

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
(Univ.-Prof. Dr. med. Chia-Jung Busch)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema:

**Evaluation einer miniaturisierten Plasmaquelle zur endoskopbasierten
Tumorthherapie im Kopf-Hals-Bereich**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald

2021

vorgelegt von: Nils Rodenburger
geb. am: 28.06.1991
in: Nordenham

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachterin: Frau Prof. Dr. med. Chia-Jung Busch

2. Gutachter: Herr PD Dr. med. Arne Böttcher

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Klinik für Innere Medizin C (Haus J - Raum J.0.37)

Tag der Disputation: 25. Februar 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich.....	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Risikofaktoren.....	1
1.1.3	Klassifikation.....	2
1.1.4	Diagnostik.....	2
1.1.5	Therapie	2
1.2	Kaltes atmosphärisches Plasma	3
1.2.1	Dielektrische Barriereentladung.....	3
1.2.2	Plasma-Jet	4
1.3	Einsatzmöglichkeiten für kaltes atmosphärisches Plasma.....	4
1.3.1	Industrielle Anwendung	4
1.3.2	Medizinische Anwendung	5
1.3.2.1	Onkologische Anwendung von kaltem atmosphärischen Plasma	5
1.4	Kaltes atmosphärisches Plasma in der Otorhinolaryngologie	6
1.4.1	Kaltes atmosphärisches Plasma zur Behandlung von HNSCC.....	6
1.5	Effekte von kaltem atmosphärischen Plasma auf zellulärer Ebene	7
1.5.1	Intrazelluläre Wirkung von kaltem atmosphärischen Plasma.....	7
1.5.2	Apoptotische Wirkung von kaltem atmosphärischen Plasma	8
1.6	Abschwächung des Effekts von kaltem atmosphärischen Plasma.....	8
1.6.1	Wirkungseinschränkung durch extrazelluläre Bestandteile	8
1.6.2	HSP27 im Fokus der Behandlung mit CAP	9
1.6.3	HSP27 als therapeutisches Ziel und Tumormarker.....	9
2	Zielstellung der Doktorarbeit	11
3	Material	12
3.1	Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	12
3.2	Zelllinien.....	12
3.3	Chemikalien	12
3.4	Lösungen.....	14
3.5	Verbrauchsmaterialien	17
3.6	Geräte	17
3.7	Antikörper.....	18
3.8	Software und Datenbanken.....	18
4	Methoden	19

4.1	Zelllinien und Zellkultivierung.....	19
4.2	Behandlung mit kaltem atmosphärischen Plasma.....	19
4.2.1	Behandlung mit Argon- und Heliumplasma	20
4.3	Wachstumskinetiken	21
4.3.1	Zellzählung.....	22
4.4	Probenaufschluss.....	22
4.5	Proteinbestimmung	23
4.6	2D-SDS-PAGE	23
4.6.1	pH-Wert-Einstellung und Markierung	23
4.6.2	Rehydratisierung und isoelektrische Fokussierung	25
4.6.3	Äquilibration und Gelelektrophorese	26
4.6.4	Färbung und Detektion der Proteine.....	26
4.7	Quantitative Analyse	27
4.8	Proteinidentifizierung.....	27
4.8.1	Massenspektrometrische Analyse.....	28
4.8.1.1	Tryptischer Proteinverdau und MALDI-TOF-MS/MS	28
4.8.1.2	Tryptischer Proteinverdau und nLC-ESI-MS/MS.....	29
4.8.2	Datenbanksuche und Auswertung	30
4.8.2.1	Auswertung der MALDI-TOF-MS/MS.....	30
4.8.2.2	Auswertung der nLC-ESI-MS/MS	30
4.9	Ingenuity Pathway Analyse.....	31
4.10	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
4.10.1	Gesamtproteinmarkierung der Proben.....	32
4.10.2	Gelelektrophorese	32
4.11	Immunoblot	33
4.11.1	Proteintransfer auf PVDF-Membran	33
4.11.2	Proteinnachweis und Quantifizierung.....	34
5	Ergebnisse.....	35
5.1	Mikroskopische Aufnahmen von Epithel- und Karzinomzellen	35
5.1.1	Effekte von CAP auf adhärenente Epithelzellen	35
5.1.2	Effekte von CAP auf adhärenente HNO97-Karzinomzellen	37
5.2	Wachstumskinetiken	39
5.2.1	Wachstumskinetiken von S9-Epithelzellen nach Behandlung mit CAP	39
5.2.2	Wachstumskinetiken von HNO97-Karzinomzellen nach Behandlung mit CAP	39
5.3	Proteinveränderungen nach Behandlung mit CAP	42
5.3.1	Detektion veränderter Proteinexpressionen mittels Delta 2D-Software	42

5.3.2	2D-DIGE: CAP- und serumbedingte Proteinregulationen.....	43
5.3.2.1	CAP- und serumbedingte Proteinveränderungen in S9 Epithelzellen	44
5.3.2.2	CAP- und serumbedingte Effekte in HNO97- und HNO41-Karzinomzellen	47
5.4	Hauptkomponentenanalyse	51
5.4.1	Hauptkomponentenanalyse aller Zelllinien.....	51
5.4.2	Hauptkomponentenanalyse in S9-Epithelzellen.....	53
5.4.3	Hauptkomponentenanalyse in HNO97-Karzinomzellen.....	55
5.4.4	Hauptkomponentenanalyse in HNO41-Karzinomzellen.....	55
5.5	Hierarchisches Clustering regulierter Proteine.....	58
5.6	Proteinidentifikation.....	59
5.6.1	Proteinidentifikation mittels Maldi-TOF-MS/MS.....	59
5.6.2	Proteinidentifikation mittels nLC-ESI-MS/MS	63
5.7	Proteinkategorisierung mittels <i>PANTHER Protein Classification System</i>	64
5.7.1	Einordnung veränderter Proteine nach molekularer Funktion	64
5.7.2	Überschneidungsmengen veränderter Proteine	66
5.7.3	Proteine in Schnittpunkten.....	67
5.8	Ingenuity Pathway Analysis	68
5.8.1	Regulatorproteine	68
5.8.2	Involvierte Signalwege, Funktionen und Toxizität.....	70
5.8.3	Netzwerkanalyse	72
5.8.3.1	Netzwerkanalyse von Epithelzellen und Karzinomzellen.	72
5.9	Nachweis von HSP27 und GAPDH in Epithel- und Karzinomzellen.....	76
5.9.1	Quantifizierung von HSP27 und GAPDH mittels Immunoblot.....	77
5.9.1.1	HSP27- und GAPDH-Quantifizierung in S9-Epithelzellen	77
5.9.1.2	HSP27- und GAPDH-Quantifizierung in HNO97-Karzinomzellen	79
5.9.1.3	HSP27- und GAPDH-Quantifizierung in HNO41-Karzinomzellen	82
5.10	Spezifisch veränderte Proteine nach selektiver Analyse in Delta 2D.....	83
5.10.1	Zelllinienspezifische Proteinveränderungen	84
5.10.2	Serumspezifische Proteinveränderungen	85
6	Diskussion	86
6.1	Physikalische Effekte von CAP	86
6.1.1	Quellgasbedingte Unterschiede von CAP	87
6.1.2	Applikationsdauerabhängige Wirkung von CAP	88
6.2	Wirkmechanismus von CAP auf Epithel- und Karzinomzellen	89
6.2.1	Wirkung von CAP auf S9-Epithelzellen	90
6.2.2	Wirkung von CAP auf HNO97- und HNO41-Karzinomzellen.....	93

6.3	Einfluss des Serums auf die CAP-Behandlung.....	96
6.3.1	Einfluss von Albumin auf die Effektivität von CAP.....	99
6.4	Regulation von Hitzeschockproteinen durch CAP	100
6.4.1	Hitzeschockproteine in S9-Epithelzellen	102
6.4.2	Hitzeschockproteine in Karzinomzellen	103
6.4.3	HSP27 als potenzielles Therapieziel	104
6.5	Funktion von GAPDH unter oxidativem Stress	105
6.6	Identifikation weiterer Zielproteine	106
6.6.1	Calmodulin-like Protein 3 und 5	107
6.7	Kritische Aspekte der Arbeit	107
6.8	Möglichkeiten des Transfers in die angewandte Medizin	108
7	Zusammenfassung	110
8	Quellenverzeichnis.....	111
9	Anhang.....	122
9.1	Tabellarische Darstellung der Identifikationen durch nESI-LC-MS/MS und Darstellung humaner Proteine in Delta 2D	122
9.2	IPA-Netzwerke von S9-, HNO97- und HNO41-Zellen	153
9.2.1	IPA-Netzwerke von S9-Epithelzellen	153
9.2.2	IPA-Netzwerke von HNO97-Karzinomzellen.....	156
9.2.3	IPA-Netzwerke von HNO41-Karzinomzelle.....	159
9.3	PCA aller Zelllinien, Kombination aller Komponenten.....	160
9.3.1	PCA von S9-Epithelzellen	164
9.3.2	PCA von HNO97-Karzinomzellen	167
9.3.3	PCA von HNO41-Karzinomzellen	170

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikroskopische Aufnahmen von S9-Epithelzellen	20
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Plasmaquellen, der verwendeten Geräte und der meanderförmigen Behandlung	21
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Reaktion von N-Ethylmaleimide	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung: 2D-DIGE	25
Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahmen von CAP-behandelten S9-Epithelzellen	36
Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahmen von CAP-behandelten HNO97-Karzinomzellen....	38
Abbildung 7: Wachstumskintetiken für S9-Epithelzellen.....	40
Abbildung 8: Wachstumskintetiken für HNO97-Karzinomzellen	41
Abbildung 9: Fusionsgel aller Proben zur Spotdetektion	42
Abbildung 10: Overlays von S9-Epithelzellen mit Gegenüberstellung der CAP-behandelten Proben und ihren entsprechenden Gaskontrollen	45
Abbildung 11: Overlays von S9-Epithelzellen mit Gegenüberstellung der Seren FCS und NTA unter gleicher Behandlungsform	46
Abbildung 12: Overlays von HNO97-Karzinomzellen mit Gegenüberstellung der CAP-behandelten Proben und ihren entsprechenden Gaskontrollen	48
Abbildung 13: Overlays von HNO97-Karzinomzellen mit Gegenüberstellung der Seren FCS und NTA unter gleicher Behandlungsform.....	49
Abbildung 14: Overlays von HNO41-Karzinomzellen.....	50
Abbildung 15: PCA aller Proben mit Darstellung der Komponenten 1 bis 3	52
Abbildung 16: PCA der S9-Epithelzellen mit Darstellung der Komponenten 1 bis 3	54
Abbildung 17: PCA der HNO97-Karzinomzellen mit Darstellung der Komponenten 1 bis 3...	56
Abbildung 18: PCA der HNO41-Karzinomzellen mit Darstellung der Komponenten 1 bis 3...	57
Abbildung 19: Hierarchisches Cluster über alle Proben.....	58
Abbildung 20: Proteinidentifikationen der MalDI-TOF-MS/MS	60
Abbildung 21: Klassifikation nach PANTHER Protein Classification System.....	65
Abbildung 22: Überschneidungen in ihrer Menge veränderter humaner Proteine	66
Abbildung 23: Netzwerk von S9 nach Ar-CAP und Kultivierung mit FCS.....	73
Abbildung 24: Netzwerk von HNO97 nach Ar-CAP und Kultivierung mit FCS.....	74
Abbildung 25: Netzwerk von HNO41 nach Ar-CAP und Kultivierung mit FCS.....	75
Abbildung 26: Spotposition von HSP27	76

Abbildung 27: Nachweis des Gesamtproteins, HSP27 und GAPDH	77
Abbildung 28: Quantifizierung von HSP27 in S9	78
Abbildung 29: Quantifizierung von GAPDH in S9.....	79
Abbildung 30: Quantifizierung von HSP27 in HNO97	80
Abbildung 31: Quantifizierung von GAPDH in HNO97	81
Abbildung 32: Quantifizierung von HSP27 und GAPDH in HNO41.....	82
Abbildung 33: Selektive Proteinveränderungen.	83
Abbildung 34: Prozentuales Spotvolumen zelllinienspezifischer Proteine	84
Abbildung 35: Prozentuales Spotvolumen serumspezifischer Proteine	85
Abbildung 36: Überschneidungsmengen boviner und humaner Proteinidentifikationen.....	88
Abbildung 37: Zusammenfassung CAP-regulierter Proteine und ihre Relation zum MAPK-ERK- Pathway	96
Abbildung 38: Overlay von S9-Epithelzellen nach Behandlung mit Ar-CAP zur exemplarischen Darstellung der Unterschiede zwischen FCS und NTA	97
Abbildung 39: Überschneidungsmengen veränderter Proteine, Differenzierung der verwendeten Seren FCS und NTA	98
Abbildung 40: Einfluss von oxidativen Stress auf Hitzeschockproteine.....	102
Abbildung 41: Frühe und späte Effekte von oxidativen Stress auf Hitzeschockproteine	103
Abbildung 42: Funktion von GAPDH unter oxidativem Stress	105
Abbildung 43: Darstellung identifizierter Proteinspots mittels UniProt-ID auf Overlays von S9- Epithelzellen nach Behandlung mit Ar-CAP in Delta 2D.....	148
Abbildung 44: Darstellung identifizierter Proteinspots mittels UniProt-ID auf Overlays von S9- Epithelzellen nach Behandlung mit He-CAP in Delta 2D	149
Abbildung 45: Darstellung identifizierter Proteinspots mittels UniProt-ID auf Overlays von HNO97-Karzinomzellen nach Behandlung mit Ar-CAP in Delta 2D.....	150
Abbildung 46: Darstellung identifizierter Proteinspots mittels UniProt-ID auf Overlays von HNO97-Karzinomzellen nach Behandlung mit He-CAP in Delta 2D	151
Abbildung 47: Darstellung identifizierter Proteinspots mittels UniProt-ID auf Overlays von HNO41-Karzinomzellen nach Behandlung mit Ar-CAP in Delta 2D.....	152
Abbildung 48: Netzwerk von S9-Epithelzellen nach Behandlung mit Heliumplasma und Kultivierung mit FCS.....	153

Abbildung 49: Netzwerk von S9-Epithelzellen nach Argonplasmabehandlung und Kultivierung mit NTA	154
Abbildung 50: Netzwerk von S9-Epithelzellen nach Heliumplasmabehandlung und Kultivierung mit NTA	155
Abbildung 51: Netzwerk von HNO97-Karzinomzellen nach Heliumplasmabehandlung und Kultivierung mit FCS.....	156
Abbildung 52: Netzwerk von HNO97-Karzinomzellen nach Behandlung mit Heliumplasma und Kultivierung mit NTA.....	157
Abbildung 53: Netzwerk von HNO97-Karzinomzellen nach Argonplasmabehandlung und Kultivierung mit NTA.....	158
Abbildung 54: Netzwerk von HNO41-Karzinomzellen nach Behandlung mit Argonplasma und Kultivierung mit NTA.....	159
Abbildung 55: Euklidisches Cluster der PCA	160
Abbildung 56: PCA aller Zelllinien mit Auftragung von Komponente 1 gegen 2.....	161
Abbildung 57: PCA aller Zelllinien mit Auftragung der Komponente 1 gegen 3	162
Abbildung 58: PCA aller Zelllinien mit Auftragung der Komponente 2 gegen 3	163
Abbildung 59: PCA von S9 mit Auftragung der Komponente 1 gegen 2	164
Abbildung 60: PCA von S9 mit Auftragung der Komponente 1 gegen 3	165
Abbildung 61: PCA von S9 mit Auftragung der Komponente 2 gegen 3	166
Abbildung 62: PCA von HNO97 mit Auftragung der Komponente 1 gegen 2	167
Abbildung 63: PCA von HNO97 mit Auftragung der Komponente 1 gegen 3	168
Abbildung 64: PCA von HNO97 mit Auftragung der Komponente 2 gegen 3	169
Abbildung 65: PCA von HNO41 mit Auftragung der Komponente 1 gegen 2.	170
Abbildung 66: PCA von HNO41 mit Auftragung der Komponente 1 gegen 3	171
Abbildung 67: PCA von HNO41 mit Auftragung der Komponente 2 gegen 3	172

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Medien und Lösungen in der Zellkultur.....	12
Tabelle 2: Verwendte Zelllinien.	12
Tabelle 3: Verwendte Chemikalien.	12
Tabelle 4: Zusammensetzung des 10%igen APS	14
Tabelle 5: Zusammensetzung des Trenngelpuffers; pH 8,8.....	14
Tabelle 6: Zusammensetzung des Sammelgelpuffers; pH 6,8	14
Tabelle 7: Zusammensetzung des 10x Laufpuffers; pH 8,3.....	14
Tabelle 8: Zusammensetzung des 1x Laufpuffers, pH 8,3.....	14
Tabelle 9: Zusammensetzung des 10x Transferpuffers; pH 8,5	14
Tabelle 10: Zusammensetzung des 1x Transferpuffers; pH 8,5	15
Tabelle 11: Zusammensetzung von 10x PBS; pH 7,4.....	15
Tabelle 12: Zusammensetzung von 1x PBS-T.....	15
Tabelle 13: Zusammensetzung von 10x TBS; pH 7,6.....	15
Tabelle 14: Zusammensetzung von 1x TBS-T	15
Tabelle 15: Zusammensetzung der Fixierungslösung für die Coomassiefärbung	15
Tabelle 16: Zusammensetzung der Coomassiefärbung	15
Tabelle 17: Zusammensetzung der Blockingpufferlösung	16
Tabelle 18: Zusammensetzung von 1x UT (+/- NEM).....	16
Tabelle 19: Zusammensetzung des 10x Rehydratisierungspuffers; pH 4-7	16
Tabelle 20: Zusammensetzung der Äquilibrierungslösung	16
Tabelle 21: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	17
Tabelle 22: Verwendete Geräte.....	17
Tabelle 23: Verwendete Antikörper.....	18
Tabelle 24: Software	18
Tabelle 25: Zusammensetzung der Medien.....	19
Tabelle 26: Übersicht über die Behandlung mit CAP.....	20
Tabelle 27: Einstellungen am CASY Cell Counter® für S9 und HNO97	22
Tabelle 28: Eichkurve mit BSA zur Bestimmung der Proteinmengen im Probenmaterial.	23
Tabelle 29: Übersicht über die 2D-Gele und dem aufgetragenen Probenmaterial	24
Tabelle 30: Zusammensetzung großer Gele (2D-PAGE), 12,5 %, 1 mm	26
Tabelle 31: Farbstoffspezifische Einstellungen für den Laserscanner Typhoon 9400	26

Tabelle 32: Zusammensetzung des Sammelgels, 5%, 1mm.....	33
Tabelle 33: Zusammensetzung des Trenngels, 12,5 %, 1 mm	33
Tabelle 34: Antikörper mit entsprechender Verdünnung und Inkubationsparameter.....	34
Tabelle 35: Übersicht über die angefertigten Wachstumskinetiken	39
Tabelle 36: Gesamtübersicht der Spotdetektionen in Delta 2D	43
Tabelle 37: Prozentueller Anteil der Hauptkomponenten 1 bis 3 an der Gesamtvarianz	51
Tabelle 38: Proteinidentifikationen detektiert durch die Maldi-TOF-MS/MS	61
Tabelle 39: Anzahl der identifizierten Proteine in der nLC-ESI-MS/MS.	63
Tabelle 40: Proteinidentifikationen nach PANTHER Protein Classification System	64
Tabelle 41: Detaillierte Auflistung humaner Proteine in den Schnittmengen zwischen allen Zelllinien und HNO97- und HNO41-Karzinomzellen	67
Tabelle 42: Regulatorproteine nach IPA aufgeteilt nach Behandlungsform.....	69
Tabelle 43: Übersicht über die Top 3 der hauptsächlich betroffene Signalwege, molekularen/zellulären Funktionen und Top Tox Listen	71
Tabelle 44: Proteinspots mit Nachweis von HSP27 und GAPDH.....	76
Tabelle 45: Identifizierte Proteine in der LC-MS	122

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
A1AT	α -1-Antitrypsin
ALB	Albumin
APC	<i>Argon Plasma Coagulation</i>
APPJ	<i>Atmospheric Pressure Plasma Jet</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Ar	Argon
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CALL3	<i>Calmodulin-like protein 3</i>
CALL5	<i>Calmodulin-like protein 5</i>
CAP	<i>Cold atmospheric plasma</i>
cm	Zentimeter (10^{-2} Meter)
CRK	<i>Adapter Molekül CRK</i>
CT	Computertomographie
Cys	Cystein
Cyt c	Cytochrom c
DBD	<i>Dielectric barrier discharge</i> , Dielektrische Barriereentladung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
eNOS	Epitheliale Stickstoffmonoxidsynthetase
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESI	Elektrosprayionisierung
Exp.	Expressionsfaktor
<i>fc</i> -Wert	<i>Fold Change</i> -Wert
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDG-PET/CT	Fluordesoxyglukose-Positronenemissionstomographie/ Computertomographie
FE-DBD	<i>Floating Electrode – Dielectric Barrier Discharge</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
He	Helium
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Cancer</i>
HPC	<i>Helium Plasma Coagulation</i>
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horseradish peroxidase
HSA	Humanes Serumalbumin
HSE	Hitzeschockelement
HSF1	<i>Heat Shock Factor 1</i>

HSP	Hitzeschockprotein
IAA	Iodacetamid
ICD	<i>International Classification of Disease</i>
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
JNK	c-Jun n-terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
kVpp.	Kilovolt peak
LC-MS	Flüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
M	Mol
mA	Milliampere
MALDI-TOF-MS	Matrixunterstützte Laserdesorptions-/ Ionisationsmassenspektrometrie mit Flugzeitanalyse
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MEKK3	<i>MAP kinase/ERK kinase kinase 3</i>
MHz	Megahertz
MK	MAPK-aktivierte Proteinkinasen
mm	Millimeter (10^{-3} Meter)
mM	Millimol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistente Staphylococcus aureus
NEAA	<i>Non-essential Amino Acids</i>
NEM	N-Ethylmaleimide
nm	Nanometer (10^{-6} Meter)
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
NP1L2	<i>Nucleosome assembly protein 1-like 2</i>
NRF2	<i>Nuclear Respiratory Factor 2</i>
NTA	Panexin NTA
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> , Hauptkomponentenanalyse
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PK	Proteinkinase
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
RONS	<i>Reactive Oxygen and Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S/N	<i>Signal-to-Noise-Verhältnis</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Ser	Serin
siRNA	<i>small interfering Ribonucleid Acid</i>
slm	Standardliter pro Minute
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure

TGFB	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Thr	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
U/Min.	Umdrehungen pro Minute
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
UT	Urea Thiourea
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDAC	<i>Voltage-dependent anion channel</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Vh	Voltstunden
W	Watt
x g	Multiplikation mit der relativen Zentrifugalkraft
XCorr	Kreuzkorrelationswert
XRCC5	<i>X-ray repair cross-complementing protein 5</i>
XRCC6	<i>X-ray repair cross-complementing protein 6</i>
μ	10 ⁻⁶

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

1.1.1 Epidemiologie

Die Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs (ICD-10: C00-C14, C30-C32) bilden die sechsthäufigste Tumorentität weltweit. 2016 wurden in Deutschland ca. 19.000 neue Diagnosen gestellt. Die Inzidenz lag 2016 bei 22,7 pro 100.000 Einwohnern mit einer 5-Jahresprävalenz von 73 pro 100.000 Einwohnern. Dabei erkrankten zwei- bis dreimal mehr Männer als Frauen und zunehmend auch junge Menschen. Die Mortalität ist mit 8,7 pro 100.000 Einwohnern im Jahr 2016 in Deutschland angegeben [1]. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt, vergleichbar mit internationalen Angaben, bei Anwendung derzeitiger therapeutischer Möglichkeiten bei etwa 50 % [2]. Gründe hierfür sind neben Metastasen häufig therapieresistente Lokalrezidive. Über 90 % der Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich entfallen auf Plattenepithelkarzinome (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, HNSCC) [3].

1.1.2 Risikofaktoren

Zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von HNSCCs zählen chronischer Tabakkonsum und übermäßiger Genuss von Alkohol. Der Alkoholkonsum ist in der Population der Erkrankten 4- bis 13-mal höher als in der Normalbevölkerung [4]. Besteht zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein Nikotin- und/oder Alkoholabusus verschlechtert sich die Lebenserwartung. Das gleiche gilt für eine positive Familienanamnese bezüglich Tumorerkrankungen [5]. Die zunehmende Erkrankung junger Menschen resultiert aus einer vermehrten Durchseuchung mit humanen Papillomaviren (HPV). Durch das in der Regel gute Ansprechen auf Chemo-, Radiochemo- und Radiotherapie hat das HPV-positive HNSCC eine vergleichsweise gute Prognose [6]. Die Karzinogenese im Bereich des Nasopharynx ist mit einer Infektion mit Epstein-Barr-Viren (EBV) assoziiert. Potenziert wird das Erkrankungsrisiko durch schlechte Mundhygiene oder durch Exposition gegenüber Lösungsmitteln und Holzstaub. Verschiedene Kohortenstudien zeigten den negativen Einfluss eines niedrigen sozioökonomischen Status, geringen Bildungsgrades und einer Kachexie auf die Überlebensrate [7-9].

1.1.3 Klassifikation

Nach Lokalisation des Primärtumors werden die Karzinome der Nasenhaupt- bzw. den Nasennebenhöhlen (Cavitas nasi bzw. Sinus paranasales), der Mundhöhle (Cavitas oris), dem Rachen (Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx) oder dem Kehlkopf (Larynx) zugeordnet. Die Klassifikation des Tumorstadiums erfolgt durch die TNM-Klassifikation entsprechend der Größe des Primärtumors, lymphogener Metastasierung und Fernmetastasen in 4 Stadien. Die Stadien I und II gelten als früh, III und IV als fortgeschritten. Die Einteilung wird durch die histopathologische Bestimmung des Differenzierungsgrades der Zellen von hochgradig differenziert (G1) bis undifferenziert (G4) ergänzt [10].

1.1.4 Diagnostik

Obwohl sich Plattenepithelkarzinome in der HNO an prädisponierten Stellen befinden, werden sie häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Bis zu diesem Zeitpunkt sind Patienten asymptomatisch oder die Symptomatik kann nicht eindeutig einer malignen Erkrankung zugeordnet werden. Die Patienten leiden vornehmlich an Heiserkeit, einer Schmerzempfindlichkeit der Schleimhaut oder Dysphagien. Es kann zu Blutungen und bei Arrosion des Knochens in der Mundhöhle, zur Lockerung der Zähne im Zahnhalteapparat kommen. Bei Untersuchung der betroffenen Areale können Ulzerationen oder eine palpable Lymphadenopathie auffallen [11].

Um die Ausdehnung des Lokalbefundes und eine mögliche Invasion von Lymphknoten abzuklären gelten die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) als Methode der Wahl. Der Lymphknotenstatus wird vom Kopf bis zur oberen Apertur geprüft und unter Umständen durch eine Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie (FDG-PET/CT) ergänzt. Eine Computertomographie von Kopf, Thorax, Abdomen und Becken dient dem Ausschluss einer Fernmetastasierung. Eine Biopsie aus dem Randbereich des Tumors ermöglicht die genaue Klassifikation [12, 13].

1.1.5 Therapie

Zur Behandlung der HNSCC werden die Mittel der Chirurgie, Systemtherapie und Radiotherapie in Abhängigkeit vom Tumorstadium und einer möglichen Metastasierung ausgeschöpft. Die Limitationen der Chirurgie liegen häufig in den anatomischen Verhältnissen, der Erreichbarkeit des Areals und der Möglichkeit einer Resektion in sano (R0). Eine Nachresektion und

eine elektive Ausräumung der regionalen Lymphknoten sind möglich. Die Entscheidung über die Wahl der Therapie wird unter Berücksichtigung der Lebensqualität, der Nebenwirkungen und der Erfolgswahrscheinlichkeit getroffen [12].

Die hohen Fallzahlen der Malignome in Deutschland und die damit verbundene Letalität rücken die Erkrankung in den Fokus aktueller Forschungen. Innovative Behandlungsformen sollen helfen, die Prognose der Erkrankung zu verbessern. Eines der Verfahren ist die Applikation von kaltem atmosphärischen Plasma (*Cold atmospheric plasma, CAP*).

1.2 Kaltes atmosphärisches Plasma

Plasma wird in der Physik als vierter Aggregatzustand beschrieben. Neben flüssig, gasförmig und fest stellt Plasma den Zustand des vollständig oder partiell ionisierten Gases dar. Es wird vermutet, dass ein Großteil der Materie des Kosmos aus Plasma besteht.

Man unterscheidet zwei Arten von Plasma, thermales Plasma und CAP. Thermales Plasma findet beispielsweise bei verschiedenen Verfahren der Elektrochirurgie Anwendung und erzeugt Temperaturen von bis zu 3000°C. Breite Verwendung findet die Plasma-Koagulation mit Argon oder Helium (*APC, HPC*), die unter anderem eine blutungsstillende und gewebeabtragende Wirkung hat [14, 15].

CAP entsteht bei einer partiellen Ionisierung des Gases, die zu einer nahezu konstanten Temperatur zwischen 37 °C und 42 °C führt [16]. Um es zu charakterisieren nutzten Balzer et al. ein optisches Emissionsspektrometer mit einer spektralen Auflösung von 1,3 nm in einem Wellenlängenbereich von 200 - 800 nm. Sie quantifizierten die Bestandteile UV-A, UV-B, Ozon, Stickstoffoxide (NO und NO₂), die Gastemperatur und die Elektronendichte [17]. Interaktionen zwischen CAP und umliegenden Gasgemischen oder Medien lassen reaktive Moleküle entstehen. Neben Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wurden die Effekte von Hydroxid-Ionen (OH⁻), Oxid-Ionen (O₂⁻), Nitrit-Ionen (NO₂⁻) und Nitrat-Ionen (NO₃⁻) beschrieben [18-23]. Diese werden als reaktive Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen and nitrogen species, RONS*) zusammengefasst. Die Behandlung mit CAP gilt im Hinblick auf eine potenzielle Mutagenität bei limitierter Behandlungszeit nach bisherigem Kenntnisstand als unbedenklich [24].

1.2.1 Dielektrische Barriereentladung

Kaltes atmosphärisches Plasma wird in der medizinischen Forschung auf verschiedene Arten generiert. Bei der dielektrischen Barriereentladung (*dielectric barrier discharge, DBD*) wird ein

Gas zwischen zwei Elektroden bei ausreichender Wechselspannung und Feldstärke ionisiert. Die Eigenschaften des Plasmas sind von der applizierten Spannung, der Distanz zwischen den beiden Elektroden und dem Elektrodenmaterial abhängig [25]. Eine Weiterentwicklung der dielektrischen Barriereentladung bildet die FE-DBD (*floating electrode dielectric barrier discharge*), bei der die zweite Elektrode nicht fest ist, sondern aus einem aktiven Medium, z.B. Haut, bestehen kann. Die geladene Elektrode muss dabei unmittelbar (< 3 mm) an die zu behandelnde „Elektrode“ reichen [26]. DBE-Plasma gilt als direkte Plasmaquelle, da Kontakt zur Oberfläche besteht.

1.2.2 Plasma-Jet

Als indirekte Plasmaquelle gilt der *atmospheric pressure plasma jet* (APPJ). Hier bilden zwei co-axiale Elektroden einen Hohlraum, in den ein Gas (Sauerstoff, Helium, Argon, Stickstoffoxide oder ein Gemisch aus Helium und Sauerstoff) mit hoher Durchflussrate geleitet wird. Durch die Entladung an der zentralen Elektrode entsteht ein Plasma-Jet am entgegengesetzten Ende zur Gaseinleitung. Dieser kann in Abhängigkeit vom Gasfluss und der applizierten Spannung mehrere Zentimeter lang sein. Die Temperatur des erzeugten Plasmas bleibt bei Raumtemperatur stabil und beträgt für den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten APPJ mit der Bezeichnung kINPen 09 an der Spitze des Jets ca. 30 °C [24, 27]. Nach Daeschlein et al. zeigten sich in dermatologischen Anwendungen keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung zwischen dielektrischer Barriereentladung und APPJ [28].

1.3 Einsatzmöglichkeiten für kaltes atmosphärisches Plasma

Die Innovation von CAP eröffnet in vielen Bereichen ein weites Feld von Anwendungsmöglichkeiten. Ansätze bieten die moderne Medizin und eine industrielle Verwendung.

1.3.1 Industrielle Anwendung

CAP wird in der Industrie zu Dekontaminations- und Oberflächenmodulationszwecken angewendet. Hervorzuheben sind zahlreiche Versuche zur Oberflächendekontamination in der Lebensmittelindustrie und Medizintechnik. Hier gelingt es der Methode sowohl Sporen als auch internalisierte Bakterien, wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, zu beseitigen. Ebenso wird die bakterielle Last durch *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* oder *Staphylococcus aureus* signifikant vermindert [29-33]. Zu Modulationszwecken wird die Oberfläche von Kunststoffen

CAP ausgesetzt, um beispielweise die Adhärenz von Zellen an Zellkulturflaschen zu verbessern [34].

1.3.2 Medizinische Anwendung

In der Medizin beschäftigen sich viele Arbeitsgruppen mit kaltem atmosphärischen Plasma, um mögliche neue Anwendungsgebiete zu erproben. In der Zahnmedizin steht neben der dekontaminierenden Fähigkeit des CAP die Induktion des Wachstums von gingivalen Fibroblasten im Fokus. Kwon et al. zeigten durch die Behandlung von gingivalen Fibroblasten mit CAP eine Erhöhung der mRNA für die Expression von Wachstumsfaktoren, wie *Transforming growth factor-β* (TGFB) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) [16, 35]. Delben et al. konnten im *in vitro*-Versuch eine signifikante Verminderung der *Candida albicans*-Besiedelung nachweisen [36].

Dieser Effekt wird in der Dermatologie bei schlecht heilenden oder infizierten Wunden genutzt. Häufig führen Infektionen mit Hautkeimen, wie *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa* zur Chronifizierung von Wunden. Die Resistenzlage ist für viele pathogene Erreger kompliziert. Durch CAP konnte eine verbesserte Wundheilung bei Infektion mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus-aureus*-Stämmen (MRSA) gezeigt werden [37, 38]. Eine zusätzliche Reduzierung der Pilz- und bakteriellen Besiedelung gilt als erfolgversprechend [39]. Der limitierende Faktor scheint aktuell die Wundgröße zu sein [40]. So fand CAP in Form des zugelassenen Medizinprodukts kINPen® MED bereits den Weg in die klinische Anwendung mit Zulassung zur Behandlung von chronischen Wunden und erregerbedingten Erkrankungen der Haut [41, 42]. Langzeitergebnisse für eine Plasmaanwendung liegen noch nicht in ausreichendem Maß vor [43].

1.3.2.1 Onkologische Anwendung von kaltem atmosphärischen Plasma

Neoplasien unterschiedlicher Entitäten zeigen auf eine Behandlung mit CAP hin eine Reduzierung der Zellproliferation, Adhäsion und Migration und eine gesteigerte Apoptose [44]. Die antineoplastischen Eigenschaften machen CAP attraktiv für die Verwendung in der Onkologie. Viele *in vitro*-Modelle machen die Generierung der RONS und den resultierenden oxidativen Stress für diese Wirkung verantwortlich.

Es konnte anhand von Versuchen an Melanomen, Prostatakarzinomen, Glioblastomen und Mammakarzinomen gezeigt werden, dass die Effekte des Plasmas abhängig von der

Behandlungsdauer sind [18, 19, 45]. Zu einer signifikanten Reduktion der Tumorzelllast kam es *in vitro* teilweise erst nach 2,83 s/cm² (150s/53cm²) Behandlungsdauer [20]. Walk et al. konnten mit der Behandlung von Neuroblastomen mittels CAP in Mäusen annähernd eine Verdoppelung der Überlebenszeit erreichen [46].

1.4 Kaltes atmosphärisches Plasma in der Otorhinolaryngologie

Bisher ist mit dem kINPen[®] MED lediglich eine Plasmaquelle für die Behandlung von äußerlich zugänglichen Geweben auf dem Markt verfügbar. Für die Verwendung von CAP in Kavitäten ist eine Miniaturisierung der Plasmaquelle notwendig. Die Erkenntnisse in der Behandlung von Wunden aus der Dermatologie konnten Lendeckel et al. bereits *in vitro* auf ein respiratorisches Epithel übertragen [47]. Dabei zeigte sich nach Stimulation mit CAP eine Induktion des Wachstums des respiratorischen Epithels bis zum Wundverschluss. Im Vergleich dazu benötigten unbehandelte Kontrollwunden signifikant länger bis zum vollständigen Wundverschluss [42, 47-49].

Pathogene Keime stellen auch in der HNO ein Problem dar. CAP könnte aufgrund der dekontaminierenden Eigenschaften eine zusätzliche Möglichkeit zur Behandlung von Candidosen und Aspergillosen darstellen [36, 50]. Auch die Behandlung von MRSA-Stämmen innerhalb der Nase ist ein Ziel [37-39].

Ein praktischer Ansatz für CAP wurde in der Behandlung des Eagle-Syndroms¹ bereits umgesetzt. Mit einer plasmaassistierten Operation ergaben sich im Vergleich zur alleinigen operativen Therapie Vorteile in der Operationszeit, postoperativen Blutungen und Schmerzen [51]. Aufgrund der antineoplastischen Eigenschaften sind auch HNSCCs Gegenstand aktueller Forschung.

1.4.1 Kaltes atmosphärisches Plasma zur Behandlung von HNSCC

In HNSCCs besteht durch eine Aktivierung von Redoxsystemen aufgrund eines erhöhten Grundumsatzes und gesteigerter Proliferation eine optimierte Anpassung an RONS [52]. Erste Ansätze der *in vitro*-Behandlung mit CAP zeigten neben einer Reduktion der Tumormasse eine Abhängigkeit des Ansprechens vom Mutationsstatus der entarteten Zellen [53-55]. Ein

¹ Symptomkomplex aus Dysphagie, unspezifischen Gesichtsschmerzen und Schmerzen bei Kopfwendung durch ein überlanges Styloid oder Kalzifizierung des Lig. stylohyoideum

Versuchsansatz mit Kombinationstherapie aus CAP und einem monoklonalen Antikörper gegen eine Rezeptor-Tyrosinkinase (EGFR) resultierte in einer Abnahme der Invasionstiefe der Krebszellen [56]. CAP bietet sich somit als Behandlungsoption bei HNSCCs an.

Problematisch bleibt der Umgang mit intrakavitären Erkrankungen, da bisherige Applikationsformen der Plasmageräte vorrangig aufgrund der Größe und der benötigten Spannung nicht für die endoskopische Anwendung in Betracht kommen. Gegenstand dieser Arbeit ist die Prüfung, ob eine Miniaturisierung der Plasmaquelle für eine Anwendung im HNO-Bereich möglich ist.

1.5 Effekte von kaltem atmosphärischen Plasma auf zellulärer Ebene

Die Konzentration der durch CAP generierten RONS ist abhängig von zahlreichen Faktoren. Dazu gehören unter anderem die Gasflussrate, das verwendete Trägergas, die Applikationsdauer und die angelegte Spannung [57]. Okazaki et al. machen die Generierung von UV-Strahlung für die Effekte des Plasmas mitverantwortlich [58]. Durch neuere Geräte mit Glaskapillare werden die Effekte der UV-Strahlung, beispielsweise eine Erhöhung der Mutationsrate durch Schädigung der Basen der DNS, minimiert [59].

1.5.1 Intrazelluläre Wirkung von kaltem atmosphärischen Plasma

Die intrazelluläre Wirkung der Behandlung mit CAP ist vielfältig. Auf molekularer Ebene ist eine erhöhte Expression von mRNAs, die Proteine für oxidativen Stress kodieren, nachgewiesen. Dazu zählen unter anderem Enzyme zur Reduktion des oxidativen Stresses, wie die Glutathionreduktase oder Peroxiredoxin, welche unter anderem der Entgiftung von Sauerstoffradikalen dienen, sowie Derivate der Hitzeschockproteine. Wachstumsfaktoren, die durch oxidativen Stress vermehrt exprimiert werden, sind ebenso beteiligt und wirken proliferativ [60]. Lendeckel et al. zeigten anhand einer respiratorischen Epithelzelllinie einen signifikanten Einfluss auf intrazelluläre Signalwege, die einer Anpassung an RONS unterliegen [47]. Auch ein Zellzyklusarrest ist in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer erkennbar. Eine Unterscheidung zwischen Proliferation und Apoptose je nach Konzentration der RONS wird hierbei diskutiert [17, 35, 42, 61]. Dieses Wissen findet in der Erforschung der bestmöglichen Applikationsdauer für CAP bei der Behandlung von Neoplasien im *in vitro*-Versuch Anwendung. Für die Praxis ist die Reduktion der Tumorzelllast bei erhaltener Proliferation der Epithelzellen von besonderer Bedeutung.

1.5.2 Apoptotische Wirkung von kaltem atmosphärischen Plasma

Neben der Schädigung von Membranproteinen und der Erhöhung der Permeabilität durch Veränderung der Ladungszustände steht die Induktion der Apoptose bei der Wirkung von CAP im Vordergrund [48, 62]. Intrazelluläre Moleküle, wie die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), zu denen Stress-aktivierte Phosphokinasen (JNK), die Proteine *Bcl-2-associated X protein* (Bax) und Cytochrom C gehören, werden aktiviert und initiieren einen kontrollierten Zelltod [22, 63]. Zudem konnte eine intrazelluläre Abnahme von Adenosintriphosphat (ATP) gezeigt werden. Dies korreliert mit einer Unfähigkeit der Zellen, auf Stress zu reagieren [19, 20, 61].

Eine direkte Schädigung von Zellwand, der DNS oder von Reparaturenzymen kann eine Nekrose der Zelle bewirken, welche nachfolgend eine Immunantwort auslöst [20, 45, 61, 64, 65]. Die apoptotische Wirkung ist von entscheidendem Nutzen in der Etablierung der Behandlung von HNSCC mittels CAP.

1.6 Abschwächung des Effekts von kaltem atmosphärischen Plasma

Bereits vor Kontakt mit den Zielzellen trifft CAP in der Behandlung auf das umgebende Medium. Extrazelluläre Bestandteile, wie Albumin und Fibrinogen, und intrazellulären Puffersysteme, wie Glutathion (GSH) und Hitzeschockproteine (HSP), können RONS reduzieren [18, 48, 61, 66, 67].

1.6.1 Wirkungseinschränkung durch extrazelluläre Bestandteile

Im Gegensatz zu körperlichen Oberflächen ist der Großteil der Kavitäten von Schleimhaut überzogen. Über die Schleimhaut werden unter anderem Mukus und Immunglobuline sezerniert. Zu den Bestandteilen des Mukus zählt unter anderem Albumin. Für humanes Serumalbumin (HSA) konnte nachgewiesen werden, dass es oxidativen Stress verringern kann [68]. Ähnliches gilt für bovines Serumalbumin (BSA). Dabei werden die Tyrosine und Cystein im Albumin für den Effekt verantwortlich gemacht [69, 70]. Katsumi et al. machten sich diesen Mechanismus bei der Behandlung von fulminantem Leberversagen zu Nutze, um die Konzentration von RONS durch Gabe von Albumin zu reduzieren [71].

Für eine Behandlung mit CAP im HNO-Bereich stellt dieser Schutz vor oxidativem Stress durch Mukus eine zu berücksichtigende Variable dar.

1.6.2 HSP27 im Fokus der Behandlung mit CAP

Hitzeschockprotein 27 (HSP27; HSPB1) ist ein kleines Hitzeschockprotein, welches in verschiedene zelluläre Mechanismen involviert ist. Unter anderem nimmt HSP27 Einfluss auf die Tumorgenität von Zellen, auf ihre Resistenz gegenüber Behandlungen und die Inhibierung der Apoptose [72]. Es wurde gezeigt, dass HSP27 in vielen Tumorzellen verstärkt exprimiert wird. HSP27 reguliert den Aufbau von Aktinfilamenten während der Migration und interagiert mit der DNS. Eine Überexpression ist zellspezifisch mit einer Regulation des Zellzyklus assoziiert. Die Expression von HSP27 ist zelllinienspezifisch, korreliert aber nicht mit dem Grad der Differenzierung [73].

HSP27 liegt phosphoryliert oder in oligomerer Anordnung im Zytosol vor. Dabei besteht ein Gleichgewicht zwischen den Zuständen. Die Phosphorylierung erfolgt über Proteinkinasen [74]. Nach Phosphorylierung bindet HSP27 an Aktin und hemmt eine Elongation von Aktinfilamenten [75]. Durch vermehrte Translation steigt der Anteil an Oligomeren. Die Steigerung der Translation erfolgt durch ein Feedback-Mechanismus über HSP90 mit HSF1 durch vermehrte Bindung von fehlgefalteten Proteinen als Reaktion auf oxidativen Stress. Als Oligomer dient HSP27 als Chaperon und reduziert oxidativen Stress, bindet an Caspase 3 und FAS und inhibiert diese, wodurch die Apoptose verhindert wird [76, 77]. Zusätzlich inaktiviert HSP27 Bax und *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (Bak) und bindet Cytochrom c im Zytosol. Bax und Bak würden anderenfalls für eine vermehrte Ausschüttung von Cytochrom c in das Zytosol sorgen, woraufhin Cytochrom c mit Caspase 9 und APAF-1 Apoptosomen bilden und wiederum Caspase 3 aktivieren würde [78, 79].

1.6.3 HSP27 als therapeutisches Ziel und Tumormarker

Zhu et al. stellen den Einfluss von HSP27 auf die metastatischen Fähigkeiten von HNSCCs in den Vordergrund. Durch siRNA-Transfektion wurde ein Ausfall von HSP27 auf Transkriptionsebene realisiert. Dies entsprach einer sechsfachen Reduktion der Expression der mRNA und einer 23-fachen Reduktion der Proteinsynthese. Dies resultierte in einer Überführung eines vermehrt migrations- und invasionsfähigen Karzinoms in einen unilokalen Primärtumor [80]. Im Tierversuch war es möglich, den Therapieanspruch von HNSCCs auf Radiotherapie durch das Ausschalten von HSP27 signifikant zu verbessern, ohne dabei die Toxizität zu erhöhen [81]. HSP27 ist auch in Vorläuferläsionen des Plattenepithelkarzinoms aktiviert. Die Möglichkeit HSP27 zur Früherkennung von HNSCCs als Tumormarker zu etablieren wird diskutiert [82]. Die

Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Reduktion von HSP27 zu einem verbesserten Ansprechen von HNSCCs auf bisherige Therapieregime führt.

2 Zielstellung der Doktorarbeit

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) bilden einen großen Anteil des Erkrankungsspektrums in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (HNO). Neuronscheideninvasion und Arrosion von großen Gefäßen sind klinisch relevante Probleme, bei denen die Chirurgie an ihre Grenzen stößt. Unter der bisherigen Therapie besteht weiterhin eine hohe Letalität, was die Notwendigkeit innovativer Behandlungsformen bedingt.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Erprobung von kaltem atmosphärischem Plasma (CAP) zur Behandlung von HNSCCs. Für eine intrakavitäre Anwendung ist neben einer Miniaturisierung für eine endoskopische Applikation die Etablierung grundlegender Voraussetzungen, wie der Behandlungsdauer und eines verwendbaren Quellgases, notwendig. Daher werden zwei unterschiedliche Geräte zur Applikation von CAP verglichen. Dem KINPen 09 wird ein Prototyp mit Glaskapillare gegenübergestellt. Dabei dient Argon dem KINPen 09 und Helium dem Prototyp als Quellgas. Um eine Gleichwertigkeit der Plasmen für Plattenepithelkarzinome herauszuarbeiten, werden vier Tumorzelllinien und eine Epithelzelllinie herangezogen. Um eine optimale Applikationsdauer für den Prototyp zu evaluieren, werden Zeitreihen aufgestellt.

Ein weiteres Problem stellt die Abschwächung des Plasmas bereits vor Kontakt mit den Zielzellen durch extrazelluläre Bestandteile dar. Um den Effekt extrazellulärer Proteine auf die Effizienz des Plasmas zu vergleichen, erfolgt die Kultivierung der Zellen mit fetalem Kälberserum (FCS) und einem synthetischen Serumersatz (Panexin NTA). Eine relevante Abschwächung des plasmatischen Effekts soll so Berücksichtigung finden und eine Anpassung der Applikationsdauer zur Folge haben.

In einer weiterführenden Untersuchung wird eine Proteomanalyse der Plattenepithelkarzinome im Vergleich zur Epithelzelllinie durchgeführt, um Einblicke in die molekularen Reaktionen nach Behandlung mit CAP zu erhalten. Dabei wird gezielt die Wirkungsweise von Hitzeschockproteinen, vor allem HSP27, analysiert und in Bezug zur Behandlung gesetzt. Durch die Analyse sollen die Kenntnisse über die Regulation von HSP27 nach Behandlung verbessert werden.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur Erforschung der Auswirkungen von CAP auf HNSCC, speziell zur Erprobung einer intrakavitären endoskopischen Anwendung von Plasma.

3 Material

3.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Tabelle 1: Verwendete Medien und Lösungen in der Zellkultur.

Bezeichnung	Hersteller
DMEM (4,5 g/l Glukose, 3,7 g/l NaHCO ₃ , L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat	PAN Biotech, Aidenbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAN Biotech, Aidenbach
DPBS	PAN Biotech, Aidenbach
Fetales Kälberserum (FCS)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin, 200 mM	PAN Biotech, Aidenbach
MEM Earle's (2,2 g/l NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin)	Merck, Darmstadt
MEM NEAA	PAN Biotech, Aidenbach
Natriumpyruvat 100 mM	PAN Biotech, Aidenbach
Panexin NTA (NTA)	PAN Biotech, Aidenbach
Trypsin/EDTA 10x (0,5%/0,2%)	PAN Biotech, Aidenbach

3.2 Zelllinien

Tabelle 2: Verwendte Zelllinien.

Bezeichnung	Hersteller
S9	ATTC, LGC Standards, Wesel
HNO97	CLS Cell Lines Service, Eppelheim
HNO41	CLS Cell Lines Service, Eppelheim

3.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendte Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
2-β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acrylamid (40%)	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bradford	BioRad, München
Bromphenolblau	Oxford Glyco Systems, UK
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS)	Sigam, Deisenhofen

Bezeichnung	Hersteller
DeStreak™	GE, Freiburg
Dithiothreitol (DTT)	GE, Freiburg
Cover Fluid	GE, Freiburg
ECL-Substrat (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate)	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (vergällt, 96%)	Merck, Darmstadt
Größenstandard (Precision Plus Protein Standard Dual Color; #161-0374)	BioRad, München
Glycerol, 87%	GE, Freiburg
Glycin	Roth, Karlsruhe
HPLC Gradient Grade (MALDI-)Wasser	Baker, Basel
Iodoacetamid (IAA)	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	ChemSolute, Renningen
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Laemmli Ladepuffer (4x)	BioRad, München
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat 20 % (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe
Pharmalyte 3-10	GE, Freiburg
Refraction-2D™ Labeling Kit	NH DyeAGNOSTICS, Halle
RotiBlue 5x Konzentrat	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Güstrow
T-Rex Protein Labeling Kit	NH DyeAGNOSTICS, Halle
Thiourea	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	GE, Freiburg
Tris	Merck, Darmstadt
Trypsin	Promega, Mannheim
Urea	Merck, Darmstadt

3.4 Lösungen

Tabelle 4: Zusammensetzung des 10%igen APS

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
APS	5 g	10 %
A. dest	ad 50 ml	

Tabelle 5: Zusammensetzung des Trenngelpuffers; pH 8,8 (Einstellung mit 37% HCl)

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
Tris/HCl	182 g	1,5 M
20 % SDS	20 ml	0,4 %
A. dest	ad 1 l	

Tabelle 6: Zusammensetzung des Sammelgelpuffers; pH 6,8 (Einstellung mit 37% HCl)

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
Tris/HCl	60 g	0,5 M
20 % SDS	20 ml	0,4 %
A. dest	ad 1 l	

Tabelle 7: Zusammensetzung des 10x Laufpuffers; pH 8,3 (Einstellung mit 37% HCl)

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
Tris/HCl	150 g	1,2 M
20 % SDS	250 ml	5 %
Glycin	720 g	9,6 M
A. dest	ad 5 l	

Tabelle 8: Zusammensetzung des 1x Laufpuffers, pH 8,3

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
10x Laufpuffer	100 ml	10 %
A. dest	ad 1 l	

Tabelle 9: Zusammensetzung des 10x Transferpuffers; pH 8,5 (Einstellung mit 37% HCl); Lagerung bei 4°C

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
Tris	30,3 g	250 mM
Glycin	144,1 g	1,9 M
A. dest	ad 1 l	

Tabelle 10: Zusammensetzung des 1x Transferpuffers; pH 8,5; Ansatz vor Benutzung; Lagerung bei 4°C

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
10x Transferpuffer	100 ml	10 %
Methanol	200 ml	20 %
20 % SDS	2,5 ml	0,25 %
A. dest	ad 1 l	

Tabelle 11: Zusammensetzung von 10x PBS; pH 7,4 (Einstellung mit 37% HCl)

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
Natriumchlorid (NaCl)	80 g	1,36 M
Kaliumchlorid (KCl)	2 g	26,8 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	2,4 g	17,6 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	14,4 g	80 mM
A. dest	ad 1 l	

Tabelle 12: Zusammensetzung von 1x PBS-T

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
10x PBS	100 ml	10 %
Tween 20	1 ml	0,1 %
A. dest	ad 1 l	

Tabelle 13: Zusammensetzung von 10x TBS; pH 7,6 (Einstellung mit 37% HCl)

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
Tris	24,2 g	1,37 M
Natriumchlorid (NaCl)	80 g	26,8 mM
A. dest	ad 1 l	

Tabelle 14: Zusammensetzung von 1x TBS-T

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
10x TBS	100 ml	10 %
Tween 20	1 ml	0,1 %
A. dest	ad 1 l	

Tabelle 15: Zusammensetzung der Fixierungslösung für die Coomassiefärbung

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
Methanol	40 ml	40 %
Essigsäure	10 ml	10 %
A. dest	ad 100 ml	

Tabelle 16: Zusammensetzung der Coomassiefärbung

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
Methanol	20 ml	20 %
RotiBlue	20 ml	20 %
A. dest	ad 100 ml	

Tabelle 17: Zusammensetzung der Blockingpufferlösung

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
Milchpulver	5 g	5 %
TBS-T	ad 100 ml	

Tabelle 18: Zusammensetzung von 1x UT (+/- NEM)

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
Urea	1,92 g	8 M
Thiourea	0,61 g	2 M
Maldi Wasser	ad 4 ml	
Experimentbedingter Zusatz von NEM:		
NEM	0,06 g	100 mM

Tabelle 19: Zusammensetzung des 10x Rehydratisierungspuffers; pH 4-7

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
CHAPS	80 mg	0,1 M
Pharmalyte	52,5 µl	13,125 %
DTT	17,5 mg	0,1 mM
1x UT	ad 400 µl	

Tabelle 20: Zusammensetzung der Äquilibrationslösung; Ansatz für 2 IPG-Streifen

für Lösung A: 100mg/10ml Dithiotreitol (DTT); für Lösung B: 250mg/10ml Iodacetamid (IAA)

Chemikalien	Menge/Volumen	Endkonzentration
Urea	3,6 g	6 M
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	375 mM
Glycerol 87%	2,3 ml	20 %
SDS 20 %	2 ml	4 %
A. dest	ad 10 ml	

3.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 21: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nürnberg
Filterpapier	GE, Freiburg
IEF-Elektrodenstreifen	GE, Freiburg
Klebefolie für MT-Platte, klar	Sarstedt, Nürnberg
6-Well Multiwell-Platte	Greiner BioOne, Frickenhausen
Mikrotiterplatte, schwarz, 96 Well	Greiner BioOne, Frickenhausen
PVDF-Membran	Merck, Darmstadt

3.6 Geräte

Tabelle 22: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Gerät	Hersteller
1D-Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra System	BioRad, München
2D-Elektrophoresekammer	PROTEAN + Dodeca™ Cell	BioRad, München
APPJ	kINPen 09	INP, Greifswald
APPJ	Prototyp	INP, Greifswald
Brutschrank	UE 500	Memmert, Schwabach
Chemilumineszenzscanner	ChemiDoc XRS+	BioRad, München
Fluoreszenzscanner	Typhoon 9400	GE, Freiburg
Gelgießständer (große Gele)	Ettan™ DAL Tsix	GE, Freiburg
Gelgießständer (kleine Gele)	Mini-PROTEAN Tetra System	BioRad, München
IEF-Apparatur	Multiphor II	Biotech, Freiburg
Kühlung für 2D-Kammer	K20, DC10	Thermo Haake, Karlsruhe
	F12, EC	Julabo, Seelbach
Kühlzentrifuge	Mega Star 1.6R	VWR, Hannover
Laminar Flowbox	Safe 2020 1.2	Thermo Fisher, Langenselbold
Massenspektrometer	Proteomics Analyzer 4800	Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
Massenspektrometer	Orbitrap Velos MS	Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA
pH/oRP-Meter	HI 2211	HANNA instruments, Vöhringen
Photometer	Ultraspec 2100 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Scanner	Perfection V750 Pro	Epson, Meerbusch
Scanner	Octopus QPLEX	NH DyeACNOSTICS, Halle
Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot SD	BioRad, München
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus instruments, Hanau
Thermomixer	Comfort 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Vakuumentrifuge	Concentrator Plus	Eppendorf, Hamburg
Zellzähler	CASY 1	Schärfe System, Reutlingen

3.7 Antikörper

Tabelle 23: Verwendete Antikörper

Firmenbezeichnung	Hersteller
GAPDH (14C10) Rabbit mAb	Cell Signaling, Cambridge (UK)
Stabilized Goat Anti Rabbit IgG (H + L), Peroxidase Conjugated	Invitrogen, Karlsruhe
HSP27 (G31) Mouse mAb IgG1	Cell Signaling, Cambridge (UK)
Horse anti-Mouse IgG (H + L), Peroxidase Conjugated	Cell Signaling, Cambridge (UK)

3.8 Software und Datenbanken

Tabelle 24: Software

Software	Version	Firma
Photoshop CS3	10.0.1	Adobe
Delta2D	4.6.3	Decodon
Image Lab	5.1 Beta	BioRad
Scaffold Viewer	4.7.2	Proteome Software Inc.
ImageJ	1.52a	Wayne Rasband

4 Methoden

4.1 Zelllinien und Zellkultivierung

Es wurden die in Tab. 25 aufgeführten Zelllinien genutzt. Für die Kultivierung wurden kryokonservierte Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in eine T75-Zellkulturflasche mit 20 ml vorgewärmtem Medium ausgesät. Für S9-Epithelzellen wurde MEM mit 2 % L-Glutamin, 1 % nicht-essenziellen Aminosäuren (NEAA) und 10 % FCS oder 8 % NTA versetzt. Karzinomzellen wurden mit DMEM versetzt mit 10 % FCS oder 5 % NTA kultiviert. Der erstmalige Mediumwechsel in 12 ml Medium erfolgte nach 24 h. Die Zellen wurden bei gesättigter Luftfeuchtigkeit, 21 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid und 37 °C kultiviert. Die Medien und Verdünnungen wurden entsprechend der Tab. 21 eingesetzt. Für die Subkultivierung wurden die Zellen bei Konfluenz von mindestens 80 % nach Entfernung des Mediums mit 5ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA bis zur Ablösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinreaktion mit frischem Medium gestoppt. Die Zellen wurden homogenisiert und in neuen Zellkulturflaschen mit 12 ml frischem Medium kultiviert.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Medien und Verdünnung der verwendeten Zelllinien mit Angabe des Ursprungsgewebes. Die Kultivierung erfolgt mit FCS oder NTA.

Zelllinie	Medium	Verdünnung	Ursprung
S9	10 % FCS oder 8 % NTA	1:4	Bronchusepithel
HNO97	10% FCS oder 5% NTA	1:3	Lingua
HNO41	10 % FCS oder 5 % NTA	1:3	Tonsille

4.2 Behandlung mit kaltem atmosphärischen Plasma

Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen aus den Flaschen auf Zellkulturplatten mit einer Fläche von 53 cm² übertragen. Die Behandlung der adhärenenten Zellen mit CAP erfolgte nach mindestens zweimaliger Subkultivierung nach dem Auftauen und vollständiger Konfluenz auf der Zellkulturplatte (Abbildung 1). Vor Behandlungsbeginn wurden die Zellen gewaschen und mit 3 ml frischem FCS-haltigen Medium oder NTA-haltigen Medium überschichtet. Die Behandlung der Zellen erfolgte manuell in Mäanderform (D, Abb. 2).

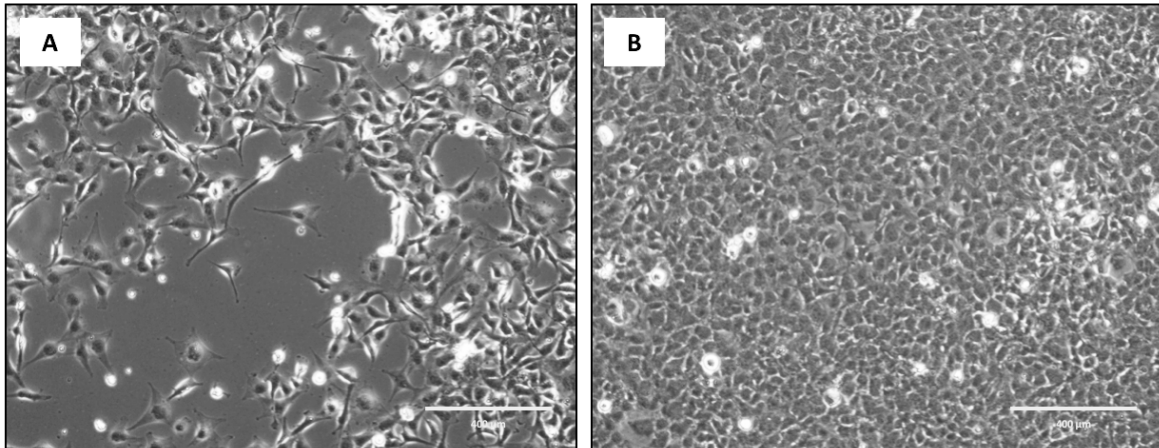


Abbildung 1: Mikroskopische Aufnahmen von S9-Epithelzellen. Die Aufnahme der Epithelzellen wurde mit 10-facher Vergrößerung 2 Tage nach Umsetzung (A) und bei Konfluenz (B) aufgenommen (Maßstab im Bild 400 µm). Die Behandlung mit CAP erfolgte bei Konfluenz.

Nach der Behandlung wurden weitere 7 ml frisches Medium zugegeben. Nach Inkubation für 24 h bei gesättigter Luftfeuchtigkeit, 21 % O₂, 5 % CO₂ und 37 °C wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und mit Trypsin von der Platte gelöst (Vgl. 4.1). Das Zelllysat wurde für 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Zur Differenzierung zwischen frühen und späten Auswirkungen der Plasmabehandlung wurden die Zellen nach Behandlung in einem zweiten Versuchsansatz nach einer Stunde und nach 24 Stunden geerntet.

4.2.1 Behandlung mit Argon- und Heliumplasma

Die Generierung des Plasmas aus den beiden Edelgasen Argon und Helium sowie die Behandlung der Zellen erfolgte entsprechend Tab. 26. Parallel wurden Gaskontrollen mitgeführt (Vgl. 4.2).

Tabelle 26: Übersicht über die Behandlung mit CAP mit Angabe der genutzten Flussrate und Hochfrequenzspannung.

Plasmaquelle	Edelgas	Flussrate in slm	Spannung in kV	Behandlungsdauer in s
kINPen 09	Argon	3,8	2-6 (bei 1.1 MHz)	120 (2,26 s/cm ²)
Prototyp	Helium	3-5	2-6 (bei 1.1 MHz)	60 (1,13 s/cm ²)
Prototyp	Helium	3-5	2-6 (bei 1.1 MHz)	120 (2,26 s/cm ²)
Prototyp	Helium	3-5	2-6 (bei 1.1 MHz)	240 (4,52 s/cm ²)

Das Plasma wird durch den Gasfluss an der Spitze der Kapillare in Form eines Jets ausgetrieben (A, Abb. 2). Für die Applikation von Argon-CAP (Ar-CAP) wurde der kINPen 09 (B, Abb. 2) und für Helium-CAP (He-CAP) ein Prototyp (C, Abb. 2), bereitgestellt durch das Leibniz-Institut Greifswald (INP, Greifswald), verwendet.

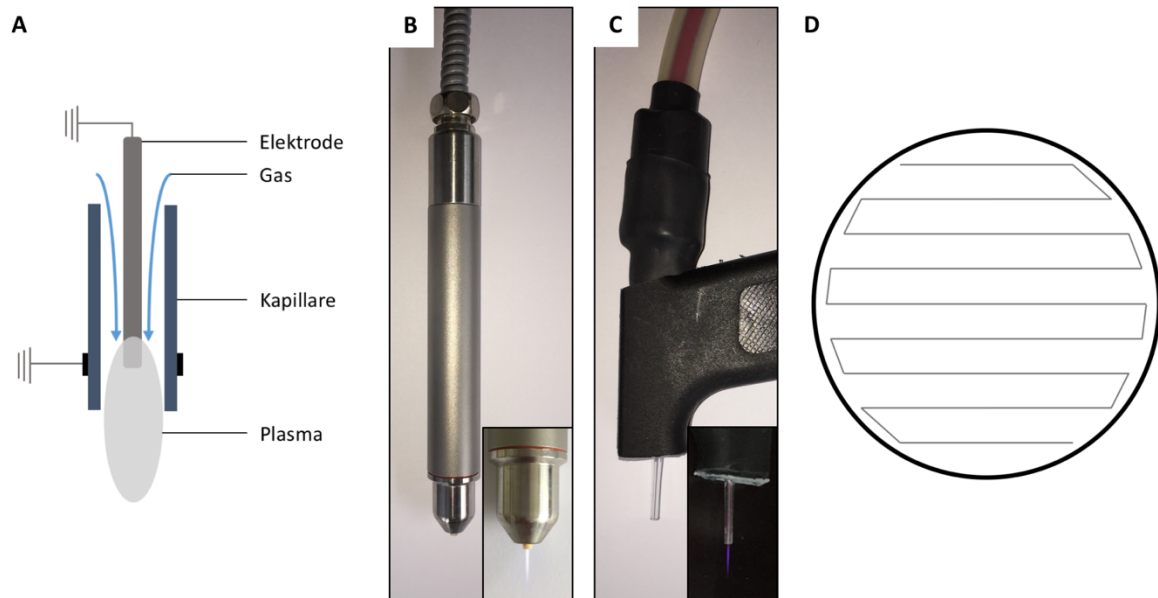


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Plasmaquellen (A), der verwendeten Geräte (B, C) und der meanderförmigen Behandlung (D). Das Edelgas wird in eine Kapillare geleitet und durch eine Elektrode gezündet. An der Spitze des Gerätes wird der Plasmajet durch das Quellgas ausgetrieben (A). Zur Generierung von Argon-CAP wird der kINPen 09 (B) genutzt. Die Kapillare besteht aus Quarzglas. Zur Behandlung mit Helium-CAP stand ein Prototyp mit Glaskapillare zur Verfügung (C). Dieser wurde freundlicherweise durch das Leibniz-Institut Greifswald (INP, Greifswald) bereit gestellt. Die Behandlung der Zellen auf Zellkulturplatten erfolgt in Mäanderform (D).

4.3 Wachstumskinetiken

Für die Erstellung von Wachstumskinetiken wurden S9-Epithelzellen und HNO97-Karzinomzellen auf 6-Well-Platten mit einer Wellfläche von $9,4 \text{ cm}^2$ ausgesät. Die Behandlung wurde nach 48 h Kultivierung durchgeführt. Zuvor wurden die Zellen mit $200 \mu\text{l}$ frischem Medium überschichtet und anschließend für 21 s (für $2,26 \text{ s/cm}^2$) behandelt. Einer CAP-behandelten Probe wurden eine Gaskontrolle und eine unbehandelte Kontrolle gegenübergestellt. Alle Proben wurden auf 2 ml Medium aufgefüllt und kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte angepasst an den spezifischen Nährstoffbedarf für S9-Epithelzellen nach 72 h und für HNO97-Karzinomzellen nach 48 h und 96 h.

4.3.1 Zellzählung

Die Zellzählung wurde für sechs Messpunkte erhoben (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h). Die erste Messung (t = 0 h) erfolgte im Anschluss an die Behandlung. Dazu wurden die Zellen mit 2 ml PBS-T gewaschen und mittels 200 µl Trypsin von der Zellkulturplatte gelöst. Die Reaktion wurde mit 800 µl PBS-T gestoppt. 100 µl der Zellsuspension wurden in 10 ml 1xCasyton gegeben und am *CASY Cell Counter*[®] (Schärfe System, Reutlingen) dreifach gemessen. Pro Messzeitpunkt und Behandlungsform wurden vier Replikate erstellt. Die Messeinstellungen am *CASY Cell Counter*[®] wurden entsprechend Tab. 27 vorgenommen.

Tabelle 27: Einstellungen am *CASY Cell Counter*[®] für S9-Epithelzellen und HNO97-Karziomzellen.

Zelllinie	Achse	CL	NL	Messbereich
S9	50 µm	11,50	6,88	11,5 - 50 µm
HNO97	50 µm	12,13	7,63	12,25 - 50 µm

4.4 Probenaufschluss

Der Aufschluss der Proben wurde mit 1 x UT (8 M Urea, 2 M Thiourea) durchgeführt. Zu den Proben wurden jeweils 200 µl Lysepuffer pipettiert und anschließend in Reaktionsgefäßen fünfmal abwechselnd in Stickstoff gefroren und im Thermomixer bei 30 °C und 1400 rpm für 5 min aufgetaut. Im Anschluss wurden die Proben bei 13.000 rpm bei 20 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Vor der Proteinbestimmung wurden alle Proben bei -80 °C gelagert.

Für den Vergleich der 1 h und 24 h Probe (Vgl. 4.2) mit der Kontrolle wurde der Lysepuffer zusätzlich mit 100 mM N-Ethylmaleimide (NEM) versetzt. NEM dient durch seine Eigenschaft als Imid der Blockierung von Thiolgruppen an Cystein und verhindert eine unspezifische Disulfidbrückenbildung (Abbildung 3).

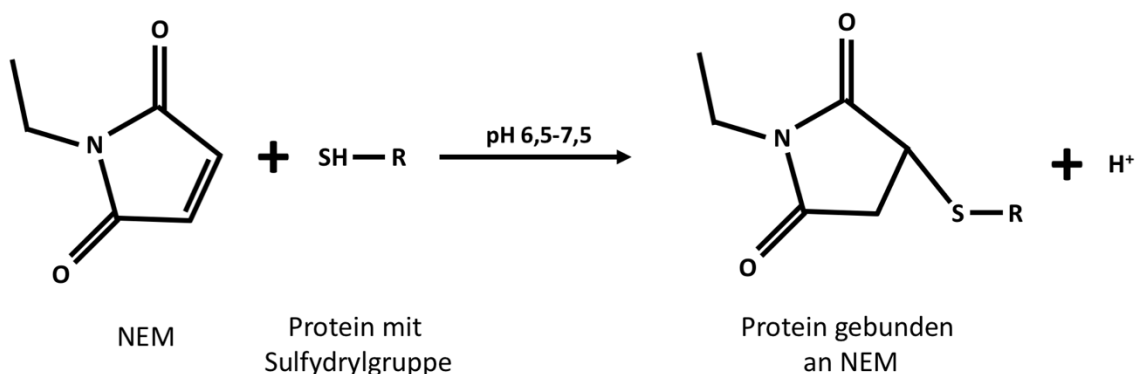


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Reaktion von N-Ethylmaleimide (NEM) mit Proteinen zur Blockierung der Sulfhydrylgruppen. Die Reaktion erfolgt spontan bei einem pH von 6,5-7,5.

4.5 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde die kalorimetrische Methode nach Bradford mit den Einstellungen nach Ernst et al. angewandt [57, 83, 84]. Es wird die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm nach Anlagerung von Coomassie-Brilliantblue G-250 Farbstoff an die kationischen Aminosäurereste der Proteine gemessen.

Zur Proteinbestimmung wurde im Vorfeld eine Eichkurve bei 595 nm mit einer Verdünnungsreihe mit BSA (0,1 µg/µl) erstellt (Tab. 28) [85].

Tabelle 28: Eichkurve mit BSA für die Bestimmung der Proteinmengen im Probenmaterial.

Laufende Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (0.1 µg/µl) [µl]	0	10	20	40	60	80	100	120
1 x UT [µl]	5	5	5	5	5	5	5	5
Maldi-Wasser [µl]	795	785	775	755	735	715	695	675
Bradford-Reagenz [µl]	200	200	200	200	200	200	200	200

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden 5 µl der Probe mit 795 µl A. bidest und 200 µl Bradford-Konzentrat vermischt und für 2 min inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 595 nm.

4.6 2D-SDS-PAGE

Die Auftrennung des Proteoms in zwei Dimensionen nach pI und Molekulargewicht ermöglicht eine detaillierte Analyse des Probenmaterials. So lassen sich durch eine CAP-Behandlung induzierte Veränderungen, explizit beim HNSCC im Vergleich zu Epithelzellen, erkennen und Rückschlüsse auf molekulare Interaktionen ziehen. Auch eine Vergleichbarkeit zwischen Tumorentitäten und Behandlungsformen gegenüber entsprechenden Kontrollen lassen sich herausarbeiten [86, 87]. Zur Analyse wurden CAP-behandelte Proben von S9-Epithelzellen, HNO97- und HNO41-Karzinomzellen und ihre korrespondierenden Gaskontrollen herangezogen. Durch die zusätzliche Verwendung von HNO41-Karzinomzellen waren Vergleiche zwischen zwei verschiedenen HNSCCs möglich. Aufgrund des zeitlichen und methodischen Aufwands und der geringen Menge an Probenmaterial wurde für HNO41-Karzinomzellen nur Proben nach Behandlung mit Ar-CAP herangezogen.

4.6.1 pH-Wert-Einstellung und Markierung

Alle herangezogenen Proben wurden durch Titrieren mit 50 mM Natronlauge auf einen pH von 8,5 eingestellt. Die Proben wurden für die Unterscheidung im 2-dimensionalen Gel mit

photostabilen Farbstoffen mit einem 3-Farben G-Dye Kit (Refraction-2D™ Labeling Kit, NH DyeAGNOSTICS, Halle) markiert. Die Fluophore in Farbstoffen binden an die Lysine der Proteine. Der interne Standard, bestehend aus 25 µg Protein jeder einzelnen Probe, wurde mit je 0,5 µl G100 markiert. Je 50 µg Protein der Kontrollproben wurden mit je 1 µl G200 markiert. Je 50 µg Protein der CAP-behandelten Proben wurden mit je 1 µl G300 gekennzeichnet (Abb. 4). Die Markierung der Proteine mit Farbstoff erfolgte durch Inkubation für 30 min auf Eis. Die Reaktionen wurden mit jeweils 1 µl Stopplösung für weitere 10 min auf Eis beendet. Der interne Standard, zu gleichen Teilen aus allen Proben bestehend, wurde zusätzlich auf jedes Gel gegeben und ermöglicht die Normalisierung über verschiedenen Gele hinweg. Pro Behandlung entsteht ein Gelbild (Tab. 29).

Tabelle 29: Übersicht über die 2D-Gele und dem aufgetragenen Probenmaterial sortiert nach Gelnummer. In allen Gelen fand sich zusätzlich G100-markierter Interner Standard bestehend aus Material aus allen Proben. Daraus ergaben sich 30 digitale Gelbilder. Der Fluoreszenzfarbstoff G300 markierte die CAP-behandelten Proben und G200 die entsprechenden Gas-kontrollen.

Plasmaquelle	Gelnummer	Zelllinie	Serum	G300	G200
kINPen 09	1	S9	FCS	Ar-CAP	Ar
	2	S9	NTA	Ar-CAP	Ar
	3	HNO97	FCS	Ar-CAP	Ar
	4	HNO97	NTA	Ar-CAP	Ar
	5	HNO41	FCS	Ar-CAP	Ar
	6	HNO41	NTA	Ar-CAP	Ar
Prototyp	7	S9	FCS	He-CAP	He
	8	S9	NTA	He-CAP	He
	9	HNO97	FCS	He-CAP	He
	10	HNO97	NTA	He-CAP	He

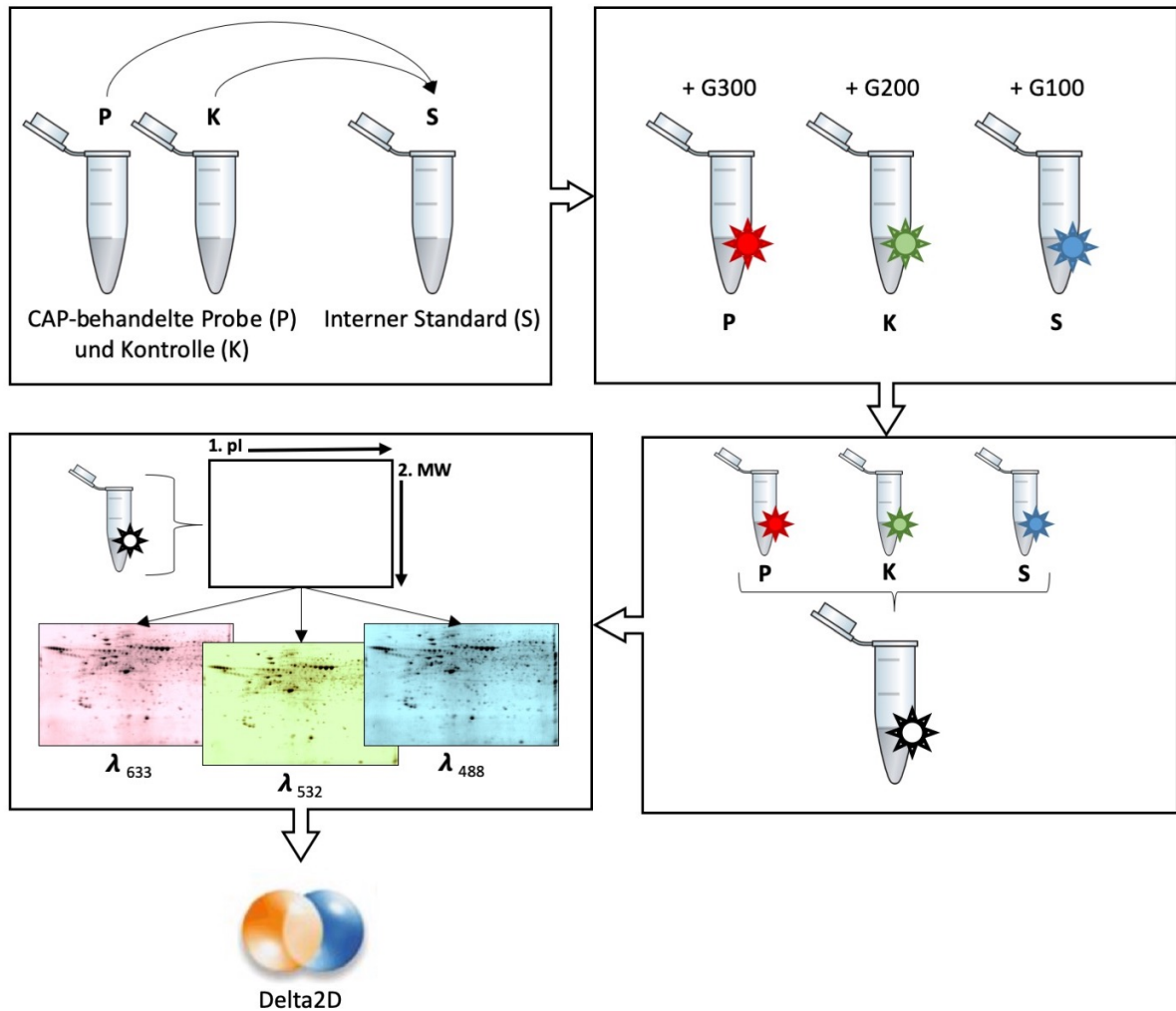


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Verarbeitung des Probenmaterials in der 2D-DIGE. Der erste Schritt war die Erstellung eines Internen Standards (S) aus Material aller CAP-behandelten Proben (P) und Gaskontrollen (K). Als nächstes wurden die Proteine in den Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen (G100, G200, G300) markiert und nach isoelektrischen Punkt (pi) und molekularem Gewicht (MW) aufgetrennt. Mittels Scannen mit drei unterschiedlichen Wellenlängen (λ_{633} , λ_{532} , λ_{488}) im Fluoreszenzscanner wurden den Probenmarkierungen entsprechende Gelbilder erzeugt und anschließend mit Hilfe der Delta 2D-Software analysiert.

4.6.2 Rehydratisierung und isoelektrische Fokussierung

Die markierten Proben bestehend aus G100- markiertem internen Standard, G200-markierter Kontrolle und G300-markierter CAP-behandelter Probe wurden gemischt. Das Gemisch wurde in 10x Rehydratisierungspuffer und 1x UT gelöst und über Nacht bei RT lichtdicht verschlossen unter Cover Fluid rehydratisiert. Hierzu wurden IPG-Streifen mit einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG) von 4 - 7 und einer Länge von 24 cm verwendet. Die isoelektrische Fokussierung wurde nach Thiele et al. mit einer linearen Zunahme von 500 V auf 3500 V bei 2 mA und 5 W für 3500 Vh über 90 min und bei 3500 V für 57000 Vh für 16 Std. 20 min durchgeführt [88].

4.6.3 Äquilibrierung und Gelelektrophorese

Die anschließende Äquilibrierung der IPG-Streifen wurde für jeweils 15 min erst mit Äquilibrierungspuffer A mit Dithiothreitol (DTT) zur Denaturierung und anschließend mit Äquilibrierungspuffer B mit Iodacetamid (IAA) zur Fixierung der Cysteine umgesetzt.

Die benötigten 25 cm x 21 cm Polyacrylamidgele wurden in Glasplatten angesetzt (Tab. 30). Die IPG-Streifen wurden zwischen die Glasplatten an die Grenze zum Gel gelegt und mit 0,5 % Agarose beschichtet. Nach dem Aushärten folgte die Gelelektrophorese für die Auftrennung in der zweiten Dimension unter Kühlung über Nacht bei 20 °C und 2 Watt pro Gel.

Tabelle 30: Zusammensetzung großer Gele (2D-PAGE), 12,5 %, 1 mm, für 12 Gele

Chemikalien	Volumina
Acrylamid 40 %	317,6 ml
Trenngelpuffer	252 ml
A. dest	439 ml
APS 10 %	5 ml
TEMED	0,25 ml

4.6.4 Färbung und Detektion der Proteine

Das Scannen der Gele erfolgte mit einem Typhoon 9400 Laserscanner (GE, Freiburg). Die Filtereinstellungen wurden entsprechend Tab. 31 vorgenommen. Anschließend wurden die Gele aus den Kassetten gelöst und die Agarose entfernt.

Tabelle 31: Farbstoffspezifische Einstellungen für den Laserscanner Typhoon 9400

Farbstoff	Anregungswellenlänge	Detektionsbereich
G100	488 nm (blauer Laser)	500 - 540 nm
G200	532 nm (grüner Laser)	565 - 595 nm
G300	633 nm (roter Laser)	655 - 685 nm

Zur Visualisierung des Gesamtproteins im Gel wurde Coomassiefärbelösung verwendet. Dafür wurden die Proteine im Vorfeld mit Fixierungslösung für 60 min bei RT fixiert und die Gele im Anschluss für 2 x 10 min mit A. dest gewaschen. Die Färbelösung inkubierte unter Schütteln bei RT über Nacht. Mit 20 % Methanol für 2 x 15 min wurde überschüssige Färbung von den Gelen entfernt. Die Gele wurden für 2 x 60 min mit A. dest gewaschen und nach dem Scannen eingeschweißt bei 4°C gelagert.

4.7 Quantitative Analyse

Die Analyse der Fluoreszenzgelbilder erfolgte mit Delta 2D-Software (Decodon v4.6, Greifswald). Durch den internen Standard, bestehend aus Material aller Proben, konnten alle Gelbilder pixelgenau übereinandergelegt werden. Anschließend wurden alle Gelbilder zu einem digitalen Gelbild fusioniert. Auf diesem wurde eine automatisierte Spotdetection durchgeführt. Von der Software nicht erfasste Spots oder grob zusammengelagerte Spots wurden manuell detektiert oder separiert [89]. Jeder detektierte Einzelspot wurde für die nachfolgende quantitative Auswertung auf alle Gelbilder übertragen. Für die Analyse und die grafische Darstellung der Proteinexpression wurde die integrierte TMeV-Software genutzt. Nachfolgend wurde die Intensität der Spots anhand des internen Standards kalibriert. Dieser Schritt wurde durch die Division des mittleren normalisierten Spotvolumens (G200 und G300) durch den Spotvolumenwert des internen Standards (G100) realisiert.

Für die Unterscheidung in der Ausprägung der Spots wurden die Werte für die Plasmabehandlung (G300) durch die entsprechenden Volumenwerte der Kontrollen geteilt.

Relevante Spots erfüllen zwei Merkmale:

- (i) Die Veränderung im Vergleich zur Kontrolle beträgt mindestens Faktor 2 (*Fold Change*-Wert, *fc*-Wert).
- (ii) Eine minimale Spotintensität von $> 0,03$ % Vol. gegenüber dem Hintergrund ist gegeben.

Proteinspots, die detektiert wurden, allerdings im präparativen coomassiegefärbten Gel nicht aufzufinden waren, wurden aus der Analyse entfernt und für die massenspektrometrische Analyse nicht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Werte für die Spotdetection werden von der Delta 2D-Software in einer Quantifizierungstabelle dargestellt und stehen der weiteren Analyse zur Verfügung.

4.8 Proteinidentifizierung

Die detektierten und regulierten Proteinspots wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in Reaktionsgefäße mit 100 μ l Maldi-Wasser übertragen und bis zur Analyse durch die Massenspektrometrie bei 4°C gelagert.

4.8.1 Massenspektrometrische Analyse

Das Massenspektrometer, bestehend aus Ionenquelle, Analysator und Detektor, bestimmt die Masse von freien Ionen im Vakuum. Dazu werden Peptide aus der Probe ionisiert und nach Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) getrennt und im Massenspektrum detektiert.

In dieser Arbeit wurden die Proben in einer ersten Analyse durch die matrixunterstützte Laserdesorptions-/ Ionisationsmassenspektrometrie mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF-MS) bestimmt. Diese verwendet einen Laserstrahl um einen Analyten aus einer Matrix heraus zu ionisieren. Die herausgelösten Peptidionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und nach einer bestimmten Flugzeit detektiert [90].

Die weitere Analyse der Proben wurde aufgrund der höheren Sensitivität mittels Flüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (LC-MS) bestimmt. Zur Ionisierung wurde die Elektrosprayionisierung (ESI) genutzt. Bei der ESI-Methode wird ein Analyt durch eine Kapillare geleitet. Dabei verdampft das Lösungsmittel wodurch an der Kapillarspitze die Analytionen mit einer Ladung versehen und anschließend mittels Massenspektrometrie gemessen werden [91].

Im Fusionsgel überlagernde Proteinspots wurden aus Gründen der Redundanz je Vergleichsbedingung und Expression einmal analysiert. Aus vorhergehenden Versuchen ist bekannt, dass für die gleiche Position in unterschiedlichen Gelen das gleiche Protein identifiziert wird [47]. Der Proteinscore ist für identische Spots gleich. Der fc -Wert wird für die jeweiligen Spots aus den digitalen Analysen in der Delta 2D-Software angegeben.

4.8.1.1 Tryptischer Proteinverdau und MALDI-TOF-MS/MS

Die Spots wurden in eine 96-Well-Platte mit je 100 μ l mit MALDI-Wasser überführt um anschließend automatisch tryptisch verdaut zu werden. Dieser Schritt erfolgte über die Etan Spot Handling Plattform. Dabei wurden die Gelstücke mit 100 μ l 50 mM ABC/ 50 % Methanol für 30 min und dann für 10 min mit 100 μ l 75 % ACN gewaschen.

Der Verdau durch Inkubation mit 10 μ l Trypsin-Lösung (20 ng/ml Trypsin in 20 mM ABC) für 120 min bei 37 °C wurde nach einer 17-minütigen Trocknung vorgenommen. Mit der Inkubation der Gelstücke mit 60 μ l 50 % ACN/ 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) für 30 min bei 37°C wurden die Proteine extrahiert und der Überstand in eine Mikrotiterplatte überführt. Eine erneute Peptidextraktion wurde mit 40 μ l 50 % ACN/ 0,1 % TFA vorgenommen wobei der Überstand wiederum übertragen wurde. Es folgte eine Trocknung der Überstände bei 40 °C

für 220 min und Lösung in 2,2 µl 0,5 % TFA/ 50 % ACN. Im nächsten Schritt wurden die Peptidgemische aus dem jeweiligen Mikrotiterplattenwell auf die korrespondierende Position eines Maldi-Targets übertragen. Dafür wurden 0,7 µl der Lösung auf das Target gegeben und mit 0,4 µl Matrix-Lösung (50 % ACN/ 0,5 % TFA gesättigt mit α-Cyano-4-hydroxymizsäure) gemischt [92].

Nach einer weiteren Trocknung für 10-15 min wurden die Proben per Proteomics Analyzer 4800 (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) gemessen. Die Matrix aus α-Cyano-4-hydroxymizsäure ist für Peptide <10 kDa geeignet.

4.8.1.2 Tryptischer Proteinverdau und nLC-ESI-MS/MS

Der In-Gel-Verdau erfolgte nach Entnahme des überschüssigen Maldi-Wassers von den Gel-spots. Anschließend wurden die Gele mit 100 µl 200 mM Ammoniumbicarbonat in 50% Acetonitril für 15 min bei 37 °C und 1500 rpm entfärbt und mit 100 µl Acetonitril für 15 min bei RT zweimal dehydriert. Durch Inkubation mit 20 µl Trypsin über Nacht bei 37 °C wurden die Proteine im Gel verdaut und der Überstand überführt. Die restlichen Proteine wurden durch zweifache Extraktion für jeweils 45 min bei RT aus dem Gel gelöst und übertragen. Auf die erste Extraktion mit 20 µl H₂O mit 0,1% Essigsäure folgte die zweite Extraktion mit 20 µl H₂O mit 0,05% Essigsäure/50% Acetonitril. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1300 rpm wurde der Überstand in ein neues Reagenzgefäß übertragen und für 30 min bei -80 °C gefroren. In einer Vakuumzentrifuge wurden die Proben bis zur Trocknung zentrifugiert. Die Proteine wurden mit 12 µl Puffer A gelöst und in Mikroinsätze übertragen. Die Analyse erfolgte durch ein NanoLC-ESI-Massenspektrometer (Orbitrap Velos MS, Thermo Fisher, USA) im Institut für funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald.

Die Einstellungen der nESI-LC-MS/MS erfolgten analog zu Menck et al. [91]. Die Separation der tryptischen Peptide wurde vor der massenspektrometrischen Analyse mittels Proxeon Easy nano-LC System umgesetzt. Dazu wurde ein binäres Puffersystem mit Puffer A, bestehend aus 0,1-prozentiger Essigsäure und 2-prozentigem Acetonitril in Wasser, und Puffer B, bestehend aus 0,1-prozentiger Essigsäure und 100-prozentigem Acetonitril, verwendet. Die Peptidseparation wurde durch den linearen Gradienten des Puffer B von 5 bis 25 % innerhalb von 35 min. erreicht. Die massenspektrometrischen Daten wurden durch ein Orbitrap Velos MS (Thermo Fisher, USA), ausgerüstet mit einer Electrospray(nanoSpray)-Ionenquelle (PicoTip Emitter, New Objective), generiert. Die MS/MS-Daten wurden für die 20 höchsten

massenspektrometrischen Peaks in der linearen Ionenfalle bei einer durch Kollision ausgelösten Energie von 30% erstellt. Die Ausschlusszeit für Massen wurde auf 60 s und ein minimales Ionensignal in der MS/MS von 2000 eingestellt.

4.8.2 Datenbanksuche und Auswertung

Der tryptische Verdau führt zu unterschiedlichen Peptidmassen. Die anschließende massenspektrometrische Analyse generiert eine Peakliste der entsprechenden Peptidmassen. Anhand dieser Liste werden mithilfe von Datenbanken mögliche Proteine identifiziert. Trypsin spaltet Peptide nach den Aminosäuren Arginin und Lysin.

4.8.2.1 Auswertung der MALDI-TOF-MS/MS

Die MALDI-TOF-MS/MS erfolgte mittels eines Proteome-Analysers 4800 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Reflektoreinstellungen wurden für ein Massenspektrum von 900 bis 3700 Da bei einem Fokus von 2000 Da vorgenommen. Nach Einteilung in 25 Subspektren wurden pro Spektrum jeweils 100 Messungen durchgeführt. Wenn die Fragmente des Trypsins mit Mono-Isotopie $(M+H)^{1+}$ m/z von 1045.564 und 2211.104 ein *Signal-to-noise*-Verhältnis (S/N) von mindestens 10 erreichten, erfolgte eine automatische Zweipunktkalibrierung. Der Toleranzbereich für Peptididentifikationen wurde auf 10 ppm eingestellt. Mittels GPS-Explorer-Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurden Peaklisten generiert. Dabei wurden die Softwareeinstellungen wie folgt vorgenommen: die Massenbreite wurde auf 900 bis 3700 Da, die Peakdichte auf 50 Peaks auf eine Breite von 200 Da, bei minimal 100 Peaks und maximal 200 Peaks pro Proteinspot und minimalem S/N-Verhältnis von 6 eingestellt. Die Peaklisten wurden mittels der MASCOT-Suchmaschine (Ver. 2.1) mit einer UniProt_SProt-Datenbank spezifisch für humane und bovine Proteine (Ver. 02-2014 - 26253 Einträge) durchgeführt. Identifikationen erfüllten dabei eine Sequenzüberschneidung von mindestens 50% und einem MOWSE-Score von mindestens 49.

4.8.2.2 Auswertung der nLC-ESI-MS/MS

Die Proteine wurden durch die Verwendung einer UniProt_SProt-Datenbank spezifisch für humane und bovine Proteine (Ver. 02-2014 - 26253 Einträge) identifiziert. Dafür wurde der SEQUEST-Algorithmus v3.5 (Sorcerer v4.04, Sage-N Research Inc.) verwendet. Auch hier wurde die Massengenauigkeit auf 10 ppm und die Toleranz für fragmentierte Ionen auf 0,6 Da

eingestellt. Als variable Proteinmodifikationen wurden die Carbamidomethylierung der Cysteine (+57 amu), die Oxidation der Methionine (+16 amu) und die Deamidierung der Asparagine und Glutamine (+1 amu) festgelegt. Mittels PeptideProphet-Algorithmus wurden die Peptide bei einer falsch positiven Rate von 0,59% errechnet.

In der Proteom-Software Scaffold (Version 4.2.0, Proteome Software Inc.) galten Proteine als identifiziert, wenn mindestens zwei Peptide mit einem Schwellenwert (*Threshold*) von > 95% nachweisbar waren [93]. Zusätzlich musste der Kreuzkorrelationswert (XCorr) ein Minimum von 1.8, 2.5, 3.5 und 3.5 für einfach, zweifach, dreifach und vierfach geladene Peptide erfüllen. Die Proteinwahrscheinlichkeiten wurden durch den ProteinProphet-Algorithmus zugewiesen [94]. Proteine, welche ähnliche Peptide enthielten aber nicht differenziert werden konnten, wurden basierend auf der MS/MS-Analyse aus Gründen der Übersichtlichkeit gruppiert. Die massenspektrometrischen Resultate wurden in Scaffold analysiert. Die identifizierten Peptide wurden zur Proteinidentifikation herangezogen [95].

Zur sicheren Identifizierung wurden die identifizierten Proteine mit der jeweiligen Spotposition auf dem entsprechenden 2D-Gel verglichen und über den dabei erwarteten pH-Wert und dem Molekulargewicht näherungsweise validiert.

4.9 Ingenuity Pathway Analyse

Zur Ermittlung von Interaktionen identifizierter Proteine wurde die *Ingenuity Pathway Analyse*-Software (IPA, Qiagen) verwendet. Abhängig von der Zelllinie (S9, HNO97, HNO41) wurden Datensätze mit tabellarischer Auflistung von Protein-ID aus der Massenspektrometrie und entsprechendem *fc*-Wert aus den Ergebnissen der Delta 2D-Software in das Programm eingelesen und von der Software auf direkte und indirekte Zusammenhänge ausgewertet.

Die Filtereinstellungen zur Proteinidentifikation über Homologien beinhalteten die Berücksichtigung von Molekülen bzw. Beziehungen von Mensch, Maus oder Ratte mit hoher Konfidenz oder experimenteller Bestätigung.

Die von der Software erstellten Pathway-Analysen wurden als Datensatz exportiert und mit Hilfe von Netzwerken graphisch dargestellt. Die Zusammenfassungen listen unter Angabe des p-Werts gefundene molekulare und zelluläre Mechanismen, eine Rangliste regulierter Proteine und die wichtigsten involvierten Regulationswege auf. Die Regulation wird mittels eines Expressionswertes (kurz Exp.) dargestellt. Der Expressionswert der mittels nLC-ESI-MS/MS bzw. Maldi-TOF-MS/MS identifizierten Proteine entspricht dem *fc*-Wert, ermittelt aus den

Gelbildern der Delta 2D-Analysen. Ein positiver Expressionswert spiegelt eine erhöhte und ein negativer Expressionswert eine verminderte Proteinmenge wieder.

4.10 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der 1D-SDS-PAGE ist eine qualitative und quantitative Nachweismethode für Proteine aus Probenmaterial. Die Proteine werden in einem Polyacrylamidgel nach ihrer spezifischen Masse im elektrischen Feld aufgetrennt und durch eine anschließende Coomassiefärbung nachgewiesen. Die Methode setzt sich aus Gelherstellung, Probenvorbereitung, Elektrophorese und Färbung zusammen [96].

4.10.1 Gesamtproteinmarkierung der Proben

Zur Standardisierung der Proben wurden 10 µg jeder Probe vor der Gelelektrophorese mit 1 µl G300-Farbstoff markiert. Der Farbstoff markiert das Gesamtprotein. Der Farbstoff wurde entsprechend den Herstellerangaben in T-Rex Solvent gelöst. Nach Vortexen und Zentrifugieren wurden 1 µl des gelösten Farbstoffs zur Probe gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Bis zur Verwendung wurden die markierten Proben bei -20 °C gelagert.

4.10.2 Gelelektrophorese

Die benötigten 1 mm Gele wurden mit 5-prozentigem Sammelgel (Tab. 32) und 12,5-prozentigem Trenngel angefertigt (Tab. 33). Zehn Mikrogramm des Gesamtproteins jeder Probe und der Marker wurden vor der Elektrophorese mit 4-fach Probenpuffer im Verhältnis 1:4 versetzt und bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden für 1 min zentrifugiert und auf die Gele aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für das Sammelgel mit 20 mA und ab Höhe des Trenngels mit 40 mA pro Gel für 90 min durchgeführt.

Nach Beendigung des Gellaufs erfolgte die Säuberung der Glasplatten mit A. dest und anschließend die Detektion des Gesamtproteins der mit G300-markierten Proben bei einer Wellenlänge von 650-665 nm am OctoPlus QPLEX Fluorescence Imager (NH DyeACNOSTICS, Halle). Die Quantifizierung des Gesamtproteins erfolgt mit ImageJ Version 1.52a.

Die Proteine im Gel wurden im Anschluss mit Coomassiefärbelösung unter RT und stetigem Schütteln bis zur Sättigung inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff wurde mit 20 % Methanol für 2 x 15 min entfernt und das Gel mit A. dest gewaschen. Die gefärbten Gele wurden eingescannt und bei 4 °C eingeschweißt gelagert.

Tabelle 32: Zusammensetzung des Sammelgels, 5%, 1mm, für 2 Gele

Chemikalien	Volumina
Acrylamid 40 %	516 µl
Sammelgelpuffer	1,05 ml
A. dest	2,6 ml
APS 10 %	28 µl
TEMED	5 µl

Tabelle 33: Zusammensetzung des Trenngels, 12,5 %, 1 mm, für 2 Gele

Chemikalien	Volumina
Acrylamid 40 %	3,9 ml
Trenngelpuffer	3,13 ml
A. dest	5,45 ml
APS 10 %	50 µl
TEMED	12,5 µl

4.11 Immunoblot

Durch den Immunoblot werden die Proteine durch ein Blottingsystem aus einem Gel auf eine Membran übertragen. Durch primäre Antikörper können spezifisch Proteine markiert und quantifiziert werden. Ein sekundärer Antikörper mit gekoppelter Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) visualisiert das Signal unter Chemilumineszenz.

4.11.1 Proteintransfer auf PVDF-Membran

In Vorbereitung wurden Filterpapiere (7x9 cm, 8 Stück pro Membran) und eine PVDF-Membran (7x9 cm) zugeschnitten. Die Filterpapiere wurden mit Transferpuffer inkubiert. Das Blotting der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte nach der Aktivierung der Membran (15 s Methanol, 120 s A. bidest, 300 s Transferpuffer) mit 1,19 mA pro cm² für 90 min durch ein TransBlot® SD semi-dry Transfersystem (BioRad, München).

Zur Überprüfung der Blottingqualität und einer späteren Quantifizierung der Proteine erfolgte eine Detektion des Gesamtproteins der G300-markierten Proben auf der Membran mittels Octoplus QPLEX Fluorescence Imager.

Die Membran wurde im Anschluss 5 min mit TBS-T gewaschen und mit Blockingpuffer für 90 min geblockt.

4.11.2 Proteinnachweis und Quantifizierung

Der primäre Antikörper HSP27 wurde in einer Verdünnung in Blockingpuffer auf der Membran über Nacht inkubiert (Tab. 34). Am Folgetag wurde nach sechsmaligem Waschen für 5 min mit TBS-T der sekundäre Antikörper, Anti-Mouse-HRP-linked, bei RT unter mäßigem Schwenken für 1 h inkubiert. Nach erneutem sechsmaligen Waschen erfolgte der Nachweis des Zielproteins über die Detektion der Chemilumineszenzsignale am ChemiDoc XRS+ (BioRad, München). Dafür wurde die Membran im Vorfeld für 5 min mit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate inkubiert. Nach erneuter Blockierung für 1 h bei RT mit Blockingpuffer wurde das Prozedere für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und den entsprechenden sekundären Antikörper Anti-Rabbit-HRP-linked wiederholt. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten wurde mit ImageLab 4.1 Beta (BioRad, München) in Relation zum Gesamtprotein umgesetzt.

Tabelle 34: Verwendete Antikörper mit entsprechender Verdünnung und Inkubationsparameter.

Antikörper	Verdünnung	Inkubation
HSP27	1:10000	über Nacht, 4 °C
Anti-Mouse-HRP-linked	1:5000	1 h, RT
GAPDH	1:2500	über Nacht, 4 °C
Anti-Rabbit-HRP-linked	1:2500	1 h, RT

5 Ergebnisse

5.1 Mikroskopische Aufnahmen von Epithel- und Karzinomzellen

Um den physikalischen und physiologischen Effekt des CAP auf die Zielzellen zu veranschaulichen wurden mikroskopische Bilder der Zellkulturplatten nach Behandlung aufgenommen (Abb. 5-6). Die mikroskopischen Aufnahmen der Zellkulturplatten erfolgten direkt im Anschluss an die Behandlung ($t = 0$ h) sowie nach Inkubation der Proben ($t = 24$ h).

5.1.1 Effekte von CAP auf adhärenente Epithelzellen

Unter den mikroskopischen Aufnahmen von S9-Epithelzellen zeigten sich Unterschiede zwischen den Gaskontrollen und den CAP-behandelten Proben. Unter den Gaskontrollen mit Argon waren keine morphologischen Veränderungen sichtbar. Die Adhärenz und die Konfluenz der Epithelzellen blieb erhalten (A, Abb. 5). Unter Verwendung von Helium werden behandelte Bereiche der Epithelzellen aufgrund der Scherkraft des schmalen Gasjets abgelöst und zusammengeschoben. Es entstand eine zellfreie Zone (B, Abb. 5).

Unter Verwendung von CAP kam es zu einer Ablösung der Epithelzellen unabhängig vom applizierten Gas (C-D, Abb. 5). Es entstanden zellfreie Zonen. Zellen, die nicht direkt in Kontakt mit dem Plasmajet kamen, zeigten keine morphologischen Veränderungen. Nach Kultivierung der CAP-behandelten Epithelzellen für 24 h kam es an der Grenzfläche zur zellfreien Zone unter Ar-CAP (E, Abb. 5) und unter He-CAP (F, Abb. 5) zu einer Proliferation und Migration der Zellen in die zellfreie Zone. An der Grenzfläche fanden sich vermehrt Zellen im Stadium der Proliferation und Migration.

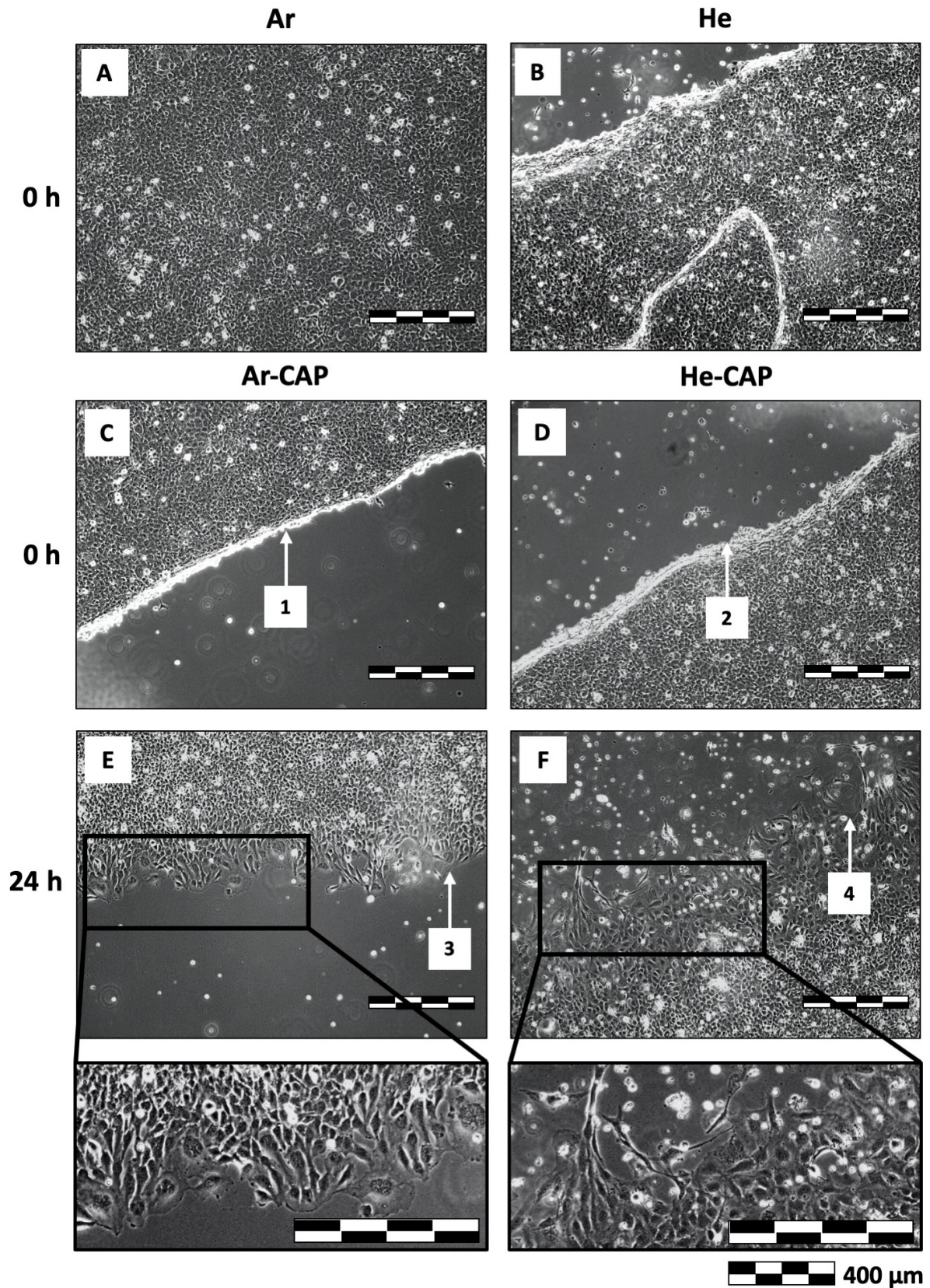


Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahmen von plasmabehandelten S9-Epithelzellen und entsprechenden Gaskontrollen (10-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild 400 μm). Die Gaskontrollen mit Argon wiesen keine Veränderungen auf (A). Unter Verwendung von Helium wurden Zellen von der Zellkulturplatte gelöst (B). Bei Applikation von Ar-CAP (C) oder He-CAP (D) lösten sich die Zielzellen von der Zellkulturplatte. Nach Kultivierung für 24 h proliferierten und migrierten die Epithelzellen in die zellfreie Zone (E und F). Die Markierungen 1-4 weisen auf die Grenze zur zellfreien Zone.

5.1.2 Effekte von CAP auf adhärenzte HNO97-Karzinomzellen

HNO97-Karzinomzellen wurden entsprechend der Versuchsanordnung für S9-Epithelzellen behandelt. Zum Vergleich wurden ebenfalls Gaskontrollen mitgeführt. In den mikroskopischen Aufnahmen zeigte sich in den Gaskontrollen mit Argon keine wesentliche Veränderung. Die Zellen verblieben adhärenz und konfluent (A, Abb. 6). Unter Applikation von Helium konnten morphologische Veränderungen beobachtet werden (B, Abb. 6). Die Adhärenz und Konfluenz der Zellen blieb erhalten.

Wurden die HNO97-Karzinomzellen mit Ar-CAP (C, Abb. 6) oder mit He-CAP (D, Abb. 6) behandelt, entstand eine Grenze zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen mit entsprechender zellfreier Zone. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen waren die plasmabehandelten Karzinomzellen morphologisch verändert. Nach Kultivierung für 24 h schritten die morphologischen Veränderungen voran. Der Prozess zeigte sich unter Ar-CAP (E, Abb. 6) und He-CAP (F, Abb. 6). Die zellfreie Zone vergrößerte sich. Im Randbereich kam es zur Proliferation und Migration unbehandelter Karzinomzellen in die zellfreie Zone.

Aufgrund der abscherenden Wirkung des Plasmajets auf S9-Epithelzellen und HNO97-Karzinomzellen konnte keine adäquate Antwort auf die Anzahl der behandelten Zellen gegeben werden. Diese unterlag Variablen wie unter anderem Zellzahl, Plasmaquelle, Behandlungsdauer, Abstand zwischen Plasmajet und Zelle und Winkel der Plasmaeinwirkung. Prinzipiell war ein Effekt der Behandlung mit CAP und teilweise auch mit Kontrollgas deutlich erkennbar. Um die Effekte quantitativ beschreiben zu können, wurden Wachstumskinetiken mit modifizierter Kultivierung und Behandlungsstrategie durchgeführt (Vgl. 5.2).

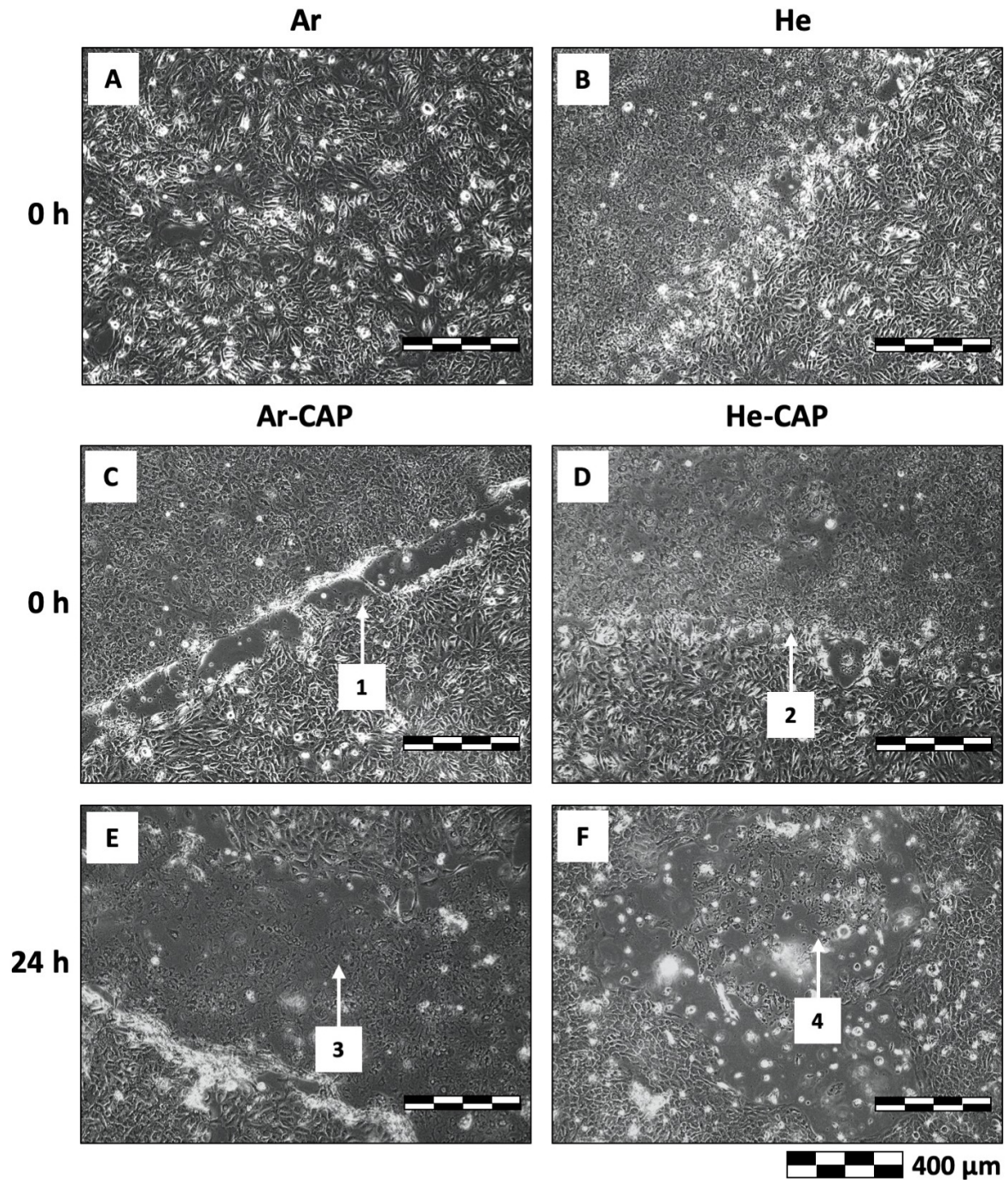


Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahmen von plasmabehandelten HNO97-Karzinomzellen und entsprechenden Gaskontrollen (10-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild 400 µm). Unter den Gaskontrollen mit Argon (A) und Helium (B) blieb die Konfluenz der Zellen erhalten. Bei Applikation von CAP entstand unter Ar-CAP (C) und He-CAP (D) eine Grenze zwischen CAP-behandelten Zellen und unbehandelten Zellen (C1, D2). Nach Kultivierung (t = 24 h) kam es zur Fragmentierung der CAP-behandelten Karzinomzellen mit Ausdehnung der zellfreien Zone (E3, F4). Im Randbereich proliferierten unbehandelte Karzinomzellen.

5.2 Wachstumskinetiken

Für beide Zelllinien wurden die Wachstumskurven unter Kultivierung mit FCS und NTA sowie Behandlung mit Argonplasma (Ar-CAP) und Heliumplasma (He-CAP) erstellt.

Tabelle 35: Übersicht über die angefertigten Wachstumskinetiken nach fortlaufender Nummer. Pro Behandlungsform (Plasma, Gaskontrolle und unbehandelte Kontrolle) wurden 4 Replikate erstellt.

Kinetik	Zelllinie	Medium	Plasma	Gaskontrolle	Kontrolle
1	S9	FCS	Ar-CAP	Argon	unbehandelt
2	S9	FCS	He-CAP	Helium	unbehandelt
3	S9	NTA	Ar-CAP	Argon	unbehandelt
4	S9	NTA	He-CAP	Helium	unbehandelt
5	HNO97	FCS	Ar-CAP	Argon	unbehandelt
6	HNO97	FCS	He-CAP	Helium	unbehandelt
7	HNO97	NTA	Ar-CAP	Argon	unbehandelt
8	HNO97	NTA	He-CAP	Helium	unbehandelt

5.2.1 Wachstumskinetiken von S9-Epithelzellen nach Behandlung mit CAP

Unter einer Behandlung mit Argon (Ar) und Helium (He) zeigten sich für S9-Epithelzellen im Vergleich der Kinetiken ähnliche Kurvenverläufe. Unter Verwendung von Argon wiesen Kontrolle und Gaskontrolle für FCS und NTA einen übereinstimmenden Verlauf auf. Bei der Behandlung mit Ar-CAP zeigte sich für FCS und NTA über alle Messpunkte eine deutlich reduzierte Zellzahl. Bei der Verwendung von Helium sind die Zellzahlen für Gaskontrolle und Plasmapehandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zusätzlich reduziert (Abb. 7).

5.2.2 Wachstumskinetiken von HNO97-Karzinomzellen nach Behandlung mit CAP

Die Zellzahl von HNO97-Karzinomzellen nach Behandlung mit Ar-CAP war im Vergleich zu entsprechenden Gaskontrollen und unbehandelten Kontrollen deutlich reduziert. Dabei stieg die Zellzahl unter FCS kontinuierlich an. Unter NTA verblieb die Zellzahl auf einem niedrigen Niveau. Ähnliche Kurvenverläufe zeigten sich unter der Verwendung von He-CAP. Hier war die Zellzahl nach Behandlung mit He-CAP und in der Gaskontrolle im Vergleich zur unbehandelten Probe deutlich reduziert. Unter FCS war bis 120 h ein kontinuierlicher Anstieg der Zellzahl nachweisbar. Dieser Anstieg blieb unter NTA aus (Abb. 8).

Sowohl für S9-Epithelzellen und HNO97-Karzinomzellen ergaben sich in den Wachstumskinetiken quellgasbedingte Unterschiede. Zur Klärung der Ursachen wurden die Proben mittels 2D-SDS-PAGE und 1D-SDS-PAGE auf molekularer Ebene untersucht.

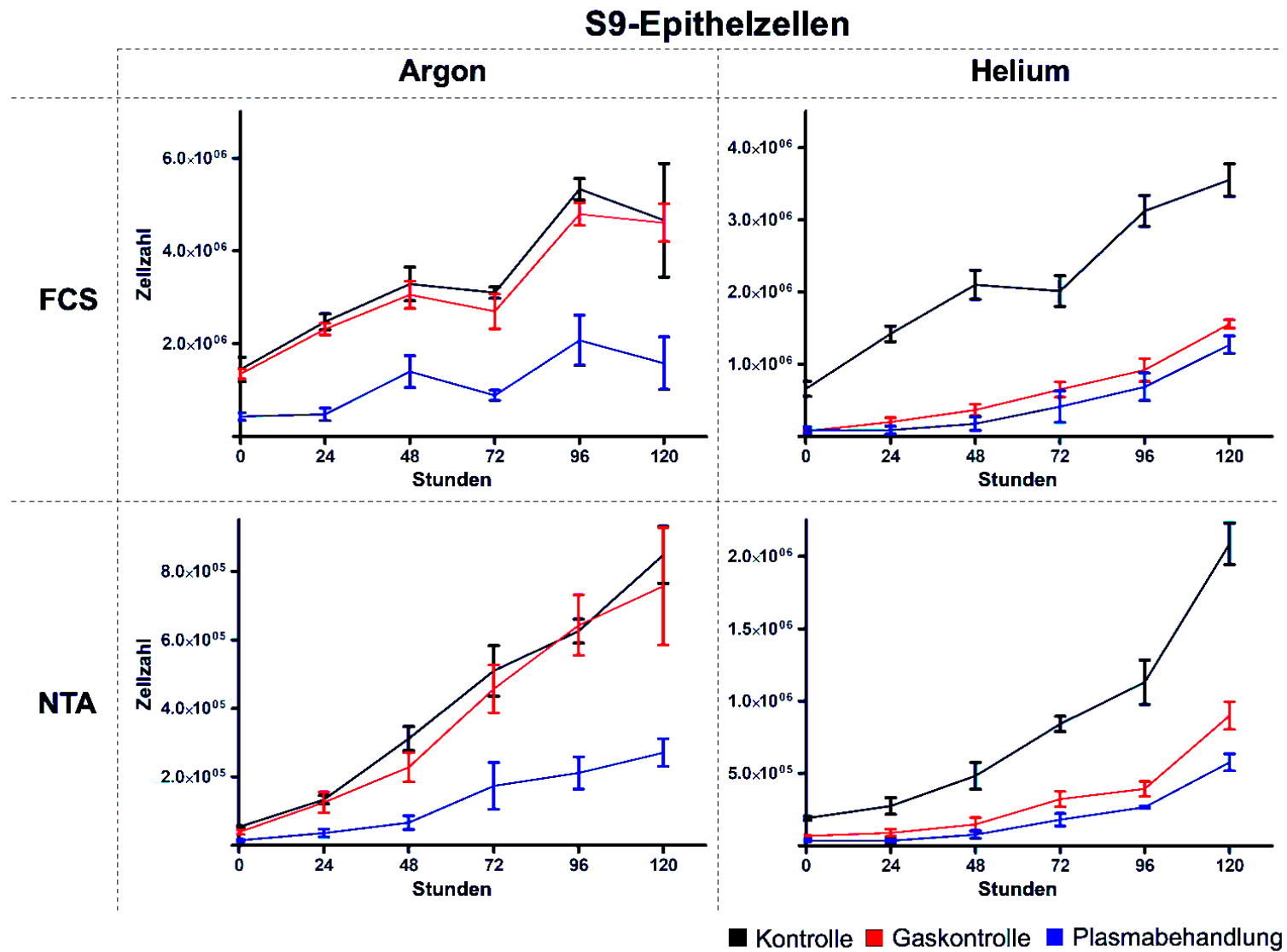


Abbildung 7: Wachstumskinetiken für S9-Epithelzellen unter Behandlung mit Argon und Helium und Kultivierung mit FCS und NTA. Einer Plasmabehandlung wurde eine Gaskontrolle und eine unbehandelte Kontrolle gegenübergestellt. Es zeigte sich für Ar-CAP eine deutliche Reduktion der Zellzahl unter FCS und NTA. Unter Verwendung von Helium waren die Zellzahlen in der Gaskontrolle und Plasmaprobe über 6 Messpunkte (0 h – 120 h) reduziert.

HNO97-Karzinomzellen

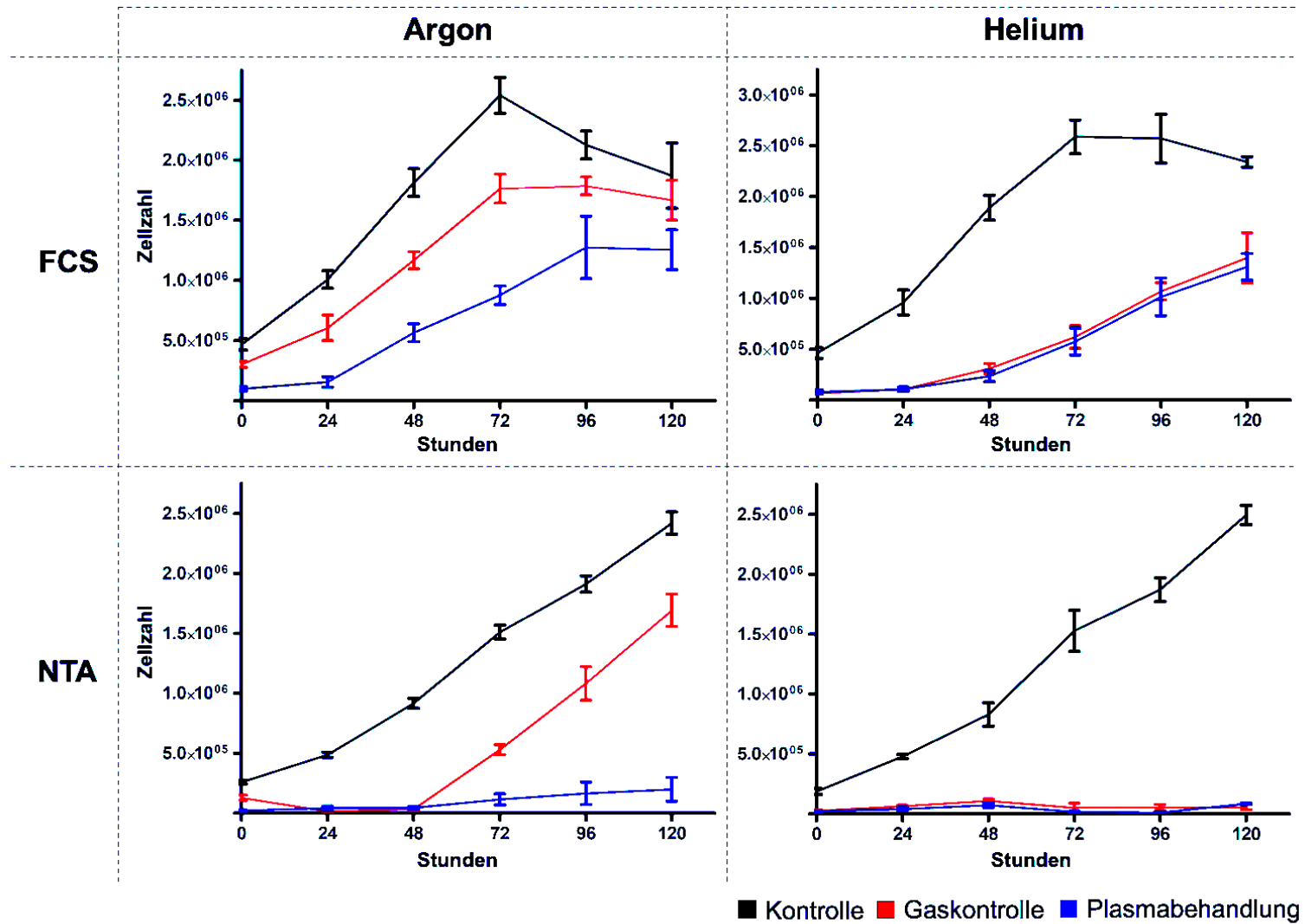


Abbildung 8: Wachstumskinetiken für HNO97-Karzinomzellen unter Behandlung mit Argon und Helium und Kultivierung mit FCS und NTA. Einer Plasmabehandlung wurde eine Gaskontrolle und eine unbehandelte Kontrolle gegenübergestellt. Es zeigte sich für Ar-CAP eine deutliche Reduktion der Zellzahl unter FCS und NTA. Unter Verwendung von Helium waren die Zellzahlen in der Gaskontrolle und Plasmaprobe reduziert. Unter FCS stieg die Zellzahl über 120 h stetig an. Unter NTA blieb der Anstieg für Ar-CAP und He-CAP aus.

5.3 Proteinveränderungen nach Behandlung mit CAP

Zur Identifikation spezifischer Veränderungen des Proteoms wurden die CAP-behandelten Proben und ihre Gaskontrollen für S9-Epithelzellen und HNO97- und HNO41-Karzinomzellen mittels 2D-DIGE aufgetrennt. Nach abgeschlossener Detektion und Digitalisierung der Gele wurden diese mit Hilfe der Delta 2D-Software (v4.2, Decodon GmbH, Greifswald, Deutschland) quantitativ analysiert. Durch den internen Standard konnten Laufunterschieden korrigiert und alle Gele pixelgenau auf einem Fusionsgel zusammengefasst werden (Abb. 9). Anhand des Fusionsgels erfolgte die Spotdetektion durch eine minimale Spotintensität von $> 0,03\%$ Vol. gegenüber dem Hintergrund.

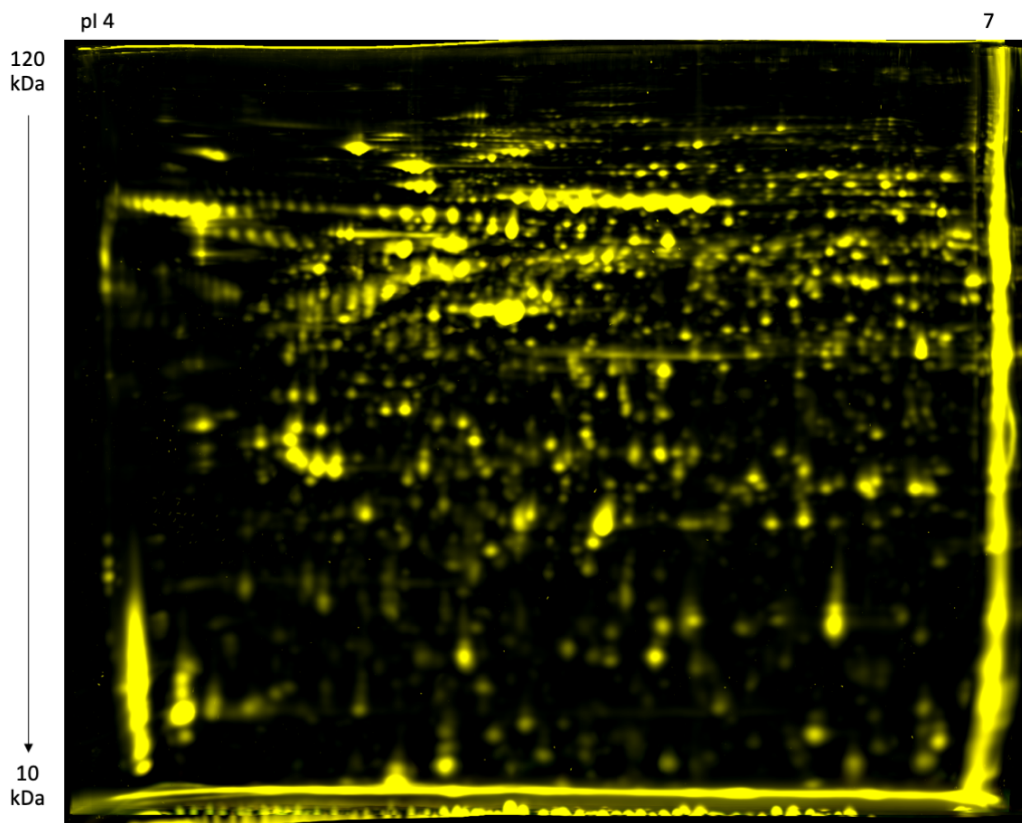


Abbildung 9: Fusionsgel aller Proben zur Spotdetektion. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch 2D-DIGE nach isoelektrischen Punkt in einem Bereich von pH 4 bis 7 und nach Molekulargewicht von 10 bis 120 kDa. In der Proteindetektion wurden 2083 regulierte Proteinspots mit einer minimalen Spotintensität von $> 0,03\%$ Vol. gegenüber dem Hintergrund detektiert und beschriftet.

5.3.1 Detektion veränderter Proteinexpressionen mittels Delta 2D-Software

Auf dem Fusionsbild ergab sich die Detektion von 2083 Spots. Davon erfüllten 928 Spots eine Veränderung des *fc*-Wert um den Faktor 2 über alle zu vergleichenden Bedingungen. Eine

erste Einteilung der Proben erfolgte nach verwendeter Plasmaquelle, um Unterschiede zwischen den Quellgasen herauszuarbeiten. Zur Veranschaulichung der Effekte des Quellgases und der unterschiedlichen Seren wurde die Anzahl der Spotdetektionen separat für jede Behandlungsform aufgelistet (Tab. 36). Hieraus ergaben sich quantitative Unterschiede für die einzelnen Behandlungsformen. Zur qualitativen Analyse CAP- und serumbedingter Effekte in der Proteinregulation wurden Zweikanalbilder aus der Delta 2D-Software erstellt (Abb. 10-14).

Tabelle 36: Gesamtübersicht der Spotdetektionen in Delta 2D mit Anzahl der regulierten Proteine nach CAP-Behandlung. Der Pfeil nach oben (↑) kennzeichnet Proteinidentifikationen mit vermehrter Proteinmenge und der Pfeil nach unten (↓) Proteine mit verminderter Menge.

Plasmaquelle	Zelllinie	Medium	Plasma	Spotdetektionen		
				Gesamt	↑	↓
kINPen 09	S9	FCS	Argon	146	86	60
	S9	NTA	Argon	159	108	51
Prototyp	S9	FCS	Helium	108	68	40
	S9	NTA	Helium	59	34	25
kINPen 09	HNO97	FCS	Argon	80	34	46
	HNO97	NTA	Argon	105	43	62
Prototyp	HNO97	FCS	Helium	50	23	27
	HNO97	NTA	Helium	44	22	22
kINPen 09	HNO41	FCS	Argon	71	21	50
	HNO41	NTA	Argon	106	61	45

5.3.2 2D-DIGE: CAP- und serumbedingte Proteinregulationen

Veränderte Proteine im Vergleich der CAP-Behandlung und der Gaskontrolle wurden durch farbliche Markierung gekennzeichnet. Die signifikant erhöhten Proteine wurden rot für CAP-behandelte Proben und grün für Gaskontrollen dargestellt. In den Overlays zum Vergleich des serumbedingten Effektes waren signifikant erhöhte Proteine unter Kultivierung mit FCS grün und mit NTA rot dargestellt. Nicht signifikant veränderte Proteine erschienen durch die Addition der Farben Rot und Grün in Gelb (Abb. 10-12). Die qualitative Analyse der Overlays ermöglichte erste Abschätzungen von Unterschieden zwischen den Quellgasen Argon und Helium sowie ein Vergleich zwischen FCS und NTA.

Aus der Proteindetektion mittels Delta 2D-Software ergaben sich unter Ar-CAP in S9- und HNO97-Zellproben zusammen insgesamt 490 signifikant veränderte Proteindetektionen, wovon 271 (55 %) induziert und 219 (45 %) reprimiert waren (Tab. 36). Bei einer Applikation von He-CAP wurden entsprechend der Spotdetektion für S9 und HNO97 251 Proteinspots

signifikant verändert. Dabei waren 147 (58,5 %) Proteinspots induziert und 114 (41,5 %) Proteinspots reprimiert (Tab. 36).

5.3.2.1 CAP- und serumbedingte Proteinveränderungen in S9 Epithelzellen

In S9-Epithelzellen wurden nach einer Behandlung mit Ar-CAP insgesamt 305 Proteine signifikant verändert. Dabei unterschied sich die Anzahl der Proteinveränderungen unter FCS (146) marginal von der unter NTA (159). Die Anzahl der Proteinregulationen nach Behandlung mit He-CAP fiel geringer aus (167). Ein Großteil der Regulationen entfiel auf die Kultivierung mit FCS (108), während der Anteil der Veränderungen unter NTA mit 59 (35%) modifizierten Proteinen in Relation niedriger war (Tab. 36).

Zur Darstellung des CAP-bedingten Effektes wurden Overlays für Ar-CAP- und He-CAP-behandelte S9-Epithelzellen gegenüber ihren Gaskontrollen in Delta 2D generiert (Abb. 10). Hier ließen sich die bereits numerisch beschriebenen CAP-bedingten Veränderungen von Proteinen qualitativ darstellen. Ar-CAP behandelte S9-Epithelzellen wiesen unter FCS (A, Abb. 10) und NTA (C, Abb. 10) mehr Proteinveränderungen auf als unter He-CAP (B und D, Abb. 10).

In S9-Epithelzellen, welche mit FCS kultiviert wurden, konnten insgesamt 254 Proteinregulationen nachgewiesen werden. Der Anteil unter Ar-CAP war mit 146 gegenüber 108 Proteinregulationen unter He-CAP größer. Bei Kultivierung mit NTA zeigten sich 218 Proteinveränderungen. Davon entfielen 159 (73%) Proteine auf die Behandlung mit Ar-CAP und 59 (27%) Proteine auf He-CAP (Tab. 36).

Um diese serumbedingten Effekte qualitativ nachzuweisen, wurden mittels Delta 2D-Software Overlays von S9-Epithelzellen bezüglich ihrer Kultivierung mit FCS und NTA bei gleicher Behandlungsform generiert (Abb. 11). Hier ergaben sich unabhängig von der Behandlungsform divergierende Proteinmuster zwischen FCS und NTA. In der Gegenüberstellung der CAP-behandelten Proben (A und C, Abb. 11) fiel der Effekt deutlicher aus als im Vergleich der Gaskontrollen (B und D, Abb. 11).

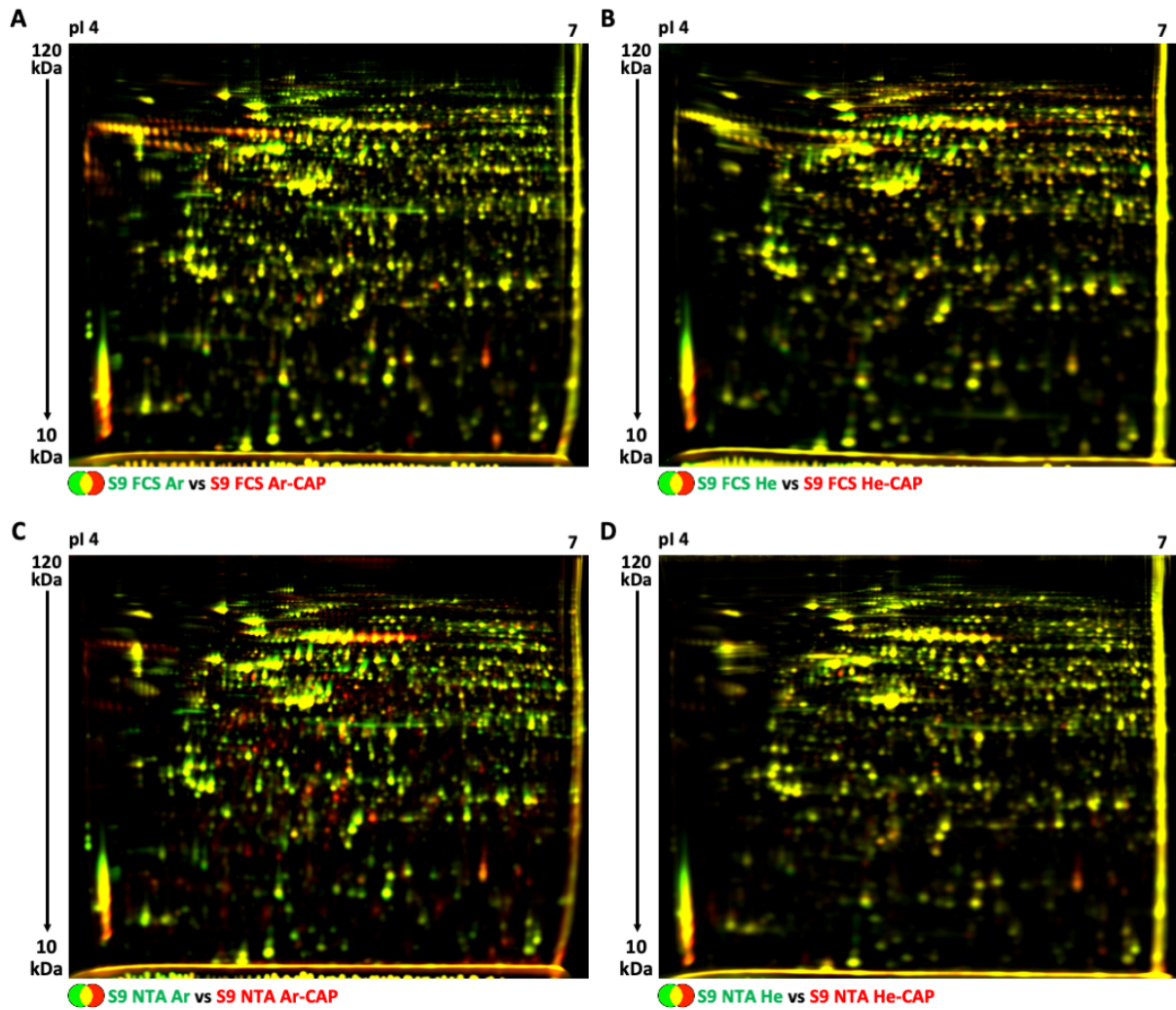


Abbildung 10: Overlays von S9-Epithelzellen mit Gegenüberstellung der CAP-behandelten Proben und ihren entsprechenden Gaskontrollen. Die Proben wurden im 2D-DIGE nach isoelektrischem Punkt (pI) von 4-7 und einem molekularen Gewicht von 10-120 kDa aufgetrennt. Regulierte Proteine wurden rot für eine vermehrte Expression durch CAP und grün in der Gaskontrolle dargestellt. Unter Ar-CAP zeigten sich ausgeprägte Proteinveränderungen unter FCS (A) und NTA (C). Der Effekt fiel unter He-CAP unter FCS (B) und NTA (D) geringer aus.

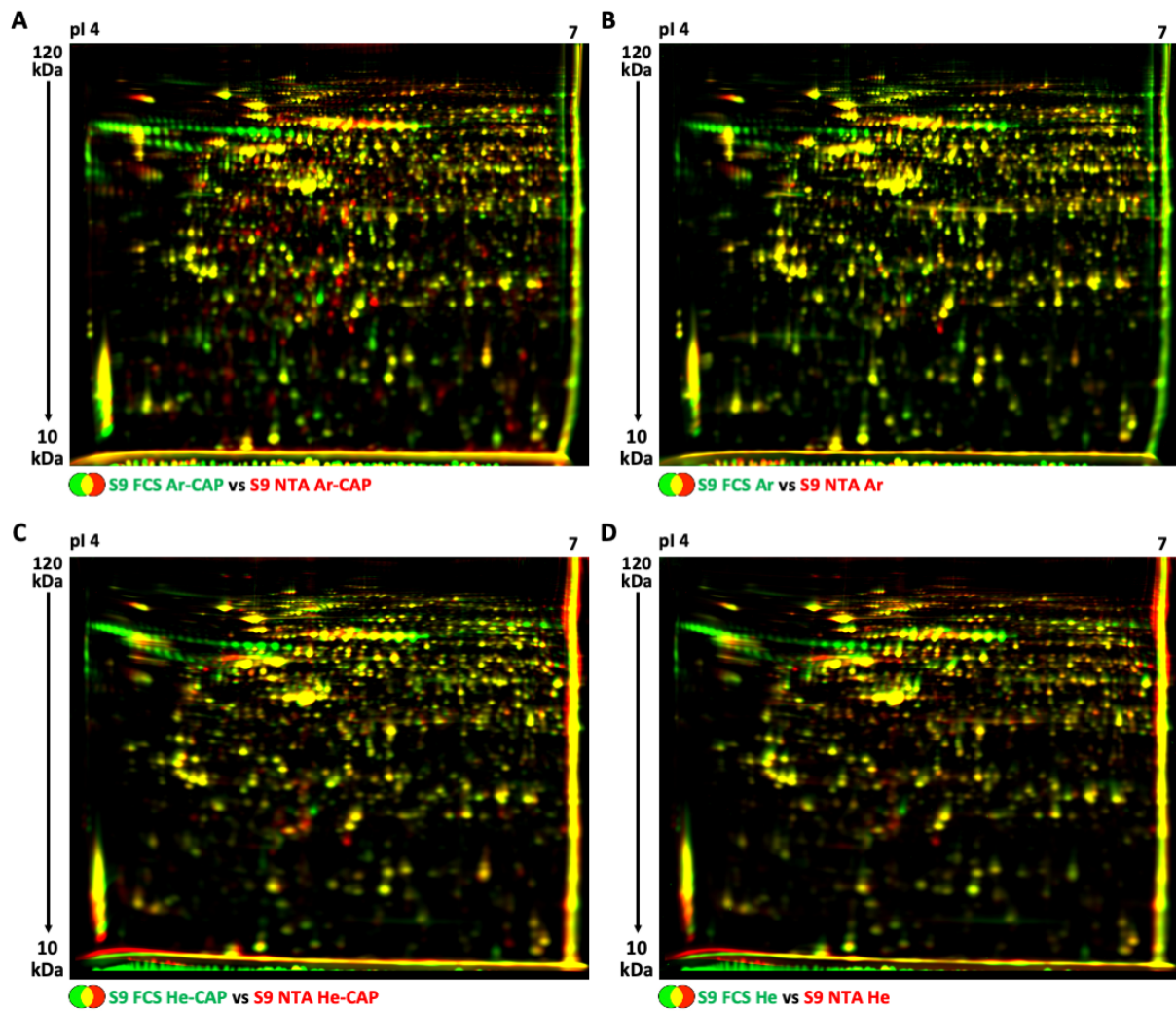


Abbildung 11: Overlays von S9-Epithelzellen mit Gegenüberstellung der Seren FCS und NTA unter gleicher Behandlungsform. Die Proben wurden im 2D-DIGE nach isoelektrischem Punkt (pI) von 4-7 und einem molekularen Gewicht von 10-120 kDa aufgetrennt. Regulierte Proteine wurden rot für eine vermehrte Expression durch NTA und grün für FCS dargestellt. Über alle Overlays (A-D) ließen sich qualitative Unterschiede zwischen FCS und NTA nachweisen.

5.3.2.2 CAP- und serumbedingte Effekte in HNO97- und HNO41-Karzinomzellen

Analog zum Vergleich von Quellgas und Serum für S9-Epithelzellen, wurde dieser auch auf das Probenmaterial der HNO97-Karzinomzellen und HNO41-Karzinomzellen angewandt. In den Karzinomzellen zeigten sich so qualitative Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsformen (Abb. 12-14).

Zum Vergleich des CAP-bedingten Effektes auf HNO97-Karzinomzellen wurden zunächst Overlays für Ar-CAP und He-CAP gegenüber ihren entsprechenden Gaskontrollen angefertigt (Abb. 12). Diese ergänzten qualitativ die Ergebnisse der quantitativen Analyse (Tab. 36), in denen unter Ar-CAP mehr Proteinmodifikationen unter NTA gezeigt wurden (A und C, Abb. 12). Für den Vergleich der Proben nach He-CAP ergaben sich keine großen qualitativen Unterschiede (B und D, Abb. 12)

Zur Darstellung der serumbedingten Effekte erfolgte anschließend die Erstellung von Overlays von FCS und NTA bei gleicher Behandlungsform (Abb. 13). Hier zeigte sich über alle angefertigten Overlays eine starke Divergenz der Aufteilungsmuster zwischen FCS und NTA unabhängig von der Behandlungsform (A-D, Abb. 13).

Die in der Delta 2D-Analyse berücksichtigten Proben von HNO41-Karzinomzellen wurden mittels kINPen 09 mit Ar-CAP behandelt. Aus diesen Proben wurden Overlays für die Behandlung mit Ar-CAP unter Kultivierung mit FCS und NTA gegenüber ihren entsprechenden Gaskontrollen erstellt (A und B, Abb. 14).

Für FCS ergaben sich 71 regulierte Spotidentifikationen, davon waren 21 (29,6%) hochreguliert und 50 (70,4%) reprimiert. Unter NTA waren von 106 regulierten Spots 61 (57,5%) vermehrt und 45 (42,5) vermindert exprimiert (Tab. 37).

Um den Einfluss von FCS und NTA bei der Behandlung von HNO41-Karzinomzellen mit Ar-CAP zu visualisieren wurden Overlays bei gleicher Behandlung mit Gegenüberstellung von FCS und NTA erstellt (C und D, Abb. 14). Wie bereits für HNO97-Karzinomzellen beschrieben, ergaben sich eindeutige qualitative Unterschiede zwischen FCS und NTA.

Zur weiteren Beschreibung der Unterschiede zwischen den Proben erfolgte anschließend eine Hauptkomponentenanalyse (Vgl. 5.4).

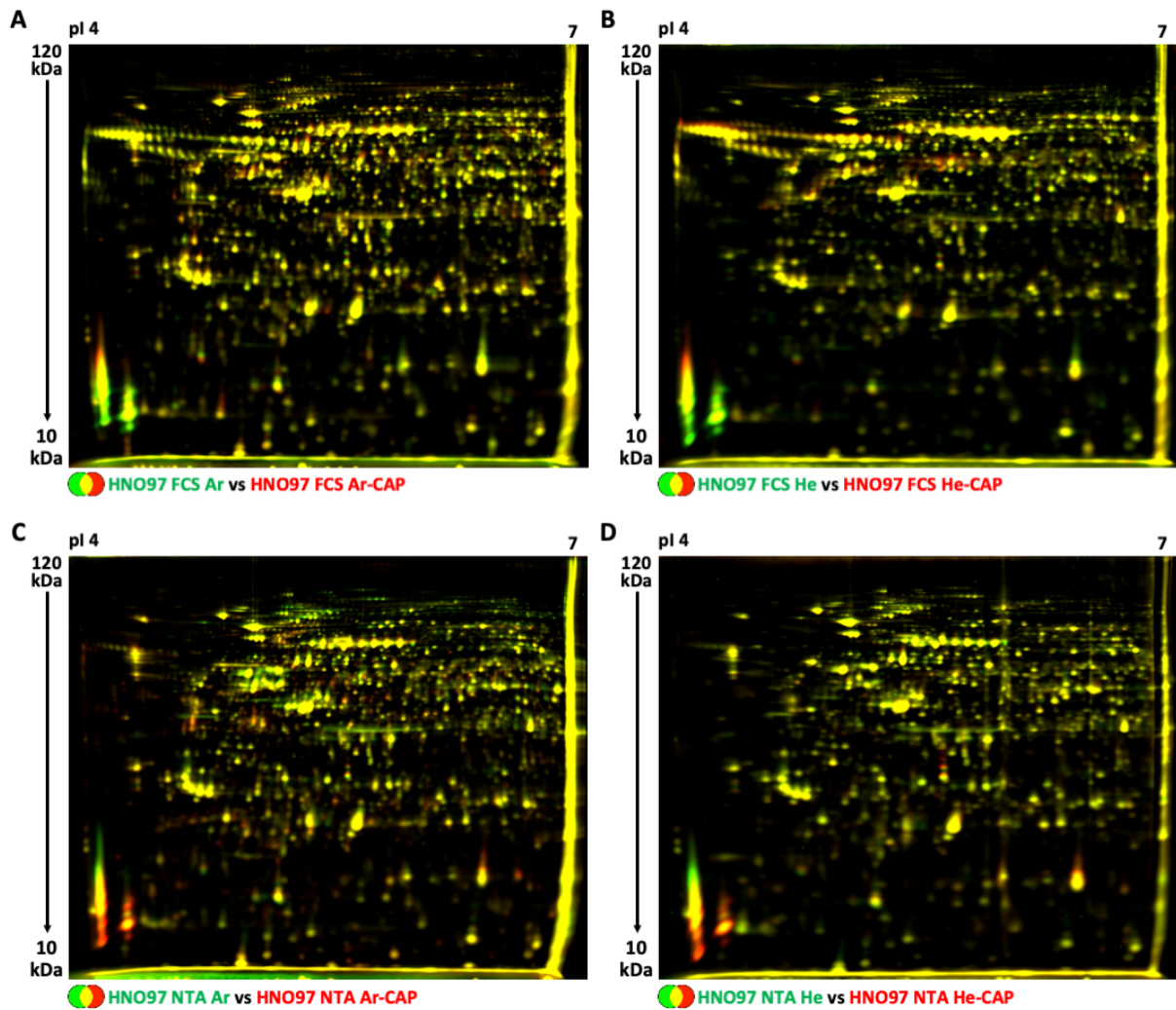


Abbildung 12: Overlays von HNO97-Karzinomzellen mit Gegenüberstellung der CAP-behandelten Proben und ihren entsprechenden Gaskontrollen. Die Proben wurden im 2D-DIGE nach isoelektrischem Punkt (pI) von 4-7 und einem molekularen Gewicht von 10-120 kDa aufgetrennt. Regulierte Proteine wurden rot für eine vermehrte Expression durch CAP und grün in der Gaskontrolle dargestellt. Für alle Behandlungsformen ließen sich vereinzelt Proteinveränderungen nachweisen. Der CAP-bedingte Effekt war unter Ar-CAP unter Kultivierung mit FCS (**A**) kleiner als unter NTA (**C**). Im Vergleich der Proben unter He-CAP ergaben sich marginale qualitative Unterschiede (**B, D**).

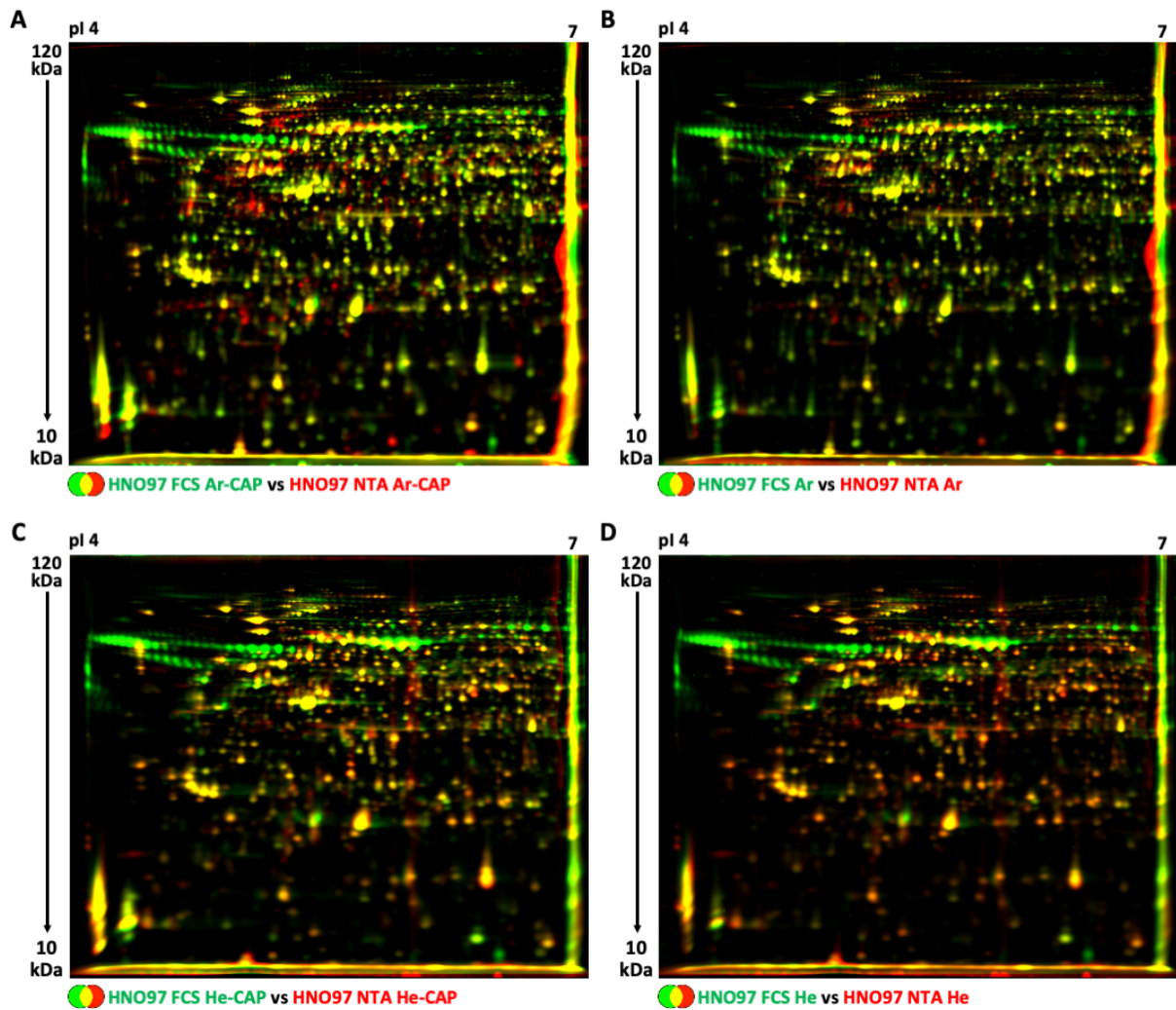


Abbildung 13: Overlays von HNO97-Karzinomzellen mit Gegenüberstellung der Serien FCS und NTA unter gleicher Behandlungsform. Die Proben wurden im 2D-DIGE nach isoelektrischem Punkt (pI) von 4-7 und einem molekularen Gewicht von 10-120 kDa aufgetrennt. Regulierte Proteine wurden rot für eine vermehrte Expression durch NTA und grün für FCS dargestellt. Über alle Overlays (A-D) ließen sich qualitative Unterschiede zwischen FCS und NTA nachweisen.

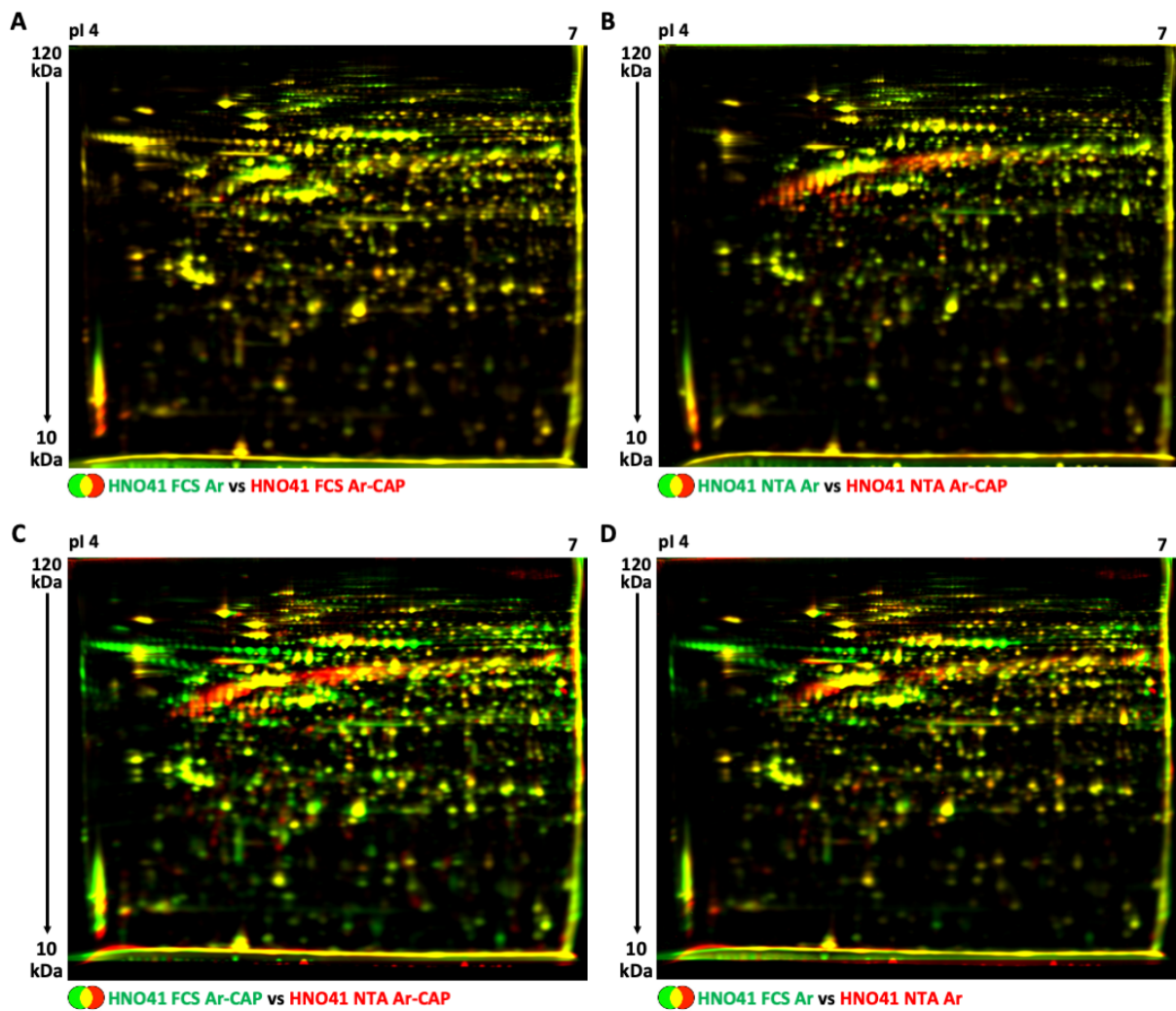


Abbildung 14: Overlays von HNO41-Karzinomzellen. Gegenüberstellung der CAP-behandelten Proben und ihren entsprechenden Gaskontrollen (**A und B**) und dem Vergleich von NTA und FCS bei gleicher Behandlungsform (**C und D**). Die Proben wurden im 2D-DIGE nach isoelektrischem Punkt (pI) von 4-7 und einem molekularen Gewicht von 10-120 kDa aufgetrennt. Regulierte Proteine wurden rot für eine vermehrte Expression durch CAP und grün in der Gaskontrolle in **A und B**, sowie rot für vermehrte Proteinexpression unter NTA und grün unter FCS in **C und D** dargestellt.

5.4 Hauptkomponentenanalyse

Mit Hilfe des *Tigr MultiExperiment Viewer* (TMeV, implementiert in Delta 2D) erfolgte durch die Normalisierung der Graustufen mittels internen Standards die Berechnung der relativen Proteinexpression von jedem Spot auf jedem Gel. Dies ermöglichte den Vergleich des selben Spots unter unterschiedlichen Behandlungsbedingungen. Es folgte eine Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA), welche die Dimensionenzahl des Datensatzes reduziert und Datenpunkte mit der größten Varianz abbildete. Dabei wurde jede Probe durch einen 2083-dimensionalen Vektor, definiert durch 2083 Spotdetektionen in Delta 2D, beschrieben. Für 2083 Spotdetektionen auf 30 Gelen ergaben sich so 62490 Datenpunkte. Nach der Reduktion der Dimensionen konnten die Komponenten in einem zweidimensionalen Koordinatensystem nach der größten Varianz im n-dimensionalen Raum abgebildet werden. Ähnliche Proben ließen sich in Clustern zusammenfassen. Unterschiede zwischen Proben wurden durch einen entsprechend großen Abstand im Koordinatensystem dargestellt. Die Auftragsungen aller Komponenten gegeneinander ist im Anhang (Abb. 56-67) aufgeführt.

Es wurde eine PCA aller Zelllinien sowie separat für jede Zelllinie erstellt. Die dargestellten Komponenten erklärten die Größen der Varianz wie folgt:

Tabelle 37: Prozentueller Anteil der Hauptkomponenten 1 bis 3 an der Gesamtvarianz in der Hauptkomponentenanalyse.

Zelllinie	Komponente 1	Komponente 2	Komponente 3	Gesamt
Alle	26,36%	20,73%	13,94%	61,03%
S9	29,82%	22,81%	18,93%	71,56%
HNO97	39,49%	23,75%	20,60%	83,84%
HNO41	50,31%	32,15%	17,54%	100%

5.4.1 Hauptkomponentenanalyse aller Zelllinien

Die PCA aller Zelllinien vereinen durch die ersten drei Komponenten 61,03% aller Varianzen (Tab. 37). Zur Übersichtlichkeit erfolgte die Betrachtung der Komponenten in zweidimensionaler Auftragung (Abb. 15). Eine Ähnlichkeit zwischen Proben und den dazugehörigen Proteinidentifikationen wurde anhand einer graphischen Nähe dargestellt.

Die erste Komponente vereint 26,36 % und trennt die Proben und ihre Proteinidentifikationen nach Zelllinien. Die so entstehenden Cluster in der Auftragung der Komponenten 1 und 2 ließen sich eindeutig voneinander separieren (A, Abb. 15). Die Komponente 2 (20,73 % der Gesamtvarianz) trennte die Proben zwischen NTA und FCS und damit in weitere kleinere Cluster. Die dritte Komponente vereint 13,94 % der Gesamtvarianz und unterteilte die Proben zwischen CAP-Behandlung und Gaskontrolle (B, Abb. 15).

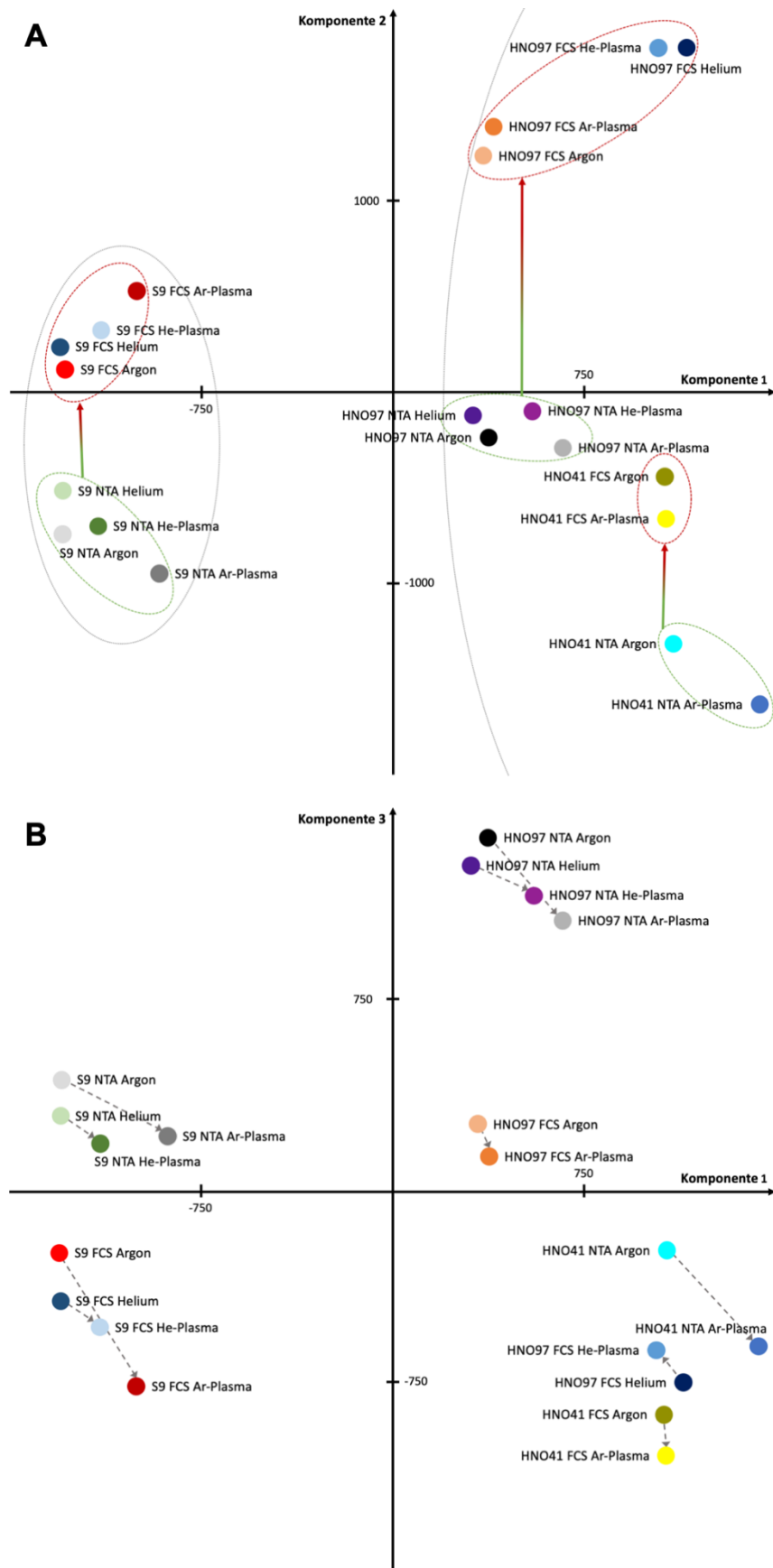


Abbildung 15: Hauptkomponentenanalyse aller Proben mit Darstellung der Komponenten 1 bis 3. Die drei Komponenten ergaben ca. 61% der Varianz. In **A** wurde die Komponente 1 gegen Komponente 2 aufgetragen. Die Komponente 1 trennte die Proben zwischen Epithelzellen (links) und Karzinomzellen (rechts). Die Komponente 2 zeigte die Trennung zwischen NTA (grüne Kreise) und FCS (rote Kreise) auf. In **B** wurde die Komponente 1 gegen die Komponente 3 aufgetragen. Die Komponente 3 veranschaulichte den CAP-bedingten Effekt zwischen Behandlung und Gaskontrolle (Pfeile zwischen den Paaren). Bis auf in dem Paar „HNO97 FCS Helium und HNO97 FCS He-Plasma“ erfolgte eine Änderung in gleicher Richtung.

5.4.2 Hauptkomponentenanalyse in S9-Epithelzellen

Die PCA der S9-Epithelzellen (Abb. 16) gruppiert ähnliche Proben anhand der Hauptkomponenten. Eine erste Einteilung erfolgt anhand der Komponente 1, welche 29,82 % der Gesamtvarianz aller Proteinidentifikationen in S9-Epithelzellen vereint (Tab. 37). Durch eine Analyse der graphischen Darstellung der Hauptkomponenten gegeneinander ließen sich Merkmale für die Differenzierung von unterschiedlichen Proben herausarbeiten. So trennte die Komponente 1 die Proben der S9-Epithelzellen nach verwendetem Serum und die Komponente 2 (22,81 % der Gesamtvarianz) nach Quellgas (A, Abb. 16). Die Komponente 3 nahm 18,93 % der Gesamtvarianz ein und differenzierte zwischen Plasmabehandlung und Gaskontrolle (B, Abb. 16).

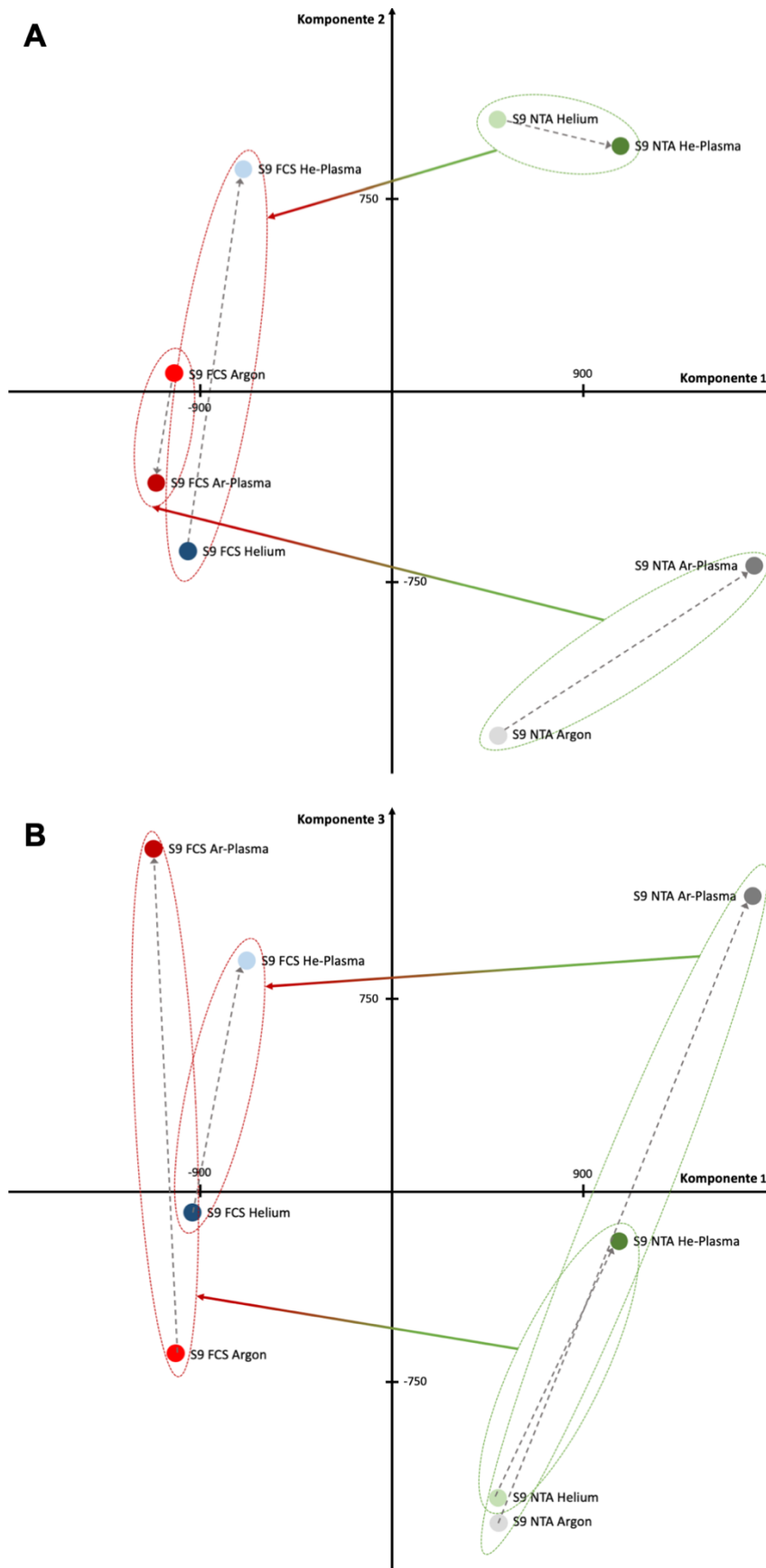


Abbildung 16: Hauptkomponentenanalyse der S9-Epithelzellen mit Darstellung der Komponenten 1 bis 3. Die drei Komponenten ergaben zusammen ca. 71,6% der Varianz. In **A** erfolgte die Auftragung der Komponente 1 gegen Komponente 2. Die Komponente 1 trennte die Proben nach verwendetem Serum. NTA-kultivierte Proben wurden grün, FCS-Proben rot eingekreist. Die Komponente 2 trennte die Proben nach verwendetem Quellgas. In **B** wurde die Komponente 1 gegen Komponente 3 aufgetragen. Die Komponente 3 verdeutlichte den plasmabedingten Effekt. Die Gaskontrollen standen jeweils getrennt von den CAP-behandelten Proben. Der Effekt mit Ar-CAP war stärker ausgeprägt (größerer Abstand) als der von He-CAP.

5.4.3 Hauptkomponentenanalyse in HNO97-Karzinomzellen

Die PCA der Proteinidentifikationen in HNO97-Karzinomzellen vereinte mit 3 Hauptkomponenten 83,84 % der Gesamtvarianz (Tab. 37). Zur Analyse der Unterschiede zwischen den Proben erfolgte eine graphische Auftragung der Komponenten gegeneinander (Abb. 17). Die Komponente 1 (39,49 % der Gesamtvarianz) veranschaulichte eine Trennung der Proben von HNO97-Karzinomzellen nach verwendetem Serumzusatz zum Medium bei der Zellkultivierung. Die Komponente 2 (23,75 % der Gesamtvarianz) unterteilte die Proteinidentifikationen in den Proben der HNO97-Karzinomzellen nach verwendetem Quellgas (A, Abb. 17).

Die Komponente 3 nimmt 20,6 % der Gesamtvarianz ein und verdeutlichte den CAP-bedingten Effekt (B, Abb. 17)

5.4.4 Hauptkomponentenanalyse in HNO41-Karzinomzellen

Zur Darstellung von Unterschieden zwischen den behandelten Proben von HNO41-Karzinomzellen und ihren Proteinidentifikationen erfolgte eine graphische Auftragung der ersten 3 Komponenten gegeneinander (Abb. 18). Die drei Komponenten vereinten 100 % der Gesamtvarianz (Tab. 37). Für HNO41-Karzinomzellen wurden Proben mit Ar-CAP behandelt.

Die Komponente 1 nahm mit 50,31 % den Großteil der Gesamtvarianz ein und trennte die Proben nach verwendetem Serum zur Kultivierung der Zellen auf. Die Komponente 2 (32,15 % der Gesamtvarianz) unterteilte die Proben nach CAP-bedingtem Effekt (A, Abb. 18).

Eine genaue Deklaration der Einteilung der Proben anhand der Komponente 3 (17,54 % der Gesamtvarianz) war durch die graphische Darstellung nicht möglich (B, Abb. 18).

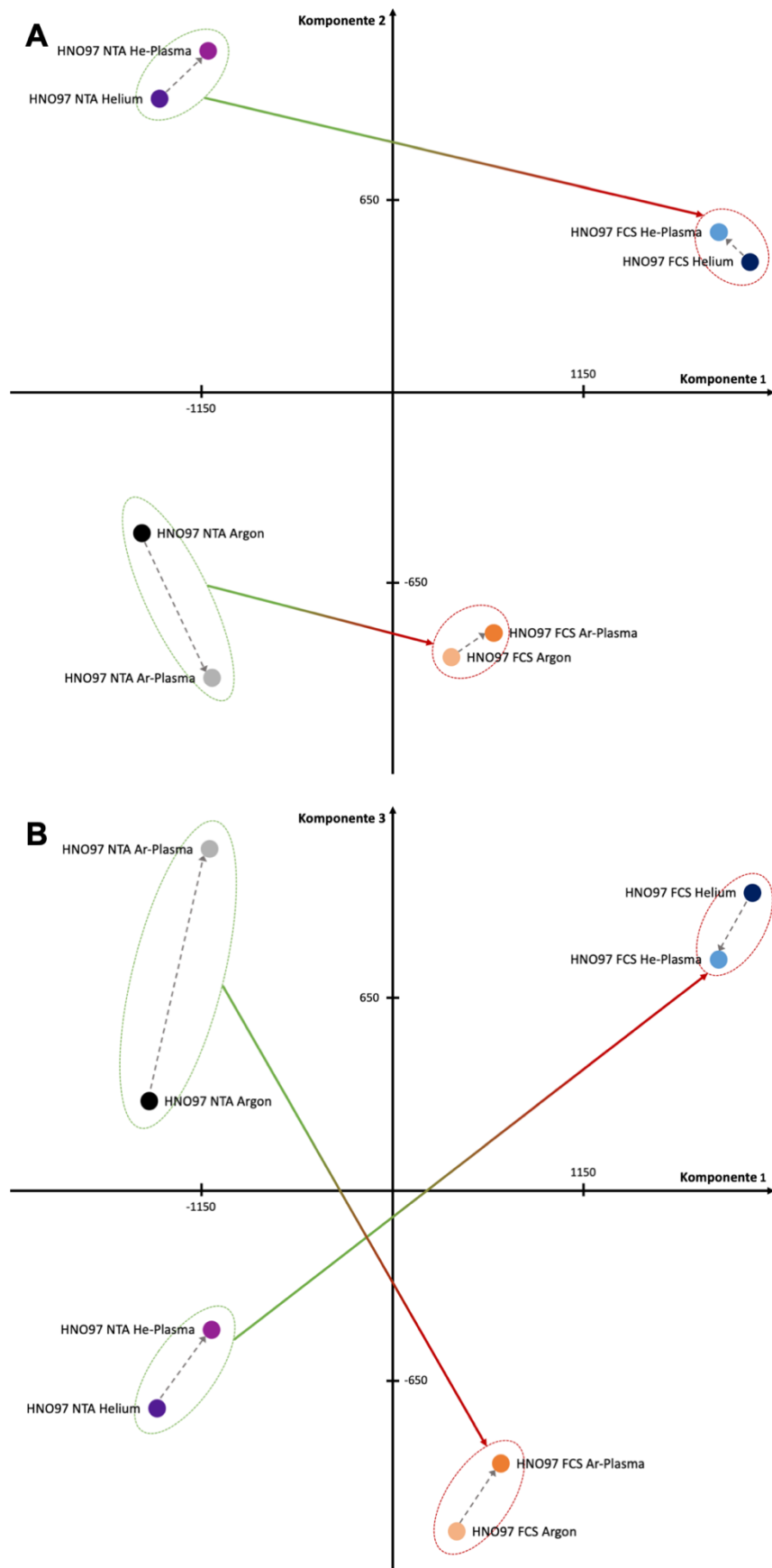


Abbildung 17: Hauptkomponentenanalyse der HNO97-Karzinomzellen mit Darstellung der Komponenten 1 bis 3. Die drei Komponenten ergaben zusammen 83,8% der Gesamtvarianz. In **A** erfolgte die Auftragung der Komponente 1 gegen Komponente 2. Die Komponente 1 trennte die Proben nach verwendetem Serum. NTA-Proben wurden grün, FCS-Proben rot eingekreist. Die Komponente 2 trennte die Proben nach verwendetem Quellgas. In **B** wurde die Komponente 1 gegen Komponente 3 aufgetragen. Die Komponente 3 verdeutlichte den CAP-bedingten Effekt.



Abbildung 18: Hauptkomponentenanalyse der HNO41-Karzinomzellen mit Darstellung der Komponenten 1 bis 3. Die größten drei Komponenten machten zusammen 100% der Varianz aus. In **A** erfolgte die Auftragung der Komponente 1 gegen Komponente 2. Die Komponente 1 trennte die Proben nach verwendetem Serum. NTA-Proben wurden grün, FCS-Proben rot eingekreist. Die Komponente 2 verdeutlichte den Effekt von Ar-CAP. In Abbildung **B** wurde die Komponente 1 gegen Komponente 3 aufgetragen.

5.5 Hierarchisches Clustering regulierter Proteine

Anhand der Hauptkomponentenanalyse wurde ein hierarchisches Cluster über alle Proben gegenüber allen regulierten Proteinen erstellt. Das hierarchische Clustering veranschaulichte Gemeinsamkeiten und stellte Beziehungen zwischen Proben aus einem großen Datensatz her (Abb. 19). Jede Spalte repräsentierte die Proteinveränderungen in der jeweiligen Probe. Proteine mit erhöhter Expression im Vergleich zu ihrer Kontrolle wurden rot, verminderte Proteinexpressionen grün dargestellt. Wurde das Protein in der Probe nicht detektiert, war ein graues Viereck dargestellt.

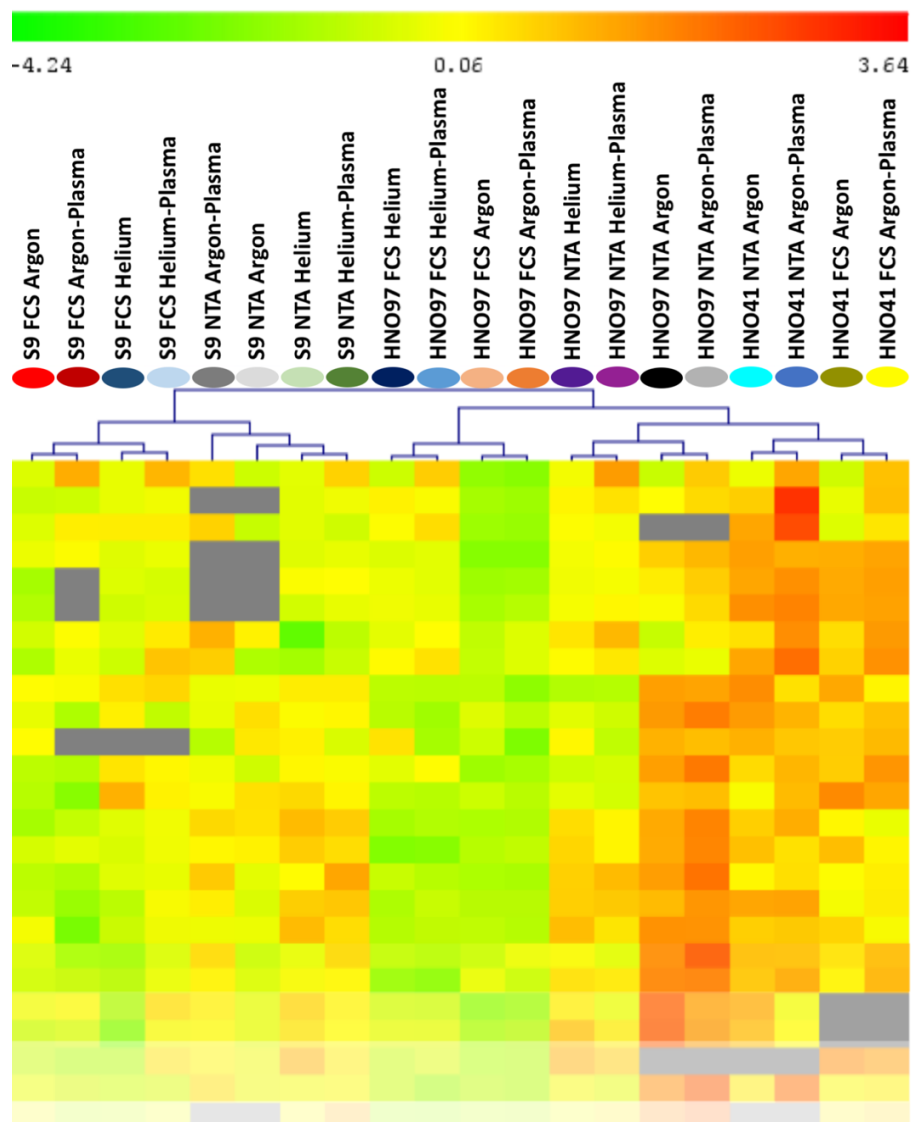


Abbildung 19: Hierarchisches Cluster über alle Proben mit Normalisierung der CAP-behandelten Proben auf die entsprechenden Gaskontrollen. Eine erste Trennung erfolgte nach Zelllinie. Die weitere Unterteilung innerhalb der Zelllinien war nach verwendetem Serum (FCS und NTA) und eine abschließende Unterteilung zwischen verwendetem Quellgas. Die grünlichen Vierecke entsprechen Proteinen mit verminderter Expression. Die rötlichen Vierecke entsprechen Proteinen mit erhöhter Expression. Die jeweilige Farbintensität verdeutlichte die Stärke der Regulation. Graue Vierecke zeigten einen fehlenden Nachweis einer Proteinregulation in der Probe.

Eine erste Trennung der Proben erfolgte zelllinienspezifisch zwischen Epithelzellen und Karzinomzellen. Des Weiteren trennte das Cluster für jede Zelllinie zwischen den verwendeten Serien FCS und NTA. Eine letzte Aufteilung erfolgte nach verwendetem Plasma. Eine komplette Aufführung des Clusters findet sich im Anhang (Abb. 55).

Um die beschriebenen Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsformen genauer analysieren zu können, wurden mengenmäßig veränderte Proteine massenspektrometrisch identifiziert.

5.6 Proteinidentifikation

Die Proteinidentifikation wurde durch die Zuordnung massenspektrometrisch analysierter Spots zu einer Datenbank realisiert. Der Vollständigkeit halber erfolgte der Nachweis von bovinen Proteinen zusätzlich zu humanen Proteinen, da bei Verwendung von FCS Bestandteile des Mediums in die Zellen aufgenommen und weiter prozessiert werden.

Die Identifikationen wurde mit Hilfe der Delta 2D-Software den Quantifizierungen zugeordnet und anschließend mittels *PANTHER Protein Classification System* und IPA weiter analysiert. Hier wurden lediglich die humanen Proteine einbezogen.

5.6.1 Proteinidentifikation mittels Maldi-TOF-MS/MS

Für die massenspektrometrische Analyse durch die Maldi-TOF-MS wurden ausschließlich Proteinspots analysiert, die mindestens zweimal auf verschiedenen präparativen Gelen in Delta 2D als reguliert identifiziert wurden. So wurde bei ausbleibender Proteinidentifikation aus der Maldi-TOF-MS/MS die Möglichkeit zur Identifikation in der nLC-ESI-MS/MS gewahrt. Von den ausgewählten 144 Spots konnten 38 Proteinspots mit jeweils einer Proteinidentifikation identifiziert werden (Tab. 38). Den 38 Proteinspots konnten 26 verschiedene Proteine zugeordnet werden. Aufgrund der geringen Identifikationsrate von nur 26 % wurden alle weiteren Proben in der nLC-ESI-MS/MS gemessen. In einem Fusionsgel wurden die entsprechenden Spots mit Protein-ID gekennzeichnet (Abb. 20). Aus der quantitativen Bildanalyse der Delta 2D-Software ergab sich der *fc*-Wert für den jeweiligen identifizierten Proteinspot.

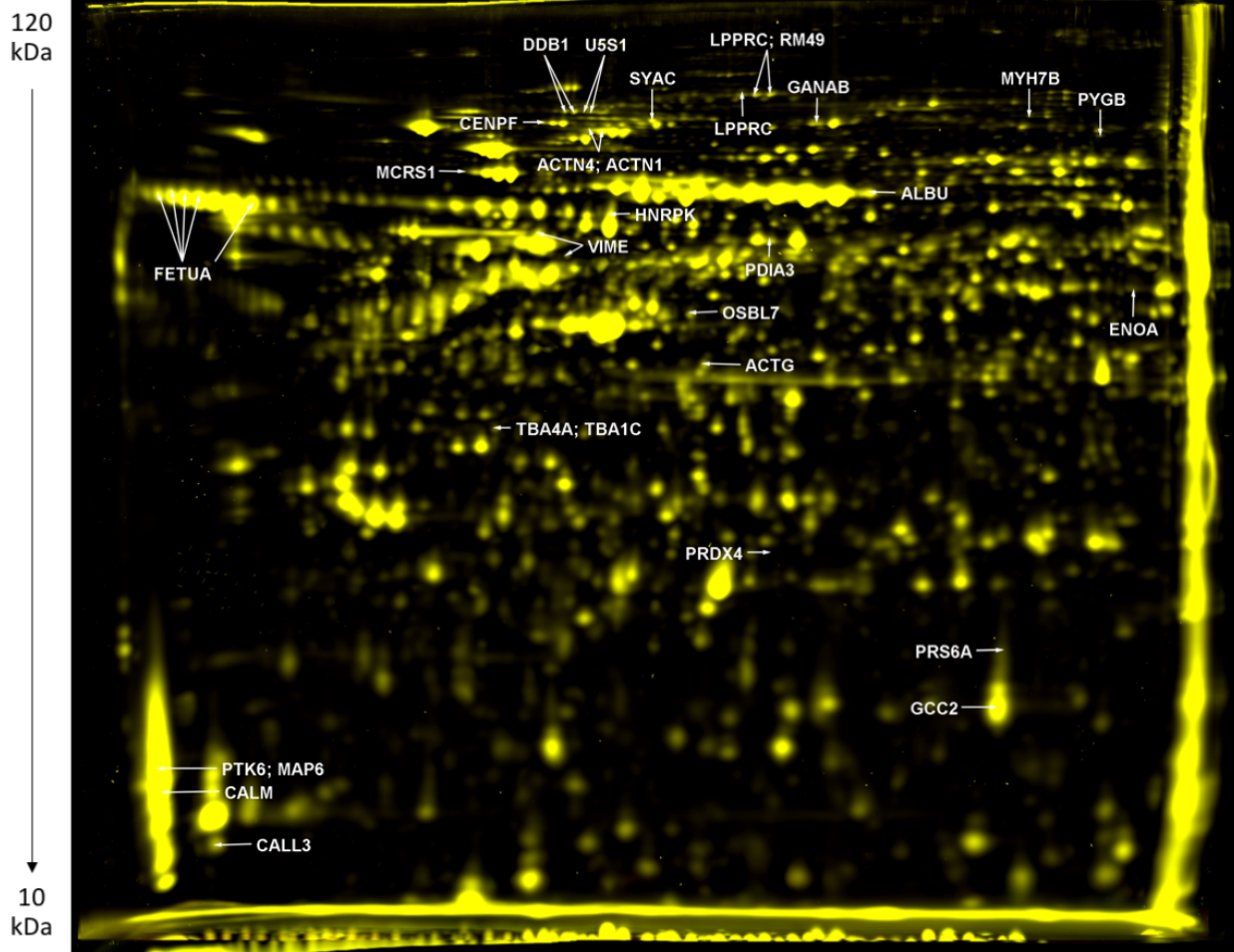


Abbildung 20: Proteinidentifikationen der Maldi-TOF-MS/MS dargestellt auf einem digitalen Fusionsbild in Delta 2D. Die 38 identifizierten Proteine aus 144 ausgeschnittenen Proteinspots wurden in Delta 2D mit Gennamen beschriftet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach isoelektrischen Punkt (pI) in einem pH-Bereich von 4 bis 7 und molekularer Masse von 10 kDa bis 120 kDa. Die ausführliche Proteinbezeichnung und der *fc*-Wert aus der Delta 2D-Software ist der Tab. 38 zu entnehmen.

Tabelle 38: Proteinidentifikationen detektiert durch die Maldi-TOF-MS/MS sortiert nach Protein-ID mit Angabe des Proteinscores aus der Massenspektrometrie. Der zugehörige *Fold-Change*-Wert (*fc*-Wert) ergab sich aus der Zuordnung und Berechnung in der Delta 2D-Software.

Spotlabel	Protein-ID	Proteinbezeichnung	Proteinscore	fc-Wert
S9-N-AP_48	ACTG	Actin, cytoplasmatic 1	415	2,694
HNO97-N-Ac_28	ACTN4	Alpha-Actinin-4	70,7	0,487
HNO97-N-Ac_28	ACTN1	Alpha-Actinin-1	68,9	0,487
HNO97-N-Ac_31	ACTN4	Alpha-Actinin-4	177	0,422
HNO97-N-Ac_31	ACTN1	Alpha-Actinin-1	141	0,422
S9-F-AP_19	ALBU	Serum Albumin	133	2,079
HNO97-F-AP_64	CALL3	Calmodulin-like Protein 3	117	3,310
S9-F-AP_80	CALM	Calmodulin	120	4,409
HNO41-F-Ac_15	CENPF	Centromer Protein F	69,1	2,757
HNO97-N-Ac_15	DDB1	DNA damage-binding Protein 1	198	0,335
HNO41-F-Ac_10	DDB1	DNA damage-binding Protein 1	247	0,296
HNO41-F-Ac_12	DDB1	DNA damage-binding Protein 1	243	0,352
S9-F-Ac_120	ENOA	Alpha-Enolase	157	0,363
S9-F-AP_09	FETUA	Alpha-2-HS-Glykoprotein	90,8	2,756
S9-F-AP_10	FETUA	Alpha-2-HS-Glykoprotein	178	2,922
S9-F-AP_11	FETUA	Alpha-2-HS-Glykoprotein	105	2,991
S9-F-AP_15	FETUA	Alpha-2-HS-Glykoprotein	121	2,970
S9-F-AP_20	FETUA	Alpha-2-HS-Glykoprotein	250	2,873
HNO97-N-Ac_27	GANAB	Neutral Alpha-Glucosidase AB	73,7	0,493
S9-F-AP_77	GCC2	GRIP and coiled-coil domain-containing Protein 2	80	4,037
S9-N-Ac_14	HNRPK	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein	120	0,355
HNO41-F-Ac_03	LPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein	107	0,389
HNO41-F-Ac_02	LPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein	134	0,328
HNO97-N-Ac_06	LPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein	209	0,352
HNO97-N-Ac_06	RM49	39S ribosomal protein L49	71,1	0,352
HNO97-N-Ac_08	LPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein	229	0,379
HNO97-N-Ac_08	RM49	39S ribosomal protein L49	71,2	0,379

Spotlabel	Protein-ID	Proteinbezeichnung	Proteinscore	fc-Wert
S9-F-AP_05	MCRS1	Microsperule Protein 1	68,5	4,840
S9-N-AP_03	MYH7B	Myosin-7B	69,1	2,789
S9-N-AP_37	OSBL7	Oxysterol-binding protein-related protein	67,7	7,905
S9-F-Ac_111	PDIA3 <i>p</i>	Proteindisulfidisomerase A3	116	0,402
HNO97-F-AP_38	PRDX4	Peroxiredoxin-4	206	11,683
S9-N-AP_85	PRS6A	26S Protease regulatory subunit 6A	70,1	4,893
S9-F-AP_79	PTK6	Protein-tyrosine Kinase	73,8	2,453
S9-F-AP_79	MAP6	Microtubule-associated Protein	70,8	2,453
HNO97-F-Ac_14	PTRF	Polymerase I and transcript relaease factor	145	0,392
HNO97-N-Ac_33	PYGB	Glycogen Phosphorylase, brain form	176	0,480
S9-F-Ac_83	SYAC	Alanin-tRNA-Ligase, cytoplasmatic	78,3	0,347
S9-N-AP_61	TBA1C	Tubulin Alpha-1C chain	104	5,713
S9-N-AP_61	TBA4A	Tubulin Alpha-4A chain	112	5,713
HNO41-F-Ac_45	U5S1	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	69	0,455
HNO97-N-Ac_17	U5S1	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	126	0,421
S9-F-Ac_109	VIME	Vimentin	347	0,306
S9-F-Ac_116	VIME	Vimentin	81,7	0,208

5.6.2 Proteinidentifikation mittels nLC-ESI-MS/MS

Aufgrund der Identifikationsrate von 26% in der Maldi-TOF-MS/MS wurden 546 weitere Proben mit Hilfe der nLC-ESI-MS/MS analysiert. Von den 546 Proteinspots wurden bei 449 Proteinspots mindestens zwei Peptide signifikant identifiziert. Dies ergab eine Identifikationsrate von 82,2 %. Die identifizierten 449 Proteinspots beinhalteten 1149 Proteinidentifikationen (Tab. 39). Eine ausführliche Darstellung der identifizierten Proteine mit Label, Protein-ID, Proteinbezeichnung, Proteinscore und *fc*-Wert aus der Delta 2D-Software ist tabellarisch im Anhang aufgeführt (Tab. 45). Die Proteinidentifikation erfolgte für humane und bovine Proteine. Dabei wurden 633 humane Proteine und 516 bovine Proteine in den ausgeschnittenen Spots identifiziert. Nach Streichung der Duplikate ergab sich der Nachweis von 176 unterschiedlichen humanen Proteinen und 54 unterschiedlichen bovinen Proteinen.

Tabelle 39: Übersichtsdarstellung der Anzahl der identifizierten Proteine in der nLC-ESI-MS/MS. Die Anzahl der unterschiedlichen Proteine nach Streichung der Duplikate ist in Klammern angegeben. Für detaillierte Ausführung siehe Anhang (Tab. 45).

Plasmaquelle	Zelllinie	Medium	Plasma	Proteinidentifikationen	
				Human	Bovin
kINPen 09	S9	FCS	Argon	82 (37)	112 (27)
	S9	NTA	Argon	87 (46)	79 (20)
Prototyp	S9	FCS	Helium	98 (48)	58 (12)
	S9	NTA	Helium	30 (18)	28 (10)
kINPen 09	HNO97	FCS	Argon	55 (30)	21 (10)
	HNO97	NTA	Argon	78 (27)	37 (10)
Prototyp	HNO97	FCS	Helium	46 (32)	34 (17)
	HNO97	NTA	Helium	44 (29)	25 (14)
kINPen 09	HNO41	FCS	Argon	46 (27)	42 (17)
	HNO41	NTA	Argon	67 (39)	79 (19)
Gesamt:				633 (176)	516 (54)

Bei mehrfachen Spots in unterschiedlichen Gelen wurden kongruente Proteinspots der jeweiligen Gele entsprechend übertragen. Aus vorhergehenden Versuchen ist bekannt, dass es sich bei kongruenten Proteinspots um die gleichen Proteine handelt [47]. Dadurch erhöhte sich die Zahl der identifizierten Proteinspots einschließlich der Ergebnisse der Maldi-TOF-MS/MS auf 620 identifizierte Spots mit 1309 Proteinidentifikationen und 187 verschiedenen humanen Proteinen.

5.7 Proteinkategorisierung mittels *PANTHER Protein Classification System*

Nach Identifikation der Proteine aus signifikant regulierten Spots durch massenspektrometrische Analyse erfolgte eine erste Einteilung der Proteine anhand des *PANTHER Protein Classification System* (Version 13.1, www.pantherdb.org). Die Datenbank ordnet den Datensatz der humanen Proteine nach ihrer Funktion. Aus den 187 unterschiedlichen humanen Proteinen konnte 4 Proteinen keine Funktion zugeordnet werden (Tab. 44).

Tabelle 40: Anzahl der Proteinidentifikationen und der Proteine nach *PANTHER Protein Classification System*. Die Proteine mit „unbekannter Funktion“ wurde in Klammern angegeben.

Zelllinie	Spotidentifikation	Proteinidentifikation	Proteine
S9	325	632	116 (3)
HNO97	167	428	74 (1)
HNO41	128	249	59 (0)
Gesamt:	620	1309	187 (4)

5.7.1 Einordnung veränderter Proteine nach molekularer Funktion

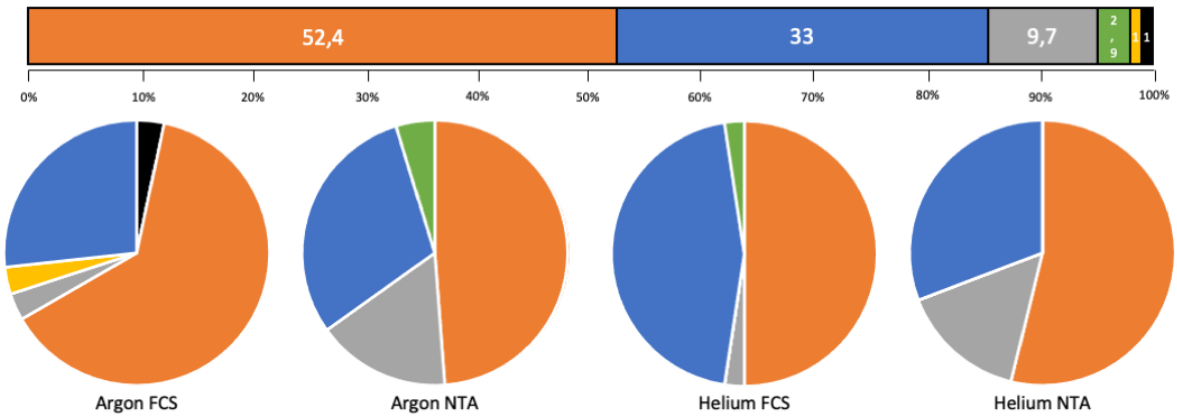
Mittels *PANTHER Protein Classification System* konnten den identifizierten humanen Proteinen sieben molekulare Funktionen zugeordnet werden. Die Zuordnung erfolgte separat für jede Zelllinie mit Hilfe eines Balkendiagramms, gebildet aus dem arithmetischen Mittel der einzelnen Behandlungsformen. Zur Darstellung der einzelnen Behandlungsformen wurden Kreisdiagramme erstellt (Abb. 21).

Hauptsächlich wurden durch die Applikation von CAP Proteine für die folgenden molekularen Funktionen verändert: „Zelluläre Bindung“, „Katalytische Aktivität“ und „Strukturmolekülaktivität“ (Abb. 21).

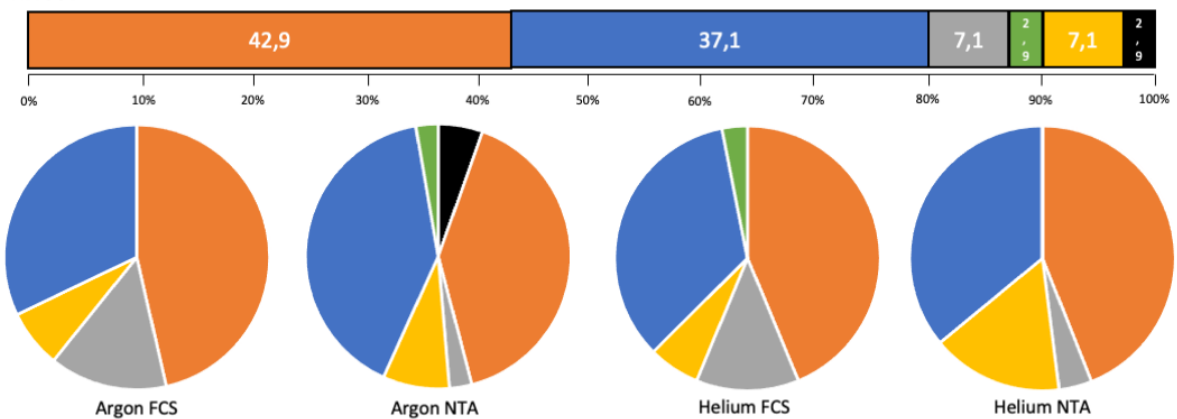
Die Analyse durch das *PANTHER Protein Classification System* trifft lediglich grundsätzliche Aussagen über eine Regulation der Proteine und vernachlässigt dabei eine vermehrte oder verminderte Proteinmenge nach CAP-Behandlung. Um hierüber Aussagen zu treffen, schloss sich eine IPA des Datensatzes an.

Molekulare Funktionen

S9



HNO97



HNO41

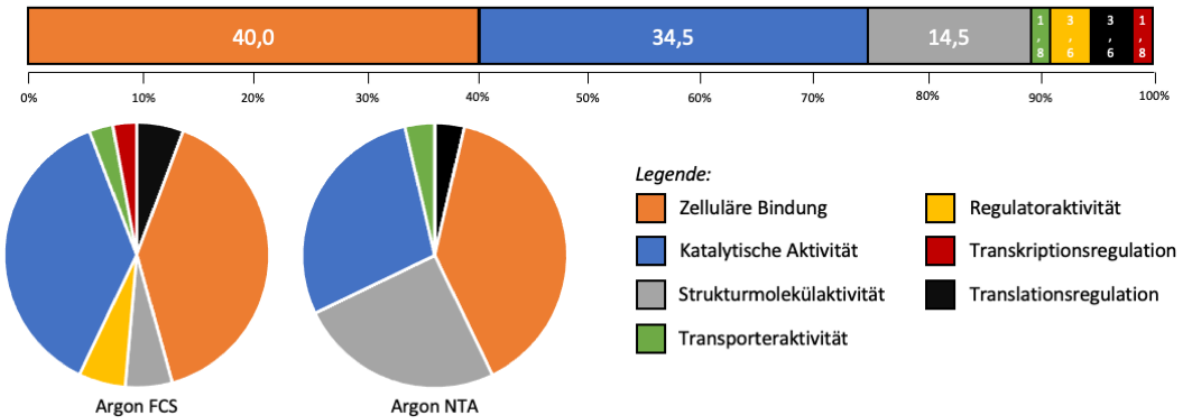


Abbildung 21: Klassifikation mengenmäßig veränderter Proteine nach Behandlung mit CAP nach molekularer Funktion mit Hilfe des PANTHER Protein Classification System. Das Balkendiagramm mit prozentueller Angabe der jeweiligen molekularen Funktion wurde aus dem arithmetischen Mittel der Gesamtheit veränderter Proteine der entsprechenden Zelllinie gebildet. Insgesamt wurden 187 Proteine in ihrer Menge durch CAP verändert, davon 4 mit unklarer molekularer Funktion. Die Gewichtung der einzelnen molekularen Funktionen im Hinblick auf die Behandlungsform (Quellgas und Serum) wurde mit Kreisdiagrammen dargestellt. Hauptsächlich unterliegen die „zelluläre Bindung“, „katalytische Aktivität“ und „Strukturmolekülaktivität“ einer Regulation durch CAP.

5.7.2 Überschneidungsmengen veränderter Proteine

Zur Darstellung von Überschneidungen humaner Proteine in Abhängigkeit der Behandlungsform wurden Venn-Diagramme erstellt (Abb. 22). Anhand dieser ließen sich für die Zelllinien S9, HNO97 und HNO41 Gemeinsamkeiten in den mengenmäßigen Veränderungen der Proteine darstellen.

In allen drei Zelllinien kam es in 9 Proteinen zur Überschneidung. S9-Epithelzellen und HNO97-Karzinomzellen besaßen eine Schnittmenge von 38 in der Menge veränderter Proteine (A, Abb. 22).

Die separate Betrachtung der Einzelzelllinien verdeutlichte Überschneidungen in humanen Proteinen entsprechend der Behandlungsformen (B-D, Abb. 22).

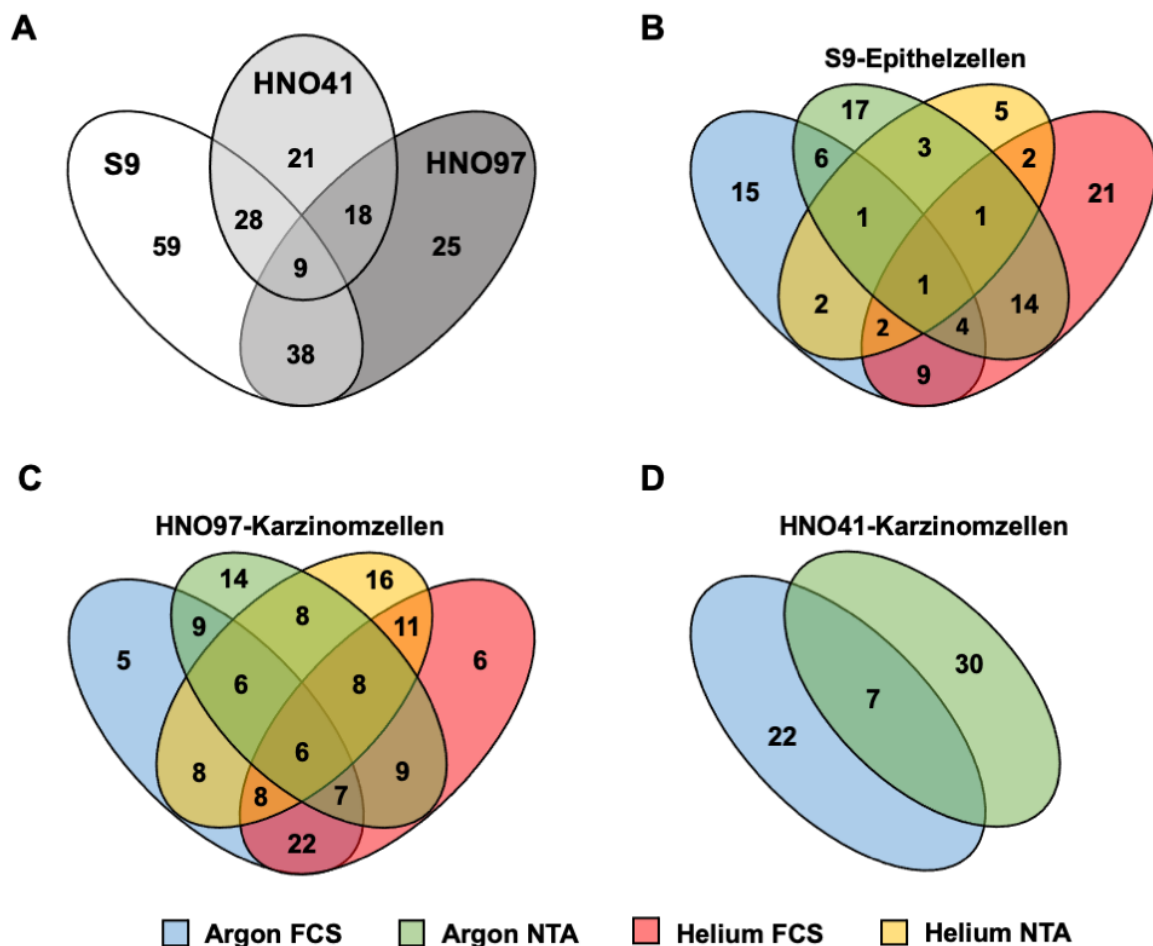


Abbildung 22: Überschneidungen in ihrer Menge veränderter humaner Proteine nach Behandlung mit CAP. Vergleich veränderter Proteinmengen zwischen den behandelten Zelllinien (A) und innerhalb von S9-Epithelzellen (B), HNO97-Karzinomzellen (C) und HNO41-Karzinomzellen (D) in Abhängigkeit der Behandlungsform.

5.7.3 Proteine in Schnittpunkten

Die humanen Proteine, welche die Schnittmengen zwischen den einzelnen Zelllinien innerhalb der Venn-Diagramme (A, Abb. 22) ausmachten, ließen sich herausarbeiten und tabellarisch darstellen (Tab. 41). Exemplarisch wurden hier die 9 Überschneidungen in ihrer Menge veränderter Proteine zwischen allen Zelllinien und die 19 Überschneidungen zwischen HNO97- und HNO41-Karzinomzellen aufgeführt.

Tabelle 41: Detaillierte Auflistung der in ihrer Menge veränderten humanen Proteine in den Schnittmengen zwischen allen Zelllinien und HNO97-Karzinomzellen und HNO41-Karzinomzellen. Angabe der UniProt ID zum entsprechenden Protein.

Alle Zelllinien (9 Proteine)

UniProt ID	Humanes Protein
DDAH2	<i>N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2</i>
HS71L	<i>Heat shock 70 kDa protein 1-like</i>
IGKC	<i>Immunoglobulin kappa constant</i>
MARCS	<i>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i>
PYC	<i>Pyruvate carboxylase, mitochondrial</i>
SYAC	<i>Alanine-tRNA ligase, cytoplasmic</i>
VATB2	<i>V-type proton ATPase subunit B, brain isoform</i>
XRCC5	<i>X-ray repair cross-complementing protein 5</i>
STML2	<i>Stomatin-like protein 2, mitochondrial</i>

HNO97- & HNO41-Karzinomzellen (18 Proteine)

UniProt ID	Humanes Protein
ACTN1	<i>Alpha-actinin-1</i>
DDAH2	<i>N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2</i>
ENOA	<i>Alpha-enolase</i>
ERAP1	<i>Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1</i>
G3P	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HS71L	<i>Heat shock 70 kDa protein 1-like</i>
IGKC	<i>Immunoglobulin kappa constant</i>
IMB1	<i>Importin subunit beta-1</i>
MARCS	<i>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i>
ODO1	<i>2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial</i>
PYC	<i>Pyruvate carboxylase, mitochondrial</i>
PYGB	<i>Glycogen phosphorylase, brain form</i>
SEMG1	<i>Semenogelin-1</i>
SYAC	<i>Alanine-tRNA ligase, cytoplasmic</i>
TGM3	<i>Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K</i>
VATB2	<i>V-type proton ATPase subunit B, brain isoform</i>
XRCC5	<i>X-ray repair cross-complementing protein 5</i>
STML2	<i>Stomatin-like protein 2, mitochondrial</i>

5.8 Ingenuity Pathway Analysis

Zur Analyse der CAP-bedingten Effekte im physiologischen Kontext wurde der Datensatz aller identifizierten und regulierten Proteine exportiert und durch die IPA in Netzwerken zusammengefasst (Abb. 24-26). Dies ermöglichte die Identifikation von Regulationsproteinen, Signalpfaden und molekularen sowie zellulären Funktionen. Anhand von Netzwerken wurden Interaktionen zwischen Proteinen graphisch dargestellt.

5.8.1 Regulatorproteine

Aufgrund von in der Literatur beschriebenen Interaktionen kann nach abgeschlossener Proteinidentifikation der mengenmäßig veränderten Proteine mit Hilfe der IPA auf zentrale Regulatoren für Stoffwechselwege geschlossen werden. Grundlage hierfür bildet der z-Score, welcher sich aus der Deduktion von Interaktionen der veränderten Proteinmengen errechnet. Die identifizierten Regulatorproteine werden mit statistischer Signifikanz ab einem z-Score von >2 bzw. <-2 als aktiviert bzw. inhibiert angesehen (Tab. 42). Für alle Werte gilt $p < 0,05$, errechnet mittels exaktem Fisher-Test via IPA.

Für die meisten Regulatorproteine konnte eine statistische Signifikanz nicht erreicht werden. Dennoch war auch bei niedrigerem z-Score von einer Affektion der entsprechenden Regulatorproteine auszugehen. Über die zehn analysierten Proben ergaben sich Hinweise auf die Beeinflussung von p53, TGFB, *Heat Shock Factor 1* (HSF1) und *Nuclear Respiratory Factor 2* (NRF2).

Der Regulator p53 konnte wiederkehrend über alle Proben gefunden werden. Das Protein kann unterschiedlichen Modifikationen unterliegen, welche die Funktion beeinflussen.

Der oxidative Stress führte in Karzinomzellen im Vergleich zu korrespondierenden Gaskontrollen zu einer vermehrten Expression von TGFB.

Mit NRF2 wurde ein Aktivator der Proteintranskription als Reaktion auf den oxidativen Stress durch die Plasmabehandlung in S9-Epithelzellen reguliert. Zusätzlich ließ sich über die meisten Proben eine Affektion von HSF1 nachweisen (Tab. 42).

Tabelle 42: Regulatorproteine nach IPA aufgeteilt nach Behandlungsform. Inhibierte Regulatoren sind grün, aktivierte Regulatoren rot unterlegt. Die Hinweise auf die Regulationsrichtung ergeben sich aus der in ihrer Menge veränderten Proteine durch CAP-Behandlung, die im Zusammenhang mit den Regulatoren stehen.

S9-Epithelzellen				HNO97-Karzinomzellen				HNO41-Karzinomzellen	
FCS Argon	FCS Helium	NTA Argon	NTA Helium	FCS Argon	FCS Helium	NTA Argon	NTA Helium	FCS Argon	NTA Argon
p53 (0,86)	p53 (1,18)	p53 (1,36)	p53 (1,71)	p53 (-1,74)	p53 (1,06)	p53 (0,57)	p53 (-1,62)	p53 (0,94)	p53 (-0,06)
TGFB (-0,14)	TGFB (0,55)			TGFB (0,97)	TGFB (1,39)	TGFB (2,18)	TGFB (1,41)	TGFB (2,17)	TGFB (1,42)
HSF1 (0,78)	HSF1 (0,21)	HSF1 (0,00)	HSF1 (-0,92)	HSF1 (0,16)	HSF1 (-0,58)				HSF1 (-0,96)
NRF2 (0,24)		NRF2 (0,37)	NRF2 (0,22)	NRF2 (-2,00)	NRF2 (1,41)				
KRAS (0,64)		KRAS (0,00)	KRAS (0,85)	KRAS (-2,21)	KRAS (1,07)				KRAS (1,25)
TNF (-1,72)	TNF (1,46)						TNF (0,15)	TNF (-0,14)	TNF (-0,35)
RICTOR(-1,34)		RICTOR(-2,00)		RICTOR(-1,00)					
XBP1 (-0,06)									
	HNF4A (1,07)								
		HSPA2 (5,22)							
			HSPA5 (-2,12)						
					HIF1A (1,00)				

5.8.2 Involvierte Signalwege, Funktionen und Toxizität

Die IPA führte durch bekannte Interaktionen zwischen Proteinen aus dem gegebenen Datensatz regulierte Zellwege, molekulare Funktionen und Top Tox Listen hierarchisch nach involvierter Proteinzahl auf (Tab. 43). Es wurden jeweils die Top 3 der entsprechenden Kategorie aufgelistet.

Bezüglich der affizierten Zellwege kam es durch die Applikation von CAP zu einer Veränderung in der Stressantwort auf ungefaltete Proteine, Proteinubiquitylierung und Modulation von Adhärenskontakten. Sowohl in Epithelzellen als auch in Karzinomzellen wurde vornehmlich „Zelltod und -überleben“ reguliert. Zusätzlich ergaben sich Hinweise auf eine Regulation der epithelialen Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOS) und des 14-3-3-vermittelten Signalwegs.

In der Kategorie der molekularen Funktionen ließ sich eine zentrale Rolle von „Zelltod- und Überleben“ und „posttranslationale Modifikation“ herausarbeiten. Gleiches galt für die „Top Tox Listen“, in welcher der hauptsächlich beeinflusste Mechanismus nach CAP-Behandlung die Apoptose war. Hier ließen sich zusätzlich die Beeinflussung negativer Akutphaseproteine und eine Checkpoint-Regulation bei DNS-Schäden vermuten (Tab. 43).

Tabelle 43: Übersicht über die Top 3 der hauptsächlich betroffene Signalwege, molekularen/zellulären Funktionen und Top Tox Listen nach Behandlung mit CAP. Hierarchische Auflistung mit Angabe der Überlappung (Zellwege und Top Tox Listen) und Proteinanzahl (Molekulare Funktionen) in Klammern.

Plasmaproben	Top Zellwege	Molekulare Funktionen	Top Tox Listen
S9 FCS Ar-CAP/Ar	Proteinubiquitylierung (10/265) Stressantwort auf ungefaltete Proteine (5/55) Antwort von Akutphaseproteinen (6/170)	Zelltod und -überleben (44) Posttranslationale Modifikation (7) Proteinfaltung (7)	Antwort negativer Akutphaseproteine (3/8) Apoptose (7/289) Mitochondriales Membranpotenzial ↗ (3/50)
S9 FCS He-CAP/He	14-3-3-vermitteltes Signal (6/131) eNOS-Signal (6/172) Stressantwort auf ungefaltete Proteine (4/55)	Zelltod und -überleben (34) Zelluläre Bewegung (24) Zelluläre Organisation (22)	Mitochon. Membranpermeabilität ↘ (2/7) Antwort negativer Akutphaseproteine (2/8) DNS-Schaden: Checkpunkt-Regulation (3/52)
S9 NTA Ar-CAP/Ar	Modulation von Adhärenskontakten (6/69) Stressantwort auf ungefaltete Proteine (5/55) eNOS-Signal (7/172)	Posttranslationale Modifikation (7) Proteinfaltung (7) Zelltod und -überleben (34)	Antwort negativer Akutphaseproteine (3/8) Apoptose (6/549)
S9 NTA He-CAP/He	Stressantwort auf ungefaltete Proteine (4/55) eNOS-Signal (5/172) Proteinubiquitylierung (5/265)	Posttranslationale Modifikation (5) Proteinfaltung (5) Zelltod und -überleben (12)	Apoptose (5/549) HIF-Signal(2/70) Genregulation durch PPAR (2/95)
HNO97 FCS Ar-CAP/Ar	Glykolyse (5/26) Adhärenskontakt-Signal (8/146) eNOS Signaling (6/172)	Zelluläre Bewegung (30) Zelltod und -überleben (36) Zelluläre Organisation (22)	Apoptose (7/549) DNS-Schaden: Checkpunkt-Regulation (2/52) Mitochon. Membranpermeabilität ↘ (1/7)
HNO97 FCS He-CAP/He	Glykolyse (5/26) Adhärenskontakt-Signal (8/146) Modulation von Adhärenskontakten (6/69)	Zelltod und -überleben (44) Zelluläre Bewegung (34) Zelluläres Wachstum und Proliferation (25)	Antwort positiver Akutphaseproteine (3/30) Apoptose (7/549) DNS-Schaden: Checkpunkt-Regulation (2/52)
HNO97 NTA Ar-CAP/Ar	eNOS-Signal (5/172) Clathrinvermitteltes Endozytosesignal (5/199) Stressantwort auf ungefaltete Proteine (3/55)	Zelltod und -überleben (22) Zelluläre Bewegung (13) DNS-Replikation und -Reparatur (4)	Mitochon. Membranpermeabilität ↘ (2/7) Antwort negativer Akutphaseproteine (1/8) Mitochondriale Dysfunktion (2/176)
HNO97 NTA He-CAP/He	eNOS-Signal (5/172) Chemokinsignale (3/71) Clathrinvermitteltes Endozytosesignal (4/199)	Zelltod und -überleben (28) Zelluläre Bewegung (19) Zell-Zell-Signale/Interaktionen (11)	Apoptose (5/549) Mitochon. Membranpermeabilität ↘ (1/7) Antwort negativer Akutphaseproteine (1/8)
HNO41 FCS Ar-CAP/Ar	Modulation von Adhärenskontakten (3/69) Clathrinvermitteltes Endozytosesignal (4/199)	Zelltod und -überleben (28) Posttranslationale Modifikation (11) Proteinfaltung (4)	Mitochon. Membranpermeabilität ↘ (1/7) Antwort negativer Akutphaseproteine (1/8)
HNO41 NTA Ar-CAP/Ar	Modulation von Adhärenskontakten (7/69) 14-3-3-vermitteltes Signal (8/131) Adhärenskontakt-Signal (7/146)	Zelltod und -überleben (28) Zell-Zell-Signale/Interaktionen (11) Zelluläre Bewegung (19)	Apoptose (6/549) Mitochon. Membranpermeabilität ↘ (1/7) Antwort negativer Akutphaseproteine (1/8)

5.8.3 Netzwerkanalyse

Die identifizierten Proteine wurden durch den Einbezug von genetischen Datenbanken und publizierten Interaktionen durch IPA in Netzwerke eingeordnet. Die Netzwerke ermöglichten eine schnelle und übersichtliche Darstellung von Zusammenhängen und Identifikation von Schlüsselproteinen. Wechselwirkende Interaktionen innerhalb des Netzwerks wurden mit einem doppelseitigen Pfeil zwischen den Proteinen gekennzeichnet. Proteine mit einer erhöhten bzw. verminderten Proteinmenge nach CAP-Behandlung sind rot bzw. grün unterlegt (Abb. 23-25).

5.8.3.1 Netzwerkanalyse von Epithelzellen und Karzinomzellen.

Exemplarisch wurden Netzwerke für S9-Epithelzellen (Abb. 23), HNO97-Karzinomzellen (Abb. 24) und HNO41-Karzinomzellen (Abb. 25) nach Behandlung mit Ar-CAP und Kultivierung mit FCS aufgeführt. Die Netzwerke für die übrigen Behandlungsformen finden sich im Anhang (Abb. 48-54).

Im Zentrum der Netzwerke standen MAPK und die *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK). Eine Affektion der Proteine ergab sich aus der Vielzahl an mengenmäßig veränderten Proteinen in der Umgebung von MAPK und ERK. Zusätzlich nahmen Hitzeschockproteine, vor allem HSP90 und Mitglieder der HSPA-Familie eine zentrale Rolle ein. Die Hitzeschockproteine interagierten untereinander.

Auch Albumin (ALB) fand sich als häufiger Bestandteil der Netzwerke. Dies ist aufgrund der zur Diskussion gestellten Scavengerfunktion von Albumin hier erwähnt.

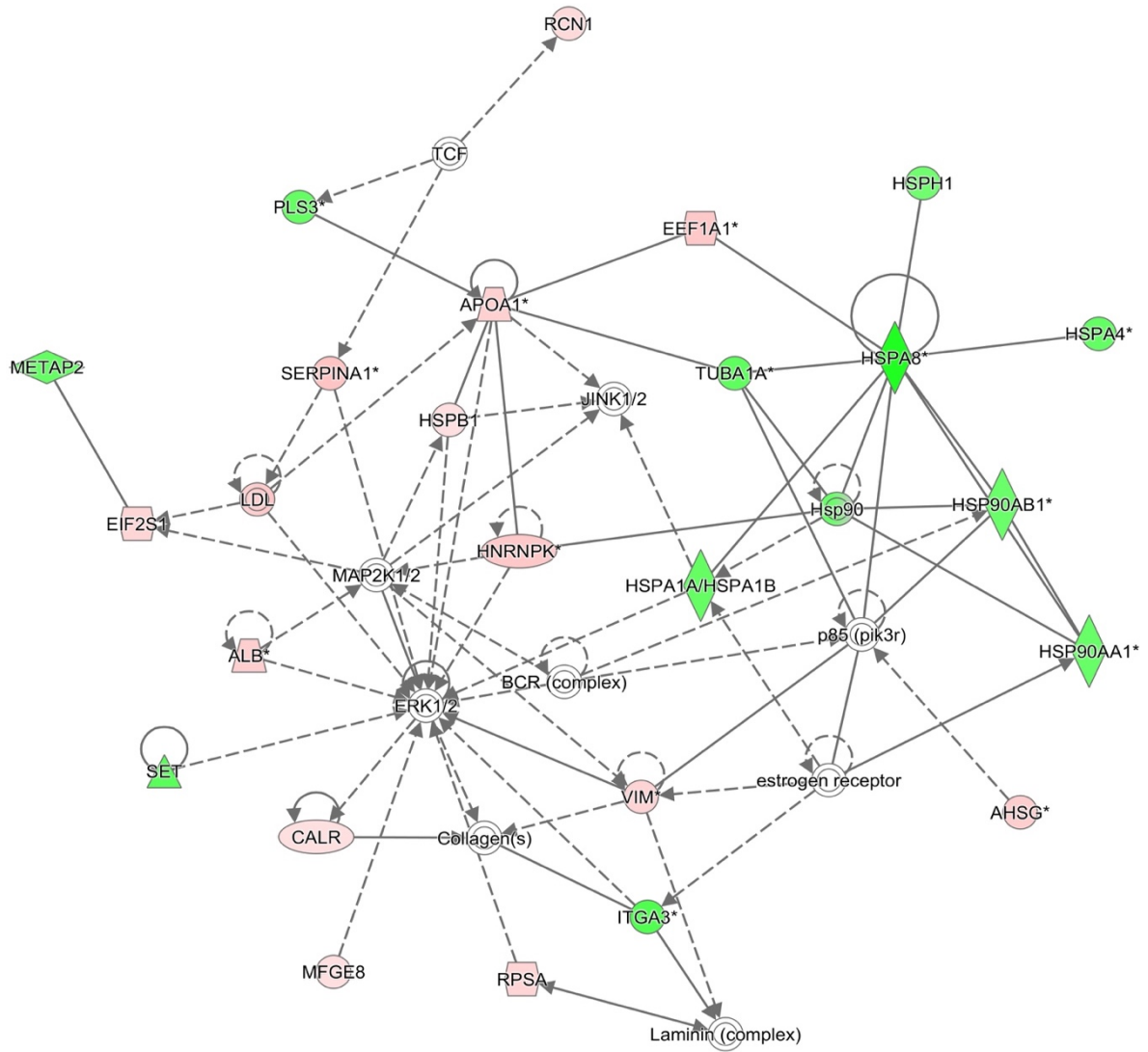


Abbildung 23: Netzwerk von S9-Epithelzellen nach Ar-CAP und Kultivierung mit FCS. Zentrum des Netzwerks bildete die MAPK-ERK-Signalkaskade (MAP2K1/2, ERK1/2). Hitzeschockproteine (HSPB1, HSPA-Familie) besaßen einen großen Anteil der Netzwerks.

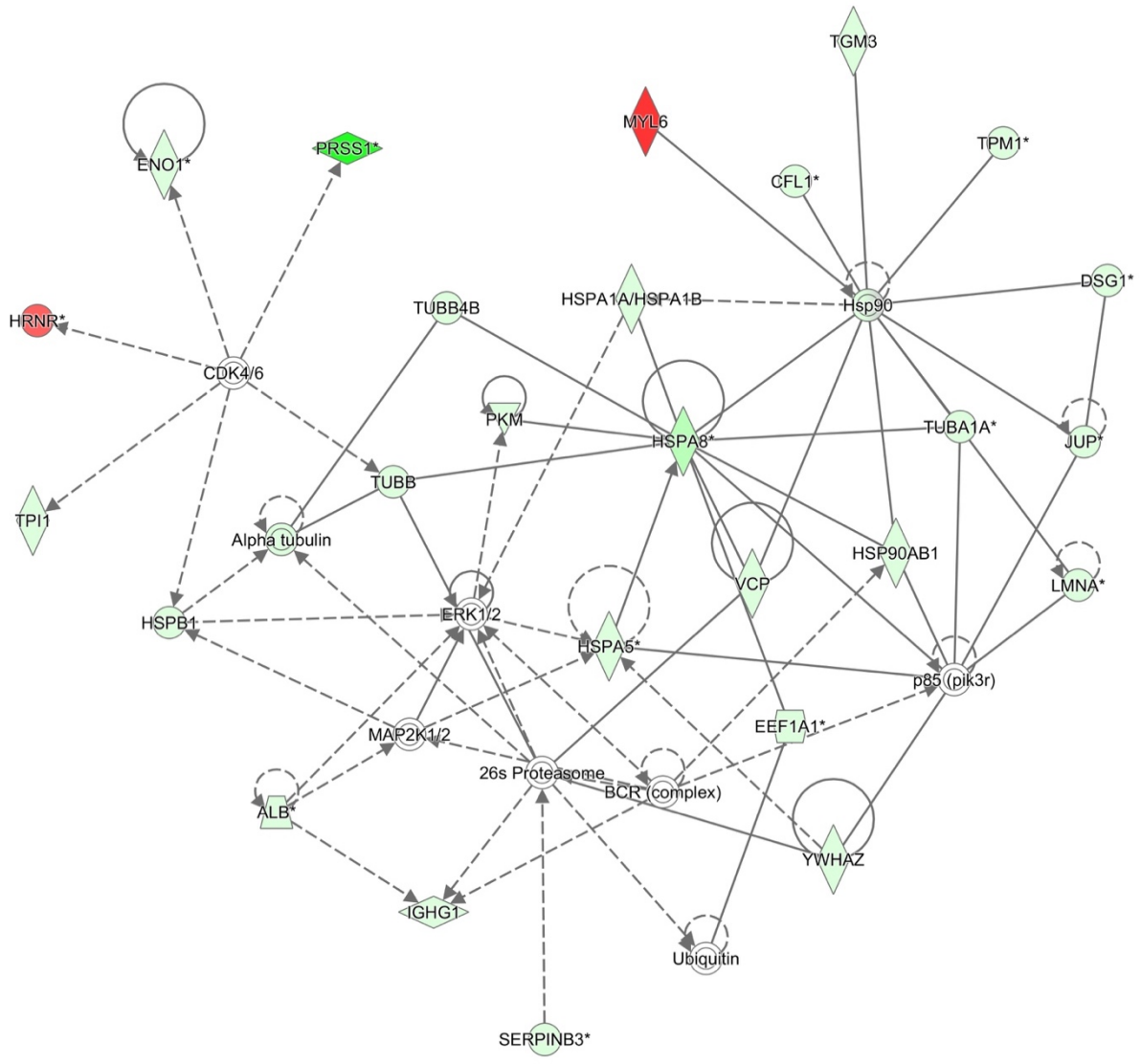


Abbildung 24: Netzwerk von HNO97-Karzinomzellen nach Ar-CAP und Kultivierung mit FCS. Es bestand ein großer Einfluss auf die MAPK-ERK-Signalkaskade. Hitzeschockproteine (HSPA-Familie, HSP90, HSPB1) bildetn einen Großteil des Netzwerks.

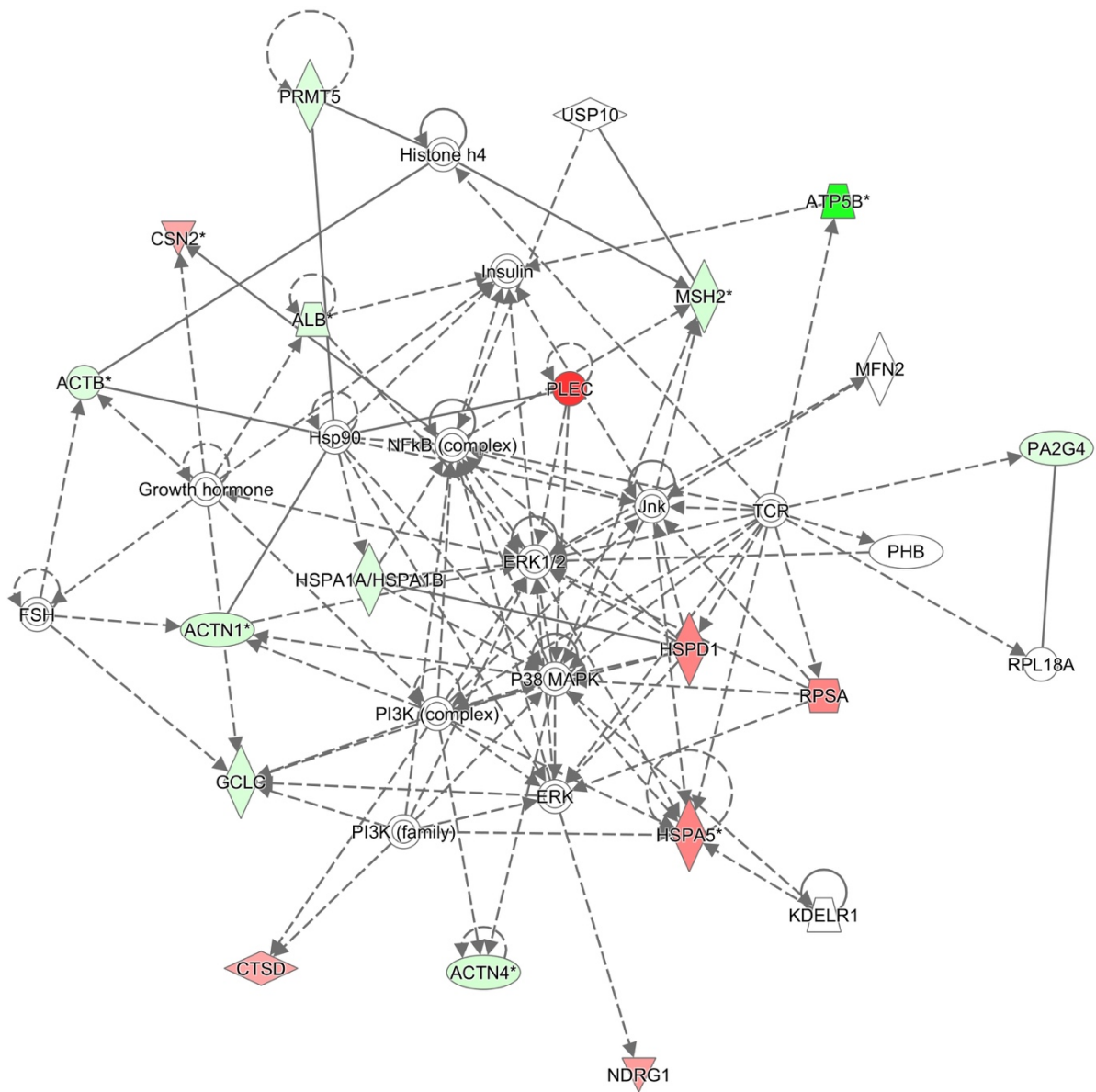


Abbildung 25: Netzwerk von HNO41-Karzinomzellen nach Behandlung mit Ar-CAP und Kultivierung mit FCS. In ihrer Menge veränderte Proteine, darunter Hitzeschockproteine (HSPD1, HSPA5, HSPA1A/HSPA1B), beeinflussten die MAPK-ERK-Signalkaskade.

5.9 Nachweis von HSP27 und GAPDH in Epithel- und Karzinomzellen

In der massenspektrometrischen Analyse der Proben konnten HSP27 (HSPB1) und GAPDH nach CAP-Behandlung mit einer veränderten Proteinmenge nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich für beide Proteine jeweils eine Spotidentifikation in den Overlays erstellt mittels Delta 2D-Software, welche positionsgetreu auf die übrigen Overlays übertragen werden konnte. Aufgrund von Vorarbeiten konnte an gleicher Position in unterschiedlichen Overlays bei entsprechendem Spotnachweis vom gleichen Protein ausgegangen werden (Abb. 27). Die entsprechenden *fc*-Werte ließen sich herausarbeiten (Tab. 44). Für GAPDH wurde auf eine entsprechende Darstellung in Delta 2D-Overlays verzichtet, da die Spotintensität zu schwach war. Um die Hinweise auf eine Regulation der Proteine weiter zu analysieren, erfolgte der Nachweis der Proteine mittels Immunoblot (Vgl. 5.9.1).

Tabelle 44: Proteinspots mit Nachweis von HSP27 und GAPDH mit entsprechendem *Fold Change*-Wert (*fc*-Wert). Der *fc*-Wert spiegelt das Verhältnis aus der Proteinmenge der CAP-behandelten Probe zur Gaskontrolle wider. Die entsprechenden signifikanten Regulationen im *fc*-Wert sind fett markiert.

Gel-Nr.	Zelllinie	Quellgas	Serum	<i>fc</i> _{HSP27} -Wert	<i>fc</i> _{GAPDH} -Wert
1	S9	Argon	FCS	2,12	0,856
2	S9	Argon	NTA	1,74	0,579
3	HNO97	Argon	FCS	1,25	0,440
4	HNO97	Argon	NTA	1,62	0,767
5	HNO41	Argon	FCS	1,56	0,945
6	HNO41	Argon	NTA	1,54	0,916
7	S9	Helium	FCS	1,01	n.a.
8	S9	Helium	NTA	1,28	0,792
9	HNO97	Helium	FCS	1,23	11,792
10	HNO97	Helium	NTA	1,24	1,405

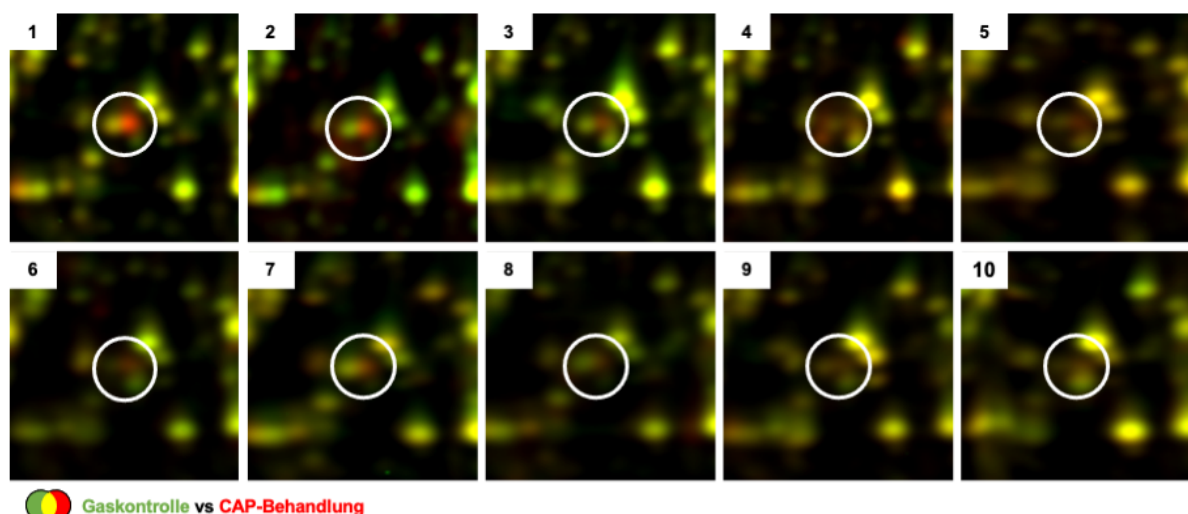


Abbildung 26: Spotposition von HSP27 in den Overlays der CAP-behandelten Proben gegenüber ihren Gaskontrollen. Die Nummerierung der Overlays erfolgte entsprechend Tab. 44. Erhöhte Proteinmengen in den CAP-behandelten Proben wurden rot und in den entsprechenden Gaskontrollen grün markiert.

5.9.1 Quantifizierung von HSP27 und GAPDH mittels Immunoblot

Um den Einfluss von CAP auf die Proteinmenge von HSP27 und GAPDH in allen Proben zu identifizieren, wurden 1D-PAGE-Gele mit fluoreszenzmarkiertem Gesamtprotein erstellt und per Immunoblot analysiert. Die Markierung des Gesamtproteins wurde mit G300-Fluoreszenzfarbstoff umgesetzt. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte mittels Octopus QPLEX Fluorescence Imager (A, Abb. 27). Das Gesamtprotein wurde zur Normalisierung von HSP27 (B, Abb. 27) und GAPDH (C, Abb. 27) genutzt. Die Quantifizierung des Gesamtproteins wurde nach Invertierung des Originalbildes mit Hilfe der ImageJ-Software (Version 1.52a) vorgenommen (Abb. 27).

Die Proben der S9-Epithelzellen und HNO97-Karzinomzellen wurden für 120 s mit Ar-CAP und für 60 s, 120 s bzw. 240 s mit He-CAP behandelt.

Des Weiteren wurden HSP27 und GAPDH in Proben nach 120-sekündiger CAP-Behandlung und Zellaufschluss nach 1 h bzw. 24 h mit Versatz des Lysepuffers mit N-Ethylmaleimide (NEM) bestimmt.

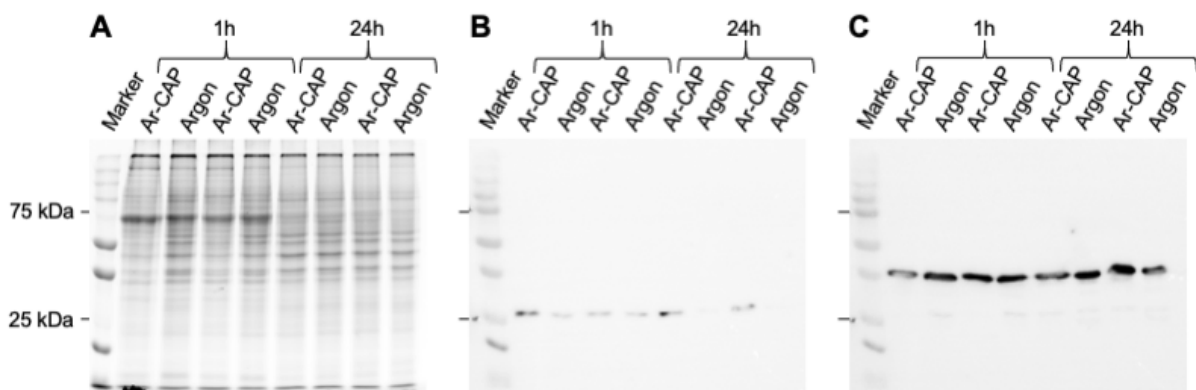


Abbildung 27: Nachweis des Gesamtproteins (A), HSP27 (B) und GAPDH (C) am Beispiel von S9-Epithelzellen nach Behandlung mit Ar-CAP, Kultivierung mit 10% FCS und Versatz des Lysepuffers mit NEM. Das Originalbild wurde durch den Octopus QPLEX Fluorescence Imager erstellt und mittels ImageJ-Software (Vers. 1.52a) invertiert (A). Per Immunoblot erfolgte der Nachweis von HSP27 (B) und GAPDH (C). Es wurden jeweils zwei Replikate für die Quantifizierung nach 1 h und 24 h aufgetragen. Ein Marker ermöglichte die Kennzeichnung der atomaren Masseneinheit von 25 und 75 kDa.

5.9.1.1 HSP27- und GAPDH-Quantifizierung in S9-Epithelzellen

Unter der Behandlung mit Ar-CAP kam es nach 24 h zu einer signifikanten Reduktion der Proteinmenge von HSP27 sowohl nach Kultivierung mit FCS als auch mit NTA. Der Effekt war unter NTA stärker ausgeprägt. Im Vergleich zu den Proben mit FCS war HSP27 bei Kultivierung mit NTA deutlicher verringert (A, Abb. 28). Eine signifikante Änderung der Konzentration von GAPDH war lediglich nach Behandlung mit Ar-CAP und Kultivierung mit NTA zu erkennen (A, Abb. 29).

Wurde der Lysepuffer mit NEM versetzt, zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Auffallend war ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben 1 h und 24 h nach CAP-Behandlung. Bei einem frühen Probenaufschluss war die Konzentration von HSP27 deutlich höher als im späten Aufschluss. Dies galt unabhängig vom verwendeten Quellgas und Serum (B, Abb.28). Für GAPDH ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsformen nach Versatz des Lysepuffers mit NEM erkennen (B, Abb. 29).

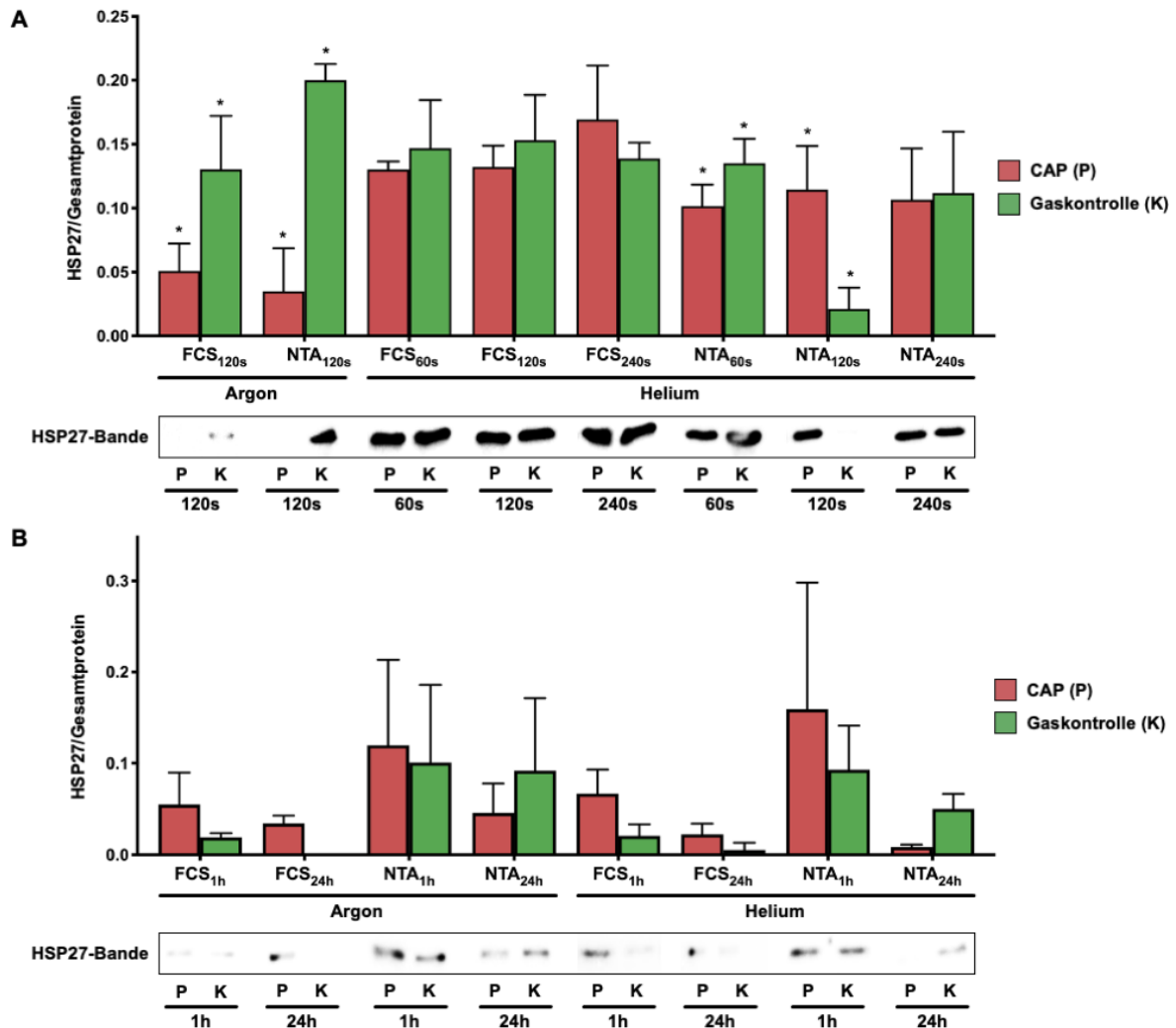


Abbildung 28: Quantifizierung von HSP27 in S9-Epithelzellen nach CAP-Behandlung und in entsprechenden Gaskontrollen mittels Immunoblot. In **A** erfolgte die Bestimmung von HSP27 nach 120-sekündiger Behandlung mit Ar-CAP bzw. nach 60-, 120- und 240-sekündiger Behandlung mit He-CAP. In **B** wurde HSP27 1 h bzw. 24 h nach CAP-Behandlung bestimmt. Dabei wurde der Lysepuffer mit N-Ethylmaleimide (NEM) versetzt. * $p < 0,05$.

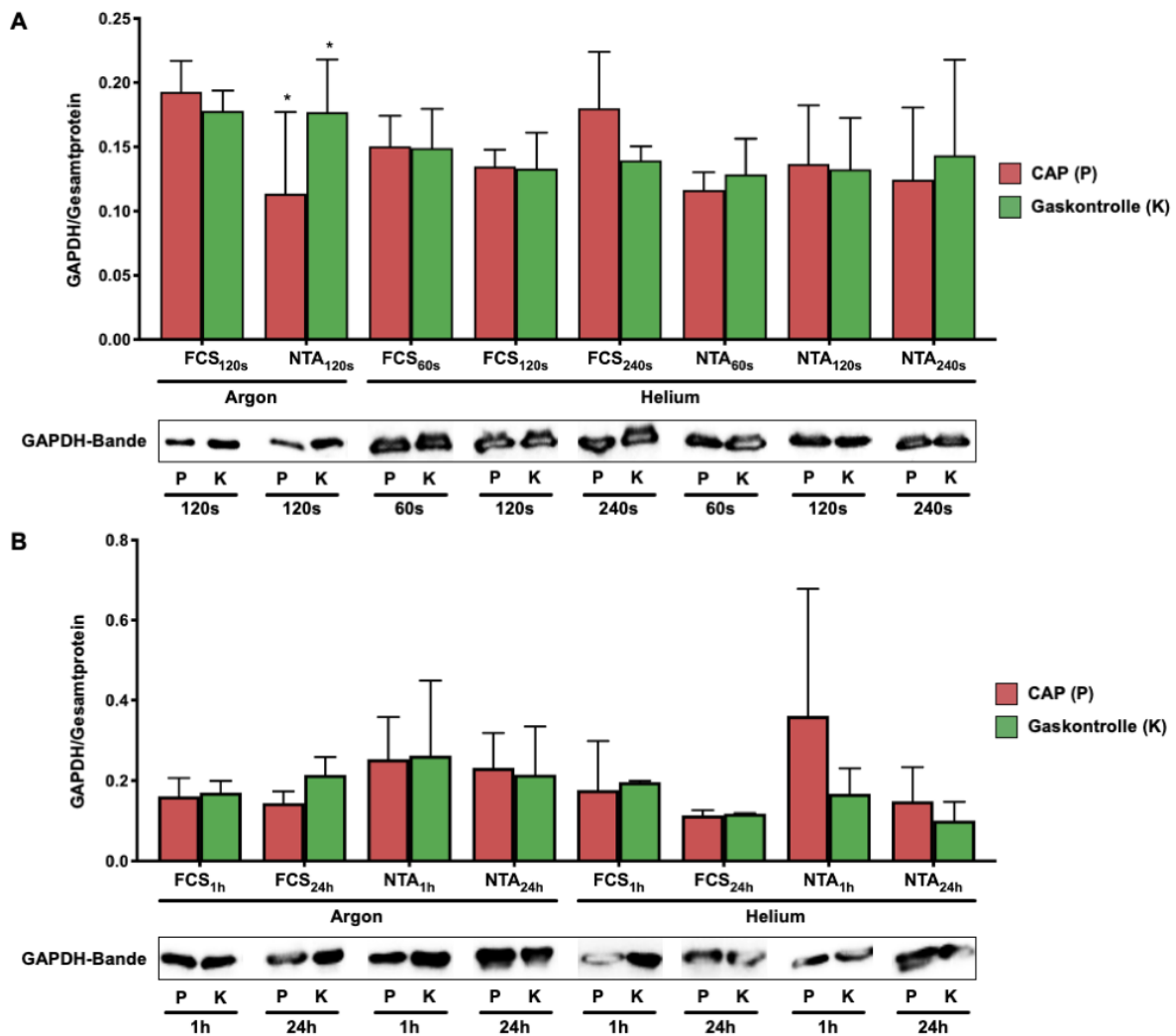


Abbildung 29: Quantifizierung von GAPDH in S9-Epithelzellen nach CAP-Behandlung und in entsprechenden Gaskontrollen mittels Immunoblot. In A erfolgte die Bestimmung von GAPDH nach 120-sekündiger Behandlung mit Ar-CAP bzw. nach 60-, 120- und 240-sekündiger Behandlung mit He-CAP. In B wurde GAPDH 1 h bzw. 24 h nach CAP-Behandlung bestimmt. Dabei wurde der Lysepuffer mit N-Ethylmaleimide (NEM) versetzt. * $p < 0,05$.

5.9.1.2 HSP27- und GAPDH-Quantifizierung in HNO97-Karzinomzellen

Die Proteinmenge von HSP27 nahm nach 120-sekündiger Behandlung mit Ar-CAP in HNO97-Karzinomzellen ab. Dieser Effekt war unter NTA größer als bei FCS. Bei Verwendung von He-CAP zeigte sich dieser Effekt ebenfalls über alle behandelten Zeitpunkte (A, Abb. 30). Bei der Bestimmung von HSP27 1 h bzw. 24 h nach CAP-Behandlung war für die Proben unter Argon jeweils eine geringere Proteinmenge im Vergleich zur Gaskontrolle nachweisbar. Eine Bestimmung von HSP27 war 1 h nach Behandlung mit He-CAP und Kultivierung mit NTA aufgrund einer zu geringen Proteinmenge nicht möglich (B, Abb. 30). Gleiches galt für GAPDH (B, Abb. 31)

Die Unterschiede in den Proteinmengen von GAPDH zwischen CAP-behandelten Proben und Gaskontrollen waren größtenteils nicht signifikant (Abb. 31). Tendenziell erschien die Proteinmenge von GAPDH 1 h bzw. 24 h nach CAP-Behandlung im Vergleich zu korrespondierenden Gaskontrollen erhöht (B, Abb. 31.).

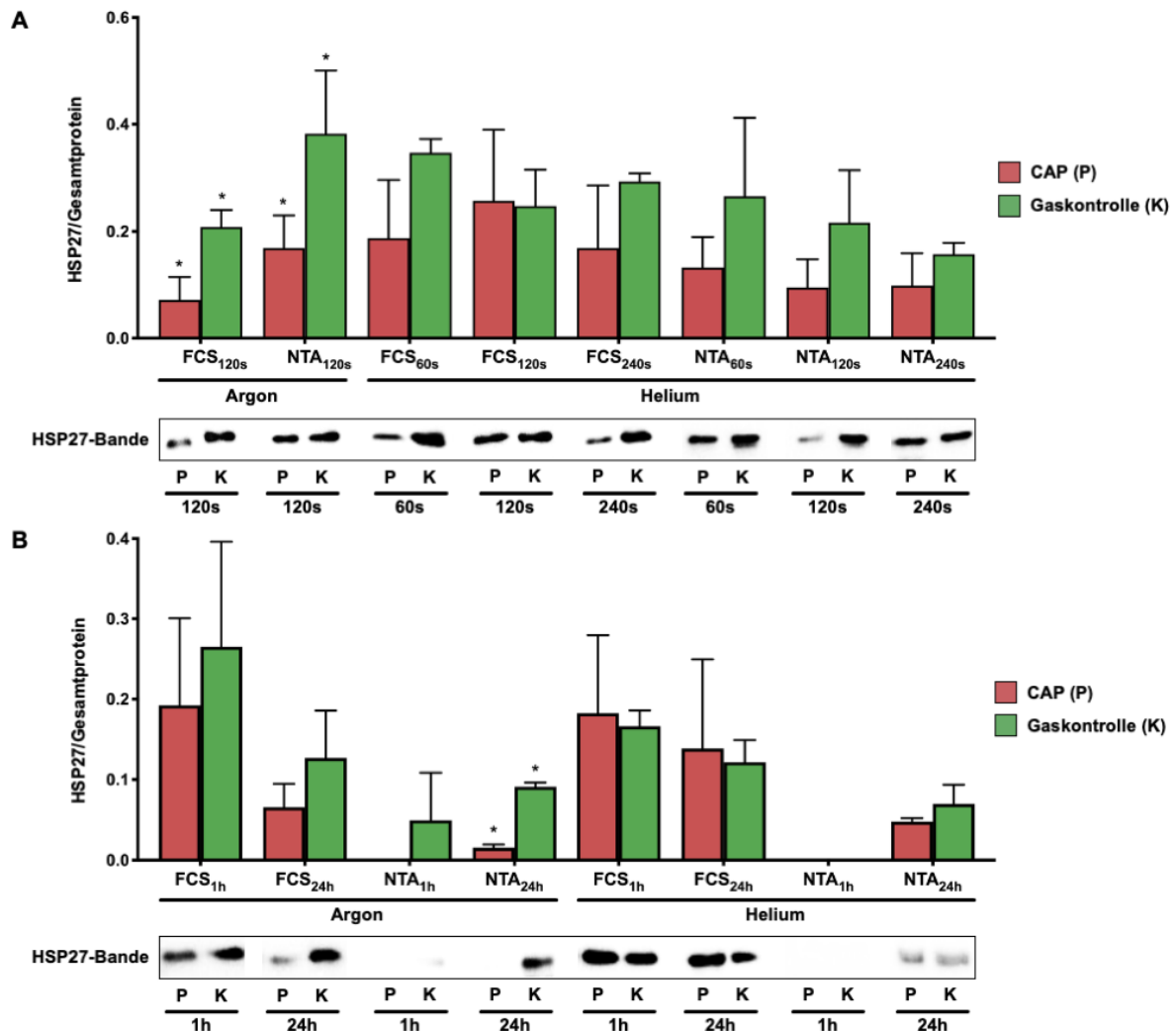


Abbildung 30: Quantifizierung von HSP27 in HNO97-Karzinomzellen nach CAP-Behandlung und in entsprechenden Gaskontrollen mittels Immunoblot. In **A** erfolgte die Bestimmung von HSP27 nach 120-sekündiger Behandlung mit Ar-CAP bzw. nach 60-, 120- und 240-sekündiger Behandlung mit He-CAP. In **B** wurde HSP27 1 h bzw. 24 h nach CAP-Behandlung bestimmt. Dabei wurde der Lysepuffer mit N-Ethylmaleimide (NEM) versetzt. * $p < 0,05$.

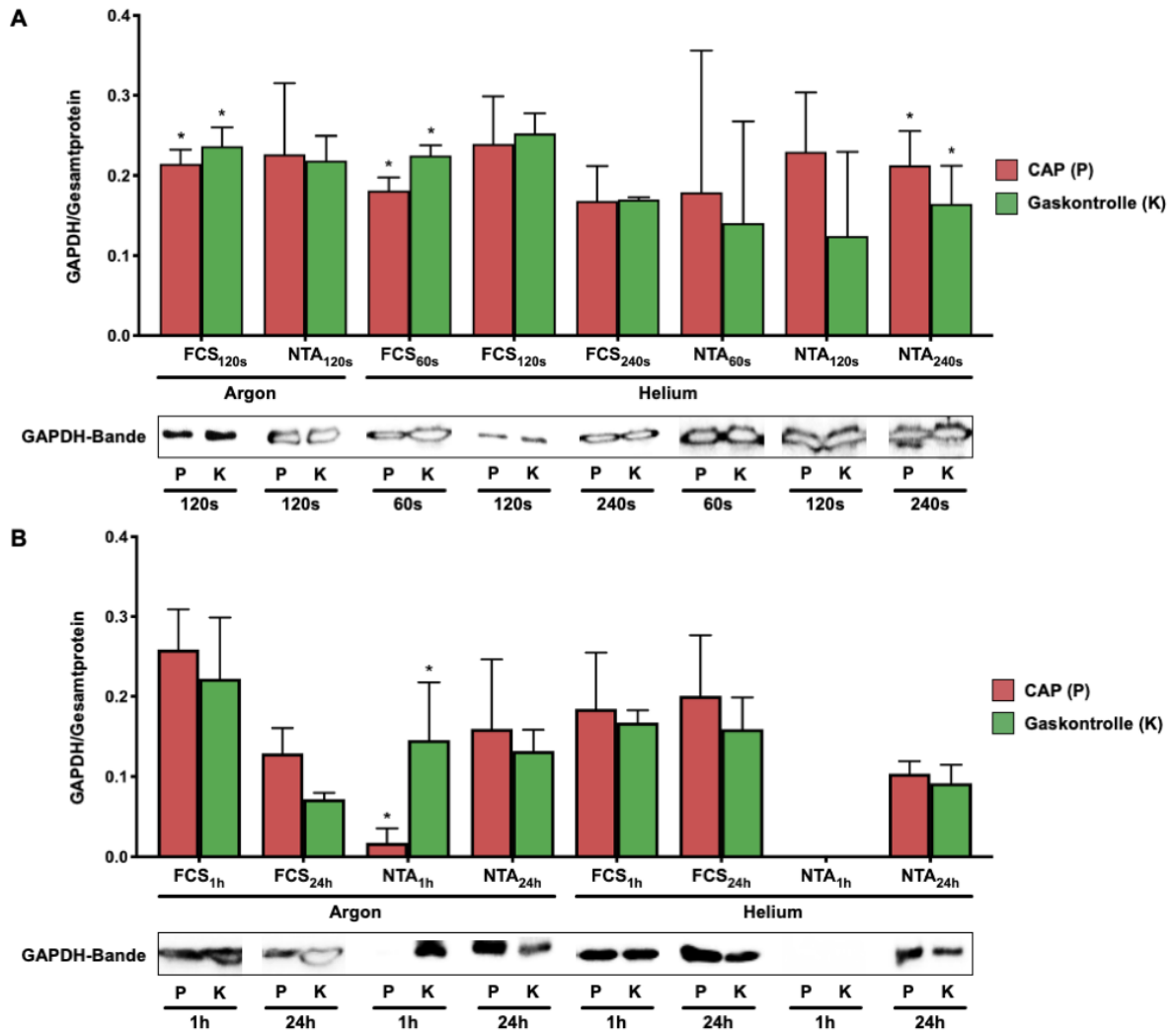


Abbildung 31: Quantifizierung von GAPDH in HNO97-Karzinomzellen nach CAP-Behandlung und in entsprechenden Gaskontrollen mittels Immunoblot. In **A** erfolgte die Bestimmung von GAPDH nach 120-sekündiger Behandlung mit Ar-CAP bzw. nach 60-, 120- und 240-sekündiger Behandlung mit He-CAP. In **B** wurde GAPDH 1 h bzw 24 h nach CAP-Behandlung bestimmt. Dabei wurde der Lysepuffer mit N-Ethylmaleimide (NEM) versetzt. *p < 0,05.

5.9.1.3 HSP27- und GAPDH-Quantifizierung in HNO41-Karzinomzellen

Für HNO41-Karzinomzellen erfolgte analog zu S9 und HNO97 die Bestimmung der Proteinmengen von HSP27 und GAPDH normiert auf die Gesamtproteinmenge. Dabei wurden HNO41-Karzinomzellen mit Ar-CAP behandelt. Es zeigte sich eine verminderte Proteinmenge von HSP27 (A, Abb. 32) und GAPDH (B, Abb. 32), signifikant unter Kultivierung mit NTA.

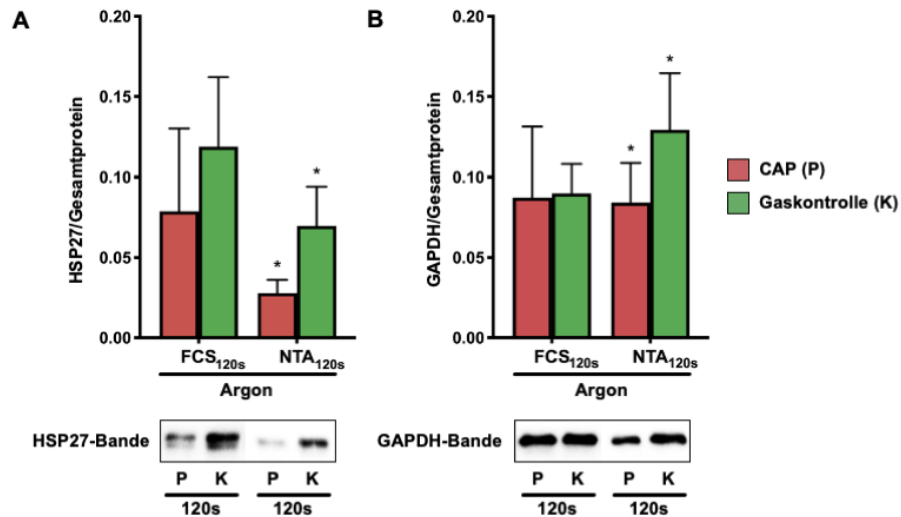


Abbildung 32: Quantifizierung von HSP27 (A) und GAPDH (B) in HNO41-Karzinomzellen nach Behandlung mit Ar-CAP. Die Proben wurden jeweils für 120 s mit Ar-CAP behandelt und korrespondierenden Gaskontrollen gegenübergestellt. * $p < 0,05$.

5.10 Spezifisch veränderte Proteine nach selektiver Analyse in Delta 2D

Neben den bisher beschriebenen, in ihrer Menge veränderten Proteine wurden durch CAP eine Vielzahl weiterer Proteine reguliert und in der Massenspektrometrie identifiziert. Mittels Delta 2D-Software konnten selektiv Proteine mit auffälliger Regulation und Verteilung dargestellt werden. Dabei bietet die multiple Bildanalysesoftware den Vorteil, Informationen zelllinien- und behandlungsspezifisch herauszuarbeiten. Hierdurch könnten eventuelle Referenzproteine für die Wirksamkeit der Plasmaquellen detektiert werden.

Aus den Spotidentifikationen in Delta 2D ergab sich aus jedem Spot ein prozentuelles Spotvolumen gegenüber dem Hintergrund (Abb. 35). Die Bildanalyse erfolgte dabei unabhängig vom *fc*-Wert, welcher das Verhältnis aus CAP-behandelter Probe zur entsprechenden Kontrolle bildet, um die Proteinmenge in den Gaskontrollen zu berücksichtigen.

Selektiv wurden hier *Calmodulin-like protein 3* und *5* (CALL3, CALL5), *Adapter Molekül CRK* (CRK), *Nucleosome assembly protein 1-like 2* (NP1L2) und *X-ray repair cross-complementing protein 5* und *6* (XRCC5, XRCC6) aufgrund ihrer zelllinienspezifischen bzw. serumspezifischen Änderung auf einem Overlay von zwei Fusionsgelen dargestellt (Abb. 34).

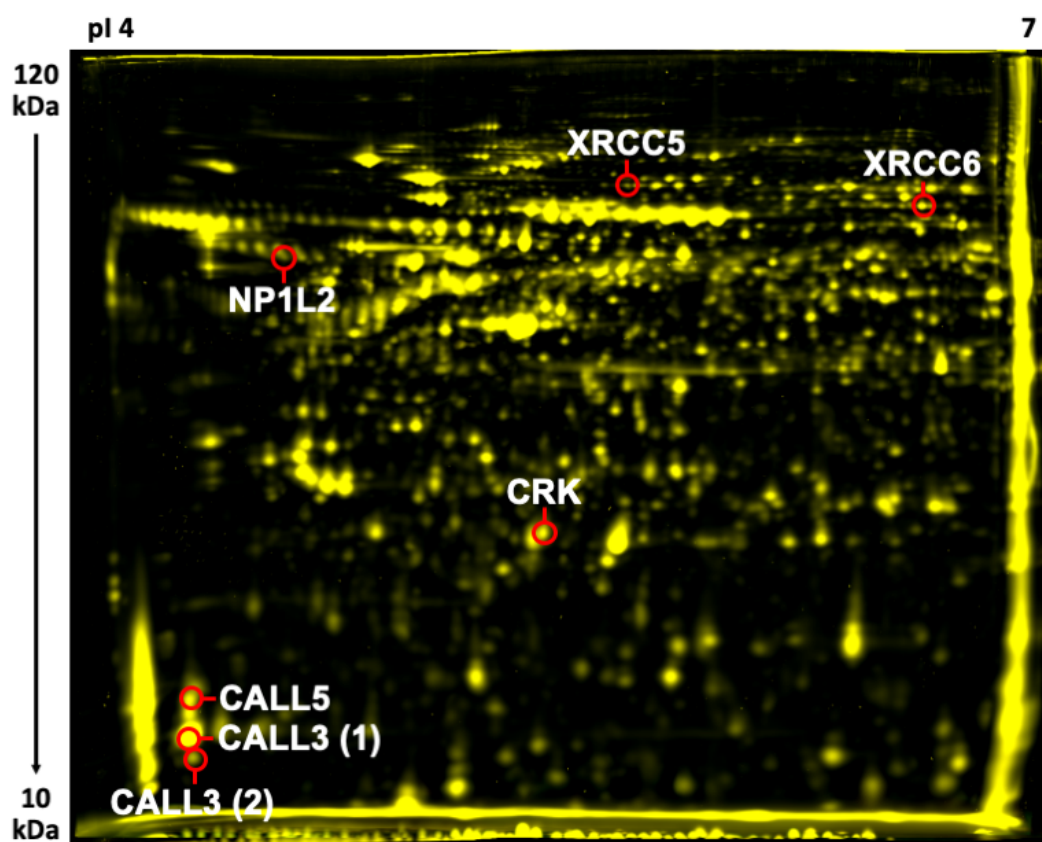


Abbildung 33: Selektive Proteinveränderungen nach Analyse der massenspektrometrischen Spotidentifikationen mittels Delta 2D-Software auf einem Overlay von zwei Fusionsgelen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Gel nach isoelektrischem Punkt (pI 4 – 7) und molekularem Gewicht (10 – 120 kDa). Für das *Calmodulin-like protein 3* (CALL3) ergaben sich zwei Proteinspots (CALL3 (1) und CALL3 (2)).

5.10.1 Zelllinienspezifische Proteinveränderungen

CALL3 und CALL5 zeigten sich vor allem in HNO97-Karzinomzellen im Vergleich zu den übrigen Zelllinien mit einer ausgeprägten Erhöhung des Spotvolumens gegenüber dem Hintergrund (Abb. 34). Zusätzlich war das Spotvolumen in den CAP-behandelten Proben im Vergleich zur korrespondierenden Gaskontrolle größer.

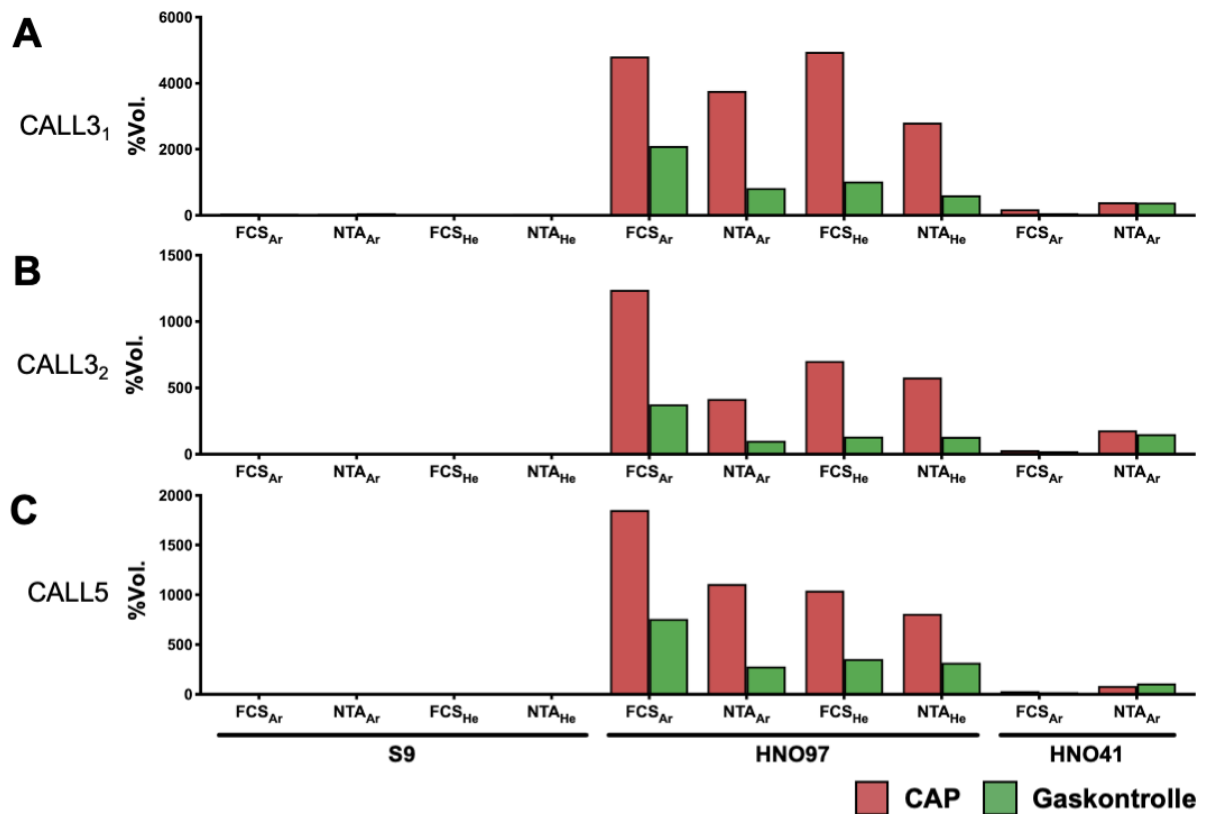


Abbildung 34: Prozentuales Spotvolumen gegenüber dem Hintergrund zelllinienspezifischer Proteine nach selektiver Analyse der massenspektrometrischen Proteinidentifikationen und den entsprechenden Spots in Delta 2D. CALL3 (A und B) ließ sich an zwei Spotpositionen nachweisen (Abb. 33). CALL3 und CALL5 sind spezifisch für HNO97-Karzinomzellen. Zusätzlich war das Spotvolumen in CAP-behandelten Proben größer als in den entsprechenden Gaskontrollen.

5.10.2 Serumspezifische Proteinveränderungen

Die Spotintensität von CRK, NP1L2 und XRCC5 gegenüber dem Hintergrund war in allen Proben, die mit FCS kultiviert wurden, erhöht. Dabei fiel der Unterschied für NP1L2 am deutlichsten aus (Abb. 35).

XRCC6 wurde hier komplementär zu XRCC5 aufgeführt, da die Proteine Dimere bilden und in der Spotidentifikation und massenspektrometrischen Analyse beide Proteine identifiziert wurden (Abb. 35). Im Gegensatz zu XRCC5 ließ sich ein gleichsinniger Effekt für XRCC6 nicht beschreiben.

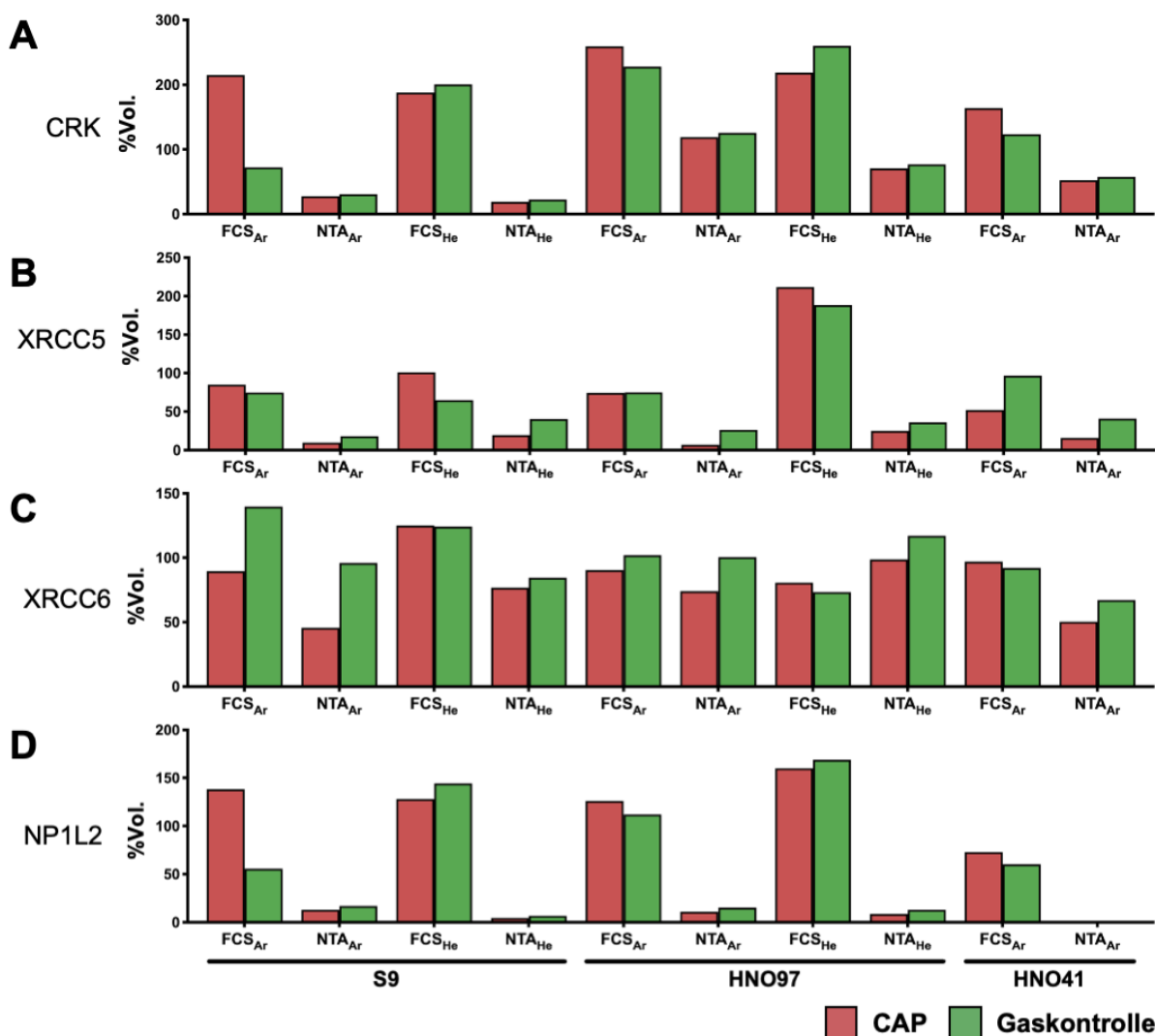


Abbildung 35: Prozentuales Spotvolumen gegenüber dem Hintergrund serumspezifischer Proteine nach selektiver Analyse der massenspektrometrischen Proteinidentifikationen und den entsprechenden Spots in Delta 2D. CRK (A), XRCC5 (B) und NP1L2 (D) wiesen im Probenmaterial kultiviert mit FCS ein erhöhtes Spotvolumen auf. XRCC6 (C) wurde komplementär zu XRCC5 (B) aufgeführt, zeigte aber keine gleichsinnige Veränderung.

6 Diskussion

Die Ergebnisse deuten auf einen komplexen Wirkungsmechanismus von CAP bei Applikation auf Epithel- und Karzinomzellen hin. Im Folgenden soll initial ein Unterschied zwischen verschiedenen Quellgasen, hier Argon und Helium, zur Generierung des CAP herausgearbeitet werden.

Die Interaktion von CAP-produzierten RONS mit intra- und extrazellulären Bestandteilen, explizit die Wirkung auf HSP27, soll diskutiert werden.

6.1 Physikalische Effekte von CAP

Als Quellgase zur Applikation von CAP wurden Argon und Helium verglichen. Beide werden zum Großteil in der aktuellen Forschung genutzt [97]. Bei der Verwendung von APPJs wird das applizierte CAP durch das Elektrodenmaterial, die Entladungsfrequenz, den Gasfluss und die Austreibungsöffnung charakterisiert [98]. Die Generierung von Ar-CAP erfolgte mittels kINPen 09 mit Quarzkapillare. He-CAP wurde durch einen Prototypen mit Glaskapillare, bereitgestellt durch das Leibnitz-Institut (INP, Greifswald), erzeugt.

Unterschiede zwischen den beiden Plasmajets zeigten sich in Form eines breiten und kurzen Jets bei Ar-CAP und eines schmalen und langen Jets bei He-CAP (Abb. 2). Anhand mikroskopischer Aufnahmen von S9-Epithelzellen nach CAP-Behandlung konnte eine Ablösung der Zellen von der Zellkulturplatte für beide Quellgase beobachtet werden (Abb. 5). Bei HNO97-Karzinomzellen wiesen behandelte Zellen und umgebende Zellen morphologische Unterschiede ohne eine eindeutige Ablösung der Zellen auf (Abb. 6). Da sich dies auch bei ungezündetem Gasfluss zeigte, scheint hier ein physikalischer Schereffekt mitverantwortlich zu sein. Bisher wurde der Einfluss des physikalischen Effekts auf die Zielzellen als marginal beschrieben [54, 99].

Diese Beobachtung wurde durch Wachstumskinetiken für S9-Epithelzellen und HNO97-Karzinomzellen nach CAP-Behandlung für 120 s bestätigt. Für beide Zelllinien ließ sich für He-CAP und die entsprechende Gaskontrolle eine ähnliche Reduktion der Zellzahl über 120 h beobachten (Abb. 7-8).

Eine Affektion von Zelladhäsion, Migration und Proliferation sowie Apoptose und Nekrose durch die direkte Applikation von CAP sind bekannt. Verantwortlich hierfür wird die Entstehung von RONS durch CAP gemacht, wobei die Konzentration durch die Charakteristik des CAP beeinflusst wird [16, 100-102].

Unter Kultivierung der behandelten Epithel- und Karzinomzellen kam es 24 h nach CAP-Behandlung zu einer Zunahme der Zelldysmorphologie der Zielzellen sowie einer Proliferation und Migration von unbehandelten Zellen (Abb. 5-6). Dies bestätigt die Beobachtung von Len-deckel et al., welche bei von S9-Epithelzellen eine Zunahme der Proliferation nach CAP-Behandlung feststellten [47].

6.1.1 Quellgasbedingte Unterschiede von CAP

Für Argon und Helium ist die Wirksamkeit und Sicherheit in der Anwendung als Quellgas zur Generierung von CAP in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen [97, 103, 104]. Auch eine Mischung der Quellgase ist in einer entsprechenden Versuchsanordnung möglich [105]. Der Wirkungsmechanismus über die Generierung von RONS ist unabhängig vom Quellgas, allerdings unterscheidet sich die Effektivität. Dabei ist die Konzentration der induzierten ROS nach Applikation von Ar-CAP höher als unter He-CAP [106].

Durch 2D-PAGE konnten für S9-Epithelzellen und HNO97-Karzinomzellen zunächst keine makroskopischen Unterschiede zwischen den Quellgasen in der Verteilung der durch CAP veränderten Proteine nachgewiesen werden (Abb. 10-13). In der anschließenden Analyse der veränderten Proteine ergaben sich allerdings vermehrt Veränderungen nach Applikation von Ar-CAP gegenüber He-CAP (Tab. 36).

Anhand des Datensatzes regulierter Proteine in Abhängigkeit von der Behandlungsform, exportiert aus Delta 2D, wurden PCAs erstellt. In den PCAs der Proben bestätigte sich die Differenzierung der Quellgase anhand der zweiten Hauptkomponente (Abb. 16-17).

Durch die massenspektrometrischen Spotidentifikationen konnten zelllinienspezifische Unterschiede herausgearbeitet werden. In S9-Epithelzellen und HNO97-Karzinomzellen überschneidet sich ein Großteil der veränderten humanen und bovinen Proteine zwischen Argon und Helium (Abb. 36). Die Betrachtung der bovinen Proteine erfolgte aufgrund einer Aufnahme des Mediums in die Zielzellen. Die Veränderungen der humanen Proteine spiegeln den Effekt auf die Zielzellen und die Veränderung der bovinen Proteine die Effekte auf das Medium wider. Trotz der Unterschiede zwischen Argon und Helium zeigte sich eine annähernd gleiche Affektion molekularer Funktionen (Abb. 21) und Regulatoren (Tab. 42).

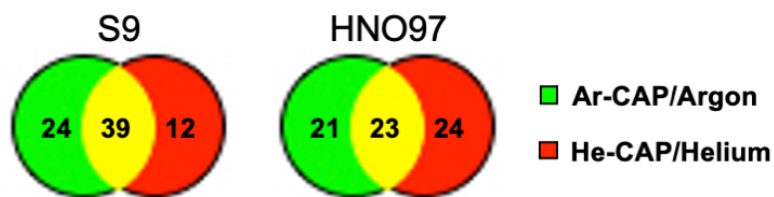


Abbildung 36: Überschneidungsmengen der massenspektrometrischen bovinen und humanen Proteinidentifikationen für Argon und Helium.

Es ist anzunehmen, dass Ar-CAP und He-CAP unter identischen Applikationsbedingungen effektiv oxidativen Stress in den Zielzellen induzieren, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Die Effektivität lässt sich durch Modifikation des Versuchsaufbaus, vor allem anhand der Applikationsdauer, beeinflussen.

Für Argon und für Helium gibt es unter Berücksichtigung der klinischen Anwendung Vor- und Nachteile. Eine Gefährdung der Atmung eines Patienten durch die Verwendung von Argon innerhalb des Atemsystems ist dabei nicht auszuschließen. Mittels Argon Plasma Koagulation (APC) konnten beispielsweise eine lokale Hämostase und gute Ergebnisse in Patienten mit kleinzelligen Lungenkarzinom nach Chemotherapie erreicht werden [107]. Allerdings berichten mehrere Fallstudien von aufgetretenen endotrachealen Metastasen, am ehesten durch hämatogene Metastasierung, sowie schlaganfallinduzierende Luftembolien nach intrakavitärer Anwendung der APC [108].

Auf ein ähnliches Problem machten auch Borowska und Mitarbeiter aufmerksam. In zwei Fällen wurden tödliche Gasembolien bei Patienten festgestellt, die Helium ausgesetzt waren. Mutmaßliche Ursache war die begrenzte Löslichkeit von Helium im Blut [109].

Für beide Gase ist der intrakavitäre Einsatz unter Berücksichtigung einer nicht zu überschreitenden Lungen- und Blutkapazität vorbehalten, was die Überführung in die praktische Anwendung erschwert. Eine eventuelle Lösung für die dargestellte Problematik könnte eine Absaugung der Gase nach CAP-Applikation sein.

6.1.2 Applikationsdauerabhängige Wirkung von CAP

Die Adaption der Parameter bei der Generierung von CAP ist entscheidend für die Wirksamkeit. Zu den veränderbaren Parametern gehören die Spannung, die Gasflussrate und die Applikationsdauer. Dabei steigt mit längerer Applikationsdauer bei sonst gleichen Bedingungen der Anteil an generierten RONS. Der Effekt ist quellgasunabhängig [105, 110, 111].

Aufgrund weiterer Arbeiten mit S9-Epithelzellen wurde die Behandlungszeit für die Applikation von Ar-CAP auf 120 s festgelegt und auf Tumorzelllinien ausgeweitet [47, 112]. Bei

erstmaliger Verwendung von He-CAP durch den Prototyp wurden S9-Epithelzellen und HNO97-Karzinomzellen für 60 s, 120 s und 240 s behandelt und HSP27 und GAPDH per Immunoblot bestimmt. Für beide Proteine ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Applikationsdauer und Proteinmenge nachweisen (Abb. 28-31). Prinzipiell ist bei einer Anhebung der Applikationsdauer für He-CAP eine Annäherung der Effektivität an Ar-CAP zu erwarten. Hierfür ist der Nachweis von HSP27 und GAPDH allerdings nicht zielführend, sodass eine Charakterisierung des applizierten He-CAP in Abhängigkeit von der Applikationsdauer notwendig ist, um eine äquivalente Wirkstärke zu erreichen. Eine näherungsweise äquivalente Wirkstärke könnte durch weitere Wachstumskinetiken identifiziert werden.

Die abscherende Wirkung von CAP nimmt mit zunehmender Behandlungsdauer zu. In Suspension gegangene Zellen wurden verworfen. Je länger das Plasma einwirkt, desto weniger Zellen verbleiben adhärent. Dieser Effekt sorgt dafür, dass der Proteinaufschluss nach einer Applikationsdauer von 240 s He-CAP eine sehr geringe Proteinmenge ergab. Zudem bleibt ungeklärt, wie sich die in Suspension gegangenen Zellen verhalten. Für Epithelzellen kann bei Verlust der Adhärenz mit benachbarten Zellen und mit der Zellkulturplatte von einer Induktion der Apoptose ausgegangen werden.

Anders verhält es sich für Karzinomzellen. Jeder chirurgische Eingriff an Karzinomen birgt das Risiko, iatrogene Metastasen zu verursachen, weshalb versucht wird, bei Resektionen einen Sicherheitsabstand einzuhalten und in der Pathologie Wundränder kontrolliert werden. In Suspension gegangene Karzinomzellen sind in der Lage erneut adhärent zu werden. Bei einer Applikation von CAP am Patienten besteht so die Gefahr für eine lokale Metastasierung. Zur Untersuchung des Verhaltens von gelösten Tumorzellen bedarf es weiterer Analysen im Anschluss an die Applikation von CAP. Dabei kann es möglich sein, über Zeitreihen eine Ablösung von Zellen zu minimieren und den Effekt von CAP auf die Generierung von RONS zu beschränken. Eine komplette Verhinderung einer Ablösung von Zellen ist selbst unter sehr kurzer Anwendung nicht auszuschließen.

6.2 Wirkmechanismus von CAP auf Epithel- und Karzinomzellen

Im 2D-SDS-PAGE wurden signifikant regulierte Proteinspots per Delta 2D-Software identifiziert und nach Analyse der Auffindbarkeit auf einem comassiegefärbten präparativen Gel ausgeschnitten. Nach tryptischem Verdau der Proteinspots schloss sich eine massenspektrometrische Analyse mit Identifikation von 70,6 % (487) der insgesamt 690 analysierten Proteinspots

an. Nach Reduktion auf Einzelproteine ohne Doppelnennungen reduzierte sich die Anzahl regulierter Proteine auf 163 in S9-Epithelzellen, 114 in HNO97-Karzinomzellen und 84 in HNO41-Karzinomzellen (Tab. 40).

Durch IPA der CAP-behandelten Proben konnten die regulierten Proteine Funktionen und funktionellen Netzwerken zugeordnet werden, um Zusammenhänge zwischen Proteinen darzustellen.

6.2.1 Wirkung von CAP auf S9-Epithelzellen

Bei der Applikation von CAP auf Epithelzellen ist die Genese von oxidativem Stress ursächlich für die sich anschließende zelluläre Reaktion [113]. Die Verträglichkeit von CAP für äußeres Epithel gilt als nachgewiesen, sodass die Applikation von CAP bei chronischen Wunden bereits Anwendung findet [114]. Bei einer Applikationsdauer von 120 s konnte eine Mutagenität und Zelltoxizität auf Epithelzellen weitestgehend ausgeschlossen werden [115]. Keratinozyten und Fibroblasten reagieren auf den Reiz mit einer Proliferation und der Ausschüttung proangiogener Botenstoffe [116, 117]. Zusätzlich kommt es zu einer Inflamationsreaktion [118]. Es erfolgt eine Anpassung der Genexpression multipler Proteine, darunter Interleukin-6 und Interleukin-8 (IL-6, IL-8) sowie von Wachstumsfaktoren [119].

In dieser Arbeit wurden S9-Epithelzellen den behandelten Plattenepithelkarzinomen gegenübergestellt, um Unterschiede in der Auswirkung einer Applikation von CAP herauszuarbeiten. Bei S9-Epithelzellen handelt es sich um immortalisiertes Flimmerepithel und somit einem intrakavitären Epithel. In Vorarbeiten wurde die Wirkung von CAP auf S9-Epithelzellen mit Hilfe eines Wundmodells analysiert. Hier konnte eine signifikante Proliferation der Zellen im Anschluss an eine CAP-Behandlung nachgewiesen werden [47, 112].

In dieser Arbeit ließen sich mittels PCA der behandelten Zellen Epithelzellen eindeutig von Karzinomzellen unterscheiden (Abb. 15A). Innerhalb der S9-Epithelzellen bildet die dritte Hauptkomponente den CAP-bedingten Effekt ab und nimmt 18,8% der Gesamtvarianz ein (Abb. 16B). In der *Panther Protein Classification* wird durch die Applikation von CAP vor allem Einfluss die auf die „zelluläre Bindung“ und „katalytische Aktivität“ der Zellen genommen. Eine Beeinflussung der Struktur molekülaktivität war zusätzlich abhängig vom verwendeten Serum im Zellkulturmedium. So ließ sich in Epithelzellen unter Kultivierung mit NTA eine deutlich höhere Veränderung der Struktur molekülaktivität als unter FCS nachweisen.

Durch die Identifikationen von veränderten Proteinen mittels Massenspektrometrie konnten IPA erstellt werden. Anhand der IPA wurden zunächst hauptsächlich veränderte Pathways durch Abgleich identifizierter Proteine mit Proteinen der entsprechenden Pathways herausgearbeitet (Tab. 43). Dabei konnte in Epithelzellen als Reaktion auf die Behandlung mit CAP eine Stressreaktion auf ungefaltete Proteine in allen Proben nachgewiesen werden. Zusätzlich ergab sich ein Einfluss auf das eNOS-Signal und die Proteinubiquitinierung.

Durch den Anstieg von intrazellulärem oxidativen Stress durch CAP-generierte RONS erhöht sich die Konzentration ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine [120]. Fehlerhaft gefaltete oder ungefaltete Proteine verlieren ihre Funktion und werden dem Abbau zugeführt [121]. Dies wird hier durch die Beteiligung der Proteinubiquitinierung als Reaktion auf die Behandlung mit CAP unterstrichen.

Durch ungefaltete Proteine wird das endoplasmatische Retikulum (ER) gestresst [122]. Der ER-Stress sorgt für eine Anpassung intrazellulärer Mechanismen an oxidativen Stress, unter anderem anhand einer Änderung der Aktivität von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) und der Konzentration von Thioredoxin und Glutathion [123]. Ziel der Anpassungsmechanismen ist im besten Fall das Remodeling der fehlgefalteten Proteine [124]. Bei mangelhafter Wiederherstellung einer Homöostase wird die Apoptose induziert [125, 126].

NOS generieren über die Synthese von Stickstoffmonoxid intrazellulären oxidativen Stress in Form von RNS. Die eNOS ist dabei eine von drei NO-Synthasen. Endogene ROS werden überwiegend über NAD(P)H-Oxidasen erzeugt. Die endogene Produktion von RONS wird fein reguliert und befindet sich ohne äußere Einflüsse im Gleichgewicht [123, 127, 128]. Über die Proteinkinase C (PKC) kann die eNOS am Thyrosin₄₉₅ phosphoryliert und dadurch inhibiert werden [129, 130]. Förstermann et al. arbeiteten die Reaktion der eNOS auf oxidativen Stress anhand von vaskulärem Epithel heraus [131]. Dabei induziert oxidativer Stress die Aktivität der eNOS [132]. Das gebildete Stickstoffmonoxid (NO) reagiert mit Superoxid (O^{\bullet}) zu Peroxynitrit ($ONOO^{\bullet}$), welches wiederum den Cofaktor der eNOS, Tetrahydrobiopterin (BH_4), oxidiert. Unter fortlaufender Oxidation entsteht Dihydrobiopterin (BH_2), welches die eNOS entkoppelt. Die entkoppelte Form der eNOS ist dysfunktional und produziert Superoxide (O^{\bullet}) [131, 133]. Das Resultat ist ein Circulus vitiosus mit zunehmender Zellschädigung.

Diese Prozesse sind mutmaßlich der Grund für den Nachweis von posttranslationalen Modifikationen sowie eine ausgeprägte Auseinandersetzung mit „Zelltod und -überleben“ laut IPA der S9-Epithelzellen laut IPA (Tab. 43). Ob die Apoptose der Zelle initiiert wird, ist abhängig

von Mechanismen zum Abbau des oxidativen Stresses und der Refaltung der Proteine [134]. Besonderes Augenmerk liegt hier auf Hitzeschockproteinen (HSP), u.a. HSP27, HSP40, HSP70, sowie HSP90. Die Proteine sind an einer Refaltung oder dem Abbau von fehlgefalteten Proteinen beteiligt [135-138]. Die Analyse der Veränderung von Hitzeschockproteinen wurde für die behandelten Proben separat vorgenommen (Vgl. 6.4).

Die Top Tox Listen der CAP-behandelten S9-Epithelzellen verdeutlichen eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotenzials, sowie eine mögliche Schädigung der DNS (Tab. 43).

Die Stabilität des mitochondrialen Membranpotenzials ist für die ATP-Synthese essenziell [139]. Eine Änderung des Membranpotenzials führt zur mitochondrialen Dysfunktion mit Abnahme des Energiestoffwechsels und Freisetzung von proapoptotischen Proteinen, darunter Cytochrom c (Cyt c) [140]. Sowohl der Anfall von oxidativem Stress, als auch die Einleitung proapoptotischer Pathways unter Involvierung von Bax und Bak können das mitochondriale Membranpotenzial ändern [141, 142].

In Abhängigkeit der in ihrer Menge veränderten Proteine werden mittels IPA Regulatorproteine identifiziert, die eine zentrale Bedeutung in zellulären Pathways haben. Dabei ist der Zustand der Regulatoren, Aktivierung oder Inhibition, abhängig von der CAP-induzierten Mengenänderung von Proteinen, die im Zusammenhang mit den Regulatoren stehen. Wichtige identifizierte Regulatoren sind NRF2, p53, HSF1 und TGFB (Tab. 42). NRF2 spielt eine entscheidende Rolle in der Homöostase von intrazellulären RONS. Der Transkriptionsfaktor NRF2 wird durch die Anwesenheit von RONS induziert und sorgt für die Produktion von Scavengersystemen, sowie die Herabregulation der zelleigenen Synthese von RONS durch die NADPH Oxidase [143, 144].

Das Protein p53 ist ein Bestandteil vieler Zellwege zur Regulation der Apoptose. In Karzinomzellen ist p53 meist funktionslos, was die Mutagenität der Zelle bedingt. In nicht mutierten Zellen führen DNS-Schäden oder oxidativer Stress über die Induktion von p53 zur Freisetzung von Cyt c. Die ansteigende Konzentration von Cyt c führt zu einer Induktion von Caspasen und nachfolgend über Apoptosomenbildung zur Apoptose [145, 146].

Das Protein p53 wurde in den Analysen der IPA für S9-Epithelzellen nach Behandlung mit Ar-CAP als aktiviert und für He-CAP als inhibiert vorausgesagt. Dies lässt vermuten, dass eine Apoptose abhängig von der Intensität des CAP ist. Unter gleichen Bedingungen ist eine geringere Effizienz von He-CAP gegenüber Ar-CAP beschrieben [106].

HSF1 ist Bestandteil der zellulären Reaktion auf oxidativen Stress und die damit verbundene Zunahme fehlgefalteter Proteine. In Form eines negativen direkten Feedbacks ist HSF1 an HSP90 gebunden und verliert die Funktion als Transkriptionsinduktor. Bei Zunahme fehlgefalteter Proteine löst sich HSF1 von HSP90, wird phosphoryliert und induziert die Bildung von Hitzeschockproteinen [147-149].

TGFB bildet den Prototypen einer gesamten Proteinfamilie. Codiert werden die Proteine durch 33 Gene. Die Proteine nehmen vielfältige Funktionen ein und sind unter anderem in die Zellproliferation integriert. Dabei können sie anti- oder proproliferativ wirken [150-152]. Anhand von Wundmodellen der Haut konnte nach Behandlung mit CAP ein Anstieg der Genexpression und Proteinkonzentration von TGFB nachgewiesen werden. Infolgedessen kam es zu einem schnelleren Wundschluss und somit zum Nachweis der proliferationsfördernden Wirkung [153, 154].

Anhand von Netzwerken stellten IPAs die Proteinidentifikationen mit entsprechender Mengenänderung im Vergleich zur korrespondierenden Gaskontrolle durch vorbeschriebene Interaktionen in Zusammenhang. Dabei konnte unabhängig vom Quellgas (Argon, Helium) oder vom Mediumzusatz (FCS, NTA) ein Einfluss auf den MAP (*Mitogen activated Protein*)-Kinase-Weg (MAPK/ERK-Pathway) nachgewiesen werden. Der Pathway besteht aus mehreren hundert Komponenten und ist unter anderem an der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt [155, 156]. MAP-Kinasen und ERK konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (Abb. 22), allerdings ist ihre Aktivierung durch CAP vorbeschrieben [66, 118].

Zusammengefasst induziert CAP in Abhängigkeit von der Effektivität des oxidativen Stresses eine Proliferation der Zellen oder die Apoptose. Die Anpassungsmechanismen, darunter der Abbau von RONS mittels Scavengersystemen induziert durch NRF2 und Proteinstabilisierung und Refaltung durch Hitzeschockproteine, können in einer Aktivierung der proliferativen MAPK/ERK-Signalkaskade und von TGFB münden. Übersteigt der oxidative Stress die Kapazität der Zelle, kann eine Homöostase nicht aufrechterhalten werden und es kommt zu einer p53-vermittelten mitochondrialen Dysfunktion und letztlich zur Apoptose. Scharf et al. konnten diese Mechanismen für S9-Epithelzellen bereits nachweisen [112].

6.2.2 Wirkung von CAP auf HNO97- und HNO41-Karzinomzellen

Bisher ist die antikarzinomatöse Wirkung von CAP auf HNSCC nicht ausreichend untersucht. Prinzipiell können die Ergebnisse bei der Behandlung weiterer Karzinome teilweise übertragen

werden. Dabei besteht großes Potenzial in der Addition von CAP zur Standardtumorthherapie [97, 102]. Als Ursache für die Wirkung des CAP auf Karzinome wird wiederum die Genese von oxidativem Stress in Form von RONS angesehen [23].

Vergleichbar zu den Ergebnissen der IPA der S9-Epithelzellen konnte für Karzinomzellen der Einfluss von CAP auf die Glykolyse, das eNOS-Signal und die Stressantwort auf ungefaltete Proteine nachgewiesen werden. Zusätzlich ließ sich eine Affektion von Adhärenskontakten und des Clathrin-vermittelten Phagozytosesignals aufzeigen (Tab. 43). Wachstumskinetiken der HNO97-Karzinomzellen unter FCS zeigten im Vergleich zur korrespondierenden unbehandelten Kontrolle eine ausgeprägte Reduktion der Zellzahl zum Zeitpunkt 0h. Es folgte ein annähernd linearer Anstieg über 5 Tage. Unter NTA blieb ein Wachstum der Zellen nach CAP-Behandlung für 120 h aus. In diesen Proben ließ sich für die Behandlung mit Arbeitsgas ohne Aktivierung des Plasmas eine ähnliche Reduktion der Zellzahl über 48 h erzielen (Abb. 8). Entgegen der mikroskopischen Aufnahmen mit Nachweis einer Proliferation und Migration von unbehandelten Zellen in die entstandenen zellfreien Zonen ließ sich die Proliferation in den Wachstumskinetiken nicht nachweisen (Abb. 6). Ursächlich hierfür könnte die deutlich reduzierte Wellfläche der 6-Well-Platten sein, wodurch bei meanderförmiger Behandlung der Wells nahezu alle Zellen dem Jet des APPJ ausgesetzt waren.

In Reaktion auf eine CAP-Behandlung wurde eine Abnahme der Lebensfähigkeit der Karzinomzellen in HNSCC bereits nachgewiesen [53]. Nach einer einmaligen Behandlung mit CAP-aktiviertem Medium zeigte sich zunächst eine Proliferationssteigerung der Karzinomzellen, sodass eine mehrfache Anwendung notwendig war [157]. Im Gegensatz zur Behandlung mit CAP-aktiviertem Medium konnte bei einer Behandlung von HNSCC mittels APPJ in vivo keine Stimulation des Tumorwachstums gesehen werden [158, 159]. Dies bestätigt die Ergebnisse der in dieser Arbeit gezeigten Wachstumskinetiken.

Unter den Top Tox Listen zu HNSCC fand sich eine Verminderung der mitochondrialen Membranpermeabilität und die Apoptose. Zusätzlich entstanden DNS-Schäden, die in einem Zellzyklusarrest in G2/M resultierten und eine Checkpoint-Regulation ermöglichten. Der Zellzyklusarrest wurde durch Hasse et al. bereits beschrieben. Dabei zeigte sich der Effekt proportional zur Applikationsdauer des CAP [160].

Die Verminderung der mitochondrialen Membranpermeabilität stellt einen zellprotektive Mechanismus dar. Dabei wird die Permeabilitätsminderung durch *Voltage-dependent anion channels* (VDAC) in der äußeren Membran der Mitochondrien realisiert. Ein offener Kanal

ermöglicht den Efflux von ATP ins Zytosol. Durch die Verminderung der Durchlässigkeit wird für eine Suppression der mitochondrialen ATP-Hydrolyse gesorgt, um die Bildung von Superoxiden zu vermindern [161]. VDAC ließ sich in HNO41-Karzinomzellen nach Behandlung mit Ar-CAP als hochreguliert nachweisen (Vgl. 8.1: HNO41-F-AP-13).

Unter den ausgewiesenen Regulatorproteinen fanden sich wie unter S9-Epithelzellen eine Veränderung für p53, NRF2, HSF1 und TGF β . Zusätzlich ergaben sich Hinweise auf eine Veränderung des Tumornekrosefaktors (TNF).

TNF ist in multiple Zellfunktionen integriert und vermittelt u.a. eine Inflamationsreaktion der Zelle [162]. TNF ist in der Lage NF- κ B und den MAP-Kinase-Pathway zu aktivieren [163]. Die Stabilität der mRNA für TNF wird über einen weiteren Bestandteil des MAP-Kinase-Pathways, M κ 2 (*p38/MAPK activated protein kinase*), aufrechterhalten [164, 165].

In der Gruppe der Regulatorproteine war TGF β in den Karzinomzellen tendenziell hochreguliert. Zur TGF- β -Familie gehört unter anderem Activin A. Eine hohe Konzentration von Activin A ist mit einer Steigerung von Proliferation, Invasivität und Metastasierung assoziiert [166, 167].

Anhand der IPA konnten Netzwerke regulierter Proteine mit einer Darstellung zentraler Pathways herausgearbeitet werden. Dabei ließ sich der MAPK-ERK-Pathway durch mengenmäßig veränderte Proteine mehrheitlich beeinflussen. MAPK und ERK konnten nicht nachgewiesen werden, allerdings kann von einer Beteiligung als Reaktion auf oxidativen Stress in HNSCC ausgegangen werden. Dabei wurden diverse Hitzeschockproteine, u.a. HSP27, Mitglieder der HSP70-Familie (HSPA5, HSPA1A/B) und HSP60 (HSPD1), sowie Albumin (ALB) und GAPDH als reguliert nachgewiesen (Abb. 37). Auf die Funktionsweise der Hitzeschockproteine, GAPDH und Albumin wird an späterer Stelle eingegangen.

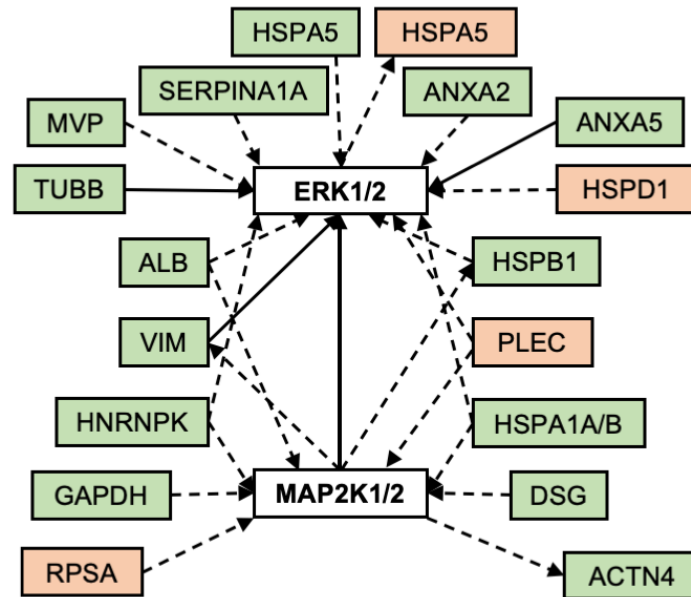


Abbildung 37: Zusammenfassung CAP-regulierter Proteine und ihre Relation zum MAPK-ERK-Pathway anhand der IPA für HNSCC (HNO97 und HNO41). Proteine mit einer mindestens zweifachen Erhöhung (rot) bzw. Verminderung (grün) der Proteinmenge in Vergleich zur korrespondierenden Gaskontrolle wurden dargestellt. Durch Pfeile wurde die Interaktionsrichtung abgebildet.

Zusammengefasst wird durch die Applikation von CAP eine signifikante Reduktion der Zellzahl bei HNSCCs erreicht. Unter anderem kommt es zur Induktion der Apoptose, bei der der MAPK-ERK-Pathway und p53 beteiligt sind. Die Apoptoseinduktion und Prozessierung überwiegt dabei Mechanismen zur Prävention der Apoptose, wie einer erhöhten Aktivität von Chaperonen und einer Verminderung der mitochondrialen Membranpermeabilität. In dieser Arbeit konnten zusätzlich DNS-Schäden als ursächlich identifiziert werden. Diese proapoptotischen Effekte wurden in vivo bereits untersucht, wobei durch eine die zusätzliche Behandlung mit CAP bei HNSCCs eine Verminderung der Tumorgroße erzielt werden konnte [53, 168]. Die Ergebnisse bestätigen die Resultate von Hasse et al., die anhand von HNO97-Karzinomzellen eine applikationsdauerabhängige proapoptotische Wirkung von CAP, u.a. durch G2/M-Arrest und Steigerung der Caspase-3-Aktivität, herausarbeiteten [160].

6.3 Einfluss des Serums auf die CAP-Behandlung

In dieser Arbeit wurde bei der Kultivierung der Zellen das Nährmedium mit FCS oder NTA versetzt und die daraus resultierenden Effekte verglichen. NTA ist ein synthetischer Serumersatz bestehend aus „Proteinen, Lipiden, Salzen, Aminosäuren, Spurenelementen, Anheftungsfaktoren und Hormonen“ und laut Herstellerangaben „frei von tierischen Bestandteilen“ (Produktinformation, Panexin NTA, Pan Biotech). Bei FCS ist die Zusammensetzung

erzeugnisabhängig und kann in den Chargen divergieren [169]. Weitere Publikationen mit Verwendung von NTA lassen sich nicht zum Vergleich heranziehen.

Die PCA der einzelnen Zellenlinien zeigten, dass nach der Unterscheidung zwischen den Zellenlinien die größte Differenz durch die unterschiedlichen Seren hervorgerufen wird. In allen analysierten Proben bildete die Verwendung von FCS bzw. NTA jeweils die erste Hauptkomponente (Abb. 16-18).

Anhand der Gelbilder mit Gegenüberstellung der Seren in Delta 2D (Abb. 11, 13-14) zeigten sich große Unterschiede in der Auftrennung des Proteoms der entsprechenden Proben, hier am Beispiel von S9-Epithelzellen nach Behandlung mit Ar-CAP aufgeführt (Abb. 38). Die Unterschiede waren dabei unabhängig von der Behandlung mit CAP und ließen sich auch in der Gegenüberstellung der entsprechenden Gaskontrollen nachweisen.

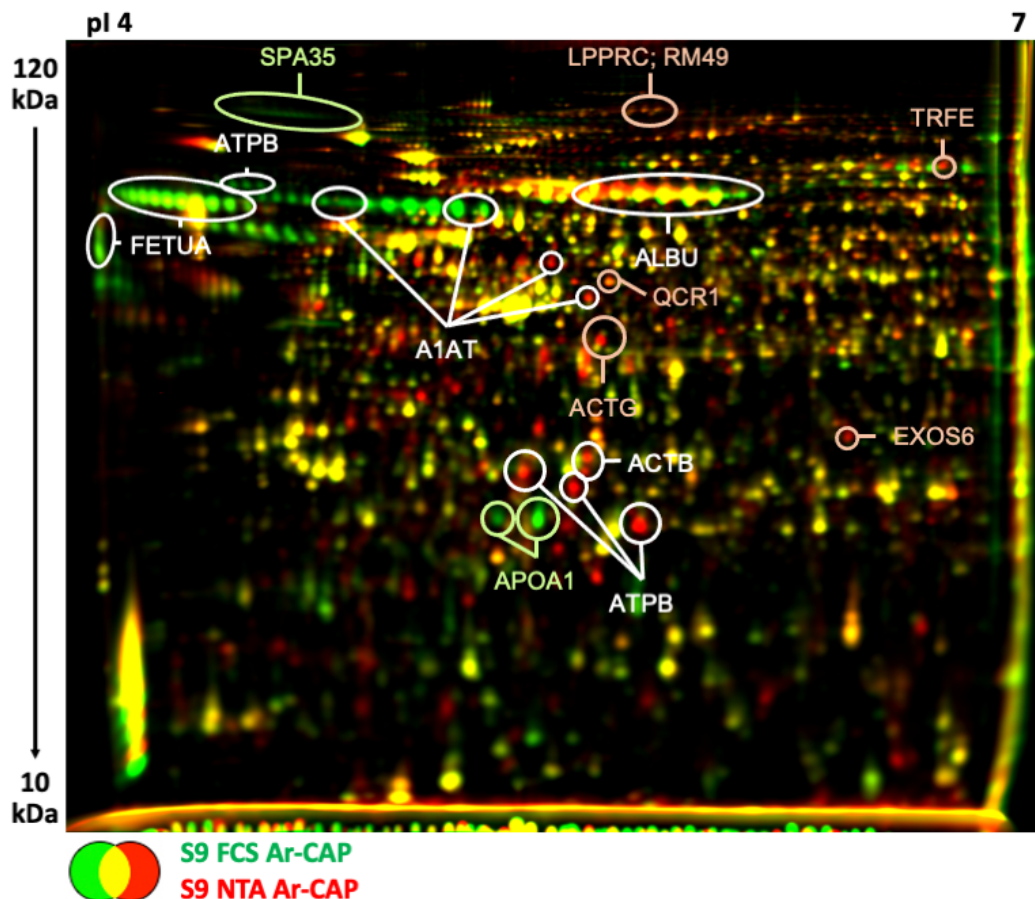


Abbildung 38: Overlay von S9-Epithelzellen nach Behandlung mit Ar-CAP zur exemplarischen Darstellung der Unterschiede zwischen FCS und NTA. Die Auftrennung der Proteine aus den Proben erfolgt nach isoelektrischem Punkt zwischen pI 4 und 7 und nach molekularer Masse zwischen 10 und 120 kDa. Grüne Spots verdeutlichen Proteine aus den Proben unter FCS und rote Spots aus Proben unter NTA. Exemplarisch sind vereinzelt identifizierte Proteine anhand ihrer UniProt-ID ausgewiesen. In beiden Proben ließ sich FETUA, ALBU, ATPB, ACTB und A1AT identifizieren. Die grünlich markierten Proteine konnten nur im Probenmaterial unter Kultivierung mit FCS und die rötlich markierten Proteine nur im Probenmaterial unter NTA identifiziert werden. Weiß markierte Proteine konnten sowohl in Proben mit FCS-haltigem als auch NTA-haltigem Medium identifiziert werden.

Nach abgeschlossener Proteinidentifikation der signifikant in ihrer Menge veränderten Proteine konnten Venn-Diagramme mit Vergleich der Identifikationen für FCS und NTA erstellt werden (Abb. 39). Hierbei wurden sowohl humane als auch bovine Proteine berücksichtigt. Die Überschneidungsmengen zwischen FCS und NTA fielen dabei unabhängig von der Zelllinie niedrig aus. Aufgrund der deutlichen Differenzen zwischen den beiden Seren ist von einer signifikanten Beeinflussung des Proteoms durch das Nährmedium auszugehen. Proteine aus dem Medium werden in die Zellen internalisiert und weiterprozessiert.

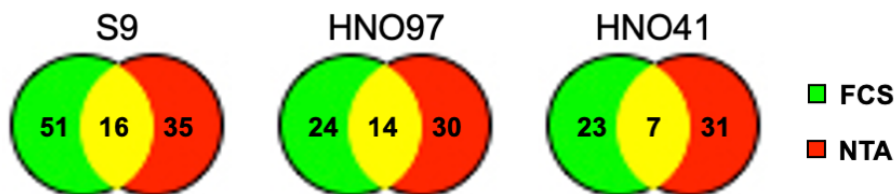


Abbildung 39: Überschneidungsmengen der mengenmäßig veränderten Proteine nach Behandlung mit CAP unter Differenzierung der verwendeten Seren FCS und NTA. Die Überschneidungsmenge war in allen untersuchten Zelllinien niedrig.

Durch die massenspektrometrische Proteinidentifikation der durch CAP regulierten Proteinspots in Delta 2D konnten einzelne Proteine mit Unterscheidung zwischen FCS und NTA nachgewiesen werden (Abb. 38). So findet sich in FCS unter anderem ausschließlich ein Serin Protease Inhibitor (SERPIN A3; SPA35) und das Apolipoprotein A1 (APOA1). Der Serin Protease Inhibitor sorgt für die Inhibition mehrerer Proteasen, darunter Elastasen, Cathepsin G und Chymasen [170]. Das Apolipoprotein A1 ist wesentlicher Bestandteil des Cholesterolverstoffwechsels [171]. Weitere Proteine, die hauptsächlich in Proben unter Kultivierung mit FCS identifiziert wurden, sind: Adapter Molekül CRK (CRK), *Nucleosome assembly protein 1-like 2* (NP1L2) und *X-ray repair cross-complementing protein 5* (XRCC5) (Abb. 35). Das Adapter Molekül CRK ist in Regulation der Zelladhäsion involviert [172]. Das *Nucleosome assembly protein 1-like 2* interagiert mit Histonen. Das Protein spielt im Wesentlichen eine Rolle in Neuronen, wurde allerdings auch schon in der Interaktion mit mRNA in Karzinomzellen identifiziert [173, 174]. XRCC5 bildet mit *X-ray repair cross-complementing protein 6* (XRCC6) Dimere, reguliert die Reparatur von DNS-Doppelstrangbrüchen und ist in die Karzinogenese unterschiedlichster Karzinome involviert [175, 176].

Proteine, die unter FCS oder NTA im Medium nach CAP-Behandlung in ihrer Menge verändert wurden, waren unter anderem Albumin (ALBU) und α 1-Antitrypsin (A1AT) (Abb. 35).

Da die Spotidentifikation durch den Vergleich der CAP-behandelten Proben mit ihren entsprechenden Gaskontrollen erfolgte, blieb ein Großteil der hier im Vergleich der 2D-Gele eindeutig regulierten Proteinspots unidentifiziert. Für eine exakte Analyse der Differenzen zwischen FCS

und NTA wäre eine Versuchsanordnung mit einem Vergleich der Seren notwendig. Zur Identifikation wurden nur Proteine mit einer Veränderung gegenüber der Kontrolle um den Faktor 2 ausgewählt. Dadurch blieben Proteine mit einer veränderten Proteinmenge unterhalb einer 2-fachen Regulation unberücksichtigt.

Es lässt sich herausarbeiten, dass das Serum einen großen Einfluss auf den Effekt der CAP-Behandlung hatte und dafür die unterschiedliche Zusammensetzung von FCS und NTA verantwortlich war. Ein direkter Vergleich der CAP-behandelten Proben mit Versatz des Nährmediums mit FCS gegenüber NTA ohne vorhergehenden Bezug auf die korrespondierenden Gas-kontrollen könnte umfangreichere Unterschiede darstellen.

6.3.1 Einfluss von Albumin auf die Effektivität von CAP

Extrazelluläre Scavengersysteme sind in der Lage, induzierte RONS signifikant zu vermindern und so den Effekt auf die Zielzellen zu reduzieren [177-180]. Neben einer Vielzahl von anderen Serumbestandteilen ist HSA eines der potentesten Proteine zur Reduktion von oxidativem Stress [68-70]. Unter oxidativem Stress wird HSA als Puffersystem genutzt [181]. Ursächlich für die Scavengerfunktion des Albumins ist eine freie Thiolgruppe am Cystatin (Cys₃₄). Die übrigen 17 Disulfidbrücken des Proteins stabilisieren es gegen äußere Einflüsse, wie Temperatur und Änderungen des pH-Werts [182]. Ein vergleichbarer Aufbau mit einer gleichen Anzahl an Disulfidbrücken und freiem Cystein findet sich im BSA [183].

Die Konzentration der oxidierten Form des Albumins kann bei oxidativen Stress im humanen Serum ansteigen und über Tyrosin Dimere bilden [181, 184]. Katsumi et al. wiesen die Effektivität von Albumin als Scavenger durch den Einsatz von konjugiertem BSA bei der Therapie des fulminanten Leberversagens in Mäusen nach. Hier konnte die Konzentration an RONS durch die Applikation signifikant gesenkt werden [71].

Für FCS und NTA konnte in der massenspektrometrischen Analyse der ausgeschnittenen Gel-spots mehrfach Albumin identifiziert werden. Dabei gelang der Nachweis von BSA unabhängig von der jeweiligen Zelllinie. Es ist davon auszugehen, dass Albumin in die Zellen aufgenommen und weiterprozessiert wird. Eine Quantifizierung des Albumins wurde nicht durchgeführt. Vor der Behandlung mit CAP wurden die Zellen mit einer definierten Menge an Nährmedium be-netzt. Es kann daher von einer annähernd konstanten Albuminmenge in den jeweiligen Pro-ben für die unterschiedlichen Seren ausgegangen werden.

Aufgrund des Nachweises von bovinem Albumin im NTA-kultivierten Probenmaterial ist von einer Verwendung der Aminosäuresequenz für Albumin zur Herstellung des synthetischen Serumersatzes auszugehen. Nach Applikation von CAP zeigte sich in allen Proben, in denen Albumin nachgewiesen werden konnte, eine Reduktion der Albuminmenge im Vergleich zur korrespondierenden Gaskontrolle. Dies lässt eine Fragmentierung von Albumin durch die Oxidation durch RONS und einen nachfolgenden Abbau vermuten [184].

Albumin befindet sich zusätzlich zur extrazellulären Matrix im Zytosol. Hier interagiert es mit dem MAPK-ERK-Pathway und kann über NFκB eine Ausschüttung von proinflammatorischen Botenstoffen initiieren [185]. Ein Zusammenhang mit diesem Pathway konnte in dieser Arbeit anhand der IPA für Karzinomzellen nachgewiesen werden (Abb. 37). Dabei war die Proteinmenge im Vergleich zu den entsprechenden Gaskontrollen vermindert. Daher kann an dieser Stelle zunächst von einer Funktion als Scavenger ausgegangen werden. Eine proapoptotische und proinflammatorische Wirkung verursacht das Protein in hohen intrazellulären Konzentrationen [186].

In welchem Ausmaß Albumin die Effektivität einer CAP-Behandlung vermindert, ließ sich nicht bestimmen. Eine signifikante Reduktion des oxidativen Stresses durch den potenten Scavenger ist zu erwarten und bei einem zukünftigen Transfer von CAP in die angewandte Medizin zu berücksichtigen.

6.4 Regulation von Hitzeschockproteinen durch CAP

Unter den vielen veränderten Effekten wurde in dieser Arbeit die Proteinmengenänderung von HSP27 in Epithelzellen und Karzinomzellen nach Behandlung mit CAP explizit untersucht. Hitzeschockproteine übernehmen unter oxidativen Stress unterschiedliche Aufgaben. HSP27 und HSP70 haben entscheidenden Einfluss auf die Inhibition der Apoptose. HSP90 reguliert durch Bindung an HSF1 dessen Aktivität. Bei Zunahme von fehlgefalteten Proteinen löst sich HSP90 von HSF1 und stabilisiert die fehlgefalteten Proteine. HSF1 bindet an Hitzeschockelemente (HSE) der DNS zur Transkription von Hitzeschockgenen. Bei erneuter Faltung der an HSP90 gebundenen Proteine oder dem Abbau durch Proteasomen bindet HSP90 an HSF1 und inaktiviert es. An die Transkription schließt sich unter anderem die Translation von HSP70 und HSP27 an [147-149].

HSP27 kann an Serin (Ser)-15, Ser-82, Ser-78 und Threonin (Thr)-143 phosphoryliert werden. Durch die Modifikation verliert es seine Funktion als Chaperon. Die Phosphorylierung erfolgt

unter ATP-Verbrauch über eine Vielzahl von Proteinkinasen, unter anderem MAPK-aktivierte Proteinkinasen-2, -3, -5 (MK2, MK3, MK5) sowie Proteinkinase (PK) A, B, C, und D [74].

Die Phosphorylierung kann per Phosphatase 2A binnen Minuten wieder aufgehoben werden. Unphosphoryliertes HSP27 ist in der Lage Multimere mit einer Masse von bis zu 1000 kDa zu bilden. Die Mechanismen des Gleichgewichts zwischen Dephosphorylierung und Phosphorylierung ermöglichen eine Anpassung der Zellen an äußere Veränderungen, wie z.B. oxidativen Stress.

HSP27 liegt vor der Behandlung in den Zellen im Gleichgewicht zwischen phosphorylierter Form und oligomerer Anordnung vor. Phosphoryliertes HSP27 bindet an Aktin und verhindert die Elongation von Aktinfilamenten [75]. Durch vermehrte Translation steigt der Anteil an Oligomeren. HSP27 übernimmt in Oligomeren die Aufgaben eines Chaperons. Als Chaperon verringert es oxidativen Stress, erhöht zusätzlich die Wirkung von Glutathion und GAPDH und inhibiert Caspase 3 und FAS [72, 187]. HSP27 bindet zusätzlich freiwerdendes Cytochrom c. Dieses würde anderenfalls mit Caspase 9 und APAF-1 Apoptosomen bilden und Caspase 3 aktivieren. Außerdem wird über die Bindung von Bad die Freisetzung von Cyt c aus dem Mitochondrium inhibiert [78, 79].

HSP70 erzeugt den gleichen Effekt über die Inhibition des mitochondrialen Cyt c-Transporters PTPC. Es verhindert die Bildung von Apoptosomen und die Induktion der Apoptose. Eine Reduktion von zusätzlichem oxidativen Stress gelingt über die Inhibition einer Inflammation über NFκB [188]. HSP70 inhibiert zusätzlich die Induktion von p53 über PI3K [187, 189].

Die Interaktionen der Hitzeschockproteine HSP90, HSP70 und HSP27 sind in Abb. 40 veranschaulicht.

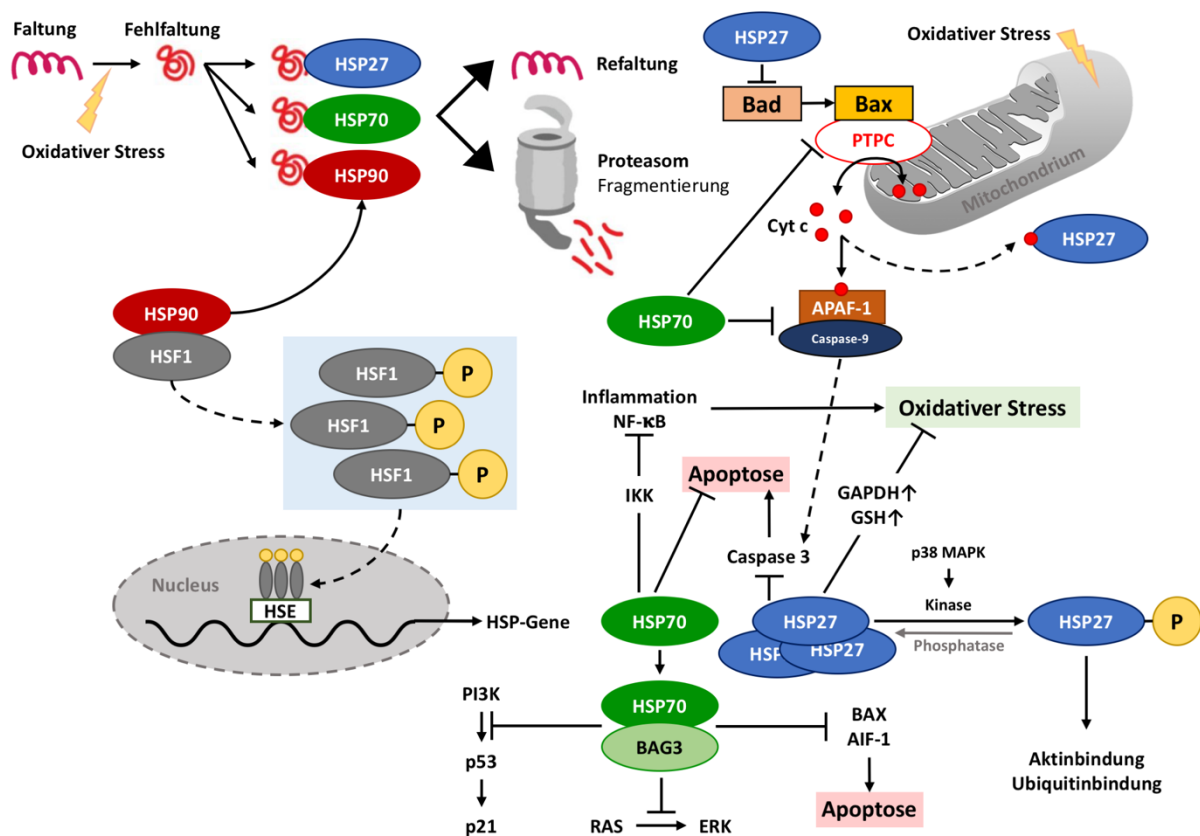


Abbildung 40: Schematische Darstellung des Einflusses von oxidativen Stress auf die Regulation von Hitzeschockproteinen. Durch oxidativen Stress kommt es zur Fehlfaltung von Proteinen. Zur Stabilisierung lagern sich HSP27, HSP70 und HSP90 an die fehlgefalteten Proteine an und führen zum Abbau oder Refaltung. HSF1 wird phosphoryliert und bindet an Hitzeschockelemente auf der DNA. Die Transkription von HSP-Genen und Translation von Hitzeschockproteinen steigt. HSP70 verhindert eine Inflammation, die Bildung von Apoptosomen und die Freisetzung von Cytochrom c (Cyt c) aus dem Mitochondrium. HSP27 inhibiert Caspase 3, bindet freiwerdendes Cytochrom c und mindert den oxidativen Stress, wodurch die Apoptose verhindert wird. Modifiziert nach Chatterjee et al [186].

6.4.1 Hitzeschockproteine in S9-Epithelzellen

HSP27 sowie Bestandteile der HSP70- und HSP90-Familie konnten durch die massenspektrometrischen Analysen ausgeschnittener Proteinspots von S9-Epithelzellen nach CAP-Behandlung in 2D-Gelen in ihrer Proteinmenge verändert nachgewiesen werden (Abb. 26). Die Proteine HSP70 und HSP90 waren dabei in CAP-behandelten Proben vermindert.

Um die Veränderung der Proteinmenge von HSP27 in Abhängigkeit von der CAP-Behandlung herauszuarbeiten, wurden Immunoblotassays der CAP-behandelten Proben und den korrespondierenden Gaskontrollen erstellt. Dabei konnte HSP27 durch die Behandlung mit Ar-CAP signifikant in der Proteinmenge reduziert werden. Im Probenmaterial unter Verwendung von He-CAP ließ sich dieser Effekt nicht darstellen. Hier ließ sich eine stärkere Wirkung von Ar-CAP

vermuten. Die Wirkung war dabei unabhängig vom verwendeten Serum (FCS oder NTA) zu beobachten (A, Abb. 28).

Eine Blockade aller freien Disulfidbrücken mittels N-Ethylmaleimide im Probenlysepuffer resultierte in einer erhöhten Proteinmenge von HSP27 nach CAP für FCS im Vergleich zur korrespondierenden Gaskontrolle. Dabei war die Proteinmenge 1 h nach Behandlung höher als nach 24 h. Für die Proben unter NTA überstieg die Proteinmenge von HSP27 nach CAP-Behandlung nach 1 h die Proteinmenge der korrespondierenden Gaskontrolle und fiel nach 24 h ab (B, Abb. 28). Es lässt sich eine zeitabhängige Regulation des Hitzeschockproteins vermuten. Dabei beruht die frühe Induktion der Hitzeschockproteine auf einer Reaktion der Zellen auf den CAP-bedingten oxidativen Stress. Die erhöhte Proteinmenge von HSP27 ist unter anderem über vermehrte Transkription und Translation über HSF1 organisiert. So stieg innerhalb der ersten Stunde die Menge an HSP27 zur Reduktion von RONS an (Abb. 41).

Nach 24 Stunden führte übermäßiger oxidativer Stress entweder zur Apoptose der Zellen oder die Regulationsmechanismen reichten für das Überleben der Zellen aus. Eine erhöhte Menge von HSP27 schützt Epithelzellen vor der Apoptose [190]. Nach 24 Stunden sinkt die Konzentration von HSP27 unter den Wert der Kontrolle.

Zur Bestätigung dieses Effekts wären in weiteren Untersuchungen Zeitreihen mit kürzeren Intervallen nötig.

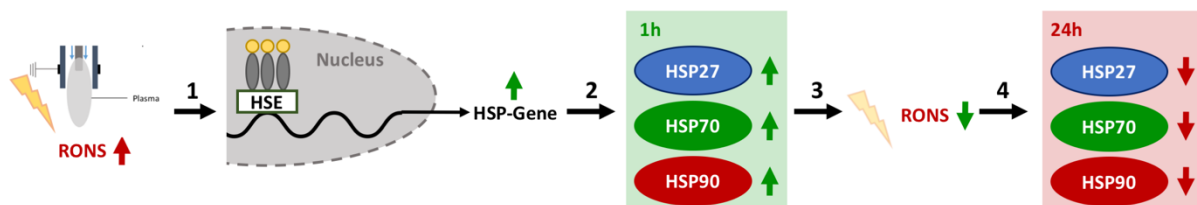


Abbildung 41: Frühe und späte Effekte von oxidativen Stress auf Hitzeschockproteine. Der oxidative Stress durch CAP führt zur Induktion von Hitzeschockproteingenen (1). Initial, nach einer Stunde, werden Hitzeschockproteine vermehrt exprimiert (2). Die hohe Konzentration an Hitzeschockproteinen verringert den oxidativen Stress (3). Nach 24 Stunden ist die Konzentration an RONS reduziert und die Hitzeschockproteine abgebaut oder wieder vermindert exprimiert (4).

6.4.2 Hitzeschockproteine in Karzinomzellen

Analog zu S9-Epithelzellen wurden in HNO97- und HNO41-Karzinomzellen Immunoblots zum Nachweis der Proteinmenge von HSP27 erstellt. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Proteinmenge von HSP27 für Ar-CAP und He-CAP unabhängig vom verwendeten Serum im Vergleich zu entsprechenden Gaskontrollen (A, Abb. 30 und 32). Die relative Proteinmengenreduktion von HSP27 fiel unter Ar-CAP größer aus als unter He-CAP. Auch bei der Bestimmung der

Proteinmenge nach 1 h und 24 h konnte jeweils eine Reduktion der Proteinmenge von HSP27 nachgewiesen werden (B, Abb. 30).

In HNO97-Karzinomzellen war in der massenspektrometrischen Proteinidentifikation eine Zunahme von HSP70 zu sehen. HSP90 war in Proben nach Plasmabehandlung vermindert exprimiert.

Im Vergleich zu den Epithelzellen zeigt sich ein zelllinienspezifischer Unterschied in der Proteinmenge von Hitzeschockproteinen als Reaktion auf oxidativen Stress. In HNO97-Karzinomzellen konnte eine Erhöhung der Proteinmenge von HSP27 innerhalb der ersten Stunde nicht nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass eine Hochregulation der Proteinmenge von HSP27 als Reaktion auf oxidativen Stress ausbleibt. Auch nach 24 h war die Proteinmenge im Vergleich zu korrespondierenden Gaskontrollen weiterhin reduziert.

In Karzinomzellen scheint eine Anpassung in Form einer vermehrten Expression von Hitzeschockproteinen auszubleiben. Die fehlende Anpassung von Hitzeschockproteinen nach Erhöhung des oxidativen Stresses macht Karzinomzellen interessant für eine Therapie mit CAP. Um die Annahmen zu bestätigen, sind auch hier weitere Untersuchungen mit Zeitreihen in kürzeren Abständen und zusätzlicher Bestimmung von HSP90 und HSP70 neben HSP27 möglich.

6.4.3 HSP27 als potenzielles Therapieziel

Dass HSP27 ein mögliches Ziel für die erfolgreiche Behandlung von HNSCCs ist, zeigten bereits Zhu et al. durch einen Knockdown von HSP27 auf Transkriptionsebene, wodurch eine Metastasierung erheblich eingeschränkt wurde [80]. Eine Überführung eines Knockdowns von HSP27 am Menschen erscheint ohne Nebenwirkungen durch Affektion gesunder Zellen nicht möglich.

Die Applikation mit CAP mittels APPJ bietet die Möglichkeit der lokalen gezielten Behandlung. Die Metaanalyse von Norton et al. gab in Zusammenschau von 77 Studien von HNSCCs eine erhöhte Expression von HSP27 an [82]. Dies lässt auf eine gute Anpassung an oxidativen Stress schließen.

Ausgehend hiervon dient HSP27 als Chaperon und inhibiert die Apoptose vornehmlich über die Inhibition von Caspase-3. Mit CAP wird gezielt oxidativer Stress erhöht und vermindert nach initialer Gegenregulation die Expression von HSP27 bzw. sorgt dieser für den Abbau von HSP27. Zusätzlich führt oxidativer Stress zu einer mitochondrialen Dysfunktion, die in einer Apoptose münden kann.

Aufgrund der unspezifischen Wirkungsweise sind Hitzeschockproteine eines von mehreren Systemen, welche durch CAP beeinflusst werden. Der multimodale Wirkungsmechanismus ist komplex und dosisabhängig. Die Evaluation der notwendigen Dosis kann in dieser Arbeit nicht abschließend eruiert werden, da die Intensität des oxidativen Stresses von weiteren Faktoren, wie extra- und intrazellulären Scavengersystemen, abhängt. Außerdem beeinflussen Tumorgröße und begleitende Therapien den Erfolg. Hadchity et al. zeigten durch ein Knockdown von HSP27 ein höheres Ansprechen von HNSCCs auf Radiotherapie [81]. Vor diesem Hintergrund scheint eine lokale Applikation von CAP zur notwendigen Reduktion von HSP27 möglich, um den Erfolg einer anschließenden Radiotherapie zu maximieren.

6.5 Funktion von GAPDH unter oxidativem Stress

Die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) nimmt eine entscheidende Funktion in der Glykolyse ein. Neben dieser Funktion erfüllt das Enzym in Abhängigkeit von seiner Proteinmodifikation wichtige Aufgaben in der Reaktion auf oxidativen Stress [191, 192]. So führt eine Oxidation des Cystein₁₅₂ (Cys₁₅₂) zur Inaktivierung der Glykolysefunktion, Veränderung der Interaktionspartner und Translokation des Proteins aus dem Zytosol in die Mitochondrien und den Zellkern [191, 193, 194]. Der Einfluss des oxidativen Stresses sorgt für einen Verlust der katalytischen Aktivität von GAPDH und einem Progress in der Zellalterung [192].

Die Oxidation des Enzyms sorgt für eine Proteinaggregation und in der Folge für eine mitochondrialen Dysfunktion mit Initiierung der Apoptose (Abb. 42) [195].

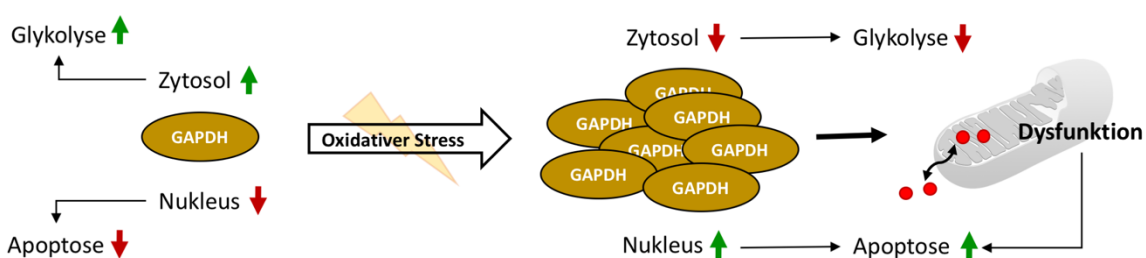


Abbildung 42: Funktion von GAPDH unter oxidativem Stress. Im Normalzustand ist GAPDH in hoher Konzentration im Zytosol und Bestandteil der Glykolyse. Durch oxidativen Stress akkumuliert GAPDH. Es erfolgt eine gesteigerte Konzentration im Zellkern was die Apoptose induziert. Die Glykolyse nimmt ab. Das akkumulierte GAPDH führt zu einer mitochondrialen Dysfunktion, die wiederum die Apoptose induziert. Abbildung modifiziert nach Nakajima et al. [144].

Aufgrund dieser proapoptotischen Wirkung von GAPDH bei oxidativem Stress werden Mechanismen zur Einflussnahme auf den Oxidationsstatus des Enzyms gesucht. So konnte durch eine

Blockade des Cys₁₅₂ eine Aggregation von GAPDH verhindert und untersuchte Zellen vor der Apoptose bewahrt werden [196-198].

In dieser Arbeit konnte eine Affektion von GAPDH durch eine CAP-Applikation nachgewiesen werden. In den IPA zeigte sich in HNO97-Karzinomzellen der Einfluss auf Enzyme der Glykolyse (Tab. 43). Zusätzlich ergab sich in den Netzwerken der Karzinomzellen eine Verbindung zum MAPK-ERK-Pathway (Abb. 37). Hier ist eine Abhängigkeit der zytosolischen GAPDH von Bestandteilen des Pathways, u.a. MEKK3 (*MAP kinase/ERK kinase kinase 3*) bekannt [199, 200]. Um Proteinmengenunterschiede von GAPDH in Abhängigkeit von der CAP-Behandlung zu beschreiben, wurden Immunoblots mit Nachweis von GAPDH in S9-Epithelzellen und HNO97- und HNO41-Karzinomzellen angefertigt. Hier konnte für die CAP-Behandlung keine eindeutige Veränderung der Proteinmenge von GAPDH nachgewiesen werden (Abb. 29, 31 und B, Abb. 31).

Aufgrund der oben beschriebenen Wirkungsweise ist von keiner Änderung der Proteinmenge sondern von einer Veränderung der Enzymfunktion auszugehen. Diese konnte mit der angewandten Methodik nicht nachvollzogen werden und würde weitere massenspektrometrische Analysen bis hin zur Sequenzierung erfordern. Dennoch kann aufgrund der bekannten Wirkmechanismen von einem entscheidenden Einfluss von GAPDH auf die Antwort der CAP-behandelten Zielzellen ausgegangen werden.

6.6 Identifikation weiterer Zielproteine

Mit Hilfe der Overlays in der Delta 2D-Software konnte die Regulation einer Vielzahl an Proteinen für jede einzelne Behandlung betrachtet und analysiert werden. Grundlage bildete dabei die Spotintensität gegenüber dem Hintergrund. Auf die Berechnung des *fc*-Werts wurde in diesem Fall verzichtet, um die Differenz der Spotintensitäten zwischen CAP-behandelten Proben und ihren Gaskontrollen darzustellen. Exemplarisch wurden einzelne, auffällig regulierte Proteine ausgewählt (Vgl. 5.9.3). Da zu jeder Behandlungsform lediglich ein präparatives Gel mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse angefertigt wurde, war eine statistische Auswertung der Ergebnisse nicht möglich, dennoch bietet sich ein Ausblick auf potenzielle Zielproteine.

6.6.1 Calmodulin-like Protein 3 und 5

CALL3 und CALL5 sind an der Karzinogenese multipler Gewebe beteiligt. Anhand von Epithelzellen der Brust wiesen Rogers et al. nach, dass eine niedrige intrazelluläre Proteinmenge von CALL3 und CALL5 mit einer Entdifferenzierung des Gewebes assoziiert ist [201]. Mutmaßlich könnte der damit verbundene Ausfall der proteinstabilisierenden Wirkung von CALL3 und CALL5 verantwortlich sein [202]. Die Proteine werden per Ubiquitylierung abgebaut [203].

CALL3 und CALL5 wiesen in HNO97-Karzinomzellen eine deutlich erhöhte Proteinmenge als in S9-Epithelzellen und HNO41-Karzinomzellen auf. Dies lässt vermuten, dass es sich um ein höher differenziertes Plattenepithelkarzinom handelt. Hervorzuheben ist, dass eine Behandlung mit CAP zusätzlich zu einem deutlichen Anstieg von CALL3 und CALL5 im Vergleich zu korrespondierenden Gaskontrollen führt. CAP scheint bei Übertragung der oben genannten Mechanismen zu einer Umkehr der Entdifferenzierung der Epithelzellen beizutragen.

Eine ähnliche Wirkung konnten Chen et al. bei der Untersuchung des Wirkmechanismus von Metformin zur Verhinderung von Magenkarzinomen darstellen. So stimulierte Metformin die Sekretion von CALL3 in karzinomassoziierten Fibroblasten, wodurch die Klonalität der Magenkarzinome sank [204].

Eine Erhöhung von CALL3 und CALL5 könnte auch bei der Therapie von HNSCC ein zukünftiger therapeutischer Ansatzpunkt sein.

6.7 Kritische Aspekte der Arbeit

Aufgrund der einmaligen Anfertigung von 2D-SDS-PAGE zu jeder Behandlungsform blieb eine statistische Auswertung des Versuchs und die Bestimmung von Standardabweichung und Standardfehler aus. Allerdings ließ sich über alle Zelllinien ein CAP-spezifischer Effekt nachweisen. Die Ergebnisse wurden teilweise durch Immunoblotassays bestätigt.

Auch die Ergebnisse der Massenspektrometrie waren auf eine einfache Ausführung beschränkt, wiesen aber unabhängig der Zelllinie molekularbiologisch ähnliche Veränderungen auf. Eine erneute Anfertigung von 2D-SDS-PAGE und eine wiederholte Analyse der ausgeschnittenen 690 Gelspots hätte den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit überzogen und bedarf weiterer Studien. Aufgrund der ausbleibenden statistischen Analyse, müssen die Ergebnisse dieser Arbeit kritisch betrachtet werden. Zum Teil gelang allerdings eine Mehrfachidentifikation von Spots.

Zusammenfassend bietet die Arbeit einen Ansatz zum Vergleich multipler Faktoren in der Anwendung von CAP auf Karzinomzellen in der HNO. Dabei konnten überwiegend Ergebnisse des aktuellen Wissensstandes bestätigt werden. Es erfolgte erstmalig ein Vergleich von synthetischem Serumersatz mit dem häufig verwendeten FCS und die Verwendung eines Prototyps zur Applikation von Helium-CAP. Dabei unterschieden sich die Proteine zwischen den Seren stark, sodass bei einer erneuten Evaluation von einzelnen Applikationsfaktoren auf ein konstantes Nährmedium zurückgegriffen werden sollte.

Prinzipiell ließen sich plasmabedingte Effekte unabhängig vom verwendeten Quellgas nachweisen. Sowohl für Argon als auch für Helium konnte eine Reduktion von Tumorzellen erreicht werden. Dabei werden proapoptotische Pathways aktiviert. Die Effektivität des CAP unterliegt zahlreichen Faktoren, darunter der Applikationsdauer und der extra- und intrazellulären Scavengersysteme. Die optimale Applikationsdauer konnte nicht vollständig geklärt werden, sollte aber so ausfallen, dass umliegendes gesundes Epithel geschont wird. Eine vollständige Standardisierung ließ sich durch die mäanderförmige Behandlung von Zellkulturplatten nicht erzielen, sodass auch hier die Intensität des CAP divergierte. Allerdings ist auch *in vivo* mit einer Schwankungsbreite in der Anwendung von CAP zu rechnen.

6.8 Möglichkeiten des Transfers in die angewandte Medizin

CAP hat durch den kINPen[®] MED erfolgreich den Weg in die angewandte Medizin gefunden. Dabei sind vor allem die positiven Ergebnisse in der Behandlung von chronischen und infizierten Wunden hervorzuheben [17, 39, 40, 42, 60, 153].

In der Therapie von Karzinomen gibt es vielversprechende Ansätze [21, 56, 100, 107, 205]. Den *in vitro*-Modellen müssen standardisierte Studien am Patienten folgen.

In der Behandlung von HNSCCs in der HNO ist sowohl die Anwendung von Ar-CAP als auch von He-CAP denkbar [53-55, 159, 206]. Die Wirkung auf Karzinomzellen ist vergleichbar, allerdings abhängig von Gasfluss, Spannung und Applikationsdauer. Aufgrund des hohen Gasflusses könnte eine respiratorische Unverträglichkeit bei intrakavitärer Anwendung auftreten. Aus diesem Grund kann die intrakavitäre Behandlung problembehaftet sein und eventuell weitere Maßnahmen, wie Absaugung oder maschinelle Beatmung, erfordern.

Prinzipiell konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Austausch des Quellgases komplikationslos möglich ist, ohne dabei eine Veränderung des Wirkmechanismus zu bedingen. Aufgrund der begrenzten Eindringtiefe von CAP ist es gewebeschonend und sicher anwendbar.

Problembereiche, wie Neuronscheideninvasion oder Gefäßinfiltration, könnten medizinische Felder für die Applikation von CAP bei HNSCCs sein. CAP kann als Add-on-Therapie zur Verbesserung der Wirksamkeit bisheriger Standardtherapien bei HNSCC dienen. Für S9-Epithelzellen wurde zusätzlich eine wundschlussfördernde Wirkung nachgewiesen.

Extra- und intrazelluläre Scavengersysteme müssen bei der Adaption der Parameter bei der Applikation von CAP berücksichtigt werden. Hier ist die Wirkung von Albumin und Hitzeschockproteinen, darunter HSP27, hervorzuheben. Aufgrund der Scavengersysteme kann eine multiple Anwendung von CAP zur Erreichung des Therapieziels notwendig sein.

Die proapoptotischen Mechanismen sind noch nicht vollends verstanden. Es ergeben sich allerdings eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung des MAPK-ERK-Pathways und der Funktion von Mitochondrien.

Karzinome sind durch eigens ausgeschüttete Wachstumsfaktoren vermehrt vaskularisiert. Bei einer lokalen Therapie besteht durch eine mechanische Einwirkung das Risiko der Blutung. CAP eignet sich zusätzlich zur Antikoagulation. Dabei unterscheiden sich die Einstellungen am verwendeten Gerät. Ein Plasmaskop, also zur intrakavitären Anwendung zugelassenes Plasmagerät, sollte in der Lage sein, mit dieser Komplikation umzugehen. Im Rahmen eines Drittmittelförderprogramms konnte in Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut (INP, Greifswald) ein Prototyp eines Plasmaskops bereits entwickelt werden.

Bis ein Patient mit HNSCC erfolgreich durch CAP minimalinvasiv intrakavitär behandelt werden kann, sind weitere Studien notwendig. Diese Arbeit bietet dafür grundlegende Anknüpfungspunkte.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der Anwendung von kaltem atmosphärischen Plasma (CAP) bei der Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) evaluiert werden. Dazu wurden *in vitro* HNO97- und HNO41-Karzinomzellen mit Argon-CAP bzw. Helium-CAP durch den kINPen 09 bzw. einen Prototyp behandelt und einer Epithelzelllinie gegenübergestellt, um quellgasbedingte Unterschiede herauszuarbeiten. Durch die Verwendung von fetalem Kälberserum (FCS) und Panexin NTA (NTA) konnten zwei unterschiedliche Mediumzusätze verglichen werden.

In Wachstumskinetiken wurde eine Reduktion der Zellzahl von Karzinom- und Epithelzellen nach CAP-Behandlung erzielt. Daran schloss sich eine Proteomanalyse durch 2D-DIGE mit massenspektrometrischer Identifikation von in ihrer Menge veränderten Proteinen im Vergleich zu korrespondierenden Gaskontrollen an. Durch eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) regulierter Proteine konnten die behandelten Proben in Cluster aufgeteilt werden. Die Auftrennung war in absteigender Effektgröße abhängig vom verwendeten Serum, Quellgas und der CAP-Behandlung. Mit Hilfe von *Ingenuity Pathway Analysen* (IPA) wurden Regulatorproteine und molekulare Funktionen identifiziert. So ließ sich die Regulation von p53, HSF1 und TGF- β und eine damit verbundene Beeinflussung der Stressantwort auf ungefaltete Proteine, der mitochondrialen Membranpermeabilität und der Apoptose nachweisen. Durch Darstellung der regulierten Proteine in Netzwerken konnte der Einfluss von CAP auf den MAPK-ERK-Pathway als zentraler Bestandteil der Wirkung identifiziert werden.

Nach Analyse der Proteinveränderungen wurde explizit eine mögliche Beeinflussung von Hitzeschockprotein 27 (HSP27) und Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) mittels Immunoblotassay untersucht. HSP27 dient u.a. der Reduktion von oxidativem Stress. GAPDH ist in Abhängigkeit vom Oxidationsstatus Bestandteil der Glykolyse oder an der Apoptose beteiligt. Es zeigte sich eine Reduktion der Proteinmenge von HSP27 durch CAP in Karzinomzellen, die unter Verwendung von NTA größer ausfiel als unter FCS. Die Proteinmenge von GAPDH änderte sich nicht, es ließ sich lediglich eine Modifikation des Proteins vermuten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Karzinomzellen an oxidativen Stress nur bedingt anpassungsfähig sind und CAP somit eine geeignete Therapieoption darstellt. Die Effektivität des CAP wird dabei durch das Quellgas, die Behandlungsdauer sowie extra- und intrazelluläre Scavengersysteme beeinflusst.

8 Quellenverzeichnis

1. RKI, *Zentrum für Krebsregisterdaten*. 2016, Robert Koch Institut https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Datenbankabfrage/Datenbankabfrage_stufe1_node.html; Stand: 03.01.2020
2. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA: a cancer journal for clinicians, 2015. **65**(2): p. 87-108.
3. Méry, B., et al., *Preclinical models in HNSCC: A comprehensive review*. Oral Oncology, 2017. **65**: p. 51-56.
4. Massa, S.T., et al., *Competing causes of death in the head and neck cancer population*. Oral Oncology, 2017. **65**: p. 8-15.
5. Getz, K.R., et al., *Family history of cancer and head and neck cancer survival*. The Laryngoscope, 2017: p. n/a-n/a.
6. Evans, M. and N.G. Powell, *The changing aetiology of head and neck cancer: the role of human papillomavirus*. Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain)), 2010. **22**(7): p. 538-546.
7. Wong, T.H., et al., *Survival of patients with head and neck squamous cell carcinoma by housing subsidy in a tiered public housing system*. Cancer, 2017.
8. Choi, S.H., et al., *Socioeconomic and Other Demographic Disparities Predicting Survival among Head and Neck Cancer Patients*. PloS One, 2016. **11**(3): p. e0149886.
9. Orell-Kotikangas, H., et al., *Cachexia at diagnosis is associated with poor survival in head and neck cancer patients*. Acta Oto-Laryngologica, 2017: p. 1-11.
10. Wittekind, C., et al., *TNM Classification of malignant Tumours Eight Edition*. 2017.
11. Argiris, A., et al., *Head and neck cancer*. The Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1695-1709.
12. Leitlinienprogramm, O., *S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom*.
13. Leitlinienprogramm, O., *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Larynxkarzinoms*. 2019, AWMF online.
14. Glover, J.L., et al., *The plasma scalpel: a new thermal knife*. Lasers in Surgery and Medicine, 1982. **2**(1): p. 101-106.
15. Mennel, H.D., et al., *Helium (argon) plasma coagulation in neurosurgery. morphology of tissue damage and reparation*. Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Für Toxikologische Pathologie, 2002. **54**(3): p. 255-263.
16. Hoffmann, C., C. Berganza, and J. Zhang, *Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology*. Medical Gas Research, 2013. **3**(1): p. 21.
17. Balzer, J., et al., *Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge (DBD) Effects on Proliferation and Differentiation of Human Fibroblasts Are Primary Mediated by Hydrogen Peroxide*. PloS One, 2015. **10**(12): p. e0144968.
18. Yan, D., et al., *Principles of using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 18339.
19. Kaushik, N., et al., *Non-thermal plasma with 2-deoxy-D-glucose synergistically induces cell death by targeting glycolysis in blood cancer cells*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 8726.
20. Kaushik, N., et al., *Responses of solid tumor cells in DMEM to reactive oxygen species generated by non-thermal plasma and chemically induced ROS systems*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 8587.
21. Kim, S.J. and T.H. Chung, *Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 20332.

22. Ahn, H.J., et al., *Targeting cancer cells with reactive oxygen and nitrogen species generated by atmospheric-pressure air plasma*. PloS One, 2014. **9**(1): p. e86173.
23. Girard, P.-M., et al., *Synergistic Effect of H₂O₂ and NO₂ in Cell Death Induced by Cold Atmospheric He Plasma*. Scientific Reports, 2016. **6**.
24. Wende, K., et al., *Risk assessment of a cold argon plasma jet in respect to its mutagenicity*. Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2016. **798-799**: p. 48-54.
25. Kuchenbecker, M., et al., *Characterization of DBD plasma source for biomedical applications*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2009. **42**(4): p. 045212.
26. Ploenes, L., et al., *Cold and intense OH radical beam sources*. The Review of Scientific Instruments, 2016. **87**(5): p. 053305.
27. Laroussi, M. and X. Lu, *Room-temperature atmospheric pressure plasma plume for biomedical applications*. Applied Physics Letters, 2005. **87**(11): p. 113902.
28. Napp, J., et al., *On the history of plasma treatment and comparison of microbiostatic efficacy of a historical high-frequency plasma device with two modern devices*. GMS hygiene and infection control, 2015. **10**: p. Doc08.
29. Ziuzina, D., et al., *Cold Plasma Inactivation of Bacterial Biofilms and Reduction of Quorum Sensing Regulated Virulence Factors*. PloS One, 2015. **10**(9): p. e0138209.
30. Sun, S., N.M. Anderson, and S. Keller, *Atmospheric pressure plasma treatment of black peppercorns inoculated with Salmonella and held under controlled storage*. Journal of Food Science, 2014. **79**(12): p. E2441-2446.
31. Lacombe, A., et al., *Atmospheric cold plasma inactivation of aerobic microorganisms on blueberries and effects on quality attributes*. Food Microbiology, 2015. **46**: p. 479-484.
32. Ziuzina, D., et al., *Cold plasma inactivation of internalised bacteria and biofilms for Salmonella enterica serovar Typhimurium, Listeria monocytogenes and Escherichia coli*. International Journal of Food Microbiology, 2015. **210**: p. 53-61.
33. Wang, S., et al., *Use of Raman Spectroscopy and Phase-Contrast Microscopy To Characterize Cold Atmospheric Plasma Inactivation of Individual Bacterial Spores*. Applied and Environmental Microbiology, 2016. **82**(19): p. 5775-5784.
34. Atyabi, S.M., et al., *Cell Attachment and Viability Study of PCL Nano-fiber Modified by Cold Atmospheric Plasma*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2016. **74**(2): p. 181-190.
35. Kwon, J.-S., et al., *Non-thermal atmospheric pressure plasma increased mRNA expression of growth factors in human gingival fibroblasts*. Clinical Oral Investigations, 2015.
36. Delben, J.A., et al., *Effect of Atmospheric-Pressure Cold Plasma on Pathogenic Oral Biofilms and In Vitro Reconstituted Oral Epithelium*. PloS One, 2016. **11**(5): p. e0155427.
37. Napp, M., et al., *In vitro susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains of Staphylococcus aureus to two different cold atmospheric plasma sources*. Infection, 2016. **44**(4): p. 531-537.
38. Mohd Nasir, N., et al., *Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2016. **605**: p. 76-85.
39. Daeschlein, G., et al., *Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation*. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG, 2015. **13**(2): p. 143-150.

40. Ulrich, C., et al., *Clinical use of cold atmospheric pressure argon plasma in chronic leg ulcers: A pilot study*. Journal of Wound Care, 2015. **24**(5): p. 196-198-200, 202-203.
41. Schmidt, A., et al., *A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds*. Experimental Dermatology, 2016.
42. Blackert, S., et al., *Influence of non-thermal atmospheric pressure plasma on cellular structures and processes in human keratinocytes (HaCaT)*. Journal of Dermatological Science, 2013. **70**(3): p. 173-181.
43. Haertel, B., et al., *Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing*. Biomolecules & Therapeutics, 2014. **22**(6): p. 477-490.
44. Gay-Mimbrera, J., et al., *Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer*. Advances in Therapy, 2016. **33**(6): p. 894-909.
45. Hirst, A.M., et al., *Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells*. British Journal of Cancer, 2015. **112**(9): p. 1536-1545.
46. Walk, R.M., et al., *Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of neuroblastoma*. J Pediatr Surg, 2013. **48**(1): p. 67-73.
47. Lendeckel, D., et al., *Proteomic Changes of Tissue-Tolerable Plasma Treated Airway Epithelial Cells and Their Relation to Wound Healing*. BioMed Research International, 2015. **2015**.
48. Lunov, O., et al., *Cell death induced by ozone and various non-thermal plasmas: therapeutic perspectives and limitations*. Scientific Reports, 2014. **4**.
49. Kang, S.U., et al., *N₂ non-thermal atmospheric pressure plasma promotes wound healing in vitro and in vivo: potential modulation of adhesion molecules and matrix metalloproteinase-9*. Experimental Dermatology, 2016.
50. Rahimi-Verki, N., et al., *Cold atmospheric plasma inhibits the growth of Candida albicans by affecting ergosterol biosynthesis and suppresses the fungal virulence factors in vitro*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2016. **13**: p. 66-72.
51. Zhang, Q., et al., *[Low-temperature plasma assisted via mouth for surgery treating styloid process syndrome]*. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi = Journal of Clinical Otorhinolaryngology, Head, and Neck Surgery, 2012. **26**(15): p. 684-686.
52. Dequanter, D., R. Dok, and S. Nuyts, *Basal oxidative stress ratio of head and neck squamous cell carcinomas correlates with nodal metastatic spread in patients under therapy*. OncoTargets and Therapy, 2017. **10**: p. 259-263.
53. Welz, C., et al., *Cold Atmospheric Plasma: A Promising Complementary Therapy for Squamous Head and Neck Cancer*. PloS One, 2015. **10**(11): p. e0141827.
54. Guerrero-Preston, R., et al., *Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells*. International Journal of Molecular Medicine, 2014. **34**(4): p. 941-946.
55. Chang, J.W., et al., *Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: Involvement of DNA-damage-triggering sub-G(1) arrest via the ATM/p53 pathway*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014. **545**: p. 133-140.
56. Chang, J.W., et al., *Combination of NTP with cetuximab inhibited invasion/migration of cetuximab-resistant OSCC cells: Involvement of NF-κB signaling*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 18208.
57. Zor, T. and Z. Selinger, *Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies*. Analytical Biochemistry, 1996. **236**(2): p. 302-308.

58. Okazaki, Y., et al., *Direct exposure of non-equilibrium atmospheric pressure plasma confers simultaneous oxidative and ultraviolet modifications in biomolecules*. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2014. **55**(3): p. 207-215.
59. Ikehata, H. and T. Ono, *The mechanisms of UV mutagenesis*. Journal of Radiation Research, 2011. **52**(2): p. 115-125.
60. Schmidt, A., et al., *Non-thermal plasma activates human keratinocytes by stimulation of antioxidant and phase II pathways*. The Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(11): p. 6731-6750.
61. Brun, P., et al., *Helium generated cold plasma finely regulates activation of human fibroblast-like primary cells*. PloS One, 2014. **9**(8): p. e104397.
62. Xu, D., et al., *The effects of cold atmospheric plasma on cell adhesion, differentiation, migration, apoptosis and drug sensitivity of multiple myeloma*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016. **473**(4): p. 1125-1132.
63. Jawaid, P., et al., *Helium-based cold atmospheric plasma-induced reactive oxygen species-mediated apoptotic pathway attenuated by platinum nanoparticles*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2016.
64. Virard, F., et al., *Cold Atmospheric Plasma Induces a Predominantly Necrotic Cell Death via the Microenvironment*. PloS One, 2015. **10**(8): p. e0133120.
65. Arjunan, K.P., V.K. Sharma, and S. Ptasinska, *Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA-a review*. International Journal of Molecular Sciences, 2015. **16**(2): p. 2971-3016.
66. Bundscherer, L., et al., *Impact of non-thermal plasma treatment on MAPK signaling pathways of human immune cell lines*. Immunobiology, 2013. **218**(10): p. 1248-1255.
67. Rosenfeld, M.A., et al., *Oxidation of proteins: is it a programmed process?* Free Radical Research, 2018. **52**(1): p. 14-38.
68. Sitar, M.E., S. Aydin, and U. Cakatay, *Human serum albumin and its relation with oxidative stress*. Clinical Laboratory, 2013. **59**(9-10): p. 945-952.
69. Wang, P., et al., *Tyrosine residues of bovine serum albumin play an important role in protecting SH-SY5Y cells against heme/H₂O₂/NO₂--induced damage*. Mol Cell Biochem, 2018.
70. Bruschi, M., et al., *Oxidized albumin. The long way of a protein of uncertain function*. Biochimica Et Biophysica Acta, 2013. **1830**(12): p. 5473-5479.
71. Katsumi, H., et al., *Development of PEGylated serum albumin with multiple reduced thiols as a long-circulating scavenger of reactive oxygen species for the treatment of fulminant hepatic failure in mice*. Free Radical Biology & Medicine, 2014. **69**: p. 318-323.
72. Katsogiannou, M., C. Andrieu, and P. Rocchi, *Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression*. Frontiers in Genetics, 2014. **5**: p. 346.
73. Suzuki, H., H. Sugimura, and K. Hashimoto, *Overexpression of heat shock protein 27 is associated with good prognosis in the patient with oral squamous cell carcinoma*. The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery, 2007. **45**(2): p. 123-129.
74. Stetler, R.A., et al., *Phosphorylation of HSP27 by protein kinase D is essential for mediating neuroprotection against ischemic neuronal injury*. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 2012. **32**(8): p. 2667-2682.
75. Bellini, S., et al., *Heat Shock Proteins in Vascular Diabetic Complications: Review and Future Perspective*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(12): p. 2709.

76. Garrido, C., et al., *HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9*. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1999. **13**(14): p. 2061-2070.
77. Pandey, P., et al., *Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3*. Oncogene, 2000. **19**(16): p. 1975-1981.
78. Benarroch, E.E., *Heat shock proteins*. Neurology, 2011. **76**(7): p. 660.
79. Fittipaldi, S., et al., *Role of exercise-induced reactive oxygen species in the modulation of heat shock protein response*. Free Radical Research, 2014. **48**(1): p. 52-70.
80. Zhu, Z., et al., *Silencing heat shock protein 27 decreases metastatic behavior of human head and neck squamous cell cancer cells in vitro*. Molecular Pharmaceutics, 2010. **7**(4): p. 1283-1290.
81. Hadchity, E., et al., *Heat shock protein 27 as a new therapeutic target for radiation sensitization of head and neck squamous cell carcinoma*. Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy, 2009. **17**(8): p. 1387-1394.
82. Norton, J.A., et al., *Significance of HSPB1 expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis of published literatures*. The Laryngoscope, 2010. **120**(S4): p. S172-S172.
83. Ernst, O. and T. Zor, *Linearization of the bradford protein assay*. Journal of Visualized Experiments: JoVE, 2010(38).
84. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**: p. 248-254.
85. Olson, B.J.S.C., *Assays for Determination of Protein Concentration*. Current Protocols in Pharmacology, 2016. **73**: p. A.3A.1-A.3A.32.
86. Merkley, M.A., et al., *2D-DIGE proteomic characterization of head and neck squamous cell carcinoma*. Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2009. **141**(5): p. 626-632.
87. Weinberger, P.M., et al., *Use of combination proteomic analysis to demonstrate molecular similarity of head and neck squamous cell carcinoma arising from different subsites*. Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery, 2009. **135**(7): p. 694-703.
88. Thiele, T., et al., *Profiling of alterations in platelet proteins during storage of platelet concentrates*. Transfusion, 2007. **47**(7): p. 1221-1233.
89. Luhn, S., et al., *Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images*. Proteomics, 2003. **3**(7): p. 1117-1127.
90. Zaluzec, E.J., D.A. Gage, and J.T. Watson, *Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization*. Protein Expression and Purification, 1995. **6**(2): p. 109-123.
91. Menck, K., et al., *Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN*. Journal of Molecular Cell Biology, 2015. **7**(2): p. 143-153.
92. Jahn, O., et al., *Automatisierter Protein-In-Gel- Verdau für MALDI-TOF-MS*. Proteomics, (Nr. 11, 12. Jahrgang 2006): p. 44-45.
93. Keller, A., et al., *Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(20): p. 5383-5392.
94. Nesvizhskii, A.I., et al., *A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(17): p. 4646-4658.

95. Searle, B.C., *Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies*. Proteomics, 2010. **10**(6): p. 1265-1269.
96. Ni, D., P. Xu, and S. Gallagher, *Immunoblotting and Immunodetection*. Current Protocols in Cell Biology, 2017. **74**: p. 6.2.1-6.2.37.
97. Dubuc, A., et al., *Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review*. Ther Adv Med Oncol, 2018. **10**: p. 1758835918786475.
98. Winter, J., R. Brandenburg, and K.D. Weltmann, *Atmospheric pressure plasma jets: an overview of devices and new directions*. Plasma Sources Science and Technology, 2015. **24**(6): p. 064001.
99. Panngom, K., et al., *Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma*. Cell Death Dis, 2013. **4**(5): p. e642.
100. Kim, J.Y., et al., *Apoptosis of lung carcinoma cells induced by a flexible optical fiber-based cold microplasma*. Biosens Bioelectron, 2011. **28**(1): p. 333-8.
101. Recek, N., et al., *Effect of cold plasma on glial cell morphology studied by atomic force microscopy*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119111.
102. Cheng, X., et al., *The effect of tuning cold plasma composition on glioblastoma cell viability*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e98652.
103. Yan, D., J.H. Sherman, and M. Keidar, *Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality*. Oncotarget, 2017. **8**(9): p. 15977-15995.
104. Rehman, M.U., et al., *Comparison of free radicals formation induced by cold atmospheric plasma, ultrasound, and ionizing radiation*. Arch Biochem Biophys, 2016. **605**: p. 19-25.
105. Lou, B.S., et al., *Helium/Argon-Generated Cold Atmospheric Plasma Facilitates Cutaneous Wound Healing*. Front Bioeng Biotechnol, 2020. **8**: p. 683.
106. Uchiyama, H., et al., *EPR-Spin Trapping and Flow Cytometric Studies of Free Radicals Generated Using Cold Atmospheric Argon Plasma and X-Ray Irradiation in Aqueous Solutions and Intracellular Milieu*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0136956.
107. Takeda, T., et al., *Successful treatment of limited-stage small-cell lung cancer in the right mainstem bronchus by a combination of chemotherapy and argon plasma coagulation*. Respiratory Medicine Case Reports, 2017. **22**: p. 175-178.
108. Hayasaka, K., S. Shiono, and N. Yanagawa, *Multiple Endotracheal Metastases of Lung Cancer after Bronchoscopic Intervention*. Internal Medicine (Tokyo, Japan), 2018. **57**(6): p. 845-847.
109. Borowska-Solonyanko, A. and A. Dąbkowska, *Gas embolism as a potential cause of death by helium poisoning - Postmortem computed tomography changes in two cases of suicidal helium inhalation*. Legal Medicine (Tokyo, Japan), 2018. **31**: p. 59-65.
110. Gjika, E., et al., *Adaptation of Operational Parameters of Cold Atmospheric Plasma for in Vitro Treatment of Cancer Cells*. ACS Appl Mater Interfaces, 2018. **10**(11): p. 9269-9279.
111. Wiegand, C., et al., *Dose- and Time-Dependent Cellular Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma Evaluated in 3D Skin Models*. Skin Pharmacol Physiol, 2016. **29**(5): p. 257-265.
112. Scharf, C., et al., *Improved Wound Healing of Airway Epithelial Cells Is Mediated by Cold Atmospheric Plasma: A Time Course-Related Proteome Analysis*. Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: p. 7071536.
113. Pai, K., et al., *Investigation of the Roles of Plasma Species Generated by Surface Dielectric Barrier Discharge*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 16674.

114. Daeschlein, G., et al., *Gute Hautverträglichkeit von Plasma: Keine Austrocknung oder Störung der Hautbarriere*. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, 2012. **10**(7): p. 509-516.
115. Maisch, T., et al., *Investigation of toxicity and mutagenicity of cold atmospheric argon plasma*. Environ Mol Mutagen, 2017. **58**(3): p. 172-177.
116. Hasse, S., et al., *Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma*. Clin Exp Dermatol, 2016. **41**(2): p. 202-9.
117. Arndt, S., et al., *Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode*. J Dermatol Sci, 2018. **89**(2): p. 181-190.
118. Schmidt, A., et al., *Cold Physical Plasma Modulates p53 and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Keratinocytes*. Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: p. 7017363.
119. Arndt, S., et al., *Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79325.
120. Shen, X., K. Zhang, and R.J. Kaufman, *The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum*. J Chem Neuroanat, 2004. **28**(1-2): p. 79-92.
121. Reed, S.I., *The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control*. Results Probl Cell Differ, 2006. **42**: p. 147-81.
122. Jeanson, L., et al., *Oxidative stress induces unfolding protein response and inflammation in nasal polyposis*. Allergy, 2012. **67**(3): p. 403-12.
123. Kupsco, A. and D. Schlenk, *Oxidative Stress, Unfolded Protein Response, and Apoptosis in Developmental Toxicity*. International review of cell and molecular biology, 2015. **317**: p. 1-66.
124. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
125. Rasheva, V.I. and P.M. Domingos, *Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis*. Apoptosis, 2009. **14**(8): p. 996-1007.
126. Poplawski, T., et al., *Interplay between Redox Signaling, Oxidative Stress, and Unfolded Protein Response (UPR) in Pathogenesis of Human Diseases*. Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: p. 6949347.
127. Dröge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
128. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
129. Ghosh, S., et al., *Phosphorylation inactivation of endothelial nitric oxide synthesis in pulmonary arterial hypertension*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016. **310**(11): p. L1199-205.
130. Guibert, C., R. Flemming, and D.J. Beech, *Prevention of a hypoxic Ca²⁺(i) response by SERCA inhibitors in cerebral arterioles*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(4): p. 927-34.
131. Förstermann, U., *Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 923-39.
132. Ding, H., M. Aljofan, and C.R. Triggle, *Oxidative stress and increased eNOS and NADPH oxidase expression in mouse microvessel endothelial cells*. J Cell Physiol, 2007. **212**(3): p. 682-9.

133. Förstermann, U. and H. Li, *Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(2): p. 213-23.
134. Runkel, E.D., et al., *Surveillance-activated defenses block the ROS-induced mitochondrial unfolded protein response*. PLoS genetics, 2013. **9**(3): p. e1003346.
135. Ikwegbue, P.C., et al., *Roles of Heat Shock Proteins in Apoptosis, Oxidative Stress, Human Inflammatory Diseases, and Cancer*. Pharmaceuticals (Basel), 2017. **11**(1).
136. Vidyasagar, A., N.A. Wilson, and A. Djamali, *Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5**(1): p. 7.
137. Li, J., X. Qian, and B. Sha, *Heat shock protein 40: structural studies and their functional implications*. Protein Pept Lett, 2009. **16**(6): p. 606-12.
138. Jee, H., *Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review*. J Exerc Rehabil, 2016. **12**(4): p. 255-9.
139. Zorova, L.D., et al., *Mitochondrial membrane potential*. Analytical Biochemistry, 2018. **552**: p. 50-59.
140. Ly, J.D., D.R. Grubb, and A. Lawen, *The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update*. Apoptosis, 2003. **8**(2): p. 115-128.
141. Wiegman, C.H., et al., *Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **136**(3): p. 769-80.
142. Korsmeyer, S.J., et al., *Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c*. Cell Death & Differentiation, 2000. **7**(12): p. 1166-1173.
143. Kovac, S., et al., *Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase*. Biochimica Et Biophysica Acta, 2015. **1850**(4): p. 794-801.
144. Niture, S.K., et al., *Nrf2 signaling and cell survival*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010. **244**(1): p. 37-42.
145. Xing, F., et al., *1800MHz Microwave Induces p53 and p53-Mediated Caspase-3 Activation Leading to Cell Apoptosis In Vitro*. PLoS ONE, 2016. **11**(9).
146. Surova, O. and B. Zhivotovsky, *Various modes of cell death induced by DNA damage*. Oncogene, 2013. **32**(33): p. 3789-97.
147. Hentze, N., et al., *Molecular mechanism of thermosensory function of human heat shock transcription factor Hsf1*. eLife. **5**.
148. Zhang, J., et al., *PI3K/Akt signaling in osteosarcoma*. Clinica Chimica Acta, 2015. **444**: p. 182-192.
149. Jaeger, A.M., et al., *Genomic heat shock element sequences drive cooperative human heat shock factor 1 DNA binding and selectivity*. The Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(44): p. 30459-30469.
150. Morikawa, M., R. Derynck, and K. Miyazono, *TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(5).
151. Lawrence, D.A., *Transforming growth factor-beta: a general review*. Eur Cytokine Netw, 1996. **7**(3): p. 363-74.
152. Govinden, R. and K.D. Bhoola, *Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta*. Pharmacol Ther, 2003. **98**(2): p. 257-65.
153. Fathollah, S., et al., *Investigation on the effects of the atmospheric pressure plasma on wound healing in diabetic rats*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 19144.

154. He, R., et al., *The efficacy and safety of cold atmospheric plasma as a novel therapy for diabetic wound in vitro and in vivo*. *Int Wound J*, 2020. **17**(3): p. 851-863.
155. Keshet, Y. and R. Seger, *The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions*. *Methods Mol Biol*, 2010. **661**: p. 3-38.
156. McCain, J., *The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma*. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 2013. **38**(2): p. 96-108.
157. Chauvin, J., et al., *Effects of Plasma Activated Medium on Head and Neck FaDu Cancerous Cells: Comparison of 3D and 2D Response*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018. **18**(6): p. 776-783.
158. Schuster, M., et al., *Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2016. **44**(9): p. 1445-52.
159. Metelmann, H.-R., et al., *Clinical experience with cold plasma in the treatment of locally advanced head and neck cancer*. *Clinical Plasma Medicine*, 2018. **9**: p. 6-13.
160. Hasse, S., et al., *Cold Argon Plasma as Adjuvant Tumour Therapy on Progressive Head and Neck Cancer: A Preclinical Study*. *Applied Sciences*, 2019. **9**(10).
161. Lemasters, J.J., *Modulation of mitochondrial membrane permeability in pathogenesis, autophagy and control of metabolism*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007. **22 Suppl 1**: p. S31-7.
162. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 805-20.
163. Covert, M.W., et al., *Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation*. *Science*, 2005. **309**(5742): p. 1854-7.
164. Hitti, E., et al., *Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(6): p. 2399-407.
165. Andersson, K. and R. Sundler, *Posttranscriptional regulation of TNFalpha expression via eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) phosphorylation in mouse macrophages*. *Cytokine*, 2006. **33**(1): p. 52-7.
166. Loomans, H.A. and C.D. Andl, *Intertwining of Activin A and TGFβ Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion*. *Cancers (Basel)*, 2014. **7**(1): p. 70-91.
167. Kelner, N., et al., *Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma*. *Head Neck*, 2015. **37**(4): p. 479-86.
168. Witzke, K., C. Seebauer, and H.-R. Metelmann, *Plasma Medical Oncology: Long-Term Results With Focus On Immunity Research*. *Clinical Plasma Medicine*, 2018. **9**: p. 48.
169. Taupin, P., *Derivation of embryonic stem cells for cellular therapy: challenges and new strategies*. *Med Sci Monit*, 2006. **12**(4): p. Ra75-8.
170. Wågsäter, D., et al., *Serine protease inhibitor A3 in atherosclerosis and aneurysm disease*. *Int J Mol Med*, 2012. **30**(2): p. 288-94.
171. van der Vorst, E.P.C., *High-Density Lipoproteins and Apolipoprotein A1*. *Subcell Biochem*, 2020. **94**: p. 399-420.
172. Sakakibara, A., et al., *Novel function of Chat in controlling cell adhesion via Cas-Crk-C3G-pathway-mediated Rap1 activation*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 24): p. 4915-24.
173. Attia, M., et al., *Nap112 promotes histone acetylation activity during neuronal differentiation*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(17): p. 6093-102.

174. Matboli, M., et al., *Role of extracellular LncRNA-SNHG14/miRNA-3940-5p/NAP12 mRNA in colorectal cancer*. Arch Physiol Biochem, 2019: p. 1-7.
175. Bau, D.T., C.W. Tsai, and C.N. Wu, *Role of the XRCC5/XRCC6 dimer in carcinogenesis and pharmacogenomics*. Pharmacogenomics, 2011. **12**(4): p. 515-34.
176. Zhang, Z., et al., *XRCC5 cooperates with p300 to promote cyclooxygenase-2 expression and tumor growth in colon cancers*. PLoS One, 2017. **12**(10): p. e0186900.
177. Ren, X., et al., *Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione Systems in the Central Nervous System*. Antioxid Redox Signal, 2017. **27**(13): p. 989-1010.
178. Zhao, M.X., et al., *Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates the resistance of cells to reactive oxygen species*. Cell Stress Chaperones, 2019. **24**(3): p. 609-619.
179. Seidkhani-Nahal, A., A. Allameh, and M. Soleimani, *Antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties of cellular albumin in HepG2 cells is mediated by the glutathione redox system*. Biotechnol Appl Biochem, 2019. **66**(2): p. 163-171.
180. Venditti, P., L. Di Stefano, and S. Di Meo, *Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species*. Mitochondrion, 2013. **13**(2): p. 71-82.
181. Bocedi, A., et al., *Thiol disulfide exchange reactions in human serum albumin: the apparent paradox of the redox transitions of Cys34*. The FEBS journal, 2018.
182. Shibata, A., et al., *Human serum albumin hydropersulfide is a potent reactive oxygen species scavenger in oxidative stress conditions such as chronic kidney disease*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016. **479**(3): p. 578-583.
183. Rombouts, I., et al., *Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation*. Scientific Reports, 2015. **5**.
184. Annibal, A., et al., *Identification of dityrosine cross-linked sites in oxidized human serum albumin*. Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2016. **1019**: p. 147-155.
185. Shen, C.Y., et al., *Advanced Glycation End Products of Bovine Serum Albumin Suppressed Th1/Th2 Cytokine but Enhanced Monocyte IL-6 Gene Expression via MAPK-ERK and MyD88 Transduced NF- κ B p50 Signaling Pathways*. Molecules, 2019. **24**(13).
186. Gonçalves, G.L., et al., *Intracellular albumin overload elicits endoplasmic reticulum stress and PKC-delta/p38 MAPK pathway activation to induce podocyte apoptosis*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 18012.
187. Chatterjee, S., et al., *Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(9): p. 1978.
188. Xanthoudakis, S. and D.W. Nicholson, *Heat-shock proteins as death determinants*. Nature Cell Biology, 2000. **2**(9): p. E163-E165.
189. Chatterjee, M., et al., *The PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma*. Haematologica, 2013. **98**(7): p. 1132-41.
190. Merendino, A.M., et al., *Heat shock protein-27 protects human bronchial epithelial cells against oxidative stress-mediated apoptosis: possible implication in asthma*. Cell Stress Chaperones, 2002. **7**(3): p. 269-80.
191. Tristan, C., et al., *The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments*. Cell Signal, 2011. **23**(2): p. 317-23.
192. Nicholls, C., H. Li, and J.P. Liu, *GAPDH: a common enzyme with uncommon functions*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012. **39**(8): p. 674-9.

193. Muronetz, V.I., et al., *Influence of Oxidative Stress on Catalytic and Non-glycolytic Functions of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*. *Curr Med Chem*, 2020. **27**(13): p. 2040-2058.
194. Hwang, N.R., et al., *Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions*. *Biochem J*, 2009. **423**(2): p. 253-64.
195. Nakajima, H., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Aggregation Causes Mitochondrial Dysfunction during Oxidative Stress-induced Cell Death*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017. **292**(11): p. 4727-4742.
196. Itakura, M., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregation inhibitor peptide: A potential therapeutic strategy against oxidative stress-induced cell death*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **467**(2): p. 373-6.
197. Kubo, T., et al., *Active site cysteine-null glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) rescues nitric oxide-induced cell death*. *Nitric Oxide*, 2016. **53**: p. 13-21.
198. Ishitani, R., et al., *Proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a possible site of action of antiapoptotic drugs*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003. **27**(2): p. 291-301.
199. Li, Y.Q., et al., *Regulation of endothelial cell survival and death by the MAP kinase/ERK kinase kinase 3 - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase signaling axis*. *Cell Signal*, 2019. **58**: p. 20-33.
200. Landino, L.M., T.D. Hagedorn, and K.L. Kennett, *Evidence for thiol/disulfide exchange reactions between tubulin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2014. **71**(12): p. 707-18.
201. Rogers, M.S., et al., *Loss of Immunoreactivity for Human Calmodulin-Like Protein is an Early Event in Breast Cancer Development*. *Neoplasia*, 1999. **1**(3): p. 220-225.
202. Villalobo, A., M. González-Muñoz, and M.W. Berchtold, *Proteins with calmodulin-like domains: structures and functional roles*. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 2019. **76**(12): p. 2299-2328.
203. Debald, M., et al., *Specific expression of k63-linked ubiquitination of calmodulin-like protein 5 in breast cancer of premenopausal patients*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2013. **139**(12): p. 2125-32.
204. Chen, G., et al., *Metformin suppresses gastric cancer progression through calmodulin-like protein 3 secreted from tumor-associated fibroblasts*. *Oncol Rep*, 2019. **41**(1): p. 405-414.
205. Lee, S.Y., et al., *Nonthermal plasma induces apoptosis in ATC cells: involvement of JNK and p38 MAPK-dependent ROS*. *Yonsei Medical Journal*, 2014. **55**(6): p. 1640-1647.
206. Kim, S.-Y., et al., *Non-thermal plasma induces AKT degradation through turn-on the MUL1 E3 ligase in head and neck cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(32): p. 33382-33396.

9 Anhang

9.1 Tabellarische Darstellung der Identifikationen durch nESI-LC-MS/MS und Darstellung humaner Proteine in Delta 2D

Tabelle 45: Identifizierte Proteine in der LC-MS gelistet nach Label mit entsprechender Proteinbezeichnung, Protein-ID nach UniProt, Molekulargewicht in Kilodalton (MW in kDa), nachgewiesenem Peptidcount (PC) und Fold-Change-Wert (*fc*-Wert).

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-F-AP_01	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_BOVIN	42	2	2,94
S9-F-AP_02	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	13,51
S9-F-AP_03	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,87
S9-F-AP_06	Serpin A3-5 SERPINA3-5	SPA35_BOVIN	46	2	5,46
S9-F-AP_07	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	4,68
S9-F-AP_13	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	5,13
S9-F-AP_14	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_BOVIN	38	8	2,97
S9-F-AP_16	Alpha-2-HS-glycoprotein	FETUA_BOVIN	38	12	2,04
S9-F-AP_16	Calreticulin B11	CALR_HUMAN	48	4	2,04
S9-F-AP_17	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	9	2,89
S9-F-AP_18	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	2	3,03
S9-F-AP_18	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,03
S9-F-AP_18	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	2	3,03
S9-F-AP_21	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	4,32
S9-F-AP_21	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	4,32
S9-F-AP_25	Alpha-1-antiproteinase SERPINA1	A1AT_BOVIN	46	6	3,81
S9-F-AP_32	Alpha-1-antiproteinase SERPINA1	A1AT_BOVIN	46	5	2,19
S9-F-AP_32	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,19
S9-F-AP_33	Alpha-1-antiproteinase SERPINA1	A1AT_BOVIN	46	15	3,43
S9-F-AP_33	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,43
S9-F-AP_33	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	2	3,43
S9-F-AP_34	Alpha-1-antiproteinase SERPINA1	A1AT_BOVIN	46	11	3,57
S9-F-AP_34	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K HNRNPK	HNRNPK_HUMAN	51	5	3,57
S9-F-AP_34	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,57
S9-F-AP_34	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	2	3,57

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-F-AP_37	Alpha-1-antiproteinase SERPINA1	A1AT_BOVIN	46	8	2,61
S9-F-AP_37	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K HNRNPK	HNRPK_HUMAN	51	2	2,61
S9-F-AP_37	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	2	2,61
S9-F-AP_39	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	5	2,12
S9-F-AP_39	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,12
S9-F-AP_39	Histone H4	H4_BOVIN	11	2	2,12
S9-F-AP_40	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	9	2,97
S9-F-AP_40	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	4	2,97
S9-F-AP_40	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,97
S9-F-AP_40	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	2	2,97
S9-F-AP_41	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	7	2,24
S9-F-AP_44	Zinc finger protein ZPR1 ZNF259	ZPR1_HUMAN	51	8	2,21
S9-F-AP_45	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	4	2,82
S9-F-AP_46	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	7	2,49
S9-F-AP_46	Nucleosome assembly protein 1-like 4 NAP1L4	NP1L4_HUMAN	43	4	2,49
S9-F-AP_47	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	8	2,69
S9-F-AP_47	Fetuin-B FETUB	FETUB_BOVIN	43	2	2,69
S9-F-AP_48	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,43
S9-F-AP_50	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	4	2,69
S9-F-AP_51	Vimentin VIM	VIME_HUMAN	54	31	2,05
S9-F-AP_51	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein IKBIP	IKIP_HUMAN	39	3	2,05
S9-F-AP_53, S9-N-HP_06	Vimentin VIM	VIME_HUMAN	54	4	2,82
S9-F-AP_53, S9-N-HP_06	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	2	2,82
S9-F-AP_54	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	2	3,08
S9-F-AP_55	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit DDOST	OST48_HUMAN	51	4	2,63
S9-F-AP_56	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	3	3,22
S9-F-AP_58	Vimentin VIM	VIME_HUMAN	54	115	2,43
S9-F-AP_58	Reticulocalbin-1 RCN1	RCN1_HUMAN	39	3	2,43
S9-F-AP_59	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	6	3,19
S9-F-AP_59	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	3,19
S9-F-AP_60, HNO41-N-AP_25	Vimentin VIM	VIME_HUMAN	54	15	2,75
S9-F-AP_60, HNO41-N-AP_25	40S ribosomal protein SA RPSA	RSSA_HUMAN	33	13	2,75
S9-F-AP_65	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	5,26

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-F-AP_67, S9-N-AP_51	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	2,96
S9-F-AP_67, S9-N-AP_51	Histone H4	H4_BOVIN	11	3	2,96
S9-F-AP_68	Protein SEC13 homolog SEC13	SEC13_HUMAN	36	23	2,65
S9-F-AP_68	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	4	2,65
S9-F-AP_68	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 EIF2S1	IF2A_HUMAN	36	4	2,65
S9-F-AP_71	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	71	2,12
S9-F-AP_71	sp P02666 CASB_BOVIN	CASB_BOVIN	?	43	2,12
S9-F-AP_71	Beta-lactoglobulin LGB	LACB_BOVIN	20	39	2,12
S9-F-AP_71	Heat shock protein beta-1 HSPB1	HSPB1_HUMAN	23	35	2,12
S9-F-AP_71	Kappa-casein CSN3	CASK_BOVIN	21	18	2,12
S9-F-AP_71	Alpha-S2-casein CSN1S2	CASA2_BOVIN	26	14	2,12
S9-F-AP_71	Proteasome subunit alpha type-6 PSMA6	PSA6_BOVIN	27	5	2,12
S9-F-AP_71	Lactadherin MFGE8	MFGM_BOVIN	47	3	2,12
S9-F-AP_73	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	10	2,88
S9-F-AP_73	Apolipoprotein A-I APOA1	APOA1_BOVIN	30	6	2,88
S9-F-AP_73	sp P02666 CASB_BOVIN	CASB_BOVIN	?	4	2,88
S9-F-AP_73	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	3	2,88
S9-F-AP_73	Histone H4	H4_BOVIN	11	2	2,88
S9-F-AP_74	Apolipoprotein A-I APOA1	APOA1_BOVIN	30	70	2,98
S9-F-AP_74	sp P02666 CASB_BOVIN	CASB_BOVIN	?	3	2,98
S9-F-AP_74	Adapter molecule crk CRK	CRK_HUMAN	34	3	2,98
S9-F-AP_74	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	2,98
S9-F-AP_84	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	2,16
S9-F-AP_86	Alpha-1-antiproteinase SERPINA1	A1AT_BOVIN	46	17	2,16
S9-F-AP_86	Protein FAM114A2 FAM114A2	F1142_HUMAN	55	10	2,16
S9-F-AP_86	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform PPP2R1B	2AAB_HUMAN	66	9	2,16
S9-F-Ac_101	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,38
S9-F-Ac_101	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	2	0,38
S9-F-Ac_102	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,47
S9-F-Ac_102	Heat shock protein HSP 90-alpha HSP90AA1	HS90A_BOVIN	85	2	0,47
S9-F-Ac_103	Heat shock protein HSP 90-alpha HSP90AA1	HS90A_BOVIN	85	9	0,48
S9-F-Ac_103	Heat shock protein HSP 90-beta HSP90AB1	HS90B_HUMAN	83	6	0,48
S9-F-Ac_103	A-kinase anchor protein 8 AKAP8	AKAP8_HUMAN	76	2	0,48

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-F-Ac_104	Heat shock protein HSP 90-alpha HSP90AA1	HS90A_BOVIN	85	18	0,49
S9-F-Ac_104	Heat shock protein HSP 90-beta HSP90AB1	HS90B_HUMAN	83	15	0,49
S9-F-Ac_104	Prolyl 3-hydroxylase 1 LEPRE1	P3H1_HUMAN	83	4	0,49
S9-F-Ac_105	Prolyl 3-hydroxylase 1 LEPRE1	P3H1_HUMAN	83	7	0,44
S9-F-Ac_105	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,44
S9-F-Ac_108	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	10	0,46
S9-F-Ac_108	Heat shock 70 kDa protein 1A HSPA1A	HS71A_BOVIN	70	6	0,46
S9-F-Ac_108	Plastin-3 PLS3	PLST_HUMAN	71	5	0,46
S9-F-Ac_108	Coronin-1B CORO1B	COR1B_HUMAN	54	4	0,46
S9-F-Ac_108	Methionine aminopeptidase 2 METAP2	MAP2_HUMAN	53	4	0,46
S9-F-Ac_110	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_BOVIN	50	35	0,44
S9-F-Ac_110	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	4	0,44
S9-F-Ac_110	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 IFIT3	IFIT3_HUMAN	56	3	0,44
S9-F-Ac_110	Histone H4	H4_BOVIN	11	2	0,44
S9-F-Ac_115	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2 DYNC1L2	DC1L2_HUMAN	54	4	0,45
S9-F-Ac_115	Histone H4	H4_BOVIN	11	3	0,45
S9-F-Ac_115	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,45
S9-F-Ac_119, HNO41-N-Ac_33	Secernin-1 SCR1	SCR1_HUMAN	46	25	0,43
S9-F-Ac_119, HNO41-N-Ac_33	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 PSMD4	PSMD4_BOVIN	41	5	0,43
S9-F-Ac_119, HNO41-N-Ac_33	Histone H4	H4_BOVIN	11	2	0,43
S9-F-Ac_119, HNO41-N-Ac_33	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,43
S9-F-Ac_121	Histone H4	H4_BOVIN	11	2	0,32
S9-F-Ac_121	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,32
S9-F-Ac_132	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,39
S9-F-Ac_138	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,37
S9-F-Ac_141	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,44
S9-F-Ac_82	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,43
S9-F-Ac_82	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,43
S9-F-Ac_84	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,46
S9-F-Ac_84	Histone H4	H4_BOVIN	11	2	0,46
S9-F-Ac_85	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	4	0,47
S9-F-Ac_85	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,47
S9-F-Ac_85	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,47
S9-F-Ac_85	Histone H4	H4_BOVIN	11	2	0,47

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-F-Ac_85	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	2	0,47
S9-F-Ac_87	Heat shock protein 105 kDa HSPH1	HS105_HUMAN	97	8	0,50
S9-F-Ac_88	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	3	0,47
S9-F-Ac_88	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,47
S9-F-Ac_88	Histone H4	H4_BOVIN	11	2	0,47
S9-F-Ac_90	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,50
S9-F-Ac_92	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	3	0,33
S9-F-Ac_94	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,47
S9-F-Ac_95	Heat shock 70 kDa protein 4 HSPA4	HSP74_HUMAN	94	13	0,46
S9-F-Ac_95	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	2	0,46
S9-F-Ac_96	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,45
S9-F-Ac_99	Heat shock protein HSP 90-alpha HSP90AA1	HS90A_BOVIN	85	7	0,50
S9-F-Ac_99	Heat shock protein HSP 90-beta HSP90AB1	HS90B_HUMAN	83	5	0,50
S9-N-AP_08, HNO41-N-AP_01	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	4	2,62
S9-N-AP_08, HNO41-N-AP_01	Histone H4	H4_BOVIN	11	2	2,62
S9-N-AP_08, HNO41-N-AP_01	Stress-70 protein, mitochondrial HSPA9	GRP75_HUMAN	74	2	2,62
S9-N-AP_102	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	10,08
S9-N-AP_104, S9-F-AP_81, S9-N-HP_30, HNO97-F-HP_16, HNO41-F-AP_17, HNO97-F- AP_62, HNO97-N-AP_38, HNO97-N-HP_15, HNO41-N-AP_57, S9-F-HP_61	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	3,04
S9-N-AP_106, S9-N-HP_32, HNO41-N-AP_59	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	4,31
S9-N-AP_11	Serotransferrin TF	TRFE_HUMAN	77	12	2,22
S9-N-AP_11	Serotransferrin TF	TRFE_BOVIN	78	8	2,22
S9-N-AP_11	Prelamin-A/C LMNA	LMNA_HUMAN	74	7	2,22
S9-N-AP_14, HNO41-F-Ac_30	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	411	6,17
S9-N-AP_15	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	332	4,90
S9-N-AP_19, HNO41-F-Ac_31	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	425	6,35
S9-N-AP_22, HNO41-F-Ac_32	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	177	6,72
S9-N-AP_23	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	170	6,35
S9-N-AP_24	Stress-70 protein, mitochondrial HSPA9	GRP75_HUMAN	74	192	4,85
S9-N-AP_24	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	51	4,85
S9-N-AP_24	Annexin A6 ANXA6	ANXA6_HUMAN	76	26	4,85
S9-N-AP_26	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	58	5,22

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-N-AP_26	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B HSPA1A	HSP71_HUMAN	70	51	5,22
S9-N-AP_26	Plastin-3 PLS3	PLST_HUMAN	71	12	5,22
S9-N-AP_26	Heat shock-related 70 kDa protein 2 HSPA2	HSP72_HUMAN	70	11	5,22
S9-N-AP_28, S9-F-AP_22	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	9	2,86
S9-N-AP_28, S9-F-AP_22	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,86
S9-N-AP_29, S9-F-AP_23	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,75
S9-N-AP_32, S9-F-AP_38	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	4,16
S9-N-AP_32, S9-F-AP_38	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	2	4,16
S9-N-AP_33, S9-F-AP_49	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	8	2,38
S9-N-AP_34	Tubulin beta chain TUBB	TBB5_HUMAN	50	32	3,33
S9-N-AP_34	Tubulin beta-4B chain TUBB4B	TBB4B_HUMAN	50	25	3,33
S9-N-AP_34	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	9	3,33
S9-N-AP_34	DNA polymerase delta subunit 2 POLD2	DPOD2_HUMAN	51	4	3,33
S9-N-AP_34	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,33
S9-N-AP_35	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial UQCRC1	QCR1_HUMAN	53	68	2,74
S9-N-AP_35	Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial ECSIT	ECSIT_HUMAN	49	5	2,74
S9-N-AP_38	Tubulin beta chain TUBB	TBB5_HUMAN	50	4	2,28
S9-N-AP_38	Selenide, water dikinase 1 SEPHS1	SPS1_BOVIN	43	3	2,28
S9-N-AP_42	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,58
S9-N-AP_45, HNO41-N-AP_36	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,53
S9-N-AP_49, S9-F-AP_66	V-type proton ATPase subunit d 1 ATP6V0D1	VAOD1_BOVIN	40	5	2,24
S9-N-AP_49, S9-F-AP_66	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,24
S9-N-AP_50, S9-N-HP_12	Stomatin-like protein 2, mitochondrial STOML2	STML2_HUMAN	39	10	2,37
S9-N-AP_50, S9-N-HP_12	Transaldolase TALDO1	TALDO_HUMAN	38	4	2,37
S9-N-AP_56	Actin, cytoplasmic 1 ACTB	ACTB_HUMAN	42	12	3,00
S9-N-AP_56	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial PDHB	ODPB_HUMAN	39	6	3,00
S9-N-AP_56	Annexin A8 ANXA8	ANXA8_HUMAN	37	4	3,00
S9-N-AP_56	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,00
S9-N-AP_56	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	2	3,00
S9-N-AP_57	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B RPRD1B	RPR1B_HUMAN	37	8	2,73
S9-N-AP_57	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial PDHB	ODPB_HUMAN	39	2	2,73

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-N-AP_60	Tubulin beta-4B chain TUBB4B	TBB4B_HUMAN	50	5	4,18
S9-N-AP_60	Tubulin beta chain TUBB	TBB5_HUMAN	50	4	4,18
S9-N-AP_60	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	4,18
S9-N-AP_65, S9-N-HP_14, HNO41-N-AP_49	Annexin A5 ANXA5	ANXA5_HUMAN	36	2	2,61
S9-N-AP_66, S9-F-AP_70, HNO97-N-HP_06, S9-N-HP_15	Prohibitin PHB	PHB_BOVIN	30	3	2,25
S9-N-AP_71	Prohibitin PHB	PHB_BOVIN	30	6	2,19
S9-N-AP_71	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,19
S9-N-AP_72	Exosome complex component MTR3 EXOSC6	EXOS6_HUMAN	28	5	6,12
S9-N-AP_74	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,85
S9-N-AP_74	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	2	2,85
S9-N-AP_75	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2 NUBP2	NUBP2_HUMAN	29	5	2,86
S9-N-AP_75	Actin, cytoplasmic 1 ACTB	ACTB_HUMAN	42	4	2,86
S9-N-AP_75	Prohibitin PHB	PHB_BOVIN	30	3	2,86
S9-N-AP_75	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,86
S9-N-AP_76	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	4	3,55
S9-N-AP_76	Elongation factor 1-alpha 2 EE1A2	EF1A2_BOVIN	50	2	3,55
S9-N-AP_77	Actin, cytoplasmic 1 ACTB	ACTB_HUMAN	42	4	3,70
S9-N-AP_77	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	3,70
S9-N-AP_79	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	6,38
S9-N-AP_80	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	4,06
S9-N-AP_80	Elongation factor 1-alpha 2 EE1A2	EF1A2_BOVIN	50	3	4,06
S9-N-AP_80	Histone H4	H4_BOVIN	11	2	4,06
S9-N-AP_81	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	5,39
S9-N-AP_83, HNO97-F-AP_48	Tubulin alpha-1A chain TUBA1A	TBA1A_HUMAN	50	3	8,20
S9-N-AP_86	Desmoplakin DSP	DESP_HUMAN	332	6	8,38
S9-N-AP_86	Protein POF1B POF1B	POF1B_HUMAN	68	3	8,38
S9-N-AP_94	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	4	3,25
S9-N-AP_95	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,74
S9-N-AP_96	Protein canopy homolog 2 CNPY2	CNPY2_HUMAN	21	3	3,16
S9-N-Ac_01	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 HNRNPUL2	HNRL2_HUMAN	85	15	0,44
S9-N-Ac_02	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2 HNRNPUL2	HNRL2_HUMAN	85	19	0,42
S9-N-Ac_03	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate MARCKS	MARCS_HUMAN	32	5	0,46
S9-N-Ac_05	X-ray repair cross-complementing protein 6 XRCC6	XRCC6_HUMAN	70	60	0,47

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-N-Ac_05	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1 SAMHD1	SAMH1_HUMAN	72	5	0,47
S9-N-Ac_07, S9-F-AP_27	Alpha-1-antiproteinase SERPINA1	A1AT_BOVIN	46	11	0,38
S9-N-Ac_08	Prelamin-A/C LMNA	LMNA_HUMAN	74	3	0,46
S9-N-Ac_08	Elongation factor 1-alpha 2 EEF1A2	EF1A2_BOVIN	50	2	0,46
S9-N-Ac_09, S9-F-AP_35	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K HNRNPK	HNRPK_HUMAN	51	15	0,44
S9-N-Ac_09, S9-F-AP_35	Alpha-1-antiproteinase SERPINA1	A1AT_BOVIN	46	14	0,44
S9-N-Ac_09, S9-F-AP_35	60 kDa heat shock protein, mitochondrial HSPD1	CH60_HUMAN	61	8	0,44
S9-N-Ac_11	Dihydropyrimidinase-related protein 2 DPYSL2	DPYL2_HUMAN	62	23	0,47
S9-N-Ac_12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K HNRNPK	HNRPK_HUMAN	51	59	0,46
S9-N-Ac_12	60 kDa heat shock protein, mitochondrial HSPD1	CH60_HUMAN	61	7	0,46
S9-N-Ac_12	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,46
S9-N-Ac_13	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K HNRNPK	HNRPK_HUMAN	51	26	0,48
S9-N-Ac_13	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,48
S9-N-Ac_16	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K HNRNPK	HNRPK_HUMAN	51	50	0,39
S9-N-Ac_16	ERO1-like protein alpha ERO1L	ERO1A_HUMAN	54	7	0,39
S9-N-Ac_16	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	4	0,39
S9-N-Ac_18	Alpha-2-HS-glycoprotein AHSG	FETUA_BOVIN	38	8	0,49
S9-N-Ac_19	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 ETF1	ERF1_BOVIN	49	4	0,33
S9-N-Ac_19	Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic HARS	SYHC_HUMAN	57	4	0,33
S9-N-Ac_21	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H HNRNPH1	HNRH1_HUMAN	49	64	0,38
S9-N-Ac_30	Transaldolase TALDO1	TALDO_HUMAN	38	9	0,47
S9-N-Ac_30	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit PPP1CA	PP1A_BOVIN	38	9	0,47
S9-N-Ac_30	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,47
S9-N-Ac_30	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog VTA1	VTA1_BOVIN	34	3	0,47
S9-N-Ac_32	Tubulin beta chain TUBB	TBB5_HUMAN	50	6	0,50
S9-N-Ac_33	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,43
S9-N-Ac_36	Transaldolase TALDO1	TALDO_HUMAN	38	6	0,39
S9-N-Ac_41	Charged multivesicular body protein 5 CHMP5	CHMP5_HUMAN	25	9	0,45
S9-N-Ac_47, S9-F-Ac_136, HNO97-F-Ac_32	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,15
S9-N-Ac_50	Ig alpha-1 chain C region IGHA1	IGHA1_HUMAN	38	3	0,42
S9-N-Ac_50	Ig gamma-1 chain C region IGHG1	IGHG1_HUMAN	36	2	0,42
S9-N-Ac_51	Histone H4	H4_BOVIN	11	2	0,45
HNO97-F-AP_19, S9-N-AP_53	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,27

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO97-F-AP_33	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,34
HNO97-F-AP_34	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,93
HNO97-F-AP_44	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,21
HNO97-F-AP_46	Desmoplakin DSP	DESP_HUMAN	332	5	155,51
HNO97-F-AP_46	Hornerin HRNR	HORN_HUMAN	282	2	155,51
HNO97-F-AP_63	Myosin light polypeptide 6 MYL6	MYL6_BOVIN	17	7	∞
HNO97-F-AP_63	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	6	∞
HNO97-F-AP_63	60S acidic ribosomal protein P2 RPLP2	RLA2_HUMAN	12	4	∞
HNO97-F-AP_68	Nucleoredoxin NXN	NXN_HUMAN	48	4	4,20
HNO97-F-Ac_01	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,49
HNO97-F-Ac_03, S9-N-AP_07	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	3	0,33
HNO97-F-Ac_05, HNO97-N-Hc_03	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,42
HNO97-F-Ac_12, S9-F-Hc_12, HNO97-F-Hc_07	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform ATP6V1B2	VATB2_HUMAN	57	8	0,17
HNO97-F-Ac_15	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,11
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Desmoplakin DSP	DESP_HUMAN	332	44	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Alpha-enolase ENO1	ENOA_HUMAN	47	12	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Actin, cytoplasmic 1 ACTB	ACTB_HUMAN	42	11	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	10	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Annexin A2 ANXA2	ANXA2_HUMAN	39	9	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Involucrin IVL	INVO_HUMAN	68	9	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E TGM3	TGM3_HUMAN	77	9	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Tubulin beta chain TUBB	TBB5_HUMAN	50	9	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Tubulin beta-4B chain TUBB4B	TBB4B_HUMAN	50	9	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Heat shock protein HSP 90-beta HSP90AB1	HS90B_HUMAN	83	7	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Prelamin-A/C LMNA	LMNA_HUMAN	74	7	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Desmoglein-1 DSG1	DSG1_HUMAN	114	6	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Ig lambda-2 chain C regions IGLC2	LAC2_HUMAN	11	6	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Junction plakoglobin JUP	PLAK_BOVIN	82	6	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Calmodulin-like protein 5 CALML5	CALL5_HUMAN	16	5	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Epiplakin EPPK1	EPIPL_HUMAN	556	5	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Heat shock protein beta-1 HSPB1	HSPB1_HUMAN	23	4	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Histone H4	H4_BOVIN	11	4	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Phosphoglycerate kinase 1 PGK1	PGK1_HUMAN	45	3	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	2	0,44

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Caspase-14 CASP14	CASPE_HUMAN	28	2	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Profilin-1 PFN1	PROF1_HUMAN	15	2	0,44
HNO97-F-Ac_17, HNO97-F-HP_03	Transgelin-2 TAGLN2	TAGL2_BOVIN	22	2	0,44
HNO97-F-Ac_18	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,47
HNO97-F-Ac_23, HNO41-F-AP_08	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,33
HNO97-F-Ac_24, S9-F-Ac_129, S9-F-Hc_28	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,29
HNO97-F-Ac_24, S9-F-Ac_129, S9-F-Hc_28	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,29
HNO97-F-Ac_25	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,31
HNO97-F-Ac_26	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,41
HNO97-F-Ac_28, S9-N-AP_82	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,19
HNO97-F-Ac_28, S9-N-AP_82	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	2	0,19
HNO97-F-Ac_28, S9-N-AP_82	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,19
HNO97-F-Ac_31	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,22
HNO97-F-Ac_31	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	0,22
HNO97-F-Ac_34, S9-F-Ac_137, S9-N-Ac_49	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,26
HNO97-F-Ac_35, S9-N-AP_97	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	3	0,17
HNO97-F-Ac_35, S9-N-AP_97	Beta-lactoglobulin LGB	LACB_BOVIN	20	2	0,17
HNO97-F-Ac_40	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,12
HNO97-F-Ac_40	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,12
HNO97-F-Ac_41	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	4	0,46
HNO97-F-Ac_41	DCC-interacting protein 13-beta APPL2	DP13B_HUMAN	74	3	0,46
HNO97-F-Ac_41	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,46
HNO97-F-Ac_42	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,18
HNO97-F-Ac_42	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,18
HNO97-F-Ac_42	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	0,18
HNO97-F-Ac_46, S9-F-Ac_144, HNO41-F-AP_21	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,31
HNO97-F-Ac_46, S9-F-Ac_144, HNO41-F-AP_21	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,31
HNO97-F-Ac_46, S9-F-Ac_144, HNO41-F-AP_21	Tropomyosin alpha-1 chain TPM1	TPM1_BOVIN	33	2	0,31
HNO97-N-AP_07	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	2,52
HNO97-N-AP_09, HNO97-F-AP_15	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	4	2,01
HNO97-N-AP_09, HNO97-F-AP_15	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	4	2,01

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO97-N-AP_10	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	3,06
HNO97-N-AP_10	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	3,06
HNO97-N-AP_10	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	3,06
HNO97-N-AP_10	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	3,06
HNO97-N-AP_10	60 kDa heat shock protein, mitochondrial HSPD1	CH60_BOVIN	61	2	3,06
HNO97-N-AP_13, S9-F-AP_62, S9-N-AP_40	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	2,47
HNO97-N-AP_13, S9-F-AP_62, S9-N-AP_40	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	2,47
HNO97-N-AP_13, S9-F-AP_62, S9-N-AP_40	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	2,47
HNO97-N-AP_14, S9-N-AP_41	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	2,57
HNO97-N-AP_14, S9-N-AP_41	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	2,57
HNO97-N-AP_14, S9-N-AP_41	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	2,57
HNO97-N-AP_15, HNO41-N-AP_32	Actin, cytoplasmic 1 ACTB	ACTB_HUMAN	42	4	3,82
HNO97-N-AP_15, HNO41-N-AP_32	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	3,82
HNO97-N-AP_15, HNO41-N-AP_32	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	3,82
HNO97-N-AP_15, HNO41-N-AP_32	Elongation factor 1-alpha 1 EEF1A1	EF1A1_BOVIN	50	2	3,82
HNO97-N-AP_18	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	3	2,13
HNO97-N-AP_18	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	2,13
HNO97-N-AP_18	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	2,13
HNO97-N-AP_19	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	2,17
HNO97-N-AP_19	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	2,17
HNO97-N-AP_20	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	4,23
HNO97-N-AP_20	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	2	4,23
HNO97-N-AP_24	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	2,08
HNO97-N-AP_24	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	2,08
HNO97-N-AP_28	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	2,96
HNO97-N-AP_28	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	2,96
HNO97-N-AP_30, S9-N-AP_91, S9-N-HP_27	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	3	2,53
HNO97-N-AP_30, S9-N-AP_91, S9-N-HP_27	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	2,53
HNO97-N-AP_31	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	∞
HNO97-N-AP_31	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	∞
HNO97-N-AP_35	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	2,78
HNO97-N-AP_42, S9-N-AP_107, S9-F-AP_83	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	4,63
HNO97-N-AP_42, S9-N-AP_107, S9-F-AP_83	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	4,63
HNO97-N-AP_43	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	2,25

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO97-N-AP_43	Tropomyosin alpha-1 chain TPM1	TPM1_BOVIN	33	2	2,25
HNO97-N-Ac_05	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,46
HNO97-N-Ac_10	Pyruvate carboxylase, mitochondrial PC	PYC_HUMAN	130	9	0,47
HNO97-N-Ac_10	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,47
HNO97-N-Ac_11, S9-F-HP_07	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,43
HNO97-N-Ac_11, S9-F-HP_07	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,43
HNO97-N-Ac_32	Glycogen phosphorylase, brain form PYGB	PYGB_HUMAN	97	5	0,41
HNO97-N-Ac_32	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	4	0,41
HNO97-N-Ac_32	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,41
HNO97-N-Ac_32	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,41
HNO97-N-Ac_36	DNA replication licensing factor MCM7 MCM7	MCM7_HUMAN	81	10	0,49
HNO97-N-Ac_36	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,49
HNO97-N-Ac_36	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,49
HNO97-N-Ac_36	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,49
HNO97-N-Ac_38	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,31
HNO97-N-Ac_38	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,31
HNO97-N-Ac_40	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,24
HNO97-N-Ac_41	Prelamin-A/C LMNA	LMNA_HUMAN	74	24	0,49
HNO97-N-Ac_41	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,49
HNO97-N-Ac_42	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,50
HNO97-N-Ac_42	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,50
HNO97-N-Ac_47, S9-N-Hc_20, HNO97-F-Hc_19	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,44
HNO97-N-Ac_50, S9-F-Ac_128, S9-N-Ac_35	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,48
HNO97-N-Ac_50, S9-F-Ac_128, S9-N-Ac_35	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	0,48
HNO97-N-Ac_56, S9-F-HP_63	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	11	0,38
HNO97-N-Ac_56, S9-F-HP_63	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	2	0,38
HNO97-N-Ac_56, S9-F-HP_63	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,38
HNO97-N-Ac_58	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic AARS	SYAC_HUMAN	107	5	0,49
HNO97-N-Ac_58	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,49
HNO97-N-Ac_58	Major vault protein MVP	MVP_HUMAN	99	2	0,49
HNO97-N-Ac_60, HNO41-N-Ac_45, HNO41-F-Ac_48, S9-N-Hc_24, HNO97-N-Hc_21, S9-F-Ac_142	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,35

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO97-N-Ac_60, HNO41-N-Ac_45, HNO41-F-Ac_48, S9-N-Hc_24, HNO97-N-Hc_21, S9-F-Ac_142	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	2	0,35
HNO97-N-Ac_61, S9-F-Ac_143	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,43
HNO97-N-Ac_61, S9-F-Ac_143	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	2	0,43
HNO97-N-Ac_61, S9-F-Ac_143	X-ray repair cross-complementing protein 5 XRCC5	XRCC5_HUMAN	83	2	0,43
HNO41-F-AP_01	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,11
HNO41-F-AP_01	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	2	2,11
HNO41-F-AP_02	Plectin PLEC	PLEC_HUMAN	532	9	4,81
HNO41-F-AP_03	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	20	2,04
HNO41-F-AP_04	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	5	2,14
HNO41-F-AP_04	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	2	2,14
HNO41-F-AP_04	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,14
HNO41-F-AP_06	Protein NDRG1 NDRG1	NDRG1_HUMAN	43	18	2,31
HNO41-F-AP_06	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	2	2,31
HNO41-F-AP_06	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,31
HNO41-F-AP_07, HNO41-N-AP_27	60 kDa heat shock protein, mitochondrial HSPD1	CH60_BOVIN	61	8	2,92
HNO41-F-AP_07, HNO41-N-AP_27	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,92
HNO41-F-AP_07, HNO41-N-AP_27	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	2	2,92
HNO41-F-AP_09	40S ribosomal protein SA RPSA	RSSA_BOVIN	33	13	2,85
HNO41-F-AP_09	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,85
HNO41-F-AP_09	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	2	2,85
HNO41-F-AP_11	Cathepsin D CTSD	CATD_HUMAN	45	40	2,07
HNO41-F-AP_11	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	3	2,07
HNO41-F-AP_12	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	68	2,04
HNO41-F-AP_12	sp P02666 CASB_BOVIN	CASB_BOVIN	?	21	2,04
HNO41-F-AP_12	Serum albumin ALB	ALBU_HUMAN	69	10	2,04
HNO41-F-AP_12	Beta-lactoglobulin LGB	LACB_BOVIN	20	8	2,04
HNO41-F-AP_12	Alpha-S2-casein CSN1S2	CASA2_BOVIN	26	7	2,04
HNO41-F-AP_12	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	4	2,04
HNO41-F-AP_12	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	2,04
HNO41-F-AP_13	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 VDAC1	VDAC1_BOVIN	31	3	3,10
HNO41-F-AP_13	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	3,10
HNO41-F-AP_19	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	3,43

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO41-F-Ac_08	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	4	0,20
HNO41-F-Ac_17, S9-F-HP_16	DNA mismatch repair protein Msh2 MSH2	MSH2_HUMAN	105	8	0,36
HNO41-F-Ac_17, S9-F-HP_16	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,36
HNO41-F-Ac_19	Alpha-actinin-4 ACTN4	ACTN4_HUMAN	105	98	0,32
HNO41-F-Ac_19	Alpha-actinin-1 ACTN1	ACTN1_HUMAN	103	48	0,32
HNO41-F-Ac_19	Puromycin-sensitive aminopeptidase NPEPPS	PSA_HUMAN	103	10	0,32
HNO41-F-Ac_19	Coatomer subunit beta' COPB2	COPB2_BOVIN	102	2	0,32
HNO41-F-Ac_20	DNA mismatch repair protein Msh2 MSH2	MSH2_HUMAN	105	3	0,34
HNO41-F-Ac_20	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,34
HNO41-F-Ac_22	Alpha-actinin-4 ACTN4	ACTN4_HUMAN	105	75	0,40
HNO41-F-Ac_22	Alpha-actinin-1 ACTN1	ACTN1_HUMAN	103	33	0,40
HNO41-F-Ac_22	Puromycin-sensitive aminopeptidase NPEPPS	PSA_HUMAN	103	8	0,40
HNO41-F-Ac_22	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,40
HNO41-F-Ac_27	E3 UFM1-protein ligase 1 UFL1	UFL1_HUMAN	90	13	0,40
HNO41-F-Ac_33	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit GCLC	GSH1_HUMAN	73	2	0,36
HNO41-F-Ac_34, S9-F-HP_41	Protein arginine N-methyltransferase 5 PRMT5	ANM5_BOVIN	73	8	0,41
HNO41-F-Ac_34, S9-F-HP_41	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,41
HNO41-F-Ac_34, S9-F-HP_41	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	2	0,41
HNO41-F-Ac_37	Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3 ALDH1A3	AL1A3_HUMAN	56	13	0,43
HNO41-F-Ac_40	Elongation factor 1-gamma EEF1G	EF1G_HUMAN	50	34	0,50
HNO41-F-Ac_40	Eukaryotic initiation factor 4A-III EIF4A3	IF4A3_BOVIN	47	9	0,50
HNO41-F-Ac_40	Proliferation-associated protein 2G4 PA2G4	PA2G4_HUMAN	44	6	0,50
HNO41-F-Ac_40	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2 MAT2A	METK2_HUMAN	44	5	0,50
HNO41-F-Ac_40	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,50
HNO41-F-Ac_41	Actin, cytoplasmic 1 ACTB	ACTB_HUMAN	42	217	0,50
HNO41-F-Ac_42	Actin, cytoplasmic 1 ACTB	ACTB_HUMAN	42	35	0,45
HNO41-F-Ac_44, HNO97-N-Ac_48	Serpin B6 SERPINB6	SPB6_HUMAN	43	9	0,06
HNO41-F-Ac_44, HNO97-N-Ac_48	Stomatin-like protein 2, mitochondrial STOML2	STML2_HUMAN	39	3	0,06
HNO41-F-Ac_44, HNO97-N-Ac_48	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,06
HNO41-F-Ac_47	Heat shock 70 kDa protein 4L HSPA4L	HS74L_HUMAN	95	13	0,50
HNO41-F-Ac_47	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,50
HNO41-F-Ac_49	Plastin-3 PLS3	PLST_HUMAN	71	43	0,47
HNO41-F-Ac_49	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	10	0,47
HNO41-F-Ac_49	Heat shock 70 kDa protein 1A HSPA1A	HS71A_BOVIN	70	4	0,47

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO41-F-Ac_49	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,47
HNO41-N-AP_04	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	6,17
HNO41-N-AP_05	Thymidine phosphorylase TYMP	TYPH_HUMAN	50	6	5,05
HNO41-N-AP_05	Tubulin beta-4B chain TUBB4B	TBB4B_HUMAN	50	3	5,05
HNO41-N-AP_05	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	5,05
HNO41-N-AP_08, HNO97-F-Hc_13	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	3,40
HNO41-N-AP_09, HNO97-F-Hc_14	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	5	4,79
HNO41-N-AP_09, HNO97-F-Hc_14	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	4,79
HNO41-N-AP_10	RuvB-like 1 RUVBL1	RUVB1_HUMAN	50	6	2,62
HNO41-N-AP_10	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	4	2,62
HNO41-N-AP_10	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	2,62
HNO41-N-AP_11	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	4,42
HNO41-N-AP_12	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	3,68
HNO41-N-AP_12	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	3,68
HNO41-N-AP_16	Hsc70-interacting protein ST13	F10A1_HUMAN	41	3	2,73
HNO41-N-AP_16	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	2,73
HNO41-N-AP_17, HNO41-F-AP_05	Endoplasmic reticulum resident protein 44 ERP44	ERP44_HUMAN	47	3	2,64
HNO41-N-AP_18, S9-F-AP_57	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	4,14
HNO41-N-AP_21	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	3,03
HNO41-N-AP_22, S9-F-Ac_122	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,86
HNO41-N-AP_23	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	5,16
HNO41-N-AP_23	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	4	5,16
HNO41-N-AP_24, HNO97-F-Hc_18	Actin, cytoplasmic 1 ACTB	ACTB_BOVIN	42	4	4,52
HNO41-N-AP_24, HNO97-F-Hc_18	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	4	4,52
HNO41-N-AP_28	sp P02666 CASB_BOVIN	CASB_BOVIN	?	2	5,15
HNO41-N-AP_28	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	2	5,15
HNO41-N-AP_28	Protein SET SET	SET_HUMAN	33	9	5,15
HNO41-N-AP_29	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,94
HNO41-N-AP_30, S9-N-Ac_26, S9-F-Ac_123	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	5,57
HNO41-N-AP_33, S9-N-Ac_28	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,99
HNO41-N-AP_33, S9-N-Ac_28	Protein SET SET	SET_HUMAN	33	10	2,99
HNO41-N-AP_34	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,89
HNO41-N-AP_34	Protein SET SET	SET_HUMAN	33	3	2,89
HNO41-N-AP_35, S9-N-Ac_29	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	4,22

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO41-N-AP_39, HNO97-F-Hc_21, HNO97-N-AP_16	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	5,08
HNO41-N-AP_40, S9-N-AP_47	sp P02666 CASB_BOVIN	CASB_BOVIN	?	2	4,15
HNO41-N-AP_40, S9-N-AP_47	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	4,15
HNO41-N-AP_40, S9-N-AP_47	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	4	4,15
HNO41-N-AP_41	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	4,88
HNO41-N-AP_42, HNO97-N-AP_17	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	4,69
HNO41-N-AP_43, S9-F-AP_64	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	3,17
HNO41-N-AP_44	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	2	3,89
HNO41-N-AP_44	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,89
HNO41-N-AP_45	sp P02666 CASB_BOVIN	CASB_BOVIN	?	2	7,11
HNO41-N-AP_50	WD repeat-containing protein 61 WDR61	WDR61_BOVIN	34	2	5,23
HNO41-N-AP_50	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	5,23
HNO41-N-AP_51, S9-N-HP_17	Inositol monophosphatase 1 IMPA1	IMPA1_HUMAN	30	4	4,61
HNO41-N-AP_52	Kappa-casein CSN3	CASK_BOVIN	21	3	2,00
HNO41-N-AP_52	Alpha-S2-casein CSN1S2	CASA2_BOVIN	26	3	2,00
HNO41-N-AP_52	sp P02666 CASB_BOVIN	CASB_BOVIN	?	3	2,00
HNO41-N-AP_52	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,00
HNO41-N-AP_52	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	10	2,00
HNO41-N-AP_53	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	4,01
HNO41-N-AP_55	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,26
HNO41-N-AP_55	Annexin A2 ANXA2	ANXA2_HUMAN	39	14	3,26
HNO41-N-AP_56	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,06
HNO41-N-AP_61	Rho GTPase-activating protein 1 ARHGAP1	RHG01_HUMAN	50	10	3,95
HNO41-N-AP_61	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial DLST	ODO2_HUMAN	49	6	3,95
HNO41-N-AP_61	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	3,95
HNO41-N-Ac_04, HNO41-F-Ac_05	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,41
HNO41-N-Ac_09, HNO97-N-Ac_12, HNO41-F-Ac_09	DNA damage-binding protein 1 DDB1	DDB1_BOVIN	127	4	0,40
HNO41-N-Ac_09, HNO97-N-Ac_12, HNO41-F-Ac_09	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,40

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO41-N-Ac_15, HNO41-F-Ac_16, HNO97-N-Ac_26	Elongation factor 2 EEF2	EF2_HUMAN	95	8	0,40
HNO41-N-Ac_15, HNO41-F-Ac_16, HNO97-N-Ac_26	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	3	0,40
HNO41-N-Ac_15, HNO41-F-Ac_16, HNO97-N-Ac_26	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,40
HNO41-N-Ac_16, HNO97-N-Ac_30, S9-F-HP_18, S9-F-Ac_100	AP-1 complex subunit beta-1 AP1B1	AP1B1_HUMAN	105	6	0,46
HNO41-N-Ac_16, HNO97-N-Ac_30, S9-F-HP_18, S9-F-Ac_100	Heat shock 70 kDa protein 4 HSPA4	HSP74_HUMAN	94	5	0,46
HNO41-N-Ac_16, HNO97-N-Ac_30, S9-F-HP_18, S9-F-Ac_100	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,46
HNO41-N-Ac_16, HNO97-N-Ac_30, S9-F-HP_18, S9-F-Ac_100	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,46
HNO41-N-Ac_18, S9-F-HP_19	Programmed cell death 6-interacting protein PDCD6IP	PDC6I_HUMAN	96	8	0,41
HNO41-N-Ac_18, S9-F-HP_19	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,41
HNO41-N-Ac_20	Programmed cell death 6-interacting protein PDCD6IP	PDC6I_HUMAN	96	10	0,46
HNO41-N-Ac_20	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,46
HNO41-N-Ac_23	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1 MX1	MX1_HUMAN	76	26	0,19
HNO41-N-Ac_25, HNO97-N-Ac_39	Neurolysin, mitochondrial NLN	NEUL_HUMAN	81	13	0,35
HNO41-N-Ac_25, HNO97-N-Ac_39	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	3	0,35
HNO41-N-Ac_26	Leukotriene A-4 hydrolase LTA4H	LKHA4_HUMAN	69	7	0,43
HNO41-N-Ac_26	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,43
HNO41-N-Ac_27, S9-N-Ac_15	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K HNRNPK	HNRPK_BOVIN	51	14	0,38
HNO41-N-Ac_27, S9-N-Ac_15	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,38
HNO41-N-Ac_27, S9-N-Ac_15	ERO1-like protein alpha ERO1L	ERO1A_HUMAN	54	2	0,38
HNO41-N-Ac_28	Dihydropyrimidinase-related protein 2 DPYSL2	DPYL2_HUMAN	62	4	0,46
HNO41-N-Ac_28	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	3	0,46
HNO41-N-Ac_29	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K HNRNPK	HNRPK_BOVIN	51	5	0,39
HNO41-N-Ac_29	T-complex protein 1 subunit epsilon CCT5	TCPE_HUMAN	60	5	0,39
HNO41-N-Ac_29	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	4	0,39
HNO41-N-Ac_29	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,39
HNO41-N-Ac_30	Tubulin alpha-1C chain TUBA1C	TBA1C_HUMAN	50	52	0,42
HNO41-N-Ac_30	Tubulin alpha-4A chain TUBA4A	TBA4A_HUMAN	50	22	0,42

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO41-N-Ac_30	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,42
HNO41-N-Ac_32	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,41
HNO41-N-Ac_34, S9-N-Hc_16	Nucleoredoxin NXN	NXN_HUMAN	48	4	0,28
HNO41-N-Ac_34, S9-N-Hc_16	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,28
HNO41-N-Ac_34, S9-N-Hc_16	Tubulin beta-4A chain TUBB4A	TBB4A_HUMAN	50	3	0,28
HNO41-N-Ac_34, S9-N-Hc_16	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,28
HNO41-N-Ac_34, S9-N-Hc_16	Vimentin VIM	VIME_HUMAN	54	2	0,28
HNO41-N-Ac_35	Vimentin VIM	VIME_HUMAN	54	3	0,37
HNO41-N-Ac_35	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit PRKAR2A	KAP2_HUMAN	46	3	0,37
HNO41-N-Ac_35	Tubulin beta-4A chain TUBB4A	TBB4A_HUMAN	50	2	0,37
HNO41-N-Ac_36, S9-F-HP_48	Ribonuclease inhibitor RNH1	RINI_HUMAN	50	10	0,46
HNO41-N-Ac_36, S9-F-HP_48	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,46
HNO41-N-Ac_36, S9-F-HP_48	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,46
HNO41-N-Ac_37	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,39
HNO41-N-Ac_37	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,39
HNO41-N-Ac_37	Eukaryotic initiation factor 4A-I EIF4A1	IF4A1_BOVIN	46	2	0,39
HNO41-N-Ac_38	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,40
HNO41-N-Ac_38	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,40
HNO41-N-Ac_39, S9-F-HP_52	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,36
HNO41-N-Ac_40	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,15
HNO41-N-Ac_40	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,15
S9-F-HP_01	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,16
S9-F-HP_01	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	3	2,16
S9-F-HP_02, HNO41-F-Ac_01, HNO97-N-Ac_03	Clathrin heavy chain 1 CLTC	CLH1_BOVIN	192	12	2,51
S9-F-HP_02, HNO41-F-Ac_01, HNO97-N-Ac_03	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,51
S9-F-HP_06	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	3	2,40
S9-F-HP_06	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,40
S9-F-HP_10	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	2,27
S9-F-HP_10	Kinesin-1 heavy chain KIF5B	KINH_HUMAN	110	2	2,27
S9-F-HP_09, HNO97-N-Ac_16	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	2,25
S9-F-HP_09, HNO97-N-Ac_16	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,25
S9-F-HP_09, HNO97-N-Ac_16	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase, mitochondrial AASS	AASS_HUMAN	102	2	2,25
S9-F-HP_12	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,97

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-F-HP_13, HNO97-N-Ac_20	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 ERAP1	ERAP1_HUMAN	107	4	2,03
S9-F-HP_13, HNO97-N-Ac_20	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	2,03
S9-F-HP_15, HNO97-N-Ac_25	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	3	2,94
S9-F-HP_17, S9-F-Ac_97	Desmoplakin DSP	DESP_HUMAN	332	9	2,24
S9-F-HP_17, S9-F-Ac_97	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,24
S9-F-HP_17, S9-F-Ac_97	Desmoglein-1 DSG1	DSG1_HUMAN	114	2	2,24
S9-F-HP_20	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	7	2,52
S9-F-HP_20	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,52
S9-F-HP_22, S9-N-AP_06	DNA mismatch repair protein Msh2 MSH2	MSH2_HUMAN	105	3	5,75
S9-F-HP_22, S9-N-AP_06	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	5,75
S9-F-HP_22, S9-N-AP_06	Spermatogenesis-associated protein 5 SPATA5	SPAT5_HUMAN	98	2	5,75
S9-F-HP_23	DNA replication licensing factor MCM6 MCM6	MCM6_HUMAN	93	9	3,01
S9-F-HP_23	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	3,01
S9-F-HP_24, HNO41-F-Ac_25, HNO41-N-Ac_19, HNO97-N-Ac_34	Importin subunit beta-1 KPNB1	IMB1_HUMAN	97	40	2,05
S9-F-HP_24, HNO41-F-Ac_25, HNO41-N-Ac_19, HNO97-N-Ac_34	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	4	2,05
S9-F-HP_26	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 TGM2	TGM2_HUMAN	77	24	2,37
S9-F-HP_26	Heat shock protein HSP 90-beta HSP90AB1	HS90B_HUMAN	83	8	2,37
S9-F-HP_26	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	2	2,37
S9-F-HP_26	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,37
S9-F-HP_27	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 IQGAP1	IQGA1_HUMAN	189	5	2,60
S9-F-HP_27	Heat shock protein HSP 90-beta HSP90AB1	HS90B_HUMAN	83	3	2,60
S9-F-HP_27	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	2	2,60
S9-F-HP_27	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,60
S9-F-HP_28, S9-N-Hc_11, HNO97-N-Ac_37, HNO41-N-Ac_21	Alpha-fetoprotein AFP	FETA_BOVIN	69	26	2,02
S9-F-HP_28, S9-N-Hc_11, HNO97-N-Ac_37, HNO41-N-Ac_21	X-ray repair cross-complementing protein 5 XRCC5	XRCC5_HUMAN	83	5	2,02
S9-F-HP_28, S9-N-Hc_11, HNO97-N-Ac_37, HNO41-N-Ac_21	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,02
S9-F-HP_30	Alpha-fetoprotein AFP	FETA_BOVIN	69	3	2,76
S9-F-HP_32	Alpha-fetoprotein AFP	FETA_BOVIN	69	3	4,82
S9-F-HP_32	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	4,82

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-F-HP_33	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,50
S9-F-HP_33	Heat shock protein HSP 90-beta HSP90AB1	HS90B_HUMAN	83	2	2,50
S9-F-HP_33	Cdc42-interacting protein 4 TRIP10	CIP4_HUMAN	68	2	2,50
S9-F-HP_33	Galectin-3-binding protein LGALS3BP	LG3BP_HUMAN	65	2	2,50
S9-F-HP_34, S9-N-AP_20	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,23
S9-F-HP_35	Serotransferrin TF	TRFE_BOVIN	78	18	2,43
S9-F-HP_35	Lysine--tRNA ligase KARS	SYK_HUMAN	68	6	2,43
S9-F-HP_38, S9-F-HP_36	Serotransferrin TF	TRFE_BOVIN	78	3	2,98
S9-F-HP_38, S9-F-HP_36	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,98
S9-F-HP_39	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,42
S9-F-HP_40	Serotransferrin TF	TRFE_BOVIN	78	2	2,20
S9-F-HP_42	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	49	3,05
S9-F-HP_42	Dihydropyrimidinase-related protein 2 DPYSL2	DPYL2_HUMAN	62	4	3,05
S9-F-HP_42	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,05
S9-F-HP_43	Plastin-3 PLS3	PLST_HUMAN	71	63	2,24
S9-F-HP_43	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	27	2,24
S9-F-HP_43	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	2	2,24
S9-F-HP_44	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 P4HA1	P4HA1_HUMAN	61	8	2,37
S9-F-HP_44	Copine-2 CPNE2	CPNE2_HUMAN	61	5	2,37
S9-F-HP_44	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,37
S9-F-HP_45	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_BOVIN	50	15	2,23
S9-F-HP_45	60 kDa heat shock protein, mitochondrial HSPD1	CH60_HUMAN	61	9	2,23
S9-F-HP_45	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic HMGCS1	HMCS1_HUMAN	57	3	2,23
S9-F-HP_46	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_BOVIN	50	6	2,14
S9-F-HP_47	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_BOVIN	50	14	2,08
S9-F-HP_47	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic HMGCS1	HMCS1_HUMAN	57	6	2,08
S9-F-HP_47	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	3	2,08
S9-F-HP_47	Importin subunit alpha-1 KPNA2	IMA1_HUMAN	58	3	2,08
S9-F-HP_49	UPF0364 protein C6orf211 C6orf211	CF211_HUMAN	51	3	2,22
S9-F-HP_49	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,22
S9-F-HP_53	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,95
S9-F-HP_53	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	2	2,95
S9-F-HP_55, S9-N-AP_52	Desmoplakin DSP	DESP_HUMAN	332	3	2,22
S9-F-HP_64	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 SPTAN1	SPTN1_HUMAN	285	8	2,26

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-F-HP_64	Integrin alpha-3 ITGA3	ITA3_HUMAN	117	3	2,26
S9-F-HP_64	DNA replication licensing factor MCM2 MCM2	MCM2_HUMAN	102	2	2,26
S9-F-HP_66	Puromycin-sensitive aminopeptidase NPEPPS	PSA_HUMAN	103	7	2,11
S9-F-HP_66	Alpha-actinin-1 ACTN1	ACTN1_HUMAN	103	4	2,11
S9-F-HP_66	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,11
S9-F-HP_67	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	5,73
S9-F-HP_67	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	2	5,73
S9-F-HP_68	Importin subunit beta-1 KPNB1	IMB1_HUMAN	97	6	2,45
S9-F-HP_68	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,45
S9-F-Hc_01, S9-N-Ac_04	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	11	0,24
S9-F-Hc_01, S9-N-Ac_04	Stress-70 protein, mitochondrial HSPA9	GRP75_BOVIN	74	4	0,24
S9-F-Hc_01, S9-N-Ac_04	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,24
S9-F-Hc_02	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	11	0,17
S9-F-Hc_03	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10 FKBP10	FKB10_HUMAN	64	10	0,28
S9-F-Hc_03	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	4	0,28
S9-F-Hc_03	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,28
S9-F-Hc_04	Sorting nexin-1 SNX1	SNX1_HUMAN	59	13	0,47
S9-F-Hc_04	78 kDa glucose-regulated protein HSPA5	GRP78_BOVIN	72	7	0,47
S9-F-Hc_04	Heat shock cognate 71 kDa protein HSPA8	HSP7C_HUMAN	71	3	0,47
S9-F-Hc_04	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,47
S9-F-Hc_04	Heat shock protein HSP 90-beta HSP90AB1	HS90B_BOVIN	83	2	0,47
S9-F-Hc_04	Lamin-B1 LMNB1	LMNB1_HUMAN	66	2	0,47
S9-F-Hc_07	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	3	0,36
S9-F-Hc_11	Tubulin beta-4A chain TUBB4A	TBB4A_HUMAN	50	4	0,46
S9-F-Hc_11	Nucleosome assembly protein 1-like 4 NAP1L4	NP1L4_HUMAN	43	3	0,46
S9-F-Hc_16	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,41
S9-F-Hc_18	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5 UBA5	UBA5_HUMAN	45	9	0,47
S9-F-Hc_18	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,47
S9-F-Hc_18	Vimentin VIM	VIME_HUMAN	54	3	0,47
S9-F-Hc_19	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,37
S9-F-Hc_21	Vimentin VIM	VIME_HUMAN	54	12	0,47
S9-F-Hc_21	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,47
S9-F-Hc_22	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,37
S9-F-Hc_22	Actin-like protein 6A ACTL6A	ACL6A_HUMAN	47	3	0,37

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-F-Hc_24	Vimentin VIM	VIME_HUMAN	54	6	0,48
S9-F-Hc_24	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,48
S9-F-Hc_24	Dermcidin DCD	DCD_HUMAN	11	2	0,48
S9-F-Hc_26	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,43
S9-F-Hc_30	14-3-3 protein gamma YWHAG	1433G_BOVIN	28	6	0,40
S9-F-Hc_30	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,40
S9-F-Hc_31	14-3-3 protein zeta/delta YWHAZ	1433Z_HUMAN	28	3	0,30
S9-F-Hc_31	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	2	0,30
S9-F-Hc_32, S9-F-AP_72	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	4	0,40
S9-F-Hc_33, S9-F-Ac_135, HNO97-F-Ac_30	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,42
S9-F-Hc_34	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,45
S9-F-Hc_40	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	3	0,31
S9-F-Hc_40	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	3	0,31
S9-N-HP_05	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_HUMAN	57	26	2,18
S9-N-HP_05	Protein disulfide-isomerase A6 PDIA6	PDIA6_HUMAN	48	3	2,18
S9-N-HP_08, HNO97-N-AP_08	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	3	2,83
S9-N-HP_02	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,71
S9-N-HP_20	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,58
S9-N-HP_20	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	2,58
S9-N-Hc_03	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,48
S9-N-Hc_04	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,43
S9-N-Hc_04	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,43
S9-N-Hc_05	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,26
S9-N-Hc_07	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,39
S9-N-Hc_08	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,50
S9-N-Hc_10	Heat shock protein HSP 90-alpha HSP90AA1	HS90A_HUMAN	85	20	0,48
S9-N-Hc_10	Heat shock protein HSP 90-beta HSP90AB1	HS90B_HUMAN	83	15	0,48
S9-N-Hc_10	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,48
S9-N-Hc_10	Heat shock 70 kDa protein 1-like HSPA1L	HS71L_HUMAN	70	2	0,48
S9-N-Hc_12	Alpha-1-antiproteinase SERPINA1	A1AT_BOVIN	46	9	0,36
S9-N-Hc_12	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	4	0,36
S9-N-Hc_12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K HNRNPK	HNRPK_BOVIN	51	4	0,36
S9-N-Hc_15	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,50
S9-N-Hc_15	Heat shock 70 kDa protein 1-like HSPA1L	HS71L_HUMAN	70	2	0,50

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
S9-N-Hc_17, S9-N-Ac_22	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,46
S9-N-Hc_17, S9-N-Ac_22	Heat shock 70 kDa protein 1-like HSPA1L	HS71L_HUMAN	70	2	0,46
S9-N-Hc_17, S9-N-Ac_22	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,46
S9-N-Hc_21	Talin-1 TLN1	TLN1_HUMAN	270	10	0,48
S9-N-Hc_21	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,48
S9-N-Hc_21	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,48
S9-N-Hc_23	Heat shock protein HSP 90-alpha HSP90AA1	HS90A_HUMAN	85	51	0,49
S9-N-Hc_23	Heat shock protein HSP 90-beta HSP90AB1	HS90B_HUMAN	83	31	0,49
S9-N-Hc_25	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_BOVIN	50	5	0,50
S9-N-Hc_25	Nuclear migration protein nudC NUDC	NUDC_HUMAN	38	3	0,50
S9-N-Hc_25	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,50
HNO97-F-HP_01	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	19	2,52
HNO97-F-HP_01	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial OPA1	OPA1_HUMAN	112	12	2,52
HNO97-F-HP_01	Alpha-S2-casein CSN1S2	CASA2_BOVIN	26	6	2,52
HNO97-F-HP_01	Kappa-casein CSN3	CASK_BOVIN	21	5	2,52
HNO97-F-HP_01	Beta-lactoglobulin LGB	LACB_BOVIN	20	4	2,52
HNO97-F-HP_01	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	2,52
HNO97-F-HP_02	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,65
HNO97-F-HP_05	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1 SLC25A24	SCMC1_HUMAN	53	4	3,95
HNO97-F-HP_05	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G EIF3G	EIF3G_BOVIN	36	3	3,95
HNO97-F-HP_06	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,95
HNO97-F-HP_08	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	8,76
HNO97-F-HP_12, HNO97-N-AP_34, HNO97-F-AP_56, HNO97-N-HP_11	Calmodulin-like protein 5 CALML5	CALL5_HUMAN	16	8	2,94
HNO97-F-HP_12, HNO97-N-AP_34, HNO97-F-AP_56, HNO97-N-HP_11	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,94
HNO97-F-HP_15, HNO97-N-AP_37, HNO97-F-AP_61, HNO41-F-AP_16, HNO97-N-HP_14	Calmodulin-like protein 3 CALML3	CALL3_HUMAN	17	25	4,82
HNO97-F-HP_15, HNO97-N-AP_37, HNO97-F-AP_61, HNO41-F-AP_16, HNO97-N-HP_14	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	4,82
HNO97-F-HP_22, HNO97-N-HP_21	Glycogen phosphorylase, brain form PYGB	PYGB_HUMAN	97	3	3,49
HNO97-F-HP_22, HNO97-N-HP_21	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	3,49

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO97-F-HP_22, HNO97-N-HP_21	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	3,49
HNO97-F-HP_22, HNO97-N-HP_21	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 PLOD2	PLOD2_HUMAN	85	2	3,49
HNO97-F-HP_23	Glycogen phosphorylase, brain form PYGB	PYGB_HUMAN	97	6	2,54
HNO97-F-HP_23	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	2,54
HNO97-F-Hc_01	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,23
HNO97-F-Hc_02, S9-F-AP_12	Serpin A3-1 SERPINA3-1	SPA31_BOVIN	46	6	0,47
HNO97-F-Hc_02, S9-F-AP_12	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,47
HNO97-F-Hc_02, S9-F-AP_12	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate MARCKS	MARCS_HUMAN	32	2	0,47
HNO97-F-Hc_08, S9-F-Hc_14	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,37
HNO97-F-Hc_08, S9-F-Hc_14	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4 FKBP4	FKBP4_HUMAN	52	2	0,37
HNO97-F-Hc_10, S9-N-Hc_14, HNO41-N-AP_03	Tubulin beta-3 chain TUBB3	TBB3_HUMAN	50	4	0,32
HNO97-F-Hc_10, S9-N-Hc_14, HNO41-N-AP_03	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,32
HNO97-F-Hc_10, S9-N-Hc_14, HNO41-N-AP_03	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_BOVIN	50	2	0,32
HNO97-F-Hc_15, HNO41-N-AP_14	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	4	0,47
HNO97-F-Hc_15, HNO41-N-AP_14	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,47
HNO97-F-Hc_20	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,39
HNO97-F-Hc_22	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,25
HNO97-F-Hc_22	Heat shock 70 kDa protein 1-like HSPA1L	HS71L_HUMAN	70	2	0,25
HNO97-F-Hc_26	Immunity-related GTPase family Q protein IRGQ	IRGQ_HUMAN	63	9	0,44
HNO97-F-Hc_26	Alpha-1-antiproteinase SERPINA1	A1AT_BOVIN	46	3	0,44
HNO97-F-Hc_26	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,44
HNO97-F-Hc_26	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,44
HNO97-F-Hc_27	Alpha-2-macroglobulin A2M	A2MG_BOVIN	168	2	0,37
HNO97-N-HP_04	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	15,64
HNO97-N-HP_07, HNO97-F-HP_07, S9-N-AP_73	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	19,65
HNO97-N-HP_07, HNO97-F-HP_07, S9-N-AP_73	Heat shock 70 kDa protein 1-like HSPA1L	HS71L_HUMAN	70	2	19,65
HNO97-N-HP_09, S9-N-HP_26, S9-F-AP_76, S9-N-AP_90	Cofilin-1 CFL1	COF1_BOVIN	19	2	2,31
HNO97-N-HP_18, HNO97-F-HP_19, HNO97-F-AP_65	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	5,79
HNO97-N-HP_18, HNO97-F-HP_19, HNO97-F-AP_65	Heat shock 70 kDa protein 1-like HSPA1L	HS71L_HUMAN	70	2	5,79

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO97-N-Hc_01	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	4	0,38
HNO97-N-Hc_01	Heat shock 70 kDa protein 1-like HSPA1L	HS71L_HUMAN	70	2	0,38
HNO97-N-Hc_02	Serpin B3 SERPINB3	SPB3_HUMAN	45	15	0,48
HNO97-N-Hc_02	Serpin B4 SERPINB4	SPB4_HUMAN	45	12	0,48
HNO97-N-Hc_02	Heat shock 70 kDa protein 1-like HSPA1L	HS71L_HUMAN	70	6	0,48
HNO97-N-Hc_02	Actin, cytoplasmic 1 ACTB	ACTB_HUMAN	42	5	0,48
HNO97-N-Hc_02	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPDH	G3P_HUMAN	36	5	0,48
HNO97-N-Hc_02	Calmodulin-like protein 5 CALML5	CALL5_HUMAN	16	5	0,48
HNO97-N-Hc_02	Ig kappa chain C region IGKC	IGKC_HUMAN	12	5	0,48
HNO97-N-Hc_02	Galectin-7 LGALS7	LEG7_HUMAN	15	5	0,48
HNO97-N-Hc_02	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B_BOVIN	50	4	0,48
HNO97-N-Hc_02	Desmoplakin DSP	DESP_HUMAN	332	4	0,48
HNO97-N-Hc_02	Histone H4	H4_BOVIN	11	3	0,48
HNO97-N-Hc_02	Alpha-enolase ENO1	ENOA_HUMAN	47	3	0,48
HNO97-N-Hc_02	Heat shock protein HSP 90-alpha HSP90AA1	HS90A_HUMAN	85	2	0,48
HNO97-N-Hc_02	Ig lambda-2 chain C regions IGLC2	LAC2_HUMAN	11	2	0,48
HNO97-N-Hc_02	Annexin A2 ANXA2	ANXA2_BOVIN	39	2	0,48
HNO97-N-Hc_05, S9-F-AP_28	Alpha-1-antiproteinase SERPINA1	A1AT_BOVIN	46	8	0,46
HNO97-N-Hc_05, S9-F-AP_28	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	3	0,46
HNO97-N-Hc_05, S9-F-AP_28	Semenogelin-1 SEMG1	SEMG1_HUMAN	52	3	0,46
HNO97-N-Hc_06	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	48	0,49
HNO97-N-Hc_06	Beta-lactoglobulin LGB	LACB_BOVIN	20	32	0,49
HNO97-N-Hc_06	Lysozyme C LYZ	LYSC_HUMAN	17	21	0,49
HNO97-N-Hc_06	Lactotransferrin LTF	TRFL_HUMAN	78	10	0,49
HNO97-N-Hc_06	Serum albumin ALB	ALBU_HUMAN	69	6	0,49
HNO97-N-Hc_06	Desmoplakin DSP	DESP_HUMAN	332	5	0,49
HNO97-N-Hc_06	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	5	0,49
HNO97-N-Hc_06	Ig lambda-2 chain C regions IGLC2	LAC2_HUMAN	11	4	0,49
HNO97-N-Hc_06	Alpha-S2-casein CSN1S2	CASA2_BOVIN	26	4	0,49
HNO97-N-Hc_06	Kappa-casein CSN3	CASK_BOVIN	21	4	0,49
HNO97-N-Hc_06	Desmoglein-1 DSG1	DSG1_HUMAN	114	4	0,49
HNO97-N-Hc_06	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPDH	G3P_HUMAN	36	3	0,49
HNO97-N-Hc_06	Ig kappa chain C region IGKC	IGKC_HUMAN	12	3	0,49
HNO97-N-Hc_06	BPI fold-containing family B member 1 BPIFB1	BPIB1_HUMAN	52	3	0,49

Label	Proteinbezeichnung	Protein-ID	MW	PC	fc-Wert
HNO97-N-Hc_06	Heat shock 70 kDa protein 1-like HSPA1L	HS71L_HUMAN	70	2	0,49
HNO97-N-Hc_06	Actin, cytoplasmic 1 ACTB	ACTB_HUMAN	42	2	0,49
HNO97-N-Hc_06	Protein S100-A9 S100A9	S10A9_HUMAN	13	2	0,49
HNO97-N-Hc_06	Junction plakoglobin JUP	PLAK_BOVIN	82	2	0,49
HNO97-N-Hc_07, HNO41-N-Ac_31	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	7	0,42
HNO97-N-Hc_07, HNO41-N-Ac_31	Beta-lactoglobulin LGB	LACB_BOVIN	20	4	0,42
HNO97-N-Hc_11	Annexin A5 ANXA5	ANXA5_HUMAN	36	2	0,41
HNO97-N-Hc_13	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 DDAH2	DDAH2_HUMAN	30	8	0,48
HNO97-N-Hc_13	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	4	0,48
HNO97-N-Hc_14	Trypsin-1 PRSS1	TRY1_HUMAN	27	2	0,49
HNO97-N-Hc_15	Cathepsin D CTSD	CATD_HUMAN	45	7	0,48
HNO97-N-Hc_16	Tumor protein D52 TPD52	TPD52_HUMAN	24	3	0,43
HNO97-N-Hc_16	Heat shock 70 kDa protein 1-like HSPA1L	HS71L_HUMAN	70	2	0,43
HNO97-N-Hc_17, HNO97-N-AP_27	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,06
HNO41-F-Ac_06, HNO41-N-Ac_05	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial LRPPRC	LRPPRC_HUMAN	158	4	0,43
HNO41-F-Ac_43, HNO41-N-Ac_41	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,38
HNO97-F-AP_50, S9-F-HP_58	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	85,93
HNO97-N-AP_32, HNO97-F-HP_11, HNO97-N-HP_10	Desmoplakin DSP	DESP_HUMAN	332	5	2,89
HNO97-N-AP_32, HNO97-F-HP_11, HNO97-N-HP_10	Desmoglein-1 DSG1	DSG1_HUMAN	114	3	2,89
HNO97-N-AP_32, HNO97-F-HP_11, HNO97-N-HP_10	Hornerin HRNR	HORN_HUMAN	282	2	2,89
S9-F-AP_61, HNO97-N-AP_12, S9-N-AP_39	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	2,99
S9-F-Ac_113, S9-F-Hc_13	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	0,36
S9-F-Ac_124, S9-N-Ac_27	Protein SET SET	SET_HUMAN	33	6	0,43
S9-N-AP_04, S9-F-HP_14, HNO97-N-Ac_22	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial OGDH	ODO1_HUMAN	116	7	2,81
S9-N-AP_04, S9-F-HP_14, HNO97-N-Ac_22	Alpha-S1-casein CSN1S1	CASA1_BOVIN	25	3	2,81
S9-N-AP_04, S9-F-HP_14, HNO97-N-Ac_22	Serum albumin ALB	ALBU_BOVIN	69	2	2,81
S9-N-AP_36, HNO41-N-AP_15, S9-F-HP_50	ATP synthase subunit beta, mitochondrial ATP5B	ATPB_BOVIN	56	2	7,09

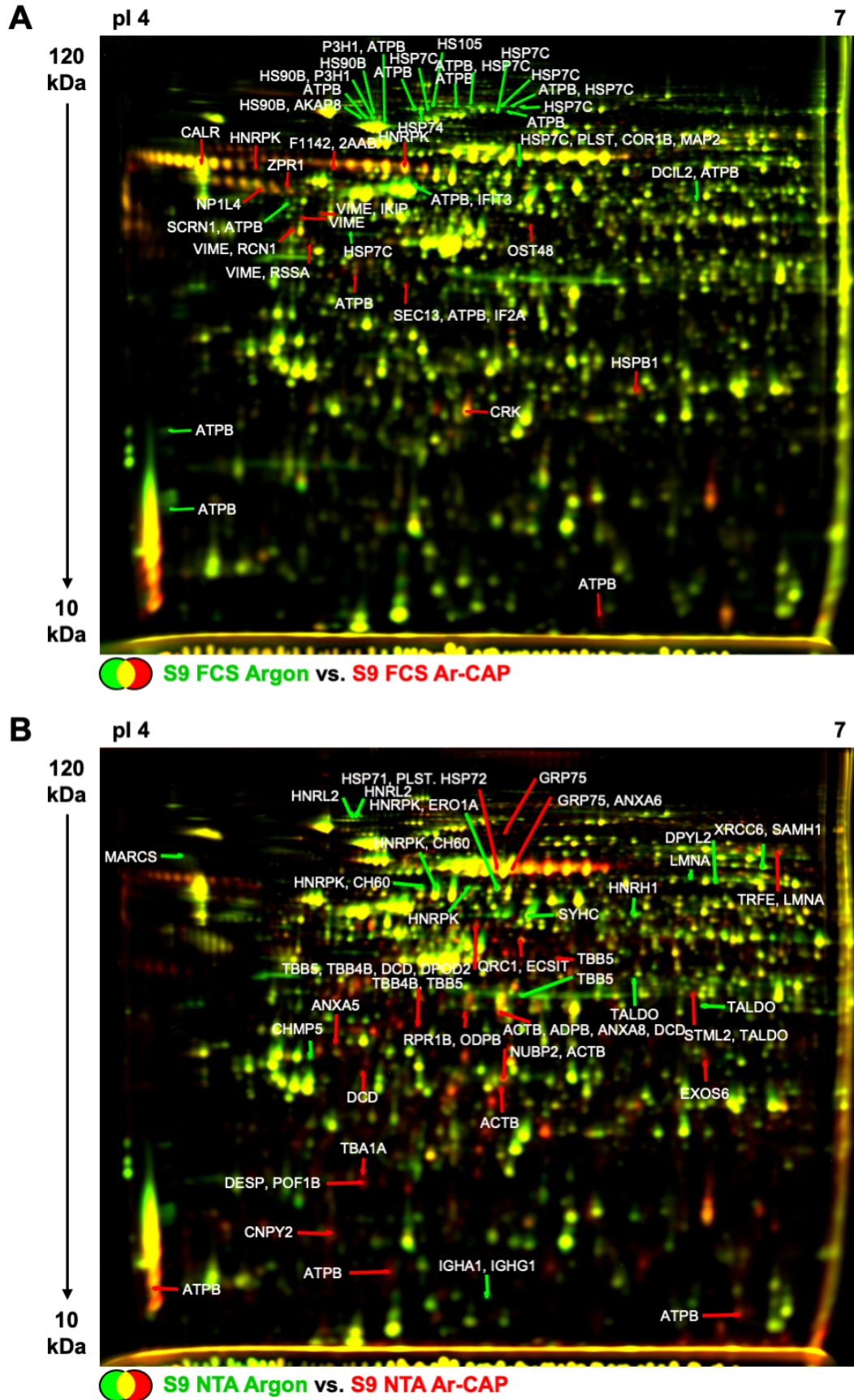


Abbildung 43: Darstellung identifizierter Proteinspots mittels UniProt-ID auf Overlays von S9-Epithelzellen nach Behandlung mit Ar-CAP in Delta 2D. Rot markierte Spots sind in den CAP-behandelten Proben und grün markierte Spots in den korrespondierenden Gaskontrollen vermehrt. In **A** sind die Proteinidentifikationen für S9-Epithelzellen unter FCS und in **B** unter NTA abgebildet.

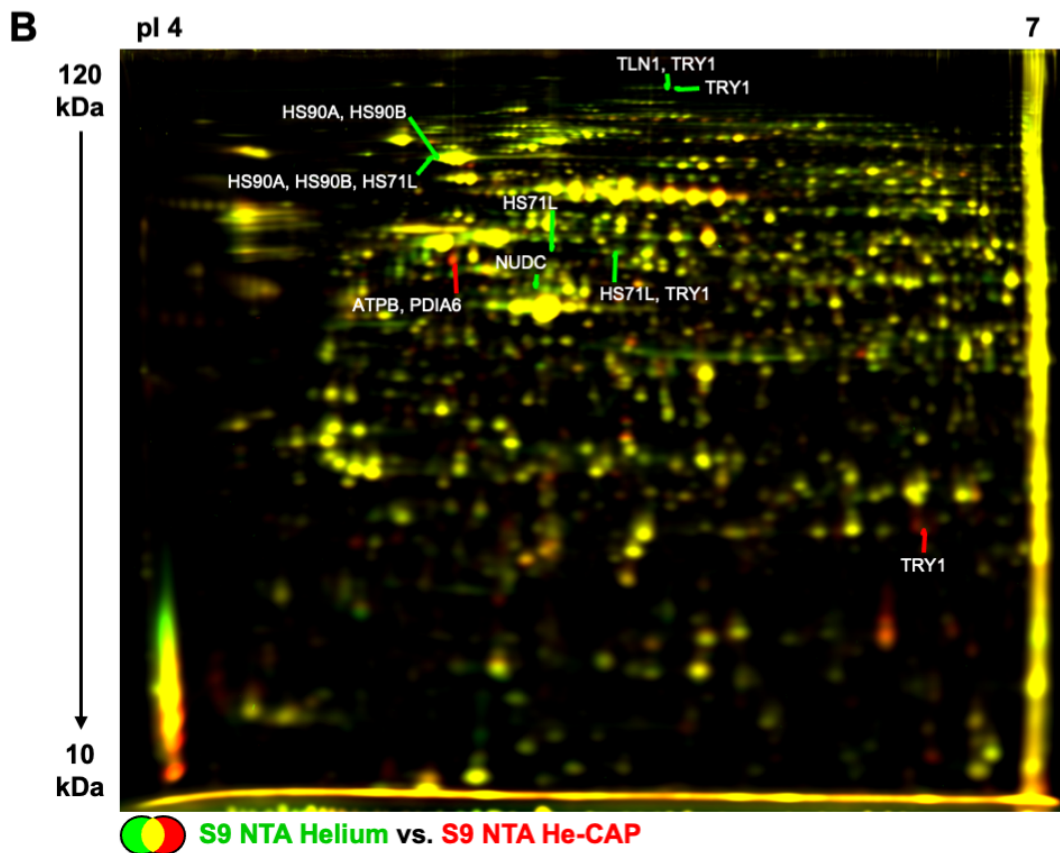
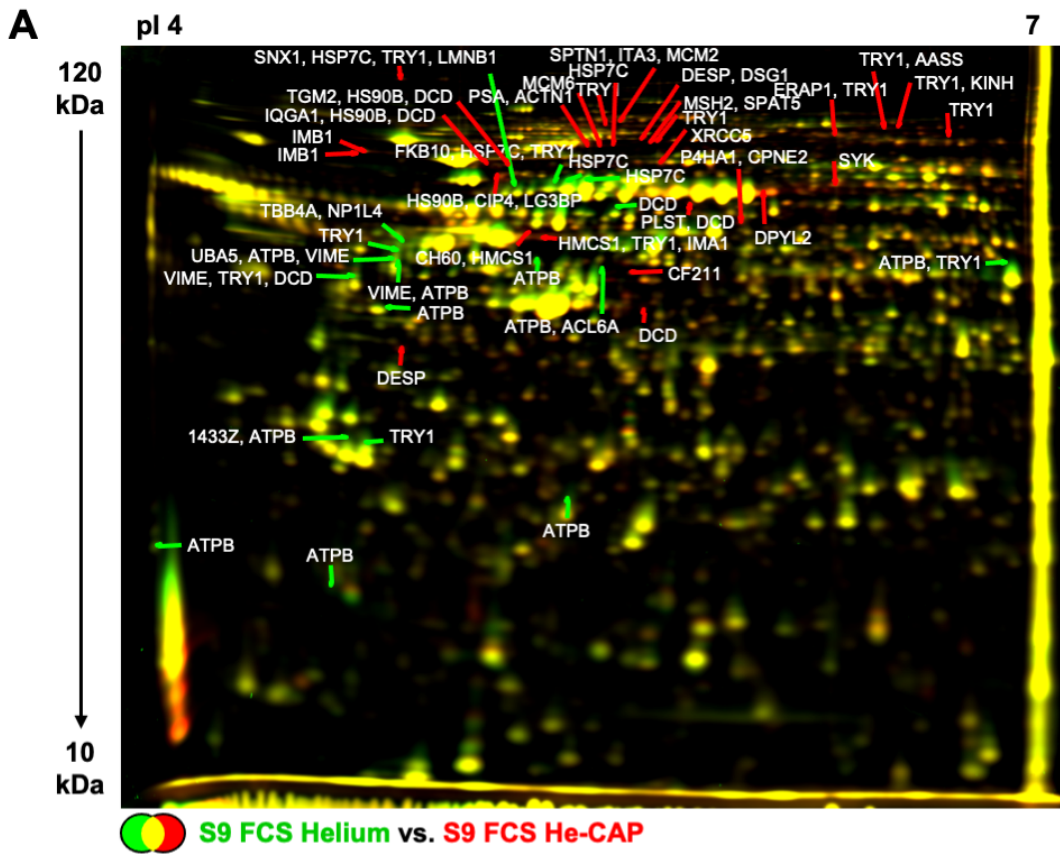


Abbildung 44: Darstellung identifizierter Proteinspots mittels UniProt-ID auf Overlays von S9-Epithelzellen nach Behandlung mit He-CAP in Delta 2D. Rot markierte Spots sind in den CAP-behandelten Proben und grün markierte Spots in den korrespondierenden Gaskontrollen vermehrt. In A sind die Proteinidentifikationen für S9-Epithelzellen unter FCS und in B unter NTA abgebildet.

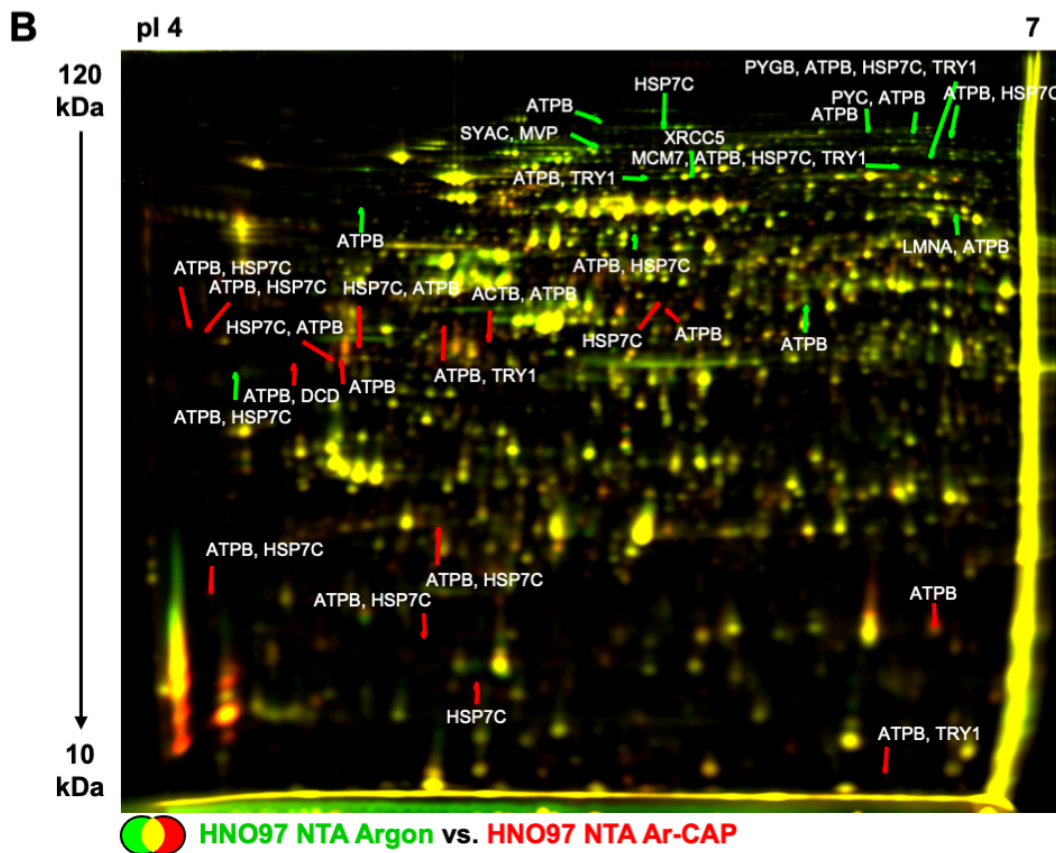
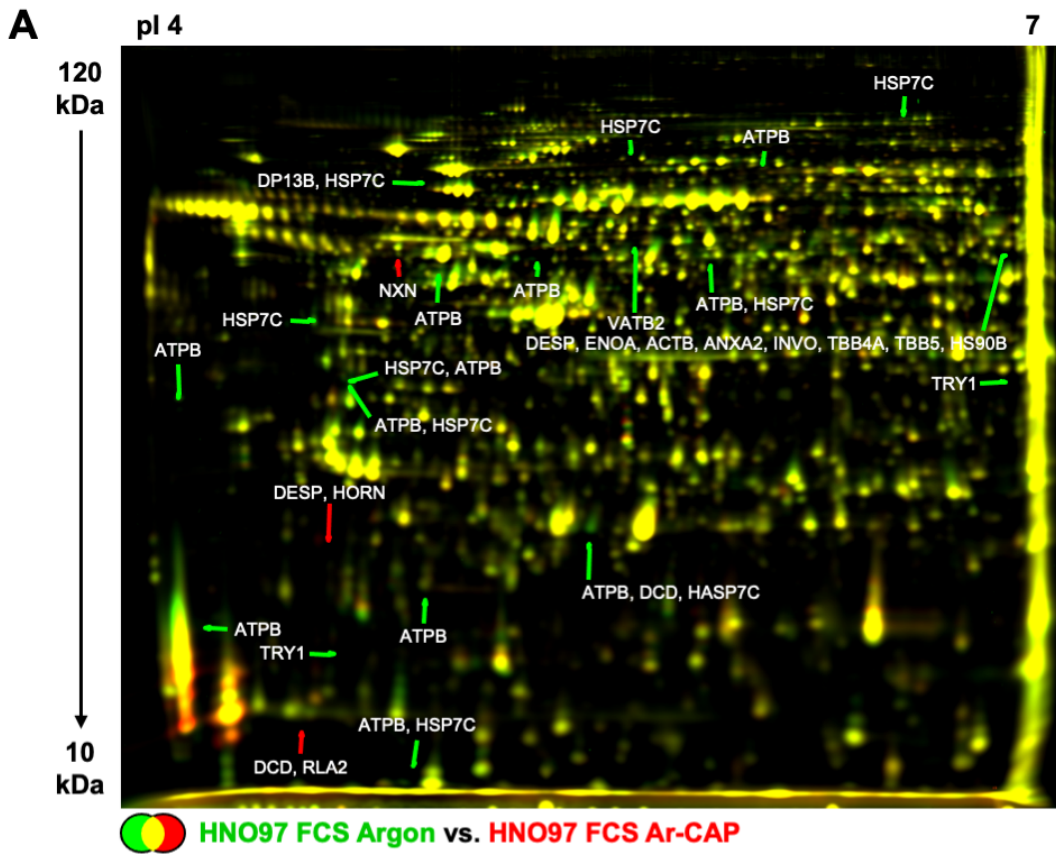


Abbildung 45: Darstellung identifizierter Proteinspots mittels UniProt-ID auf Overlays von HNO97-Karzinomzellen nach Behandlung mit Ar-CAP in Delta 2D. Rot markierte Spots sind in den CAP-behandelten Proben und grün markierte Spots in den korrespondierenden Gaskontrollen vermehrt. In A sind die Proteinidentifikationen für HNO97-Karzinomzellen unter FCS und in B unter NTA abgebildet.

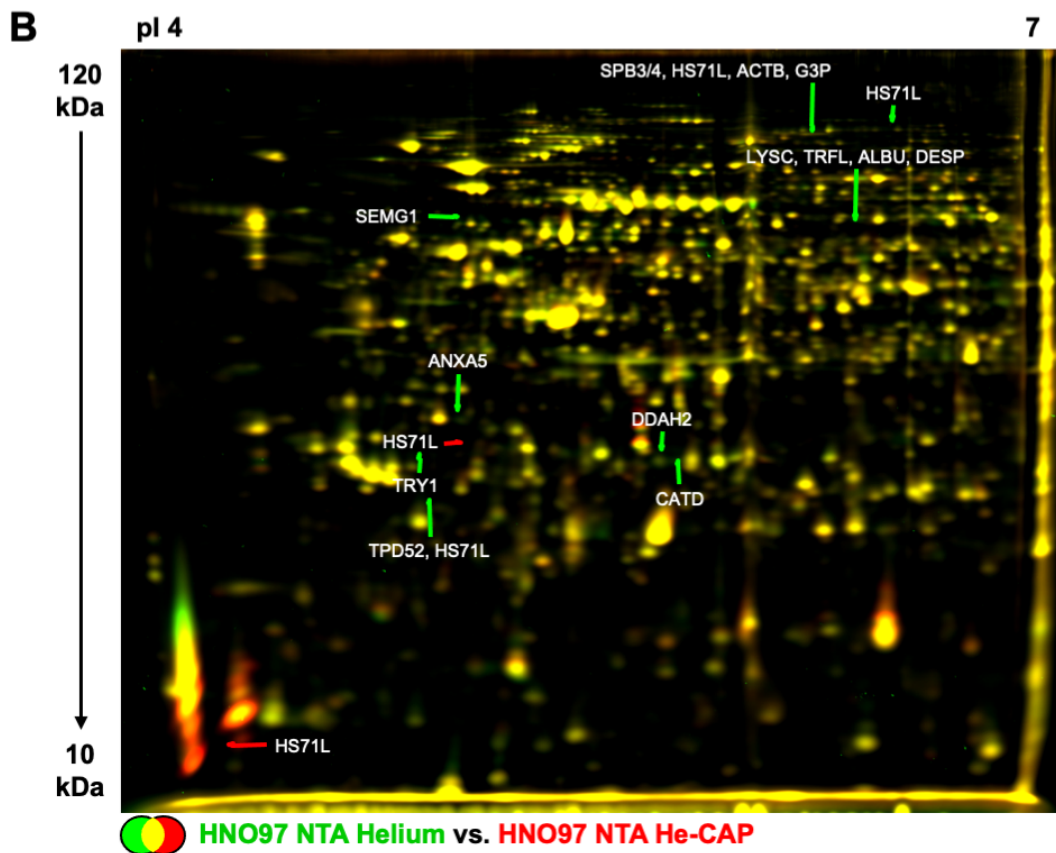
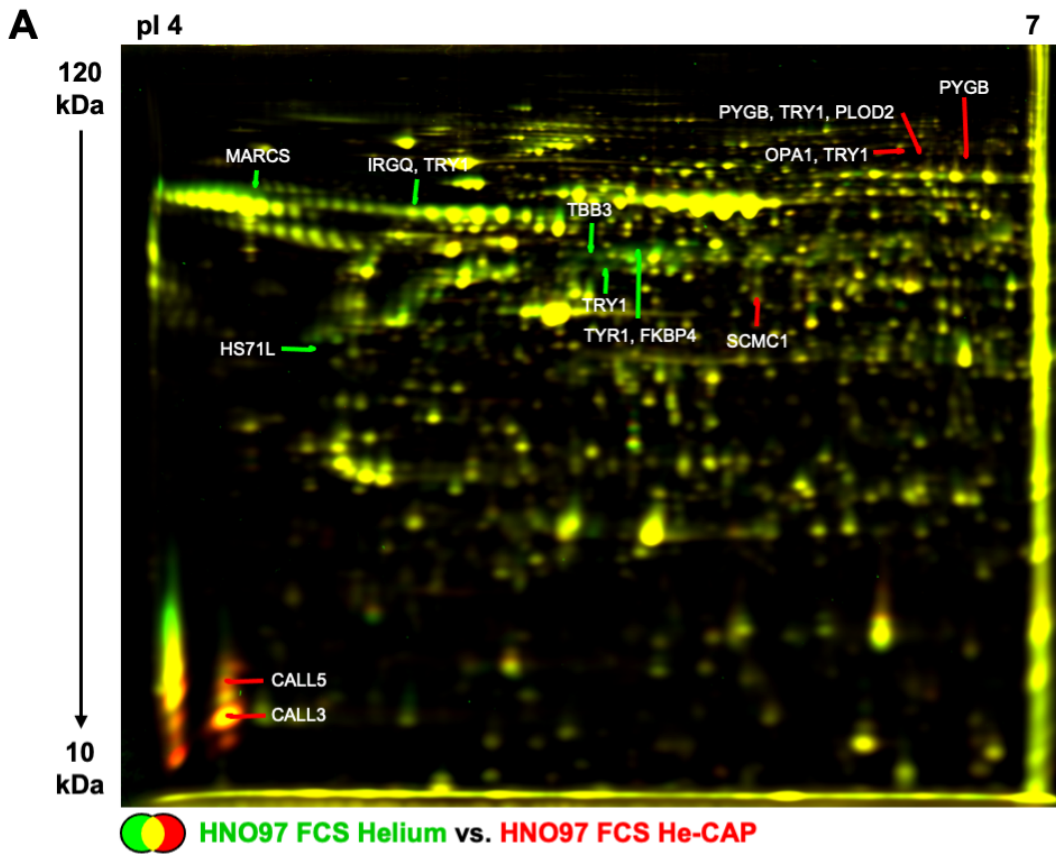


Abbildung 46: Darstellung identifizierter Proteinspots mittels UniProt-ID auf Overlays von HNO97-Karzinomzellen nach Behandlung mit He-CAP in Delta 2D. Rot markierte Spots sind in den CAP-behandelten Proben und grün markierte Spots in den korrespondierenden Gaskontrollen vermehrt. In A sind die Proteinidentifikationen für HNO97-Karzinomzellen unter FCS und in B unter NTA abgebildet.

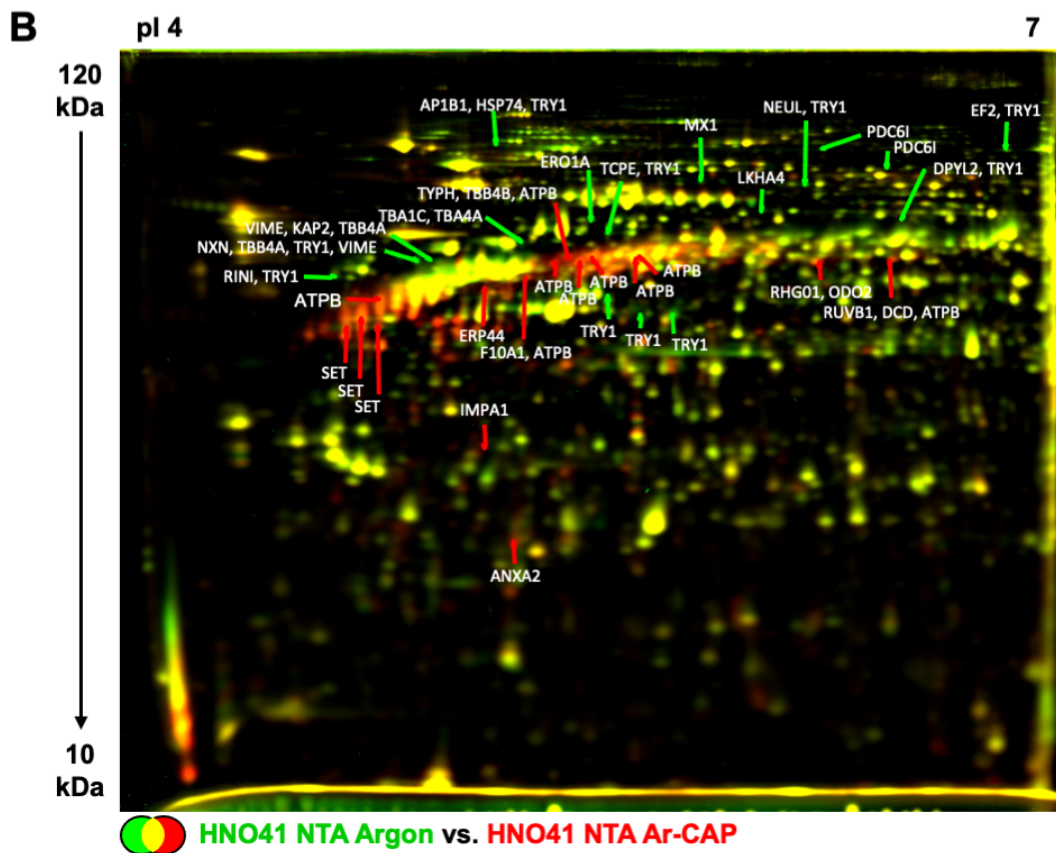
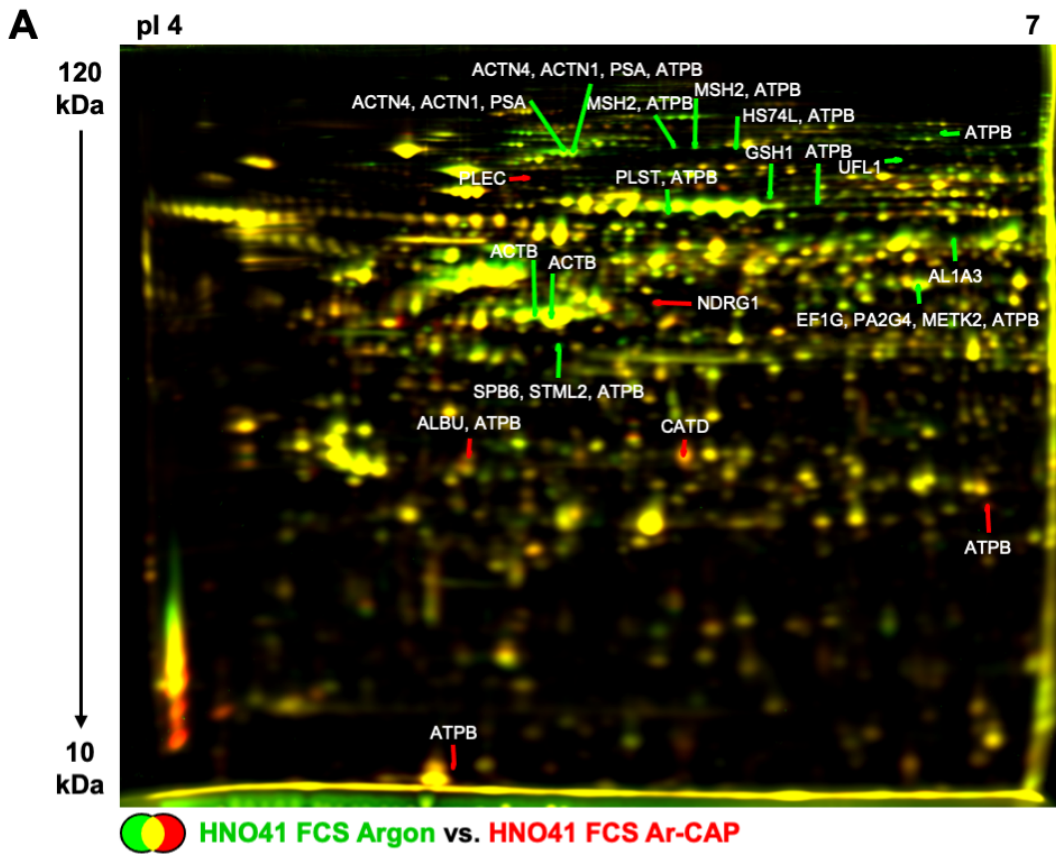


Abbildung 47: Darstellung identifizierter Proteinspots mittels UniProt-ID auf Overlays von HNO41-Karzinomzellen nach Behandlung mit Ar-CAP in Delta 2D. Rot markierte Spots sind in den CAP-behandelten Proben und grün markierte Spots in den korrespondierenden Gaskontrollen vermehrt. In A sind die Proteinidentifikationen für HNO97-Karzinomzellen unter FCS und in B unter NTA abgebildet.

9.2 IPA-Netzwerke von S9-, HNO97- und HNO41-Zellen

9.2.1 IPA-Netzwerke von S9-Epithelzellen

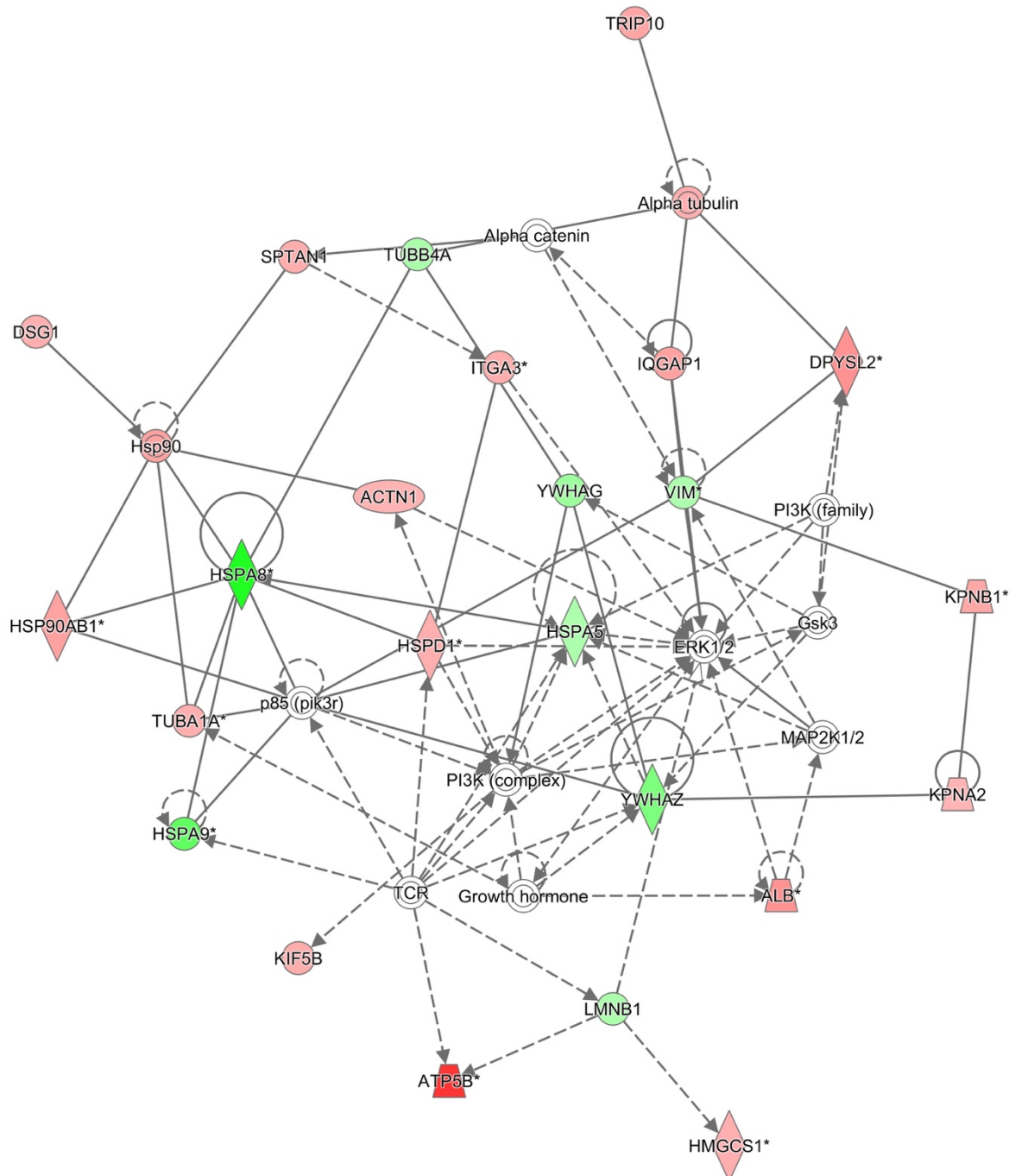


Abbildung 48: Netzwerk von S9-Epithelzellen nach Behandlung mit Heliumplasma und Kultivierung mit FCS.

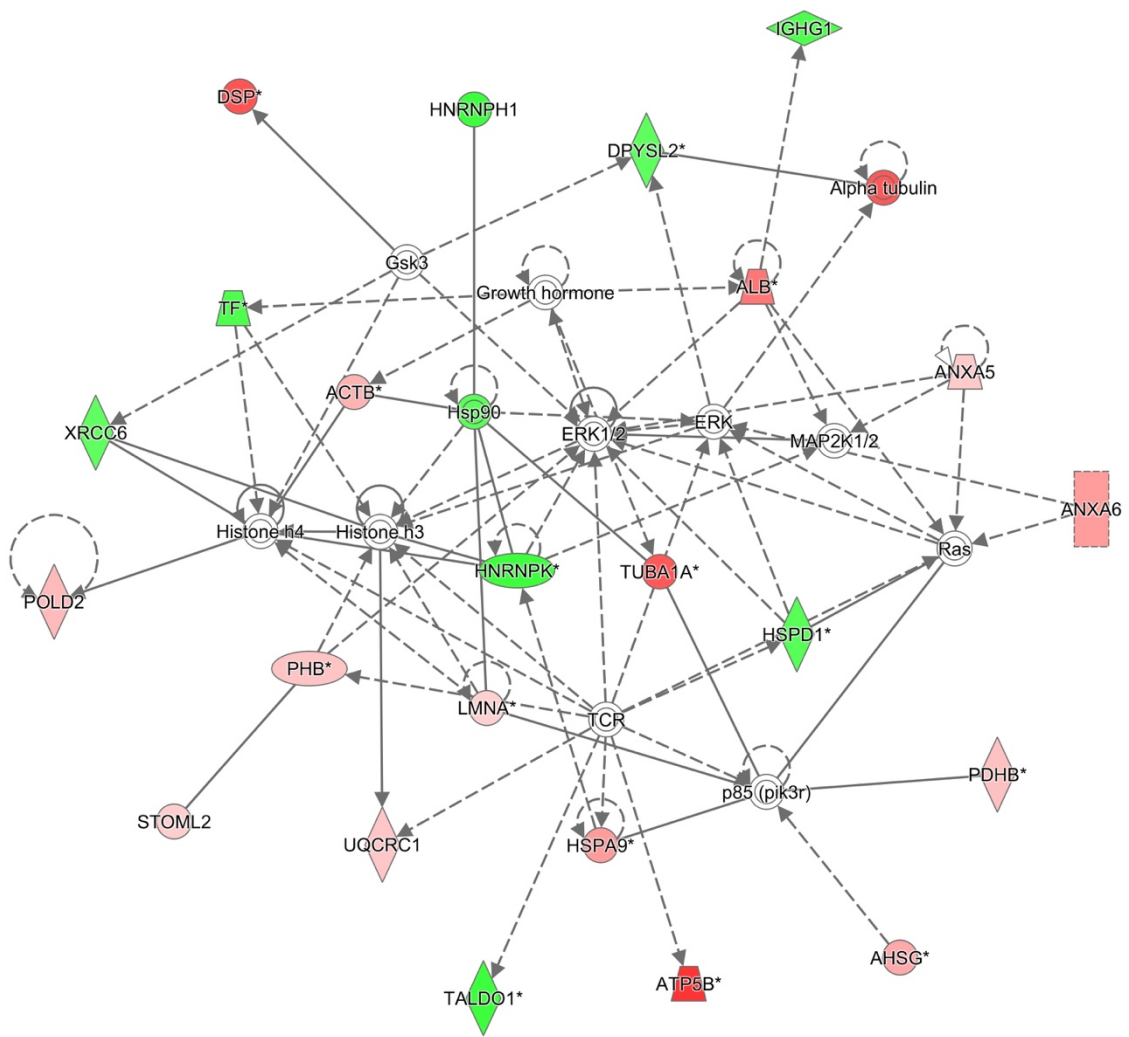


Abbildung 49: Netzwerk von S9-Epithelzellen nach Argonplasmabehandlung und Kultivierung mit NTA.

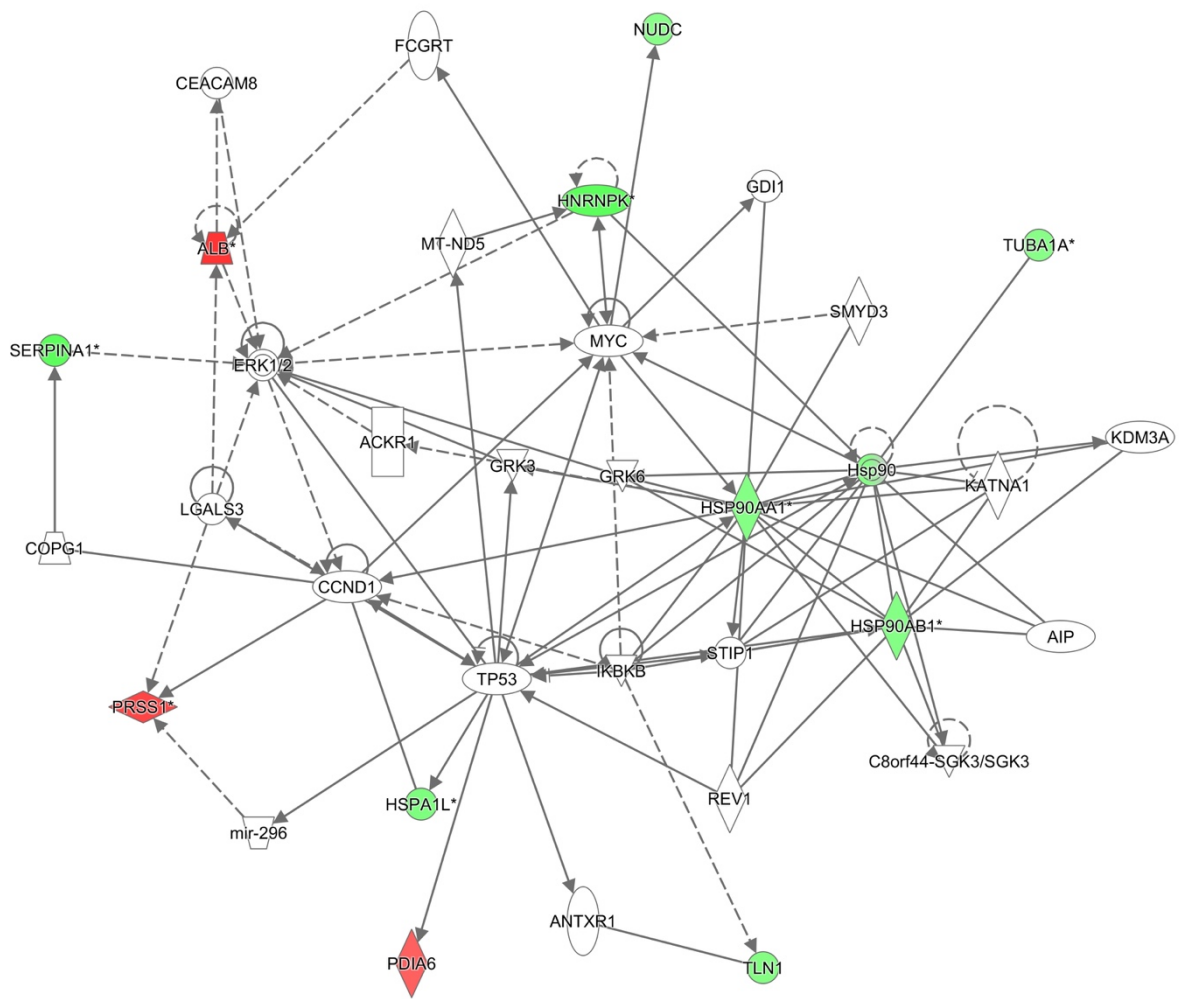


Abbildung 50: Netzwerk von S9-Epithelzellen nach Heliumplasmabehandlung und Kultivierung mit NTA.

9.2.2 IPA-Netzwerke von HNO97-Karzinomzellen

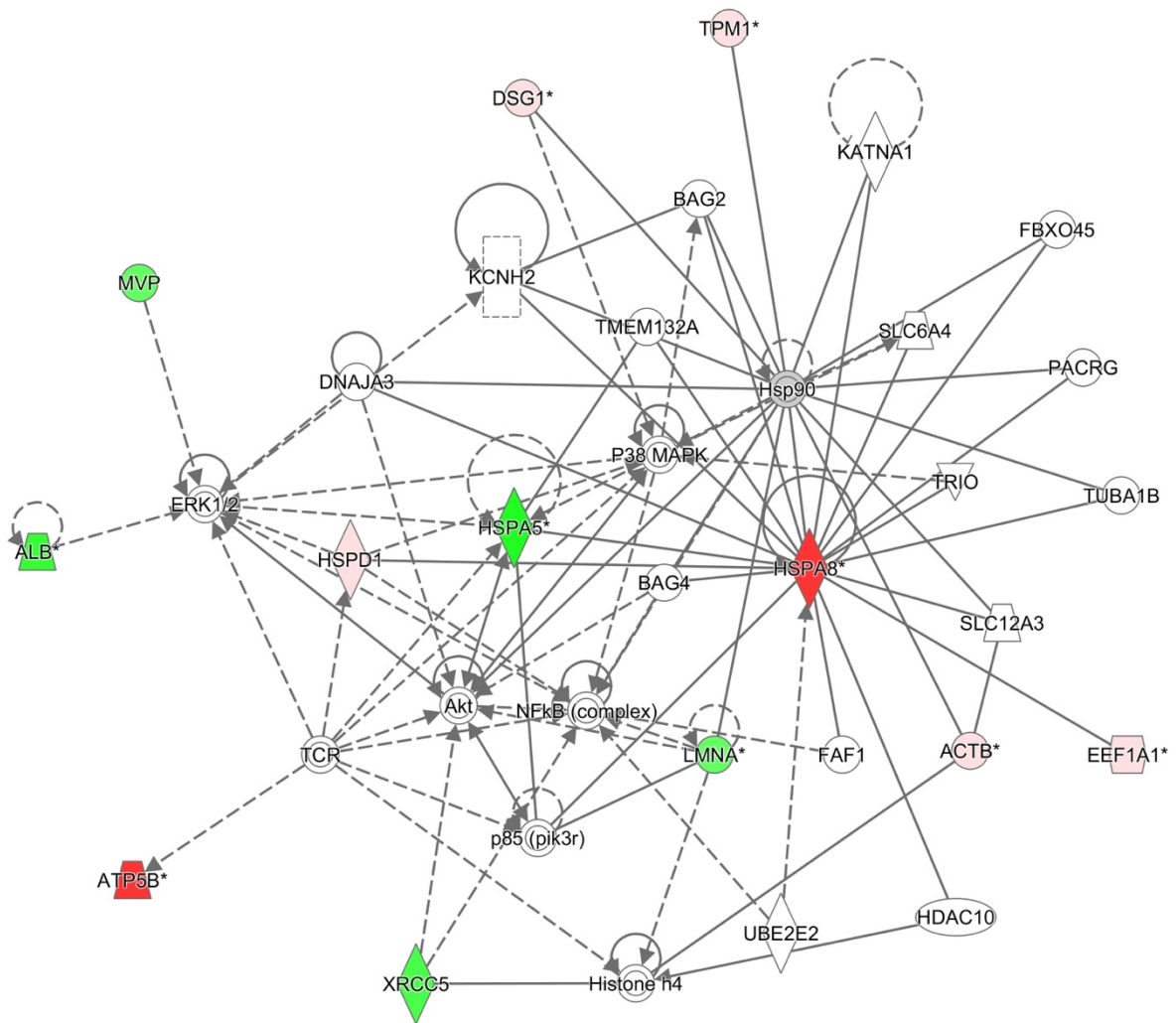


Abbildung 51: Netzwerk von HNO97-Karzinomzellen nach Heliumplasmabehandlung und Kultivierung mit FCS.

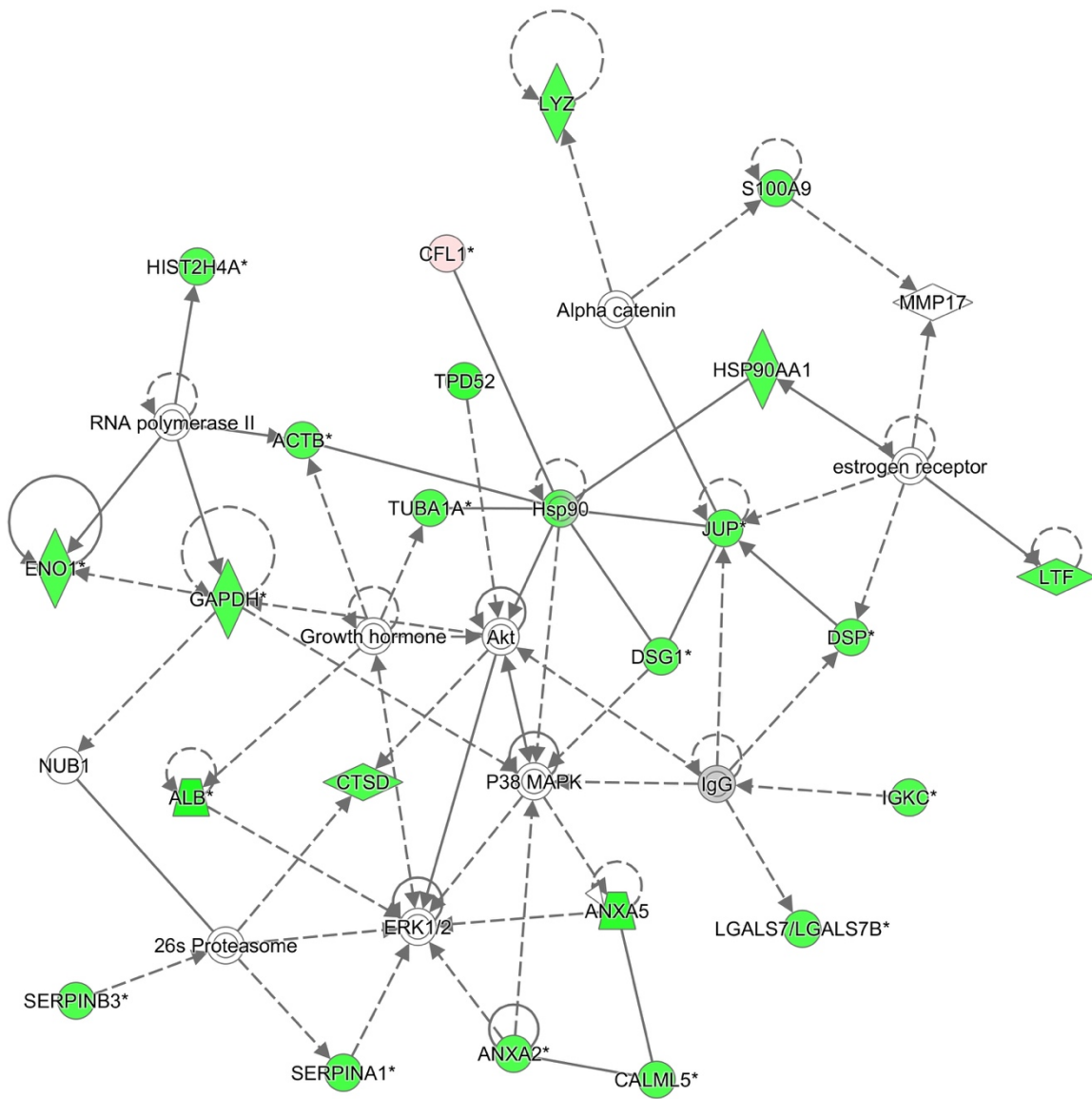


Abbildung 52: Netzwerk von HNO97-Karzinomzellen nach Behandlung mit Heliumplasma und Kultivierung mit NTA.

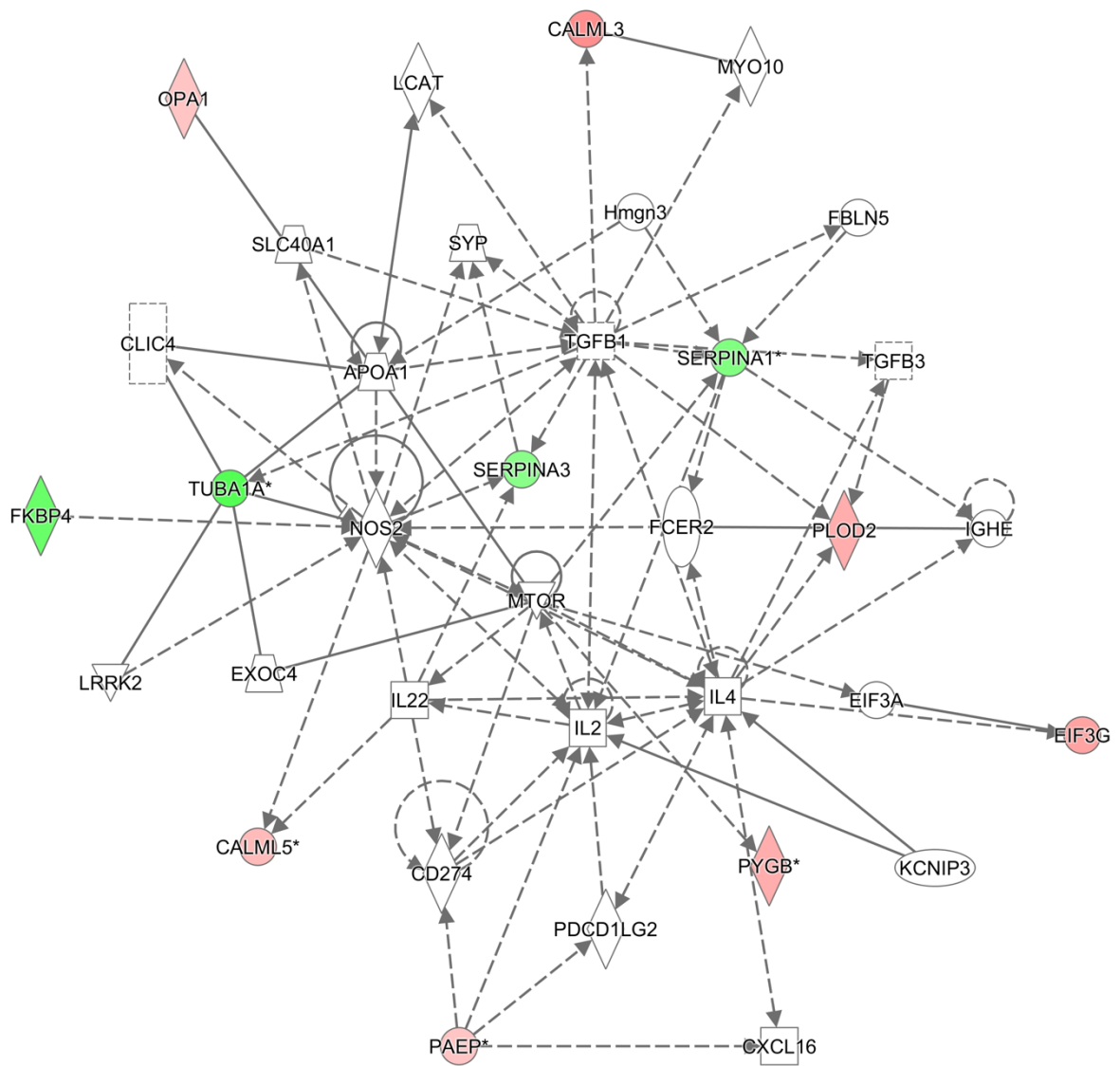


Abbildung 53: Netzwerk von HNO97-Karzinomzellen nach Argonplasmabehandlung und Kultivierung mit NTA.

9.2.3 IPA-Netzwerke von HNO41-Karzinomzelle

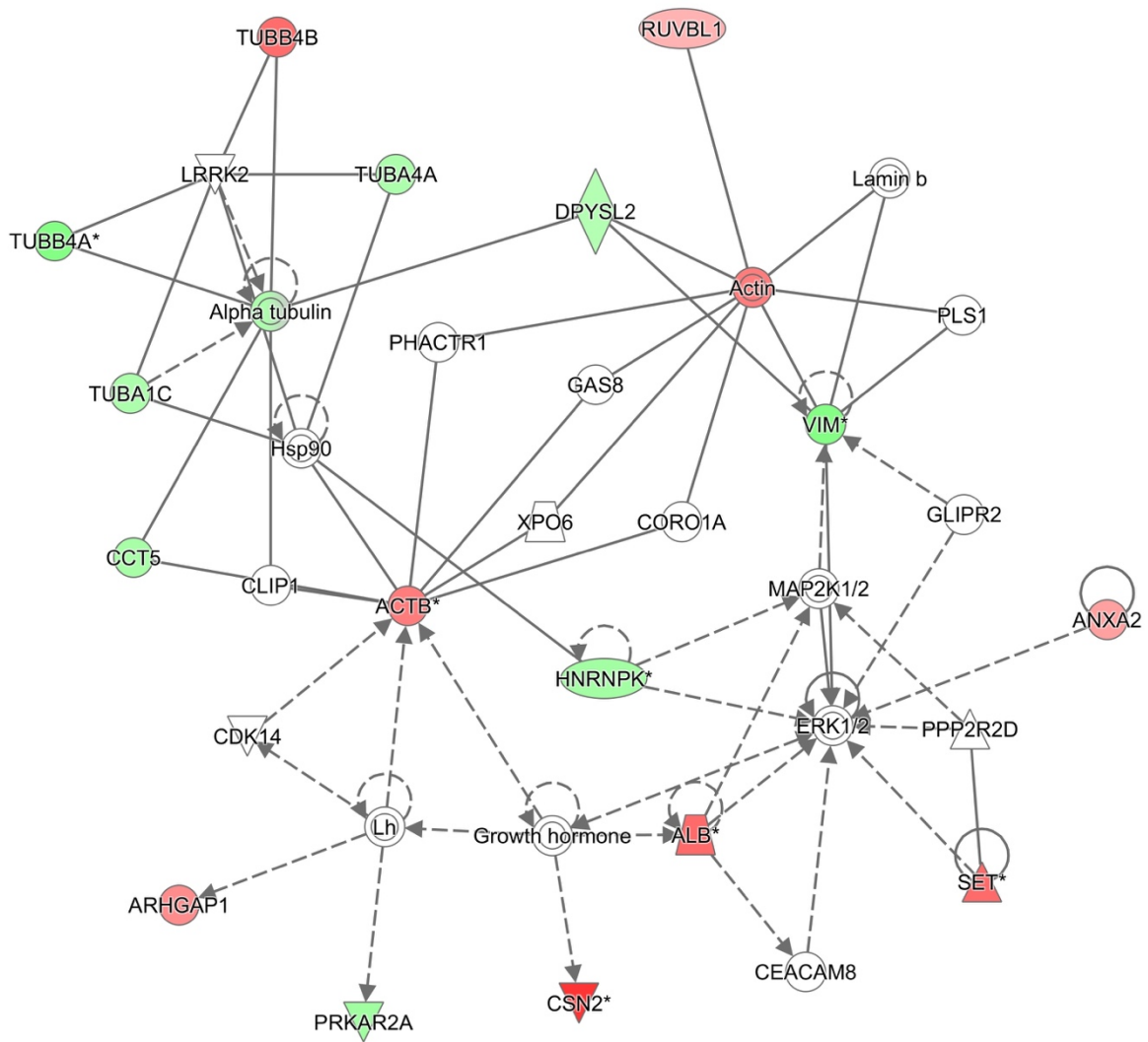


Abbildung 54: Netzwerk von HNO41-Karzinomzellen nach Behandlung mit Argonplasma und Kultivierung mit NTA.

9.3 PCA aller Zelllinien, Kombination aller Komponenten

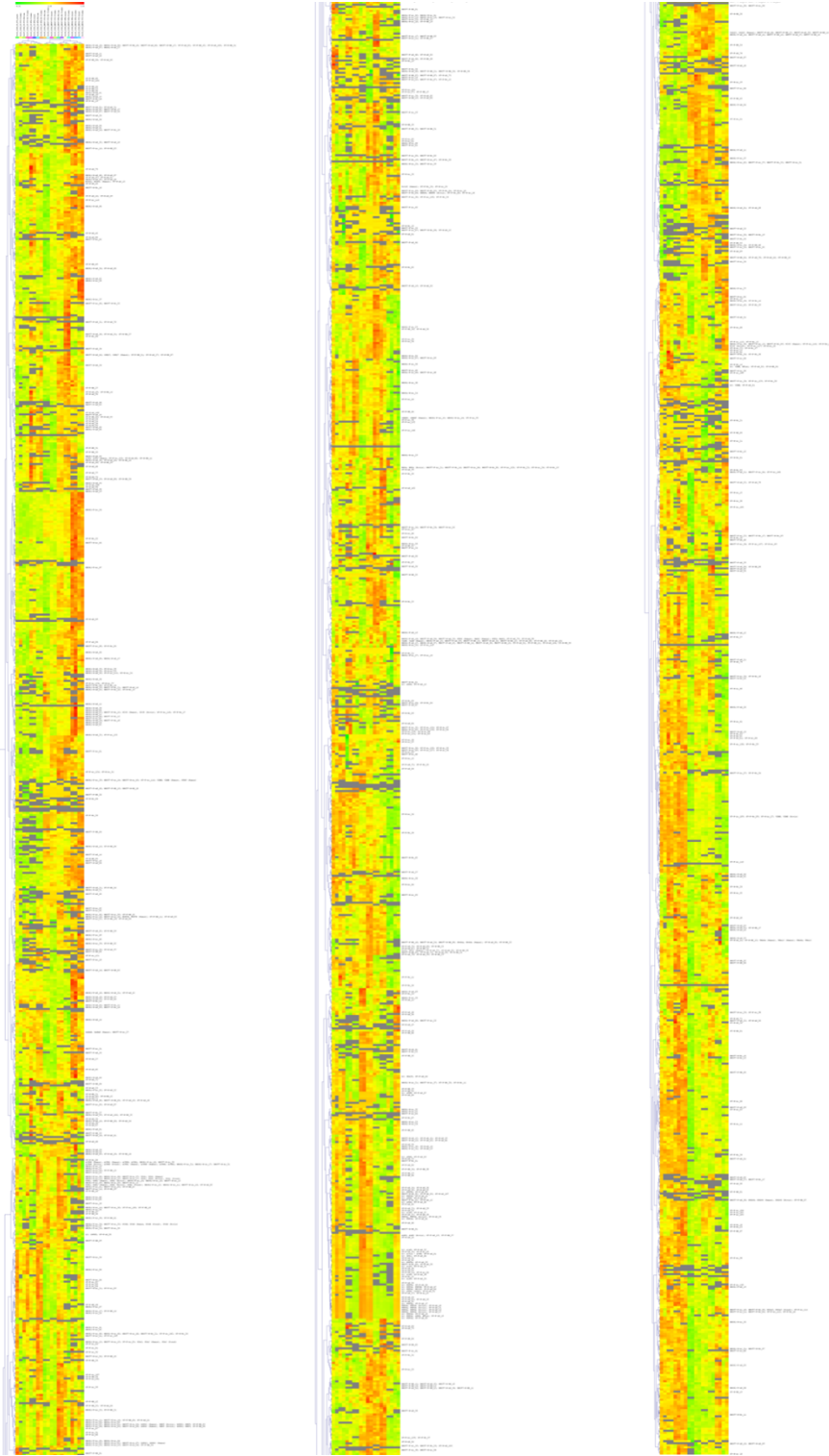


Abbildung 55: Euklidisches Cluster der PCA. Durchgehende Säule zerlegt in 3 Abschnitte zur größeren Darstellung. Betrachtung nacheinander von Säule 1 bis Säule 3.

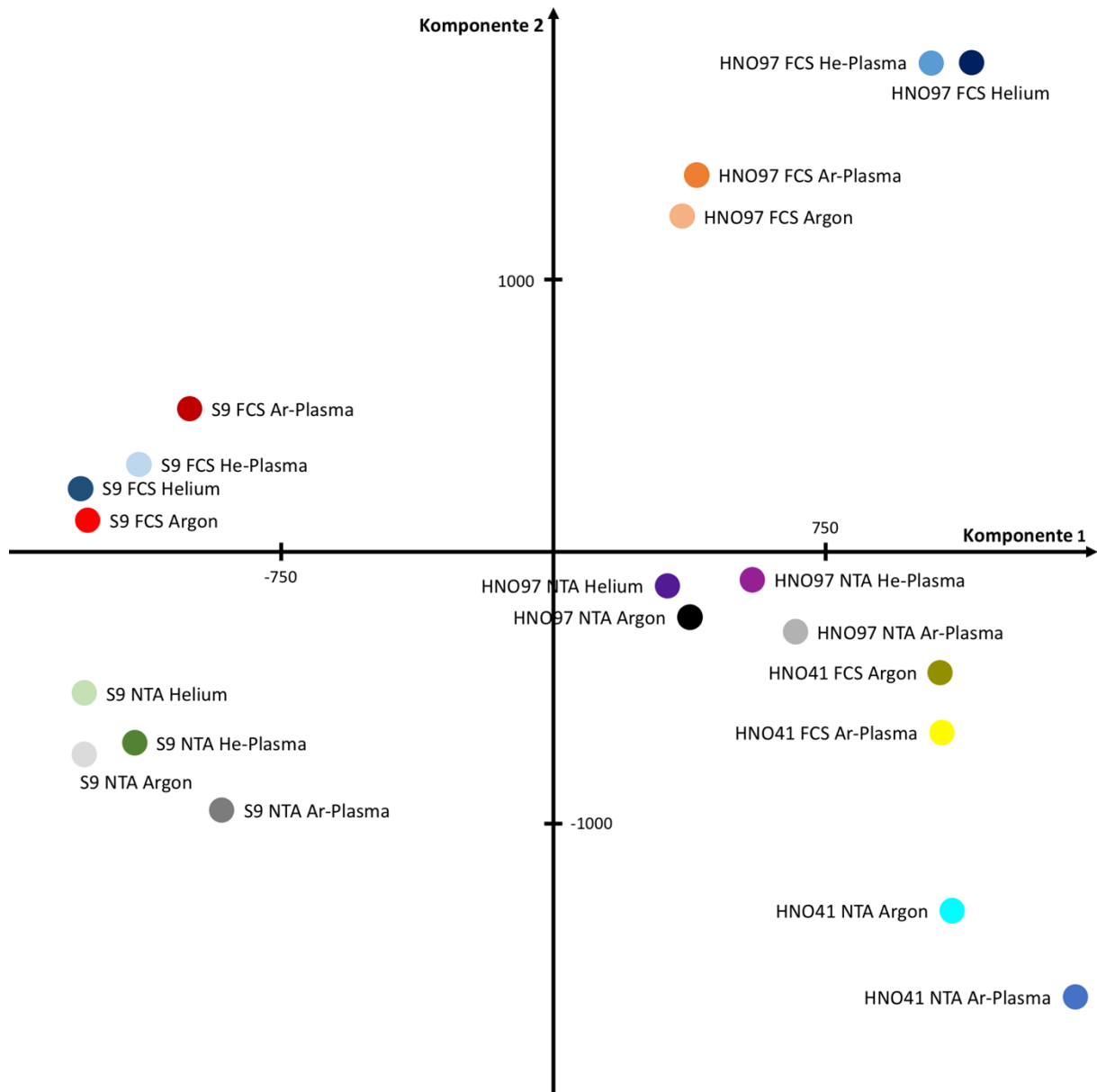


Abbildung 56: PCA aller Zelllinien mit Auftragung von Komponente 1 gegen Komponente 2. Komponente 1 trennte die Proben nach Epithelzellen und Karzinomzellen. Komponente 2 trennt die Proben nach verwendetem Serum.



Abbildung 57: PCA aller Zelllinien mit Auftragung der Komponente 1 gegen Komponente 3. Komponente 1 trennte die Proben nach Epithelzellen und Karzinomzellen. Komponente 3 trennt die Proben nach verwendetem Plasma.

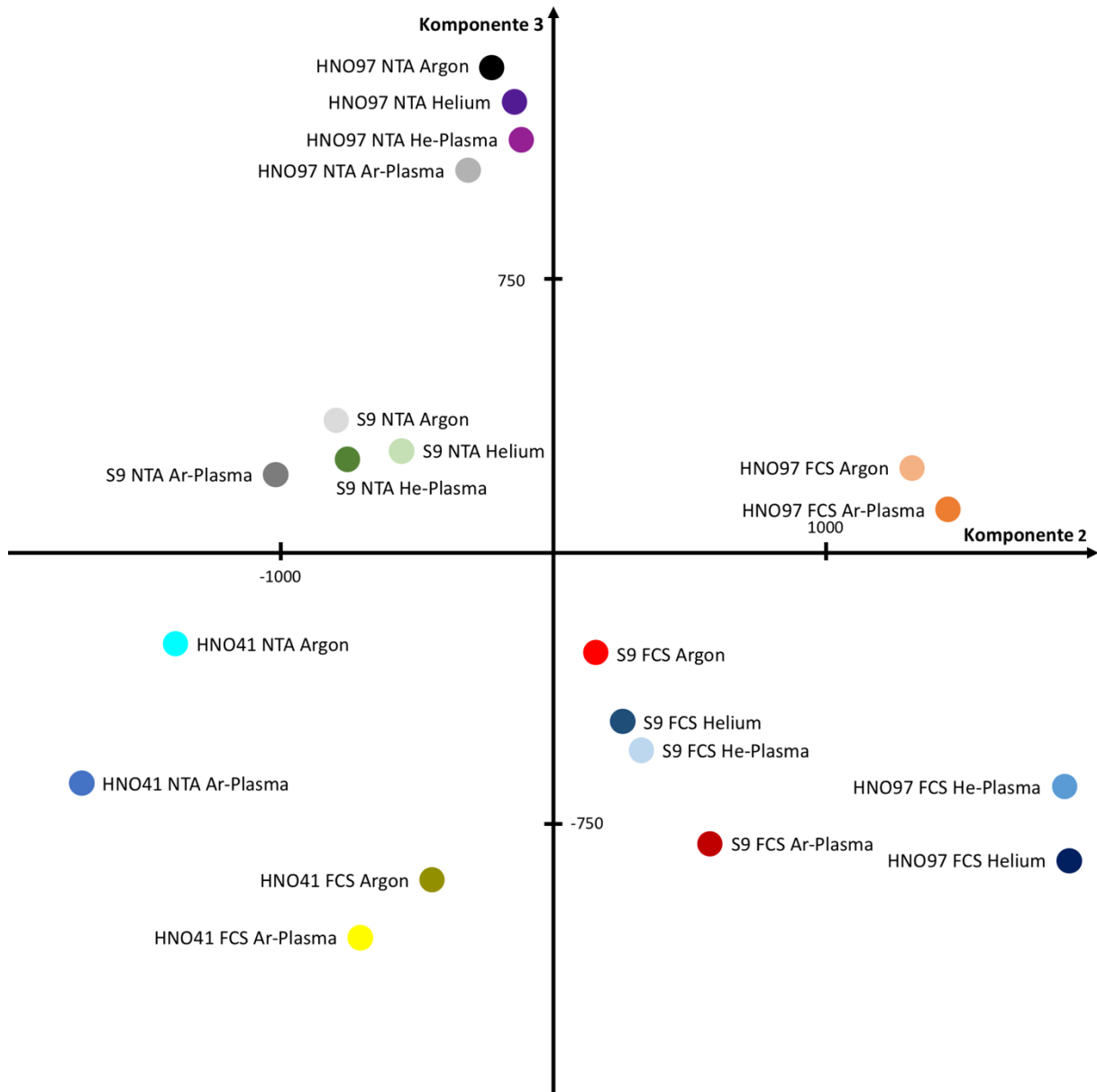


Abbildung 58: PCA aller Zelllinien mit Auftragung der Komponente 2 gegen Komponente 3. Komponente 2 trennte die Proben FCS und NTA auf. Die Komponente 3 trennt die Proben nach verwendetem Gas.

9.3.1 PCA von S9-Epithelzellen

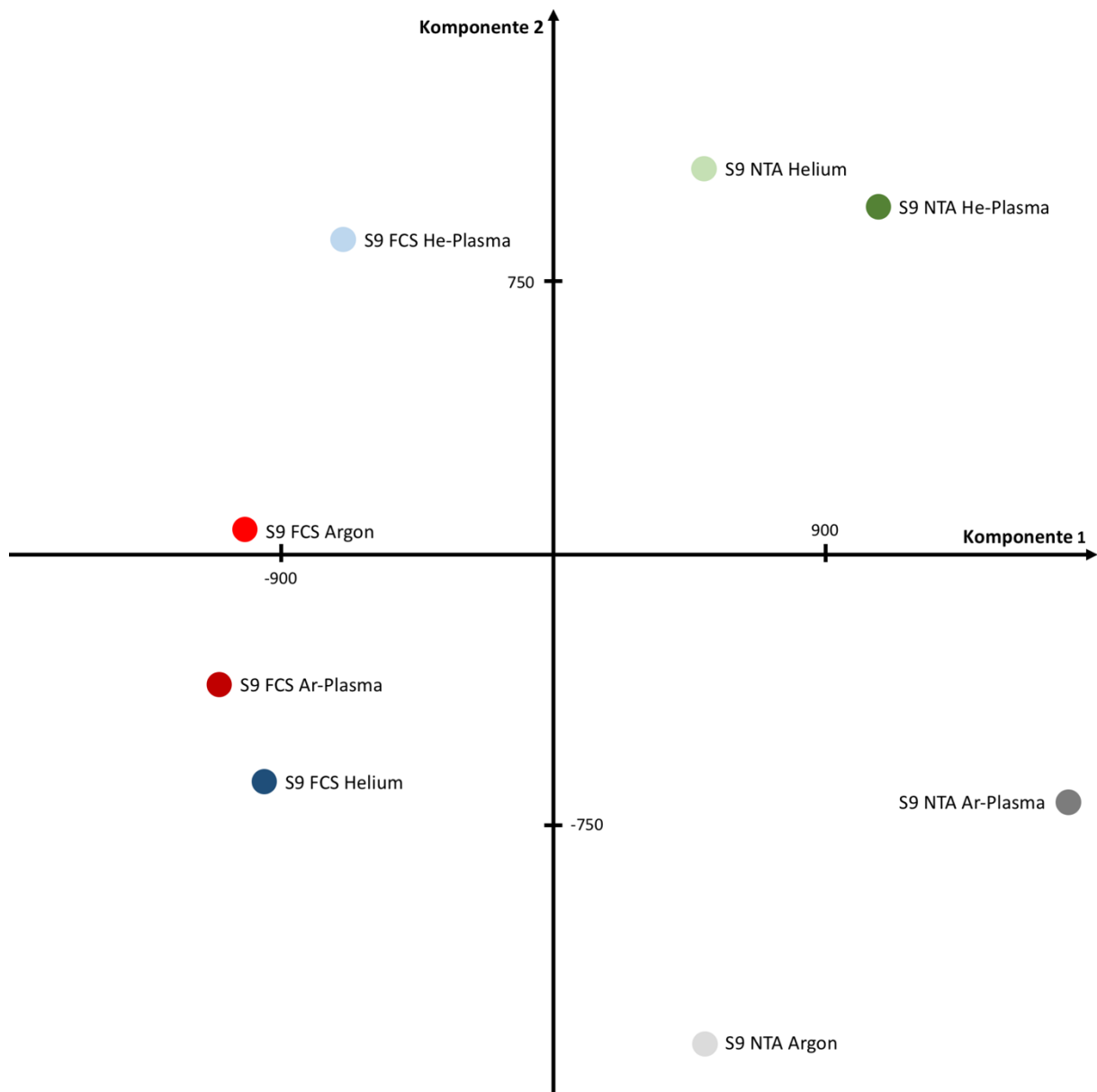


Abbildung 59: PCA von S9-Epithelzellen mit Auftragung der Komponente 1 gegen Komponente 2. Die Komponente 1 trennt die Proben der S9-Epithelzellen nach Serum auf (FCS negativ, NTA positiv). Komponente 2 teilt die Proben nach verwendetem Gas. Dabei bildet die Kontrolle „S9 FCS Helium“ eine Ausnahme.

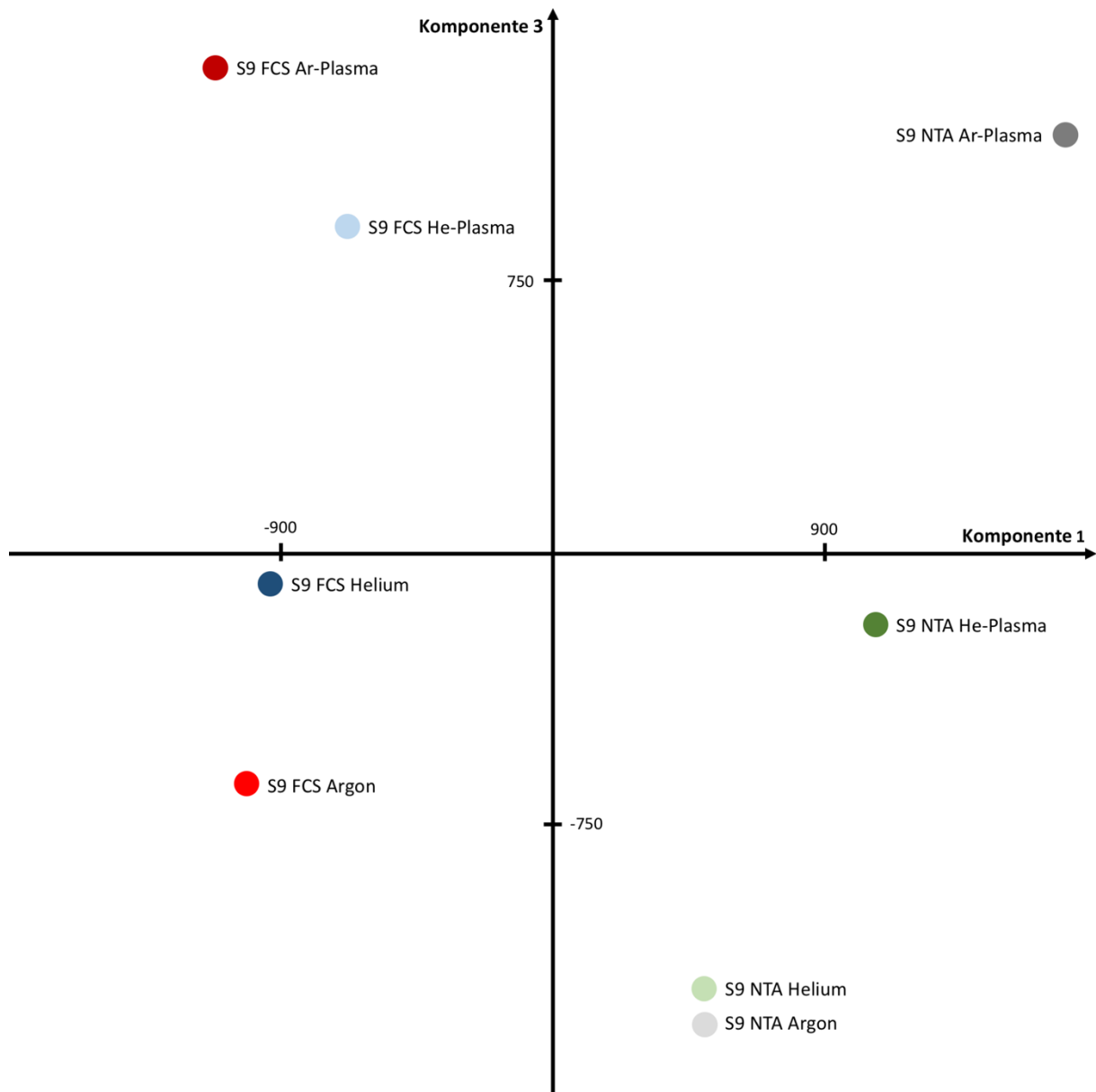


Abbildung 60: PCA von S9-Epithelzellen mit Auftragung der Komponente 1 gegen Komponente 3. Komponente 1 trennt die Proben zwischen FCS und NTA. Komponente 3 differenziert zwischen Kontrollen und plasmabehandelten Proben.

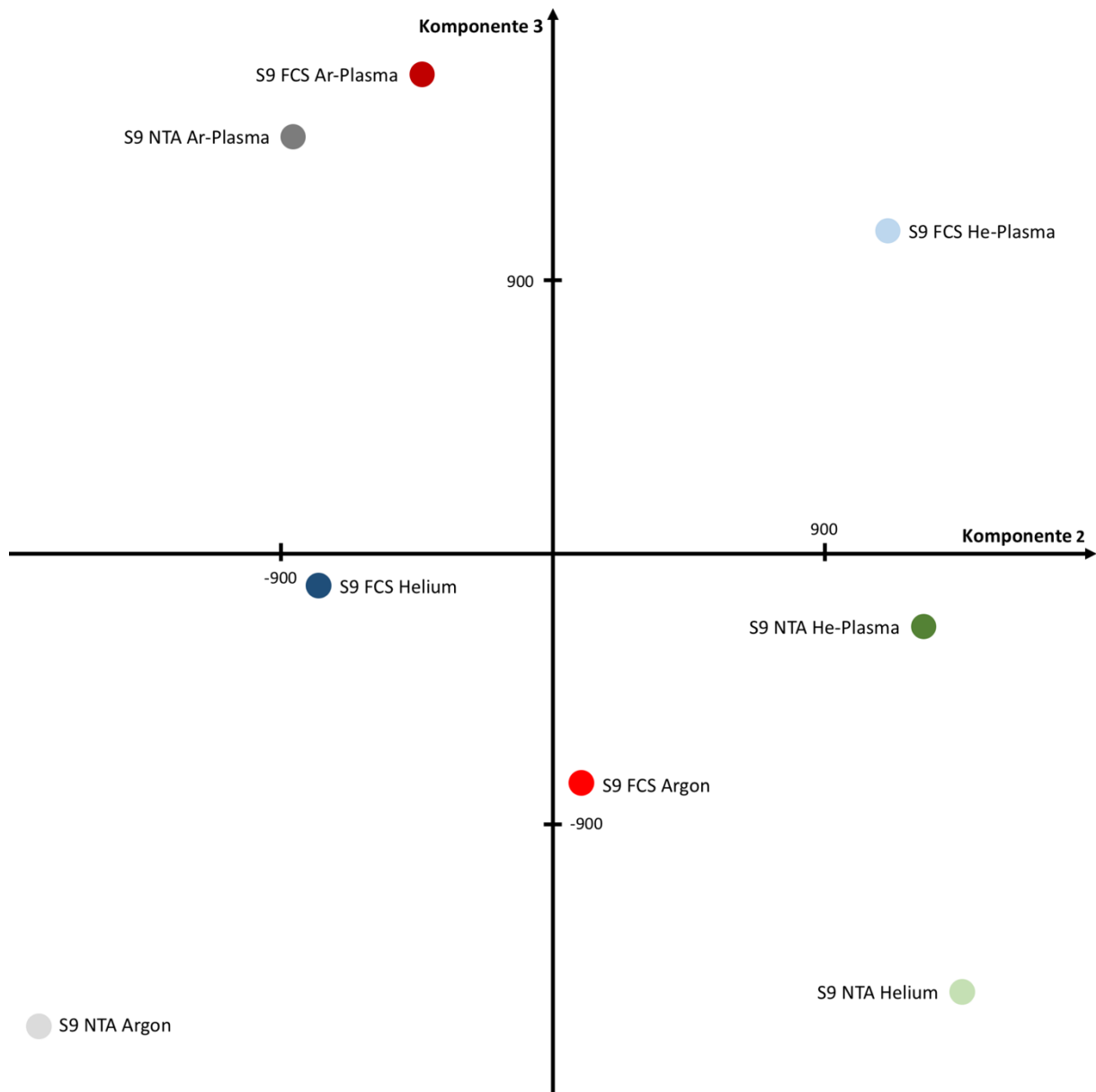


Abbildung 61: PCA von S9-Epithelzellen mit Auftragung der Komponente 2 gegen Komponente 3. Die Komponente 2 trennt die Proben nach verwendetem Gas. Komponente 3 unterscheidet zwischen Kontrolle und Plasmabehandlung

9.3.2 PCA von HNO97-Karzinomzellen

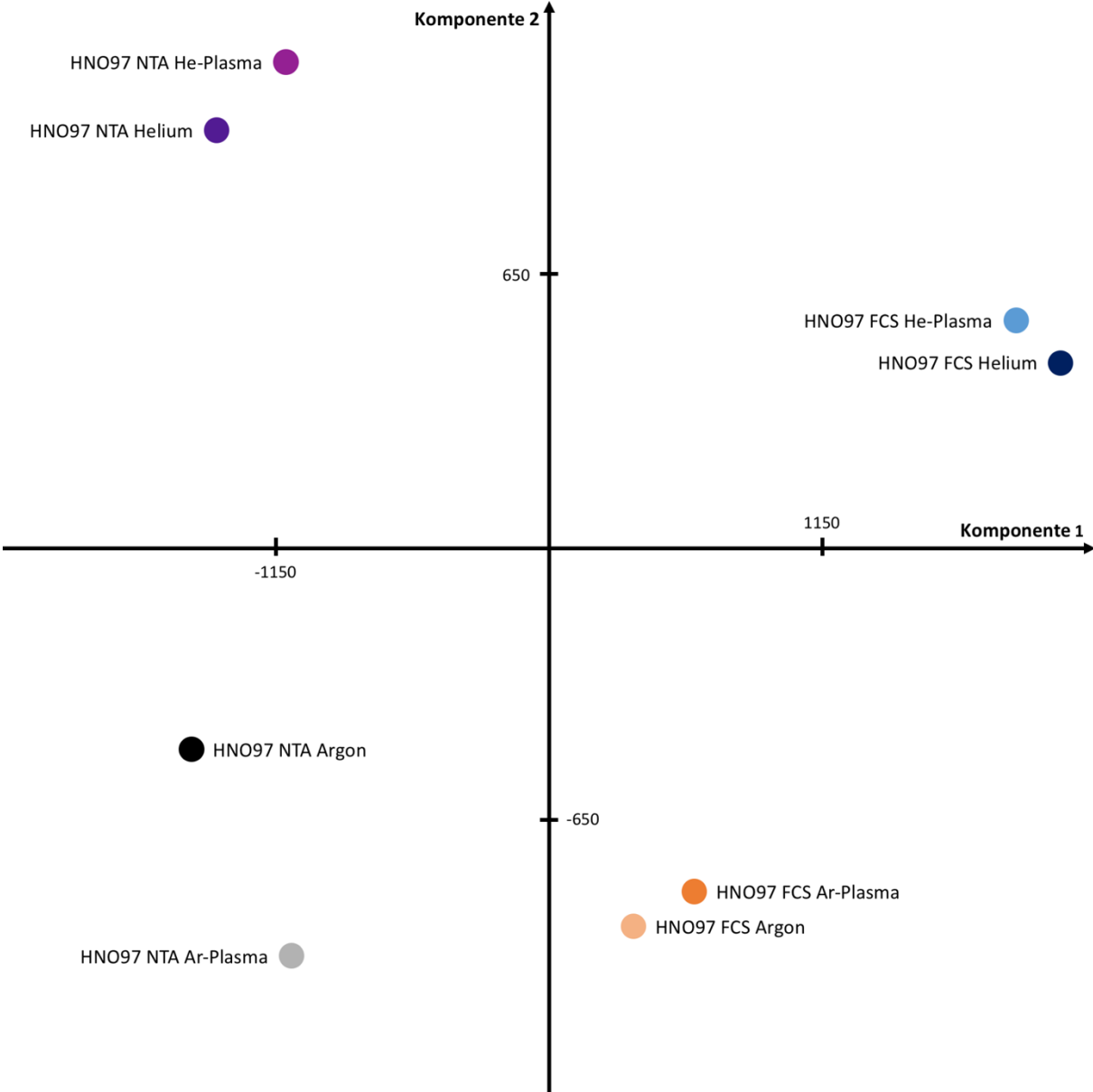


Abbildung 62: PCA von HNO97-Karzinomzellen mit Auftragung der Komponente 1 gegen Komponente 2. Trennung der Proben zwischen NTA und FCS durch die Komponente 1. Die Komponente 2 trennt alle Proben nach verwendetem Gas (Argon negativ, Helium positiv).

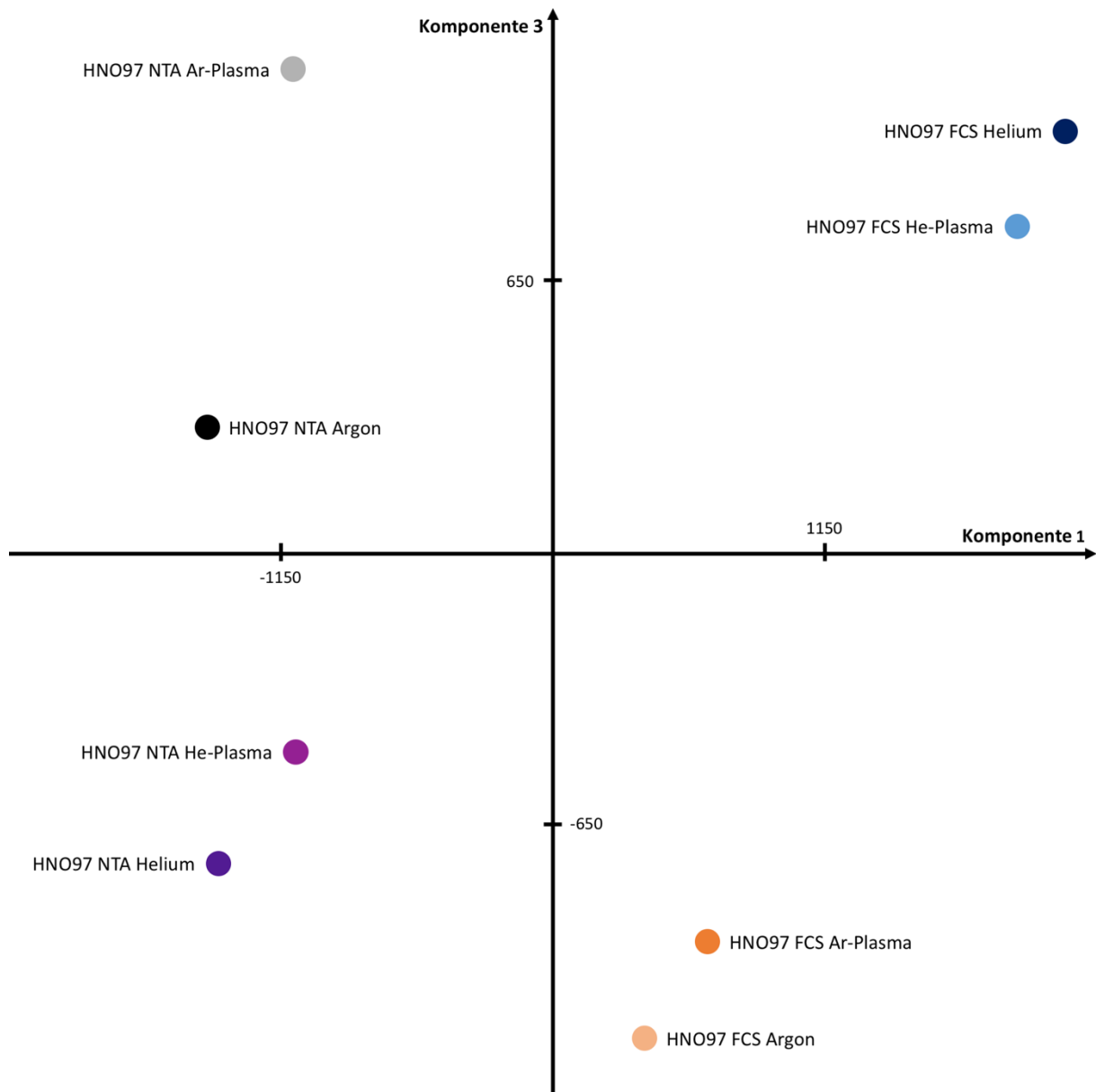


Abbildung 63: PCA von HNO97-Karzinomzellen mit Auftragung der Komponente 1 gegen Komponente 3. Trennung der Proben zwischen NTA und FCS durch die Komponente 1. Die Komponente 3 trennt CAP-behandelte Proben und ihre entsprechenden Gaskontrollen.

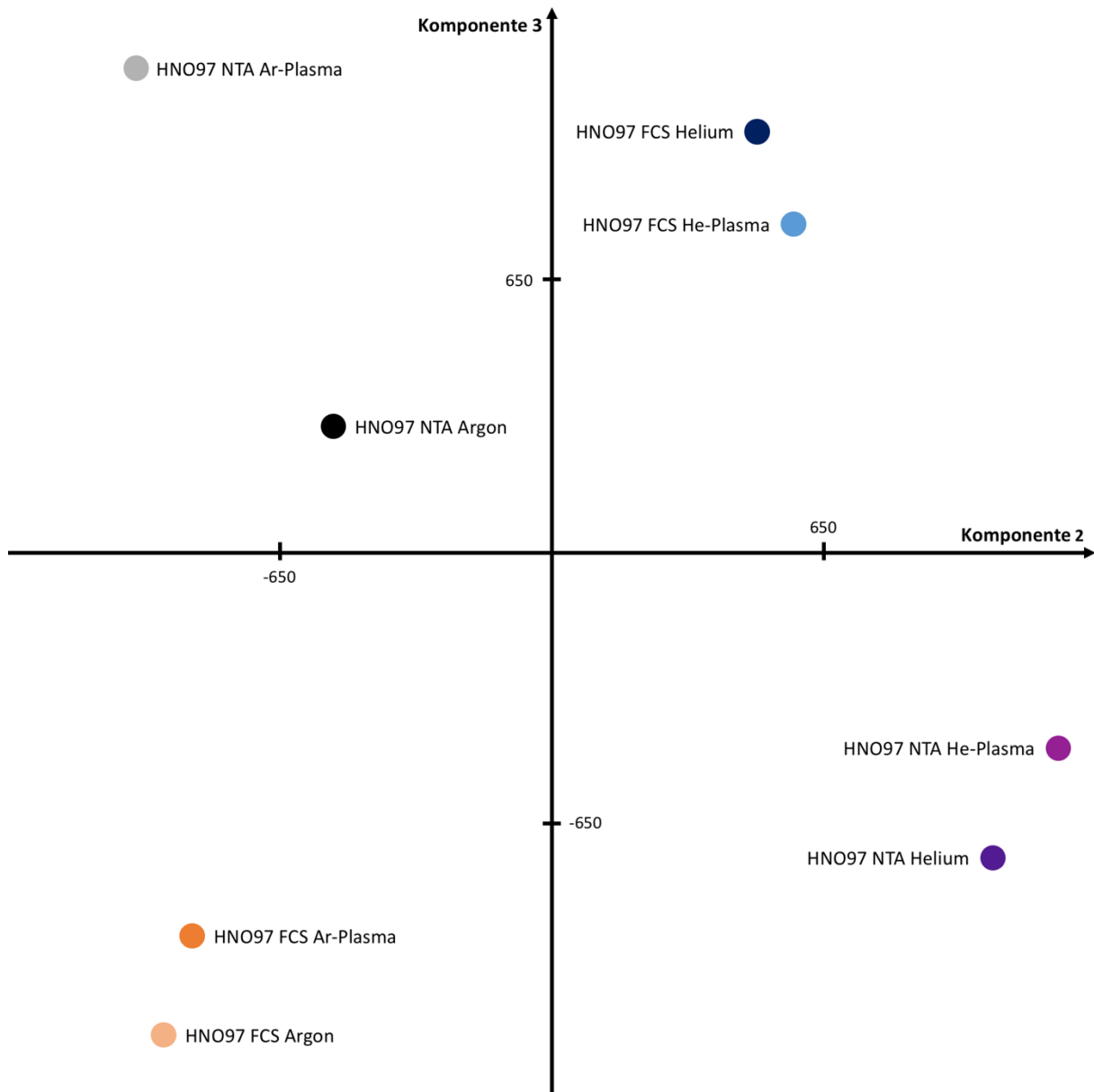


Abbildung 64: PCA von HNO97-Karzinomzellen mit Auftragung der Komponente 2 gegen Komponente 3. Die Komponente 2 trennt die Proben nach verwendetem Gas. Die Komponente 3 differenziert die Proben nach Gasontrollen und CAP-behandelten Proben.

9.3.3 PCA von HNO41-Karzinomzellen

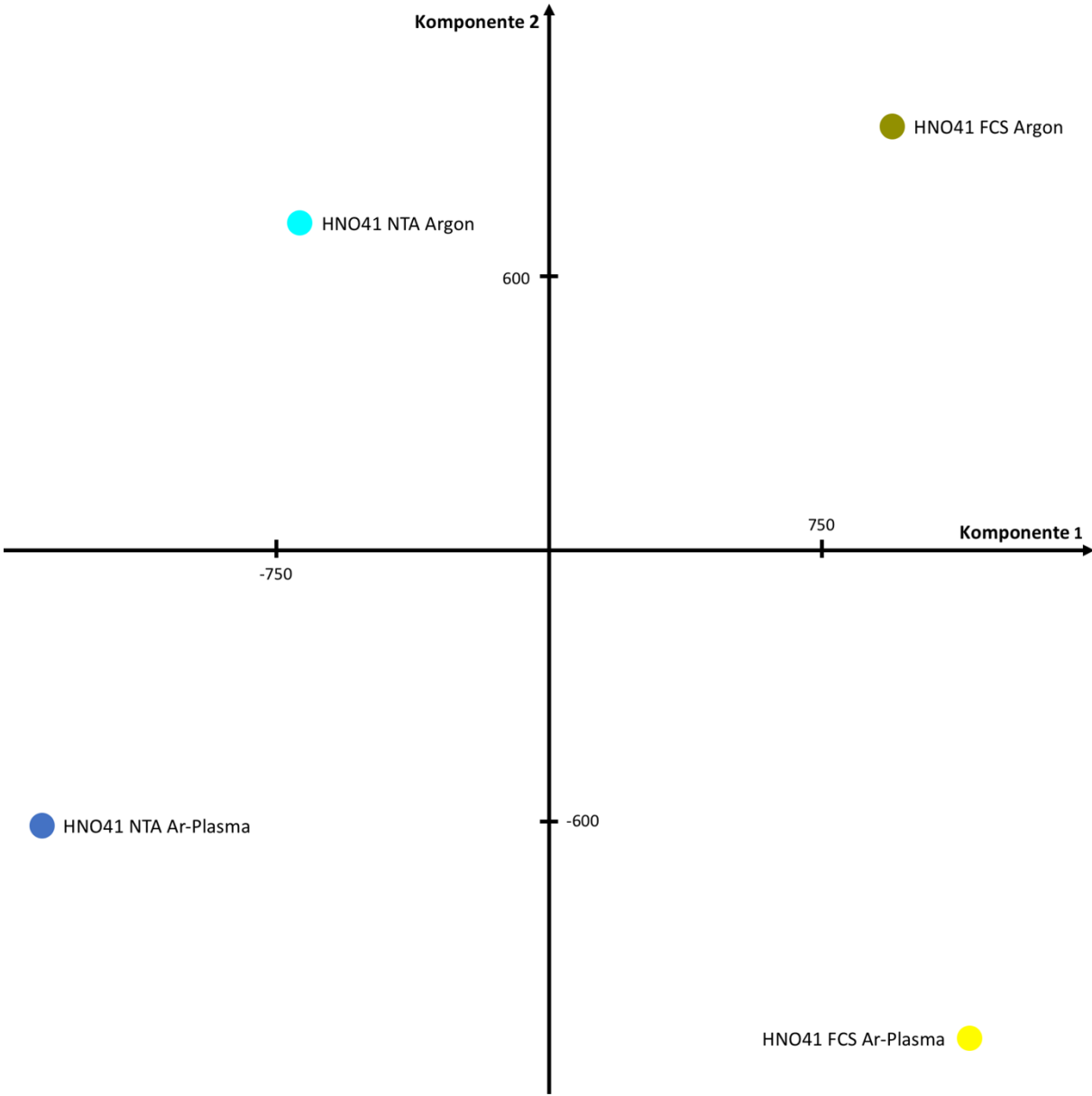


Abbildung 65: PCA von HNO41-Karzinomzellen mit Auftragung der Komponente 1 gegen Komponente 2. Differenzierung der Proben nach verwendetem Serum durch Komponente 1. Komponente 2 trennt zwischen Plasmabehandlung und Kontrolle.

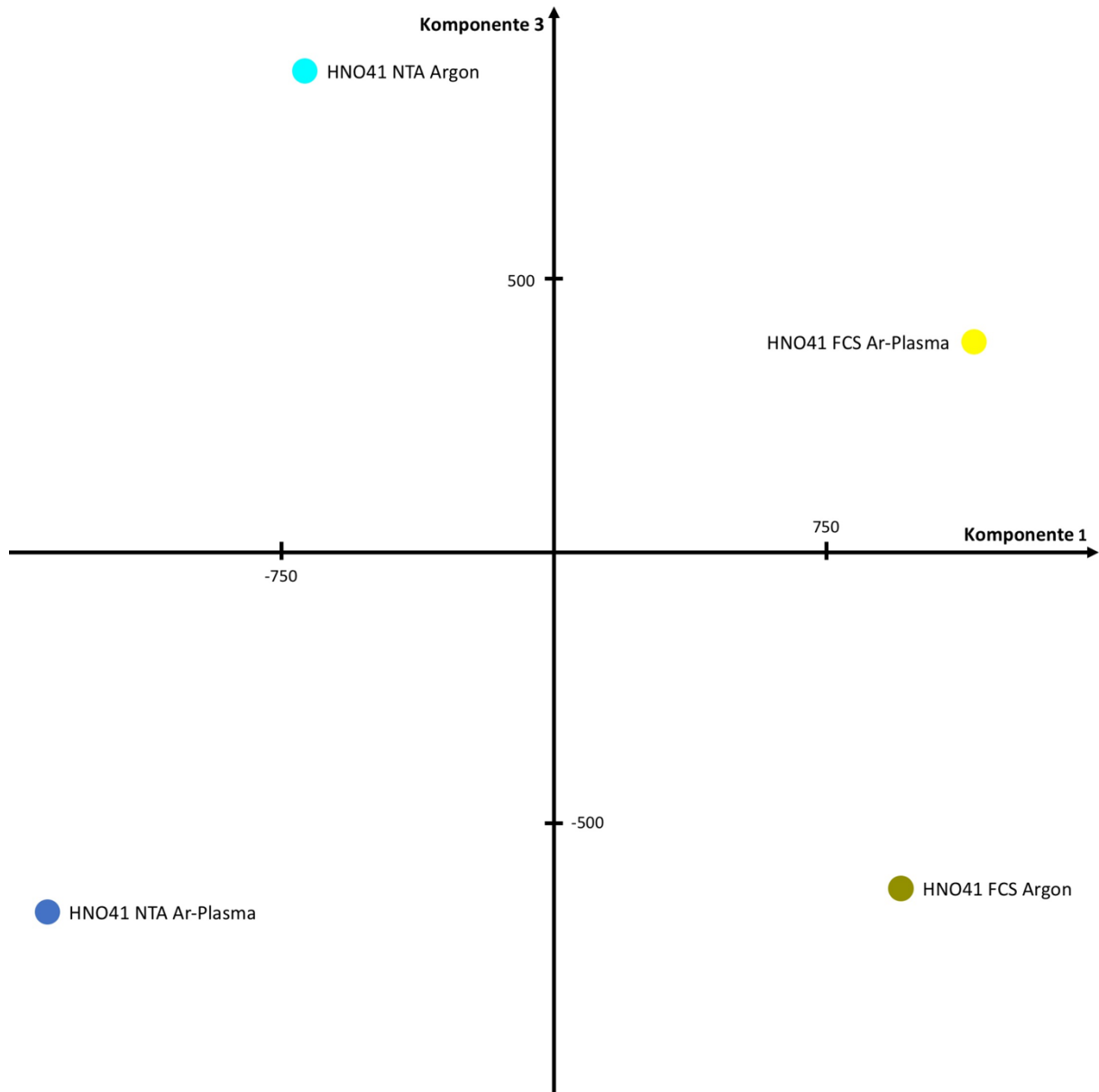


Abbildung 66: PCA von HNO41-Karzinomzellen mit Auftragung der Komponente 1 gegen Komponente 3. Komponente 1 trennt die Proben der Karzinomzellen nach verwendetem Serum. Für Komponente 3 ist eine genaue Charakteristik nicht möglich.

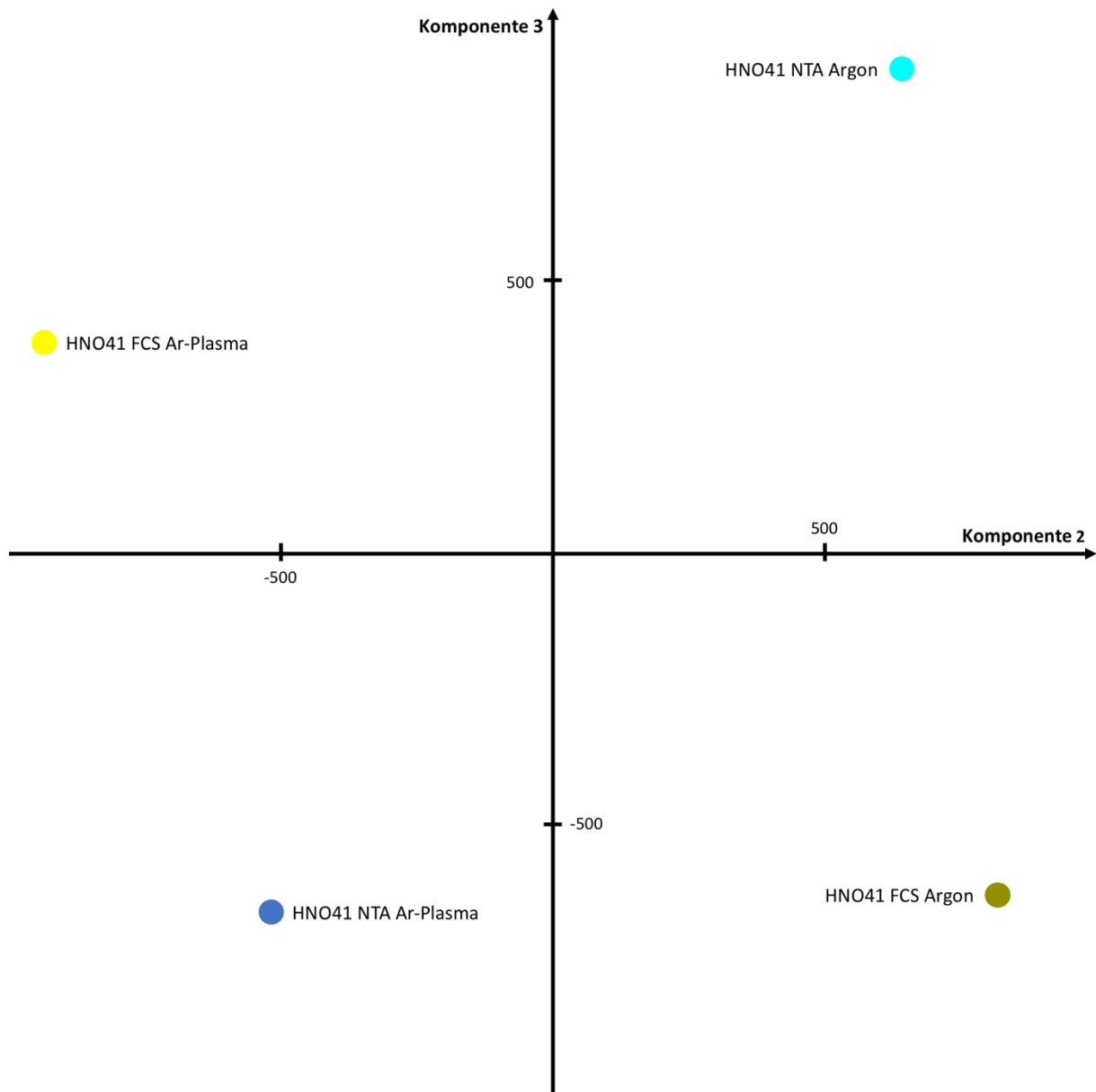


Abbildung 67: PCA von HNO41-Karzinomzellen mit Auftragung der Komponente 2 gegen Komponente 3. Komponente 2 differenziert zwischen Plasmaproben und Kontrollbehandlungen. Der Komponente 3 kann keine genaue Charakteristik zugeordnet werden.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen bedanken, die an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt und mich bei der Fertigstellung unterstützt haben. Dabei gilt besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Werner Hosemann für die Überlassung des Themas dieser Promotion. Bei Frau Prof. Dr. med. Busch möchte ich mich für die Betreuungsübernahme bedanken.

Bei Herrn Dr. Christian Scharf bedanke ich mich für die geduldige und intensive Betreuung. Die regelmäßigen Gespräche halfen mir, mich in die Thematik einzufinden und Probleme in der Ausarbeitung zu bewältigen. Seine Expertise im Bereich der Massenspektrometrie verdient besondere Anerkennung und ermöglichte mir eine zielgenaue Auswertung der Ergebnisse. Die Zusammenarbeit war stets von Humor und Kollegialität geprägt.

Bei dem Laborteam der HNO-Klinik bedanke ich mich für die Unterstützung in der Durchführung der Experimente. Hervorheben möchte ich Frau Katrin Darm für ihre ausgezeichnete Umsetzung der proteomischen Arbeiten, welche einen entscheidenden Beitrag zu dieser Arbeit leisten. Bei Frau Anne Jüngling bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Handhabung der Zellkinetiken und der immensen Arbeit des tryptischen Verdauens auf die Vorbereitung der Massenspektrometrie. Einen großen Dank möchte ich an Herrn Martin Wilhelm richten, der zu jeder Zeit eine Lösung für meine Probleme parat hatte und einen großen Anteil an der Korrektur der Arbeit hat. Das Arbeiten im Team war stets unterhaltsam und ließ auch monotone Tätigkeiten schnell vergehen.

Zudem bedanke ich mich bei dem Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP) für die Bereitstellung der Plasmaquellen und der Firma Decodon für die Analyse der großen Datensätze.

Dir, Lena, danke ich für deine liebevolle Art und deinen akribischen Blick für verständliche Formulierungen in der Arbeit.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie, die mich zu jedem Zeitpunkt unterstützt hat. Ohne euch wäre mein persönlicher und beruflicher Werdegang nicht möglich gewesen.