

Aus der Hautklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Wirkung von kaltem atmosphärischem Plasma auf die Funktion von Zellen des
malignen Melanoms sowie CD3⁺T-Zellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Isabelle Marie-Sophie Gehringer
aus Mannheim

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

08. Dezember 2020

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 ZIEL DER ARBEIT.....	2
2 LITERATURDISKUSSION	3
2.1 DAS IMMUNSYSTEM	3
2.1.1 <i>Das angeborene Immunsystem</i>	3
2.1.2 <i>Das erworbene Immunsystem</i>	4
2.1.3 <i>Immunität bei Malignomen.....</i>	6
2.2 MALIGNES MELANOM	7
2.2.1 <i>Definition und Epidemiologie</i>	7
2.2.2 <i>Risikofaktoren und Pathogenese</i>	8
2.2.3 <i>Klinik und Stadieneinteilung</i>	9
2.2.4 <i>Therapie.....</i>	11
2.3 KALTES ATMOSPHERISCHES PLASMA	13
2.3.1 <i>Grundlagen.....</i>	14
2.3.2 <i>Unterschiedliche Arten von Plasma</i>	14
2.3.3 <i>Zusammensetzung und biologische Wirkkomponenten von KaP</i>	16
2.3.4 <i>Plasma-Anwendung in der Medizin</i>	21
3 MATERIAL UND METHODEN	28
3.1 MATERIAL	28
3.1.1 <i>Laborgeräte.....</i>	28
3.1.2 <i>Materialien</i>	29
3.1.3 <i>Substanzen</i>	31
3.1.4 <i>Antikörper.....</i>	33
3.1.5 <i>Puffer und Lösungen.....</i>	33
3.1.6 <i>Medien.....</i>	34
3.1.7 <i>Verwendete Zelllinien</i>	34
3.2 METHODEN	35
3.2.1 <i>Kultivierung der Melanom-Zelllinien</i>	35
3.2.2 <i>Arbeiten mit humanen Blutzellen</i>	35
3.2.3 <i>CFSE-Markierung von Melanomzellen und isolierten CD3⁺ T-Zellen</i>	37
3.2.4 <i>Bestimmung der Zellzahl</i>	38

3.2.5	<i>Plasmabehandlung</i>	38
3.2.6	<i>Datenerhebung</i>	40
3.2.7	<i>Statistische Auswertung</i>	46
4	ERGEBNISSE	48
4.1	ERGEBNISSE DER MELANOMZELL-VERSUCHE.....	48
4.1.1	<i>Einfluss von KaP auf die Morphologie von Melanomzellen</i>	48
4.1.2	<i>Wirkung von KaP auf die metabolische Aktivität von Melanomzellen</i>	51
4.1.3	<i>Wirkung von KaP auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten von Melanomzellen</i>	53
4.1.4	<i>Ko-Kulturen aus Antioxidantien und KaP-exponierten Melanomzellen</i>	56
4.1.5	<i>Wirkung von KaP auf die Genexpression von Melanomzellen</i>	64
4.2	ERGEBNISSE DER CD3 ⁺ T-ZELL-VERSUCHE.....	69
4.2.1	<i>Wirkung von KaP auf die Komposition von CD3⁺T-Zellen</i>	69
4.2.2	<i>Wirkung von KaP auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten von CD3⁺T-Zellen</i>	71
4.2.3	<i>Ko-Kulturen aus Antioxidantien und KaP-exponierten CD3⁺T-Zellen</i>	75
4.2.4	<i>Wirkung von KaP auf die Genexpression von CD3⁺T-Zellen</i>	82
5	DISKUSSION	86
6	ZUSAMMENFASSUNG	96
7	LITERATURVERZEICHNIS	98
8	DANKSAGUNG	122
9	LEBENS LAUF	123

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BV-711	Brilliant Violet 711 Konjugat
CD	Cluster of Differentiation
CDKN2a	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
cm	Zentimeter
CRT	Calretikulin
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4
DAMPs	Schädigungsassoziierte molekulare Muster
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBD	Phosphatgepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz-basierte Zellsortierung
FCS	Fetales Serum vom Kalb
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
HIF1a	Hypoxie induzierter Faktor
HSA	Humanes Serum Albumin
ICD	Immunologisch-induzierter Zelltod
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
IOD	Indolamin-2,3-Dioxygenase
KaP	Kaltes atmosphärisches Plasma
MACS	Magnetische Zelltrennung
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MM	Malignes Melanom

mRNA	messenger-RNA
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PD-1	Programmierter Zelltod-assoziiertes Protein
PD-L1	Ligand 1 für programmierter Zelltod-assoziiertes Protein
PFA	Paraformaldehyd
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RONS	Sauerstoff- und Stickstoffradikale
ROS/RNS	Sauerstoff-/Stickstoffradikale
ROX	Carboxy-X-Rhodamine
SD	Standardabweichung
sek	Sekunde
SSC	Seitwärtsstreulicht
TH1/2	T-Helferzellen Typ1/Typ2
TNF- β	Tumornekrosefaktor- β
TZR	T-Zell-Rezeptor
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromol

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung über die Änderung der verschiedenen Aggregatzustände durch Energiezufuhr.....	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung heißes Plasma und kaltes Plasma.....	15
Abbildung 3: Publikationszahlen von KaP in der Krebstherapie	23
Abbildung 4: PlasmaJet PM-10 Heuermann HF-Technik GmbH	29
Abbildung 5: Dichtegradientenzentrifugation	36
Abbildung 6: Versuchsaufbau	40
Abbildung 7: beispielhafter Resazurin-Test	41
Abbildung 8: Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop der Melanomzellen MaMel-19 nach Plasmabehandlung zur Untersuchung morphologischer Veränderungen (Maßstabskala 400 µm).....	49
Abbildung 9: Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop der Melanomzellen UKRV-15a nach Plasmabehandlung zur Untersuchung morphologischer Veränderungen (Maßstabskala 400 µm).....	50
Abbildung 10: Veränderungen der metabolischen Aktivität (Resazurin-Test) von Melanomzellen unter dem Einfluss von KaP.....	52
Abbildung 11: Veränderungen der Vitalität bei Melanomzellen durch den Einfluss von KaP	54
Abbildung 12: Veränderungen des Proliferationsverhaltens von Melanomzellen durch den Einfluss von KaP.....	55
Abbildung 13: Antioxidantien-Test Melanomzellen– Naturstoff-Lösungen und ihre Auswirkungen auf Melanomzellen.....	57
Abbildung 14: Veränderungen der Zellvitalität von Melanomzellen nach Antioxidantien-Zugabe sowie anschließenden KaP-Behandlungen.....	60
Abbildung 15: Veränderungen des Proliferationsverhaltens von Melanomzellen nach Antioxidantien-Zugabe sowie anschließenden KaP-Behandlungen	63
Abbildung 16: Expressionsanalysen mittels RT-qPCR der Melanom-Zelllinie MaMel-19	65
Abbildung 17: Expressionsanalysen mittels RT-qPCR der Melanom-Zelllinie UKRV-15a.....	67
Abbildung 18: Beispielhafte FACS-Analyse über die Reinheit isolierter CD3 ⁺ T-Zellen gewonnen aus PBMCs	69
Abbildung 19: Wirkung von KaP auf die Komposition und Vitalität von CD3 ⁺ -Immunzellen..	70
Abbildung 20: Veränderungen der Vitalität von CD3 ⁺ T-Zellen durch den Einfluss von KaP...	72

Abbildung 21: Veränderungen des Proliferationsverhaltens durch den Einfluss von KaP	74
Abbildung 22: Antioxidantien-Test CD3 ⁺ T-Zellen – Naturstoff-Lösungen und ihre Auswirkungen auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten	75
Abbildung 23: Kokultur Veränderungen der Zellvitalität von CD3 ⁺ T-Zellen nach der Zugabe von Antioxidantien sowie anschließender KaP-Behandlung.....	77
Abbildung 24: Veränderungen des Proliferationsverhaltens von CD3 ⁺ T-Zellen nach der Zugabe von Antioxidantien sowie anschließender KaP-Behandlung	79
Abbildung 25: Messungen der Vitalität von KaP-exponierten CD3 ⁺ T-Zellen und der Zugabe der Naturstoff-Lösung Kaffeesäure 10 µM zu zwei Zeitpunkten	81
Abbildung 26: Expressionsanalysen mittel RT-qPCR von CD3 ⁺ T-Zellen	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung MM	10
Tabelle 2: Antioxidantien	18
Tabelle 3: Verwendete Antioxidantien	21
Tabelle 4: Geräte-Liste	28
Tabelle 5: Materialien-Liste	29
Tabelle 6: Substanzen-Liste.....	31
Tabelle 7: verwendete Antikörper	33
Tabelle 8: Antikörper zur T-Zellaktivierung.....	33
Tabelle 9: verwendete Lösungen und Puffer	33
Tabelle 10: Reaktionsaufbau cDNA-Synthese	44
Tabelle 11: Reaktionsablauf cDNA-Synthese	44
Tabelle 12: Reaktionsaufbau qRT-PCR	45

1 Einleitung

Auf der Suche nach zukunftsorientierten Behandlungsmöglichkeiten von Krebs steht kaltes atmosphärisches Plasma (KaP) in der jüngsten Vergangenheit immer mehr im Fokus medizinischer Krebsforschung. Gleichzeitig beschränkt sich die klinische Anwendung von KaP derzeit auf die Behandlung von chronischen Wunden und Ulzera. Hier konnten positive Effekte von KaP auf die Wundreinigung, aber auch immunmodulierende Effekte erzielt werden. Es häufen sich deshalb Untersuchungsansätze, in denen eine mögliche breitere Anwendung von KaP in der Krebstherapie untersucht wird.

Einer dieser Anwendungsmöglichkeiten ist die plasmamedizinische Behandlung von malignen Melanomen (MM), deren Inzidenzrate seit Jahren eine steigende Tendenz aufweist. Zwar erfolgt die Diagnose der Erkrankung in vielen Fällen in einem frühen Erkrankungsstadium, jedoch zählt das maligne Melanom aufgrund seiner frühen hämatogenen und lymphogenen Metastasierung zu den aggressiven Krebserkrankungen. Die Therapiemöglichkeiten haben sich in den vergangenen Jahren seit dem Einsatz von BRAF-/MEK- und Immuncheckpoint-Inhibitoren besonders im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium zwar erweitert, Resistenzen und starke Nebenwirkungen dieser Systemtherapien bilden jedoch noch immer eine große therapeutische Herausforderung. So ist die Weiter- und Neuentwicklung von Therapiemöglichkeiten ein wichtiger Bestandteil der Plasmaforschung geworden.

Das große Potenzial von KaP in der Krebstherapie konnte in einer Reihe von *in vitro* Versuchen, bei denen eine Vielzahl verschiedenster Zellen zum Einsatz kam, bereits belegt werden. In diesem Zuge wurden auch einige Erkenntnisse über die biologischen Wirkkomponenten von KaP gewonnen. Im Rahmen dieser Versuche wurden neben verschiedenen Krebszelllinien auch gesunde und immunmodulierende Zellen bestrahlt. Letztere spielen bei der Entstehung und Bekämpfung von Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle und können dabei helfen, immunologische Konsequenzen einer KaP-Behandlung besser abschätzen zu können.

Um die Praktikabilität und Sicherheit bei einer möglichen therapeutischen Anwendung garantieren zu können, ist es wichtig, die Wirkmechanismen und Wirkkomponenten von KaP genau zu untersuchen und sämtliche offene Fragen bezüglich der Interaktion von KaP und biologischem Gewebe zu klären.

1.1 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von KaP auf humane Melanom- und Immunzellen und damit die Erforschung möglicher Anwendungspotentiale von KaP bei der Therapie des malignen Melanoms. Durch *in vitro* Versuche mit ausgewählten Zellen, soll daher (i) der biologische Einfluss von KaP auf die Morphologie und die metabolische Aktivität von Melanomzellen sowie auf das Proliferationsverhalten und die Vitalität von Melanom- und Immunzellen untersucht werden. Da die genaue Wirkung von chemischen und physikalischen Komponenten des KaP noch nicht abschließend geklärt werden konnten und in einigen Publikationen die in diesem Zusammenhang wichtige Rolle von reaktiven Radikalen (RONS) diskutiert wird, soll zudem durch die Zugabe von Antioxidantien (Naturstoff-Lösungen: Kaffeesäure, Rutin-Hydrat und Resveratol) (ii) der biologische Effekt des KaP auf die Zellen reduziert und (iii) mittels Genexpressionsanalysen Aufschluss über die genaue Wirkungsweise von KaP erlangt werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems besteht im Schutz des Körpers gegen äußere Einflüsse, in der Überwachung der Homöostase und dem Eliminieren von geschädigten Zellen. Es bildet ein interaktives Netzwerk bestehend aus Zellen, löslichen Molekülen, dem lymphatischen System, dem Knochenmark, dem Thymus und der Milz. Unterschieden wird zwischen dem angeborenen und dem erworbenen/adaptiven Immunsystem. Der Schutz vor schädigenden Einflüssen geschieht auf verschiedenen Ebenen, wobei angeborenes und adaptives Immunsystem Hand in Hand zusammenarbeiten.¹

2.1.1 *Das angeborene Immunsystem*

Das angeborene Immunsystem kann innerhalb von Minuten oder Stunden auf unerwünschte Eindringlinge reagieren. Es besteht aus zellulären Komponenten und gelösten Plasmaprotein-Komponenten. Im Zuge einer Aktivierung wird eine Entzündungsreaktion im Zielgewebe ausgelöst.

Auf der Oberfläche von sogenannten Wächterzellen befinden sich verschiedenste angeborene Erkennungsrezeptoren, die Mediatoren und Botenstoffe binden. Kommt es zu einer solchen Bindung, werden die Wächterzellen angeregt. Wächterzellen können entweder direkt durch Effektor-Aktivitäten wie beispielsweise Phagozytose oder indirekt durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren die Immunantwort voranbringen. Wichtige Entzündungsmediatoren sind signalvermittelnde Chemokine und Zytokine. Zu den Wächterzellen des angeborenen Immunsystems gehören unter anderem Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und neutrophile Granulozyten.²

Eine Schlüsselrolle beim Zusammenspiel von angeborenem und adaptivem Immunsystem nehmen sogenannte Antigenpräsentierende Zellen (APC) ein. Durch Phagozytose oder Pinozytose kontrollieren APC den „Antigenstatus“ des umgebenden Extrazellulärraums. Antigene sind Substanzen, die durch das Immunsystem erkannt werden und wiederum zur Einleitung einer Immunreaktion führen können. Meist handelt es sich bei Antigenen um komplexe Moleküle wie Proteine, Lipide oder Kohlenhydrate. Mit Hilfe des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) erfolgt die Präsentation dieser prozessierten Antigene auf der Zelloberfläche. Unterscheiden lässt sich bei den MHC-Rezeptoren zwischen

dem MHC-I-Rezeptor und dem MHC-II-Rezeptor. Auf die Bindung des Antigens an einen passenden Antigen-Rezeptor und eine damit verbundene Aktivierung der Zellen des adaptiven Immunsystems wird im Folgenden genauer eingegangen.

2.1.2 Das erworbene Immunsystem

Die Wirkung des erworbenen/adaptiven Immunsystems entwickelt sich langsamer, ist jedoch in seiner Wirkweise im Vergleich zum angeborenen Immunsystem bei weitem spezifischer. Die zellulären Bestandteile des adaptiven Immunsystems entwickeln sich im Laufe des Lebens und spiegeln sich in einem Repertoire aus verschiedenen hochspezifischen Antigen-Rezeptoren wieder. Diese Antigen-Rezeptoren binden über verschiedene Mechanismen passende Antigene. Antigene, die durch die Bindung an einen Rezeptor oder Antikörper eine adaptive Immunantwort induzieren, bezeichnet man als immunogen. Eine besondere Eigenschaft der Zellen des adaptiven Immunsystems ist die Entwicklung eines sogenannten immunologischen Gedächtnisses, das einen besonders anhaltenden Schutzmechanismus des Organismus gegen Pathogene darstellt.³

Bei den zellulären Bestandteilen des erworbenen Immunsystems handelt es sich um B-Lymphozyten und T-Lymphozyten, welche sich in großer Anzahl hauptsächlich im lymphatischen Gewebe befinden oder im Blut sowie in der Lymphflüssigkeit zirkulieren. Auf der Oberfläche der Lymphozyten befindet sich je nach Zelltyp ein B-Zellrezeptor oder ein T-Zellrezeptor (TZR), an den Antigene hochspezifisch binden können. TZR sind monovalent und besitzen über genetische Rekombinationsmechanismen eine große Spezifität gegenüber Antigenen. T-Zellen erkennen Fremdatigene jedoch nur in Kombination mit einem körpereigenen Genprodukt. Bei letzterem handelt es sich um den bereits erwähnten MHC-Komplexes auf der Zelloberfläche von APC. Zusätzlich ist die Aktivierung der Zellen des adaptiven Immunsystems abhängig von dem vorherrschenden Zytokinmilieu sowie von den passenden löslichen oder membranständigen kostimulierenden Faktoren. APC sind in der Lage, solche akzessorischen/kostimulierenden Moleküle zu exprimieren, die durch Interaktion mit T-Zellen deren Aktivierung beeinflussen. Eine solche kostimulierende Wirkung hat beispielsweise das B7-Oberflächenmolekül auf APC im Zusammenspiel mit dem Oberflächenmolekül CD-28 auf T-Lymphozyten.^{4 5}

Ein besonders wichtiger Bestandteil des TZR-Komplexes ist das membranständige CD3-Molekül auf reifen T-Lymphozyten, welches nach erfolgreicher Antigen-Bindung am TZR eine intrazelluläre Signaltransduktionskette in Gang setzt.⁶

Sobald eine erfolgreiche Aktivierung oder auch Stimulation einer naiven T-Zelle über eine Bindung an den TZR-Komplex stattgefunden hat, beginnt ein Prozess der klonalen Selektion. Dieser beschreibt die Proliferation und Differenzierung der naiven T-Lymphozyten zu einer Vielzahl rezeptoridentischer T-Effektorzellen. In Konsequenz der Lymphozyten-Aktivierung ergeben sich eine Reihe von zellulären Ereignissen, zu denen unter anderem Änderungen der Morphologie, der Oberflächenmarker, der Expressionsmuster und -level, der Proliferation sowie Änderungen des Sekretionsmusters von Zytokinen und Chemokinen gehören.

T-Effektorzellen nehmen beispielsweise über Zytokinausschüttung Einfluss auf andere Zellen und werden unterteilt in drei Untergruppen. Zytotoxische T-Zellen leiten nach Antigenkontakt Prozesse der Apoptose oder Nekrose zur Zellzerstörung ein. Regulatorische T-Zellen (Treg) übernehmen immunregulatorische Aufgaben, indem sie zum Beispiel Effektorzellantworten unterdrücken. Die dritte Gruppe der Effektorzellen bilden die T-Helferzellen (TH-Zellen), die durch die Freisetzung von löslichen Botenstoffen verschiedenste Signale an ihre Umgebung senden. TH1-Zellen aktivieren beispielsweise Makrophagen und induzieren die funktionelle Reifung von zytotoxischen T-Zellen. TH2-Zellen kontrollieren die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und sorgen für die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Neutrophile Granulozyten schließlich werden durch TH17-Zellen aktiviert.¹⁷

Zur eindeutigeren Differenzierung der Zellen des adaptiven Immunsystems bedient man sich der sogenannten „Cluster of Differentiation“-Nomenklatur (CD-Nomenklatur). Mittels Durchnummerierung der immunophänotypischen Lymphozyten-Oberflächenantigene ist eine Unterscheidung zwischen bestimmten Zellarten und Entwicklungsstadien möglich. Es sind mittlerweile über 200 verschiedene CD-Marker bekannt. Reife Lymphozyten tragen beispielsweise das oberflächencharakteristische Antigen CD3 (CD3⁺). Zusätzlich ist eine Unterteilung in die Subpopulationen CD3⁺CD4⁺ T-Zellen für T-Helferzellen und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen für zytotoxische T-Zellen möglich. Eine noch tiefergehende Differenzierung der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen ist anschließend nur noch über die Identifikation spezifischer Zytokinmuster durchführbar. Neben der Identifikation der spezifischen Oberflächenmarker

ist es möglich, durch die Analyse der verschiedenen spezifischen Zytokine Aussagen über den Aktivitätszustand und den Differenzierungsstatus der T-Zellen zu treffen.⁸ Dazu gehört auch Interferon- γ (IFN- γ), welches ein typisches TH1-Markerzytokin ist und proinflammatorische Immunreaktionen auslöst. Durch die Produktion des tolerogenen Zytokins Interleukin-10 (IL-10) haben Tregs- und TH2-Zellen einen hemmenden Einfluss auf die Immunantwort und sind damit wichtig für die Erhaltung der Immuntoleranz. Der Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (FOXP3) spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Tregs. Das proinflammatorische Zytokin IL-2 wirkt hingegen stimulierend auf andere Lymphozyten. Nach antigener Stimulation wird es von allen TH-Zellen sezerniert.⁹ Neben den aufgezählten Zytokinen gibt noch einige weitere Zytokine, die eine Einschätzung über den immunologischen Zustand und die ablaufenden Immunantworten ermöglichen.

2.1.3 Immunität bei Malignomen

Die Entstehung von Krebs ist vielschichtig und beruht auf einem komplexen Zusammenspiel mehrerer zellulärer Veränderungen die dazu führen, dass sich gesunde körpereigene Zellen verändern und schließlich zu Tumorzellen werden.^{10 11} Diese zellulären Aspekte der Krebsentstehung sind unter dem Überbegriff „Hallmarks of Cancer“ zusammengefasst und wurden im Jahr 2011 von *Hanahan und Weinberg*¹² überarbeitet und erweitert. Eines in diesem Zuge hinzugefügtes Kapitel beleuchtet nun auch die Eigenschaft von Krebszellen, dem immunologischen Abwehrsystem zu entkommen beziehungsweise als körpereigene veränderte Zellen unentdeckt zu bleiben. Auf der Oberfläche von kanzerogenen Zellen befinden sich tumorassoziierte Antigene. Diese werden T-Zellen durch MHC-Moleküle präsentiert, wodurch anschließend eine tumorspezifische T-Zellreaktion eingeleitet wird. Die wichtige Rolle eines intakten Immunsystems bei der Abwehr von entarteten Zellen wird damit hervorgehoben und ist zudem bereits in diversen Studien belegt worden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass chronisch-immunsupprimierte Patienten nach einer Organtransplantation eine erhöhte Inzidenz für eine Krebserkrankung haben.¹³ Eine Studie von *Schreiber, Old und Smyth* zeigte ebenfalls eine erhöhte Inzidenz von Krebserkrankungen bei Mäusen mit Immundefizienz im Vergleich zu gesunden Mäusen.¹⁴ All diese Erkenntnisse verdeutlichen das komplexe Zusammenspiel von Immunsystem und Tumorzellen bei der Tumorentwicklung. Das Tumorgewebe wird dabei von einer Vielzahl verschiedener

Immunzellen besiedelt. Das Vorkommen jedes dieser verschiedenen Zelltypen hat dabei unterschiedliche immunologische Konsequenzen auf den Tumorstoffwechsel, das Tumorwachstum und die Tumorentwicklung.^{15 16} So entstehen während des Tumorwachstums Tumorzellvarianten, die sich dem Eliminierungsmechanismus widersetzen. Histologische Auswertungen von Primärmelanomen zeigen beispielsweise in vielen Fällen ein großes lymphozytäres Infiltrat im Gewebe und auch klinisch lässt sich teilweise Inflammation und Regression beobachten.^{17 18} Dennoch scheint es im Laufe der Tumorprogression zu keiner spezifischen Immunantwort zu kommen. Folglich muss es möglich sein, die anfängliche Immunantwort im Zuge des Tumorwachstums wieder auszuschalten.^{19 20} Es gibt eine Vielzahl an Mechanismen, durch die maligne Zellen der Immunkontrolle entgehen beziehungsweise diese gezielt ausschalten.²¹ Beispielsweise kann eine geringe immunogene Wirkung durch inhibitorische Moleküle, fehlende kostimulierende Moleküle, Mutationen in Antigenen oder eine reduzierte MHC-Molekül-Expressierung erzeugt werden. Eine weitere Strategie ist das Erzeugen eines immunsuppressiven Mikromilieus. Durch sezernierte Faktoren wie IL-10, Tumor-Nekrose-Faktor- β (TNF- β), Programmed Death Ligand-1 (PD-L1), das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), aber auch durch die tumorgesteuerte Umwandlung von naiven T-Zellen in regulatorische T-Zellen wird die Immunantwort gezielt reguliert.¹ Das Zusammenspiel dieser verschiedenen Mechanismen führt letztendlich zu einem Versagen der Immunantwort und zu einem ungehemmten Tumorwachstum.

2.2 Malignes Melanom

2.2.1 Definition und Epidemiologie

Das maligne Melanom (MM) ist ein bösartiger Tumor der Haut ausgehend von Melanozyten nach maligner Umwandlung. Melanozyten gehören zu den Zellen der epidermalen Basalzellschicht an. Die neoplastische Transformation beginnt in der Regel aufgrund einer komplexen molekularen Signaltransduktionsstörung und führt schließlich zu einer autonomen Zellproliferation, einer Apoptoseresistenz sowie einer gesteigerten Gewebsinvasivität.^{10 22}

Allgemein kann Hautkrebs in zwei Gruppen unterteilt werden: Maligne Melanome und nicht-melanozytärer Hautkrebs. Das MM gehört zu den hoch malignen und aggressiven Tumorerkrankungen. Das „World Cancer Research Fund Network“ berichtet in seinem „Skin Cancer Report 2019“ von einer steigenden Tendenz der Erkrankungsraten in den letzten 20 Jahren. Laut dem Robert Koch-Institut ist die 5-Jahres-Überlebensrate jedoch günstig, da in etwa zwei Drittel der Tumore in einem sehr frühen und damit prognostisch-guten Stadium diagnostiziert werden. Ein Grund dafür ist sicherlich mit unter die Einführung der ärztlichen Früherkennungsuntersuchung im Jahr 2008.²³ Meist erfolgt die Diagnose im mittleren Lebensalter zwischen dem 50. und dem 60. Lebensjahr, in etwa gleich verteilt bei Männern und Frauen. Sehr selten tritt das MM hingegen im Kindes- und Jugendalter auf.^{23 24} Die Überlebensrate hängt dabei stark vom erreichten Stadium des diagnostizierten MM ab.²⁵ Berücksichtigt man geographische Komponenten, so kommt es in den äquatorfernen Ländern zu den meisten Diagnosen.^{26 27}

2.2.2 Risikofaktoren und Pathogenese

Heute wird das MM als eine multifaktorielle Erkrankung eingestuft, die durch ein Zusammenspiel von Umgebungseinflüssen und genetischer Disposition entstehen kann.^{28 29}

Zu dem wohl wichtigsten und gefährlichsten Risikofaktor bei der Entstehung einer MM gehört UV-Strahlung, die einen Teil des Spektrums der elektromagnetischen Strahlung der Sonne ausmacht. Diverse Studien haben bereits den Zusammenhang zwischen UV-Strahlung und der MM-Entstehung bestätigt.³⁰ Die „Internationale Agentur für Krebsforschung“ ordnete 2009 UV-Strahlung in die höchste kanzerogene Gruppe (Gruppe 1) ein und unterstreicht damit ihre hochgradig mutagene Wirkung.³¹ Für die Entstehung eines MM ist insbesondere eine intermittierende hohe UV-Dosis auf sonst sonnengeschützte Körperareale ausschlaggebend und nicht eine kumulative UV-Dosis auf bestimmte Körperareale.³² UV-induzierte DNA-Läsionen können mit Hilfe von Reparaturmechanismen wieder behoben werden. Versagt dieser Vorgang, verbleiben die Mutationen jedoch in den DNA-Strängen und verursachen Probleme bei der DNA-Replikation und führen letztendlich zur Entartung der Zellen. Zu den am häufigsten vorkommenden Mutationen des MM gehören Veränderungen im Genabschnitt des MAPK-Signalwegs. Mit rund 50 % bildet hier die Mutation im BRAF-Genabschnitt die am häufigsten auftretende genomische Veränderung des MAPK-Signalwegs.^{33 34} Wobei wiederum davon eine Vielzahl der Mutationen in der

BRAF^{V600E}-Gensequenz lokalisiert sind.^{33 35} Eine der Auswirkungen einer solchen Mutation ist unter anderem eine Überstimulation der Signaltransduktionskette RAS/RAF/MEK/ERK, die sich in einer gesteigerten Proliferationsrate bei verlängertem Zellüberleben manifestiert.^{36 37}
38 39

Aber auch gewisse genetische Faktoren wie der Hauttyp, der Haartyp sowie die Augenfarbe sind mit einer erhöhten Sonnenempfindlichkeit und damit einem höheren MM-Risiko verbunden.^{40 41} Abhängig von der UV-Empfindlichkeit ist beim Menschen eine Einteilung in sechs Hauttypen möglich. Die mutagene Wirkung von UV-Strahlung korreliert dabei mit dem individuellen Hauttyp.⁴² Ein weiterer genetischer Risikofaktor stellt eine familiäre Vorbelastung mit der Krankheit dar.⁴³ Im Fall von sogenannten „familiären Melanomen“ treten gehäuft Keimbahnmutationen mit hoher Penetranz in den Genabschnitten der zyklusregulierenden Proteine CDKN2A und CDK4 auf.⁴⁴

Darüber hinaus gehören Personen mit einer hohen Anzahl an melanozytären Nävi und dysplastischen Nävi zu der Risikogruppe mit erhöhter Erkrankungswahrscheinlichkeit.⁴⁵

2.2.3 Klinik und Stadieneinteilung

Klinisch manifestiert sich das Melanom in einer außerordentlichen morphologischen Vielfalt. Mit Hilfe der Anamnese und des klinischen Befundes kann zunächst die Verdachtsdiagnose gestellt werden.

Die ABCDE-Regel ist dabei ein frühdiagnostisches klinisches Hilfsmittel zur differentialdiagnostischen Abgrenzung.^{46 47} Aufgrund ihrer geringen Spezifität und Sensitivität hat die Regel jedoch nur ein geringes Gewicht in der praktischen Diagnostik.^{127 49} Unterstützend wird deshalb für die Diagnosestellung die Auflichtmikroskopie beziehungsweise die Dermoskopie hinzugezogen.⁵⁰ Erscheint ein Pigmentmal verdächtig, sollte dieses primär komplett exzidiert und die Gewebeprobe anschließend histologisch beurteilt werden.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) gibt mit der „International Classification of Diseases for Oncology“ (ICD-O) ein weltweit gültiges Klassifikationssystem basierend auf der Lokalisation, der Wuchsart und dem Aussehen des MM heraus. Auf Basis dessen lassen sich auch hier Subtypen des malignen Melanoms definieren. Dazu gehören das Superfiziell

Spreitende Melanom, das Noduläre Maligne Melanom, das Lentigo-Maligna-Melanom, das akral-lentiginöse Melanom sowie das nicht-klassifizierbare Melanom.

Die Stadien-Einteilung (Staging) ist ein wichtiger prognostischer und therapieentscheidender Schritt. Das Staging (Tabelle 1) erfolgt nach abgeschlossener TNM-Klassifikation und wird mit Hilfe einer histologischen Untersuchung des Tumorgewebes durchgeführt. Es umfasst die Einzelmerkmale Tumordicke nach Breslow (T), Vorkommen einer Ulzeration, metastatischer Lymphknotenbefall (N) und vorhandene Fernmetastasen (M). Die aktuelle TNM-Klassifikation des „American Joint Committee on Cancer“ (AJCC) aus dem Jahr 2017 bildet die Grundlage für empfohlene Therapiemaßnahmen nach aktueller Leitlinie.⁵¹

Tabelle 1: Stadieneinteilung MM

Stadieneinteilung MM nach S3-Leitlinie Version 3.0 - April 2018 (modifizierte Ansicht)⁵¹

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)
0	Melanoma in situ (Tis)	Keine regionären Lymphknotenmetastasen nachweisbar (N0)	Kein Hinweis auf Fernmetastasen (M0)
IA	< 0.8 mm, ohne Ulzeration (T1a)	N0	M0
IB	< 0.8 mm, mit Ulzeration (T1b)	N0	M0
	0.8 mm - 1.0 mm, ohne/mit Ulzeration (T1b)		
	> 1.0 - 2.0 mm, ohne Ulzeration (T2a)	N0	M0
IIA	> 1.0 - 2.0 mm, mit Ulzeration (T2b)	N0	M0
	> 2.0 - 4.0 mm, ohne Ulzeration (T3a)	N0	M0
IIB	> 2.0 - 4.0 mm, mit Ulzeration (T3b)	N0	M0
	> 4.0 mm, ohne Ulzeration (T4a)	N0	M0
IIC	> 4.0 mm, mit Ulzeration (T4b)	N0	M0
IIIB	Kein Anhalt über einen Primärtumor (T0)	Ein klinisch metastatisch befallener Lymphknoten (N1b) oder Transit-, Satelliten- und/oder Mikrosatellitenmetastasen ohne einen metastatisch	M0

		befallenen Lymphknoten (N1c)	
IIIC	T0	Zwei oder drei metastatisch befallene Lymphknoten (N2b) oder Transit-, Satelliten- und/oder Mikrosatellitenmetastasen mit einem metastatisch befallenen Lymphknoten (N2c)	M0
		Vier oder mehr metastatisch befallene Lymphknoten (N3b) oder Intransit-, Satelliten-, und/oder Mikrosatelliten-Metastasen mit zwei oder mehr metastatisch befallenen Lymphknoten oder „verbackenes“ Lymphknotenkonglomerat OHNE Intransit-, Satelliten-, und/oder Mikrosatelliten-Metastasen (N3c)	
IIIA	T1a/b - T2a	N1a, N2a	M0
IIIC	T1a - T3a	N2c, N3a/b/c	M0
	T3b/T4a	Jedes N \geq N1	M0
	T4b	N1a - N2c	M0
IIID	T4b	N3a/b/c	M0
IV	Jedes T, Tis	Jedes N	Vorhandensein von Fernmetastasen (M1)

2.2.4 Therapie

Nachdem die Stadien-Einteilung des vorliegenden Tumorgewebes erfolgt ist, wird im Anschluss über die entsprechenden Therapiemaßnahmen des Primär-Tumors sowie gegebenenfalls gegen vorliegende Metastasen entschieden. Neben der operativen Therapie sind noch verschiedene stadiengerechte-adjuvante Therapien möglich.⁵¹

2.2.4.1 Operative Therapie

Liegt ein klinischer Verdacht auf ein MM vor, stellt eine komplette Primärexzision des Tumors sowie eine Nachexzision mit einem angemessenen Sicherheitsabstand (lateral: etwa 2 mm; Tiefe: bis ins Fettgewebe), um lokale Rezidive zu vermeiden, den angestrebten Goldstandard dar.⁵²

2.2.4.2 Stadiengerechte-adjuvante Therapie

Neben der bis zum Stadium IIIB wichtigsten therapeutische Maßnahme, der operativen Exzision *in toto* können darauffolgend weiterführende Therapiemaßnahmen ergriffen werden. Dazu gehören unter anderem die adjuvante Strahlentherapie und die adjuvante medikamentöse Therapie.

Strahlentherapie

Eine Strahlentherapie kann in verschiedenen Fällen in Erwägung gezogen werden. Dabei kann die Therapie einen adjuvanten oder palliativen Ansatz verfolgen. Eine Empfehlung zur adjuvanten Strahlentherapie ist laut Leitlinie unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien auszusprechen und soll zu einer verbesserten Tumorkontrolle der Lymphknotenstation beitragen. Zu den Kriterien gehört das Vorkommen von mindestens drei befallenen Lymphknoten, Lymphknotenmetastasen > 3 cm, ein lymphogenes Rezidiv oder ein Kapseldurchbruch des betroffenen Lymphknotens.⁵³ Eine primäre Radiotherapie wird hingegen beispielsweise bei der Bestrahlung von inoperablen bzw. nicht *in toto* entfernbaren Primärtumoren angewendet.^{54 55}

Medikamentöse Therapie

Die zweite Säule der adjuvanten Therapie beinhaltet die medikamentöse Therapie. Je nach Staging werden auch hier unterschiedliche evidenzbasierte medikamentöse Empfehlungen ausgesprochen. Mögliche Präparate gehören den Medikamenten-Gruppen Interferone, Immuncheckpoint-Inhibitoren oder BRAF/MEK-Inhibitoren an.

Interferone

Interferone gehören zu den körpereigenen Zytokinen und haben eine immunmodulatorische, antiproliferatorische und antivirale Wirkung im Körper. Ab einem Tumor-Staging IIA kann laut Leitlinie eine niedrig dosierte adjuvante Interferontherapie angeboten werden und ab einem Tumor-Staging IIB/C soll eine adjuvante Interferontherapie angeboten werden.⁵⁶ Aufgrund der starken, teils lebensqualitätssenkenden Nebenwirkungen ist die Gabe einer Interferontherapie jedoch sorgfältig abzuwägen.⁵⁷

Immuncheckpoint-Inhibitoren

Im Falle einer adjuvanten Systemtherapie mit einem Immuncheckpoint-Inhibitor (ab Stadium IIIA-D und IV) wird über die Inhibition des Transmembranproteins „Programmed

Cell Death Protein 1“ (PD-1) oder des „Zytotoxischen T-Lymphozyten Assoziierten Protein-4“ (CTLA-4) eine antikörper-vermittelte Aktivierung Einfluss auf das Immunsystem genommen. Die Regulation aktivierter T-Zellen erfolgt durch sogenannte „Imm checkpoints“. CTLA-4-Inhibitoren sind humane monoklonale Anti-CTLA-4-Antikörper und blockieren den CTLA-4-Signalweg. PD-1 ist ebenfalls ein Immuncheckpoint-Rezeptor und wird durch PD-1-Inhibitoren blockiert. Die Signalmoleküle sind unter anderem auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen exprimiert. Die Bindung eines Liganden wirkt im Sinne eines negativen Feedbacks inhibitorisch auf die Aktivität zytotoxischer T-Zellen und mindert so die Anti-Tumor-Antwort. Eine Folge der Immuncheckpoint-Blockaden ist daher eine gesteigerte Immunität durch eine Inhibition des negativen Feedbacks und dadurch eine gesteigerte Anti-Tumor-T-Zellantwort.^{58 59} Das Verabreichen der Präparate ist im Rahmen einer Monotherapie sowie als Kombinationstherapie möglich. Nicht zu vernachlässigen ist bei einer Immuncheckpoint-Inhibitoren-Therapie die schwere der auto-immunvermittelten Nebenwirkungen.^{60 61 62} Laut Leitlinie überwiegt jedoch der positive Effekt einer Therapie.⁶³

BRAF-/MEK-Inhibitoren

BRAF-/MEK-Inhibitoren gehören zur Gruppe der Tyrosinkinase-Inhibitoren. Wurde im Zuge einer molekularen Untersuchung eine BRAF^{V600}-Mutation nachgewiesen, so stehen diese kleinmolekularen Signalhemmstoffe zur Therapie im fortgeschrittenen Tumorstadium zur Verfügung (Staging IIIA-D).⁶⁴ Die Inhibitoren können durch eine Hemmung auf zwei Ebenen den durch eine Mutation überaktivierten BRAF-MEK-ERK-Signalweg wieder abschalten.

2.3 Kaltes atmosphärisches Plasma

Die Anwendungsmöglichkeiten von Immun-Checkpoint-Inhibitoren und die damit verbundenen Modifikationen der immunologischen Aktivität gegenüber Krebszellen haben neue Therapiechancen und -erfolge bei der Behandlung des MM mit sich gebracht.^{65 58} Trotz allem zählt jedoch zu den bestehenden Herausforderungen noch immer eine ständige Neu- und Weiterentwicklung von Therapiemöglichkeiten, um die teilweise starken Nebenwirkungen der medikamentösen Therapien^{61 62} zu vermeiden und bisher therapieresistente Tumore behandeln zu können. Auf der Suche nach zukunftsorientierten lokalen und additiven Behandlungsmöglichkeiten des MM, stellt KaP ein vielversprechendes Forschungsgebiet dar.

2.3.1 Grundlagen

Spricht man von Aggregatzuständen, so ist in der Physik zwischen drei klassischen Zuständen zu unterscheiden. Neben den bekannten Zuständen fest, flüssig und gasförmig reiht sich schließlich Plasma als vierter möglicher Aggregatzustand ein. Im Universum liegen mehr als etwa 95 % der Materie in diesem Zustand vor. Plasma spielt in unserer unmittelbaren Umgebung eine Rolle bei vielen natürlichen Erd-Phänomenen, wie beispielsweise bei der Entstehung von Blitzen und den Nordlichtern.^{66 67} Der Begriff „Plasma“ wurde im wissenschaftlichen Kontext erstmals im Jahr 1928 von Irving Langmuir verwendet.⁶⁸ Plasma kommt jedoch nicht nur als natürliches physikalisches Phänomen vor. Es kann auch künstlich erzeugt werden. Zur Plasmaentstehung kommt es immer dann, wenn neutrale Atome eines Gasgemisches durch Energiezufuhr in Protonen, Neutronen und Elektronen zerfallen. Diese Vorgänge bei denen sogenannte „energiereiche Gase“ entstehen sind auch unter dem Begriff „Ionisation“ bekannt. Mögliche Formen der Energiezufuhr können beispielsweise das Anlegen eines elektrischen Feldes, Druckerhöhung oder Wärmezufuhr sein.⁶⁹

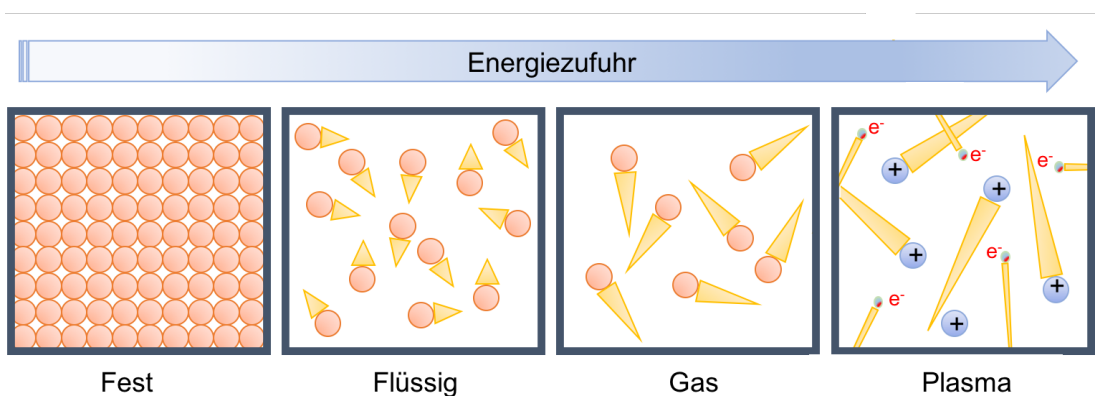


Abbildung 1: Schematische Darstellung über die Änderung der verschiedenen Aggregatzustände durch Energiezufuhr.

Die Dreiecke repräsentieren die thermische Bewegungsstärke der Atome. Braune Kugeln stellen neutrale Atome, lila Kugeln Ionen und bunte Kugeln stellen Elektronen dar (modifizierte Abbildung⁷⁰).

Das Anwendungsgebiet von künstlich generiertem Plasma ist heute breit gefächert. Es erstreckt sich über verschiedene Industrie-Bereiche wie zum Beispiel in der Lebensmittelindustrie⁷¹, der Verarbeitung von Rohstoffen⁶⁷, der Umwelttechnik⁷², der Textilindustrie⁷³ und unter anderem auch in Teilgebieten der Medizin.⁷⁴

2.3.2 Unterschiedliche Arten von Plasma

Plasma kann mit Hilfe verschiedener Kriterien in Kategorien unterteilt werden. So kann der vorherrschende Umgebungsdruck während der Plasmageneration zur Unterscheidung

zwischen Niederdruck-, Hochdruck- und atmosphärischem Druck-Plasma herangezogen werden. Ein weiteres Kriterium zur Unterscheidung der verschiedenen Plasmaarten ist die Temperatur. Diese ermöglicht die Unterteilung in sogenannte thermale (heiße) und nicht-thermale (kalte) Plasmen.^{75 66} Bei dieser Art der Differenzierung ist es entscheidend, ob sich die im Plasma enthaltenden Elektronen, Ionen und neutralen Teilchen in einem thermischen Gleichgewicht befinden (komplette Ionisation). Ist dies der Fall, handelt es sich um warmes bzw. thermisches Plasma. Befinden sich jedoch nur die Elektronen des ionisierten Gases auf einem sehr hohen thermischen Level, während die Ionen und Neutralteilchen Raumtemperaturen aufweisen, so spricht man von kaltem bzw. nicht-thermischem Plasma (partielle Ionisation).⁷⁴

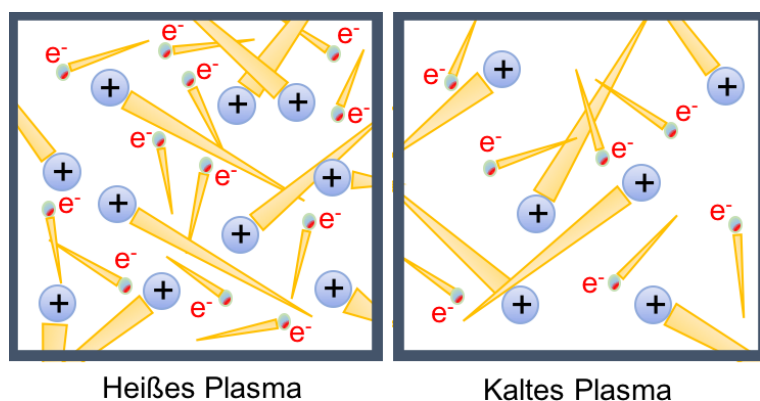


Abbildung 2: Schematische Darstellung heißes Plasma und kaltes Plasma

Lila Kugeln stellen Ionen und bunte Kugeln stellen Elektronen dar. Die Dreiecke repräsentieren die thermische Bewegungsstärke der Partikel (modifizierte Abbildung⁷⁰).

Weitere Differenzierungsmöglichkeiten bieten unter anderem das genutzte Trägergasgemisch und die unterschiedlichen Plasmagenerationsquellen.

Im Fokus dieser Arbeit steht „kaltes Atmosphärenplasma“, welches aufgrund seiner thermischen Beschaffenheit für die Behandlung von lebender und hitze-sensibler Materie geeignet ist.^{76 77 78} Thermales bzw. heißes Plasma hingegen ist hauptsächlich für den Gebrauch bei hitzeresistenten Materialien geeignet und findet daher keine Anwendung an lebender Materie.^{79 80}

Im Zusammenhang mit KaP kann weiterhin unterschieden werden zwischen direktem, indirektem und Hybridplasma.^{81 77 75} Direktes Plasma wird mit einer Technologie hergestellt, die auf dielektrischer Barriere-Entladung basiert.⁸² Mindestens eine der beiden Elektroden ist dabei mit einer isolierenden Schicht (Dialektrikum) überzogen. Durch direktes Auflegen

der Plasmaquelle auf das gewünschte Zielgewebe wird dieses zu einer Gegenelektrode umfunktioniert. Die anschließende Ionisation der Umgebungsluft zwischen dem Dielektrikum und dem Gewebe ermöglicht eine Plasmabehandlung über kurze räumliche Distanzen.⁸³ Indirektes Plasma entsteht hingegen zwischen zwei Elektroden, die in oder an einer Düse angeordnet werden (Plasma-Handstück). Mit Hilfe eines durch die Düse geleiteten Trägergases und durch das Anlegen einer hohen Spannung an den Elektroden entsteht dabei durch Ionisation energiereiches Gas. Bei den verwendeten Trägergasen handelt es sich hauptsächlich um Edelgase, die aufgrund ihrer ihrer vollständig gefüllten äußeren Atomorbitale (Edelgaskonfiguration) äußerst reaktionsträge sind und daher nahezu ausschließlich in atomarer Form vorliegen. Durch den vorhandenen Gasfluss wird das generierte Plasma als sogenanntes „Effluent“ anschließend zu der gewünschten Zielmaterie befördert und mischt sich auf seinem Weg mit Gasen aus der Umgebungsluft.⁷⁷ Hybridplasma schließlich basiert auf der Oberflächenmikroentladungstechnologie und stellt eine Kombination aus direkter und indirekter Plasmatechnik dar. Die zweite Elektrode ist in diesem Fall eine geerdete Maschendraht-Elektrode, die auf das Zielgewebe aufgelegt wird. Wegen des kleineren elektrischen Widerstandes der Maschendraht-Elektrode im Vergleich zur Hautoberfläche können die generierten Plasmabestandteile diese überqueren und gelangen so zum Zielgewebe.⁸⁴

Die Plasmakomposition und Effektstärke von indirekten Plasmaquellen kann durch die Auswahl des Trägergases beeinflusst werden.^{85 86 87} Vorliegende Resultate zeigen, dass die Produktion von reaktiven Radikalen bei Verwendung des Trägergases Helium erhöht ist im Vergleich zu den Trägergasen Argon oder Nitrogen und somit Einfluss auf die Effektstärke hat.⁸⁸ So zeigen veröffentlichte Daten von *Cheng et al.* sowie Daten von *Joh et al.*, dass die Zugabe von O₂ zum Trägergas die biologische Wirkung von KaP auf die Zellen vermindert.⁸⁹⁹⁰ Als mögliche Trägergase können beispielsweise reine Gase (Helium, Argon, Stickstoff)^{91 92} oder künstliche Gasgemische (Helium-N₂, Helium-O₂)⁸⁵ eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine indirekte Plasmaquelle (0) in Kombination mit dem Edelgas Argon verwendet.

2.3.3 Zusammensetzung und biologische Wirkkomponenten von KaP

KaP besteht aus einem Mix aus verschiedenen geladenen Ionen, Elektronen und ungeladenen Atomen. Es entsteht durch eine unelastische Kollision von energiereichen Elektronen mit

neutralen Gasbestandteilen, wobei sich neue reaktive Radikale und Ionen bilden, es jedoch dabei zu keinem signifikanten Temperaturanstieg kommt.⁶⁶ Die bei der Interaktion von KaP und Gewebe wichtigen Wirkkomponenten sind physikalischer und chemischer Natur. Zu ihnen gehören Elektronen und Ionen, ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung), Wärmestrahlung, elektromagnetische Felder sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS).^{70 93 94} Letztere sind Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen enthalten und sich dadurch in einem reaktionsfreudigen Zustand befinden. Insbesondere die ROS und RNS (in ihrer Kombination hier RONS genannt) spielen eine wichtige biochemische Rolle bei der Wirkung von KaP auf exponierte Zellen.⁹⁵

Durch Wechselwirkungen der ionisierten Bestandteile des Plasmas mit Stickstoff, Sauerstoff und Wasserbestandteilen der Umgebungsluft entstehen in der Gasphase reaktive Spezies, bei denen es sich unter anderem um Hydroxyl-Radikale (OH•), Stickoxide (•NO, •NO₂, ONOO•), Wasserstoffperoxide (•H₂O₂) sowie Ozone und Hyperoxid-Anionen (O₃, •O₂⁻) handelt. Um eine Charakterisierung der auftretenden Spezies in der Plasmagasphase durchführen zu können, bedient man sich spektroskopischer Messungen. Dazu zählen die optische Emissionsspektroskopie, die laserinduzierte Fluoreszenz-Messung sowie die Absorptionsspektroskopie.⁹⁶ Die Bestandteile des sogenannten „Plasma-Effluent“ reagieren bei *in vitro* Versuchsansätzen mit Bestandteilen des bestrahlten flüssigen Mediums.⁹⁷ Deutlich wird die Interaktion des Plasma-Effluents mit dem bestrahlten Medium insbesondere durch das Hervorrufen von biologischen Plasmaeffekten bei Zugabe von plasmaaktivierten Medien ohne eine direkte Plasmabestrahlung der Zellen.^{98 99}

Wasserstoffperoxid sowie andere sauerstoffbasierte Radikale scheinen eine besonders wichtige Rolle bei der KaP-Wirkung auf Zellen *in vitro* zu spielen.^{100 101 102} Der generierte reaktive Mix verbleibt jedoch nicht nur im flüssigen Umgebungsmedium der Zellen. Die KaP-generierten RONS entfalten ihre Wirkung vor allem intrazellulär.^{103 91} Wie diese generierten RONS in das Zellinnere gelangen, ist eine von vielen nicht geklärten Fragestellungen im Rahmen der Plasmabehandlung. Da jedoch bereits direkt im Anschluss einer Plasmabehandlung ein Anstieg intrazellulärer RONS beobachtet werden konnte,¹⁰⁴ wird das Überqueren der Zellmembran durch Diffusion nicht ausgeschlossen.¹⁰⁵ Aber auch eine mögliche Rolle von Transmembranmolekülen bei der Überwindung der Zellmembran wird diskutiert, insbesondere wird eine Beteiligung von Aquaporinen sowie der NADPH-Oxidase (NOX) vermutet. Aquaporine sind spezifische transmembrane Wasserkanäle, die beim

Transport spezifischer Moleküle durch die Zellmembran (wie beispielsweise H_2O_2 , NO, CO_2 oder auch NH_3) beteiligt sind und somit eine mögliche Rolle bei der KaP-Wirkung auf Zellen spielen.^{106 107 108} Zusätzlich wird eine Aktivierung des sich auf der Zytoplasmamembran befindenden Enzyms NOX durch KaP und eine damit verbundene gesteigerte Produktion von Nebenprodukten wie beispielsweise H_2O_2 mit einer steigenden intrazellulären Konzentration von RONS in Verbindung gebracht.¹⁰⁹

Das Vorkommen von RONS im Körper ist grundsätzlich ein physiologischer Zustand.¹¹⁰ Sie sind beispielsweise ein wichtiger Bestandteil einiger Regulationsmechanismen und von Peroxisomen oder werden im Zuge einer Entzündungsreaktion von phagozytierenden Zellen produziert.^{111 112} Dennoch kommen sie in Zellen und im Gewebe lediglich in geringen Konzentrationen vor und werden durch Produktion und Ausscheidung in einem sensiblen Gleichgewicht gehalten. Eine Reihe niedermolekularer Moleküle und Enzyme, sogenannte „Antioxidantien“, sind dabei wichtige Bestandteile dieses „Redox-Gleichgewichts“. Antioxidantien sind chemische Verbindungen, die die Oxidation einer Substanz verhindern oder verlangsamen. Einige Antioxidantien sind natürlicher Bestandteil des Organismus und somit endogen. Sogenannte exogene Antioxidantien wiederum müssen mit der Nahrung aufgenommen werden.¹¹³ In Tabelle 2 sind einige dieser antioxidativ-wirksamen Enzyme und niedermolekularen Gruppen aufgezählt.

Tabelle 2: Antioxidantien
Beispiele einiger endogener und exogener Antioxidantien

Antioxidativ wirksame Enzyme	Antioxidativ wirksame niedermolekulare Gruppen
Superoxiddismutase	Vitamin C (L-Ascorbinsäure)
Glutathion-Peroxidase	Vitamin E (Tocopherole)
Peroxidasen	Provitamin A
Katalasen	Glutathion
Thioredoxinreduktase	Polyphenole
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Selen

Eine Störung des Redox-Gleichgewichts, beispielsweise durch exogen zugeführte RONS, versetzt die Zelle in einen Zustand von oxidativem Stress. Oxidativer Stress kann durch unterschiedlichste Einflüsse entstehen, wie zum Beispiel durch Bestrahlung⁹¹, Alkoholkonsum¹¹⁴ oder Rauchen¹¹⁵. Der dabei stattfindende Regulationsmechanismus einer Zelle hängt vom Ausmaß und der Dauer der „Stresssituation“ ab.

Eine wichtige Rolle bei der Reaktion von Zellen auf die Unterversorgung mit Sauerstoff und somit oxidativem Stress nimmt der Hypoxie induzierbare Faktor 1 (HIF1) ein.¹¹⁶ HIF1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus jeweils einer α - und β -Untereinheit zusammengesetzt ist.¹¹⁷ Die Aktivierung von HIF1 hängt von der durch hypoxische Bedingungen stabilisierten α -Untereinheit ab. HIF1 beeinflusst wiederum die Induktion von einigen Genen, zu denen unter anderem VEGF und Erythropoetin gehören.¹¹⁸

Bei einem nur geringen Ausmaß und kurzer Dauer kommt es lediglich zu einem kurzen temporären Anstieg des RONS-Levels. Dieser hält so lange an, bis die von der Zelle getroffenen Gegenmaßnahmen Wirkung zeigen und somit der RONS-Level auf den ursprünglichen Normalwert gebracht wurde. Moderate Erhöhungen der RONS-Konzentration können sogar positive Auswirkungen auf Proliferation und Differenzierung einer Zelle haben.¹¹¹ Die zugrundeliegende Kinetik und das Wirkprinzip wird hierbei unter dem Begriff „Hormesis“ zusammengefasst.¹¹⁹ Kommt es jedoch zu einer lang anhaltenden und starken Konzentrationserhöhung von freien reaktiven Radikalen, führt dies zu chronischem oxidativen Stress und einem anhaltend erhöhten RONS-Spiegel. In diesem Fall kommt es durch die Interaktion von intrazellulären RONS mit Proteinen zu Kompositions- und Strukturveränderungen an funktionellen Gruppen, wodurch die Funktionsfähigkeit der zugehörigen Makromoleküle beeinflusst wird.¹²⁰ Chronischer oxidativer Stress hat somit unter anderem negative Auswirkungen auf Transduktionsvorgänge, die Gentranskription und kann Protein- und Lipidschäden bewirken.^{121 122} Die Effekte von oxidativen Stress zeigen sich nicht nur auf zellulärer Ebene. Einige systemische Erkrankungen und pathologische Vorgänge im Körper können in direkte Beziehung mit oxidativem Stress gesetzt werden. Dazu zählen unter anderem Diabetes Mellitus, rheumatoide Arthritis, kardiovaskuläre Erkrankungen oder neurologische Dysfunktionen.¹²³

Die biochemische Wirkung bei der KaP-Behandlung entstehenden intrazellulären RONS wurde bereits in der Vergangenheit des Öfteren thematisiert. Die dabei zugrundeliegenden Mechanismen und ihre Auswirkungen auf Zellen, insbesondere auf *in vivo* behandelte Zellen,

ist jedoch nicht abschließend geklärt und noch immer Bestandteil der Plasma-Grundlagenforschung. Im Rahmen von *in vitro* Versuchen an verschiedenen Zellen konnten bereits einige weiterführende Erkenntnisse über zelluläre Auswirkungen und Mechanismen gewonnen werden. Die „Clinical Plasma Medicine Core Group“ veröffentlichte im Jahr 2014 in einem Konsensuspapier „Clinical Concepts in Plasma Medicine“ eine Zusammenfassung der durch KaP *in vitro* hervorgerufenen zellulären Effekte:¹²⁴

- *Gezielte Ablösung von Zellen von Matrices bzw. Herauslösung aus Zellverbänden*
- *Beeinflussung der Zellmigration*
- *Beeinflussung/Stimulation der Zellproliferation sowie Angiogenese*
- *Einfluss auf die Expression von Oberflächenproteinen/Adhäsionsmolekülen*
- *Reversible Einwirkung auf die DNA*
- *Induktion von Apoptose und dadurch resultierende Inaktivierung von Krebszellen*
- *Reversible Permeabilisierung der Zellmembran*
- *Blutkoagulation durch direkte Beeinflussung der Gerinnungskaskade*

2.3.3.1 Antioxidantien

Im Rahmen einiger Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Zugabe verschiedener antioxidativer Substanzen die Wirkung von KaP auf exponierte Zellen vermindert.^{94 95 125} Die in dieser Arbeit verwendeten Antioxidantien gehören der Gruppe der Polyphenole an. Es handelt sich hierbei um sekundäre Pflanzenstoffe, die über die Nahrung aufgenommen werden können. Polyphenole sind Verbindungen, die sich auf die chemische Struktur von Phenol zurückführen lassen. Phenole bestehen aus einem aromatischen Ring und einem oder mehreren gebundenen Hydroxygruppen. Anhand ihrer chemischen Struktur können Polyphenole wiederum in Gruppen unterteilt werden. Vier große Hauptgruppen sind Phenolsäuren, Flavonoide, Stilben und Lignane.^{126 127} Ihre chemische Wirkung entfalten Polyphenole durch ihre Rolle als Radikalfänger. Die oxidative Kapazität von Phenolen entwickelt sich dabei erst mit dem Vorliegen einer Ortho- oder einer Para-Diphenol-Stellung. Die Substitution von Wasserstoffatomen durch Ethyl- oder n-Butylgruppen steigert die oxidative Kapazität.¹²⁷ Delokalisierte ungepaarte Elektronen an den aromatischen Ringen bewirken die Bildung stabiler Phenol-Radikale, die zum Abbruch der Radikalübertragungskette beitragen.¹²⁸

Das Interesse an Polyphenolen ist unter anderem aufgrund ihrer antioxidativen,^{129 130}

antimutagenen^{131 132} und antiinflammatorischen^{133 134} Wirkung stark gestiegen. Die Wirkungen durch ihren erhöhten Konsum über Nahrungsmittelaufnahme wird kontrovers diskutiert.¹³⁵ Tabelle 3 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Antioxidantien, aufgeteilt in die jeweiligen Hauptgruppen.

Tabelle 3: Verwendete Antioxidantien

Gruppen	Klassen	Substanz	„Natürliches Vorkommen“
Phenolsäuren	Zimtsäure	Kaffeensäure	Kaffeebohne
Flavenoide	Flavonole	Rutin	Petersilie
Stilben	Resveratol	Trans und cis Resveratol	Rote Weintrauben

2.3.4 Plasma-Anwendung in der Medizin

Die Plasmamedizin ist ein relativ junges und interdisziplinäres medizinisches Gebiet.⁷⁴ Die Anwendungsmöglichkeiten in verschiedensten medizinischen Fachbereichen werden derzeit noch erforscht und sind in den meisten Fällen noch nicht im klinischen Alltag angekommen. Hinsichtlich der biomedizinischen Anwendungsmöglichkeiten ist eine Unterteilung in zwei große Gruppen möglich. Mit der „indirekten“ Plasmaanwendung ist eine Vorbehandlung von abiotischen Oberflächen und Materialien für den medizinischen Gebrauch möglich.^{136 80} Auf diese Weise können eine Vielzahl medizinischer Geräte und Materialien dem medizinischen Anspruch von Sterilität gerecht werden. Die Wirkung von KaP auf verschiedene Bakterien, Pilze, Viren, Bakteriensporen oder Prionen wurde bereits in diversen Studien dargelegt.^{137 138}
^{139 140} Das zweite große Anwendungsfeld basiert auf der „direkten“ Plasmainteraktion mit biologischem Gewebe. In der Elektrochirurgie wird heißes Plasma schon seit vielen Jahren¹⁴¹ zum Beispiel zur Blutungsstillung, bei Gewebeschnitten, bei der Denaturierung von Proteinen oder zur Devitalisierung von Gewebe verwendet.^{142 143} Aber auch kaltes Plasma scheint die Koagulation beeinflussen zu können.⁸¹

Weitere Anwendungsmöglichkeiten gibt es in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde im Rahmen der therapeutischen Behandlung von Periimplantitis, Mundschleimhauterkrankungen und -infektionen sowie bei der konservierenden Zahnerhaltung.^{144 145 146 147} Die Publikationen auf diesem Gebiet verdeutlichen gegenwärtig

lediglich die Möglichkeiten und Vorteile, beinhalten derweilen jedoch keine konkreten klinischen Anwendungen.

Auch in der Dermatologie findet viel plasmamedizinische Forschung statt. Im Gegensatz zu anderen Fachrichtungen gibt es in diesem Gebiet bereits verschiedene klinisch geprüfte und erforschte direkte Anwendungen. Dabei wird KaP vor allen Dingen bei der Behandlung von Ulzera und im Rahmen der chronischen Wundtherapie eingesetzt und stellt durch die antimikrobiellen und positiven Effekte auf das Wundmilieu schon jetzt eine effektive Add-On-Therapiemaßnahme dar.^{148 149} KaP fördert hierbei die Wundheilung durch eine Steigerung der Angiogenese, eine gesteigerte Migration von Fibroblasten und eine gesteigerte Endothel-Proliferation.^{103 150 151 152 153}

Um die genauen Anforderungen an medizinisch einsetzbare Plasmageräte zu standardisieren, wurde 2014 vom Deutsches Institut für Normierung (DIN) eine Spezifikation verfasst und veröffentlicht.¹⁵⁴ Diese gibt Auskunft über festgelegte Leistungsparameter, die von atmosphärischen Plasmageräten in biochemischen und biologischen Anwendungsgebieten erfüllt werden sollen. In Folge diverser klinischer Studien gibt es seit einigen Jahren CE-gekennzeichnete Plasmageräte zur Behandlung von chronischen Wunden der Haut. Dazu gehören der kINPen® MED (INP Greifswald/neoplas tools GmbH, Greifswald, Deutschland), der PlasmaDerm® VU-2010 (CINOGY Technologies GmbH, Duderstadt, Deutschland) sowie der vice SteriPlas (Adtec Ltd., London, England). Des Weiteren arbeitet eine Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften aktuell an der Verfassung einer Leitlinie (Leitlinien-Klassifikation: S2k) über den „rationalen therapeutischen Einsatz von kaltem physikalischem Plasma“ mit geplanter Fertigstellung im Jahre 2020.

Das Anwendungspotenzial von KaP in der Dermatologie und in anderen Fachrichtungen scheint damit jedoch noch nicht ausgeschöpft zu sein. So wird seit einigen Jahren vermehrt an möglichen KaP-Behandlungen von Krebs geforscht.

2.3.4.1 Tumorthherapie in der Plasmamedizin

Das Interesse an der Plasmamedizin und ihr therapeutischer Nutzen in der Tumorthherapie haben in der Vergangenheit stark zugenommen und wurden bereits in verschiedensten Fachbereichen thematisiert. In Abbildung 3 sind als Beleg dafür die wachsenden Publikationszahlen der letzten Jahre zu dieser Thematik dargestellt.

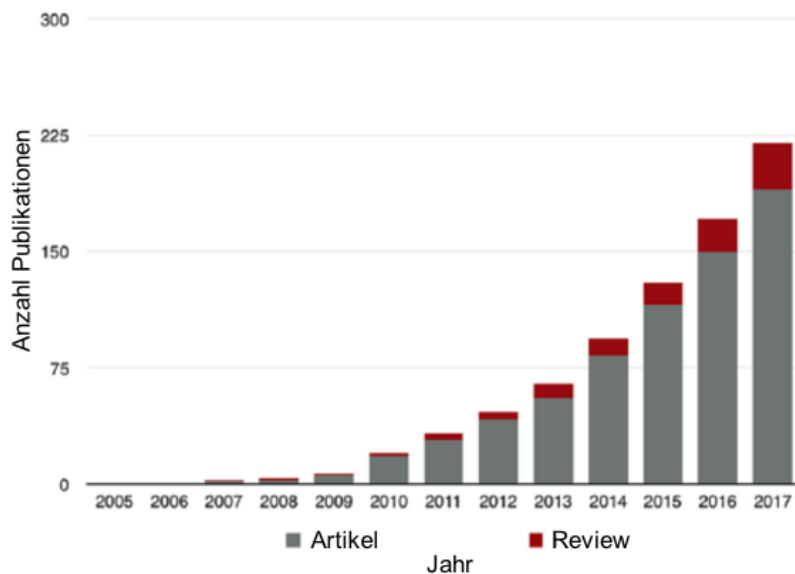


Abbildung 3: Publikationszahlen von KaP in der Krebstherapie
Entwicklung der Publikationszahlen zur Thematik KaP in der Krebstherapie (modifizierte Abbildung⁹²).

In vitro konnte bereits in einigen Studien mit verschiedensten Krebs-Zelllinien die Wirkungen von KaP auf behandelte Tumorzellen demonstriert werden. *Yan et. al* berichten in diesem Zuge von ungefähr 20 verschiedenen Zellreihen, die für die Untersuchungen des zellulären Wirkspektrums von KaP auf Krebszellen zum Einsatz kamen.⁷⁰ Dazu gehörten unter anderem Zellen des Kolonkarzinoms,¹⁵⁵ des Glioblastoms,¹²⁵ nicht-adhärenente Leukämie-Zellen,¹⁵⁶ Zellen des Mammakarzinoms,¹⁵⁷ des Hepatozellulären Karzinoms¹⁵⁸ sowie verschiedene Melanom-Zelllinien.^{159 85}

Auf dieser Grundlage konnten mittlerweile Aussagen über einige molekulare Mechanismen und somit auch über zelluläre Auswirkungen von KaP auf exponierte Krebszellen getroffen werden. Dazu zählen unter anderem das Anhalten des Zellzyklus in der G2/M- und S-Phase^{160 161 162}, DNA-Schäden¹⁶³, die letztendlich zu einem Zellzyklus-Stopp führen,^{125 164} Enzym-/Membranpotenzialveränderungen^{95 165} und Dysfunktion der Mitochondrien,^{95 166} Veränderungen der Genexpression,^{77 151 167} plasmaintuzierte Apoptose,^{83 168 169 170 171} Veränderungen der Architektur des Zytoskeletts und des Adhärenzverhaltens^{172 173 174 175} sowie die Inhibition des Zellwachstums und der Proliferation.^{155 159 176} Das komplette Ausmaß der intrazellulären Auswirkung von KaP ist jedoch weiterhin Thema in der Grundlagenforschung der Plasmamedizin.¹⁷⁷ Bei der Behandlung von Krebs scheint eine Kombinationstherapie mit systemisch verabreichten Medikamenten und KaP eine gute Einsatzmöglichkeit dazustellen. Veröffentlichte Studien zeigen ein erhöhtes

Penetrationsvermögen von systemisch verabreichten Zytostatika verursacht durch eine zusätzliche Behandlung mit KaP des Tumors¹⁷⁸ sowie die Revision von bestehenden Resistenzen von Tumorzellen gegenüber einer erfolgten Zytostatika-Therapie.¹⁷⁹ Durch eine Kombination aus zuvor markierten Tumorzellen mit Gold-Nanopartikeln¹⁸⁰ und Tumor-Antikörpern¹⁸¹ konnte eine gesteigerte KaP-Wirkung sowie eine gesteigerte Selektivität des KaP gegenüber malignen Zellen bei geringen Behandlungsdosen erreicht werden.

So liegt es nun vor allem daran die in *ex vivo* Experimenten gewonnen Daten und Erkenntnisse in *in vivo* Experimenten zu prüfen und auszuweiten. *Keidar et al.* konnten beispielsweise im Jahr 2011 mit einer transkutanen Plasmabehandlung das Wachstum von Tumorgewebe *in vivo* bei Mäusen signifikant reduzieren.¹⁷⁷ Das ist jedoch nur ein Beispiel von vielen vielversprechenden Ergebnissen aus *in vivo* Experimenten.^{125 178}

Zudem konnte bereits in ersten klinischen Studien mit Patienten mit einem Tumorleiden der erfolgreiche palliative oder prä-operative Einsatz von KaP zur Steigerung der Lebensqualität demonstriert werden.¹⁸² Als lebensqualitätssteigernde Merkmale zählten die Reduktion des Geruchs, des Schmerzmittelgebrauchs, der Tumorkontamination sowie der Tumorgroße.

Zusammenfassend ist es wichtig, Erkenntnisse über zellulären Mechanismen zu gewinnen, um mögliche Behandlungen mit KaP sicher und berechenbar gestalten zu können. Eine wichtige Rolle spielt dabei besonders die Verträglichkeit und Effektivität von KaP gegen verschiedenste Tumore und auch auf gesundes umgebendes Gewebe. Vorbereitend auf *in vivo* Anwendungen testeten daher *Lademann et al.* erfolgreich die Behandlung von KaP an Schweineohren um mögliche thermische-/UV-Schäden ausschließend zu können.⁷⁸ Ebenso wurde bereits an 3D-Hautmodellen gezielt mittels Histologie, UV-Anteilmessung sowie die Untersuchung von möglichen DNA-Schäden die Verträglichkeit einer KaP-Behandlung geprüft. Die Resultate deuten darauf hin, dass Behandlungen mit KaP bis zu zwei Minuten in dem ausgewählten Versuchsmodell als nicht schädigend auf umgebendes Gewebe eingeschätzt wurde.¹⁸³ Zusätzlich untersuchte *Fluhr et al.* in einer klinischen Studie bereits KAP-induzierte physiologische Parameter der Haut.¹⁸⁴ Eine weitere Studie von *Partecke et al.* untersuchte die Penetrationstiefe einer direkten KaP-Behandlung. So konnte in einem Hautmodell KAP-induzierte Apoptose von Zellen durch die erste Zellschicht auf etwa 60 µm nachgewiesen werden.¹⁸⁵

Mit besonders großem Interesse wird die Selektivität der oben genannten zellulären Wirkungen auf maligne Zellen untersucht. Tumorzellen reagieren scheinbar sensibler auf KaP als umgebende gleichartige benigne Zellen einer Zellkultur.^{173 177 186 187} *Yonghao et al.* und *Guerrero-Preston et al.* konnten darauf aufbauend zeigen, dass maligne Zellen mit einer Genmutation im Protein p53, welches eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Tumoren und der Regulation von oxidativem Stress¹⁸⁸ spielt, mit erhöhter Sensibilität auf eine KaP-Behandlung reagieren.^{189 190} Die Ergebnisse einer Studie von *Tuhvatulin et al.* zeigten wiederum, dass in Zellen mit einem intakten Protein p53 eben dieses nach einer Behandlung mit KaP vermehrt intrazellulär vorzufinden ist und anschließend ausschlaggebend für die Expression von p53-regulierten Genen wie beispielsweise dem proapoptischen Enzym Caspase 3 ist.¹⁹¹ Aber auch andere Mutationen in anderen Genabschnitten könnten mögliche Erklärungen für die unterschiedliche Sensitivität der Zellen sein. Zudem vermuten Forscher eine verstärkte Sensibilität stark proliferierender Tumorzellen im Vergleich zu weniger stark proliferierenden Zellen.¹⁹² Ob nun eine erhöhte basale RONS-Konzentration in kanzerogenen Zellen¹⁹³ oder Unterschiede in der antioxidativen Kapazität von Melanomzellen¹⁹⁴ die erhöhte Sensibilität gegenüber exogen zugeführten RONS erklären, ist noch unklar. Eine Publikation von *Van der Paal, Verheyen, Neyts et al.* postuliert in diesem Zusammenhang die Abhängigkeit dieser Selektivität von der unterschiedlichen Dichte des Vorkommens des membranständigen Cholesterols in der Zellmembran von Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen.¹⁹⁵ So konnte vor allem in exponierten Krebszellen ein Anstieg der intrazellulären RONS-Konzentration nachgewiesen werden.^{196 186} In der Literatur finden sich verschiedene Erklärungsversuche für diese RONS-Selektivität.^{197 198 187} Letztendlich sind die genauen Abläufe und Mechanismen bis jetzt noch ungeklärt.

Neben der Wirkungs-Selektivität lassen aktuelle Daten (seit 2015) eine mögliche plasmainduzierte Immunmodulation in Tumorgewebe vermuten. Auf Basis der Erkenntnis, dass tumorinfiltrierende Immunzellen ausschlaggebend für die Pathogenese und Progression mancher tumoröser Erkrankungen sind,^{199 200} wurden vermehrt auch Immunzellen Bestandteil von KaP-Versuchsreihen. Zu den infiltrierenden Zellen eines Tumors gehören neben Zellen des angeborenen Immunsystems unter anderem auch Zellen des adaptiven Immunsystems. Dazu zählen beispielsweise Lymphozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen. Unter physiologischen Bedingungen erkennen und bekämpfen diese tumorinfiltrierenden Immunzellen mutierte Zellen und verhindern somit

die Tumorentstehung.²⁰¹ Über tumorassoziierte Antigene auf der Tumorzelloberfläche werden APC zur Phagozytose dieser Tumorzellen stimuliert. Im Anschluss wird die spezifische systemische Immunantwort gegenüber dem Tumorgewebe durch die Interaktion von APC und Effektorzellen eingeleitet. Pathologische Interaktionen zwischen tumorinfiltrierenden Immunzellen und Tumorzellen bewirken die Entstehung eines komplexen immunsuppressiven Netzwerkes, das die mutierten Zellen vor immunologischen Angriffen schützt und das Tumorwachstum fördert. Dies ist keineswegs ein passiver Vorgang, sondern das Ergebnis einer aktiv induzierten Tumortoleranz.^{12 19 202} Bleiben dabei die mutierten Tumorzellen vom Immunsystem unbemerkt, so spricht man von Immunevasion.

Diese Kenntnisse über das komplexe immunsuppressive Netzwerk zwischen Tumorgewebe und Immunsystem werden schon seit einigen Jahren für therapeutische Zwecke genutzt. Die medikamentöse Immuntherapie bildet dabei schon jetzt ein wichtiges therapeutisches Feld bei der Behandlung des MM. Ziel einer Immuntherapie ist dabei, die körpereigene Immunantwort wiederaufzunehmen und damit eine Tumorsuppression zu induzieren.^{203 204}

Aufbauend auf dieser Vorgehensweise gibt es Forschungsansätze, die untersuchen, ob es mit Hilfe von KaP möglich ist, durch die Provokation eines „immunogen-induzierten Zelltods“ (ICD) von kanzerogenen Zellen eine systemische aber auch spezifische Tumorthherapie zu schaffen und auf dieser Weise die Tumormunität aufzuheben. In der Theorie sollen dabei durch die KaP-Behandlung spezielle ICD-spezifische Moleküle, sogenannte „Damage Associated Molecular Patterns“ (DAMP), freigesetzt werden, die letztendlich zur Stimulation der APC und zur Phagozytose der Tumorzellen führen sollen. Bisher wurden sechs ICD-assoziierte DAMP identifiziert. Zu diesen gehören Calreticulin (CRT), Adenosintriphosphat (ATP), High Mobility Group Box-1 (HMGB1), Interferon Typ-1 (IFN-1), Annexin-1 und Krebszell-assoziierte Nukleinsäuren.²⁰⁵ Durch die darauffolgende Präsentation der Tumorantigene in den Lymphknoten wird damit eine systemische und spezifische Immunantwort durch die T-Zell-Aktivierung angestrebt.^{206 207 208 209} Derweilen konnte bereits gezeigt werden, dass KaP Makrophagen zu einer erhöhten lokalen Tumor-Migration und einer erhöhten Phagozytose-Leistung stimuliert.^{210 211 212} Unter anderem durch ein vermehrtes Vorkommen von speziellen Oberflächenmolekülen (MHCII) und von CRT konnte zudem im Rahmen von *in vitro* Versuchen ein KaP-induzierter IDC demonstriert werden.²¹¹
^{213 214} Aufbauend darauf beobachteten *Mizuno et al.* (2017) bei *in vivo* Mausversuchen eine Reduktion der Tumorgrößen beidseitiger Tumoren, wobei nur einer der beiden Tumore eine

direkte KaP-Behandlung erfahren hatte.²¹⁵ Auch *Lin et al.* (2018) konnten mittels *in vivo* transkutaner KaP-Behandlung einen KaP-induzierten ICD-assoziierten Anstieg von DAMPs, eine erhöhte APC-Migration sowie eine tumorantigen-spezifische T-Zell-Antwort beobachten und damit das Potenzial von KaP in diesem Kontext untermauern.²¹⁶

Um immunologische Konsequenzen einer möglichen KaP-Tumorthherapie bestmöglich abschätzen zu können, wurden bereits verschiedene Subpopulationen des Immunsystems auf ihre Reaktionen getestet. Abhängig von der jeweiligen Zellsubpopulation fallen diese unterschiedlich in Bezug auf ihre Sensibilität und Aktivitätsänderungen aus.^{217 218 219 220}

3 Material und Methoden

Im Folgenden soll ein Überblick über die Versuchsabläufe und die dabei verwendeten Materialien gegeben werden.

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

In Tabelle 4 werden die genutzten Laborgeräte aufgeführt.

Tabelle 4: Geräte-Liste

Gerät	Model	Hersteller
Zentrifugen	Mini Star Silverline	VWR
	Multifuge 3 L-R	Heraeus
Lichtmikroskop	Eclipse TS100	Nikon
	EVOS Fl	Leitz Wetzlar
Wasserbad	TW 12	Julabo
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann
Sterile Werkbank	HeraSafe KS	Thermo Scientific
Einkanalpipetten	Pipetman Gilson	Gilson
	1 – 10 µl	
	10 – 100 µl	
	200 – 1000 µl	
Dispensiergerät	Multipette plus	Eppendorf
CO2-Inkubator	HERAcell 240 i	Thermo Scientific
Digitalwaage	MC1	Sartorius
Durchflusszytometer	BD LSRII	BD
Microplate Reader	Hidex Sense Beta Plus	Hidex
Thermocycler	7300 Real Time PCR system Applied Biosystems	UnoCycler-VWR

PCR-Gerät	T-Zellen	Rotor-Gene Q	QIAGEN
	Melanomzellen	73000 Real Time PCR System	Applied BioSystems
Nanodrop		NanoDrop 2000	PeqLab

3.1.1.1 Plasmajet Heuermann MiniJetPr-10

Der MiniJetPr-10 (Abbildung 4) der Firma Heuermann (*Heuermann HF Technik GmbH*) nutzt Mikrowellen zur Generation von kaltem Atmosphärenplasma. Die Nutzungsfrequenz beträgt 2,45 GHz und die Powerlevel-Wahlmöglichkeiten liegen zwischen 2 und 10 Watt. Das Grundgerät versorgt das Plasmahandstück mit einem konstanten Trägergasfluss zwischen 0.2 und 2 Standardliter pro Minute (sl/min). In dieser Arbeit wurden sämtliche Versuchsansätze mit dem Powerlevel 4 und dem Trägergas Argon (2 l/min) durchgeführt. Die ARC-Plus Gasversorgungseinheit der Firma BOWA (*BOWA-electronic GmbH & Co.KG*) bildete dabei das Bindestück zwischen Trägergasflasche und Plasma-MiniJet.^{221 222}



Abbildung 4: PlasmaJet PM-10 Heuermann HF-Technik GmbH

3.1.2 Materialien

Die für die Versuche benötigten Materialien werden in Tabelle 5 aufgezählt.

Tabelle 5: Materialien-Liste

Material	Model	Hersteller
Pipettenspitzen	Spitzen 1000 µl	Greiner bio-one

	Spitzen 200 µl	
	Spitzen 10 µl	
Zentrifugen-Röhrchen	Röhrchen 15 ml	Greiner bio-one
	Röhrchen 50 ml	
Kulturflaschen	Wachstumsfläche 75 cm ²	TPP
FACS-Rundboden Röhrchen	Polystyrol, 5 ml	Corning B.V.
Dispensiergerät-Aufsätze	Combitips advanced 0.5 ml	Eppendorf AG
Zellkultur-Platten	24-Loch-Gewebekultur- Platte (Flachboden)	Corning Incorporated
Eppendorf- Mikroreaktionsgefäß	0.5 ml	Eppendorf AG
	1.5 ml	
	2 ml	
Sterilfilter	Cell Strainer 40 µm	VWR
FACS-Platten	96-MicroWell Plate (Rundboden)	Greiner bio-one
Seperationshilfe Säulen	MACS- LS Columns	Miltenyi Biotec
Filterspitzen	Safe Seal Tips	Biozym
qPCR Kit	SYBR Green	Bimake
Mirco RNA Kit	peqGOLD	VWR International GmbH
cDNA Synthese Kit	iScript	Bio-Rad
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	VWR International GmbH

3.1.3 Substanzen

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verwendeten Substanzen.

Tabelle 6: Substanzen-Liste

Substanz	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethanol (96 %ig)	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Appllichem
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco
Isopropanol (2-Propanol)	Hedinger
Humanes Serum Albumin (HSA)	CSL Behring
Glutamax	Gibco
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich
X-VIVO 15	Biozym
RPMI Medium 1640	Gibco
Paraformaldehyd	Roth
Aqua	Ampuwa
Trypanblau	Sigma
Sandoglobin	CSL Behring
Primocin	Invivogen
Resazurin-Salz	Sigma-Aldrich
Accutase	Thermo Fisher Scientific
Trypsin	Sigma-Aldrich
Biocoll	Biochrom GmbH
5,6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen

Lebend-Tod Farbstoff (FVD 780)	Invitrogen
Antioxidantien	Sigma-Aldrich

3.1.3.1 Antioxidantien

Die Naturstoffe Kaffeesäure, Rutin-Hydrat und Resveratol wurden als Antioxidantien genutzt.

Kaffeesäure	Formel: $C_9H_8O_4$ Synonym: 3,4-Dihydroxizimtsäure Molekulargewicht: 180,16 g/mol
-------------	--

Rutin-Hydrat	Formel: $C_{27}H_{30}O_{16}$ Synonym: Quercetin-3-O-rutinosid Molekulargewicht: 610,52 g/mol
--------------	--

Resveratol	Formel: $C_{14}H_{12}O_3$ Synonym: 3,4',5-Stilbentriol Molekulargewicht: 228,25 g/mol
------------	---

Pro Naturstoff-Lösung wurden je 10 μ l von drei unterschiedlich konzentrierten Naturstofflösungen (Arbeitslösung: 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M) eingesetzt. Als Grundlage diente jeweils eine zuvor angesetzte 100 μ M Stammlösung. Bei der Herstellung wurde die angemessene Menge an Naturstoffpulver abgewogen, anschließend in sterilem DMSO gelöst und durch einen Sterilfilter gepresst. Aus den jeweiligen Stammlösungen wurde mittels 10-facher Verdünnung anschließend die verschieden konzentrierten Lösungen hergestellt und in 2 ml Aliquotes aufgeteilt. Bis zu ihrem Gebrauch wurden die befüllten Aliquotes kühl gelagert.

3.1.4 Antikörper

3.1.4.1 Primärantikörper für FACS-Färbung

Für durchflusszytometrische Messungen wurden folgende Antikörper verwendet.

Tabelle 7: verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Markierung	Verdünnung	Hersteller
CD3	MEM-57	APC	1:20	ImmunoTools
CD4	RPA-T4	PE	1:20	BD Biosciences
CD8	SK1	BV-711	1:20	BioLegend

3.1.4.2 Antikörper zur Zellaktivierung

Um *in vitro* T-Zellen zu aktivieren und Zellproliferation zu erzielen, hat sich die Verwendung der monoklonalen Antikörper CD3 und CD28 etabliert.²²³

Tabelle 8: Antikörper zur T-Zellaktivierung

Antikörper	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Purified anti-human CD3	1.0 µg/ml	Bioxcell
Purified anti-human CD28	1.0 µg/ml	BD Bioscience

3.1.5 Puffer und Lösungen

Folgende Lösungen und Puffer wurden für die Versuchsansätze verwendet.

Tabelle 9: verwendete Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Bestandteile
DPBS + EDTA	1 x DPBS; 1mM EDTA
FACS-Medium	1 x DPBS; 0.5 % HSA; 1 mM EDTA; 10 µg/ml Sandoglobin
FACS-Fixierlösung	1 x DPBS; 1 % Paraformaldehyd

MACS-Medium	1 x DPBS; 0.5 % HSA; 3 mM EDTA
X-VIVO 15 + HSA	1 x X-VIVO 15; 10 % HSA
Trypanblau-Gebrauchslösung	0.4 % Trypanlösung

3.1.6 Medien

Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte unter Verwendung folgender Medien.

Melanomzellen

Melanomzell-Kulturmedium	RPMI1640 10 % FCS 1 % Glutamax Primocin 1 ml pro 500 ml
--------------------------	--

T-Zellen

CD3 ⁺ T-Zell-Kulturmedium	X-VIVO 15
--------------------------------------	-----------

3.1.7 Verwendete Zelllinien

MaMel-19

Diese Zelllinie ist eine humane Melanom-Krebszelllinie. Etabliert wurde sie aus kutanen/subkutanen Metastasen einer Patientin mit metastasierendem Melanom (Stadium IV, oberflächlich streuend).²²⁴ Die Zelllinie wurde im Rahmen der „European Searchable Tumour Line Database“ (das sogenannte ESTDAB-Projekt) gesammelt und charakterisiert.²²⁵

UKRV-Mel-15a

Bei der Zelllinie UKRV-Mel-15a (UKRV-15a) handelt es sich ebenfalls um eine humane Melanom-Krebszelllinie. Beim Ursprungsgewebe handelt es sich um Gewebe aus Lymphknoten. Die Zelllinie wurde ebenfalls im Rahmen des ESTDAB-Projekts gesammelt und charakterisiert.²²⁵

3.2 Methoden

Sämtliche Versuchsansätze wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Ebenso kamen ausschließlich sterile Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Lösungen zum Einsatz.

3.2.1 Kultivierung der Melanom-Zelllinien

Für die Kultivierung der adhärennten Melanomzellen wurde eine 75 cm² große Kulturflasche mit 20 ml Melanom-Kulturmedium verwendet. Das Zellwachstum wurde regelmäßig mit dem Lichtmikroskop kontrolliert und in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer gesättigten Wasserdampfatosphäre aufbewahrt.

Nach Erreichen einer etwa 80 %-igen Konfluenz am Boden der Kulturflaschen erfolgte nach 4-minütiger Inkubationszeit das Ernten der Zellen mit 4 ml Trypsin-Lösung. 25 % der geernteten Zellen wurden erneut ausgesät und mit 20 ml frischem Kulturmedium versetzt. Die verbliebenen Melanomzellen wurden in 10 ml vorgelegtem, erwärmten Melanom-Zellmedium für jeweils nachfolgende Versuche überführt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension sedimentiert (400 x g, 5 °C, 6 Minuten), mit Kulturmedium gewaschen und schließlich in frischem Kulturmedium aufgenommen.

Die gewonnenen Zellen wurden je nach Versuchsaufbau anschließend für anstehende Versuche gesammelt.

3.2.2 Arbeiten mit humanen Blutzellen

Um mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zu gewinnen, wurden Blutkonserven von gesunden Blutspendern der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz genutzt.²²⁶

3.2.2.1 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Das dabei verwendete Trennverfahren beruht auf dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Unter dem Einfluss von Zentrifugalkräften und dem Lymphozyten-Separationsmedium Ficoll (Biocoll) teilen sich die verschiedenen Bestandteile des Spenderbluts anhand ihrer unterschiedlichen Dichte und Sedimentationsgeschwindigkeit in Zonen auf.

In einem 50 ml-Röhrchen wurde zunächst 15 ml Biocoll (Raumtemperatur) vorgelegt und anschließend mit der Hälfte des Gesamtvolumens des Spenderbluts vorsichtig überschichtet

(etwa 30 ml). Die verbleibenden 30 ml Spenderblut wurden vorsichtig in ein zweites mit Ficoll befülltes Röhrchen gegeben. In der Zentrifuge erfolgte nun für 30 Minuten bei 800 x g, 22 °C die Separation in die verschiedenen Bestandteile. Um Verwirbelungen der Dichtegradienten zu verhindern, wurde die Bremse des Rotors ausgeschaltet.

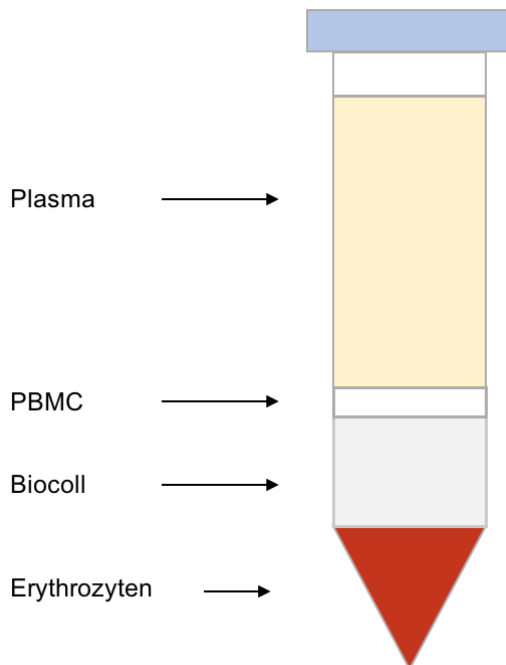


Abbildung 5: Dichtegradientenzentrifugation

Phasenauftrennung der Blutspende nach erfolgter Dichtegradientenzentrifugation

Nach der Phasentrennung wurde nun mit einer 10 ml Glaspipette vorsichtig die PBMC-reiche Phase zwischen Plasma und Biocoll abgenommen und in ein frisches 50 ml-Röhrchen mit 10 ml kaltem vorgelegtem DPBS + EDTA überführt. Im Anschluss wurden die soeben isolierten Zellen zur Entfernung von restlichen verbliebenen unerwünschten Bestandteilen in mehreren Zentrifugations- und Waschschritten mit DPBS + EDTA (Zentrifugation 300 x g, 4 °C, 6 Minuten) gereinigt. Daraufhin folgte die Isolation der CD3⁺ T-Zellen aus der Zellsuspension.

3.2.2.2 Isolation von CD3⁺ T-Zellen

Das hier verwendete Verfahren beruht auf dem Prinzip der magnetisch aktivierten Zellseparation und findet unter Verwendung von Magnetpartikeln (Mikro Beads), an die monoklonale anti-human CD3-Antikörper gebunden sind, statt. Diese sind in der Lage, entsprechende Antigene auf der Zelloberfläche zu erkennen, an die Epitop-Region auf der CD3ε-Kette von T-Zellen zu binden und ermöglichen somit die Abtrennung der gewünschten CD3⁺ T-Zellpopulation aus der Suspension. Die Zellsuspension wird dafür in Separations-

Säulen überführt. Diese sind mit einer Eisenmatrix befüllt und werden für den Separationsvorgang in einen MACS-Separator gespannt. Ein starkes magnetisches Feld entsteht, welches das Verweilen von markierten CD3⁺ T-Zellen in der Eisenmatrix der Säule bewirkt. Beim hier verwendeten Verfahren handelt es sich somit um eine Positivselektion.

Es wurden zunächst 400×10^6 isolierte, abzentrifugierte PBMCs mit 80 µl CD3 Mikro Beads und 500 µl MACS-Puffer für 15 Minuten bei 4 °C unter ständiger Bewegung auf einem Wackelbrett inkubiert. Nachdem durch die Zugabe von MACS-Puffer und anschließendem 10-minütigem Zentrifugieren alle ungebundenen Mikro Beads aus der Zellsuspension entfernt wurden, konnte diese in bereitliegende, mit 5 ml Pufferlösung aktivierte MACS-Säulen überführt werden. Nicht-markierte T-Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit je 5 ml MACS-Puffer aus der Säule gespült und im Anschluss verworfen. Die gesammelten CD3⁺ T-Zellen in der Eisenmatrix der Säulen wurden durch die Zugabe von 10 ml Pufferlösung mit einem Stempel unter konstantem Druck mechanisch aus der Säule gespült und in frischen 15 ml-Röhrchen aufgefangen. Die T-Zellen wurden zentrifugiert und in 10 ml Kulturmedium aufgenommen.

Die gewonnenen Zellen wurden je nach Versuchsaufbau anschließend für anstehende Versuche gesammelt und kühl gelagert.

3.2.3 CFSE-Markierung von Melanomzellen und isolierten CD3⁺ T-Zellen

Um während einer durchflusszytometrischen Messung eine Proliferations-Analyse vornehmen zu können, wurden Zellen mit CFSE inkubiert. Der Farbstoff durchdringt die Zellmembran, lagert sich im Inneren der Zellen an und wird durch Esterasen gespalten, sodass er dieser das Zellinnere nicht mehr verlassen kann. Zudem entsteht im Inneren der Zelle durch den Abbau ein fluoreszierender Farbstoff. CFSE geht im Inneren der Zellen eine Bindung mit freien Aminogruppen ein und ist somit über einen längeren Zeitraum stabil. Teilen sich die gefärbten Zellen, so wird der Farbstoff im Zytoplasma zu gleichen Teilen an die Tochtergenerationen aufgeteilt. Durch die durchlaufenen Zellzyklen verändert sich die Fluoreszenzintensität der Zellen und ermöglicht mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Messung Rückschlüsse über das Teilungsverhalten der markierten Zellen.

Für die Färbung wurde eine CFSE-Stock-Lösung (1 µM CFSE in DPBS) hergestellt. Zu den sedimentierten Zellen wurde 2 ml CFSE/1 x PBS-Lösung (1 µM CFSE) gegeben und resuspendiert. Im Anschluss folgte eine 20-minütige Inkubationszeit bei 37 °C im

Brutschrank. Daraufhin wurde zum Stoppen der Färbereaktion 10 ml erwärmtes X-VIVO 15 + 10 % humanes Serum Albumin (HSA) zur Zellsuspension hinzugefügt und in der Zentrifuge pelletiert (400 x g, 6 Minuten, Raumtemperatur). Nach vorsichtigem Verwerfen des Überschusses wurde das Zellpellet in neuem erwärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und gewaschen. Anschließend wurden für die folgenden Versuche die Zellzahlen der CFSE-markierten Zellen bestimmt.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Erfassung der vitalen Zellen wurde eine diffusionsbasierte Vitalfarbstoff-Färbung mit Trypanblau vorgenommen. Unmittelbar nach der Zugabe zu der Zellsuspension erfolgt die Einteilung in lebende und tote Zellen. Trypanblau dringt in tote Zellen ein und färbt das Zytoplasma blau. Bei lebenden Zellen mit einer intakten Zellmembran reichert sich der Farbstoff im Inneren hingegen nicht an. Bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop zeigen sich daher lebende Zellen ungefärbt. Für das Vorgehen wurde eine 1/10-Verdünnung der Zellsuspension mit der Trypanblau-Lösung hergestellt. Anschließend erfolgte die Auszählung der Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop.

Mit einer Formel lässt sich die Anzahl der Zellen je Volumeneinheit definieren.

Zellzahl = Anzahl der Zellen im Großquadrat x Gesamtvolumen der Zellsuspension (in ml) x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor (10^4)

3.2.5 Plasmabehandlung

Für die Behandlungen mit KaP wurden die ausgewählten Zellen unter festgelegten Bedingungen kultiviert, Plasma behandelt und anschließend verschiedene Messungen vorgenommen.

3.2.5.1 Kulturbedingungen Melanom-Zelllinien

Für die Durchführung der Plasmabehandlung wurden die gezählten Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät. Pro Vertiefung wurde eine gewünschte Zellzahl von 1×10^5 Zellen in 2 ml Melanom-Zellkulturmedium festgelegt. Jeder Versuchsansatz bestand aus einer unbehandelten Kontrollprobe (Negativprobe) und jeweils zwei Proben (Dubletten) für die jeweilige Behandlungszeit. Je nach Versuchsaufbau wurde zudem eine Tod-Kontrolle der Zellen (Positivprobe) mit 200 µl DMSO angesetzt. Bis die ausgesäten Zellen adhärent waren,

wurden die befüllten Loch-Platten im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Im Anschluss erfolgte die Durchführung der Plasmabehandlung.

Sämtliche weiterführende Messungen wurden nach einer Inkubationszeit von drei Tagen und Lagerung im Brutschrank vorgenommen.

3.2.5.2 Kulturbedingungen CD3⁺ T-Zellen

Beim Ansetzen der CD3⁺ T-Zellen wurde bei der Plasmabehandlung wurden zunächst die gezählten Zellen in 24-Loch/Platten ausgesät. Pro Vertiefung wurde eine gewünschte Zellzahl von 2.5×10^6 Zellen in 2 ml T-Zell-Kulturmedium (X-VIVO 15) festgelegt. Ein Versuchsansatz bestand auch hier aus einer unbehandelten Kontrolle (Negativ-Kontrolle) und jeweils einer Vertiefung in der Lochplatte pro Behandlungszeit. Abhängig vom jeweiligen Versuch wurden zwei Versuchsansätze parallel angesetzt. So gab es einen Versuchsansatz mit unstimulierten CD3⁺ T-Zellen und stimulierten CD3⁺ T-Zellen. Die Stimulation der Zellen erfolgte dabei mit den monoklonalen Antikörper anti-CD3 1.0 µg/ml und anti-CD28 1.0 µg/ml. Im Anschluss erfolgte die Durchführung der Plasmabehandlung.

Sämtliche weiterführende Messungen, sofern nicht anders beschrieben, wurden auch hier nach einer Inkubationszeit von drei Tagen und Lagerung im Brutschrank vorgenommen.

3.2.5.3 Behandlungsablauf

Für die Behandlung der Zellen wurde der PlasmaJet PM-10 (siehe Kapitel 3.1.1.1) verwendet. Die Zellen wurden je nach Versuchsaufbau für definierte Zeiten (CD3⁺ T-Zellen: 5 Sekunden, 30 Sekunden, 60 Sekunden; Melanomzellen: 1 Minute, 2 Minuten, 3 Minuten) und mit einem definierten Abstand von 1 cm dem Plasmastrahl ausgesetzt. Die ausgewählten Behandlungszeiten der Melanomzellen^{102 159 168} und der T-Zellen^{217 219 220} wurden auf Basis von in der Literatur beschriebenen Zeiten getroffen. Unter zur Hilfenahme einer Stoppuhr und eines Stativs zur Fixierung des Plasmahandstückes erfolgte die KaP-Behandlung. Während der Plasmabehandlung wurde die Kulturplatte manuell so bewegt, dass der einfallende Plasmastrahl möglichst gleichmäßig auf die gesamten zu behandelten Zellen in den Vertiefungen traf. Abbildung 6 zeigt den Versuchsaufbau für die KaP-Behandlungen.

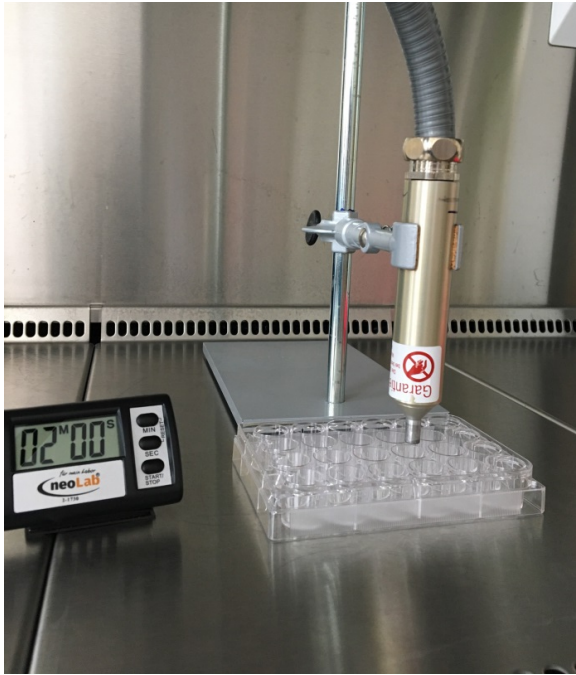


Abbildung 6: Versuchsaufbau

Versuchsaufbau Plasmabehandlung mit Fixierung des Plasmahandstücks und Stoppuhr

3.2.5.4 Antioxidantien

Alle neun Naturstoff-Arbeitslösungen wurden mittels Testversuchen (siehe 4.1.4.1 und 4.2.3.1) auf ihre Toxizität und ihren Einfluss auf das Proliferationsverhalten getestet. Die Messungen erfolgten mittels Durchflusszytometrie.

Für die anschließenden Kombinations-Versuche in Ko-Kulturen aus den verschiedenen Naturstoff-Lösungen und den Plasmabehandlungen wurden jeweils, abhängig von der gewünschten Endkonzentration (siehe 3.1.3.1), 10 μl der ausgewählten Naturstoff-Lösung unmittelbar vor der Plasmabehandlung zu den Zellen in den Vertiefungen der Lochplatte hinzugegeben und resuspendiert.

3.2.6 Datenerhebung

Zur Erhebung der Daten wurden verschiedene Verfahren und entsprechende Versuchsprotokolle verwendet.

3.2.6.1 Resazurin-Zell-Viabilitäts-Test

Zur Detektion der metabolischen Aktivität von Melanomzellen wurde ein Fluoreszenz-Test durchgeführt. Durch die Reduktion des Redox-Indikators Resazurin in den metabolisch

aktiven Zellen entsteht pinkfarbenes, fluoreszierendes Resorufin. Abbildung 7 zeigt den Farbumschlag eines beispielhaften Resazurin-Tests mit behandelten Melanomzellen.

Die gemessenen Fluoreszenzwerte des Tests werden als proportional zur Zellzahl lebender Zellen angesehen und mit Hilfe einer unbehandelten Kontrollprobe (Negativ-Kontrolle/ ϕ) normiert.

Um den Test zu starten, wurde eine Resazurin-Stock-Lösung (0.3 mg/ml in DPBS) hergestellt und in die jeweiligen Plattenvertiefungen mit einer 50-fachen Verdünnung hinzugefügt.

Nach einer 60-minütigen Inkubationszeit erfolgte die Messung der Fluoreszenzwerte durch einen Multiplate-Reader (*Hidex Sense Beta Plus*). Als Filter wurde für die Messungen eine Anregungswellenlänge von 544/20 nm und eine Emissionswellenlänge von 590/20 nm festgelegt. Für die Hintergrund-Kontrolle der Messungen wurde zusätzlich eine Vertiefung der Lochplatte mit ausschließlich Zellkulturmedium angesetzt.

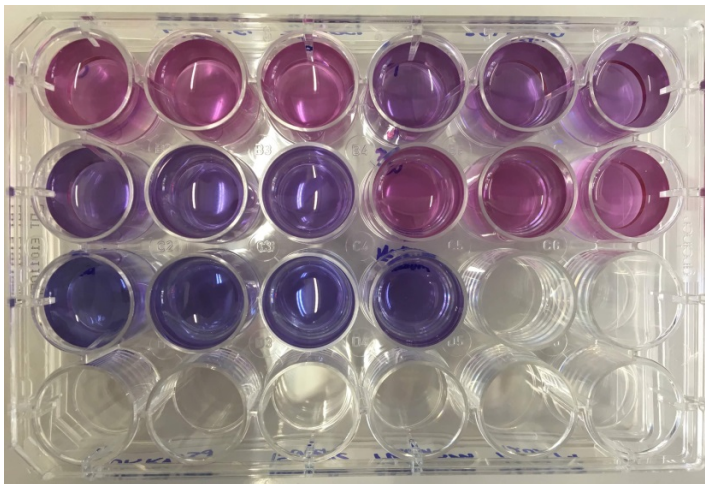


Abbildung 7: beispielhafter Resazurin-Test

Farbumschlag eines beispielhaften Resazurin-Tests mit Melanomzellen und verschiedenen Plasmabehandlungszeiten

3.2.6.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder auch „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS)-Analyse, ist eine Quantifizierungsmethode basierend auf der Zellgröße, der Zellgranularität und Molekülen auf der Zelloberfläche. Die Messungen ermöglichen die Trennung verschiedener Zellpopulationen einer Zellsuspension voneinander. Dabei passieren suspendierte Zellen einzeln mehrere Laserstrahlen. Mehrere Detektoren registrieren dabei charakteristische Lichtsignale, die charakteristisch für den Zelltyp und die Zellvorbehandlung der jeweiligen

Zelle sind. Durch die dabei entstehende Lichtstreuung (Seitwärtsstreulicht: SSC) und die Lichtbeugung (Vorwärtsstreulicht: FSC) können Aussagen über die relative Größe und die relative Granularität bzw. Komplexität der Zellen getroffen werden. Zusätzlich ermöglichen Fluoreszenzfarbstoffe an der Oberfläche Rückschlüsse auf die spezifische Fluoreszenz und die entsprechende relative Fluoreszenz-Intensität einzelner Zellen. Das Prinzip der verwendeten Fluoreszenzmarkierung beruht auf der Antikörper-Antigen-Reaktion, wobei unterschiedlichste fluoreszenzfarbstoffmarkierte Antikörper zum Einsatz kommen können. Trifft der Laser einer spezifischen Wellenlänge auf die mit Fluorochrom markierte Zelle, werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Da dieser Zustand nicht stabil ist, fallen die Elektronen im Anschluss wieder auf ihr Ursprungsenergieniveau zurück und Energie in Form von Photonen wird frei. Diese Emission von Photonen erfolgt in einer charakteristischen Wellenlänge und wird von einem Photonendetektor registriert. Durch die jeweils charakteristischen Emissionsspektren der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe ist es möglich, gleich mehrere Farbstoffe in einer Messung zu verwenden.

Antikörperfärbung von Oberflächenmolekülen

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden die adhärennten behandelten Melanomzellen zunächst mit 250 µl Accutase geerntet. Von den behandelten CD3⁺ T-Zellen wurden 250 µl der Zellsuspension entnommen. Die gesammelten Zellen wurden anschließend für die Färbungen in eine 96-Mikroplatte überführt. Nach Zentrifugation der befüllten Mikroplatten (4 Minuten, 400 x g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 10 µl Lebend-/Tod-Färbung (FVD780) für 20 Minuten bei 4 °C und bei Dunkelheit inkubiert. Nachdem die Zellen erneut mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen wurden, erfolgte je nach Versuchsaufbau zusätzlich die Zugabe von 10 µl des Antikörpermixes, bestehend aus mehreren Primärantikörpern, zur Detektion von Oberflächenmoleküle. Folgende Antikörper wurden zusätzlich zur T-Zell-Differenzierung verwendet: anti-CD3, anti-CD4 und anti-CD8 (siehe Kapitel 3.1.4). Darauf folgte eine erneute Inkubationszeit von 20 Minuten (4 °C, Dunkelheit). Abschließend wurden die gefärbten Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und für die folgenden durchflusszytometrischen Analysen in FACS-Röhrchen überführt. War es nicht möglich, die durchflusszytometrischen Messungen am gleichen Tag vorzunehmen, so wurden die gefärbten Zellen in eine Fixierlösung (1 % PFA + DPBS) aufgenommen und bis zum Messzeitpunkt bei Dunkelheit im Kühlschrank gelagert.

Die Messungen der vorbereiteten Zellen erfolgten am BD FACS LSRII mit der Software BD FACS DIVA. Zur weiteren Analyse der Daten wurde die online verfügbare Plattform Cytobank²²⁷ (<https://community.cytobank.org/cytobank/login>) verwendet.

3.2.6.3 Morphologische Bilder

Zur Erfassung morphologischer Veränderungen durch KaP wurden drei Tage nach erfolgter Plasmabehandlung unter Verwendung eines Lichtmikroskops repräsentative Bilder der Zellkulturen angefertigt.

3.2.6.4 Genexpressionsanalysen

Um KaP-induzierte zelluläre Veränderungen besser einordnen zu können wurden Genexpressionsanalysen mittels quantifizierter Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion durchgeführt (qRT-PCR). Dafür wurden Messungen der gleichen Proben nach 16 Stunden und nach drei Tagen vorgenommen. Die Versuchsansätze enthielten jeweils eine unbehandelte Negativprobe, eine Probe nach Zugabe einer Naturstoff-Arbeitslösung, eine plasmabehandelte Probe sowie eine Probe aus der Kombination Naturstoff-Arbeitslösung und anschließender Plasmabehandlung.

Isolation und Quantifizierung von RNA

Die behandelten Melanom- und T-Zellen wurden in Aliquotes überführt und für zwei Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in Lyse-Puffer des peqGOLD Mirco RNA Kit (VWR International GmbH) resuspendiert. Während des kompletten Isolations-Prozesses wurden die Herstellerangaben berücksichtigt. Die befüllten Aliquotes wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Spektralphotometer (Nanodrop, ThermoScience) verwendet.

cDNA Synthese mittels RT-qPCR

Aus der isolierten RNA konnte anschließend mit Hilfe von reversen Transkriptasen die benötigte cDNA synthetisiert werden. Zum Einsatz kam dabei das iScript cDNA Synthese Kit (Bio-Rad). Eingesetzt wurden 120 ng isolierter RNA jeder Probe.²²⁸ Tabelle 10 zeigt die verwendeten Komponenten in den entsprechenden Volumina (pro Reaktion).

Reaktionsaufbau

Tabelle 10: Reaktionsaufbau cDNA-Synthese

Komponenten	Volumen pro Reaktion (in μ l)
5 x iSkript Reaktions-Mix	4
iSkript Reverse-Transkriptase	1
Nuklease-freies Wasser	variabel
RNA Template	variabel
Gesamtvolumen	20

Reaktionsprotokoll

Der Reaktionsmix wurde in einem Thermocycler nach Herstellerangaben inkubiert und das in Tabelle 11 dargestellte Reaktionsprotokoll verwendet.

Tabelle 11: Reaktionsablauf cDNA-Synthese

Priming	5 Minuten bei 25 °C
Reverse-Transkription	20 Minuten bei 46 °C
RT Interaktion	1 Minute bei 95 °C
Optionaler Schritt	Halten bei 4 °C

Quantitative Real-Time PCR

Die „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) ist ein zyklischer Prozess zur selektiven, exponentiellen Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz. Entscheidend für die Selektivität des Prozesses sind die ausgewählten Primer. Der Zyklus besteht aus drei temperaturabhängigen Schritten:

1. Denaturierung der DNA-Doppelstränge
2. Anlagerung der Primer an die DNA
3. Verlängerung durch eine thermostabile DNA-Polymerase

Der entstandene neue Strang steht nun wiederum als Vorlage für einen neuen Zyklus zur Verfügung. Bei der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) werden zur Detektion von PCR-

Produkten Fluoreszenz-Farbstoffe (SYBR-GREEN) verwendet. SYBR-Green bindet hochspezifisch an doppelsträngige DNA und ermöglicht anschließend über gemessene Fluoreszenzsignale eine Quantifizierung der PCR-Produkte. Die Besonderheit dieses Verfahrens besteht in der Datenerfassung während des Ablaufes der PCR. Entscheidend für die Charakterisierung ist dabei der Zeitpunkt eines Fluoreszenzanstiegs während der Vervielfältigung. Je früher es zu einem Anstieg der Fluoreszenz kommt, desto mehr anfängliche DNA-Sequenzen waren in der Probe enthalten.^{229 230}

Die qRT-PCR wurde nach Herstellerangaben mit dem SYBR Green qPCR Kit (Bimake) durchgeführt. Jede Probe wurde in Dubletten angesetzt. Tabelle 12 zeigt die für die qRT-PCR verwendeten Komponenten in entsprechenden Volumina (pro Reaktion). Die Messungen der Melanomzellen erfolgte mit dem 73000 Real Time PCR System (*Applied BioSystem*), die Messungen der T-Zellen mit dem Rotor-Gene Q (*QIAGEN*). Die Programmeinstellungen wurden nach Herstellerangaben festgelegt (45 Zyklen).

Reaktionsaufbau

Tabelle 12: Reaktionsaufbau qRT-PCR

Komponente	Volumen pro Reaktion (in µl)
2 x Bimake SYBR Green Master Mix	10
Probe	2
Vorwärtsprimer	1
Rückwärtsprimer	1
Carboxy-X-Rhodamine (ROX) Referenz-Färbung	0.4
RNAse-freies Wasser	Differenz bis 20
Gesamtvolumen	20

Zum Einsatz kamen folgende Melanomzell-Primer:

CDKN2a: CDKN2A_s CTTGGCTGACTGGCTGG

CDKN2A_as TCATCATGACCTGGATCGGC

HIF1: HIF1alpha_s CACAGAAATGGCCTTGTGAA
 HIF1alpha_as CCAAGCAGGTCATAGGTGGT

Zum Einsatz kamen folgende T-Zell-Primer:

IL-2: IL-2-s CAAGAAGGCCACAGAACTGAA
 IL-2-as TGGTTGCTGTCTCATCAGCAT
IFN- γ : IFNG_s GGCTTTTCAGCTCTGCATCG
 IFNG_as TCTGTCACTCTCCTCTTTCCAA
IL-10: IL-10_s ACGGCGCTGTCATCGATTT
 IL-10_as GCCACCCTGATGTCTCAGTT
FOXP3: FOXP3_s CACTGCCCTAGTCATGGTG
 FOXP3_as CGTTGAGAGCTGGTGCATGA

Zur Normalisierung aller Expressionen wurde das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ausgewählt. Das Verhältnis von Haushaltsgen und Zielgen wurde mit der delta-delta CT-Methode kalkuliert.²³¹

3.2.7 Statistische Auswertung

Die Daten wurden zunächst mit dem Programm Excel Microsoft Office erfasst und anschließend mit dem Statistikprogramm SPSS (Superior Performance Software System Version 23) ausgewertet.

3.2.7.1 Deskriptive Auswertung

Für die deskriptiven Analysen wurden die Mittelwerte (*MW*) und Standardabweichungen (*SD*) ermittelt.

Zur graphischen Darstellung der erhobenen Daten wurden Balkendiagramme (*SD* +/- 1) ausgewählt.

3.2.7.2 Explorative Auswertung

Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurde keine Normalverteilung der erhobenen Daten angenommen. Um Wertunterschiede zu definieren wurden bei unabhängigen Stichproben Tests nach Kruskal Wallis/ Whitney-U (Positiv-Kontrollen sind aus den Tests

ausgeschlossen) angewandt. Bei abhängigen Stichproben wurde der Wilcoxon-Vorzeichentest angewendet. Wertunterschiede sind auf Schaubildern mit Sternen markiert ($***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$). Zur Bestimmung von Korrelationen wurde der Spearman-Korrelationstest durchgeführt (r).

4 Ergebnisse

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die *in vitro* Untersuchung (i) des zeitabhängigen Effekts von KaP in Bezug auf die metabolische Aktivität und die Morphologie von Melanomzellen sowie auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten von humanen Melanom- und Immunzellen. Für die Versuchsansätze wurden verschiedene Plasmabehandlungszeiten (Melanomzellen: 1 Minute, 2 Minuten, 3 Minuten; CD3⁺ T-Zellen: 5 Sekunden, 30 Sekunden, 60 Sekunden) ausgewählt. Die Behandlungen der Tumorzellen beziehungsweise der CD3⁺ T-Zellen erfolgte jeweils an Tag 0. Darauf folgende Analysen – sofern nicht anders beschrieben – wurden nach drei Tagen durchgeführt.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Antioxidantien in Form verschiedener Naturstoff-Lösungen (Kaffeensäure, Rutin-Hydrat und Resveratrol) auf die mit KaP behandelten Zellen getestet um (ii) den Effekt des Plasmas auf die Zellen zu reduzieren und (iii) mittels Genexpressionsanalysen Aufschluss über die genaue Wirkungsweise von KaP erlangt werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche beschrieben. Zunächst die der Versuchsreihen mit den Melanom-Zelllinien MaMel-19 und UKRV-15a.

4.1 Ergebnisse der Melanomzell-Versuche

4.1.1 Einfluss von KaP auf die Morphologie von Melanomzellen

Um morphologische Veränderungen der beiden Melanom-Zelllinien UKRV-15a und MaMel-19 nach erfolgter Plasmabehandlung untersuchen zu können, wurden mikroskopische Aufnahmen der jeweiligen Zellkulturen gemacht. Neben den Aufnahmen der Proben mit unterschiedlichen Behandlungszeiten wurden zudem Aufnahmen von Negativproben (unbehandelte Melanomzellen) und Positivproben (Tod-Kontrolle mit 200 µl DMSO) angefertigt. Die im Folgenden dargestellten und für die jeweilige Zellkultur repräsentativen mikroskopischen Bilder wurden nach dreitägiger Inkubationszeit aufgenommen (vgl. Abbildung 8 und Abbildung 9)

Mikroskopische Aufnahmen Zelllinie MaMel-19

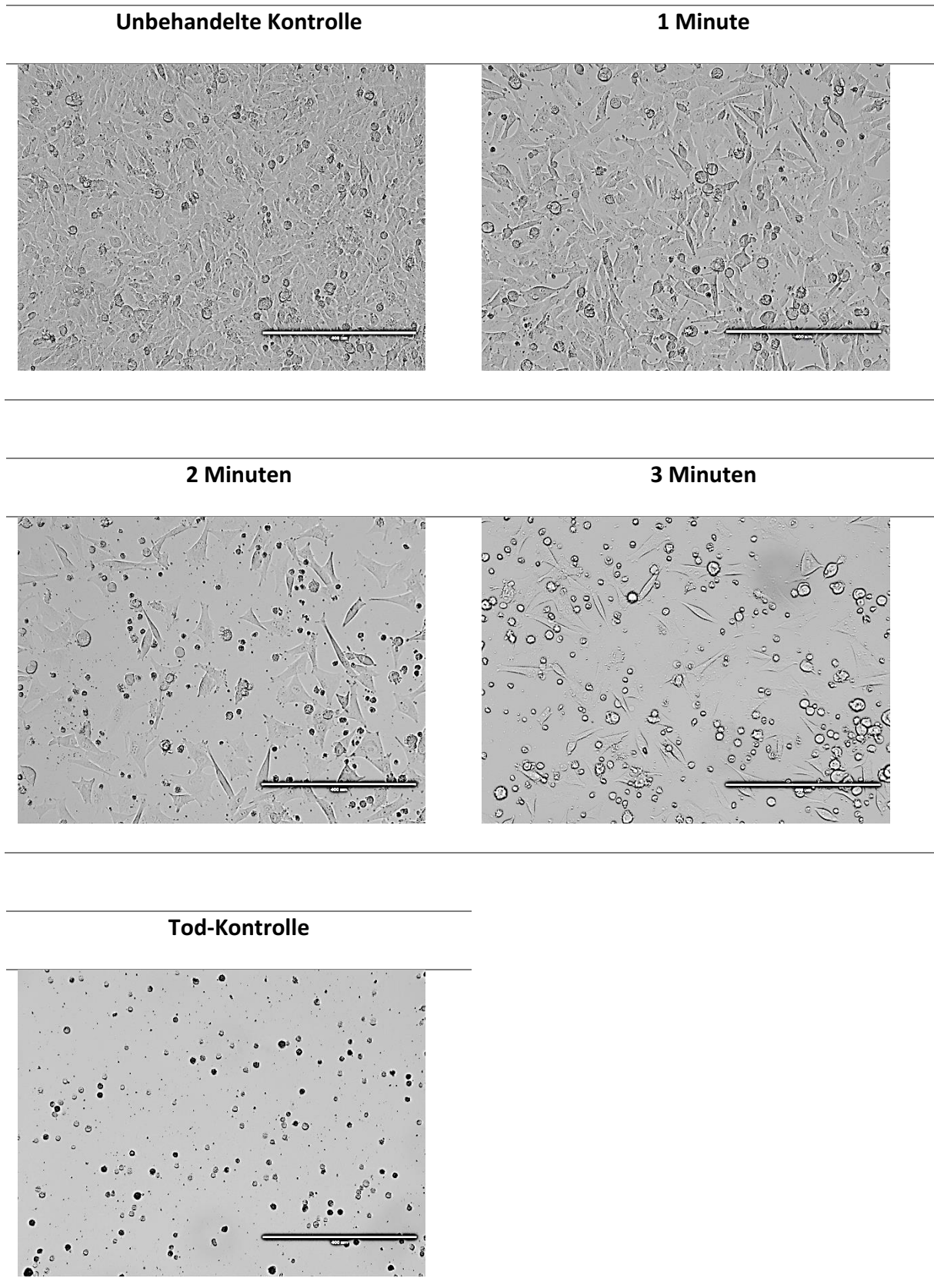


Abbildung 8: Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop der Melanomzellen MaMel-19 nach Plasmabehandlung zur Untersuchung morphologischer Veränderungen (Maßstabskala 400 µm)

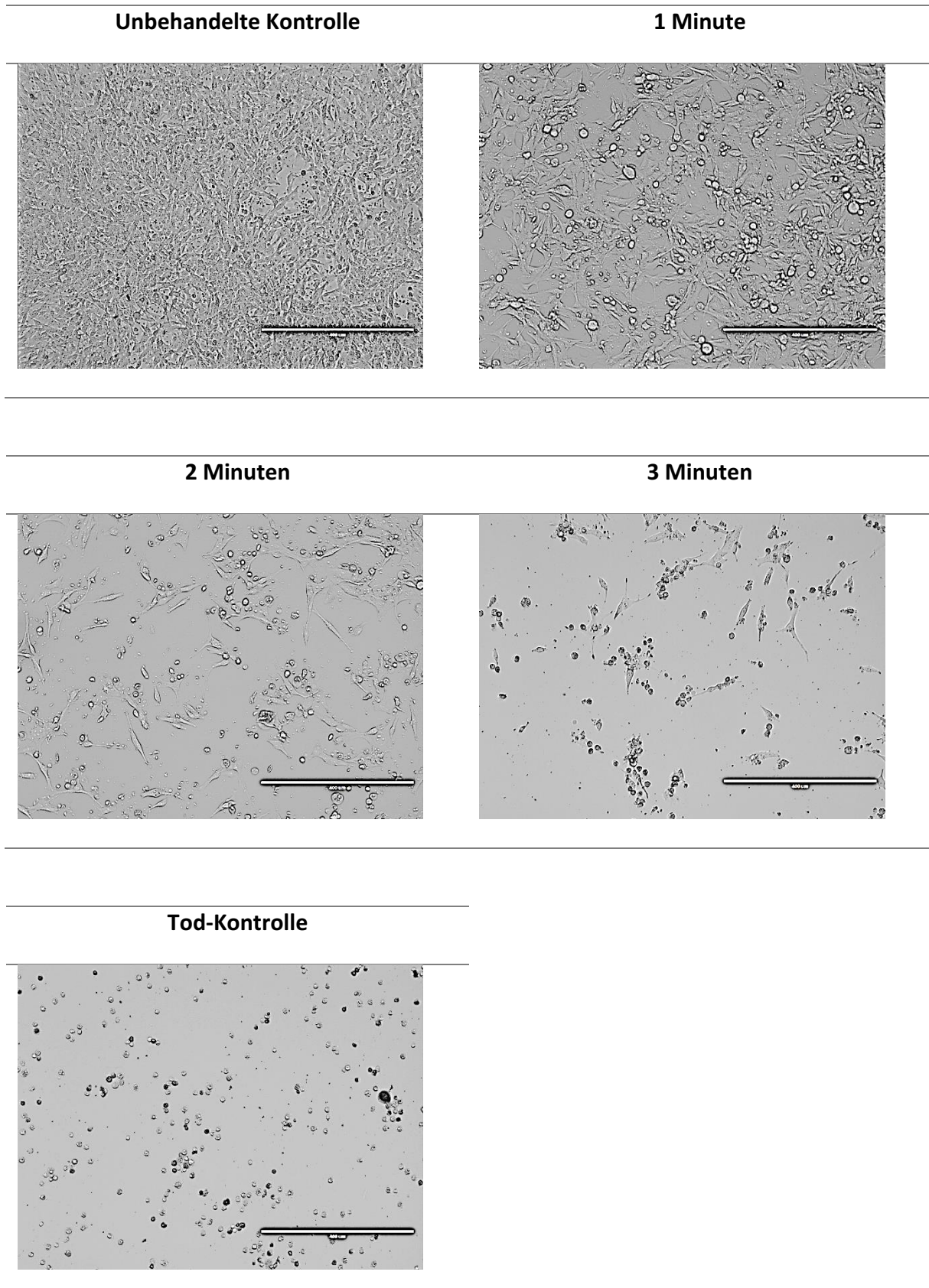
Mikroskopische Aufnahmen Zelllinie UKRV-15a

Abbildung 9: Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop der Melanomzellen UKRV-15a nach Plasmabehandlung zur Untersuchung morphologischer Veränderungen (Maßstabskala 400 µm)

Um den Einfluss von KaP auf die Morphologie der Tumorzellen besser beurteilen zu können, wurden in Abbildung 8 und Abbildung 9 zusätzlich zu den Aufnahmen mit unterschiedlichen Behandlungszeiten jeweils Negativkontrollproben von unbehandelten Zellen beider Zelllinien abgebildet. In der Negativkontrolle zeigt sich ein dichter Zellrasen aus gleichmäßigen, länglichen, adhärenen Zellen. Nach einer Minute KaP-Behandlung stellt sich bei beiden Zelllinien eine deutlich verringerte Zelldichte im Vergleich zur Negativkontrollprobe dar. Die Melanomzellen beider Zelllinien zeigen sich jedoch noch zum Großteil länglich und adhärent. Mit steigender Behandlungszeit ändert sich das mikroskopische Erscheinungsbild der Zellkulturen zunehmend. Es sind nun immer mehr runde und nicht-adhärenente Zellen sichtbar. Morphologisch ähneln KaP-behandelten Zellen nun zunehmend den Zellen der Tod-Kontrolle. Nur zu geringen Anteilen sind die Zellen nach drei Minuten Plasmabehandlungszeit noch länglich und adhärent. Die Zellzahl hat sich augenfällig zunehmend verringert und der dichte Zellrasen am Boden der Zellkultur ist verschwunden.

Zusammenfassend ist auf Basis der mikroskopischen Darstellungen in Abbildung 8 und Abbildung 9 ein von der Behandlungszeit abhängiger Effekt von KaP auf die Adhärenz, das Zellwachstum und das Zellüberleben bei beiden Zelllinien zu vermuten.

4.1.2 Wirkung von KaP auf die metabolische Aktivität von Melanomzellen

Die mikroskopischen Aufnahmen in 4.1.1 lassen einen zeitabhängigen Effekt von KaP auf das Zellwachstum, die Zellzahl sowie auf den Anteil vitaler und adhärenenter Melanomzellen der beiden Zelllinien MaMel-19 und UKRV-15a vermuten. Um den Einfluss von KaP genauer zu untersuchen und zu quantifizieren, wurde deshalb mit Resazurin-Tests der Anteil metabolisch-aktiver Zellen nach den Plasmabehandlungen ermittelt und in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

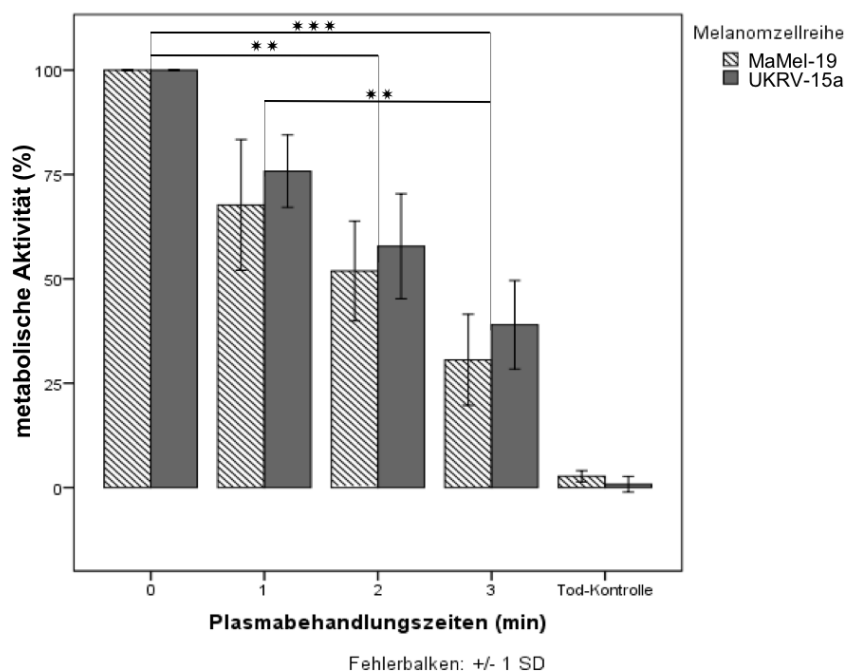


Abbildung 10: Veränderungen der metabolischen Aktivität (Resazurin-Test) von Melanomzellen unter dem Einfluss von KaP

Für die Analysen wurden Melanomzellen der Zelllinien MaMel-19 und UKRV-15a mit unterschiedlich lange mit Plasma behandelt (Plasmabehandlungszeiten: 1 Minute, 2 Minuten, 3 Minuten) und anschließend kultiviert. Es wurden zudem unbehandelte Negativproben (0 Minuten Plasmabehandlung) sowie Positivproben (Tod-Kontrolle mit 200 µl DMSO) angesetzt. Nach drei Tagen wurde mittels Resazurin-Tests und anschließenden Fluoreszenzmessungen die metabolische Aktivität (in %) der Melanom-Zelllinien ermittelt. Die Messwerte aus den Versuchsansätzen ($n = 10$) wurden gemittelt und auf die unbehandelten Negativproben normiert. Wertunterschiede wurden mittels Kruskal Wallis-Test ermittelt und sind durch Sterne markiert (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Wie in Abbildung 10 dargestellt, ergibt sich mit zunehmender Plasmabehandlungszeit eine sinkende metabolische Aktivität bei beiden Melanom-Zelllinien. Die genormten metabolischen Aktivitäts-Mittelwerte der unterschiedlichen Behandlungsgruppen (1 Minute, 2 Minuten, 3 Minuten) sind bei Zellen der Zelllinie MaMel-19 jeweils um etwa 10 % niedriger als bei der Zelllinie UKRV-15a. So liegen die Mittelwerte nach einer Minute Plasmabehandlung bei MaMel-19 bei 67 % ($SD = 15$ %), bei UKRV-15a bei 75 % ($SD = 8$ %). Die Zellen der Gruppe nach zweiminütiger Plasmabehandlung zeigen Mittelwerte von etwa 50 % (MaMel-19: $MW = 51$ %; $SD = 11$ %; UKRV-15a: $MW = 57$ %; $SD = 12$ %). Nach drei Minuten Plasmabehandlung bleiben bei beiden Zelllinien weniger als 40 % metabolisch-aktiver Zellen übrig (MaMel-19: $MW = 30$ %; $SD = 10$ %; UKRV-15a: $MW = 39$ %; $SD = 10$ %).

Ein Kruskal Wallis-Test ergab Wertunterschiede hinsichtlich des Anteils metabolisch aktiver Zellen zwischen den verschiedenen Behandlungszeiten. So zeigen sich für beide Zelllinien jeweils veränderte Wertunterschiede zwischen den Plasmabehandlungsgruppen „0 Minuten“ und „2 Minuten“ (MaMel-19: $p = 0.002$; UKRV-15a: $p = 0.001$), „0 Minuten“ und „3

Minuten“ (MaMel-19: $p < 0.001$; UKRV-15a: $p < 0.001$) sowie „1 Minute“ und „3 Minuten“ (MaMel-19: $p = 0.005$; UKRV-15a: $p = 0.005$).

Die Korrelation der Variablen „Plasmabehandlungszeit“ und „metabolische Aktivität“ wurde zudem mittels Spearman-Korrelation überprüft. Dabei ergaben sich bei beiden Melanom-Zelllinien signifikante Korrelationen zwischen diesen beiden Größen (MaMel-19: $r = -0.958$; UKRV-15a: $r = -0.959$). Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass je länger eine Plasmabehandlung andauert, desto geringer fällt dementsprechend die gemessene metabolische Aktivität der Zellen aus.

4.1.3 Wirkung von KaP auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten von Melanomzellen

Nachdem durch die Resazurin-Tests eine zunehmend verminderte metabolische Aktivität bei steigender Plasmabehandlungszeit gezeigt werden konnte, wurde anschließend der Einfluss von KaP auf die Vitalität und auf das Proliferationsverhalten der Melanom-Zelllinien überprüft.

4.1.3.1 Veränderungen der Vitalität

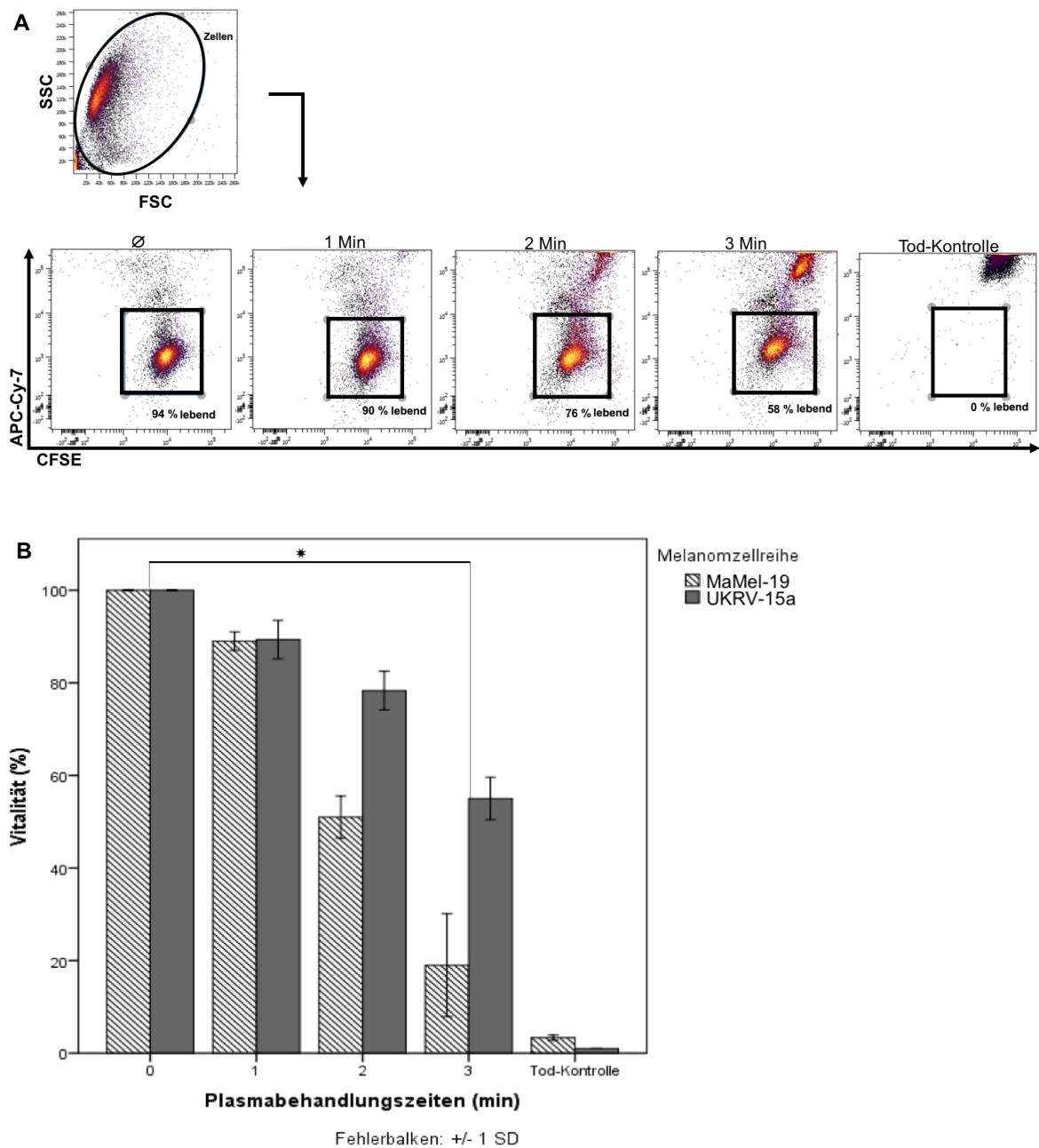


Abbildung 11: Veränderungen der Vitalität bei Melanomzellen durch den Einfluss von KaP

Für die Analysen wurden CFSE-markierte Melanomzellen der Zelllinie MaMel-19 und UKRV-15a unterschiedlich lange (Plasmabehandlungszeiten: 1 Minute, 2 Minuten, 3 Minuten) mit KaP behandelt und anschließend kultiviert. Es wurden zudem unbehandelte Negativproben (0 Minuten KaP-Behandlung = ϕ) sowie Positivproben (Tod-Kontrolle mit 200 μ l DMSO) angesetzt. An Tag drei wurde mittels Lebend/Tod-Färbung (FVD780) und anschließender durchflusszytometrischer Messung der Anteil lebender Zellen (in %) ermittelt. **A** Dargestellt ist ein repräsentatives FACS-Plot-Beispiel der verschiedenen Behandlungszeiten eines Versuchsansatzes sowie die Gating-Strategie vitaler Zellen. **B** Gemittelte und auf die unbehandelten Negativproben normierte Werte aus 3 Versuchsansätzen ($n = 3$) sind dargestellt. Wertunterschiede wurden mittels Kruskal Wallis-Test ermittelt und sind durch Sterne markiert (* $p < 0.05$).

Wie Abbildung 11 B erkennen lässt ist nach drei Tagen die Tendenz einer sinkenden Vitalität beider Tumor-Zelllinien bei zunehmenden Plasmabehandlungszeiten festzustellen. Die

beiden Zelllinien reagieren dabei mit auffällig unterschiedlich stark ausgeprägten Vitalitätsverlusten auf die Plasmabehandlungen. Die Mittelwerte unterscheiden sich untereinander innerhalb der gleichen Behandlungsgruppe 1 (1 Minute) kaum (MaMel-19: $MW = 89 \%$, $SD = 2 \%$; UKRV-15a: $MW = 89 \%$, $SD = 4 \%$). Ab einer der Plasmabehandlungszeit von zwei Minuten ist vor allem bei Zellen der Zelllinie MaMel-19 ein deutlich stärkerer Vitalitätsverlust im Vergleich zu den Zellen der Zelllinie UKRV-15a zu erkennen (MaMel-19: $MW = 51 \%$, $SD = 4 \%$; UKRV-15a: $MW = 78 \%$, $SD = 4 \%$). Nach dreiminütiger Plasmabehandlung liegen erneut deutliche Mittelwertunterschiede (MaMel-19: $MW = 19 \%$, $SD = 11 \%$, UKRV-15a: $MW = 55 \%$, $SD = 4 \%$) zwischen den beiden Tumorzelllinien vor. Die Werte beider Zelllinien der Behandlungsgruppe mit dreiminütiger Plasmabehandlung unterscheiden sich ($p = 0.012$) im Vergleich zu den Vitalitätswerten der unbehandelten Negativproben.

4.1.3.2 Veränderungen des Proliferationsverhaltens

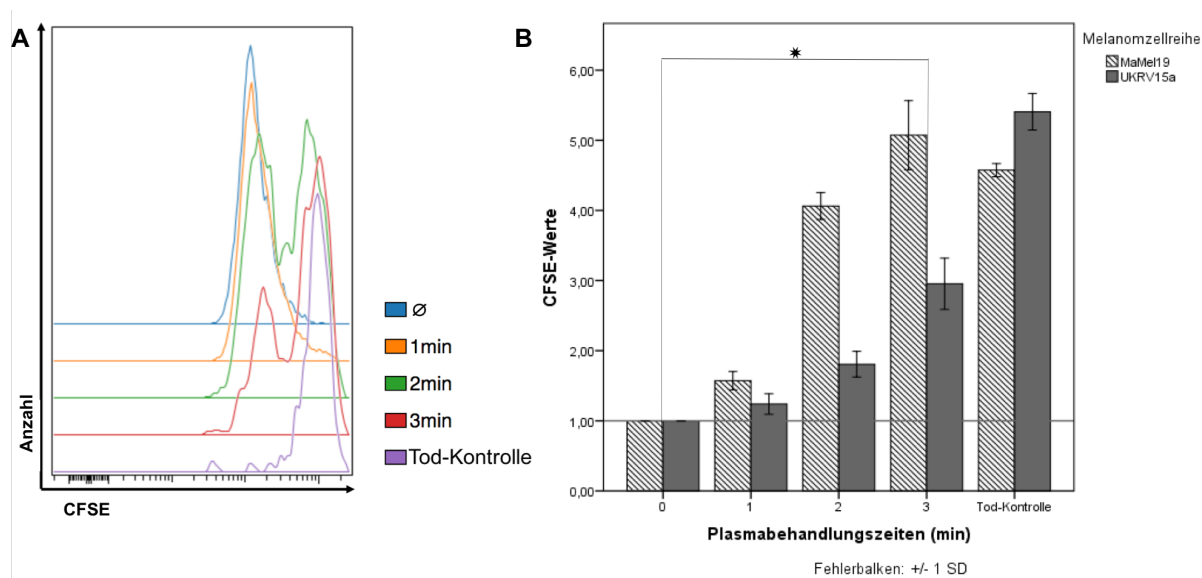


Abbildung 12: Veränderungen des Proliferationsverhaltens von Melanomzellen durch den Einfluss von *KaP*

Für die Analyse wurden CFSE-markierte Melanomzellen der Zelllinien MaMel-19 und UKRV-15a unterschiedlich lange (1 Minute, 2 Minuten, 3 Minuten) mit *KaP* behandelt und anschließend kultiviert. Es wurden zudem unbehandelte Negativproben (0 Minuten *KaP*-Behandlung = ϕ) sowie Positivproben (Tod-Kontrolle mit 200 μ l DMSO) angesetzt. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach drei Tagen der Anteil proliferierender Zellen (in CFSE-Werten) in den Zellkulturen analysiert. **A** Gezeigt wird ein repräsentatives Überlagerungs-Histogramm der verschiedenen Behandlungszeiten eines Versuchsansatzes. **B** Dargestellt sind die gemittelten und auf die unbehandelten Negativproben normierten Werte aus 3 Versuchsansätzen ($n = 3$). Wertunterschiede wurden mittels Kruskal Wallis-Test bestimmt und sind mit Sternen markiert (* $p < 0.05$).

Wie in Abbildung 12 B dargestellt führt die Behandlung mit *KaP* zu einer zeitabhängigen Inhibition der Proliferation beider Melanom-Zelllinien. Deutlich wird dies durch die hoch bleibenden CFSE-Werte der behandelten Tumorzellen. Die genormten Mittelwerte der

Melanomzellen MaMel-19 stellen sich nach zwei Minuten Plasmabehandlungszeit um etwa das 4-fache ($MW = 4.06$, $SD = 0.19$) und nach drei Minuten Plasmabehandlungszeit um etwa das 5-fache ($MW = 5.07$, $SD = 0.49$) des Ursprungs-CFSE-Wertes der unbehandelten Negativprobe höher dar. Die Melanomzellen der Zelllinie UKRV-15a zeigen in etwa die gleiche Tendenz nach den Behandlungen, jedoch in geringerem Ausmaß (2 Minuten: $MW = 1.80$, $SD = 0.18$; 3 Minuten: $MW = 2.95$, $SD = 0.36$). Veränderte Wertunterschiede zeigen sich jeweils zwischen den beiden Behandlungsgruppen „3 Minuten“ und „0 Minuten“ ($p = 0.012$).

Zusammenfassend lässt sich somit eine behandlungszeitabhängige Inhibition der Proliferation, der Vitalität sowie der metabolischen Aktivität der Melanomzellen beobachten. Das Ausmaß der untersuchten biologischen Wirkung von KaP auf die beiden Zelllinien fällt dabei unterschiedlich stark aus.

4.1.4 Ko-Kulturen aus Antioxidantien und KaP-exponierten Melanomzellen

Um die in 4.1.3 beobachteten Effekte von KaP genauer untersuchen zu können, wurde im Folgenden untersucht, welche Auswirkungen die Zugabe von Antioxidantien in Form von Naturstoff-Lösungen auf die KaP-exponierten Melanomzellen hat.

4.1.4.1 Wirkung von Antioxidantien auf Melanomzellen

Um den Einfluss der Antioxidantien selbst auf die Vitalität und auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen zu prüfen, wurde zu Beginn der Versuchsreihe zunächst einige Antioxidantien-Testversuche durchgeführt.

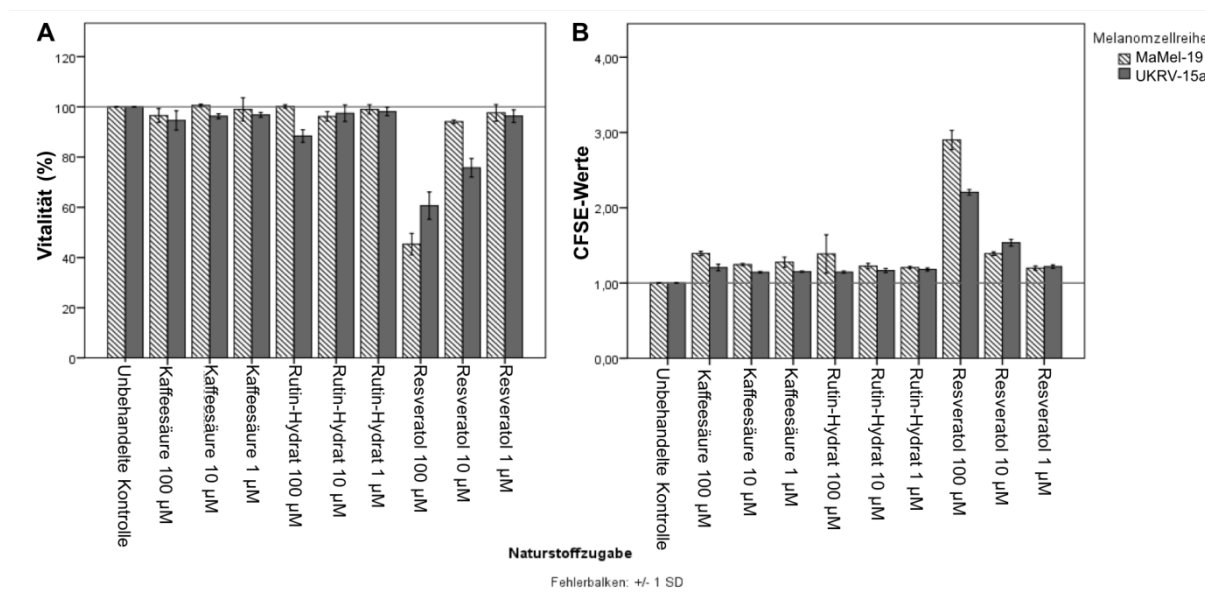


Abbildung 13: Antioxidantien-Test Melanomzellen– Naturstoff-Lösungen und ihre Auswirkungen auf Melanomzellen

Die Zellen der Melanom-Zelllinien MaMel-19 und UKRV-15a wurden mit CFSE markiert und anschließend mit drei verschiedenen Naturstoffen-Lösungen (Kaffeensäure, Rutin-Hydrat, Resveratrol) in drei unterschiedlichen Konzentrationen (100 µM, 10 µM, 1 µM) stimuliert. Nach drei Tagen erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der **A** Vitalität (in %) und **B** des Proliferationsverhaltens (in CFSE-Werten) der kultivierten Zellen. Dargestellt sind die gemittelten und auf die unbehandelten Negativproben normierten Mittelwerte aus 3 Versuchsansätzen (n = 3).

Die Zugabe der Naturstoff-Lösungen nimmt in unterschiedlichem Maße Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen (Abbildung 13 A). Beurteilt man den Einfluss der Kaffeensäure auf die Vitalität der Tumorzellen zeigen sich nach der Zugabe aller drei Konzentrationen leicht verminderte, jedoch annähernd unveränderte Vitalitätswerte (UKRV-15a: Kaffeensäure 100 µM: $MW = 94 \%$, $SD = 3 \%$; Kaffeensäure 10 µM: $MW = 96 \%$, $SD = 0 \%$; Kaffeensäure 1 µM: $MW = 96 \%$, $SD = 0 \%$; MaMel-19: Kaffeensäure 100 µM: $MW = 96 \%$, $SD = 2 \%$; Kaffeensäure 10 µM: $MW = 100 \%$, $SD = 0 \%$, Kaffeensäure 1 µM: $MW = 99 \%$, $SD = 4 \%$).

Die Addition von Rutin-Hydrat zu den Tumorzellen UKRV-15a zeigt vor allem in der höchsten Konzentration einen negativen Einfluss auf das Überleben der Zellen ($MW = 88 \%$, $SD = 2 \%$). Mit sinkender Konzentration der Rutin-Hydrat-Lösungen steigt in geringem Ausmaß der Anteil vitaler Zellen (10 µM: $MW = 97 \%$, $SD = 3 \%$; Arbeitslösung 1 µM: $MW = 98 \%$, $SD = 1 \%$). Die Zellen der Zelllinie MaMel-19 reagieren durch die Zugabe der Rutin-Hydrat-Lösungen nur mit geringfügigen Veränderungen ihrer Vitalität (MaMe-19: Rutin-Hydrat 100 µM: $MW = 100 \%$, $SD = 0 \%$; Rutin-Hydrat 10 µM: $MW = 96 \%$, $SD = 1 \%$; Rutin-Hydrat 1 µM: $MW = 98 \%$, $SD = 1 \%$).

Durch die Zugabe der Resveratol wird ein konzentrationsabhängiger Verlust der Vitalität beider Melanom-Zelllinien hervorgerufen. So zeigt sich nach Addition der höchsten Resveratol-Lösung eine Verminderung der Vitalität um circa 40 % (MaMel-19: $MW = 45 \%$, $SD = 4 \%$; UKRV-15a: $MW = 60 \%$, $SD = 5 \%$). Die Resveratol-Lösung in $10 \mu\text{M}$ Konzentration reduziert den Anteil vitaler UKRV-15a Tumorzellen um circa 25 % ($MW = 75 \%$, $SD = 3 \%$). Zellen der Zelllinie MaMel-19 reagieren hingegen auf diese Resveratol-Lösung nur mit geringfügigen Vitalitätsverlusten ($MW = 94 \%$, $SD = 0 \%$). Die am niedrigstens konzentrierte Naturstoff-Lösung ruft ebenfalls nur geringe Veränderungen der Vitalität hervor (MaMel-19 $1 \mu\text{M}$: $MW = 97 \%$, $SD = 3 \%$; UKRV-15a $1 \mu\text{M}$: $MW = 96 \%$, $SD = 2 \%$).

Auch die Proliferation der Melanom-Zelllinien wird in unterschiedlichem Ausmaß durch die Zugabe der Naturstoff-Lösungen inhibiert (Abbildung 13 B). Beurteilt man die Wirkung der Arbeitslösungen der Kaffeesäure auf die Tumorzellen, zeigt sich nach Zugabe der drei Konzentrationen ein geringer Anstieg der CFSE-Werte beider Melanom-Zelllinien (MaMel-19: Kaffeesäure $100 \mu\text{M}$: $MW = 1.39$, $SD = 0.02$; Kaffeesäure $10 \mu\text{M}$: $MW = 1.24$, $SD = 0.01$; Kaffeesäure $1 \mu\text{M}$: $MW = 1.27$, $SD = 0.06$; UKRV-15a: Kaffeesäure $100 \mu\text{M}$: $MW = 1.20$, $SD = 0.04$; Kaffeesäure $10 \mu\text{M}$: $MW = 1.14$, $SD = 0.01$; Kaffeesäure $1 \mu\text{M}$: $MW = 1.15$, $SD = 0.00$).

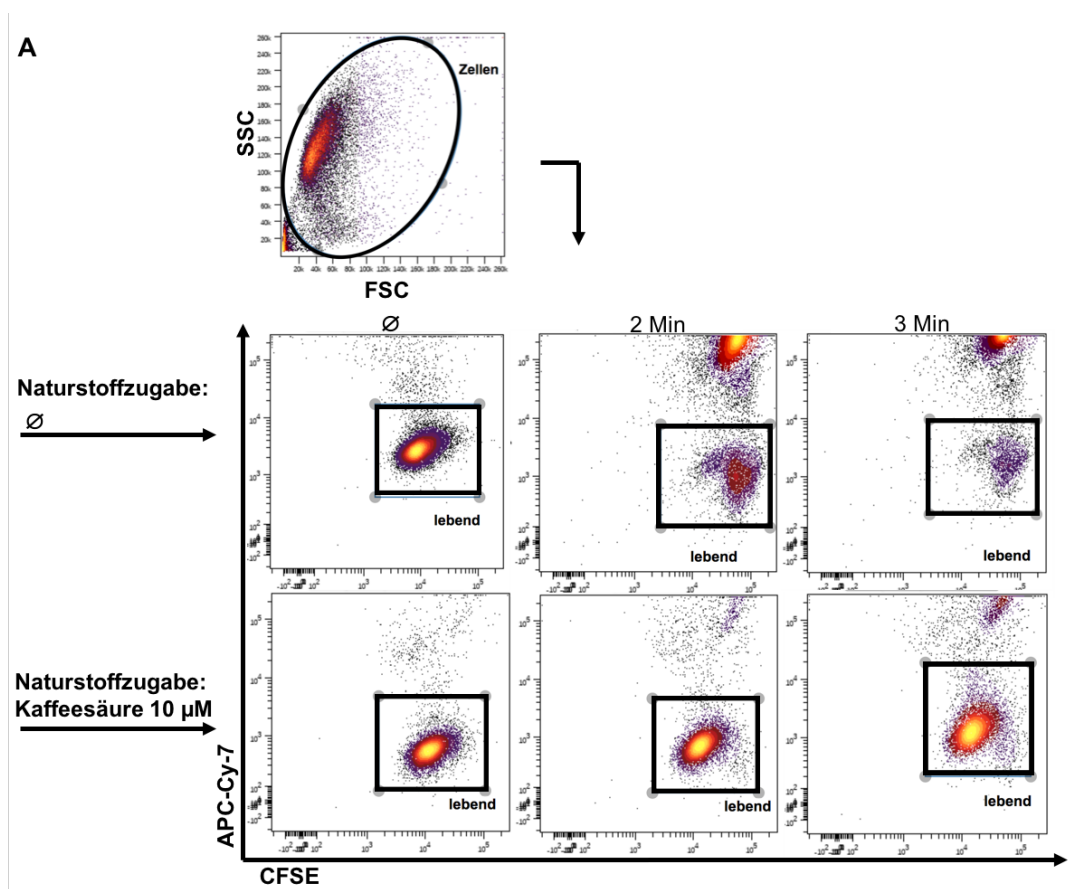
Durch die Zugabe der Rutin-Hydrat-Lösungen zu den Melanomzellen ist die gleiche Tendenz zu beobachten. Die CFSE-Werte beider Tumor-Zelllinien sind auch hier leicht erhöht (MaMel-19: Rutin-Hydrat $100 \mu\text{M}$: $MW = 1.38$, $SD = 0.25$; Rutin-Hydrat $10 \mu\text{M}$: $MW = 1.22$, $SD = 0.03$; Rutin-Hydrat $1 \mu\text{M}$: $MW = 1.20$, $SD = 0.01$; UKRV-15a: Rutin-Hydrat $100 \mu\text{M}$: $MW = 1.14$, $SD = 0.01$; Rutin-Hydrat $10 \mu\text{M}$: $MW = 1.16$, $SD = 0.02$; Rutin-Hydrat $1 \mu\text{M}$: $MW = 1.18$, $SD = 0.02$).

Durch die Addition der Resveratol-Lösungen in den unterschiedlichen Konzentrationen ist ebenfalls eine konzentrationsabhängige Inhibition des Proliferationsverhaltens zu beobachten. Nachdem die am höchsten konzentrierte Resveratol-Lösung hinzugefügt wurde stiegen die CFSE-Werte der beiden Zelllinien stark an (MaMel-19: $100 \mu\text{M}$: $MW = 2.89$, $SD = 0.12$; UKRV-15a: Resveratol $100 \mu\text{M}$: $MW = 2.20$, $SD = 0.03$). Je geringer die Konzentrationen der darauffolgenden Resveratol-Naturstofflösungen ausfielen, desto weniger wurde das Proliferationsverhalten der Zellen eingeschränkt (MaMel-19: Resveratol $10 \mu\text{M}$: $MW = 1.38$, $SD = 0.02$; Resveratol $1 \mu\text{M}$: $MW = 1.19$, $SD = 0.02$; UKRV-15a: Resveratol $10 \mu\text{M}$: $MW = 1.53$, $SD = 0.04$; Resveratol $1 \mu\text{M}$: $MW = 1.21$, $SD = 0.02$).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ausgenommen von den 10 μM und 100 μM konzentrierten Resveratrol-Lösungen sowie der 100 μM Kaffeesäure-Lösung, die Naturstoffe einen vernachlässigbar geringen Einfluss auf die Vitalität und die Proliferation der Melanomzellen haben.

4.1.4.2 Wirkung von Antioxidantien auf KaP-exponierte Melanomzellen

Aufgrund der beschriebenen Wirkung der Naturstoff-Lösungen auf die Vitalität und auf die Proliferation der Melanomzellen wurden für die folgenden Versuchsreihen nur die Naturstoff-Lösungen in den Konzentrationen: Kaffeesäure 10 μM und 1 μM , Rutin-Hydrat 100 μM , 10 μM und 1 μM sowie Resveratrol 1 μM verwendet.



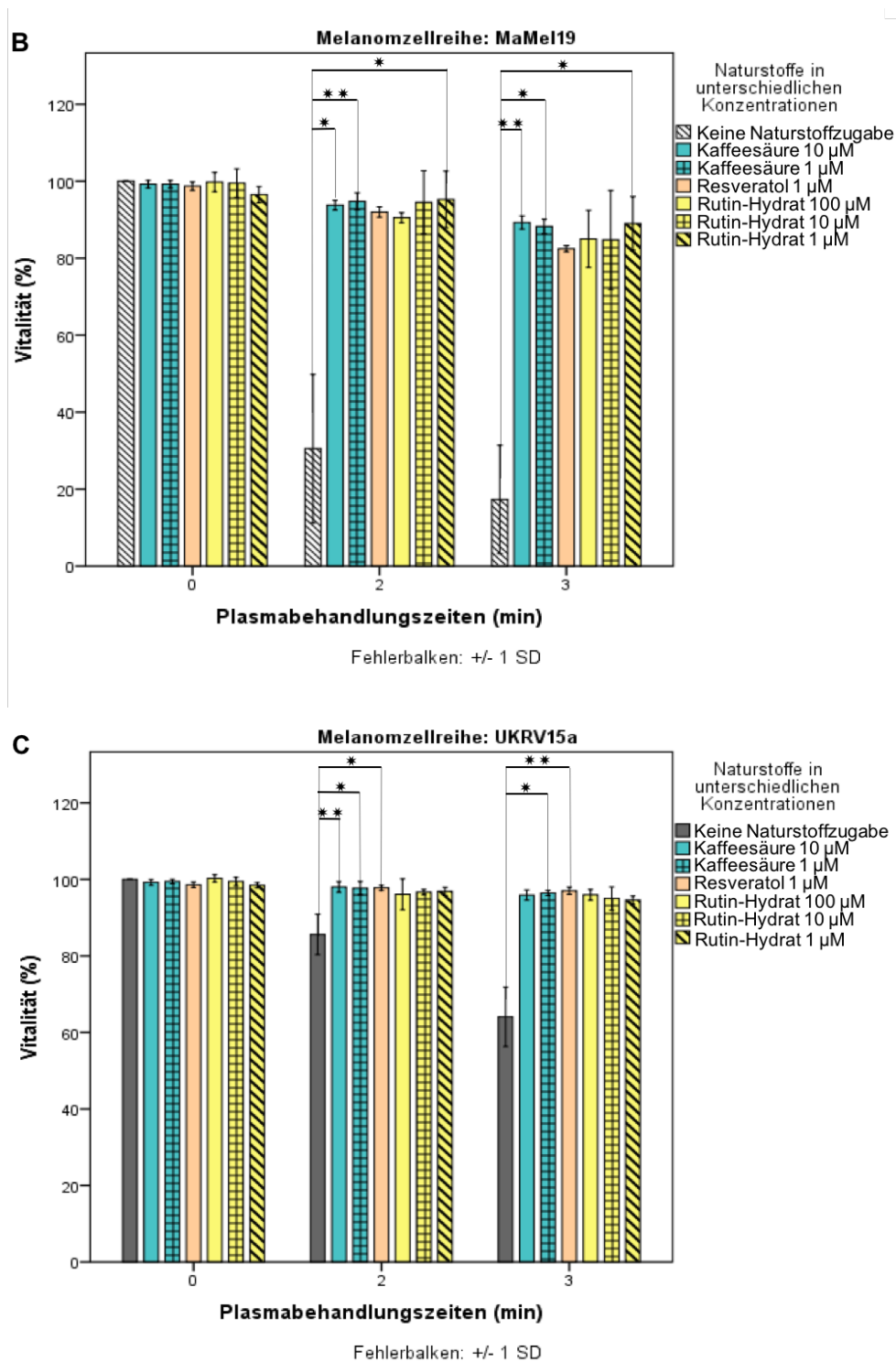


Abbildung 14: Veränderungen der Zellvitalität von Melanomzellen nach Antioxidantien-Zugabe sowie anschließenden KaP-Behandlungen

Für die Analyse wurden zu CFSE-markierten Melanomzellen der Zelllinien MaMel-19 und UKRV-15a Naturstoff-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt (100 μM , 10 μM , 1 μM) und anschließend unterschiedlich lange mit KaP behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach drei Tagen der Anteil lebender Zellen (in %) bestimmt. Dargestellt sind die Negativkontrollen (0 Minuten KaP-Behandlung = ϕ), Stimulationen mit 2 Minuten und 3 Minuten Plasmabehandlung mit/beziehungswise ohne die Zugabe der Naturstoff-Lösungen. **A** Dargestellt ist ein repräsentatives FACS-Plot-Beispiel der verschiedenen Behandlungszeiten und Naturstoff-Lösungen eines Versuchsansatzes sowie die Gating-Strategie für vitale Zellen. Die Messwerte der Melanom-Zelllinien **B** MaMel-19 und **C** UKRV-15a aus 4 Versuchsansätzen ($n = 4$)

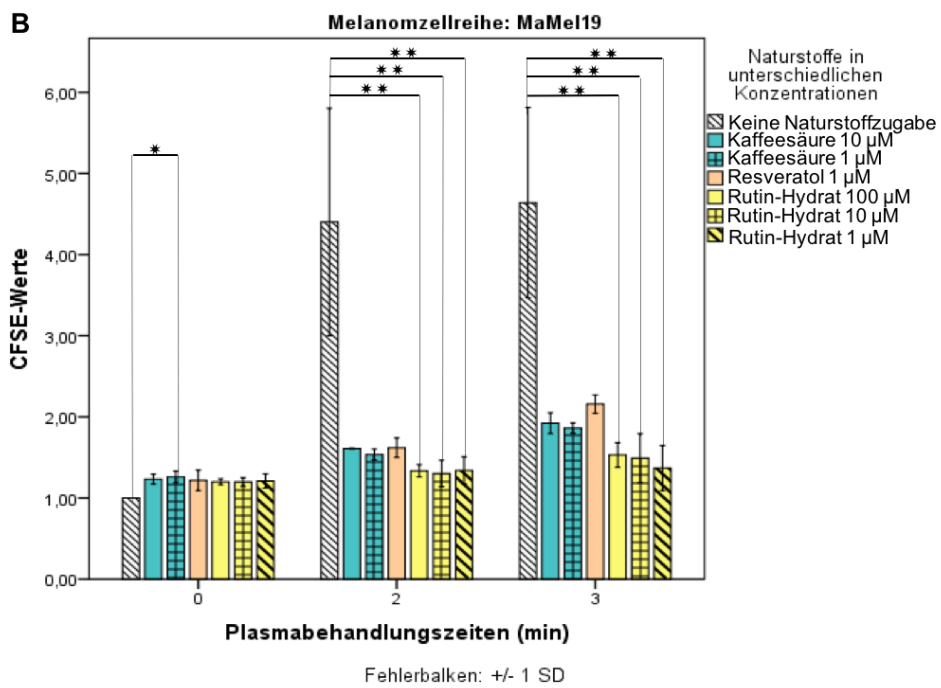
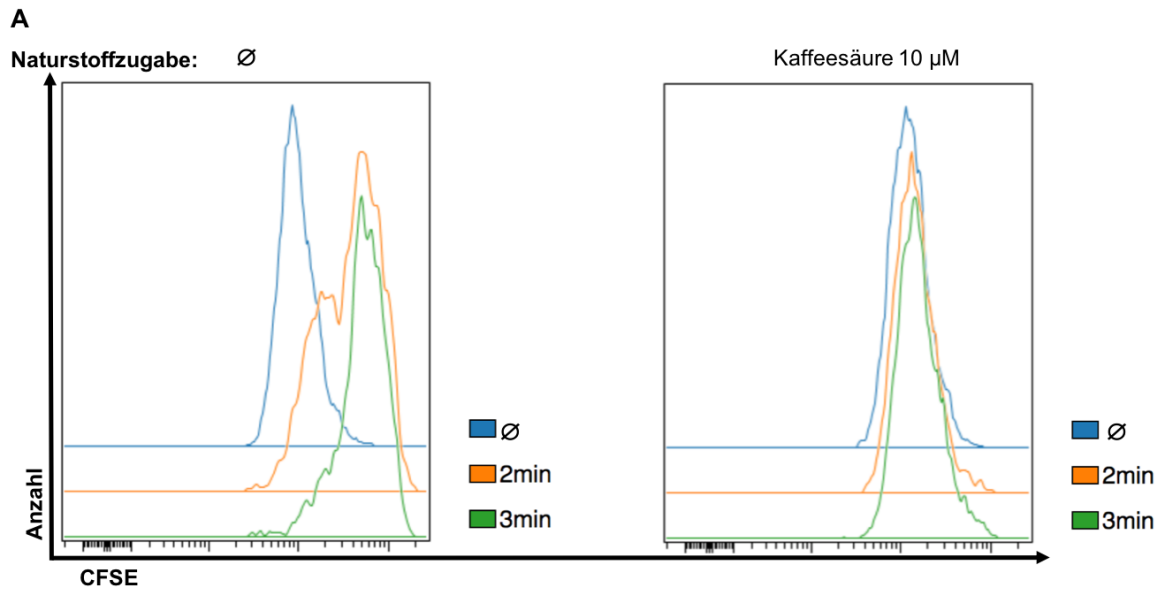
wurden gemittelt und auf die unbehandelten Negativproben normiert. Wertunterschiede wurden mittels Kruskal Wallis-Test bestimmt und sind mit Sternen markiert (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Die Zugabe der Antioxidantien hat großen Einfluss auf die Vitalität von KaP-exponierten Melanomzellen (Abbildung 14). Beide Melanom-Zelllinien reagieren nach Zugabe der Naturstoff-Lösungen nicht/beziehungsweise nur stark abgeschwächt auf die Plasmabehandlungen.

Die Zellen MaMel-19 reagieren auf eine Plasmabehandlung mit einer ausgeprägten Reduktion (siehe Abbildung 14 B und 4.1.3.1) vitaler Zellen (2 Minuten: $MW = 30 \%$, $SD = 19 \%$; 3 Minuten: $MW = 17 \%$, $SD = 14 \%$). Erfolgte hingegen zuvor die Zugabe einer der verschiedenen Naturstoff-Lösungen ist der Anteil vitaler Zellen nur leicht reduziert im Vergleich zu den unbehandelten Negativkontrollen. Die Zellen der Behandlungsgruppe mit einer zweiminütigen Plasmabehandlung plus der Zugabe der Naturstoffe: 10 μM -Konzentration Kaffeesäure ($MW = 93 \%$, $SD = 1 \%$; $p = 0.013$), 1 μM -Konzentration Rutin-Hydrat ($MW = 95 \%$, $SD = 7 \%$; $p = 0.046$) und 1 μM -Konzentration Kaffeesäure ($MW = 94 \%$, $SD = 2 \%$; $p = 0.006$) zeigen Vitalitätswert-Unterschiede im Vergleich zu den plasmabehandelten Melanomzellen ohne die Zugabe der Naturstoff-Lösungen. Es zeigen sich ebenfalls Mittelwertunterschiede nach dreiminütiger Plasmabehandlung und der Zugabe der Lösungen Kaffeesäure 10 μM ($MW = 89 \%$, $SD = 1 \%$; $p = 0.009$), Kaffeesäure 1 μM ($MW = 88 \%$, $SD = 1 \%$; $p = 0.023$) und Rutin-Hydrat 1 μM ($MW = 89 \%$, $SD = 6 \%$; $p = 0.012$) im Vergleich zu behandelten Melanomzellen ohne addierte Naturstoff-Lösungen.

Die Zellen UKRV-15a zeigen die gleichen Tendenzen (Abbildung 14 C) wie zuvor bei den Melanomzellen MaMel-19 beschrieben. Tumorzellen, die einer Plasmabehandlung unterzogen wurden und bei denen zuvor keine Naturstoff-Lösung addiert wurde, reagieren mit einem deutlich stärkeren Vitalitätsverlust auf die Plasmabehandlungen (2 Minuten: $MW = 85 \%$, $SD = 5 \%$; 3 Minuten: $MW = 64 \%$, $SD = 7 \%$). Nach zweiminütiger Behandlung mit KaP und zusätzlicher Zugabe der Resveratol-Lösung 1 μM ($MW = 97 \%$, $SD = 0 \%$; $p = 0.018$), Kaffeesäure-Lösung 1 μM ($MW = 97 \%$, $SD = 1 \%$; $p = 0.033$) und Kaffeesäure-Lösung 10 μM ($MW = 98 \%$, $SD = 1 \%$; $p = 0.009$) werden unterschiedliche Mittelwerte im Vergleich zu den behandelten Melanomzellen ohne Zugabe einer der Naturstoff-Lösungen deutlich. Ein derartiges Ergebnis erhält man ebenso nach einer dreiminütigen KaP-Behandlung der Melanomzellen. So zeigen die Zellen nach Zugabe der Lösungen Kaffeesäure 1 μM ($MW = 96 \%$, $SD = 0 \%$; $p = 0.018$) und Resveratol 1 μM ($MW = 97 \%$, $SD = 0 \%$; $p = 0.001$) ebenfalls

auffällige große Wertunterschiede im Vergleich zu den Proben ohne zusätzliche Naturstoff-Lösung.



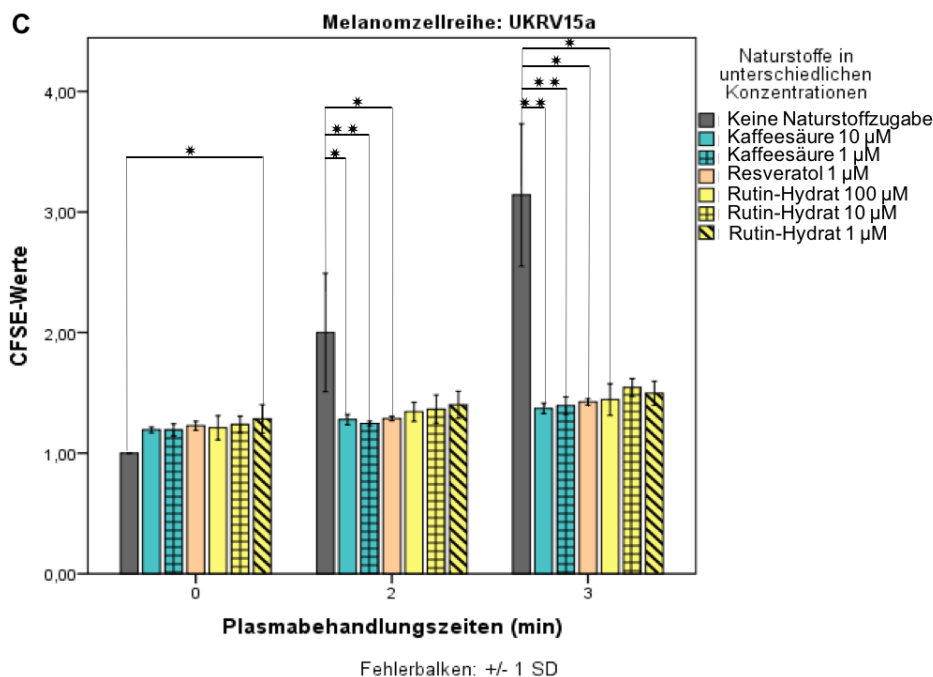


Abbildung 15: Veränderungen des Proliferationsverhaltens von Melanomzellen nach Antioxidantien-Zugabe sowie anschließenden KaP-Behandlungen

Nur lebende CFSE-markierte Melanomzellen sind dargestellt. Für die Analyse wurden zu den Zellen der Zelllinien MaMel-19 und UKRV-15a verschiedene Naturstoff-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben (100 µM, 10 µM, 1 µM) und anschließend mit unterschiedlichen Plasmabehandlungszeiten behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach drei Tagen das Proliferationsverhalten analysiert. Dargestellt sind die Negativproben (0 Minuten Plasmabehandlung = ϕ), Stimulationen mit 2 Minuten und 3 Minuten Plasmabehandlung mit/ beziehungsweise ohne die Zugabe von Naturstoff-Lösungen. **A** Gezeigt ist ein repräsentatives Overlay-Histogramm der Versuchsansätze mit/ohne Kaffeesäure-Zugabe (10 µM). Die CFSE-Werte der Melanomzellen **B** MaMel-19 und **C** UKRV-15a aus 4 Versuchsansätzen ($n = 4$) wurden gemittelt und auf die unbehandelten Negativproben normiert. Wertunterschiede wurden mittels Kruskal Wallis-Test bestimmt und sind mit Sternen markiert (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Abbildung 15 zeigt, dass durch die Addition der Antioxidantien die proliferationshemmende Wirkung von KaP auf die Melanomzellen reduziert wird. Behandelt man Zellen der Zelllinie MaMel-19 mit Plasma (siehe Abbildung 15 B und 4.1.3.2) reagieren diese mit einer Reduktion ihres Teilungsverhaltens. Deutlich wird dies durch hohe CFSE-Werte im Vergleich zu den unbehandelten Negativproben (2 Minuten: $MW = 4.4$, $SD = 1.7$, 3 Minuten: $MW = 4.6$, $SD = 1.1$). Die gleiche Tendenz (siehe Abbildung 15 C und 4.1.3.2) zeigen ebenfalls die Melanomzellen der Zelllinie UKRV-15a (2 Minuten: $MW = 2.0$, $SD = 0.4$; 3 Minuten: $MW = 3.1$, $SD = 0.5$). Erfolgt hingegen zuvor die Addition einer der Naturstoff-Lösungen nehmen die CFSE-Werte der Melanomzellen im Vergleich zu der unbehandelten Negativkontrolle deutlich ab. Die CFSE-Mittelwerte der Melanomzellen MaMel-19 nach zwei Minuten und drei Minuten Plasmabehandlung plus der Zugabe der Naturstoff-Lösungen Rutin-Hydrat 100 µM (2 Minuten: $MW = 1.3$, $SD = 0.0$, $p = 0.002$; 3 Minuten: $MW = 1.5$, $SD = 0.1$, $p = 0.003$), der Rutin-Hydrat 10 µM (2 Minuten: $MW = 1.3$, $SD = 0.1$, $p = 0.001$; 3 Minuten: $MW = 1.4$, $SD = 0.1$, $p = 0.001$).

= 0.3, $p = 0.004$) und der Rutin-Hydrat 1 μM (2 Minuten: $MW = 1.3$, $SD = 0.1$, $p = 0.004$; 3 Minuten: $MW = 1.3$, $SD = 0.2$, $p = 0.001$) zeigen deutliche Wertunterschiede der CFSE-Werte im Vergleich zu plasmabehandelten Melanomzellen ohne die Zugabe einer Naturstoff-Lösung. Ein derartiges Ergebnis zeigt sich ebenfalls bei den Melanomzellen der Zelllinie UKRV-15a. Nach zweiminütiger KaP-Behandlung sind nach der Zugabe der Lösungen Resveratol 1 μM ($MW = 1.2$, $SD = 0.0$; $p = 0.04$), der Kaffeesäure 10 μM ($MW = 1.2$, $SD = 0.0$, $p = 0.021$) und der Kaffeesäure 1 μM ($MW = 1.2$, $SD = 0.0$, $p = 0.001$) zeigen sich ebenfalls deutlich unterschiedliche CFSE-Mittelwerte im Vergleich zu behandelten Melanomzellen ohne die Zugabe der Naturstoff-Lösungen. Nach drei Minuten Behandlung mit KaP und zusätzlicher Zugabe der Lösungen Kaffeesäure 10 μM ($MW = 1.3$, $SD = 0.0$, $p = 0.002$), Kaffeesäure 1 μM ($MW = 1.3$, $SD = 0.0$, $p = 0.009$), Resveratol 1 μM ($MW = 1.4$, $SD = 0.0$, $p = 0.049$) und Rutin-Hydrat 100 μM ($MW = 1.4$, $SD = 0.1$, $p = 0.043$) sind auch hier signifikant unterschiedliche CFSE-Mittelwerte der behandelten Zellen zu beobachten.

Zusammenfassend wird deutlich, dass durch die Zugabe der Naturstoff-Lösungen zu den behandelten Melanomzellen die hemmende Wirkung des KaP auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten der Zellen vermindert wird.

4.1.5 Wirkung von KaP auf die Genexpression von Melanomzellen

In den oben dargestellten Daten dieser Arbeit zeigt sich, dass durch die Zugabe der Naturstoff-Lösungen die biologische Wirkung von KaP auf die Melanomzellen vermindert wird. Aus diesem Grund sind für funktionelle Analysen die Veränderungen der Genexpression von verschiedenen Genabschnitten der verschiedenen Stimulationsansätze von Interesse. Mit Hilfe einer qRT-PCR wurde daher abschließend die Expressionslevels der Genabschnitte für die Proteine CDKN2a und HIF1a auf mRNA Ebene ermittelt. CDKN2a ist ein mit der Erkrankung des MM assoziierter Protein-kodierender Genabschnitt. Dieses zellzyklusregulierende Protein nimmt dabei unter anderem eine Rolle als Tumorsuppressor ein. HIF1a reguliert die zelluläre und systemische homeostatische Antwort von Zellen auf Hypoxie durch die Transkription verschiedener Gene.

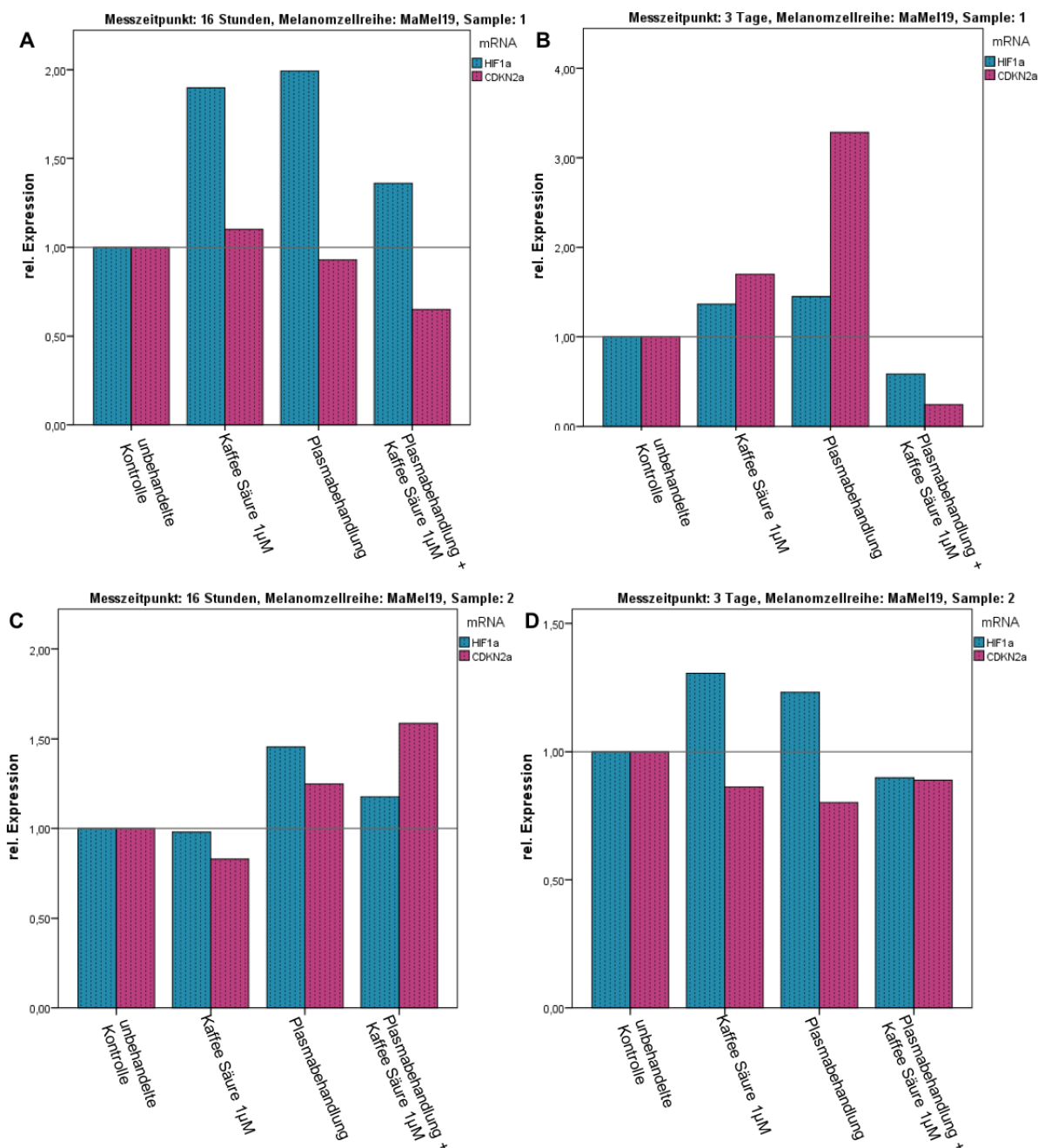


Abbildung 16: Expressionsanalysen mittels RT-qPCR der Melanom-Zelllinie MaMel-19

Dargestellt sind Melanomzellen der Zelllinie MaMel-19. Für die Expressionsanalysen wurden vier unterschiedliche Stimulationsansätze untersucht. Dargestellt sind aus 2 Versuchsansätzen **A + B/ C + D** ($n = 2$) die Negativproben (unbehandelte Kontrolle), Stimulationen mit 10 μ l der Naturstoff-Lösungen Kaffeesäure 1 μ M, Stimulationen mit 2 Minuten Plasmabehandlung mit/ beziehungsweise ohne die Zugabe (10 μ l) der Naturstoff-Lösung Kaffeesäure 1 μ M. Mittels RT-qPCR wurden nach 16 Stunden (links) und nach 3 Tagen (rechts) Inkubationszeit das relative Expressionslevel (rel. Expression) von HIF1a und CDKN2a untersucht.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, lassen sich in beiden Versuchsansätzen keine eindeutigen Tendenzen der Expressionslevel-Veränderungen darstellen. Nach 16 Stunden Inkubationszeit (Abbildung 16 A + C) steigt bei Versuchsansatz A die relative Expression von HIF1a nach der Zugabe von Kaffeesäure und der Behandlung mit KaP um etwa das Doppelte an. Die Kombination aus der Naturstoff-Lösung und der KaP-Behandlung führt zu einem Abfall der

erhöhten Expressionswerte. In Versuchsansatz C zeigt sich nach der Zugabe von Kaffeesäure keine Veränderung der relativen Expression von HIF1a. Durch eine Behandlung mit KaP steigt die Expression jedoch auch hier an und wird ebenfalls erneut nach der Kombination der Naturstoff-Arbeitslösung und der Behandlung mit KaP annähernd auf das ursprüngliche Expressionslevel herunterreguliert. Beurteilt man nach 16 Stunden die Veränderungen der relativen Expression von CDKN2a erhält man gegenläufige Tendenzen der Versuchsansätze. In Versuchsansatz A zeigt sich nach der Zugabe von Kaffeesäure eine geringe Erhöhung der relativen Expression, welche nach der Behandlung mit KaP auf das ursprüngliche Expressionslevel abfällt. Nach der Kombination von Kaffeesäure und KaP ist das relative Expressionslevel von CDKN2a reduziert. In Versuchsansatz C zeigt sich eine gegenläufige Expressionslevel-Veränderung von CDKN2a im Vergleich zu Versuchsansatz A.

Die relativen Expressionen von HIF1a nach drei Tagen Inkubationszeit zeigen eine einheitliche Tendenz der beiden Versuchsansätze B und D. In beiden Fällen kommt es durch die Zugabe von Kaffeesäure zu einer erhöhten relativen Expression von HIF1a. Durch die Behandlung mit KaP bleibt die relative Expression weiterhin erhöht. Die Kombination aus der Zugabe von Kaffeesäure und einer Behandlung mit KaP bewirkt anschließend in beiden Ansätzen ein Absinken des relativen Expressionslevels in etwa auf das ursprüngliche Expressionsniveau der unbehandelten Probe. Die Expression von CDKN2a stellt sich erneut in beiden Versuchsansätzen als gegenläufig dar. So steigt in Versuchsansatz B durch Zugabe von Kaffeesäure die Expression von CDKN2a an und nimmt nach Behandlung mit KaP erneut zu. Eine Kombination der Stimulationen Kaffeesäure und KaP bewirkt eine Expressionsreduktion unter das ursprüngliche relative Expressionslevel von CDKN2a. Die Analysen des Versuchsansatzes D zeigten eine Abnahme des relativen Expressionslevels nach der Zugabe von Kaffeesäure, sowie nach der Behandlung mit KaP und der Kombination aus beiden Stimulationen.

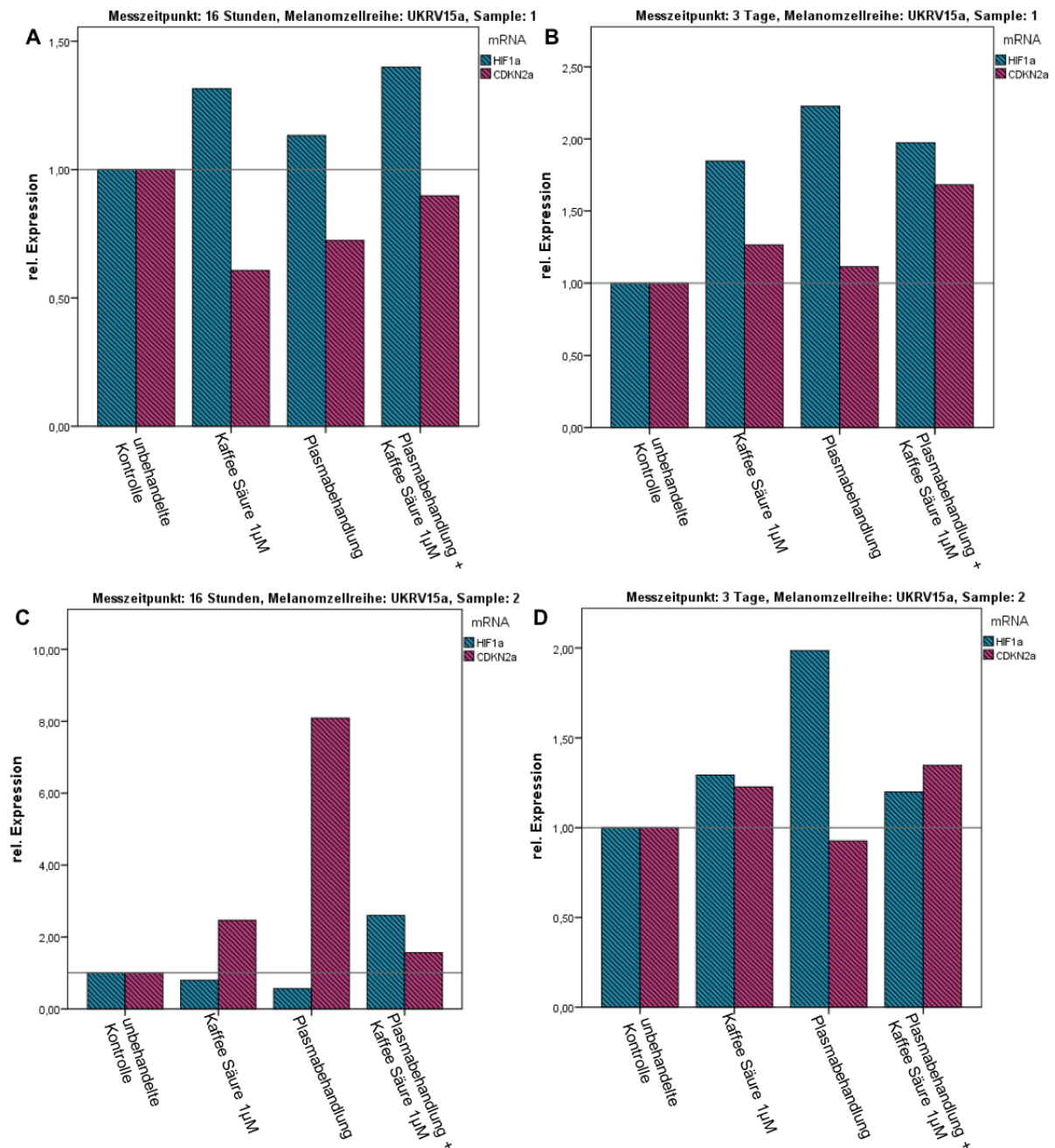


Abbildung 17: Expressionsanalysen mittels RT-qPCR der Melanom-Zelllinie UKRV-15a

Dargestellt sind Melanomzellen der Zelllinie UKRV-15a. Für die Expressionsanalysen wurden vier unterschiedliche Stimulationsansätze untersucht. Dargestellt sind aus 2 Versuchsansätzen **A + B/ C + D** ($n = 2$) die Negativproben (unbehandelte Kontrolle), Stimulationen mit 10 μ l der Naturstoff-Lösungen Kaffeesäure 1 μ M, Stimulationen mit 3 Minuten Plasmabehandlung mit/ beziehungsweise ohne die Zugabe (10 μ l) der Naturstoff-Lösung Kaffeesäure 1 μ M. Mittels RT-qPCR wurden nach 16 Stunden (links **A + C**) und nach 3 Tagen (rechts **B + D**) das relative Expressionslevel (rel. Expression) von HIF1a und CDKN2a untersucht.

Beurteilt man die Veränderungen der relativen Expressionen der beiden Zytokine HIF1a und CDKN2a nach 16 Stunden Inkubationszeit (Abbildung 17 A + C) erhält man ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis. So verursacht die Zugabe von Kaffeesäure in Versuchsansatz A eine leichte Zunahme der relativen Expression von HIF1a, wohingegen in Versuchsansatz C die Zugabe der Naturstoff-Lösung eine verminderte relative Expression bewirkt. Nach der

Behandlung mit KaP ist die relative Expression von HIF1a in Versuchsansatz verringert. Die Kombination aus Naturstoff-Zugabe und KaP-Behandlung verursacht eine erneute Zunahme der relativen Expression von HIF1a. In Versuchsansatz C wird nach der Behandlung mit KaP ebenfalls die relative Expression von HIF1a reduziert, um nach der Zugabe von Kaffeesäure und der zusätzlichen KaP-Behandlung auf etwa das Doppelte anzusteigen. Die relative Expression von CDKN2a ist ebenfalls in beiden Versuchsansätzen nach 16 Stunden Inkubationszeit unterschiedlich dargestellt. So verdoppelt sich durch die Zugabe von Kaffeesäure die relative Expression von CDKN2a in Versuchsansatz C. Nach der Behandlung mit KaP stellt sich eine ausgeprägte Zunahme der relativen Expression dar, die wiederum nach Zugabe der Kaffeesäure-Lösung sowie zusätzlicher KaP-Behandlung auf etwa das ursprüngliche Expressionslevel abnimmt. Im Gegensatz zu Versuchsansatz C wird in Versuchsansatz A durch die Zugabe der Naturstoff-Lösung die relative Expression von CDKN2a reduziert. Durch die Behandlung mit KaP ist die relative Expression reduziert. Die Kombination aus Naturstoff-Lösung und KaP-Behandlung bewirkt eine Regulation der relativen Expression auf das ursprüngliche relative Expressionslevel von CDKN2a der unbehandelten Kontrollprobe.

Die relativen Expressionslevel von HIF1a nach drei Tagen Inkubationszeit zeigen eine einheitliche Tendenz der beiden Versuchsansätze B und D. In beiden Fällen kommt es nach der Zugabe von Kaffeesäure zu einer Erhöhung der relativen Expression von HIF1a. Durch die Behandlung mit KaP steigt die relative Expression um etwa das Doppelte des ursprünglichen Expressionslevels an. Die Expressionswerte nach der Kombination aus Kaffeesäure-Zugabe und KaP-Behandlung sind in beiden Ansätzen verringert im Vergleich zu den Expressionswerten nach den Behandlungen mit KaP. Die relativen Expressionslevels von CDKN2a sind nach drei Tagen ebenfalls in beiden Versuchsansätzen ähnlich. Nach der Zugabe der Naturstoff-Lösung sind in beiden Versuchsansätzen die Werte leicht erhöht. Nach den Behandlungen mit KaP sind die relativen Expressionslevel erneut reduziert. Die Kombination der Stimulationen Kaffeesäure und KaP bewirken ein erneutes Ansteigen der relativen Expressionen in beiden Versuchsansätzen.

Zusammenfassend lässt sich aus den Genexpressionsanalysen der behandelten Melanomzellen keine eindeutig aussagekräftige Expressionslevelveränderung darstellen.

4.2 Ergebnisse der CD3⁺ T-Zell-Versuche

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den Ergebnissen der Versuchsreihe mit CD3⁺ T-Zellen. Um die Reinheit der isolierten CD3⁺-Immunzellen und somit das verwendete Isolations-Protokoll zu prüfen wurden FACS-Analysen durchgeführt.

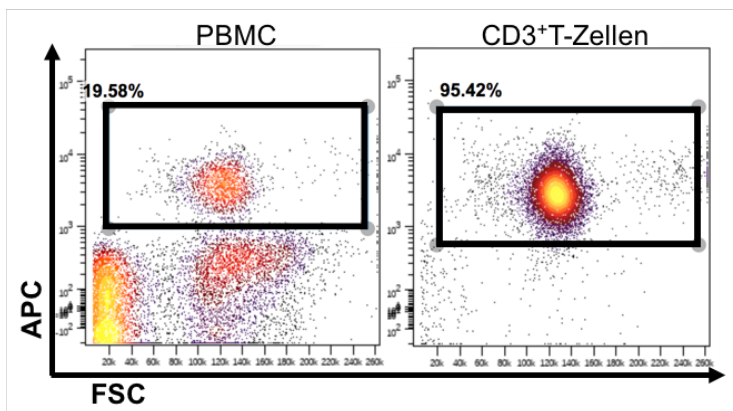


Abbildung 18: Beispielhafte FACS-Analyse über die Reinheit isolierter CD3⁺ T-Zellen gewonnen aus PBMCs. Aus gewonnenen PBMCs wurden CD3⁺ T-Zellen mit Hilfe von Mikro-Beads isoliert. Anschließend wurden die isolierten CD3⁺ T-Zellen und die jeweiligen PBMCs mit CD3⁺-Antikörpern (Farbstoff: APC) angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist ein exemplarisches Beispiel.

Die Analysen zeigen eine hohe Reinheit (95 %) der aus den PBMCs isolierten CD3⁺ T-Zellen. Die isolierten Immunzellen sind daher für die Untersuchung der Fragestellung dieser Arbeit geeignet.

4.2.1 Wirkung von KaP auf die Komposition von CD3⁺ T-Zellen

Zunächst wurde die Wirkung von KaP auf die Subpopulationen CD3⁺CD4⁺-Immunzellen und CD3⁺CD8⁺-Immunzellen mittels immunologischen Färbungen untersucht.

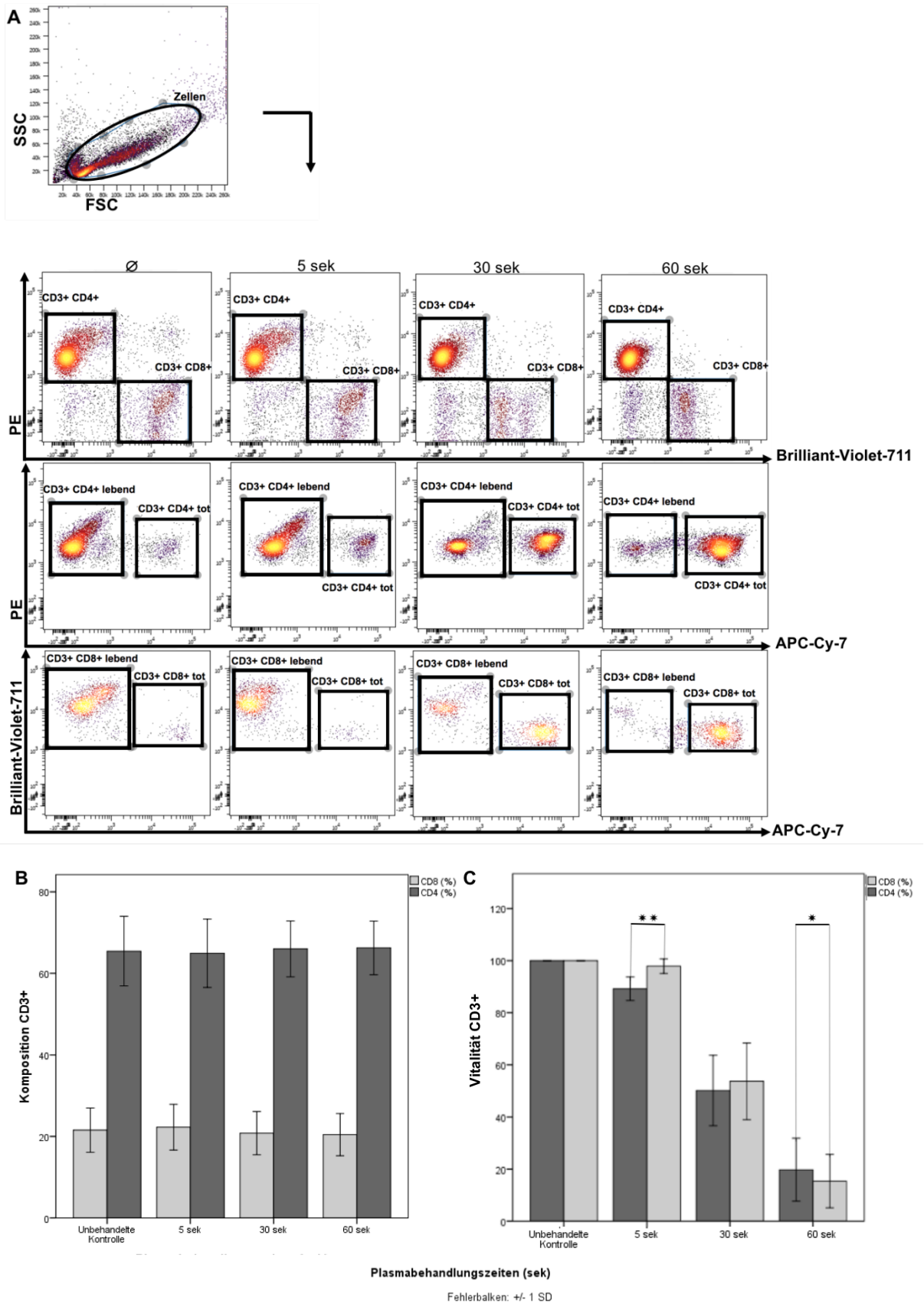


Abbildung 19: Wirkung von KaP auf die Komposition und Vitalität von CD3⁺-Immunzellen
 Aus PBMCs isolierte CD3⁺ T-Zellen wurden mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) stimuliert und anschließend unterschiedlich lange mit KaP behandelt (Plasmabehandlungszeiten: 5 Sekunden, 30 Sekunden, 60 Sekunden). Nach drei Tagen erfolgte unter Verwendung Fluorchrom-markierter Antikörper die durchflusszytometrische Analyse der Subpopulationen

CD3⁺CD4⁺-Immunzellen (APC/PE positiv) und CD3⁺CD8⁺-Immunzellen (APC/Brilliant-Violet-711 positiv). **A** Zeigt ein repräsentatives Beispiel aus 12 Versuchen (n = 12). **B** Dargestellt ist die Komposition der CD3⁺T-Zellen in die beiden Subpopulationen CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ (in %). **C** Gezeigt wird der Anteil vitaler Zellen der Subpopulationen (in %). Die Daten in **C** sind gemittelt und auf die unbehandelte Negativprobe (0 Sekunden Plasmabehandlung = ϕ) normiert. Wertunterschiede wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichenrang-Test ermittelt und sind mit Sternen markiert (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Zunächst erfolgte die Differenzierung der isolierten Zellen in die CD3⁺-Subpopulationen CD3⁺CD4⁺-Zellen und CD3⁺CD8⁺-Zellen (Abbildung 19 A in Reihe 2). Wie die Abbildung 19 B erkennen lässt sind drei Tage nach den Plasmabehandlungen keine signifikanten Kompositionsveränderungen der isolierten Immunzellen festzustellen (5 Sekunden: CD3⁺CD4⁺ T-Zellen: $MW = 99 \%$, $SD = 14 \%$ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen: $MW = 103 \%$, $SD = 8 \%$; 30 Sekunden: CD3⁺CD4⁺ T-Zellen: $MW = 101 \%$, $SD = 5 \%$ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen: $MW = 97 \%$, $SD = 10 \%$; 60 Sekunden: CD3⁺CD4⁺ T-Zellen: $MW = 101 \%$, $SD = 6 \%$ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen: $MW = 95 \%$, $SD = 12 \%$).

Im Anschluss erfolgte die Differenzierung innerhalb der zwei Subpopulationen in lebende und tote Zellen mittels Lebend-Tod Färbung (Abbildung 19 A in Reihe 3 und 4). Die Reduktion des Anteils vitaler Immunzellen nimmt innerhalb der beiden Subpopulationen (Abbildung 19 C) mit zunehmender Plasmabehandlungszeit annähernd in gleichen Maßen ab (5 Sekunden: CD3⁺CD4⁺ T-Zellen: $MW = 98 \%$, $SD = 4 \%$ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen: $MW = 97 \%$, $SD = 2 \%$; 30 Sekunden: CD3⁺CD4⁺ T-Zellen: $MW = 50 \%$, $SD = 13 \%$ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen: $MW = 53 \%$, $SD = 14 \%$; 60 Sekunden: CD3⁺CD4⁺ T-Zellen: $MW = 19 \%$, $SD = 12 \%$ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen: $MW = 15 \%$, $SD = 10 \%$).

Aufgrund der geringfügigen Ergebnisunterschiede wurde im Anschluss bei den folgenden Versuchsansätzen keine weitere Differenzierung der CD3⁺ T-Zellen in CD3⁺CD4⁺ T-Zellen und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen vorgenommen.

4.2.2 Wirkung von KaP auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten von CD3⁺ T-Zellen

Nachdem keine Veränderungen in der Komposition von CD3⁺ T-Zellen nach Behandlungen mit Plasma gezeigt werden konnte, wurde anschließend der Einfluss auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten genauer untersucht.

4.2.2.1 Veränderungen der Vitalität

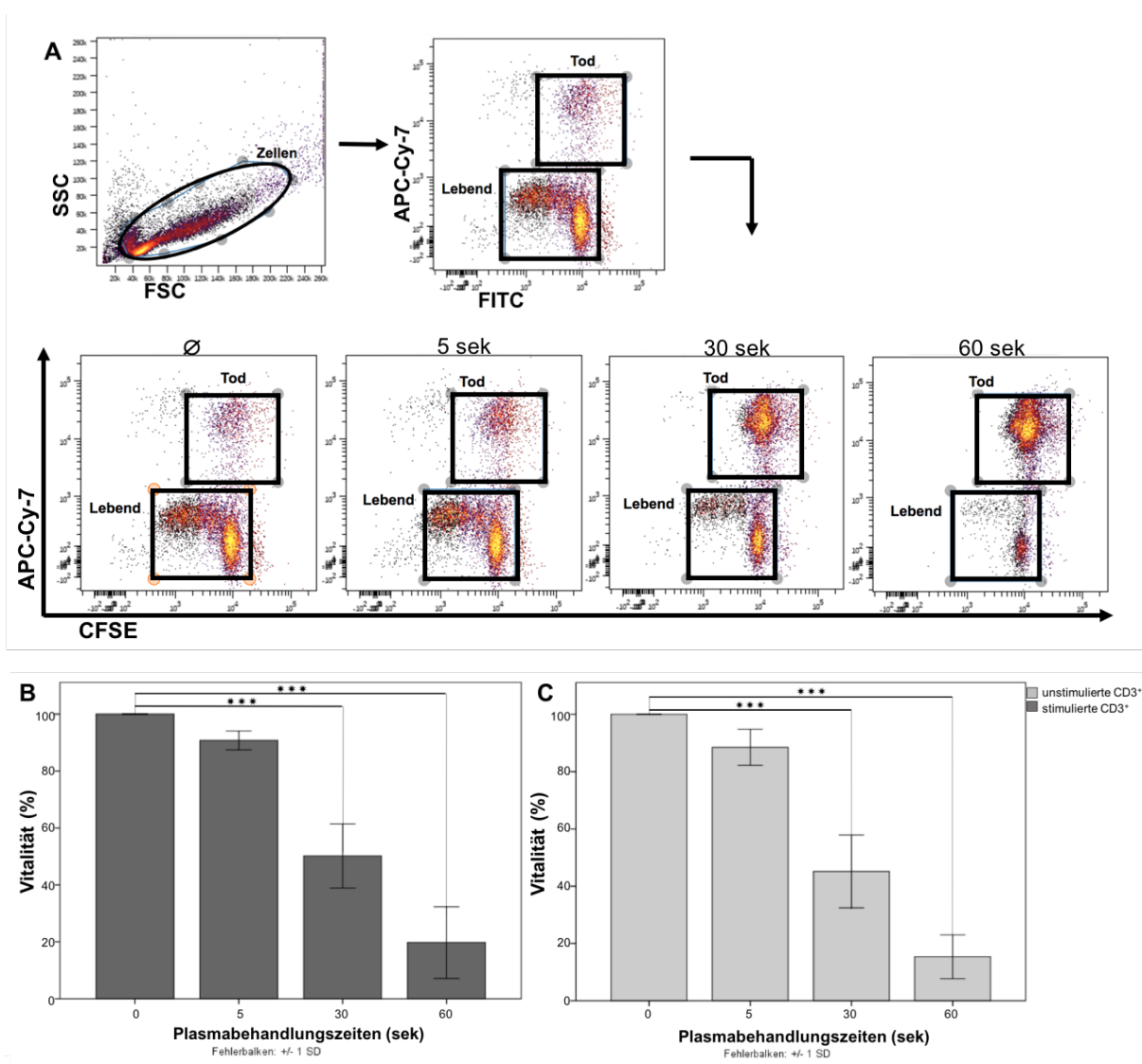


Abbildung 20: Veränderungen der Vitalität von CD3⁺ T-Zellen durch den Einfluss von KaP
 CFSE markierte aus PBMCs isolierte CD3⁺ T-Zellen wurden **A+B** mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) stimuliert sowie **C** ohne Stimulation und im Anschluss unterschiedlich lange mit KaP behandelt (Plasmabehandlungszeiten: 5 Sekunden, 30 Sekunden, 60 Sekunden). Nach drei Tagen wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil lebender Zellen (in %) ermittelt. **A** Zeigt ein repräsentativer FACS-Plot. **B+C** Dargestellt sind die gemittelten und auf die unbehandelten Negativproben (0 Sekunden Plasmabehandlung = ϕ) normierten Daten aus 12 Versuchsansätzen (n = 12). Wertunterschiede wurden mittels Kruskal Wallis-Test bestimmt und sind mit Sternen markiert (***) $p < 0.001$.

Wie in Abbildung 20 B + C zu erkennen lässt sich nach drei Tagen ein behandlungszeitabhängiger Verlust der Zellvitalität darstellen. Es kommt sowohl bei den stimulierten Immunzellen, als auch bei den unstimulierten Immunzellen zu einem deutlichen Verlust vitaler Zellen in den Zellkulturen. Eine 5-sekündige Plasmabehandlung reduziert den Anteil lebender Zellen um etwa 10 % (stimulierte CD3⁺ T-Zellen: MW = 90 %, SD = 3 %; unstimulierte CD3⁺ T-Zellen: MW = 88 %, SD = 8 %). Nach 30 Sekunden KaP-Behandlung sinkt in beiden Versuchsansätzen der Anteil vitaler Zellen sogar um etwa die Hälfte (stimulierte

CD3⁺ T-Zellen: $MW = 50 \%$, $SD = 11 \%$; unstimulierte CD3⁺ T-Zellen: $MW = 45 \%$, $SD = 12 \%$). Die Mittelwerte der Behandlungsgruppen „30 Sekunden“ und „0 Sekunden“ unterscheiden sich besonders deutlich ($p < 0.001$). Einen verstärkten Effekt des Plasmas auf die Vitalität der Immunzellen zeigt sich nach 60 Sekunden Behandlungszeit. In beiden Versuchsreihen sinkt in diesem Fall der Anteil vitaler Zellen auf unter 20 % (stimulierte CD3⁺ T-Zellen: $MW = 19 \%$, $SD = 12 \%$; unstimulierte CD3⁺ T-Zellen: $MW = 15 \%$, $SD = 7 \%$). Auch die Mittelwerte der Behandlungsgruppe „60 Sekunden“ stellen sich verändert ($p < 0.001$) im Vergleich zu den unbehandelten Negativkontrollen dar.

Mit Hilfe des Spearman-Tests konnte die Korrelation der Variablen „Plasmabehandlungszeit“ und „Zellviabilität“ überprüft werden. Es zeigen sich deutlich korrelierende Mittelwerte beider Versuchsreihen. Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass je länger die Plasmabehandlung andauert, desto geringer der Anteil vitaler Zellen ist (stimulierte CD3⁺ T-Zellen: $r = -0.968$; unstimulierte CD3⁺ T-Zellen: $r = -0.971$).

4.2.2.2 Veränderungen des Proliferationsverhaltens

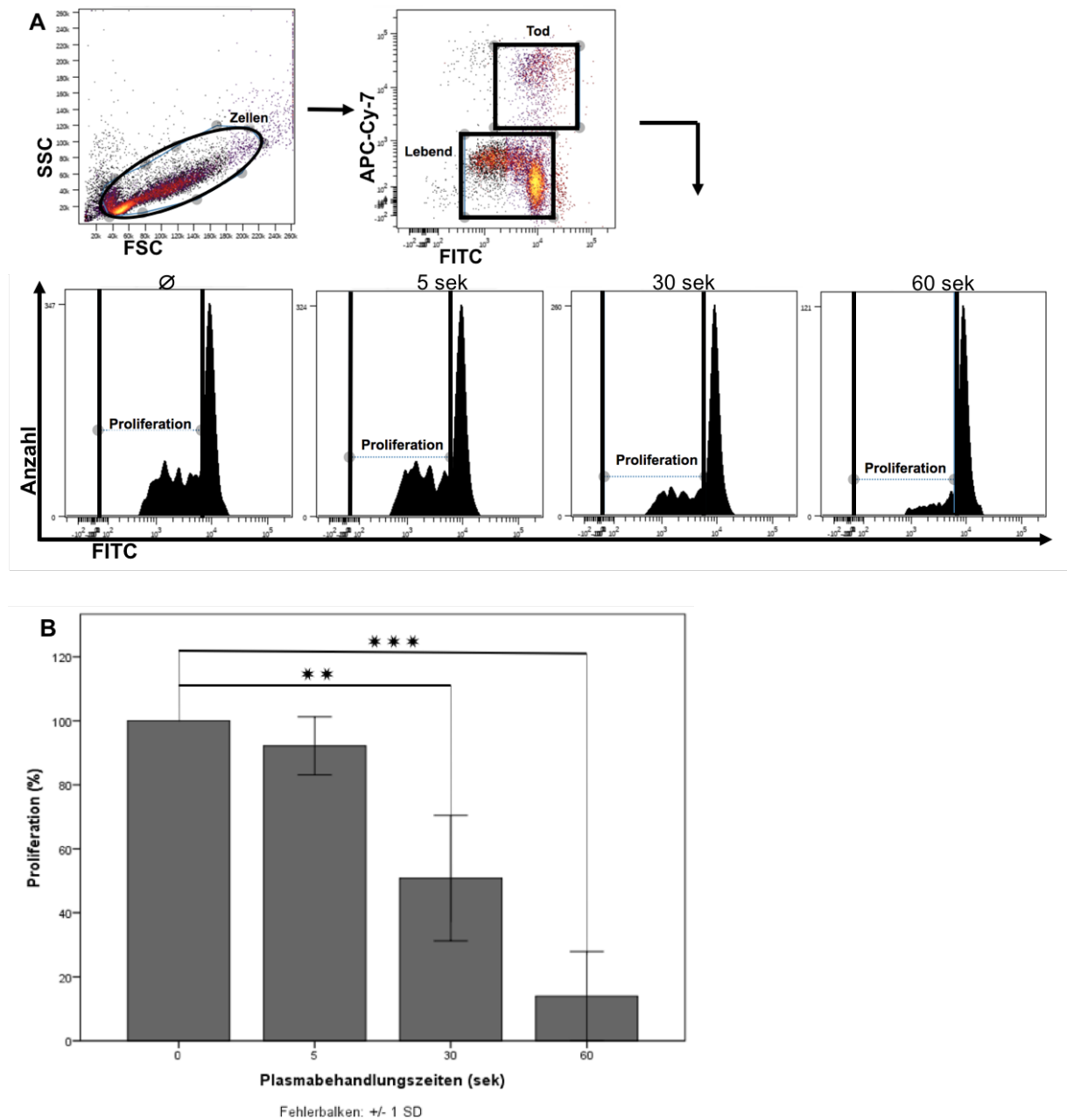


Abbildung 21: Veränderungen des Proliferationsverhaltens durch den Einfluss von KaP

Für die Analyse wurden nur lebende CFSE-markierte, aus PBMC isolierte $CD3^+$ T-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und anti-CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert und anschließend unterschiedlich lange mit KaP behandelt (Plasmabehandlungszeiten: 5 Sekunden, 30 Sekunden und 60 Sekunden). Der Anteil proliferierender Zellen (in %) wurde an Tag drei mittels Durchflusszytometrie ermittelt. **A** Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel. **B** Gemittelte und auf die unbehandelten Negativproben (0 Sekunden Plasmabehandlung = ϕ) normierte Werte aus 12 Versuchsansätzen sind dargestellt ($n = 12$). Wertunterschiede wurden mittels Kruskal Wallis-Test bestimmt und sind mit Sternen markiert (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Abbildung 21 B zeigt eine behandlungszeitabhängige Inhibition der Proliferation der behandelten Immunzellen. Nach fünf Sekunden KaP-Behandlung zeigt sich ein relativ geringer Einfluss auf das Teilungsverhalten der Zellen ($MW = 92\%$, $SD = 9\%$) während nach

30 Sekunden KaP-Behandlungszeit eine Reduktion der proliferierenden Zellen um etwa 50 % messbar ist ($MW = 50 \%$, $SD = 19 \%$). Die Mittelwerte der Behandlungsgruppen „30 Sekunden“ sind deutlich ($p = 0.001$) verändert im Vergleich zu den unbehandelten Negativproben. Nach 60 Sekunden Kap-Behandlung sinkt der Anteil proliferierender Immunzellen auf unter 20 % ($MW = 14 \%$, $SD = 13 \%$, $p < 0.001$).

Anhand des Spearman-Test konnte erneut die Korrelation der Variablen „Plasmabehandlungszeit“ und „Proliferation“ überprüft werde. Je länger die Behandlungszeit ist, desto geringer ist der Anteil proliferierender Zellen in der Kultur ($r = -0.910$).

4.2.3 Ko-Kulturen aus Antioxidantien und KaP-exponierten $CD3^+$ T-Zellen

Auch in diesem Abschnitt der Arbeit wurde der Einfluss von Antioxidantien auf die KaP-exponierten Zellen getestet. Verwendet wurden die in 4.1.4 beschriebenen Naturstoff-Arbeitslösungen.

4.2.3.1 Wirkung von Antioxidantien und $CD3^+$ T-Zellen

Wie bereits in 4.1.4.1 erfolgten zunächst Antioxidantien-Testversuche um den Einfluss der Antioxidantien selbst auf die Immunzellen und deren Vitalität sowie Teilungsverhalten ohne nachfolgende Plasmabehandlungen zu prüfen.

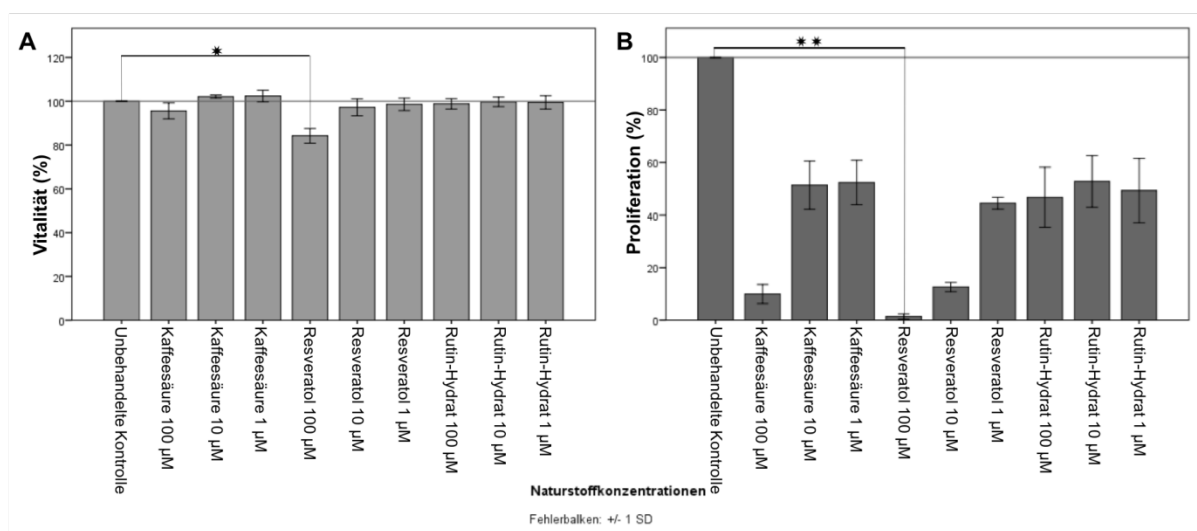


Abbildung 22: Antioxidantien-Test $CD3^+$ T-Zellen – Naturstoff-Lösungen und ihre Auswirkungen auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten

Aus PBMCs isolierte $CD3^+$ T-Zellen wurden CFSE markiert und Naturstoff-Lösungen (Kaffeesäure, Rutin-Hydrat und Resveratrol) in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt (100 µM, 10 µM, 1 µM). Nach drei Tagen erfolgte die durchflusszytometrische Analyse **A** der Vitalität (in %) und **B** des Proliferationsverhaltens (in %) der kultivierten Zellen. Dargestellt sind die gemittelten und auf die unbehandelte Kontrollprobe normierten

Mittelwerte aus 6 Versuchsansätzen ($n = 6$). Wertunterschiede wurden mittels Kruskal Wallis-Test bestimmt und sind durch Sterne markiert ($*p < 0.05$).

Wie in Abbildung 22 A zu erkennen lassen sich drei Tage nach der Zugabe der Naturstoff-Arbeitslösungen nur geringfügige Veränderungen der Zellvitalität feststellen. Lediglich die Naturstoff-Lösungen Kaffeesäure 100 μM ($MW = 95 \%$, $SD = 3 \%$) und Resveratol 100 μM ($MW = 84 \%$, $SD = 3 \%$) haben einen negativen Einfluss auf die Vitalität der kultivierten Immunzellen. Durch die Addition der Arbeitslösung Resveratol 100 μM sind deutliche ($p = 0.013$) Wertunterschiede zwischen der unbehandelten Negativkontrolle feststellbar. Die Zugabe der Rutin-Hydrat Lösungen in den drei Konzentrationen (Arbeitslösung 100 μM : $MW = 98 \%$, $SD = 2 \%$; Arbeitslösung 10 μM : $MW = 99 \%$, $SD = 2 \%$; Arbeitslösung 1 μM : $MW = 99 \%$, $SD = 3 \%$) und der Lösungen Kaffeesäure 10 μM ($MW = 102 \%$, $SD = 0 \%$), Kaffeesäure 1 μM ($MW = 102 \%$, $SD = 2 \%$), Resveratol 1 μM ($MW = 98 \%$, $SD = 2 \%$) führen hingegen zu annähernd unveränderten Vitalitätswerten im Vergleich zu den unbehandelten Negativkontrollen.

Wie in Abbildung 22 B dargestellt hat die Zugabe der verschiedenen Naturstoff-Lösungen einen großen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der CD3^+ T-Zellen. Eine besonders stark ausgeprägte Hemmung der Proliferation wird nach der Zugabe der Lösungen Kaffeesäure 100 μM ($MW = 9 \%$, $SD = 3 \%$), Resveratol 100 μM ($MW = 1 \%$, $SD = 1 \%$, $p = 0.008$) und Resveratol 10 μM ($MW = 12 \%$, $SD = 1 \%$) hervorgerufen. Nach Zugabe der übrigen Naturstoff-Lösungen wird ebenfalls eine starke Inhibition der Proliferation um etwa die Hälfte im Vergleich zu den unbehandelten Negativkontrollen deutlich (Kaffeesäure 10 μM : $MW = 51 \%$, $SD = 9 \%$; Kaffeesäure 1 μM : $MW = 52 \%$, $SD = 8 \%$; Resveratol 1 μM : $MW = 44 \%$, $SD = 2 \%$; Rutin-Hydrat 100 μM : $MW = 46 \%$, $SD = 11 \%$; Rutin-Hydrat 10 μM : $MW = 52 \%$, $SD = 9 \%$; Rutin-Hydrat 1 μM : $MW = 49 \%$, $SD = 12 \%$).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass es durch die Zugabe der verschiedenen Naturstoffe zu nur geringfügigen Einschränkungen der Vitalität der Zellen gekommen ist. Das Proliferationsverhalten der Zellen jedoch teilweise stark negativ beeinflusst wurde.

4.2.3.2 Wirkung von Antioxidantien auf KaP -exponierte CD3^+ T-Zellen

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Tests der Naturstoff-Lösungen (siehe 4.2.3.1) wurden für die folgenden Versuchsansätze lediglich die Naturstoffe Kaffeesäure 10 μM und 1 μM , Resveratol 1 μM und Rutin-Hydrat 10 μM und 1 μM verwendet.

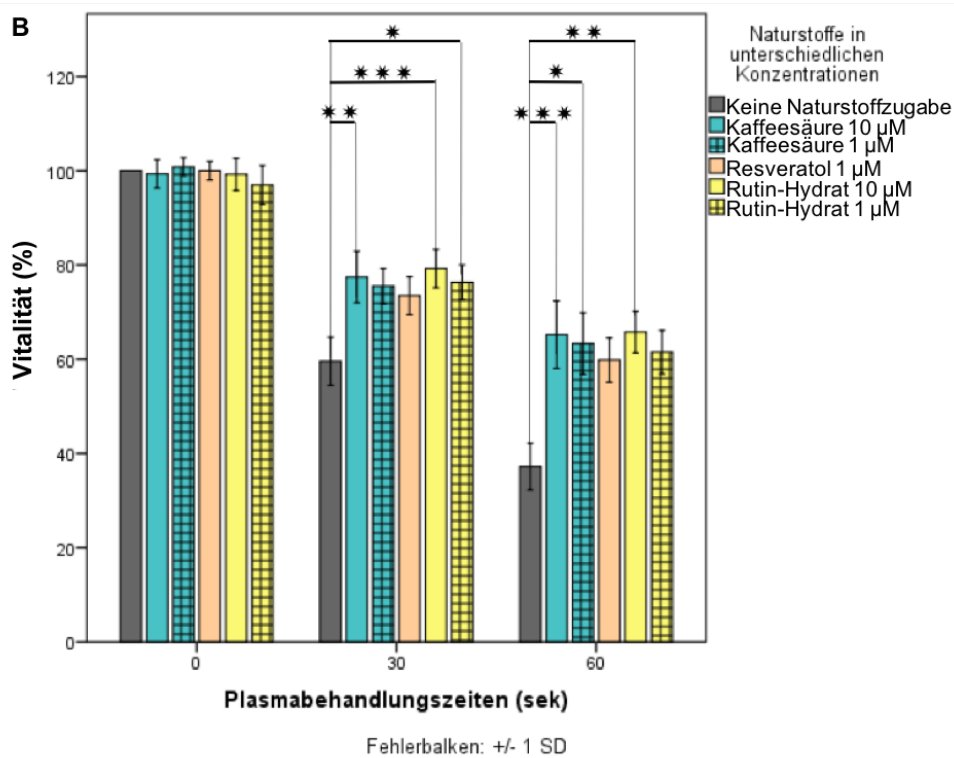
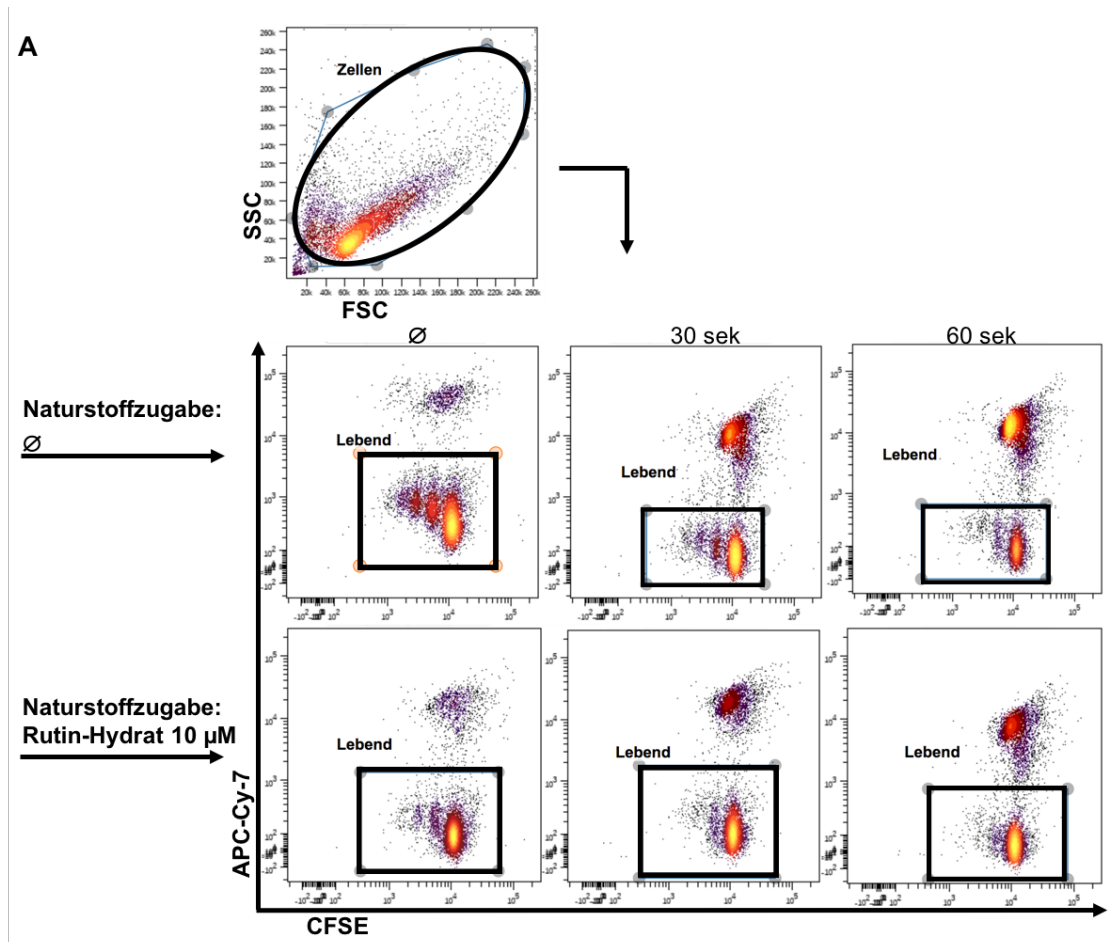


Abbildung 23: Kokultur Veränderungen der Zellvitalität von CD3⁺ T-Zellen nach der Zugabe von Antioxidantien sowie anschließender KaP-Behandlung
 Für die Analyse wurden CFSE-markierte, aus PBMC isolierte CD3⁺ T-Zellen mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) stimuliert und Naturstoff-Lösungen in unterschiedlichen

Konzentrationen hinzugefügt (10 μM , 1 μM). Im Anschluss wurden die Zellen unterschiedlich lange mit KaP behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach drei Tagen der Anteil lebender Zellen (in %) ermittelt. Dargestellt sind die Negativkontrollen (0 Sekunden Plasmabehandlung = ϕ), Stimulationen mit 30 Sekunden und 60 Sekunden Plasmabehandlung mit/beziehungsweise ohne die Zugabe von Naturstoff-Lösungen. **A** Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel nach Zugabe der Naturstoff-Arbeitslösung Rutin-Hydrat 10 μM . **B** Die Daten von 6/9 Versuchen (Naturstoff-Lösungen 10 μM $n = 9$; Naturstoff-Lösungen 1 μM $n = 6$) wurden gemittelt und auf die unbehandelten Negativproben normiert. Wertunterschiede wurden mittels Kruskal Wallis-Test bestimmt und sind mit Sternen markiert (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Nach der Zugabe der Naturstoff-Lösungen wurde der Einfluss des KaP auf die Vitalität der behandelten Immunzellen reduziert (Abbildung 23 B). Ohne die Zugabe der Naturstoffe reagieren die behandelten Zellen auf eine Plasmabehandlung wie bereits in 4.2.2.1 festgestellt, mit einer behandlungszeitabhängigen Reduktion vitaler Zellen (30 Sekunden: $MW = 59 \%$, $SD = 5 \%$; 60 Sekunden: $MW = 37 \%$, $SD = 4 \%$). Nach Zugabe der verschiedenen Naturstoff-Lösungen ist der Anteil vitaler Zellen in den Zellkulturen erhöht im Vergleich zu den Proben ohne Naturstoffzugabe. Nach 30 Sekunden Plasmabehandlung lassen sich deutliche Mittelwertunterschiede zwischen den behandelten Immunzellen ohne Naturstoffzugabe und den behandelten Immunzellen mit den Naturstoff-Lösungen Rutin-Hydrat 1 μM ($MW = 76 \%$, $SD = 3 \%$, $p = 0.032$), Rutin-Hydrat 10 μM ($MW = 79 \%$, $SD = 4 \%$, $p < 0.001$) und Kaffeesäure 10 μM ($MW = 77 \%$, $SD = 5 \%$, $p = 0.001$) feststellen. Die Mittelwerte der Behandlungsgruppe mit 60 Sekunden Plasmabehandlung sind ebenfalls merklich verändert zwischen behandelten Immunzellen ohne Naturstoffzugabe und behandelten Immunzellen mit den Lösungen Kaffeesäure 10 μM ($MW = 65 \%$, $SD = 7 \%$, $p < 0.001$), Kaffeesäure 1 μM ($MW = 63 \%$, $SD = 6 \%$, $p = 0.012$) und Rutin-Hydrat 10 μM ($MW = 65 \%$, $SD = 4 \%$, $p = 0.001$).

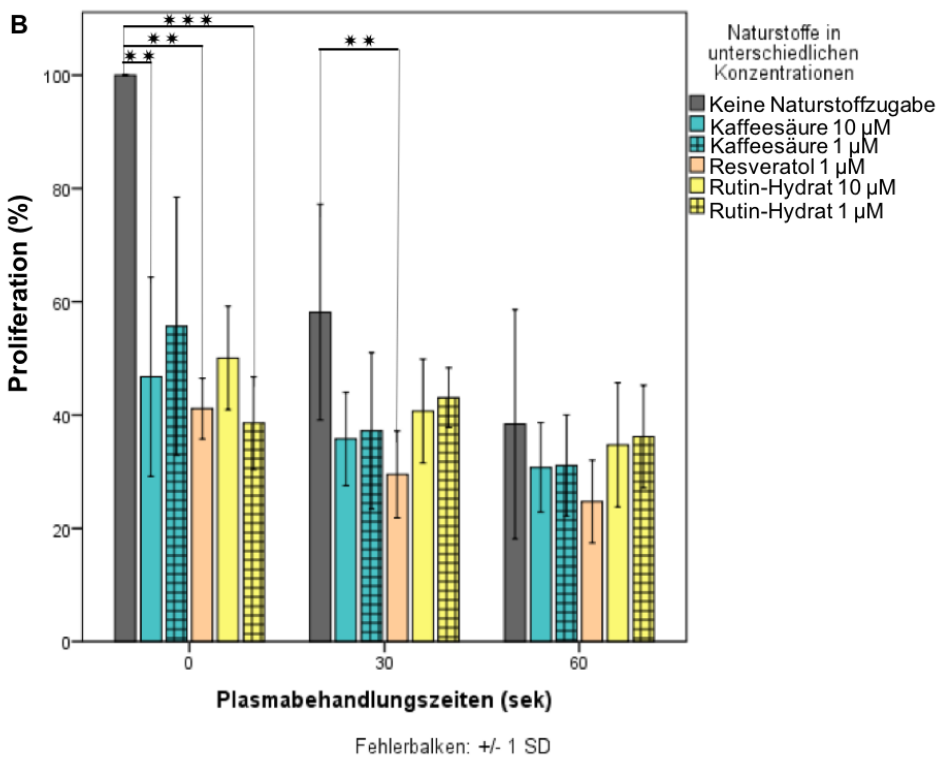
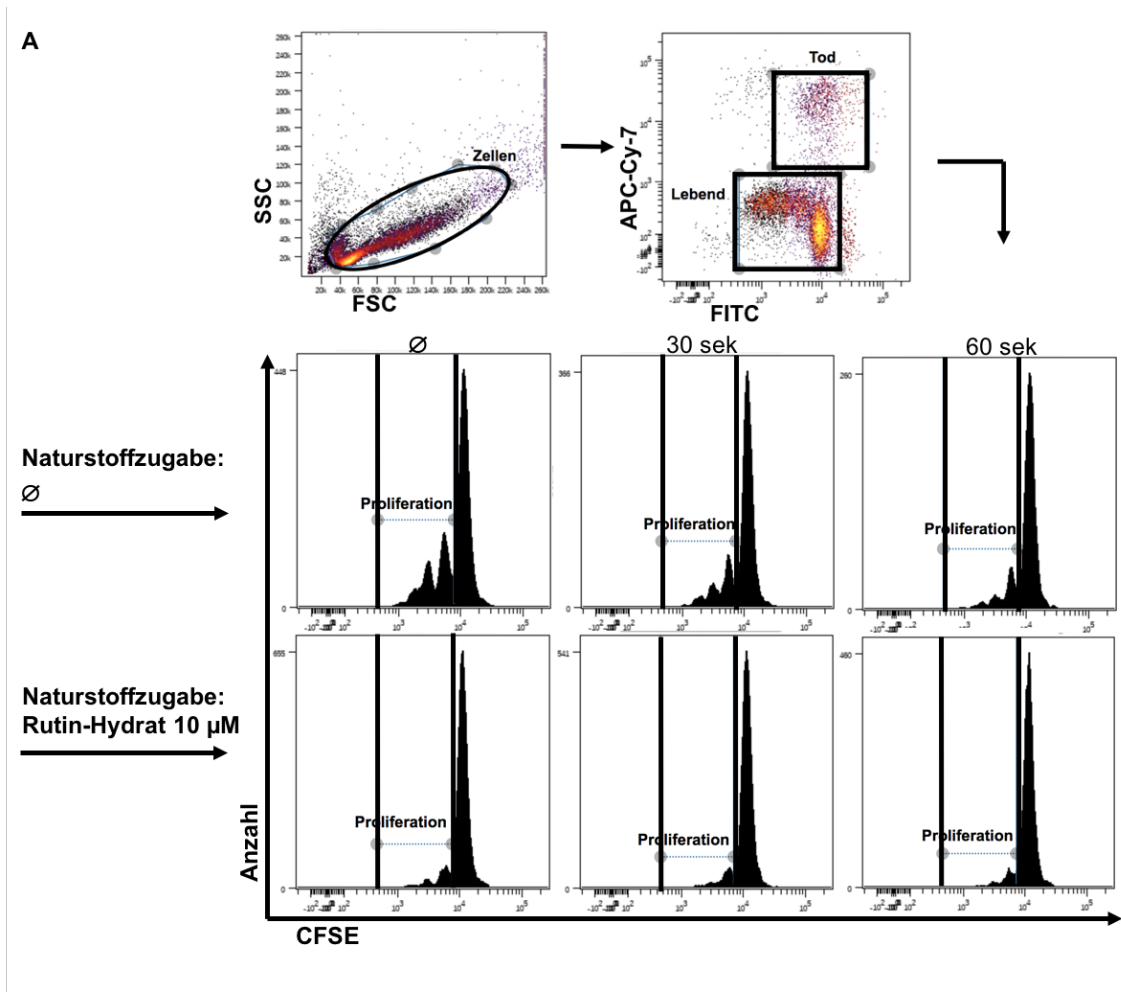


Abbildung 24: Veränderungen des Proliferationsverhaltens von CD3⁺ T-Zellen nach der Zugabe von Antioxidantien sowie anschließender KaP-Behandlung

Für die Analyse wurden lebende CFSE-markierte, aus PBMC isolierte CD3⁺ T-Zellen mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) stimuliert und Naturstoff-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt (100 µM, 10 µM). Anschließend wurden die Zellen unterschiedlich lange mit KaP behandelt. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach drei Tagen das Proliferationsverhalten (in %) der Zellkulturen analysiert. Dargestellt sind die Negativkontrollen (0 Sekunden Plasmabehandlung = ϕ), Stimulationen mit 30 Sekunden und 60 Sekunden Plasmabehandlung mit/ beziehungsweise ohne die Zugabe von Naturstoff-Lösungen. **A** Gezeigt wird ein repräsentatives Beispiel nach Zugabe der Naturstoff-Lösung Rutin-Hydrat 10 µM. **B** Die Daten von 6/9 Versuchen (Naturstoff-Lösungen 10 µM n = 9; Naturstoff-Lösungen 1 µM n = 6) wurden gemittelt und auf die unbehandelten Negativproben normiert. Wertunterschiede wurden mittels Kruskal Wallis-Test bestimmt und sind mit Sternen markiert (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Wie in Abbildung 24 B zu erkennen kann durch die Zugabe der verschiedenen Naturstoff-Lösungen die proliferationshemmende Wirkung von KaP nicht vermindert werden. Es zeigt sich bereits wie bereits in 4.2.3.1 beschrieben ein stark vermindertes Teilungsverhalten der Immunzellen nach der Zugabe der Naturstoff-Lösungen ohne eine zusätzliche Plasmabehandlung (Kaffeensäure 10 µM: $MW = 46 \%$, $SD = 17 \%$, $p = 0.001$; Kaffeensäure 1 µM: $MW = 55 \%$, $SD = 22 \%$; Resveratol 1 µM: $MW = 41 \%$, $SD = 5 \%$, $p = 0.002$; Rutin-Hydrat 10 µM: $MW = 50 \%$, $SD = 9 \%$; Rutin-Hydrat 1 µM: $MW = 38 \%$, $SD = 8 \%$, $p < 0.001$). An dieser Tendenz ändert sich mit einer zusätzlichen Plasmabehandlung nichts. Nach 30 Sekunden Plasmabehandlung lassen sich keine erhöhten Wertunterschiede zwischen den behandelten Immunzellen ohne Naturstoffzugabe und den behandelten Immunzellen mit den Naturstoff-Lösungen feststellen (Kaffeensäure 10 µM: $MW = 35 \%$, $SD = 8 \%$; Kaffeensäure 1 µM: $MW = 37 \%$, $SD = 13 \%$; Resveratol 1 µM: $MW = 29 \%$, $SD = 7 \%$, $p = 0.005$; Rutin-Hydrat 10 µM: $MW = 40 \%$, $SD = 9 \%$; Rutin-Hydrat 1 µM: $MW = 43 \%$, $SD = 5 \%$). Die Mittelwerte der Behandlungsgruppe nach 60 Sekunden zeigen ebenfalls keine erhöhten Proliferationswerte nach der Behandlung mit KaP und der zusätzlichen Addition der verschiedenen Lösungen (Kaffeensäure 10 µM: $MW = 30 \%$, $SD = 7 \%$; Kaffeensäure 1 µM: $MW = 31 \%$, $SD = 8 \%$; Resveratol 1 µM: $MW = 24 \%$, $SD = 7 \%$; Rutin-Hydrat 10 µM: $MW = 34 \%$, $SD = 10 \%$; Rutin-Hydrat 1 µM: $MW = 36 \%$, $SD = 9 \%$).

Zusammenfassend konnte herausgearbeitet werden, dass die Zugabe der Naturstoff-Lösungen zu den behandelten T-Zellen die devitalisierende Wirkung des KaP vermindern konnte. Der hemmende Einfluss des KaP auf das Proliferationsverhalten der Zellen wird jedoch nicht eindeutig reduziert.

4.2.3.3 Zeitlicher Verlauf der Veränderungen der Vitalität von KaP-exponierten CD3⁺ T-Zellen

Um die beobachteten Veränderungen der Vitalität nach einer Behandlung mit KaP und zusätzlicher Antioxidantien-Zugabe genauer untersuchen zu können, wurden Messungen von behandelten Zellen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen. Der Versuchsaufbau entsprach dabei wie in 4.2.3.2 beschrieben.

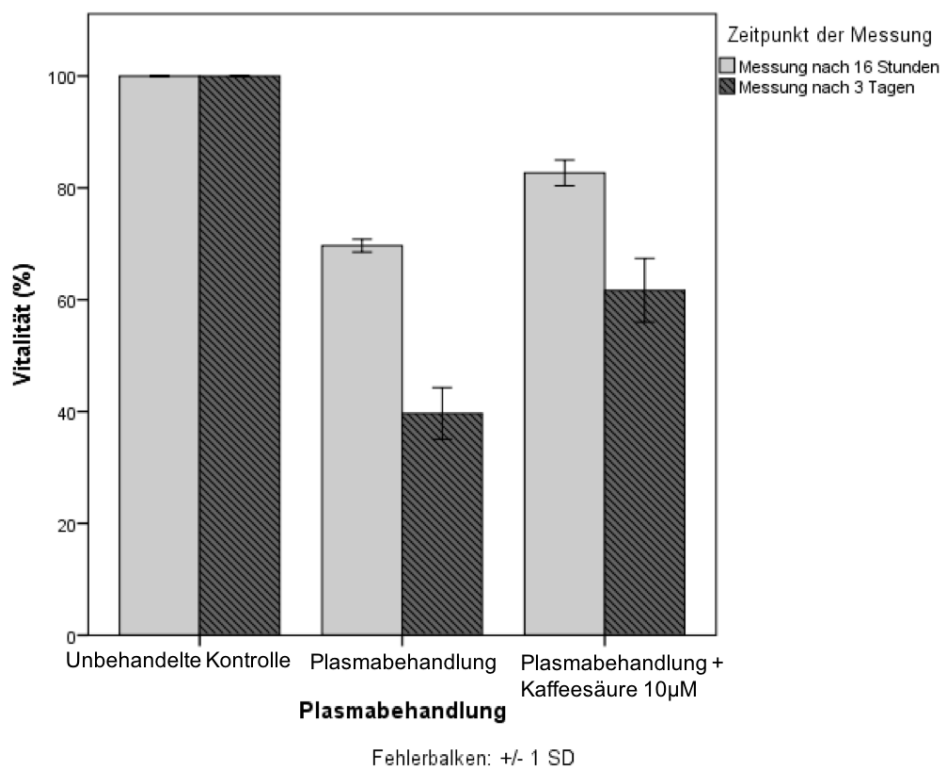


Abbildung 25: Messungen der Vitalität von KaP-exponierten CD3⁺ T-Zellen und der Zugabe der Naturstoff-Lösung Kaffeesäure 10 µM zu zwei Zeitpunkten

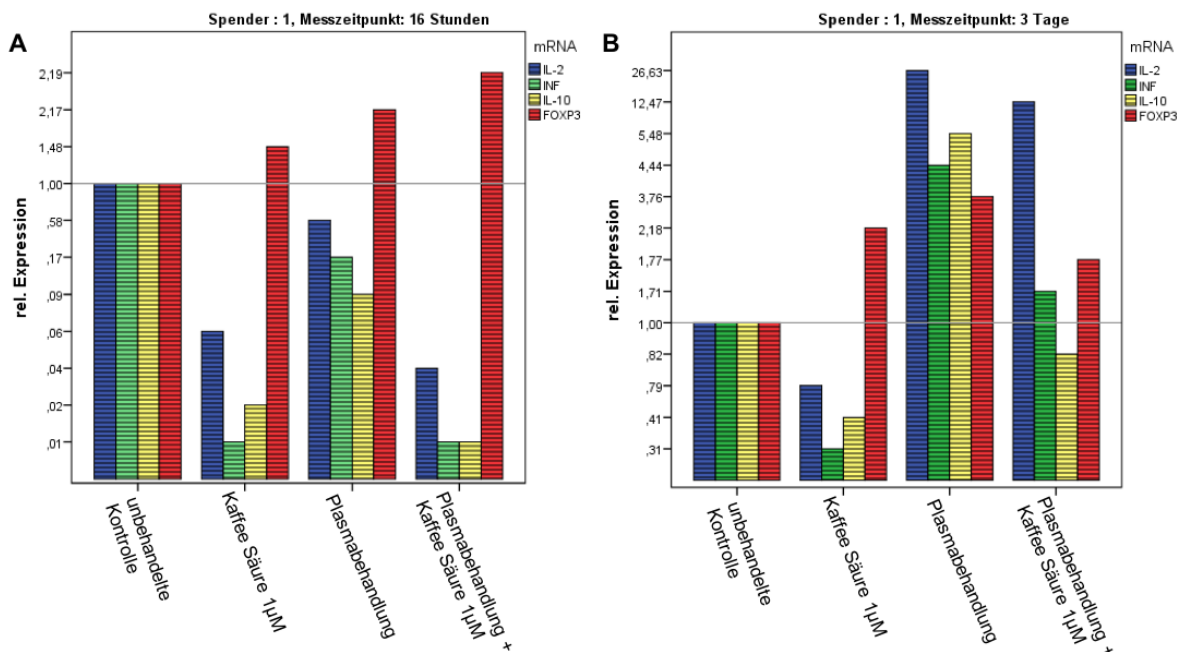
Für die Analyse wurden zu CFSE markierte, aus PBMC isolierte CD3⁺ T-Zellen mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 (1 µg/ml) und anti-CD28 (1 µg/ml) stimuliert. Neben den Negativkontrollen (unbehandelte Kontrolle ohne Zugabe von Kaffeesäure 10 µM sowie ohne Plasmabehandlung) wurde jeweils eine Probe mit KaP-behandelten Zellen (Plasmabehandlungszeit: 60 Sekunden) sowie eine Probe nach der Zugabe der Naturstoff-Lösung Kaffeesäure 10 µM und anschließender KaP-Behandlung (Plasmabehandlungszeit: 60 Sekunden) dargestellt. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach 16 Stunden und nach drei Tagen der Anteil lebender Zellen (in %) analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Versuchen (n = 3). Die Daten wurden gemittelt und auf die unbehandelten Negativproben normiert. Wertunterschiede wurden mittels Whitney-U-Test bestimmt.

Wie in Abbildung 25 B zu erkennen zeigt sich ein deutlicher zeitlicher Verlauf (nicht signifikant Whitney-U Test) der Veränderungen in der Vitalität nach einer Behandlung mit KaP. Analysiert man den Anteil lebender Zellen 16 Stunden nach erfolgter KaP-Behandlung, erhält man Mittelwerte um etwa 69 % (SD = 1 %). Erfolgen die Messungen drei Tage nach der Behandlung mit KaP sind noch etwa 39 % (SD = 4 %) der behandelten Immunzellen vital.

Die gleiche Tendenz ist nach der Zugabe der Naturstoff-Lösung Kaffeesäure 10 μM und anschließender Plasmabehandlung zu erkennen. 16 Stunden nach der Plasmabehandlung sind etwa 82 % ($SD = 2\%$) und drei Tage nach der Plasmabehandlung noch etwa 61 % ($SD = 5\%$) der kultivierten Zellen vital.

4.2.4 Wirkung von KaP auf die Genexpression von $CD3^+$ T-Zellen

Durch die Zugabe der Naturstoff-Lösungen wird die biologische Wirkung von KaP auf die $CD3^+$ T-Zellen verringert. Daher sind für funktionelle Analysen die Veränderungen in der Zytokinproduktion der verschiedenen Stimulationsansätze von Interesse. Mit Hilfe von RT-qPCRs wurde aus diesem Grund die Expressionslevel der Genabschnitte IL-2, IFN- γ , IL-10 und FOXP3 auf mRNA Ebene ermittelt. Die ausgewählten Genabschnitte ermöglichen Rückschlüsse über den Differenzierungsstatus und Aktivitätsstand der $CD3^+$ T-Zellen.



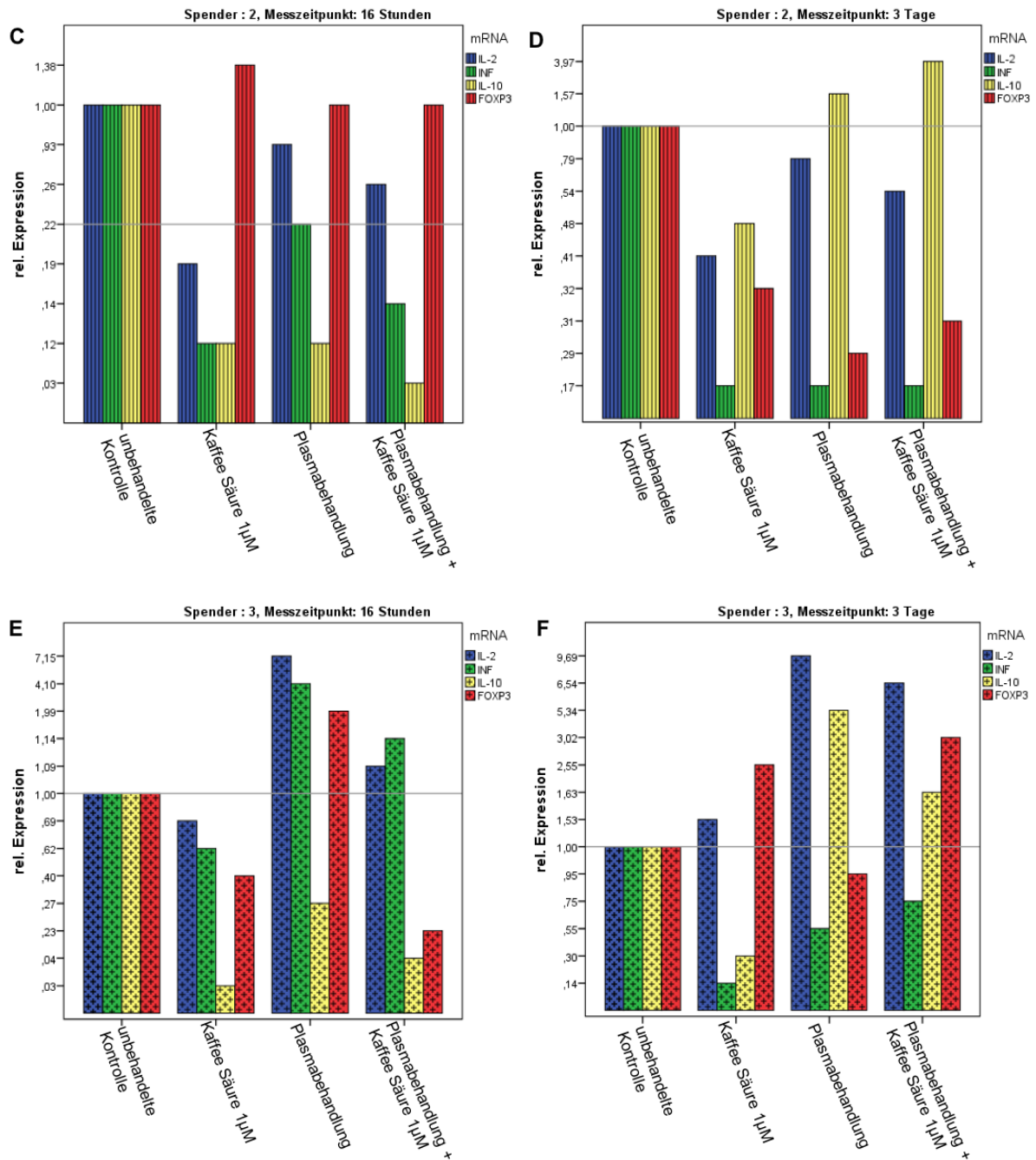


Abbildung 26: Expressionsanalysen mittel RT-qPCR von CD3⁺T-Zellen

Für die Analyse wurden lebende CFSE-markierte, aus PBMC isolierte CD3⁺ T-Zellen mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 (1 μ g/ml) und anti-CD28 (1 μ g/ml) stimuliert. Für die Expressionsanalysen wurden vier unterschiedliche Stimulationsansätze untersucht. Dargestellt sind aus den Versuchsansätzen **A + B/C + D** und **E + F** (n = 3) die Negativproben (unbehandelte Kontrolle), Stimulationen der Naturstoff-Lösungen Kaffeesäure 10 μ M, Stimulationen mit 60 Sekunden Plasmabehandlung mit/ beziehungsweise ohne die Zugabe der Naturstoff-Lösung. Mittels RT-qPCR wurden nach 16 Stunden (links **A + C + E**) und nach 3 Tagen (rechts **B + D + F**) das relative Expressionslevel (rel. Expression) von IL-2, IFN, IL-10 und FOXP3 untersucht.

Beurteilt man die relativen Expressionslevel der unterschiedlichen Genabschnitte nach 16 Stunden Inkubationszeit (Abbildung 26 A/C/E) zeigen sich keine einheitlichen Expressionsveränderungen in den drei Versuchsansätzen. In Versuchsansatz A werden durch die Zugabe der Naturstoff-Lösung die relativen Expressionslevels von IL-2, IL-10 und IFN- γ

reduziert. Nach den Behandlungen mit KaP, und den Kombinationen aus Naturstoff-Zugabe und KaP-behandelten Zellen sind fast keine Veränderungen der reduzierten Expressionslevel der oben genannten Genabschnitte feststellbar. Im Gegensatz dazu verdoppelt sich die relative Expression von FOXP3 durch die Zugabe von Kaffeesäure und der Behandlung mit KaP. Die Kombination aus Kaffeesäure und KaP verändert nichts an den verdoppelten Expressionswerten von FOXP3 in diesem Versuchsansatz. In Versuchsansatz C werden die relativen Expressionen von IL-10, IL-2 und IFN- γ ebenfalls durch die Zugabe der Naturstoff-Lösung reduziert. Die relativen Expressionslevel von IL-10 und IFN- γ bleiben bei einer Behandlung mit KaP und der Kombination aus KaP-behandelten Zellen mit Naturstoff-Zugabe reduziert. Das relative Expressionslevel von IL-2 wird jedoch nicht durch eine Behandlung mit KaP reduziert. Die Zugabe von Kaffeesäure hat auch in diesem Versuchsansatz eine expressionssteigernde Wirkung auf FOXP3. Eine Behandlung mit KaP sowie die Kombination aus der KaP-Behandlung und der Naturstoff-Zugabe haben in dem Versuchsansatz keinen Einfluss auf die Expression von FOXP3. In Versuchsansatz E wird die relative Expression aller untersuchten mRNA-Abschnitte durch die Zugabe der Kaffeesäure im Verhältniss zu den unbehandelten Kontrollproben reduziert. Lediglich die relative Expression von IL-10 wird anschließend nicht durch eine KaP-Behandlung beeinflusst und bleibt daher in den folgenden Simulationsansätzen reduziert. Die relativen Expressionslevels von IL-2, FOXP3 und IFN- γ steigen durch eine Behandlung mit KaP an. Die Kombination aus einer Behandlung mit KaP und der Zugabe des Naturstoffes bewirkt eine Herunterregulation der erhöhten Expressionslevel von allen drei mRNA-Abschnitten auf das ursprüngliche Expressionsniveau.

Beurteilt man die relativen Expressionslevel der Genabschnitte nach drei Tagen Inkubationszeit (Abbildung 26 B/D/F), zeigen sich bei den drei Versuchsansätzen erneut unterschiedliche Expressionsveränderungen. So wird in Versuchsansatz B durch die Zugabe von Kaffeesäure die relativen Expressionslevel von IL-2, IFN- γ und IL-10 nicht beeinflusst. Durch die Behandlung mit KaP werden die relativen Expressionen jedoch erhöht. Besonders ausgeprägt stellt sich die Zunahme des Expressionslevels von IL-2 dar. Die FOXP3-Expression wird sowohl durch die Zugabe von Kaffeesäure als auch durch eine KaP-Behandlung erhöht. Die relativen Expressionen aller vier untersuchten Genabschnitten sind in Versuchsansatz B bei KaP-behandelten Zellen und Naturstoff-Zugabe im Vergleich zu nur KaP-behandelten Zellen reduziert und nähern sich den ursprünglichen Expressionsniveaus an. Lediglich die IL-

IL-2-Expression weicht stark von dem ursprünglichen Expressionslevel der unbehandelten Kontrollprobe ab. In Versuchsansatz D sind die relativen Expressionen aller untersuchten Genabschnitte nach der Zugabe von Kaffeesäure verringert. Die relativen Expressionlevel von IL-10, FOXP3 und IL-2 bleiben bei den Stimulationsansätzen mit KaP sowie bei der Kombination aus KaP und Naturstoff reduziert. Lediglich die relative Expression von IL-10 steigt nach der KaP-Bestrahlung an und nimmt nach der Kombination aus KaP-Behandlung und Naturstoff-Zugabe weiter zu. Die Expressionslevel von IL-10 und IFN- γ sind in Versuchsansatz F nach der Zugabe der Naturstoff-Lösung im Gegensatz zu den Expressionlevels von IL-2 und FOXP3 reduziert. Nach der Behandlung mit KaP steigen die relativen Expressionen von IL-10 und IL-2, wohingegen die relative Expression von FOXP3 nicht- beziehungsweise bei IFN- γ nur geringfügig verändert wird. Die Expressionslevel von IL-2 und IL-10 werden nach der Kombination aus KaP-Bestrahlung und Naturstoff-Lösung erneut reduziert und nähern sich damit den ursprünglichen Expressionsniveaus an. Das relative Expressionslevel von IL-2 bleibt jedoch erhöht. Das IFN- γ -Expressionslevel erreicht annähernd das ursprüngliche Expressionsniveau, wohingegen gleichzeitig das FOXP3-Expressionslevel steigt.

Zusammenfassend lässt sich bei den durchgeführten Genexpressionsanalysen der ausgewählten Genabschnitte keine einheitliche und somit keine aussagekräftige Expressionslevelveränderung bei den drei Versuchsansätzen darstellen.

5 Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung des Einflusses von KaP auf humane Melanom- und Immunzellen und damit die Erforschung möglicher Anwendungspotentiale von KaP bei der Therapie des malignen Melanoms. Durch *in vitro* Versuche mit ausgewählten Zellen wurde der biologische Einfluss von KaP auf die Morphologie und die metabolische Aktivität von Melanomzellen sowie auf das Proliferationsverhalten und die Vitalität von Melanom- und Immunzellen untersucht. Da die genaue Wirkung von chemischen und physikalischen Komponenten des KaP bislang nicht abschließend geklärt werden konnte und in einigen Publikationen die in diesem Zusammenhang wichtige Rolle von RONS diskutiert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Zugabe von Antioxidantien versucht, den biologischen Effekt von KaP auf die behandelten Zellen zu reduzieren und durch die Untersuchung ausgewählter Genexpressionsveränderungen mittels qPCR einen genaueren Aufschluss über die Wirkungsweise von KaP zu erlangen. Basierend auf diesen Untersuchungsschwerpunkten sollen die wichtigsten Untersuchungsergebnisse im Folgenden noch einmal kurz zusammengefasst und diskutiert werden.

Im Zentrum des ersten Teils dieser Arbeit stand die Analyse von KaP-behandelten Melanomzellen. Untersucht wurden morphologische Veränderungen, Veränderungen der metabolischen Aktivität, der Zellvitalität sowie des Proliferationsverhaltens nach unterschiedlich langer Plasmabehandlung. Anschließend erfolgten durchflusszytometrische Messungen von Ko-Kulturen aus KaP-behandelten Melanomzellen und antioxidativen Naturstoffen. Genexpressionsanalysen von ausgewählten Proteinen sollten anschließend genauere Rückschlüsse über KaP-induzierte zelluläre Veränderungen liefern.

Die Betrachtung der behandelten Melanomzellen unter dem Lichtmikroskop legte einen Zusammenhang zwischen der Behandlungszeit und dem biologischen Effekt des Plasmas auf die behandelten Melanomzellen nahe. Dieser Zusammenhang ist konform zu Beobachtungen, die im Rahmen anderer *in vitro* Studien beschrieben wurden.^{196 232 173 168}

Neben Melanomzellen wurden in diesen Studien zudem verschiedene andere adhärenz Krebszellen wie beispielsweise Prostatakarzinomzellen und Zervixkarzinomzellen untersucht. Behandlungszeitabhängige morphologische Veränderungen nach KaP-Behandlung waren dabei in allen Versuchen feststellbar, obwohl es Unterschiede in der Trägergasauswahl, dem Messzeitpunkt und den Versuchsparametern (Voltstärke, Behandlungsabstand,

Behandlungsablauf) gab. Kritisch ist hinsichtlich der Analyse morphologischer Veränderungen im Rahmen dieser Arbeit anzumerken, dass nur repräsentative Bildausschnitte ausgewählt und nicht mehrere Aufnahmen von verschiedenen Abschnitten der Zellkulturen gemacht wurden und zudem morphologische Veränderungen nur schwierig zu quantifizieren sind. Durch die manuell geführte Plasmabehandlung sind weiterhin kleine Unregelmäßigkeiten im Ausmaß der durch die Plasmabehandlung verursachten Effekte nicht vollständig auszuschließen. Um eine regelmäßige Behandlung der behandelten Zellkulturabschnitte zu gewährleisten, kann eine computergeführte Plasmabehandlung durchgeführt werden.^{218 219} *Iseki et al.* nahmen zur exakten Detektion morphologischer Veränderungen zudem, abhängig von der Entfernung zum Plasmastrahl, eine Einteilung in verschiedene Bestrahlungsregionen (Region direkter Bestrahlung, Region in Umgebung direkter Bestrahlung, Region entfernt von direkter Bestrahlung) vor. In diesem Modell zeigten sich deutliche Unterschiede in der Wirkung des KaP auf Zellen in den unterschiedlichen Bestrahlungsregionen.¹⁷⁰ Diese Erkenntnisse konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt werden.

Die beobachteten morphologischen Veränderungen der Melanomzellen wurden anschließend durch durchflusszytometrische Messungen der Vitalität und des Proliferationsverhaltens sowie durch Messungen der metabolischen Zellaktivität mittels Resazurin-Tests tiefergehend untersucht und quantifiziert. Im Ergebnis zeigte sich jeweils ein negativer Zusammenhang zwischen der Plasmabehandlungszeit (und damit auch der -dosis) und der Vitalität, dem Proliferationsverhalten sowie der metabolischen Aktivität der Melanomzellen. Auch hier stimmen die Resultate mit den Ergebnissen anderer Studien überein, obwohl die im Rahmen dieser Studien präsentierten Ergebnisse zum Teil auf anderen Messmethoden und Versuchsparametern beruhen.^{159 83 168 125} So nutzten beispielsweise *Arndt et al.* zur Detektion des Proliferationsverhaltens Analysen des Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) und zur Detektion der Zellviabilität eine auf Widerstandsmessung basierende Methode (xCelligence System).¹⁵⁹ Bei der Deutung der Ergebnisse dieser Arbeit muss zudem einschränkend angemerkt werden, dass keine Analysen zu den exakten Zelltod-Vorgängen gemacht wurden. Weitreichendere Untersuchungen in anderen Publikationen, die vergleichbare Versuche durchgeführt haben, ergaben beispielsweise durch durchflusszytometrische Messungen von Annexin V- und Propidium Iod (PI)-gefärbten Zellen¹⁶⁸, durch die Analyse von Apoptose-assoziierten

Proteinen¹⁵⁹ sowie durch DNA-Fragmentationsanalysen^{83 232}, dass es sich dabei um apoptotische Vorgänge handelt. *Fridman et al.* beobachteten dagegen in ihrem Versuchsmodell mit Melanomzellen bei hohen Behandlungsdosen (15 Sekunden Plasmabehandlung, 1.4 W/cm²) nekrotische Vorgänge, wohingegen bei niedrigen Behandlungsdosen (5 Sekunden Plasmabehandlung, 0.8 W/cm²) apoptotische Vorgänge zu beobachten waren. Diese Resultate lassen einen dosisabhängigen Effekt von KaP auf die behandelten Melanomzellen vermuten, der im Rahmen künftiger Forschungsarbeit auch für die in dieser Studie gewählten Zellen und Plasmaquelle genauer untersucht werden könnte.⁸³

Eine weitere wichtige Beobachtung, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht werden konnte, ist die unterschiedlich stark ausfallende Wirkung von KaP auf die unterschiedlichen verwendeten Melanom-Zelllinien. So bewirkt eine Plasmabehandlung bei Zellen der Linie MaMel-19 eine stärkere Reduktion vitaler Zellen und vermindert das Teilungsverhalten stärker als dies bei Melanomzellen der Zelllinie UKRV-15a der Fall ist. Auch diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Ergebnissen anderer Studien, die die unterschiedlich starke Wirkung von KaP auf verschiedene Zellenarten und -linien untersucht haben.^{233 173 177} Wie diese Unterschiede genau zu Stande kommen, ist jedoch nicht abschließend geklärt. *Biscop et al.* diskutieren in diesem Zusammenhang einen möglichen Einfluss des verwendeten Kulturmediums, das für verschiedene Zelllinien unterschiedlich sein kann, auf die Wirksamkeit von KaP *in vitro*.²³⁴ Da jedoch in dieser Arbeit für beide Zelllinien das gleiche Kulturmedium verwendet wurde, ist dies als Grund für eine unterschiedlich starke KaP-Wirkung auszuschließen. Ein Grund für die unterschiedlich stark ausfallende Wirkung der KaP-Behandlung könnten Unterschiede der oxidativen Kapazität der verschiedenen Zelllinien sein. So gibt es bereits einige Experimente, die sogenannte „slow cycling“ Melanomzellen als medikamenten-resistenter identifiziert haben. Als Grund dafür wurde unter anderem ihr gesteigerter oxidativer Metabolismus und damit oxidative Kapazität im Vergleich zu anderen Melanomzellen genannt.^{235 236}

Zusammenfassend konnte in den durchgeführten Versuchen ein inhibierender Effekt von KaP auf die metabolische Aktivität, das Teilungsverhalten und die Vitalität sowie auf das morphologische Erscheinungsbild der untersuchten Tumorzellen nachgewiesen werden.

Ein zweiter wichtiger Punkt bei der Untersuchung der bestrahlten Melanomzellen war die Reduktion der biologischen Effekte von KaP durch die Zugabe von Antioxidantien. Im

Rahmen der Arbeit durchgeführte Versuche zeigten eine deutliche Reduktion der KaP-Wirkung auf die Melanomzellen bei Zugabe von antioxidativen Naturstoffen. Die Wirkung fiel jedoch je nach Zelllinie, verwendeter Naturstoffkonzentration und Länge der Plasmabehandlung unterschiedlich stark aus. Auch in anderen Studien konnte durch die Verwendung verschiedener Antioxidantien die Wirkung von KaP auf *in vitro* behandelte Zellen reduziert werden.^{125 232} Hier wurden als Antioxidantien beispielsweise N-Acetyl-L-Cystein^{171 94}, D-Mannitol oder Natriumpyruvat⁹⁵ verwendet und nicht wie in dieser Arbeit Naturstoff-Lösungen auf der Basis von Kaffeesäure, Resveratrol und Rutin-Hydrat. Insgesamt scheint die Zugabe von Antioxidantien jedoch stets die KaP-Wirkung auf die Melanomzellen zu reduzieren. Direkte Vergleiche zwischen den verschiedenen Antioxidantien bezüglich der Stärke ihres jeweiligen reduzierenden Effekts lassen sich jedoch aus verschiedenen Gründen nicht ziehen. So erfolgte beispielsweise sowohl in den betrachteten Versuchen, als auch im Rahmen dieser Arbeit die Zugabe der Antioxidantien zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Zeitrahmen maximal einer Stunde vor der KaP-Behandlung. Die Länge der Inkubationszeit der Antioxidantien vor der Behandlung scheint dabei jedoch den reduzierenden Effekt der Antioxidantien auf die KaP-Wirkung nicht zu beeinflussen. Weiterhin fielen die gewählten Konzentrationen der Antioxidantien unterschiedlich aus. Dazu kommt, dass, im Gegensatz zum Vorgehen in dieser Arbeit, in keiner der erwähnten Publikationen die KaP-unabhängige und damit isolierte Wirkung der Antioxidantien auf die Zellen untersucht wurden.

Schließlich wurden Genexpressionsanalysen der Genabschnitte CDKN2a (Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2) und Hypoxie induzierter Faktor 1-alpha (HIF1a) durchgeführt, um genauere Aussagen über die zellulären Effekte von KaP treffen zu können. Die Ergebnisse der RT-qPCR-Analysen ließen jedoch keine eindeutige Aussage darüber zu, ob KaP eine Veränderung der Expressionslevel verursacht und die hinzugefügten Antioxidantien diese Expressionsveränderungen verhindern können. Lediglich bei der Zelllinie UKRV-15a ist nach drei Tagen eine erhöhte Expression von HIF1a zu beobachten. Eine KaP induzierte Überexpression verursacht dementsprechend ein Anhalten des Zellzyklus, des Zellwachstums, der Proliferation und kann zur Apoptose der Zellen führen. Durch die Kombination mit der Naturstoff-Arbeitslösung wird dieser Effekt wiederum abgeschwächt. Dies verdeutlicht die antioxidative Wirkung des Naturstoffes auf die KaP-generierten RONS und eine damit verbundene Reduktion des biologischen Effekts von KaP auf die Zellen. Die Naturstoffe verhindern dabei die Entstehung von oxidativen Stress, wodurch es zu keiner

Stabilisierung des Transkriptionsfaktors kommt. Die geringe Anzahl der Versuchsansätze sowie die teilweise lange Inkubationszeit von drei Tagen könnten Gründe für die begrenzte Aussagekraft der Genanalysen sein. Möglich ist daher, dass es während der Inkubationszeit bereits zu Expressionsveränderungen gekommen ist, welche nicht genau bestimmt werden konnten. Eine Wiederholung der Genexpressionsanalysen mit einer höheren Anzahl von Versuchsansätzen und verkürzten Inkubationszeiten ist daher indiziert, um an dieser Stelle fundiertere Aussagen treffen zu können.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Untersuchung von isolierten T-Zellen, die auf Veränderungen ihrer Vitalität, ihres Proliferationsverhaltens und ihrer Zusammensetzung in $CD3^+CD4^+$ T-Zellen und $CD3^+CD8^+$ T-Zellen nach KaP-Behandlung hin untersucht wurden. Anschließend erfolgten durchflusszytometrische Messungen von Ko-Kulturen aus KaP-behandelten Immunzellen und antioxidativen Naturstoffen sowie Messungen ihrer Vitalität zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (16 Stunden, 3 Tage). Wie schon bei den Melanomzellen sollten auch hier anschließend Genexpressionsanalysen ausgewählter Genabschnitte genauere Rückschlüsse über KaP-induzierte zelluläre Veränderungen liefern.

Die Untersuchung der Vitalität und des Teilungsverhaltens der Immunzellen nach den KaP-Behandlungen ergab, wie auch bei den Melanomzellen, eine behandlungszeitabhängige Reduktion von vitalen und proliferierenden Zellen. Auch hier stehen diese Ergebnisse in Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien über behandelte isolierte PBMCs mit anschließender Antikörperfärbung der $CD3^+CD4^+$ T-Zellen.^{217 219} Auf Basis der gesammelten Daten lassen sich auch hier keine Rückschlüsse über genaue Zelltod-Vorgänge ziehen. *Bekeschus et al.* konnten jedoch Apoptose-assoziierte Vorgänge bei isolierten $CD4^+$ T-Zellen nach KaP-Behandlung feststellen.²¹⁹ Da die Versuchsbedingungen und -abläufe dieser Studie vergleichbar mit den Bedingungen und Abläufen der vorliegenden Arbeit sind, kann davon ausgegangen werden, dass diese Erkenntnisse auf die in dieser Arbeit beobachteten Daten übertragbar sind. In nachfolgenden Versuchen wäre dies allerdings kritisch zu überprüfen.

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Messung der Vitalität 16 Stunden sowie drei Tage nach den KaP-Behandlungen der zeitliche Verlauf der KaP-Wirkung auf die Zellen untersucht. So sind nach drei Tagen deutlich mehr T-Zellen devitalisiert als 16 Stunden nach der KaP-Behandlung. Der mit der Zeit bei der Plasmabehandlung zunehmende oxidative Stress auf die behandelten Zellen wurde von *Bekeschus et al.* durch Messungen des Proteins Caspase-3 und der oxidativen Aktivität der Mitochondrien bereits dokumentiert und stützt

die in dieser Arbeit dokumentierten Ergebnisse bezüglich des zeitlichen Verlaufs des biologischen Effekts von KaP auf die Immunzellen.²¹⁹ Hier wurden Messungen ähnlich wie in dieser Arbeit 2, 6, 12, 18 und 24 Stunden nach den KaP-Behandlungen durchgeführt. Auch im Vergleich zu anderen veröffentlichten Studien, die die Wirkung von KaP unter zeitlichen Aspekten untersucht haben, sind die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Messergebnisse konsistent.²³⁷

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit durch gezielte Proliferationsanalysen herausgefunden werden, dass das Teilungsverhalten der vitalen CD3⁺ T-Zellen nach den KaP-Behandlungen behandlungszeitabhängig inhibiert wird. Je länger die Behandlungszeit war, desto stärker wurde das Proliferationsverhalten gehemmt. Abweichend von diesen Resultaten kommen *Bekeschus et al.* auf Basis ihrer Analysen zum Schluss, dass *in vitro* behandelte T-Zellen durch KaP entweder direkt devitalisiert werden oder es zu keinerlei Einschränkung ihrer Funktionsfähigkeit bzw. ihres Proliferationsverhaltens kommt.²³⁸ Die Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse sind noch nicht abschließend geklärt, könnten jedoch eventuell auf Unterschiede im Versuchsaufbau zurückzuführen sein. So haben *Bekeschus et al.* isolierte CFSE-markierte PBMCs mit Phytohaemagglutinin P (PHA) stimuliert und erst nach zweitägiger Inkubationszeit mit KaP behandelt. Erst am Tag 7 wurden schließlich durchflusszytometrische Messungen vorgenommen. Grund für das Ausbleiben der Proliferationshemmung könnte somit die stark verlängerte Inkubationszeit sein sowie ein unterschiedlich ablaufender Stimulationsmechanismus der Zellen durch das mitogene PHA. Die Aktivierung der Proliferation durch PHA erfolgt über die Bindung an glykolysierte, membranständige Proteine (unter anderem dem TZR) und einer damit einhergehenden Kreuzvernetzung der Membranproteine, die eine Calcium-abhängige intrazelluläre Kaskade einleitet.²³⁹

Zu Beginn der Versuche wurde zudem eine Differenzierung der CD3⁺ T-Zellen in die Subpopulationen CD3⁺ CD4⁺ (T-Helfer-Zellen) und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) mittels Antikörperfärbung vorgenommen. Dabei ergaben sich nach der Plasmabehandlung weder Unterschiede hinsichtlich der Komposition der CD3⁺ T-Zellen noch hinsichtlich der Vitalitätsreduktion in den beiden Subpopulationen. Obwohl es klare Unterschiede im Versuchsaufbau gab, fanden *Bekeschus et al.* ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Vitalitätsreduktion in den betrachteten Subpopulationen nach den Behandlungen mit KaP. So wurde in deren Versuchen auf deren Isolation verzichtet und

PBMCs in ihrer Gesamtheit mit vergleichbaren Behandlungszeiten (5, 20, 60 Sekunden) untersucht.²⁴⁰ Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde auf eine solche Differenzierung in der Folge verzichtet. *Haertel et al.* beobachteten jedoch bei Analysen von isolierten Immunzellen unterschiedlich sensitive T-Zellen nach der Behandlung mit Plasma.²²⁰ T-Helfer-Zellen reagierten hier im Vergleich zu zytotoxischen T-Zellen mit einem deutlich stärkeren Vitalitätsverlust auf die KaP-Behandlungen. Ein Grund für dieses Ergebniss könnte zum einen die Untersuchung der Subpopulation nicht in Form von isolierten Immunzellen in Monokulturen (wie im Rahmen dieser Arbeit geschehen), sondern als Suspension vieler verschiedener Immunzell-Populationen sein. Zudem ist festzuhalten, dass es sich bei den untersuchten Immunzellen von *Haertel et al.* nicht um humane, sondern Immunzellen von Ratten handelte.

Um tiefere Aussagen über die Wirkung von KaP auf CD3⁺ T-Zellen und insbesondere auf die Subpopulation der T-Helferzellen (CD3⁺ CD4⁺) treffen zu können, haben *Bekeschus et al.* eine Differenzierung der T-Helferzellen in naive T-Zellen und in Gedächtnis-T-Zellen vorgenommen. Die Autoren zeigen, dass innerhalb der T-Helfer-Subpopulation T-Helfer Gedächtniszellen stärker auf eine Plasmabehandlung reagieren als naive T-Helferzellen. Dies äußerte sich vor allen Dingen durch eine höhere Anzahl apoptotischer Zellen und einer verminderten Expression einiger Zytokine.²¹⁷ Eine solche Differenzierung der T-Helferzellen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht, ist jedoch ein interessanter Ansatz für zukünftige Versuche, um immunologischen Konsequenzen von KaP abschätzen zu können.

Schließlich konnte im Rahmen dieser Arbeit eine leicht unterschiedliche KaP-Wirkung auf die Vitalität von stimulierten und unstimulierten Immunzellen nachgewiesen werden. So fällt die vitalitätseinschränkende Wirkung von KaP bei unstimulierten CD3⁺ T-Zellen etwas stärker aus als bei stimulierten CD3⁺ T-Zellen. Zu diesem Resultat kamen *Bekeschus et al.* und *Haertel et al.* trotz der bereits erwähnten Unterschiede im Versuchsaufbau bei ihren Untersuchungen mit PBMC²⁴⁰ beziehungsweise mit Immunzellen der Ratte ebenfalls.²²⁰ Womit sich die erhöhte Widerstandsfähigkeit der aktivierten Zellen begründen lässt, war nicht Gegenstand dieser Arbeit, könnte aber ebenfalls im Rahmen weiterführender Untersuchungen näher beleuchtet werden.

Genau wie bei den Melanomzell-Versuchen, wurde der Effekt von antioxidativen Naturstoffen auch für die KaP-behandelten Immunzellen untersucht. Dabei ergaben sich bei Zugabe der Antioxidantien deutlich erhöhte Vitalitätswerte bei den behandelten T-Zellen im

Vergleich zu behandelten T-Zellen, bei denen keine Naturstoffe zugegeben wurden. Die Effektstärke der verschiedenen Naturstoffe fiel dabei je nach Konzentration der Naturstoff-Arbeitslösung und der Plasmabehandlungszeit unterschiedlich stark aus. Die Zugabe der verschiedenen Naturstoff-Lösungen bewirkt zwar erhöhte Vitalitätswerte der behandelten Zellen, jedoch sind diese trotz allem noch reduziert im Vergleich zu den unbehandelten Proben. So scheinen die Naturstoff-Lösungen nur eine gewisse Menge der KaP-generierten RONS inaktivieren und damit die Wirkung von KaP auf die Zellen abschwächen zu können. Vergleichbare Studien, die an T-Zellen eine ähnliche Fragestellung untersucht haben, liegen derzeit nicht vor. Daher wäre es denkbar, die Versuchsansätze mit anderen Antioxidantien zu wiederholen, um deren unterschiedliche Effektstärken und Abhängigkeiten zu anderen Variablen (z.B. Behandlungszeit, Konzentration) besser herausarbeiten zu können.

Wichtig ist an dieser Stelle zu betonen, dass aufgrund des starken negativen Einflusses der ausgewählten Naturstoff-Lösungen auf das Teilungsverhalten der Immunzellen, diesbezüglich keine Aussagen getroffen werden konnten. Die Proliferationswerte der T-Zellen waren bereits nach der Antioxidantien-Zugabe und ohne die zusätzliche KaP-Behandlung stark reduziert. So sollte in folgenden Versuchsansätzen die Auswahl der Antioxidantien überdacht werden und nach möglichen Alternativstoffen gesucht werden, die das Proliferationsverhalten nicht negativ beeinflussen.

Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen wurden schließlich die relativen Genexpressionslevel der Genabschnitte FOXP3, IL-10, INF- γ sowie IL-2 auf mögliche KaP-induzierte Veränderungen hin untersucht. Auf Basis der Daten dieser Studie sind leider keine fundierten Aussagen über Expressionsveränderungen möglich. So gab es in den verschiedenen Versuchsansätzen sich widersprechende Zahlen. Lediglich die Ergebnisse eines Versuchsansatzes (Abbildung 26 E) lassen durch eine erhöhte relative Expression von IL-2 und IFN- γ eine proinflammatorische Reaktion der behandelten T-Zellen auf die KaP-Behandlung vermuten. Zusätzlich konnte durch die Zugabe der Naturstofflösung die KaP-induzierte erhöhte relative Expression der beiden Genabschnitte und somit die biologische Wirkung von KaP vermindert werden. Sämtliche hier gewonnen Ergebnisse sollten jedoch im Rahmen zukünftiger Versuche kritisch überprüft werden. Bei der möglichen Wiederholung solcher Expressionsanalysen werden Anpassungen vorgeschlagen. So sollte die Anzahl der Versuchsansätze erhöht sowie die Inkubationszeiten bzw. die Messintervalle verkürzt werden um Expressionsveränderungen rechtzeitig dokumentieren zu können und

spenderindividuelle Expressionsabweichungen besser interpretieren zu können. Zu betonen ist an dieser Stelle zudem, dass es wegen der devitalisierenden Wirkung von KaP auf die Lymphozyten grundsätzlich schwierig ist, die genaue Ursache für ein potentiell reduziertes Expressionslevel eines Genabschnitts zu identifizieren, da eine solche Reduktion auch in der sinkenden Anzahl der Zellen begründet sein könnte.

Zusammenfassend konnte in den durchgeführten Versuchen ein inhibierender Effekt von KaP auf das Teilungsverhalten und die Vitalität der untersuchten T-Zellen nachgewiesen werden. Wobei weder Unterschiede hinsichtlich der Komposition der CD3⁺ T-Zellen noch hinsichtlich der Vitalitätsreduktion in den beiden Subpopulationen nach den Plasmabehandlungen festgestellt werden konnten.

Die Anwesenheit von antioxidativen Naturstoff-Lösungen verringert dabei deutlich die vitalitätsreduzierende Wirkung von KaP auf die behandelten T-Zellen. Die durchgeführten Genexpressionsanalysen ließen keine Aussagen zu.

Die verwendeten Parameter und Geräteeinstellungen, wie beispielsweise der Abstand der Plasmaquelle zu den behandelten Zellen, die Auswahl des Trägergases (Argon) und das genutzte Powerlevel, wurden auf der Basis ausgewählter Literatur festgelegt.^{77 196 86} Da derzeit keine Publikationen über den verwendeten PlasmaJet der Firma Heuermann vorliegen, wurden die Parameter der in anderen Studien verwendeten Plasmageräte für den PlasmaJet übernommen. Die Versuchsparameter wurden dabei während der Datenerhebung zu keinem Zeitpunkt verändert.

Grundsätzlich wird die Parameterauswahl und ihre Variation bei der Plasmabestrahlung jedoch durchaus in einigen Publikationen diskutiert. So wurde gezeigt, dass Veränderungen der Länge der Behandlungszeiten, des Flow-Levels, der Trägergas-Komposition, des Behandlungsabstandes und der Voltage¹⁹⁶ einen großen Einfluss auf die biologische Wirkung von KaP auf unterschiedliche Zellen haben können.^{89 196}

Da die Parameterauswahl am PlasmaJet bei der Bestrahlung von Melanom- und Immunzellen im Rahmen dieser Studie zum ersten Mal vorgenommen wurde, sollte diese in zukünftigen Studien weiter ausgearbeitet und validiert werden. So wäre es beispielsweise denkbar, den exakten Versuchsaufbau dieser Studie mit verschiedenen Plasmageräten durchzuführen, Parametereinstellungen zusätzlich zu verändern und dabei die Unterschiede in den Auswirkungen auf die bestrahlten Zellen tiefergehend zu untersuchen.

Bezüglich der Aussagekraft der in dieser Arbeit erhobenen Daten muss kritisch angemerkt werden, dass alle Versuchsansätze unter Verwendung von Monokulturen erfolgten. Es wurden keine Versuchsansätze mit verschiedenen PBMC-Subpopulationen sowie mit Melanomzellen und CD3⁺ T-Zellen in Ko-Kultur angesetzt. Die Reaktionen isolierter Zellen auf die KaP-Behandlung lassen sich nur eingeschränkt auf den lebenden Organismus übertragen und müssen im Rahmen weiterer Forschungsarbeit mit Hilfe von Ko-Kulturen genauer überprüft werden. Zudem ist das Immunsystem des Menschen äußerst komplex und besteht aus einer Vielzahl zellulärer und molekularer Komponenten. Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen ergeben sich damit viele Fragestellungen, die nicht vollständig durch *in vitro* Experimente geklärt werden können. Berücksichtigt werden muss außerdem, dass die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lediglich Aussagen über die kurzfristigen Auswirkungen von KaP auf die behandelten Zellen ermöglichen. Für Aussagen über mögliche Langzeitwirkungen von KaP sind *in vitro* Modelle ebenfalls nicht geeignet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur ein Ausschnitt der potenziellen biologischen Wirkungen von KaP auf *in vitro* behandelte Melanom- und T-Zellen untersucht. Dennoch konnte zusammenfassend und unter Berücksichtigung der einschränkenden Anmerkungen im Rahmen dieser Diskussion das große Potenzial von KaP in der Krebstherapie herausgearbeitet und verdeutlicht werden. Damit KaP-Behandlungen in die Krebstherapie Einzug erhalten können, sind noch weitere vor allem *in vivo* Studien zwingend erforderlich. Vor allen Dingen mit dem Ziel, Langzeiteffekte sowie Nebenwirkungen zu untersuchen, um Behandlungskonzepte zu etablieren und somit die Sicherheit der Behandlung gewährleisten zu können.

6 Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung des Einflusses von KaP auf humane Melanom- und Immunzellen. Durch *in vitro* Versuche mit ausgewählten Zellen wurde (i) der biologische Einfluss von KaP auf die Morphologie und die metabolische Aktivität von Melanomzellen sowie auf das Proliferationsverhalten und die Vitalität von Melanom- und Immunzellen untersucht. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Zugabe von Antioxidantien versucht, (ii) den biologischen Effekt von KaP auf die behandelten Zellen zu reduzieren und (iii) durch die Untersuchung ausgewählter Genexpressionsveränderungen mittels qPCR genaueren Aufschluss über die Wirkungsweise von KaP zu erlangen.

Zusammenfassend konnte in den durchgeführten Versuchen ein inhibierender Effekt von KaP auf die metabolische Aktivität sowie das morphologische Erscheinungsbild der untersuchten Melanom-Zelllinien sowie ein inhibierender Effekt von KaP auf das Teilungsverhalten und die Vitalität der untersuchten T- und Melanomzellen nachgewiesen werden. Nach den Plasmabehandlungen konnten jedoch weder Unterschiede hinsichtlich der Komposition noch der Vitalitätsreduktion zwischen den beiden Subpopulationen der CD3⁺ T-Zellen (CD3⁺ CD4⁺ und CD3⁺ CD8⁺) festgestellt werden. Im Gegensatz waren jedoch unterschiedlich starke Effekte von KaP auf stimulierte und unstimulierte T-Zellen sowie auf die beiden Melanom-Zelllinien erkennbar.

Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Zugabe von antioxidativen Naturstoffen zu den KaP-behandelten Zellen eine deutliche Reduktion der KaP-Wirkung auf diese Zellen bewirkt werden. Der die Wirkung der KaP-Bestrahlung abschwächende Einfluss der Naturstoffe fiel dabei je nach Zelllinie, verwendeter Naturstoffkonzentration und Länge der Plasmabehandlung unterschiedlich stark aus.

Schließlich wurden Genexpressionsanalysen ausgewählter Genabschnitte durchgeführt, um genauere Aussagen über die zellulären Effekte von KaP treffen zu können. Die Ergebnisse der RT-qPCR-Analysen ließen jedoch keine eindeutige Aussage darüber zu, ob KaP eine Veränderung der Expressionslevels verursacht und die hinzugefügten Antioxidantien diese Expressionsveränderungen verhindern können.

Zusammenfassend bekräftigen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse das große Potenzial von KaP in der MM-Therapie. Zur Etablierung standardisierter Behandlungsabläufe sind jedoch noch weitere, vor allem *in vivo* Studien dringend

erforderlich, um mögliche Schäden für den Organismus, vor allem von gesundem Gewebe ausschließen und Berechenbarkeit der KaP-Behandlungen gewährleisten sowie zu können.

7 Literaturverzeichnis

1. Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018 [zitiert 8. August 2019]. Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-56004-4>
2. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*. Februar 2004;40(12):845–59.
3. Kaufmann SHE. T-Zellen. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, Herausgeber. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016 [zitiert 7. August 2019]. S. 79–92. Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-48678-8_12
4. Frauwirth KA, Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *Journal of Clinical Investigation*. 1. Februar 2002;109(3):295–9.
5. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*. Dezember 1992;71(7):1065–8.
6. Kay JE. Mechanisms of T lymphocyte activation. *Immunology Letters*. Juli 1991;29(1–2):51–4.
7. Laky K, Fleischacker C, Fowlkes BJ. TCR and Notch signaling in CD4 and CD8 T-cell development. *Immunological Reviews*. Februar 2006;209(1):274–83.
8. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of Immunological Methods*. Oktober 2004;293(1–2):127–42.
9. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. Januar 1994;76(2):241–51.
10. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. Januar 2000;100(1):57–70.
11. Harrington KJ. The biology of cancer. *Medicine*. Januar 2016;44(1):1–5.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. März 2011;144(5):646–74.
13. Vajdic CM, van Leeuwen MT. Cancer incidence and risk factors after solid organ

transplantation. *International Journal of Cancer*. 15. Oktober 2009;125(8):1747–54.

14. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*. 25. März 2011;331(6024):1565–70.

15. Fridman W-H, Dieu-Nosjean M-C, Pagès F, Cremer I, Damotte D, Sautès-Fridman C, u. a. The Immune Microenvironment of Human Tumors: General Significance and Clinical Impact. *Cancer Microenvironment*. August 2013;6(2):117–22.

16. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. 3. April 2015;348(6230):69–74.

17. Yazdi AS, Morstedt K, Puchta U, Ghoreschi K, Flaig MJ, Rocken M, u. a. Heterogeneity of T-Cell Clones Infiltrating Primary Malignant Melanomas. *Journal of Investigative Dermatology*. Februar 2006;126(2):393–8.

18. Wieder T, Brenner E, Braumüller H, Röcken M. Immuntherapie des Melanoms: Wirksamkeit und Wirkungsmechanismen: Krebskontrolle durch Immunsystem-vermittelte Seneszenz. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. Januar 2016;14(1):28–37.

19. Pietra G, Manzini C, Rivara S, Vitale M, Cantoni C, Petretto A, u. a. Melanoma Cells Inhibit Natural Killer Cell Function by Modulating the Expression of Activating Receptors and Cytolytic Activity. *Cancer Research*. 15. März 2012;72(6):1407–15.

20. Hölsken O, Miller M, Cerwenka A. Exploiting natural killer cells for therapy of melanoma. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. Januar 2015;13(1):23–8.

21. Poschke I, Mougiakakos D, Kiessling R. Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. August 2011;60(8):1161–71.

22. Roesch und Berking - 2018 - Melanom.pdf.

23. Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, Herausgeber. *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 10. Ausg. Berlin; 2015. 152 S. (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes).

24. Garbe C, Blum A. Epidemiology of Cutaneous Melanoma in Germany and Worldwide. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2001;14(5):280–90.

25. Shaikh WR, Dusza SW, Weinstock MA, Oliveria SA, Geller AC, Halpern AC. Melanoma Thickness and Survival Trends in the United States, 1989–2009. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. Januar 2016 [zitiert 26. November 2019];108(1). Verfügbar unter: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djv294>
26. Global Cancer Observatory: Cancer today [Internet]. International Agency for Research on Cancer. [zitiert 27. November 2019]. Verfügbar unter: <http://gco.iarc.fr/today/home>
27. Holmes D. The cancer that rises with the Sun. *Nature*. November 2014;515(7527):S110–1.
28. Hawryluk, Elena B., Fisher, David E. Melanoma Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Phenotypes. In: *Advances in Malignant Melanoma - Clinical and Research Perspectives* [Internet]. InTech; 2011 [zitiert 6. August 2019]. Verfügbar unter: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-malignant-melanoma-clinical-and-research-perspectives/melanoma-epidemiology-risk-factors-and-clinical-phenotypes>
29. Holman C, Armstrong B, Heenan P. A theory of the etiology and pathogenesis of human cutaneous malignant melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 1983;(71):651–656.
30. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, u. a. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *European Journal of Cancer*. Januar 2005;41(1):45–60.
31. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, u. a. A review of human carcinogens—Part D: radiation. *The Lancet Oncology*. August 2009;10(8):751–2.
32. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: An overview of published studies. *International Journal of Cancer*. 9. Oktober 1997;73(2):198–203.
33. Libra M, Malaponte G, Navolanic PM, Gangemi P, Bevelacqua V, Proietti L, u. a. Analysis of BRAF Mutation in Primary and Metastatic Melanoma. *Cell Cycle*. 23. Oktober 2005;4(10):1382–4.
34. Smalley KSM. Understanding Melanoma Signaling Networks as the Basis for Molecular Targeted Therapy. *Journal of Investigative Dermatology*. Januar 2010;130(1):28–37.
35. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, u. a. Genomic

Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. Juni 2015;161(7):1681–96.

36. Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, u. a. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature*. Juli 1999;400(6743):468–72.
37. Smalley KSM. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *International Journal of Cancer*. 1. Mai 2003;104(5):527–32.
38. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*. 15. Oktober 2000;351(2):289–305.
39. Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, u. a. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol*. März 2003;22(3):469–80.
40. Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson JJ, Cole BF, Ernstoff MS. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *International Journal of Cancer*. 10. August 2005;116(1):144–9.
41. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, u. a. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European Journal of Cancer*. September 2005;41(14):2040–59.
42. BFS - Die verschiedenen Hauttypen [Internet]. [zitiert 2. August 2019]. Verfügbar unter: http://www.bfs.de/DE/themen/opt/uv/wirkung/hauttypen/hauttypen_node.html
43. Ford D, Bliss JM, Swerdlow AJ, Armstrong BK, Franceschi S, Green A, u. a. Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. *International Journal of Cancer*. 9. August 1995;62(4):377–81.
44. Tsao H, Niendorf K. Genetic testing in hereditary melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. November 2004;51(5):803–8.
45. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, u. a. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European Journal of Cancer*. Januar 2005;41(1):28–44.
46. Friedman RJ, Rigel DS. The Clinical Features of Malignant Melanoma. *Dermatologic Clinics*. April 1985;3(2):271–83.
47. Thomas L, Tranchand P, Berard F, Secchi T, Colin C, Moulin G. Semiological Value of

ABCDE Criteria in the Diagnosis of Cutaneous Pigmented Tumors. *Dermatology*. 1998;197(1):11–7.

48. Girardi S, Gaudy C, Gouvernet J, Teston J, Richard MA, Grob J-J. Superiority of a cognitive education with photographs over ABCD criteria in the education of the general population to the early detection of melanoma: A randomized study. *International Journal of Cancer*. 1. Mai 2006;118(9):2276–80.

49. Dinnes J, Deeks JJ, Grainge MJ, Chuchu N, Ferrante di Ruffano L, Matin RN, u. a. Visual inspection for diagnosing cutaneous melanoma in adults. Cochrane Skin Group, Herausgeber. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 4. Dezember 2018 [zitiert 2. August 2019]; Verfügbar unter: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD013194>

50. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *The Lancet Oncology*. März 2002;3(3):159–65.

51. S3-Leitlinie Melanom. 2019;270.

52. Sladden MJ, Balch C, Barzilai DA, Berg D, Freiman A, Handiside T, u. a. Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma. Cochrane Skin Group, Herausgeber. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 7. Oktober 2009 [zitiert 5. August 2019]; Verfügbar unter: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004835.pub2>

53. Gojkovič-Horvat A, Jančar B, Blas M, Žumer B, Karner K, Hočevan M, u. a. Adjuvant Radiotherapy for Palpable Melanoma Metastases to the Groin: When to Irradiate? *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*. Mai 2012;83(1):310–6.

54. Farshad A, Burg G, Panizzon R, Dummer R. A retrospective study of 150 patients with lentigo maligna and lentigo maligna melanoma and the efficacy of radiotherapy using Grenz or soft X-rays. *British Journal of Dermatology*. Juni 2002;146(6):1042–6.

55. Stevens G, Thompson JF, Firth I, O'Brien CJ, McCarthy WH, Quinn MJ. Locally advanced melanoma: Results of postoperative hypofractionated radiation therapy. *Cancer*. 1. Januar 2000;88(1):88–94.

56. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon Alpha Adjuvant Therapy in Patients With High-Risk Melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 7. April 2010;102(7):493–501.

57. Reuter K, Albrecht K, Seelig H, Meiss F, Mauch C, Kreuzberg N, u. a. Health-related

Quality of Life, Fatigue, and Depression Under Low-Dose IFN- α Therapy in Melanoma Patients: *Journal of Immunotherapy*. 2014;37(9):461–7.

58. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. April 2012;12(4):252–64.

59. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science*. 22. März 1996;271(5256):1734–6.

60. Hassel JC, Heinzerling L, Aberle J, Bähr O, Eigentler TK, Grimm M-O, u. a. Combined immune checkpoint blockade (anti-PD-1/anti-CTLA-4): Evaluation and management of adverse drug reactions. *Cancer Treatment Reviews*. Juni 2017;57:36–49.

61. Naidoo J, Wang X, Woo KM, Iyriboz T, Halpenny D, Cunningham J, u. a. Pneumonitis in Patients Treated With Anti-Programmed Death-1/Programmed Death Ligand 1 Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. März 2017;35(7):709–17.

62. Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, Feldman AL, Hughes MS, Royal RE, u. a. Enterocolitis in Patients With Cancer After Antibody Blockade of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4. *Journal of Clinical Oncology*. 20. Mai 2006;24(15):2283–9.

63. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, u. a. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 9. November 2017;377(19):1824–35.

64. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, u. a. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF Mutated Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 9. November 2017;377(19):1813–23.

65. Rozeman EA, Dekker TJA, Haanen JBAG, Blank CU. Advanced Melanoma: Current Treatment Options, Biomarkers, and Future Perspectives. *American Journal of Clinical Dermatology*. Juni 2018;19(3):303–17.

66. Tendero C, Tixier C, Tristant P, Desmaison J, Leprince P. Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. Januar 2006;61(1):2–30.

67. d'Agostino R, Favia P, Oehr C, Wertheimer MR. Low-Temperature Plasma Processing of Materials: Past, Present, and Future. *Plasma Processes and Polymers*. 12. Januar 2005;2(1):7–15.

68. Langmuir I. Oscillations in ionized gases. Resarch Laboratory, General Electric Co.; 1928.
69. Conrads H, Schmidt M. Plasma generation and plasma sources. 27. September 2000;Plasma Sources Sci. Technol.(9).
70. Dayun Yan, Jonathan H. Sherman, Michael Keidar. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. Oncotarget(Vol. 8).
71. Bourke P, Ziuzina D, Boehm D, Cullen PJ, Keener K. The Potential of Cold Plasma for Safe and Sustainable Food Production. Trends in Biotechnology. Juni 2018;36(6):615–26.
72. Brandenburg R, Basner R, Weltmann K-D. Nicht-thermische Plasmen zum Emissionsschutz: Stand und Perspektiven. Vakuum in Forschung und Praxis. April 2010;22(2):6–12.
73. Höcker H. Plasma treatment of textile fibers. Pure and Applied Chemistry. 1. Januar 2002;74(3):423–7.
74. von Woedtke Th, Reuter S, Masur K, Weltmann K-D. Plasmas for medicine. Physics Reports. September 2013;530(4):291–320.
75. Haertel B, Woedtke T von, Weltmann K-D, Lindequist U. Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma Possible Application in Wound Healing. Biomolecules & Therapeutics. 30. November 2014;22(6):477–90.
76. von Woedtke Th, Metelmann H-R, Weltmann K-D. Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of *in Vivo* Application of Cold Atmospheric Plasma: Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of *in Vivo* Application of Cold Atmospheric Plasma. Contributions to Plasma Physics. Februar 2014;54(2):104–17.
77. 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. Juni 2016;33(6):894–909.
78. Lademann J, Richter H, Alborova A, Humme D, Patzelt A, Kramer A, u. a. Risk assessment of the application of a plasma jet in dermatology. Journal of Biomedical Optics. 2009;14(5):054025.
79. Kogelschatz U. Atmospheric-pressure plasma technology. Plasma Physics and

Controlled Fusion. 1. Dezember 2004;46(12B):B63–75.

80. von Woedtke T, Kramer A, Weltmann K-D. Plasma Sterilization: What are the Conditions to Meet this Claim? *Plasma Processes and Polymers*. 15. August 2008;5(6):534–9.

81. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. *Applied Plasma Medicine*. *Plasma Processes and Polymers*. 15. August 2008;5(6):503–33.

82. U. Kogelschatz. Dielectric-Barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. März 2003;Vol.23.

83. Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, Fridman A, Gutsol A, u. a. Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 22. März 2007;27(2):163–76.

84. Boxhammer V, Morfill GE, Jokipii JR, Shimizu T, Klämpfl T, Li Y-F, u. a. Bactericidal action of cold atmospheric plasma in solution. *New Journal of Physics*. 29. November 2012;14(11):113042.

85. Dezest M, Chavatte L, Bourdens M, Quinton D, Camus M, Garrigues L, u. a. Mechanistic insights into the impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on human epithelial cell lines. *Scientific Reports* [Internet]. März 2017 [zitiert 27. Mai 2019];7(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/srep41163>

86. Wende K, Williams P, Dalluge J, Van Gaens W, Aboubakr H, Bischof J, u. a. Identification of the biologically active liquid chemistry induced by a nonthermal atmospheric pressure plasma jet. *Biointerphases*. Juni 2015;10(2):029518.

87. Vermeylen S, De Waele J, Vanuytsel S, De Backer J, Van der Paal J, Ramakers M, u. a. Cold atmospheric plasma treatment of melanoma and glioblastoma cancer cells. *Plasma Processes and Polymers*. Dezember 2016;13(12):1195–205.

88. Joh HM, Kim SJ, Chung TH, Leem SH. Comparison of the characteristics of atmospheric pressure plasma jets using different working gases and applications to plasma-cancer cell interactions. *AIP Advances*. September 2013;3(9):092128.

89. Cheng X, Sherman J, Murphy W, Ratovitski E, Canady J, Keidar M. The Effect of Tuning Cold Plasma Composition on Glioblastoma Cell Viability. Yousfi M, Herausgeber. *PLoS ONE*. 30. Mai 2014;9(5):e98652.

90. Joh HM, Choi JY, Kim SJ, Chung TH, Kang T-H. Effect of additive oxygen gas on cellular response of lung cancer cells induced by atmospheric pressure helium plasma jet. *Scientific Reports* [Internet]. Mai 2015 [zitiert 22. Dezember 2019];4(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/srep06638>
91. Rehman MU, Jawaid P, Uchiyama H, Kondo T. Comparison of free radicals formation induced by cold atmospheric plasma, ultrasound, and ionizing radiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. September 2016;605:19–25.
92. Dubuc A, Monsarrat P, Virard F, Merbahi N, Sarrette J-P, Laurencin-Dalicieux S, u. a. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. Januar 2018;10:175883591878647.
93. Kolb JF, Mohamed A-AH, Price RO, Swanson RJ, Bowman A, Chiavarini RL, u. a. Cold atmospheric pressure air plasma jet for medical applications. *Applied Physics Letters*. 16. Juni 2008;92(24):241501.
94. Ahn HJ, Kim KI, Hoan NN, Kim CH, Moon E, Choi KS, u. a. Targeting Cancer Cells with Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generated by Atmospheric-Pressure Air Plasma. Shi X, Herausgeber. *PLoS ONE*. 21. Januar 2014;9(1):e86173.
95. 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. Zhivotovsky B, Herausgeber. *PLoS ONE*. 29. November 2011;6(11):e28154.
96. Schmidt-Bleker A, Winter J, Iseni S, Dünnbier M, Weltmann K-D, Reuter S. Reactive species output of a plasma jet with a shielding gas device—combination of FTIR absorption spectroscopy and gas phase modelling. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 9. April 2014;47(14):145201.
97. Bruggeman P, Leys C. Non-thermal plasmas in and in contact with liquids. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 7. März 2009;42(5):053001.
98. Tanaka H, Mizuno M, Toyokuni S, Maruyama S, Kodera Y, Terasaki H, u. a. Cancer therapy using non-thermal atmospheric pressure plasma with ultra-high electron density. *Physics of Plasmas*. Dezember 2015;22(12):122004.
99. Yan D, Sherman JH, Cheng X, Ratovitski E, Canady J, Keidar M. Controlling plasma stimulated media in cancer treatment application. *Applied Physics Letters*. Dezember

2014;105(22):224101.

100. Bekeschus S, Kolata J, Winterbourn C, Kramer A, Turner R, Weltmann KD, u. a. Hydrogen peroxide: A central player in physical plasma-induced oxidative stress in human blood cells. *Free Radical Research*. Mai 2014;48(5):542–9.
101. Kurake N, Tanaka H, Ishikawa K, Kondo T, Sekine M, Nakamura K, u. a. Cell survival of glioblastoma grown in medium containing hydrogen peroxide and/or nitrite, or in plasma-activated medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. September 2016;605:102–8.
102. Schmidt A, Dietrich S, Steuer A, Weltmann K-D, von Woedtke T, Masur K, u. a. Non-thermal Plasma Activates Human Keratinocytes by Stimulation of Antioxidant and Phase II Pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 13. März 2015;290(11):6731–50.
103. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, u. a. Effects of Non-Thermal Plasma on Mammalian Cells. Koutsopoulos S, Herausgeber. *PLoS ONE*. 21. Januar 2011;6(1):e16270.
104. Yan X, Xiong Z, Zou F, Zhao S, Lu X, Yang G, u. a. Plasma-Induced Death of HepG2 Cancer Cells: Intracellular Effects of Reactive Species. *Plasma Processes and Polymers*. Januar 2012;9(1):59–66.
105. Gaur N, Szili EJ, Oh J-S, Hong S-H, Michelmore A, Graves DB, u. a. Combined effect of protein and oxygen on reactive oxygen and nitrogen species in the plasma treatment of tissue. *Applied Physics Letters*. 7. September 2015;107(10):103703.
106. Bienert GP, Møller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, u. a. Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 12. Januar 2007;282(2):1183–92.
107. Bienert GP, Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Mai 2014;1840(5):1596–604.
108. Yan D, Xiao H, Zhu W, Nourmohammadi N, Zhang LG, Bian K, u. a. The role of aquaporins in the anti-glioblastoma capacity of the cold plasma-stimulated medium. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 8. Februar 2017;50(5):055401.
109. Ishaq M, Evans MDM, Ostrikov K (Ken). Atmospheric pressure gas plasma-induced colorectal cancer cell death is mediated by Nox2–ASK1 apoptosis pathways and oxidative

stress is mitigated by Srx–Nrf2 anti-oxidant system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Dezember 2014;1843(12):2827–37.

110. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free Radicals in Biological Materials. *Nature*. Oktober 1954;174(4432):689–91.

111. Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. August 2004;337:1–13.

112. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*. Juni 2001;30(11):1191–212.

113. Bouayed J, Bohn T. Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2010;3(4):228–37.

114. Koop DR. Alcohol metabolism's damaging effects on the cell: a focus on reactive oxygen generation by the enzyme cytochrome P450 2E1. *Alcohol Res Health*. 2006;29(4):274–80.

115. Halliwell B, Poulsen HE, Herausgeber. *Cigarette smoke and oxidative stress*. Berlin ; New York: Springer; 2006. 407 S.

116. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB Journal*. August 2002;16(10):1151–62.

117. Jiang B-H, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA Binding, and Transactivation Properties of Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry*. 26. Juli 1996;271(30):17771–8.

118. Semenza GL. Development of novel therapeutic strategies that target HIF-1. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. April 2006;10(2):267–80.

119. Calabrese EJ, Baldwin LA. Hormesis: The Dose-Response Revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. April 2003;43(1):175–97.

120. Lu X, Naidis GV, Laroussi M, Reuter S, Graves DB, Ostrikov K. Reactive species in non-equilibrium atmospheric-pressure plasmas: Generation, transport, and biological effects.

Physics Reports. Mai 2016;630:1–84.

121. Wulf, Dröge. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Januar 2002;Pysiology Review(Vol. 82):47–95.

122. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? Nature Reviews Drug Discovery. Juli 2009;8(7):579–91.

123. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. Januar 2007;39(1):44–84.

124. Nationales Zentrum für Plasmamedizin. Positionspapier zum Risikopotenzial und zu Anwendungsperspektiven von kaltem Atmosphärendruckplasma in der Medizin. 2014.

125. Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S, u. a. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. International Journal of Cancer. 1. Mai 2012;130(9):2185–94.

126. Myburgh KH. Polyphenol Supplementation: Benefits for Exercise Performance or Oxidative Stress? Sports Medicine. Mai 2014;44(S1):57–70.

127. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews. 27. April 2009;56(11):317–33.

128. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med. 1996;20(7):933–56.

129. Leonard SS, Xia C, Jiang B-H, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, u. a. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. Biochemical and Biophysical Research Communications. Oktober 2003;309(4):1017–26.

130. Yashin A, Yashin Y, Wang J, Nemzer B. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. Antioxidants. 15. Oktober 2013;2(4):230–45.

131. Bhat KPL, Pezzuto JM. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol. Annals of the New York Academy of Sciences. Mai 2002;957(1):210–29.

132. Berman AY, Motechin RA, Wiesenfeld MY, Holz MK. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. npj Precision Oncology [Internet]. Dezember 2017

[zitiert 15. August 2019];1(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/s41698-017-0038-6>

133. Morikawa K, Nonaka M, Narahara M, Torii I, Kawaguchi K, Yoshikawa T, u. a. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sciences*. Dezember 2003;74(6):709–21.

134. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry M, Wang S, u. a. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*. 15. März 2016;8(3):167.

135. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*. 2010;8(2):1489.

136. Coelho PG, Giro G, Teixeira HS, Marin C, Witek L, Thompson VP, u. a. Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. Juli 2012;100A(7):1901–6.

137. Daeschlein G, Scholz S, Arnold A, von Podewils S, Haase H, Emmert S, u. a. In Vitro Susceptibility of Important Skin and Wound Pathogens Against Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) and Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBD). *Plasma Processes and Polymers*. April 2012;9(4):380–9.

138. Koban I, Matthes R, Hübner N-O, Welk A, Meisel P, Holtfreter B, u. a. Treatment of *Candida albicans* biofilms with low-temperature plasma induced by dielectric barrier discharge and atmospheric pressure plasma jet. *New Journal of Physics*. 27. Juli 2010;12(7):073039.

139. Zimmermann JL, Dumler K, Shimizu T, Morfill GE, Wolf A, Boxhammer V, u. a. Effects of cold atmospheric plasmas on adenoviruses in solution. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 21. Dezember 2011;44(50):505201.

140. Ehlbeck J, Schnabel U, Polak M, Winter J, von Woedtke T, Brandenburg R, u. a. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 12. Januar 2011;44(1):013002.

141. Morrison, C.F., Jr. Electrosurgical Method and Apparatus for Initiating an Electrical

Discharge in an Inert Gas Flow. 1977.

142. Raiser J, Zenker M. Argon plasma coagulation for open surgical and endoscopic applications: state of the art. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 21. August 2006;39(16):3520–3.
143. Ginsberg GG, Barkun AN, Bosco JJ, Burdick JS, Isenberg GA, Nakao NL, u. a. The argon plasma coagulator February 2002. *Gastrointestinal Endoscopy*. Juni 2002;55(7):807–10.
144. Gherardi M, Tonini R, Colombo V. Plasma in Dentistry: Brief History and Current Status. *Trends in Biotechnology*. Juni 2018;36(6):583–5.
145. Liu D, Xiong Z, Du T, Zhou X, Cao Y, Lu X. Bacterial-killing effect of atmospheric pressure non-equilibrium plasma jet and oral mucosa response. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. Dezember 2011;31(6):852–6.
146. Maisch T, Shimizu T, Isbary G, Heinlin J, Karrer S, Klämpfl TG, u. a. Contact-Free Inactivation of *Candida albicans* Biofilms by Cold Atmospheric Air Plasma. *Applied and Environmental Microbiology*. 15. Juni 2012;78(12):4242–7.
147. Yavirach P, Chaijareenont P, Boonyawan D, Pattamapun K, Tunma S, Takahashi H, u. a. Effects of plasma treatment on the shear bond strength between fiber-reinforced composite posts and resin composite for core build-up. *Dental Materials Journal*. 2009;28(6):686–682.
148. Isbary G, Stolz W, Shimizu T, Monetti R, Bunk W, Schmidt H-U, u. a. Cold atmospheric argon plasma treatment may accelerate wound healing in chronic wounds: Results of an open retrospective randomized controlled study in vivo. *Clinical Plasma Medicine*. Dezember 2013;1(2):25–30.
149. Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, Görlitz A, u. a. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm[®] VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. Januar 2015;29(1):148–55.
150. Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Endothelial Cell Proliferation is Enhanced by Low Dose Non-Thermal Plasma Through Fibroblast Growth Factor-2 Release. *Annals of Biomedical Engineering*. März 2010;38(3):748–57.

151. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li Y-F, u. a. Cold Atmospheric Plasma (CAP) Changes Gene Expression of Key Molecules of the Wound Healing Machinery and Improves Wound Healing In Vitro and In Vivo. Hamblin M, Herausgeber. PLoS ONE. 12. November 2013;8(11):e79325.
152. Kalghatgi SU, Fridman A, Friedman G, Clyne AM. Cell proliferation following non-thermal plasma is related to reactive oxygen species induced fibroblast growth factor-2 release. In: 2009 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society [Internet]. Minneapolis, MN: IEEE; 2009 [zitiert 30. Juli 2019]. S. 6030–3. Verfügbar unter: <http://ieeexplore.ieee.org/document/5333168/>
153. Arjunan KP, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species. Journal of The Royal Society Interface. 7. Januar 2012;9(66):147–57.
154. DIN SPEC 91315:2014-06, Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen [Internet]. Beuth Verlag GmbH; [zitiert 30. Juli 2019]. Verfügbar unter: <https://www.beuth.de/de/-/-/203493369>
155. Kim C-H, Bahn JH, Lee S-H, Kim G-Y, Jun S-I, Lee K, u. a. Induction of cell growth arrest by atmospheric non-thermal plasma in colorectal cancer cells. Journal of Biotechnology. Dezember 2010;150(4):530–8.
156. Barezzi N, Laroussi M. Dose-dependent killing of leukemia cells by low-temperature plasma. Journal of Physics D: Applied Physics. 24. Oktober 2012;45(42):422002.
157. Kim SJ, Chung TH, Bae SH, Leem SH. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet. Appl Phys Lett. 12. Juli 2010;97(2):023702.
158. Tan X, Zhao S, Lei Q, Lu X, He G, Ostrikov K. Single-Cell-Precision Microplasma-Induced Cancer Cell Apoptosis. Yousfi M, Herausgeber. PLoS ONE. 27. Juni 2014;9(6):e101299.
159. Arndt S, Wacker E, Li Y-F, Shimizu T, Thomas HM, Morfill GE, u. a. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. Experimental Dermatology. April 2013;22(4):284–9.
160. Keidar M. Plasma for cancer treatment. Plasma Sources Science and Technology. 20.

Mai 2015;24(3):033001.

161. Volotskova O, Hawley TS, Stepp MA, Keidar M. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. *Scientific Reports* [Internet]. Dezember 2012 [zitiert 12. November 2019];2(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/srep00636>
162. Yan X, Zou F, Zhao S, Lu X, He G, Xiong Z, u. a. On the Mechanism of Plasma Inducing Cell Apoptosis. *IEEE Transactions on Plasma Science*. September 2010;38(9):2451–7.
163. Kalghatgi S, Fridman A, Azizkhan-Clifford J, Friedman G. DNA Damage in Mammalian Cells by Non-thermal Atmospheric Pressure Microsecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Plasma is not Mediated by Ozone. *Plasma Processes and Polymers*. Juli 2012;9(7):726–32.
164. Park S-B, Kim B, Bae H, Lee H, Lee S, Choi EH, u. a. Differential Epigenetic Effects of Atmospheric Cold Plasma on MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. Weisz A, Herausgeber. *PLOS ONE*. 4. Juni 2015;10(6):e0129931.
165. Panngom K, Baik KY, Nam MK, Han JH, Rhim H, Choi EH. Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma. *Cell Death & Disease*. Mai 2013;4(5):e642–e642.
166. Yang J, Wu L-J, Tashino S-I, Onodera S, Ikejima T. Reactive oxygen species and nitric oxide regulate mitochondria-dependent apoptosis and autophagy in evodiamine-treated human cervix carcinoma HeLa cells. *Free Radical Research*. Januar 2008;42(5):492–504.
167. Wiegand C, Fink S, Beier O, Horn K, Pfuch A, Schimanski A, u. a. Dose- and Time-Dependent Cellular Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma Evaluated in 3D Skin Models. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2016;29(5):257–65.
168. Xia J, Zeng W, Xia Y, Wang B, Xu D, Liu D, u. a. Cold atmospheric plasma induces apoptosis of melanoma cells via Sestrin2-mediated nitric oxide synthase signaling. *Journal of Biophotonics*. Januar 2019;12(1):e201800046.
169. Georgescu N, Lupu AR. Tumoral and Normal Cells Treatment With High-Voltage Pulsed Cold Atmospheric Plasma Jets. *IEEE Transactions on Plasma Science*. August 2010;38(8):1949–55.
170. Iseki S, Nakamura K, Hayashi M, Tanaka H, Kondo H, Kajiyama H, u. a. Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma. *Applied Physics Letters*. 12. März 2012;100(11):113702.

171. Ishaq M, Kumar S, Varinli H, Han ZJ, Rider AE, Evans MDM, u. a. Atmospheric gas plasma–induced ROS production activates TNF-ASK1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis. Heldin C-H, Herausgeber. *Molecular Biology of the Cell*. Mai 2014;25(9):1523–31.
172. Lee HJ, Shon CH, Kim YS, Kim S, Kim GC, Kong MG. Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma. *New Journal of Physics*. 26. November 2009;11(11):115026.
173. Zucker SN, Zirnheld J, Bagati A, DiSanto TM, Des Soye B, Wawrzyniak JA, u. a. Preferential induction of apoptotic cell death in melanoma cells as compared with normal keratinocytes using a non-thermal plasma torch. *Cancer Biology & Therapy*. 16. November 2012;13(13):1299–306.
174. Haertel B, Wende K, von Woedtke T, Weltmann KD, Lindequist U. Non-thermal atmospheric-pressure plasma can influence cell adhesion molecules on HaCaT-keratinocytes. *Experimental Dermatology*. März 2011;20(3):282–4.
175. Chang JW, Kang SU, Shin YS, Kim KI, Seo SJ, Yang SS, u. a. Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Inhibits Thyroid Papillary Cancer Cell Invasion via Cytoskeletal Modulation, Altered MMP-2/-9/uPA Activity. Cao J, Herausgeber. *PLoS ONE*. 25. März 2014;9(3):e92198.
176. Keidar M, Yan D, Beilis II, Trink B, Sherman JH. Plasmas for Treating Cancer: Opportunities for Adaptive and Self-Adaptive Approaches. *Trends in Biotechnology*. Juni 2018;36(6):586–93.
177. Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S, u. a. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *British Journal of Cancer*. Oktober 2011;105(9):1295–301.
178. Brullé L, Vandamme M, Riès D, Martel E, Robert E, Lerondel S, u. a. Effects of a Non Thermal Plasma Treatment Alone or in Combination with Gemcitabine in a MIA PaCa2-luc Orthotopic Pancreatic Carcinoma Model. Eaves CJ, Herausgeber. *PLoS ONE*. 26. Dezember 2012;7(12):e52653.
179. Köritzer J, Boxhammer V, Schäfer A, Shimizu T, Klämpfl TG, Li Y-F, u. a. Restoration of Sensitivity in Chemo — Resistant Glioma Cells by Cold Atmospheric Plasma. Lim M, Herausgeber. *PLoS ONE*. 21. Mai 2013;8(5):e64498.

180. Cheng X, Murphy W, Recek N, Yan D, Cvelbar U, Vesel A, u. a. Synergistic effect of gold nanoparticles and cold plasma on glioblastoma cancer therapy. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 20. August 2014;47(33):335402.
181. Kim GC, Kim GJ, Park SR, Jeon SM, Seo HJ, Iza F, u. a. Air plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: a new weapon against cancer. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 7. Februar 2009;42(3):032005.
182. Metelmann H-R, Seebauer C, Miller V, Fridman A, Bauer G, Graves DB, u. a. Clinical experience with cold plasma in the treatment of locally advanced head and neck cancer. *Clinical Plasma Medicine*. März 2018;9:6–13.
183. Isbary G, Köritzer J, Mitra A, Li Y-F, Shimizu T, Schroeder J, u. a. Ex vivo human skin experiments for the evaluation of safety of new cold atmospheric plasma devices. *Clinical Plasma Medicine*. Juni 2013;1(1):36–44.
184. Fluhr JW, Sassning S, Lademann O, Darvin ME, Schanzer S, Kramer A, u. a. In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum: Tissue-tolerable plasma and beta-carotene profile in vivo. *Experimental Dermatology*. Februar 2012;21(2):130–4.
185. Partecke LI, Evert K, Haugk J, Doering F, Normann L, Diedrich S, u. a. Tissue Tolerable Plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC Cancer* [Internet]. Dezember 2012 [zitiert 22. Dezember 2019];12(1). Verfügbar unter: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-473>
186. Ja Kim S, Min Joh H, Chung TH. Production of intracellular reactive oxygen species and change of cell viability induced by atmospheric pressure plasma in normal and cancer cells. *Applied Physics Letters*. 7. Oktober 2013;103(15):153705.
187. Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Sherman JH, Cheng X, Keidar M. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma—A model based on aquaporins (Review). *Biointerphases*. Dezember 2015;10(4):040801.
188. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature Medicine*. Dezember 2005;11(12):1306–13.
189. Yonghao Ma, Ha CS, Hwang SW, Lee HJ, Kim GC, Lee K-W, u. a. Non-Thermal

Atmospheric Pressure Plasma Preferentially Induces Apoptosis in p53-Mutated Cancer Cells by Activating ROS Stress-Response Pathways. Roy S, Herausgeber. PLoS ONE. 23. April 2014;9(4):e91947.

190. Guerrero-Preston R, Ogawa T, Uemura M, Shumulinsky G, Valle BL, Pirini F, u. a. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*. Oktober 2014;34(4):941–6.

191. Tuhvatulin AI, Sysolyatina EV, Scheblyakov DV, Logunov DY, Vasiliev MM, Yurova MA, u. a. Non-thermal Plasma Causes p53-Dependent Apoptosis in Human Colon Carcinoma Cells. *Acta Naturae*. Juli 2012;4(3):82–7.

192. Mariam Naciri, Dowling D, Al-Rubeai M. Differential Sensitivity of Mammalian Cell Lines to Non-Thermal Atmospheric Plasma: Sensitivity of Mammalian Cells to Atmospheric Plasma. *Plasma Processes and Polymers*. April 2014;11(4):391–400.

193. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*. 16. Januar 1995;358(1):1–3.

194. Meyskens FL, McNulty SE, Buckmeier JA, Tohidian NB, Spillane TJ, Kahlon RS, u. a. Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. September 2001;31(6):799–808.

195. Van der Paal J, Verheyen C, Neyts EC, Bogaerts A. Hampering Effect of Cholesterol on the Permeation of Reactive Oxygen Species through Phospholipids Bilayer: Possible Explanation for Plasma Cancer Selectivity. *Scientific Reports* [Internet]. April 2017 [zitiert 22. Dezember 2019];7(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/srep39526>

196. Kim SJ, Chung TH. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Scientific Reports* [Internet]. April 2016 [zitiert 18. März 2019];6(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/srep20332>

197. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*. April 2004;7(2):97–110.

198. Papadopoulos MC, Saadoun S. Key roles of aquaporins in tumor biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. Oktober 2015;1848(10):2576–83.

199. Fortes C, Mastroeni S, Mannooranparampil TJ, Passarelli F, Zappalà A, Annessi G, u. a. Tumor-infiltrating lymphocytes predict cutaneous melanoma survival: *Melanoma Research*.

August 2015;25(4):306–11.

200. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman W-H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. Februar 2010;29(8):1093–102.

201. Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nature Reviews Immunology*. August 2003;3(8):630–41.

202. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*. Januar 2006;6(1):24–37.

203. Achkar T, Tarhini AA. The use of immunotherapy in the treatment of melanoma. *Journal of Hematology & Oncology* [Internet]. Dezember 2017 [zitiert 23. Mai 2019];10(1). Verfügbar unter: <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0458-3>

204. Palumbo MO, Kavan P, Miller WH, Panasci L, Assouline S, Johnson N, u. a. Systemic cancer therapy: achievements and challenges that lie ahead. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2013 [zitiert 7. August 2019];4. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2013.00057/abstract>

205. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, u. a. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*. März 2018;25(3):486–541.

206. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annual Review of Immunology*. 21. März 2013;31(1):51–72.

207. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. Dezember 2012;12(12):860–75.

208. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, u. a. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death: CRT, ATP, and immunogenic cancer cell death. *The EMBO Journal*. 7. März 2012;31(5):1062–79.

209. Unanue E. Antigen-Presenting Function of the Macrophage. *Annual Review of Immunology*. April 1984;2(1):395–428.

210. Miller V, Lin A, Fridman G, Dobrynin D, Fridman A. Plasma Stimulation of Migration of Macrophages: Plasma Stimulation of Migration Plasma Processes and Polymers. Dezember 2014;11(12):1193–7.
211. Lin A, Truong B, Pappas A, Kirifides L, Oubarri A, Chen S, u. a. Uniform Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Plasma Enhances Anti-Tumor Effects by Induction of Immunogenic Cell Death in Tumors and Stimulation of Macrophages: Uniform Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge. Plasma Processes and Polymers. Dezember 2015;12(12):1392–9.
212. Kaushik NK, Kaushik N, Min B, Choi KH, Hong YJ, Miller V, u. a. Cytotoxic macrophage-released tumour necrosis factor-alpha as a killing mechanism for cancer cell death after cold plasma activation. Journal of Physics D: Applied Physics. 2. März 2016;49(8):084001.
213. Bekeschus S, Rödder K, Fregin B, Otto O, Lippert M, Weltmann K-D, u. a. Toxicity and Immunogenicity in Murine Melanoma following Exposure to Physical Plasma-Derived Oxidants. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2017;2017:1–12.
214. Bekeschus S, Mueller A, Miller V, Gaipf U, Weltmann K-D. Physical Plasma Elicits Immunogenic Cancer Cell Death and Mitochondrial Singlet Oxygen. IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences. März 2018;2(2):138–46.
215. Mizuno K, Yonetamari K, Shirakawa Y, Akiyama T, Ono R. Anti-tumor immune response induced by nanosecond pulsed streamer discharge in mice. Journal of Physics D: Applied Physics. 29. März 2017;50(12):12LT01.
216. Lin AG, Xiang B, Merlino DJ, Baybutt TR, Sahu J, Fridman A, u. a. Non-thermal plasma induces immunogenic cell death in-vivo in murine CT26 colorectal tumors. Oncoimmunology. 2. September 2018;7(9):e1484978.
217. Bekeschus S, Rödder K, Schmidt A, Stope MB, von Woedtke T, Miller V, u. a. Cold physical plasma selects for specific T helper cell subsets with distinct cells surface markers in a caspase-dependent and NF- κ B-independent manner. Plasma Processes and Polymers. Dezember 2016;13(12):1144–50.
218. Bekeschus S, Schmidt A, Bethge L, Masur K, von Woedtke T, Hasse S, u. a. Redox Stimulation of Human THP-1 Monocytes in Response to Cold Physical Plasma. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016;2016:1–11.

219. Bekeschus S, von Woedtke T, Kramer A, Weltmann K-D, Masur K. Cold Physical Plasma Treatment Alters Redox Balance in Human Immune Cells. *Plasma Medicine*. 2013;3(4):267–78.
220. Haertel B, Volkmann F, von Woedtke T, Lindequist U. Differential sensitivity of lymphocyte subpopulations to non-thermal atmospheric-pressure plasma. *Immunobiology*. Juni 2012;217(6):628–33.
221. HHF - Heuermann HF-Technik GmbH [Internet]. [zitiert 11. August 2019]. Verfügbar unter: http://www.hhft.de/index.php?page=plasma&subpage=ps_p1e
222. ARC PLUS für ARC 400 / 350 - BOWA [Internet]. [zitiert 11. August 2019]. Verfügbar unter: <https://www.bowa-medical.com/shop/de/arc-elektrochirurgiegeraete/arc-geraete/arc-plus-fuer-arc-400-350.html>
223. Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods*. April 2003;275(1–2):251–5.
224. ECACC General Cell Collection_13012460 Ma-Mel-19.pdf.
225. Pawelec G, Marsh SG. ESTDAB: a collection of immunologically characterised melanoma cell lines and searchable databank. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Juni 2006;55(6):623–7.
226. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 27. November 2013;310(20):2191.
227. Kotecha N, Krutzik PO, Irish JM. Web-based analysis and publication of flow cytometry experiments. *Curr Protoc Cytom*. Juli 2010;Chapter 10:Unit10.17.
228. cDNA Synthesis Kits | Life Science Research | Bio-Rad [Internet]. [zitiert 13. August 2019]. Verfügbar unter: <http://www.bio-rad.com/de-de/category/cdna-synthesis-kits?ID=M87EPGE8Z>
229. Wichtige Informationen zur Real-Time PCR - DE [Internet]. [zitiert 13. August 2019]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>
230. Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie* [Internet]. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011 [zitiert 13. August 2019]. Verfügbar unter:

<https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2647-5>

231. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. Dezember 2001;25(4):402–8.
232. Li W, Yu KN, Ma J, Shen J, Cheng C, Zhou F, u. a. Non-thermal plasma induces mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway via ROS generation in HeLa cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. November 2017;633:68–77.
233. Mokhtari H, Farahmand L, Yaserian K, Jalili N, Majidzadeh-A K. The antiproliferative effects of cold atmospheric plasma-activated media on different cancer cell lines, the implication of ozone as a possible underlying mechanism. *Journal of Cellular Physiology*. Mai 2019;234(5):6778–82.
234. Biscop, Boxem, Backer, Deben, Dewilde, Smits, u. a. Influence of Cell Type and Culture Medium on Determining Cancer Selectivity of Cold Atmospheric Plasma Treatment. *Cancers*. 1. September 2019;11(9):1287.
235. Roesch A, Vultur A, Bogeski I, Wang H, Zimmermann KM, Speicher D, u. a. Overcoming Intrinsic Multidrug Resistance in Melanoma by Blocking the Mitochondrial Respiratory Chain of Slow-Cycling JARID1B^{high} Cells. *Cancer Cell*. Juni 2013;23(6):811–25.
236. Cierlitz M, Chauvistré H, Bogeski I, Zhang X, Hauschild A, Herlyn M, u. a. Mitochondrial oxidative stress as a novel therapeutic target to overcome intrinsic drug resistance in melanoma cell subpopulations. *Experimental Dermatology*. Februar 2015;24(2):155–7.
237. Thiyagarajan M, Anderson H, Gonzales XF. Induction of apoptosis in human myeloid leukemia cells by remote exposure of resistive barrier cold plasma: Cancer Treatment by Resistive Barrier Cold Plasma. *Biotechnology and Bioengineering*. März 2014;111(3):565–74.
238. Bekeschus S, Masur K, Kolata J, Wende K, Schmidt A, Bundscherer L, u. a. Human Mononuclear Cell Survival and Proliferation is Modulated by Cold Atmospheric Plasma Jet: Human Mononuclear Cell Survival and Proliferation. *Plasma Processes and Polymers*. August 2013;10(8):706–13.
239. Movafagh A, Heydary H, Mortazavi-Tabatabaei SA, Azargashb E. The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure. *Iran J Pharm Res*. 2011;10(4):895–903.

240. Bekeschus S, Kolata J, Muller A, Kramer A, Weltmann K-D, Broker B, u. a. Differential Viability of Eight Human Blood Mononuclear Cell Subpopulations After Plasma Treatment. *Plasma Medicine*. 2013;3(1–2):1–13.

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei ... bedanken. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung sowie die Möglichkeit, meine Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen.

Vielen Dank an ... für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein Dankeschön geht auch an die Mitarbeiter des IMBEI für die statistische Beratung.

Besonderer Dank gilt ... und ..., die mich in die Laborwelt eingeführt haben und mir allzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

9 Lebenslauf