

Aus dem Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP)  
(Direktor: Prof. Dr. Klaus-Dieter Weltmann) und dem  
Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Universitätsmedizin Greifswald  
(Direktor: Prof. Dr. med. Axel Kramer)

# **Tumor-Sphäroid-Microarrays als *high-throughput*-Methode für die Erforschung neuer Krebs-Therapien im Labor**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2019

vorgelegt von:  
Paul, Kraus  
geb. am: 08.12.1993  
in: Krasnyj Oktjabr  
Gebiet Omsk

Dekan: Prof. Dr. Karlhans Endlich  
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Thomas von Woedtke  
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Anja Bosserhoff  
Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, Raum J.0.37  
Tag der Disputation: 18.03.2022

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
1. Einleitung .....	1
1.1 Das humane Melanom .....	1
1.2 Hochdurchsatz-Screenings ( <i>high throughput screening</i> ) in der Forschung .....	3
1.3 Sphäroide – Organoide-Zellkulturen .....	4
1.4 Einführung in die Plasmamedizin .....	9
1.4.1 Plasma als vierter Aggregatzustand .....	9
1.4.2 Effekte und Anwendung von Plasma .....	11
1.4.3 Plasmageräte in der Klinik .....	14
1.5 Einfluss von Plasma auf Sphäroide .....	17
1.6 Gepulste elektrische Felder (PEF) – Effekte und Anwendungsgebiete.....	17
1.7 Die antioxidative Zellantwort ( <i>antioxidant response</i> ) auf oxidativen Stress.....	18
1.8 Zielsetzung .....	19
2. Material und Methoden .....	21
2.1 Material .....	21
2.1.1 Chemikalien .....	21
2.1.2 Gebrauchsfertige Kitsysteme .....	22
2.1.3 Geräte und Gebrauchswaren .....	22
2.1.4 Enzyme und Wachstumsfaktoren.....	24
2.1.5 Puffer und Lösungen .....	25
2.1.6 Nährmedien und Zusätze.....	26
2.1.7 Gebrauchsfertige Reagenzien.....	27
2.1.8 Zelllinien .....	27
2.1.9 Antikörper .....	27
2.1.10 Software .....	30
2.2 Methoden .....	31
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	31
2.2.1.1 Zellkulturbedingungen .....	31
2.2.1.2 Auftauen und Anzucht von Zellen .....	31
2.2.1.3 Kultivierung der Zellen .....	31
2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl .....	32

2.2.1.5 Anzucht einer Sphäroid-Kultur .....	32
2.2.1.6 Einbettung der Sphäroide in Microarrays .....	33
2.2.1.7 Einbettung in Paraffin .....	34
2.2.1.8 Herstellung von Methocel für die Sphäroidkultivierung.....	35
2.2.2 Immunzytologische und immunhistochemische Methoden .....	36
2.2.2.1 Anfertigung von HE-Präparaten.....	36
2.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung .....	37
2.2.2.3 TUNEL-Färbung .....	38
2.2.2.4 Immunhistochemie .....	39
2.2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung von ganzen Sphäroiden .....	40
2.2.2.6 Aufbau und Funktion des CLS-Gerätes .....	41
2.2.3 Plasmabehandlung.....	42
2.2.3.1 Direkte Plasmabehandlung.....	43
2.2.3.2 Indirekte Plasmabehandlung .....	43
2.2.3.3 Positivkontrolle mittels Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )-Behandlung.....	44
2.2.4 Gepulste elektrische Felder (PEF).....	45
2.2.6 Statistik.....	46
3. Ergebnisse.....	47
3.1 Vorarbeiten zur Erreichung einer konstanten Sphäroidgröße.....	47
3.1.1 Einfluss der Zellzahl auf den Sphäroiddurchmesser .....	47
3.1.2 Einfluss der Stärke der Zentrifugation auf den Durchmesser über die Zeit .....	52
3.2 Etablierung der Sphäroideinbettung und Fehlerquellen .....	53
3.2.1 Sphäroideinbettung.....	53
3.2.2 Herstellung von Paraffinschnitten .....	55
3.2.3 Fehlerquellen bei der Paraffineinbettung .....	56
3.3 Der Vergleich verschiedener Behandlungsmodalitäten im Hinblick auf die Sphäroidmorphologie.....	58
3.3.1 Der Einfluss von Plasma auf die Sphäroidmorphologie.....	58
3.3.2 Vergleich der Sphäroidmorphologie mit und ohne Methocel .....	59
3.3.3 Unterschiede zwischen direkter und indirekter Plasmabehandlung.....	63
3.3.4 Der Einfluss gepulster elektrischer Felder (PEF) auf die Sphäroidgröße und das Aussehen.....	75
3.4 Der Vergleich verschiedener Behandlungsmodalitäten mittels immunzytologischer und immunhistochemischer Untersuchungen .....	79
3.4.1 Immunfluoreszenzfärbungen und automatisierte Bildauswertung am CLS.....	79
3.4.2 Ausschluss der Kreuzreaktivität.....	81
3.4.3 Immunfluoreszenzauswertung der verschiedenen Sets .....	84

3.4.3.1 Auswertung von Set 1 – Viabilität (TUNEL, Cleaved Caspase 3, Ki-67) .....	85
3.4.3.2 Auswertung von Set 2 – DNA-Schaden (pATR, 8-OHdGuanosine, $\gamma$ -H2A.X) .....	89
3.4.3.3 Auswertung von Set 3 – Antioxidative Antwort (Katalase, SOD-1, GPX1) .....	92
3.4.3.4 Auswertung von Set 4 – Nrf2-Antwort (HMOX1, Nrf2, HIF1 $\alpha$ ) .....	95
3.4.3.5 Auswertung von Set 5 – Epithelial-mesenchymale Transition (E-Cad, $\alpha$ -SMA, ZEB1) .....	97
3.4.3.6 Auswertung von Set 6 – Danger response (HSP70, CRT, HSP90).....	99
3.4.3.7 Auswertung von Set 7 (MCT1, pAKT, LC3 A/B).....	101
3.4.4 Betrachtung der Antikörperfärbung sowie Antikörperverteilung in ganzen Sphäroiden...	103
3.4.4.1 Darstellung der mit AF 488 gefärbten Sphäroide .....	105
3.4.4.2 Darstellung der mit AF 594 gefärbten Sphäroide .....	107
3.4.4.3 Darstellung der mit AF 647 gefärbten Sphäroide .....	109
4. Diskussion .....	113
4.1 Problematik der Modellfindung in der Tumorthherapie.....	113
4.2 Der Einfluss von Methocel auf die optische Sphäroidkompaktheit.....	114
4.3 Der Einfluss von kaltem Plasma auf die Sphäroidmorphologie .....	115
4.4 Der Einfluss von gepulsten elektrischen Feldern auf die Sphäroidgröße und Morphologie.....	117
4.5 Immunzytologische und immunhistochemische Untersuchungen der Wirkung von Plasma und PEF auf die Tumorsphäroide.....	118
4.6 Potential und Fehlerquellen des Sphäroid-Microarrays und Ausblick .....	130
5. Zusammenfassung .....	133
6. Literaturverzeichnis .....	135
Eidesstattliche Erklärung .....	149
Danksagung .....	150

---

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
8-OHdGuanosine	8-Hydroxydesoxyguanosin
A	Adenin (Nukleinbase)
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
AF	Alexa Fluor
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BRAF	Isoform B der Raf-Proteine (engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> )
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin (Nukleinbase)
ca.	Circa
CC3	Cleaved Caspase-3
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CRT	Calregulin/Calreticulin
CV	Variationskoeffizient (engl. <i>coefficient of variation</i> )
Da	Dalton
DAB	3,3'Diaminobenzidine ein Chromogen zur immunhistochemischen Färbung
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

---

dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser bzw. Aquadest
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
E-Cad	E-Cadherin (CD324)
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
et al.	und andere (lat.: <i>et alii</i> [m], <i>et aliae</i> [f], <i>et alia</i> [n])
FBS	fötales bovines Serum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin (Nukleinbase)
GPX1	Glutathionperoxidase 1
h	Stunde
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1 (engl. <i>hypoxia-inducible factor-1</i> )
HMOX1	Heme oxygenase 1
HSP	Hitzeschockproteine (engl. <i>Heat Shock Protein</i> )

---

IBC	Entzündlicher Brustkrebs (engl. <i>Inflammatory breast cancer</i> )
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaar
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
kV	Kilovolt
l	Liter
LC3	<i>Light Chain 3</i>
LRP	<i>low density lipoprotein-related protein</i>
M	mol/l (veralteter Begriff der Molarität)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MCT1	Monocarboxylat-Transporter 1
MFI	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (engl. <i>mean fluorescence intensity</i> )
MHC I	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
miRNA	Micro RNA
MITF	<i>microphthalmia-associated transcription factor</i>
ML-IAP	<i>Melanoma inhibitor of apoptosis</i>
MMP-2, MMP-9	Matrixmetalloproteasen 2 bzw. 9
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer (Wellenlängeneinheit)



---

Nr.	Nummer
NRAS	Neuroblastoma RAS ( <i>Rat sarcoma</i> )
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2 related factor 2</i>
nsPEF	Nanosekunden-gepulste elektrische Felder (engl. <i>Nanosecond Pulsed Electric Fields</i> )
O.C.T.	<i>Optimum cutting temperature</i>
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PEF	Gepulste elektrische Felder (engl. <i>Pulsed Electric Fields</i> )
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert (negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration)
PKB	Protein Kinase B
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i> (Proto-Onkogen)
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptors</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (engl. <i>reactive nitrogen species</i> )
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i> )

---

rpm	Umdrehungen pro Minute <i>(rounds per minute)</i>
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sCMOS	<i>Scientific Complementary Metal-Oxide Semiconductor</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLC16A1	<i>Solute Carrier Family 16 Member 1</i>
slm	Standardliter pro Minute
SOD-1	Superoxid-Dismutase 1
T	Thymin(Nukleinbase)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung <i>(Tris buffered saline)</i>
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung und Tween 20
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling mit TdT terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
U	Enzym-Einheit ( <i>units</i> )
ULA	<i>Ultra-low-attachment</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt

v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
ZEB1	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>
$\alpha$	alpha und Anti bei Antikörpern
$\alpha$ -SMA	<i>Alpha smooth muscle Actin</i>
$\beta$	beta
$\gamma$	Gamma
$\kappa$	Kappa

## 1. Einleitung

Die Krebsinzidenz und Mortalität wächst weltweit rapide. Die Gründe hierfür sind sowohl komplex als auch vielfältig und liegen beispielsweise am höheren Altersdurchschnitt. Daraus ergeben sich die Notwendigkeiten, die Krebsentstehung besser zu verstehen sowie die Therapie zu verbessern (Bray et al. 2018). Hierfür müssen zum einen Modelle angewandt werden, die möglichst das Tumorverhalten genau widerspiegeln und dadurch den Erkenntnisstand voranbringen. Zum anderen müssen diese Untersuchungen schnell erfolgen und replizierbar sein. In dieser Arbeit wird ein Modell vorgestellt, welches sowohl ein derartiges Modell (Tumorsphäroide) verwendet, als auch eine Möglichkeit bietet, verschiedene Fragestellungen im Hochdurchsatz-Screening (*high throughput screening*) zu untersuchen. Spezielles Augenmerk wird auf das humane Melanom gelegt, da die folgenden Ergebnisse aus diesen Tumorzellen erhoben wurden.

### 1.1 Das humane Melanom

Das Melanom – eine Neoplasie, die sich von den Melanozyten ableitet – ist eines der am stärksten metastasierenden Krebsformen. Über die letzten 50 Jahre ist die Inzidenz des Melanoms in den Industrienationen stärker angestiegen als jede andere Krebsform. Diese Krankheit betrifft vor allem junge bis mittelalte Erwachsene (25-30 Jahre). Unbehandelt und nach Durchtritt der Dermis weist das Melanom eine schlechte Prognose auf (Böhme & Bosserhoff 2016).

Eine Behandlung des Melanoms ist aufgrund der zahlreichen und schnell wachsenden Metastasen besonders schwierig. Zudem weisen Melanome, im Vergleich zu allen anderen Tumoren, die höchste Mutationsrate auf (Schumacher & Schreiber 2015; Pasqual-Melo et al. 2018). Dies könnte daran liegen, dass UV-Strahlung in der Genese oberflächlicher Melanome eine entscheidende Rolle spielt und die tägliche Exposition schwierig zu vermeiden ist (Shtivelman et al. 2014). Des Weiteren weisen Melanomzellen eine hohe Resistenz gegenüber Chemo- und Immuntherapie auf. Ein möglicher Grund dieser Resistenzlage könnte die hohe Mutationsrate der metastasierenden Melanomzellen sein (Hölzel et al. 2013; Wagle et al. 2011; Nazarian et al. 2010; Pasqual-Melo et al. 2018).

Ein häufiges gemeinsames Ziel der Antitumorthherapie ist die Eliminierung des Tumors durch Aktivierung proapoptotischer Programme (Bauer et al. 2017; Pasqual-Melo et al. 2018). Dies

erweist sich beim Melanom als äußerst schwierig, da die Melanomzellen eine geringe spontane Apoptoserate und eine erhöhte Resistenzlage gegenüber Apoptose-induzierenden Chemotherapeutika aufweisen (Das Thakur & Stuart 2013; Pasqual-Melo et al. 2018).

Der *Melanoma inhibitor of apoptosis* (ML-IAP) gehört zur Familie der antiapoptotischen Regulatoren, die die Apoptose inhibieren und in Melanomzellen verstärkt exprimiert werden. Dieser ist womöglich für die chemotherapeutische Resistenz von Melanomen mit verantwortlich. Die Expression von ML-IAP ist vom Onkogen *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) abhängig. Eine Herunterregulierung von MITF – z. B. durch *small interfering RNA* (siRNA) – in Melanomzellen führt zu einer starken Reduktion der ML-IAP mRNA- und Proteinkonzentration. Des Weiteren wird MITF als Onkogen für das Zelllinienüberleben diskutiert, da es für die Proliferation sowie Differenzierung von Melanozyten benötigt wird (Dynek et al. 2008).

Die beiden wesentlichen, die Apoptose einleitenden Wege sind zum einen der extrinsische und zum anderen der intrinsische Signalweg. Dabei wird der extrinsische Weg über die Interaktion von Todesliganden (FasL) mit den entsprechenden Todesrezeptoren (FasR) aktiviert. Der intrinsische Signalweg wird durch Zell- oder DNA-Schädigung eingeleitet, die zu einer proapoptotischen Mitochondrienaktivierung führen (Elmore 2007).

Es wird kontrovers diskutiert, ob die extrazelluläre Azidose zu aggressiveren Melanomzell-Phänotypen führt. Dies könnte zum einen durch eine säureinduzierte Aufregulierung von proteolytischen Enzymen wie Metalloproteasen (MMP-2, MMP-9) oder Kathepsin B sowie Kathepsin L und zum anderen durch eine erhöhte Exozytoserate von abbauenden Enzymen aus den Lysosomen hervorgerufen werden. Hierdurch wird die extrazelluläre Umgebung umgebaut und ermöglicht dadurch die Invasion und Metastasierung der Tumorzellen (Böhme & Bosserhoff 2016). Des Weiteren haben Kuphal et al. gezeigt, dass der *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) – welcher bei hypoxischen Bedingungen verstärkt transkribiert wird und dessen Überexpression die Entwicklung von verschiedenen Tumoren begünstigt – im malignen Melanom bereits bei normoxischen Bedingungen erhöht ist (Kuphal et al. 2010). Diese erhöhte HIF-Aktivität führt zu einer verstärkten Glykolyse, die letztendlich eine Ansäuerung der Zelle bewirkt. Als Erklärungsansatz dieser gesteigerten Aktivität kommen unterschiedliche Mutationen in Frage. Als Beispiel seien die Mutationen von B-Raf und Ras oder der loss-of-function Mutation der PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) aufgeführt. Über die genaue Säureregulation von HIF im humanen Melanom ist wenig bekannt. Vermutet wird eine positive Feedbackschleife, ähnlich wie die in der Expression von HIF-2 $\alpha$  bei

niedrigem pH-Wert in Gliomen (Böhme & Bosserhoff 2016). Darüber hinaus haben Barbi de Moura et al. gezeigt, dass das maligne Melanom einen im Vergleich zu Melanozyten erhöhten Spiegel an oxidativer Phosphorylierung aufweist. Dies wirft die Frage auf, ob die Energiestoffwechselprozesse der Zelle, wie die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), die Progression des Melanoms beeinflussen (Barbi de Moura et al. 2012). Beispielsweise konnten Nuccitelli et al. den Einfluss von nsPEF im Mausmodell nachweisen. Innerhalb von zwei Wochen nach der Behandlung waren die Melanome um bis zu 90 % geschrumpft (Nuccitelli et al. 2006). In weiteren Untersuchungen konnte sogar die vollständige Remission gezeigt werden (Nuccitelli et al. 2009).

## **1.2 Hochdurchsatz-Screenings (*high throughput screening*) in der Forschung**

Das Hochdurchsatz-Screening ist, insbesondere in der Pharmakologie sowie der Biotechnologie, eine gut etablierte wissenschaftliche Methode, um eine hohe Anzahl an experimentellen Proben in kurzer Zeit und unter vergleichbaren Bedingungen zu untersuchen. Heutzutage werden diese Verfahren ebenfalls in der Grundlagen- und angewandten Forschung eingesetzt. Der Fokus liegt dabei nicht mehr nur auf der Quantitätssteigerung über immer kleinere und automatisierte Verfahren, sondern ebenfalls auf der Qualität, beispielsweise von physiologisch relevanten Mechanismen (Mayr et al. 2009; Hertzberg et al. 2000).

Bezüglich des Hochdurchsatzscreenings von neuen Medikamenten erhofft man sich eine höhere Erfolgsrate in der Validierungsphase. Des Weiteren sollen dadurch die Entdeckung, Charakterisierung sowie Validierung von Genfunktionen in biologischen und pathologischen Schlüsselprozessen ermöglicht werden (Thoma et al. 2013). Zukünftig soll der Flaschenhals des primären Screenings entfernt werden, da die molekulare Biologie, die Humangenetik und die funktionale Genomforschung eine immer höhere Anzahl an molekularen Zielen für die therapeutische Anwendung zur Verfügung stellen (Hertzberg et al. 2000). Dabei sind fluoreszenz-basierte Methoden aufgrund der hohen Sensitivität und der dadurch möglichen Verkleinerung der Proben eine der wichtigsten Detektionsmethoden in der Zukunft (Hertzberg et al. 2000).

Die 3D-Kultivierung von Gewebe spiegelt das In-vivo-Tumorwachstum im Hinblick auf die komplexe Interaktion mit weiteren Zellen, mechanischen und chemischen Bestandteilen sowie der Genexpression besser wider als das in 2D-Zellkulturmodellen möglich ist.

Das magische Dreieck des Hochdurchsatz-Screenings besteht aus Zeit, Kosten und Qualität (Mayr et al. 2009). Innerhalb dieser Arbeit wurde ein Verfahren der Arbeitsgruppe von Ivanov und Grabowska etabliert, welches im Vergleich zu einer Bearbeitung von einzelnen Proben 11-mal weniger Reagenzien benötigt. Zudem ist das Verfahren zeitsparender und ermöglicht eine automatische Bildaufnahme (Ivanov & Grabowska 2017).

### **1.3 Sphäroide – Organoide-Zellkulturen**

Tumor-Sphäroide sind dreidimensionale Tumorzellkulturen, die das In-vivo-Mikromilieu der Zellen besser widerspiegeln als zweidimensionale Zell-Monolayer. Dies liegt daran, dass hierdurch die zelluläre Heterogenität, die Nährstoffverteilung, der Sauerstoffgradient, die Zell-Zell-Interaktionen sowie die Genexpression mit berücksichtigt werden können (Vinci et al. 2012). Den zweidimensionalen Zell-Monolayern fehlen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, die in nativen Tumoren vorhanden sind. Zudem sind sie durch ein verändertes Aussehen gekennzeichnet. Diese Zellen sind gestreckt und weisen keine zytoskelettale Neuformierung auf. Hierdurch wird eine künstliche Polarität geschaffen, die zu einer abnormalen Gen- und Proteinexpression führt (Nath & Devi 2016).

Sphäroide als dreidimensionale Zellkulturen wurden erstmals von Moscona in den 1950er Jahren beschrieben (Moscona et al. 1952). Die ersten Experimente mit Sphäroiden in der Krebsforschung begannen in den 1970er Jahren von Sutherland et al. (Sutherland et al. 1971).

Heutzutage ist es möglich, Tumor-Sphäroide auf unterschiedliche Art und Weise zu generieren. Im Folgenden werden einige Techniken kurz vorgestellt. Es sei zu beachten, dass jede Methode individuelle Vor- und Nachteile aufweist, die hier nicht für alle Techniken vollständig beschrieben werden. Generell lassen sich die Techniken zunächst in gerüstbasiert (*Scaffold-based*) und gerüstfrei (*Scaffold-free*) unterteilen. Die gerüstbasierten Techniken unterstützen nicht nur die Ausbildung von dreidimensionalen Sphäroiden, sondern beinhalten zudem noch einen externen Zusatz, der die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst. Hierzu gehören beispielsweise die Matrix-on-top, die Matrix-Einkapselung oder die „*Spinner flasks*“. Die gerüstfreien Techniken sind besonders für Tumorzellen geeignet, die

sich der Selbstaggregation unterziehen. Hierbei seien die *Ultra-low attachment* (ULA)-Platten zu erwähnen, die mit einem inerten Substrat beschichtet sind, welches die Zellbefestigung blockiert und das *Hanging-Drop*-Verfahren, bei dem die Zellen durch die Gravitation sowie die Oberflächenspannung spontan aggregieren. Insbesondere die ULA-Platten ermöglichen die kostengünstige sowie einfache Handhabung von einer großen Anzahl an Sphäroiden (96-Well). Zudem ermöglichen die ULA-Platten das Multiplexing mittels Bildgebung oder anderen biochemischen Assays. Für weitere Informationen sei beispielsweise die Arbeit von Nath und Devi zu erwähnen (Nath & Devi 2016).

Mithilfe dieser 3D-Zellkulturbedingungen kann die Lücke zwischen einem 2D-Zellkulturmodell und den In-vivo-Tierversuchsmodellen teilweise geschlossen werden (Nath & Devi 2016). Durch die Tatsache, dass die Mikroumgebung – durch die Gewebearchitektur sowie die extrazelluläre Matrix (ECM) – die Tumorzellantwort in einem signifikanten Ausmaß beeinflusst, sollten beispielsweise die Effekte von Zytostatika, die bereits auf zweidimensionalen Zell-Monolayern getestet wurden, erneut überprüft werden. Arbeiten von Vinci sowie Howes et al. haben gezeigt, dass adäquate In-vitro-Bedingungen notwendig sind, um die Wirkungen von Medikamenten adäquat einschätzen zu können (Vinci et al. 2012, Howes et al. 2007). Dies liegt unter anderem daran, dass viele Therapeutika über den Blutstrom transportiert werden und in einem minderversorgten Gefäßgebiet teilweise nicht alle Zellen erreichen können. Selbst wenn das Therapeutikum den Tumor erreicht, bildet sich ein Konzentrationsgradient aus, sodass nicht alle Tumorzellen die gleiche Dosis erfahren. Demnach ist ein Modell, welches das therapeutische Ansprechen – im Hinblick auf die In-vivo-Situation mit einer heterogenen Mikroumgebung und keinem konstanten Sauerstoff- und Nährstoffangebot, wie es in zweidimensionalen Zellmonolayern der Fall ist, – genauer widerspiegelt, essentiell (Thoma et al. 2014).

Ein Vergleich der Gen- und Proteinexpression veranschaulicht, dass der Metabolismus, die Zellstress-Antwort, die Signaltransduktion und die zellulären Transportproteine in Sphäroiden höher exprimiert sind als in 2D-Zellkulturen (Nath & Devi 2016). Des Weiteren spielt die Mikroumgebung der Tumoren eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung sowie dem Krebsfortschreiten (Nath & Devi 2016). Dabei werden die Tumorzellen von zellulären und nicht-zellulären Komponenten der Mikroumgebung beeinflusst. Zu den zellulären Komponenten werden veränderte epitheliale Zellen, Krebs-assoziierte Fibroblasten, tumorinfiltrierte mesenchymale Zellen sowie Lymphozyten und Endothelzellen gezählt, wohingegen die extrazelluläre Matrix, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine die



nicht-zellulären Komponenten darstellen. Dieses Wechselspiel mit zellulären und nicht-zellulären Komponenten hat eine enorme Auswirkung auf eine Vielzahl biologischer Eigenschaften wie die Proliferation, die Migration sowie die therapeutische Resistenz (Nath & Devi 2016). Des Weiteren wird das komplexe Netzwerk, welches durch die verschiedenen Zellpopulationen gebildet wird, durch unterschiedliche physikalische und chemische Gradienten innerhalb des Tumors weiter unterteilt. Hierdurch kommt es zu einer Zonierung und phänotypischen Heterogenität der Tumoren (Thoma et al. 2014).

Durch die uneinheitliche Aggregation der Sphäroide, die größer sind als 500  $\mu\text{m}$ , lassen sich hypoxische Regionen sowie nekrotische Zentren beschreiben (Vinci et al. 2012; Abb. 1). Dabei ist der Mindestdurchmesser von 300  $\mu\text{m}$  essentiell, um die maximale kapilläre In-vivo-Diffusionsstrecke von 100  $\mu\text{m}$  nicht zu unterschreiten (Vinci et al. 2013). Ein Tumolvolumen von etwa 0,5-1,0  $\text{mm}^3$  führt zu einer unzureichenden Sauerstoffversorgung aller umgebenden Zellen. Das adaptive Programm, welches durch die Hypoxie eingeleitet wird, führt zu einer gesteigerten Sauerstoffzufuhr über die Rekrutierung und Aktivierung von Endothelzellen, die zu einer Vaskualisierung und einem damit einhergehenden gesteigerten Tumorwachstum führen (Thoma et al. 2014). Dennoch weisen Tumorsphäroide, abhängig von den Zellkulturbedingungen und ihren inhärenten Zelleigenschaften, zahlreiche unterschiedliche Zellmorphologien auf (Nath & Devi 2016).

Ein besonderer Effekt von vielen Tumoren ist die Bildung einer sauren Mikroumgebung um die Tumorzellen herum. Dies erfolgt auf vielen verschiedenen Stoffwechselwegen. Die wichtigsten Mechanismen werden im Folgenden kurz beschrieben und erläutert. Eine erhöhte Glykolyse trotz genügend Sauerstoffangebot führt zu einer verstärkten Produktion von Laktat. Das Laktat wird anschließend aus der Zelle transportiert und führt dadurch zur Ansäuerung der Tumorumgebung sowie einer erhöhten Glukoseaufnahme (Abb. 1). Dieser Effekt wird nach dem Erstbeschreiber Otto Warburg als Warburg-Effekt bezeichnet (Böhme & Bosserhoff 2016). Der Warburg-Effekt könnte den Tumoren einen Vorteil bezüglich des Zellwachstums in einer multizellulären Umgebung bieten. Durch die Ansäuerung und weitere metabolische Interaktionen mit der extrazellulären Umgebung wird die Tumordinvasion erleichtert. Zudem kommt es durch die erhöhte Glykolyse der Tumorzellen zu einer Konkurrenz um Glukose mit den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL), die eine hinreichend hohe Glukosemenge für ihre Effektorfunktion benötigen. Hieraus lässt sich – im Hinblick auf die Protumor-Immunität – eine Interaktion von Tumorzellen mit dem Immunsystem vermuten (Liberti & Locasale 2016). Weiterhin sind Krebszellen besonders

empfindlich gegenüber oxidativem Stress. Die stark proliferierenden Zellen, die durch die bereits vorhandenen onkogenetischen Mutationen im Metabolismus und der Proteintranslation eine bereits erhöhte Produktion von ROS aufweisen, können durch den Warburg-Effekt ihr antioxidatives System hochregulieren und sich dadurch besser gegenüber ROS-Akkumulation schützen (Li et al. 2013).

Ein weiterer Weg zur Ansäuerung der Tumorumgebung ist eine erhöhte Aktivität des Pentosephosphatweges und der daraus resultierenden CO<sub>2</sub>-Produktion – der wichtigste CO<sub>2</sub> produzierende Weg (Helmlinger et al. 2002; Böhme & Bosserhoff 2016). Pro Glukosemolekül wird ein CO<sub>2</sub>-Molekül generiert, welches in wässriger Umgebung zu einem H<sup>+</sup>-Ion und einem Bikarbonat-Ion (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) umgewandelt wird. Katalysiert wird diese Reaktion über die Carboanhydrase (II: intrazellulär und IX, XII: extrazellulär) (Kato et al. 2013; Böhme & Bosserhoff 2016). Der CO<sub>2</sub>-Transport wird über Aquaporine, die als CO<sub>2</sub>-Kanäle fungieren, verstärkt (Böhme & Bosserhoff 2016).

L-Glutamin spielt eine besondere Rolle im Ammoniumtransport und ist eines der wichtigsten Substrate zur Energiegewinnung von schnell proliferierenden Tumorzellen (Kallinowski et al. 1987; Mazurek et al. 2007; Böhme & Bosserhoff 2016). In Tumorzellen wurde eine erhöhte Aufregulierung von hochaffinen Glutamin-Transportern beschrieben (Fuchs & Bode 2005; Böhme & Bosserhoff 2016). Glutamin wird zu Glutamat umgewandelt, welches im Citratzyklus zur Produktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat genutzt wird. Dieses wird über Zwischenschritte weiter zu Malat umgewandelt, welches dann über den Malat-Aspartat-Shuttle aus dem Mitochondrium transportiert wird. Im Zytosol entsteht aus dem Malat Pyruvat, welches zu Laktat reduziert wird. Somit stellt der Glutaminolyse-Weg eine weitere Möglichkeit zur Ansäuerung der Tumorumgebung dar (Böhme & Bosserhoff 2016).

Der Hypoxie-regulierte „Hypoxie-induzierte Faktor“ (HIF) steht in enger Beziehung zur sauren Mikroumgebung von Tumorzellen. Durch das starke Wachstum und der dadurch weiteren Entfernung von den Blutgefäßen, kommt es zu einem Sauerstoffmangel. Diese Hypoxie erhöht die Aktivität und Stabilität vom Transkriptionsfaktor HIF, welcher als aktives Heteromer zum Glykolyse-Phänotyp der Tumorzellen beiträgt. Zudem steigert er die Lactatdehydrogenase A (LDH-A) und hemmt die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, den Übergangsschritt zum Citratzyklus, durch die Aufregulierung der Pyruvat-Dehydrogenase Kinase 1 (PDK1), welche die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) hemmt. Zudem erhöht HIF-1 die Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT3. Insgesamt kommt es zu einem Wechsel des Energiemetabolismus der Zelle. Ausgehend vom Zustand der oxidativen

Phosphorylierung betreibt die Zelle anschließend eine stärkere anaerobe Glykolyse, welche zu einer extrazellulären Ansäuerung führt (Böhme & Bosserhoff 2016). Außerdem haben Sonveaux et al. gezeigt, dass eine metabolische Symbiose zwischen oxygenierten und hypoxischen Tumorzellen bestehen könnte. Das produzierte Laktat der hypoxischen Tumorzellen wird aus der Mikroumgebung von oxygenierten Tumorzellen über sogenannte Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1) aufgenommen und zu Pyruvat umgesetzt. Pyruvat kann dabei weiter über die oxidative Phosphorylierung verstoffwechselt werden. Eine pharmakologische Hemmung der MCT1 in oxygenierten Tumorzellen führt zur Verwertung von Glukose anstatt von Laktat. Dadurch kommt es zum Verhungern der hypoxischen Glukose-verwertenden Zellen (Sonveaux et al. 2008; Thoma et al. 2014).

Des Weiteren kommt es im Tumorgewebe häufig zu einer Überexpression von Transportern und Kanälen, die zur Aufrechterhaltung der intrazellulären pH-Homöostase notwendig sind (Swietach et al. 2009; Böhme & Bosserhoff 2016). Durch den erhöhten Säure-Export in den Extrazellulärraum werden das Interstitium sowie der Intrazellulärraum alkalisiert. Aufgrund der mangelnden Vaskularisierung der Tumorzellen lagern sich die metabolischen Säuren im Extrazellulärraum ab. Die  $H^+$ -Diffusion erfolgt entlang eines Konzentrationsgradienten aus der sauren Tumorumgebung in das umliegende Gewebe. Hierdurch kommt es im gesunden angrenzenden Gewebe ebenfalls zu einer chronischen Ansäuerung (Zhang et al. 2010; Estrella et al. 2013; Böhme & Bosserhoff 2016).

Einige der letalen phänotypischen Merkmale von Tumoren, wie Invasion und Metastasierung, sind keine direkte Konsequenz genetischer Veränderungen, sondern resultieren aus einer einzigartigen physiologischen Umgebung. Daraus ergibt sich, dass die Hypoxie und die saure Umgebung mehr als nur die phänotypischen Charakteristika des Tumorwachstums sind, sondern essentielle Vermittler der Tumorprogression darstellen (Smallbone et al. 2005). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, Modelle wie die Tumorsphäroide, zu finden, die diese einzigartige Mikroumgebung am besten widerspiegeln.

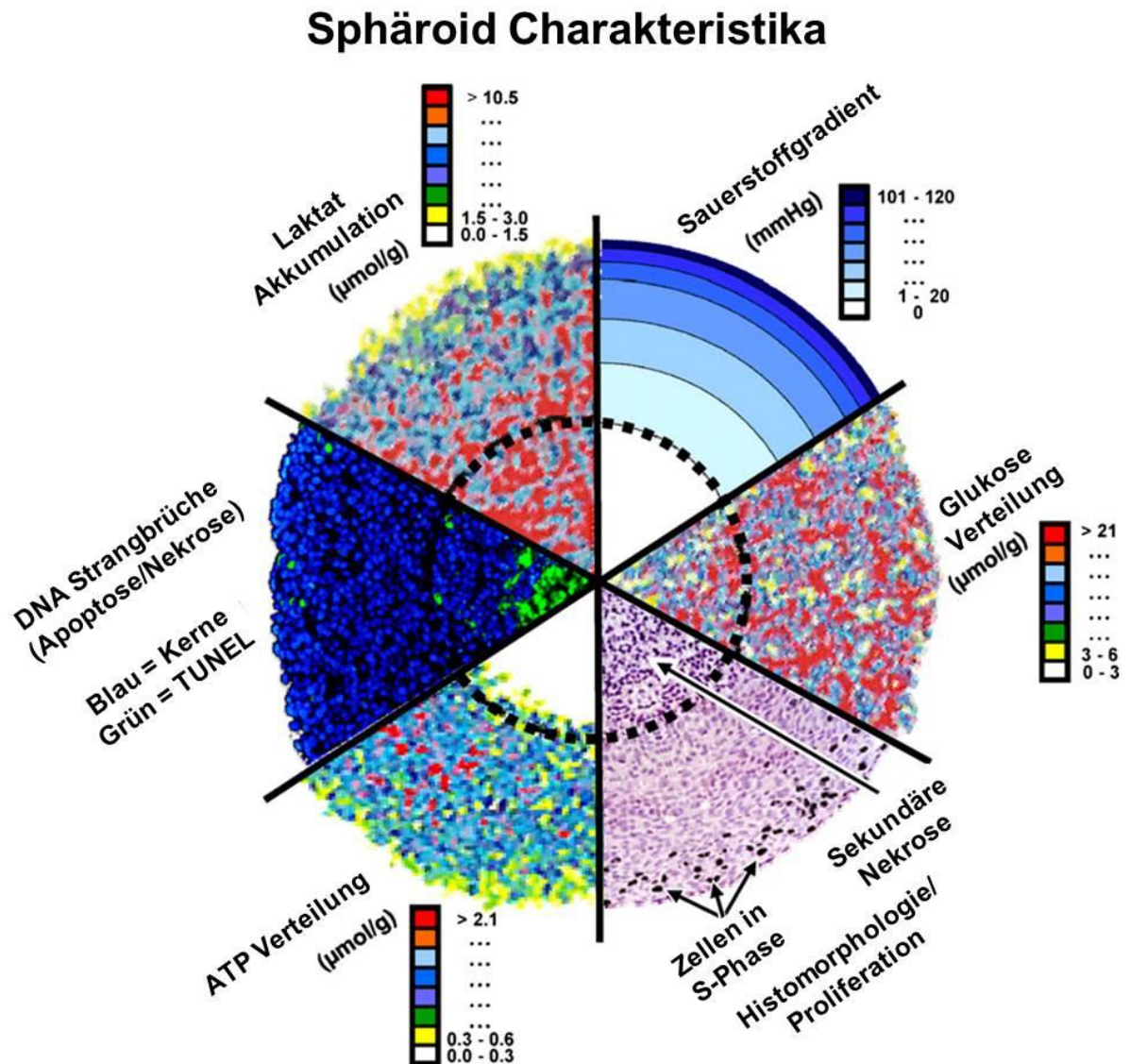


Abbildung 1: Sphäroid Charakteristika (modifiziert nach Hirschhaeuser et al. 2010).

## 1.4 Einführung in die Plasmamedizin

### 1.4.1 Plasma als vierter Aggregatzustand

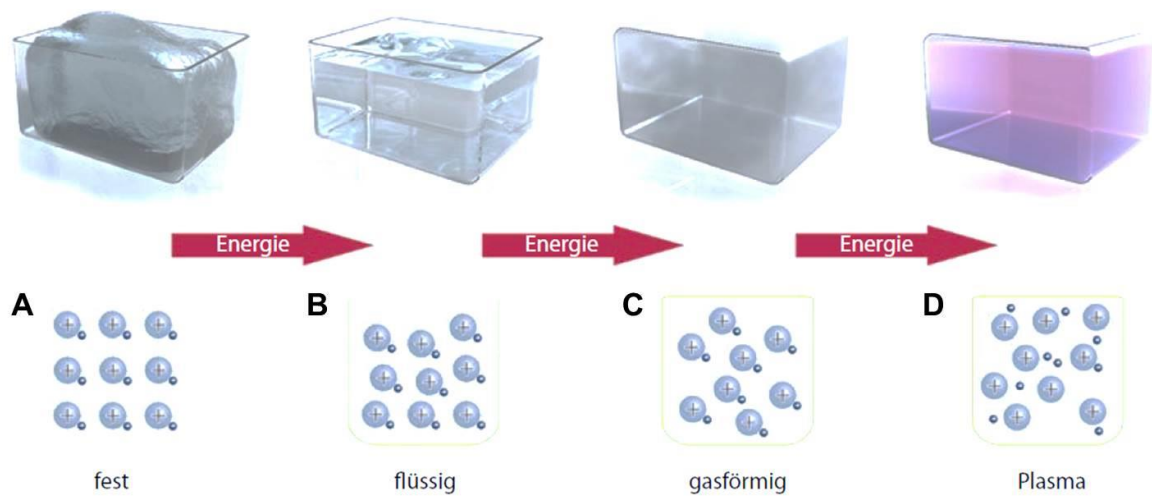
Der Begriff Plasma leitet sich ursprünglich aus dem griechischen „πλάσμα“ ab und bedeutet zu Deutsch „Gebilde“ oder „Bildwerk“ (Pfeifer et al. 1993). Im alltäglichen Sprachgebrauch und insbesondere in der Medizin wird dieser Ausdruck häufig mit dem Blutplasma in Verbindung gebracht. Erstmals wurde der Begriff des Plasmas in der Physik von Langmuir verwendet (Langmuir 1928). Mott-Smith – einer seiner damaligen Mitarbeiter – beschreibt in einer Erzählung die Assoziation Langmuirs. Dieser verglich den Transport von geladenen Teilchen in einer Gasentladung mit einem Medium, welches seiner Ansicht nach eine starke

Ähnlichkeit zu dem Transport von roten und weißen Blutkörperchen im Blutfluss aufwies (Mott-Smith 1971).

Physikalisches Plasma ist ein vollständig oder partiell ionisiertes Gas, welches aus einer Fülle von verschiedenen niedermolekularen Atomen, Ionen und Molekülen besteht (Abb. 2). Die angeregten Neutralgase emittieren einige Arten elektromagnetischer Strahlung wie Infrarotstrahlung, sichtbares Licht sowie ultraviolettes Licht (Abb. 3: A). Durch Zumischung verschiedener Gase lassen sich, über die unterschiedliche Anregung der einzelnen Komponenten, verschiedene Strahlungsemissionen des Plasmas erzeugen, die in der Praxis eine optische Unterscheidung zulassen. Plasma wird – neben fest, flüssig und gasförmig – als vierter Aggregatzustand bezeichnet, in dem sich die Elektronen frei bewegen können (Abb. 2). Daher wird auch der Begriff des ionisierten Gases, welches im Gegensatz zu herkömmlichen Gasen elektrisch leitbar ist, verwendet. Grundsätzlich lässt sich Plasma in thermisches als auch nicht-thermisches Plasma unterteilen. Weitere physikalische Unterscheidungen sind möglich, werden an dieser Stelle aber nicht näher erläutert (von Woedtke et al. 2013).

Thermisches Plasma besteht aus Elektronen und Ionen, die dieselbe Energie aufweisen. Dieses lässt sich vielfältig in der Natur, wie beispielsweise in der Sonne, den Polarlichtern *Aurora borealis* oder in Blitzen, wiederfinden. Im Allgemeinen gilt, je stärker die Ionisierung des Gases ist, desto höher sind auch die Temperaturen und umgekehrt (von Woedtke et al. 2013).

Demgegenüber besteht nicht-thermisches Plasma aus hochenergetischen Elektronen, die gleichzeitig auch für die unterschiedlichsten Effekte verantwortlich sind, sowie aus Ionen und Neutralteilchen, die kalt bleiben. Die schnellen Elektronen, die Temperaturen von etwa  $10^4$  K aufweisen können, ionisieren oder regen Atome und Moleküle des Arbeitsgases (z. B. Argon) und der Atmosphäre an (von Woedtke et al. 2013). Sie selber stellen dabei nur einen geringen Anteil von weniger als 0,1 % dar (Hirst et al. 2016). Die Argon-Ionen sind schwerer als die Elektronen und bewegen sich daher langsamer im elektrischen Feld. Zudem ist die Energieübertragung – diese entspricht der erzeugten Wärmeenergie – der schnellen Elektronen auf die schweren Partikel wenig effektiv, wodurch das Gesamtplasma kalt bleibt (von Woedtke et al. 2013, Bekeschus et al. 2016; Hirst et al. 2016). Dadurch lässt sich die Zusammensetzung und Temperatur des kalten Plasmas über weite Bereiche durch die Veränderung des Energieeintrages – z. B. durch gepulste Anregung –, des verwendeten Gases, den Gasdruck und viele weitere Faktoren regulieren (von Woedtke et al. 2013).



**Abbildung 2:** Übersicht der vier Aggregatzustände. Durch Hinzufügen von Energie kommt es zum Phasenübergang von fest über flüssig zu einem gasförmigen Zustand (A bis C). Schematisch wird dies als Schmelzen von Eis dargestellt. **A:** Fester Zustand. **B:** Flüssiger Zustand. **C:** Gasförmiger Zustand. **D:** Plasma-Zustand (modifiziert nach von Woedtke et al. 2013).

### 1.4.2 Effekte und Anwendung von Plasma

Plasma wird sehr häufig verwendet, ohne dass es der Allgemeinheit wirklich bewusst ist. Die drei großen Felder der Plasmaanwendung im medizinischen Umfeld sind die therapeutische Anwendung, die Oberflächenmodifikation sowie die biologische Dekontamination. Für medizinisch-therapeutische Anwendungen sind vor allem kalte Plasmen ( $<40\text{ °C}$ ) von Interesse. Kalte Plasmen weisen keinen irreversiblen thermischen Effekt auf biologisches Gewebe auf (Zenker 2008). Im Gegensatz dazu kommen auch heißere Plasmen in der Medizin zum Einsatz. Diese werden zum einen zur Koagulation von Blutungen (Temperaturen  $< 100\text{ °C}$ ) oder zum Schneiden von Geweben in der Elektrochirurgie (Temperaturen  $> 100\text{ °C}$ ) angewendet (Zenker 2008). Die Temperaturkontrolle von unterschiedlichen Plasmageräten kann mittels faseroptischen Temperaturmessungen erfolgen.

Im Folgenden wird ein Überblick über die verschiedenen Anwendungsbereiche von Plasma gegeben. Zur Orientierung sollen die drei großen Anwendungsbereiche dienen, wobei diese nicht immer trennscharf zu unterscheiden sind.

Ein großes und intensiv beforschtes Anwendungsgebiet der Plasmamedizin sind die Oberflächenmodifikationen. Mit Hilfe von Plasma lassen sich Oberflächen reinigen, ätzen, funktionalisieren, aktivieren oder beschichten. Ein enormer Vorteil ist dabei, dass die Plasmaanwendung lediglich die Oberfläche modifiziert und der Großteil des Materials

unverändert bleibt. Medizinisches Material – wie Implantate oder Katheter, die im direkten Kontakt mit lebendem Gewebe stehen – bestehen häufig aus synthetischen Polymeren, sodass die Anwendung mit kaltem Plasma bevorzugt wird (von Woedtke et al. 2013).

Ein weiteres Anwendungsgebiet von Plasma ist die Dekontamination und Sterilisation von Oberflächen (von Woedtke et al. 2013). Hierbei wird die inaktivierende, nicht-thermische Wirkung von Plasma auf Mikroorganismen, Pilze sowie Parasiten ausgenutzt. Dabei bleibt die antibakterielle Wirkung auch gegenüber multiresistenten Bakterien erhalten. Dadurch lassen sich beispielsweise chirurgisches Besteck, Nahrungsmittel und Verpackungen dekontaminieren (Bekeschus et al. 2016).

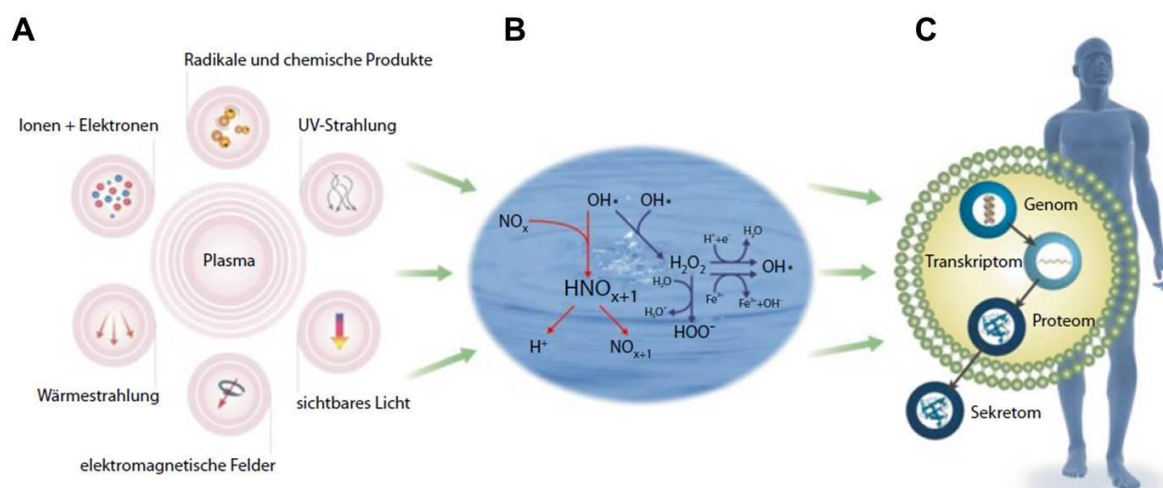
Der dritte große Bereich ist die therapeutische Anwendung. Hierbei spielen drei biologische Grundeffekte von Plasma eine entscheidende Rolle, die sich teilweise mit den oben beschriebenen Effekten decken. Zum einen die Inaktivierung von Mikroorganismen (Bekeschus et al. 2016). Zum Beispiel könnte kaltes Plasma auch in der Zahnheilkunde zur Reinigung und Desinfektion von verletzbaren Geweben, wie Zahnhöhlen oder Zahnkanälen, ohne die Verwendung von hohen Gastemperaturen oder aggressiven Chemikalien eingesetzt werden (von Woedtke et al. 2013). Zum anderen lassen sich zwei grundsätzliche Effekte beschreiben, die von der Intensität der Plasmaeinwirkung abhängen. Bei geringer Behandlungsintensität fördert kaltes Plasma die Geweberegeneration durch die Stimulation der Zellproliferation sowie der Angiogenese (Schmidt et al. 2015; Tanaka & Hori 2017). Dabei wird vermutet, dass die Wundheilung eng mit dem Redoxsystem – insbesondere scheinen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/ RNS) eine zentrale Rolle in der Vermittlung dieser biologischen Effekte zu spielen – der Zelle verknüpft ist (Graves 2012; Bekeschus et al. 2016). Höhere Behandlungsintensitäten führen demgegenüber zu einer Inaktivierung der Zellen über die Aktivierung der Apoptose oder Nekrose (Tanaka & Hori 2017). Dieser Effekt lässt sich auch bei Krebszellen beobachten, die häufig ihre Apoptosefähigkeit verloren haben (von Woedtke et al. 2013). Zudem reagieren Krebszellen – im Vergleich zu normalen Zellen – sensitiver auf Strahlung, was bei der therapeutischen Dosis berücksichtigt werden sollte. Dabei lässt sich ein Optimum zwischen therapeutischem Effekt auf der einen Seite und minimaler Gewebeschädigung auf der anderen Seite erzielen (Kajiyama et al. 2017).

Zum besseren Verständnis von Plasma sind verschiedene Charakterisierungsmöglichkeiten notwendig. Zum einen können die gebildeten reaktiven Spezies und die elektromagnetische Strahlung durch Emissions- und Absorptionsspektroskopie näher beschrieben werden. Zum

anderen können Gasanalysen, Lichtablenkungen sowie Spannung und Stromstärke zum besseren Verständnis der Plasmaquelle gemessen werden (Reuter et al. 2015; Reuter et al. 2018). Dies ist vor allem zur Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Plasmaquellen besonders wichtig. Ein quantitativer Vergleich der Plasmaeffekte zwischen verschiedenen Plasmaquellen ist aufgrund der komplexen Wechselwirkungen, der reaktiven Spezies, der Strahlung, des elektrischen Stromflusses und der Temperaturübertragung auf die zu behandelnden biologischen Targets schwierig, da die biologischen Effekte im Detail stark von der Plasmaerzeugungstechnologie abhängig sind (Arndt et al. 2018). Insgesamt sollten demnach die Temperatur, die verschiedenen Strahlungen (UV-A, -B, -C), die Bildung toxischer Gase ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{O}_3$  etc.) sowie die Patientenableitströme zur besseren Vergleichbarkeit angegeben werden (von Woedtke et al. 2013). Zu diesen vier Parametern können weitere Steuerparameter wie der Abstand zur Plasmaquelle, die Eingangsleistung des Plasmagerätes, das verwendete Arbeitsgas (Argon, Helium, Umgebungsluft) sowie die Behandlungszeit angegeben werden.

Des Weiteren lassen sich verschiedene Effekte des Plasmas durch eine Gaszumischung mit Hilfe der optischen Emissionsspektroskopie (OES) aufzeigen. Das Zumischen von Sauerstoff führt zu einer Verkürzung des Effluenten sowie zu einer Reduktion von Hydroxylradikalen ( $\text{OH}\cdot$ ). Durch die Zumischung von Luft hingegen steigt der Anteil an Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ) an, was sich anhand der verstärkten Emissionsbanden im Bereich von 200-250 nm widerspiegelt. Das Zuführen von  $\text{N}_2$  führt zu einer Änderung der gesamten Plasmazusammensetzung. Der Anteil von OH und Argon verringert sich, wohingegen der Anteil an  $\text{N}_2$  ansteigt. Insgesamt nimmt der Effluent eine gelbliche Farbe an. Einen besonderen Einfluss nimmt Wasser in Form von Gasfeuchtigkeit auf das Plasma. Der Anteil an  $\text{OH}\cdot$  steigt stark an. Durch den Einsatz eines Schutzgases erhält man ein vollständig umflossenes Plasma, welches von der atmosphärischen Außenluft geschützt ist. Dadurch lässt sich die Effluentchemie besser kontrollieren (Reuter et al. 2012).





**Abbildung 3:** Effekte und Interaktionen von kaltem Plasma mit dem menschlichen Körper. **A:** Physikalische und chemische Komponenten des Plasmas. **B:** Interaktion und Reaktion von Radikalen und reaktiven Spezies in einer Flüssigkeit. **C:** Wirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) auf das biologische System der menschlichen Zelle (modifiziert nach von Woedke et al. 2013).

### 1.4.3 Plasmageräte in der Klinik

Es sind viele verschiedene Plasmaquellen bekannt, die jedoch nicht alle eine biologische Anwendung finden. Dementsprechend werden im Folgenden die drei Plasmageräte kurz vorgestellt, die zurzeit eine Zulassung als Medizinprodukt in Deutschland haben und im therapeutischen Einsatz sind. Innerhalb dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der Plasma-Jet Methode mit dem kINPen MED® (neoplas tools GmbH Greifswald) gearbeitet, sodass der Fokus auf dieses Plasmagerät gelegt wurde.

#### Dielektrische behinderte Entladung (DBE)

Die dielektrische behinderte Entladung besitzt grundlegend zwei Elektroden, von denen mindestens eine Elektrode eine isolierende Schicht besitzt. Durch diesen Aufbau wird eine direkte Plasmabehandlung des Gewebes, das dann als zweite Elektrode fungiert, ermöglicht. Eine indirekte Plasmabehandlung kann durch den direkten Kontakt beider Elektroden mit dem Isolator erfolgen. Hierdurch entsteht kein elektrischer Kontakt mit dem Gewebe, da dieses kein Teil einer Elektrode mehr darstellt. Eine besonders gut erforschte DBE-Plasmaquelle, die auch die CE-Zertifizierung erhalten hat, ist das Gerät PlasmaDerm® von der CINOGY GmbH Duderstadt. 2011/2012 wurden erste klinische Untersuchungen an ulzerierten und schmerzhaften Beinen durchgeführt. Zum Zünden des Plasmas wird ein Hochspannungspuls von etwa 13 kV mit einer Frequenz von 100 kHz verwendet. Hierbei lässt sich die Frequenz

im Bereich von 200-300 Hz verändern. Eine Gaszuleitung mit Helium oder Argon wird nicht benötigt, da das Plasma in der Raumluft gezündet wird (von Woedtke et al. 2013).

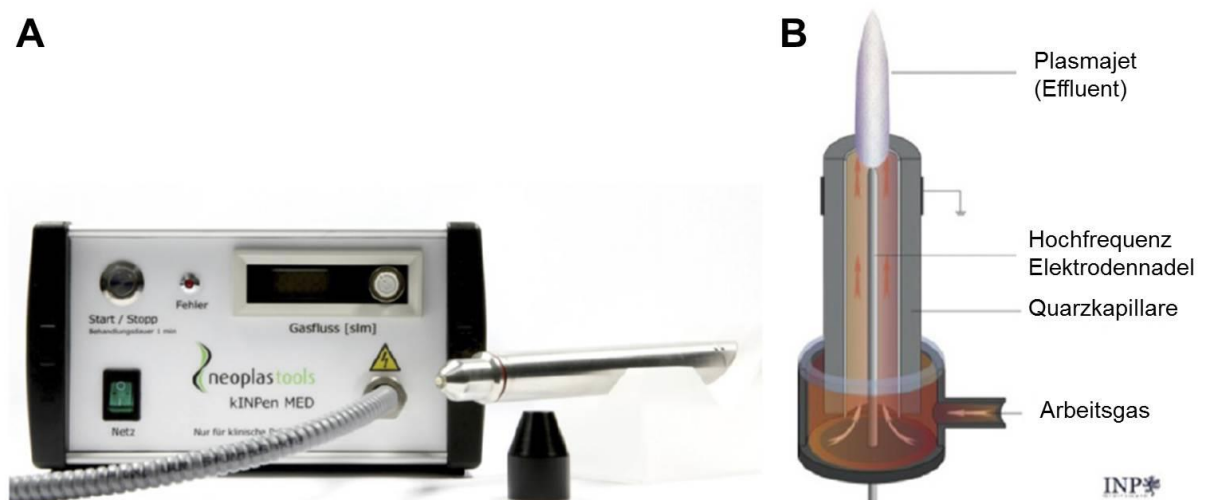
### **Mikrowellenplasma**

Das Mikrowellenplasma beruht auf dem Prinzip, dass mindestens ein rostfreier Metalldraht, der von einem Gas umströmt wird, von einer hochfrequenten Mikrowellenleistung gezündet wird. In Verwendung ist das sogenannte MicroPlaSter bzw. SteriPlas von ADTEC Healthcare, Hunslow, UK, welches aus sechs solcher Metallelektroden besteht, die sich in einem Metallzylinder befinden. Als Arbeitsgas wird Argon verwendet und mit einer Mikrowellenleistung von 2,45 GHz sowie 85 W werden Plasmazonen zwischen den einzelnen Elektroden erzeugt. Zur Kühlung wird ein weiterer Gaszufluss verwendet, um das Plasma unter einer Temperatur von 50 °C zu halten (von Woedtke et al. 2013).

### **Plasma-Jet**

Ein Atmosphärendruck-Plasmajet, der am INP entwickelt wurde, ist der der kINPen MED® (neoplas tools GmbH Greifswald) (vgl. Tab. 15). Dieser enthält eine Gleichstromversorgung mit 8 W bei 220 V sowie einer Frequenz von 50/60 Hz und eine Gaszuleitung. Als Arbeitsgas wird das Edelgas Argon (Ar) mit einer Gasflussrate zwischen 3 und 5 Standardlitern pro Minute (slm) verwendet. Die Plasmaquelle besteht aus einer Nadelelektrode, die sich im Zentrum einer Quarzkapillare befindet. Das Plasma wird an der Spitze der Elektrode durch eine Hochfrequenzspannung (1,1 MHz, 2-6 kV) generiert und durch den Gasstrom aus der Düse als sogenannter Effluent in die Umgebung erweitert (Abb. 4). Der gepulste Plasmajet wird mit einem *burst*-Modus mit einer konstanten Periode einer Hochfrequenz-Spannung, kurz Plasma-On, und einem pausiertem-Modus, kurz Plasma-Off, betrieben (von Woedtke et al. 2013). Die Temperatur des Effluenten des kINPen MED® beträgt 7-10 mm außerhalb der Quarzkapillare etwa 35 bis 40 °C. Diese Entfernung entspricht demnach der optimalen Distanz zur Behandlung von biologischem Gewebe (Mann et al. 2016). Der kINPen MED® erfüllt alle elektrischen Sicherheitsanforderungen. Er besitzt eine CE-Zertifizierung und wird als erster Plasmajet, der als medizinisches Produkt der Klasse IIa für die Versorgung von Wunden eingesetzt wird, verwendet (Bekeschus et al 2016).

Zusammenfassend lassen sich zwei Grundprinzipien der Plasmagenerierung beschreiben. Zum einen die DBE und zum anderen die Plasmajets. Beide Plasmaquellen weisen Vor- und Nachteile auf. Die DBEs verfügen über eine große Fläche und nutzen Luft als Arbeitsgas. Dadurch werden keine weiteren Gasleitungen benötigt und die Behandlungszeit verkürzt. Der Einsatz von Umgebungsluft hat aber den Nachteil, dass diese stark von den atmosphärischen Konditionen wie der Luftfeuchtigkeit abhängt und kaum moduliert werden kann. Zudem bildet das zu behandelnde Gewebe die Gegenelektrode. Im Beispiel der Haut kann diese verschiedene Leitfähigkeiten aufweisen. In Abhängigkeit von der individuellen Hautbeschaffenheit (dünne, dicke, rissige Haut) und der Hautfeuchtigkeit (feucht, trocken) ergeben sich zahlreiche, nicht konstante Gegebenheiten. Dies erschwert die Kontrollierbarkeit der Plasmabehandlungen. Im Gegensatz zu den DBE haben die Plasmajets den Vorteil der punktförmigen Behandlung. Dadurch lassen sich kleine Bereiche sehr spezifisch behandeln. Gleichwohl kann dies bei größeren Flächen ebenfalls zum Nachteil werden. Des Weiteren lässt sich das Arbeitsgas durch die Möglichkeit der genauen Hinzumischung von weiteren Gasen (Argon, Helium, Sauerstoff, Stickstoff) gut definieren. Der Nachteil ist jedoch, dass die Plasmageräte eine weitere Gasleitung benötigen.



**Abbildung 4:** Atmosphärendruckplasmagerät kINPen MED® von neoplas tools GmbH Greifswald zur biomedizinischen Anwendung. **A:** Zeigt die Stromversorgung und das Handstück des kINPen MED®. **B:** Schematische Darstellung des Aufbaus vom kINPen MED® (modifiziert nach von Woedtke et al. 2013).

## 1.5 Einfluss von Plasma auf Sphäroide

Es ist bekannt, dass die Plasmabehandlung einen selektiven Einfluss auf Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen hat (Karrer et al. 2015). Plewa et al. haben von der Intensität der Plasmaeinwirkung abhängige Effekte auf das Sphäroidwachstum und die Zellkomposition beschrieben. Bei kurzer Einwirkungszeit kommt es zunächst zu einem partiellen Sphäroidwachstum, wohingegen hohe Dosen zu einer vollständigen Hemmung des Wachstums führen (Plewa et al. 2014). Im Weiteren werden auch die Zellmorphologie und der Zusammenhalt der Zell-Zell-Kontakte verändert. Dies lässt sich – bei einer hohen Dosisexposition – als Auflockerung des Zellrandes sowie einer dichten zentralen Region um bzw. in den Sphäroiden erkennen (Plewa et al. 2014, Abb. 17).

## 1.6 Gepulste elektrische Felder (PEF) – Effekte und Anwendungsgebiete

Gepulste elektrische Felder (PEF) haben zahlreiche Anwendungsfelder in der Medizin, Forschung und Dekontamination von Lebensmitteln. Neumann und Rosenheck haben in den 1970er Jahren den Einfluss von elektrischen Pulsen auf die Durchlässigkeit von Vesikeln untersucht. Sie haben herausgefunden, dass diese elektrischen Felder zu einer vorübergehenden Permeabilitätsänderung der Vesikelmembran führen (Neumann & Rosenheck 1972). Zehn Jahre später fanden Neumann et al. heraus, dass elektrische Pulse zur Porenbildung in Zellmembranen führen und dadurch eine Steigerung der DNA-Aufnahme in die Zellen ermöglichen. Dieses Einbringen von Fremdmaterial bezeichneten Neumann et al. erstmals als Elektroporation (Neumann et al. 1982). Diese Methode wird heutzutage zum einen für die Transfektion und Transformation von beispielsweise Säugertierzellen genutzt (Potter & Heller 2003). Zum anderen kann dieses Verfahren in der Elektrochemotherapie genutzt werden, um die Zytostatika effizienter in die transient permeabilisierten Tumorzellen einzubringen und dadurch die Zytotoxizität zu erhöhen (Mali et al. 2013; Gothelf et al. 2003). Des Weiteren werden gepulste elektrische Felder in der Lebensmittelindustrie zur nicht-thermischen Pasteurisierung genutzt. Durch die Hochspannungs-PEF kommt es zur elektromechanischen Instabilität der Mikroorganismenzellmembran (Zhang et al. 1994; Jeyamkondan et al. 1999). Durch die Modifikation der Pulslänge ergeben sich verschiedene biologische Effekte. Die Anwendung von sogenannten Nanosekunden-gepulsten elektrischen Feldern (nsPEF), deren elektrische Pulslänge kürzer ist als die Aufladezeit der äußeren Membran, führt zu einer starken Interaktion mit intrazellulären Strukturen der Zelle. Dadurch

kommt es zur Permeabilisierung intrazellulärer Organellen mit einem plötzlichen Anstieg des freien intrazellulären Kalziumspiegels sowie einer erhöhten Genexpression ohne einen dauerhaften Schaden der äußeren Zellmembran (Schoenbach et al. 2004). Der Einsatz von nsPEF hängt von der Pulslänge und der Amplitude ab und kann in biologischen Zellen die Apoptose induzieren sowie zur Reduktion der Tumorgroße führen (Schoenbach et al. 2004; Beebe et al. 2002; Joshi & Schoenbach 2010). Nuccitelli et al. haben den Einfluss von nsPEF auf das Melanom gezeigt. Dabei sind die Melanome innerhalb von zwei Wochen bis zu 90 % geschrumpft (Nuccitelli et al. 2006). Weitere Untersuchungen konnten eine vollständige Remission im Mausmodell nachweisen (Nuccitelli et al. 2009).

### **1.7 Die antioxidative Zellantwort (*antioxidant response*) auf oxidativen Stress**

Aus der Literatur ist bekannt, dass Plasma zahlreiche Effekte, über die Einbringung von ROS und RNS in die Zelle bzw. das Zellmedium, auslöst und dadurch zur antioxidativen Antwort führt (siehe Kapitel 1.4.2). Zum besseren Verständnis sowie der Interpretation von antioxidativen Zellantworten soll im Folgenden eine kurze Einführung in die biochemischen Vorgänge der Zelle gegeben werden.

Der menschliche Organismus ist dem ständigen Einfluss von Pathogenen, Stress-induzierenden Substanzen und Allergenen ausgesetzt, die Infektionen oder Vergiftungen auslösen können. Zum Schutz dieser endogenen oder exogenen Substanzen hat der Körper zahlreiche Abwehrmechanismen entwickelt. Ein Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2 related factor 2*). Dieser ist in die Regulation der Zellzyklushomöostase, der Zytoprotektion, der innate Immunabwehr, der Phase-II-Biotransformation von Xenobiotika und der Tumorgenese involviert. Zudem spielt Nrf2 eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des endogenen Redoxgleichgewichtes (Battino et al. 2017). Beim Vorliegen von oxidativem bzw. elektrophilem Stress kommt es beispielsweise zu einer Interaktion mit Cystein-Resten von Nrf2 direkt sowie deren Inaktivator Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). Hierdurch kann zum einen Keap1 nicht mehr an Nrf2 binden und damit die Ubiquitinierung sowie den Abbau von Nrf2 initiieren. Zum anderen wird die Translokation von Nrf2 in den Zellkern verstärkt (Battino et al. 2017).

Mitochondriale ROS (mtROS) stimulieren direkt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und haben einen Einfluss auf die innate Immunantwort über die Aktivierung neu charakterisierter *RIG-I-like receptors* (RLRs), Inflammasomen sowie *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). Zusätzlich begünstigen mtROS zahlreiche pathologische Zustände, wie Autoimmun- oder kardiovaskulären Erkrankungen (Li et al. 2013). Dauerhafter oxidativer Stress führt zu einer chronischen Inflammation, welche sich zu weiteren chronischen Erkrankungen wie Krebs, Diabetes und kardiovaskulären, neurologischen sowie pulmonalen Erkrankungen entwickeln kann. Oxidativer Stress induziert viele Transkriptionsfaktoren – unter anderem NF- $\kappa$ B, AP-1, p53, HIF-1 $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ ,  $\beta$ -Catenin/Wnt und Nrf2 – die zur Expression von mehr als 500 unterschiedlichen Genen beitragen (Reuter et al. 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass HMOX-1 (heme oxygenase-1, HO-1) in vielen Tumoren überexprimiert wird. Eine erhöhte Konzentration von HMOX-1 wird mit einem erleichterten Tumorwachstum, einem verbesserten Tumorüberleben sowie einer erhöhten Resistenz gegenüber Stress und Apoptose in Verbindung gebracht. Des Weiteren wird dadurch die Angiogenese und Metastasierungsfähigkeit des Tumors begünstigt (Jozkowicz et al. 2007; Reuter et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich oxidativer Stress nicht vermeiden, da eine aerobe Lebensweise zwangsläufig zur Bildung von Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) führt, sobald molekularer Sauerstoff chemisch Elektronentransporter – wie sie beispielsweise in der Atmungskette vorkommen – oxidiert (Storz & Imlay 1999).

## 1.8 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Verfahren zu etablieren, welches zum einen eine automatisierte Bildaufnahme im Hochdurchsatz (*high throughput screening*) ermöglicht und zum anderen ein Modell nutzt, welches das In-vivo-Tumorwachstum sowie die Heterogenität und Komplexität besser widerspiegelt als 2D-Zellmonolayer. Die Wirkung von Plasma und gepulsten elektrischen Feldern als potentielle Tumorthapeutika sollten anhand 3-dimensionaler Organoid-Zellkulturen (Sphäroide) zwei verschiedener Melanomzelllinien (SK-Mel-28, MNT-1) getestet werden.

Hieraus ergaben sich die folgenden drei Arbeitsaufgaben:

- 1) Für beide Zelllinien mussten zunächst optimale Wachstumsparameter festgelegt werden, um stets vergleichbare und reproduzierbare Sphäroide mit einer Größe von 300-500 µm zu erhalten.
- 2) Ein Verfahren von Ivanov und Grabowska (Ivanov & Grabowska 2017) musste zunächst etabliert und anschließend in leicht modifizierter Form angewandt werden. Hierdurch werden im Vergleich zu einer Bearbeitung von einzelnen Proben elfmal weniger Reagenzien benötigt (Ivanov & Grabowska 2017). Des Weiteren ist das Verfahren mittels der *Ultra-Low-Attachment*-Methode zeitsparender und ermöglicht eine automatische Bildaufnahme von bis zu 60 Sphäroiden pro Präparat.
- 3) Abschließend mussten die Sphäroide in Paraffin eingebettet, geschnitten, gefärbt und die Bilder mit dem CLS-Gerät, welches ein automatisiertes Zell-Imaging-System ist, automatisch aufgenommen sowie ausgewertet werden. Zur Anwendung und Untersuchung unterschiedlicher Effekte kam die Immunfluoreszenzfärbung, die aufgrund ihrer hohen Sensitivität und der dadurch möglichen Verkleinerung der Proben eine der wichtigsten Detektionsmethoden der Zukunft darstellt (Hertzberg et al. 2000). Das CLS-Gerät ermöglicht dabei die Immunfluoreszenzfärbung mit vier verschiedenen Farbstoffen (DAPI, AlexaFluor 488, Alexafluor 594, AlexaFluor 647). In dieser Kombination lassen sich bis zu 60 Sphäroide gleichzeitig mit einer großen Vielzahl unterschiedlicher Marker (Kernfärbung sowie drei Marker) untersuchen. Dadurch erlaubt dieses Verfahren die Plasma- und PEF-Effekte schnell und effektiv zu testen. Insbesondere sollten diese Effekte auf den Sphäroiden der beiden Melanomzelllinien (SK-Mel-28 und MNT-1) durch unterschiedliche Marker (Tab. 17) für verschiedene Zellantworten untersucht werden. Dafür wurden sieben thematisch geordnete Sets zusammengestellt. Hierdurch sollte die etablierte Methodik auf die Untersuchung des Einflusses von Plasma und PEF angewandt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Im Folgenden werden die verwendeten Chemikalien mit den entsprechenden Herstellern aufgelistet (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol ROTIPURAN® ≥99,8 %	Carl Roth
Agarose Low Melt	Carl Roth
Agarose Standard	Carl Roth
Cryo-Gel Surgipath	Leica
DAPI	Sigma-Aldrich®
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dinatriumphosphat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth
Eosin G-Lösung 1 % wässrig	Carl Roth
Ethanol 100 %	Carl Roth
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	Carl Roth
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	Carl Roth
Isopropanol	AppliChem
Methanol 100 %	Carl Roth
Methylcellulose	Sigma-Aldrich®
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth
NEO-CLEAR®	Merck
O.C.T. <sup>TM</sup> Compound	Tissue-Tek®
Paraffin Histosec® Pastillen	Merck
Paraffin-Entferner	Melite-Histotechnic
Paraformaldehyd	Carl Roth
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich®
Roti®-Histokitt II Einschlussmittel	Carl Roth
Roti®-Plast Paraffin	Carl Roth



Silikon-Gleitspray	Nigrin Performance
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth
TRIS PUFFERAN® $\geq 99,3$ %	Carl Roth
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich®
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma® Life Science
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich®
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth
Xylol (Isomere)	Carl Roth

### 2.1.2 Gebrauchsfertige Kitsysteme

**Tabelle 2:** Verwendete Kitsysteme

Name	Hersteller	Verwendung
Fluoromount-G™	Invitrogen™	Immunfluoreszenz
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein Mit einer Enzym-zu-Label-Solution-Mischung von 1:10	Roche	Immunfluoreszenz TUNEL
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako	Immunhistochemie

### 2.1.3 Geräte und Gebrauchswaren

**Tabelle 3:** Verwendete Geräte

Funktion	Name	Hersteller
Absaugsystem	VACUSAFE	INTEGRA
Bildaufnahme	Operetta CLS™	PerkinElmer
Brutschrank für Eukaryoten	HERA Cell 150	Thermo Scientific
Elektroporator	Electro Square Porator™ ECM 830	BTX® Harvard Apparatus
Fluoreszenzkamera	QuantEM:512SC	Photometrics®
Fluoreszenzlampe	HXP 120 C	Kübler Codix
Heizplatte	Hot Plate 062	Labotect

Heizplatten-Kontroller	Hot Plate Controller	Labotect
Kryoschnitte	CM1950 Cryostat	Leica Biosystems
Kühlplatte	MCS 400	pfm AG
Magnetrührer	IKA® RCT classic	IKA®
Mikroskop Zellkultur	Axiovert 40 CFL	Zeiss
Mikroskop Zellkultur	Primo Vert	Zeiss
Mikroskopkamera	AxioCam MRm	Zeiss
Milli-Q-Wasseraufbereitung	Barnstead GenPure Pro	Thermo Scientific
Pipettierhelfer	Accurpette	VWR
Pipettierhelfer	PIPETBOY	INTEGRA
Präzisionswaage	ED623-CW	Sartorius
Sicherheitsstativ	Safety Stand 630B	BTX® Harvard Apparatus
Sterilbank	HERASafe KS	Thermo Scientific
Sterilbank	B-[MaxPro] <sup>2</sup> -130	Thermo Scientific
Stromversorgungsgerät	Power Supply 232	Zeiss
Tissue Floating Bath	TFB 45	MEDITE GmbH
Ultra-Tiefkühlgeräte -86°C	Green Line VIP insulation 570 L	Telstar® Igloo
Vacuboy-Handoperator	VACUBOY	INTEGRA
Vortexmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Vortexmischer	Digital Vortex Mixer	VWR
Zellzahlbestimmung	Cedex XS System	INNOVATIS
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG

**Tabelle 4:** Verwendete Gebrauchswaren

Name	Hersteller
Ausgießformen Tissue-Tek® Base Molds (32 mm x 25 mm x 6mm)	Sakura
C-Chip Neubauer Improved	NanoEnTek
CellCarrier™ -96 Spheroid ULA/CS 10x1	PerkinElmer, Inc.
CryoPure Gefäß 1,8 ml weiß	Sarstedt AG & Co
Dako Pen	Dako
Deckgläschen/Coverslips (23,8 x 50 mm)	MEDITE GmbH Medizintechnik

Deckgläser Nr. 1 (ca. 24x50mm)	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Elektroporationsküvette 1 mm Gap	VVR®
Eppendorf-Gefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG
Falcon-Röhrchen 12 ml und 50 ml	Sarstedt AG & Co
Filterpapier	VVR®
Glastrichter	VVR®
Mikrotom für Paraffinschnitte	Leica RM2235
Nitril Untersuchungshandschuhe	centramed
Nunclon Sphera Bottom Plate	Thermo Scientific
Objektträger	Carl Roth
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Thermo Scientific
Parafilm „M“	American National Can™
Pasteurpipetten	LABSOLUTE®
Präzisionswischtücher	KIMTECH SCIENCE*
Reagenzbehälter	Corning® Costar® Sigma-Aldrich®
RL-Pen	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik
Slidebox	Heathrow Scientific
Smart Slides	ibidi®
Sterile Pipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt AG & Co
TC-Schale 60, Standard (Zellkulturschale)	Sarstedt AG & Co
Zählkammer Neubauer-improved	Marienfeld Superior™
Zellkulturflasche 25,75	Sarstedt AG & Co
Zellkulturtestplatte 6	TPP®

### 2.1.4 Enzyme und Wachstumsfaktoren

**Tabelle 5:** Verwendete Enzyme und Wachstumsfaktoren

Name	Hersteller
0.05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA, 1X	Corning®

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben oder bereits gebrauchsfertig geliefert, in Milli-Q-Wasser angesetzt. Dieses ist aufgrund seiner Reinheit besonders für Zellkulturen geeignet. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C oder bei größeren Mengen aliquotiert und eingefroren bei -20 °C. Selektionszusätze wurden kurz vor Gebrauch hinzugegeben.

**Tabelle 6:** Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Substanzen</b>
Agarose 2 %	2 %	Agarose in Milli-Q-Wasser aufkochen
Agarose Low Melt 2 %	2 %	Agarose Low Melt in Milli-Q-Wasser aufkochen
DAPI	10 µM	Verdünnung 1:500 aus 5 mM
Hämatoxylinlösungen A und B nach Weigert (1:1)	50 % 50 %	Hämatoxylinlösung A nach Weigert Hämatoxylinlösung B nach Weigert
Immunfluoreszenz von ganzen Sphäroiden	0,25 % 10 µM 1:50 – 1:100	Triton-X-100 in PBS DAPI primär gelabelte Antikörper
Paraformaldehyd 4 %	4 %	Paraformaldehyd bei 90 °C in 1X PBS gelöst
PBS-Puffer 10X	1,45 M 70 mM 30 mM pH 7,4-7,5	Natriumchlorid NaCl Dinatriumhydrogenphosphat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Natriumdihydrogenphosphat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Permeabilisierungslösung TUNEL-Färbung	0,1 % 0,1 %	Triton-X-100 Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 1X PBS gelöst
TBS 10X, 1 l	200 mM/ 24,2 g 1,37 M/ 80 g pH 7,6	Tris-HCL Natriumchlorid NaCl
TBS-T	200 µl	Tween 20 auf 1 l TBS
Triton-X-100-Puffer	0,25 %	Triton-X-100 in PBS
Wasserstoffperoxid-Lösung	3 %	30 % Wasserstoffperoxid-Lösung 1 zu 10 in MilliQ-Wasser verdünnen

### 2.1.6 Nährmedien und Zusätze

Die folgenden Nährmedien wurden, wenn nicht anders angegeben oder bereits gebrauchsfertig geliefert, in Milli-Q-Wasser angesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Selektionszusätze wie Antibiotika oder Vitamine wurden kurz vor Gebrauch hinzugegeben.

**Tabelle 7:** Nährmedien und Zusätze

Medium	Konzentration	Name
Einfriermedium	50 %	DMEM-Medium mit 8 % FCS
	50 %	DMSO (1:1) (v/v)
RPMI 1640 1X	8 %	Roswell Park Memorial Institute FCS (Fetales Kälberserum)
	1 %	Pen/Strep
	1 %	L-Glutamin

Im Nachfolgenden werden die verwendeten Zusätze, die den Nährmedien hinzugegeben wurden, alphabetisch mit dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

**Tabelle 8:** Verwendete Zusätze für Nährmedien

Name	Hersteller
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich®
L-Glutamin (200 mM) 100x	PAN™-Biotech GmbH
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	PAN™-Biotech GmbH

## 2.1.7 Gebrauchsfertige Reagenzien

**Tabelle 9:** Verwendete Reagenzien

<b>Name</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
Antibody Diluent II	Verdünnungsmittel für primäre und sekundäre Antikörper	ProteinSimple
DPBS, 10X ohne Kalzium und Magnesium	Verdünnung und Verwendung als Puffer	Corning®
Histofine Simple Stain Mouse Max PO (Rabbit)	Nachweisreagenz für Immunhistochemie	N-Histofine®
Protein Block Serum-Free	Blockierungspuffer Immunhistochemie	Dako
VECTASHIELD®	Mounting Medium für Immunfluoreszenz mit DAPI	Vector Laboratories

## 2.1.8 Zelllinien

### SK-Mel-28

Hierbei handelt es sich um eine weiß erscheinende humane Melanomzelllinie (ATCC HTB-72), die erstmals von Lloyd und Toshitada aus axillären Lymphknoten eines 51-jährigen Mannes unbekannter Ethnizität etabliert wurde. Die Zelllinie exprimiert ein mutiertes B-Raf (Isoform B der Raf-Proteine, englisch *rapidly accelerated fibrosarcoma*) sowie ein Wildtyp-N-Ras (Neuroblastoma *Rat sarcoma*). Eine Tumorbildung in Nacktmäusen ist möglich.

### MNT1

Diese stark pigmentierte Melanomzelllinie stammt aus metastasierenden Lymphknoten des Menschen (CVCL\_5624).

## 2.1.9 Antikörper

Im Folgenden werden die verwendeten Antikörper aufgelistet. Dabei werden die primären Antikörper nach mono- und polyklonalem Ursprung aufgeteilt. Die primär gelabelten Antikörper sowie die sekundären Antikörper werden separat dargestellt.

**Tabelle 10:** Primäre monoklonale Antikörper

Antigen	Herkunft	Verdünnung Immunfluoreszenz	Verdünnung Immunhistochemie	Hersteller/Nummer
8-OHd Guanosin (15A3)	Maus	1:100	–	Abcam® Nr.: ab62623
E- Cadherin	Kaninchen	1:100	–	Cell Signaling Technology® Nr.: 3195S
HMOX1 (HO-1-1)	Maus	1:50	1:50	Invitrogen™ Nr.: MA1-112

**Tabelle 11:** Primäre polyklonale Antikörper

Antigen	Herkunft	Verdünnung Immunfluoreszenz	Verdünnung Immunhistochemie	Hersteller/Nummer
Anti- pATR (phospho T1989)	Kaninchen	1:100	–	Abcam® Nr.: ab227851
Catalase	Kaninchen	1:50	1:50	Invitrogen™ Nr.: PA5-29183
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Kaninchen	1:100	–	Cell Signaling Technology® Nr.: 9661T
GPX1	Kaninchen	1:50	1:50	Thermo Scientific Nr.: PA5-26323
Phospho- AKT Pan	Kaninchen	1:50	–	Invitrogen™ Nr.: PA5-36728
SOD1	Kaninchen	1:50	1:50	Invitrogen™ Nr.: PA5-27240

**Tabelle 12:** Sekundäre Antikörper

Antigen	Verdünnung Immunfluoreszenz	Verdünnung Immunhistochemie	Hersteller
α-mouse IgG AlexaFluor 488	1:200	-	Life technologies™ Nr.: A11001
α-mouse IgG AlexaFluor 594	1:200	-	Invitrogen™ Nr.: A11032
α-rabbit IgG AlexaFluor 488	1:200	-	Life technologies™ Nr.: A11008
α-rabbit IgG AlexaFluor 594	3 Tropfen auf 600 µl	-	Life technologies™ Nr.: R37117

**Tabelle 13:** Primär gekoppelte Antikörper mit Alexa Fluor

<b>Antigen (Klon)</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung Immunfluoreszenz</b>	<b>Alexa Fluor®</b>	<b>Hersteller/Nummer</b>
Anti-alpha smooth muscle Actin (1A4)	Maus	1:100	AF594	Abcam® Nr.: ab202368
Anti-gamma H2A.X (phospho S139) [EP854(2)Y]	Kaninchen	1:100	AF647	Abcam® Nr.: ab195189
Anti- Glutathion Peroxidase 1 (EPR3312)	Kaninchen	1:100	AF647	Abcam® Nr.: ab197033
Anti-Hsp70 (W27)	Maus	1:50	AF488	Biolegend® Nr.: 648003
Anti-human CD324 (E- Cadherin) [67A4]	Maus	1:50	AF488	Biolegend® Nr.: 324110
Anti-human HIF1 $\alpha$ (546-16)	Maus	1:50	AF647	Biolegend® Nr.: 359706
Anti-mouse Ki-67 (16A8)	Ratte	1:25	AF647	Biolegend® Nr.: 652408
Anti-Nrf2 (EP1808Y)	Kaninchen	1:50	AF594	Abcam® Nr.: ab206890
Calregulin (F-4)	Maus	1:50	AF594	Santa Cruz Biotechnology, INC. Nr.: sc-373863 AF594
HSP90 beta	Kaninchen	1:100	AF647	Invitrogen™ Nr.: PA3-012-A647
Human ZEB1 (639914)	Maus	1:50	AF700	R&D Systems® Nr.: FAB6708N
LC3A/B (D3U4C) XP®	Kaninchen	1:50	AF647	Cell Signaling Technology® Nr.: 13394
MCT1/ SLC16A1	Kaninchen		AF488	Novus Biologicals® Nr.: NBP1- 59656AF488
SOD-1 (24)	Maus	1:50	AF594	Santa Cruz Biotechnology, INC. Nr.: sc-101523 AF594



### 2.1.10 Software

Im Folgenden sind die Programme und deren Verwendungszweck alphabetisch aufgelistet.

**Tabelle 14:** Software

<b>Programm</b>	<b>Verwendung</b>
AxioVision 4.8	Fotografieren und Ausmessen der Sphäroide unter dem Mikroskop
Cedex XS Messung	Bestimmung der Zellzahl
GraphPad Prism 7	Statistische Auswertung sowie zum Erstellen von Diagrammen
Harmony High Content Imaging and Analysis Software	Aufnahme und Analyse der Sphäroide in Kulturplatten sowie Objektträgern
Microsoft Office Excel 2010	Auswerten von Statistiken sowie zum Erstellen von Diagrammen
Microsoft Office PowerPoint 2010	Bearbeitung von Grafiken
Microsoft Office Word 2010	Erstellen der Textdokumente
WinPC-NC Professional	Bewegung des PlasmaJets
ZEN Mikroskopie- und Imaging-Software 2011 von Carl Zeiss	Aufnahme und Bearbeitung der Fluoreszenzbilder

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Zellkulturbedingungen

Zur Vermeidung einer Kontamination der Zellkulturen mit Bakterien oder Pilzen wurden alle Arbeiten unter der Sterilbank durchgeführt. Die Zellkulturen reagieren empfindlich auf Temperaturschwankungen, weswegen die Medien stets im Wasserbad auf 37 °C vortemperiert wurden. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 2.2.1.2 Auftauen und Anzucht von Zellen

Die SK-Mel-28- und MNT-1-Zellen lagerten in flüssigem Stickstoff. Zunächst wurden die Zellen zügig im Wasserbad bei 37 °C angetaut und in eine Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Nachdem sich die Zellen nach circa 8 bis 24 h angeheftet hatten, wurde das Kulturmedium erneut gewechselt.

#### 2.2.1.3 Kultivierung der Zellen

Die adhärent gewachsenen Zellen wurden alle 3 Tage passagiert. Hierfür wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und anschließend vorsichtig mit 5 ml 1X PBS gewaschen. Durch das Waschen wurde das überschüssige FCS entfernt, sodass das Trypsin besser wirken kann. Im Anschluss wurde vorgewärmtes Trypsin auf die Zellen gegeben. Abhängig von der Flaschengröße wurden entweder 3 ml für eine T-75- oder 1 ml für eine T-25-Flasche verwendet. Die Kulturflasche wurde zum Inkubieren etwa 3 bis 5 min in den Brutschrank (siehe 2.2.1.1 Zellkulturbedingungen) gestellt, bis sich die Zellen sichtbar vom Boden gelöst haben. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Zum besseren Lösen der Zellen wurde das Medium mehrfach über den gesamten Boden der Zellkulturflasche auf- und abpipettiert. Abschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 3 min und 1200 Umdrehungen pro Minute (rpm = *rounds per minute*) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde zurück in die Kulturflasche gegeben und auf 10 ml bei einer T-75- und 5 ml bei einer T-25-Flasche Gesamtvolumen mit Medium aufgefüllt. Die restlichen Zellen wurden für die Herstellung der Sphäroide eingesetzt. Die Zellzahl wurde in einer Zählkammer gezählt (siehe 2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl).

#### 2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in der Regel parallel zum Passagieren der Zellen. Zunächst wurden die Zellen in einer 96er Wellplatte 1:5 in Trypanblau (1:4) verdünnt und anschließend in einem C-Chip – einer Einmal-Neubauer-Zählkammer – oder einer herkömmlichen Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Gezählt wurden die vier randständigen Quadrate, sodass man hieraus den Mittelwert ermitteln konnte.

Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl}/_{ml}$$

Alternativ erfolgte die Zellzählung automatisiert auf Smart Slides von ibidi mit Hilfe des Programms Cedex XS Messung. Die Zellsuspension wurde dafür 1:1 mit Trypanblau vermischt und auf die Smart Slides gegeben. Als Ausgabe wird sowohl die Gesamtzellzahl, als auch die Anzahl der vitalen Zellen angegeben. Nur die Zellzahl der vitalen Zellen wurde für die Anzucht verwendet.

#### 2.2.1.5 Anzucht einer Sphäroid-Kultur

Zur Anzucht der Sphäroide wurden die beiden Zelllinien SK-Mel-28 und MNT-1 verwendet. Zunächst wurden die Zellen gezählt und anschließend auf Nunclon Sphera 96-Well-Mikrotiterplatten mit rundem Boden von Thermo Scientific ausgesät. Verwendet wurden verschiedene Zellzahlen pro Well (500, 1000, 2000), die sich jeweils in 200 µl Medium befanden. Der Randwells der Platte wurde mit 200 µl 1X PBS befüllt, um die Sphäroide vor dem Austrocknen zu schützen. Zudem unterscheiden sich die Randwells häufig in ihrer Form, was auf die Produktion der Platte zurückzuführen ist. Um die Fehlerrate bzw. die Größenschwankungen bei der Reproduktion der Sphäroide zu minimieren, wurden diese Wells nicht zur Anzucht verwendet. Anschließend wurde die Platte bei Raumtemperatur und 500 rcf (*relative centrifugal force*) für 10 min zentrifugiert. Es wurden weitere Untersuchungen mit 750 rcf durchgeführt und diese Zentrifugenstärke anschließend beibehalten. Dadurch sammelten sich die Zellen am Boden und wuchsen über 72 h zu kompakten Sphäroiden heran. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>. Jeden Tag wurde der Durchmesser der Sphäroide gemessen, bis die entsprechende Größe zwischen 300 und

500  $\mu\text{m}$  für die Experimente erreicht war (meist nach 3 Tagen). Die Messung sowie die Bildaufnahme erfolgte mittels des Programms AxioVision 4.8 und der Harmony High Content Imaging and Analysis Software. Vor der Einbettung der Sphäroide wurde das alte Medium abgesaugt – bis auf etwa 15  $\mu\text{l}$  Restvolumen – und vorsichtig mit 1X PBS gewaschen. Anschließend wurden die Sphäroide über Nacht, dies entsprach etwa 16 bis 24 h, bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und am nächsten Tag weiterverarbeitet (siehe Kapitel 2.2.1.6).

### 2.2.1.6 Einbettung der Sphäroide in Microarrays

Nach der Fixierung in 4 % PFA waren die Sphäroide bereit zur Einbettung. Hierfür wurde zunächst 4 % Agarose aufgeköcht und bei 56 °C im Wasserbad zwischengelagert. Die sogenannten Mold-Maker – mit insgesamt 66 Pins/Stiften – wurden mit Silikon besprüht. Dadurch sollte das einfachere Herausziehen gewährleistet werden. Etwa 2,0-2,5 ml vorgewärmte Agarose wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette in eine rostfreie Stahlwanne gegeben. Die Agarose sollte nach Möglichkeit keine Blasen enthalten. Anschließend wurde der Mold-Maker vorsichtig waagrecht in die noch flüssige Agarose gedrückt. Es muss darauf geachtet werden, dass man nicht den Boden der Wanne berührt (keine Löcher bilden), gleichzeitig aber auch Mulden bildet, die tief genug sind, um die Sphäroide mit wenigen Mikrolitern ( $\mu\text{l}$ ) Flüssigkeit sicher voneinander zu trennen. Eingeschlossene Blasen sollten entfernt werden. Gegebenenfalls musste die Agarose erneut gegossen werden. Die Wanne wurde anschließend mit dem Mold-Maker für wenige Minuten bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt. Alternativ kann eine auf -18 °C heruntergekühlte Kühlplatte verwendet werden. Während der Wartezeit wurden einige Pipettenspitzen mit einer Schere oder einem Skalpell präpariert. Dafür wurde die Spitze der Pipette abgeschnitten, um eine größere Öffnung zu schaffen. Hierdurch konnten die Sphäroide ohne größere Schäden aufgenommen werden. Nachdem die Agarose erhärtet war, wurde der Mold-Maker vorsichtig entfernt. Hierzu empfiehlt es sich, die Wanne mit einem Finger festzuhalten und jede Seite zunächst separat zu lockern, ohne das Gel zu beschädigen. Die fixierten Sphäroide wurden in 4  $\mu\text{l}$  Flüssigkeit aufgenommen und in die Mulden im Gel gegeben. Zur Orientierung wurden ein bis zwei Mulden am Rand des Gels mit einem Marker – zum Beispiel Hämatoxylinlösungen A und B nach Weigert – befüllt. Der Farbstoff ist auch nach der Paraffineinbettung noch sichtbar. Nachdem alle Sphäroide im Gel eingebettet waren, wurde die Wanne bei 100 rcf für 2 min

zentrifugiert. Die Fixierung erfolgte unter Spannung mit einem Klebeband. Durch diesen Schritt werden alle gleich großen Sphäroide auf den Boden gedrückt und befanden sich dadurch in einer Ebene. Danach wurde langsam über den Rand der Wanne etwa 0,5-1 ml 2 % flüssige Low-melting-Agarose auf die noch offenen Mulden gegossen. Die entstandenen Luftblasen wurden vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Nicht entfernte Luftblasen können die Struktur der Agarose und damit der Paraffineinbettung stören. Zur Aushärtung wurde die Wanne mit der Agarose in den Kühlschrank gestellt. Abschließend wurde die Agarose in eine Kassette überführt. Es sollte darauf geachtet werden, dass die Seite mit der Low-melting-Agarose nach der Paraffineinbettung nicht als erstes geschnitten wird. Dies liegt daran, dass die Sphäroide sich auf dem Boden der 4 % Agarose befinden und man dadurch sehr viel Paraffin schneiden müsste, bis man die richtige Schnittebene erreicht hat. Die Orientierung der Agarose wurde mit Bleistift auf der Kassette vermerkt. Die weitere Paraffineinbettung erfolgte wie in Kapitel „2.2.1.7 Einbettung in Paraffin“ beschrieben.

#### **2.2.1.7 Einbettung in Paraffin**

Nach der Aufarbeitung und Einbettung der Sphäroide in Agarose wurde die Kassette in mehreren Schritten unter permanentem Umrühren entwässert. Zunächst wurde die Kassette mit dem Gewebe für 1 h in ein 50 %iges Ethanolbad gegeben. Danach jeweils für 1 h in ein 70 %iges, ein 90 %iges und abschließend vier Mal in ein 100 %iges Ethanolbad (I, II, III, IV) überführt. Zwischen den Überführungen wurde die Kassette leicht abgetrocknet, um eine Verunreinigung der nächsthöheren Konzentration zu minimieren. Hiernach erfolgten drei Bäder für je 1 h in Xylol (kurz Bad I, II, III) – nach IUPAC wird Xylol als Dimethylbenzen bezeichnet. Abschließend erfolgten 2 Bäder in flüssigem Paraffin bei etwa 60 °C für je 2 h. Alternativ konnte das erste Paraffinbad auch über Nacht erfolgen. Die Einbettung in die Paraffinblöcke erfolgte am nächsten Tag. Dafür wurde die Kassette aus dem zweiten Paraffinbad entnommen und der Deckel entfernt. Die zuvor für das Gießen der Agarose verwendete Wanne wurde mit flüssigem Paraffin befüllt. Die Probe wurde mit der „low-melting-Agarose“-Seite nach oben in das Paraffin gelegt. Danach wird die zweite Hälfte der Kassette vorsichtig auf die Probe gedrückt und mit weiterem Paraffin übergossen. Zum schnelleren Aushärten kann die Wanne bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt werden. Nachdem das Paraffin fest geworden war, konnte der Block aus der Wanne genommen werden und war bereit zum Schneiden.

Alternativ zum oben beschriebenen Verfahren wurden die in Agarose eingebetteten Sphäroide über Nacht in die Histokinette gegeben. Die Histokinette wurde nach einem Standardprotokoll betrieben. Zunächst wurden die Proben für 1 h in 40 °C Formaldehyd behandelt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol) für jeweils 1 h entwässert (50 %, 70 %, 90 %, 96 %, 96 %, 99 %, 99 %). Hiernach wurden die Proben bei 35 °C jeweils für eine Stunde in zwei Xylobädern (I, II) entfettet. Abschließend wurden die entwässerten und entfetteten Proben für jeweils 30 min in 61 °C warmem Paraffin behandelt. Dadurch wurde die Paraffineinbettung erleichtert und die in Kapitel „3.2.3 Fehlerquellen bei der Paraffineinbettung“ beschriebenen Fehlerquellen vermieden.

Am nächsten Tag wurden Paraffinschnitte mit einer Schichtdicke von 3-5 µm am Mikrotom angefertigt. Hierfür wurden die ausgehärteten Paraffinblöcke kurzzeitig bei einer Temperatur von -20 °C im Gefrierschrank abgekühlt, um das Schneiden von dünneren Schichten zu erleichtern. Die Schnitte wurden vorsichtig in ein lauwarmes Wasserbad überführt und auf Superfrost-Objektträger aufgenommen. Zum Strecken des Paraffins wurden die Objektträger kurz in ein auf 60 °C vortemperiertes Wasserbad überführt. Es sollte darauf geachtet werden, dass sich die Schnitte nicht zu lange im warmen Wasserbad befinden. Hierdurch wird das Herauslösen der Sphäroide und dadurch der Verlust minimiert. Das überschüssige Wasser wurde vorsichtig abgetupft und die Präparate für mehrere Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Das Trocknen bei hohen Temperaturen im Brutschrank (70 °C) führte zu einem schmierigen Schmelzen der Schnitte.

#### **2.2.1.8 Herstellung von Methocel für die Sphäroidkultivierung**

Es wurde gezeigt, dass Methylcellulose (Methocel) die Sphäroidanzucht bezüglich der Rundheit und Kompaktheit im *Hanging-Drop*-Verfahren verbessern kann (Leung et al. 2015). Für die Herstellung einer gebrauchsfertigen Lösung wurde zunächst 1,2 g Methylcellulose in einer Glasflasche mit einem Magnetrührer autoklaviert. Danach wurde 50 ml reines Medium (RPMI, DMEM) ohne Zusätze auf 50 °C erwärmt und zu der autoklavierten Methylcellulose hinzugegeben. Das Gemisch wurde langsam für 20 min bei Raumtemperatur unter der Sterilbank umgerührt. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen. Anschließend wurden weitere 50 ml Medium, die 20 % FCS enthielten, hinzugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C bei einer langsamen Geschwindigkeit gerührt. Der Rührprozess kann auf bis zu drei Tage ausgedehnt werden. Ein schnelles Umrühren wird

nicht empfohlen, da dadurch die Eigenschaften der Lösung verändert werden können und zusätzlich unerwünschte Luftblasen entstehen. Nach dem Rühren wurde die Lösung in zwei 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und bei 2500 g für 99 min zentrifugiert. Nur der klare und hochvisköse Überstand wurde weiterverwendet und in 2 ml Eppendorfgefäße aliquotiert. Die aliquotierten Eppendorfgefäße wurden bei -20 °C gelagert und sind bis zu einem Jahr haltbar. Vor der Verwendung der Aliquots wurden diese langsam bei 4 °C aufgetaut. Zum aliquotierten 1,2 %igen Methocel wurde anschließend 200 µl/ml Zellsuspension hinzugegeben, um eine finale Konzentration von 0,24 % zu erreichen. Die weitere Anzucht der Sphäroide erfolgte wie in Abschnitt „2.2.1.5 Anzucht einer Sphäroid-Kultur“ beschrieben.

## **2.2.2 Immunzytologische und immunhistochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Anfertigung von HE-Präparaten**

Aus den Paraffinblöcken wurden 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt und vorsichtig in kaltes Wasser gelegt. Nach der Aufnahme auf einen Objektträger wurden die Schnitte in ein auf etwa 40-50 °C vortemperiertes Wasserbad überführt. Hierdurch wurden Unebenheiten gestreckt. Im Anschluss wurden die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde jeweils für 10 min eine Entparaffinierung über eine Xylolreihe 1, 2 und 3 durchgeführt. Xylol ist ein organisches Lösungsmittel, was sich gleichmäßig mit Ethanol und Paraffin vermischt. Dieser Schritt entfällt bei den Gefrierschnitten. Die weiteren Schritte erfolgten für beide Schnittverfahren analog. Anschließend wurden die Präparate jeweils 20-mal in eine von 100 % auf 50 % absteigende Ethanolreihe getaucht. Aus der 50 %igen Ethanollösung wurden die Präparate in Leitungswasser abgewaschen und leicht trocken geklopft. Hiernach erfolgte eine 7 min Kernfärbung in Hämatoxylinlösungen A und B nach Weigert (vor Gebrauch 1:1 Mischung aus Hämatoxylinlösung A nach Weigert mit Hämatoxylinlösung B nach Weigert, siehe Tab. 6), gefolgt von einem Waschschrift in lauwarmem Leitungswasser, bis keine Farbwolke mehr zu sehen war. Dadurch kam es zur pH-Wert Änderung. Im Anschluss daran wurden die Präparate für 5 min in Eosin Y gestellt, um die übrigen Zellbestandteile zu färben. Das Waschen der Präparate erfolgte analog zum ersten Färbeschritt. Die gefärbten Präparate wurden danach jeweils 20-mal in eine aufsteigende Ethanolreihe getaucht und abschließend in Xylol eingestellt. Nach der Entnahme aus der Xylollösung wurden die Schnittpräparate abgetrocknet und mit Hilfe einer Glaspipette mit bis zu drei Tropfen eines Eindeckmittels (Eukitt) betropft, bevor sie mit einem Deckglas

versiegelt wurden. Mögliche Luftblasen wurden mit einer Präpariernadel entfernt und überschüssiges Eindickmittel mit einem Tuch abgewischt. Vor dem Mikroskopieren wurden die Präparate über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Derartig konservierte Präparate sind Jahrzehntelang haltbar.

### **2.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung**

Das Prinzip der Immunfluoreszenz basiert auf der Antigen-Antikörper-Bindung sowie der Kopplung mit fluoreszierenden Farbstoffen. Diese Farbstoffe können bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und emittieren anschließend Licht einer spezifischen Wellenlänge. Dieses kann mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops detektiert werden. Grundsätzlich lassen sich zwei Methoden unterscheiden. Entweder der fluoreszierende Farbstoff ist bereits am primären Antikörper gebunden (primär gelabelter Antikörper) und erkennt das Antigen direkt, oder es wird ein sekundärer Antikörper benötigt, welcher wiederum fluoreszenzmarkiert ist. Der sekundäre Antikörper erkennt dabei die Spezies (Kaninchen, Maus) des primären Antikörpers und damit nur indirekt das Antigen. Dadurch kann der sekundäre Antikörper unterschiedliche primäre Antikörper einer bestimmten Spezies, gegen die dieser gerichtet ist, detektieren.

Zunächst wurden die geschnittenen und bei Raumtemperatur getrockneten Paraffinpräparate entparaffiniert. Hierfür wurden die Objektträger für 5 min und anschließend für weitere 3 min in jeweils ein separates Xylolbad gestellt. Hiernach erfolgte eine absteigende Ethanolreihe – zweimal 100 % und jeweils einmalig 90 %, 80 %, 70 % Ethanolbad – für jeweils 3 min pro Bad. Im Anschluss daran wurden die Präparate für 5 min in 1X PBS gewaschen. Zum Antigen-Masking wurden die Proben für 30 min bei Raumtemperatur in Triton-X behandelt und anschließend 5 min in PBS gewaschen. Die Probe wurde danach mit dem Dako Pen umrandet. Als nächstes erfolgte eine Blockierung für 30 min mit Dako Protein Block. Nach der Blockierung wurden die Objektträger erneut für 4 min in PBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer mit dem primären Antikörper in einer 1:1 Mischung von PBS mit Dako Protein Block verdünnt inkubiert. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper durch dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 3 min abgelöst. Alternativ konnte die Inkubation über Nacht gegen eine 1 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank ersetzt werden. Hiernach wurde der sekundäre Antikörper – in einer Verdünnung von 1:200 in der 1:1 Mischung von PBS mit Dako Protein Block – für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.



Anschließend wurden die Objektträger erneut drei Mal – für jeweils 3 min – in PBS gewaschen. Hiernach wurden die Proben für weitere 5 min mit DAPI (10 µM) inkubiert. Abschließend wurden die Proben mit Fluoromount-G™ eingebettet und im Dunklen aufbewahrt.

### 2.2.2.3 TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Färbung (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) beruht auf dem Prinzip einer enzymatischen Reaktion, die an freie 3'-OH-Gruppen von DNA-Strangbrüchen fluoreszenzmarkierte Nukleotide anheftet. Diese können anschließend am Fluoreszenzmikroskop oder mit der Durchflusszytometrie detektiert werden. DNA-Doppelstrangbrüche, kleinere DNA-Fragmente sowie Einzelstrangbrüche, die als „nicks“ bezeichnet werden, können während der Apoptose bei der Teilung genomischer DNA entstehen.

Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert. Hierfür wurden die Objektträger zunächst zwei Mal für jeweils 5 min in Xylol gestellt und anschließend in eine absteigende Ethanolreihe (100 %, 100 %, 90 %, 80 %, 70 % Ethanol) für jeweils 3 min überführt. Abschließend wurde zwei Mal mit destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) und einmal für 5 min in PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte für 8 min in einer Lösung aus 0,1 % Triton X-100 und 0,1 % Natriumcitrat auf Eis. Hiernach wurden die permeabilisierten Proben erneut für 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde der TUNEL-Mix – bestehend aus Enzyme Solution und Label Solution in einem Verhältnis 1:10 – hergestellt. Es wurde jeweils etwa 100 µl TUNEL-Mix auf die – mit einem Fettstift von Dako umrandeten – Sphäroidschnitte gegeben. Eine Anpassung der Menge muss je nach Gewebegröße individuell erfolgen. Die Präparate wurden für 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend dreimal 3 min in PBS gewaschen. Es muss darauf geachtet werden, dass nach der Zugabe des TUNEL-Mix alle weiteren Schritte im Dunklen erfolgen. Hierfür kann ein Transportcontainer genutzt werden. Die fertigen Präparate können nun im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 450-500 nm und einer Emissionswellenlänge von 515-565 nm (grün) betrachtet werden.

Falls ein weiterer Antikörper verwendet werden soll, kann dies ähnlich wie in „2.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung“ beschrieben erfolgen. Hierfür werden die Objektträger für weitere 30 min in einer feuchten Kammer mit Dako Block blockiert. Anschließend wird für 4 min in PBS gewaschen und 100 µl des primäre Antikörpers (mit einer Verdünnung von 1:20 - 1:100

in einer Lösung aus Dako-Block mit PBS (1:1) vermischt) auf die Proben gegeben. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgt über Nacht bei 4 °C. Alternativ können die Proben für 1 h bei 37 °C inkubiert werden. Am nächsten Tag oder nach 1 h werden die Proben drei Mal drei Minuten in reinem PBS gewaschen. Danach wird der sekundäre Antikörper hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur wird erneut drei Mal für jeweils 5 min in PBS gewaschen und mit DAPI (10 µM) gefärbt. Abschließend wird die Probe in Fluoromount-G<sup>TM</sup> Medium eingebettet und mit einem Deckglas verschlossen. Die Mikroskopierung sollte innerhalb der nächsten Tage erfolgen. Während der Zwischenzeit sollten die Präparate bei 4 °C im Dunklen gelagert werden.

#### **2.2.2.4 Immunhistochemie**

Nach dem Prinzip der Antigen-Antikörperbindung wurden spezifische Antigene, wie z. B. Proteine angefärbt, um im Anschluss unter dem Mikroskop detektiert werden zu können.

Zunächst erfolgte eine Entparaffinierung der Schnitte. Dafür wurden die Objektträger drei Mal für jeweils 10 min in Xylol gespült und anschließend in eine absteigende Ethanolreihe (96 %, 80 %, 70 %, 50 %) für jeweils 5 min überführt. Im Anschluss wurden die Paraffinschnitte in mehreren dH<sub>2</sub>O-Bädern gewaschen. Als nächstes wurden die Proben für 20 min in 0,25 % Triton-X-100-Lösung demaskiert und zweimal in PBS gewaschen. Hiernach wurden die Schnitte für weitere 10 min in 3 %ige Wasserstoffperoxidlösung gegeben und danach zweimal in PBS gewaschen, bevor sie mit einem Dako Pen eingekreist wurden. Für die folgenden Schritte wurde eine feuchte Kammer verwendet. Die Präparate wurden mit Dako Protein Block blockiert. Nach einer 30 min Blockierung wurden die Schnitte zweimal in Tris-gepufferter Kochsalzlösung und Tween 20 (TBST) gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper (1:50 in Antibody Diluent II verdünnt) über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der primäre Antikörper mit TBST abgespült und für weitere 5 min unter Schütteln in TBST gewaschen. Hiernach wurde für 30 min ein Histofine Simple Stain Mouse Max PO Nachweisreagenz auf die Schnitte aufgetragen. Es sollte darauf geachtet werden, dass dieser mit dem primären Antikörper kompatibel ist (Maus, Kaninchen, Ratte etc.). Danach wurde das Nachweisreagenz vorsichtig mit TBST abgespült und für 10 min mit 3,3'Diaminobenzidine-(DAB)-Konzentrat – einer Mischung aus 1 ml Liquide DAB+-Substrat und einem Tropfen DAB-Chromogen aus einem Kit-System – inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen und

mit Hämatoxylinlösungen A und B nach Weigert gegengefärbt. Hierfür wurden die Schnitte für 4 min in Hämatoxylinlösungen A und B nach Weigert gestellt, welches vorher filtriert oder frisch angesetzt wurde (Tab. 6). Danach wurden die Schnitte kurz in dH<sub>2</sub>O gespült und mit lauwarmem Leitungswasser zweimal gewaschen, um eine Blaufärbung der Präparate zu erreichen. Abschließend wurden die Proben in eine aufsteigende Ethanolreihe – 80 %, 96 %, 96 %, 100 % für jeweils 5 min – gestellt und zweimal für jeweils 5 min in Xylol gewaschen, bevor sie mit Eindeckmittel versiegelt wurden. Nach dem Trocknen können die Schnitte mikroskopiert werden.

### **2.2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung von ganzen Sphäroiden**

Dieses Verfahren besteht aus einer Kombination aus Sphäroidanzucht (vgl. Kapitel „2.2.1.5 Anzucht einer Sphäroid-Kultur“), einer beliebigen Behandlung (z. B. einer direkten Plasmabehandlung) und primär gelabelten Antikörpern zur Detektion im CLS-Gerät. Zunächst werden die Sphäroide wie in Kapitel 2.2.1.5 kultiviert und nach 72 h mit Plasma behandelt. Daraufhin wurden die behandelten Sphäroide für weitere 24 h im Brutschrank bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. 24 h nach der Behandlung wurde das Zellmedium vorsichtig entfernt und die Sphäroide gründlich mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurde das PBS gegen eine 1 %ige PFA-Lösung ersetzt und die Sphäroide für 1 h bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank fixiert. Nach der Fixierung wurde das PFA verworfen und die Sphäroide gründlich mit PBS gewaschen. Es ist darauf zu achten, dass die plasmabehandelten Sphäroide fragiler sein können als die Kontrollsphäroide. Anderenfalls kann es zum partiellen oder kompletten Sphäroidverlust kommen. Die gewaschenen Sphäroide wurden anschließend für 24 h bei 4 °C im Kühlschrank in einer 0,25 %igen Triton-X-100-Lösung, die die primär gelabelten Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 – 1:100 sowie DAPI (10 µM) enthält, inkubiert. Durch die lange Einwirkzeit soll eine gleichmäßige Verteilung der Fluorophore ermöglicht werden. Vor der Aufnahme am CLS-Gerät müssen die Sphäroide erneut mit PBS gewaschen werden, um die Hintergrundfluoreszenz zu verringern. Das Waschen sollte dabei möglichst schnell erfolgen und die Sphäroide während jeder längeren Unterbrechung im Dunkeln gelagert werden. Hierdurch soll ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe minimiert und die Qualität der Fluoreszenzaufnahme verbessert werden.

### 2.2.2.6 Aufbau und Funktion des CLS-Gerätes

Das Operetta CLS-Gerät von PerkinElmer ist ein automatisiertes Zell-Imaging-System und besteht aus einer kompakten 8x LED-Lichtquelle zur optimalen Auswahl der Fluorophorlichtwellenlänge sowie einer Drehscheibentechnologie, die mehrere Punkte gleichzeitig erfassen kann. Hierdurch wird die Aufnahmezeit des Scans verkürzt. Zudem ermöglicht die sCMOS (*Scientific Complementary Metal-Oxide Semiconductor*)-Kamera ein geringeres Hintergrundrauschen, einen größeren dynamischen Bereich und eine höhere Auflösung. Dadurch lassen sich empfindliche und quantitative Messungen bei kurzer Belichtungszeit erzielen. Des Weiteren besitzt das CLS-Gerät Wasserimmersionsobjektive mit einer hohen numerischen Apertur und bietet dadurch eine höhere Auflösung in allen drei Ebenen (XYZ). Zudem wird bis zu viermal mehr Licht als mit einem Luftobjektiv erfasst. Hierdurch können empfindliche, lebende Zellproben, wie beispielsweise Tumorsphäroide, mit wenig Licht betrachtet werden, um diese vor Lichtschäden zu schützen, oder die Aufnahmequalität mit Hilfe der 3D-Stapelaufnahme gesteigert werden. Optional kann die Temperatur sowie der CO<sub>2</sub>-Partialdruck reguliert werden (Zusammenfassung der Herstellerangaben Inc, PerkinElmer; Stand: Dezember 2018).

### 2.2.3 Plasmabehandlung

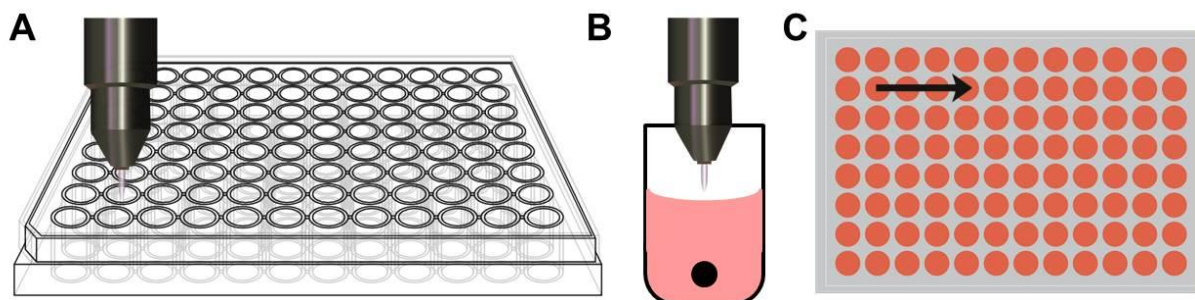
Die Plasmabehandlung erfolgte mit dem Plasmagerät kINPen MED® von neoplas tools GmbH. Als Arbeitsgas wurde Argon mit einem Gasfluss von 3 slm verwendet. Vor dem Gebrauch wurde das Plasmagerät für etwa 30 min bei 5 slm betrieben, um mögliches Kondenswasser in den zuleitenden Leitungen zu trocknen und dadurch keine durch Wasser verursachte Radikale zu erzeugen. Tabelle 15 fasst die technischen Werte des kINPen MED® zusammen (vgl. Tab. 15).

**Tabelle 15:** Technische Werte des kINPen MED von neoplas tools GmbH Greifswald (zusammengefasst nach von Woedtke et al. 2013; Reuter et al. 2018; Bekeschus et al. 2016).

Technische Daten	kINPen MED
Länge	170 mm
Durchmesser	20 mm
Gewicht	170 g
Stromversorgungssystem	8 W bei 220 V, 50/60 Hz
Betriebszyklus	Plasma On/Off = 1:1
Quarzkapillare	
Innendurchmesser	1,6 mm
Außendurchmesser	2,0 mm
Elektrodenadeldurchmesser	1,0 mm
Haltefrequenzspannung	1,1 MHz, 2-6 kV <sub>PP</sub>
Gasfluss	3-5 slm
Arbeitsgas	Argon
Effluentlänge/-durchmesser	9-14 mm/ 1mm
Temperatur bei Arbeitsdistanz	35-38 °C
UV-Strahlung bei Arbeitsdistanz	UVA: 5-15 µW/cm <sup>2</sup> UVB: 5-15 µW/cm <sup>2</sup>

### 2.2.3.1 Direkte Plasmabehandlung

Für die direkte Plasmabehandlung wurde der Effluent des Plasmagerätes nahe oberhalb der Luft-Flüssigkeitsgrenze ausgerichtet (Abb. 5 A-B). Um die Gefahr des Übertrittes von Flüssigkeit aus dem Well zu minimieren, wurde vor der Behandlung etwa die Hälfte (100  $\mu$ l) Medium aus jedem Well entnommen. Anschließend wurde der Plasmajet jeweils vorsichtig von oben über das zu behandelnde Well geführt und in dieser Position über die ganze Behandlungszeit fixiert (Abb. 5 B-C). Nach der Behandlung wurden die 96-Well-Platten für weitere 24 h im Brutschrank bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und am nächsten Tag in 4 % PFA für weitere 16-24 h bei 4 °C fixiert. Die Behandlungszeiten variierten von 20 s bis 89 s pro Well.

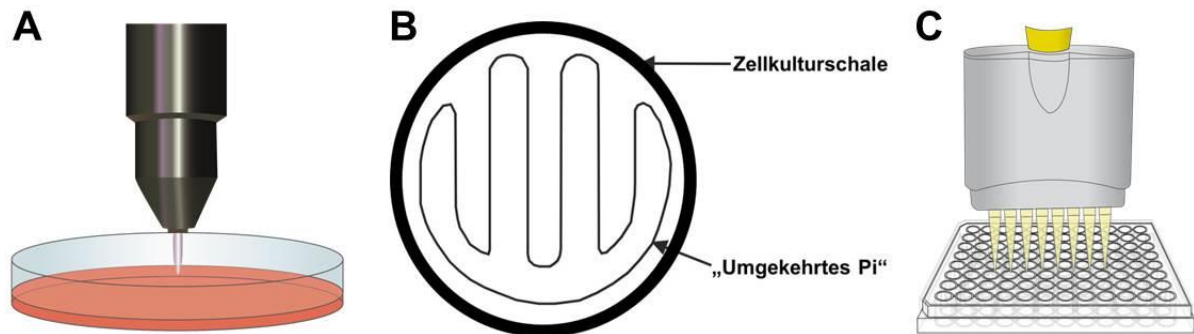


**Abbildung 5:** Schematische Darstellung einer direkten Plasmabehandlung mit dem kINPen MED®. Als Arbeitsgas wurde 3 slm Argon verwendet. **A:** Übersichtsbild einer Plasmabehandlung einer 96-Wellplatte. **B:** Vergrößerte Darstellung der direkten Plasmabehandlung. Der Effluent des Plasmagerätes wird kurz oberhalb der Luft-Flüssigkeitsgrenze platziert. Durch den Luftstrahl des Plasmagerätes wird das Kulturmedium (rosa) zur Seite gedrückt. Es muss darauf geachtet werden, dass das Well nicht zu voll befüllt ist. **C:** Richtung der Plasmabehandlung. Die Plasmabehandlung erfolgte horizontal. Vor jedem Well wurde das Plasmagerät angehoben und mittig über dem jeweils nächsten Well platziert.

### 2.2.3.2 Indirekte Plasmabehandlung

Bei der indirekten Plasmabehandlung wurde 5 ml Medium in einer 60-mm-Petrischale mit einem Gasfluss von 3 slm behandelt (Abb. 6: A). Hierfür wurde ein „umgekehrtes Pi“ mit dem Plasmajet abgefahren (Abb. 6: B). Durch die Behandlung des Mediums kamen die Sphäroide nicht direkt in Kontakt mit dem Plasma-Effluenten, sondern indirekt über die im Medium generierten Spezies. Das behandelte Medium wurde anschließend in die vorher abgesaugten Wells mit den Sphäroiden pipettiert (Abb. 6: C). Abschließend wurden die 96-Well-Platten für 24 h im Brutschrank bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und am nächsten Tag in 4 % PFA für 16-24 h bei 4 °C fixiert. Es wurden Behandlungszeiten von 60 s bis 300 s verwendet, die denen der direkten

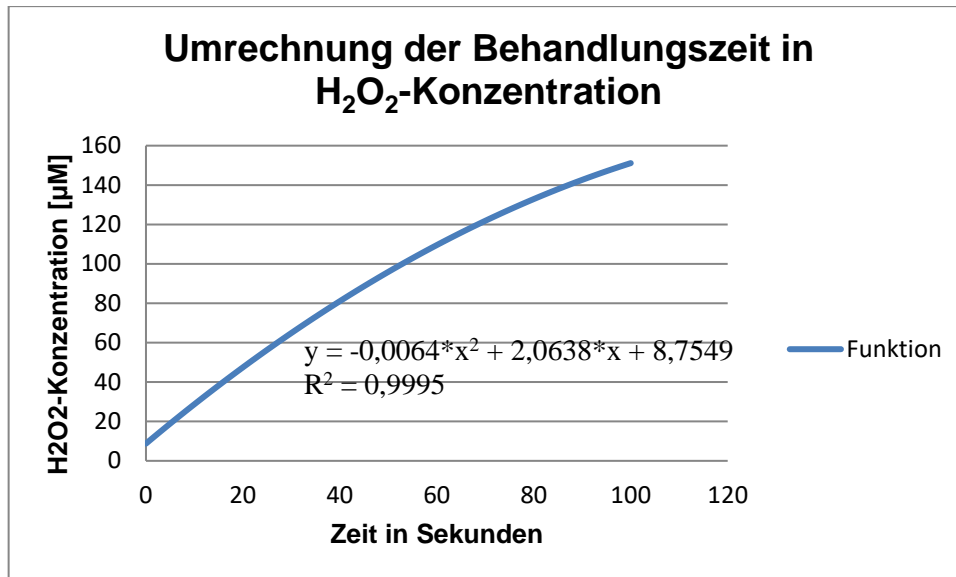
Plasmabehandlung (19 s und 89 s) entsprechen. Die Entsprechung dieser Zeiten wurde am INP Greifswald erhoben. Hierfür wurde jeweils die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration zum einen nach einer direkten Plasmabehandlung der einzelnen Wells und zum anderen nach einer Plasmabehandlung von 5 ml Medium, welches anschließend auf die einzelnen Wells verteilt wurde, gemessen (Unveröffentlichte Arbeiten: Stand Mai 2018).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der indirekten Plasmabehandlung. **A:** Behandlung des Mediums (rot) mit dem kINPen Med®. **B:** Der kINPen Med wird automatisch über die Platte gefahren, um eine gleichmäßige Behandlung des Mediums zu erreichen. Die Form wird als „umgekehrtes Pi“ bezeichnet. **C:** Das behandelte Medium wird vorsichtig in die 96-Well-Platte pipettiert. Vorher wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und verworfen.

### 2.2.3.3 Positivkontrolle mittels Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )-Behandlung

Die Generierung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS) spielt eine wesentliche Rolle bei der Behandlung einer Flüssigkeit mit Plasma. Um die Effekte teilweise nachzustellen, wurde Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nach der Formel in Abbildung 7 berechnet. Die Formel stellt eine quadratische Regression von mehreren Messpunkten auf der x-Achse in Bezug auf die zu diesem Zeitpunkt gemessene  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ( $\mu\text{M}$ ) auf der y-Achse im Zellkulturmedium dar. Die verwendeten Daten wurden während vorheriger Arbeiten am INP in Greifswald erhoben. Die entsprechende Konzentration wurde zu dem Medium hinzugegeben. Danach wurden die 96-Well-Platten für weitere 24 h im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$ , einer Luftfeuchtigkeit von 90 % und einer Atmosphäre mit 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert und am nächsten Tag in 4 % PFA für weitere 16-24 h bei  $4^\circ\text{C}$  fixiert.



**Abbildung 7:** Umrechnung der Behandlungszeit einer direkten Plasmabehandlung zu verschiedenen Messzeitpunkten in die entsprechende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration. Der Graph ergibt sich aus der Formel  $y = -0,0064 \cdot x^2 + 2,0638 \cdot x + 8,7549$  mit einem  $R^2 = 0,9995$ . Die Formel wurde mittels mehrerer Messpunkte und mit Hilfe einer quadratischen Regression berechnet. Die Daten stammen aus Berechnungen von noch nicht veröffentlichten Arbeiten am INP [Stand: 05/2018].

#### 2.2.4 Gepulste elektrische Felder (PEF)

Die Behandlung der Sphäroide mit gepulsten elektrischen Feldern (PEF) erfolgte 72 h nach dem Aussähen der Zellen (1000 SK-Mel-28; 2000 MNT-1). Hierfür wurde zunächst etwa 100 µl Zellmedium in eine Elektroporationsküvette mit einem 1 mm Spalt überführt. Anschließend wurden die Sphäroide einzeln hinzugegeben. Es muss darauf geachtet werden, dass die Sphäroide zwischen den beiden Elektroden platziert werden, da ansonsten keine Elektroporation stattfindet. Sphäroide derselben Zelllinie sowie der gleichen Behandlungsmodalität können gleichzeitig behandelt werden. Die Elektroporationsküvette wurde anschließend in dem Elektroporator (Metall an Metall) platziert und die Spannung, die Pulsanzahl sowie das Gesamtintervall eingestellt. Nach der Behandlung wurden die Sphäroide vorsichtig mit einer Pasteurpipette in eine Zellkulturschale mit etwa 4-5 ml Zellmedium überführt. Der Transfer sollte nach Möglichkeit ohne Luftblasen erfolgen. Abhängig von den Sphäroidfarben (weiß bei den SK-Mel-28- und schwarz bei den MNT-1-Zellen) kann die Zellkulturschale auf unterschiedliche Hintergründe gestellt werden, um das Identifizieren der Sphäroide zu erleichtern. 24 h nach der PEF-Behandlung wurden die Sphäroide in 4 % PFA über Nacht bei 4 °C fixiert und am nächsten Tag in Agarose eingebettet.

Verwendet wurde eine Feldstärke von 1 kV/cm mit 8 Pulsen mit einer Zeitdauer von jeweils 10 µs bzw. 100 µs über eine Gesamtlänge von 1 s. Die Spannung muss für unterschiedliche



Elektroporationsküvetten individuell in Abhängigkeit der Spaltgröße und der gewünschten Feldstärke berechnet werden.

Im Folgenden erfolgt eine kurze Herleitung der Berechnung der elektrischen Feldstärke  $\vec{E}$ . Die Umrechnung der einzelnen SI-Einheiten können aus Büchern der Physik entnommen werden.

Es gilt, dass die elektrische Feldstärke  $\vec{E}$  Newton (N) pro Coulomb (C) entspricht.

Ferner gilt hieraus:

$$\vec{E} = \frac{N}{C} = \frac{J}{C \times m} = \frac{Ws}{As \times m} = \frac{VA \times s}{As \times m} = \frac{V}{m}$$

Daraus folgt exemplarisch, dass für 1 kV/cm bei einer Spaltgröße von  $m = 1 \text{ mm}$ , die 0,1 cm entspricht, genau  $V = 100 \text{ V}$  Spannung benötigt werden:

$$\vec{E} = \frac{100 \text{ V}}{0,1 \text{ cm}} = 1 \frac{\text{kV}}{\text{cm}}$$

Aus den obigen Formeln lassen sich alle weiteren Modifikationen berechnen.

## 2.2.6 Statistik

Die Messung der Sphäroiddurchmesser erfolgte am Zeiss Mikroskop Axiovert 40 CFL bei einer 5-fachen Vergrößerung mit dem Programm AxioVision 4.8. Pro Sphäroid wurden mindestens zwei Werte verwendet und der Mittelwert aus diesen beiden gebildet. Die Gesamtfläche sowie die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity* – MFI) der Sphäroidschnitte wurde am CLS-Gerät bei einer 5-fachen Vergrößerung aufgenommen und mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software ausgewertet. Dabei wurde jeweils der Mittelwert der MFI mit der entsprechenden Standardabweichung dargestellt. Die weiteren Auswertungen und grafischen Darstellungen erfolgten mit den Programmen GraphPad Prism 7, Microsoft Office Excel 2010 und Microsoft Office PowerPoint 2010. Zur Berechnung der Signifikanzen zwischen zwei verschiedenen Proben wurde – falls nicht anders angegeben – der Students T-Test angewandt. Die p-Werte wurden mit Sternchen versehen. Dabei entspricht ein Sternchen (\*) einem p-Wert von  $p \leq 0,05$ , das von zwei Sternchen (\*\*) einem p-Wert von  $p \leq 0,01$  und das von drei Sternchen (\*\*\*) einem p-Wert von  $p \leq 0,001$ . Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde für alle Versuche auf einen Wert von  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Vorarbeiten zur Erreichung einer konstanten Sphäroidgröße

#### 3.1.1 Einfluss der Zellzahl auf den Sphäroiddurchmesser

Bevor die Sphäroide in Agarose eingebettet werden konnten, musste sichergestellt werden, dass stets eine reproduzierbare Größe erreicht wird. Die Sphäroide wurden nach 72 Stunden fixiert, sodass sich die folgenden Ergebnisse auf dieses Zeitintervall beschränken. Ein vergleichbarer Durchmesser zwischen den einzelnen Proben sowie unter den verschiedenen Zelllinien (SK-Mel-28 und MNT-1) ist besonders wichtig, da die Ergebnisse der Einbettung und die der Paraffinschnitte wesentlich davon abhängen. Ziel war es, dass alle Proben in etwa derselben Ebene zu liegen kommen. Des Weiteren musste ein optimales Zeitintervall zwischen der Aussaat und Weiterverarbeitung gefunden werden, das zum einen den kritischen Durchmesser von 300 bis 500  $\mu\text{m}$  (Vinci et al. 2013 und Vinci et al. 2012) gewährleistet und zum anderen den Zellen genügend Zeit gibt, sich so stark zu aggregieren, dass sie während der Einbettungsschritte nicht zerstört werden.

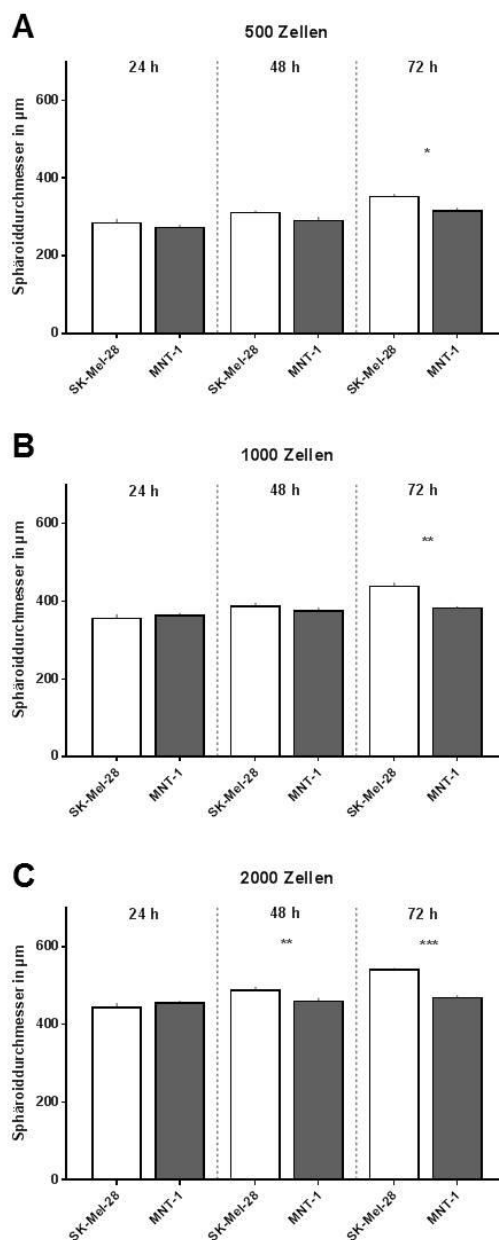
Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene Zellzahlen über insgesamt drei Tage beobachtet. Hierbei wurde täglich der Durchmesser an zwei verschiedenen Stellen der runden Sphäroide gemessen und jeweils der Mittelwert gebildet. Die folgende Abbildung 8 A-C veranschaulicht den Zellzuwachs pro Tag sowie die unterschiedlichen Sphäroiddurchmesser in  $\mu\text{m}$  im Hinblick auf die verwendeten Zellzahlen bei der Aussaat.

Betrachtet man die einzelnen in Abbildung 8 dargestellten Diagramme so wird ersichtlich, dass der Sphäroiddurchmesser – unabhängig von der Zellzahl zum Zeitpunkt  $t = 0$  – pro Tag signifikant ansteigt (mit  $p$  jeweils  $p \leq 0,05$  für jede Zelllinie, Ergebnisse nicht dargestellt). Des Weiteren hängt die Sphäroidgröße zu jedem Zeitpunkt der Messung signifikant von der Zellzahl ab (mit  $p$  jeweils  $p \leq 0,05$  für jeweils jede Zelllinie im Größenvergleich [500 mit 1000, 1000 mit 2000 und 500 mit 2000 Zellen], Ergebnisse nicht dargestellt). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien (SK-Mel-28 und MNT-1) wird bei 500 ( $p = 0,01043$ ) und 1000 ( $p = 0,0028$ ) Zellen nach 72 h und bei 2000 Zellen ( $p = 0,0095$  nach 48 h und  $p < 0,001$  nach 72 h) bereits nach 48 h ersichtlich (Abb. 8: A-C). Hieraus wurde geschlossen, dass die MNT-1 Zellen langsamer wachsen als die SK-Mel-28 Zellen. Um beide Zelllinien zusammen auf einer Agaroseplatte weiterverarbeiten zu können, wurde die Zellzahl in weiteren Versuchen auf 1000 SK-Mel-28 Zellen und 2000 MNT-1 Zellen

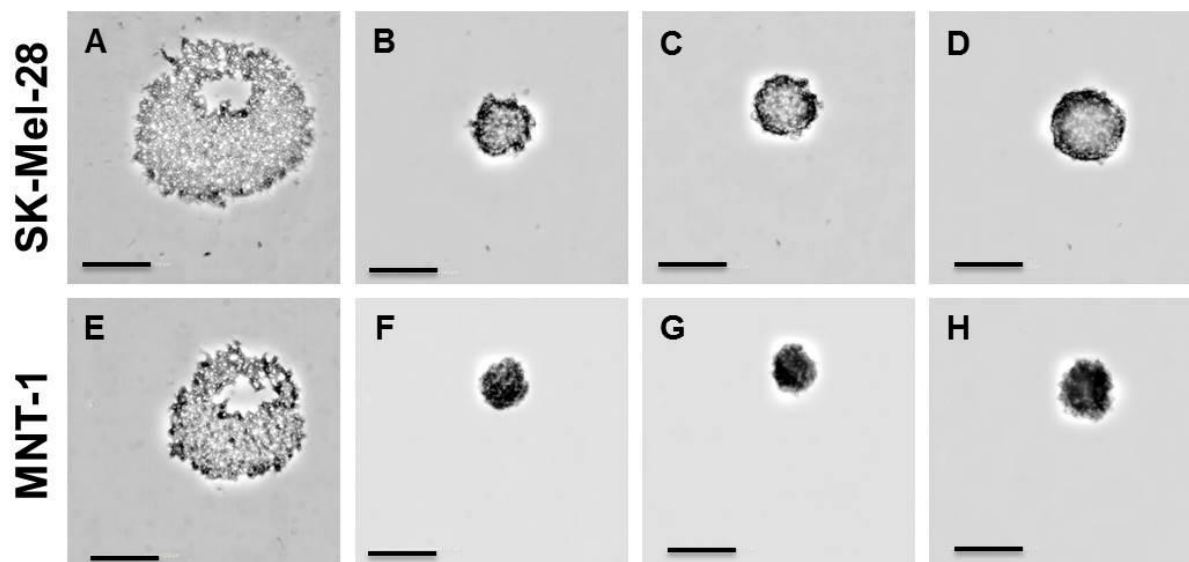
angepasst. Damit wurde erreicht, ähnlich große Sphäroide über die Zelllinien hinweg zu generieren. Dennoch blieb ein signifikanter Unterschied nach 72 h erhalten (p-Wert nicht angegeben). Die Abbildung 9 veranschaulicht anhand repräsentativer Bilder das Zellwachstum über 72 h von den beiden Zelllinien SK-Mel-28 (A-D) und MNT-1 (E-H). Hierbei wurden jeweils 1000 Zellen zum Zeitpunkt  $t = 0$  h ausgesät (Abb. 9). Die Zunahme der Rundheit bei den SK-Mel-28-Zellen lässt sich deutlicher erkennen als die der MNT-1-Zellen über drei Tage. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem CLS-Gerät bei 5-facher Vergrößerung.

Abbildungen 10 und 11 veranschaulicht optisch die in Abbildung 8 dargestellten Erkenntnisse. Es lässt sich erkennen, dass das Wachstum der Sphäroide über die Zeit nicht direkt proportional zur Zellzahl zunimmt (Korrelation nicht enthalten). Die Form und Kompaktheit hingegen nehmen mit steigender Zellzahl rundere und dichtere Gestalt an.

Des Weiteren wachsen die Sphäroide, unabhängig von der Zelllinie und der ausgesäten Zellzahl, pro Tag signifikant (p-Werte nicht dargestellt). Zudem lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der verwendeten Zellzahl zum Zeitpunkt  $t = 0$  h und dem Sphäroiddurchmesser erkennen. Daraus folgt, dass die Sphäroidgröße unabhängig von der Zeit (24 h, 48 h, 72 h) und der Zelllinie (SK-Mel-28, MNT-1) von der Zellzahl bei der Aussaat abhängt (vgl. Tabelle 16).



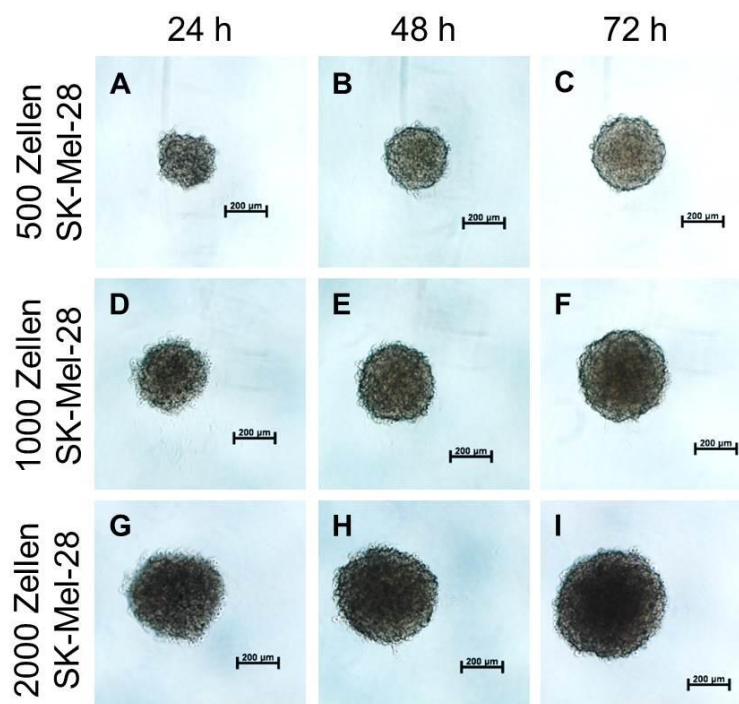
**Abbildung 8:** Sphäroidgröße in Abhängigkeit von der Zellzahl über 72 h. Dargestellt sind drei Diagramme (A, B, C) mit jeweils unterschiedlich ausgesäten Zellzahlen an Tag 0. Verwendet wurden zwei verschiedene Zelllinien (SK-Mel-28 in weiß und MNT-1 in schwarz dargestellt) und drei verschiedene Zellzahlen (500 (A), 1000 (B) und 2000 (C) Zellen). Die Zentrifugation erfolgte bei 500 rcf für 10 min. Auf der x-Achse ist die Zeit in 24-Stunden-Abständen (24h, 48 h, 72 h) und auf der y-Achse der Sphäroiddurchmesser in µm mit Standardabweichung dargestellt (n = 5 mit dem Mittelwert aus je zwei Messpunkten pro Sphäroid). Das Signifikanzniveau für einen Größenunterschied zwischen den beiden Zelllinien (SK-Mel-28 und MNT-1) entspricht \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Weitere Signifikanzen wurden nicht dargestellt und werden im Kontext erörtert. Der Durchmesser wurde am Zeiss Mikroskop Axiovert 40 CFL bei einer 5-fachen Vergrößerung mit dem Programm AxioVision 4.8 ausgemessen. **A:** Ausgesät wurden 500 Zellen und über drei Tage (24h, 48h, 72h) beobachtet sowie der Durchmesser beider Zelllinien ausgemessen. Nach 72 h sind die SK-Mel-28-Sphäroide signifikant größer als die aus MNT-1-Zellen ( $p \leq 0,05$ ). **B:** Ausgesät wurden 1000 Zellen und über 72 h beobachtet. Wie bei A zeigt sich nach 72 h ein signifikanter Unterschied zwischen den Sphäroiden aus SK-Mel-28- und den aus MNT-1-Zellen ( $p \leq 0,01$ ). **C:** Ausgesät wurden 2000 Zellen und über 72 h beobachtet. Bereits nach 48 h ( $p \leq 0,01$ ) zeigt sich ein signifikanter Unterschied. Dieser ist nach 72 h hochgradig signifikant mit einem p-Wert von  $p \leq 0,001$ .



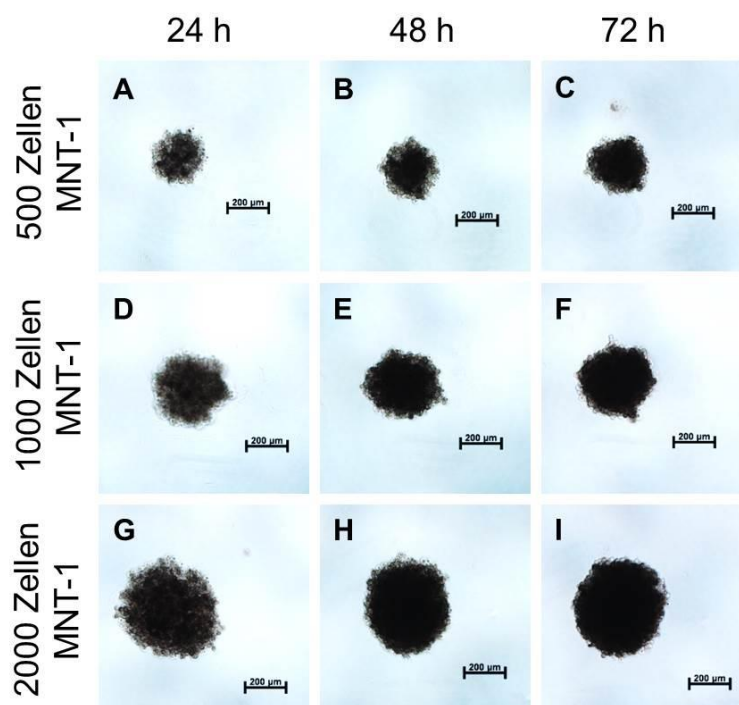
**Abbildung 9:** Zellwachstum über 72 h. Ausgesät wurden jeweils 1000 Zellen der beiden Zelllinien SK-Mel-28 (A-D) und MNT-1 (E-H) und über 72 h beobachtet. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS. Die Maßstabsskala beträgt 500  $\mu\text{m}$ . Die Sphäroide wurden bei 500 rcf zentrifugiert. Zwischen den Bildaufnahmen wurden die Sphäroide im Brutschrank kultiviert. **A:** 1000 SK-Mel-28-Zellen zum Zeitpunkt  $t = 0$  h, direkt nach der Zentrifugation aufgenommen. Die Sphäroidbildung ist noch nicht abschließend erfolgt. Die Zellen ballen sich im zeitlichen Verlauf weiter zusammen. **B:** Sphäroid 24 h nach Aussaat. **C:** Sphäroid 48 h nach Aussaat. **D:** Sphäroid 72 h nach Aussaat. Es lässt sich eine deutliche Größenzunahme sowie eine rundere Form über die Zeit erkennen. **E:** 1000 MNT-1-Zellen zum Zeitpunkt  $t = 0$  h, direkt nach der Zentrifugation aufgenommen. Die Sphäroidbildung ist noch nicht abschließend erfolgt. Die Zellen ballen sich im zeitlichen Verlauf weiter zusammen. **F:** Sphäroid 24 h nach Aussaat. **G:** Sphäroid 48 h nach Aussaat. **H:** Sphäroid 72 h nach Aussaat. Im zeitlichen Verlauf lässt sich eine geringere Größenzunahme erkennen. Im Vergleich zu den SK-Mel-28-Sphäroiden (B-D) ist die Rundheit der MNT-1-Sphäroide (F-H), insbesondere nach 72 h, weniger stark ausgeprägt.

**Tabelle 16:** Messung des durchschnittlichen Sphäroiddurchmessers von jeweils  $n = 5$  Einzelbestimmungen an zwei verschiedenen Stellen über drei Tage. Ausgemessen mit dem Programm AxioVision 4.8. Die Sphäroide wachsen unabhängig von der ausgesäten Zellzahl signifikant pro Tag. Zudem hängt die Größe zu jedem Zeitpunkt signifikant von der Zellzahl ab (p-Werte nicht dargestellt). Die Standardabweichung (SD) wurde jeweils hinter den Sphäroiddurchmesser gestellt.

Zelllinie	Zellzahl	Durchschnittlicher Sphäroiddurchmesser in $\mu\text{m}$		
		24 h ( $\pm$ SD)	48 h ( $\pm$ SD)	72 h ( $\pm$ SD)
SK-Mel-28	500	286,314 ( $\pm$ 15,73)	312,317 ( $\pm$ 6,32)	353,51 ( $\pm$ 9,02)
	1000	357,357 ( $\pm$ 17,89)	388,922 ( $\pm$ 14,22)	440,808 ( $\pm$ 13,00)
	2000	445,358 ( $\pm$ 18,27)	489,726 ( $\pm$ 12,82)	542,737 ( $\pm$ 3,55)
MNT-1	500	274,097 ( $\pm$ 9,02)	291,308 ( $\pm$ 16,59)	316,5 ( $\pm$ 11,55)
	1000	364,791 ( $\pm$ 9,68)	376,973 ( $\pm$ 11,80)	384,583 ( $\pm$ 4,78)
	2000	457,014 ( $\pm$ 7,00)	462,29 ( $\pm$ 11,39)	470,916 ( $\pm$ 6,19)



**Abbildung 10:** Übersicht des Zellwachstums der SK-Mel-28-Zellen bei der Aussaat von verschiedenen Zellzahlen (500, 1000, 2000) über den Zeitraum von 72 h. Die Zellen wurden mit 500 rcf für 10 min zentrifugiert. Die Bilder wurden mit dem Programm AxioVision 4.8 bei einer 5-fachen Vergrößerung aufgenommen.

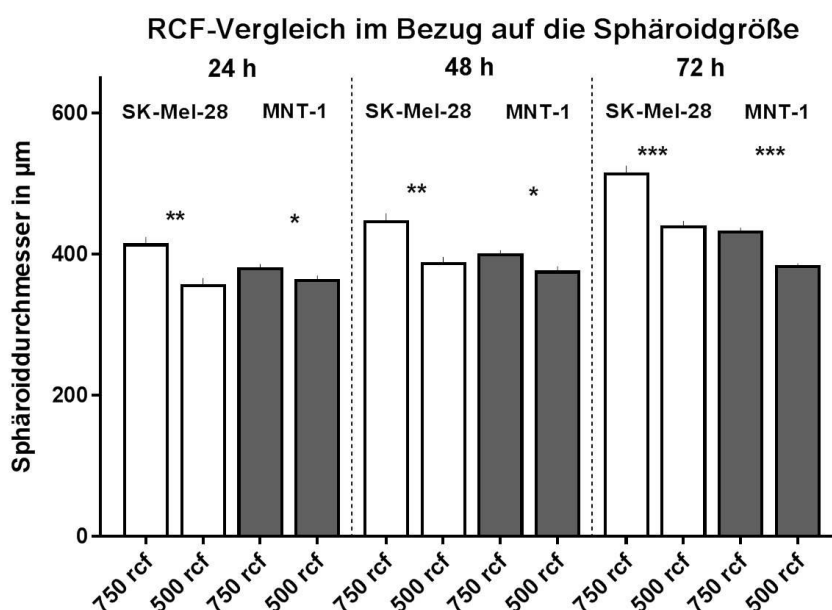


**Abbildung 11:** Übersicht des Zellwachstums der MNT-1-Zellen bei der Aussaat von verschiedenen Zellzahlen (500, 1000, 2000) über den Zeitraum von 72 h. Die Zellen wurden mit 500 rcf für 10 min zentrifugiert. Die Bilder wurden mit dem Programm AxioVision 4.8 bei einer 5-fachen Vergrößerung aufgenommen.

### 3.1.2 Einfluss der Stärke der Zentrifugation auf den Durchmesser über die Zeit

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Modifikation der Stärke der Zentrifugation, gemessen in rcf, während der Anzucht, bei gleicher Zellzahl der Sphäroide einen Einfluss auf den Sphäroiddurchmesser hat. Hierfür wurden Sphäroide, die bei 500 rcf zentrifugiert wurden (vgl. Ergebnisteil 3.1.1) mit denen verglichen, die bei 750 rcf zentrifugiert wurden. Betrachtet wurden nur Sphäroide mit gleicher Zellzahl zu Beginn der Aussaat. Alle weiteren Parameter waren identisch. Die getestete Zellzahl betrug jeweils 1000 Zellen unabhängig von der Zelllinie.

Die Ergebnisse in Abbildung 12 zeigen, dass der Durchmesser der Sphäroide aus SK-Mel-28-Zellen als auch der MNT-1-Zellen signifikant von der verwendeten Stärke der Zentrifugation abhängt. Zu jedem Zeitpunkt (24 h, 48 h und 72 h) waren die Sphäroide, die bei der höheren Drehzahlen (rcf) zentrifugiert wurden, signifikant größer. Für die weiteren Versuche wurden je 1000 SK-Mel-28- und 2000 MNT-1-Zellen bei 750 rcf zentrifugiert sowie nach 72 h behandelt.



**Abbildung 12:** Der Einfluss der Stärke der Zentrifugation (rcf) auf den Sphäroiddurchmesser von den Zelllinien SK-Mel-28 und MNT-1. Verglichen wurden jeweils 500 rcf und 750 rcf über 72 h. Betrachtet wurden jeweils 1000 Zellen, die zum Zeitpunkt  $t = 0$  ausgesät wurden. Auf der x-Achse ist die Zeit in 24 Stunden Intervallen und auf der y-Achse der durchschnittliche Sphäroiddurchmesser in  $\mu\text{m}$  mit Standardabweichungen aufgetragen ( $n = 15$  mit dem Mittelwert aus je zwei Messpunkten pro Sphäroid). Die p-Werte betragen bei jedem Vergleichspaar  $p \leq 0,05$ . Damit nimmt die Stärke der Zentrifugation einen signifikanten Einfluss auf den Sphäroiddurchmesser. Die Ausmessung erfolgte unter dem Mikroskop Axiovert 40 CFL von Zeiss bei einer 5-fachen Vergrößerung und dem Programm AxioVision 4.8. Dabei entspricht \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

## 3.2 Etablierung der Sphäroideinbettung und Fehlerquellen

### 3.2.1 Sphäroideinbettung

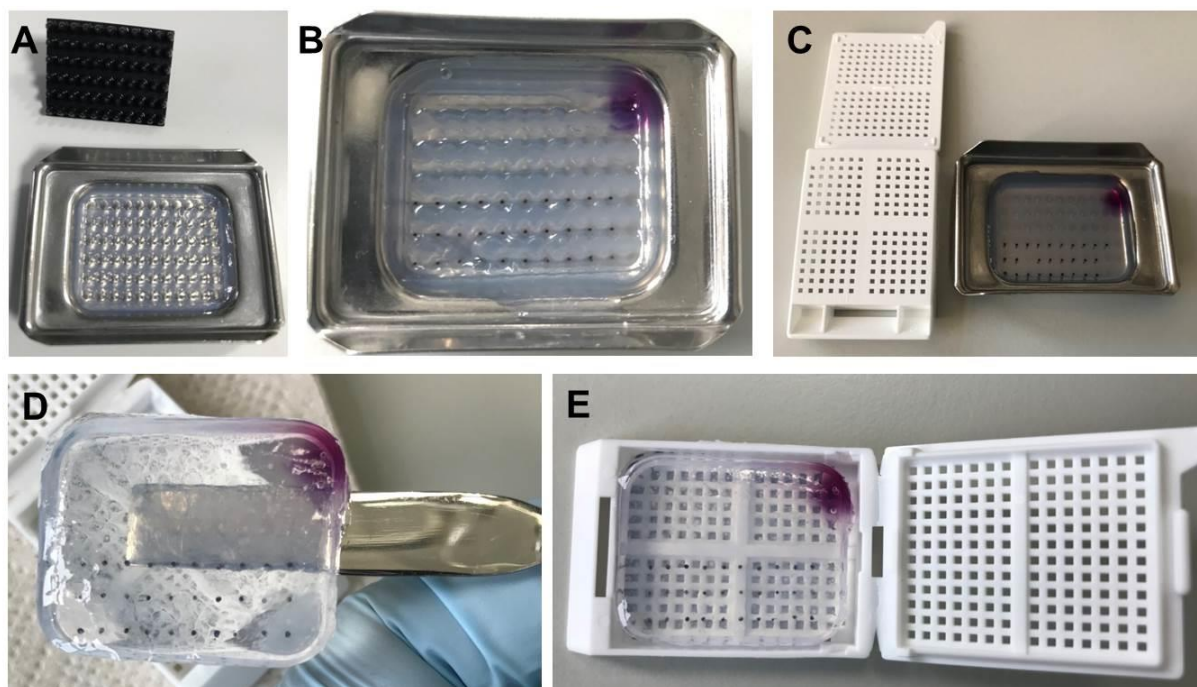
Die Sphäroide waren 72 Stunden nach Aussaat im Durchschnitt 500 µm groß und konnten im tissue microarray weiterverwendet werden (vgl. Kapitel „3.1.1 Einfluss der Zellzahl auf den Sphäroiddurchmesser“). Genutzt wurde das Protokoll, welches im Kapitel „2.2.1.6 Einbettung der Sphäroide in Microarrays“ beschrieben wurde. Im Nachfolgenden werden einzelne Durchführungsschritte näher dargestellt sowie Vorteile, Nachteile und Konsequenzen von Modifikationen einzelner Zwischenschritte erläutert.

Verwendet wurden Ausgießformen aus Metall (25x20 mm), die auf 37-50 °C vorgewärmt wurden, bevor die Agarose mit Hilfe einer Einmalpipette hineingegeben wurde. Dadurch wurde die Agarose nicht so schnell fest, was zum einen ein langsames und zum anderen dadurch ein luftblasenfreieres Arbeiten ermöglicht. Mögliche Luft einschüsse wurden mit der Pipette zum Rand der Wanne gedrückt. Die Vertiefungen wurden mit dem Mold-Maker durchgeführt. Eine gewisse Mindestmenge von rund 2 ml Agarose ist wichtig, um zum einen genügend tiefe Mulden zu erhalten und zum anderen die Gefahr des Durchstechens der Agarose und den Verlust der Sphäroide zu minimieren. Nach einer Abkühlung von etwa 2 min bei Raumtemperatur (21 °C) wurde die Agarose für eine weitere Minute bei -18 °C in den Gefrierschrank gestellt. Zur optimalen Wärmeableitung wurde eine Kühlplatte verwendet. Nachdem der Mold-Maker vorsichtig entfernt wurde, sollte die Agarose auf Fehler überprüft werden (Abb. 13: A). Mögliche Luft einschüsse können zu einer Verletzung der Muldenwand und zu einem Übertreten von Sphäroiden von einer zur anderen Vertiefung führen. Dadurch wird die Unterscheidung sowie anschließende Auswertung erschwert.

Das Aussäen der Sphäroide in die einzelnen Vertiefungen sollte mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze erfolgen. Hierdurch wird zum einen das Aufnehmen der Sphäroide vereinfacht und zum anderen die Scherkräfte reduziert. Ein Volumen von etwa 5-8 µl wurde verwendet, wobei gleichzeitig darauf geachtet wurde, dass die Flüssigkeit nur in eine Vertiefung gelangt. Ein zu schnelles Befüllen der Mulden kann zu einem Übertreten von Flüssigkeit – samt der darin befindlichen Probe – führen. Verwendet wurde eine 20 µl Pipette. Es wurde darauf geachtet, dass die Pipettenspitze nicht die Agarose berührt, da diese leicht verletzt werden kann. Die Sphäroide sollten möglichst mittig in die Vertiefung pipettiert werden (Abb. 13: B). Ein Anheften an der Muldenwand kann die Anordnung der Sphäroide in derselben Ebene erschweren. Falls die Zentrifugation nicht ausgereicht hat, wurde etwas Flüssigkeit in die



entsprechende Vertiefung gegeben, um die Adhäsion des Sphäroides an der Agarose (Muldenwand) zu verringern und dadurch die optimale Positionierung zu erreichen. Zum Austarieren der Zentrifuge wurde – bei einer Probe – eine weitere Ausgießform mit reiner Agarose befüllt. Nach der Zentrifugation von 1-2 min bei 100 rcf wurde die Ausgießform bei etwa 37-40 °C auf einer Heizplatte erwärmt, bevor die low-melting-Agarose (0,5-1 ml) vorsichtig über den Rand pipettiert wurde (Abb. 13: C). Ein zu schnelles und direktes pipettieren kann die Sphäroide aus den Vertiefungen schwemmen oder zu einem Luftblaseneinschluss führen. Luftblasen können mit einer spitzen Pinzette entfernt werden. Die generelle Vermeidung von Lufteinschlüssen kann durch das vollständige Befüllen der Vertiefungen mit Flüssigkeit – auch von den „leeren“ Mulden – erreicht werden. Hiernach wurde die low-melting-Agarose 5 min bei Raumtemperatur und anschließend für 1 min bei -18 °C ausgehärtet. Abschließend wurde die Agarose vorsichtig mit einem Spatel aus der Ausgießform herausgelöst (Abb. 13: D) und in eine Einbettkassette zur Paraffineinbettung (vgl. Kapitel 2.2.1.7) überführt (Abb. 13: E).

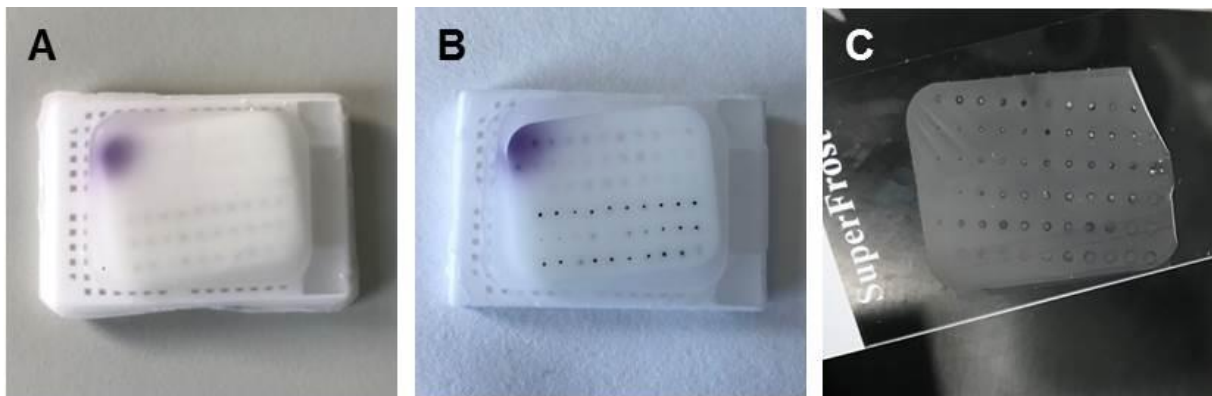


**Abbildung 13:** Einbettung der Sphäroide in Agarose. **A:** Herstellung von 66 Vertiefungen mit dem Mold-Maker (schwarz, in der oberen Bildhälfte). **B:** Aussaat der Sphäroide in die Mulden. In der rechten oberen Ecke wurde ein Marker (5 µl Hämatoxylinlösungen A und B nach Weigert, violett) gesetzt. Dieser dient später zur Orientierung. **C:** Rechts sieht man die zentrifugierten und mit 2 %iger low-melting-Agarose übergossenen Sphäroide in der Ausgießform. Links ist eine offene Einbettungskassette zu sehen. **D:** Eingebettete Sphäroide in Agarose mit dem Spatel aus der Ausgießform herausgenommen, um diese in die Einbettkassette überführen zu können. **E:** Fertige Einbettkassette kurz vor der Paraffineinbettung mit den eingebetteten Sphäroiden in Agarose.

### 3.2.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Zunächst wurden aus den fertig eingebetteten Sphäroiden Paraffinblöcke hergestellt. Hierfür wurden die Präparate automatisiert über Nacht dehydriert, entfettet und mit Paraffin getränkt (Histokinette), sodass sie am nächsten Tag fertig zur Paraffineinbettung waren. Alternativ konnte das manuelle Verfahren, welches in Kapitel „2.2.1.7 Einbettung in Paraffin“ beschrieben wurde, angewandt werden. Mögliche Fehlerquellen werden in Kapitel „3.2.3 Fehlerquellen bei der Paraffineinbettung“ beschrieben.

Vollständig mit Paraffin durchtränkte Präparate erscheinen weiß (Abb. 14: A) und nicht mehr klar durchsichtig (Abb. 13: D, E und Abb. 15). Nach dem Trimmen des Blockes in Längsrichtung (Abb. 14: B) wurden 3-5  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt (Abb. 14: C) und bei Raumtemperatur getrocknet. Es muss darauf geachtet werden, dass die Paraffinschnitte nicht zu lange im warmen Wasser – welches zum Strecken der Präparate notwendig ist – verweilen und schnell auf den Objektträger überführt werden. Ein Loslösen und damit der Verlust der Sphäroide aus dem Paraffinschnitt wäre ansonsten die Folge.

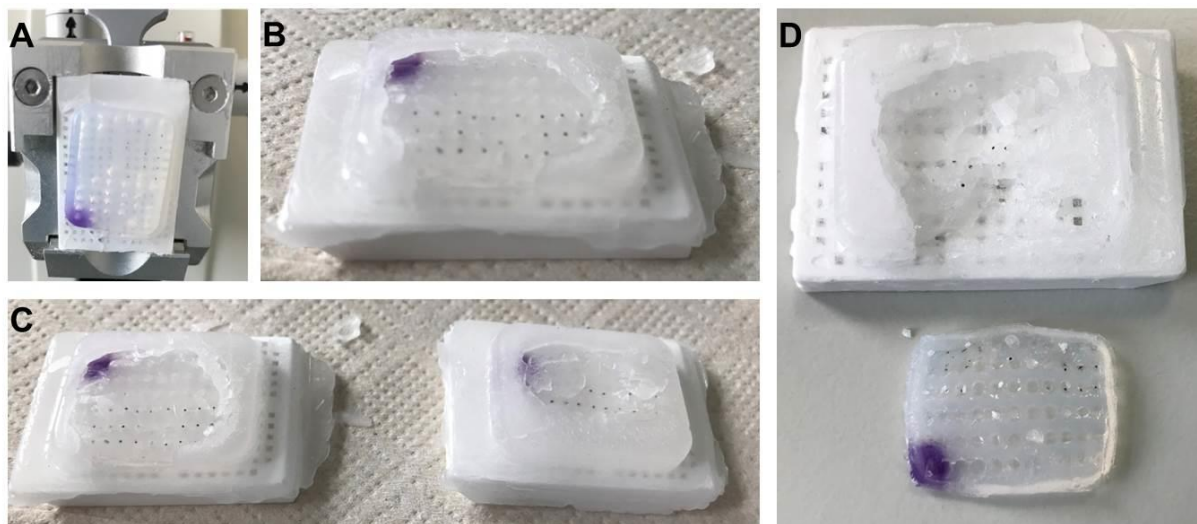


**Abbildung 14:** Herstellung von Paraffinblöcken und Gewebeschnitten. **A:** Eingebettete Agarose in Paraffin. Diese erscheint im Vergleich zum umliegenden Paraffin weißer. **B:** Getrimmter und teilweise angeschnittener Paraffinblock mit sichtbaren Sphäroiden. Zu sehen sind drei Reihen SK-Mel-28- (weiß, obere drei Reihen) und drei Reihen dunkle MNT-1-Sphäroide (schwarz, unteren drei Reihen). **C:** Paraffinschnitt (4  $\mu\text{m}$ ) auf einem Objektträger.

### 3.2.3 Fehlerquellen bei der Paraffineinbettung

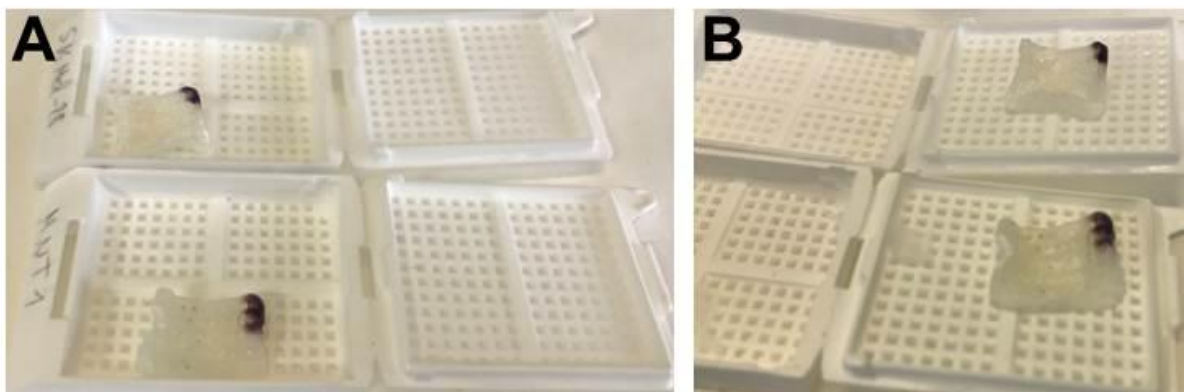
Zur Paraffineinbettung wurde das in Kapitel „2.2.1.7 Einbettung in Paraffin“ beschriebene Protokoll in teilweise modifizierter Form verwendet. Im Folgenden werden die größten Fehlerquellen dargestellt und mögliche Lösungsansätze präsentiert.

Zunächst ist es wichtig, dass die Dehydrierung in Alkohol sowie die Entfettung in Xylol in ausreichend großen Volumina durchgeführt werden. Dafür ist die Verwendung eines Rührmagneten sowie die sorgfältige Überführung der Einbettungskassetten – mit möglichst wenig Flüssigkeit von einem zum nächsten Gefäß – entscheidend. Verbleibt Wasser oder Xylol in der Probe, so kommt es zu einer mangelhaften Paraffininfiltration, die eine Verbindung von Einbettungsparaffin mit der Probe erschwert bzw. teilweise unmöglich macht. Die Probe fällt beim Schneiden aus dem Paraffin heraus und fühlt sich nach dem Aushärten weich an (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Fehlerhafte Paraffininfiltration. **A:** Eingespanntes Präparat. Das Paraffin hat sich nicht mit der Agarose verbunden und ist nach den ersten Schnitten herausgebrochen. **B:** Vergrößerung eines Präparates nach dem Versuch, dieses zu schneiden. Das Paraffin lässt sich zudem durch leichten Druck herauslösen. **C:** Übersicht von zwei Präparaten, die sich nach dem Schneiden sowie leichtem Druck von der Paraffinumgebung gelöst haben. **D:** Unvollständige Paraffininfiltration einiger Sphäroide (schwarze und gelbe Punkte in der oberen Bildhälfte), die in dem herausgelösten Agarosestück (untere Bildhälfte) fehlen.

Das Paraffinbad benötigt eine konstante Temperatur von rund 2 °C über dem Erstarrungspunkt. Dabei ist der Schwankungsbereich sehr eng und sollte nicht über 65 °C liegen, um die Proben nicht zu stark zu schädigen. Es muss darauf geachtet werden, dass die Proben möglichst ohne Xylol-Reste in das erste Paraffinbad über Nacht überführt werden. Die Verwendung eines Wärmeschrankes und das sehr frühe langsame Schmelzen des Paraffins sind zu empfehlen. Die Verwendung der Heizplatte mit einem Rührmagneten hat zur Folge, dass die Unterseite des Paraffinbades heißer ist als die Oberseite. Dadurch kommt es zu Temperaturschwankungen, die schwer einzustellen sind. Hierdurch kann es zu einer temperaturbedingten Schrumpfung und Verformung der Präparate kommen (Abb. 16). Zudem wird das Präparat hart und ist dadurch schwer zu schneiden. Um diese Fehlerquellen zu umgehen, wurde die automatisierte Paraffineinbettung vorgezogen.

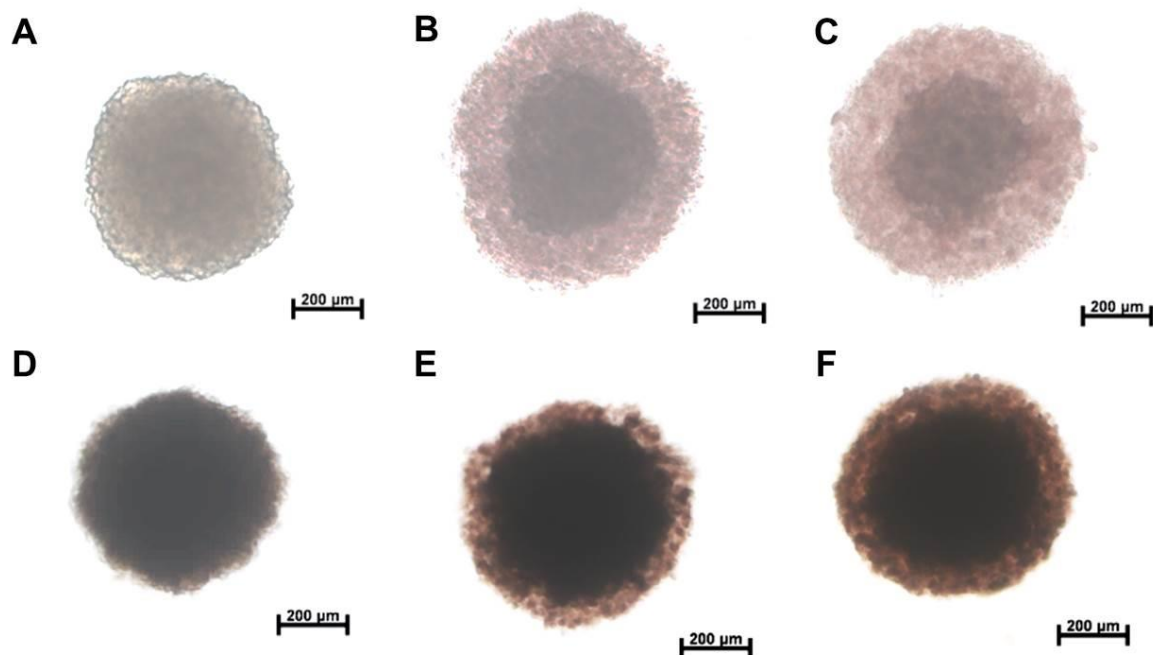


**Abbildung 16:** Zu heißes Paraffinbad über Nacht. **A:** Zwei geschrumpfte Präparate, die über Nacht auf einer Heizplatte in Paraffin eingelegt wurden. **B:** Herausgenommene Präparate, die sich temperaturbedingt verformt haben.

### 3.3 Der Vergleich verschiedener Behandlungsmodalitäten im Hinblick auf die Sphäroidmorphologie

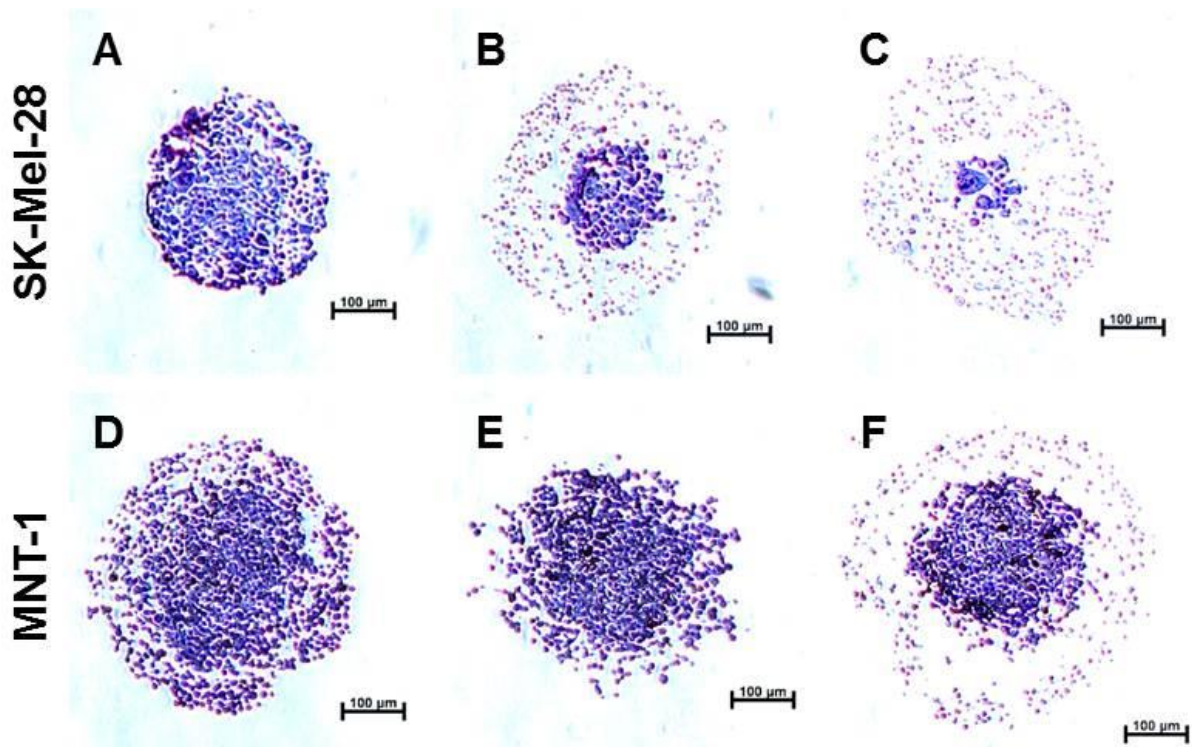
#### 3.3.1 Der Einfluss von Plasma auf die Sphäroidmorphologie

Nachfolgend wird der Einfluss von kaltem Atmosphärenplasma auf die Zellmorphologie von SK-Mel-28- und MNT-1-Zellen dargestellt. Als Plasmaquelle wurde der kINPen® MED von der neoplas tools GmbH verwendet. Die Behandlung erfolgte für jeweils 50 bzw. 89 s mit einem Gasflow von 3 Standardlitern pro Minute (slm). In Abbildung 17 sind die Kontrolle und die Ergebnisse beider Behandlungen (50 und 89 s), jeweils für beide Zelllinien, 24 h nach der Plasmabehandlung dargestellt (vgl. Abb. 17: A-C: SK-Mel-28 und D-F: MNT-1). Es lässt sich erkennen, dass die Plasmabehandlung bereits nach 50 s eine Auflockerung der Peripherie und eine Verdichtung der zentralen Regionen der Sphäroide nach sich zieht. Diese Auflockerung bestätigt sich in der HE-Färbung (Abb. 18).



**Abbildung 17:** Der Einfluss von Plasma wurde mit einer unterschiedlicher Behandlungszeit (Kontrolle: A, D; 50 s: B, E und 89 s: C, F) und einem Gasflow von 3 slm auf SK-Mel-28- (A-C) und MNT-1-Sphäroide (D-F) untersucht. Die Plasmabehandlung erfolgte 72 h nach der Aussaat und die Bildaufnahme 24 h nach der direkten Plasmabehandlung. Die Bildaufnahme wurde mit dem Axiovert 40 CFL von Zeiss bei 5x Vergrößerung aufgenommen und mit den Programmen AxioVision 4.8 sowie Microsoft PowerPoint 2010 bearbeitet. **A:** Kontrolle SK-Mel-28. **B:** SK-Mel-28 24 h nach einer 50 s Plasmabehandlung. **C:** SK-Mel-28 24 h nach einer 89 s Plasmabehandlung. **D:** Kontrolle MNT-1. **E:** MNT-1 24 h nach einer 50 s Plasmabehandlung. **F:** MNT-1 24 h nach einer 89 s Plasmabehandlung.

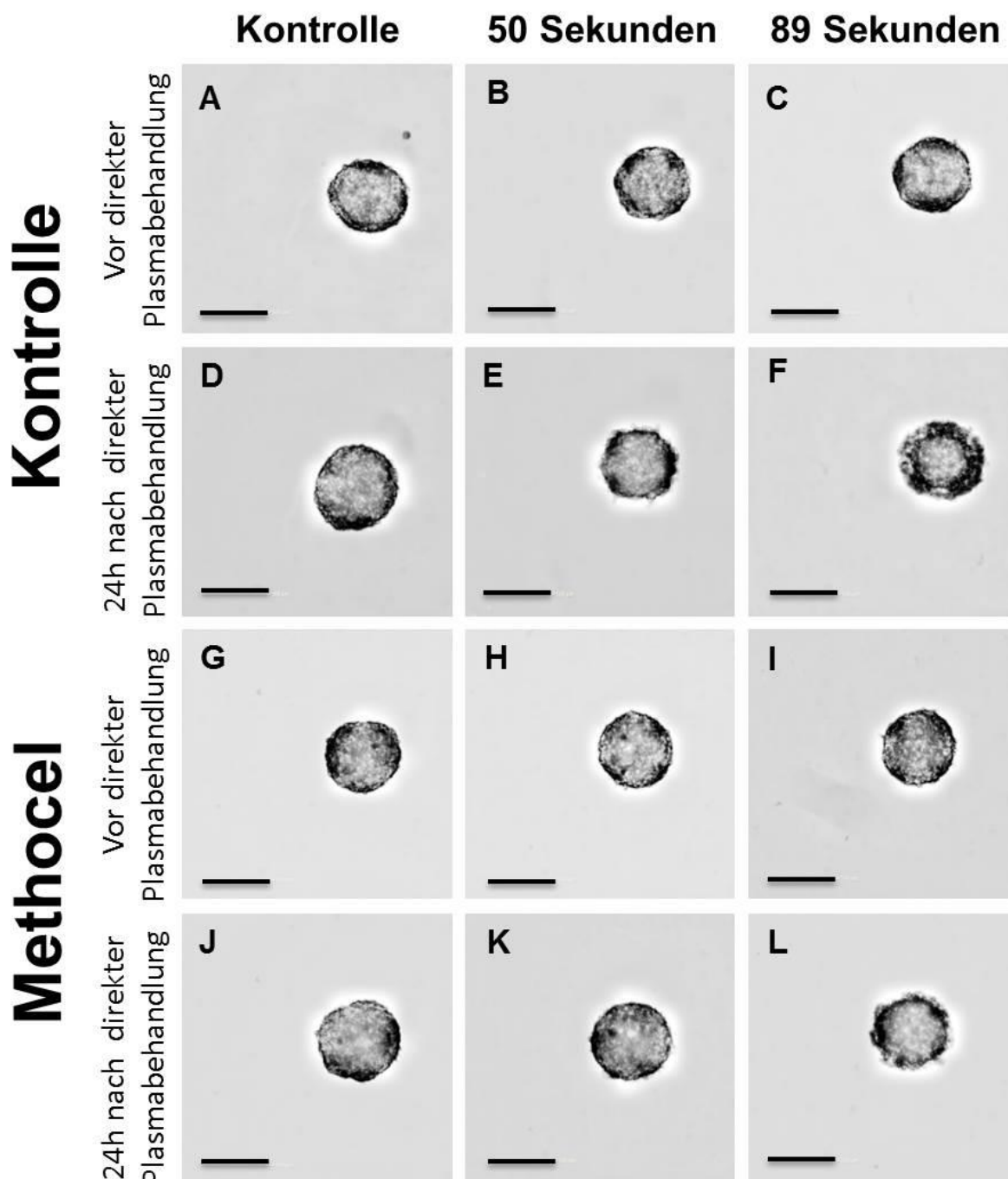




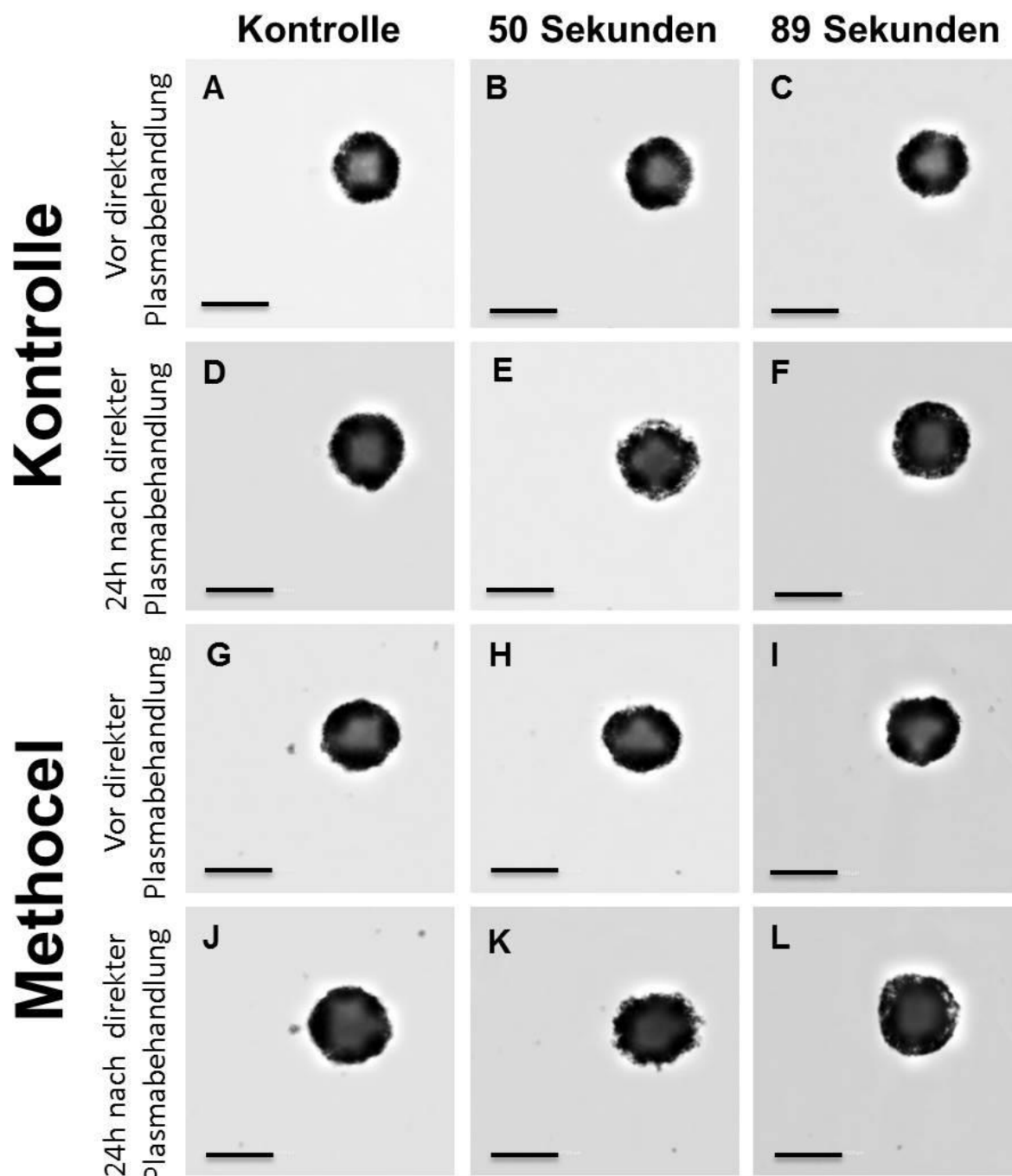
**Abbildung 18:** HE-Färbung der Sphäroide der beiden Zelllinien SK-Mel-28 (A-C) und MNT-1 (D-F) nach der direkten Plasmabehandlung für jeweils 50 s (B und E) und 89 s (C und F). Die Plasmabehandlung erfolgte am dritten Tag (72 h) nach Aussaat von 1000 SK-Mel-28- und 2000 MNT-1-Zellen an Tag 1 (0 h). Nach weiteren 24 h wurden die Sphäroide in 4 % PFA über Nacht bei 4 °C fixiert und anschließend in Agarose und dann in Paraffin eingebettet. Die Schnittdicke beträgt 3 µm. Die Bildaufnahme erfolgte bei 10x Vergrößerung mit dem Mikroskop Axiovert 40 CFL von Zeiss. Zur Bildbearbeitung wurden die Programme AxioVision 4.8 sowie Microsoft PowerPoint 2010 verwendet. **A:** Kontrolle SK-Mel-28. **B:** 50 s direkte Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Zellen. **C:** 89 s direkte Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Zellen. **D:** Kontrolle MNT-1. **E:** 50 s direkte Plasmabehandlung der MNT-1-Zellen. **F:** 89 s direkte Plasmabehandlung der MNT-1-Zellen.

### 3.3.2 Vergleich der Sphäroidmorphologie mit und ohne Methocel

Leung et al. haben gezeigt, dass Methylcellulose (Methocel) die Rundheit und Kompaktheit von Sphäroiden im *Hanging Drop*-Verfahren verbessern kann (Leung et al. 2015). Zudem deutete die tabellarische Zusammenfassung von Vinci et al. an, dass die Melanomzelllinien sich nur lose aggregieren (Vinci et al. 2012). Aus diesem Grund wurde testweise das Aussehen der SK-Mel-28- (Abb. 19) sowie der MNT-1-Sphäroide (Abb. 20) mit und ohne Zusatz von 0,24 % Methocel zum Zellkulturmedium nach einer direkten Plasmabehandlung (vgl. Abb. 19, 20: 50 s und 89 s) betrachtet. Die beiden Abbildungen zeigen, dass sich kaum Unterschiede in der Form und Kompaktheit ergeben. Beide Formen weisen ein vergleichbares Aussehen sowie vergleichbare Handhabbarkeit bei der Agaroseeinbettung auf. Aus diesem Grund wurde auf den Gebrauch des Methocels in den folgenden Versuchen verzichtet. Des Weiteren ist eine mögliche Interaktion zwischen dem Plasma und dem Methocel nicht auszuschließen.



**Abbildung 19:** Vergleich der Sphäroidmorphologie der SK-Mel-28-Zelllinie mit(G-L) und ohne (A-F) Zusatz von 0,24 % Methocel. Es wurden 1000 SK-Mel-28-Zellen ausgesät und am dritten Tag (72 h) plasmabehandelt. A-C (ohne Methocel) und G-I (mit Methocel) zeigen die Sphäroide vor der direkten Plasmabehandlung und D-F (ohne Methocel) sowie J-L (mit Methocel) 24 h nach der direkten Plasmabehandlung. Es lässt sich kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (ohne Methocel; A-F) und der Sphäroide mit 0,24 % Methocel (G-L) erkennen. Die Auflockerung der Sphäroidperipherie ist bei 50 s (E und K) sowie 89 s (F und L) vergleichbar stark ausgeprägt. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software am CLS. Die Maßstabsskala beträgt 500  $\mu\text{m}$ . **A:** Kontrolle SK-Mel-28. **B:** Vor 50 s Plasmabehandlung. **C:** Vor 89 s Plasmabehandlung. **D:** Kontrolle 24 h nach Plasmabehandlung. **E:** 24 h nach 50 s Plasmabehandlung. **F:** 24 h nach 89 s Plasmabehandlung. **G:** Kontrolle SK-Mel-28 mit 0,24 % Methocel-Zusatz. **H:** Sphäroid vor 50 s Plasmabehandlung mit 0,24 % Methocel-Zusatz. **I:** Sphäroid vor 89 s mit 0,24 % Methocel-Zusatz. **J:** Kontrolle 24 h nach Plasmabehandlung mit 0,24 % Methocel-Zusatz. **K:** 24 h nach 50 s Plasmabehandlung mit 0,24 % Methocel-Zusatz. **L:** 24 h nach 89 s Plasmabehandlung mit 0,24 % Methocel-Zusatz.

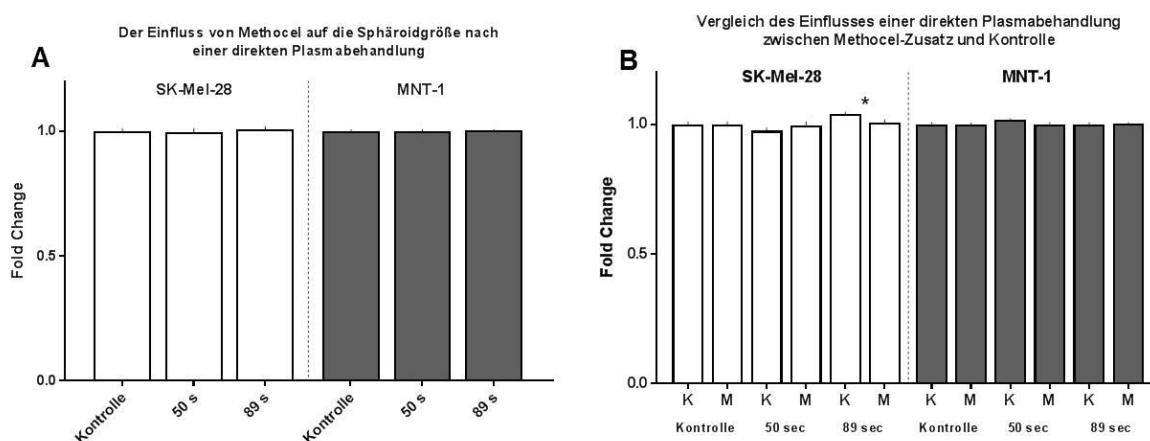


**Abbildung 20:** Vergleich der Sphäroidmorphologie der MNT-1-Zelllinie mit(G-L) und ohne (A-F) Zusatz von 0,24 % Methocel. Die Plasmabehandlung erfolgte am dritten Tag (72 h) nach Aussaat. A-C (ohne Methocel) und G-I (mit Methocel) zeigen die Sphäroide vor der direkten Plasmabehandlung und D-F (ohne Methocel) sowie J-L (mit Methocel) 24 h nach der direkten Plasmabehandlung. Es lässt sich kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (ohne Methocel; A-F) und der Sphäroide mit 0,24 % Methocel (G-L) erkennen. Die Auflockerung der Sphäroidperipherie ist bei 50 s (E und K) sowie 89 s (F und L) vergleichbar stark ausgeprägt. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software am CLS. Die Maßstabsskala beträgt 500  $\mu\text{m}$ . **A:** Kontrolle MNT-1. **B:** Vor 50 s Plasmabehandlung. **C:** Vor 89 s Plasmabehandlung. **D:** Kontrolle 24 h nach Plasmabehandlung. **E:** 24 h nach 50 s Plasmabehandlung. **F:** 24 h nach 89 s Plasmabehandlung. **G:** Kontrolle MNT-1 mit 0,24 % Methocel-Zusatz. **H:** Sphäroid vor 50 s Plasmabehandlung mit 0,24 % Methocel-Zusatz. **I:** Sphäroid vor 89 s mit 0,24 % Methocel-Zusatz. **J:** Kontrolle 24 h nach Plasmabehandlung mit 0,24 % Methocel-Zusatz. **K:** 24 h nach 50 s Plasmabehandlung mit 0,24 % Methocel-Zusatz. **L:** 24 h nach 89 s Plasmabehandlung mit 0,24 % Methocel-Zusatz.



Betrachtet man ferner die Sphäroiddurchmesser der mit Methocel behandelten Sphäroide untereinander, so lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und den plasmabehandelten Sphäroiden erkennen. Hierbei wurde der Sphäroiddurchmesser der Kontrolle (SK-Mel-28, MNT-1) jeweils auf 1 gesetzt und die plasmabehandelten Sphäroiddurchmesser als fold change darauf bezogen (Abb. 21: A).

Des Weiteren wurden jeweils die Durchmesser der Sphäroide, die mit sowie ohne Methocel-Zusatz kultiviert wurden und anschließend für 50 bzw. 89 s direkt mit Plasma behandelt wurden, miteinander verglichen. Die Abbildung 21 zeigt bis auf die 89 s direkte Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Zelllinie keinen signifikanten Unterschied zwischen den Sphäroiden mit und ohne Methocel-Zusatz (Abb. 21: B).



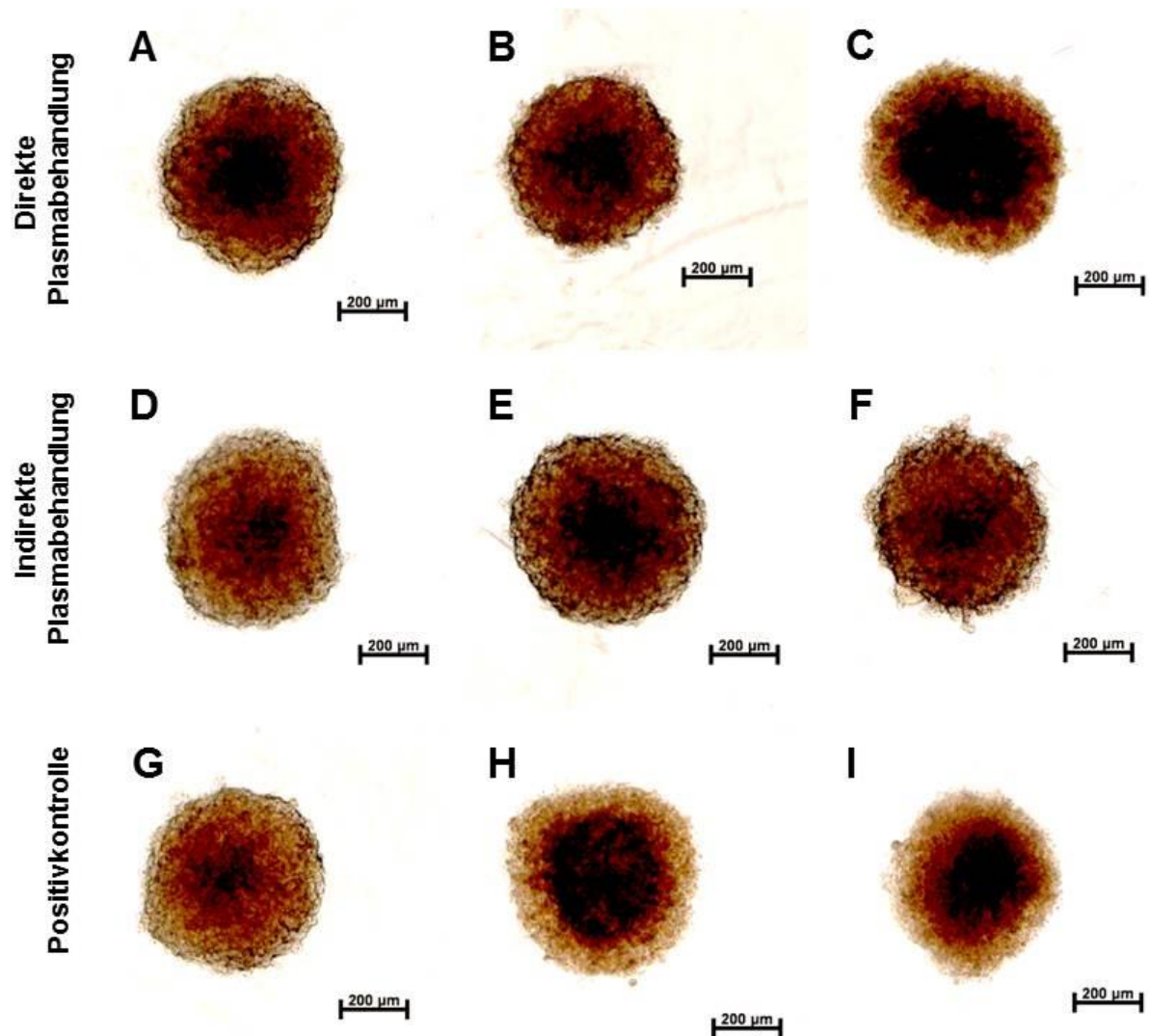
**Abbildung 21:** Vergleich des Einflusses von Methocel auf den Sphäroiddurchmesser nach einer direkten Plasmabehandlung. Die Mittelwerte der Kontrollsphäroide der jeweiligen Zelllinie (SK-Mel-28, MNT-1) wurden auf 1 gesetzt und die Resultate beider Behandlungszeiten (50 s, 89 s) als fold change darauf bezogen. **A:** Dargestellt sind die beiden Zelllinien SK-Mel-28 und MNT-1, die in einem Medium mit 0,24 %igen Methocel-Zusatz kultiviert wurden. Verglichen werden dabei jeweils in Methocel kultivierte Sphäroide in Bezug auf eine mögliche Änderung des Sphäroiddurchmessers. Zu erkennen ist, dass sowohl die SK-Mel-28- als auch die MNT-1-Sphäroide im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle keinen signifikanten Durchmesserunterschied nach einer direkten Plasmabehandlung von 50 bzw. 89 s aufweisen. **B:** Vergleich zwischen Sphäroiden, die mit (M, kurz für Methocel-behandelte-Sphäroide) und ohne Methocel (K, kurz für Kontrollsphäroide) kultiviert wurden bezüglich der direkten Plasmawirkung auf den Sphäroiddurchmesser. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich zwischen den 89 s behandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. Die Kontrollsphäroide (K), die nicht in Methocel kultiviert wurden, weisen dabei nach einer 89 s direkten Plasmabehandlung eine leichte Vergrößerung des Sphäroiddurchmessers auf, als die vergleichbaren Sphäroide, die in Methocel (M) kultiviert wurden. Berechnet wurden jeweils die Mittelwerte der Sphäroiddurchmesser und die entsprechenden Standardabweichungen, aus denen die weiteren fold change Werte ermittelt wurden. Für die Kontrollsphäroide wurden bis n = 15 und für die Methocel-behandelten-Sphäroide n = 5 Sphäroide betrachtet. Dabei entspricht \*  $p \leq 0,05$ .

### 3.3.3 Unterschiede zwischen direkter und indirekter Plasmabehandlung

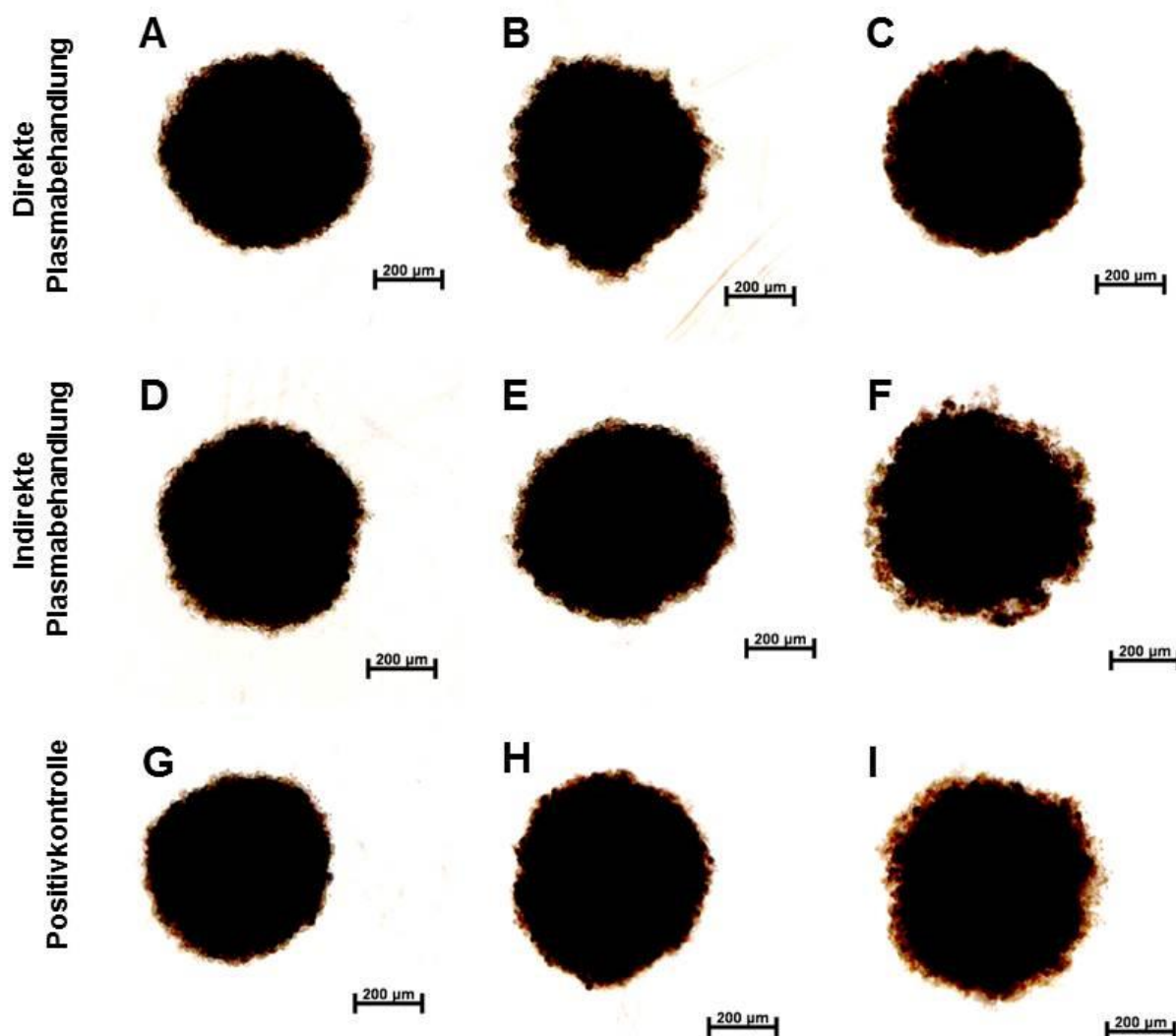
Nachdem der Einfluss der direkten Plasmabehandlung auf die Sphäroidmorphologie in Kapitel 3.3.1 untersucht und ein charakteristisches Aussehen beschrieben wurde (Abb. 17), wird im Folgenden der Vergleich zwischen direkter und indirekter Plasmabehandlung untersucht. In Vorarbeiten am INP Greifswald wurde untersucht, welcher Zeitraum einer direkten Plasmabehandlung von Zellen in einer 96-Well-Platte dem einer indirekten Plasmabehandlung über die separate Behandlung von Zellkulturmedium in einer 60-mm-Petrieschale entspricht. Als Bezugsparameter diente die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Zellkulturmedium (unveröffentlichte Arbeiten: Stand Mai 2018). Dabei ergibt sich eine rechnerische Entsprechung von 19 s einer direkten Plasmabehandlung zu 60 s einer indirekten Plasmabehandlung bzw. 89 s direkter zu 300 s indirekter Behandlung. Auf dieser Grundlage wurden die folgenden Behandlungszeiten gewählt. Die Versuchsdurchführung wird im Abschnitt Material und Methoden „2.2.3 Plasmabehandlung“ und folgende beschrieben. Als Positivkontrolle wurde eine Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  gewählt. Die Wasserstoffperoxid-Konzentration lässt sich für die entsprechende Behandlungszeit einer direkten Plasmabehandlung, wie in Abschnitt „2.2.3.3 Positivkontrolle mittels Wasserstoffperoxid- ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )-Behandlung“ und Abbildung 7 beschrieben, berechnen.

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen, dass die direkte Plasmabehandlung (Abb. 22, 23: A-C) zu einer Auflockerung der Zellperipherie führt. Dieser Effekt wird mit längerer Behandlungszeit deutlicher. Eine vergleichbare morphologische Veränderung lässt sich bei der entsprechenden Positivkontrollbehandlung mit Wasserstoffperoxid (Abb. 22, 23: G-H) beobachten. Die indirekte Plasmabehandlung führt dagegen zu einem Ausfransen der Zellperipherie und weniger zu einer scheinbar durchgehenden Aufhellung der Zellperipherie, die sich als Auflockerung darstellt (Abb. 22, 23: D-F). Ähnliche Effekte lassen sich bei der Bildaufnahme mit dem CLS-Gerät beobachten, in dem mehrere Schnittbilder der Sphäroide auf unterschiedlichen Ebenen aufgenommen und anschließend digital zu einem Gesamtbild zusammengefügt wurden (Abb. 24-27). Hierbei wurden die Zeiten wie in Abschnitt „3.3.1 Der Einfluss von Plasma auf die Sphäroidmorphologie“ beschrieben gewählt. Dabei wurden die Sphäroide jeweils zu drei verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen: zum einen direkt vor (Abb. 24-27: A, D, G) und dann jeweils 1 h (Abb. 24-27: B, E, H) bzw. 24 h (Abb. 24-27: C, F, I) nach der jeweiligen Plasmabehandlung (Abb. 24, 26: direkt, Abb. 25, 27: indirekt). Es wird ersichtlich, dass die Plasmawirkung zunächst eine gewisse Zeit benötigt, um die volle Wirkung zu erreichen, da die Effekte nach 1 h noch kaum sichtbar sind (Abb. 24-27). Sowohl

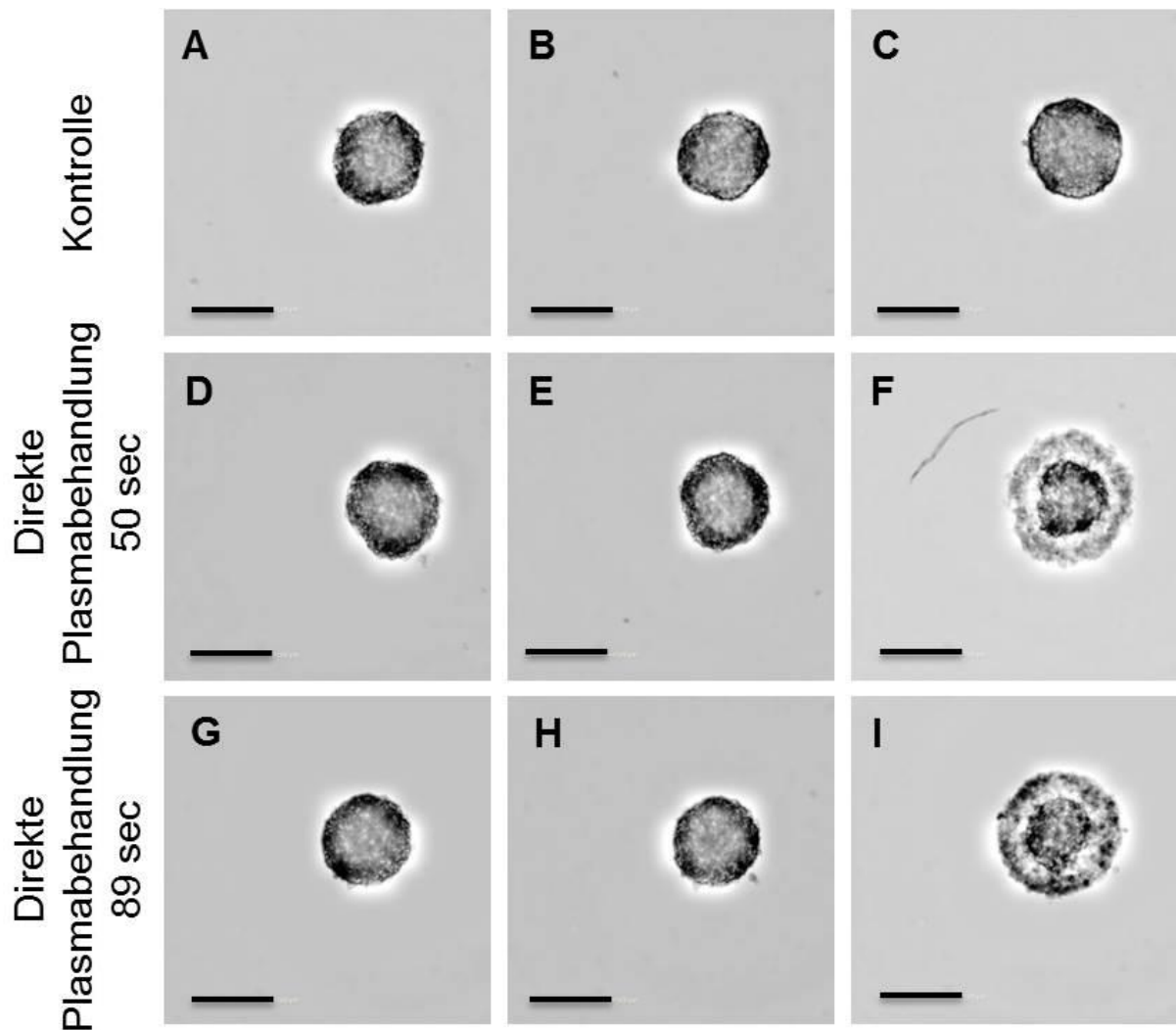
bei den SK-Mel-28- als auch bei der MNT-1-Sphäroiden lässt sich eine deutliche Auflockerung der Zellperipherie erst nach 24 h bei der direkten Plasmabehandlung (Abb. 24 F, I und Abb. 26 F, I) beobachten. Die Effekte der indirekten Plasmabehandlung sind bei beiden Zelllinien weniger stark ausgeprägt (Abb. 25 F, 27 F).



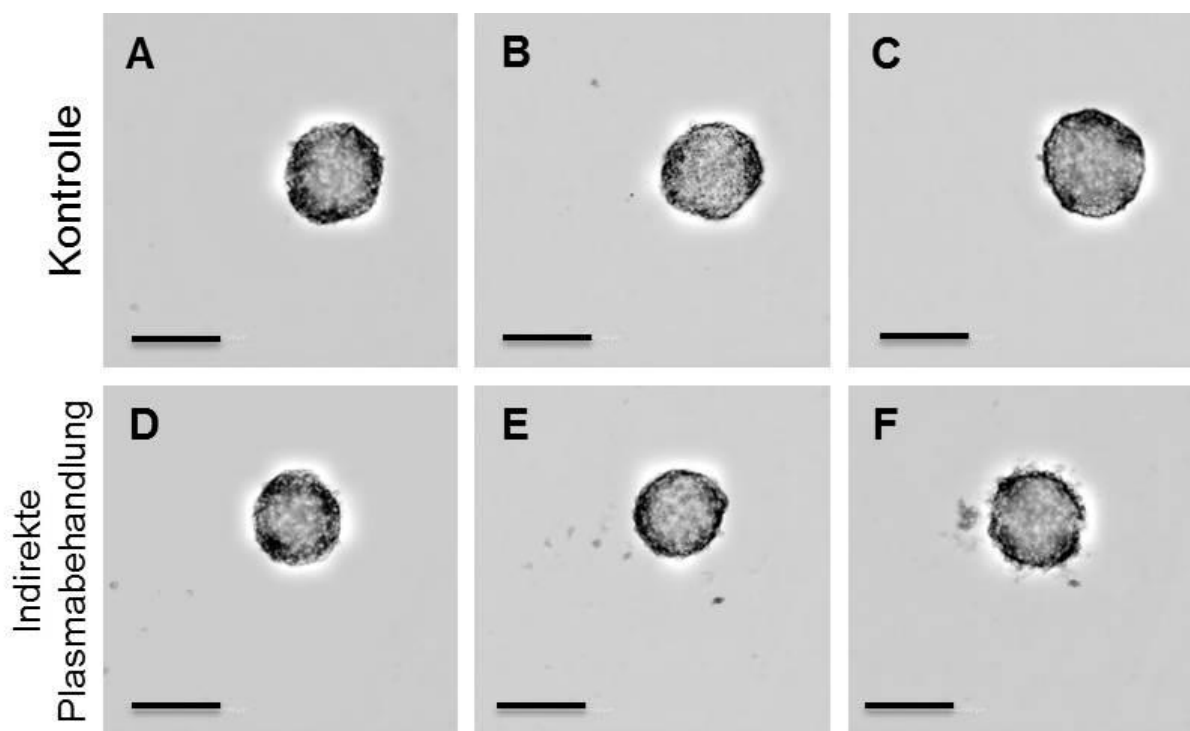
**Abbildung 22:** Der Einfluss verschiedener Behandlungsmodalitäten auf die Sphäroidmorphologie von SK-Mel-28-Zellen. Die Behandlung erfolgte 72 h nach Aussaat von 1000 Zellen an Tag 1 (0 h) pro Well. Die Bildaufnahme erfolgte 24 h nach der jeweiligen Behandlung bei 5-facher Vergrößerung mit dem Axiovert 40 CFL Mikroskop von Zeiss und wurde mit den Programmen AxioVision 4.8 sowie Microsoft PowerPoint 2010 bearbeitet. Verglichen werden die beiden Plasmabehandlungen (A-C: direkt und D-F: indirekt). Als Positivkontrolle wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet (G-I). **A:** Kontrolle der direkten Plasmabehandlung. **B:** 19 s direkte Plasmabehandlung. **C:** 89 s direkte Plasmabehandlung. Zu sehen ist eine Auflockerung (heller) der Peripherie. **D:** Kontrolle indirekte Plasmabehandlung. **E:** 60 s indirekte Plasmabehandlung des Zellmediums. **F:** 300 s indirekte Plasmabehandlung des Zellmediums. Ein leichtes Ausfransen der Zellperipherie lässt sich erkennen. Im Gegensatz zur direkten Plasmabehandlung (C) und der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung (H-I) lassen sich keine durchgehenden kreisrunden Aufhellungen an der Zellperipherie erkennen. Viel mehr scheinen die Randbereiche unregelmäßige „Auszieher“ aufzuweisen. **G:** Kontrolle der Positivkontrolle. **H:** Behandlung mit  $50 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in Zellmedium. **I:** Behandlung mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in Zellmedium. Eine deutliche Auflockerung der Zellperipherie lässt sich erkennen (H-I).



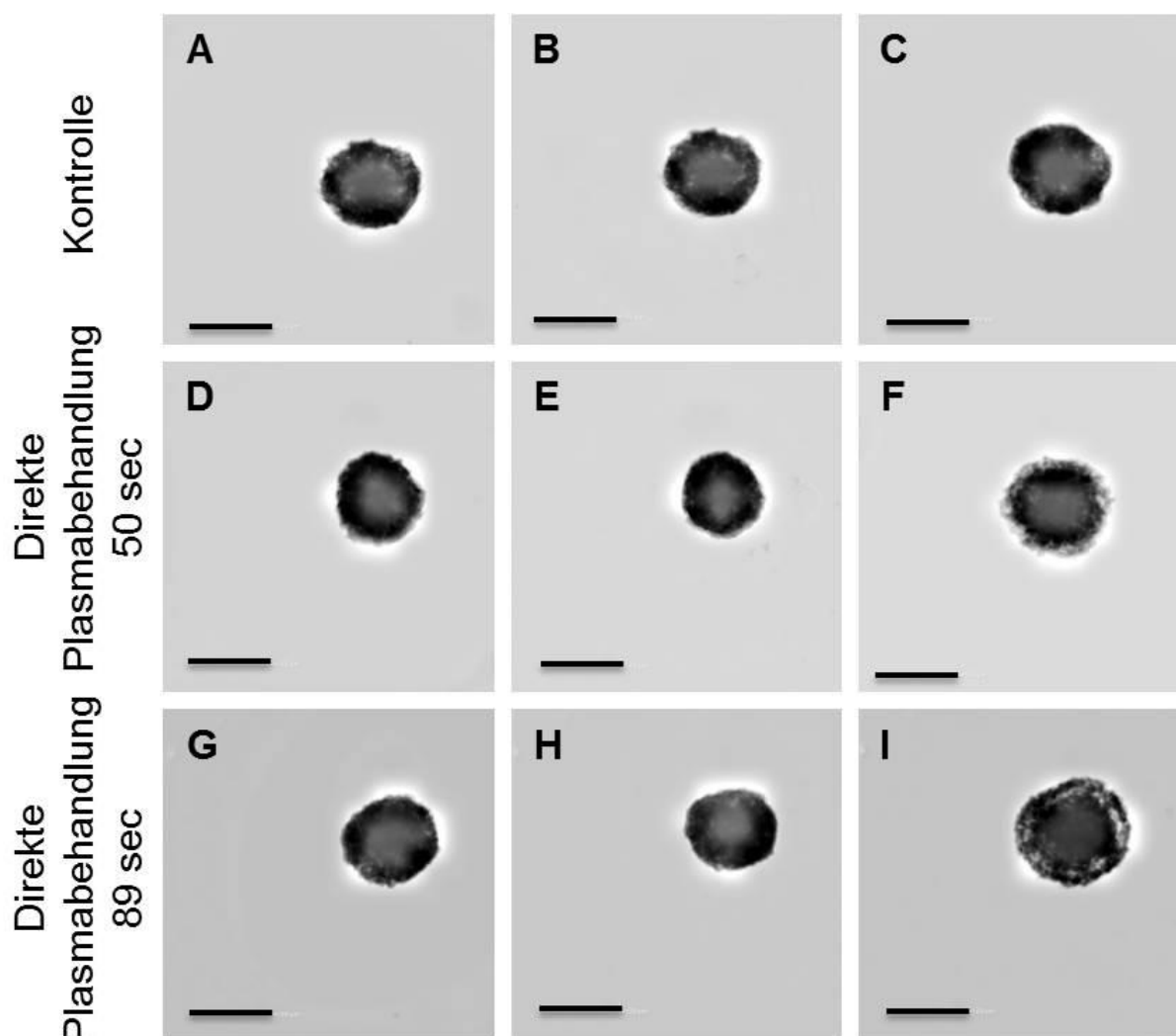
**Abbildung 23:** Der Einfluss verschiedener Behandlungsmodalitäten auf die Sphäroidmorphologie von MNT-1-Zellen. Die Behandlung erfolgte 72 h nach Aussaat von 2000 Zellen an Tag 1 (0 h) pro Well. Die Bildaufnahme erfolgte 24 h nach der jeweiligen Behandlung bei 5-facher Vergrößerung mit dem Axiovert 40 CFL Mikroskop von Zeiss und wurde mit den Programmen AxioVision 4.8 sowie Microsoft PowerPoint 2010 bearbeitet. Verglichen werden die beiden Plasmabehandlungen (A-C: direkt und D-F: indirekt). Als Positivkontrolle wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet (G-I). **A:** Kontrolle der direkten Plasmabehandlung. **B:** 19 s direkte Plasmabehandlung. **C:** 89 s direkte Plasmabehandlung. Zu sehen ist eine geringe Auflockerung (heller) der Peripherie. **D:** Kontrolle indirekte Plasmabehandlung. **E:** 60 s indirekte Plasmabehandlung des Zellmediums. **F:** 300 s indirekte Plasmabehandlung des Zellmediums. Ein leichtes Ausfransen der Zellperipherie lässt sich erkennen. Im Gegensatz zur direkten Plasmabehandlung (C) und der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung (I) lassen sich keine durchgehenden kreisrunden Aufhellungen an der Zellperipherie erkennen. Viel mehr scheinen die Randbereiche unregelmäßige „Auszieher“ aufzuweisen. Durch die verstärkte Pigmentierung lassen sich die Aufhellungen nur schwer abbilden. **G:** Kontrolle der Positivkontrolle. **H:** Behandlung mit  $50 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in Zellmedium. **I:** Behandlung mit  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in Zellmedium. Eine geringe Auflockerung der Zellperipherie lässt sich erkennen.



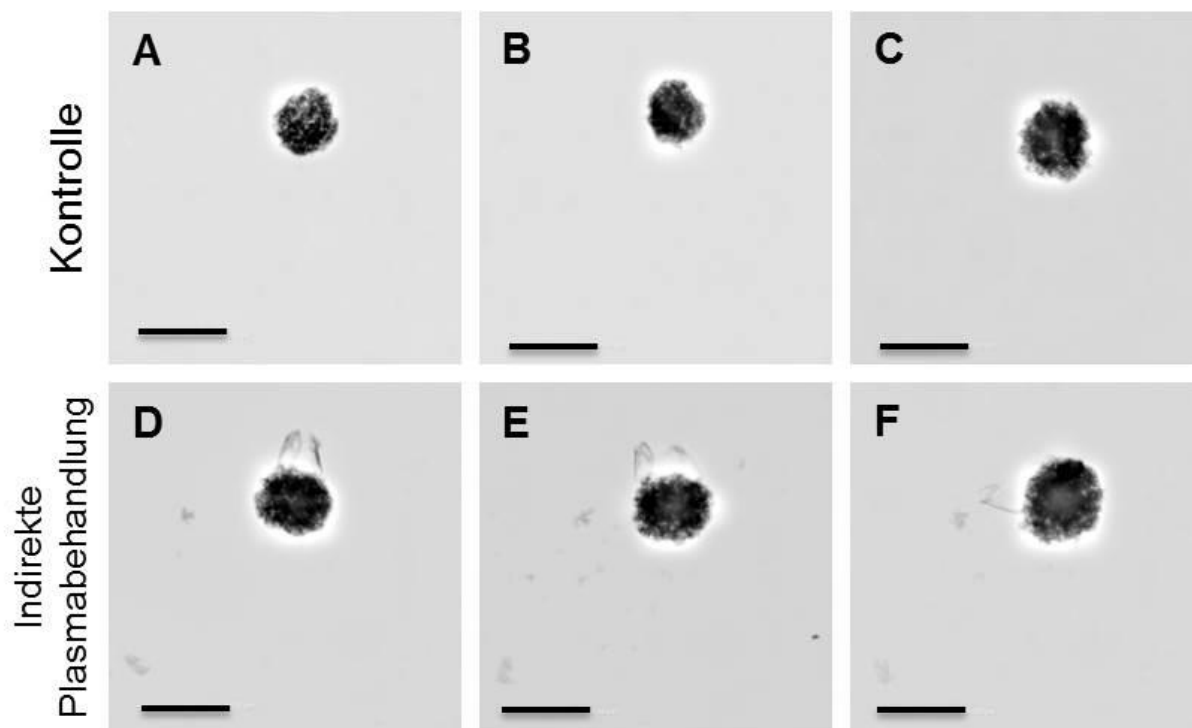
**Abbildung 24:** Direkte Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Sphäroide. Zunächst wurden 1000 SK-Mel-28-Zellen ausgesät und nach 72 h weiterverwendet. Es wurden zwei verschiedene Plasmazeiten (50 s: D-F bzw. 89 s: G-I) sowie eine Kontrolle (A-C) gewählt. Zudem wurden die Bilder zu drei verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen. Zum einen direkt vor (A, D, G) sowie 1 h (B, E, H) und 24 h (C, F, I) nach der jeweiligen Behandlung. Die Kontrolle wurde nicht behandelt. Zur zeitlichen Orientierung beziehen sich die Aufnahmezeiten auch bei der Kontrolle jeweils auf den Zeitpunkt  $t = 0$  ab der Behandlung. Die Bildaufnahme erfolgte 24 h nach der Behandlung mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS. Die Maßstabsskala beträgt  $500 \mu\text{m}$ . **A:** SK-Mel-28-Kontrollsphäroid vor der Behandlung. **B:** SK-Mel-28-Kontrollsphäroid 1 h nach der Behandlung. **C:** SK-Mel-28-Kontrollsphäroid 24 h nach der Behandlung. **D:** SK-Mel-28-Sphäroid vor 50 s direkter Plasmabehandlung. **E:** SK-Mel-28-Sphäroid 1 h nach 50 s direkter Plasmabehandlung. Es ist kaum eine Veränderung zu erkennen. **F:** SK-Mel-28-Sphäroid 24 h nach 50 s direkter Plasmabehandlung. Eine deutliche Auflockerung der Zellperipherie lässt sich erkennen. **G:** SK-Mel-28-Sphäroid vor 89 s direkter Plasmabehandlung. **H:** SK-Mel-28-Sphäroid 1 h nach 89 s direkter Plasmabehandlung. Es ist kaum eine Veränderung zu erkennen. **I:** SK-Mel-28-Sphäroid 24 h nach 89 s direkter Plasmabehandlung. Eine deutliche Auflockerung der Zellperipherie lässt sich erkennen.



**Abbildung 25:** Indirekte Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Sphäroide. Zunächst wurden 1000 SK-Mel-28-Zellen ausgesät und nach 72 h weiterverwendet. Dargestellt sind eine Kontrolle (A-C) und eine indirekte Plasmabehandlung des Mediums über 300 s (D-F) zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Zum einen direkt vor (A, D), dann 1 h (B, E) und 24 h (C, F) nach der jeweiligen Behandlung. Die Kontrolle wurde nicht behandelt. Zur zeitlichen Orientierung beziehen sich die Aufnahmezeiten auch bei der Kontrolle jeweils auf den Zeitpunkt  $t = 0$  ab der Behandlung. Die Bildaufnahme erfolgte 24 h nach der Behandlung mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS. Die Maßstabsskala beträgt  $500 \mu\text{m}$ . **A:** SK-Mel-28-Kontrollsphäroid vor der Behandlung. **B:** SK-Mel-28-Kontrollsphäroid 1 h nach der Behandlung. **C:** SK-Mel-28-Kontrollsphäroid 24 h nach der Behandlung. **D:** SK-Mel-28-Sphäroid vor der Zugabe des über 300 s plasmabehandelten Mediums. **E:** SK-Mel-28-Sphäroid 1 h nach der Zugabe des über 300 s plasmabehandelten Mediums. Es ist kaum eine Veränderung zu erkennen. **F:** SK-Mel-28-Sphäroid 24 h nach der Zugabe des über 300 s plasmabehandelten Mediums. Ein leichtes Ausfransen und damit eine Aufhebung des runden Randabschlusses der Zellperipherie lassen sich erkennen.



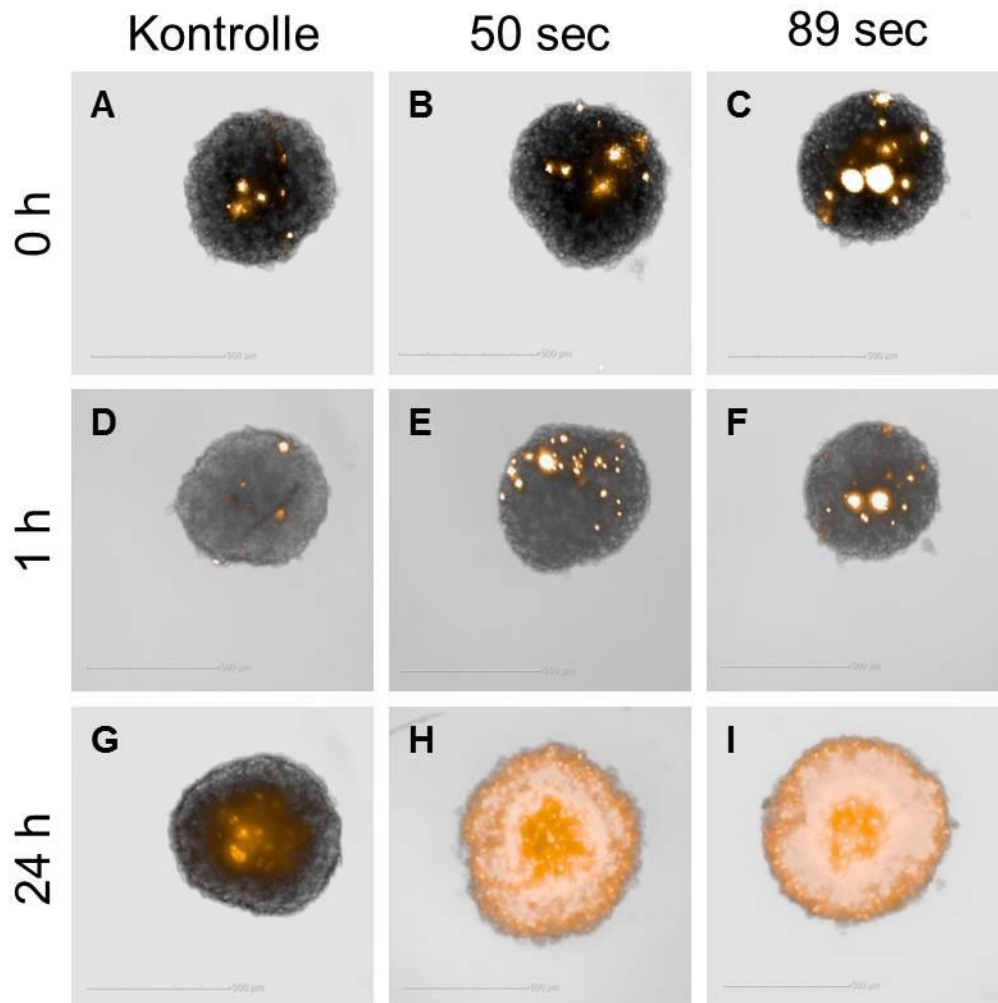
**Abbildung 26:** Direkte Plasmabehandlung der MNT-1-Sphäroide. Zunächst wurden 1000 MNT-1-Zellen ausgesät und nach 72 h weiterverwendet. Es wurden zwei verschiedene Plasmazeiten (50 s: D-F bzw. 89 s: G-I) sowie eine Kontrolle (A-C) gewählt. Zudem wurden die Bilder zu drei verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen. Zum einen direkt vor (A, D, G) sowie 1 h (B, E, H) und 24 h (C, F, I) nach der jeweiligen Behandlung. Die Kontrolle wurde nicht behandelt. Zur zeitlichen Orientierung beziehen sich die Aufnahmezeiten auch bei der Kontrolle jeweils auf den Zeitpunkt  $t = 0$  ab der Behandlung. Die Bildaufnahme erfolgte 24 h nach der Behandlung mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS. Die Maßstabsskala beträgt 500  $\mu\text{m}$ . **A:** MNT-1-Kontrollsphäroid vor der Behandlung. **B:** MNT-1-Kontrollsphäroid 1 h nach der Behandlung. **C:** MNT-1-Kontrollsphäroid 24 h nach der Behandlung. **D:** MNT-1-Sphäroid vor 50 s direkter Plasmabehandlung. **E:** MNT-1-Sphäroid 1 h nach 50 s direkter Plasmabehandlung. Es ist kaum eine Veränderung zu erkennen. **F:** MNT-1-Sphäroid 24 h nach 50 s direkter Plasmabehandlung. Eine deutliche Auflockerung der Zellperipherie lässt sich erkennen. **G:** MNT-1-Sphäroid vor 89 s direkten Plasmabehandlung. **H:** MNT-1-Sphäroid 1 h nach 89 s direkter Plasmabehandlung. Es ist kaum eine Veränderung zu erkennen. **I:** MNT-1-Sphäroid 24 h nach 89 s direkter Plasmabehandlung. Eine deutliche Auflockerung der Zellperipherie lässt sich erkennen.



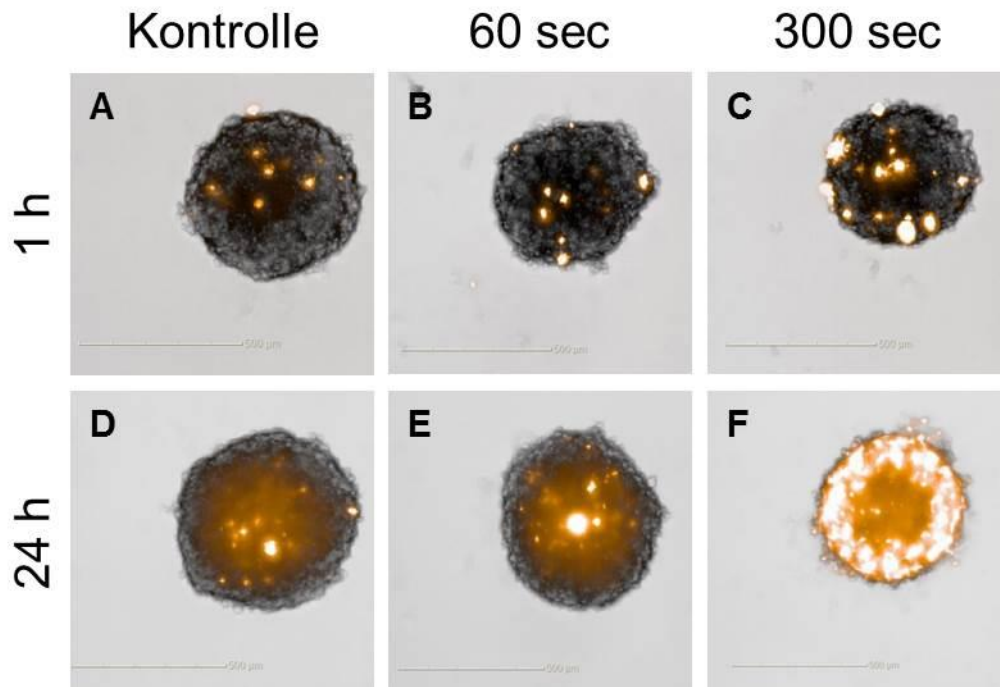
**Abbildung 27:** Indirekte Plasmabehandlung der MNT-1-Sphäroide. Zunächst wurden 1000 MNT-1-Zellen ausgesät und nach 72 h weiterverwendet. Dargestellt sind eine Kontrolle (A-C) und eine indirekte Plasmabehandlung des Mediums über 300 s (D-F) zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Zum einen direkt vor (A, D), dann 1 h (B, E) und 24 h (C, F) nach der jeweiligen Behandlung. Die Kontrolle wurde nicht behandelt. Zur zeitlichen Orientierung beziehen sich die Aufnahmezeiten auch bei der Kontrolle jeweils auf den Zeitpunkt  $t = 0$  ab der Behandlung. Die Bildaufnahme erfolgte 24 h nach der Behandlung mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS. Die Maßstabsskala beträgt 500  $\mu\text{m}$ . **A:** MNT-1-Kontrollsphäroid vor der Behandlung. **B:** MNT-1-Kontrollsphäroid 1 h nach der Behandlung. **C:** MNT-1-Kontrollsphäroid 24 h nach der Behandlung. **D:** MNT-1-Sphäroid vor der Zugabe des über 300 s plasmabehandelten Mediums. **E:** MNT-1-Sphäroid 1 h nach der Zugabe des über 300 s plasmabehandelten Mediums. Es ist kaum eine Veränderung zu erkennen. **F:** MNT-1-Sphäroid 24 h nach der Zugabe des über 300 s plasmabehandelten Mediums. Ein deutliches Ausfransen der Zellperipherie lässt sich kaum erkennen.



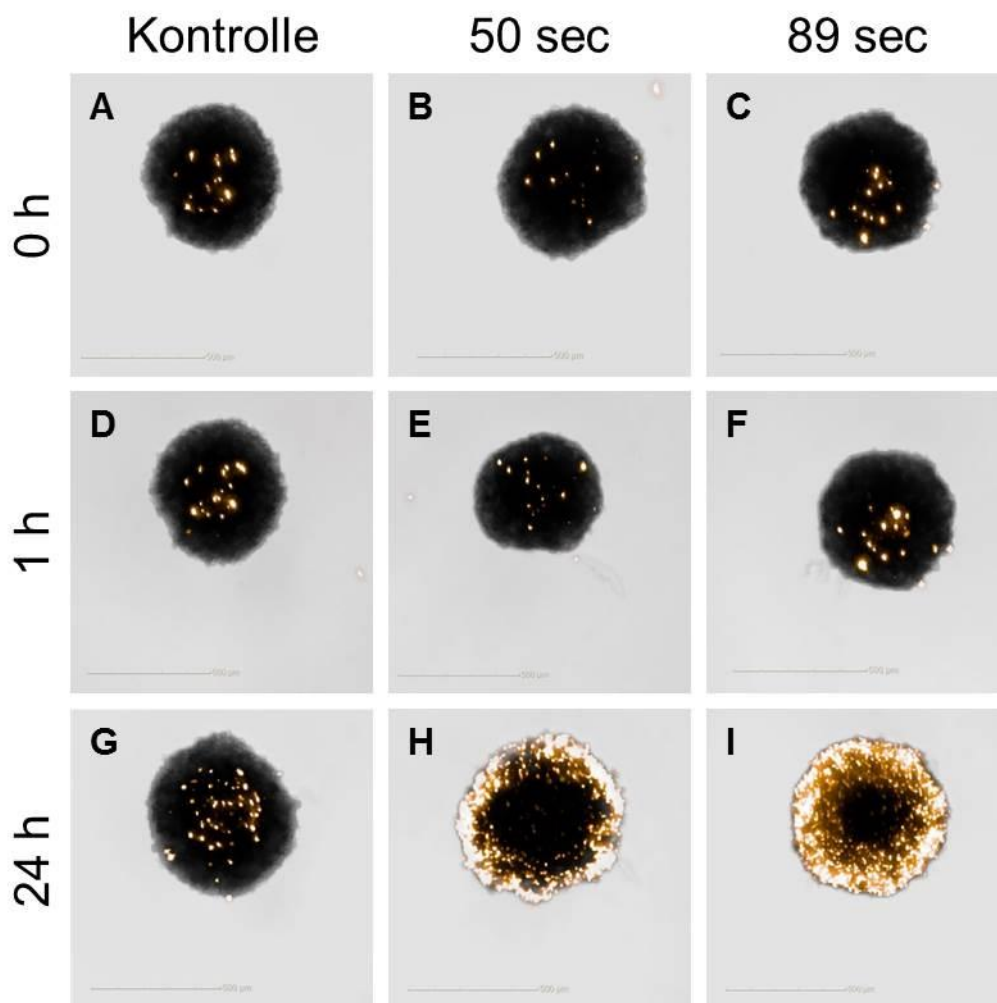
Diese Effekte wurden in einem weiteren Versuch durch die Zugabe von Propidiumiodid (PI), einem Nukleinsäureinterkalator, der nur die Zellmembran von perforierten oder toten Zellen passieren, jedoch nicht durch die intakte Membran von lebenden Zellen hindurchdiffundieren kann, validiert (Abb. 28-31). Die Zeiten der direkten Plasmabehandlung wurden wie in den vorhergehenden Versuchen gewählt (vgl. Kapitel 3.3.1). Die direkte Plasmabehandlung zeigt sowohl bei den SK-Mel-28- als auch bei den MNT-1-Zellen eine deutliche Zunahme der PI-Signalintensität über die Zeit (Abb. 28, 30). Dabei lassen sich kaum Unterschiede direkt nach (Abb. 28: A-C, Abb. 30: A-C) oder 1 h (Abb. 28: D-F, Abb. 30: D-F) nach der Plasmabehandlung bzw. eine Stunde nach dem Zusatz von plasmabehandeltem Medium (Abb. 29: A-C, Abb. 31: A-C) erkennen. Nach 24 h ist eine deutliche Signalsteigerung (Abb. 28: G-I; 29: D-F und 30: G-I, 31: D-F) sichtbar. Besonders in der aufgelockerten Zellperipherie scheint, neben dem Zellinneren des Sphäroids, besonders viel PI in die Zellen aufgenommen worden zu sein (Abb. 28-31). Die Bilder wurden innerhalb einer Zelllinie und eines Versuchs mit der gleichen Intensitätsstärke aufgenommen, sodass eine Signalzunahme durch keine weiteren digitalen Korrekturen (Autokontrast) verändert wird und dadurch ein optisches Unterscheidungsmerkmal darstellt. Es wird deutlich, dass die Sphäroide nach direkter Plasmabehandlung intensiver gefärbt sind als nach Zugabe von plasmabehandeltem Medium (Abb. 28-31).



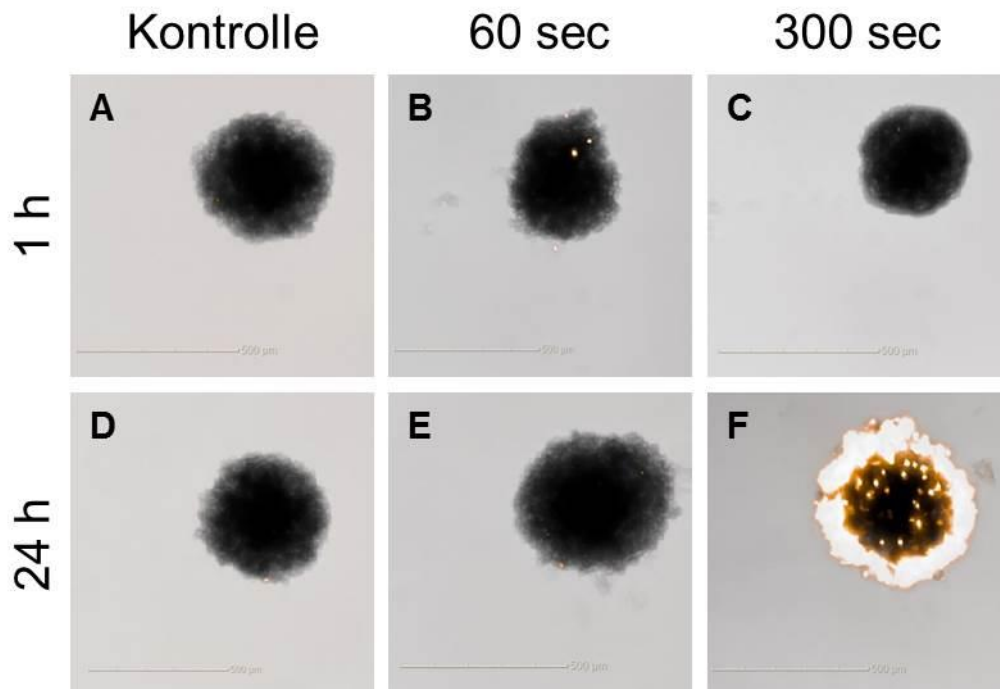
**Abbildung 28:** Zeitlicher Verlauf einer Propidiumiodid-Färbung (PI) von SK-Mel-28-Sphäroiden nach einer direkten Plasmabehandlung. Dargestellt sind die direkt plasmabehandelten Sphäroide, die über einen Zeitraum von 24 h mit dem CLS-Gerät aufgenommen wurden. Die Kontrolle wurde nicht behandelt. Zur zeitlichen Orientierung beziehen sich die Aufnahmezeiten auch bei der Kontrolle jeweils auf den Zeitpunkt  $t = 0$  ab der Behandlung. Die Bildaufnahme sowie Bearbeitung erfolgte mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS. Die Maßstabsskala beträgt  $500\ \mu\text{m}$ . Zum Zeitpunkt  $t = 0$  h wurden jeweils  $20\ \mu\text{l}$  einer verdünnten PI-Lösung (1:200 verdünnt in PBS) zu den Zellen, die 72 h kultiviert wurden, gegeben. **A:** Kontrolle der SK-Mel-28-Sphäroide zum Zeitpunkt  $t = 0$ . **B:** SK-Mel-28-Sphäroid, welches 50 s mit Plasma behandelt wurde, direkt nach der Plasmabehandlung ( $t = 0$  h). **C:** SK-Mel-28-Sphäroid, welches 89 s mit Plasma behandelt wurde, direkt nach der Plasmabehandlung ( $t = 0$  h). **D:** Kontrolle der SK-Mel-28-Sphäroide nach 1 h. **E:** SK-Mel-28-Sphäroid, welches 50 s direkt mit Plasma behandelt wurde, 1 h nach Behandlung. **F:** SK-Mel-28-Sphäroid, welches 89 s direkt mit Plasma behandelt wurde, 1 h nach Behandlung. **G:** Kontrolle der SK-Mel-28-Sphäroide nach 24 h. Eine PI Anreicherung lässt sich vor allem im Zentrum des Sphäroids erkennen. **H:** SK-Mel-28-Sphäroid 24 h nach 50 s direkter Plasmabehandlung. Eine deutliche Signalzunahme über dem ganzen Sphäroid ist ersichtlich. **I:** SK-Mel-28-Sphäroid 24 h nach 89 s direkter Plasmabehandlung. Die PI-Anreicherung ist über dem gesamten Sphäroid deutlich sichtbar.



**Abbildung 29:** Zeitlicher Verlauf einer Propidiumiodid-Färbung (PI) von SK-Mel-28-Sphäroiden nach einer indirekten Plasmabehandlung. Hierfür wurde Zellmedium für 60 s (B, E) oder 300 s (C, F) mit Plasma behandelt und anschließend gegen das unbehandelte Zellmedium ersetzt. Das Zellmedium der Kontrolle (A, D) wurde nicht mit Plasma behandelt. Dargestellt sind die Ergebnisse einer indirekten Plasmabehandlung, die über einen Zeitraum von 24 h mit dem CLS-Gerät aufgenommen wurde. Die Kontrolle wurde nicht behandelt. Zur zeitlichen Orientierung beziehen sich die Aufnahmezeiten auch bei der Kontrolle jeweils auf den Zeitpunkt  $t = 0$  ab der Behandlung. Die Bildaufnahme sowie Bearbeitung erfolgte mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS. Die Maßstabsskala beträgt  $500 \mu\text{m}$ . Zum Zeitpunkt  $t = 0$  h wurden jeweils  $20 \mu\text{l}$  einer verdünnten PI-Lösung (1:200 verdünnt in PBS) zu den Zellen, die 72 h kultiviert wurden, gegeben. Nach einer 1 h wurde das erste CLS-Bild bei einer 5-fachen Vergrößerung aufgenommen. Der Zeitpunkt direkt (0 h) nach der Plasmabehandlung wurde nicht erfasst. **A:** Kontrolle der SK-Mel-28-Sphäroide nach 1 h. Eine Signalzunahme ist vor allem im Zellinneren zu erkennen. **B:** SK-Mel-28-Sphäroid 1 h nach Zugabe eines 60 s plasmabehandeltem Mediums. Es ist kein deutlicher Unterschied zu dem Kontrollsphäroid ersichtlich. **C:** SK-Mel-28-Sphäroid 1 h nach Zugabe eines 300 s plasmabehandeltem Mediums. Es lassen sich punktuelle Signalerhöhungen im Vergleich zum Kontrollsphäroid erkennen. **D:** Kontrolle der SK-Mel-28-Sphäroide nach 24 h. Die PI-Anreicherung ist vor allem innerhalb des Sphäroids ausgeprägt und nimmt zur Peripherie ab. **E:** SK-Mel-28-Sphäroid 24 h nach Zugabe eines 60 s plasmabehandeltem Mediums. Die Signalintensität hat besonders im Sphäroidzentrum zugenommen. Ein deutlicher Unterschied zur Kontrolle ist nicht zu erkennen. **F:** SK-Mel-28-Sphäroid 24 h nach Zugabe eines 300 s plasmabehandeltem Mediums. Es ist eine deutliche Signalzunahme in der Peripherie sowie über dem gesamten Sphäroid vorhanden.



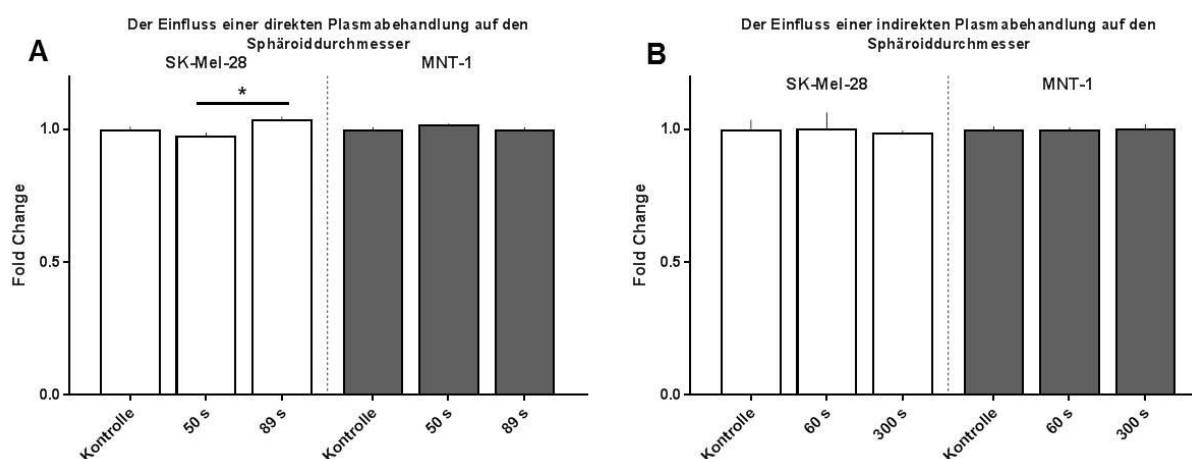
**Abbildung 30:** Zeitlicher Verlauf einer Propidiumiodid-Färbung (PI) von MNT-1-Sphäroiden nach einer direkten Plasmabehandlung. Dargestellt ist eine direkte Plasmabehandlung, die über einen Zeitraum von 24 h mit dem CLS-Gerät aufgenommen wurde. Die Kontrolle wurde nicht behandelt. Zur zeitlichen Orientierung beziehen sich die Aufnahmezeiten auch bei der Kontrolle jeweils auf den Zeitpunkt  $t = 0$  ab der Behandlung. Die Bildaufnahme sowie Bearbeitung erfolgte mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS. Die Maßstabsskala beträgt  $500\ \mu\text{m}$ . Zum Zeitpunkt  $t = 0$  h wurden jeweils  $20\ \mu\text{l}$  einer verdünnten PI-Lösung (1:200 verdünnt in PBS) zu den Zellen, die 72 h kultiviert wurden, gegeben. **A:** Kontrolle der MNT-1-Sphäroide zum Zeitpunkt  $t = 0$ . **B:** MNT-1-Sphäroid, welches 50 s direkt mit Plasma behandelt wurde, unmittelbar nach der Plasmabehandlung ( $t = 0$  h). **C:** MNT-1-Sphäroid, welches 89 s direkt mit Plasma behandelt wurde, unmittelbar nach der Plasmabehandlung ( $t = 0$  h). **D:** Kontrolle der MNT-1-Sphäroide nach 1 h. **E:** MNT-1-Sphäroid, welches 50 s direkt mit Plasma behandelt wurde, 1 h nach Behandlung. **F:** MNT-1-Sphäroid, welches 89 s direkt mit Plasma behandelt wurde, 1 h nach Behandlung. **G:** Kontrolle der MNT-1-Sphäroide nach 24 h. Eine PI Anreicherung lässt sich vor allem im Zentrum des Sphäroids erkennen. **H:** MNT-1-Sphäroid 24 h nach 50 s direkter Plasmabehandlung. Eine deutliche Signalzunahme besonders in der Peripherie des Sphäroids ist ersichtlich. **I:** MNT-1-Sphäroid 24 h nach 89 s direkter Plasmabehandlung. Die PI-Anreicherung ist besonders an der Sphäroidperipherie erkennbar und verringert sich tendenziell zum Sphäroidzentrum hin.



**Abbildung 31:** Zeitlicher Verlauf einer Propidiumiodid-Färbung (PI) von MNT-1-Sphäroiden nach einer indirekten Plasmabehandlung. Hierfür wurde Zellmedium für 60 s (B, E) oder 300 s (C, F) mit Plasma behandelt und anschließend gegen das unbehandelte Zellmedium ersetzt. Das Zellmedium der Kontrolle (A, D) wurde nicht mit Plasma behandelt. Dargestellt ist eine indirekte Plasmabehandlung, die über einen Zeitraum von 24 h mit dem CLS-Gerät aufgenommen wurde. Die Kontrolle wurde nicht behandelt. Zur zeitlichen Orientierung beziehen sich die Aufnahmezeiten auch bei der Kontrolle jeweils auf den Zeitpunkt  $t = 0$  ab der Behandlung. Die Bildaufnahme sowie Bearbeitung erfolgte mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS. Die Maßstabsskala beträgt  $500 \mu\text{m}$ . Zum Zeitpunkt  $t = 0$  h wurden jeweils  $20 \mu\text{l}$  einer verdünnten PI-Lösung (1:200 verdünnt in PBS) zu den Zellen, die 72 h kultiviert wurden, gegeben. Nach einer 1 h wurde das erste CLS-Bild bei einer 5-fachen Vergrößerung aufgenommen. Der Zeitpunkt direkt (0 h) nach der Plasmabehandlung wurde nicht erfasst. **A:** Kontrolle der MNT-1-Sphäroide nach 1 h. Es ist kaum ein PI-Signal zu detektieren. **B:** MNT-1-Sphäroid 1 h nach Zugabe eines 60 s plasmabehandeltem Mediums. Es ist kein deutlicher Unterschied zu dem Kontrollsphäroid ersichtlich. Lediglich einzelne punktuelle Signale sind vorhanden. **C:** MNT-1-Sphäroid 1 h nach Zugabe eines 300 s plasmabehandeltem Mediums. Es lässt sich kein Unterschied im Vergleich zum Kontrollsphäroid erkennen. **D:** Kontrolle der MNT-1-Sphäroide nach 24 h. Es ist keine deutliche Signalzunahme erkennbar. **E:** MNT-1-Sphäroid 24 h nach Zugabe eines 60 s plasmabehandeltem Mediums. Die Signalintensität ist im Vergleich zu der Aufnahme zum Zeitpunkt  $t = 1$  h unverändert geblieben. **F:** MNT-1-Sphäroid 24 h nach Zugabe eines 300 s plasmabehandeltem Mediums. Es ist eine deutliche ringförmige, den Sphäroid umfassende Signalzunahme in der Peripherie vorhanden.

Bezüglich des Sphäroiddurchmessers lassen sich keine signifikanten Größenunterschiede zwischen den Behandlungen (direkte, indirekte Plasmabehandlung) erkennen (Abb. 32). Hierfür wurde der Durchmesser für jeden einzelnen Tumorsphäroid an zwei verschiedenen Stellen ausgemessen und der Mittelwert gebildet. Verglichen wurden die einzelnen Behandlungsmodalitäten als fold change bezogen auf die Kontrolle, die auf 1 gesetzt wurde. Die aufgelockerte Peripherie der Sphäroide nach der direkten Plasmabehandlung (Abb. 24-27) wurde im Durchmesser mitgemessen. Hieraus lässt sich der signifikante Unterschied zwischen der 50 s und 89 s direkten Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Sphäroide erklären.

Die SK-Mel-28-Sphäroide, die 89 s direkt mit Plasma behandelt wurden, sind signifikant größer im Vergleich zu den 50 s behandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. (Abb. 32: A). Insgesamt wurden pro Versuchsmodalität jeweils zwischen  $n = 10$  bis  $n = 15$  Sphäroide, 24 h nach der jeweiligen Behandlung, ausgemessen. Die unterschiedliche Anzahl liegt zum einen am möglichen Verlust der Sphäroide durch die Behandlung und zum anderen an unförmigen Sphäroiden, die keine runde Form aufwiesen und daher nicht miteinbezogen wurden.



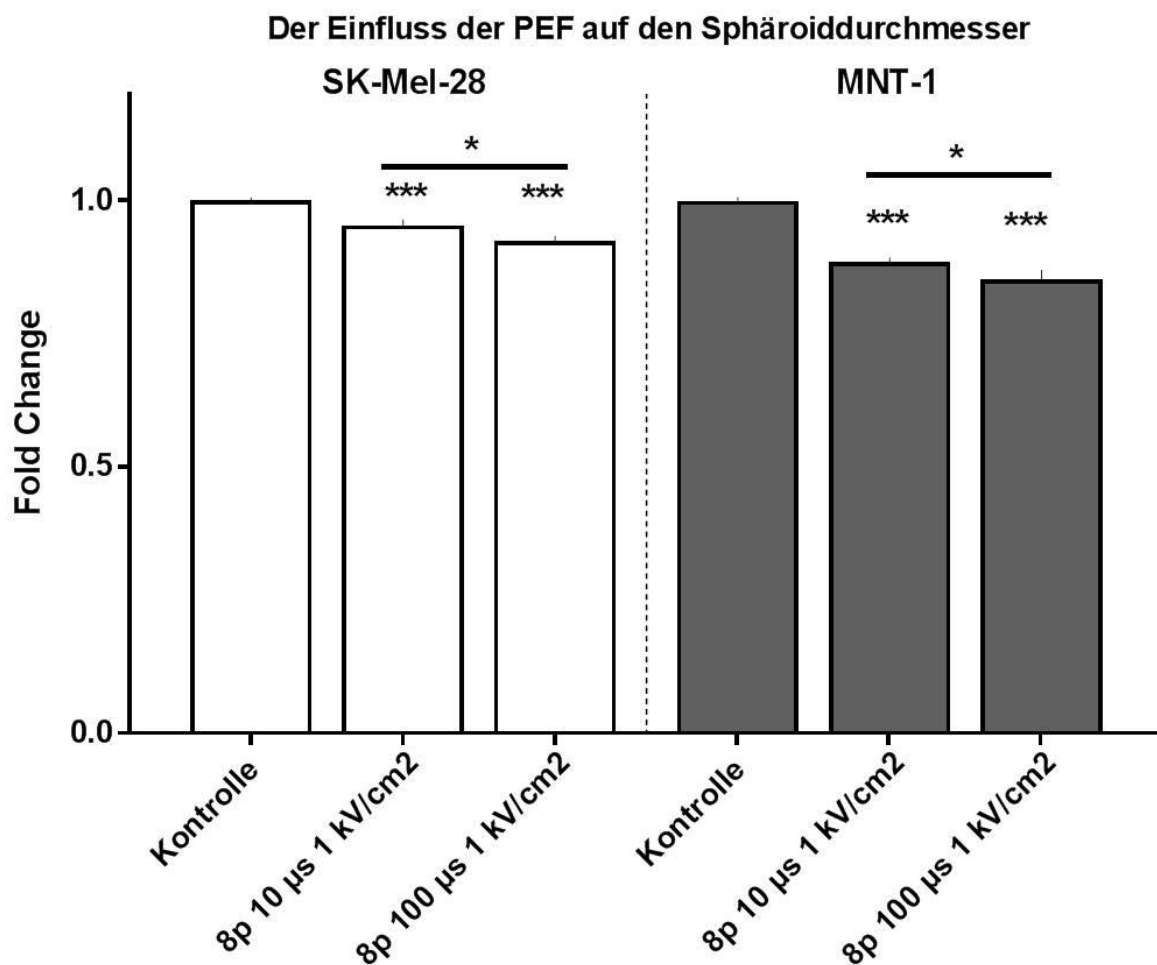
**Abbildung 32:** Diagrammübersicht über den Einfluss der direkten und indirekten Plasmabehandlung auf den Sphäroiddurchmesser. **A:** Der Einfluss der direkten Plasmabehandlung (Kontrolle, 50 s, 89 s) auf den Sphäroiddurchmesser von SK-Mel-28- und MNT-1-Zellen. Die fold change wurde jeweils auf die unbehandelte Kontrolle bezogen, die auf 1 gesetzt wurde. **B:** Der Einfluss der indirekten Plasmabehandlung (Kontrolle, 60 s, 300 s) auf den Sphäroiddurchmesser. Als fold change wurde jeweils die unbehandelte Kontrolle gewählt und auf 1 gesetzt. Die Anzahl der ausgemessenen Sphäroide belief sich zwischen  $n = 10$  und  $n = 15$  Sphäroide pro Versuchsmodalität. Die Messung erfolgte 24 h nach der jeweiligen Behandlung. Dabei entspricht \*  $p \leq 0,05$ .

### 3.3.4 Der Einfluss gepulster elektrischer Felder (PEF) auf die Sphäroidgröße und das Aussehen

Es wurde die Einwirkung von zwei verschiedenen Pulslängen ( $10 \mu\text{s}$  bzw.  $100 \mu\text{s}$ ) auf die Sphäroide der beiden Zelllinien SK-Mel-28 und MNT-1 getestet, um die Effekte von  $\mu\text{sPEF}$  am Sphäroidmodell zu beobachten. Angewandt wurden 8 Pulse mit einer Pulslänge von jeweils  $10 \mu\text{s}$  bzw.  $100 \mu\text{s}$  und einer Feldstärke von  $1 \text{ kV/cm}$  über eine Gesamtdauer von 1 s, 72 h nach Aussaat der Sphäroide (1000 Zellen bei der SK-Mel-28- und 2000 Zellen bei den MNT-1-Zelllinie). 24 h nach der Behandlung wurden die Sphäroide über Nacht in 4 % PFA bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  fixiert und am nächsten Tag in Agarose eingebettet (vgl. Kapitel 2.2.4). Vor der Fixierung wurden die Durchmesser von insgesamt jeweils 30 Sphäroiden pro Behandlungsmodalität (Kontrolle,  $10 \mu\text{s}$ ,  $100 \mu\text{s}$  PEF-Behandlung) bzw. Zelllinie (SK-Mel-28

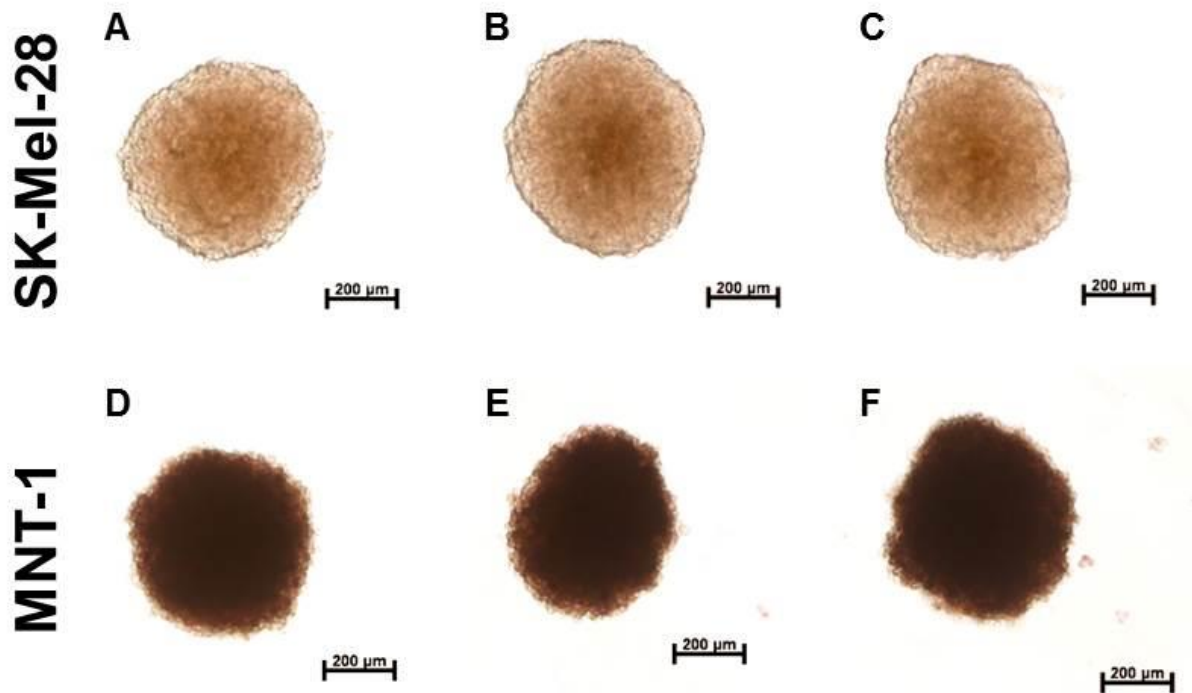
bzw. MNT-1) ausgemessen. Die Messungen ergaben eine signifikante Reduktion des Sphäroiddurchmessers nach der PEF-Behandlung. In Abbildung 33 wird jeweils der Sphäroiddurchmesser als fold change bezogen auf die jeweilige Kontrolle (SK-Mel-28 bzw. MNT-1), die auf 1 gesetzt wurde, dargestellt. Die hochgradige Signifikanz ( $p\text{-Wert} \leq 0,001$ ) bezieht sich jeweils auf die Kontrolle. Die Reduktion des Durchmessers lässt sich sowohl bei der Behandlung mit einer Pulslänge von jeweils  $10\ \mu\text{s}$ , als auch bei einer von  $100\ \mu\text{s}$ , unabhängig von der Zelllinie, erkennen. Dabei kam es bei den SK-Mel-28-Zellen zu einer relativen Reduktion auf 0,95 nach  $10\ \mu\text{s}$  bzw. auf 0,92 nach  $100\ \mu\text{s}$  Behandlungszeit. Bei den MNT-1-Zellen war eine relative Reduktion auf 0,88 nach  $10\ \mu\text{s}$  bzw. auf 0,84 nach  $100\ \mu\text{s}$  PEF-Behandlung zu beobachten (Abb. 33). Zwischen den beiden Behandlungsformen ( $10\ \mu\text{s}$  bzw.  $100\ \mu\text{s}$ ) besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied mit einem  $p\text{-Wert} p \leq 0,05$  bei beiden Zelllinien.

Morphologisch unterscheiden sich die behandelten Sphäroide nicht stark von der jeweiligen Kontrolle. Zudem ist die Größenreduktion rein visuell kaum zu erkennen (Abb. 34). Eine Verformung (nicht dargestellt) der behandelten Sphäroide lässt sich vereinzelt erkennen. Die Verkleinerung der Sphäroide lässt sich, aufgrund des signifikanten Unterschiedes zwischen den beiden Behandlungsformen, nicht ausschließlich auf die Scherkräfte während der Versuchsdurchführung zurückführen (Abb. 33).



**Abbildung 33:** Einfluss der PEF-Behandlung auf den Sphäroiddurchmesser 24 h nach Behandlung. Dargestellt sind die SK-Mel-28- (links) sowie die MNT-1-Sphäroide (rechts). Die jeweilige Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Änderungen nach der Behandlung (10 µs, 100 µs) als fold change dargestellt. Die Messung erfolgte 24 h nach der jeweiligen Behandlung mit dem Programm AxioVision 4.8 bei 5-facher Vergrößerung am Axiovert 40 CFL Mikroskop von Zeiss. Es lässt sich eine signifikante Reduktion des Sphäroiddurchmessers erkennen mit einem p-Wert von  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) nach 10 µs PEF-Behandlung und einem p-Wert von  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) nach 100 µs PEF-Behandlung erkennen. Zwischen den beiden Behandlungen 10 µs bzw. 100 µs besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von  $p \leq 0,05$  (\*). Insgesamt wurden pro Behandlungsmodalität die Mittelwerte der Sphäroiddurchmesser von  $n = 30$  Sphäroiden mit der entsprechenden Standardabweichung gemessen und ausgewertet.





**Abbildung 34:** Einfluss der PEF-Behandlung auf die Sphäroidmorphologie von SK-Mel-28- und MNT-1-Sphäroide. Ausgesät wurden 1000 SK-Mel-28- (A-C) und 2000 MNT-1-Zellen (D-F) an Tag 1 (0 h) und nach 72 h mit 8 Pulsen mit einer Pulslänge von jeweils 10 µs (B, E) bzw. 100 µs (C, F) und einer Feldstärke von 1 kV/cm über eine Gesamtdauer von 1 s behandelt. Die Bildaufnahme erfolgte 24 h nach der Behandlung bei 5-facher Vergrößerung mit dem Axiovert 40 CFL Mikroskop von Zeiss und wurde mit den Programmen AxioVision 4.8 sowie Microsoft PowerPoint 2010 bearbeitet. **A:** Kontrolle der SK-Mel-28-Sphäroide. **B:** PEF-Behandlung mit einer Pulslänge von 10 µs. **C:** PEF-Behandlung mit einer Pulslänge von 100 µs. **D:** Kontrolle der MNT-1-Sphäroide. **E:** PEF-Behandlung mit einer Pulslänge von 10 µs. **F:** PEF-Behandlung mit einer Pulslänge von 100 µs. Vom optischen Erscheinungsbild lassen sich keine Unterschiede in der Kompaktheit erkennen.

### **3.4 Der Vergleich verschiedener Behandlungsmodalitäten mittels immunzytologischer und immunhistochemischer Untersuchungen**

#### **3.4.1 Immunfluoreszenzfärbungen und automatisierte Bildauswertung am CLS**

Die Schnittpräparate der Sphäroide wurden auf die Expression von jeweils vier verschiedenen Targets getestet, die anhand von verschiedenen Fluoreszenzlabels dargestellt wurden. DAPI wurde zur Kernfärbung verwendet. Insgesamt wurden sieben verschiedene Sets betrachtet, die in Tabelle 17 aufgelistet sind. Diese wurden so gewählt, dass sie den Einfluss der Plasmabehandlung bzw. der Behandlung mit PEF auf die Proliferation/Apoptose, DNA-Schädigung, Nrf2-Antwort, antioxidative Antwort, EMT und andere widerspiegeln und untersuchen. Verwendet wurden Alexa-Fluor-Farbstoffe, die entweder bereits an den ersten Antikörper primär gebunden sind oder an einen sekundären Antikörper gekoppelt waren (vgl. Kapitel „2.1.9 Antikörper“). Zur Differenzierung der Emissionsfarben wurden die Farbstoffe Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 sowie Alexa Fluor 647 (für einen Antikörper ebenfalls Alexa Fluor 700) genutzt. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte wie im Kapitel „2.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung“ bzw. „2.2.2.3 TUNEL-Färbung“ beschrieben. Die angewandten Verdünnungen der primären und sekundären Antikörper wurden tabellarisch in Kapitel „2.1.9 Antikörper“ aufgelistet.

Die Kombination von primär gelabelten Antikörpern derselben Spezies wird von zahlreichen Anbietern wie Novus Biologicals, Cellsignaling oder Abcam mit einer geringen Kreuzreaktivität beschrieben. Dies liegt daran, dass der primäre Antikörper als Fluorophor bereits mit dem Farbstoff gekoppelt ist. Dagegen können sekundäre Antikörper mit anderen Substanzen als den gewünschten Spezies kreuzreagieren. Demnach ist der Einsatz primärer Antikörper von unterschiedlichen Spezies bei dieser indirekten Methode der Immunfluoreszenz mit sekundären Antikörpern notwendig.

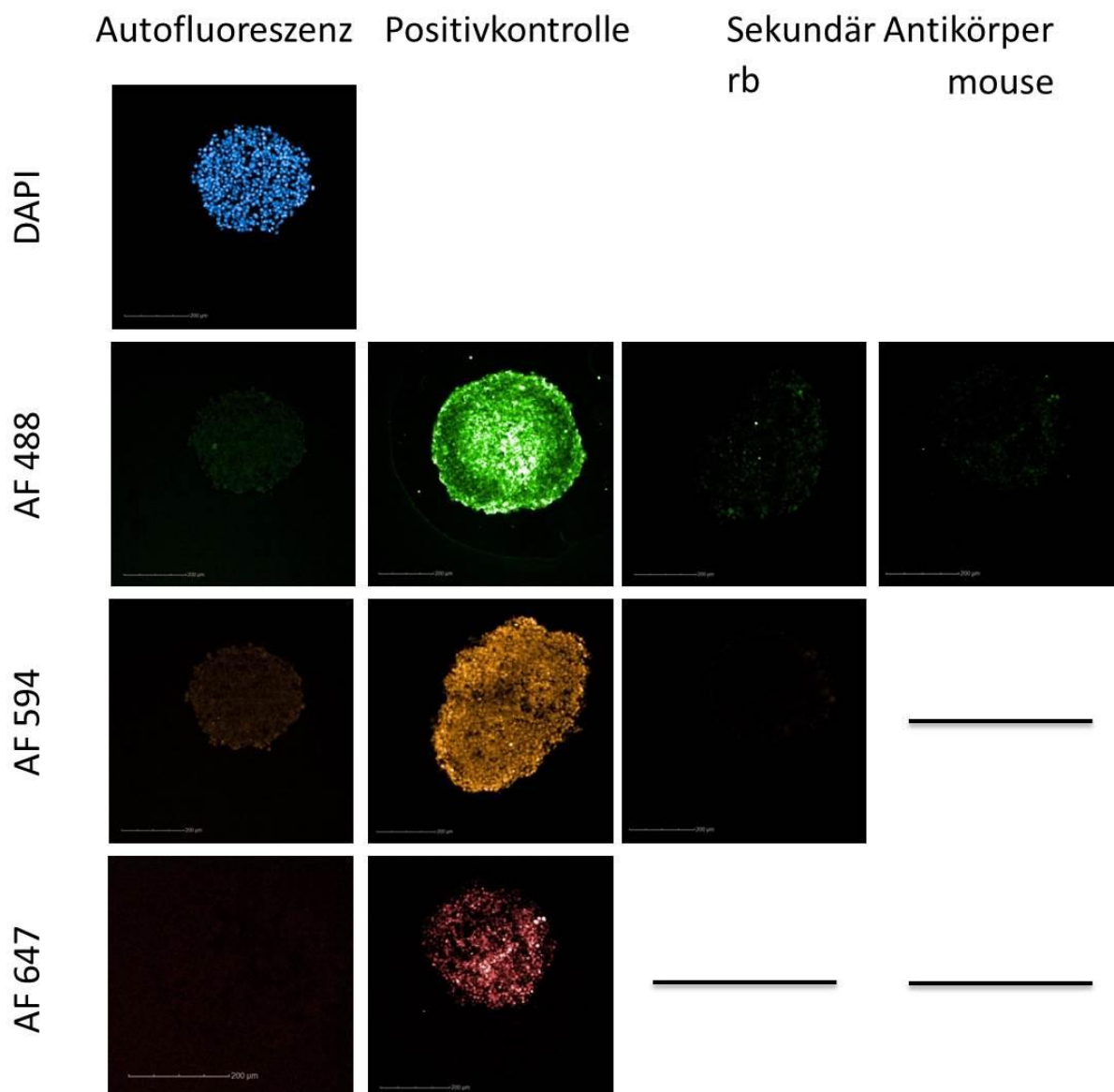
**Tabelle 17:** Antikörpersets. Zur Kernfärbung wurde bei jedem Set DAPI verwendet.

<b>Set</b>	<b>Antikörper/Enzyme</b>	<b>Immunfluoreszenz</b>
Set 1: Viabilität	TUNEL Cleaved Caspase 3 Ki-67	Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 594 Alexa Fluor 647
Set 2: DNA-Schaden	pATR 8-OHdGuanosine $\gamma$ -H2A.X	Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 594 Alexa Fluor 647
Set 3: Antioxidative Antwort	Catalase Superoxid-Dismutase-1 Glutathion-Peroxidase	Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 594 Alexa Fluor 647
Set 4: Nrf2-Antwort	Heme Oxygenase 1 Nrf2 HIF1 $\alpha$	Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 594 Alexa Fluor 647
Set 5: Epithelial- mesenchymale Transition (EMT)	E-Cadherin $\alpha$ -smooth muscle Actin ZEB1	Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 594 Alexa Fluor 700
Set 6: Danger response	HSP70 Calregulin/Calreticulin HSP90 beta	Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 594 Alexa Fluor 647
Set 7: Andere	MCT1/SLC16A1 Phospho-AKT Pan Light Chain 3 (LC3A/B)	Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 594 Alexa Fluor 647

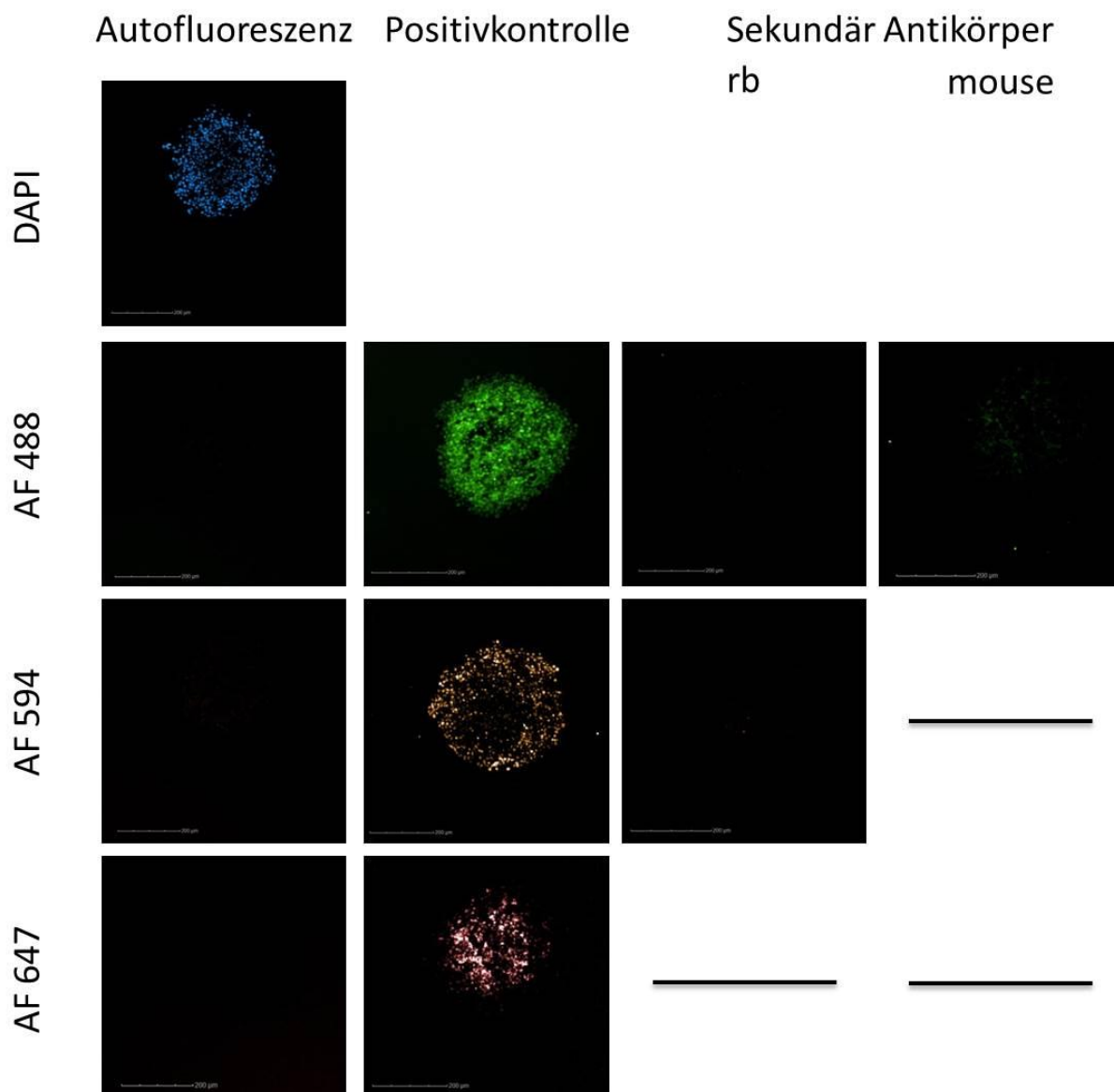
### 3.4.2 Ausschluss der Kreuzreaktivität

Zur Verwendung mehrerer Farben bei der indirekten Immunfluoreszenz mit einem sekundären Antikörper ist es notwendig, dass die weiteren Antikörper von einer anderen Spezies als die der Reaktivität des sekundären Antikörpers abstammen. Unter Betrachtung der Tabelle 17 lassen sich Sets finden, die entweder nur primär gelabelte Antikörper (z. B. Set 6), eine Kombination von primär gelabelten und sekundären Antikörpern mit verschiedenen Spezies (Set 1), oder mindestens einen primär gelabelten Antikörper mit derselben Spezies wie ein sekundärer Antikörper (z. B. Set 2) aufweisen. Zum Ausschluss der Kreuzreaktivität eines sekundären Antikörpers mit einem primär gelabelten Antikörper derselben Spezies wurde exemplarisch ein primär gelabelter Antikörper und der sekundäre Antikörper ohne seinen entsprechenden primären Antikörper nacheinander inkubiert. Dabei sollte der primär gelabelte Antikörper ein positives Signal – nach dem Prinzip der spezifischen Bindung –, der sekundäre Antikörper hingegen kein Signal abgeben. Die Fluoreszenzintensität wird dabei mit der Autofluoreszenz der geschnittenen Sphäroide verglichen. Der Nachweis der Autofluoreszenzsignalstärke erfolgte durch eine reine DAPI-Färbung ohne den Einsatz weiterer Antikörper. Die weiteren Kanäle (AF 488, AF 594, AF 647) wurden mit derselben Belichtungszeit aufgenommen wie auch die entsprechende spezifische Antikörperfärbung. Das dabei entstandene Signal wurde als Autofluoreszenz definiert (Abb. 35, 36).

Die Abbildungen 35 und 36 zeigen, dass sich die potentielle Kreuzreaktivität der sekundären Antikörper nicht signifikant von der Autofluoreszenz der reinen DAPI-Färbung unterscheidet. Hieraus wurde angenommen, dass die folgenden MFI-Messergebnisse auf spezifischen positiven Signalen beruhen (Abb. 35, 36).



**Abbildung 35:** Graphische Darstellung der Autofluoreszenz im Vergleich zur Kreuzreaktivität der SK-Mel-28-Sphäroide. In den Reihen sind geschnittene SK-Mel-28-Sphäroide, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (DAPI, AF 488, AF 594, AF 647) gefärbt wurden, dargestellt. In den Spalten wurden die Autofluoreszenz als Grundfluoreszenz, eine Positivkontrolle mit jeweils einem exemplarischen Antikörper der entsprechenden Fluoreszenzfarbe und die sekundären Antikörper der jeweiligen Spezies (rb = Kaninchen und mouse = Maus) dargestellt. Dabei entspricht die Autofluoreszenz einer reinen DAPI-Färbung mit einer identischen Aufnahmezeit wie die Positivkontrolle der entsprechenden Kanäle (AF 488, 594, 647). Die Spalte sekundäre Antikörper wurde anhand der Sets gewählt, die eine mögliche Kreuzreaktion zwischen sekundären und primär gelabelten Antikörper ermöglichen und entspricht einer reinen Färbung mit einem sekundären Antikörper, ohne den entsprechenden zu detektierenden primären Antikörper. Der potentielle primär gelabelte Antikörper der gleichen Spezies (Kaninchen oder Maus) wurde mit inkubiert. Die Positivkontrolle entspricht einer Färbung mit dem jeweils zu detektierenden Antikörper. Die Aufnahme erfolgte am CLS-Gerät bei 5-facher Vergrößerung. Die optimale Bildaufnahmehöhe wurde für jeden Fluoreszenzkanal individuell ermittelt. Die Aufnahmezeit wurde für jede Farbe jedes Sets gleich belassen.



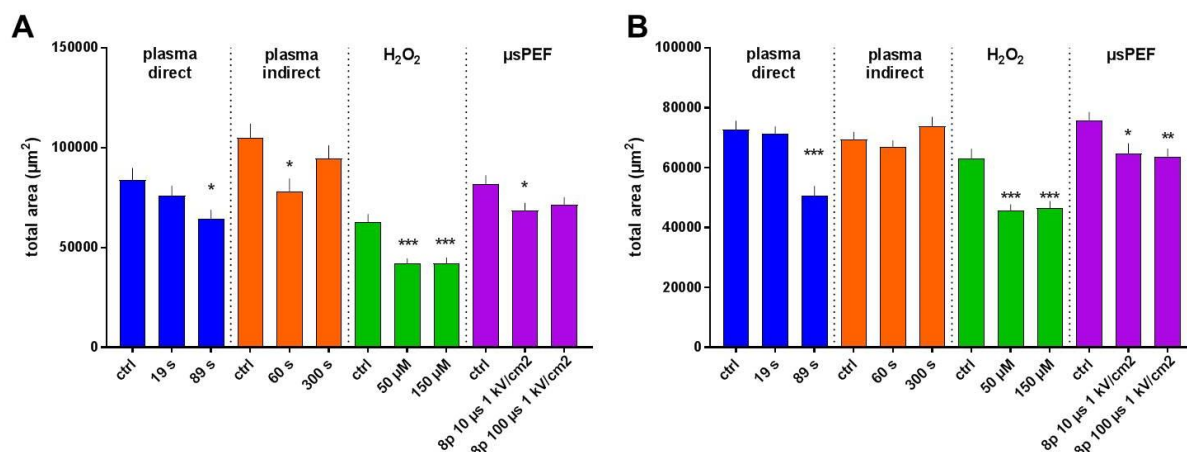
**Abbildung 36:** Graphische Darstellung der Autofluoreszenz im Vergleich zur Kreuzreaktivität der MNT-1-Sphäroide. In den Reihen sind geschnittene MNT-1-Sphäroide, die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (DAPI, AF 488, AF 594, AF 647) gefärbt wurden, dargestellt. In den Spalten wurden die Autofluoreszenz als Grundfluoreszenz, eine Positivkontrolle mit jeweils einem exemplarischen Antikörper der entsprechenden Fluoreszenzfarbe und die sekundären Antikörper der jeweiligen Spezies (rb = Kaninchen und mouse = Maus) dargestellt. Dabei entspricht die Autofluoreszenz einer reinen DAPI-Färbung mit einer identischen Aufnahmezeit wie die Positivkontrolle der entsprechenden Kanäle (AF 488, 594, 647). Die Spalte sekundäre Antikörper wurde anhand der Sets gewählt die eine mögliche Kreuzreaktion zwischen sekundären und primär gelabelten Antikörper ermöglichen und entspricht einer reinen Färbung mit einem sekundären Antikörper, ohne den entsprechenden zu detektierenden primären Antikörper. Der potentielle primär gelabelte Antikörper der gleichen Spezies (Kaninchen oder Maus) wurde mit inkubiert. Die Positivkontrolle entspricht einer Färbung mit dem jeweils zu detektierenden Antikörper. Die Aufnahme erfolgte am CLS-Gerät bei 5-facher Vergrößerung. Die optimale Bildaufnahmehöhe wurde für jeden Fluoreszenzkanal individuell ermittelt. Die Aufnahmezeit wurde für jede Farbe jedes Sets gleich belassen.

### 3.4.3 Immunfluoreszenzauswertung der verschiedenen Sets

Die Immunfluoreszenzaufnahme und Auswertung erfolgte am CLS-Gerät und mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software bei einer 5-fachen Vergrößerung. Ausgewertet wurden Sphäroide zweier Zelllinien (SK-Mel-28 und MNT-1), die vier verschiedenen Behandlungsformen unterzogen wurden: die direkte sowie die indirekte Plasmabehandlung, die Positivkontrolle mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und die gepulsten elektrischen Felder (PEF) mit jeweils drei Behandlungsmodalitäten (Kontrolle und zwei verschiedene Behandlungszeiten/-intensitäten). Von den sieben Sets mit jeweils drei verschiedenen Immunfluoreszenzfarbstoffen (AF 488, AF 594, AF 647) sowie dem DNA-Marker DAPI zur Kernfärbung wurden jeweils die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten (*mean fluorescence intensity* = MFI) und die Gesamtfläche (*total area*) in  $\mu\text{m}^2$  pro Sphäroidschnitt erfasst. Das Auffinden der Sphäroide auf dem gescannten Slide erfolgte halbautomatisch, da das Programm ebenfalls jegliche Art von Verschmutzungen detektiert. Der Ausschluss falsch positiver Ergebnisse und die richtige Zuordnung der Zelllinie sowie der entsprechenden Behandlungsmodalität musste für jeden Sphäroidschnitt selbstständig durchgeführt werden.

In Abbildung 37 wird die Gesamtfläche der SK-Mel-28- (Abb. 37: A) und der MNT-1-Sphäroide (Abb. 37: B) in  $\mu\text{m}^2$  auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse werden die verschiedenen Behandlungsformen (direkte, indirekte Plasmabehandlung, Positivkontrolle mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung und  $\mu\text{sPEF}$ -Behandlung) mit den je drei Behandlungsmodalitäten dargestellt. Der Vergleich beider Zelllinien lässt erkennen, dass die SK-Mel-28 Sphäroidschnitte eine größere Gesamtfläche aufweisen als die MNT-1-Sphäroidschnitte (Abb. 37: A, B). Des Weiteren ist eine signifikante Größenreduktion (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen markiert wurden. Es lässt sich erkennen, dass die Sphäroide mit steigender Behandlungsintensität eine signifikante Gesamtflächenreduktion aufweisen. Die SK-Mel-28-Sphäroide weisen in mindestens einer Behandlungsmodalität pro Behandlungsform eine signifikante Reduktion auf. Jedoch trifft dies nicht immer auf die stärkste Behandlungsintensität zu. Ähnliche Effekte wurden auch bei den MNT-1-Sphäroiden mit Ausnahme der indirekten Plasmabehandlungsgruppe festgestellt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunzytologischen und immunhistochemischen Untersuchungen in den einzelnen Sets vorgestellt. Für die ersten drei Sets wurden zur Veranschaulichung exemplarische Immunfluoreszenzbilder beigefügt. Aus Platzgründen sowie aufgrund der relativen Ähnlichkeit der Abbildungen wurden die Immunfluoreszenzbilder der Sets 4 bis 7 nicht mehr einzeln aufgeführt.



**Abbildung 37:** Gesamtfläche (*total area*) der Sphäroide in  $\mu\text{m}^2$ . Auf der y-Achse wird die Gesamtfläche beider Zelllinien (A: SK-Mel-28 kurz SKM und B: MNT-1) dargestellt. Die x-Achse wird in die vier verschiedenen Behandlungsformen: direkte Plasmabehandlung (blau), indirekte Plasmabehandlung (orange), Positivkontrolle mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (grün) und  $\mu\text{sPEF}$  (violett) unterteilt (gestrichelte Linie). Die drei Behandlungsmodalitäten pro Behandlungsform werden auf der x-Achse beginnend mit der Kontrolle (ctrl) dargestellt. Dargestellt wurde jeweils der Mittelwert der jeweiligen Sphäroid-Gesamtfläche mit der entsprechenden Standardabweichung. Die Untersuchungen wurden 24 h nach der entsprechenden Behandlung durchgeführt. Dabei beträgt n für die SK-Mel-28-Sphäroide zwischen n = 55-94 und für die MNT-1-Sphäroide zwischen n = 11-84. Die Bildaufnahme der gefärbten Sphäroidschnitte erfolgte 24 h nach der Immunfluoreszenzfärbung am CLS-Gerät. Ein signifikanter Größenunterschied innerhalb einer Behandlungsform gegenüber der Kontrolle wird mit einem bis drei Sternchen (\*, \*\*, \*\*\*) markiert. Dabei entsprechen ein Sternchen (\*) einem p-Wert von  $p \leq 0,05$ , zwei Sternchen (\*\*) einem p-Wert von  $p \leq 0,01$  und drei Sternchen (\*\*\*) einem p-Wert von  $p \leq 0,001$ . Die statistische Auswertung, der am CLS-Gerät erhobenen Daten und die tabellarische Darstellung erfolgten mit dem GraphPad Prism 7. **A:** Dargestellt sind die SK-Mel-28-Sphäroide. Eine signifikante Reduktion der Gesamtfläche lässt sich mindestens für eine Behandlungsmodalität innerhalb jeder Behandlungsform erkennen. **B:** Darstellung der MNT-1-Sphäroide. Eine signifikante Reduktion der Gesamtfläche lässt sich bis auf die indirekte Plasmabehandlung in jeder Behandlungsform finden.

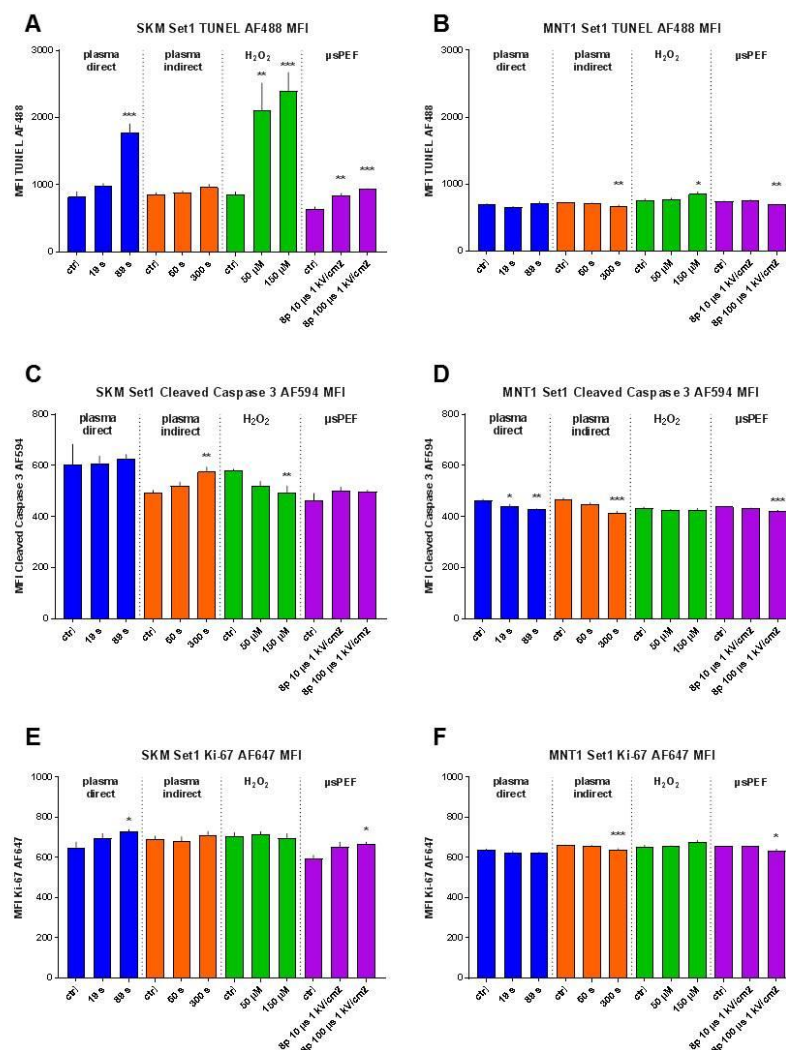
### 3.4.3.1 Auswertung von Set 1 – Viabilität (TUNEL, Cleaved Caspase 3, Ki-67)

Die verwendeten Sets wurden nach Themen zusammengestellt, um verschiedene Aspekte des Zellstoffwechsels oder des Zellschadens näher zu untersuchen. Im ersten Set wurden zwei Antikörper (Cleaved Caspase 3 AF 594; Ki-67 AF 647), eine enzymatische Reaktion (TUNEL AF 488) und DAPI zur Kernfärbung verwendet (vgl. Tab. 17). Insgesamt sollte dadurch die Apoptose- bzw. Proliferationsrate untersucht werden. In Abbildung 38 wird die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) aller drei Fluoreszenzfarbstoffe (AF 488, AF 594, AF 647) in insgesamt sechs Diagrammen auf der y-Achse dargestellt. Dabei stellen drei Diagramme die SK-Mel-28- (Abb. 38: A, C, E) und drei die MNT-1-Sphäroide (Abb. 38: B, D, F) dar. Die beiden Zelllinien werden – zur besseren Vergleichbarkeit der MFI – pro Fluoreszenzfarbstoff mit derselben Skalierung auf der y-Achse nebeneinander gestellt. Auf der x-Achse sind pro Diagramm vier Behandlungsformen (direkte, indirekte Plasmabehandlung, Positivkontrolle mit einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung,  $\mu\text{sPEF}$ -Behandlung) mit jeweils drei Behandlungsmodalitäten (unterschiedliche Zeiten oder Konzentrationen)



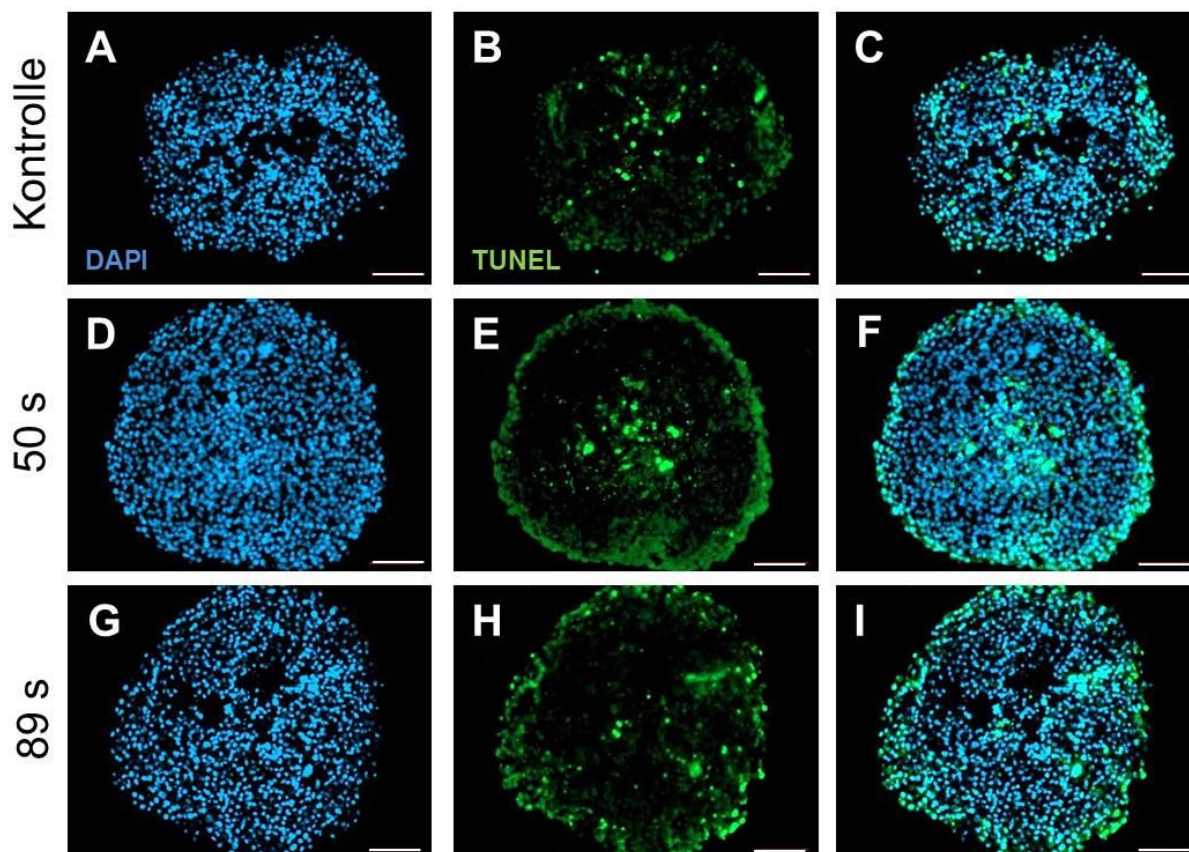
dargestellt. Dieser grundlegende Aufbau der Diagramme ist für alle weiteren Sets identisch (Abb. 38, 40, 42, 44-47).

Zur Quantifizierung der Apoptose wurde die MFI der TUNEL-Färbung (AF 488) bei beiden Zelllinien betrachtet (Abb. 38: A, B). Bei den SK-Mel-28-Sphäroiden kommt es bei der direkten Plasmabehandlung, der Positivkontrolle durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und der  $\mu$ sPEF-Behandlung zu einem hochgradig signifikanten Anstieg der TUNEL-MFI im Vergleich zur Kontrolle, jedoch nicht infolge der indirekten Plasmabehandlung (Abb. 38: A). Dieser Effekt zeigt sich bei den MNT-1-Sphäroiden nur bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung. Die indirekte Plasmabehandlung sowie die  $\mu$ sPEF weisen sogar eine geringfügige, jedoch signifikante Reduktion des MFI-Signals auf (Abb. 38: B). Ebenfalls eine Aussage über die Apoptose gibt die MFI der Cleaved Caspase 3, einem wichtigen, die Apoptose einleitenden Protein (Mazumder et al. 2008). Bei der indirekten Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Sphäroide lässt sich eine signifikante MFI-Erhöhung messen, die jedoch bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung entgegengesetzte Resultate aufzeigt. Bei der direkten Plasma- und der  $\mu$ sPEF-Behandlung gab es keinen Effekt (Abb. 38: C). Bei den MNT-1-Sphäroiden wurde eine signifikante Reduktion der MFI in drei Behandlungsformen (direkte, indirekte Plasmabehandlung und  $\mu$ sPEF-Behandlung) nachgewiesen (Abb. 38: D). Der dritte Antikörper dieses Sets war Ki-67, ein Proliferationsmarker, der nur in sich teilenden Zellen exprimiert ist (Scholzen & Gerdes 2000). Bei den MNT-1-Sphäroiden kam es in zwei Behandlungsformen (indirekte Plasmabehandlung und  $\mu$ sPEF-Behandlung) zu einer signifikanten Reduktion der MFI dieses Proliferationsmarkers (Abb. 38: F). Die SK-Mel-28-Sphäroide wiesen in zwei Gruppen (direkte Plasmabehandlung und  $\mu$ sPEF) gegenläufige Effekte auf, die später näher diskutiert werden (Abb. 38: E; Kapitel 4.5).



**Abbildung 38:** Set 1 Fluoreszenzfärbung. Gleichzeitig gefärbt wurden zwei Antikörper (C-F). Des Weiteren wurde noch eine enzymatische Reaktion (AF 488 TUNEL A, B) sowie DAPI zur Kernfärbung eingesetzt. Verwendet wurden die beiden Antikörper Cleaved Caspase 3 (1:100 rb, C, D), welcher mit einem sekundären Antikörper AF 594 (1:200, anti-rb) detektiert wurde und Ki-67 (AF 647, 1:25 rat, E, F), ein primär gelabelter Antikörper. Auf der y-Achse wird jeweils die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) mit der entsprechenden Standardabweichung pro Sphäroidschnitt angegeben. Pro Fluoreszenzfarbstoff wurden die beiden Zelllinien SK-Mel-28 (A, C, E) und MNT-1 (B, D, F) mit der gleichen Skalierung nebeneinandergestellt. Die Untersuchungen wurden 24 h nach der entsprechenden Behandlung durchgeführt. Bei den SK-Mel-28-Sphäroiden wurden pro Fluoreszenzfärbung n = 5-14 Schnitte ausgewertet. Bei den MNT-1-Sphäroiden wurden für die TUNEL- n = 8-24, für die CCP3- n = 7-25 und für die Ki-67-Färbung n = 7-24 Schnitte ausgewertet. Die Bildaufnahme der gefärbten Sphäroidschnitte erfolgte 24 h nach der Immunfluoreszenzfärbung am CLS-Gerät. **A:** MFI der TUNEL-Immunfluoreszenzfärbung bei SK-Mel-28-Sphäroiden. Es ist ein signifikanter Anstieg der MFI bei der direkten Plasmabehandlung sowie bei den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und μsPEF-behandelten Sphäroiden bei steigender Behandlungsintensität zu beobachten. **B:** MFI der TUNEL-Immunfluoreszenzfärbung der MNT-1-Sphäroide. Die MFI ist im Vergleich zu den SK-Mel-28-Zellen geringer. Ein signifikanter Anstieg ist bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung messbar. Die indirekte Plasmabehandlung sowie die μsPEF-behandelten Sphäroide weisen eine geringfügige Reduktion der MFI auf. **C:** Dargestellt wird die MFI der Cleaved Caspase 3 bei SK-Mel-28-Sphäroiden. Es ist sowohl ein signifikanter Anstieg bei der indirekten Plasmabehandlung, als auch eine signifikante Reduktion bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung zu sehen. **D:** Die MFI der Cleaved Caspase 3 bei den MNT-1-Zellen weist bei der direkten sowie indirekten Plasmabehandlung und der μsPEF eine signifikante Reduktion auf. **E:** Die MFI der Ki-67 Immunfluoreszenz weist bei den SK-Mel-28-Sphäroiden eine geringfügige Erhöhung in den beiden Behandlungsformen der direkten Plasmabehandlung sowie der μsPEF auf. **F:** Dargestellt wird die Ki-67-MFI bei den MNT-1-Sphäroiden. Es ließ sich eine signifikante Reduktion des Signals bei der indirekten Plasmabehandlung sowie der μsPEF-Behandlung messen.

Die Abbildung 39 verdeutlicht exemplarisch die TUNEL-Immunfluoreszenzverteilung bei den SK-Mel-28-Sphäroiden 24 h nach einer direkten Plasmabehandlung von 50 s und 89 s. Bereits nach einer 50 s Plasmabehandlung lässt sich eine deutliche Fluoreszenzintensivierung der Randbereiche sowie der zentralen Regionen erkennen (Abb. 39: E, F). Diese Verteilung ist bei einer 89 s Plasmabehandlung vergleichbar ausgeprägt (Abb. 39: H, I).

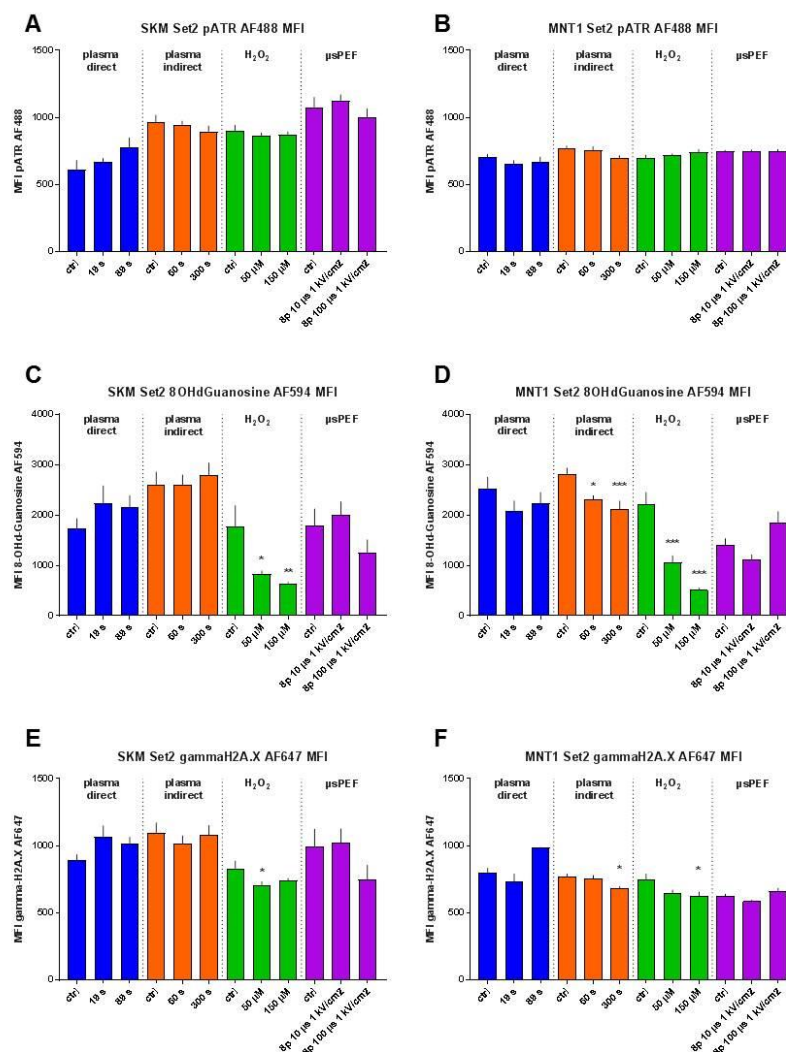


**Abbildung 39:** TUNEL-Immunfluoreszenzverteilung von SK-Mel-28-Sphäroidschnitten nach einer direkten Plasmabehandlung mit 50 s und 89 s. Die apoptotischen Zellen sind mit einer enzymatischen TUNEL-Immunfluoreszenzfärbung (AF 488) grün dargestellt. Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Aufgenommen wurden die Sphäroide 24 h nach der Behandlung mit der AxioCam MRm bei einer 10-fachen Vergrößerung und bearbeitet mit der ZEN Mikroskopie- und Imaging-Software 2011 von Carl Zeiss. Die Maßstabsskala beträgt 100  $\mu\text{m}$ . **A:** DAPI-Färbung eines Kontrollsphäroids. **B:** TUNEL-Färbung eines Kontrollsphäroids. **C:** Summationsbild der DAPI- und TUNEL-Kontrollimmunfluoreszenzfärbung. **D:** DAPI-Färbung der 50 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. **E:** TUNEL-Färbung der 50 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Die Zellperipherie sowie der Sphäroidkern weisen eine verstärkte Intensität auf. **F:** Summationsbild DAPI- und TUNEL-Immunfluoreszenzfärbung der 50 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. **G:** DAPI-Färbung der 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. **H:** TUNEL-Färbung der 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Die Immunfluoreszenz ist besonders am Randbereich intensiver ausgeprägt. **I:** Summationsbild DAPI- und TUNEL-Immunfluoreszenzfärbung der 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide.

### 3.4.3.2 Auswertung von Set 2 – DNA-Schaden (pATR, 8-OHdGuanosine, $\gamma$ -H2A.X)

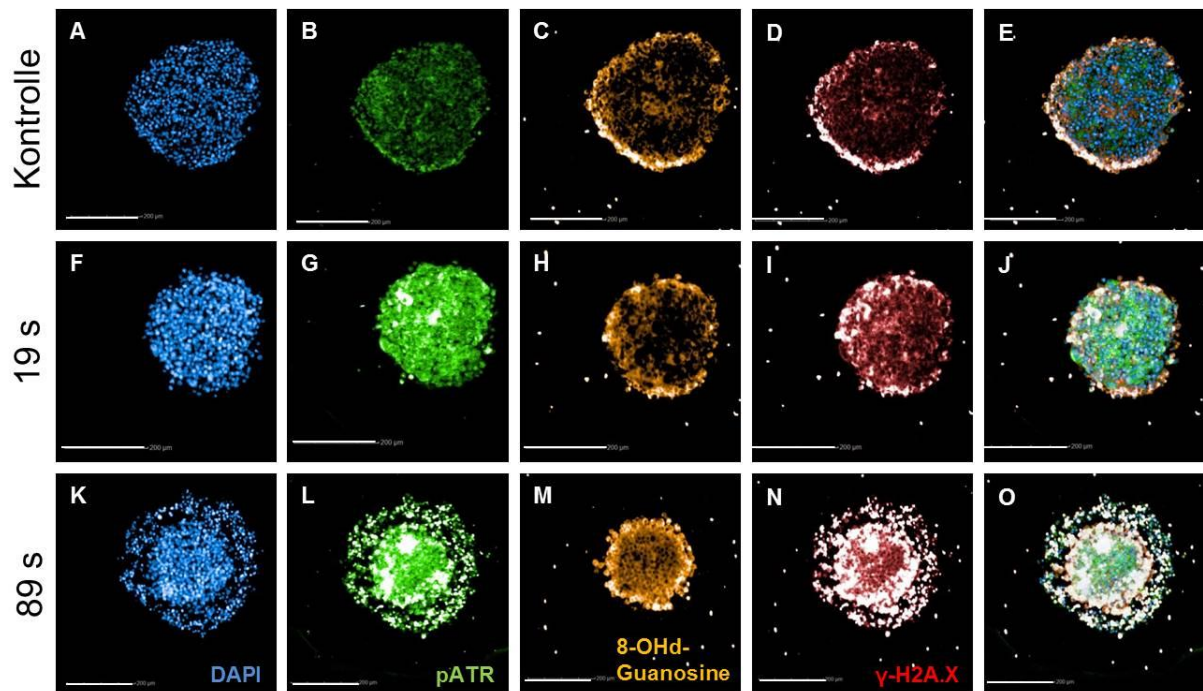
Zur Untersuchung des DNA-Schadens innerhalb der Sphäroide wurden die drei Antikörper pATR, 8-OHdGuanosine und  $\gamma$ -H2A.X gewählt. pATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die als DNA-Schadenssensor bei genotoxischem Stress zum Zellzyklusarrest führt (Weber & Ryan 2015). 8-OHdGuanosine kann als Marker von DNA-Schäden durch oxidativen Stress, welcher vor allem durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst wird, angesehen werden (Valavanidis et al. 2009). Dabei kann es zu Fehlpaarungen mit Adenin kommen, die zu einer Substitution von G zu T und C zu A im Genom führen (Bacolla et al. 2014).  $\gamma$ -H2A.X stellt die phosphorylierte Form des Histonproteins H2A.X dar und wird beispielsweise bei DNA-Doppelstrangbrüchen verstärkt gebildet. Hierdurch wird die Genomstabilität aufrechterhalten (Ward & Chen 2001). Die Untersuchungen der MFI haben nicht signifikante Anstiegstendenzen bei der direkten Plasmabehandlung bei der SK-Mel-28-Zelllinie von allen drei getesteten Antikörpern ergeben (Abb. 40: A, C, E). Demgegenüber lassen sich signifikante Reduktionen des 8-OHdGuanosine- und des  $\gamma$ -H2A.X-MFI sowohl bei den SK-Mel-28- als auch bei den MNT-1-Sphäroiden erkennen (Abb. 40: C-F). Bei der pATR-MFI gibt es innerhalb beider Zelllinien keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (Abb. 40: A-B).

Die Abbildung 41 veranschaulicht – exemplarisch für die direkte Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Sphäroide – die Verteilungsmuster der in Set 2 verwendeten Antikörper. Sowohl bei dem 8-OHdGuanosine- als auch dem  $\gamma$ -H2A.X-Antikörper lassen sich bei der Kontrolle als auch bei der 19 s direkten Plasmabehandlung eine Fluoreszenzintensivierung der peripheren Bereiche erkennen (Abb. 41: C, D, H, I). Nach 89 s direkter Plasmabehandlung kam es zu einer Zellperipherieauflockerung (Abb. 41: A, F, K). Der 8-OHdGuanosine-Antikörper wies kaum eine Fluoreszenzfärbung in den Randbereichen auf. Lediglich der innere Anteil zeigte randständig einzelne Signalverstärkungen auf (Abb. 41: M). Der  $\gamma$ -H2A.X-Antikörper hingegen zeigt eine deutliche Signalintensivierung der peripheren als auch der zentralen Bereiche. Im Gegensatz zu diesen beiden Antikörpern wies der pATR-Antikörper bei dem Kontrollsphäroid eine gleichmäßige Färbung auf. Nach einer 19 s direkten Plasmabehandlung wies der Sphäroid fokale Fluoreszenzintensivierungen auf (Abb. 41: B, G). Die 89 s direkte Plasmabehandlung zeigt sowohl in der aufgelockerten Zellperipherie, als auch zentral verstärkte Fluoreszenzintensivierungen des pATR-Antikörpers (Abb. 41: L).



**Abbildung 40:** Set 2 Fluoreszenzfärbung. Gleichzeitig wurden drei Antikörper, die den DNA-Schaden der Zelle widerspiegeln, gefärbt. Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet. pATR (rb, 1:100, A-B), ein DNA-Schadenssensor, und 8-OHdGuanosine (mouse, 1:100, C-D) wurden jeweils mit einem sekundären Antikörper gegen Kaninchen bzw. Maus (AF 488, 1:200 bzw. AF 594, 1:200) gefärbt.  $\gamma$ -H2A.X (AF 647, rb, 1:100), ein primär gelabelter Antikörper, wurde mit einer Konzentration von 1:100 inkubiert. Auf der y-Achse wird jeweils die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. Pro Fluoreszenzfarbstoff wurden die beiden Zelllinien SK-Mel-28 (A, C, E) und MNT-1 (B, D, F) mit der gleichen Skalierung nebeneinandergestellt. Die Untersuchungen wurden 24 h nach der entsprechenden Behandlung durchgeführt. Bei den SK-Mel-28-Sphäroiden wurden pro Fluoreszenzfärbung n = 8-19 Schnitte ausgewertet. Bei den MNT-1-Sphäroiden wurden für die pATR- n = 4-31, für die 8-OHdGuanosine- n = 4-30 und für die  $\gamma$ -H2A.X-Färbung n = 3-31 Schnitte ausgewertet. Die Bildaufnahme der gefärbten Sphäroidschnitte erfolgte 24 h nach der Immunfluoreszenzfärbung am CLS-Gerät. **A:** MFI der pATR-Immunfluoreszenz bei SK-Mel-28-Sphäroiden. Es lässt sich innerhalb der vier Behandlungsformen kein signifikanter Unterschied erkennen. Eine nicht-signifikante Anstiegstendenz lässt sich bei der direkten Plasmabehandlung sehen. **B:** MFI der pATR-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied erkennen. Insgesamt ist die durchschnittliche MFI geringer als die der SK-Mel-28-Sphäroide. **C:** MFI der 8-OHdGuanosine-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Eine signifikante Reduktion des MFIs ist bei der  $H_2O_2$ -Behandlung erkennbar. Eine nicht-signifikante Anstiegstendenz lässt sich bei der direkten und indirekten Plasmabehandlung sehen. Die  $\mu$ sPEF-Behandlung weist keinen signifikanten Unterschied auf. **D:** MFI der 8-OHdGuanosine-Immunfluoreszenz der MNT-1-Zelllinie. Es ist eine signifikante Reduktion der MFI innerhalb der beiden Behandlungsformen der indirekten Plasmabehandlung sowie der  $H_2O_2$ -Behandlung zu erkennen. Die direkte Plasmabehandlung und die  $\mu$ sPEF weisen bezüglich der 8-OHdGuanosine-MFI keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. **E:** MFI der  $\gamma$ -H2A.X-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Es ist eine signifikante Reduktion innerhalb der  $H_2O_2$ -Behandlung sichtbar. **F:** MFI der  $\gamma$ -H2A.X-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. Eine signifikante Reduktion der MFI ist jeweils bei der höchsten Behandlungsintensität bei der indirekten Plasmabehandlung sowie der  $H_2O_2$ -Behandlung zu erkennen.

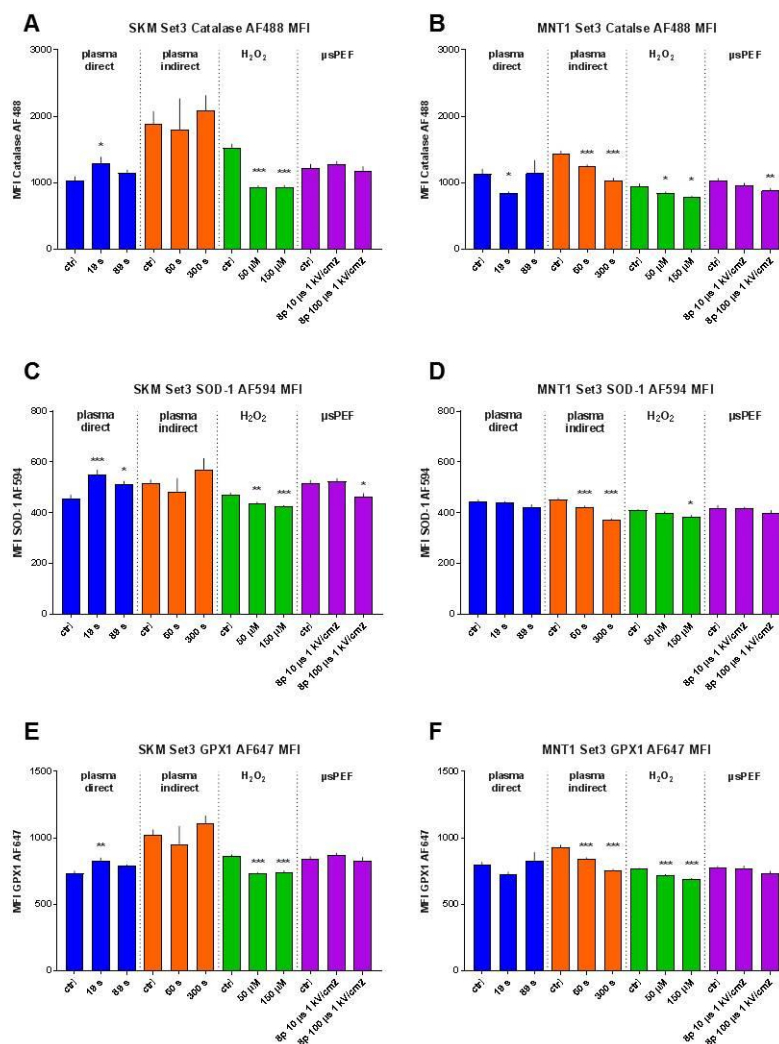




**Abbildung 41:** Immunfluoreszenzfärbung nach Set 2 der SK-Mel-28-Sphäroidschnitte nach einer direkten Plasmabehandlung von 19 s und 89 s. Verwendet wurden drei Antikörper, die den DNA-Schaden der Zelle widerspiegeln. Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet. pATR (rb, 1:100, B, G, L), ein DNA-Schadenssensor, und 8-OHdGuanosine (mouse, 1:100, C, H, M) wurden jeweils mit einem sekundären Antikörper gegen Kaninchen bzw. Maus (AF 488, 1:200 bzw. AF 594, 1:200) gefärbt.  $\gamma$ -H2A.X (AF 647, rb, 1:100, D, I, N), ein primär gelabelter Antikörper, wurde mit einer Konzentration von 1:100 inkubiert. Die Untersuchungen wurden 24 h nach der entsprechenden Behandlung durchgeführt. Aufgenommen und bearbeitet wurden die Immunfluoreszenzbilder am CLS-Gerät (24 h nach der Immunfluoreszenzfärbung) sowie mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software. Die Maßstabsskala beträgt 200  $\mu$ m und die Aufnahme erfolgte bei einer 5-fachen Vergrößerung mit digitalem Zoom. Die Intensitäten aller verwendeten Fluorophore sind identisch und wurden in der jeweiligen Wellenlänge mit der gleichen Zeitdauer belichtet. Hierdurch ist ein direkter Intensitätsvergleich unter den drei Behandlungsmodalitäten (Kontrolle, 19 s, 89 s) möglich. **A:** DAPI-Färbung des Kontrollsphäroids. **B:** pATR-Immunfluoreszenzfärbung der Kontrollsphäroide. **C:** 8-OHdGuanosine-Immunfluoreszenzfärbung der Kontrollsphäroide. Der Randbereich weist eine intensivere Fluoreszenzfärbung auf. **D:**  $\gamma$ -H2A.X-Immunfluoreszenzfärbung der Kontrollsphäroide. Die Peripherie zeigt eine stärkere Fluoreszenzintensität. **E:** Summationsbild aller vier fluorophoren Farbstoffe bei den Kontrollsphäroiden. **F:** DAPI-Färbung der 19 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. **G:** pATR-Immunfluoreszenzfärbung der 19 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Die zentralen Bereiche weisen zwei fokale Intensitätserhöhungen auf. **H:** 8-OHdGuanosine-Immunfluoreszenzfärbung der 19 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Die Randbereiche zeigen einzelne Fluoreszenzintensivierungen auf. **I:**  $\gamma$ -H2A.X-Immunfluoreszenzfärbung der 19 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Eine deutliche Fluoreszenzsteigerung der peripheren Bereiche ist zu erkennen. **J:** Summationsbild aller vier fluorophoren Farbstoffe bei den 19 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. **K:** DAPI-Färbung der 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Eine deutliche Auflockerung der peripheren Bereiche ist zu erkennen. **L:** pATR-Immunfluoreszenzfärbung der 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Die aufgelockerten Randbereiche sowie fokale Bereiche innerhalb zentraler Regionen weisen eine deutliche Fluoreszenzintensivierung auf. **M:** 8-OHdGuanosine-Immunfluoreszenzfärbung der 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Die aufgelockerte Zellperipherie weist kaum eine Fluoreszenzfärbung auf. Die Randbereiche der inneren Anteile weisen eine leichte Fluoreszenzverstärkung auf. **N:**  $\gamma$ -H2A.X-Immunfluoreszenzfärbung der 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Sowohl die peripheren als auch die zentralen Anteile weisen deutliche Fluoreszenzintensivierungen auf. **O:** Summationsbild aller vier fluorophoren Farbstoffe bei den 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden.

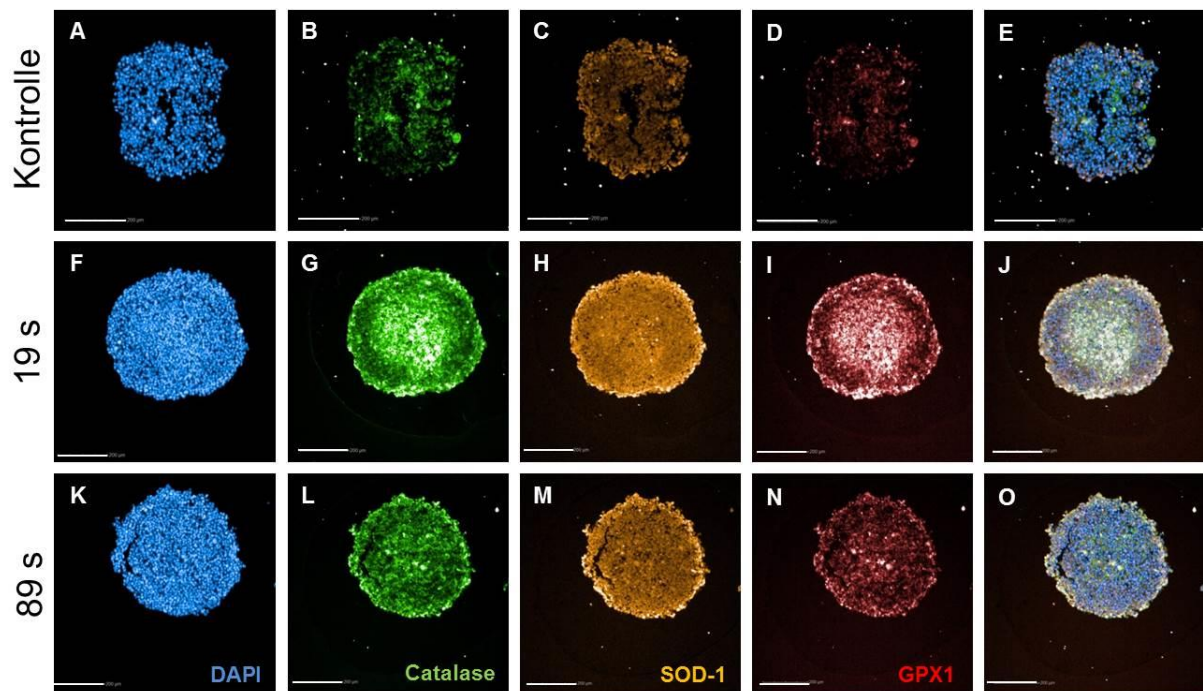
### 3.4.3.3 Auswertung von Set 3 – Antioxidative Antwort (Katalase, SOD-1, GPX1)

Es ist bekannt, dass zum einen die verwendeten Behandlungsformen und zum anderen die Zellen selbst reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies ins Medium einbringen (von Woedtke et al. 2013) bzw. produzieren können (Prasad et al. 2017). Dahingehend wurde die Veränderung des MFI der drei Antikörper gegen Katalase (AF 488), Superoxid-Dismutase-1 (AF 594) und Glutathionperoxidase 1 (AF 647) getestet. Katalase ist ein antioxidatives Häm-Enzym, welches in den Peroxisomen nahezu aller aerober Zellen vorkommt und diese vor oxidativem Stress schützt. Dabei wird der Abbau von Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser katalysiert (Chelikani et al. 2004). Die Superoxid-Dismutase 1 (SOD-1) ist ein Kupfer und Zink enthaltendes zytoplasmatisches antioxidatives Enzym, welches als Radikalfänger gegen freie Sauerstoffradikale wirkt (Sherman et al. 1983). Die Glutathionperoxidase 1 (GPX1) katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid und Hydroperoxiden über das Peptid Glutathion. Hierdurch wird die Zelle vor oxidativen Schäden geschützt (Lubos et al. 2011). Die Abbildung 42 zeigt für die direkte Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Sphäroide einen signifikanten Anstieg des MFI aller drei getesteten Antikörper (Abb. 42: A, C, E). In der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlungform lässt sich dagegen eine signifikante Reduktion aller drei Antikörperfluoreszenzen nachweisen (Abb. 42: A, C, E). Bis auf die stärkste Behandlungsmodalität der  $\mu$ sPEF-Behandlung, nach welcher ebenfalls eine Reduktion des SOD-1-Antikörpers festzustellen war, lassen sich keine weiteren signifikanten Unterschiede der MFIs erkennen (Abb. 42: C). Bei der MNT-1-Zelllinie lässt sich für keinen Antikörper sowie keine Behandlungsform ein signifikanter Anstieg der drei Antikörpersignale nachweisen (Abb. 42: B, D, F). Für die indirekte Plasmabehandlung sowie die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung lässt sich für jeden Antikörper, in mindestens einer Behandlungsmodalität, eine signifikante Reduktion des MFIs nachweisen (Abb. 42: B, D, F). Für den Katalase-Antikörper gibt es zusätzlich noch in der 19 s direkten Plasmabehandlung sowie der langen  $\mu$ sPEF-Behandlung eine signifikante Reduktion des MFI (Abb. 42: B). Die Abbildung 43 veranschaulicht exemplarisch die Immunfluoreszenzverteilung der verwendeten Antikörper nach der direkten Plasmabehandlung. Sowohl in der SOD-1- als auch in der GPX1-Immunfluoreszenzfärbung lässt sich im Verlauf der Behandlungsmodalitäten eine Umverteilung der Fluoreszenzintensität auf die peripheren Bereiche erkennen (Abb. 43: C, D, H, I, M, N). Eine ausgeprägte Katalase-Immunfluoreszenz wurde nach 19 s einer direkten Plasmabehandlung aufgenommen. Insbesondere die zentralen Bereiche sowie eine leichte periphere Tendenz war zu erkennen (Abb. 43: B, G). Die zarte Intensitätssteigerung der Peripherie lässt sich ebenfalls nach 89 s beobachten (Abb. 43: B, L).



**Abbildung 42:** Set 3 Fluoreszenzfärbung. Verwendet wurden drei Antikörper die der antioxidativen Antwort zugeordnet werden. Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Katalase (AF 488, rb, 1:50) wurde mit dem sekundären Antikörper gegen Kaninchen (AF 488, 1:200) inkubiert. SOD-1 (mouse, 1:50) und GPX1 (AF 647, rb, 1:50) wurden als primär gelabelte Antikörper mit einer Konzentration von 1:50 verwendet. Auf der y-Achse wird jeweils die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. Pro Fluoreszenzfarbstoff wurden die beiden Zelllinien SK-Mel-28 (A, C, E) und MNT-1 (B, D, F) mit der gleichen Skalierung nebeneinandergestellt. Die Untersuchungen wurden 24 h nach der entsprechenden Behandlung durchgeführt. Bei den SK-Mel-28-Sphäroiden wurden für die Katalase- n = 5-18, für die SOD-1- n = 5-17 und für die GPX1-Färbung n = 5-18 Schnitte ausgewertet. Bei den MNT-1-Sphäroiden wurden für die Katalase- n = 6-24, für die SOD-1- n = 6-24 und für die GPX1-Färbung n = 6-23 Schnitte ausgewertet. Die Bildaufnahme der gefärbten Sphäroidschnitte erfolgte 24 h nach der Immunfluoreszenzfärbung am CLS-Gerät. **A:** MFI der Katalase-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Eine signifikante Erhöhung des Signals lässt sich in der 19 s Behandlungsmodalität der direkten Plasmabehandlung nachweisen. Die 89 s Behandlung weist einen tendenziellen Anstieg auf, welcher jedoch nicht signifikant ist. Im Gegensatz dazu zeigt sich in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung eine signifikante Reduktion des MFI. Die indirekte Plasmabehandlung sowie die µsPEF-Behandlung unterscheiden sich nicht signifikant von der jeweiligen Kontrolle. **B:** MFI der Katalase-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. In allen vier Behandlungsformen lässt sich bei mindestens einer Behandlungsmodalität eine signifikante Reduktion des MFI nachweisen. **C:** MFI der SOD-1-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. In der direkten Plasmabehandlungsgruppe lässt sich in beiden Behandlungsmodalitäten eine signifikante Signalerhöhung des MFI erkennen. Dahingehend ist bei den beiden Behandlungsformen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- sowie µsPEF-Behandlung eine signifikante Reduktion zu sehen. **D:** MFI der SOD-1-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. Eine leichte signifikante Reduktion des MFIs lassen sich in den beiden Behandlungsformen der indirekten Plasmabehandlung sowie der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung nachweisen. **E:** MFI der GPX1-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Es zeigt sich in der direkten Plasmabehandlung ein signifikanter Anstieg und in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung ein signifikanter Abfall des MFIs. **F:** MFI der GPX1-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. Sowohl in der indirekten Plasmabehandlung, als auch in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung lässt sich eine signifikante Reduktion des MFIs nachweisen.



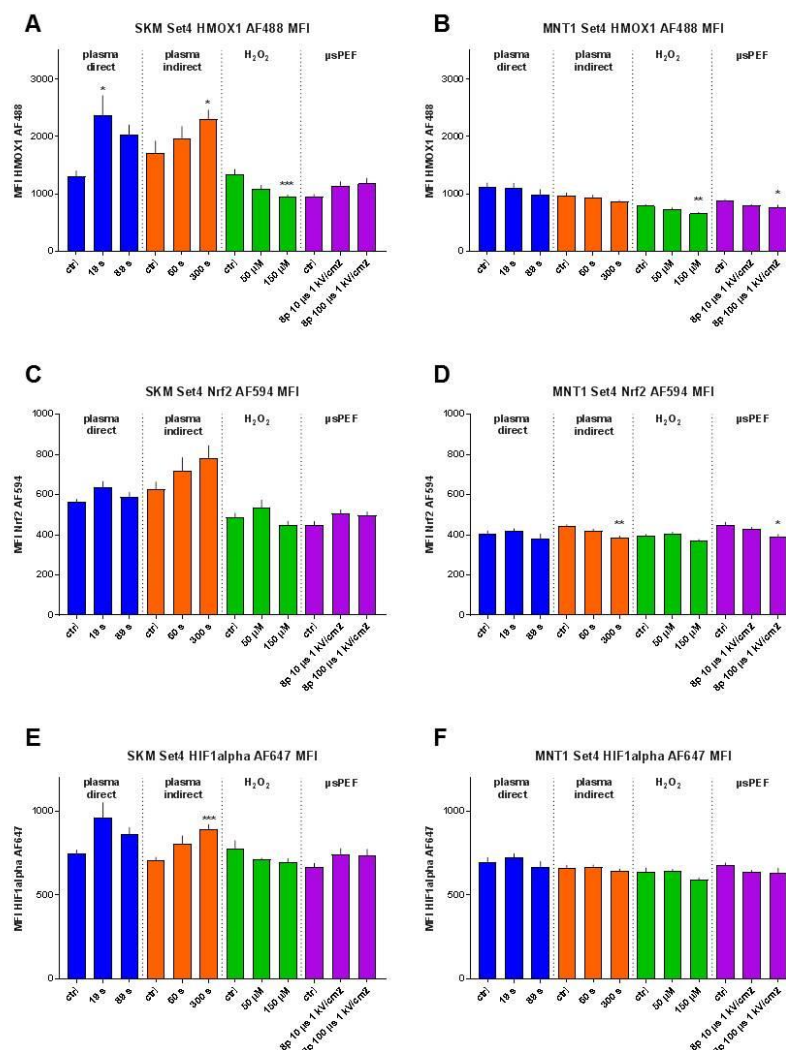


**Abbildung 43:** Immunfluoreszenzfärbung nach Set 3 der SK-Mel-28-Sphäroidschnitte nach einer direkten Plasmabehandlung von 19 s und 89 s. Verwendet wurden drei Antikörper, die die antioxidative Zellantwort widerspiegeln. Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Katalase (AF 488, rb, 1:50, B, G, L) wurde mit dem sekundären Antikörper gegen Kaninchen (AF 488, 1:200) inkubiert. SOD-1 (mouse, 1:50, C, H, M) und GPX1 (AF 647, rb, 1:50, D, I, N) wurden als primär gelabelte Antikörper mit einer Konzentration von 1:50 verwendet. Die Untersuchungen wurden 24 h nach der entsprechenden Behandlung durchgeführt. Aufgenommen und bearbeitet wurden die Immunfluoreszenzbilder am CLS-Gerät (24 h nach der Immunfluoreszenzfärbung) sowie mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software. Die Maßstabsskala beträgt 200  $\mu\text{m}$  und die Aufnahme erfolgte bei einer 5-fachen Vergrößerung mit digitalem Zoom. Die Intensitäten aller verwendeten Fluorophore sind identisch und wurden in der jeweiligen Wellenlänge mit der gleichen Zeitdauer belichtet. Hierdurch ist ein direkter Intensitätsvergleich unter den drei Behandlungsmodalitäten (Kontrolle, 19 s, 89 s) möglich. **A:** DAPI-Färbung des Kontrollsphäroids. **B:** Katalase-Immunfluoreszenzfärbung der Kontrollsphäroide. **C:** SOD-1-Immunfluoreszenzfärbung der Kontrollsphäroide. **D:** GPX1-Immunfluoreszenzfärbung der Kontrollsphäroide. **E:** Summationsbild aller vier fluorophoren Farbstoffe bei den Kontrollsphäroiden. **F:** DAPI-Färbung der 19 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. **G:** Katalase-Immunfluoreszenzfärbung der 19 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Der zentrale Sphäroidkern weist eine Intensitätserhöhung auf. **H:** SOD-1-Immunfluoreszenzfärbung der 19 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Die Randbereiche zeigen eine leichte und zarte Fluoreszenzintensivierung auf. **I:** GPX1-Immunfluoreszenzfärbung der 19 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Eine deutliche Fluoreszenzsteigerung des gesamten Sphäroidschnittes ist zu erkennen. **J:** Summationsbild aller vier fluorophoren Farbstoffe bei den 19 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. **K:** DAPI-Färbung der 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. **L:** Katalase-Immunfluoreszenzfärbung der 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Die Randbereiche sowie einzelne Bereiche innerhalb der zentralen Kernregion weisen eine leichte Fluoreszenzintensivierung auf. **M:** SOD-1-Immunfluoreszenzfärbung der 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Die Zellperipherie weist eine zarte Fluoreszenzintensivierung auf. **N:** GPX1-Immunfluoreszenzfärbung der 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroide. Die Peripherien sowie zentralen Bereiche weisen eine leichte Fluoreszenzanreicherung auf. **O:** Summationsbild aller vier fluorophoren Farbstoffe bei den 89 s direkt plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden.

#### 3.4.3.4 Auswertung von Set 4 – Nrf2-Antwort (HMOX1, Nrf2, HIF1 $\alpha$ )

Innerhalb dieses Sets wurden drei verschiedene Antikörper getestet, die mit der Nrf2-Antwort zusammenhängen. Die Hämoxygenase 1 (HMOX1) ist ein mikrosomales Enzym, welches Reaktionen der Häm-Oxidation katalysiert. Darunter fallen unter anderem Biliverdin, Kohlenstoffmonoxide und weitere Antioxidantien (Holowiecki et al. 2016). Der Nrf2-Signalweg führt unter anderem zu einer Erhöhung des HMOX1 und spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des endogenen Redoxgleichgewichtes (Battino et al. 2017). Hiernach besteht ein kausaler Zusammenhang dieser beiden Konzentrationen. Der Hypoxie-induzierte Faktor 1  $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) wird unter hypoxischen Zuständen verstärkt exprimiert (Wang et al. 1995).

Die Abbildung 44 zeigt einen signifikanten Anstieg des HMOX1-MFI bei den SK-Mel-28-Sphäroiden in der direkten und indirekten Plasmabehandlung sowie eine tendenzielle Erhöhung bei der  $\mu$ sPEF-Behandlung. Dahingegen wurde eine signifikante Reduktion in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung gemessen (Abb. 44: A). Der Nrf2-MFI bei den SK-Mel-28-Sphäroiden wies insgesamt bei keiner Behandlungsform einen signifikanten Unterschied auf. Dennoch stimmen die Anstiegs- und Abfalltendenzen mit denen des teilweise signifikanten HMOX1-MFI überein (Abb. 44: A, C). In den MNT-1-Sphäroiden wurden ausschließlich signifikante Reduktionen gemessen. Bei dem HMOX1-MFI zeigte sich bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- sowie der  $\mu$ sPEF-Behandlung eine signifikante Reduktion und bei der Nrf2-MFI bei der indirekten Plasmabehandlung sowie der  $\mu$ sPEF-Behandlung (Abb. 44: B, D). Ein signifikanter Anstieg der HIF1 $\alpha$ -MFI wurde nur bei der indirekten Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Sphäroide nachgewiesen. Alle anderen Behandlungsformen sowie alle MNT-1-Sphäroide wiesen keinen Unterschied des MFI auf (Abb. 44: E, F).

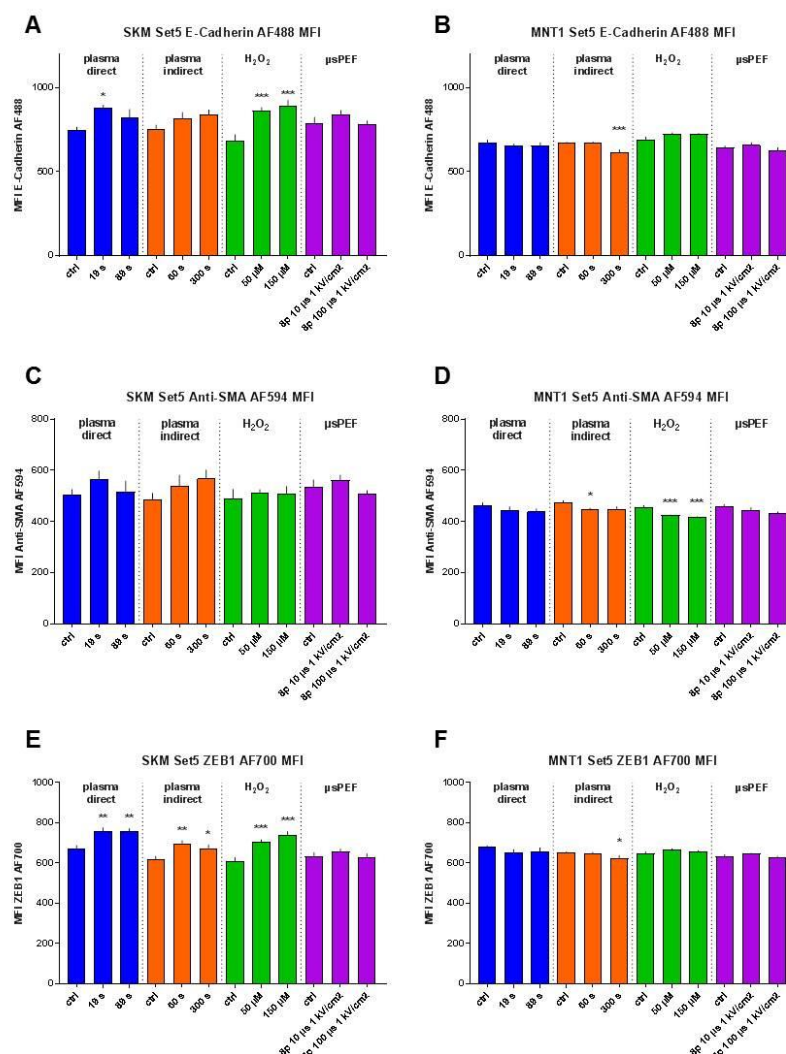


**Abbildung 44:** Set 4 Fluoreszenzfärbung. Getestet wurde die Nrf2-Antwort. Hierfür wurden die drei Antikörper gegen HMOX1 (mouse, 1:50), Nrf2 (AF 594, rb, 1:50) und HIF1 $\alpha$  (AF 647, mouse, 1:50) untersucht. HMOX1 wurde mit einem sekundären Antikörper (AF 488, 1:200) inkubiert. Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Auf der y-Achse wird jeweils die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. Pro Fluoreszenzfarbstoff wurden die beiden Zelllinien SK-Mel-28 (A, C, E) und MNT-1 (B, D, F) mit der gleichen Skalierung nebeneinandergestellt. Die Untersuchungen wurden 24 h nach der entsprechenden Behandlung durchgeführt. Bei den SK-Mel-28-Sphäroiden wurden pro Fluoreszenzfärbung n = 5-15 Schnitte ausgewertet. Bei den MNT-1-Sphäroiden wurden pro Fluoreszenzfärbung n = 8-24 Schnitte ausgewertet. Die Bildaufnahme der gefärbten Sphäroidschnitte erfolgte 24 h nach der Immunfluoreszenzfärbung am CLS-Gerät. **A:** MFI der HMOX1-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Sowohl in der direkten als auch in der indirekten Plasmabehandlung lässt sich ein signifikanter Anstieg der HMOX1-MFI erkennen. Dahingegen ist in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung eine signifikante Reduktion zu verzeichnen. Die  $\mu$ sPEF weist einen tendenziellen Anstieg auf, welcher nicht signifikant ist. **B:** MFI der HMOX1-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. In den beiden Behandlungsformen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- als auch der  $\mu$ sPEF-Behandlung zeigt sich eine signifikante Reduktion der MFI. Die direkte und indirekte Plasmabehandlung weisen keinen signifikanten Unterschied auf. **C:** MFI der Nrf2-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Dennoch zeigt sich ein vergleichbarer Anstieg bzw. Ablauf zur HMOX1-MFI. **D:** MFI der Nrf2-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. Eine signifikante Reduktion des MFI lässt sich in der letzten Behandlungsmodalität der beiden Behandlungsformen der indirekten Plasmabehandlung und der  $\mu$ sPEF-Behandlung beobachten. **E:** MFI der HIF1 $\alpha$ -Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Eine signifikante Erhöhung des MFI lässt sich nur in der indirekten Plasmabehandlung messen. Bei der direkten Plasmabehandlung sowie der  $\mu$ sPEF-Behandlung lässt sich eine tendenzielle Erhöhung erkennen. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung deutet auf eine Reduktion hin. **F:** MFI der HIF1 $\alpha$ -Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen.

### 3.4.3.5 Auswertung von Set 5 – Epithelial-mesenchymale Transition (E-Cad, $\alpha$ -SMA, ZEB1)

Innerhalb dieses Sets wurde die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) mit den drei Markern E-Cadherin,  $\alpha$ -SMA und ZEB1 näher untersucht. Unter der EMT wird der Übergang von Epithelzellen zu Mesenchymzellen verstanden. Dabei spielt E-Cadherin als calciumabhängiges transmembranes Zell-Zell-Adhäsionsglykoprotein eine besondere Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellpolarität sowie beim Zellzusammenhalt. Als Zelladhäsionsmolekül ist E-Cadherin (CD324) in der Zellentwicklung, der bakteriellen Pathogenese sowie der Tumordinvasion mitbeteiligt (Riethmacher et al. 1995). Eine Repression von E-Cadherin und die dadurch verringerte Zell-Zell-Interaktion führt zum motilen Phänotyp und hierdurch bei Krebszellen zu einer Erleichterung der Metastasierungsfähigkeit.  $\alpha$ -SMA (*alpha-smooth muscle actin*) wird ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen exprimiert und ist in der Zellmotilität beteiligt. Weitere Anwendung findet  $\alpha$ -SMA als ein verlässlicher Marker innerhalb der EMT (Kalluri & Weinberg 2009). ZEB1 (*Zinc Finger E Box-Binding Homeobox 1*) codiert für einen Zink-Finger-Transkriptionsfaktor, welcher T-Lymphozyten-spezifische IL2-Gene herunterreguliert (Williams et al. 1991). Eine Überexpression von ZEB1 induziert in Krebszellen eine EMT und führt dadurch zu einer erleichterten Metastasierungsfähigkeit (Liu, El-Nagger et al. 2008).

Die Abbildung 45 zeigt einen signifikanten Anstieg der E-Cadherin-MFI innerhalb der direkten Plasmabehandlung sowie der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung der SK-Mel-28-Sphäroide (Abb. 45: A). Des Weiteren weisen drei der vier Behandlungsformen (direkte, indirekte Plasmabehandlung sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung) einen signifikanten Anstieg der ZEB1-MFI bei den SK-Mel-28-Sphäroiden auf (Abb. 45: E). Innerhalb der  $\alpha$ -SMA-MFI gibt es keinen signifikanten Unterschied, jedoch eine Anstiegstendenz bei den SK-Mel-28-Sphäroiden (Abb. 45: C). Die MNT-1-Sphäroide weisen im Gegensatz dazu ausschließlich signifikante Reduktionen innerhalb aller drei getesteten Antikörper auf. Es wurde eine signifikante Reduktion des E-Cadherin-,  $\alpha$ -SMA- und ZEB1-MFIs in der indirekten Plasmabehandlungsgruppe gemessen (Abb. 45: B, D, F). Zudem ist die  $\alpha$ -SMA-MFI innerhalb der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung signifikant abgefallen (Abb. 45: D). Alle weiteren Behandlungsformen haben keinen signifikanten Unterschied aufgezeigt (Abb. 45: B, D, F).



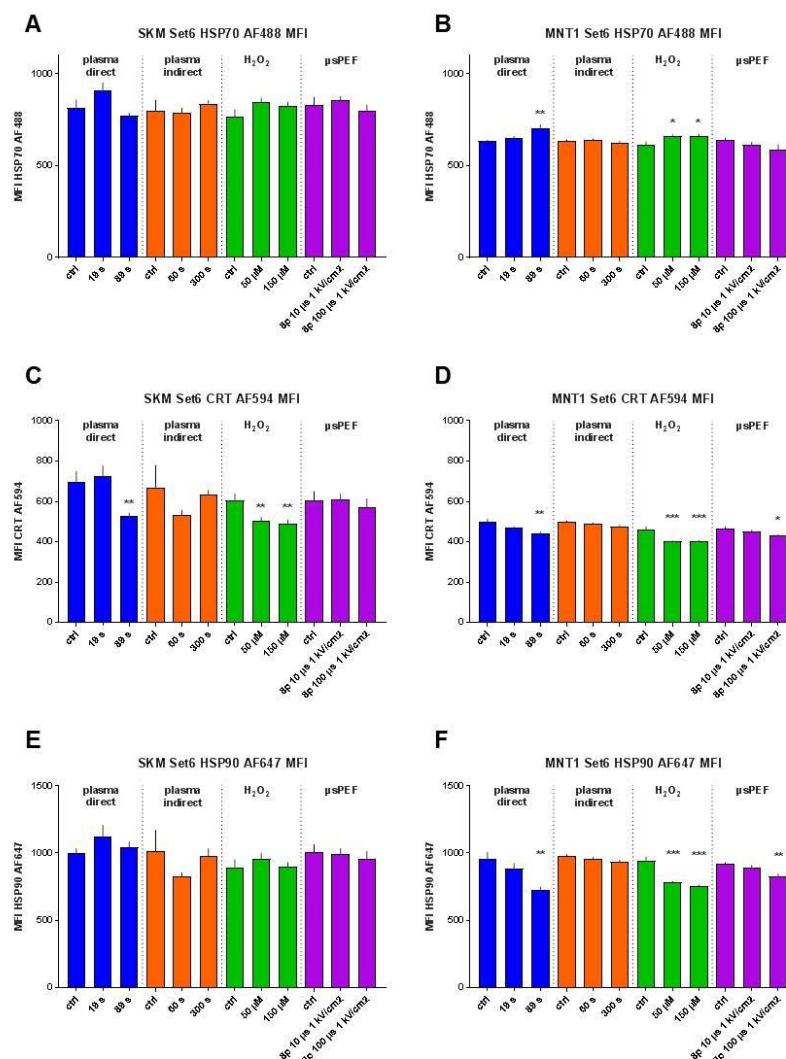
**Abbildung 45:** Set 5 Fluoreszenzfärbung. Untersucht wurden drei Antikörper, die bei der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) mitbeteiligt sind. Dafür wurden die drei primär gelabelten Antikörper gegen E-Cadherin (AF, 488, mouse, 1:50),  $\alpha$ -SMA (AF 594, mouse, 1:100) und ZEB1 (AF 700, mouse, 1:50) eingesetzt. Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Auf der y-Achse wird jeweils die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. Pro Fluoreszenzfarbstoff wurden die beiden Zelllinien SK-Mel-28 (A, C, E) und MNT-1 (B, D, F) mit der gleichen Skalierung nebeneinandergestellt. Die Untersuchungen wurden 24 h nach der entsprechenden Behandlung durchgeführt. Bei den SK-Mel-28-Sphäroiden wurden pro Fluoreszenzfärbung n = 5-16 Schnitte ausgewertet. Bei den MNT-1-Sphäroiden wurden pro Fluoreszenzfärbung n = 8-34 Schnitte ausgewertet. Die Bildaufnahme der gefärbten Sphäroidschnitte erfolgte 24 h nach der Immunfluoreszenzfärbung am CLS-Gerät. **A:** MFI der E-Cadherin-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Sowohl in der direkten Plasmabehandlung als auch in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung lassen sich signifikante Erhöhungen der MFI erkennen. Ein tendenzieller Anstieg ist auch in der indirekten Plasmabehandlung zu verzeichnen. **B:** MFI der E-Cadherin-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. In der indirekten Plasmabehandlung lässt sich eine signifikante Reduktion messen. **C:** MFI der  $\alpha$ -SMA-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Ein tendenzieller Anstiegstrend innerhalb aller Behandlungsformen wird deutlich. **D:** MFI der  $\alpha$ -SMA-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. Innerhalb der indirekten Plasmabehandlung sowie der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung lässt sich eine signifikante Reduktion des MFI erkennen. **E:** MFI der ZEB1-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. In drei der vier Behandlungsformen (direkte, indirekte Plasmabehandlung sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung) lassen sich signifikante Erhöhungen des MFI messen. **F:** MFI der ZEB1-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. Lediglich in der indirekten Plasmabehandlung lässt sich eine signifikante Reduktion des ZEB1-MFI nachweisen.

### 3.4.3.6 Auswertung von Set 6 – Danger response (HSP70, CRT, HSP90)

Innerhalb dieses Sets wurden die zellulären Veränderungen auf schädigende Reize untersucht. Hierfür wurden die drei Antikörper HSP70, CRT und HSP90 näher betrachtet. HSP70 gehört zur stark konservierten Familie der Heat-Shock-Proteine. Wichtige Funktionen übernehmen diese bei der exakten Proteinfaltung sowie dem Schutz vor schädigenden Reizen (Tavaria et al. 1996). Calregulin (CRT, synonym Calretikulin) kommt als kalziumbindendes Protein im Endoplasmatischem Retikulum (ER) vor und wirkt als pro-phagozytotisches Signalmolekül auf die Makrophagen. Während der Apoptose wirkt Calretikulin an der Zelloberfläche als pro-phagozytotisches Signal über die Bindung an den Makrophagenrezeptor LRP (*low density lipoprotein-related protein*). Dies führt zur Phagozytose (Chao et al. 2010). Das HSP90 kommt ubiquitär in den nicht gestressten Zellen vor und wird bei Stress zusätzlich exprimiert. Die hochgradig konservierten Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Proteinfaltung sowie der Proteindegradation und interagieren mit weiteren Chaperonen wie dem HSP70. Hierdurch liegen zahlreiche Interaktionen mit intrazellulären Proteinen, wie beispielsweise Steroidrezeptoren, vor (Wegele et al. 2004).

Die Abbildung 46 zeigt bei den beiden Heat-Shock-Proteinen HSP70 und HSP90 innerhalb der SK-Mel-28-Sphäroide keine signifikanten Unterschiede des MFI (Abb. 46: A, E). Eine signifikante Reduktion des CRT-MFI bei den SK-Mel-28-Sphäroiden konnte bei der direkten Plasmabehandlung sowie der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung gemessen werden. Eine nicht signifikante Tendenz lässt sich ebenfalls innerhalb der beiden verbleibenden Behandlungsformen (indirekte Plasmabehandlung und  $\mu$ sPEF-Behandlung) erkennen (Abb. 46: C). Innerhalb der MNT-1-Sphäroide lässt sich ein signifikanter Anstieg des HSP70 in den beiden Behandlungsformen der direkten Plasmabehandlung sowie der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung nachweisen (Abb. 46: B). Die CRT- als auch HSP90-MFI weist in drei von vier Behandlungsformen – jeweils in der direkten Plasmabehandlung, der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und der  $\mu$ sPEF-Behandlung – eine signifikante Reduktion auf (Abb. 46: D, F).





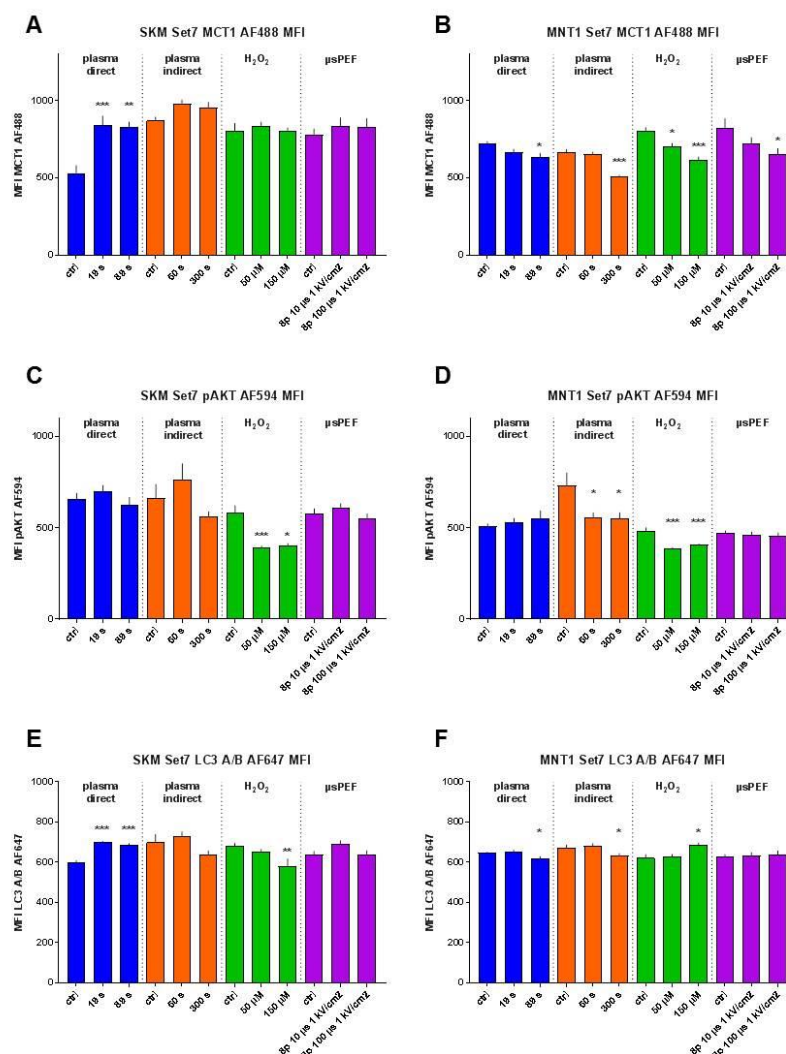
**Abbildung 46:** Set 6 Fluoreszenzfärbung. Innerhalb dieses Sets wurden die drei primär gelabelten Antikörper HSP70 (AF 488, mouse, 1:50), CRT (AF 594, mouse, 1:50) und HSP90 (AF 647, rb, 1:100) untersucht. Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Auf der y-Achse wird jeweils die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. Pro Fluoreszenzfarbstoff wurden die beiden Zelllinien SK-Mel-28 (A, C, E) und MNT-1 (B, D, F) mit der gleichen Skalierung nebeneinandergestellt. Die Untersuchungen wurden 24 h nach der entsprechenden Behandlung durchgeführt. Bei den SK-Mel-28-Sphäroiden wurden pro Fluoreszenzfärbung n = 7-16 Schnitte ausgewertet. Bei den MNT-1-Sphäroiden wurden pro Fluoreszenzfärbung n = 10-30 Schnitte ausgewertet. Die Bildaufnahme der gefärbten Sphäroidschnitte erfolgte 24 h nach der Immunfluoreszenzfärbung am CLS-Gerät. **A:** MFI der HSP70-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen. **B:** MFI der HSP70-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. Sowohl bei der direkten Plasmabehandlung als auch bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung lässt sich ein signifikanter Anstieg des MFI messen. **C:** MFI der CRT-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Es lässt sich ein signifikanter Abfall des MFI in der direkten Plasmabehandlungs- als auch in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlungsgruppe nachweisen. Ein tendenzieller Abfall lässt sich auch in den anderen Behandlungsformen erkennen. **D:** MFI der CRT-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. In drei von vier Behandlungsformen (direkte Plasmabehandlung, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und μsPEF-Behandlung) lässt sich eine signifikante Reduktion des MFI nachweisen. Die indirekte Plasmabehandlung weist eine vergleichbare Tendenz auf. **E:** MFI der HSP90-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Ein signifikanter Unterschied lässt sich in keiner Behandlungsform nachweisen. **F:** MFI der HSP90-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. In drei der vier Behandlungsformen (direkte Plasmabehandlung, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und μsPEF-Behandlung) kann eine signifikante Reduktion des MFI gemessen werden.

### 3.4.3.7 Auswertung von Set 7 (MCT1, pAKT, LC3 A/B)

In diesem Set wurden weitere Aspekte der Krebsprognose sowie Krebsentstehung durch die Untersuchung von unterschiedlichen Markern näher betrachtet. Der Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1), welcher vom Gen SLC16A1 (*Solute Carrier Family 16 Member 1*) kodiert wird, ist ein Membrantransporter, der im Symport den Transport von Monocarboxylaten wie Laktat, Pyruvat oder Ketonkörper mit einem Proton ( $H^+$ ) über die Plasmamembran aus der Zelle hinaus katalysiert (Halestrap 2012). Des Weiteren fungiert MCT1 als wichtiger Transporter für den Warburg-Effekt – einem Zustand der aeroben Glykolyse innerhalb vieler Tumoren mit einer erhöhten Produktion von freien Protonen und Laktat. Durch den Efflux dieser beiden Substanzen in den Extrazellularraum wird der hyperglykotische als auch der säureresistente Phänotyp der Tumorzellen begünstigt (Pinheiro et al. 2016). AKT – auch bekannt als Protein Kinase B (PKB) – ist eine Serin/Threonin Proteinkinase, die in Säugetieren als drei stark konservierte und homologe Isoformen (PKB $\alpha$ /Akt1, PKB $\beta$ /Akt2, PKB $\gamma$ /Akt3) vorkommt. Eine besondere Rolle spielt AKT als kritischer Regulator des Zellüberlebens und der Zellproliferation (Song et al. 2005). Als dritter Antikörper wurde LC3 A/B untersucht. Der menschliche Organismus enthält drei LC3 (*Light Chain 3*) Isoformen (LC A, B, C), die als Strukturproteine in der Autophagosomenmembranen vorkommen und als Autophagiemarker genutzt werden (Koukourakis et al. 2015).

Die Abbildung 47 weist bei den SK-Mel-28-Sphäroiden einen signifikanten Anstieg des MCT1-MFI in der direkten Plasmabehandlungsgruppe auf. Ein tendenzieller, jedoch nicht signifikanter Anstieg wird in den verbleibenden drei Behandlungsformen ersichtlich (Abb. 47: A). Eine signifikante Reduktion des MFI von pAKT bei den SK-Mel-28-Sphäroiden wurde ausschließlich in der  $H_2O_2$ -Behandlung gemessen (Abb. 47: C). Der Autophagiemarker LC3 A/B hat in der direkten Plasmabehandlung einen signifikanten Anstieg und in der  $H_2O_2$ -Behandlungsform eine signifikante Reduktion des MFI ergeben (Abb. 47: E). Innerhalb der MNT-1-Sphäroide wurde in allen vier Behandlungsformen eine signifikante Reduktion des MCT1-MFI beobachtet (Abb. 47: B). Des Weiteren konnte in der indirekten Plasmabehandlung als auch innerhalb der  $H_2O_2$ -Behandlung eine signifikante Reduktion des pAKT-MFI gemessen werden (Abb. 47: D). Eine signifikante Reduktion des LC3 A/B-MFI wurde in der direkten und indirekten Plasmabehandlungsform beobachtet. Dahingehend zeigte sich in der  $H_2O_2$ -Behandlungsform ein signifikanter Anstieg des LC3 A/B-MFIs (Abb. 47: F).





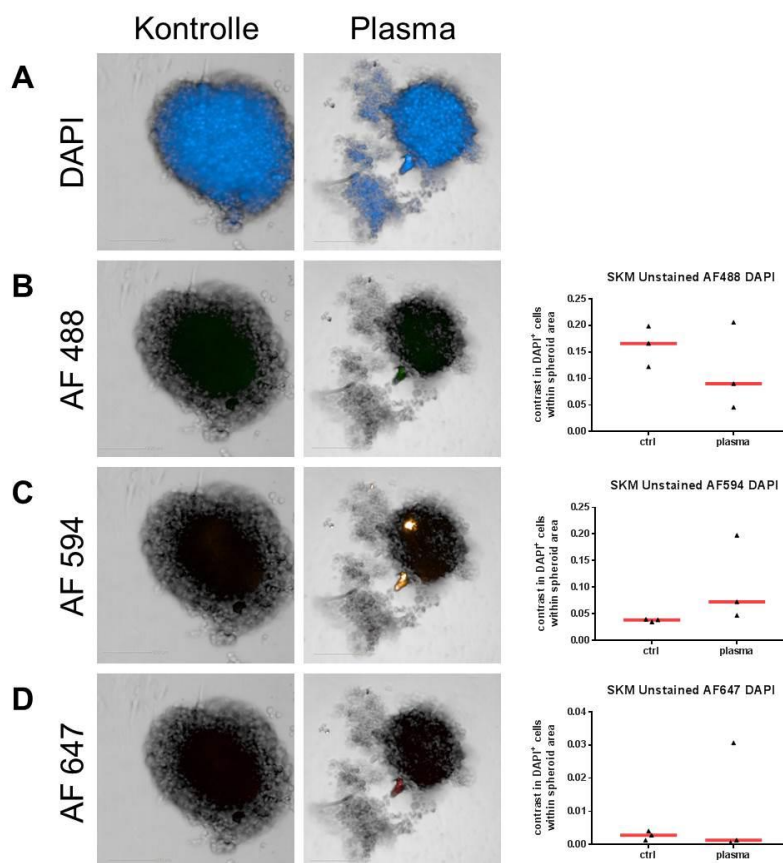
**Abbildung 47:** Set 7 Fluoreszenzfärbung. Untersucht wurden innerhalb dieses Sets drei verschiedene Antikörper. MCT1 (AF 488, rb, 1:50) und LC3 A/B (AF 647, rb, 1:50) sind primär gelabelte Antikörper. pAKT (rb, 1:50) wurde mit einem sekundären Antikörper (AF 594, rb, 1:200) inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Auf der y-Achse wird jeweils die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. Pro Fluoreszenzfarbstoff wurden die beiden Zelllinien SK-Mel-28 (A, C, E) und MNT-1 (B, D, F) mit der gleichen Skalierung nebeneinandergestellt. Die Untersuchungen wurden 24 h nach der entsprechenden Behandlung durchgeführt. Bei den SK-Mel-28-Sphäroiden wurden für die MCT1- n = 3-10, für die pAKT- n = 3-15 und für die LC3 A/B-Färbung n = 3-17 Schnitte ausgewertet. Bei den MNT-1-Sphäroiden wurden für die MCT1- n = 8-18, für die pAKT- n = 5-24 und für die LC3 A/B-Färbung n = 5-25 Schnitte ausgewertet. Die Bildaufnahme der gefärbten Sphäroidschnitte erfolgte 24 h nach der Immunfluoreszenzfärbung am CLS-Gerät. **A:** MFI der MCT1-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Ein signifikanter Anstieg der MFI lässt sich bei der direkten Plasmabehandlung messen. Ein tendenzieller Anstieg ist ebenfalls bei der indirekten Plasmabehandlung erkennbar. **B:** MFI der MCT1-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. In mindestens einer Behandlungsmodalität aller vier Behandlungsformen (direkte, indirekte Plasmabehandlung, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und µsPEF-Behandlung) lässt sich eine signifikante Reduktion des MFI nachweisen. **C:** MFI der pAKT-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Eine deutliche und signifikante Reduktion lässt sich ausschließlich in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlungsgruppe messen. **D:** MFI der pAKT-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. Sowohl in der indirekten Plasmabehandlungs- als auch in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlungsgruppe ist eine signifikante Reduktion des MFI zu sehen. **E:** MFI der LC3 A/B-Immunfluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Innerhalb der direkten Plasmabehandlung ist ein signifikanter Anstieg des MFI messbar. Dagegen zeigt sich innerhalb der höchsten Behandlungsmodalität der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlungsform ein signifikanter Abfall. **F:** MFI der LC3 A/B-Immunfluoreszenz der MNT-1-Sphäroide. In den beiden Behandlungsformen der direkten und indirekten Plasmabehandlung zeigt sich jeweils bei der höchsten Behandlungsmodalität eine signifikante Reduktion des MFI. Bei der höchstens Behandlungsmodalität der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung ist ein signifikanter Anstieg des MFI messbar.

### 3.4.4 Betrachtung der Antikörperfärbung sowie Antikörperverteilung in ganzen Sphäroiden

Betrachtet wurden SK-Mel-28-Sphäroide, die wie in Abschnitt „2.2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung von ganzen Sphäroiden“ beschrieben, kultiviert und einer 89 s direkten Plasmabehandlung unterzogen wurden. Im Unterschied zu den vorherigen Untersuchungen wurden keine Schnitte der Sphäroide untersucht, sondern die Immunfluoreszenzfärbung an nicht eingebetteten, nicht geschnittenen Sphäroiden vorgenommen. Verwendet wurden ausschließlich primär gelabelte Antikörper verschiedener Wellenlängen (AF 488, AF 594, AF 647, AF 700). Als Kontrolle wurden ungefärbte Sphäroide eingesetzt, die ausschließlich mit DAPI zur Kernfärbung inkubiert wurden. Hierdurch konnte die Autofluoreszenz der verschiedenen Wellenlängen beobachtet werden. Auf der y-Achse wurde der Kontrast der DAPI-positiven-Zellen innerhalb des Sphäroides gegenüber der Umgebungsintensität der jeweiligen Fluoreszenzfarbe aufgetragen. Es wurde in allen Abbildungen 48 bis 53 jeweils der Umgebungskontrast der Kontrolle (ctrl) mit der 89 s direkten Plasmabehandlung (plasma) verglichen. Die Mittelwerte der Variationskoeffizienten (cv in %) pro Sphäroid werden jeweils mit einem roten Strich und die Einzelwerte (cv) der einzelnen Sphäroide mit Dreiecken dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Plasmabehandlung sind mit jeweils (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ) markiert. Es wurde der Variationskoeffizient – als Division der Standardabweichung durch den Erwartungswert – als relatives Streuungsmaß gewählt, um unabhängig von der Maßeinheit und absoluten Intensität des Kontrastes von Sphäroid zum Hintergrund zu sein. Jedes Sphäroid wurde am CLS-Gerät bei einer 5-fachen Vergrößerung aufgenommen und mit dem Programm Harmony High Content Imaging and Analysis Software analysiert.

Abbildung 48 stellt die Autofluoreszenz der einzelnen Kanäle (AF 488, AF 594, AF 647) dar. Zu jeder Abbildung der Autofluoreszenz wird ein Diagramm mit der Darstellung des Kontrastes zwischen dem Sphäroid der Kontrolle sowie der Plasmabehandlung gegenüber dem Hintergrund abgebildet (Abb. 48: A-D). Für keinen der getesteten Kanäle ließ sich ein signifikanter Unterschied des Kontrastes messen (Abb. 48: B-D). Lediglich einzelne fokal sichtbare Autofluoreszenzintensitäten konnten bei den Plasmabehandlungsgruppen gesehen werden (Abb. 48: B-D). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die getesteten Antikörper jeweils richtig-positive Ergebnisse liefern (Abb. 49-53).

Im Folgenden wurden die einzelnen primär gelabelten Antikörper nach den Wellenlängen geordnet (AF 488, AF594, AF 647) zusammengestellt.

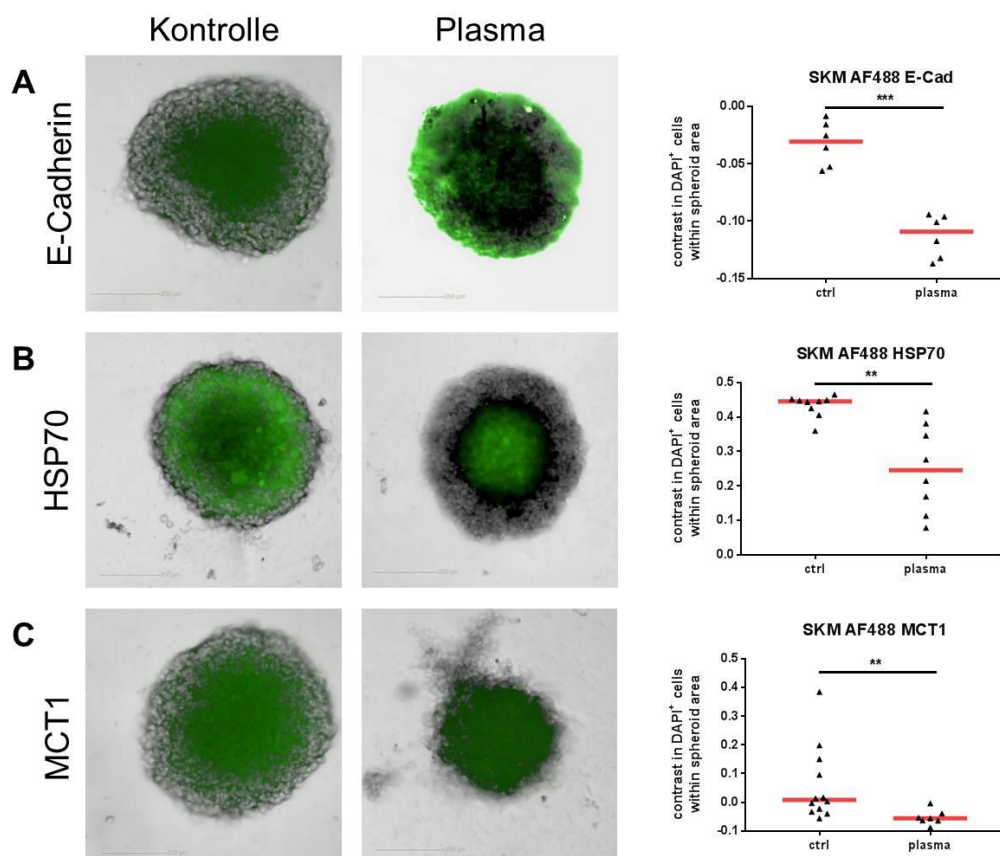


**Abbildung 48:** DAPI Kontrollfärbung der Autofluoreszenz. An Tag 0 wurden 1000 SK-Mel-28-Sphäroide ausgesät und 72 h kultiviert. Nach 72 h wurden diese 89 s mit Plasma behandelt und anschließend für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden alle Sphäroide fixiert und mit DAPI zur Kernfärbung behandelt. Dargestellt werden jeweils die Durchlichtaufnahmen – bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS-Gerät – überlagert mit dem entsprechenden Fluoreszenzkanal (DAPI, A488, AF 594, AF 647). Die Maßstabsskala beträgt 500  $\mu\text{m}$ . Auf der y-Achse der Diagramme (rechte Spalte) wurde der Kontrast der DAPI positiven Zellen innerhalb des Sphäroides gegenüber der Umgebungsintensität der jeweiligen Fluoreszenzfarbe aufgetragen. Die Mittelwerte der Variationskoeffizienten (cv in %) pro Sphäroid werden jeweils mit einem roten Strich und die Einzelwerte (cv) der einzelnen Sphäroide mit Dreiecken dargestellt (je  $n = 3$ ). Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Plasmabehandlung sind mit jeweils einem bis drei Sternchen markiert (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). **A:** Darstellung der DAPI-Kernfärbung überlagert mit der Durchlichtaufnahme bei der Kontrolle und der Plasmabehandlung. Die plasmabehandelten Sphäroide weisen eine instabilere Form auf. **B:** Darstellung der AF488-Autofluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Eine optisch sichtbare Autofluoreszenz ist sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Plasmabehandlung nicht zu erkennen. Das Diagramm stellt den Variationskoeffizienten des Kontrastes der Kontrolle (ctrl) und der Plasmabehandlung (plasma) dar. Es ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen. **C:** Darstellung der AF594-Autofluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Bei der Plasmabehandlung sieht man fokale Intensitätserhöhungen, die sich im Diagramm der Kontrastdarstellung nicht signifikant von der Kontrolle unterscheiden. **D:** Darstellung der AF647-Autofluoreszenz der SK-Mel-28-Sphäroide. Optisch lässt sich, bis auf kleine Bereiche in der Plasmabehandlungsgruppe, keine Autofluoreszenz erkennen. Es liegen keine signifikanten Unterschiede innerhalb des Kontrastes zwischen der Kontroll- und Plasmabehandlungsgruppe vor.

#### 3.4.4.1 Darstellung der mit AF 488 gefärbten Sphäroide

Dargestellt wurden drei primär gelabelte Antikörper (E-Cadherin, HSP 70, MCT1), die mit dem Fluoreszenzfarbstoff AF 488 gekoppelt sind. In der Abbildung 49 werden pro Antikörper jeweils die Kontroll- den plasmabehandelten Sphäroiden gegenübergestellt. Ergänzt wird diese Gegenüberstellung jeweils mit einem Diagramm, welches auf der y-Achse den Kontrast der DAPI-Positiven-Zellen innerhalb des Sphäroides gegenüber der Umgebungsintensität der AF 488-Fluoreszenzfärbung darstellt (Abb. 49: A-C).

Die E-Cadherin-Färbung weist bei der Kontrolle eine deutliche Fluoreszenzfärbung des Sphäroidkernes auf. Diese Antikörperverteilung hat sich bei der direkten Plasmabehandlungsgruppe zu Gunsten der Zellperipherie verlagert. Des Weiteren scheint die gesamte Intensitätsstärke erhöht zu sein. Beide Aufnahmen erfolgten unter identischen Belichtungszeiten. Durch das ergänzende Diagramm wird der Intensitätsunterschied deutlich. Es liegt eine signifikante Reduktion des Kontrastverhältnisses der plasmabehandelten Sphäroide im Vergleich zu den Kontrollsphäroiden gegenüber dem Hintergrund vor. Aufgrund der negativen Skalierung der y-Achse entspricht ein höherer Wert einer Reduktion (Abb. 49: A). Die HSP 70-Färbung weist eine gegensätzliche Verteilung auf. Bei der Kontrolle zeigt sich eine – über dem ganzen Sphäroid – gleichmäßige Antikörperverteilung, die bei dem plasmabehandelten Sphäroid vor allem im Sphäroidinneren nachweisbar ist. Des Weiteren liegt eine signifikante Reduktion des Kontrastes bei den plasmabehandelten Sphäroiden vor (Abb. 49: B). Bei der dritten Antikörperfärbung wurde bei den Kontrollsphäroiden eine ausgeprägte MCT1-Verteilung im Sphäroidkern beobachtet. Diese weitete sich bei den plasmabehandelten Sphäroiden auf die Zellperipherie aus, wobei aufgrund der Zellverluste insbesondere in den äußeren Zelllagen, nicht genau ersichtlich ist, ob es sich hierbei nicht um eine vergleichbare Verteilung handelt. Gleichwohl liegt eine signifikante Reduktion des Kontrastes bei den plasmabehandelten Sphäroiden im Vergleich zu den Kontroll-Sphäroiden vor (Abb. 49: C).



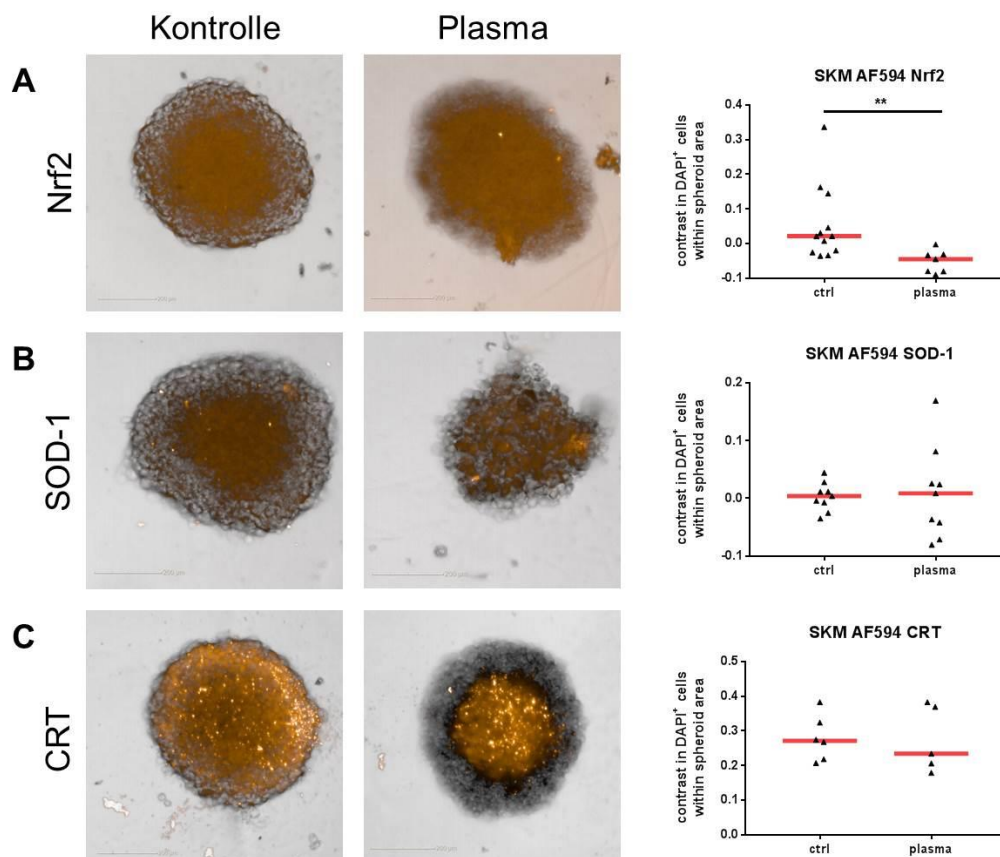
**Abbildung 49:** AF 488 primär gelabelte Antikörper. Verwendet wurden die drei Antikörper E-Cadherin (A), HSP 70 (B) und MCT1 (C). An Tag 0 wurden 1000 SK-Mel-28-Sphäroide ausgesät und 72 h kultiviert. Nach 72 h wurden diese 89 s mit Plasma behandelt und anschließend für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden alle Sphäroide fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Dargestellt werden jeweils die Durchlichtaufnahmen – bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS-Gerät – überlagert mit dem AF 488-Fluoreszenzkanal. Die Maßstabsskala beträgt 500  $\mu\text{m}$ . Auf der y-Achse der Diagramme (rechte Spalte) wurde der Kontrast der DAPI positiven Zellen innerhalb des Sphäroids gegenüber der Umgebungsintensität des AF 488-Fluoreszenzfarbstoffes aufgetragen. Die Mittelwerte der Variationskoeffizienten (cv in %) pro Sphäroid werden jeweils mit einem roten Strich und die Einzelwerte (cv) der einzelnen Sphäroide mit Dreiecken dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Plasmabehandlung sind mit jeweils einem bis drei Sternchen markiert (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). **A:** Darstellung der E-Cadherin-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. Bei der Kontrolle (n = 6) lässt sich eine zentralbetonte Antikörperverteilung nachweisen, die sich bei der plasmabehandelten Gruppe (n = 6) auf dem gesamten Sphäroid verteilt. Die Kontrastmessung ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, mit einer Kontrasterniedrigung bei den plasmabehandelten Sphäroiden. Aufgrund der negativen y-Achse entspricht eine negative Abnahme des Kontrastes einer vergleichweisen Reduktion. **B:** Darstellung der HSP 70-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. Bei der Kontrolle (n = 9) liegt eine flächenhafte Verteilung über dem ganzen Sphäroid vor, die sich bei den plasmabehandelten Sphäroiden (n = 8) auf das Innere konzentriert. Die Kontrastmessung ergab eine signifikante Reduktion des Kontrastes bei den plasmabehandelten Sphäroiden im Vergleich zur Kontrolle. **C:** Darstellung der MCT1-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. Die Kontrollsphäroide (n = 12) weisen eine zur Zellperipherie abnehmende Antikörperdichte auf, die sich bei den plasmabehandelten Sphäroiden (n = 7) auf die gesamte Fläche bzw. Volumen ausbreitet. Aufgrund von peripheren Verlusten bei den plasmabehandelten Sphäroiden lässt sich nicht eindeutig zeigen, ob die Reduktion des Sphäroidvolumens nicht den Grund der flächigen Umverteilung darstellt. Die Kontrastmessung ergab eine signifikante Reduktion des Kontrastes bei den plasmabehandelten Sphäroiden im Vergleich zu Kontrolle.

### 3.4.4.2 Darstellung der mit AF 594 gefärbten Sphäroide

Untersucht wurden die Verteilung von drei mit dem AF 594-Fluoreszenzfarbstoff primär gelabelten Antikörpern (Nrf2, SOD-1, CRT). In Abbildung 50 werden – pro verwendetem Antikörper – die Kontrollsphäroide den mit 89 s plasmabehandelten Sphäroiden gegenübergestellt. Ergänzt werden diese Abbildungen jeweils mit einem Diagramm, welches auf der y-Achse den Kontrast der DAPI-positiven-Zellen innerhalb des Sphäroides gegenüber der Umgebungsintensität der AF 594-Fluoreszenzfärbung darstellt (Abb. 50: A-C).

Bei der Nrf2-Antikörperfärbung lässt sich bei der Kontrolle eine Anreicherung der AF-Farbindensität in der Mitte des Sphäroides sehen, die bei den plasmabehandelten Sphäroiden stärker in die Zellperipherie reicht. Im Diagramm zeigt sich ein signifikanter Unterschied in Form einer Reduktion des Kontrastverhältnisses der plasmabehandelten Sphäroide im Vergleich zu den Kontrollsphäroiden gegenüber dem Hintergrund (Abb. 50: A). Ein signifikanter Unterschied im Kontrastverhältnis liegt bei den Sphäroiden, die mit SOD-1- bzw. CRT-behandelt wurden, nicht vor (Abb. 50: B, C). Die Verteilung der SOD-1-Antikörper liegt bei den Kontrollsphäroiden besonders in der Sphäroidmitte und wandert bei den plasmabehandelten Sphäroiden in Richtung Peripherie. Aufgrund der durch die Plasmabehandlung teilweise zerfallenden Sphäroide lässt sich eine eindeutige Verteilungstendenz nicht erkennen. Diese Schwankungen spiegeln sich in der breiten Verteilung der Kontrastverteilungswerte wider (Abb. 50: B). Das CRT verteilt sich bei der Kontrolle über dem ganzen Sphäroid mit leichten, punktuellen Intensitätserhöhungen im Bereich der Peripherie. Durch die Plasmabehandlung scheint es zu einer Umverteilung in das Zentrum des Sphäroides zu kommen. Bei dem Kontrastverhältnis gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Plasmabehandlung (Abb. 50: C).





**Abbildung 50:** AF 594 primär gelabelte Antikörper. Verwendet wurden die drei Antikörper Nrf2 (A), SOD-1 (B) und CRT (C). An Tag 0 wurden 1000 SK-Mel-28-Sphäroide ausgesät und 72 h kultiviert. Nach 72 h wurden diese 89 s mit Plasma behandelt und anschließend für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden alle Sphäroide fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Dargestellt werden jeweils die Durchlichtaufnahmen – bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS-Gerät – überlagert mit dem AF 594-Fluoreszenzkanal. Die Maßstabsskala beträgt 500  $\mu\text{m}$ . Auf der y-Achse der Diagramme (rechte Spalte) wurde der Kontrast der DAPI positiven Zellen innerhalb des Sphäroides gegenüber der Umgebungsintensität des AF 594-Fluoreszenzfarbstoffes aufgetragen. Die Mittelwerte der Variationskoeffizienten (cv in %) pro Sphäroid werden jeweils mit einem roten Strich und die Einzelwerte (cv) der einzelnen Sphäroide mit Dreiecken dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Plasmabehandlung sind mit jeweils einem bis drei Sternchen markiert (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). **A:** Darstellung der Nrf2-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. In der Kontrolle (n = 12) lässt sich eine zentralbetonte Antikörperanreicherung beobachten, die sich bei den plasmabehandelten Sphäroiden (n = 7) in die Peripherie ausdehnt. Die Kontrastmessung ergab einen signifikanten Unterschied mit einer Reduktion des Kontrastverhältnisses bei den plasmabehandelten Sphäroiden. **B:** Darstellung der SOD-1-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden (je n = 9). Die Antikörperverteilung dehnt sich bei den plasmabehandelten Sphäroiden von dem Sphäroidinneren bei der Kontrolle auf die gesamte Fläche aus. Die Kontrastmessung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der Plasmabehandlungsgruppe. **C:** Darstellung der CRT-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. Es zeigt sich eine gleichmäßige – jedoch mit leichter Präferenz der peripheren Bereiche – Antikörperverteilung bei der Kontrollgruppe (n = 6). Nach der Plasmabehandlung (n = 5) lässt sich eine Antikörperanreicherung der zentralen Sphäroidbereiche beobachten. Die Kontrastmessung ergab keinen signifikanten Unterschied.

### 3.4.4.3 Darstellung der mit AF 647 gefärbten Sphäroide

Es wurden insgesamt sieben mit dem AF 647-Fluoreszenzfarbstoff primär gelabelte Antikörper untersucht, die insgesamt in drei Abbildungen dargestellt werden (Abb. 51-53). In jeder Abbildung werden pro verwendeten Antikörper die Kontroll-Sphäroide den mit 89 s plasmabehandelten Sphäroiden gegenübergestellt. Ergänzt werden diese Abbildungen jeweils mit einem Diagramm, welches auf der y-Achse den Kontrast der DAPI-Positiven-Zellen innerhalb des Sphäroides gegenüber der Umgebungsintensität der AF 647-Fluoreszenzfärbung darstellt (Abb. 51-53: A-C).

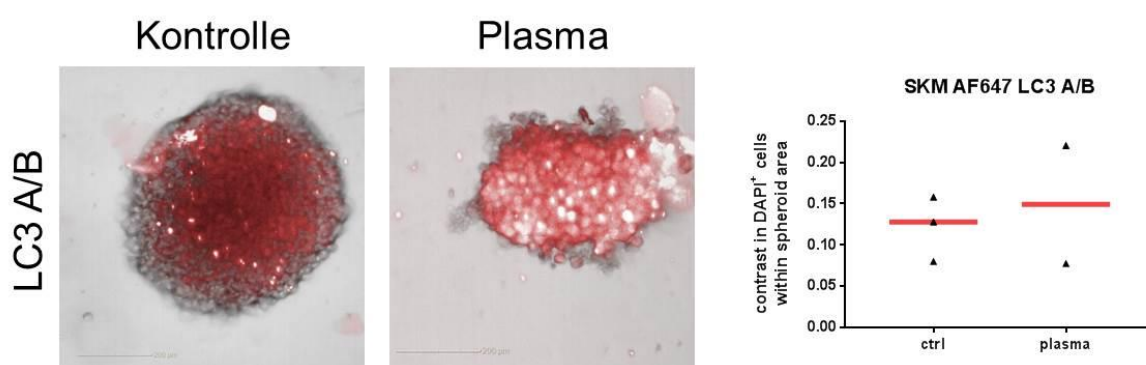
In der Abbildung 51 wird der Autophagiemarker LC3 A/B dargestellt. Die Antikörperverteilung sowohl bei den Kontroll- als auch bei den plasmabehandelten Sphäroiden breitet sich über die ganze Sphäroidfläche aus. Die Kontrastmessung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und der Plasmabehandlung (Abb. 51).

Die Abbildung 52 zeigt die drei Antikörper  $\gamma$ -H2A.X (Abb. 52: A), HIF1 $\alpha$  (Abb. 52: B) und Ki-67 (Abb. 52: C). Die  $\gamma$ -H2A.X-Antikörperverteilung der Kontroll-Sphäroide weist eine Präferenz im Sphäroidkern auf, wohingegen die plasmabehandelten Sphäroide eine deutliche Gesamtreduktion zeigen. Die Kontrastmessung bestätigt diese visuelle Reduktion mit einer signifikanten Reduktion des Kontrastverhältnisses bei den plasmabehandelten Sphäroiden (Abb. 52: A). Der Hypoxiemarker HIF1 $\alpha$  weist sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Plasmabehandlung eine gleichmäßige Verteilung über dem gesamten Sphäroid auf. Die Kontrastmessung ergibt ebenfalls keinen Unterschied zwischen der Kontroll- und der Plasmabehandlungsgruppe (Abb. 52: B). Der Proliferationsmarker Ki-67 (Scholzen & Gerdes 2000) zeigt eine deutliche Zunahme der Signalintensität bei den plasmabehandelten Sphäroiden auf. Dies wird in der Kontrastmessung durch eine signifikante Reduktion von negativen Kontrastverhältnissen bestätigt (Abb. 52: C).

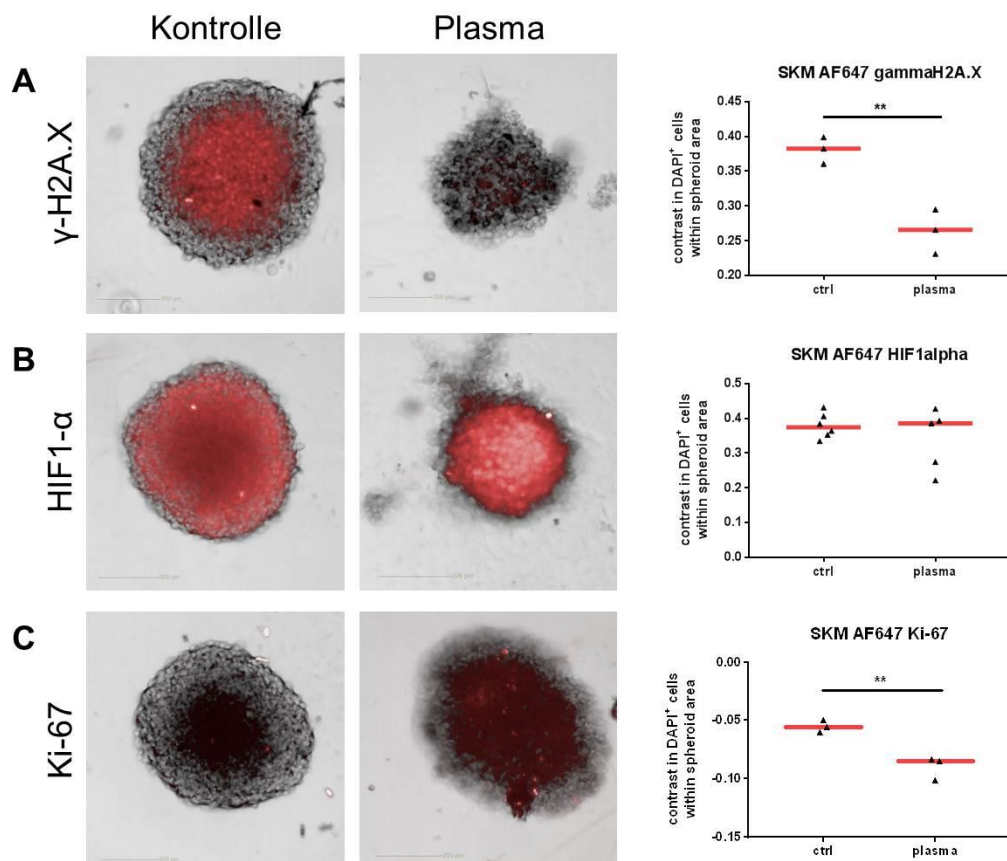
In der Abbildung 53 werden die drei Antikörper ZEB1 (Abb. 53: A), GPX1 (Abb. 53: B) und HSP90 (Abb. 53: C) dargestellt. Der Antikörper ZEB1, welcher mit einem AF 700-Fluorophor gekoppelt ist, wurde aus technischen Gründen mit dem AF 647-Fluoreszenzkanal am CLS-Gerät aufgenommen. Nachfolgend wird dieser Antikörper ebenfalls als AF 647 bezeichnet. Die Antikörperverteilung des ZEB1-Antikörpers ist sowohl bei der Kontrolle, als auch bei der Plasmabehandlung schwach ausgeprägt. Die Kontrastmessung ergibt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und der Plasmabehandlung. Zudem weisen die gemessenen Werte ein Kontrastverhältnis von etwa 0 auf (Abb. 53: A). Die GPX1-



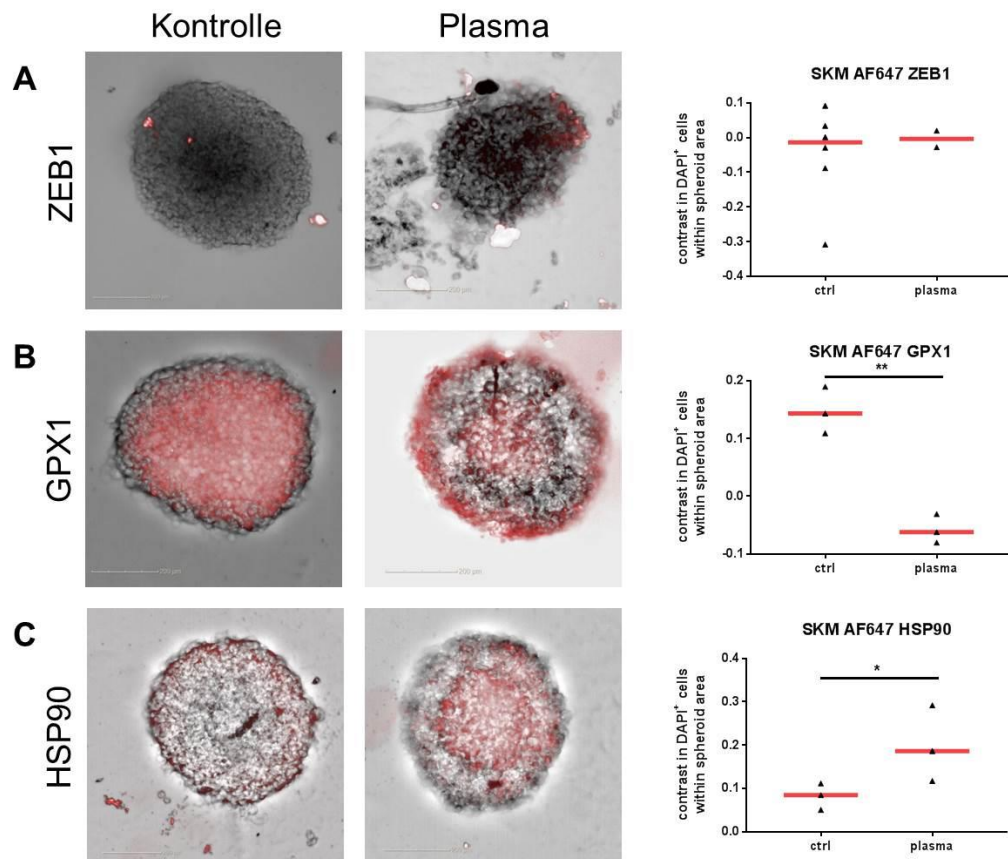
Antikörperverteilung der Kontroll-Sphäroide weist eine zentrale Tendenz auf, die zur Zellperipherie abnimmt. Das Verteilungsmuster ändert sich in der Plasmabehandlungsgruppe zu Gunsten der aufgelockerten Zellperipherie und des Sphäroidkerns. Des Weiteren nimmt das Kontrastverhältnis bei den plasmabehandelten Sphäroiden signifikant ab (Abb. 53: B). Die Antikörperverteilung der HSP90-Antikörper konzentriert sich bei den Kontroll-Sphäroiden leicht auf die Peripherie und wandelt sich bei den plasmabehandelten Sphäroiden nach zentral. Zudem ergeben die Kontrastmessungen eine signifikante Erhöhung des Kontrastverhältnisses bei den plasmabehandelten Sphäroiden (Abb. 53: C).



**Abbildung 51:** LC3 A/B AF 647 primär gelabelte Antikörper. An Tag 0 wurden 1000 SK-Mel-28-Sphäroide ausgesät und 72 h kultiviert. Nach 72 h wurden diese 89 s mit Plasma behandelt und anschließend für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden alle Sphäroide fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Dargestellt werden jeweils die Durchlichtaufnahmen – bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS-Gerät – überlagert mit dem AF 647-Fluoreszenzkanal. Die Maßstabsskala beträgt 500  $\mu\text{m}$ . Auf der y-Achse im Diagramm (rechts) wurde der Kontrast der DAPI positiven Zellen innerhalb des Sphäroides gegenüber der Umgebungintensität des AF 647-Fluoreszenzfarbstoffes aufgetragen. Die Mittelwerte der Variationskoeffizienten (cv in %) pro Sphäroid werden jeweils mit einem roten Strich und die Einzelwerte (cv) der einzelnen Sphäroide mit Dreiecken dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle (n = 3) und der Plasmabehandlung (n = 2) sind mit jeweils einem bis drei Sternchen markiert (\*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,01; \*\*\*p  $\leq$  0,001). Dargestellt wird die LC3 A/B-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. Sowohl die Kontroll- als auch die plasmabehandelten Sphäroide weisen eine über dem ganzen Sphäroid gleichmäßige Antikörperverteilung auf. Die Kontrastmessung ergab keinen signifikanten Unterschied im Kontrastverhältnis zwischen der Kontroll- und Plasmabehandlungsgruppe.



**Abbildung 52:** AF 647 primär gelabelte Antikörper. Verwendet wurden die drei Antikörper  $\gamma$ -H2A.X (A), HIF1 $\alpha$  (B) und Ki-67 (C). An Tag 0 wurden 1000 SK-Mel-28-Sphäroide ausgesät und 72 h kultiviert. Nach 72 h wurden diese 89 s mit Plasma behandelt und anschließend für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden alle Sphäroide fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Dargestellt werden jeweils die Durchlichtaufnahmen – bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS-Gerät – überlagert mit dem AF 647-Fluoreszenzkanal. Die Maßstabsskala beträgt 500  $\mu$ m. Auf der y-Achse der Diagramme (rechte Spalte) wurde der Kontrast der DAPI positiven Zellen innerhalb des Sphäroides gegenüber der Umgebungsintensität des AF 647-Fluoreszenzfarbstoffes aufgetragen. Die Mittelwerte der Variationskoeffizienten (cv in %) pro Sphäroid werden jeweils mit einem roten Strich und die Einzelwerte (cv) der einzelnen Sphäroide mit Dreiecken dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Plasmabehandlung sind mit jeweils einem bis drei Sternchen markiert (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). **A:** Darstellung der  $\gamma$ -H2A.X-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. Die Kontroll-Sphäroide weisen eine Antikörperanreicherung insbesondere im Sphäroidkern auf, welche bei den plasmabehandelten Sphäroiden insgesamt abnimmt. Die Kontrastmessung bestärkt die visuelle Vermutung der Reduktion des Kontrastverhältnisses bei der plasmabehandelten Gruppe (je  $n = 3$ ). **B:** Darstellung der HIF1 $\alpha$ -Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. Sowohl die Kontroll- als auch die plasmabehandelten Sphäroide weisen eine über dem ganzen Sphäroid gleichmäßige Antikörperverteilung auf. Die Kontrastmessung ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ( $n = 6$  bei der Kontroll- und  $n = 5$  bei der Plasmabehandlungsgruppe). **C:** Darstellung der Ki-67-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. In den Kontrollsphäroiden ließ sich kaum eine Fluoreszenz erkennen. Bei der Plasmabehandlungsgruppe war diese Fluoreszenzintensität insbesondere der zentralen Bereiche stärker ausgeprägt. In der Kontrastmessung ergab sich eine signifikante Reduktion negativer Kontrastverhältnisse bei den plasmabehandelten Sphäroiden (je  $n = 3$ ).



**Abbildung 53:** AF 647 primär gelabelte Antikörper. Verwendet wurden die drei Antikörper ZEB1 (A), GPX1 (B) und HSP90 (C). An Tag 0 wurden 1000 SK-Mel-28-Sphäroide ausgesät und 72 h kultiviert. Nach 72 h wurden diese 89 s mit Plasma behandelt und anschließend für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden alle Sphäroide fixiert und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt. Dargestellt werden jeweils die Durchlichtaufnahmen – bei einer 5-fachen Vergrößerung am CLS-Gerät – überlagert mit dem AF 647-Fluoreszenzkanal. Die Maßstabsskala beträgt 500 µm. Auf der y-Achse der Diagramme (rechte Spalte) wurde der Kontrast der DAPI positiven Zellen innerhalb des Sphäroids gegenüber der Umgebungsintensität des AF 647-Fluoreszenzfarbstoffes aufgetragen. Die Mittelwerte der Variationskoeffizienten (cv in %) pro Sphäroid werden jeweils mit einem roten Strich und die Einzelwerte (cv) der einzelnen Sphäroide mit Dreiecken dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Plasmabehandlung sind mit jeweils einem bis drei Sternchen markiert (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). ZEB1 wurde als primär gelabelter Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff AF 700, aufgrund technischer Einschränkungen mit einem AF 647-Fluoreszenzkanal aufgenommen. Demnach wird im Folgenden auch für diesen Antikörper die Bezeichnung AF 647 verwendet. **A:** Darstellung der ZEB1-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. Sowohl in den Kontroll- als auch in den plasmabehandelten Sphäroiden lässt sich kein eindeutiges Verteilungsmuster erkennen. Es lassen sich lediglich einzelne punktuelle Antikörperanreicherungen erkennen. Die Kontrastmessung ergab zum einen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle ( $n = 6$ ) und der Plasmabehandlung ( $n = 2$ ) und zum anderen Kontrastverhältnisse die sich nahe 0 zur Umgebung befinden. Dies deckt sich mit der schwachen allgemeinen Sphäroidfärbung. **B:** Darstellung der GPX1-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. Die Kontrollsphäroide weisen eine gleichmäßige Antikörperverteilung über dem ganzen Sphäroid auf. Das Verteilungsmuster ändert sich bei der plasmabehandelten Gruppe und konzentriert sich nun auf den peripheren Rand sowie den zentralen Kern. Bei der Kontrastmessung lässt sich ein signifikanter Unterschied mit einer Reduktion des Kontrastverhältnisses bei den plasmabehandelten Sphäroiden erkennen (je  $n = 3$ ). **C:** Darstellung der HSP90-Antikörperfärbung bei Kontroll- und 89 s plasmabehandelten SK-Mel-28-Sphäroiden. Sowohl die Kontroll- als auch die plasmabehandelten Sphäroide weisen eine leichte und auf die Peripherie konzentrierte Antikörperverteilung auf. Die Kontrastmessung ergab eine signifikante Erhöhung des Kontrastverhältnisses bei den plasmabehandelten Sphäroiden (je  $n = 3$ ).

## 4. Diskussion

Die grundlegende Zielstellung dieser Arbeit war es ein Verfahren von Ivanov und Grabowska (Ivanov & Grabowska 2017) für die Etablierung sowie Optimierung von Tumorsphäroidkulturen anzuwenden. Hierfür wurden zunächst die Paraffineinbettung und das parallele Schneiden von mehreren Sphäroiden etabliert und im Verlauf optimiert. Anschließend wurde die Methodik auf die Untersuchung des Einflusses von Plasma und PEF auf Tumorsphäroide angewendet. Im Folgenden sollen diese Punkte als Orientierung dienen und kritisch in Hinblick auf die Anwendung als *high-throughput*-Methode betrachtet werden. Des Weiteren sollen Fehlerquellen sowie Problematiken aufgezeigt und im Kontext der aktuellen Erkenntnisse betrachtet werden.

### 4.1 Problematik der Modellfindung in der Tumorthherapie

In der Forschung wird stets versucht, adäquate Modelle zu einer gewissen Fragestellung zu finden. Tumorsphäroide stellen dabei eine dreidimensionale Tumorzellkultur dar, die durch ihre Struktur das In-vivo-Mikromilieu sowie die komplexe zelluläre Heterogenität der Krebszellen besser darstellen als die bisher genutzten zweidimensionalen Zellmonolayer (Vinci et al. 2012; Thoma et al. 2014). Hierdurch kann die Lücke zwischen einem 2D-Zellkulturmodell und den In-vivo-Tierversuchsmodellen teilweise geschlossen werden (Nath & Devi 2016). Vinci et al. beschrieben einige wichtige Größenparameter von Tumorsphäroiden, die bei der Versuchsplanung berücksichtigt wurden. Als optimal wurde eine Größe zwischen 300 und 500  $\mu\text{m}$  identifiziert, die eine Diffusion mit Nährstoffen gewährleisten kann (Vinci et al. 2013). Des Weiteren, bedingt durch die ansteigenden hypoxischen Bedingungen zum Kern hin, lassen sich nekrotische Zentren bei Sphäroiden, die größer sind als 500  $\mu\text{m}$ , beschreiben (Vinci et al. 2013), die unter Umständen zu einer Instabilität des ganzen Sphäroids führen.

Davon ausgehend wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche durchgeführt, um sowohl die Reproduzierbarkeit als auch die optimale Sphäroidgröße von 300-500  $\mu\text{m}$  zu erreichen. Verwendet wurden zwei verschiedene Zelllinien (SK-Mel-28, MNT-1), die zunächst in einer unterschiedlichen Zellzahl von 500, 1000 und 2000 Zellen zum Zeitpunkt  $t = 0$  h ausgesät wurden (vgl. Kapitel 3.1). Die beiden Zelllinien wuchsen unterschiedlich schnell, sodass verschiedene Anfangszellzahlen verwendet wurden (SK-Mel-28: 1000 Zellen; MNT-1: 2000 Zellen). Um des Weiteren den Einfluss der Zentrifugenstärke auf den Durchmesser zu untersuchen, wurden jeweils 1000 SK-Mel-28 und 2000 MNT-1 Zellen bei 500 und 750 rcf

zentrifugiert. Nach 72 h wurden die Durchmesser verglichen (Abb. 12). Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Zentrifugenstärken, die durch die initial verstärkte Aggregation der Zellen verursacht wurde. Die Sphäroide waren jeweils bei 750 rcf signifikant größer als bei 500 rcf, sodass die folgenden Versuche bei 750 rcf für 10 min durchgeführt wurden. Die größeren und beim Umsetzen scheinbar stabileren Sphäroide stellten für die Etablierung sowie den Einsatz des Microarrays eine positive Eigenschaft dar. Wiederholenden Messungen ergaben keinen signifikanten Unterschied im Sphäroiddurchmesser innerhalb der Zelllinie (Werte nicht dargestellt). Ein signifikanter Unterschied zwischen den SK-Mel-28- und den MNT-1-Zellen blieb erhalten, wobei sich die Größe nach 72 h für beide Zelllinien im gewünschten Bereich von etwa 500 µm befand (vgl. Tab. 16). Dies war die Grundlage für die Festlegung der Kultivierungsbedingungen für die weiteren Untersuchungen.

## 4.2 Der Einfluss von Methocel auf die optische Sphäroidkompaktheit

Die Behandlung der Sphäroide mit kaltem Atmosphärendruckplasma sowie die Einbettung in Agarose erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Verlustes bzw. der manuellen Zerstörung des Sphäroids. Aufgrund der Heterogenität der Tumoren gibt es auch Unterschiede in der Form und Kompaktheit der dreidimensionalen Sphäroide. In Anbetracht der Arbeiten von Vinci et al., die eine lose Aggregation von SK-Mel-5 Zellen beschreiben (Vinci et al. 2012), wurde vermutet, dass die SK-Mel-28 Zellen ebenfalls keine dichte und stabile Aggregation aufweisen.

Um die Kompaktheit und Rundheit zu verbessern wurde testweise 0,24 % Methocel zu dem Medium (RPMI 1640) hinzugegeben. Leung et al. beschreiben in der *Hanging-Drop*-Methode eine Verbesserung der Sphäroidform (Leung et al. 2015). Sowohl die SK-Mel-28- als auch die MNT-1-Zellen wiesen – rein optisch – keinen Unterschied in Bezug auf das Aussehen nach einer direkten Plasmabehandlung auf (vgl. Kapitel 3.3.2; Abb. 19, 20). Sowohl die Kontrolle als auch die zwei Behandlungszeiten (50 und 90 s) zeigten kaum Differenzen auf (Abb. 19 und Abb. 20). Auch der Vergleich der direkten Plasmabehandlung mit und ohne Methocel-Zugabe ergab lediglich bei einer 89 s direkten Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Zelllinie einen signifikanten Unterschied im Sphäroiddurchmesser (Abb. 21: B). Des Weiteren ist die Interaktion von kaltem Plasma mit dem Methocel nicht näher untersucht worden und könnte dadurch eine potenzielle Fehlerquelle darstellen. Daher wurde der Gebrauch des Methocels

für die *Ultra-Low-Attachment*-Methode nicht weiter verwendet. Weitere Untersuchungen auf potenzielle Interaktionen zwischen Methocel und kaltem Atmosphärendruckplasma sind notwendig, um die Verwendung für andere Zelllinien – die eine geringe Aggregation und Kompaktheit aufweisen – ausweiten zu können. Zudem sollte die abweichende Sphäroidanzuchtsmethode (*Hanging Drop* (Leung et al. 2015) gegenüber der *Ultra-Low-Attachment*-Methode) in weiteren Versuchsdurchführungen mit berücksichtigt werden.

### 4.3 Der Einfluss von kaltem Plasma auf die Sphäroidmorphologie

Die Plasmatherapie hat zahlreiche Anwendungsgebiete (vgl. Kapitel 1.4.2) in der Medizin, an denen aktuell intensiv geforscht wird. Dabei stellt die Plasmabehandlung eine mögliche Option zur Bekämpfung von Krebs dar, die in der Tumorforschung an unterschiedlichen Modellen geprüft werden (vgl. Kapitel 1.4.2 und 1.5). Dennoch sind aktuell weder der Einfluss von kaltem Atmosphärenplasma auf das das Tumorgewebe umgebende Medium noch die genaue Zusammensetzung der dabei freigesetzten Spezies im Detail bekannt. Zudem sind weder die genaue Eindringtiefe noch die Effekte auf zellulärer Ebene hinreichend analysiert (Plewa et al. 2014). Dennoch sind einige Plasma-induzierte Effekte auf die unterschiedlichsten Zellformen charakterisiert und beschrieben worden. Als Beispiel seien Arbeiten von Köritzer et al. an chemoresistenten Glioblastomzellen zu nennen, die durch verschiedene Plasmabehandlungszeiten in die Apoptose oder in den Zell-Zyklus-Arrest übergingen (Köritzer et al. 2013). Eine Induktion der Apoptose konnte über die MFI-Untersuchung der TUNEL-Immunfluoreszenzfärbung bei einer direkten Plasmabehandlung von 89 s bei den SK-Mel-28-Melanomzellen nachgewiesen werden (Abb. 38: A). Die Positivkontrolle mit einer 50  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung ergab vergleichbare Ergebnisse (Abb. 38: A). Hieraus lässt sich vermuten, dass die Apoptose-Induktion insbesondere durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt wurde (Bekeschus et al. 2016; Tanaka & Hori 2017; von Woedtke et al. 2013; Kapitel 4.5).

Nach einer direkten Plasmabehandlung konnte sowohl bei den SK-Mel-28- als auch bei den MNT-1-Sphäroiden eine deutliche Auflockerung der Zellperipherie und eine Verdichtung der zentralen Regionen in lichtmikroskopischen Untersuchungen beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.3.1). Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits von Plewa et al. an Kolonkarzinomzellen (HCT116) beschrieben (Plewa et al. 2014). In weiteren Untersuchungen wurden diese direkten Plasmaeffekte mit einer vergleichbaren indirekten Plasmabehandlung sowie einer

Positivkontrolle mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  wiederholt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Behandlungszeiten über alle drei Behandlungsformen eine vergleichbare Intensität aufweisen. Hierfür wurden Ergebnisse aus vorhergehenden Arbeiten des INP verwendet. Dabei entsprach eine direkte Plasmabehandlung von 19 s und 89 s einer indirekten Plasmabehandlungszeit von 60 s und 300 s bzw. einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  und  $150 \mu\text{M}$ . Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden in den Low-Attachment-Kulturplatten erhoben, die für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurden (Abb. 17). In weiteren Experimenten musste zunächst überprüft werden, ob die aufgelockerten Randbereiche überhaupt mit in die Microarrays und anschließend auf den Objektträger übertragen werden. Dafür wurde bei den eingebetteten und geschnittenen Sphäroiden, die zuvor mit Plasma behandelt wurden, eine HE-Färbung durchgeführt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass große Teile der durch Plasmawirkung induzierten Zellauflockerung mit auf das geschnittene Präparat übertragen werden (Abb. 18).

Im Weiteren wurden die Sphäroidgrößen lichtmikroskopisch über den Durchmesser als auch am CLS-Gerät bei den geschnittenen und gefärbten Präparaten über die Gesamtfläche ermittelt. Die Relationen der Gesamtfläche der einzelnen Sphäroidschnitte lassen sich mit den Mittelwerten der Sphäroiddurchmesser (vgl. Abschnitt 3.3.3 und 3.3.4) vergleichen. Bereits die lichtmikroskopischen Messungen haben eine signifikante Größenreduktion bei der  $\mu\text{sPEF}$ -Behandlung gezeigt (Abb. 33; Kapitel 4.4). Diese Ergebnisse lassen sich für beide Zelllinien bei der Messung am CLS-Gerät verifizieren. Signifikante Größenänderungen bei den anderen Behandlungsformen haben sich lichtmikroskopisch nicht ergeben (Abb. 32: A, B). Lichtmikroskopisch konnte für beide Zelllinien keine signifikante Größenänderung zwischen der direkten und indirekten Plasmabehandlung beobachtet werden. Lediglich bei den SK-Mel-28-Sphäroiden wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der 50 und 89 s direkten Plasmabehandlung gemessen (Abb. 32). Die scheinbare Vergrößerung lässt sich auf die Messmethode zurückführen. Die aufgelockerte Zellperipherie ist bei der Messung des Durchmessers mit berücksichtigt. Die Messung der Gesamtfläche am CLS-Gerät hingegen ergab, bis auf die indirekte Plasmabehandlung der MNT-1-Zelllinie, eine signifikante Reduktion der Fläche und damit der Sphäroidgröße im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 37). Hieraus kann zum einen geschlossen werden, dass die Behandlungsformen zu einer Reduktion des Zellwachstums führen (Plewa et al. 2014, Köritzer et al. 2013) und zum anderen könnte davon ausgegangen werden, dass die Zellperipherie teilweise durch die ansonsten identischen Behandlung zwischen Kontrolle und der Plasmabehandlung verloren geht oder vom Programm – aufgrund der großen Abstände sowie ausgedünnten Zellen im Randbereich – nicht vollständig als Ganzes erkannt wird. Diese Ergebnisse der

Tumorverkleinerung (Abb. 37) decken sich mit den Beobachtungen zur Eradikation von Krebszellen in-vitro unter der Erhaltung der normalen Zellen sowie der signifikanten Reduktion der Tumorgröße in-vivo (Schlegel et al. 2013; Keidar et al. 2018). Dennoch hängen die Ergebnisse der Plasma-Zell-Interaktion von weiteren Faktoren, wie beispielsweise der Entladung, dem Gasfluss, der Leistung sowie der Zelllinie an sich ab (Keidar et al. 2018). Bis auf die Zeit wurde innerhalb einer Behandlungsform pro Zelllinie nichts weiter verändert. Nähere Charakterisierungen dieser potentiellen Parameter sollten in weiteren Untersuchungen genauer abgeklärt werden.

#### **4.4 Der Einfluss von gepulsten elektrischen Feldern auf die Sphäroidgröße und Morphologie**

Der Einsatz gepulster elektrischer Felder (PEF) findet zahlreiche Anwendungsfelder in der Medizin und der Forschung, angefangen von der Permeabilisierung der Zellmembran (Neumann & Rosenheck 1972) über das Einbringen von Fremdmaterial in die Zelle, was heutzutage in der Transfektion und Transformation von DNA Anwendung findet (Neumann et al. 1982), bis hin zu Tumortherapieansätzen wie der Elektrochemotherapie (Mali et al. 2013; Gothelf et al. 2003) oder der direkten Apoptose-Induktion mit einer Tumorgrößenreduktion (Schoenbach et al. 2004; Beebe et al. 2002; Joshi & Schoenbach 2010). Es ist bekannt, dass gepulste elektrische Felder – abhängig von der Dauer und Stärke der Pulse – eine Vielzahl von Effekten auf die Zellen ausüben können. Die Arbeitsgruppe von Nuccitelli et al. beschreibt die antitumorale Wirkung von nanosekunden gepulsten elektrischen Feldern (nsPEF) auf Melanome im Mausmodell (Nuccitelli et al. 2006; Nuccitelli et al. 2009). Die Reduktion der Tumorgröße konnte bei beiden Zelllinien (SK-Mel-28, MNT-1) sowohl lichtmikroskopisch über den Durchmesser (Abb. 33) als auch in Immunfluoreszenzaufnahmen der Schnittpräparate über die Gesamtfläche (Abb. 37) nachgewiesen werden. Dabei lässt sich eine stärkere Reduktion des Durchmessers mit zunehmender Behandlungszeit erkennen (Abb. 33). Rein morphologisch lassen sich kaum Unterschiede zwischen den Behandlungstärken erkennen (Abb. 34), wobei die Sphäroide aufgrund der Scherkräfte während des Behandlungsablaufes teilweise deformiert wurden (nicht dargestellt). Wahrscheinlich lassen sich die Größenreduktionen sowie die Verformungen teilweise auf die lose Aggregationsfähigkeit der Sphäroide zurückführen (Vinci et al. 2012). Hierdurch zerfallen die



Sphäroide leichter am Rand oder verformen sich. Dadurch kann es sein, dass einige Sphäroide nicht mehr für die Auswertung bzw. Einbettung verwendet werden können.

Die Induktion der Apoptose ließ sich nur bei den SK-Mel-28-Zellen signifikant nachweisen (Abb. 38: A). Es lässt sich nur vermuten, dass die stärker pigmentierten MNT-1-Zellen aufgrund des höheren Melaningehaltes eine Art protektiven Einfluss über das Abfangen von zellulären Toxinen, wie beispielsweise oxidativen Radikalen, haben (Brożyna et al. 2016). Diese Vermutung stützt sich auf die signifikante Reduktion der TUNEL- und der Cleaved Caspase 3-MFI bei den MNT-1- im Vergleich zu den SK-Mel-28-Zellen (Abb. 38: A-D). Dennoch scheint die  $\mu$ sPEF-Behandlung einen, wenn auch geringen Effekt, auf die Proliferationsrate durch die Reduktion des Ki-67-Proliferationsmarkers zu nehmen (Abb. 38: F). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von Nuccitelli et al., die den schrumpfenden Effekt der nsPEF-Behandlung auf Melanome im Mausmodell gezeigt haben (Nuccitelli et al. 2006; 2009).

#### **4.5 Immunzytologische und immunhistochemische Untersuchungen der Wirkung von Plasma und PEF auf die Tumorsphäroide**

Insgesamt wurde der Einfluss der Plasmabehandlung (direkt, indirekt) sowie die  $\mu$ sPEF-Behandlung auf insgesamt 21 einzelne, spezifische Zellfunktionen bzw. -strukturen mittels Immunfluoreszenz untersucht, die jeweils thematisch in sieben Sets gruppiert wurden (vgl. Tab. 17). Dabei entsprach jedes Set einer bestimmten Fragestellung, wie beispielsweise der Viabilität (vgl. Set 1 Kapitel 3.4.3.1) oder der antioxidativen Zellantwort (vgl. Set 3 Kapitel 3.4.3.3, Kapitel 1.7). Im Folgenden sollen die sieben Sets nacheinander diskutiert und in Hinblick auf die bekannte Literatur kritisch betrachtet werden.

Das erste untersuchte Set umfasste Marker der Zellviabilität. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Behandlung von Tumorzellen mit hohen Plasmabehandlungsintensitäten diese in die Apoptose führen können (Bekeschus et al. 2016; Tanaka & Hori 2017; von Woedtke et al. 2013). Dieser Effekt wurde über eine enzymatische Reaktion, die TUNEL-Färbung, und die Cleaved Caspase 3-MFI teilweise bei den SK-Mel-28-Sphäroiden nachgewiesen (vgl. Kapitel 3.4.3.1). Ebenfalls ist bekannt, dass die Proliferation in nicht malignen Zellen durch eine Plasmabehandlung induziert werden kann, was unter anderem die Wundheilung fördert (Schmidt et al. 2015; Tanaka & Hori 2017). Laut Cairns et al. wird dieser Effekt durch einen

ROS-Konzentrationsgradienten begründet. Dabei fördern geringe Konzentrationen die Zellproliferation, wohingegen hohe Level zum Zelltod führen (Cairns et al. 2011). Es wird vermutet, dass die Reduktion der TUNEL-MFI bei der indirekten Plasmabehandlung der MNT-1-Sphäroide teilweise durch den schützten Effekt des höheren Melaningehaltes, über das verstärkte Abfangen von zellulären Toxinen, dieser Zelllinie zu erklären ist (Brożyna et al. 2016). Es wäre denkbar, dass die benötigte Konzentration an reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies – die die Apoptose induzieren – noch nicht erreicht wurde. Gegen diese Vermutung spricht die ebenfalls signifikante Reduktion des Ki-67-Proliferationsmarkers bei derselben Behandlungsmodalität von 300 s indirekter Plasmabehandlung (Abb. 38). Somit scheint diese Behandlung sowohl die Apoptose signifikant reduziert, als auch die Proliferation gehemmt zu haben. Des Weiteren ist eine präzise Aussage bei den MNT-1-Zellen aufgrund des höheren Melaningehaltes im Vergleich zu den SK-Mel-28-Zellen und der dadurch teilweisen Fluoreszenzlöschung (Quenching) schwierig. Gegebenenfalls wurde für diese Zelllinie genau eine Konzentration zwischen der Apoptoseinduktion und der Proliferationsförderung erreicht. Ebenfalls konnte sowohl bei der direkten Plasmabehandlung sowie der  $\mu$ PEF-Behandlung der SK-Mel-28-Sphäroide ein signifikanter Anstieg des Ki-67-Proliferationsmarkers nachgewiesen werden (Abb. 38), was sich nicht mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen deckt (Plewa et al. 2014). Hieraus ergibt sich, dass die Plasma- und PEF-Behandlung durchaus (wenn auch nicht signifikant) zellstimulierende Impulse induzieren können, was bei einer Therapie unbedingt beachtet werden muss. Eine ungünstige Intensität der Plasmawirkung („Dosierung“) könnte dementsprechend kontraproduktive Effekte bei der Tumorthherapie bewirken. Demnach sollten die künftigen Arbeiten einen besonderen Wert hierauf legen. Vor allem, da diese Effekte durchaus zelllinienunterschiedlich auftreten können (Abb. 38: E, F). Erneut wird ersichtlich, dass mittlerweile zwar die einzelnen Bestandteile einer Plasmabehandlung immer detaillierter beschrieben und charakterisiert wurden (Reuter et al. 2018; Bruggeman et al. 2016), die genaue Interaktion der ROS und RNS mit dem biologischen Milieu dennoch weitestgehend ungeklärt bleibt (Graves 2012). Es wird vermutet, dass sowohl die normalen Zellen als auch die Tumorzellen ein Gleichgewicht zwischen Pro- und Antioxidantien aufweisen. In der Redoxchemotherapie wird ausgenutzt, dass zum einen die Tumorzellen ein höheres Basallevel an Pro- und Antioxidantien aufweisen, und zum anderen, dass durch die Erhöhung der ROS-Konzentration ebenfalls die ROS-Level bei normalen als auch Krebszellen ansteigen, aber die Schwellenkonzentration zum Zelltod bei den Tumorzellen schneller überschritten wird und daher die selektive Tumoreradikation erfolgt (Trachootham et al. 2009; Graves 2012). Dadurch lässt sich

möglicherweise ein Optimum zwischen dem therapeutischen Effekt der Tumorbekämpfung auf der einen Seite und der minimalen Gewebeschädigung auf der anderen Seite erzielen (Kajiyama et al. 2017). Dennoch sollte im Zuge der individualisierten Medizin mehr auf die einzelnen Tumorcharakteristika geachtet werden. Dies liegt vor allem daran, dass unterschiedliche Mutationen, wie beispielsweise eine p53-Mutation, zu einer höheren Resistenz gegenüber Plasma führen könnten (Ma et al. 2014; Keidar et al. 2018), oder stark proliferierende Zellen sensitiver auf kaltes Atmosphärenplasma reagieren als langsam proliferierende Zellen (Keidar et al. 2018). Ein möglicher Erklärungsansatz könnte in dem unterschiedlichen Membranpotential schnell proliferierender Tumoren liegen. Es ist bekannt, dass diese ein depolarisiertes Membranpotential und dadurch ein um den Faktor zwei bis drei geringeres elektrisches Feld aufweisen. Hierdurch verändert sich die „Plasmadynamik“ der durch das Plasma eingebrachten ROS. Die exakten Wirkungsmechanismen müssen noch genauer beschrieben werden, wobei die Apoptoseinduktion wahrscheinlich über einen selektiven Anstieg an intrazellulären ROS und die damit korrespondierenden Apoptosesignalwege in den Krebszellen vermittelt wird. Beispielsweise könnte dies durch verschiedene DNA-Schäden, Mitochondrienschäden, Zytoplasmamembranschäden oder eine Schwächung des intrazellulären Antioxidantssystems erfolgen (Kim & Chung 2016; Keidar et al. 2018).

Das zweite Set beinhaltete mehrere verschiedene Marker, die zum Nachweis von DNA-Schäden eingesetzt werden. ATR (*Ataxia-telangiectasia and Rad3*) ist eine zentrale Kinase, die als DNA-Schadenssensor fungiert und nach der Aktivierung verschiedene Signalwege fördert, die zur Reparatur sowie Stabilisierung der DNA führen und einen zeitweisen Zellzyklus-Arrest einleiten (Weber & Ryan 2015). In keiner der beiden Zelllinien konnte ein signifikanter Unterschied gesehen werden. Eine tendenzielle Erhöhung lässt sich bei der direkten Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Sphäroide vermuten (Abb. 40: A). 8-OHdGuanosine wird besonders als ein wichtiger Marker für DNA-Schäden, die durch freie Radikale bei oxidativen Stress verursacht werden, herangezogen (Valavanidis et al. 2009). Ein vermuteter Anstieg der DNA-Schäden konnte nicht gezeigt werden (Abb. 40: C, D). Vielmehr wurde eine signifikante Reduktion gemessen, die gegebenenfalls durch Heterogenitätsanalysen innerhalb der Sphäroide - z. B. durch Messung des Randbereiches ohne das Zentrum - überprüft werden müssten. Es ist denkbar, dass besonders die apoptotischen Randbereiche, die ebenfalls eine erhöhte 8-OHdGuanosine-MFI aufzeigen (Abb. 41), leichter verloren oder vom Programm nicht erkannt werden. Hieraus werden dann irrtümlicherweise falsche Schlüsse gezogen.  $\gamma$ -H2A.X stellt die phosphorylierte Form des

Histonproteins H2A.X dar und wird bei DNA-Doppelstrangbrüchen durch ionisierende Strahlung verstärkt gebildet. Zudem wird die Zelle über S-Phase-Checkpoint arretiert. Es wird vermutet, dass H2A.X als Antwort auf den Zellzyklusarrest durch ATR phosphoryliert wird. Dadurch wird die zelluläre Genomstabilität aufrechterhalten (Ward & Chen 2001). Die Reduktion des  $\gamma$ -H2A.X-MFI (Abb. 40: E, F) kann mit denselben Schlüssen wie bei der 8-OHdGuanosine-MFI interpretiert werden. Dennoch wurde diese Reduktion ebenfalls in separaten Experimenten mit ganzen Sphäroiden über eine Kontrastmessung gezeigt (Abb. 52: A). Der Verlust der äußeren Bereiche bei der Paraffineinbettung wird ebenfalls von der Arbeitsgruppe von Plewa et al. in einer zeitabhängigen Art und Weise beschrieben (Plewa et al. 2014). Wahrscheinlich war die Inkubationszeit von 24 h nach der Plasmabehandlung zu lang und der Verlust der geschädigten Zellen in der 96-Well-Platte dadurch zu hoch. Plewa et al. beschreiben einen progressiven Verlust nach 16 h, der nach 24 h nicht mehr nachweisbar war (Plewa et al. 2014). Zusammenfassend konnten keine Hinweise auf DNA-Schädigung gefunden werden (Abb. 40).

Innerhalb des dritten Sets wurde die antioxidative Zellantwort auf ROS geprüft. Hierfür wurden Antikörper gegen Enzyme verwendet, die Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff abbauen (Katalase), als Radikalfänger das Zellinnere vor freien Sauerstoffradikalen schützen (SOD-1) oder Radikale über Tripeptide wie das Glutathion (GSH) umbauen (GPX1). Insgesamt wurde eine Induktion des MFI aller drei Antikörper bei der SK-Mel-28-Zelllinie nach der direkten Plasmabehandlung beobachtet (Abb. 42: A, C, E). Bis auf die SK-Mel-28-Sphäroidschnitte nach der direkten Plasmabehandlung (Abb. 42: A) wiesen alle anderen Behandlungsformen eine signifikante Reduktion auf bzw. blieben unverändert (Abb. 42: A, B). Unerwartet wiesen alle drei Antikörper auch eine signifikante Reduktion des MFI nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung auf (Abb. 42: A, C, E), die normalerweise durch die hohe Wasserstoffperoxidkonzentration und den dadurch erhöhten oxidativen Stress zu einer vergleichbaren Induktion wie bei der direkten Plasmabehandlung führen sollte. Anfängliche Verteilungsanalysen mittels der Immunfluoreszenzfärbung der ganzen Sphäroide ergaben nach einer 89 s direkten Plasmabehandlung der SK-Mel-28-Sphäroide eine Umverteilung der GPX1-Antikörperanreicherung in den peripheren Bereich (Abb. 53: B). Die MNT-1-Sphäroide hingegen ergaben ausschließlich eine Reduktion der drei getesteten Antikörper (Abb. 42: B, D, E). Eine genauere Beobachtung der Verteilungsmuster sowie eine strenge Kontrolle der Bildauswertung der aufgelockerten peripheren Bereiche sind notwendig. Auch hier könnte vermutet werden, dass der hohe Melaningehalt eine protektive Rolle spielt und die antioxidative Antwort reduziert ausfällt. Zusammenfassend lässt sich eine erhöhte

antioxidative Antwort nach direkter Plasmabehandlung lediglich bei den SK-Mel-28-Sphäroiden beobachten (Abb. 42 C, E), nicht aber bei der indirekten Plasmabehandlung oder der PEF-Behandlung (Abb. 42). Der erhöhten antioxidativen Antwort steht jedoch ein ebenfalls erhöhter Katalase-MFI gegenüber (Abb. 42 A). Eine verringerte Expression an Katalase sowie eine erhöhte Expression an Kanälen für reaktive Spezies, wie den Aquaporinen, könnte zu einem selektiven Anstieg der ROS in Krebszellen führen und wird in der Literatur beschrieben (Yan et al. 2017; Keidar et al. 2018). Der Aspekt der Katalase-Reduktion ließ sich sowohl bei allen Behandlungsformen der MNT-1-Sphäroide als auch bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung der SK-Mel-28-Sphäroide beobachten (Abb. 42 A, B).

Das vierte Set beschäftigte sich mit der Nrf2-Antwort und dem HIF1 $\alpha$ . Der menschliche Organismus ist konstant einer Vielzahl von Pathogenen und Stress-induzierenden Faktoren ausgesetzt, die Infektionen, Vergiftungen oder andere ungewollte Reaktionen verursachen (Battino et al. 2017). Dabei stellt Nrf2 einen Transkriptionsfaktor dar, welcher direkt in die zelluläre Homöostase, das Redoxgleichgewicht, die innate Immunität sowie in die Tumorgenese eingreift (Battino et al. 2017). Insgesamt stellt Nrf2 einen Masterregulator defensiver Mechanismen dar. Eine dauerhafte Aktivierung wird mit Autophagie und epigenetischen Mutationen in Verbindung gebracht, die zu einer möglichen Tumorresistenz gegenüber Radio- und Chemotherapien führt (Zenkov et al. 2017; Battino et al. 2017; Huppke et al. 2017). Andererseits schützt die Aktivierung des Nrf2-Signalweges über die Induktion zahlreicher antioxidativer Enzyme, beispielsweise HMOX1, molekularer Chaperone oder Xenobiotika metabolisierende Enzyme die Zelle vor Karzinogenesen sowie oxidativem Stress und Inflammationen (Yu & Kensler 2005). Innerhalb der SK-Mel-28-Zelllinie wurde kein signifikanter Unterschied in der Nrf2-MFI festgestellt. Gleichwohl lässt sich ein tendenzieller Anstieg innerhalb der indirekten Plasmabehandlung erkennen (Abb. 44: B). Dies deckt sich mit dem signifikanten Anstieg der HMOX1-MFI (Abb. 44: A), die durch Nrf2 induziert wird (Battino et al. 2017). Es wird vermutet, dass HMOX1 – ein Enzym der Häm-Gruppe – die Zelle in Zusammenarbeit mit der Biliverdin-Reduktase durch eine Mehrproduktion von antioxidativen Bilirubin vor oxidativen Stress schützt (Holowiecki et al. 2016). Obwohl HMOX1 sowie Nrf2 in normalen Zellen einen protektiven Einfluss haben, stellen diese Überlebensvorteile in Krebszellen ein unerwünschtes Problem dar. Eine Überexpression von HMOX1 wurde in unterschiedlichen Tumorzellen festgestellt. Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass eine erhöhte HMOX1-Konzentration damit in Verbindung gebracht werden kann, das Tumorwachstum zu erleichtern, das Tumorüberleben zu verbessern sowie die Resistenz gegenüber Stress und Apoptose zu erhöhen. Des Weiteren wird dadurch die

Angiogenese und Metastasierungsfähigkeit des Tumors begünstigt (Jozkowicz et al. 2007; Reuter et al. 2010). Es ist nicht eindeutig geklärt, ob die signifikante MFI-Reduktion der HMOX1- und Nrf2-MFI in einigen Behandlungsformen der SK-Mel-28- und MNT-1-Sphäroidschnitte (Abb. 44: A, B, D) aufgrund von Verlusten der Zellperipherie oder auf der Grundlage von weiteren, womöglich noch unerforschten pleiotropen Effekten der Plasmabehandlung zustande gekommen sind. Eine nähere Untersuchung dieser Signalwege sollte zum besseren Verständnis erfolgen. Des Weiteren wurde nach einer indirekten Plasmabehandlung ein signifikanter Anstieg der HIF1 $\alpha$ -MFI bei der SK-Mel-28-Zelllinie gemessen (Abb. 44: E). In Säugetierzellen wird HIF1 $\alpha$  insbesondere unter hypoxischen Bedingungen exprimiert und wirkt als wichtiger Genexpressionsverstärker des Erythropoetinsignalweges (Wang et al. 1995). Die uneinheitliche Aggregation der Tumorsphäroide, die größer sind als 500  $\mu\text{m}$ , führt zur Ausbildung hypoxischer Regionen sowie nekrotischer Zentren (Vinci et al. 2012; Abb. 1; Abb. 39). Eine bekannte intrinsische Zellveränderung, die durch HIF1 $\alpha$  induziert wird, ist die Verschiebung des oxidativen zu einem glukoseabhängigen Metabolismus durch die Hochregulierung von Glukosetransportern (Ebert et al. 1995; Thoma et al. 2014). Die dadurch in Tumorzellen entstehenden metabolischen Abnormalitäten führen wiederum zu einer weiteren Verstärkung der HIF1 $\alpha$ -Expression und erlauben den Tumoren, unter hypoxischen Bedingungen das Redoxgleichgewicht sowie das Zellüberleben aufrechtzuerhalten. Hieraus kann die HIF1 $\alpha$ -Aktivität zum Tumorprogress beitragen (Semenza 2010). Die stark proliferierenden Zellen, die durch die bereits vorhandenen onkogenetischen Mutationen im Metabolismus und der Proteintranslation eine bereits erhöhte Produktion von ROS aufweisen, können durch den Warburg-Effekt ihr antioxidatives System hochregulieren und sich dadurch besser gegenüber ROS schützen (Li et al. 2013). Es ist bekannt, dass oxidativer Stress viele Transkriptionsfaktoren, unter anderem NF- $\kappa$ B, AP-1, p53, HIF-1 $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ ,  $\beta$ -Catenin/Wnt und Nrf2, die zur Expression von mehr als 500 unterschiedlichen Genen beitragen, induziert (Reuter et al. 2010; Abb. 42). Untersuchungen haben ergeben, dass die Plasmabehandlung die Abgabe von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), einem wichtigen Molekül für die Angiogenese, verringert und dieser folglich gegebenenfalls Redox-kontrolliert wird (Bekeschus, Rödder et al. 2017).

Innerhalb des fünften Sets wurde die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) an ausgewählten Markern (E-Cadherin,  $\alpha$ SMA, ZEB1) untersucht. Unter der EMT wird der biologische Übergang von polarisierten Epithelzellen, die mit der Basalmembran interagieren, zu mesenchymalen Zellen verstanden. Die mesenchymalen Zellen weisen eine verstärkte

Migrationsfähigkeit, Invasivität und gesteigerte Apoptoseresistenz auf (Kalluri & Weinberg 2009). Aus biologischer Sicht wird durch den epithelialen Umbau die Zellbewegung ermöglicht. Diese erfolgt über eine Kombination aus Zytokinen, die mit proteolytischen Enzymen assoziiert sind und über zahlreiche Signalwege das epitheliale Fundament umbauen (Kalluri & Neilson 2003). Hierfür wird unter anderem das calciumabhängige sowie transmembrane Zell-Zell-Adhäsionsglykoprotein E-Cadherin (CD324), welches eine besondere Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellpolarität sowie für den Zellzusammenhalt spielt (Riethmacher et al. 1995), intrazellulär degradiert (Kalluri & Neilson 2003). Eine Reduktion der E-Cadherin-MFI wurde bei der indirekten Plasmabehandlung der MNT-1-Sphäroidschnitte festgestellt (Abb. 45: B). Die SK-Mel-28-Zelllinie hingegen wies eine signifikante MFI-Steigerung auf (Abb. 45: A). Die MFI des Mesenchym-Markers  $\alpha$ SMA (Kalluri & Weinberg 2009) wies bei den SK-Mel-28-Sphäroidschnitten keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 45: C). Bei den MNT-1-Sphäroidschnitten kam es hingegen zu einer Reduktion der  $\alpha$ SMA-MFI (Abb. 45: D). Dieses gegensätzliche Verhalten der E-Cadherin- und  $\alpha$ SMA-MFI lässt sich nicht grundlegend mit der EMT vereinbaren, wobei es unterschiedliche Formen der EMT gibt (Kalluri & Weinberg 2009; Liu et al. 2008). Eine genaue Untersuchung ist in diesem Fall notwendig. Beispielsweise lässt sich beim entzündlichen Brustkrebs IBC (*Inflammatory breast cancer*) ein hohes E-Cadherin-Level messen. Die verstärkte Expression von E-Cadherin wird selbst während dem Gewinn mesenchymaler und Stammzellcharakteristika beibehalten (Nath & Devi 2016). Dennoch deutet die verstärkte ZEB1-MFI in der SK-Mel-28-Zelllinie auf eine EMT und die sehr geringe Reduktion in der MNT-1-Zelllinie gegen diese hin (Abb. 45: E). ZEB1 (*Zinc Finger E Box-Binding Homeobox 1*) codiert für einen Zink-Finger-Transkriptionsfaktor, welcher T-Lymphozyten-spezifische IL2-Gene herunterreguliert (Williams et al. 1991). Eine Überexpression von ZEB1 induziert in Krebszellen eine EMT über die Repression von E-Cadherin und erleichtert dadurch die Metastasierungsfähigkeit (Liu et al. 2008). Die Repression bzw. Induktion von E-Cadherin konnte bei einem MFI-Anstieg (Abb. 45: E) bzw. Abfall (Abb. 45: F) von ZEB1 nicht gezeigt werden. Genauere Untersuchungen sind notwendig.

Die in Set 6 untersuchten Marker reagieren auf zelluläre Schädigungen. Teilweise werden die ergänzenden Marker aus dem Set 7 vorgezogen und bereits innerhalb dieses Sets mit diskutiert. HSP70 und HSP90 sind jeweils Heat-Shock-Proteine (HSP). Ursprünglich und namensgebend wurden die HSP in hitzebehandelten Zellen der Taufliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Tavaria et al. 1996). HSP binden Polypeptide und unterstützen dabei

die korrekte Faltung, den Transport sowie die Lokalisation reifender Proteine (Tavaria et al. 1996). Das HSP70 wird in malignen Melanomen überexprimiert (Ricaniadis et al. 2001; Shipp et al. 2013). Die Untersuchungen ergaben eine signifikante Induktion des HSP70-MFI nach der direkten Plasmabehandlung sowie der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung der MNT-1-Sphäroidschnitte (Abb. 46: B). Dies lässt sich durch die verstärkte HSP70-Expression durch oxidativen Stress erklären (El Golli-Bennour & Bacha 2011). Innerhalb der SK-Mel-28-Zelllinie ließ sich kein signifikanter HSP70-MFI Unterschied messen (Abb. 46: A). Dennoch ergaben die Versuche mit ganzen Sphäroiden eine signifikante Reduktion des Kontrastes nach einer 89 s direkten Plasmabehandlung (Abb. 49: B). Das HSP90 kommt ubiquitär in den nicht-gestressten Zellen vor und wird bei Stress zusätzlich exprimiert. Die hochgradig konservierten Proteine spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Proteinfaltung sowie der Proteindegradation und interagieren mit weiteren Chaperonen wie dem HSP70 (Wegele et al. 2004). Hierdurch liegen zahlreiche Interaktionen mit intrazellulären Proteinen, wie beispielsweise Steroidrezeptoren, vor (Wegele et al. 2004). Untersuchungen haben gezeigt, dass mutierte Onkoproteine, wie beispielsweise bcr-abl und V600E BRAF, stark mit dem HSP90 interagieren, was die nicht mutierten Proteine nicht in diesem Ausmaß tun. Hieraus ergibt sich ein weiteres Tumortherapiekonzept zur Eindämmung dieser „*gain of function*“-Mutation über die Inhibition von HSP90 (Sawai et al. 2008). Die MFI-Messung des HSP90 ergab bei der MNT-1-Zelllinie eine signifikante Reduktion innerhalb der direkten und indirekten Plasmabehandlung sowie der  $\mu$ sPEF-Behandlung (Abb. 46: F). In der SK-Mel-28-Zelllinie wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen (Abb. 46: E), wobei die Kontrastmessung einen signifikanten Anstieg erkennen ließ (Abb. 53: C). Unter der Annahme, dass die Reduktion des MFI innerhalb der MNT-1-Zellreihe nicht durch ein Fehlen peripherer Bereiche zustande gekommen ist, eröffnet sich hierdurch ein weiteres Untersuchungsfeld mit zusätzlichen Erklärungsansätzen der Wirkung von Plasmabehandlungen. Ferner ist bekannt, dass HSP90 nicht nur mit HSP70, sondern auch mit AKT interagiert. Sato et al. beschreiben diese Interaktion. Die Inhibition der HSP90-AKT-Bindung führt zu einer Dephosphorylierung und dadurch zu einer Inaktivierung von AKT. Der Akt/PKB-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Antwort auf Wachstumsfaktoren und andere extrazelluläre Stimuli, die zahlreiche zelluläre Funktionen wie das Zellwachstum, den Nährstoffmetabolismus, die Apoptose sowie das Zellüberleben regulieren (Song et al. 2005). Bereits die Hochregulierung der Glukoseaufnahme kann onkogene Signalwege wie EGFR,  $\beta$ 1-Integrin, MEK oder Akt aktivieren und dadurch zum Verlust der Zellpolarität sowie einem erhöhten Wachstumsreiz führen (Nath & Davi 2016).



Hierdurch wird die anti-apoptotische Wirkung des Akts verringert und die Zelle reagiert sensitiver auf Apoptose-induzierende Stimuli (Sato et al. 2000). Es könnte vermutet werden, dass die ROS, die durch die Plasmabehandlung in das Zellmedium gelangen, auf diese HSP90-AKT-Interaktion wirken. Innerhalb der MNT-1-Sphäroidschnitte wurde eine signifikante AKT-MFI Reduktion in der indirekten Plasmabehandlungs- sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlungsgruppe (Abb. 47: D) und bei den SK-Mel-28-Sphäroidschnitten nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung gemessen (Abb. 47: C). Des Weiteren wird eine Überexpression von Akt in vielen Krebsformen beobachtet (Yang, Dan et al. 2004). Inwiefern dies auf die beiden untersuchten Zelllinien zutrifft lässt sich nicht klären, da die Kontrolle bereits eine Tumorform darstellt. Womöglich sind die gemessenen MFI-Werte auf ein bereits überexprimiertes Antigen zurückzuführen. Dennoch lässt sich auf Grundlage eines Tumorkontrollbasalwertes eine relative Intensitätsänderung durch die Plasmabehandlung beschreiben. Das Calretikulin (CRT) kommt als kalzium-bindendes Protein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) vor und wirkt als pro-phagozytotisches Signalmolekül auf die Makrophagen. Während der Apoptose wirkt CRT an der Zelloberfläche als pro-phagozytotisches Signal über die Bindung an den Makrophagenrezeptor LRP (*low density lipoprotein-related protein*). Dies führt zur Phagozytose (Chao et al. 2010). Die signifikante Reduktion des CRT-MFI in beiden Zelllinien (Abb. 46: C, D) spricht für eine reduzierte immunologische Antwort. Es ist bekannt, dass die Tumorerkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten entscheidend über den MHC I (*major histocompatibility complex*) erfolgt. Eine Herunterregulierung des MHC Ia und die dadurch fehlerhafte immunologische Kontrolle der Tumorprogression wird in vielen Melanomen beschrieben. Die korrekte Assemblierung des MHC I ist abhängig von einigen Cofaktoren, wie dem Calretikulin oder Calnexin (Dissemond et al. 2004). Womöglich können dadurch ansatzweise die durch Plasma aktivierte Immunantwort mit einer Tumorbekämpfung im Mausmodell erklärt werden (Keidar et al. 2018). Eine zusätzliche Reduktion des CRT (Abb. 46: C, D) würde zu einer Verringerung der MHC I-Produktion und dadurch zu einem erleichterten Immunescape der Tumoren führen (Dissemond et al. 2004). Des Weiteren wird der Immunescape in einigen weiteren Tumoren, wie der Myeloischen Leukämie oder dem Non-Hodgkin-Lymphom, durch eine Überexpression von CD47 erleichtert. Eine Inhibition dieses Faktors könnte zu einer verbesserten pro-phagozytotischen CRT-Wirkung führen (Chao et al. 2010). Dennoch zeigen Untersuchungen mit kaltem Atmosphärendruck Plasma eine Erhöhung der Expression von immunogenen Zelloberflächenmolekülen wie dem MHC I, dem Calretikulin und dem Melanocortinrezeptor 1 (Bekeschus, Rödder et al. 2017).

In Set 7 wurden einige weitere Marker untersucht, mit denen Aussagen zu Signalwegen, wie dem AKT-Signalweg, der bereits bei Set 6 als möglicher Interaktionspartner von HSP90 erwähnt wurde möglich werden, und zu Stoffwechselfvorgängen, die zum einen die Umstellung des Metabolismus betreffen (Warburg-Effekt) oder zum anderen die Autophagievorgänge betreffen. MCT1 katalysiert als Symporter den Transport von Monocarboxylaten wie Laktat, Pyruvat oder Ketonkörper mit einem Proton ( $H^+$ ) über die Plasmamembran aus der Zelle hinaus (Halestrap 2012). Hierdurch fungiert der MCT1 als wichtiger Transporter zur Aufrechterhaltung des Warburg-Effektes – einem Zustand der aeroben Glykolyse innerhalb vieler Tumoren mit einer erhöhten Produktion von freien Protonen und Laktat. Das dadurch entstandene Mikromilieu erhöht die Metastasierungsfähigkeit sowie die Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie. Insgesamt wird durch den MCT1 der hyperglykotische als auch der säureresistente Phänotyp der Tumorzellen begünstigt (Pinheiro et al. 2016). Des Weiteren haben Sonveaux et al. gezeigt, dass eine metabolische Symbiose zwischen oxygenierten und hypoxischen Tumorzellen bestehen könnte. Das produzierte Laktat der hypoxischen Tumorzellen wird aus der Mikroumgebung von oxygenierten Tumorzellen über sogenannte Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1) aufgenommen und zu Pyruvat umgesetzt. Pyruvat kann dabei weiter über die oxidative Phosphorylierung verstoffwechselt werden. Eine pharmakologische Hemmung der MCT1 in oxygenierten Tumorzellen führt zur Verwertung von Glukose anstatt von Laktat. Dadurch kommt es zum Verhungern der hypoxischen Glukose-verwertenden Zellen (Sonveaux et al. 2008; Thoma et al. 2014). Die MFI-Untersuchungen ergaben eine signifikante Reduktion innerhalb der MNT-1-Zelllinie (Abb. 47: B). Daraus lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Ansäuerung des extrazellulären Milieus verringert wird und dadurch die Metastasierungsfähigkeit behindert wird. Innerhalb der SK-Mel-28-Zelllinie wurde hingegen ein signifikanter Anstieg des MCT1-MFI nach der direkten Plasmabehandlung gemessen (Abb. 47: A). Dies deckt sich mit dem signifikanten Anstieg des HIF-1 $\alpha$ -MFI bei der indirekten Plasmabehandlung sowie der tendenziellen Intensitätserhöhung nach der direkten Plasmabehandlung (Abb. 44: E). HIF-1 $\alpha$  wird auch als einer der wichtigsten Antriebe des Warburg-Effektes angenommen (Kroemer & Pouyssegur 2008). Zudem haben Untersuchungen am Mausmodell ergeben, dass Antioxidantien das Metastasierungspotential von Melanomen erhöhen (Le Gal et al. 2015; Bekeschus, Rödder et al. 2017). Es bleibt nicht eindeutig geklärt, ob die Plasmabehandlungen Vorteile oder Nachteile bezüglich des Warburg-Effektes für die Tumorzellen bieten. Einige der letalen phänotypischen Merkmale von Tumoren, wie Invasion und Metastasierung, sind keine direkte

Konsequenz genetischer Veränderungen, sondern Resultat der Entstehung einer einzigartigen physiologischen Umgebung. Daraus ergibt sich, dass die Hypoxie und die saure Umgebung mehr als nur die phänotypischen Charakteristika des Tumorwachstums sind, sondern essentielle Vermittler der Tumorprogression darstellen (Smallbone et al. 2005). Die Untersuchungen zeigen ambivalente Ergebnisse, die eine genauere Betrachtung benötigen. Gegebenenfalls sind diese Effekte Zelllinien-spezifisch bzw. konzentrationsabhängig über die Behandlungszeit und die eingebrachten ROS. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, Modelle wie die Tumorsphäroide zu verwenden, die diese einzigartige Mikroumgebung am besten widerspiegeln. Der menschliche Organismus enthält drei Isoformen des *Light Chain 3*-Autophagiemarkers (LC A, B, C), die als Strukturproteine in der Autophagosomenmembranen vorkommen (Koukourakis et al. 2015). Die Autophagie der Zelle ist ein katabolischer Prozess der lysosomal-vermittelten Degradierung von intrazellulären Substanzen zur Energiegewinnung und zum Überleben. Reguliert wird dieser über ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Signalwege (Tang et al. 2016). Hohe LC3-B-Expressionen werden in vielen soliden Tumoren beobachtet und sind mit Proliferation, Invasion, Metastasierung sowie schlechteren Prognosen assoziiert (Lazova et al. 2012). Untersuchungen haben ergeben, dass die Autophagie bei vielen Tumoren, unter anderem auch bei Melanomen, dereguliert ist und als potentieller prognostischer Marker eingesetzt werden kann (Tang et al. 2016). Die Abbildung 47 ergab für die beiden Zelllinien unterschiedliche Effekte. Bei den SK-Mel-28-Sphäroidschnitten führte die direkte Plasmabehandlung zu einem signifikanten Anstieg des LC 3 A/B-MFI (Abb. 47: E), wohingegen die MNT-1-Sphäroidschnitte eine signifikante Reduktion innerhalb der direkten und indirekten Plasmabehandlung aufwiesen (Abb. 47: F). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung ergab genau entgegengesetzte Messungen (Abb. 47: E, F). Die Autophagie spielt in den Tumoren eine paradoxe Rolle. Zum einen schützt die Autophagie die Zelle vor dem Aufbau toxischer Komponenten und reduziert dadurch genomischen Stress sowie Instabilität. Zum anderen wird durch die Autophagie das Überleben von fortgeschrittenen festen Tumoren wie dem Melanom in einer nährstoffarmen sowie hypoxischen Umgebung gefördert (Tang et al. 2016). Daher wird vermutet, dass eine Autophagie-Inhibition in Tumoren eine neue Krebstherapieform darstellen könnte (Mathew & White 2011; Lazova et al. 2012). Die meisten Tumorthapeutika induzieren die Autophagie über direkte Modulierung von Signalwegen oder indirekt durch zytotoxische Therapien (Mathew & White 2011). Nun lässt sich der reduktive Effekt durch die Plasmabehandlungen der MNT-1-Sphäroide als potenzielle Krebstherapieform erkennen (Abb. 47: E). Gleichwohl bleibt unklar, wie genau

die Plasmabehandlung auf die Signalwege der Autophagie wirkt. Es ist unklar, ob die Zelllinie (vgl. umgekehrte Ergebnisse bei den SK-Mel-28-Sphäroiden Abb. 47: E) oder die Art der Anwendung (vgl. tendenzieller Abfall innerhalb der indirekten Plasmabehandlung sowie signifikante Reduktion nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung bei den SK-Mel-28-Sphäroiden Abb. 47: E) einen entscheidenden Einfluss auf die Signalwege der Autophagie nehmen. Insgesamt spielt die Autophagie eine entscheidende Rolle in der Krebsentstehung sowie der Krebstherapie (Lazova et al. 2012). Genauere Untersuchungen der einzelnen Signalwege sowie Wirkungsweisen sind notwendig.

Trotz des Nachweises der Übertragung der aufgelockerten Peripherie der Sphäroide (Abb. 18) sollte die Datenauswertung am CLS-Gerät kritisch betrachtet werden. Dies liegt daran, dass besonders aufgelockerte Bereiche nicht mehr zusammenhängend vom Programm erkannt werden und daher aus der Berechnung des MFI fallen können. Hierdurch kann es sein, dass bestimmte Antikörper wie beispielsweise der Proliferationsmarker Ki-67 scheinbar signifikant bei der direkten Plasmabehandlung und  $\mu$ sPEF-Behandlung zunehmen. Diese Ergebnisse fallen besonders bei der höchsten Behandlungsmodalität auf (Abb. 38). Hieraus ergibt sich zunächst die Vermutung, dass die Proliferationsrate zunimmt, was der Zunahme der Apoptose (Abb. 38) und den Ergebnissen von weiteren Arbeitsgruppen (Plewa et al. 2014, Köritzer et al. 2013) widerspricht. Daraus wird die Notwendigkeit der Heterogenitätsanalysen ersichtlich. Die einzelnen Sphäroidschnitte müssen nach Bereichen (z. B. Ringförmig) und nicht über die gesamte Fläche untersucht werden. Durch die Zonierung können des Weiteren Rückschlüsse auf die Eindringtiefe sowie die Effektverteilung geschlossen werden. Beispielsweise ergeben sich besondere Intensitätsverstärkungen der TUNEL-Immunfluoreszenz in der beschriebenen aufgelockerten Peripherie und dem nekrotischen Kern (Abb. 39). Solche Heterogenitätsanalysen können unter dem Einsatz von primär gelabelten Antikörpern bereits anhand ganzer Sphäroide untersucht werden (vgl. Kapitel 3.4.4). Hierfür ist es möglich, die Kontrastunterschiede zwischen dem Sphäroid und dem Hintergrund der einzelnen Zellen des Sphäroids als Einzelevents zu analysieren. Der Einsatz des MFI, wie bei den geschnittenen Sphäroiden, kann aufgrund potentieller Antikörperreste im umgebenden Medium zu Verfälschungen der Ergebnisse führen. Dies liegt vor allem daran, dass die behandelten Sphäroide instabil werden und das häufige Waschen mit PBS zu enormen Verlusten und Deformationen führt (vgl. Abschnitt 3.4.4). Gleichwohl können – durch den Einsatz verschiedener Fokusebenen am CLS-Gerät – mehrere Schichtaufnahmen auf unterschiedlichen Höhen des Sphäroids aufgenommen werden und dadurch erste Verteilungsmuster sowie behandlungsbedingte Umverteilungen schneller analysiert werden

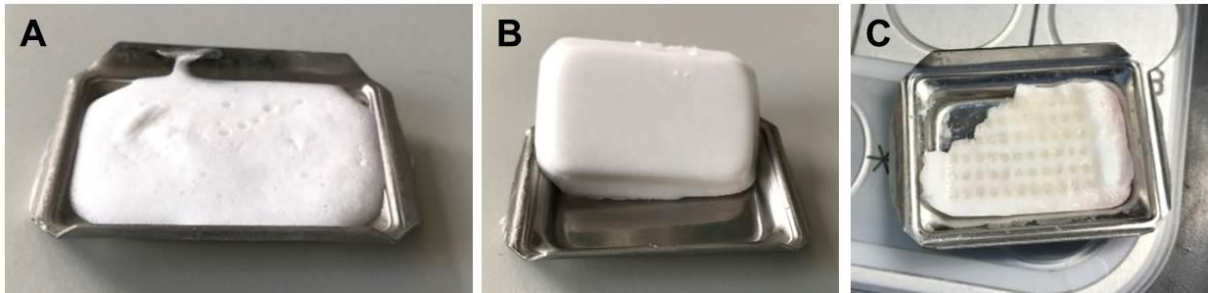
(Abb. 49-53). Dadurch ergibt sich ein genaueres dreidimensionales Gesamtbild des Sphäroids und der verschiedenen Verteilungsgradienten. Hierdurch lassen sich auch Rückschlüsse auf die Eindringtiefe der ROS schließen. PI, welches nur durch perforierte Zellmembranen hindurchdiffundiert, lässt sich als prognostischer Marker der Zellmembranintegritätsauflösung und dadurch indirekt als Marker der Eindringtiefe einsetzen. Weitere Versuche in einer 2D-Zellkultur wären notwendig, um die genauen Intensitätsdauern auf Einzelzellenebene herauszufinden. Dadurch ließe sich eine Korrelation von Intensitätsdauer zu Zellmembranintegritätsauflösung und im weiteren Schritt eine Abschätzung der Plasmabehandlungszeit auf die Eindringtiefe abschätzen. Beispielsweise würde durch eine 89 s Plasmabehandlung tiefere Strukturen des Sphäroids erreicht werden als durch eine 19 s Plasmabehandlung. Des Weiteren sollte der Unterschied der direkten zur indirekten Plasmabehandlung näher untersucht werden. Beispielsweise kann die Morphologie und Verteilung an Licht- sowie Immunfluoreszenzbildern untersucht werden (vgl. Kapitel 3.3.3). Abschließend sollte die Wahl der zu untersuchenden Zelllinie bedacht werden. Innerhalb dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Melanomzelllinien betrachtet, die deutliche Unterschiede im Melaningehalt aufwiesen. Die helleren SK-Mel-28-Zellen haben innerhalb der Immunfluoreszenzaufnahmen den Vorteil, dass das Melanin deutlich weniger zur Fluoreszenzauslöschung führt (Quenching), wie es bei den dunkleren MNT-1-Zellen der Fall ist. Hierdurch verändert sich die Sensitivität der Aufnahmen und muss bei der Auswertung bedacht werden. Die dunkleren MNT-1-Zellen hatten jedoch den Vorteil, dass die Sphäroideinbettung in das Agarosegel leichter fällt. Die dunkleren Sphäroide sind leichter zu erkennen und insbesondere zu Beginn besser zu handhaben (siehe Kapitel 3.2).

#### **4.6 Potential und Fehlerquellen des Sphäroid-Microarrays und Ausblick**

Innerhalb dieser Arbeit wurde die publizierte Methode der Sphäroid-Microarrays von Ivanov und Grabowska in einer leicht veränderten Form verwendet (Ivanov & Grabowska 2017). Durch dieses neue Verfahren ist es möglich, 60 Sphäroide gleichzeitig auf einem Objektträger zu färben und halbautomatisch auszuwerten. Für das Einbetten von gestanztem ganzem Gewebe in Paraffin liegen zahlreiche, schrittweise stets einfacher werdende und weiterentwickelte Verfahren vor (Battifora 1986; Miller & Groothuis 1991; Kononen et al. 1997; Yan et al. 2007). Ivanov und Grabowska postulieren, dass – im Vergleich zu den vorherigen Verfahren der Sphäroideinbettung – mehrere verschiedene Behandlungsformen

oder unterschiedliche Zelllinien nicht mehr separat voneinander eingebettet und geschnitten werden müssen (Ivanov & Grabowska 2017). Dadurch sinken die Zahl der notwendigen Schnitte sowie der Verbrauch von teuren Antikörpern um ein Vielfaches (Ivanov & Grabowska 2017). Des Weiteren ist das herkömmliche Verfahren extrem zeitaufwendig und ermöglicht kein Hochdurchsatz-Screening. Gleichwohl erfordert das neue Verfahren eine gewisse Einarbeitungsphase, um den sicheren Umgang mit den Sphäroiden sowie das verlustfreie und schnelle Einbetten in Agarose zu beherrschen. Besondere Fehlerquellen innerhalb des Einbettungsprozesses sind das Überführen der Sphäroide in die Mulden sowie das Erreichen einer optimalen horizontalen Einbettung aller 60 Sphäroide in einer Ebene. Des Weiteren ist die Paraffineinbettung, falls diese nicht automatisch über Nacht in einer Histokinette erfolgt, sehr zeitaufwendig und fehleranfällig. Wie in Kapitel „3.2.3 Fehlerquellen bei der Paraffineinbettung“ gezeigt, kommt es – bei einer zu geringen Dehydrierung mit Alkohol oder Entfettung mit Xylol – zu einer mangelhaften Paraffinfiltrierung der Probe. Hierdurch lässt sich die Probe, aufgrund der weichen Konsistenz, nicht schneiden und bricht aus der Paraffineinbettung heraus (Abb. 15). Des Weiteren ist die exakte Paraffintemperatur kritisch für die Größe und Konsistenz der Proben. Ein zu langes oder zu heißes Paraffinbad führte zur Schrumpfung, Verformung und Erhärtung der Probe (Abb. 16). Die Verwendung eines Vakuums ist von Vorteil, um alle störenden Luftblasen aus der histologischen Kassette zu entfernen. Die abschließende Einbettung benötigt ebenfalls etwas Übung und Erfahrung. Die paraffinisierten Agaroseblöcke müssen exakt waagrecht eingebettet werden, um die Schnittebene und dadurch die Anzahl der Sphäroide pro Schnitt nicht zu reduzieren. Um weitere Verluste innerhalb des Paraffinschneidens zu vermeiden, sollten die 4 µm dicken Präparate schnell und sicher auf den Objektträger überführt werden. Ein zu langes Positionieren, insbesondere im warmen Wasserbad, führt zu einem weiteren Verlust der Sphäroide. Dies liegt daran, dass ein gewisser Spielraum der Sphäroide in den Mulden besteht und dadurch der Zusammenhalt gestört ist. Ebenfalls schrumpfen die Sphäroide durch die Paraffinbehandlung ein wenig, sodass zusätzlicher Spielraum entsteht.

Insgesamt lassen sich durch dieses Verfahren Zeit und Kosten sparen. Des Weiteren können durch den Einsatz der multiplexen Immunfluoreszenz viele Signalwege gleichzeitig untersucht und ausgewertet werden. Durch die Immunfluoreszenzaufnahmen können zudem die Interaktionen sowie Verteilungen besser analysiert und bewertet werden. Darauf sollte in künftigen Durchführungen ein besonderes Augenmerk gelegt werden, um die Validität der Ergebnisse und dadurch die Aussagekraft zu erhöhen.



**Abbildung 54:** Präparation von Kryoschnitten. Hergestellt wurde die Agarose-OCT-Lösung (5 % Agarose in OCT w/v) nach dem Patent von Ton-That et al. 2003. Das Cryoprotective-Medium wurde aus Zellmedium mit 10 % DMSO-Zusatz hergestellt. **A:** Darstellung einer befüllten Ausgießform mit heruntergekühlter Agarose-OCT-Lösung. **B:** Entnahme der Agarose-OCT-Lösung aus der Ausgießform. Die Formstabilität bleibt erhalten, wenn die Mischung kalt bleibt. **C:** Darstellung der Brüchigkeit der Agarose-OCT-Lösung nach der Herstellung von Mulden mit einem Mold-Maker aus Metall und der Befüllung der Mulden mit Cryoprotectiven-Medium. Ein geringfügiger Temperaturanstieg führt zur Konsistenzänderung und zum Abbrechen des Microarrays.

In zukünftigen Arbeiten wäre die Ausweitung dieser Methode auf Kryoschnitte denkbar und wünschenswert. Dies liegt zum einen daran, dass Kryoschnitte gegenüber Paraffinschnitten eine bessere Erhaltung der Antigenität aufweisen und dadurch die Detektion von Antigenen am Mikroskop erleichtern. Zum anderen werden viele Schritte wie die Dehydrierung nicht benötigt und insgesamt die gesamte Prozessdauer verkürzt (Fischer et al. 2008). Ansatzweise wurde die Herstellung von patentierten Multiarrays versucht (Ton-That et al. 2010). Es sind jedoch noch weitere Etablierungsarbeiten für eine vergleichbare Einbettung von Sphäroiden nötig. Dies liegt daran, dass die Herstellung der speziellen Mixtur und die Durchführung der exakten Abkühlung noch nicht optimal funktioniert haben. Zudem brechen die Microarrays leicht, sobald die Temperatur nur geringfügig ansteigt (Abb. 54: C).

## 5. Zusammenfassung

Die Therapie des Melanoms sowie die Erforschung neuer Behandlungsmöglichkeiten stehen im Fokus zahlreicher Forschungsgruppen. Um der Komplexität dieser Erkrankung gerecht zu werden, müssen möglichst genaue Modelle gefunden werden. Tumor-Sphäroide als dreidimensionale Tumorzellkulturen schließen dabei teilweise die Lücke zwischen den herkömmlichen zweidimensionalen Zellmonolayern und den Tiermodellen. Hierdurch lassen sich die zelluläre Heterogenität, die Nährstoffverteilung, der Sauerstoffgradient, die Zell-Zell-Interaktionen sowie die Genexpression genauer abbilden und dadurch untersuchen. Arbeiten von Vinci sowie Howes et al. haben gezeigt, dass adäquate In-vitro-Bedingungen notwendig sind, um die Wirkungen von Medikamenten nicht zu über- beziehungsweise unterschätzen (Vinci et al. 2012, Howes et al. 2007). Ziel dieser Arbeit war, ein Verfahren zu etablieren, welches Sphäroide in einen tissue microarray zur Testung von potenziellen neuen Therapeutika zur Verfügung stellt, wobei in dieser Arbeit die Anwendung von kaltem Atmosphärendruckplasma und gepulsten elektrischen Feldern im Mittelpunkt des Interesses stand. Diese Methode von Ivanov und Grabowska (Ivanov & Grabowska 2017) wurde dazu in leicht modifizierter Form angewandt. Verwendet wurden zwei Melanomzelllinien (SK-Mel-28 MNT-1), für die zunächst optimale Wachstumsparameter festgelegt werden mussten, um stets vergleichbare und reproduzierbare Sphäroide mit einer Größe von 300-500  $\mu\text{m}$  zu erhalten. Das etablierte Verfahren ist zeitsparender und ermöglicht eine automatische Bildaufnahme im Hochdurchsatz (*high throughput screening*) von bis zu 60 Sphäroiden pro Präparat. Die Immunfluoreszenzfärbung stellt aufgrund ihrer hohen Sensitivität und der dadurch möglichen Verkleinerung der Proben eine der wichtigsten Detektionsmethoden der Zukunft dar (Hertzberg et al. 2000). Es wurden parallel vier verschiedene Farbstoffe (DAPI, AlexaFluor 488, Alexafluor 594, AlexaFluor 647) mit zu testenden Targets markiert und mittels des CLS-Gerätes aufgenommen sowie quantitativ ausgewertet. Exemplarisch wurden 21 Fluorophore, innerhalb von sieben thematischen Sets und vier verschiedenen Behandlungsformen (direkte, indirekte Plasmabehandlung,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung,  $\mu\text{sPEF}$ -Behandlung) betrachtet. Hierdurch wurden unterschiedliche Plasma-induzierende Effekte auf die Zellmorphologie sowie ansatzweise auf die Verteilung innerhalb der Sphäroide untersucht. Bereits lichtmikroskopisch ließen sich eine Auflockerung der Peripherie sowie eine Verdichtung der zentralen Regionen der Sphäroide nach einer direkten Plasmabehandlung beobachten. Mittels der Immunfluoreszenz wurden sowohl bekannte Plasmaeffekte, wie die Apoptoseinduktion plasmabehandelter SK-Mel-28-Sphäroide mit hohen Plasmabehandlungsintensitäten, als auch verschiedene Signalwege, wie die



antioxidative Zellantwort, beobachtet. Teilweise wurden kontroverse Ergebnisse gemessen, die die Notwendigkeit der Heterogenitätsanalyse innerhalb der Sphäroidschnitte aufzeigen. Beispielsweise weist die aufgelockerte Peripherie eine besonders hohe Apoptoserate auf, die mittels der TUNEL-IF-Färbung detektiert wurde (Abb. 38; Abb. 39). Zu der gesteigerten Apoptoserate lässt sich eine verstärkte Expression von HMOX1 bei den SK-Mel-28-Sphäroiden nach einer direkten sowie indirekten Plasmabehandlung nachweisen (Abb. 44). Hierraus lassen sich grundsätzliche Plasmaeffekte ableiten, wie die Einbringung von ROS und RNS. Zudem konnte die Größenreduktion der Sphäroiddurchmesser mittels  $\mu$ sPEF-Behandlung sowohl lichtmikroskopisch (Abb. 33) als auch am CLS-Gerät über die Gesamtfläche (Abb. 37) gezeigt werden. Diese Ergebnisse entsprechen denen von Nuccitelli et al. am Mausmodell (Nuccitelli et al. 2006, Nuccitelli et al. 2009). Des Weiteren wurden alternative Methoden angewandt, durch die die Antikörperverteilungen in ganzen Sphäroiden untersucht werden könnte (vgl. Kapitel 3.4.4).

Insgesamt liefert diese Methode, aufgrund der schnelleren sowie kostengünstigeren Durchführbarkeit und der potenziellen Automatisierung am CLS-Gerät, ein ausgesprochen mächtiges Verfahren zur Erforschung neuer Krebstherapien im Labor.

## 6. Literaturverzeichnis

„**Plasma**“, in: Wolfgang Pfeifer et al., Etymologisches Wörterbuch des Deutschen (1993), digitalisierte und von Wolfgang Pfeifer überarbeitete Version im Digitalen Wörterbuch der deutschen Sprache, <<https://www.dwds.de/wb/Plasma>>, abgerufen am 19.05.2018.

**Arndt**, Stephanie; Schmidt, Anke; Karrer, Sigrid; Woedtke, Thomas von (2018): Comparing two different plasma devices kINPen and Adtec SteriPlas regarding their molecular and cellular effects on wound healing. In: *Clinical Plasma Medicine* 9, S. 24–33. DOI: 10.1016/j.cpme.2018.01.002.

**Bacolla**, Albino; Cooper, David N.; Vasquez, Karen M. (2014): Mechanisms of base substitution mutagenesis in cancer genomes. In: *Genes* 5 (1), S. 108–146. DOI: 10.3390/genes5010108.

**Barbi de Moura**, Michelle; Vincent, Garret; Fayewicz, Shelley L.; Bateman, Nicholas W.; Hood, Brian L.; Sun, Mai et al. (2012): Mitochondrial respiration--an important therapeutic target in melanoma. In: *PloS one* 7 (8), e40690. DOI: 10.1371/journal.pone.0040690.

**Battifora**, H. (1986): The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 55 (2), S. 244–248.

**Battino**, Maurizio; Giampieri, Francesca; Pistollato, Francesca; Sureda, Antoni; Oliveira, Marcos Roberto de; Pittalà, Valeria et al. (2018): Nrf2 as regulator of innate immunity: A molecular Swiss army knife! In: *Biotechnology advances* 36 (2), S. 358–370. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.012.

**Bauer**, Daniel; Werth, Felix; Nguyen, Ha An; Kiecker, Felix; Eberle, Jürgen (2017): Critical role of reactive oxygen species (ROS) for synergistic enhancement of apoptosis by vemurafenib and the potassium channel inhibitor TRAM-34 in melanoma cells. In: *Cell death & disease* 8 (2), e2594. DOI: 10.1038/cddis.2017.6.

**Beebe**, S. J.; Fox, P. M.; Rec, L. J.; Somers, K.; Stark, R. H.; Schoenbach, K. H. (2002): Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition. In: *IEEE Trans. Plasma Sci.* 30 (1), S. 286–292. DOI: 10.1109/TPS.2002.1003872.

- Bekeschus**, Sander; Rödder, Katrin; Fregin, Bob; Otto, Oliver; Lippert, Maxi; Weltmann, Klaus-Dieter et al. (2017): Toxicity and Immunogenicity in Murine Melanoma following Exposure to Physical Plasma-Derived Oxidants. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, S. 4396467. DOI: 10.1155/2017/4396467.
- Bekeschus**, Sander; Schmidt, Anke; Weltmann, Klaus-Dieter; Woedtke, Thomas von (2016): The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing. In: *Clinical Plasma Medicine* 4 (1), S. 19–28. DOI: 10.1016/j.cpme.2016.01.001.
- Böhme**, Ines; Bosserhoff, Anja Katrin (2016): Acidic tumor microenvironment in human melanoma. In: *Pigment cell & melanoma research* 29 (5), S. 508–523. DOI: 10.1111/pcmr.12495.
- Bray**, Freddie; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Siegel, Rebecca L.; Torre, Lindsey A.; Jemal, Ahmedin (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), S. 394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- Brożyna**, Anna A.; Józwicki, Wojciech; Roszkowski, Krzysztof; Filipiak, Jan; Slominski, Andrzej T. (2016): Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy. In: *Oncotarget* 7 (14), S. 17844–17853. DOI: 10.18632/oncotarget.7528.
- Bruggeman**, P. J.; Kushner, M. J.; Locke, B. R.; Gardeniers, J. G. E.; Graham, W. G.; Graves, D. B. et al. (2016): Plasma–liquid interactions: a review and roadmap. In: *Plasma Sources Sci. Technol.* 25 (5), S. 53002. DOI: 10.1088/0963-0252/25/5/053002.
- Cairns**, Rob A.; Harris, Isaac S.; Mak, Tak W. (2011): Regulation of cancer cell metabolism. In: *Nature reviews. Cancer* 11 (2), S. 85–95. DOI: 10.1038/nrc2981.
- Chao**, Mark P.; Jaiswal, Siddhartha; Weissman-Tsukamoto, Rachel; Alizadeh, Ash A.; Gentles, Andrew J.; Volkmer, Jens et al. (2010): Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. In: *Science translational medicine* 2 (63), 63ra94. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001375.
- Chelikani**, P.; Fita, I.; Loewen, P. C. (2004): Diversity of structures and properties among catalases. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61 (2), S. 192–208. DOI: 10.1007/s00018-003-3206-5.
- Crookes**, W. (1879): On radiant matter; a lecture delivered to the British Association for the Advancement of Science, at Sheffield, Friday, August 22, 1879. In: *American Journal of Science* s3-18 (106), S. 241–262. DOI: 10.2475/ajs.s3-18.106.241.

- Das Thakur**, Meghna; Stuart, Darrin D. (2013): The evolution of melanoma resistance reveals therapeutic opportunities. In: *Cancer research* 73 (20), S. 6106–6110. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1633.
- Dissemond**, Joachim; Busch, Michael; Kothen, Thomas; Mörs, Janet; Weimann, Tatjana K.; Lindeke, Anette et al. (2004): Differential downregulation of endoplasmic reticulum-residing chaperones calnexin and calreticulin in human metastatic melanoma. In: *Cancer Letters* 203 (2), S. 225–231. DOI: 10.1016/j.canlet.2003.09.036.
- Dynek**, Jasmin N.; Chan, Sara M.; Liu, Jinfeng; Zha, Jiping; Fairbrother, Wayne J.; Vucic, Domagoj (2008): Microphthalmia-associated transcription factor is a critical transcriptional regulator of melanoma inhibitor of apoptosis in melanomas. In: *Cancer research* 68 (9), S. 3124–3132. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6622.
- Ebert**, Benjamin L.; Firth, John D.; Ratcliffe, Peter J. (1995): Hypoxia and Mitochondrial Inhibitors Regulate Expression of Glucose Transporter-1 via Distinct Cis-acting Sequences. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (49), S. 29083–29089. DOI: 10.1074/jbc.270.49.29083.
- El Golli-Bennour**, Emna; Bacha, Hassen (2011): Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: mycotoxins' exploration. In: *Toxicology* 287 (1-3), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.tox.2011.06.002.
- Elmore**, Susan (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicologic pathology* 35 (4), S. 495–516. DOI: 10.1080/01926230701320337.
- Estrella**, Veronica; Chen, Tingan; Lloyd, Mark; Wojtkowiak, Jonathan; Cornnell, Heather H.; Ibrahim-Hashim, Arig et al. (2013): Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. In: *Cancer research* 73 (5), S. 1524–1535. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2796.
- Fischer**, Andrew H.; Jacobson, Kenneth A.; Rose, Jack; Zeller, Rolf (2008): Cryosectioning tissues. In: *CSH protocols* 2008, pdb.prot4991. DOI: 10.1101/pdb.prot4991.
- Fuchs**, Bryan C.; Bode, Barrie P. (2005): Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? In: *Seminars in cancer biology* 15 (4), S. 254–266. DOI: 10.1016/j.semcancer.2005.04.005.
- Gothelf**, Anita; Mir, Lluís M.; Gehl, Julie (2003): Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. In: *Cancer Treatment Reviews* 29 (5), S. 371–387. DOI: 10.1016/S0305-7372(03)00073-2.

- Graves**, David B. (2012): The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 45 (26), S. 263001. DOI: 10.1088/0022-3727/45/26/263001.
- Halestrap**, Andrew P. (2012): The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. In: *IUBMB life* 64 (1), S. 1–9. DOI: 10.1002/iub.573.
- Helmlinger**, Gabriel; Sckell, Axel; Dellian, Marc; Forbes, Neil S.; Jain, Rakesh K. (2002): Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8 (4), S. 1284–1291.
- Hertzberg**, Robert P.; Pope, Andrew J. (2000): High-throughput screening: new technology for the 21st century. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 4 (4), S. 445–451. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00110-1.
- Hirschhaeuser**, Franziska; Menne, Heike; Dittfeld, Claudia; West, Jonathan; Mueller-Klieser, Wolfgang; Kunz-Schughart, Leoni A. (2010): Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. In: *Journal of Biotechnology* 148 (1), S. 3–15. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
- Hirst**, Adam M.; Frame, Fiona M.; Arya, Mani; Maitland, Norman J.; O’Connell, Deborah (2016): Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future. In: *Tumor Biol.* 37 (6), S. 7021–7031. DOI: 10.1007/s13277-016-4911-7.
- Holowiecki**, Andrew; O’Shields, Britton; Jenny, Matthew J. (2016): Characterization of heme oxygenase and biliverdin reductase gene expression in zebrafish (*Danio rerio*): Basal expression and response to pro-oxidant exposures. In: *Toxicology and applied pharmacology* 311, S. 74–87. DOI: 10.1016/j.taap.2016.09.022.
- Hölzel**, Michael; Bovier, Anton; Tüting, Thomas (2013): Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? In: *Nature reviews. Cancer* 13 (5), S. 365–376. DOI: 10.1038/nrc3498.
- Huppke**, Peter; Weissbach, Susann; Church, Joseph A.; Schnur, Rhonda; Krusen, Martina; Dreha-Kulaczewski, Steffi et al. (2017): Activating de novo mutations in NFE2L2 encoding NRF2 cause a multisystem disorder. In: *Nature communications* 8 (1), S. 818. DOI: 10.1038/s41467-017-00932-7.

- Inc**, PerkinElmer: 012495C\_02 BRO Operetta CLS, <[https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO\\_Operetta\\_CLS\\_FINAL.pdf](https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_Operetta_CLS_FINAL.pdf)>, abgerufen am 19.12.2018.
- Ivanov**, Delyan P.; Grabowska, Anna M. (2017): Spheroid arrays for high-throughput single-cell analysis of spatial patterns and biomarker expression in 3D. In: *Scientific reports* 7, S. 41160. DOI: 10.1038/srep41160.
- JEYAMKONDAN**, S.; JAYAS, D. S.; HOLLEY, R. A. (1999): Pulsed Electric Field Processing of Foods: A Review. In: *Journal of Food Protection* 62 (9), S. 1088–1096. DOI: 10.4315/0362-028X-62.9.1088.
- Joshi**, R. P.; Schoenbach, K. H. (2010): Bioelectric effects of intense ultrashort pulses. In: *Critical reviews in biomedical engineering* 38 (3), S. 255–304.
- Jozkowicz**, Alicja; Was, Halina; Dulak, Jozef (2007): Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? In: *Antioxidants & redox signaling* 9 (12), S. 2099–2117. DOI: 10.1089/ars.2007.1659.
- Kajiyama**, Hiroaki; Utsumi, Fumi; Nakamura, Kae; Tanaka, Hiromasa; Toyokuni, Shinya; Hori, Masaru; Kikkawa, Fumitaka (2017): Future perspective of strategic non-thermal plasma therapy for cancer treatment. In: *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 60 (1), S. 33–38. DOI: 10.3164/jcbrn.16-65.
- Kallinowski**, F.; Runkel, S.; Fortmeyer, H. P.; Frster, H.; Vaupel, P. (1987): l-glutamine: a major substrate for tumor cells in vivo? In: *J Cancer Res Clin Oncol* 113 (3), S. 209–215. DOI: 10.1007/BF00396375.
- Kalluri**, Raghu; Neilson, Eric G. (2003): Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. In: *J. Clin. Invest.* 112 (12), S. 1776–1784. DOI: 10.1172/JCI20530.
- Kalluri**, Raghu; Weinberg, Robert A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. In: *The Journal of clinical investigation* 119 (6), S. 1420–1428. DOI: 10.1172/JCI39104.
- Karrer**, S.; Arndt, S. (2015): Plasmamedizin in der Dermatologie : Wirkmechanismen und Anwendungsmöglichkeiten. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 66 (11), S. 819–828. DOI: 10.1007/s00105-015-3686-x.
- Kato**, Yasumasa; Ozawa, Shigeyuki; Miyamoto, Chihiro; Maehata, Yojiro; Suzuki, Atsuko; Maeda, Toyonobu; Baba, Yuh (2013): Acidic extracellular microenvironment and cancer. In: *Cancer cell international* 13 (1), S. 89. DOI: 10.1186/1475-2867-13-89.

- Keidar**, Michael; Yan, Dayun; Beilis, Isak I.; Trink, Barry; Sherman, Jonathan H. (2018): Plasmas for Treating Cancer: Opportunities for Adaptive and Self-Adaptive Approaches. In: *Trends in biotechnology* 36 (6), S. 586–593. DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.06.013.
- Kim**, Sun Ja; Chung, T. H. (2016): Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. In: *Scientific reports* 6, S. 20332. DOI: 10.1038/srep20332.
- Kononen**, J.; Bubendorf, L.; Kallioniemi, A.; Bärnlund, M.; Schraml, P.; Leighton, S. et al. (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. In: *Nature medicine* 4 (7), S. 844–847.
- Köritzer**, Julia; Boxhammer, Veronika; Schäfer, Andrea; Shimizu, Tetsuji; Klämpfl, Tobias G.; Li, Yang-Fang et al. (2013): Restoration of sensitivity in chemo-resistant glioma cells by cold atmospheric plasma. In: *PloS one* 8 (5), e64498. DOI: 10.1371/journal.pone.0064498.
- Koukourakis**, Michael I.; Kalamida, Dimitra; Giatromanolaki, Alexandra; Zois, Christos E.; Sivridis, Efthimios; Pouliliou, Stamatia et al. (2015): Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. In: *PloS one* 10 (9), e0137675. DOI: 10.1371/journal.pone.0137675.
- Kroemer**, Guido; Pouyssegur, Jacques (2008): Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. In: *Cancer cell* 13 (6), S. 472–482. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.05.005.
- Kuphal**, Silke; Winklmeier, Andreas; Warnecke, Christina; Bosserhoff, Anja-Katrin (2010): Constitutive HIF-1 activity in malignant melanoma. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 46 (6), S. 1159–1169. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.01.031.
- Langmuir**, I. (1928): Oscillations in Ionized Gases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 14 (8), S. 627–637. DOI: 10.1073/pnas.14.8.627.
- Lazova**, Rossitza; Camp, Robert L.; Klump, Vincent; Siddiqui, Summar F.; Amaravadi, Ravi K.; Pawelek, John M. (2012): Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (2), S. 370–379. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1282.
- Le Gal**, Kristell; Ibrahim, Mohamed X.; Wiel, Clotilde; Sayin, Volkan I.; Akula, Murali K.; Karlsson, Christin et al. (2015): Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. In: *Science translational medicine* 7 (308), 308re8. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad3740.

- Leung**, Brendan M.; Leshner-Perez, Sasha Cai; Matsuoka, Toshiki; Moraes, Christopher; Takayama, Shuichi (2015): Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. In: *Biomaterials science* 3 (2), S. 336–344. DOI: 10.1039/c4bm00319e.
- Li**, Xinyuan; Fang, Pu; Mai, Jietang; Choi, Eric T.; Wang, Hong; Yang, Xiao-feng (2013): Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. In: *Journal of hematology & oncology* 6, S. 19. DOI: 10.1186/1756-8722-6-19.
- Li**, Xinyuan; Fang, Pu; Mai, Jietang; Choi, Eric T.; Wang, Hong; Yang, Xiao-feng (2013): Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. In: *Journal of hematology & oncology* 6, S. 19. DOI: 10.1186/1756-8722-6-19.
- Liberti**, Maria V.; Locasale, Jason W. (2016): The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? In: *Trends in Biochemical Sciences* 41 (3), S. 211–218. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.
- Liu**, Yongqing; El-Naggar, Shahenda; Darling, Douglas S.; Higashi, Yujiro; Dean, Douglas C. (2008): Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. In: *Development (Cambridge, England)* 135 (3), S. 579–588. DOI: 10.1242/dev.007047.
- Lubos**, Edith; Loscalzo, Joseph; Handy, Diane E. (2011): Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. In: *Antioxidants & redox signaling* 15 (7), S. 1957–1997. DOI: 10.1089/ars.2010.3586.
- Ma**, Yonghao; Ha, Chang Seung; Hwang, Seok Won; Lee, Hae June; Kim, Gyoo Cheon; Lee, Kyo-Won; Song, Kiwon (2014): Non-thermal atmospheric pressure plasma preferentially induces apoptosis in p53-mutated cancer cells by activating ROS stress-response pathways. In: *PloS one* 9 (4), e91947. DOI: 10.1371/journal.pone.0091947.
- Mali**, B.; Jarm, T.; Snoj, M.; Sersa, G.; Miklavcic, D. (2013): Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: A systematic review and meta-analysis. In: *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 39 (1), S. 4–16. DOI: 10.1016/j.ejso.2012.08.016.
- Mann**, Miriam Stella; Tiede, Regina; Gavenis, Karsten; Daeschlein, Georg; Bussiahn, Rene; Weltmann, Klaus-Dieter et al. (2016): Introduction to DIN-specification 91315 based on the characterization of the plasma jet kINPen® MED. In: *Clinical Plasma Medicine* 4 (2), S. 35–45. DOI: 10.1016/j.cpme.2016.06.001.



- Mathew**, Robin; White, Eileen (2011): Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. In: *Current opinion in genetics & development* 21 (1), S. 113–119. DOI: 10.1016/j.gde.2010.12.008.
- Mazumder S.**, Plesca D., Almasan A. (2008) Caspase-3 Activation is a Critical Determinant of Genotoxic Stress-Induced Apoptosis. In: Mor G., Alvero A.B. (eds) Apoptosis and Cancer. *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>, vol 414. Humana Press.
- Mazurek**, Sybille; Drexler, Hannes C. A.; Troppmair, Jakob; Eigenbrodt, Erich; Rapp, Ulf R. (2007): Regulation of pyruvate kinase type M2 by A-Raf: a possible glycolytic stop or go mechanism. In: *Anticancer research* 27 (6B), S. 3963–3971.
- Miller**, R. T.; Groothuis, C. L. (1991): Multitumor "sausage" blocks in immunohistochemistry. Simplified method of preparation, practical uses, and roles in quality assurance. In: *American journal of clinical pathology* 96 (2), S. 228–232.
- Moscona**, A.; Moscona, H. (1952): The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. In: *Journal of Anatomy* 86 (Pt 3), S. 287–301.
- Mott-Smith**, H. M. (1971): History of "plasmas". In: *Nature* 233 (5316), S. 219. DOI: 10.1038/233219a0.
- Nath**, Sritama; Devi, Gayathri R. (2016): Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. In: *Pharmacology & Therapeutics* 163, S. 94–108. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.
- Nazarian**, Ramin; Shi, Hubing; Wang, Qi; Kong, Xiangju; Koya, Richard C.; Lee, Hane et al. (2010): Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. In: *Nature* 468 (7326), S. 973–977. DOI: 10.1038/nature09626.
- Neumann**, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P. H. (1982): Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. In: *The EMBO Journal* 1 (7), S. 841–845.
- Neumann**, Eberhard; Rosenheck, Kurt (1972): Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. In: *J. Membranes Biol.* 10 (1), S. 279–290. DOI: 10.1007/BF01867861.
- Nuccitelli**, Richard; Chen, Xinhua; Pakhomov, Andrei G.; Baldwin, Wallace H.; Sheikh, Saleh; Pomictier, Jennifer L. et al. (2009): A new pulsed electric field therapy for melanoma

disrupts the tumor's blood supply and causes complete remission without recurrence. In: *Int. J. Cancer* 125 (2), S. 438–445. DOI: 10.1002/ijc.24345.

**Nuccitelli**, Richard; Pliquett, Uwe; Chen, Xinhua; Ford, Wentia; James Swanson, R.; Beebe, Stephen J. et al. (2006): Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343 (2), S. 351–360. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.02.181.

**Pasqual-Melo**, Gabriella; Gandhirajan, Rajesh Kumar; Stoffels, Ingo; Bekeschus, Sander (2018): Targeting malignant melanoma with physical plasmas. In: *Clinical Plasma Medicine* 10, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.cpme.2018.03.001.

**Pinheiro**, Céline; Miranda-Gonçalves, Vera; Longatto-Filho, Adhemar; Vicente, Anna L. S. A.; Berardinelli, Gustavo N.; Scapulatempo-Neto, Cristovam et al. (2016): The metabolic microenvironment of melanomas: Prognostic value of MCT1 and MCT4. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 15 (11), S. 1462–1470. DOI: 10.1080/15384101.2016.1175258.

**Plewa**, Joseph-Marie; Yousfi, Mohammed; Frongia, Céline; Eichwald, Olivier; Ducommun, Bernard; Merbahi, Nofel; Lobjois, Valérie (2014): Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multi-cellular tumor spheroids. In: *New J. Phys.* 16 (4), S. 43027. DOI: 10.1088/1367-2630/16/4/043027.

**Potter**, Huntington; Heller, Richard (2003): Transfection by Electroporation. In: *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* CHAPTER, Unit-9.3. DOI: 10.1002/0471142727.mb0903s62.

**Prasad**, Sahdeo; Gupta, Subash C.; Tyagi, Amit K. (2017): Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. In: *Cancer Letters* 387, S. 95–105. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.042.

**Reuter**, Simone; Gupta, Subash C.; Chaturvedi, Madan M.; Aggarwal, Bharat B. (2010): Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? In: *Free radical biology & medicine* 49 (11), S. 1603–1616. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

**Reuter**, Stephan; Sousa, Joao Santos; Stancu, Gabi Daniel; van Hubertus Helden, Jean-Pierre (2015): Review on VUV to MIR absorption spectroscopy of atmospheric pressure plasma jets. In: *Plasma Sources Sci. Technol.* 24 (5), S. 54001. DOI: 10.1088/0963-0252/24/5/054001.

**Reuter**, Stephan; Winter, Jörn; Schmidt-Bleker, Ansgar; Tresp, Helena; Hammer, Malte U.; Weltmann, Klaus-Dieter (2012): Controlling the Ambient Air Affected Reactive Species

Composition in the Effluent of an Argon Plasma Jet. In: *IEEE Trans. Plasma Sci.* 40 (11), S. 2788–2794. DOI: 10.1109/TPS.2012.2204280.

**Reuter**, Stephan; Woedtke, Thomas von; Weltmann, Klaus-Dieter (2018): The kINPen—a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications. In: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 51 (23), S. 233001. DOI: 10.1088/1361-6463/aab3ad.

**Ricaniadis**, N.; Katakaki, A.; Agnantis, N.; Androulakis, G.; Karakousis, C. P. (2001): Long-term prognostic significance of HSP-70, c-myc and HLA-DR expression in patients with malignant melanoma. In: *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 27 (1), S. 88–93. DOI: 10.1053/ejso.1999.1018.

**Riethmacher**, D.; Brinkmann, V.; Birchmeier, C. (1995): A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (3), S. 855–859. DOI: 10.1073/pnas.92.3.855.

**Sato**, S.; Fujita, N.; Tsuruo, T. (2000): Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (20), S. 10832–10837. DOI: 10.1073/pnas.170276797.

**Sawai**, Ayana; Chandarlapaty, Sarat; Greulich, Heidi; Gonen, Mithat; Ye, Qing; Arteaga, Carlos L. et al. (2008): Inhibition of Hsp90 down-regulates mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and sensitizes EGFR mutant tumors to paclitaxel. In: *Cancer research* 68 (2), S. 589–596. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1570.

**Schlegel**, Jürgen; Köritzer, Julia; Boxhammer, Veronika (2013): Plasma in cancer treatment. In: *Clinical Plasma Medicine* 1 (2), S. 2–7. DOI: 10.1016/j.cpme.2013.08.001.

**Schmidt**, Anke & Bekeschus, Sander & Hasse, Sybille & Masur, Kai & Wende, Kristian & von Woedtke, Thomas. (2015).: Molekular- und zellbiologische Charakterisierung humaner Hautzellen nach Behandlung mit kaltem physikalischem Plasma. In: *Galvanotechnik.*, zuletzt geprüft am 30.05.2018.

**Schoenbach**, Karl H.; Joshi, Ravindra; Kolb, J.; Buescher, Stephen; Beebe, Stephen (2004): Subcellular effects of nanosecond electrical pulses. In: *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference* 7, S. 5447–5450. DOI: 10.1109/IEMBS.2004.1404522.

- Scholzen**, Thomas; Gerdes, Johannes (2000): The Ki-67 protein: From the known and the unknown. In: *J. Cell. Phys.* 182 (3), S. 311–322. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
- Schumacher**, Ton N.; Schreiber, Robert D. (2015): Neoantigens in cancer immunotherapy. In: *Science (New York, N.Y.)* 348 (6230), S. 69–74. DOI: 10.1126/science.aaa4971.
- Semenza**, Gregg L. (2010): HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. In: *Current opinion in genetics & development* 20 (1), S. 51–56. DOI: 10.1016/j.gde.2009.10.009.
- Sherman**, L.; Dafni, N.; Lieman-Hurwitz, J.; Groner, Y. (1983): Nucleotide sequence and expression of human chromosome 21-encoded superoxide dismutase mRNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (18), S. 5465–5469. DOI: 10.1073/pnas.80.18.5465.
- Shipp**, Christopher; Weide, Benjamin; Derhovanessian, Evelyn; Pawelec, Graham (2013): Hsps are up-regulated in melanoma tissue and correlate with patient clinical parameters. In: *Cell Stress & Chaperones* 18 (2), S. 145–154. DOI: 10.1007/s12192-012-0363-1.
- Shtivelman**, Emma; Davies, Michael Q. A.; Hwu, Patrick; Yang, James; Lotem, Michal; Oren, Moshe et al. (2014): Pathways and therapeutic targets in melanoma. In: *Oncotarget* 5 (7), S. 1701–1752. DOI: 10.18632/oncotarget.1892.
- Smallbone**, Kieran; Gavaghan, David J.; Gatenby, Robert A.; Maini, Philip K. (2005): The role of acidity in solid tumour growth and invasion. In: *Journal of theoretical biology* 235 (4), S. 476–484. DOI: 10.1016/j.jtbi.2005.02.001.
- Song**, Gang; Ouyang, Gaoliang; Bao, Shideng (2005): The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. In: *J Cellular Mol Med* 9 (1), S. 59–71. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x.
- Sonveaux**, Pierre; Végran, Frédérique; Schroeder, Thies; Wergin, Melanie C.; Verrax, Julien; Rabbani, Zahid N. et al. (2008): Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. In: *J. Clin. Invest.* DOI: 10.1172/JCI36843.
- Storz**, Gisela; Imlay, James A. (1999): Oxidative stress. In: *Current Opinion in Microbiology* 2 (2), S. 188–194. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80033-2.
- Sutherland**, R. M.; McCredie, J. A.; Inch, W. R. (1971): Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. In: *Journal of the National Cancer Institute* 46 (1), S. 113–120.

- Swietach**, Pawel; Patiar, Shalini; Supuran, Claudiu T.; Harris, Adrian L.; Vaughan-Jones, Richard D. (2009): The role of carbonic anhydrase 9 in regulating extracellular and intracellular pH in three-dimensional tumor cell growths. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (30), S. 20299–20310. DOI: 10.1074/jbc.M109.006478.
- Tanaka**, Hiromasa; Hori, Masaru (2017): Medical applications of non-thermal atmospheric pressure plasma. In: *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 60 (1), S. 29–32. DOI: 10.3164/jcbn.16-67.
- Tang**, Diana Y. L.; Ellis, Robert A.; Lovat, Penny E. (2016): Prognostic Impact of Autophagy Biomarkers for Cutaneous Melanoma. In: *Frontiers in oncology* 6, S. 236. DOI: 10.3389/fonc.2016.00236.
- Tavaria**, Michael; Gabriele, Tim; Kola, Ismail; Anderson, Robin L. (1996): A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. In: *Cell Stress & Chaperones* 1 (1), S. 23–28.
- Thoma**, Claudio R.; Zimmermann, Miriam; Agarkova, Irina; Kelm, Jens M.; Krek, Wilhelm (2014): 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 69-70, S. 29–41. DOI: 10.1016/j.addr.2014.03.001.
- Ton-That**, Long Ai; Kalantarov, Gavreel; Trakht, Ilya (2010): Frozen cell and tissue microarrays. In: *United States Patent Application Publication*, Pub. No.: US 2010/0323907 A1.
- Trachootham**, Dunyaporn; Alexandre, Jerome; Huang, Peng (2009): Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? In: *Nature reviews. Drug discovery* 8 (7), S. 579–591. DOI: 10.1038/nrd2803.
- Valavanidis**, Athanasios; Vlachogianni, Thomais; Fiotakis, Constantinos (2009): 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. In: *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews* 27 (2), S. 120–139. DOI: 10.1080/10590500902885684.
- Vinci**, Maria; Box, Carol; Zimmermann, Miriam; Eccles, Suzanne A. (2013): Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 986, S. 253–266. DOI: 10.1007/978-1-62703-311-4\_16.
- Vinci**, Maria; Gowan, Sharon; Boxall, Frances; Patterson, Lisa; Zimmermann, Miriam; Court, William et al. (2012): Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor

spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. In: *BMC biology* 10, S. 29. DOI: 10.1186/1741-7007-10-29.

**Wagle**, Nikhil; Emery, Caroline; Berger, Michael F.; Davis, Matthew J.; Sawyer, Allison; Pochanard, Panisa et al. (2011): Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (22), S. 3085–3096. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.2312.

**Wang**, G. L.; Jiang, B. H.; Rue, E. A.; Semenza, G. L. (1995): Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (12), S. 5510–5514. DOI: 10.1073/pnas.92.12.5510.

**Ward**, I. M.; Chen, J. (2001): Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (51), S. 47759–47762. DOI: 10.1074/jbc.C100569200.

**Weber**, Anika Maria; Ryan, Anderson Joseph (2015): ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. In: *Pharmacology & Therapeutics* 149, S. 124–138. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.12.001.

**Wegele**, H.; Müller, L.; Buchner, J. (2004): Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 151, S. 1–44. DOI: 10.1007/s10254-003-0021-1.

**Williams**, T.; Moolten, D.; Burlein, J.; Romano, J.; Bhaerman, R.; Godillot, A. et al. (1991): Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression. In: *Science* 254 (5039), S. 1791–1794. DOI: 10.1126/science.1840704.

**Woedtke**, Th. von; Reuter, S.; Masur, K.; Weltmann, K.-D. (2013): Plasmas for medicine. In: *Physics Reports* 530 (4), S. 291–320. DOI: 10.1016/j.physrep.2013.05.005.

**Yan**, Dayun; Sherman, Jonathan H.; Keidar, Michael (2017): Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. In: *Oncotarget* 8 (9), S. 15977–15995. DOI: 10.18632/oncotarget.13304.

**Yan**, Pu; Seelentag, Walter; Bachmann, Astrid; Bosman, Fred T. (2007): An agarose matrix facilitates sectioning of tissue microarray blocks. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 55 (1), S. 21–24. DOI: 10.1369/jhc.6A6987.2006.

**Yang**, Lin; Dan, Han C.; Sun, Mei; Liu, Qiyuan; Sun, Xia-meng; Feldman, Richard I. et al. (2004): Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. In: *Cancer research* 64 (13), S. 4394–4399. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0343.

**Yu**, Xiang; Kensler, Thomas (2005): Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. In: *Mutation research* 591 (1-2), S. 93–102. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.04.017.

**Zenker**, Matthias (2008): Argon plasma coagulation. In: *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 3 (1).

**Zenkov**, N. K.; Kozhin, P. M.; Chechushkov, A. V.; Martinovich, G. G.; Kandalintseva, N. V.; Menshchikova, E. B. (2017): Mazes of Nrf2 Regulation. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 82 (5), S. 556–564. DOI: 10.1134/S0006297917050030.

**Zhang**, Qinghua; Barbosa-Cánovas, Gustavo V.; Swanson, Barry G. (1995): Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. In: *Journal of Food Engineering* 25 (2), S. 261–281. DOI: 10.1016/0260-8774(94)00030-D.

**Zhang**, Xiaomeng; Lin, Yuxiang; Gillies, Robert J. (2010): Tumor pH and its measurement. In: *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 51 (8), S. 1167–1170. DOI: 10.2967/jnumed.109.068981.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift



## **Danksagung**

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas von Woedtke für die zahlreichen Korrekturen dieser Arbeit und die stets hilfreichen Anmerkungen.

Außerdem gilt mein Dank meinen Betreuern Dr. Sybille Hasse und Dr. Sander Bekeschus für die unzähligen Gespräche, die zahlreichen Lösungsvorschläge sowie die Möglichkeit mit meinen Problemen stets vorbeizukommen.

Frau Liane Kantz möchte ich für die Unterstützung bei der Paraffineinbettung sowie der Einführung in die Laborarbeiten danken.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Angela Privat Maldonado für die zahlreichen Ratschläge bei der Sphäroideinbettung.

Ich danke allen Mitarbeitern des INP Greifswald, die bei Fragen stets ein offenes Ohr hatten.

Besonders möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden für die vielen motivierenden Gespräche danken.