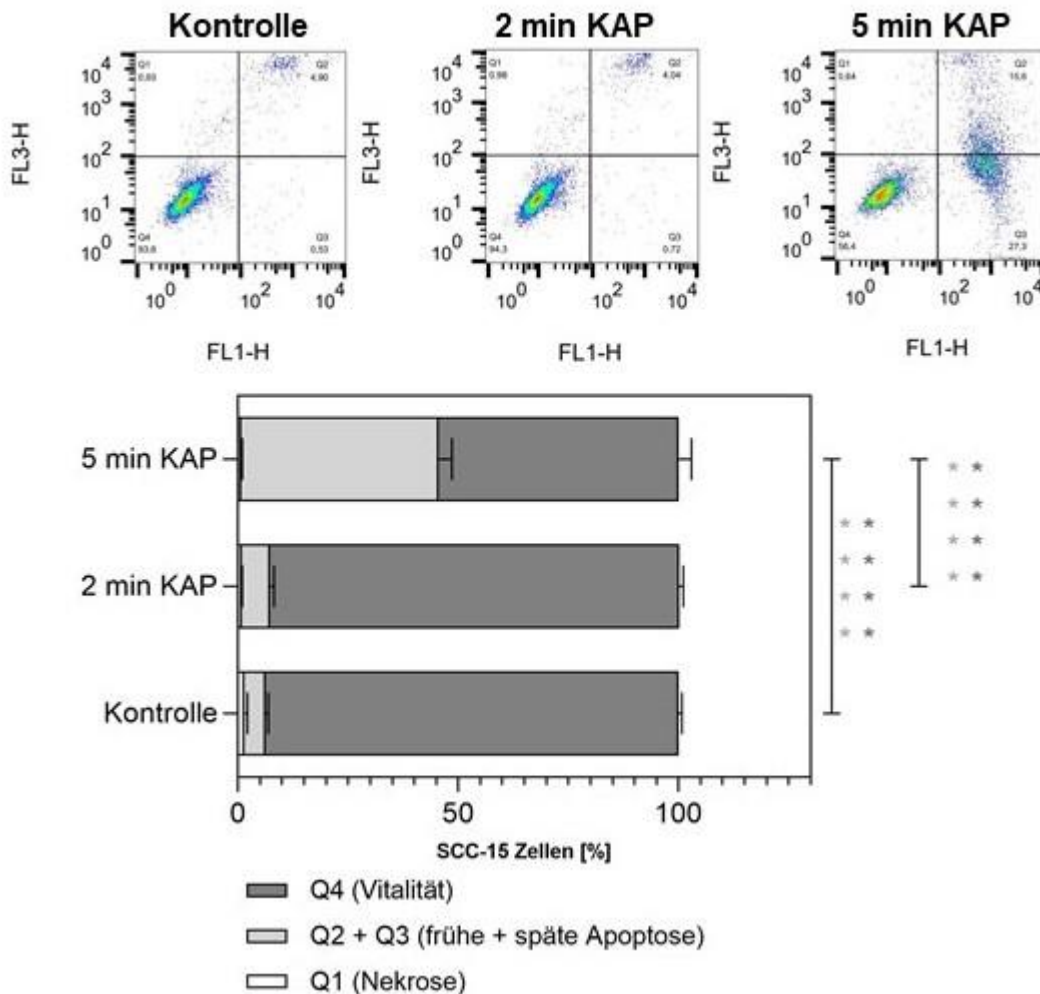


Abbildung 27: Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie SCC-15

Die Abbildung zeigt im oberen Abschnitt exemplarische Dot Plot Darstellungen der Apoptosedetektion für die Zelllinie SCC-15 mittels FACS-Analyse. Von links nach rechts werden Dot Plot Darstellungen erst einer unbehandelten Kontrollprobe und dann ansteigend erst die für 2 min mit KAP behandelte Probe und abschließend die für 5 min mit KAP behandelte Probe dargestellt. Im unteren Abschnitt der Abbildung wird eine Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie SCC-15 dargestellt. Darin werden mit unterschiedlichen Plasmadosen behandelte Zellgruppen, also für 5 min, für 2 min oder in der Kontrolle für 0 min mit KAP behandelte Proben gegenübergestellt und als vollständige Zellpopulation also 100 Prozent betrachtet. Entsprechend ihrer Eigenschaften werden diese dann anteilig den Populationsgruppen Vitalität, Apoptose und Nekrose zugeteilt. Für die Gegenüberstellung werden all diese Anteile als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Ein p-Wert $< 0,005$ wurde dabei als statistisch signifikant angesehen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Somit zeigt uns **** in der Grafik, dass nach 5 min KAP gegenüber der Kontrolle bzw. gegenüber 2 min KAP eine sehr signifikante Zunahme der frühen und späten Apoptose erfolgt. Die Vitalität, dargestellt mit **** nimmt nach 5 min KAP gegenüber 2 min KAP oder gegenüber der Kontrolle mit starker Signifikanz ab.

Die Zelllinie Mel Im, dargestellt in Abbildung 28 hebt sich von den anderen analysierten Zelllinien ab, indem sie bereits nach 2-minütiger KAP-Behandlung gegenüber der

Kontrolle einen sichtbaren jedoch nicht signifikanten Anstieg in der Apoptose verzeichnet.

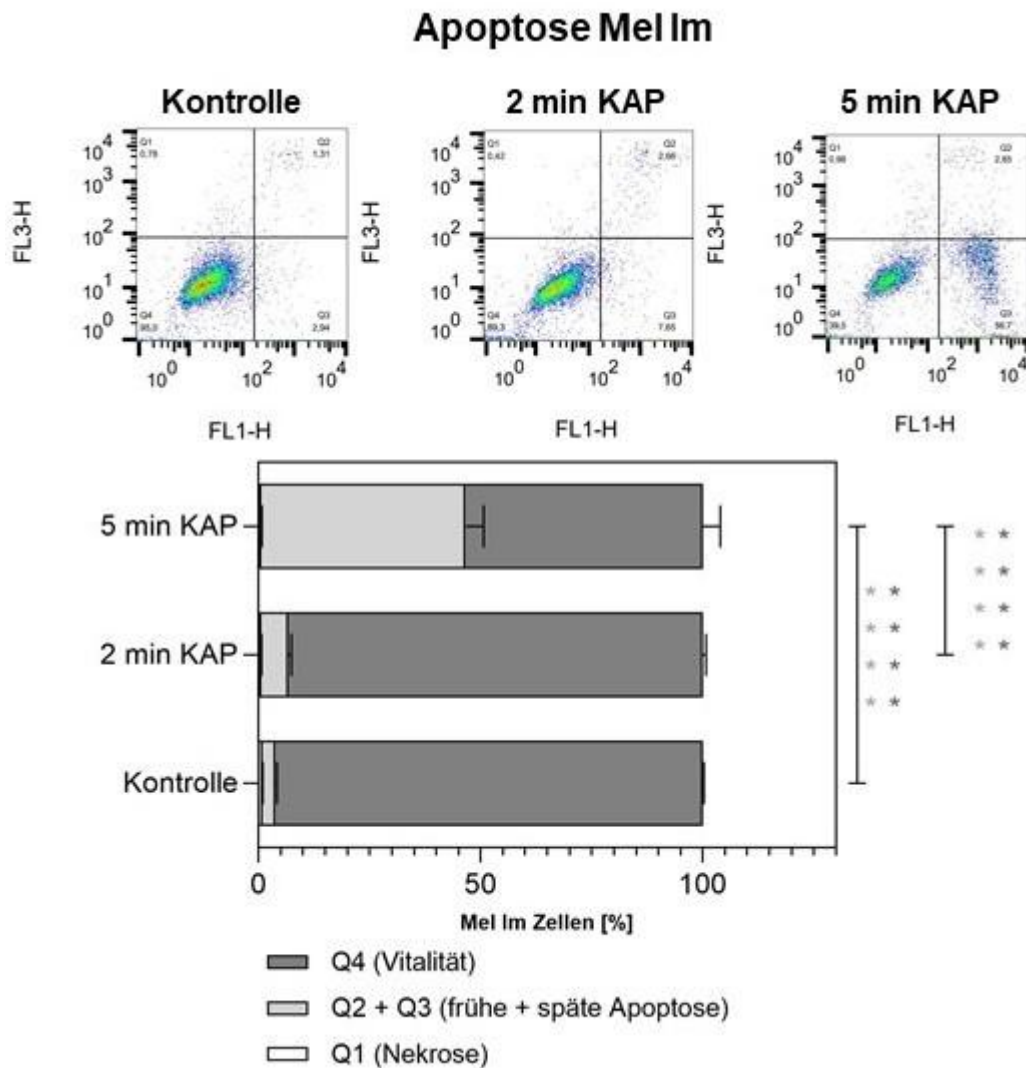


Abbildung 28: Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie Mel Im

Die Abbildung zeigt im oberen Abschnitt exemplarische Dot Plot Darstellungen der Apoptosedetektion für die Zelllinie Mel Im mittels FACS-Analyse. Von links nach rechts werden Dot Plot Darstellungen erst einer unbehandelten Kontrollprobe und dann ansteigend erst die für 2 min mit KAP behandelte Probe und abschließend die für 5 min mit KAP behandelte Probe dargestellt. Im unteren Abschnitt der Abbildung wird eine Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie Mel Im dargestellt. Darin werden mit unterschiedlichen Plasmadosen behandelte Zellgruppen, also für 5 min, für 2 min oder in der Kontrolle für 0 min mit KAP behandelte Proben gegenübergestellt und als vollständige Zellpopulation also 100 Prozent betrachtet. Entsprechend ihrer Eigenschaften werden diese dann anteilig den Populationsgruppen Vitalität, Apoptose und Nekrose zugeteilt. Für die Gegenüberstellung werden all diese Anteile als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Ein p-Wert $< 0,005$ wurde dabei als statistisch signifikant angesehen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Somit zeigt uns **** in der Grafik, dass nach 5 min KAP gegenüber der Kontrolle bzw. gegenüber 2 min KAP eine sehr signifikante Zunahme der frühen und späten Apoptose erfolgt. Die Vitalität, dargestellt mit **** nimmt nach 5 min KAP gegenüber 2 min KAP oder gegenüber der Kontrolle mit starker Signifikanz ab.

4.5. Molekularbiologische Analyse der RNA

Die molekularbiologische Analyse der RNA erfolgte zum einen am Beispiel der Zelllinie A-431 stellvertretend für Zellen kutanen Ursprungs und zum anderen an der Zelllinie SCC-9 stellvertretend für epitheliale Zellen der Schleimhaut.

Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Dabei werden die Kontrollwerte für die einzelnen Tumormarker im relativen Verhältnis zu der für 2 min mit KAP behandelten Gruppe auf den Wert 1 normiert. Für den Vergleich der 3 Gruppen, also Kontrolle, 2 min KAP und 5 min KAP wurde ein ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test durchgeführt. Dabei wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Alle Berechnungen wurden mit dem Softwarepaket GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt.

4.5.1. Expressionsanalyse Apoptose-assoziiierter Gene nach KAP

In Abbildung 29 werden die Gesamtauswertungen zur Expressionsanalyse der bereits zuvor unter 3.10. beschriebenen Apoptose-Marker Caspase-3, Caspase-7 und Caspase-9 für die Zelllinie A-431 und SCC-9 gegenübergestellt.

Ganz allgemein fällt auf, dass die Expressionsanalysen für Caspase-3 und -7 unabhängig von der überprüften Zelllinie ein recht ähnliches Bild erzeugen, während sich Caspase-9 bei der Zelllinie A-431 durch eine signifikant verstärkte Expression bereits nach 2-minütiger KAP-Behandlung und dafür einer signifikant abgefallenen Expression nach 5-minütiger KAP-Behandlung gegenüber der Kontrolle abhebt. Auch bei der Zelllinie SCC-9 unterscheiden sich die Ergebnisse für Caspase-9 ganz klar von allen anderen Caspasen. Bei der Zelllinie SCC-9 löst die Plasmabehandlung unabhängig von der Anwendungsdauer von 2 oder 5 min keine veränderte Nachweisbarkeit von Caspase-9 aus. Die Expression von Caspase-3 und -7 wird in allen untersuchten Zelllinien nach 5-minütiger Plasmabehandlung gegenüber der Kontrolle signifikant gesteigert. Nach einer Plasmabehandlung für nur 2 min kann gegenüber der Kontrolle nur bei der Zelllinie A-431 eine gesteigerte Expression von Caspase-3 und -9 nachgewiesen werden.

Expressionsanalyse Apoptose-assoziiierter Gene nach KAP-Behandlung

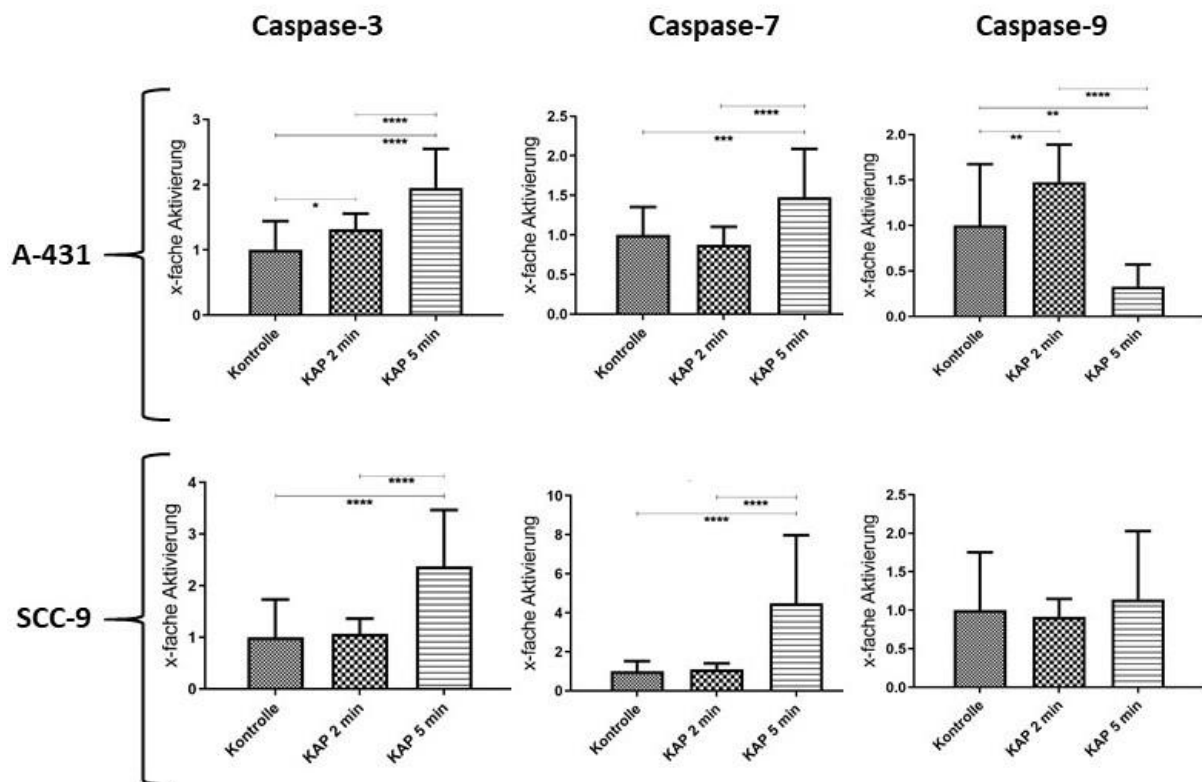


Abbildung 29: Expressionsanalyse Apoptose-assoziiierter Gene

In der Abbildung werden die Gesamtauswertungen zur Expressionsanalyse der Apoptose-Marker Caspase-3, Caspase-7 und Caspase-9 für die Zelllinie A-431 (kutan) und SCC-9 (oral) gegenübergestellt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Dabei werden die Kontrollwerte für die einzelnen Tumormarker im relativen Verhältnis zu der für 2 min mit KAP behandelten Gruppe auf den Wert 1 normiert. Für den Vergleich der 3 Gruppen, also Kontrolle, 2 min KAP und 5 min KAP wurde ein ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test durchgeführt. Dabei wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Unabhängig von der Zelllinie erzeugen Caspase-3 und -7 ein recht ähnliches Bild, nach 5 min KAP wird die Expression der Apoptose-Marker gegenüber 2 min KAP und der Kontrolle signifikant gesteigert. Caspase-9 hebt sich von den anderen Apoptose-Markern ab indem bei der Zelllinie SCC-9 zwischen den unterschiedlichen KAP-Behandlungszeiten keine signifikanten Veränderungen in der Expression nachweisbar sind. Bei der Zelllinie A-431 zeigt sich bereits nach 2 min KAP eine signifikant gesteigerte Expression von Caspase-9 gegenüber der Kontrolle und dafür nach 5 min KAP ein signifikanter Abfall der Expression von Caspase-9 gegenüber der Kontrolle.

4.5.2. Expressionsanalyse Seneszenz-assoziiierter Gene nach KAP

Die Nachweisbarkeit der Seneszenz-assoziierten Gene p16 und p21 nach Behandlung mit KAP wird am Beispiel der Zelllinien A-431 und SCC-9 in Abbildung 30 dargestellt. Während die 2-minütige Plasmabehandlung dabei unabhängig von der Zelllinie keinerlei Veränderungen gegenüber der Kontrolle für die Seneszenz-assoziierten Gene p16 und p21 bewirkt, kann nach 5-minütiger Plasmabehandlung jeweils ein signifikanter Anstieg beim Nachweis der Seneszenz-assoziierten Gene p16 und p21 verzeichnet werden. Die Zelllinie A-431 weicht mit einer etwas niedrigeren Signifikanz in der Expression von p16 nach Plasmabehandlung gegenüber der Kontrolle bzw. zwischen den für 2 min und für 5 min mit KAP behandelten Proben vom Rest ab. Jedoch kann

ein ganz eindeutiger Trend in den Auswirkungen der KAP-Behandlung bezüglich der Seneszenz nachgewiesen werden, nämlich der Anstieg der Seneszenz mit steigender Plasmadosis.

Expressionsanalyse Seneszenz-assoziiierter Gene nach KAP-Behandlung

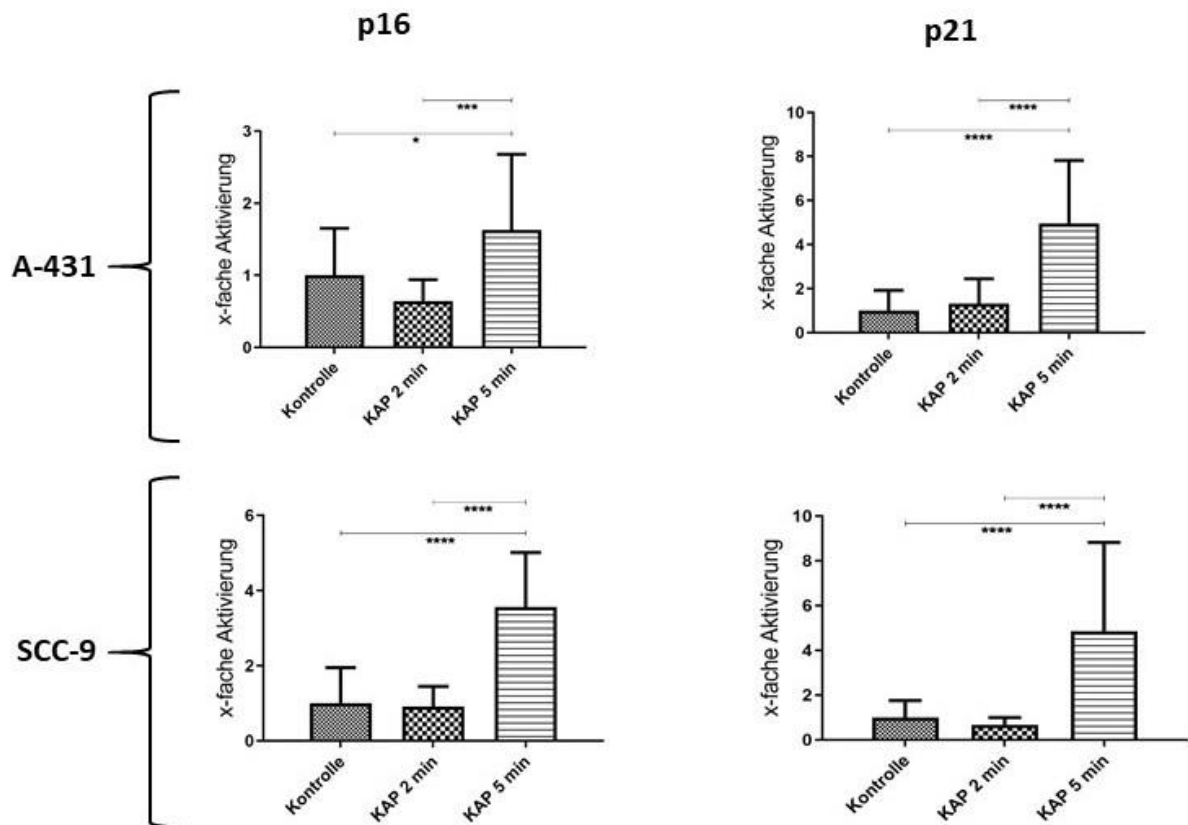


Abbildung 30: Expressionsanalyse Seneszenz-assoziiierter Gene

In der Abbildung werden die Gesamtauswertungen zur Expressionsanalyse der Seneszenz-Marker p16 und p21 für die Zelllinien A-431 (kutan) und SCC-9 (oral) gegenübergestellt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Dabei werden die Kontrollwerte für die einzelnen Tumormarker im relativen Verhältnis zu der für 2 min mit KAP behandelten Gruppe auf den Wert 1 normiert. Für den Vergleich der 3 Gruppen, also Kontrolle, 2 min KAP und 5 min KAP wurde ein ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test durchgeführt. Dabei wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Unabhängig von der Zelllinie kann in den Gesamtauswertungen ein signifikanter Anstieg der Seneszenz mit steigender Plasmadosis gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden.

4.5.3. Expressionsanalyse bezüglich DNA-Schäden nach KAP

Der Nachweis der durch KAP-Behandlung induzierten Steigerungen der Expression von γ H2AX, die wie in Kapitel 3.10. beschrieben für DNA-Schäden stehen, wird in Abbildung 31 am Beispiel der Zelllinien A-431 und SCC-9 dargestellt. Während die Zelllinie A-431 schon nach 2-minütiger Plasmabehandlung einen minimal signifikanten Anstieg von γ H2AX gegenüber der Kontrolle verzeichnet, gleichen sich die Expression von γ H2AX in der Kontrolle und nach 2-minütiger Plasmabehandlung bei der Zelllinie SCC-9. Bei der Zelllinie A-431 ordnet sich die Expression von γ H2AX nach 5-minütiger

Plasmabehandlung zwischen der unbehandelten Kontrolle und der für 2 min mit KAP behandelten Probe ein, es kann somit keine signifikante Veränderung im Vergleich mit den anderen Proben nachgewiesen werden. Die Expressionsanalyse bezüglich DNA-Schäden gleicht bei der Zelllinie SCC-9 der Tendenz vieler anderer Untersuchungen nach KAP, denn für eine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle ist dabei eine Behandlungszeit von 5 min notwendig. Die Nachweisbarkeit nach 2-minütiger Plasmabehandlung gleicht der Kontrolle und ist somit auch signifikant niedriger als nach 5-minütiger Plasmabehandlung.

Expressionsanalyse bezüglich DNA-Schäden nach KAP-Behandlung

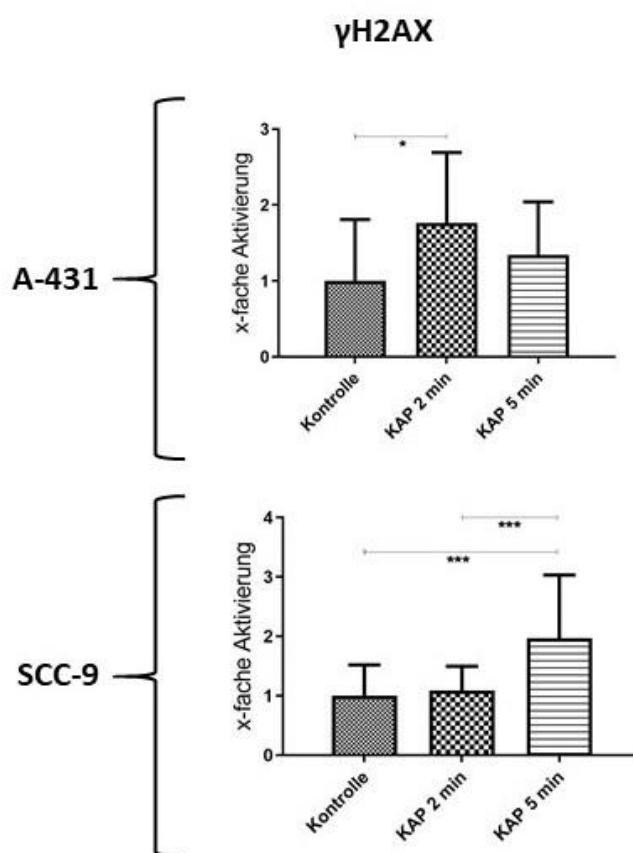


Abbildung 31: Expressionsanalyse auf γ H2AX bezüglich DNA-Schäden

In der Abbildung werden die Gesamtauswertungen zur Expressionsanalyse bezüglich DNA-Schäden für die Zelllinien A-431 (kutan) und SCC-9 (oral) gegenübergestellt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SD ausgedrückt. Dabei werden die Kontrollwerte für die einzelnen Tumormarker im relativen Verhältnis zu der für 2 min mit KAP behandelten Gruppe auf den Wert 1 normiert. Für den Vergleich der 3 Gruppen, also Kontrolle, 2 min KAP und 5 min KAP wurde ein ANOVA Bonferroni's multiple comparisons test durchgeführt. Dabei wurde ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Während die Zelllinie A-431 bereits nach 2 min KAP gegenüber der Kontrolle einen signifikanten Anstieg von γ H2AX aufweist, kann bei der Zelllinie SCC-9 keine signifikante Veränderung zwischen 2 min KAP und Kontrolle nachgewiesen werden. Nach 5 min KAP kann bei der Zelllinie SCC-9 ein signifikanter Anstieg in der Expression von γ H2AX gegenüber 2 min KAP und gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie A-431 hingegen kann nach 5 min KAP sowohl gegenüber 2 min KAP als auch gegenüber der Kontrolle keine signifikante Veränderung nachgewiesen werden.

5. Diskussion

5.1. *In vitro* Untersuchung an PEK-Zellen

Alle im Rahmen dieser Dissertation vorgenommenen Analysen wurden als *in-vitro*-Anwendung an PEK-Zelllinien ausgeführt. Brany et al. bestätigen in „Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine“ die Relevanz dieser leichter zugänglichen und einfach durchzuführenden Experimente zur Erforschung der fundamentalen Kaltplasmaeffekte im Bereich der Onkologie, halten eine umfassende Prüfung *in vivo* aber trotzdem für unverzichtbar (108). Die im Zentrum der vorgenommenen Untersuchungen stehenden Anti-Krebs-Effekte durch KAP wurden bereits in zahlreichen Publikationen für die unterschiedlichsten Tumorzelllinien aus Brust, Lunge, Hirn oder Haut bestätigt (109–111). Auch in der Behandlung aktinischer Keratosen, welche häufig die Vorstufe eines invasiven Plattenepithelkarzinoms der Haut darstellen, konnten Wirtz et al. gute Erfolge erzielen (8). Darum ist der Einfluss von KAP auf Plattenepithelkarzinomzellen das zentrale Thema dieser Arbeit und wird am Beispiel der epithelialen PEK-Zelllinie A-431 aus einem PEK der Haut und der PEK-Zelllinien SCC-9 und SCC-15 aus PEK der Zunge analysiert. Die untersuchten Zelllinien haben zwar wie in Kapitel 4.1. genauer beschrieben, unterschiedliche morphologische Merkmale, weisen aber ansonsten, wie in der Übersicht aller Effekte durch KAP dargestellt (Abbildung 32), überwiegend sehr vergleichbare Veränderungen auf. Diese hohe Ähnlichkeit zwischen kutanen und oralen PEK-Zelllinien konnte auch von Dooley et al. in der Biomarkeranalyse mittels qRT-PCR untermauert werden (112).

5.2. plasma care® Prototyp in medizinischer Anwendung

Der Hauptfokus in klinischen Studien bezüglich der medizinischen Anwendung von KAP lag primär auf der Behandlung chronischer Wunden und Hautinfektionen (108). Demzufolge ist die einzige der Leitlinienempfehlung entsprechende kurative Anwendung aktuell die Behandlung von chronischen und infizierten Wunden wofür 2013 erstmalig Kaltplasmaquellen als Medizingeräte (Klasse IIa) zugelassen wurden (113). Im Juni 2019 erhielt auch der plasma care® die CE-Zertifizierung als Medizinprodukt der Klasse IIa und war somit das erste tragbare, batteriebetriebene KAP-Medizinprodukt das auf der SMD-Technologie basiert. Der plasma care® ist für die therapeutische Behandlung von chronischen und akuten, offenen Wunden mit

kritischer Besiedelung oder Infektionen mit Bakterien sowie für die prophylaktische Behandlung von Wunden zur Vorbeugung von Infektionen zugelassen (114). Doch nach und nach werden andere Einsatzmöglichkeiten von KAP wie die Tumorthherapie erforscht (108). Vor der Implementierung als neues medizinisches Behandlungsinstrument beim Plattenepithelkarzinom müssen Wirkungsweise und Sicherheit des plasma care® Prototyps charakterisiert werden. Daher erfolgten alle im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Behandlungen mit KAP mit einem plasma care® Prototyp an Plattenepithelkarzinomzellen und es folgt durch Gegenüberstellung mit unbehandelten Proben (Abbildung 32) eine Analyse der durch die KAP-Behandlung ausgelösten Effekte. Allerdings ist der Vergleich der Untersuchungsergebnisse mit anderen Publikationen und somit generell das Zusammentragen aller Erfahrungswerte bezüglich KAP-Behandlungen an Plattenepithelkarzinomzellen nicht möglich. Denn all die unterschiedlichen aktuell in der Forschung verwendeten KAP-Geräte weisen unterschiedliche Eigenschaften auf. Dieser Faktor muss in der Planung neuer Untersuchungen in den Fokus gerückt und berücksichtigt werden. Beispielsweise ist mit dem plasma care® Prototyp für die Apoptoseinduktion wie in Kapitel 4.4. beschrieben eine Behandlungsdauer von 5 min notwendig, um signifikante apoptotische Veränderungen hervorzurufen. Arndt et al. konnten hingegen in „Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells“ bereits nach 2-minütiger Behandlung mit dem miniFlatPlaSter ähnliche Ergebnisse erzielen (43). Durch unterschiedliche Plasmaparameter und damit unterschiedlicher Zusammensetzungen und Konzentrationen der Plasmaprodukte wie Elektronen, geladene Teilchen, reaktive Spezies, UV-Licht und Wärme, ist es schwierig, verschiedene Studien gegenüberzustellen und nach KAP-Behandlung nachgewiesene Effekte direkt miteinander zu vergleichen. Die Variation der aktiven Plasmakomponenten hängt stark von den Plasmaproduktionsmechanismen ab (43).

Die S2k-Leitlinie „Rationaler therapeutischer Einsatz von kaltem physikalischem Plasma“ bestätigt, dass zur Erzeugung von KAP zugelassene Medizingeräte verschiedenen Verfahren der KAP-Generierung unterliegen. Somit hat neben den variablen Einflussgrößen wie Raumluft und Feuchtigkeit auch das Quellen-Design Einfluss auf das Plasmaprodukt. Trotzdem versichert die Leitlinie die Generierung

eines zuverlässigen und therapeutisch nutzbaren Plasmas, dessen Qualität durch ausführliche physikalische und biologische Charakterisierung ausgewiesen ist (113).

Unter anderem entspricht der plasma care® bereits den Anforderungen der DIN SPEC 91315 über „General requirements for plasma sources in medicine“ (114). Zur besseren Standardisierung von Plasmaquellen für die medizinische Anwendung wird aktuell eine neue Spezifikation im DIN (Deutsches Institut für Normierung) erstellt. In diesem Rahmen sollen Basiskriterien festgelegt und Anforderungen bis zum Ende der 12-monatigen Projektlaufzeit am 06.07.2024 definiert werden (115).

5.3. Durch KAP-Behandlung vermittelte Effekte

Als Fazit aus den in Kapitel 4 ausführlich beschriebenen Effekten auf die untersuchten Plattenepithelkarzinomzelllinien ausgelöst durch eine Behandlung mit KAP lässt sich schließen, dass PEK-Zellen unterschiedlicher Herkunft teils unterschiedliche morphologische Merkmale aufweisen, trotzdem aber bei Invasions- bzw. Migrationsanalysen mittels Boyden-Kammer nach 2-minütiger KAP-Behandlung und bei allen anderen Untersuchungen nach 5-minütiger KAP-Behandlung beinahe die gleiche Entwicklung zeigen. Auch Dooley et al. bestätigen im Rahmen ihrer Untersuchungen bereits, dass orale und kutane Plattenepithelkarzinomzellen eine ähnliche Tendenz zeigen, jedoch erweist sich die Sensibilität der Zellen als variabel (112). Ein Überblick dieser Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe ist in Abbildung 32 dargestellt.

5.3.1. Veränderungen in Morphologie und Wachstumsmuster

Alle untersuchten Zelllinien zeigen mit zunehmender Plasmabehandlungszeit eine deutliche Reduktion der Zellproliferation. Seebauer et al. untermauern diese These in „Palliative Plasmabehandlung von Kopf-Hals-Tumoren und kurative Konzepte“ wo sie morphologische Veränderungen wie lokales Einschrumpfen der Gewebemasse oder ein sistierendes Tumorwachstum beschreiben (28). Darüber hinaus zeigt sich direkt nach KAP-Behandlung bei Gegenüberstellung mit der unbehandelten Kontrolle ein vorübergehendes Abkugeln der Tumorzellen. Diese Abrundung und Schrumpfung der Tumorzellen wird auch von Recek et al. in „Effect of Cold Plasma on Glial Cell Morphology Studied by Atomic Force Microscopy“ nachgewiesen (116). Was ganz genau hinter dem „Abkugeln“ steckt ist bisher noch nicht untersucht, allerdings beschreiben gleich mehrere Publikationen ähnliche Effekte von KAP wie das

vorübergehende Abkugeln oder die Ablösung der behandelten Zellen von der extrazellulären Matrix (3, 111, 116).

5.3.2. Hemmung der horizontalen Migration

Bei der horizontalen Migration am Spalt können wie in Abbildung 32 dargestellt nach 2-minütiger Plasmabehandlung kaum Veränderungen detektiert werden. Dafür liegt nach 5-minütiger KAP-Behandlung eine starke Reduktion des Migrationsverhaltens vor. Hierbei gibt es eine Überschneidung mit den Ergebnissen von Wang et al. die im Rahmen ihrer Untersuchungen an humanen metastasierten Brustkrebszellen eine durch die KAP-Behandlung bedingte Reduktion der Spaltschlussgeschwindigkeit verzeichnen (110).

5.3.3. Abnahme der gerichteten Migration/Invasion

Die Migrations- und Invasionsanalyse mittels Boyden-Kammer Assay zeigt gegenüber der horizontalen Migrationsanalyse am Spalt, bereits bei geringerer KAP-Dosis, also für nur 2 Minuten eine Reduktion der gerichteten Migrations- und Invasionsfähigkeit von PEK-Zellen. Diese Minderung der Zellmotilität durch KAP konnte bereits mit Tumorzellen aus Eierstöcken und Dickdarm nachgewiesen werden (80, 117). Auch Li et al. demonstrieren in ihrer Studie die hemmende Wirkung von KAP bezüglich der Invasion und Migration auf das Mammakarzinom (118).

5.3.4. Apoptoseinduktion

Die Rahmenbedingungen für die durchflusszytometrischen Analysen zum Apoptosenachweis wurden an Untersuchungen mit Melanomzellen von Arndt. et al. angelehnt (43). Da nach 2-minütiger KAP-Behandlung bei den PEK-Zellen kaum Effekte verzeichnet werden konnten, wurde die Zelllinie Mel Im hinzugezogen, um einen besseren Vergleich zur Studie von Arndt et al. zu schaffen (43). Anders als erwartet ist die Apoptose auch bei den Melanomzellen nach 2 min KAP-Behandlung gegenüber der Kontrolle kaum erhöht. Die Ergebnisse deuten also darauf hin, dass keine Korrelation zwischen der verringerten Empfindlichkeit gegenüber der KAP-Behandlung und der verwendeten Tumorzelllinie besteht. Folglich bleibt nur noch das Plasmagerät als möglicherweise für die Differenzen verantwortlicher Versuchsparameter. Daraus resultiert, dass die verwendete Plasmaquelle, also der plasma care® Prototyp für die gleichen Effekte wie der miniFlatPlaSter eine längere Behandlungszeit erfordert. Somit zeichnet sich bei der Apoptosedetektion mittels

FACS-Analyse nach 2-minütiger KAP-Behandlung kaum eine Veränderung gegenüber der Kontrolle ab. Erst nach 5-minütiger KAP-Behandlung können für alle untersuchten Zelllinien signifikant erhöhte Apoptoseraten nachgewiesen werden. Hierbei gibt es Überschneidungen mit den Ergebnissen von Welz et al., die am Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom (HNSCC) untersuchten, ob dosisabhängige DNA-Schäden Apoptose induzieren und dabei zu dem Schluss kamen, dass lediglich lange Behandlungszeiten und entsprechend hohe Plasmadosen eine hohe Rate an apoptotischen Zellen induzieren (119). Mehrere Publikationen deuten darauf hin, dass die Produktion von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies durch KAP, die DNA-Schäden sowie Apoptose hervorrufen, ein Schlüsselfaktor für die antitumoralen Effekte ist (42, 120).

5.3.5. Molekularbiologische Veränderungen

Gegenüber der Apoptosedetektion mittels FACS-Analyse kann bei der Expressionsanalyse Apoptose-assoziiierter Gene bei der Zelllinie A-431 manchmal schon nach 2-minütiger KAP-Behandlung ein leichter Anstieg beobachtet werden, während für einen starken Anstieg eine 5-minütige KAP-Behandlung erforderlich ist. Die Expressionsanalyse der Apoptose-assoziierten Caspase-9 unterscheidet sich mit einem ausbleibenden Anstieg in der Apoptose durch eine gesteigerte Behandlungsdauer von den anderen. In verschiedenen Studien wurde der plasmadosisabhängige Konzentrationsanstieg der Caspasen-3 und -9 beim Apoptosenachweis in Tumorzellen auf molekularer Ebene bestätigt (111, 121). Auch bei Melanomzellen wurde nach KAP-Behandlung eine Caspase-abhängige Apoptoseinduktion nachgewiesen (122).

Im Vergleich mit existierender Literatur, die Seneszenz häufig als Reaktion auf niedrigere KAP-Dosen beschreibt, war in den vorgenommenen Untersuchungen für eine deutliche Zunahme Seneszenz-assoziiierter Gene genauso wie für die Apoptoseinduktion eine 5-minütige KAP-Behandlung erforderlich (43, 123). Das bestätigt die Hypothese, dass die benutzte Plasmaquelle „schwächer“ ist als Vergleichsgeräte in Bezug auf die Wirkung auf Tumorzellen.

Während bei der Zelllinie SCC-9 erst nach 5-minütiger KAP-Behandlung ein starker Anstieg in der γ H2AX-Expression verzeichnet werden konnte, zeichnete sich bei der Zelllinie A-431 schon nach 2 Minuten ein Anstieg ab, der mit höherer Behandlungszeit

nicht gesteigert werden konnte. In der existierenden Literatur wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass KAP-Behandlung in Tumorzellen DNA-Schäden verursacht, die durch γ H2AX-Phosphorylierung nachgewiesen werden können (123–125). Die Besonderheit dabei ist die erhöhte Empfindlichkeit von Tumorgewebe gegenüber KAP, somit die selektive Schädigung von Tumorzellen. Keidar et al. zeigten auf, dass sich bei malignen Zellen ein größerer Zellanteil in der Synthese-Phase, einem Schritt im Zellzyklus der Zellproliferation befindet. Somit wird der Zellzyklus durch KAP bei Tumorzellen stärker gehemmt. All das steht im direkten Zusammenhang mit dem Anstieg in der Expression von γ H2AX, welcher für gesteigerten oxidativen Stress durch DNA-Schäden in der S-Phase steht (126, 127). Um in der klinischen Praxis DNA-Schäden durch KAP an gesundem Gewebe zu vermeiden, müssen unbedingt noch Untersuchungen bezüglich der Dosierung vorgenommen werden, sodass DNA-Schäden möglichst zielgerichtet nur auf Tumorzellen gelenkt werden können.

Obwohl Dooley et al. durch DNA-Microarrays und qRT-PCR bereits zeigen konnten, dass die Biomarkerprofile für kutane und orale SCC-Zelllinien sehr ähnlich sind, wurden alle Expressionsanalysen tumorassoziierter Gene mit der Zelllinie A-431 und der Zelllinie SCC-9 durchgeführt (112). Es ist überwiegend eine ähnliche Tendenz beider Zelllinien in der Reaktion auf die KAP-Behandlung zu beobachten, allerdings zeichnen sich wie soeben beschrieben auch einzelne Abweichungen ab.

Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle			
Zelllinie:	A-431	SCC-9	SCC-15
Horizontale Migration am Spalt nach 2 min KAP	↔	↔	↔
Horizontale Migration am Spalt nach 5 min KAP	↓↓	↓↓	↓↓
Invasion (Boyden-Kammer) nach 2 min KAP	↓↓	↓	↓↓
Migration (Boyden-Kammer) nach 2 min KAP	↓↓	↓↓	↓
Apoptose (FACS) nach 2 min KAP	↔	↔	↔
Apoptose (FACS) nach 5 min KAP	↑↑	↑↑	↑↑
Apoptose (Caspase-3 Expression) nach 2 min KAP	↑	↔	n.a.
Apoptose (Caspase-3 Expression) nach 5 min KAP	↑↑	↑↑	n.a.
Apoptose (Caspase-7 Expression) nach 2 min KAP	↔	↔	n.a.
Apoptose (Caspase-7 Expression) nach 5 min KAP	↑↑	↑↑	n.a.
Apoptose (Caspase-9 Expression) nach 2 min KAP	↑	↔	n.a.
Apoptose (Caspase-9 Expression) nach 5 min KAP	↑	↔	n.a.
Seneszenz (p16 Expression) nach 2 min KAP	↔	↔	n.a.
Seneszenz (p16 Expression) nach 5 min KAP	↑	↑↑	n.a.
Seneszenz (p21 Expression) nach 2 min KAP	↔	↔	n.a.
Seneszenz (p21 Expression) nach 5 min KAP	↑↑	↑↑	n.a.
DNA-Schäden (H2AX Expression) nach 2 min KAP	↑	↔	n.a.
DNA-Schäden (H2AX Expression) nach 5 min KAP	↔	↑↑	n.a.

Abbildung 32: Übersicht zellbiologischer und molekularer Effekte von KAP

Die in der Abbildung dargestellte Tabelle zeigt mittels folgender Symbole: ↑↑ starker Anstieg, ↑ Anstieg, ↔ keine Veränderung, ↓ Reduktion, ↓↓ starke Reduktion und n.a. für nicht analysiert die entsprechenden Veränderungen von Plattenepithelkarzinomzellen gegenüber der Kontrolle. Unabhängig von der Zelllinie fällt in dieser Zusammenfassung auf, dass ausgenommen von den Boyden-Kammer-Versuchen nach 2 min KAP meist keine bis maximal eine geringe Veränderung nachgewiesen werden kann, während nach 5 min KAP überwiegend ein starker Anstieg bzw. eine starke Reduktion vorliegt.

5.4. Klinische Relevanz und Perspektiven

Im Rahmen dieser Dissertation konnte ein hemmender Einfluss von KAP auf das Migrations- und Invasionsverhalten sowie die Induktion von Apoptose, Seneszenz und DNA-Schäden bei PEK-Zellen nachgewiesen werden. Die biologische Wirkung kann dabei über die physikalischen Determinanten der Plasmaquelle reguliert werden. Auch wenn beispielsweise eine Zunahme an DNA-Schäden in gesundem Gewebe bei fehlgeschlagenem Reparaturmechanismus wiederum zu einer erhöhten Krebsdisposition führen kann, werden Risiken wie diese durch Studien, die eine selektive Wirksamkeit auf Tumorzellen bestätigen als weniger bedeutsam eingestuft. Die Auswirkungen von KAP auf normale Hautzellen war nicht Gegenstand der im

Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen, jedoch wird das Nutzen-Risiko-Verhältnis von KAP in therapeutischen Dosen in aktuellen Studien insgesamt als sehr positiv eingestuft. Diese *in-vitro* erlangten Erkenntnisse bezüglich der Wirkung von KAP liefern wertvolle Informationen für den *in-vivo* Einsatz. So bestätigen die stark reduzierte horizontale Migration am Spalt sowie die reduzierte Migrations- und Invasionsfähigkeit nach 5 min KAP das Eindämmen des Tumorwachstums und der Tumorausbreitung im Körper. Des Weiteren liefern die Untersuchungen bezüglich der Apoptose den Beleg für eine den Zelltod einleitende Wirkung von KAP, was eine Schrumpfung des Tumors begünstigen würde. Außerdem bestätigt eine steigende Seneszenz eine Einschränkung in der Tumorzellaktivität, was ein weiteres Fortschreiten der Tumorerkrankung hemmt. Gerade durch die anatomische Position stellt die Haut das ideale Organ für die KAP-Therapie dar. Somit sind auch Tumoren der Haut für alle Arten von Plasmaquellen sehr gut zugänglich. Die chirurgische Exzision des Tumors gilt aktuell laut Leitlinie als Standardtherapie, gelangt jedoch bei fortgeschrittenen PEK's an ihre Grenzen (16). Dieser Umstand in Kombination mit zunehmenden Resistenzentwicklungen gegenüber verbreiteten Zytostatika macht KAP für die kurative Anwendung in der Tumorthherapie so interessant (128). Verschiedene Publikationen bestätigen, dass die Entwicklung der Plasmageräte so weit fortgeschritten ist, dass ihr Einsatz in der klinischen Praxis bei angemessener Dosierung nicht mit signifikanten Nebenwirkungen verbunden ist. Um die Auswirkung von KAP auf normale Zellen zu definieren, wurden epidermale Keratinozyten sowie dermale Fibroblasten nach KAP-Behandlung beobachtet. Bei einer KAP-Anwendung unter 2 Minuten auf Keratinozyten und Fibroblasten folgte weder eine erhöhte Apoptose noch eine gesteigerte Zytotoxizität (56, 127, 129). Sinnvoll wäre, im Rahmen einer Sicherheitsstudie, die Auswirkungen der KAP-Behandlung mit dem plasma care® Prototyp auf normale epidermale Zellen (z.B. Keratinozyten) und dermale Zellen (z.B. Fibroblasten) inklusive Behandlungszeiten über 2 Minuten nochmal genauer zu analysieren, was im aktuellen Studiendesign allerdings nicht vorgesehen war.

Außerdem könnte KAP zusätzlich auch ein Zugewinn in der palliativen Therapie sein. Gegenüber KAP, wofür laut der S2k-Leitlinie „Rationaler therapeutischer Einsatz von kaltem physikalischem Plasma“ bei korrekter Anwendung keine unerwünschten Nebenwirkungen bekannt sind, geht die mitunter von Desideri et al. bei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen empfohlene palliative Radiotherapie gelegentlich mit

Nekrosen oder Inflammationen einher (113, 130, 131). Untersuchungen von Metelmann et al. bestätigen am Beispiel des Plattenepithelkarzinoms am Oropharynx, dass die KAP-Behandlung einen Wachstumsrückgang des Tumors sowie eine Reduktion des Leidensdrucks der Patienten bewirkt (132).

Weiteren Einsatz könnte KAP auch in Form von Kombinationstherapien finden. Die Kombination von KAP mit PDT zeigt sich in der Krebsforschung als sehr vielversprechend. Karami-Gadallo et al. untersuchten die Wirksamkeit von KAP sowie PDT mit ALA als Photosensibilisator an humanen Lungenkarzinomzellen sowohl getrennt voneinander als auch in der Kombinationstherapie. Dabei wurde nach Bestrahlung für 60 s eine Verbesserung der Wirksamkeit von 37 % gegenüber der alleinigen Therapie mit PDT und von 41 % im Vergleich zur alleinigen KAP-Behandlung nachgewiesen (133, 134). Insbesondere für die Behandlung von Tumoren, die sowohl mit KAP als auch mit PDT gut zu erreichen sind (beispielsweise Hauttumoren) stellen diese Ergebnisse einen interessanten Ansatz dar. Diesem geht aktuell auch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Sigrid Karrer in der Dermatologie am Universitätsklinikum Regensburg nach.

Zusammenfassend liegt die Perspektive von KAP in der Erweiterung und Ergänzung gängiger Therapien beim PEK. Die kurative Anwendung in-vivo erfordert allerdings weitere Untersuchungen zum Beispiel in Tiermodellen, um Wirkmechanismen final zu entschlüsseln. (59).

6. Zusammenfassung

Seit die selektive und schmerzfreie Abtötung von Tumorzellen ohne große Auswirkung auf das umliegende Gewebe bestätigt werden konnte, gilt kaltes atmosphärisches Plasma (KAP), ein teilionisiertes Gas, welches bei Raumtemperatur agiert als vielversprechender Therapieansatz für verschiedene Tumorerkrankungen. Bei der Erzeugung von KAP entstehen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, denen die Vermittlung einer tumorhemmenden Wirkung nachgewiesen werden konnte. Weiter wurde die Wirksamkeit von KAP bei der Behandlung aktinischer Keratosen (AK), die als Vorstufe des invasiven kutanen Plattenepithelkarzinoms gilt, bestätigt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der molekulare- und zelluläre Einfluss von KAP auf die oralen Plattenepithelkarzinom Zelllinien SCC-9 sowie SCC-15 und die kutane A-431 Zelllinie näher untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, die KAP-Behandlung mit dem plasma care® Prototyp für die ausgewählten Zelllinien im Hinblick auf das Antitumorpotential maximal effektiv zu gestalten. Allerdings muss für eine spätere therapeutische Anwendung immer auch bedacht werden, dass die Behandlung für normale Zellen möglichst schonend sein sollte. Auch die spenderabhängige Sensitivität der Zellen spielt bei der therapeutischen Wirksamkeit eine Rolle, und sollte im Rahmen dieser Untersuchungen durch Zeit- und Dosisstudien evaluiert werden. Mit Hilfe dieser präklinischen Forschungsarbeit sollten die molekularen- und zellulären Einflüsse von KAP auf SCC-Zellen besser verstanden werden, um so die Entwicklung einer effektiven KAP-Behandlung als innovativen therapeutischen Ansatz für das Plattenepithelkarzinom voranzutreiben.

Der Fokus der Untersuchungen lag dabei auf dem horizontalen Migrationsverhalten dieser Tumorzellen nach KAP-Behandlung am Spalt. Daneben wurde auch das vertikale Migrations- und Invasionsverhalten mittels Boyden-Kammer Assays untersucht. In Ergänzung wurde die Aktivierung von Apoptose- bzw. Seneszenz-Mechanismen nach KAP-Behandlung mittels FACS-Analytik und mit Hilfe von mRNA Expressionsanalysen von Apoptose- und Seneszenz-assoziierten Molekülen überprüft.

Die Ergebnisse dieser *in vitro* Arbeit zeigten eindeutig durch KAP induzierte Anti-Tumoreffekte auf. Diese konnten durch die für alle untersuchten Zelllinien einheitlich

stark reduzierte horizontale Migration am Spalt nach 5 min KAP-Behandlung bestätigt werden. Ergänzt wurde das Antitumorpotential durch die Boyden-Kammer Ergebnisse, welche bereits nach einer nur 2-minütigen KAP-Behandlung für alle untersuchten Zelllinien eine reduzierte Migrations- und Invasionsfähigkeit aufzeigten. Die durchflusszytometrischen- und Expressionsanalysen konnten belegen, dass eine 5-minütige KAP-Behandlung eine erhöhte Apoptose induziert. Somit wurde ein deutlicher Nachweis für Effekte der KAP-Behandlung auf die Viabilität der untersuchten Tumorzellen geliefert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass KAP in den untersuchten Tumorzellen zudem einen starken Anstieg von Seneszenz-induzierten Markern bewirkt. Eine allgemeine Auffälligkeit bei allen vorgenommenen Untersuchungen war die Abhängigkeit der KAP Effekte von der Dosis, die beim verwendeten plasma[®] care Prototyp über die Behandlungszeit reguliert wurde.

Die in dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Wirkung von KAP auf Plattenepithelkarzinomzellen bestätigen somit Mechanismen, die für die Abtötung von Tumorzellen sowie für die Einschränkung der Zellaktivität sprechen. Um all die Wirkmechanismen von KAP vollständig zu verstehen und das therapeutische Potenzial voll auszuschöpfen, sind allerdings weitere Anstrengungen in diesem aufstrebenden Bereich der Plasmamedizin erforderlich.

7. Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	aktinische Keratose
ALA	Aminolävulinsäure
Ampho-B	Amphotericin-B
AO	Acridine Orange
APPJ	Atmosphärendruck-Plasmajet
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BS	Binding Solution
cDNA	complementary DNA (dt.: komplementäre DNS)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DBD	Dielectric Barrier Discharge (dt.: dielektrische Barriereentladung)
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure (engl.: DNA = deoxyribonucleic acid)
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSBs	Doppelstrangbrüche
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (dt. epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanning
FKS	fetales Kälberserum
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HNSCC	Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom
HPV-Virus	Humanes Papillomavirus
H-Ras	Harvey Rat sarcoma virus
KAP	kaltes atmosphärisches Plasma (engl.: CAP = cold atmospheric plasma)

kHz	Kilohertz
kV	Kilovolt
LG	L-Glutamin
MAL	Methylaminolävulinat
min	Minuten
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (dt.: Boten RNS)
N	Stichprobenumfang
NMSC	Non-Melanoma Skin Cancer (dt.: nichtmelanozytäre Hauttumoren)
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
O ₃	Ozon
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (dt.: Polymerase-Kettenreaktion)
PDT	Photodynamische Therapie
PEK	Plattenepithelkarzinom (engl.: SCC = squamous cell carcinoma)
PI	Propidium Iodide
PS	Penicillin-Streptomycin
RNS	Ribonukleinsäure (engl.: RNA = ribonucleic acid)
RONS	Reactive Oxide and Nitrogen Species
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Real Time PCR
s	Sekunden
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SD	Standardabweichung
SMD	Surface Micro-Discharge (dt. = Oberflächenmikroentladung)
TNM-Systeme	Tumor Lymphknoten (lat. Nodus) Metastasen
UICC	Union for International Cancer Control

UV-Strahlung

Ultraviolettstrahlung

WB2

Wash Buffer 2

WHO

World Health Organization

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Progression von AK zum PEK	9
Abbildung 2: Einordnung von Plasma als vierter Aggregatzustand	13
Abbildung 3: Wirkkomponenten von KAP	15
Abbildung 4: Wirkung von KAP	16
Abbildung 5: Auswirkungen von KAP auf Tumorzellen.....	18
Abbildung 6: Anwendungsgebiete des plasma care®	21
Abbildung 7: Wirkleistungsüberprüfung der Plasmaelektrode	34
Abbildung 8: Ibbidi-8-Well-Slide für KAP-Zeitreihe in Doppelbestimmung.....	37
Abbildung 9: Positionierung der Culture Inserts im Zellkulturschälchen	38
Abbildung 10: Kontrollreihe Spaltschluss im Zeitverlauf	39
Abbildung 11: Vorgehen bei der Auswertung der horizontalen Migration am Spalt..	40
Abbildung 12: Aufbau Boyden-Kammer	41
Abbildung 13: Beispiel-Layout FACS-Analyse.....	46
Abbildung 14: Zellmorphologie der A-431 nach KAP-Behandlung	53
Abbildung 15: Zellmorphologie der SCC-9 nach KAP-Behandlung	53
Abbildung 16: Zellmorphologie der Mel Im nach KAP-Behandlung	54
Abbildung 17: Durchlichtmikroskopieaufnahmen Migration am Spalt der SCC-15 ...	55
Abbildung 18: Durchlichtmikroskopieaufnahmen Migration am Spalt der A-431	56
Abbildung 19: Durchlichtmikroskopieaufnahmen Migration am Spalt der SCC-9	57
Abbildung 20: Veränderung der Zellmorphologie direkt nach KAP-Behandlung.....	57
Abbildung 21: Graphische Darstellung der horizontalen Migration	60
Abbildung 22: Aufnahmen aus den Boyden-Kammer Migrationsversuchen	62
Abbildung 23: Aufnahmen aus den Boyden-Kammer Invasionsversuchen	63
Abbildung 24: Gegenüberstellung von Invasions- und Migrationsverhalten	66
Abbildung 25: Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie A-431	68
Abbildung 26: Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie SCC-9	69
Abbildung 27: Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie SCC-15	70
Abbildung 28: Gesamtauswertung der FACS-Analyse für die Zelllinie Mel Im	71
Abbildung 29: Expressionsanalyse Apoptose-assoziiierter Gene.....	73
Abbildung 30: Expressionsanalyse Seneszenz-assoziiierter Gene	74
Abbildung 31: Expressionsanalyse auf γ H2AX bezüglich DNA-Schäden.....	75
Abbildung 32: Übersicht zellbiologischer und molekularer Effekte von KAP	82

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Materialien.....	25
Tabelle 2: Substanzen.....	26
Tabelle 3: Geräte.....	28
Tabelle 4: Primerdesign.....	29
Tabelle 5: Software.....	31
Tabelle 6: Reverse Transkription Mastermix Zusammensetzung	50
Tabelle 7: qRT-PCR Mastermix Zusammensetzung	51

10. Literatur

1. Semmler ML, Bekeschus S, Schäfer M, Bernhardt T, Fischer T, Witzke K et al. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. *Cancers* 2020; 12(2):269.
doi: 10.3390/cancers12020269.
2. Dubuc A, Monsarrat P, Virard F, Merbahi N, Sarrette J-P, Laurencin-Dalichieux S et al. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review. *Therapeutic advances in medical oncology* 2018; 10:1758835918786475.
doi: 10.1177/1758835918786475.
3. Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S et al. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *British journal of cancer* 2011; 105(9):1295–1301.
doi: 10.1038/bjc.2011.386.
4. Zimmermann T, Staebler S, Taudte RV, Ünüvar S, Grösch S, Arndt S et al. Cold Atmospheric Plasma Triggers Apoptosis via the Unfolded Protein Response in Melanoma Cells. *Cancers* 2023; 15(4):1064.
doi: 10.3390/cancers15041064.
5. Schneider C, Gebhardt L, Arndt S, Karrer S, Zimmermann JL, Fischer MJM et al. Cold atmospheric plasma causes a calcium influx in melanoma cells triggering CAP-induced senescence. *Scientific reports* 2018; 8(1):10048.
doi: 10.1038/s41598-018-28443-5.
6. Schneider C, Arndt S, Zimmermann JL, Li Y, Karrer S, Bosserhoff AK. Cold atmospheric plasma treatment inhibits growth in colorectal cancer cells. *Biological chemistry* 2018; 400(1):111–122. doi: 10.1515/hsz-2018-0193.
7. Arisi M, Soglia S, Guasco Pisani E, Venturuzzo A, Gelmetti A, Tomasi C et al. Cold atmospheric plasma (CAP) for the treatment of actinic keratosis and skin field cancerization: clinical and high-frequency ultrasound evaluation. *Dermatology and Therapy* 2021; 11(3):855–866.
doi: 10.1007/s13555-021-00514-y.
8. Wirtz M, Stoffels I, Dissemond J, Schadendorf D, Roesch A. Actinic keratoses treated with cold atmospheric plasma. *Journal of the European Academy of*

- Dermatology and Venereology : JEADV 2018; 32(1):e37-e39.
doi: 10.1111/jdv.14465.
9. Werner R, Stockfleth E, Connolly S, Correia O, Erdmann R, Foley P et al. Evidence- and consensus-based (S3) Guidelines for the Treatment of Actinic Keratosis – International League of Dermatological Societies in cooperation with the European Dermatology Forum – Short version. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 2015; 29(11):2069-2079.
doi: 10.1111/jdv.13180.
 10. Vegter S, Tolley K. A network meta-analysis of the relative efficacy of treatments for actinic keratosis of the face or scalp in Europe. PloS one 2014; 9(6):e96829.
doi: 10.1371/journal.pone.0096829.
 11. Leiter U, Gutzmer R, Alter M, Ulrich C, Lonsdorf AS, Sachse MM et al. Kutanes Plattenepithelkarzinom. Der Hautarzt 2016; 67(11):857–866.
doi: 10.1007/s00105-016-3875-2.
 12. Sterry W, Stockfleth E. Maligne epitheliale Tumoren. In: Plewig G, Ruzicka T, Kaufmann R, Hertl M, Hrsg. Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. 6., überarb. und erw. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012 (vol. 2).
 13. Waldman A, Schmults C. Cutaneous squamous cell carcinoma. Hematology/Oncology Clinics of North America 2019; 33(1):1–12.
doi: 10.1016/j.hoc.2018.08.001.
 14. Leiter U, Keim U, Eigentler T, Katalinic A, Holleczek B, Martus P et al. Incidence, Mortality, and Trends of Nonmelanoma Skin Cancer in Germany. Journal of Investigative Dermatology 2017; 137(9):1860–1867.
doi: 10.1016/j.jid.2017.04.020.
 15. Singer S, Karrer S, Berneburg M. Modern sun protection. Current Opinion in Pharmacology 2019; 46:24–28. doi: 10.1016/j.coph.2018.12.006.
 16. Leiter U, Heppt MV, Steeb T, Amaral T, Bauer A, Becker JC et al. S3-Leitlinie „Aktinische Keratose und Plattenepithelkarzinom der Haut“ - Kurzfassung, Teil 2: Epidemiologie, chirurgische und systemische Therapie des Plattenepithelkarzinoms, Nachsorge, Prävention und Berufskrankheit. Journal der

- Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 2020; 18(4):400–413.
doi: 10.1111/ddg.14072_g.
17. Schmitz L, Oster-Schmidt C, Stockfleth E. Nichtmelanozytäre Hauttumoren - von der aktinischen Keratose bis zum Plattenepithelkarzinom. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 2018; 16(8):1002–1014.
doi: 10.1111/ddg.13614_g.
18. Babilas P, Landthaler M, Szeimies R-M. Die aktinische Keratose. *Der Hautarzt* 2003; 54(6):551-562. doi: 10.1007/s00105-003-0543-0.
19. Burda B, Schultz ES. Das kutane Plattenepithelkarzinom – ein Update. *Aktuelle Dermatologie* 2022; 48(04):155–61 [Stand: 07.10.2022]. Verfügbar unter: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/a-1666-3585.pdf>.
20. Rollison DE, Viarasio D, Amorrotu RP, Gheit T, Tommasino M. An Emerging Issue in Oncogenic Virology: the Role of Beta Human Papillomavirus Types in the Development of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Journal of virology* 2019; 93(7). doi: 10.1128/jvi.01003-18.
21. Lobl MB, Clarey D, Schmidt C, Wichman C, Wysong A. Analysis of mutations in cutaneous squamous cell carcinoma reveals novel genes and mutations associated with patient-specific characteristics and metastasis: a systematic review. *Archives of Dermatological Research* 2021; 314(7):711–718.
doi: 10.1007/s00403-021-02213-2.
22. Szeimies R-M, Karrer S. Photodynamische Therapie – Trends und neue Entwicklungen. *Der Hautarzt* 2021; 72(1):27–33.
doi: 10.1007/s00105-020-04737-6.
23. Szeimies R-M. Pain perception during photodynamic therapy: why is daylight PDT with methyl aminolevulinate almost pain-free? A review on the underlying mechanisms, clinical reflections and resulting opportunities. *Giornale italiano di dermatologia e venereologia: organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia* 2018; 153(6):793–799.
doi: 10.23736/s0392-0488.18.06011-x.

24. Eisemann N, Waldmann A, Geller AC, Weinstock MA, Volkmer B, Greinert R et al. Non-melanoma skin cancer incidence and impact of skin cancer screening on incidence. *Journal of Investigative Dermatology* 2014; 134(1):43–50. doi: 10.1038/jid.2013.304.
25. Haedersdal M, Erlendsson AM, Paasch U, Anderson RR. Translational medicine in the field of ablative fractional laser (AFXL)-assisted drug delivery: A critical review from basics to current clinical status. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2016; 74(5):981–1004. doi: 10.1016/j.jaad.2015.12.008.
26. Gellrich FF, Hüning S, Beissert S, Eigentler T, Stockfleth E, Gutzmer R et al. Medical treatment of advanced cutaneous squamous-cell carcinoma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2019; 33:38–43. doi: 10.1111/jdv.16024.
27. Schmale I. PD-1-Inhibitoren effektiv beim kutanen Plattenepithelkarzinom. *Onkologische Welt* 2021; 12(02):128. doi: 10.1055/a-1397-5114.
28. Metelmann H-R, Woedtke T, Weltmann K-D, Hrsg. *Plasmamedizin: Kaltplasma in der medizinischen Anwendung*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016. doi: 10.1007/978-3-662-52645-3. [Stand: 01.11.2022]. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-662-52645-3.pdf>.
29. Friedman PC. Cold atmospheric pressure (physical) plasma in dermatology: where are we today? *International Journal of Dermatology* 2020; 59(10):1171–1184. doi: 10.1111/ijd.15110.
30. Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Morfill G, Landthaler M, Shimizu I et al. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2011; 25(1):1-11. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x.
31. Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* 2017; 8(9):15977-15995. doi: 10.18632/oncotarget.13304.

32. Tan F, Wang Y, Zhang S, Shui R, Chen J. Plasma Dermatology: Skin Therapy Using Cold Atmospheric Plasma. *Frontiers in Oncology* 2022; 12:918484. doi: 10.3389/fonc.2022.918484.
33. Bunz O, Mese K, Funk C, Wulf M, Bailer SM, Piwowarczyk A et al. Cold atmospheric plasma as antiviral therapy - effect on human herpes simplex virus type 1. *The Journal of General Virology* 2020; 101(2):208–215. doi: 10.1099/jgv.0.001382.
34. Wiegand C, Beier O, Horn K, Pfuch A, Tölke T, Hipler U-C et al. Antimicrobial impact of cold atmospheric pressure plasma on medical critical yeasts and bacteria cultures. *Skin Pharmacology and Physiology* 2013; 27(1):25–35. doi: 10.1159/000351353.
35. Isbary G, Shimizu T, Li Y-F, Stolz W, Thomas HM, Morfill GE et al. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. *Expert Review of Medical Devices* 2013; 10(3):367–377. doi: 10.1586/erd.13.4.
36. Boeckmann L, Schäfer M, Bernhardt T, Semmler ML, Jung O, Ojak G et al. Cold Atmospheric Pressure Plasma in Wound Healing and Cancer Treatment. *Applied Sciences* 2020; 10(19):6898. doi: 10.3390/app10196898.
37. Gerling T, Weltmann KD. Einführung in Atmosphärendruck-Plasmaquellen für plasmamedizinische Anwendungen. In: Metelmann HR et al. *Plasmamedizin: Kaltplasma in der medizinischen Anwendung* 2016; 3–15. doi: 10.1007/978-3-662-52645-3_1.
38. Gan L, Jiang J, Duan JW, Wu XJZ, Zhang S, Duan XR et al. Cold atmospheric plasma applications in dermatology: A systematic review. *Journal of Biophotonics* 2021; 14(3):e202000415. doi: 10.1002/jbio.202000415.
39. Arndt S, Landthaler M, Zimmermann JL, Unger P, Wacker E, Shimizu T et al. Effects of cold atmospheric plasma (CAP) on β -defensins, inflammatory cytokines, and apoptosis-related molecules in keratinocytes in vitro and in vivo. *PLoS one* 2015; 10(3):e0120041. doi: 10.1371/journal.pone.0120041.
40. Keidar M, Yan D, Beilis II, Trink B, Sherman JH. Plasmas for Treating Cancer: Opportunities for Adaptive and Self-Adaptive Approaches. *Trends Biotechnology* 2018; 36(6):586–593. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.06.013.

41. Tan F, Fang Y, Zhu L, Al-Rubeai M. Cold atmospheric plasma as an interface biotechnology for enhancing surgical implants. *Critical reviews in biotechnology* 2021; 41(3):425–440. doi: 10.1080/07388551.2020.1853671.
42. Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *International journal of cancer* 2012; 130(9):2185–2194. doi: 10.1002/ijc.26252.
43. Arndt S, Wacker E, Li Y-F, Shimizu T, Thomas HM, Morfill GE et al. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Exp Dermatol* 2013; 22(4):284–289. doi:10.1111/exd.12127.
44. Isbary G, Shimizu T, Zimmermann JL, Heinlin J, Al-Zaabi S, Rechfeld M et al. Randomized placebo-controlled clinical trial showed cold atmospheric argon plasma relieved acute pain and accelerated healing in herpes zoster. *Clinical Plasma Medicine* 2014; 2(2):50–55. doi: 10.1016/j.cpme.2014.07.001.
45. Arndt S, Fadil F, Dettmer K, Unger P, Boskovic M, Samol C et al. Cold Atmospheric Plasma Changes the Amino Acid Composition of Solutions and Influences the Anti-Tumor Effect on Melanoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(15):7886. doi: 10.3390/ijms22157886.
46. Schmidt A, Bekeschus S, Jablonowski H, Barton A, Weltmann K-D, Wende K. Role of Ambient Gas Composition on Cold Physical Plasma-Elicited Cell Signaling in Keratinocytes. *Biophysical Journal* 2017; 112(11):2397–2407. doi: 10.1016/j.bpj.2017.04.030.
47. Yadav DK, Adhikari M, Kumar S, Ghimire B, Han I, Kim M-H et al. Cold atmospheric plasma generated reactive species aided inhibitory effects on human melanoma cells: an in vitro and in silico study. *Scientific reports* 2020; 10(1):3396. doi: 10.1038/s41598-020-60356-0.
48. Kluge S, Bekeschus S, Bender C, Benkhail H, Sckell A, Below H et al. Investigating the Mutagenicity of a Cold Argon-Plasma Jet in an HET-MN Model. *PLoS One* 2016; 11(9):e0160667. doi: 10.1371/journal.pone.0160667.
49. Maisch T, Bosserhoff AK, Unger P, Heider J, Shimizu T, Zimmermann JL et al. Investigation of toxicity and mutagenicity of cold atmospheric argon plasma.

- Environmental and Molecular Mutagenesis 2017; 58(3):172–177.
doi: 10.1002/em.22086.
50. Wende K, Bekeschus S, Schmidt A, Jatsch L, Hasse S, Weltmann KD et al. Risk assessment of a cold argon plasma jet in respect to its mutagenicity. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2016; 798-799:48–54.
doi: 10.1016/j.mrgentox.2016.02.003.
51. Hua D, Cai D, Ning M, Yu L, Zhang Z, Han P et al. Cold atmospheric plasma selectively induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in AR-independent prostate cancer cells. *Journal of Cancer* 2021; 12(19):5977.
doi: 10.7150/jca.54528.
52. Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Cheng X, Canady J, Sherman J et al. Principles of using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment. *Scientific reports* 2015; 5(1):18339. doi: 10.1038/srep18339.
53. Braný D, Dvorská D, Halašová E, Škovierová H. Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. *International journal of molecular sciences* 2020; 21(8):2932. doi: 10.3390/ijms21082932.
54. Wiegand C, Fink S, Beier O, Horn K, Pfuch A, Schimanski A et al. Dose- and Time-Dependent Cellular Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma Evaluated in 3D Skin Models. *Skin pharmacology and physiology* 2016; 29(5):257–265. doi: 10.1159/000450889.
55. Siu A, Volotskova O, Cheng X, Khalsa SS, Bian K, Murad F et al. Differential Effects of Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Malignant Glioma. *PLoS one* 2015; 10(6):e0126313. doi: 10.1371/journal.pone.0126313.
56. 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. *Advances in therapy* 2016; 33(6):894–909.
doi: 10.1007/s12325-016-0338-1.
57. Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, Fridman A, Gutsol A et al. Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines. *Plasma Chemistry and Plasma*

- Processing 2007; 27(2):163–176.
doi: 10.1007/s11090-007-9048-4.
58. Perrotti V, Caponio VCA, Lo Muzio L, Choi EH, Di Marcantonio MC, Mazzone M et al. Open Questions in Cold Atmospheric Plasma Treatment in Head and Neck Cancer: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23(18). doi: 10.3390/ijms231810238.
59. Bernhardt T, Semmler ML, Schäfer M, Bekeschus S, Emmert S, Boeckmann L. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019; 2019:3873928. doi: 10.1155/2019/3873928.
60. Isbary G, Zimmermann JL, Shimizu T, Li Y-F, Morfill GE, Thomas HM et al. Non-thermal plasma—More than five years of clinical experience. *Clinical Plasma Medicine* 2013; 1(1):19–23. doi: 10.1016/j.cpme.2012.11.001.
61. Kupke LS, Arndt S, Lenzer S, Metz S, Unger P, Zimmermann JL et al. Cold Atmospheric Plasma Promotes the Immunoreactivity of Granulocytes In Vitro. *Biomolecules* 2021; 11(6). doi: 10.3390/biom11060902.
62. Terraplasma. Was ist Kaltplasma? - Terraplasma; 2022 [Stand: 10.01.2023]. Verfügbar unter: <https://www.terraplasma-medical.com/kaltplasma/>.
63. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature review drug discovery* 2013; 12(12):931–947. doi: 10.1038/nrd4002.
64. Schmidt A, Woedtke T von, Bekeschus S. Periodic Exposure of Keratinocytes to Cold Physical Plasma: An In Vitro Model for Redox-Related Diseases of the Skin. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016; 2016:9816072. doi: 10.1155/2016/9816072.
65. Kuida K. Caspase-9. *The international journal of biochemistry and cell biology* 2000; 32(2):121–124. doi: 10.1016/s1357-2725(99)00024-2.
66. Böhm I, Träber F, Block W, Schild H. Molekulare Bildgebung von Apoptose und Nekrose - Zellbiologische Grundlagen und Einsatz in der Onkologie. *RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren* 2006; 178(3):263–271. doi: 10.1055/s-2005-858791.

67. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell* 2002; 108(2):153-164.
doi: 10.1016/S0092-8674(02)00625-6.
68. Ahn HJ, Kim KI, Kim G, Moon E, Yang SS, Lee J-S. Atmospheric-pressure plasma jet induces apoptosis involving mitochondria via generation of free radicals. *PloS one* 2011; 6(11):e28154. doi: 10.1371/journal.pone.0028154.
69. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of clinical investigation* 2018; 128(4):1238–1246. doi: 10.1172/JCI95148.
70. Krumm A. Apoptose und Nekrose in Echtzeit messen. *BIOspektrum* 2019; 25(4):412–413. doi: 10.1007/s12268-019-1071-5.
71. Majtnerová P, Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular biology reports* 2018; 45(5):1469–1478.
doi: 10.1007/s11033-018-4258-9.
72. Keidar M. Cold Atmosphere Plasma in Cancer Therapy. *APS Division of Plasma Physics Meeting Abstracts* 2012; 54:PI2.005. doi: 10.1063/1.4801516.
73. Dezest M, Chavatte L, Bourdens M, Quinton D, Camus M, Garrigues L et al. Mechanistic insights into the impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on human epithelial cell lines. *Sci Rep* 2017; 7:41163. doi: 10.1038/srep41163.
74. Jacob K, Bosserhoff AK, Wach F, Knüchel R, Klein EC, Hein R et al. Characterization of selected strongly and weakly invasive sublines of a primary human melanoma cell line and isolation of subtractive cDNA clones. *International journal of cancer* 1995; 60(5):668–675.
doi: 10.1002/ijc.2910600517.
75. Ressel L. Normal cell morphology in canine and feline cytology: An identification guide. John Wiley & Sons 2017. ISBN: 9781119278917.
76. Trepát X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration. *Comprehensive Physiology* 2012; 2(4):2369–2392. doi: 10.1002/cphy.c110012.
77. Plewa J-M, Yousfi M, Frongia C, Eichwald O, Ducommun B, Merbahi N et al. Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multi-cellular tumor spheroids. *New Journal of Physics* 2014; 16(4):043027.
doi: 10.1088/1367-2630/16/4/043027.

78. Nitsch A. Einfluss von kaltem atmosphärischem Plasma auf Nierenzellkarzinomzellen 2021 [Stand: 11.06.2023]. <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:gbv:9-opus-43930>.
79. Stephens D, Allan Victoria. Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *science* 2023; 300(5616):82–86. doi: 10.1126/science.1082160.
80. Kim C-H, Kwon S, Bahn JH, Lee K, Jun SI, Rack PD et al. Effects of atmospheric nonthermal plasma on invasion of colorectal cancer cells. *Applied physics letters* 2010; 96(24):243701. doi: 10.1063/1.3449575.
81. Chen H-C. Boyden chamber assay. *Cell migration: developmental methods and protocols* 2005; 294:15–22. doi: 10.1385/1-59259-860-9:015.
82. Falasca M, Raimondi C, Maffucci T. Boyden chamber. *Cell migration: developmental methods and protocols* 2011; 769:87–95. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_7.
83. Guy J-B, Espenel S, Vallard A, Battiston-Montagne P, Wozny A-S, Ardail D et al. Evaluation of the Cell Invasion and Migration Process: A Comparison of the Video Microscope-based Scratch Wound Assay and the Boyden Chamber Assay. *Journal of Visualized Experiments* 2017; (129). doi: 10.3791/56337.
84. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of Visualized Experiments* 2014; (88):e51046. doi: 10.3791/51046.
85. Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. Cell Migration: An Overview. In: *Cell Migration: Developmental methods and protocols*; Humana Press 2011. 1–24. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_1.
86. Ketterlinus R, Schwengberg S, Zhao L. Inflammation und Metastasierung von Tumorgeweben. *BIOSpektrum* 2015; 21(3):308–310. doi: 10.1007/s12268-015-0579-6.
87. Suwanna K, Ratchaporn S, La-Onghong V. Effect of Aloe resin on cell migration between Scratch and Boyden chamber assays. *Journal of Medicinal Plants Research* 2020; 14(8):366–372. doi: 10.5897/JMPR2020.6981.
88. Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Current opinion in genetics & development* 2005; 15(1):87–96. doi: 10.1016/j.gde.2004.12.002.

89. Kleinman HK, Jacob K. Invasion assays. *Current Protocols in Cell Biology* 2001; Chapter 12:Unit 12.2. doi: 10.1002/0471143030.cb1202s00.
90. Marshall J. Transwell® Invasion Assays. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*; Humana Press 2011. 97–110.
doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_8.
91. Wallberg F, Tenev T, Meier P. Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Cold Spring Harbor Protocols* 2016; 2016(4):pdb.prot087387. doi: 10.1101/pdb.prot087387.
92. Chang JW, Kang SU, Shin YS, Kim KI, Seo SJ, Yang SS et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: Involvement of DNA-damage-triggering sub-G(1) arrest via the ATM/p53 pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014; 545:133–140.
doi: 10.1016/j.abb.2014.01.022.
93. Weaver RF. *Molecular biology*. 5. ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2011. ISBN: 978-0-0713-1686-6.
94. Berg JM, Tymoczko JL et al. *Stryer Biochemie*. 8. Aufl. Berlin; Springer Spektrum 2018. ISBN: 978-3662546192.
95. Huang W, Hickson LJ, Eirin A, Kirkland JL, Lerman LO. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nature Reviews Nephrology* 2022; 18(10):611–627. doi: 10.1038/s41581-022-00601-z.
96. Sikora E, Bielak-Żmijewska A, Mosieniak G. Czym jest i czym nie jest starzenie komórki? *Postepy Biochemii* 2018; 64(2):110–118.
doi: 10.18388/pb.2018_120.
97. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, Guevara RL de, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell biology* 2013; 14:32. doi: 10.1186/1471-2121-14-32.
98. Wang Y, Tjandra N. Structural insights of tBid, the caspase-8-activated Bid, and its BH3 domain. *Journal of Biological Chemistry* 2013; 288(50):35840–35851. doi: 10.1074/jbc.M113.503680.
99. Kuo LJ, Yang L-X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 2008; 22(3):305–309. PMID: 18610740.

100. Kreuzer K-A, Lass U, Landt O, Nitsche A, Laser J, Ellerbrok H et al. Highly Sensitive and Specific Fluorescence Reverse Transcription-PCR Assay for the Pseudogene-free Detection of β -Actin Transcripts as Quantitative Reference. *Clinical Chemistry* 1999; 45(2):297–300. doi: 10.1093/clinchem/45.2.297.
101. Gelbrich N, Stope MB, Burchardt M. Kaltes atmosphärisches Plasma für die urologische Tumorthherapie. *Urologe* 2019; 58(6):673–679. doi: 10.1007/s00120-018-0754-8.
102. Doccheck M. Reverse Transkription - DocCheck. DocCheck Community GmbH 19.02.2015 [Stand: 02.02.2023]. https://flexikon.doccheck.com/de/Reverse_Transkription.
103. Reverse Transcription Reaction Setup | Thermo Fisher Scientific - DE; 2023 [Stand: 20.06.2023]. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-setup.html>.
104. Müller H-J. PCR - Polymerase-Kettenreaktion. 2nd ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. [Stand: 20.06.2023] <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=4213053>.
105. Éva Mészáros. qPCR: Wie SYBR® Green und TaqMan® real-time PCR Assays funktionieren 2022.
106. Singh C, Roy-Chowdhuri S. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Clinical Applications of PCR: Humana Press, New York, NY; 2016. 161–176.*
107. Janiszewska M, Primi MC, Izzard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2020; 295(8):2495–2505. doi: 10.1074/jbc.REV119.007759.
108. Braný D, Dvorská D, Halašová E, Škovierová H. Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(8):2932. doi: 10.3390/ijms21082932.
109. Vermeylen S, Waele J de, Vanuytsel S, Backer J de, van der Paal J, Ramakers M et al. Cold atmospheric plasma treatment of melanoma and glioblastoma cancer cells. *Plasma Processes and Polymers* 2016; 13(12):1195–1205. doi: 10.1002/ppap.201600116.

110. 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(9):e73741. doi: 10.1371/journal.pone.0073741.
111. Wang Y, Mang X, Li X, Cai Z, Tan F. Cold atmospheric plasma induces apoptosis in human colon and lung cancer cells through modulating mitochondrial pathway. *Frontiers in Cell Developmental Biology* 2022; 10:915785. doi: 10.3389/fcell.2022.915785.
112. Dooley TP, Reddy SP, Wilborn TW, Davis RL. Biomarkers of human cutaneous squamous cell carcinoma from tissues and cell lines identified by DNA microarrays and qRT-PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 306(4):1026–1036. doi: 10.1016/S0006-291X(03)01099-4.
113. Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Rationaler therapeutischer Einsatz von kaltem physikalischem Plasma 2022; (Version 1.0) [Stand: 29.06.2023]. https://register.awmf.org/assets/guidelines/007-107I_Rationaler-therapeutischer-Einsatz-von-kaltem-physikalischem-Plasma_2022-02.pdf.
114. Metelmann H-R, Woedtke T von, Weltmann K-D, Emmert S, Hrsg. Textbook of Good Clinical Practice in Cold Plasma Therapy: Springer, Cham; 2022.
115. DIN Deutsches Institut für Normung e. V. Geschäftsplan: DIN SPEC 91315 rev: Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen; 2023 [Stand: 09.07.2023]. <https://www.din.de/de/forschung-und-innovation/din-spec/alle-geschaeftsplaene/wdc-beuth:din21:366900961>.
116. Recek N, Cheng X, Keidar M, Cvelbar U, Vesel A, Mozetic M et al. Effect of cold plasma on glial cell morphology studied by atomic force microscopy. *PloS one* 2015; 10(3):e0119111. doi: 10.1371/journal.pone.0119111.
117. Koensgen D, Besic I, Gumbel D, Kaul A, Weiss M, Diesing K et al. Cold Atmospheric Plasma (CAP) and CAP-Stimulated Cell Culture Media Suppress Ovarian Cancer Cell Growth - A Putative Treatment Option in Ovarian Cancer Therapy. *Anticancer Research* 2017; 37(12):6739–6744. doi: 10.21873/anticancer.12133.

118. Li X, Sun T, Zhang X, Hou C, Shen Q, Wang D et al. Low temperature plasma suppresses proliferation, invasion, migration and survival of SK-BR-3 breast cancer cells. *Molecular Biology Reports* 2023; 50(3):2025–2031.
doi: 10.1007/s11033-022-08026-4.
119. Welz C, Emmert S, Canis M, Becker S, Baumeister P, Shimizu T et al. Cold Atmospheric Plasma: A Promising Complementary Therapy for Squamous Head and Neck Cancer. *PloS one* 2015; 10(11):e0141827.
doi: 10.1371/journal.pone.0141827.
120. Graves DB. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2012; 45(26):263001.
doi: 10.1088/0022-3727/45/26/263001.
121. Weiss M, Gumbel D, Gelbrich N et al. Inhibition of Cell Growth of the Prostate Cancer Cell Model LNCaP by Cold Atmospheric Plasma. *In Vivo* 2015; 29(5):611–616. PMID: 26359422.
122. Ratovitski EA, Cheng X, Yan D, Sherman JH, Canady J, Trink B et al. Anti-Cancer Therapies of 21st Century: Novel Approach to Treat Human Cancers Using Cold Atmospheric Plasma. *Plasma Processes and Polymers* 2014; 11(12):1128–1137. doi: 10.1002/ppap.201400071.
123. Motaln H, Recek N, Rogelj B. Intracellular Responses Triggered by Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Media in Cancer Cells. *Molecules* 2021; 26(5):1336. doi: 10.3390/molecules26051336.
124. Vaquero J, Judée F, Vallette M, Decauchy H, Arbelaiz A, Aoudjehane L et al. Cold-Atmospheric Plasma Induces Tumor Cell Death in Preclinical In Vivo and In Vitro Models of Human Cholangiocarcinoma. *Cancers* 2020; 12(5):1280.
doi: 10.3390/cancers12051280.
125. Bekeschus S, Schütz CS, Nießner F, Wende K, Weltmann K-D, Gelbrich N et al. Elevated H2AX Phosphorylation Observed with kINPen Plasma Treatment Is Not Caused by ROS-Mediated DNA Damage but Is the Consequence of Apoptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019; 2019:8535163.
doi: 10.1155/2019/8535163.

126. Guerrero-Preston R, Ogawa T, Uemura M, Shumulinsky G, Valle BL, Pirini F et al. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2014; 34(4):941–946. doi: 10.3892/ijmm.2014.1849.
127. Keidar M, Shashurin A, Volotskova O, Ann Stepp M, Srinivasan P, Sandler A et al. Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Physics of Plasmas* 2013; 20(5). doi: 10.1063/1.4801516.
128. Facompre N, Nakagawa H, Herlyn M, Basu D. Stem-like cells and therapy resistance in squamous cell carcinomas. *Advances in pharmacology* 2012; 65:235–265. doi: 10.1016/B978-0-12-397927-8.00008-7.
129. Terefinko D, Dzimitrowicz A, Bielawska-Pohl A, Klimczak A, Pohl P, Jamroz P. Biological Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Skin Cancer. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 2021; 41(2):507–529. doi: 10.1007/s11090-020-10150-7.
130. Desideri I, Becherini C, Belgioia L, Merlotti A, Ciccone LP, Franzese C et al. Palliative radiotherapy in older adults with head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *Oral Oncology* 2021; 119:105355. doi: 10.1016/j.oraloncology.2021.105355.
131. Ishaq M, Evans MM, Ostrikov KK. Effect of atmospheric gas plasmas on cancer cell signaling. *Int J Cancer* 2014; 134(7):1517–1528. doi: 10.1002/ijc.28323.
132. Metelmann H-R, Seebauer C, Miller V, Fridman A, Bauer G, Graves DB et al. Clinical experience with cold plasma in the treatment of locally advanced head and neck cancer. *Clinical Plasma Medicine* 2018; 9:6–13. doi: 10.1016/j.cpme.2017.09.001.
133. Karami-Gadallo L, Ghoranneviss M, Ataie-Fashtami L, Pouladian M, Sardari D. Enhancement of cancerous cells treatment by applying cold atmospheric plasma and photo dynamic therapy simultaneously. *Clinical Plasma Medicine* 2017; 7-8:46–51. doi: 10.1016/j.cpme.2017.08.002.
134. Braný D, Dvorská D, Strnádel J, Matáková T, Halašová E, Škovierová H. Effect of Cold Atmospheric Plasma on Epigenetic Changes, DNA Damage,

and Possibilities for Its Use in Synergistic Cancer Therapy. International Journal of Molecular Sciences 2021; 22(22):12252.
doi: 10.3390/ijms222212252.

Danksagung

Nachfolgend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg meiner Promotion unterstützt und begleitet haben.

Zunächst ein ausgesprochen großer Dank an meine Doktormutter, Prof. Dr. Sigrid Karrer, für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ich möchte mich für die freundliche und wertschätzende Unterstützung, sowie die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Erstellung der Dissertation bedanken.

Ein aufrechtes Dankeschön gilt auch Dr. rer. nat. Michael Gruber, dem ich die Vermittlung des Themas verdanke. Gerade bei anfänglichen Schwierigkeiten konnte ich immer auf konstruktive Diskussionen und unerschöpfliche Geduld zählen.

Des Weiteren möchte mich auch bei PD Dr. rer. nat. Stephanie Arndt für ihre kompetente Unterstützung bedanken. Die zahlreichen Gespräche, in denen wertvolle Ideen entstanden und das Korrekturlesen der Dissertation waren eine große Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt Petra Unger, für die geduldige Einarbeitung in die Zellkultur und viele andere labortechnische Methoden. Ihr großes Engagement und die fortwährende Bereitschaft auf all meine Fragen Antworten und für all meine Probleme Lösungen zu finden, haben wesentlich zum Gelingen der Experimente beigetragen.

Zudem möchte ich mich bei Irina, Teodora, Bernadette, Judith und allen anderen Mitgliedern des Forschungslabors für Dermatologie für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Eure Hilfsbereitschaft war mir in vielen ratlosen Momenten eine wesentliche Stütze.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, die mir das Studium erst ermöglicht hat, und meinem Freund Marco bedanken. Ihr habt mich mit grenzenlosem Rückhalt und großem Verständnis immer unterstützt. Danke, dass ihr immer an mich glaubt und mich bei der Verwirklichung meiner Ziele unterstützt.

Erklärung zum Promotionsverfahren

Nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Sabrina Hehenberger, geboren am 11. Mai 1998 in Grieskirchen

Ich erkläre,

- dass ich den Doktorgrad der Zahnmedizin nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe.
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des zahnmedizinischen Doktorgrades zugelassen bin.
- dass ich die zahnmedizinische Doktorprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe.

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen.
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hemau, 16. Mai 2024

Sabrina Hehenberger