

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Wiederherstellungschirurgie und  
Rehabilitative Medizin  
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Dr. h.c. Axel Ekkernkamp)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: Induktion von Apoptose durch kaltes physikalisches Plasma – molekulare und  
zelluläre Analyse in einem in vitro Osteosarkom-Modell

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von:  
Lasse Wien  
geb. am: 13.08.1993  
in: Hamburg

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich  
1. Gutachter: PD Dr. med. habil. Denis Gümbel  
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Harth

Ort, Raum: Greifswald, Universitätsklinikum, Raum P01.37  
Tag der Disputation: 05.09.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Osteosarkom.....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Epidemiologie .....	9
1.1.2 Ätiologie .....	9
1.1.3 Pathogenese.....	9
1.1.4 Klassifikation.....	12
1.1.5 Diagnostik .....	15
1.1.6 Therapie.....	17
<b>1.2 Kaltes atmosphärisches Plasma .....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Physikalische Grundlagen .....	19
1.2.2 Biologisch reaktive Bestandteile .....	21
1.2.3 CAP-Quellen.....	22
1.2.4 Biologische Effekte und medizinische Anwendungsgebiete von CAP.....	23
1.2.5 CAP in der Onkologie .....	24
<b>1.3 Apoptose .....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Grundlagen.....	25
1.3.2 Apoptose in der Onkologie und onkologischen Therapie .....	27
<b>1.4 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>28</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>29</b>
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen .....	30
2.1.3 Hergestellte Lösungen.....	31
2.1.4 OS Zelllinien .....	32
2.1.5 Zellkultivierung: Medien, Lösungen und Zusätze .....	33
2.1.6 Software.....	34

<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>34</b>
2.2.1 Zellkultivierung.....	34
2.2.2 Zellzahlbestimmung.....	36
2.2.3 CAP Behandlung.....	36
2.2.4 Wachstumskinetik.....	38
2.2.5 TUNEL-Assay.....	38
2.2.6 Caspase-Assay.....	41
2.2.7 Komet-Assay.....	42
2.2.8 Statistische Auswertung.....	45
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Antiproliferative Effekte von CAP des kINPen MED und MiniJet-R....</b>	<b>47</b>
<b>3.2 Analyse CAP-induzierter DNA-Strangbrüche mittels TUNEL-Assay..</b>	<b>49</b>
<b>3.3 CAP stimuliert die Apoptose-assoziierten Proteasen Caspase-3/7....</b>	<b>51</b>
<b>3.4 Analyse CAP-induzierter DNA-Strangbrüche mittels Komet-Assay...</b>	<b>53</b>
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>55</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>63</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>64</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Histologische Subtypen des klassischen OS .....	10
Abb. 2: Diagnostischer Algorithmus für maligne Knochentumoren, modifiziert für das OS .....	15
Abb. 3: CAP Quellen .....	22
Abb. 4: Automatisierte Detektion und Analyse von DNA einzelner Zellen .....	44
Abb. 5: Prinzip des Komet-Assay .....	44
Abb. 6: kINPen MED – Wachstumskinetik von U2OS- und MNNG/HOS-Zellen...	47
Abb. 7: MiniJet-R – Wachstumskinetik von U2OS- und MNNG/HOS-Zellen .....	48
Abb. 8: kINPen MED – TUNEL-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen .....	49
Abb. 9: MiniJet-R – TUNEL-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen .....	50
Abb. 10: kINPen MED – Caspase-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen .....	51
Abb. 11: MiniJet-R – Caspase-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen .....	52
Abb. 12: kINPen MED – Komet-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen .....	53
Abb. 13: MiniJet-R – Komet-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen .....	54

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: TNM Klassifikation des OS .....	12
Tab. 2: Stadieneinteilung des OS.....	13
Tab. 3: R-System des „American Joint Committee on Cancer“ .....	17
Tab. 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	29
Tab. 5: Chemikalien und Lösungen.....	30
Tab. 6: Hergestellte Lösungen .....	31
Tab. 7: OS Zelllinien.....	33
Tab. 8: Medien, Lösungen und Zusätze.....	33
Tab. 9: Software .....	34

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Apaf-1	Apoptose Protease-aktivierenden Faktor 1
APPJ	atmosphärischer Plasmajet (atmospheric pressure plasma jet)
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
BAK	B-Zell Lymphom 2 Antagonist/Killer (BCL-2 antagonist/killer)
BAX	B-Zell Lymphom 2 assoziiertes Protein X (BCL-2 associated x protein)
BCL-2	B-Zell Lymphom 2 Protein (B-cell lymphoma 2 protein)
BCL-X <sub>L</sub>	B-Zell Lymphom extra groß (B-cell lymphoma extra large)
CAP	Kaltes atmosphärisches Plasma (cold atmospheric plasma)
Caspase	Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Protease
Caspase3/7	Caspase-3 und Caspase-7
CD	Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale (Cluster of differentiation)
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COSS	Cooperative Osteosarcoma Study Group
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomografie
DBD	dielektrische Barriereentladung (dielectric barrier discharge)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSB	DNA Doppelstrangbrüche (double-strand breaks)
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor)
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
GHz	Gigahertz
h	Stunde (hour)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
HLA	Humanes leukozytäres Antigen
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase
kHz	Kilohertz
kV	Kilovolt
LMA	Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (Low Melting Point Agarose)
M	Mol
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter



MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MOMP	Mitochondriale äußere Membranpermeabilisierung (mitochondrial outer membrane permeabilization)
MRT	Magnetresonanztomografie
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier (mammalian Target of Rapamycin)
MW	Mittelwert
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (Non-Homologous End-Joining)
nm	Nanometer
OS	Osteosarkom
PET	Positronenemissionstomografie
RB	Gen des Retinoblastomproteins
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNS	reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (Standard deviation)
slm	Standard-Liter pro Minute
SSB	DNA Einzelstrangbrüche (single-strand breaks)
Tab.	Tabelle
TdT	Terminale Desoxynukleotidtransferase (Terminal deoxynucleotidyl transferase)
TP53	Gen des Tumorsupressorproteins 53

TUNEL	TdT dUTP Nick-End Labeling
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGFR	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol

# **1 Einleitung**

## **1.1 Osteosarkom**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Das Osteosarkom (OS) ist der häufigste primär maligne Knochentumor des Menschen.<sup>1</sup> Die jährliche Inzidenz des OS ist mit 2-3 pro 100.000 Einwohner zwar gering, jedoch machen OS bis zu 40 % aller diagnostizierten primär malignen Knochentumoren aus.<sup>2</sup> Bei Kindern und Jugendlichen bis zum 20. Lebensjahr werden sogar in über 50 % der primär malignen Knochentumoren OS diagnostiziert.<sup>3</sup> Die jährliche Inzidenz des OS weist altersbezogen zwei Häufigkeitsgipfel auf: Der erste und größere Häufigkeitsgipfel liegt bei Kindern und jungen Erwachsenen vor dem 25. Lebensjahr, der zweite und kleinere Häufigkeitsgipfel liegt im höheren Alter bei über 60-jährigen.<sup>4</sup> Männer sind mit Ausnahme der ersten Lebensdekade in einem Verhältnis von 1,35:1 häufiger betroffen als Frauen.<sup>5,6</sup> Die Mehrheit der OS entstehen mit 76 % im Bereich der Extremitäten, während sich 24 % der Tumoren am Achsenskelett manifestieren.<sup>7</sup>

### **1.1.2 Ätiologie**

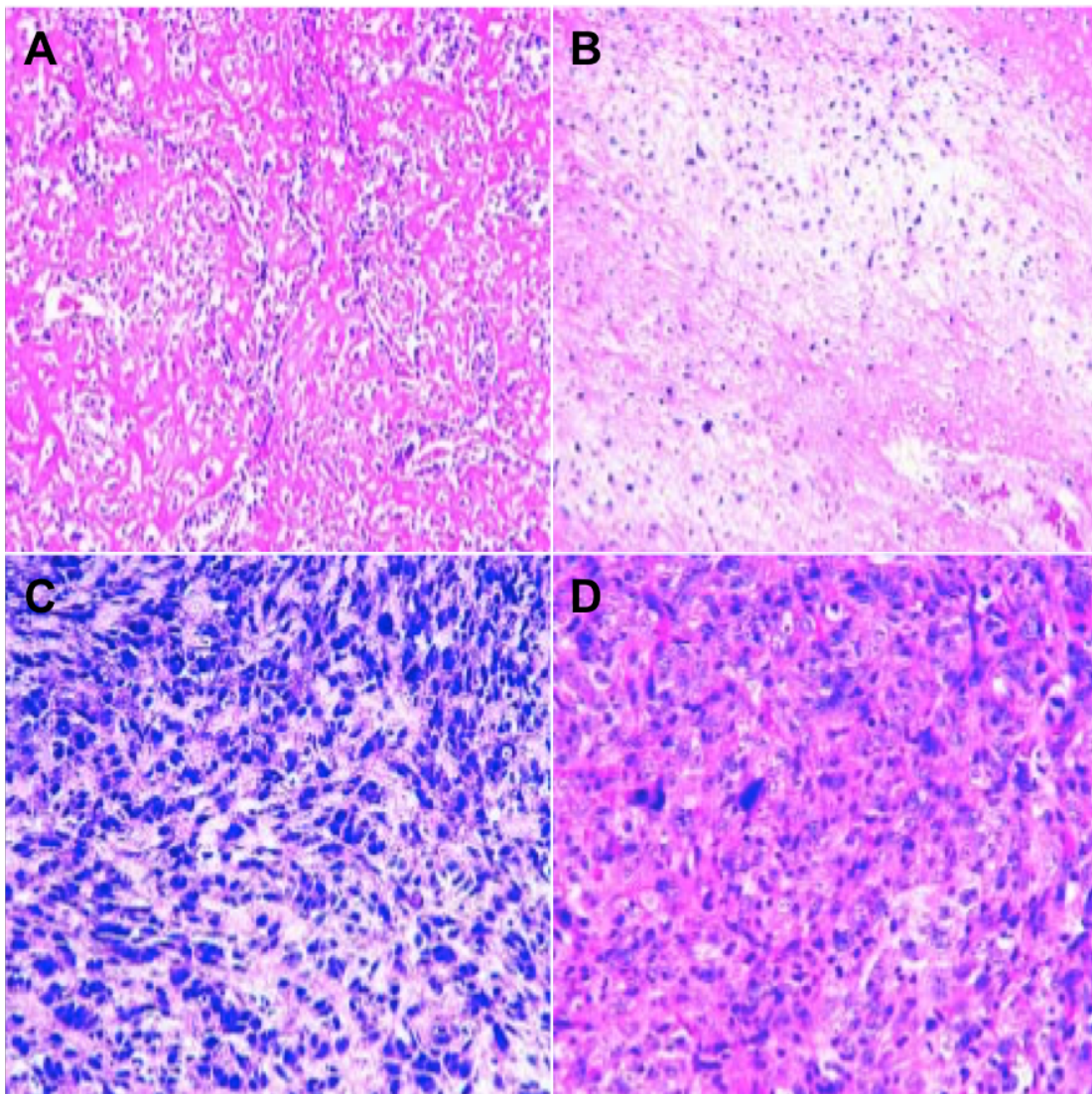
Während in der Altersgruppe von Kindern und jungen Erwachsenen OS fast ausschließlich als primäre Tumoren vorkommen, treten sie im höheren Alter in über 50 % der Fälle in sekundärer Form auf.<sup>8</sup> Die Ätiologie des primären OS ist weitgehend ungeklärt. Neben den bereits beschriebenen Faktoren Alter und Geschlecht sind hohes Geburtsgewicht und große Körperlänge mit einem gehäuften Auftreten assoziiert.<sup>4,9</sup> Darüber hinaus sind verschiedene Keimbahnmutationen – beispielsweise des TP53-Gens – bekannt, die mit dem gehäuften Auftreten von OS einhergehen.<sup>10</sup>

Das sekundäre OS entwickelt sich auf der Grundlage einer knöchernen Vorschädigung, die beispielsweise durch Morbus Paget, therapeutische Bestrahlung oder weitere, seltenerer Erkrankungen hervorgerufen werden kann.<sup>8,11</sup>

### **1.1.3 Pathogenese**

Definitionsgemäß ist das OS ein Osteoid produzierender maligner Tumor mesenchymaler Herkunft.<sup>12</sup> Die naheliegende Annahme der Tumorgenese ausgehend von Osteoblasten, die im physiologischen Zustand Osteoid

produzieren, wird der histologischen Differenzierung der Tumoren nicht gerecht. Neben Osteoid produzieren OS in unterschiedlichem Ausmaß weitere Gewebe wie beispielsweise Knorpel und fibröses Bindegewebe, sodass beim klassischen OS die histologischen Subtypen osteoblastisches, chondroblastisches, fibroblastisches und pleomorphes OS unterschieden werden (Abb. 1).<sup>13</sup> Die Entwicklung aus einer pluripotenten Vorläuferzelle des Osteoblasten ist deshalb als wahrscheinlich anzunehmen.



**Abb. 1: Histologische Subtypen des klassischen OS**

*Histologische Subtypen des klassischen OS, klassifiziert nach zellulärer und extrazellulärer Zusammensetzung des Tumorgewebes. A: Osteoblastisches OS (Hämatoxylin-Eosin (HE), x100), B: Chondroblastisches OS (HE, x100), C: Fibroblastisches OS (HE, x250), D: Pleomorphes OS (HE, x250); nach Klein et al.<sup>13</sup>*

Der Zusammenhang zwischen hereditären Erkrankungen und der Entwicklung von OS wurde bereits am Beispiel der Keimbahnmutation des TP53-Gens beschrieben.<sup>10</sup> Darüber hinaus sind weitere Keimbahnmutationen bekannt, die ein gehäuftes Auftreten von OS bedingen: Die Mutation des RB1-Gens wird als ursächlich für die Entwicklung des Retinoblastoms angesehen und führt am zweithäufigsten zur Ausbildung von OS. RecQ-Helicasen sorgen physiologisch für genetische Integrität und führen im Fall einer Mutation ebenfalls zu OS prädisponierenden Syndromen – RECQL4: Rothmund-Thompson-Syndrom; RECQL2: Werner-Syndrom; RECQL3: Bloom-Syndrom.<sup>14</sup> Insgesamt sind hereditäre Erkrankungen selten ursächlich für die Entstehung von OS und können deshalb nur Hinweise auf die pathogenetisch zugrundeliegenden Mechanismen geben. Die beschriebenen Keimbahnmutationen führen schließlich nicht unmittelbar selbst zur Ausbildung der Tumoren sondern begünstigen lediglich eine erleichterte Akkumulation von Alterationen in Tumorsupressor- und Onkogenen. Gensequenzierungen von OS zeigen, dass die Tumoren genetisch hochgradig heterogen sind und häufig Alterationen in mehreren verschiedenen Tumorsupressor- und Onkogenen aufweisen.<sup>15</sup> Die häufigsten Alterationen finden sich, wie bei den hereditären Syndromen, an den Genen TP53 und RB1.<sup>16</sup> Darüber hinaus sind über 50 weitere Gene identifiziert worden, die in der Entstehung von OS eine Rolle spielen könnten.<sup>17</sup>

### 1.1.4 Klassifikation

Die TNM Klassifikation (Tab. 1) wurde dem klinischen Auftreten von OS über viele Jahre nicht ausreichend gerecht, sodass die weitaus gebräuchlichere Stadieneinteilung nach Enneking et al. (Tab. 2) weiterhin Anwendung findet.

**Tab. 1: TNM Klassifikation des OS**

<b>T – Primärtumor</b>	<p><b>TX:</b> Primärtumor kann nicht beurteilt werden</p> <p><b>T0:</b> Kein Anhalt für Primärtumor</p> <p><b>T1:</b> Tumor 8 cm oder weniger in größter Ausdehnung</p> <p><b>T2:</b> Tumor mehr als 8 cm in größter Ausdehnung</p> <p><b>T3:</b> Diskontinuierliche Ausbreitung im primär befallenen Knochen</p>
<b>N – Regionäre Lymphknoten</b>	<p><b>NX:</b> Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden</p> <p><b>N0:</b> Keine regionären Lymphknotenmetastasen</p> <p><b>N1:</b> Regionäre Lymphknotenmetastasen</p>
<b>M – Fernmetastasen</b>	<p><b>M0:</b> Keine Fernmetastasen</p> <p><b>M1:</b> Fernmetastasen</p> <p style="padding-left: 40px;"><b>M1a:</b> Lunge</p> <p style="padding-left: 40px;"><b>M1b:</b> Andere Fernmetastasen</p>
<b>G – Histopathologisches Grading</b>	<p><b>G1:</b> Gut differenziert</p> <p><b>G2:</b> Mäßig differenziert</p> <p><b>G3:</b> Schlecht differenziert</p> <p><b>G4:</b> Undifferenziert</p>

Nach Wittekind et al. und Page et al.<sup>18,19</sup>

Für die Stadieneinteilung nach Enneking, et al. werden die Tumoren unter Einbeziehung von drei Faktoren – Malignitätsgrad, kompartimentale Ausbreitung und Metastasierung – klassifiziert. Zur Graduierung werden durch histologische, klinische und radiologische Kriterien niedrigmaligne von hochmalignen OS unterschieden. In Abhängigkeit vom Überschreiten biologisch präformierter Kompartimente wird intrakompartimentales von extrakompartimentalem Tumorwachstum differenziert. Da regionale Metastasen und Fernmetastasen mit einer vergleichbaren Prognose einhergehen, wird lediglich zwischen vorhandener und fehlender Metastasierung unterschieden. Auf Grundlage dieser drei Faktoren erfolgt die Einteilung in die Stadien I-III. Niedrigmaligne (G1) werden von hochmalignen (G2) Tumoren jeweils in den Stadien I und II voneinander abgegrenzt. Die Untergruppen – IA und IB bei niedrigmalignen und IIA und IIB bei hochmalignen Tumoren – ergeben sich aus der kompartimentalen Ausbreitung des Tumors, wobei extrakompartimentales Tumorwachstum das jeweils höhere Stadium bedingt. Unabhängig von Malignitätsgrad und kompartimentaler Ausbreitung werden metastasierte Tumoren aufgrund ihres aggressiven Wachstums dem Stadium III zugeordnet. Die Klassifikation ermöglicht eine präzisere Aussage hinsichtlich der 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit als die TNM-Klassifikation und ist deshalb sowohl prognostisch als auch therapeutisch für das OS relevant.<sup>20</sup>

**Tab. 2: Stadieneinteilung des OS**

<b>Stadium</b>	<b>Grad (G)</b>	<b>Kompartiment (T)</b>
<b>IA</b>	Niedrigmaligne (G1)	Intrakompartimental (T1)
<b>IB</b>	Niedrigmaligne (G1)	Extrakompartimental (T2)
<b>IIA</b>	Hochmaligne (G2)	Intrakompartimental (T1)
<b>IIB</b>	Hochmaligne (G2)	Extrakompartimental (T2)
<b>III</b>	Jedes G, regionale Metastasen oder Fernmetastasen	Jedes T

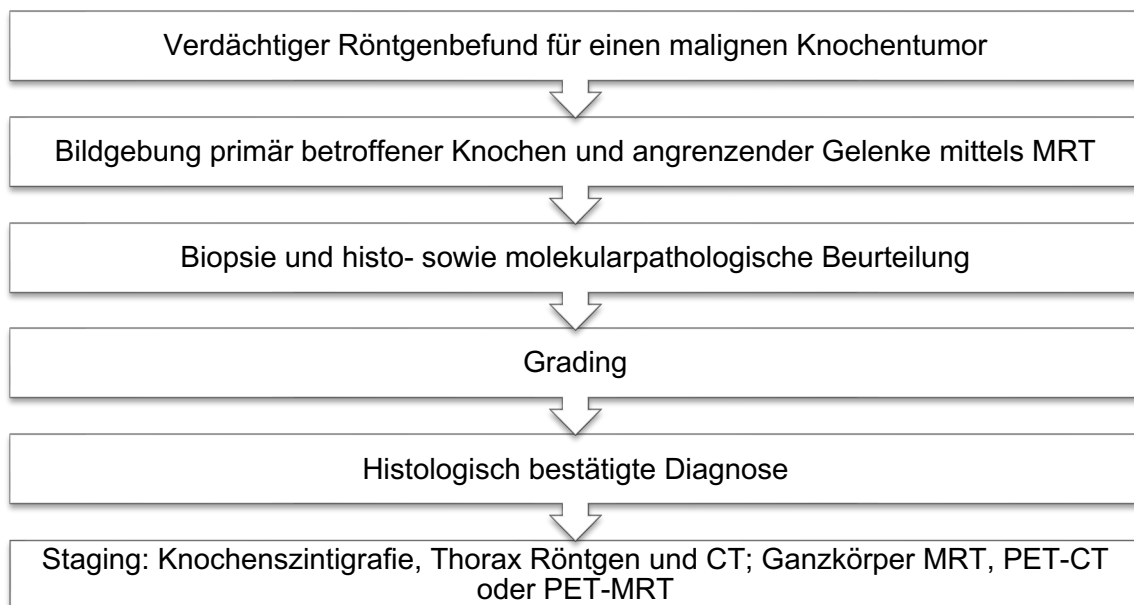
*Nach Enneking et al.<sup>20</sup>*

Nach Fletcher, et al. werden OS neben den bereits genannten Einteilungen von der WHO unter pathologischen Gesichtspunkten in verschiedene Subtypen klassifiziert. Das konventionelle OS, dessen histologische Subtypen unter 1.1.3 beschrieben sind, macht demnach ca. 80-90 % aller OS aus. Darüber hinaus treten niedriggradig-zentrale, telangiektatische, kleinzellige, parossale, periostale und hochgradige-oberflächliche OS mit Häufigkeiten von 1-4 % auf.<sup>21</sup>



### 1.1.5 Diagnostik

Das seltene Auftreten von OS bedarf eines diagnostischen Algorithmus, der durch möglichst frühzeitige Erkennung eine suffiziente therapeutische Intervention in spezialisierten Zentren ermöglicht. Neben weiteren benignen und malignen Tumoren sowie metastatischen Absiedelungen kommen differentialdiagnostisch Infektionen, anatomische Varianten sowie degenerative und metabolische Erkrankungen in Betracht, die insgesamt weitaus häufiger auftreten als das OS selbst.<sup>22</sup> In den „Clinical Practice Guidelines“ der European Society for Medical Oncology wurde in Zusammenarbeit mit weiteren Fachgesellschaften ein genereller diagnostischer Algorithmus für maligne Knochentumoren entwickelt, der modifiziert für das OS in Abb. 2 dargestellt ist.<sup>23</sup>



**Abb. 2: Diagnostischer Algorithmus für maligne Knochentumoren, modifiziert für das OS**

*MRT: Magnetresonanztomografie, CT: Computertomografie, PET: Positronenemissionstomografie; nach Casali et al.<sup>23</sup>*

OS werden häufig erst in fortgeschrittenen Tumorstadien symptomatisch, zunächst oft durch intermittierend auftretende Schmerzen, die initial eine Belastungsabhängigkeit aufweisen können.<sup>24</sup> Schwellung und Funktionseinschränkung gehören ebenfalls zu den typischen Symptomen, während Fieber, Gewichtsverlust und generelle Erschöpfung sich als

unspezifische Spätsymptome manifestieren.<sup>25</sup> 5-10 % der OS werden infolge einer pathologischen Fraktur diagnostiziert, die mit höheren Rezidiv- und geringeren Überlebensraten einhergehen.<sup>26</sup>

Besteht nach Anamnese und klinischer Untersuchung der Verdacht auf ein OS oder einen anderen Knochentumor, sollte zunächst eine konventionelle Röntgendiagnostik der betroffenen Region mit angrenzenden Gelenken in zwei Ebenen erfolgen – je nach Befund ergibt sich hieraus der Einstieg in den diagnostischen Algorithmus (siehe Abb. 2).<sup>23,27</sup> Zu den typischen Röntgenbefunden, die zum Verdacht auf einen malignen Knochentumor führen, zählen Sklerosen, Osteolysen, ossifizierte Raumforderungen der Weichteile und Zeichen einer Periostreaktion wie dem Codman-Dreieck.<sup>25,28</sup> Obgleich sich die Qualität der lokalen Beurteilbarkeit von Knochengewebe zwischen MRT und CT nicht signifikant unterscheidet, wird die MRT aufgrund des besseren Weichteilkontrasts unter Verzicht auf Strahlenexposition zur Bildgebung der primär betroffenen Knochen sowie der angrenzenden Gelenke bevorzugt angewandt.<sup>27</sup> Darüber hinaus können durch diese Bildgebung Skip-Metastasen, also metastatische Absiedelungen innerhalb des primär betroffenen Knochens und angrenzender Gelenke, detektiert werden.<sup>29</sup> Patienten, bei denen die radiologischen Befunde einen malignen Knochentumor vermuten lassen, sollten zur weiteren Diagnostik und Therapie in spezialisierte Zentren mit multidisziplinären Tumorboards verlegt werden, da hierdurch ein längeres rezidivfreies Überleben sowie geringere Amputationsraten erreicht werden können.<sup>30,31</sup> Dort soll der Primärtumor biopsiert und das gewonnene Gewebe histo- und molekularpathologisch beurteilt werden. Nach Grading und histologischer Bestätigung der Diagnose OS sollte ein Staging erfolgen, das mindestens aus Röntgen/CT des Thorax sowie Knochenszintigrafie besteht.<sup>23,32</sup> Darüber hinaus finden Ganzkörper-MRT, PET-CT und PET-MRT aufgrund ihrer hohen diagnostischen Präzision vermehrt Anwendung beim Staging von OS.<sup>33</sup> Unspezifische Laborparameter wie die alkalische Phosphatase und Laktatdehydrogenase haben prognostische Relevanz, ein diagnostisch wegweisender Laborparameter konnte bislang jedoch nicht identifiziert werden.<sup>23,34</sup> Auf Grundlage des Stagings und Gradings können in Zusammenschau mit der individuellen Gesamtsituation des Patienten schließlich die verschiedenen Therapiekonzepte gegeneinander abgewogen werden.

### 1.1.6 Therapie

Grundsätzlich muss beim OS, wie bei malignen Erkrankungen üblich, zwischen kurativen und palliativen Therapiekonzepten unterschieden werden. Kurative Therapiekonzepte für hochmaligne OS beinhalten stets eine chirurgische Intervention sowie multimodale Chemotherapie, indes die Therapie niedrigmaligner OS auch ohne Chemotherapie erfolgen kann.<sup>23,35</sup> Ziel der chirurgischen Therapie ist die lokale Tumorkontrolle bei bestmöglichem Funktionserhalt – die chirurgischen Resektionsgrenzen spielen hierbei aufgrund ihres hohen prognostischen Aussagegewerts hinsichtlich des Gesamtüberlebens eine zentrale Rolle.<sup>36</sup> Das am weitesten verbreitete System zur Beurteilung chirurgischer Resektionsgrenzen stellt das der „Musculoskeletal Tumor Society“ dar, dessen Grundlage ursprünglich von Enneking et al. in Verbindung mit der unter 1.1.4 beschriebenen Stadieneinteilung definiert wurde. Demnach wird zwischen radikaler (extrakompartimentale *en bloc* Resektion), weiter (intrakompartimentale *en bloc* Resektion umgeben von gesundem Gewebe), marginaler (*en bloc* Resektion durch die Pseudokapsel oder reaktive Zone) und intraläsionaler (stückweises Tumordebulking oder Kürettage) Resektion unterschieden.<sup>20</sup> Dieses System ist dem R-System des „American Joint Committee on Cancer“ (Tab. 3) überlegen und weist eine vergleichbare prognostische Aussagekraft wie die histopathologische Beurteilung des Abstands zwischen Resektionsgrenzen und Tumor auf.<sup>37</sup>

**Tab. 3: R-System des „American Joint Committee on Cancer“**

<b>R – Residualer Tumor</b>	<b>RX:</b> Residualer Tumor nicht beurteilbar <b>R0:</b> Kein residualer Tumor <b>R1:</b> Mikroskopisch residualer Tumor <b>R2:</b> Makroskopisch residualer Tumor
-----------------------------	---

Nach Edge, et al. <sup>38</sup>

Während das progressionsfreie Überleben hochmaligner OS bei ausschließlich chirurgischer Therapie nur bei unter 20 % liegt, konnte es durch die Einführung

multimodaler Chemotherapien auf ca. 70 % angehoben werden.<sup>39</sup> Doxorubicin, Ifosfamid, Methotrexat und Cisplatin zeigen beim OS die besten Ansprechraten, sodass die verbreiteten Therapieprotokolle aus Kombinationen dieser vier Medikamente bestehen.<sup>40</sup> Die Kombination von mindestens drei Chemotherapeutika, z.B. Methotrexat, Doxorubicin und Cisplatin im MAP-Protokoll, in adjuvanter und/oder neoadjuvanter Anwendung erzielte bislang die besten Überlebensraten.<sup>23,40</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Überlebensraten sich nach neoadjuvanter Chemotherapie verglichen mit ausschließlich adjuvanter Chemotherapie nicht signifikant unterscheiden.<sup>41</sup> Dennoch kommen durch die präoperative Anwendung funktionserhaltende chirurgische Verfahren häufiger in Betracht.<sup>42</sup> Deshalb werden Chemotherapien beim OS standardisiert sowohl neoadjuvant als auch adjuvant angewendet.

Seit Einführung der Chemotherapie vor über 30 Jahren konnte die Gesamtüberlebensrate von Patienten mit OS nicht relevant verbessert werden, sodass sie nach wie vor bei ca. 70 % liegt.<sup>40</sup> Eine Vielzahl neuer Therapiekonzepte sind in den vergangenen Jahrzehnten erprobt worden. Weder durch die Erweiterung des Chemotherapieprotokolls mit Interferon  $\alpha$ , Interferon  $\alpha$ -2b oder Ifosfamid und Etoposid noch durch eine Anpassung des postoperativen Chemotherapieprotokolls bei schlechten präoperativen Ansprechraten konnte eine Verbesserung hinsichtlich des Gesamtüberlebens erreicht werden.<sup>23,43,44</sup> Auch durch die intraarterielle Applikation von Cisplatin im Rahmen des COSS-86-Protokolls konnte keine Verbesserung der Therapieergebnisse erzielt werden.<sup>45</sup> In der randomisierten Studie von Meyers, et al. konnte gezeigt werden, dass die Gesamtüberlebensrate durch Erweiterung etablierter Therapieprotokolle um Muramyl-Tripeptid signifikant auf 78 % ansteigt.<sup>46</sup> Die Aussagekraft der Studie wird jedoch kontrovers diskutiert und Interaktionen mit anderen Medikamenten sind im Rahmen des Studiendesigns nicht auszuschließen, sodass weitere Studien vor einer routinemäßigen klinischen Anwendung außerhalb kontrollierter Studien gefordert werden.<sup>35,47</sup> Demzufolge ergibt sich jedoch die Vermutung, dass ein richtiges Maß an Immunaktivierung das Gesamtüberleben von OS Patienten verbessern könnte. Die Anwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren führte in Einzelfällen zu partiellem Ansprechen oder stabilen Erkrankungssituationen bei Patienten mit fortgeschrittenem OS.<sup>48</sup> Im Gegensatz dazu zeigen einige Studien, dass antiinflammatorisch wirksame Medikamente, wie beispielsweise

Cyclooxygenase-2 Inhibitoren, ebenfalls positive Effekte in OS Patienten hervorrufen könnten.<sup>48</sup> Die Immunmodulation stellt somit sowohl mit pro- als auch mit antiinflammatorischen Ansätzen ein geeignetes Forschungsfeld hinsichtlich zukünftiger Therapiestrategien dar. Untersuchungen mit zielgerichteten Tumortherapeutika wie monoklonalen Antikörpern (z.B. gegen HER2, EGFR oder VEGFR) *in vitro* und *in vivo* sowie in Kombination zur konventionellen Chemotherapie blieben bisher erfolglos. Weder die Entwicklung von Metastasen konnte hierdurch verhindert noch das Gesamtüberleben von OS Patienten verbessert werden.<sup>48-50</sup> In Phase-II-Studien mit kleinen Patientenkollektiven konnte durch Behandlungen mit unterschiedlichen Tyrosinkinase-Inhibitoren (Sorafenib, Regorafenib und Cabozantinib) im Anschluss an das MAP-Protokoll bei chirurgisch nicht resezierbaren, rezidivierenden OS ein progressionsfreies Überleben in Zeiträumen von zwei bis sechs Monaten von bis zu 46 % erreicht werden.<sup>51-53</sup> Weitere Studien werden gefordert, um die Effekte hinsichtlich der Kombination mit der klassischen Chemotherapie zu beurteilen. Eine Studie mit Erweiterung des Therapieregimes durch den mTOR Inhibitor Everolimus zur Steigerung der Aktivität von Sorafenib verfehlte den primären Endpunkt eines 6-monatigen progressionsfreien Überlebens von 50 %.<sup>54</sup> Die präklinisch vielversprechende Anwendung von Bisphosphonaten zeigte in einer Phase-III-Studie ergänzend zum MAP Protokoll schlechtere 3-Jahres-Überlebensraten als die Kontrollgruppe und stellt somit keine Therapiealternative dar.<sup>55</sup>

Die Radiotherapie ist nicht Bestandteil kurativer Therapiekonzepte, jedoch stellt sie ein geeignetes Verfahren zur Symptomkontrolle in der palliativen Therapie dar.<sup>23</sup> Zahlreiche Wissenschaftler und Arbeitsgruppen beanstanden den seit mehreren Jahrzehnten bestehenden Mangel an Fortschritt in der OS-Therapie und fordern Innovationen für die Zukunft.<sup>40,56</sup>

## **1.2 Kaltes atmosphärisches Plasma**

### **1.2.1 Physikalische Grundlagen**

Als Plasma wird vollständig oder partiell ionisiertes Gas bezeichnet, das physikalisch den vierten Aggregatzustand neben den Aggregatzuständen fest, flüssig und gasförmig darstellt.<sup>57</sup> Plasma entsteht, indem einem Gas Energie zugeführt und dadurch die enthaltenen Atome und Moleküle angeregt werden.<sup>58</sup> In der Folge werden Elektronen freigesetzt, die wiederum mittels Stoßionisation

weitere Atome und Moleküle ionisieren sowie weitere Elektronen freisetzen.<sup>59</sup> Schließlich liegt ein Gemisch aus freien Elektronen und ionisierten Atomen und Molekülen vor. Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte erzeugen Plasma mittels Zuführung von elektrischer Energie in Form von Strom. Durch Anlage einer Spannung zwischen zwei Elektroden kann bei Überschreitung der Zündspannung, die vom Produkt aus Gasdruck und Elektrodenabstand abhängt, Plasma generiert werden (Paschen-Gesetz).<sup>60</sup> Nach Tendero, et al. werden die sich im Gas befindlichen Elektronen durch das elektrische Feld angeregt und übertragen mittels elastischer und unelastischer Kollisionen Energie auf neutrale Spezies.<sup>61</sup> Elastische Kollisionen führen zu einer leichten Zunahme der kinetischen Energie, während unelastische Kollisionen – die bei ausreichend hoher Energiezufuhr entstehen – zur Stoßionisation neutraler Spezies führen.<sup>59,61</sup> Um Plasma wie oben beschrieben unter atmosphärischen Druckverhältnissen zu generieren, ist, dem Paschen-Gesetz folgend, die Anlage hoher Spannungen notwendig, infolgedessen hohe Temperaturen entstehen.<sup>62</sup> Für einige in der Medizin etablierte Anwendungsgebiete werden die thermischen Eigenschaften dieser „heißen“ Plasmen genutzt – beispielsweise zur Sterilisierung oder Koagulation.<sup>57,63-66</sup> Kaltes atmosphärisches Plasma (cold atmospheric plasma, CAP) hingegen kann bei Temperaturen von unter 40 °C generiert werden, sodass eine schonende und schmerzfreie Anwendung an vitalem Gewebe möglich ist.<sup>67,68</sup> Die Temperatur des Plasmas ist von mehreren Faktoren abhängig, deren Modifikation das Erzeugen von CAP mittels verschiedener technischer Ansätze erlaubt. Abhängig vom Gasdruck nähern sich die Elektronentemperatur und die Temperatur der schweren Teilchen bei hohem Druck einem thermodynamischen Gleichgewicht an oder entfernen sich bei niedrigem Druck von jenem.<sup>61</sup> Aufgrund der Massenunterschiede hängt die Temperatur des Plasmas vorrangig von der Temperatur der schweren Teilchen ab, sodass die Erzeugung von CAP bei sehr niedrigem Gasdruck (Niederdruckplasma) grundsätzlich einen geeigneten Ansatz darstellt, der jedoch mit einem hohen technischen Aufwand einhergeht und deshalb für eine medizinische Anwendung bisher nicht praktikabel zu sein scheint.<sup>61</sup> Hinsichtlich einer klinischen Anwendung am Menschen werden aktuell Verfahren bevorzugt, mit denen CAP bei atmosphärischen Druckverhältnissen mittels entsprechender Spannungsformen und spezieller Elektrodenkonfiguration erzeugt werden kann.<sup>69</sup> Die Applikation gepulster oder hochfrequenter Spannung

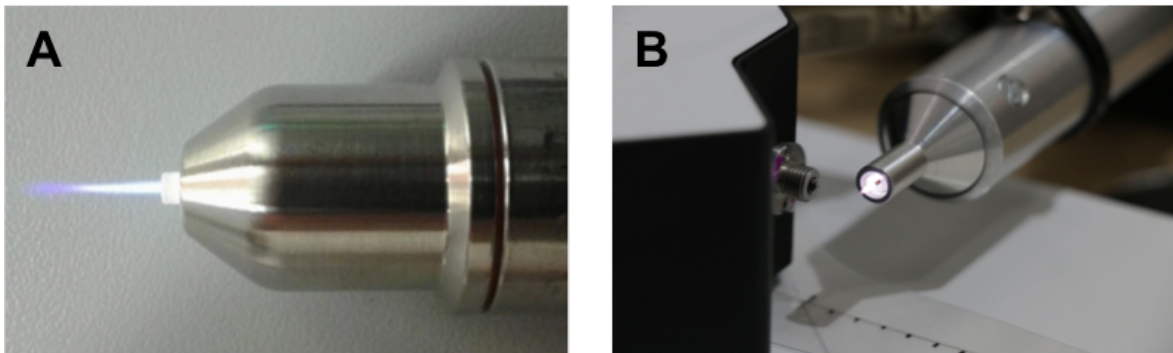
führt zu verkürzter Entladungsdauer und die Abdeckung der Elektroden mit einem Dielektrikum (z.B. Keramik) führt zu verminderter Stromdichte, wodurch einer Funkenbildung vorgebeugt werden kann.<sup>70</sup> Geringe Abstände bei der Elektrodenkonfiguration ermöglichen nach dem Paschen-Gesetz niedrigere Zündspannungen und externe Kühlsysteme können die Temperatur eines Plasmas zusätzlich reduzieren.<sup>71</sup> Das Zusammenwirken der beschriebenen Faktoren führt dazu, dass kein thermodynamisches Gleichgewicht erreicht wird und ermöglicht die Erzeugung von CAP unter atmosphärischen Druckverhältnissen.

### **1.2.2 Biologisch reaktive Bestandteile**

Die Entstehung reaktiver Bestandteile von CAP basiert auf unterschiedlichen physikalischen und chemischen Prozessen: Durch Anlage einer Spannung wird Energie, wie unter 1.2.1 beschrieben, mittels Elektronen auf Atome und Moleküle eines neutralen Trägergases (z.B. Argon) übertragen, was zur Reorganisation der elektronischen Struktur und zu Anregung sowie Ionisierung führt.<sup>61</sup> Die angeregten und ionisierten Spezies sowie die Elektronen reagieren – durch Kontakt mit umgebenden Medien wie z.B. Luft oder Flüssigkeiten – mit weiteren Atomen und Molekülen. Hierdurch wird eine Vielzahl verschiedener reaktiver Spezies generiert.<sup>72</sup> Von biologischer Relevanz sind vor allem reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (reactive oxygen species, ROS; reactive nitrogen species RNS), die physiologisch im menschlichen Körper vorkommen und von denen nachfolgend einige wichtige Vertreter genannt werden: Superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxyl-Radikal ( $\bullet OH$ ), Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ), Ozon ( $O_3$ ), organische Radikale ( $RO\bullet$ ,  $RO_2\bullet$ ), Stickstoffmonoxid ( $\bullet NO$ ), Stickstoffdioxid ( $\bullet NO_2$ ) und Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ).<sup>72,73</sup> Im Rahmen der Erzeugung von CAP entsteht elektromagnetische Strahlung, die einerseits als Licht emittiert wird, und so CAP für das menschliche Auge sichtbar macht, und andererseits in Form von UV-Strahlung oder elektrischen Feldern einen biologisch reaktiven Bestandteil von CAP darstellt.<sup>72,74</sup> Darüber hinaus enthält CAP weitere Bestandteile, die hinsichtlich der biologischen Reaktivität jedoch wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle einnehmen.<sup>74</sup>

### 1.2.3 CAP-Quellen

Nach Kong, et al. können grundsätzlich zwei Typen von CAP-Quellen unterschieden werden: Direkte CAP-Quellen und indirekte CAP-Quellen. Darüber hinaus existieren hybride Geräte, die Eigenschaften der beiden vorgenannten kombinieren. Während indirektes CAP zwischen zwei Elektroden erzeugt und anschließend zum Anwendungsgebiet transportiert wird, stellt bei direkten CAP-Quellen das Anwendungsgebiet selbst die Gegenelektrode bei der Erzeugung dar.<sup>68</sup> Es existiert eine Vielzahl verschiedener Geräte, von denen als direkte CAP-Quellen Geräte mit dielektrischer Barriereentladung (dielectric barrier discharge, DBD) und als indirekte CAP-Quellen atmosphärische Plasmajets (atmospheric pressure plasma jet, APPJ) im Bereich der Plasmamedizin vorwiegend eingesetzt werden.<sup>72</sup> Direkte CAP-Quellen wie DBD benötigen für die Anwendung spezifische Behandlungsabstände und möglichst ebene Zieloberflächen und eignen sich deshalb besonders beispielsweise zur oberflächlichen Behandlung an der Haut.<sup>69</sup> Da der klinische Einsatz von CAP beim OS unebene Oberflächen und schwierig erreichbare Anwendungsgebiete voraussetzt, sind für die Experimente der vorliegenden Arbeit zwei APPJ ausgewählt worden, deren spezifische Merkmale nachfolgend aufgeführt sind.<sup>67</sup>



**Abb. 3: CAP Quellen**

*Handinstrumente der eingeschalteten CAP Quellen kINPen MED (A) und MiniJet-R (B) mit ihren sichtbaren CAP Ausströmen; Abb. 3A mit freundlicher Genehmigung von M.B. Stope*

#### 1.2.3.1 kINPen MED

Der kINPen MED (neoplas tools GmbH, Greifswald, Deutschland; Abb. 3A) aus der kINPen-Serie besteht aus einem Handinstrument, einem



Hochfrequenzgenerator und einem Gaszufuhrsystem. CAP wird unter Anlage von 2 - 6 kV Spannung pulsierend mit einer Frequenz von 2,5 kHz bei einer Frequenzbelegungsdauer von 50 % erzeugt.<sup>71</sup> Mit Leistungen von < 8 W im Gesamtsystem und < 3,5 W im Handinstrument wird unter Verwendung von Argon als Trägergas bei einem Gasmengenstrom von 3 - 5 slm ein stabiler CAP-Ausstrom von 9 – 11 mm Länge aus dem Handinstrument generiert, der mit Temperaturen von 35 - 38 °C eine nicht-thermische und somit schmerzfreie und gewebeschonende Anwendung am Menschen erlaubt.<sup>75</sup>

### **1.2.3.2 MiniJet-R**

Der MiniJet-R (Heuermann HF-Technik GmbH, Aachen, Deutschland; Abb. 3B) ist ebenfalls ein APPJ, der CAP unter Verwendung des Trägergases Argon erzeugt. Entsprechend der Herstellerangaben erzeugt der Generator unter Verwendung einer Mikrowellenfrequenz von 2,45 GHz eine Leistung von 2 – 10 W.<sup>76</sup> Bei einem Gasmengenstrom von 0,2 – 2 slm wird ein stabiler CAP Ausstrom mit einer Länge von 10 – 12 mm generiert. Bei einer Temperaturentwicklung bis zu 40 °C ist auch mit dem MiniJet-R eine schmerzfreie und gewebeschonende Anwendung möglich.<sup>76</sup> Bisherige Anwendungsgebiete beinhalten lediglich Dekontamination und Oberflächenaktivierung, sodass im Rahmen dieser Arbeit erstmals biologische Effekte von CAP des MiniJet-R auf maligne Zellen charakterisiert werden.<sup>76</sup>

### **1.2.4 Biologische Effekte und medizinische Anwendungsgebiete von CAP**

In der Medizin findet CAP über zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze Anwendung in Forschung und Klinik: 1. medizintechnische Anwendung durch CAP Behandlung von Materialien, Oberflächen oder Geräten, die anschließend im medizinischen Bereich eingesetzt werden, und 2. therapeutische Anwendung von CAP an vitalen Zellen oder Geweben.<sup>77</sup> Dieser Arbeit zugrundeliegende Untersuchungen beziehen sich auf die therapeutische Anwendung von CAP, die aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen CAP-Quellen sowie verschiedenen biologischen Effekten ein heterogenes Forschungsfeld darstellt. Daraus ergibt sich eine breite Anwendungsperspektive in verschiedenen Fachgebieten der Medizin, deren Grundlage einige wiederkehrend in der Literatur beschriebene biologische Effekte von CAP sind.<sup>57,72,78,79</sup>

Die Inaktivierung einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen, inklusive multiresistenter Erreger, stellt einen der am häufigsten wissenschaftlich untersuchten biologischen Effekt von CAP *in vitro* dar und ist durch Untersuchungen *in vivo* belegt.<sup>80-82</sup> Darüber hinaus können durch CAP Behandlung Zellproliferation und Angiogenese stimuliert werden, was zur Förderung von Geweberegeneration und Wundheilung beiträgt.<sup>83-85</sup> Hieraus ergeben sich Anwendungsmöglichkeiten in der Dermatologie und plastischen Chirurgie, respektive zur Behandlung von infektiösen oder entzündlichen Hauterkrankungen sowie zur Behandlung chronischer und infizierter Wunden.<sup>79</sup> Im Gegensatz hierzu können durch CAP Zellproliferation und Angiogenese auch inhibiert werden, worauf hinsichtlich der onkologischen Anwendung von CAP unter 1.2.5 ausführlicher eingegangen wird.<sup>86,87</sup>

Einen weiteren vielseitigen Anwendungsbereich von CAP stellt die Zahnmedizin dar, wo neben intraoralen Infektionen und Entzündungen beispielsweise die Desinfektion von Wurzelkanälen und die Behandlung von Implantaten eine Rolle spielt.<sup>88,89</sup> Im Zentrum dieser Arbeit steht der Einfluss von CAP auf maligne Tumoren, auf den im nachfolgenden Absatz ausführlich eingegangen wird.

### **1.2.5 CAP in der Onkologie**

Dem seit mehreren Jahren wachsenden Interesse an CAP im Forschungsfeld der Onkologie liegen die Effekte von CAP bei der Interaktion mit malignen Zellen zugrunde. *In vitro* Untersuchungen mit malignen Zellen verschiedener Entitäten zeigen infolge CAP Behandlung eine Induktion von DNA-Schäden, Einschränkung von Zellviabilität, Inhibition von Zellproliferation und Angiogenese sowie Induktion von Zellzyklusarrest, Zellseneszenz, Apoptose und nicht-apoptotischem Zelltod.<sup>86,90-95</sup> Die *in vitro* nachgewiesenen Effekte konnten bereits teilweise *in vivo* bestätigt werden: So führte die CAP Behandlung in Experimenten im Maus-Modell zu einer Reduktion des Tumolvolumens bei Kopf-Hals-Tumoren sowie zu einer vollständigen Tumorablation bei Untersuchungen am Melanom.<sup>96,97</sup> Erste klinischen Anwendungen von CAP bei 12 Patienten mit palliativ therapierten Kopf-Hals-Tumoren durch Metelmann, et al. weisen darauf hin, dass CAP Behandlungen zu einer Reduktion des Analgetikabedarfs, Foetor und mikrobieller Besiedlung führen. Darüber hinaus traten in einigen Fällen oberflächliche Tumorremission und Wundheilung infizierter Ulcera infolge CAP Behandlungen

auf.<sup>98</sup> Die *in vitro* und *in vivo* demonstrierten Eigenschaften von CAP stellen die Grundlage für eine potentielle klinische Anwendung in der Therapie maligner Tumoren unterschiedlicher Entitäten dar, obgleich die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen weiterhin Gegenstand aktueller Forschungsprojekte sind.

Als Hauptmediatoren zytotoxischer CAP Effekte auf maligne Zellen gelten ROS/RNS, wenngleich andere CAP Bestandteile wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle spielen.<sup>99</sup> Dem entsprechend führt die Applikation antioxidativ wirksamer Substanzen zur Reduktion von CAP Effekten.<sup>100</sup> In Vorarbeiten mit dem kINPen MED, in denen antiproliferative Effekte von CAP ROS/RNS vermittelt auftraten, ließen sich diese Ergebnisse an OS-Zellen bestätigen.<sup>87,101</sup> Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der antiproliferativen Effekte von CAP auf OS-Zellen sind darüber hinaus weitgehend ungeklärt, indes an anderen Tumorentitäten die Induktion von Apoptose beschrieben wurde.<sup>71,102</sup> Vorarbeiten ergaben eine gesteigerte Expression von p53 sowie nukleäre Kondensation in OS-Zellen infolge der CAP Behandlung als erste Hinweise darauf, dass apoptotische Prozesse den antiproliferativen Effekten von CAP in OS-Zellen zugrunde liegen könnten.<sup>87</sup>

## **1.3 Apoptose**

### **1.3.1 Grundlagen**

Die Apoptose stellt als regulierte Form des Zelltods eine essentielle zelluläre Funktion dar, die dem Organismus die Kontrolle von Zellzahl und Gewebegröße ermöglicht und damit zur Aufrechterhaltung der Homöostase beiträgt.<sup>103-105</sup> Die ursprüngliche Beschreibung der Apoptose basiert auf den typischen zytomorphologischen Veränderungen, die infolge einer kaskadenartigen Aktivierung von Cystein-abhängigen Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen) auftreten.<sup>105,106</sup> Aktivierte Caspasen spalten Zielproteine selektiv an einer oder mehreren Stellen (gewöhnlich C-terminal von Aspartat), wodurch eine Inaktivierung oder seltener auch Aktivierung des jeweiligen Zielproteins hervorgerufen wird.<sup>105</sup> Zur Induktion von Apoptose in humanen Zellen werden allgemein zwei Signalkaskaden unterschieden, eine extrinsische und eine intrinsische, obgleich weitere Zelltod auslösende Mechanismen existieren.<sup>105</sup>

Die extrinsische Signalkaskade hat ihren Ursprung in der Aktivierung von transmembranösen Rezeptoren, insbesondere der Todesrezeptor-Superfamilie, wie beispielsweise Fas(CD 95).<sup>105</sup> Nach extrazellulärer Bindung eines entsprechenden Liganden wird auf der intrazellulären Seite des Rezeptors ein Signalkomplex gebildet, der zur Rekrutierung und Aktivierung von Procaspase-8 führt.<sup>105,107</sup> Die intrinsische Signalkaskade, beispielsweise ausgelöst durch DNA-Schäden oder metabolischen Stress, wird durch ein komplexes System an beteiligten Faktoren reguliert. Durch die Zusammensetzung von Proteinen der BCL-2 Familie an der äußeren mitochondrialen Membran, die einerseits proapoptotische (z.B. BAX, BAK) und andererseits antiapoptotische (z.B. BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>) Eigenschaften besitzen, wird die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol reguliert.<sup>105,108</sup> Dieser von einem komplexen System an Regulatoren gesteuerte Prozess wird als „mitochondrial outer membrane permeabilization“ (MOMP) bezeichnet.<sup>109</sup> Der bekannteste proapoptotische Faktor aus dem Intermembranraum der Mitochondrien, Cytochrom C, bildet nach Freisetzung in das Zytosol einen Komplex mit dem Apoptose Protease-aktivierenden Faktor 1 (Apaf-1) und Procaspase-9, der als Apoptosom bezeichnet wird und zur Aktivierung von Caspase-9 führt.<sup>105</sup>

Eine gegenseitige Beeinflussung der intrinsischen und extrinsischen Signalkaskaden mittels Mediatoren ist möglich und es existieren neben den bereits genannten weitere Caspasen, die an den Apoptose-auslösenden Mechanismen beteiligt sind.<sup>105,110</sup> Schließlich münden die extrinsische und intrinsische Signalkaskade mit der Aktivierung der Effektorcaspasen (Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7) durch Caspase-8 oder Caspase-9 in eine gemeinsame Endstrecke.<sup>105,110</sup> Effektorcaspasen aktivieren weitere Proteasen sowie Nukleasen, die letztendlich zur Degradation zellulärer Proteine und DNA führen.<sup>110</sup> Hieraus resultieren die typischen zytomorphologischen Veränderungen der Apoptose: Zellschrumpfung, Bläschenbildung der Zellmembran, Chromatinkondensation, Karyorrhexis und Ausbildung von Apoptosekörperchen.<sup>107</sup>

### **1.3.2 Apoptose in der Onkologie und onkologischen Therapie**

Nach Singh, et al. wird bei der Entstehung maligner Zellen zellulärer Stress erzeugt, der mit Akkumulation von DNA-Schäden sowie einem gesteigerten Wachstumsverhalten einhergeht. Zum Teil stimulieren an Proliferation und Zellwachstum beteiligte Regulatoren auch die Expression proapoptotischer Gene (z.B. MYC), sodass Zellen während der malignen Transformation gehäuft eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Apoptosesignalen aufweisen. Erhöhte Resistenz gegenüber dem physiologischen Regulationsmechanismus Apoptose wird deshalb als eine der zentralen Eigenschaften in der Entwicklung maligner Tumoren angesehen.<sup>108</sup> Maligne Zellen sind jedoch nicht grundsätzlich gegenüber Apoptose resistent. Intrinsische und extrinsische proapoptotischen Reize werden nur insoweit umgangen, dass das Überleben der Zelle gesichert ist.<sup>108,111</sup> Der vorherrschende onkogene Stress sowie zusätzlich Umweltstress (z.B. Hypoxie oder Nährstoffmangel), dem maligne Zellen häufig ausgesetzt sind, führen insgesamt zu einer gesteigerten Suszeptibilität gegenüber Apoptose, infolgedessen im Vergleich mit gesunden Zellen eine erhöhte Sensitivität für Chemo- oder Radiotherapie entsteht.<sup>108,111</sup> Die Induktion von Apoptose ist zentrale Eigenschaft etablierter onkologischer Therapien und stellt eine Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze dar.<sup>112</sup>

## 1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die molekulare und zelluläre Analyse der Effekte von CAP auf maligne OS-Zellen unter besonderer Berücksichtigung der Apoptoseinduktion. Hierzu werden die Effekte von CAP aus zwei unterschiedlichen CAP-Quellen auf OS-Zellen *in vitro* untersucht.

Die Hypothese, dass antiproliferative Effekte von CAP auf OS-Zellen mit der Induktion von Apoptose einhergehen, soll unter Beachtung der nachfolgenden Kriterien untersucht werden. Um größtmögliche Sicherheit für den Nachweis CAP induzierter Effekte unabhängig von den einzelnen beteiligten Variablen zu gewährleisten, sollen

- mehrere, unabhängige laborchemische Methoden zum Einsatz kommen,
- Prozesse in zeitlich verschiedenen Phasen der apoptotischen Kaskade betrachtet werden,
- unterschiedliche zelluläre und molekulare Mechanismen der apoptotischen Kaskade untersucht werden,
- die Untersuchungen anhand von zwei unabhängigen OS-Zelllinien durchgeführt werden sowie
- zwei unabhängige CAP-Quellen hinsichtlich ihrer Eigenschaften charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Absaugsystem VACUSAFE	Integra Biosciences (Biebertal)
ALPHAGAZ™ 1 Argon	Air Liquide Deutschland GmbH (Düsseldorf)
Autoklav VX150	Systemec (Wettenberg)
CASY Röhren	Roche Applied Science (Mannheim)
CASY TT Cell Counter and Analyzer	Roche Applied Science (Mannheim)
Eismaschine	Manitowoc (Manitowoc, USA)
Elektrophoresekammer GH101	biostep GmbH (Burkhardtshausen)
Falcon® 50 ml	BD Biosciences (Heidelberg)
Feinwaage ABS 120-4	Kern & Sohn (Balingen)
Glaspasteurpipette 230 nm	VWR International (Darmstadt)
Handschuhe	Hartmann (Heidenheim)
Heracell™ VIOS 160i CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
HS All-in-one Fluorescence Microscope BZ-9000E	Keyence (Neu-Isenburg)
kINPen MED	neoplas tools GmbH (Greifswald)
Klimageräte (4 °C, -20 °C, -80 °C, -140 °C)	Liebherr (Biberach an der Riß)
Lichtmikroskop	VWR International (Darmstadt)
Magnetrührer mit Heizplatte – IKA RCT classic	IKA®-Werke (Staufen)
MiniJet-R	Heuermann HF-Technik GmbH (Aachen)
pH-Meter™ FE20 FiveEasy	Mettler Toledo (Schwerzenbach)
Pipettensatz 0,5–1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen Multi-Flex Tips	Roth (Karlsruhe)
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)

Plattenleser Infinite® M200 PRO NanoQuant	Tecan Group Ltd. (Männedorf)
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 15 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
T75-Zellkulturflasche	Sarstedt (Nümbrecht)
TC Platte 24-Well	Sarstedt (Nümbrecht)
TC Platte 96-Well	Sarstedt (Nümbrecht)
Trevigen CometSlide™	Trevigen (Gaithersburg, MD, USA)
Vakuumpumpe Vacusafe	Integra Biosciences (Fernwald)
Waage EMB 2000-2	Kern & Sohn (Balingen)
Wärmeschrank	Memmert (Schwabach)
Wasserbad WNB10	Memmert (Schwabach)
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Micro Centrifuge	Carl Roth (Karlsruhe)

## 2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

**Tab. 5: Chemikalien und Lösungen**

Chemikalie/Lösung	Hersteller
10,000X SYBR® Gold in DMSO	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
CASYton®	Roche Applied Science (Mannheim)
CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
CometAssay® Kit (25 x 2-Well Objektträger)	Trevigen (Gaithersburg, MD, USA)
D(+)-Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10x (DPBS 10x)	PAN Biotech (Aidenbach)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w: Ca and Mg 10x (DPBS-CM 10x)	PAN Biotech (Aidenbach)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)



Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd 37 %	Carl Roth (Karlsruhe)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Konservierer für Wasserbäder	Carl Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid (Pellets)	Carl Roth (Karlsruhe)
TiterTACS™ Colorimetric Apoptosis Detection Kit	Trevigen (Gaithersburg, MD, USA)
TRIS-Hydrochlorid (TRIS-HCl)	Sigma-Aldrich (München)
Trypsin/EDTA 10x	PAN Biotech (Aidenbach)
Tween 20	Sigma-Aldrich (München)

### 2.1.3 Hergestellte Lösungen

**Tab. 6: Hergestellte Lösungen**

Lösung	Zusammensetzung
Alkaline Electrophoresis Solution (pH > 13)	Dest. H <sub>2</sub> O mit 8 g NaOH Pellets, 2 ml EDTA (500 mM, pH 8) auf 1 l Volumen
Alkaline Unwinding Solution (pH > 13)	Dest. H <sub>2</sub> O mit 0,4 g NaOH Pellets, 200 mM EDTA (im CometAssay® Kit enthalten) auf 50 ml Volumen
DPBS-CM 1x	Dest. H <sub>2</sub> O mit 10 % DPBS-CM 10x
DPBS-T	DPBS mit 0,1 % Tween 20
Formaldehyd 3,7 %	DPBS mit 5 ml Formaldehyd 37 %, 10 g D(+)-Saccharose, 4 ml DPBS 10x, 36 ml dest. H <sub>2</sub> O auf 50 ml Volumen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3 %	Methanol mit 10 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %

HCl 0,2 M	Verdünnung aus konz. HCl
Labeling Reaction Mix	Für eine Probe: 50 µl TdT Labeling Buffer 1x, 0,35 µl TdT dNTP Mix (im TiterTACS™ Kit enthalten), 1 µl Mn <sup>2+</sup> (im TiterTACS™ Kit enthalten), 0,35 µl TdT Enzyme (im TiterTACS™ Kit enthalten)
Reagenzlösung des CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent	DPBS-CM mit 5 % FCS, 10 µM CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent
Strep-HRP Solution	Für eine Probe: 50 µl Blue-Strep-Diluent (im TiterTACS™ Kit enthalten), 0,04 µl Strep-HRP (im TiterTACS™ Kit enthalten)
SYBR® Gold Staining Solution	1 µl 10,000X SYBR® Gold in DMSO 30 ml TE Puffer
TACS-Nuclease Solution	50 µl TACS-Nuclease Buffer (im TiterTACS™ Kit enthalten), 1 µl TACS Nuclease (im TiterTACS™ Kit enthalten)
TdT Labeling Buffer 1x	Dest. H <sub>2</sub> O mit 10 % TdT Labeling Buffer 10x (im TiterTACS™ Kit enthalten)
TdT Stop Buffer 1x	Dest. H <sub>2</sub> O mit 10 % TdT Stop Buffer 10x (im TiterTACS™ Kit enthalten)
TE-Puffer	Dest. H <sub>2</sub> O mit 10 mM TRIS-HCl 1 mM EDTA

#### 2.1.4 OS Zelllinien

Für die Durchführung der Experimente wurden zwei verschiedenen humane OS Zelllinien verwendet – die weniger aggressiv wachsende Zelllinie U2OS und die aggressiv wachsende Zelllinie MNNG/HOS.<sup>113</sup> Die Zelllinie U2OS wurde aus einem mäßig differenzierten OS der Tibia einer 15-jährigen Kaukasierin isoliert und besitzt *in vitro* ein adhärentes, epitheliales Wachstumsmuster.<sup>114</sup> U2OS-Zellen weisen hochgradige chromosomale Aberrationen auf und exprimieren unter anderem die Insulin-like growth factor Rezeptoren I und II sowie Antigene der Blutgruppe A, Rhesus positiv, HLA A2, Aw30, B12, Bw35 und B40.<sup>115</sup> Das

Proteom der Zellen besteht primär aus Enzymen, regulatorischen und RNA-assoziierten Proteinen sowie zu einem geringen Anteil aus Proteinen, die von Proto- und Antionkogenen codiert werden.<sup>116</sup>

Die Zelllinie MNNG/HOS stellt eine durch N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) chemisch modifizierte Form der HOS Zelllinie dar, die ursprünglich von einem OS des distalen Femur einer 13-jährigen Kaukasierin isoliert wurde.<sup>117,118</sup> MNNG/HOS-Zellen produzieren nach Injektion in Mäuse schlecht differenzierte OS und besitzen *in vitro* ein adhärentes, gemischt fibroblastisch-epitheliales Wachstumsmuster.<sup>119</sup> Im Gegensatz zu U2OS-Zellen bilden sie schneller größere Tumoren aus und haben eine stärkere Tendenz zu Koloniebildung und Invasion.<sup>113</sup>

**Tab. 7: OS Zelllinien**

Zelllinie	Hersteller
U2OS	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
MNNG/HOS	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

### 2.1.5 Zellkultivierung: Medien, Lösungen und Zusätze

**Tab. 8: Medien, Lösungen und Zusätze**

Produkt (Hersteller)	Zusammensetzung
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; PAN Biotech, Aidenbach)	DMEM mit 1,0 g/l Glukose, L-Glutamin, Na-Pyruvat, 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub>
Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach)	10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin
Fetales Kälberserum (FCS; Invitrogen, Darmstadt)	Gebrauchsfertig nach Hitzeaktivierung für 30 min bei 56 °C
Vollmedium	DMEM mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; PAN Biotech, Aidenbach)	Gebrauchsfertig

Kryokonservierungsmedium	DMEM mit 20 % FCS, 10 % DMSO
Fibronectin® (Sigma-Aldrich, München)	Gebrauchsfertig
Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, München)	Gebrauchsfertig
2xTrypsin	DPBS mit 20 % Trypsin/EDTA 10x

## 2.1.6 Software

**Tab. 9: Software**

Software	Hersteller
BZ-II Analyzer Software	Keyence (Neu-Isenburg)
I-control 1.9	Tecan Group Ltd. (Männedorf)
ImageJ	Open-source Software
OpenComet-plugin	Open-source Software
SPSS	IBM (Armonk, NY, USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultivierung

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente wurden an Zellen aus zwei humanen OS-Zelllinien U2OS und MNNG/HOS durchgeführt. Beide Zelllinien wurden in Vollmedium, bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum (FCS), kultiviert. Für adhärentes Zellwachstum wurden T75-Zellkulturflaschen, 24-Well-Platten und 96-Well-Platten vor Verwendung mit Poly-L-Lysin für U2OS-Zellen und mit Fibronectin für MNNG/HOS-Zellen beschichtet. Hierzu wurden die Wachstumsflächen der Materialien zunächst mit gebrauchsfertigen Lösungen an Poly-L-Lysin und Fibronectin (Sigma-Aldrich, München) bedeckt. Nach Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur (RT) wurde die überschüssige Lösung entfernt und die beschichteten Materialien trocken gelagert.

### **2.2.1.1 Kryokonservierung und Rekultivierung der Zellen**

Zellen der beiden OS-Zelllinien, U2OS und MNNG/HOS, wurden in niedriger Passage kryokonserviert. Je Kryokultur wurden  $3 \times 10^6$  Zellen, in 1 ml Kryokonservierungsmedium gelöst und zunächst auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt. Anschließend wurden die Kryokulturen auf  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und bei dieser Temperatur eingelagert.

Zur Rekultivierung der Zellen wurde eine Kryokultur für 20 s im Wasserbad ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) erwärmt und in 10 ml Vollmedium ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1000 U/min wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet in 1 ml Vollmedium resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde für die Rekultivierung in eine T75-Zellkulturflasche zu 19 ml Vollmedium ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hinzugegeben. Die anschließende Kultivierung der Zellen erfolgte bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Vor Einbringen in den Versuchsablauf wurden rekultivierte Zellen mindestens drei Mal passagiert.

### **2.2.1.2 Passagieren der Zellen**

Lichtmikroskopisch wurde das Wachstum der Zellen kontrolliert. Bei einer Konfluenz von 70 % bis 90 % erfolgte das Passagieren sowie gegebenenfalls Einbringen in den Versuchsablauf.

Hierzu wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgesaugt und die Wachstumsfläche der T75-Zellkulturflasche mit 10 ml auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmtem Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) gewaschen. Der adhärente Zellrasen wurde mit 1 ml 2xTrypsin bedeckt und für 3 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von 5 ml bis 13 ml Vollmedium aus der T75-Zellkulturflasche entnommen, wobei Verdünnungen im Verhältnis von 1:6 bis 1:14 entstanden. Für die nachfolgende Passage wurde 1 ml der hergestellten Zellsuspension zu 19 ml Vollmedium ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in eine neue T75-Zellkulturflasche gegeben und anschließend bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Aus der übrigen Zellsuspension wurden gegebenenfalls Zellen in den Versuchsablauf eingebracht. Für die durchgeführten Experimente wurden Zellen maximal bis zur Passage 30 verwendet.

### **2.2.2 Zellzahlbestimmung**

Um die angewandten Methoden reproduzieren zu können, war die Aussaat definierter Zellzahlen unabdingbar. Zellzahl pro Volumeneinheit von Zellsuspensionen können durch den CASY TT Cell Counter and Analyzer (Roche Applied Science, Mannheim) ermittelt werden. Neben der Zellzahl kann das Zellvolumen bestimmt werden, wodurch zwischen vitalen Zellen, Zellaggregaten, Zelldetritus und toten Zellen unterschieden werden kann. Für das Messprinzip wird die Eigenschaft der elektrischen Isolation von Zellmembranen vitaler Zellen verwendet. Eine mit Elektrolytlösung ausgefüllte Pore stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Wenn eine Zelle die Pore passiert, verdrängt sie Elektrolyte und generiert dadurch einen elektrischen Impuls. Amplitude und Dauer des elektrischen Impulses entsprechen der Quantität verdrängter Elektrolyte und ermöglichen somit die automatisierte Berechnung von Zellvolumen und Durchmesser der passierenden Zelle. Aufgrund ihrer individuellen Größe wurden U2OS-Zellen mit einem Durchmesser von 7,20 µm bis 13,95 µm und MNNG/HOS-Zellen mit einem Durchmesser von 7,20 µm bis 14,85 µm als vitale Zellen detektiert. Zur Zellzahlbestimmung wurden 100 µl der zu untersuchenden Zellsuspension in 10 ml CASYton pipettiert und die Probe analysiert. Unter Verwendung dieser definierten Volumina wurde die Zellkonzentration als Anzahl vitaler Zellen pro ml Zellsuspension im CASY TT Cell Counter and Analyzer ermittelt. Nach entsprechender Verdünnung konnten definierte Zellzahlen ausgesät und dadurch reproduzierbare Experimente durchgeführt werden.

### **2.2.3 CAP Behandlung**

#### **2.2.3.1 CAP Behandlung durch den kINPen MED**

Eine durch den kINPen MED zu behandelnde Zellsuspension, die wie unter 2.2.1.2 beschrieben aus dem Zellkultivierungsprozess entnommen wurde, wurde zunächst für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Das nach dem Verwerfen des Überstands verbliebene Zellpellet wurde in 4 ml Vollmedium (37 °C) resuspendiert und die Zellkonzentration, entsprechend der Beschreibung unter 2.2.2, bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension so mit Vollmedium (37 °C) verdünnt, dass 200 µl Volumen eine definierte Zellzahl – zwischen  $2 \times 10^4$  und  $8 \times 10^4$  Zellen – enthielten. Schließlich wurden jeweils 200 µl der Zellsuspension in ein Well einer

nicht-beschichteten 24-Well-Platte überführt, bevor die eigentliche Behandlung durch den kINPen MED durchgeführt werden konnte.

U2OS-Zellen wurden für 10 s und MNNG/HOS-Zellen für 20 s mit CAP oder Argon durch den kINPen MED bei einem Gasmengenstrom von 4 slm behandelt. Hierbei wurde der kINPen MED im Abstand von 0,5 cm in einer manuellen, standardisierten, halbmondförmigen Bewegung über die Zellsuspension geführt. Zu CAP-behandelten Zellen wurde stets ein Kontrollansatz hergestellt, indem Zellen aus derselben Passage mit dem Trägergas Argon behandelt wurden. Da die Zellen der Argon-Kontrollen denselben Umwelteinflüssen und demselben mechanischen Stress ausgesetzt waren wie CAP-behandelte Zellen, konnten auftretende Effekte mit größtmöglicher Sicherheit als CAP-abhängig bezeichnet werden.

Nach Behandlung mit CAP oder Argon wurde die Zellsuspension in eine beschichtete 24-Well- oder 96-Well-Platte überführt. Bei Überführung in eine 24-Well-Platte wurde zu jeder behandelten Zellsuspension (200 µl Volumen) 800 µl Vollmedium (37 °C) hinzugegeben, um das den Herstellerangaben entsprechende Füllvolumen von 1 ml einzuhalten. Behandelte Zellen wurden schließlich bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit für bis zu 120 h inkubiert.

### **2.2.3.2 CAP Behandlung durch den MiniJet-R**

Für Behandlungen durch den MiniJet-R wurden Zellsuspensionen, nachdem sie wie unter 2.2.1.2 erläutert aus der Zellkultur entnommen wurden, für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das verbliebene Zellpellet in 4 ml Vollmedium (37 °C) gelöst und die Zellkonzentration bestimmt. Anschließend wurde eine Verdünnung mit Vollmedium (37 °C) vorgenommen, sodass eine Zellsuspension mit einer definierten Zellzahl – zwischen  $2 \times 10^4$  und  $8 \times 10^4$  Zellen je 200 µl – entstand. Vor einer Behandlung durch den MiniJet-R wurden hiervon jeweils 200 µl in ein Well einer nicht beschichtete 96-Well-Platte pipettiert.

Eine Suspension von U2OS- oder MNNG/HOS-Zellen wurde für 30 s mit CAP oder Argon bei einem Gasmengenstrom von 1,5 slm behandelt. Hierzu wurde der MiniJet-R im Abstand von 0,2 cm zur Zellsuspension in einem Stativ eingespannt. Durch den MiniJet-R behandelte Zellsuspensionen wurden anschließend, entsprechend der Beschreibung unter 2.2.3.1, in beschichtete 24-Well- oder 96-

Well-Platten überführt und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit für bis zu 120 h inkubiert.

#### **2.2.4 Wachstumskinetik**

Um eine Wachstumskinetik zu erstellen, wurden jeweils sechs Proben mit  $2 \times 10^4$  Zellen, wie unter 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben, mit CAP oder Argon behandelt und in entsprechend beschichtete 24-Well-Platten überführt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit über 120 h. Zu den Zeitpunkten 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach Behandlung mit CAP oder Argon wurde die Anzahl vitaler Zellen ermittelt. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und der vorhandene Zellrasen mit 500 µl DPBS (37 °C) gewaschen. Nach Verwerfen des DPBS wurden die Zellen mit 500 µl 2xTrypsin (37 °C) bedeckt und für 3 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert, um Adhäsionen zur Wachstumsfläche sowie zwischen den Zellen zu lösen. Anschließend wurden die 500 µl 2xTrypsin – mit den darin gelösten Zellen – in ein Reagiergefäß überführt. Jedes Well wurde zweifach mit je 500 µl DPBS (37 °C) ausgespült und die Volumina in das entsprechende Reagiergefäß hinzugegeben. Eine so hergestellte Zellsuspension besaß ein Volumen von 1,5 ml. Die Zellkonzentration wurde, wie unter 2.2.2 beschrieben, bestimmt. Da die gemessene Zellkonzentration als Anzahl vitaler Zellen pro ml Zellsuspension vom CASY TT Cell Counter and Analyzer ausgegeben wird, wurde das Messergebnis zur absoluten Zellzahlbestimmung einer analysierten Probe mit dem Faktor 1,5 multipliziert.

#### **2.2.5 TUNEL-Assay**

Zur Charakterisierung CAP abhängiger molekularer Prozesse sollten DNA-Strangbrüche in Form freier 3'-OH-Gruppen im TUNEL-Assay quantifiziert werden. In der Versuchsvorbereitung wurden stets zwei Probensätze hergestellt. Mit einem Probensatz wurde der TUNEL-Assay durchgeführt, während aus dem zweiten die Anzahl vitaler Zellen zum Versuchszeitpunkt bestimmt wurden. Die Zellzahlbestimmung war für eine vergleichbare Auswertung der Ergebnisse notwendig, auf die weiter unten in diesem Abschnitt eingegangen wird. Für einen Probensatz wurden entweder  $5 \times 10^4$  Zellen für eine anschließende Inkubation von 24 h oder  $2,5 \times 10^4$  Zellen für eine anschließende Inkubation von 48 h, wie unter 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben, mit CAP oder Argon behandelt. Nach



Behandlung wurden die Zellen in eine beschichtete 96-Well-Platte überführt. Zur Herstellung von Kontrollen wurden drei Proben unbehandelter Zellen ausgesät. Nach Inkubation der Proben für 24 h oder 48 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit war die Versuchsvorbereitung abgeschlossen.

Der TUNEL-Assay wurde unter Verwendung des TiterTACS™ Colorimetric Apoptosis Detection Kit (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Zunächst wurde eine Probenpräparation und Fixierung der Zellen vorgenommen. Hierzu wurden die Proben für 3 min bei 2229 U/min zentrifugiert, das Medium verworfen und die Zellen in jedem Well mit 200 µl DPBS gewaschen. Nach Entfernen des DPBS erfolgte eine Inkubation mit 200 µl 3,7 % Formaldehyd je Well bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit für 9 min. Anschließend wurde das Formaldehyd verworfen und die Zellen erneut mit 200 µl DPBS je Well gewaschen. Nach Verwerfen des DPBS folgte eine Inkubation mit 100 µl Methanol (100 %) je Well für 20 min bei Raumtemperatur (RT). Durch zwei weitere Waschzyklen mit DPBS, zwischen denen die Zellen kurz bei 2229 U/min zentrifugiert wurden, wurden die Probenpräparation und Fixierung der Zellen abgeschlossen.

Im nächsten Versuchsabschnitt wurde die Positiv-Kontrolle hergestellt und anschließend die Markierung freier 3'-OH-Gruppen der DNA durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 50 µl Cytonin (im Kit enthalten) je Well für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2229 U/min für 3 min wurden die Überstände verworfen und die Zellen mit 200 µl destilliertem H<sub>2</sub>O je Well bedeckt. Nach erneuter Zentrifugation bei 2229 U/min für 3 min wurden die Überstände verworfen.

In ein Well, das unbehandelte Zellen enthielt, wurden 50 µl TACS-Nuclease Solution (Komponenten im Kit enthalten) hinzugegeben, während alle anderen Proben mit 200 µl DPBS bedeckt wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit für 45 min. Durch die Nuklease werden in der DNA große Mengen freier 3'-OH-Gruppen erzeugt und somit eine Positiv-Kontrolle hergestellt. Anschließend wurden die Zellen in zwei Zyklen mit je 200 µl DPBS gewaschen und bei 2229 U/min für 3 min zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände wurden alle Proben mit 50 µl 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bedeckt und bei RT für 5 min inkubiert. Erneut wurden die Proben mit je 200 µl DPBS gewaschen und für 3 min bei 2229 U/min zentrifugiert. Mit 150 µl 1xTdT Labeling Buffer (im Kit

enthalten) je Well wurden die Zellen bedeckt und nach Inkubation für 5 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit bei 2229 U/min für 3 min zentrifugiert. Die Markierung freier 3'-OH-Gruppen erfolgte nun durch Zugabe von 50 µl Labeling Reaction Mix (Komponenten im Kit enthalten) je Well und Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit für 1 h. Hierbei wurden pro Versuchsdurchgang jeweils zwei Negativ-Kontrollen hergestellt, indem der Labeling Reaction Mix für zwei unbehandelte Proben kein TdT-Enzym enthielt. Die Reaktion wurde nach 1 h Inkubation durch Zugabe von 150 µl 1xTdT Stop Buffer (im Kit enthalten) und erneute Inkubation für 5 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit beendet. Hierauf folgten nach Zentrifugation bei 2229 U/min für 3 min zwei Waschzyklen mit 200 µl DPBS je Well für alle Proben, zwischen denen wiederum jeweils für 3 min bei 2229 U/min zentrifugiert wurde. Jede Probe erhielt anschließend 50 µl Strep-HRP Solution (Komponenten im Kit enthalten) und wurde für 10 min bei RT inkubiert. Es folgten vier Waschzyklen mit 200 µl DPBS-T je Well, zwischen denen jeweils 3 min bei 2229 U/min zentrifugiert wurde.

Im abschließenden Versuchsabschnitt wurden freie 3'-OH-Gruppen in den verschiedenen Proben durch eine Farbreaktion quantifiziert. Zum Start der Reaktion wurde jedes Well mit dem Reaktionssubstrat, 100 µl TACS-Sapphire (im Kit enthalten), befüllt. Durch Absorptionsmessungen bei 630 nm im Plattenleser Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan Group Ltd., Männedorf) in Abständen von 1 min wurde eine Reaktionskinetik erstellt. Zunächst sind die an freien 3'-OH-Gruppen angelagerten Enzyme an Substrat gesättigt und zeigen einen linearen Anstieg der Absorption. Bei Verlassen des linearen Anstiegs der Positiv-Kontrolle wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 0,2 M HCl je Well gestoppt. Dadurch wurde ein Farbumschlag von blau nach gelb erzeugt, der den Endpunkt der Reaktion anzeigte. Nach Abschluss der Reaktion erfolgte schließlich die Absorptionsmessung bei 450 nm.

Da die Ergebnisse der Absorptionsmessung im TUNEL-Assay von der Anzahl untersuchter vitalen Zellen abhing, wurde aus den Proben der zweiten 96-Well Platte jeweils, wie unter 2.2.4 beschrieben, die Anzahl vitaler Zellen bestimmt. Das Verhältnis aus gemessener Absorption und der Anzahl vitaler Zellen der korrespondierenden Probe ergibt die relative Absorption. Die relative Absorption

stellt somit das Maß der Anzahl freier 3'-OH-Gruppen im Verhältnis zur Anzahl untersuchter vitaler Zellen zum Versuchszeitpunkt dar.

### **2.2.6 Caspase-Assay**

Im Caspase-Assay sollten CAP abhängige zelluläre Prozesse anhand der Aktivität von Caspase-3 und Caspase-7 (Caspase-3/7) untersucht werden. Zur Versuchsvorbereitung wurden  $5 \times 10^4$  Zellen für eine anschließende Inkubation von 24 h oder  $2,5 \times 10^4$  Zellen für eine anschließende Inkubation von 48 h, wie unter 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben, mit CAP oder Argon behandelt und anschließend in geeignet beschichtete 96-Well Platten überführt. Für Positiv-Kontrollen wurden unbehandelte Zellen mit Vollmedium versetzt, das 5 µg/ml Cycloheximid enthielt. Negativ-Kontrollen hingegen bestanden aus unbehandelten Zellen, die in Vollmedium kultiviert wurden. Es folgte eine Inkubation der Zellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit für 24 h oder 48 h. Für jeden Versuchsdurchgang wurden zwei 96-Well Platten präpariert, die äquivalent behandelte Proben enthielten. Mit einer der Platten wurde der Caspase-Assay durchgeführt, während aus der anderen die Anzahl vitaler Zellen, wie unter 2.2.4 beschrieben, bestimmt wurde. Analog zum TUNEL-Assay wurde die Anzahl vitaler Zellen für die Ergebnisauswertung verwendet, die weiter unten in diesem Abschnitt beschrieben ist.

Zur Durchführung des Caspase-Assay wurde das CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Zunächst wurde das überstehende Medium der vorbereiteten Proben verworfen und 100 µl der Reagenzlösung (37 °C), bestehend aus DPBS-CM mit 10 µM CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent und 5 % FCS, zu jeder Probe hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit für 45 min. Das Detektionsreagenz besteht aus einem Nukleinsäure-bindenden Farbstoff, der an ein Peptid konjugiert ist. Das Reagenz ist intrinsisch nicht fluoreszierend, bis das Peptid abgespalten und der Farbstoff an zelluläre DNA gebunden ist. Aktivierte Caspase-3/7 spalten die Bindung zwischen Peptid und Farbstoff auf, sodass die fluoregene Reaktion abläuft.

Die Fluoreszenzmessung jeder Probe erfolgte im Plattenleser Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan Group Ltd., Männedorf) durch Anregung bei 495 nm und

Emissionsmessung bei 535 nm. Da das Ergebnis der Fluoreszenzmessung analog zur Absorptionsmessung im TUNEL-Assay von der Zellzahl abhing, wurde aus den Proben der zweiten 96-Well Platte, wie unter 2.2.4 beschrieben, die Anzahl vitaler Zellen bestimmt. Das Verhältnis aus gemessener Emission und Anzahl vitaler Zellen der korrespondierenden Probe ergab die relative Fluoreszenz. Die relative Fluoreszenz stellte somit das Maß der Caspase-3/7 Aktivität im Verhältnis zur untersuchten Zellzahl dar.

### **2.2.7 Komet-Assay**

CAP abhängige Effekte auf die DNA von OS-Zellen sollten mittels Komet-Assay untersucht werden. In der Versuchsvorbereitung wurden  $5 \times 10^4$  Zellen für eine anschließende Inkubation von 24 h oder  $2,5 \times 10^4$  Zellen für eine anschließende Inkubation von 48 h mit CAP oder Argon, wie unter 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschrieben, behandelt und in geeignet beschichtete 96-Well Platten überführt. Daraufhin wurden die Zellen für 24 h oder 48 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Für die Durchführung des alkalischen Komet-Assay wurde das CometAssay® Kit (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Zu Beginn wurden definierte Anzahlen behandelte Zellen für den Versuch auf Objektträgern fixiert. Hierzu wurde zunächst das Medium verworfen und die Zellen mit 100 µl 2xTrypsin je Well für 3 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in ein Reagiergefäß überführt und jedes Well zweifach mit 200 µl Vollmedium (37 °C) ausgespült, sodass Zellsuspensionen mit Volumina von 500 µl entstanden. Die Zellkonzentrationen der Suspensionen wurden, wie unter 2.2.2 beschrieben, bestimmt. Von jeder Zellsuspension wurde ein  $1 \times 10^5$  Zellen enthaltendes Volumen in ein neues Reagiergefäß überführt und für 3 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die entstandenen Zellpellets in je 500 µl DPBS (4 °C) resuspendiert. Low Melting Point Agarose (LMA, im Kit enthalten) wurde zu Beginn des Versuchs bei 95 °C im Wasserbad zum Schmelzen gebracht und anschließend für mindestens 20 min in einem Wasserbad auf 37 °C heruntergekühlt. Jeweils 40 µl flüssige LMA wurden mit 10 µl einer Zellsuspension (entspricht ca. 2000 Zellen) vermischt und umgehend auf

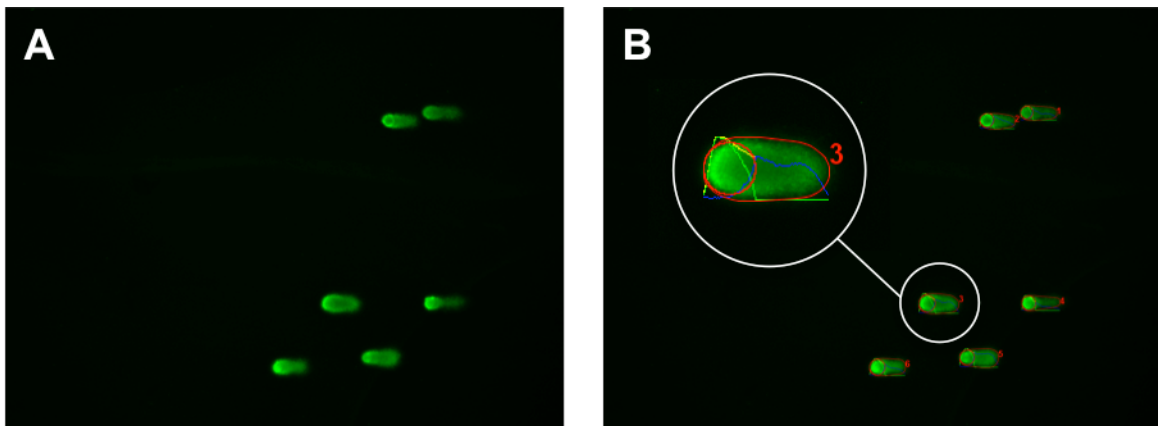
einen Objektträger (im Kit enthalten) aufgetragen. Es folgte eine Inkubation der Objektträger bei 4 °C für 20 min im Dunkeln.

Im nächsten Versuchsabschnitt erfolgte die Lyse der in LMA eingebetteten Zellen sowie die Auflösung der doppelsträngigen DNA Struktur in alkalischem Milieu. Hierzu wurden die Objektträger in je 8 ml Lysis Solution (4 °C, im Kit enthalten) getaucht und für 60 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Abtropfen der überschüssigen Lösung wurden die Objektträger in je 8 ml Alkaline Unwinding Solution getaucht und für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Für die anschließende elektrophoretische Auftrennung der DNA wurden die Objektträger in einer Elektrophoresekammer platziert und diese mit Alkaline Electrophoresis Solution befüllt, sodass die Objektträger davon bedeckt waren. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 14 V für 15 min. Hierbei wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Kleine DNA-Fragmente laufen in der Elektrophorese schneller und damit weiter in Richtung Anode als größere DNA-Fragmente. Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger zweifach in destilliertem H<sub>2</sub>O und einfach in 70 % Ethanol für jeweils 5 min vorsichtig gewaschen und bei 37 °C für 15 min getrocknet.

Zur Visualisierung und Analyse der DNA-Integrität wurde die DNA abschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Hierzu wurde jedes Probenareal mit 100 µl verdünnter SYBR® Gold Staining Solution bedeckt und die Objektträger für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger vorsichtig in destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen und für weitere 15 min bei 37 °C getrocknet.

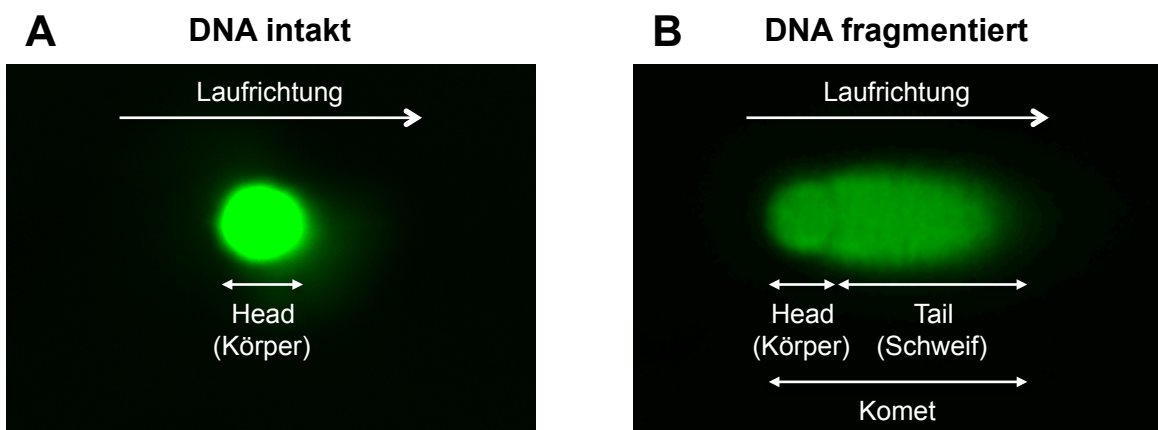
Die Proben wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht und je Probe 10 zufällig ausgewählte Bildausschnitte für die automatisierte Analyse der DNA-Integrität dokumentiert. Die Bildausschnitte wurden unter Verwendung des OpenComet-Plugins im Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (U.S. National Institutes of Health) analysiert (Abb. 4).



**Abb. 4: Automatisierte Detektion und Analyse von DNA einzelner Zellen**

Dargestellt ist ein zufällig ausgewählter Bildausschnitt einer Probe aus dem Komet-Assay (A). Angefärbte DNA wird fluoreszenzmikroskopisch grün abgebildet. Mittels OpenComet-plugin wurde die DNA einzelner Zellen im Bildverarbeitungsprogramm ImageJ automatisiert detektiert und analysiert (B). Zur besseren Visualisierung ist Komet 3 beispielhaft vergrößert worden (weiße Markierungen).

Durch die Software erfolgte eine automatisierte Analyse der gefärbten DNA-Struktur jeder einzelnen im Bildausschnitt gelegenen Zelle. Intakte DNA vitaler Zellen stellt sich hierbei als rundliche, gleichmäßig gefärbte Struktur dar (Abb. 5A). Im Gegensatz dazu imponiert fragmentierte DNA einer Zelle als so genannter Komet (Abb. 5B).



**Abb. 5: Prinzip des Komet-Assay**

DNA wurde im Komet-Assay elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff dargestellt. Intakte DNA (A) imponiert als rundliche, gleichmäßig gefärbte Struktur, indes fragmentierte DNA (B) die typische Kometenform ausbildet.

Ein Komet besteht aus einer rundlichen, gleichmäßig gefärbten Struktur (Kometenkörper) und einer daran angeschlossenen länglichen, weniger stark fluoreszierenden Struktur (Kometenschweif). Entsprechend der elektrophoretischen Laufrichtung bildet der Kometenkörper größere DNA-Fragmente (zur Kathode gelegen) und der Kometenschweif kleinere DNA-Fragmente (zur Anode gelegen) ab. Mittels OpenComet-plugin können im Bildverarbeitungsprogramm ImageJ Flächen sowie Signalintensitäten von Kometenkörper und Kometenschweif automatisiert detektiert werden.

Aus der Signalintensität pro Fläche im Kometenschweif und der Signalintensität pro Fläche des gesamten Kometen wird ein Quotient gebildet, der als % Tail-DNA angegeben ist. % Tail-DNA stellt somit den im Komet-Assay detektierten Anteil fragmentierter DNA einer Einzelzelle im Verhältnis zur gesamten DNA jener Zelle dar und wird als Parameter zur Untersuchung von DNA-Strangbrüchen im Komet-Assay herangezogen.

### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Software SPSS (IBM, Armonk, NY, USA). Zunächst wurden die statistisch zu untersuchenden Daten in die Software importiert und eine explorative Datenanalyse durchgeführt. Hierbei wurden zwei zu vergleichende Stichproben mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  auf Normalverteilung getestet. In Abhängigkeit der Testergebnisse wurden anschließend entweder parametrische oder nicht-parametrische Testverfahren angewendet.

Sofern sowohl der Kolmogorov-Smirnov-Test als auch der Shapiro-Wilk-Test nicht signifikant auf nicht-normalverteilte Daten hinwiesen, wurden parametrische Tests verwendet. In diesem Fall wurden die Stichproben zunächst mittels Levene-Test auf Gleichheit der Varianzen bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  überprüft. Ergab der Levene-Test ein signifikantes Ergebnis ( $p \leq 0,05$ ) – also eine hohe Wahrscheinlichkeit auf Unterschiede der Varianzen beider Stichproben – wurden sie mittels Welch-Test miteinander verglichen. Wurde im Levene-Test hingegen kein signifikanter Hinweis auf unterschiedliche Varianzen der Stichproben gefunden, erfolgte der Vergleich zweier Stichproben mittels Zweistichproben-T-Test.

Zeigte sich initial bei der explorativen Datenanalyse entweder im Kolmogorov-Smirnov-Test oder im Shapiro-Wilk-Test ein signifikantes Ergebnis ( $p \leq 0,05$ ) – es bestand also eine hohe Wahrscheinlichkeit für nicht-normalverteilte Daten – wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Rangsummentest zum Vergleich zweier Stichproben herangezogen.

Für alle verwendeten statistischen Testverfahren wurden folgende Signifikanzniveaus festgelegt:  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*).

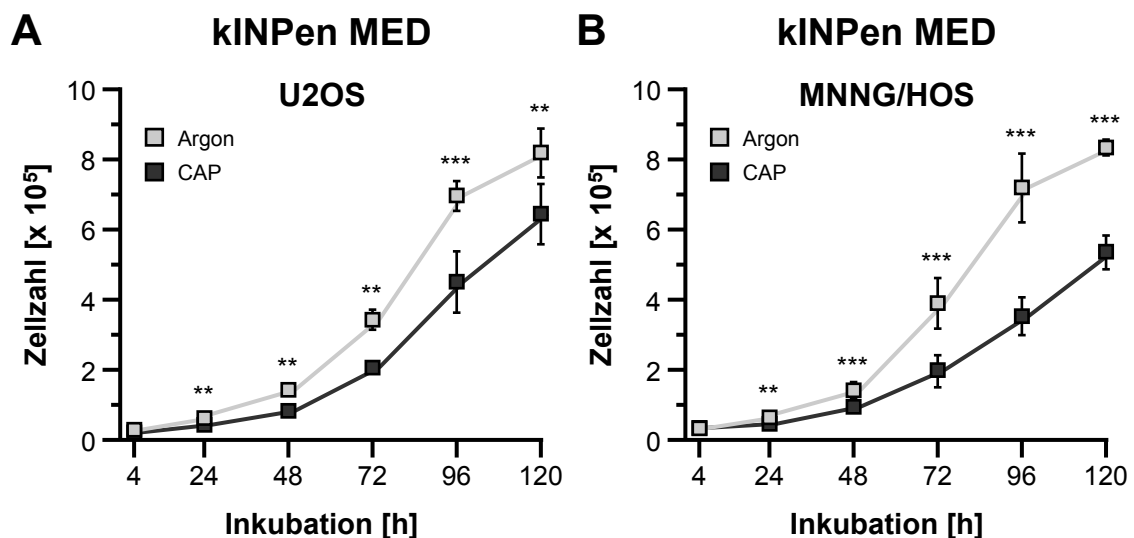


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Antiproliferative Effekte von CAP des kINPen MED und MiniJet-R

Ein zentraler Bestandteil der Therapie von Malignomen ist die Hemmung des Tumorwachstums. Für die CAP-Quelle kINPen MED sind inhibierende Effekte auf die Zellproliferation bereits in mehreren Tumorentitäten nachgewiesen worden. Bei der Behandlung von U2OS- und MNNG/HOS-Zellen mit dem kINPen MED konnten nach 4 h noch keine signifikanten CAP-Effekte beobachtet werden (Abb. 6). Zwischen 24 h und 120 h Inkubation zeigte sich jedoch zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine statistisch signifikante Reduktion des Zellwachstums CAP-behandelter Zellen verglichen mit Argon-behandelten Kontrollansätzen. Dies betraf sowohl U2OS- (Abb. 6A) als auch MNNG/HOS-Zellen (Abb. 6B).

Experimentelles Ziel war eine möglichst äquivalente Inhibition der Zellproliferation in beiden Zelllinien, um die biologischen Effekte von CAP in U2OS- und MNNG/HOS-Zellen vergleichend betrachten zu können. MNNG/HOS-Zellen wurden deshalb mit 20 s doppelt so lange behandelt wie U2OS-Zellen.

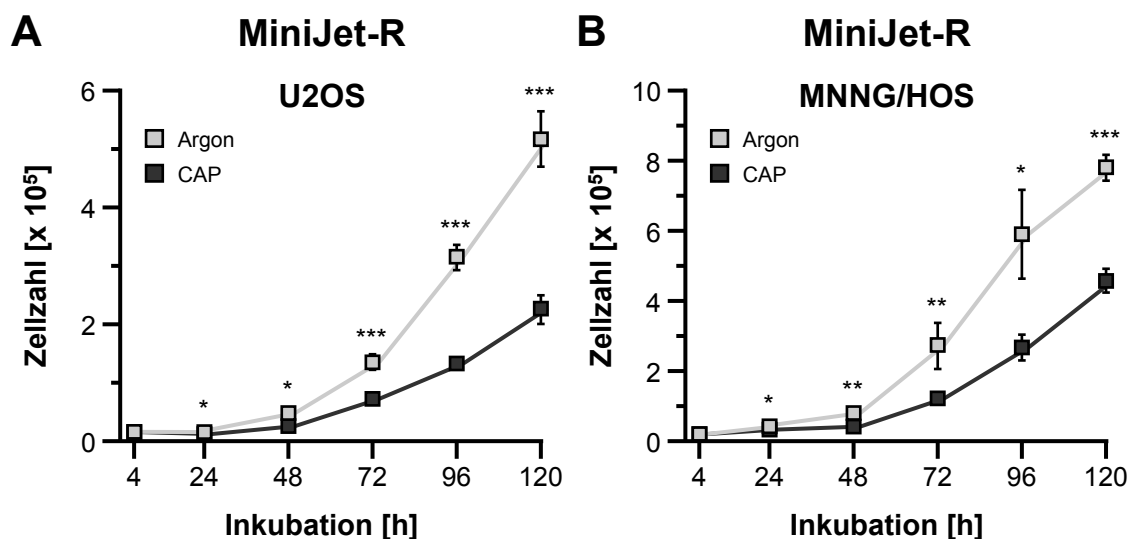


**Abb. 6: kINPen MED – Wachstumskinetik von U2OS- und MNNG/HOS-Zellen**

U2OS-Zellen wurden für 10 s (A) und MNNG/HOS-Zellen für 20 s (B) mit CAP oder dem Trägergas Argon behandelt und für 4 h bis 120 h inkubiert. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurden die Zellzahlen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als signifikant gewertet.

Verschiedene CAP-Quellen erzeugen CAP mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften. Auf zellbiologische Prozesse waren deshalb ungleiche Einflüsse von CAP aus verschiedenen Geräten denkbar. Die CAP-Quelle MiniJet-R ist bislang noch nicht hinsichtlich antiproliferativer Eigenschaften charakterisiert worden und sollte mit dem kINPen MED verglichen werden.

Bei Behandlungen mit dem MiniJet-R ergaben sich nach 4 h Inkubation keine signifikant abweichenden Einflüsse zwischen Argon und CAP auf das Zellwachstum (Abb. 7). Zwischen 24 h und 120 h Inkubation wurde die Proliferation jedoch in beiden Zelllinien infolge der CAP-Behandlung signifikant inhibiert. Darüber hinaus wurde sowohl in U2OS- als auch in MNNG/HOS-Zellen die mittlere inhibitorische Dosis ( $ID_{50}$ ) von CAP des MiniJet-R bei einer Behandlungsdauer von 30 s erreicht.



**Abb. 7: MiniJet-R – Wachstumskinetik von U2OS- und MNNG/HOS-Zellen**

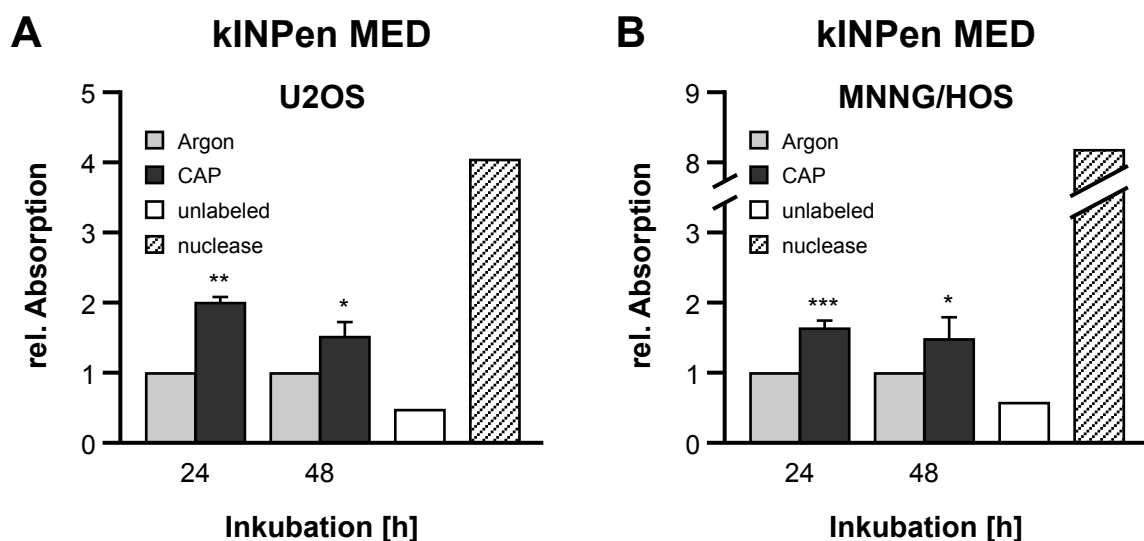
U2OS- (A) und MNNG/HOS-Zellen (B) wurden für 30 s mit CAP oder dem Trägergas Argon behandelt und für 4 h bis 120 h inkubiert. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurden die Zellzahlen bestimmt. Dargestellt sind  $MW \pm SD$  aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als signifikant gewertet.

Ogleich die Behandlungsdauern von kINPen MED und MiniJet-R nicht identisch waren, konnten mit beiden Geräten antiproliferative Effekte von CAP auf OS-Zellen gezeigt werden. Im Folgenden sollten die beiden CAP-Quellen hinsichtlich ihrer zellulären und molekularen Eigenschaften vergleichend untersucht werden.

### 3.2 Analyse CAP-induzierter DNA-Strangbrüche mittels TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay wird im Kontext zellbiologischer Prozesse für die Charakterisierung von Apoptose verwendet. Indes im Komet-Assay unspezifisch DNA-Strangbrüche untersucht werden, ermöglicht der TUNEL-Assay eine selektive Quantifizierung freier 3'-OH-Gruppen in der DNA. Hierzu werden Enzyme an freie 3'-OH-Gruppen angelagert und anschließend geeignete Substrate zugeführt, die nach Umsetzung einen Farbumschlag erzeugen. Die Absorption des Reaktionsprodukts korreliert mit der Anzahl freier 3'-OH-Gruppen und wird zur Beurteilung von DNA-Strangbrüchen mittels TUNEL-Assay verwendet.

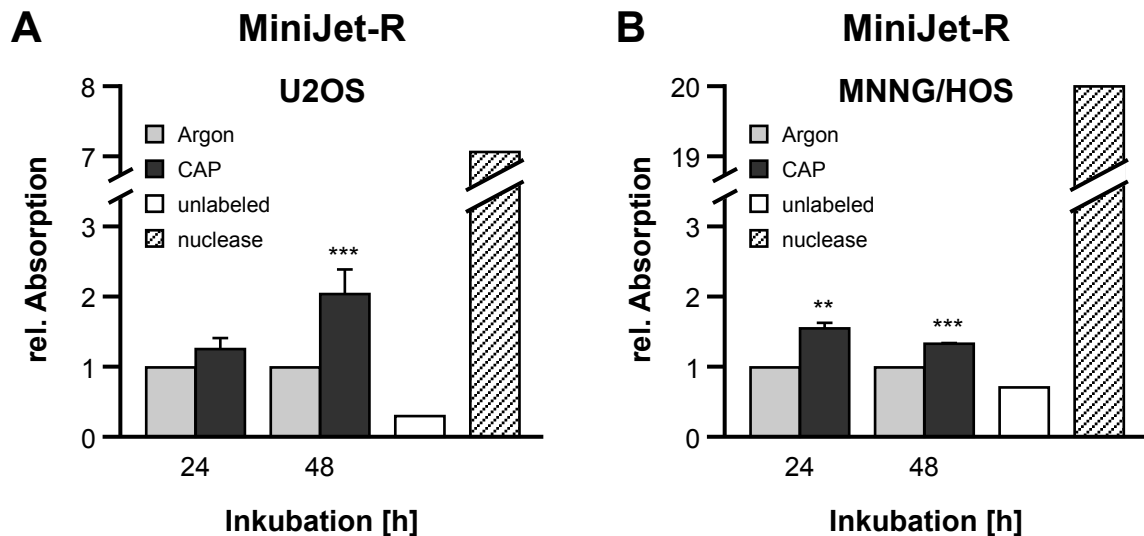
Beim kINPen MED wurden Strangbrüche in Form freier 3'-OH-Gruppen 24 h und 48 h nach Behandlung signifikant durch CAP induziert. Dieser Effekt zeigte sich sowohl in U2OS- (Abb. 8A) als auch MNNG/HOS-Zellen (Abb. 8B).



**Abb. 8: kINPen MED – TUNEL-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen**

U2OS-Zellen wurden für 10 s (A) und MNNG/HOS-Zellen für 20 s (B) mit Argon oder CAP behandelt und für 24 h und 48 h inkubiert. DNA-Strangbrüche im Form freier 3'-OH-Gruppen wurden mittels TUNEL-Assay in mindestens zwei unabhängigen Experimenten untersucht. Dargestellt sind MW + SD der relativen Absorption (pro Zellzahl) nach CAP-Behandlung im Verhältnis zur Argon-Behandlung sowie negative und positive Kontrollen. Statistische Unterschiede mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als signifikant gewertet.

Obgleich beim MiniJet-R in U2OS-Zellen nach 24 h noch keine signifikanten Unterschiede zwischen CAP und Argon beobachtet wurden, zeigten sich 48 h nach CAP-Behandlung signifikant mehr freie 3'-OH-Gruppen als in den Argon-behandelten Kontrollen (Abb. 9A). Demgegenüber wurde in MNNG/HOS-Zellen zu beiden Zeitpunkten ein signifikanter Anstieg freier 3'-OH-Gruppen durch die CAP-Behandlung hervorgerufen (Abb. 9B).



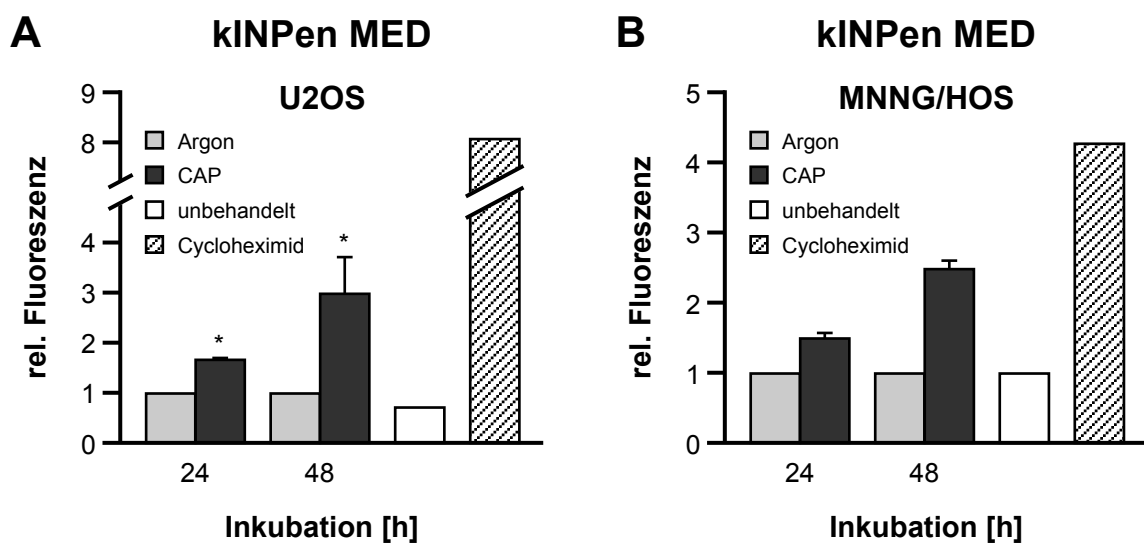
**Abb. 9: MiniJet-R – TUNEL-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen**

U2OS- (A) und MNNG/HOS-Zellen (B) wurden für 30 s mit Argon oder CAP behandelt und für 24 h und 48 h inkubiert. DNA-Strangbrüche im Form freier 3'-OH-Gruppen wurden mittels TUNEL-Assay in mindestens drei unabhängigen Experimenten untersucht. Dargestellt sind MW + SD der relativen Absorption (pro Zellzahl) nach CAP-Behandlung im Verhältnis zur Argon-Behandlung sowie negative und positive Kontrollen. Statistische Unterschiede mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als signifikant gewertet.

### 3.3 CAP stimuliert die Apoptose-assoziierten Proteasen Caspase-3/7

Caspase-3/7 sind zentrale Effektoren in der apoptotischen Kaskade. Das intrinsisch nicht fluoreszierende CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Molecular Probes™) kann nach Abspaltung eines Tetrapeptids, die spezifisch durch Caspase-3/7 erfolgt, an DNA binden und eine fluorogene Reaktion hervorrufen. Die Intensität der Fluoreszenz dient als Maß für die Aktivität von Caspase-3/7.

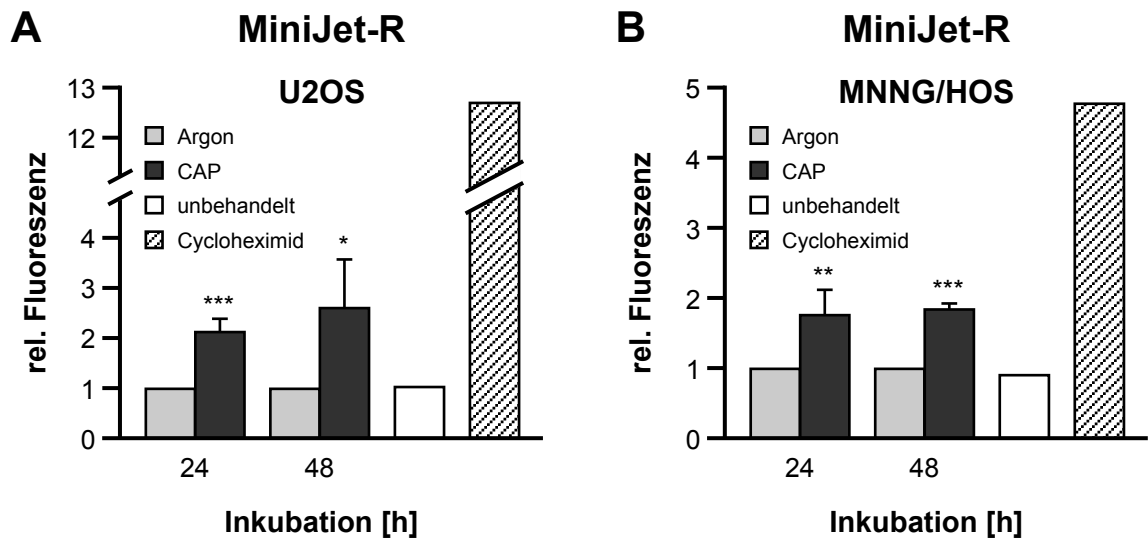
Durch Behandlung mit CAP des kINPen MED wurde die Caspase-3/7-Aktivität in U2OS-Zellen nach 24 h und 48 h im Vergleich zu Argon-Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 10A). MNNG/HOS-Zellen zeigten nach CAP-Behandlung vergleichbare Anstiege in der Aktivität von Caspase-3/7, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwiesen (Abb. 10B).



**Abb. 10: kINPen MED – Caspase-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen**

U2OS-Zellen wurden für 10 s (A) und MNNG/HOS-Zellen für 20 s (B) mit Argon oder CAP behandelt und für 24 h und 48 h inkubiert. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde mittels Caspase-Assay in mindestens drei unabhängigen Experimenten untersucht. Dargestellt sind MW + SD der relativen Fluoreszenz (pro Zellzahl) nach CAP-Behandlung im Verhältnis zur Argon-Behandlung sowie negative und positive Kontrollen. Statistische Unterschiede mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als signifikant gewertet.

Mit dem MiniJet-R wurde die stimulierende Eigenschaft von CAP auf Caspase-3/7 bestätigt. Sowohl U2OS- als auch MNNG/HOS-Zellen zeigten infolge CAP-Behandlung signifikant mehr Caspase-3/7-Aktivität als Argon-behandelte Kontrollansätze (Abb. 11).



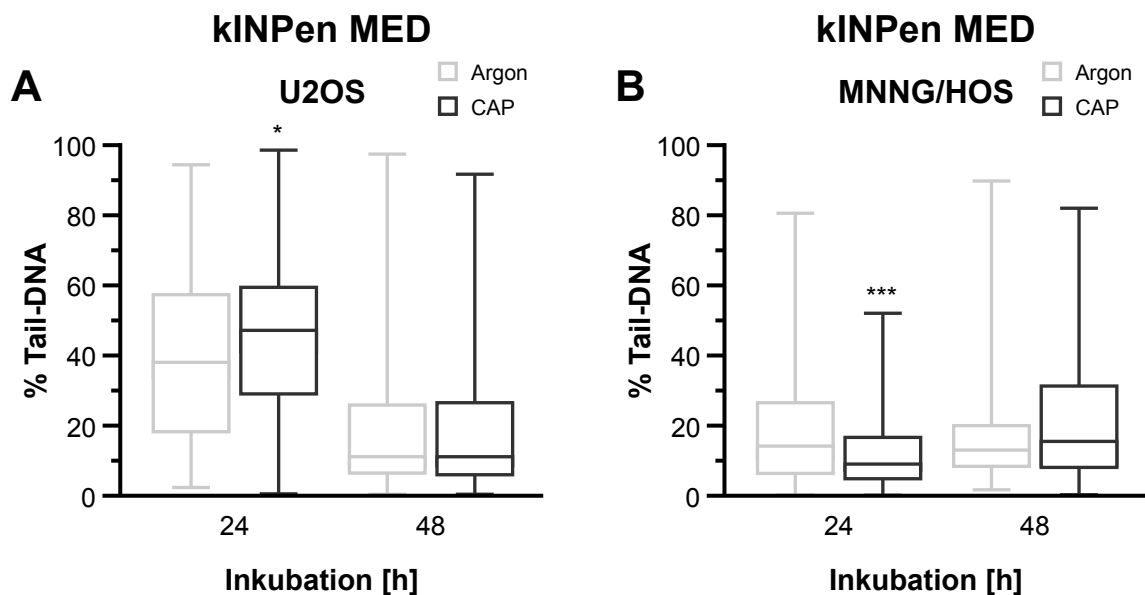
**Abb. 11: MiniJet-R – Caspase-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen**

U2OS- (A) und MNNG/HOS-Zellen (B) wurden für 30 s mit Argon oder CAP behandelt und für 24 h und 48 h inkubiert. Die Caspase-3/7-Aktivität wurde mittels Caspase-Assay in mindestens drei unabhängigen Experimenten untersucht. Dargestellt sind MW + SD der relativen Fluoreszenz (pro Zellzahl) nach CAP-Behandlung im Verhältnis zur Argon-Behandlung sowie negative und positive Kontrollen. Statistische Unterschiede mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als signifikant gewertet.

### 3.4 Analyse CAP-induzierter DNA-Strangbrüche mittels Komet-Assay

DNA-Strangbrüche können sowohl als direkter Effekt einer CAP Behandlung als auch infolge CAP-induzierter apoptotischer Prozesse entstehen. Hinsichtlich eines klinischen Einsatzes von CAP sind dessen Auswirkungen auf die DNA deshalb von entscheidender Bedeutung. Im Komet-Assay wird fragmentierte von intakter DNA elektrophoretisch getrennt und durch Fluoreszenzfärbung dargestellt. Das Verhältnis zwischen fragmentierter DNA (Kometenschweif) und gesamter DNA einer Zelle wird als % Tail-DNA zur Bewertung von Strangbrüchen herangezogen.

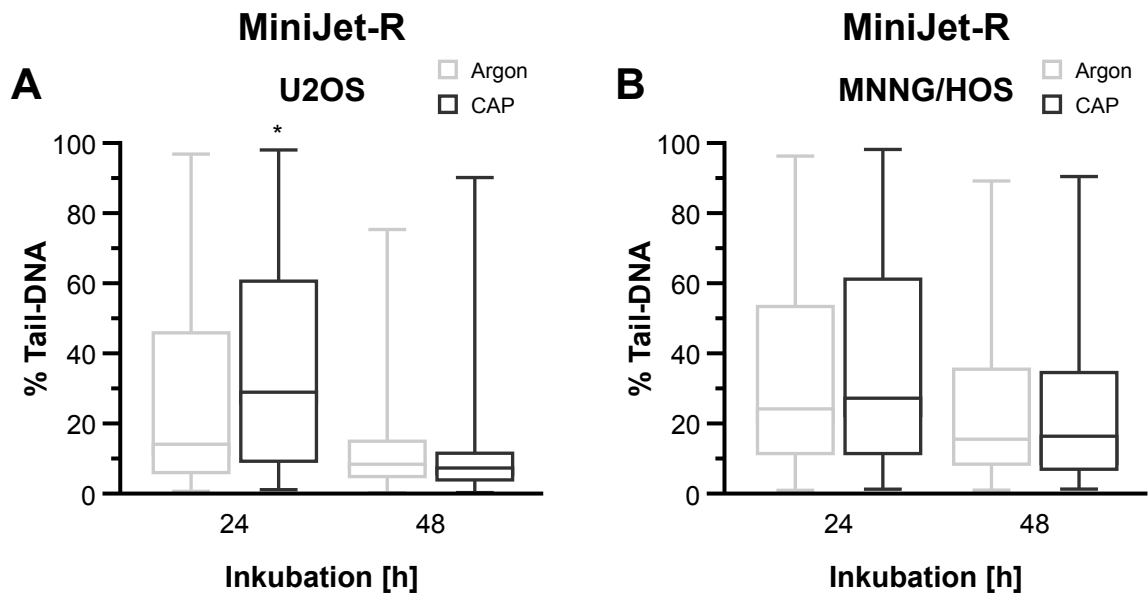
Beim kINPen MED wurden in U2OS-Zellen 24 h nach CAP-Behandlung signifikant mehr Strangbrüche detektiert als in den Argon-behandelten Kontrollen, indessen bei MNNG/HOS-Zellen gegenteilige Effekte auftraten (Abb. 12). Nach 48 h konnten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen Argon und CAP beobachtet werden.



**Abb. 12: kINPen MED – Komet-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen**

U2OS-Zellen wurden für 10 s (A) und MNNG/HOS-Zellen für 20 s (B) mit Argon oder CAP behandelt und für 24 h und 48 h inkubiert. % Tail-DNA wurde von mindestens 100 Einzelzellen aus zwei unabhängigen Experimenten im alkalischen Komet-Assay ermittelt. Statistische Unterschiede mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als signifikant gewertet.

Infolge der Behandlung mit CAP des MiniJet-R zeigten U2OS-Zellen nach 24 h Inkubation ebenfalls signifikant häufiger Strangbrüche als Kontroll-Zellen (Abb. 13A). Jedoch wurden weder nach 48 h bei U2OS-Zellen noch an beiden Untersuchungszeitpunkten bei MNNG/HOS-Zellen weitere signifikante Effekte von CAP festgestellt (Abb. 13).



**Abb. 13: MiniJet-R – Komet-Assay mit U2OS- und MNNG/HOS-Zellen**

U2OS- (A) und MNNG/HOS-Zellen (B) wurden für 30 s mit Argon oder CAP behandelt und für 24 h und 48 h inkubiert. % Tail-DNA wurde von mindestens 100 Einzelzellen aus zwei unabhängigen Experimenten im alkalischen Komet-Assay ermittelt. Statistische Unterschiede mit  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als signifikant gewertet.



## 4 Diskussion

CAP erhält seit Jahren wachsende Aufmerksamkeit in der biomedizinischen Grundlagenforschung aufgrund seiner vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten.<sup>73,120,121</sup> Inzwischen konnte gezeigt werden, dass CAP großes Potential im Anwendungsbereich der onkologischen Therapie besitzt.<sup>122-125</sup> Die Grundlage hierfür stellen inhibitorische Wirkungen auf das Tumorwachstum dar, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei verschiedenen Tumorentitäten beobachtet wurden.<sup>92,126,127</sup>

Im Einklang mit bestehender Literatur wurden signifikante antiproliferative Effekte von CAP des kINPen MED auf OS-Zellen zwischen 24 h und 120 h nach Behandlung beobachtet.<sup>87</sup> Darüber hinaus ergaben Experimente mit der CAP-Quelle MiniJet-R, deren biologische Effekte auf Tumorzellen nach unserem Wissen erstmalig untersucht wurden, ebenfalls eine signifikante Reduktion des Wachstums von OS-Zellen infolge CAP-Behandlung. Um vergleichbare antiproliferative Effekte als Grundlage für weiterführende Untersuchungen zu erzielen, wurden Zellen mit dem MiniJet-R teils mehr als doppelt so lange behandelt als mit dem kINPen MED. Eine vergleichbare Abhängigkeit vom Ausmaß der antiproliferativen Wirkung zur Behandlungsdauer konnte für die beiden CAP-Quellen inzwischen anhand weiterer Zelllinien bestätigt werden (unpublizierte Daten). Ursache hierfür können sowohl abweichende experimentelle Bedingungen als auch Unterschiede zwischen den CAP-Quellen selbst darstellen, die neben ihrem geometrischen Aufbau nach Plasmatyp, Anregungsfrequenz und Anregungsmuster sowie ihrem Trägergas klassifiziert werden.<sup>128</sup> Obgleich die untersuchten CAP-Quellen nicht identisch aufgebaut sind, erzeugen beide CAP unter Verwendung des Trägergases Argon. In der physikalischen Klassifizierung nach Anregungsfrequenz und Anregungsmuster können die beiden Geräte jedoch eindeutig voneinander abgegrenzt werden: Der kINPen MED erzeugt CAP pulsierend bei einer Frequenz von 2,5 kHz, indes der MiniJet-R CAP bei 2,41 GHz generiert und damit zu den unter Mikrowellenfrequenz arbeitenden Quellen gehört.<sup>129</sup> Die Anregungsfrequenz beeinflusst Eigenschaften eines CAP wie beispielsweise die Dichte unterschiedlicher reaktiver Spezies oder die Temperatur maßgeblich – dies stellt einen plausiblen Erklärungsansatz für die abweichenden Behandlungsdauern der CAP-Quellen bei vergleichbaren antiproliferativen

Effekten innerhalb einer Zelllinie dar.<sup>128</sup> Darüber hinaus unterscheiden sich Zelllinien in ihrer Sensibilität gegenüber CAP einer CAP-Quelle, wie die verschiedenen Behandlungsdauern in U2OS- (10 s) und MNNG/HOS-Zellen (20 s) mit dem kINPen MED bei vergleichbarer antiproliferativer Wirksamkeit zeigen.

Im Gegensatz zu den antiproliferativen Effekten ab 24 h nach Behandlung führten Behandlungen mit CAP aus beiden Quellen nach 4 h Inkubation verglichen mit Argon-Kontrollen zu keiner signifikanten Inhibition der Zellproliferation. Ähnliche experimentelle Ansätze mit anderen Zelllinien zeigten hierzu sowohl übereinstimmende als auch gegensätzliche Ergebnisse – dies ist darauf zurückzuführen, dass die Wachstumsraten unterschiedlicher Zelllinien spezifisch sowie von der Behandlungsdauer mit CAP abhängig sind.<sup>95,122,130</sup> Die Latenz zwischen CAP-Behandlung und signifikanter Wachstumsreduktion von über 4 h weist auf eine Beteiligung zeitabhängiger zellulärer Mechanismen bei der Entstehung antiproliferativer Effekte durch CAP in OS-Zellen hin.

In Untersuchungen zur Ursache der CAP-induzierten Antiproliferation ist bislang in verschiedenen Tumorentitäten hauptsächlich der Zelltod durch Apoptose beschrieben worden, obgleich auch nicht-apoptotische Prozesse stattfinden.<sup>95,125</sup> In Abhängigkeit der Tumorentität wurde die Beteiligung verschiedener Signalkaskaden (u.a. ATM/p53) bei der Induktion von Apoptose durch CAP entdeckt.<sup>96,100,131</sup> Vorarbeiten an OS-Zellen zeigten eine gesteigerte Expression sowie Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 infolge CAP Behandlung, was einen Zusammenhang mit der genannten Signalkaskade vermuten ließ.<sup>87</sup> Hieraus resultierte die Hypothese, dass antiproliferative Effekte von CAP auf OS-Zellen mit der Induktion von Apoptose einhergehen.

Einen wichtigen Prozess der apoptotischen Kaskade stellt die DNA-Degradation durch spezifische Endonukleasen dar.<sup>132</sup> Im TUNEL-Assay erfolgt eine Analyse jener DNA-Degradation anhand freier 3'-OH-Gruppen.<sup>133,134</sup> Mit dem kINPen MED konnte nach 24 h sowie 48 h gezeigt werden, dass U2OS- und MNNG/HOS-Zellen infolge CAP-Behandlung signifikant mehr freie 3'-OH-Gruppen in der DNA aufwiesen – also stärker fragmentierte DNA besaßen – als Argon-behandelte Kontrollansätze. Diese Ergebnisse konnten in entsprechenden Experimenten mit der Plasmaquelle MiniJet-R bestätigt werden und sind konform zu Untersuchungen an anderen Tumorentitäten.<sup>93,135</sup> Für die Interpretation jener

DNA-Degradation im Kontext zellulärer Mechanismen wurde anschließend eine zweite Phase der apoptotischen Kaskade untersucht. Die Aktivität von Caspase-3/7, zwei zentrale Effektoren der apoptotischen Kaskade, wurde für die Analyse apoptotischer Prozesse auf Proteinebene herangezogen.<sup>104</sup> Die Ergebnisse zeigten stimulierende Effekte von CAP des kINPen MED auf die Aktivität von Caspase-3/7 in U2OS- und MNNG/HOS-Zellen, die in weiteren Tumorentitäten bestätigt werden konnten.<sup>136</sup> Eine vergleichbare, signifikante Stimulation von Caspase-3/7 wurde durch CAP-Behandlungen mit dem MiniJet-R in OS-Zellen hervorgerufen. Behandlungen mit CAP aus zwei unterschiedlichen CAP-Quellen lösten verglichen mit Argon-Kontrollen sowohl auf molekularer als auch auf zellulärer Ebene signifikant apoptotische Prozesse aus. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die antiproliferative Wirkung von CAP auf OS-Zellen mit der Induktion von Apoptose einhergeht.

Im Zusammenhang mit CAP-abhängigen apoptotischen Mechanismen wurde gezeigt, dass reaktiven Spezies eine vermittelnde Rolle bei biologischen CAP-Effekten zukommt.<sup>137</sup> Hohe Konzentrationen an ROS/RNS lösen oxidativen Stress aus, welcher zur Induktion von Apoptose in OS-Zellen geführt haben kann.<sup>138</sup> In U2OS- sowie MNNG/HOS-Zellen konnten biologische Effekte von CAP durch Zugabe des Radikalfängers N-Acetyl-Cystein signifikant abgeschwächt werden – dies legt den Einfluss von ROS/RNS in der Vermittlung CAP-abhängiger zellulärer Mechanismen nahe.<sup>101</sup> Demzufolge erscheint eine vermittelnde Rolle von ROS/RNS auch bei CAP-induzierter Apoptose in OS-Zellen wahrscheinlich.<sup>123,139</sup> Dies müsste jedoch in entsprechenden experimentellen Ansätzen weiter untersucht werden.

ROS/RNS, die nach CAP-Behandlung intrazellulär angereichert vorliegen, wurden darüber hinaus als primärer Vermittler direkter CAP-Effekte auf die DNA beschrieben, obgleich zusätzlich weitere physikalische und chemische Faktoren beteiligt sind.<sup>140</sup> ROS/RNS können, sofern sie in ausreichender Konzentration vorliegen, DNA-Schäden verursachen, indem sie beispielsweise N-glykosidische Bindungen hydrolysieren oder Pyrimidin- und Purinbasen oxidieren. Indirekt durch enzymatische Spaltung im Rahmen der Reparatur jener DNA-Schäden oder direkt durch Oxidation von Desoxyribosen könnten ROS/RNS-vermittelte DNA-Strangbrüche als unmittelbares Resultat einer CAP-Behandlung entstehen.<sup>140</sup>

CAP-Effekte auf die DNA von OS-Zellen wurden deshalb mit dem alkalischen Komet-Assay untersucht, der nach elektrophoretischer Auftrennung von DNA eine fluoreszenzmikroskopische Detektion von DNA-Strangbrüchen in Einzelzellen ermöglicht.<sup>141</sup>

U2OS-Zellen zeigten, einhergehend mit Untersuchungen an weiteren Zelllinien, 24 h nach CAP-Behandlung ein signifikant verstärktes Auftreten von DNA-Strangbrüchen im Komet-Assay – dies gilt sowohl für den kINPen MED als auch für den MiniJet-R.<sup>93,135</sup> Bei Untersuchungen an HaCaT-Zellen mit dem kINPen 09, Vorläufergerät des kINPen MED, traten unmittelbar nach CAP-Behandlung signifikant mehr DNA-Strangbrüche im Komet-Assay auf, während dieser Effekt nach längerer Inkubation nicht mehr beobachtet werden konnte.<sup>142</sup> Diesen Ergebnissen entsprechend wurden auch in U2OS-Zellen nach längerer Inkubation von 48 h keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen CAP und Kontrollbehandlung im Komet-Assay detektiert. Zeitpunkt und Intervall der initial auftretenden DNA-Strangbrüche bis zum Rückgang auf Kontroll-Niveau variierten unter klinisch relevanten Bedingungen abhängig von der untersuchten Zelllinie.<sup>143</sup> Diese interzelluläre Variabilität könnte eine Ursache für die ausgebliebenen oder teils gegensätzlichen Effekte nach CAP-Behandlung auf MNNG/HOS-Zellen im Komet-Assay sein. Darüber hinaus kann durch die Behandlungsdauer das Auftreten von DNA-Strangbrüchen im Komet-Assay moduliert werden.<sup>143-145</sup> Neben der Möglichkeit, dass CAP unter den experimentellen Bedingungen in MNNG/HOS-Zellen keine DNA-Strangbrüche verursacht, könnte deshalb das Zeitintervall, in dem möglicherweise in MNNG/HOS-Zellen ebenfalls DNA-Strangbrüche auftraten, außerhalb des Untersuchungszeitraums liegen. Die Regredienz der detektierten DNA-Strangbrüche in U2OS-Zellen nach 48 h kann entweder durch Zelluntergang – z.B. infolge CAP-induzierter Apoptose – oder durch DNA-Reparaturprozesse verursacht worden sein.

Um genetische Informationen möglichst unbeschadet zu speichern, werden sowohl endogen als auch exogen induzierte DNA-Strangbrüche durch DNA-Reparaturmechanismen kontinuierlich beseitigt.<sup>146</sup> Dabei existieren für Einzel- und Doppelstrangbrüche (single-strand breaks – SSB / double-strand breaks – DSB) jeweils separate Reparaturmechanismen. SSB, von denen unter physiologischen Bedingungen zehntausende je Zelle pro Tag entstehen, können durch das Vorhandensein eines komplementären DNA-Strangs mit hoher Effizienz repariert

werden.<sup>147</sup> Übersteigt die Anzahl an SSB jedoch die Kapazität dieser Reparatursysteme kann es durch übermäßige Stimulation des SSB-Sensors Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1 zur Induktion von Apoptose kommen – dies stellt einen möglichen zugrundeliegenden Mechanismus der CAP-induzierten Apoptose dar.<sup>148</sup> Weiterhin können aus SSB im Verlauf der Replikation oder aber durch direkten Einfluss von CAP auf die DNA – vermittelt über ROS/RNS – DSB entstehen.<sup>140,149</sup> Neben dem Reparaturmechanismus der homologen Rekombination, die aufgrund von Einbeziehung nicht-beschädigter DNA-Sequenzen homologer Chromosomen oder Schwesterchromatiden ein vergleichsweise geringes Fehlerpotential besitzt, wurde das Non-Homologous End-Joining (NHEJ) als wesentlicher Mechanismus für die DSB-Reparatur beschrieben.<sup>150,151</sup> Die Enden eines DNA-Strangs werden hierbei nicht-homolog zusammengeführt, wodurch Insertionen sowie Deletionen in betroffenen Arealen der DNA entstehen können.<sup>152</sup> Hieraus resultiert die Möglichkeit, dass bei der Reparatur CAP-induzierter DSB mittels NHEJ Mutationen in OS-Zellen entstehen könnten.

Inzwischen existiert bereits eine CAP-Quelle speziell für die Induktion von Mutationen in Mikroorganismen.<sup>153</sup> Dadurch dass bereits über 40 mutierte Mikroorganismen, darunter Bakterien, Pilze und Algen, erzeugt wurden, wurden mutagene Effekte von CAP auch auf humane Zellen in Betracht gezogen.<sup>154</sup> Die Einordnung der aufgetretenen DNA-Strangbrüche in den Zusammenhang zellbiologischer Prozesse ist deshalb hinsichtlich einer sicheren klinischen Anwendung von CAP notwendig. DNA-Strangbrüche können sowohl infolge eines direkten Effekts von CAP auf die DNA (mit potentiell mutagenem Potential) entstanden sein als auch das Resultat CAP-induzierter Apoptose darstellen.

Für Untersuchungen von Mutagenität in humanen Zellen existieren verschiedene experimentelle Verfahren, von denen im Zusammenhang mit CAP bislang hauptsächlich der Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Assay und der Mikronukleus-Assay angewendet wurden. Im Sinne einer negativen Selektion überleben im HPRT-Assay ausschließlich Zellen mit mutiertem HPRT-Gen, das für das gleichnamige Enzym codiert, die Zugabe des zytotoxischen Analogons 6-Thioguanin – bei anschließender Inkubation spiegelt die Ausbildung von Kolonien aufgetretene Mutationen im HPRT-Gen wider.<sup>155</sup> Indirekte CAP-Behandlungen

für bis zu 300 s führten zu vermehrtem Auftreten von Kolonien im HPRT-Assay, dieses Ergebnis blieb jedoch ohne statistische Signifikanz.<sup>156</sup> Im Gegensatz dazu führten direkte CAP-Behandlungen für bis zu 240 s – bei zum kINPen MED und MiniJet-R vergleichbaren Anregungsfrequenzen – nicht zu vermehrten Koloniebildungen.<sup>157,158</sup> Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen durch den Mikronukleus-Assay, bei dem postmitotische chromosomale Strukturveränderungen mikroskopisch quantifiziert werden.<sup>159</sup> Während CAP-Behandlungen für 30 s in T98G-Zellen noch nicht zu vermehrtem Auftreten von Mikronuklei führten, wurden bei längeren Behandlungsdauern für bis zu 240 s in CAP-behandelten Zellen signifikant mehr Mikronuklei entdeckt als in Kontroll-Zellen.<sup>160</sup> Obgleich sich die hierbei verwendete CAP-Quelle in vielen Eigenschaften vom kINPen MED und MiniJet-R unterscheidet, wurde durch diese Untersuchung gezeigt, dass lange CAP-Behandlungen in humanen Zellen prinzipiell mutagene Veränderungen auslösen können. Die CAP-Quelle kINPen 09 ist aufgrund ähnlicher technischer Parameter besser mit dem kINPen MED vergleichbar und wurde erst jüngst hinsichtlich mutagener Eigenschaften charakterisiert: Weder indirekte CAP-Behandlungen für bis zu 180 s noch direkte CAP-Behandlungen für bis zu 30 s riefen hierbei signifikante Unterschiede zu Kontroll-Behandlungen im HPRT-Assay oder Mikronukleus-Assay hervor.<sup>161</sup> Hiermit übereinstimmend konnte mit dem kINPen MED im „Hen’s Egg Test – Micronucleus Induction“ ebenfalls kein vermehrtes Auftreten von Mikronuklei nach CAP-Behandlungen für bis zu 10 min detektiert werden.<sup>162</sup> Darüber hinaus trat in einer klinischen Studie mit dem kINPen MED nach Wundbehandlungen für 10 s bis 30 s über den gesamten Untersuchungszeitraum von 12 Monaten keine präkanzeröse Läsion auf.<sup>163</sup>

Zusammenfassend ergab der Großteil der bislang vorliegenden Untersuchungsergebnisse keine mutagenen Eigenschaften von CAP, indes vereinzelt gegensätzliche Hinweise vorliegen. Sofern mutagene Effekte in Experimenten auftraten, zeigten diese eine Abhängigkeit zur Behandlungsdauer und waren nur nach langen CAP-Behandlungen detektierbar.<sup>160</sup> Unabhängig von CAP-Quelle sowie Zelllinie konnte bei Behandlungsdauern von maximal 30 s keinerlei Hinweis auf CAP-induzierte Mutagenität gezeigt werden. Da die Behandlungsdauer von 30 s in keinem der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimente überschritten wurde, erscheinen mutagene

Eigenschaften von CAP des kINPen MED sowie MiniJet-R auf OS-Zellen in diesem Zusammenhang unwahrscheinlich. Die umfangreichen Untersuchungen zu mutagenen Effekten des kINPen MED sowie dessen Vorgängermodell unterstützen diese Annahme.<sup>161-163</sup> Die durch CAP entstandenen DNA-Strangbrüche in OS-Zellen stellen somit eher einen Ausdruck CAP induzierter Apoptose dar als das Resultat direkter CAP-Interaktion mit der DNA. Dennoch bleiben mutagene Effekte von CAP auf OS-Zellen unter längeren Behandlungsdauern nicht ausgeschlossen und sollten hinsichtlich der Unbedenklichkeit einer klinischen Anwendung berücksichtigt werden.

Limitationen der vorliegenden Arbeit ergeben sich aus dem Versuchsaufbau *in vitro*, weshalb die dargestellten Effekte von CAP weiterführende Untersuchungen erfordern, um sie auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen zu können. Die anhand von zwei unterschiedlichen OS-Zelllinien gezeigten Effekte von CAP legen eine Übertragbarkeit auf weitere OS-Zellen nahe, sollten jedoch bezüglich der verschiedenen Eigenschaften von OS-Zellen, insbesondere hinsichtlich der Heterogenität sowie unterschiedlicher Differenzierungsgrade der Tumoren, bestätigt werden. CAP Effekte auf einzelne OS-Zellen *in vitro* sollten zudem auf ein potentiell abweichendes Verhalten der Zellen im Gewebeverbund eines soliden Tumors untersucht werden. Perspektivisch sind somit auf dem Weg zur klinischen Anwendung von CAP am OS Experimente im Gewebeverbund (*ex vivo*) sowie *in vivo* erforderlich.

Es konnte gezeigt werden, dass mit zwei technisch unterschiedlich aufgebauten CAP Quellen vergleichbare biologische Effekte erzielt werden können, obgleich hierzu abweichende Behandlungsdauern notwendig waren. Bislang existiert neben der Behandlungsdauer kein definierter Messparameter zur Dosierung von CAP, indes eine Vielzahl unterschiedlicher CAP Quellen zur Verfügung stehen. Da Eigenschaften von CAP aus verschiedenen Quellen voneinander abweichen, ist die Objektivierbarkeit und Reproduzierbarkeit biologischer Effekte verschiedener CAP Quellen eine zentrale Herausforderung im Forschungsfeld der Plasmamedizin. Die Standardisierung der Behandlung stellt deshalb einen essentiellen Faktor für einen breiteren klinischen Einsatz von CAP dar.

Auch nach Bewältigung der genannten Herausforderungen auf dem Weg zur klinischen Anwendung von CAP wird die OS-Therapie Domäne der Chirurgie und Chemotherapie bleiben. Eine isolierte Therapie von OS mittels CAP erscheint in Anbetracht der limitierten Eindringtiefe sowie der häufig lokal fortgeschrittenen Tumorbefunde bei Diagnosestellung nicht erfolgversprechend.<sup>31</sup> Die dargestellten zellulären und molekularen Effekte von CAP stellen jedoch eine aussichtsreiche Grundlage für den adjuvanten Einsatz von CAP in der OS-Therapie dar, da das Erreichen mikroskopisch tumorfreier Resektionsgrenzen unmittelbare Konsequenz hinsichtlich der Überlebens- und Rezidivrate hat und vielfach eine chirurgische Herausforderung ist.<sup>23</sup> Hierzu sind zwei Anwendungsmodalitäten denkbar: 1. Nach chirurgischer Tumorresektion direkte intraoperative Behandlung der Resektionsränder mittels CAP, insbesondere von Arealen unsicherer Resektionsgrenzen, und 2. Intraoperative Spülung der Resektionsränder nach chirurgischer Tumorresektion mittels CAP-behandelter Flüssigkeit, für die ebenfalls antiproliferative Effekte am OS *in vitro* gezeigt werden konnten.<sup>164</sup> Neben dem primären Ziel einer Steigerung der Überlebensrate von OS Patienten könnten hierdurch Amputationen zugunsten Extremitäten-erhaltender Verfahren vermieden werden. Darüber hinaus gibt es Tumoren, deren anatomische Lokalisation eine vollständige chirurgische Resektion unmöglich macht, sodass hier eine Anwendung von CAP mit dem Ziel einer Verlängerung des progressionsfreien Intervalls infrage kommt.<sup>23</sup>

Zunächst sollten die oben beschriebenen Anwendungsprinzipien von CAP *in vivo* erprobt werden, bevor erste klinische Anwendungen mit kleinen Patientenkollektiven erfolgen können. Anschließend muss in klinischen Studien überprüft werden, ob durch die adjuvante Anwendung von CAP verglichen mit den aktuellen Therapiekonzepten eine signifikante Überlegenheit hinsichtlich der genannten Endpunkte erreicht werden kann.



## 5 Zusammenfassung

Seit Einführung der multimodalen Chemotherapie vor über 30 Jahren liegt die 5-Jahres-Überlebensrate des Osteosarkoms (OS) unverändert bei ca. 70 %. Als potentielle neue Therapieoption ruft kaltes atmosphärisches Plasma (cold atmospheric plasma, CAP) *in vitro* antiproliferative Effekte in OS-Zellen hervor. Die zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen wurden unter der Hypothese einer Induktion von Apoptose infolge CAP Behandlung untersucht. Effekte von CAP wurden anhand von zwei CAP-Quellen (kINPen MED und MiniJet-R) an zwei OS-Zelllinien (U2OS und MNNG/HOS) überprüft. Hinsichtlich früher apoptotischer Prozesse auf zellulärer Ebene erfolgte die Aktivitätsbestimmung der Effektorcaspasen 3 und 7 im Caspase-Assay. Spät in der apoptotischen Kaskade auftretende molekulare Prozesse wurden durch zwei unabhängige Nachweisverfahren von DNA-Strangbrüchen untersucht – Komet-Assay und TUNEL-Assay.

CAP Behandlungen mit dem kINPen MED führten zu signifikanter Hemmung der Zellproliferation zwischen 24 h und 120 h. Die Effektorcaspasen 3 und 7 zeigten infolge CAP Behandlung nach 24 h und 48 h erhöhte Aktivitätsniveaus. Im Komet-Assay wurden 24 h nach CAP Behandlung in U2OS-Zellen signifikant mehr DNA-Strangbrüche detektiert als in Kontrollansätzen. Der TUNEL-Assay ergab in beiden OS-Zelllinien nach 24 h und 48 h signifikant mehr DNA-Strangbrüche infolge CAP Behandlung. Die Effekte von CAP des kINPen MED konnten durch den MiniJet-R, der erstmals hinsichtlich biologischer Effekte auf maligne Zellen charakterisiert wurde, bestätigt werden. Sowohl antiproliferative Effekte als auch die Prozesse der frühen und späten apoptotischen Kaskade traten signifikant häufiger infolge CAP Behandlung mit dem MiniJet-R auf. Schlussfolgernd gehen antiproliferative Effekte von CAP mit Induktion von Apoptose in OS-Zellen einher, unabhängig von der verwendeten CAP-Quelle.

Die *in vitro* gezeigte CAP Effekte sollten hinsichtlich der klinischen Anwendung *in vivo* bestätigt werden. Obgleich die OS-Therapie weiterhin Domäne der Chirurgie und Chemotherapie bleiben wird, bilden die dargestellten zellulären und molekularen Effekte eine aussichtsreiche Grundlage für einen erfolgreichen adjuvanten Einsatz von CAP am OS.

## Literaturverzeichnis

1. Niethard, F.U., Pfeil, J. & Biberthaler, P. *Orthopädie und Unfallchirurgie*, (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2017).
2. Scharf, H.-P., Rüter, A., Pohlemann, T., Marzi, I., Kohn, D. & Günther, K.-P. *Orthopädie und Unfallchirurgie*, (Elsevier, München, 2011).
3. Stiller, C.A., Bielack, S.S., Jundt, G. & Steliarova-Foucher, E. Bone tumours in European children and adolescents, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur. J. Cancer* 42, 2124-2135 (2006).
4. Mirabello, L., Troisi, R.J. & Savage, S.A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer* 115, 1531-1543 (2009).
5. Anfinson, K.P., Devesa, S.S., Bray, F., Troisi, R., Jonasdottir, T.J., Bruland, O.S. & Grotmol, T. Age-period-cohort analysis of primary bone cancer incidence rates in the United States (1976-2005). *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 20, 1770-1777 (2011).
6. Ottaviani, G. & Jaffe, N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* 152, 3-13 (2009).
7. Duong, L.M. & Richardson, L.C. Descriptive epidemiology of malignant primary osteosarcoma using population-based registries, United States, 1999-2008. *J Registry Manag* 40, 59-64 (2013).
8. Huvos, A.G. Osteogenic sarcoma of bones and soft tissues in older persons. A clinicopathologic analysis of 117 patients older than 60 years. *Cancer* 57, 1442-1449 (1986).
9. Mirabello, L., Pfeiffer, R., Murphy, G., Daw, N.C., Patino-Garcia, A., Troisi, R.J., Hoover, R.N., Douglass, C., Schuz, J., Craft, A.W. & Savage, S.A. Height at diagnosis and birth-weight as risk factors for osteosarcoma. *Cancer causes & control : CCC* 22, 899-908 (2011).
10. Savage, S.A. & Mirabello, L. Using epidemiology and genomics to understand osteosarcoma etiology. *Sarcoma* 2011, 548151 (2011).

11. Dores, G.M., Metayer, C., Curtis, R.E., Lynch, C.F., Clarke, E.A., Glimelius, B., Storm, H., Pukkala, E., van Leeuwen, F.E., Holowaty, E.J., Andersson, M., Wiklund, T., Joensuu, T., van't Veer, M.B., Stovall, M., Gospodarowicz, M. & Travis, L.B. Second malignant neoplasms among long-term survivors of Hodgkin's disease: a population-based evaluation over 25 years. *J. Clin. Oncol.* 20, 3484-3494 (2002).
12. Raymond, A.K. & Jaffe, N. Osteosarcoma multidisciplinary approach to the management from the pathologist's perspective. *Cancer Treat. Res.* 152, 63-84 (2009).
13. Klein, M.J. & Siegal, G.P. Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *Am. J. Clin. Pathol.* 125, 555-581 (2006).
14. Lu, L., Jin, W., Liu, H. & Wang, L.L. RECQ DNA helicases and osteosarcoma. *Advances in experimental medicine and biology* 804, 129-145 (2014).
15. Kovac, M., Blattmann, C., Ribí, S., Smida, J., Mueller, N.S., Engert, F., Castro-Giner, F., Weischenfeldt, J., Kovacova, M., Krieg, A., Andreou, D., Tunn, P.U., Durr, H.R., Rechl, H., Schaser, K.D., Melcher, I., Burdach, S., Kulozik, A., Specht, K., Heinemann, K., Fulda, S., Bielack, S., Jundt, G., Tomlinson, I., Korb, J.O., Nathrath, M. & Baumhoer, D. Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nature communications* 6, 8940 (2015).
16. Baumhoer, D. Pathogenese und genetischer Hintergrund des Osteosarkoms. *Der Pathologe* 39, 139-145 (2017).
17. Behjati, S., Tarpey, P.S., Haase, K., Ye, H., Young, M.D., Alexandrov, L.B., Farndon, S.J., Collord, G., Wedge, D.C., Martincorena, I., Cooke, S.L., Davies, H., Mifsud, W., Lidgren, M., Martin, S., Latimer, C., Maddison, M., Butler, A.P., Teague, J.W., Pillay, N., Shlien, A., McDermott, U., Futreal, P.A., Baumhoer, D., Zaikova, O., Bjerkehaugen, B., Myklebost, O., Amary, M.F., Tirabosco, R., Van Loo, P., Stratton, M.R., Flanagan, A.M. & Campbell, P.J. Recurrent mutation of IGF signalling genes and distinct patterns of genomic rearrangement in osteosarcoma. *Nature communications* 8, 15936 (2017).
18. Wittekind, C. & Meyer, H. *TNM Klassifikation maligner Tumoren*, (Wiley-VCH, Weinheim, 2010).

19. Page, D., Fleming, I., Fritz, A., Balch, C. & Haller, D. *AJCC Cancer Staging Handbook from the AJCC Cancer Staging Manual*, (Springer Verlag, New York, 2010).
20. Enneking, W.F., Spanier, S.S. & Goodman, M.A. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 106-120 (1980).
21. Fletcher, C.D.M., Bridge, J.A., Hogendoorn, P.C.W. & Mertens, F. *WHO Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone*, (International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2013).
22. Malhas, A.M., Grimer, R.J., Abudu, A., Carter, S.R., Tillman, R.M. & Jeys, L. The final diagnosis in patients with a suspected primary malignancy of bone. *J. Bone Joint Surg. Br.* 93, 980-983 (2011).
23. Casali, P.G., Bielack, S., Abecassis, N., Aro, H.T., Bauer, S., Biagini, R., Bonvalot, S., Boukovinas, I., Bovee, J., Brennan, B., Brodowicz, T., Broto, J.M., Brugieres, L., Buonadonna, A., De Alava, E., Dei Tos, A.P., Del Muro, X.G., Dileo, P., Dhooge, C., Eriksson, M., Fagioli, F., Fedenko, A., Ferraresi, V., Ferrari, A., Ferrari, S., Frezza, A.M., Gaspar, N., Gasperoni, S., Gelderblom, H., Gil, T., Grignani, G., Gronchi, A., Haas, R.L., Hassan, B., Hecker-Nolting, S., Hohenberger, P., Issels, R., Joensuu, H., Jones, R.L., Judson, I., Jutte, P., Kaal, S., Kager, L., Kasper, B., Kopeckova, K., Krakorova, D.A., Ladenstein, R., Le Cesne, A., Lugowska, I., Merimsky, O., Montemurro, M., Morland, B., Pantaleo, M.A., Piana, R., Picci, P., Piperno-Neumann, S., Pousa, A.L., Reichardt, P., Robinson, M.H., Rutkowski, P., Safwat, A.A., Schoffski, P., Sleijfer, S., Stacchiotti, S., Strauss, S.J., Sundby Hall, K., Unk, M., Van Coevorden, F., van der Graaf, W.T.A., Whelan, J., Wardelmann, E., Zaikova, O., Blay, J.Y., Esmo Guidelines Committee, P. & Ern, E. Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 29, iv79-iv95 (2018).
24. Widhe, B. & Widhe, T. Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J. Bone Joint Surg. Am.* 82, 667-674 (2000).
25. Messerschmitt, P.J., Garcia, R.M., Abdul-Karim, F.W., Greenfield, E.M. & Getty, P.J. Osteosarcoma. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 17, 515-527 (2009).

26. Scully, S.P., Ghert, M.A., Zurakowski, D., Thompson, R.C. & Gebhardt, M.C. Pathologic fracture in osteosarcoma : prognostic importance and treatment implications. *J. Bone Joint Surg. Am.* 84-A, 49-57 (2002).
27. Meyer, J.S., Nadel, H.R., Marina, N., Womer, R.B., Brown, K.L., Eary, J.F., Gorlick, R., Grier, H.E., Randall, R.L., Lawlor, E.R., Lessnick, S.L., Schomberg, P.J. & Kailo, M.D. Imaging guidelines for children with Ewing sarcoma and osteosarcoma: a report from the Children's Oncology Group Bone Tumor Committee. *Pediatr. Blood Cancer* 51, 163-170 (2008).
28. Clayer, M. Many faces of osteosarcoma on plain radiographs. *ANZ J. Surg.* 85, 22-26 (2015).
29. Wittig, J.C., Bickels, J., Priebat, D., Jelinek, J., Kellar-Graney, K., Shmookler, B. & Malawer, M.M. Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician* 65, 1123-1132 (2002).
30. Blay, J.Y., Soibinet, P., Penel, N., Bompas, E., Duffaud, F., Stoeckle, E., Mir, O., Adam, J., Chevreau, C., Bonvalot, S., Rios, M., Kerbrat, P., Cupissol, D., Anract, P., Gouin, F., Kurtz, J.E., Lebbe, C., Isambert, N., Bertucci, F., Toumonde, M., Thyss, A., Piperno-Neumann, S., Dubray-Longeras, P., Meeus, P., Ducimetiere, F., Giraud, A., Coindre, J.M., Ray-Coquard, I., Italiano, A., Le Cesne, A., RREPS, N. & Networks, G.-G. Improved survival using specialized multidisciplinary board in sarcoma patients. *Ann. Oncol.* 28, 2852-2859 (2017).
31. Andreou, D., Bielack, S.S., Carrle, D., Kevric, M., Kotz, R., Winkelmann, W., Jundt, G., Werner, M., Fehlberg, S., Kager, L., Kuehne, T., Lang, S., Dominkus, M., Exner, G.U., Hardses, J., Hillmann, A., Ewerbeck, V., Heise, U., Reichardt, P. & Tunn, P.U. The influence of tumor- and treatment-related factors on the development of local recurrence in osteosarcoma after adequate surgery. An analysis of 1355 patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *Ann. Oncol.* 22, 1228-1235 (2011).
32. Picci, P., Vanel, D., Briccoli, A., Talle, K., Haakenaasen, U., Malaguti, C., Monti, C., Ferrari, C., Bacci, G., Saeter, G. & Alvegard, T.A. Computed tomography of pulmonary metastases from osteosarcoma: the less poor

- technique. A study of 51 patients with histological correlation. *Ann. Oncol.* 12, 1601-1604 (2001).
33. Buchbender, C., Heusner, T.A., Lauenstein, T.C., Bockisch, A. & Antoch, G. Oncologic PET/MRI, part 2: bone tumors, soft-tissue tumors, melanoma, and lymphoma. *J. Nucl. Med.* 53, 1244-1252 (2012).
  34. Bramer, J.A.M., van Linge, J.H., Grimer, R.J. & Scholten, R.J.P.M. Prognostic factors in localized extremity osteosarcoma: A systematic review. *Ejso-Eur J Surg Onc* 35, 1030-1036 (2009).
  35. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. Osteosarkome - Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. *AWMF* (2010).
  36. Picci, P., Sangiorgi, L., Rougraff, B.T., Neff, J.R., Casadei, R. & Campanacci, M. Relationship of chemotherapy-induced necrosis and surgical margins to local recurrence in osteosarcoma. *J. Clin. Oncol.* 12, 2699-2705 (1994).
  37. Cates, J.M. Reporting Surgical Resection Margin Status for Osteosarcoma: Comparison of the AJCC, MSTs, and Margin Distance Methods. *Am. J. Surg. Pathol.* 41, 633-642 (2017).
  38. Edge, S., Byrd, D., Compton, C., Fritz, A., Greene, F. & Trotti, A. *AJCC Cancer Staging Manual*, (Springer Verlag, New York, 2010).
  39. Link, M.P., Goorin, A.M., Miser, A.W., Green, A.A., Pratt, C.B., Belasco, J.B., Pritchard, J., Malpas, J.S., Baker, A.R., Kirkpatrick, J.A. & et al. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N. Engl. J. Med.* 314, 1600-1606 (1986).
  40. Anninga, J.K., Gelderblom, H., Fiocco, M., Kroep, J.R., Taminiau, A.H.M., Hogendoorn, P.C.W. & Egeler, R.M. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: Where do we stand? *Eur. J. Cancer* 47, 2431-2445 (2011).
  41. Carrle, D. & Bielack, S.S. Current strategies of chemotherapy in osteosarcoma. *Int. Orthop.* 30, 445-451 (2006).
  42. Weeden, S., Grimer, R.J., Cannon, S.R., Taminiau, A.H., Uscinska, B.M. & European Osteosarcoma, I. The effect of local recurrence on survival in resected osteosarcoma. *Eur. J. Cancer* 37, 39-46 (2001).

43. Bielack, S.S., Smeland, S., Whelan, J.S., Marina, N., Jovic, G., Hook, J.M., Krailo, M.D., Gebhardt, M., Papai, Z., Meyer, J., Nadel, H., Randall, R.L., Deffenbaugh, C., Nagarajan, R., Brennan, B., Letson, G.D., Teot, L.A., Goorin, A., Baumhoer, D., Kager, L., Werner, M., Lau, C.C., Sundby Hall, K., Gelderblom, H., Meyers, P., Gorlick, R., Windhager, R., Helmke, K., Eriksson, M., Hoogerbrugge, P.M., Schomberg, P., Tunn, P.U., Kuhne, T., Jurgens, H., van den Berg, H., Bohling, T., Picton, S., Renard, M., Reichardt, P., Gerss, J., Butterfass-Bahloul, T., Morris, C., Hogendoorn, P.C., Seddon, B., Calaminus, G., Michelagnoli, M., Dhooge, C., Sydes, M.R., Bernstein, M. & investigators, E.-. Methotrexate, Doxorubicin, and Cisplatin (MAP) Plus Maintenance Pegylated Interferon Alfa-2b Versus MAP Alone in Patients With Resectable High-Grade Osteosarcoma and Good Histologic Response to Preoperative MAP: First Results of the EURAMOS-1 Good Response Randomized Controlled Trial. *J. Clin. Oncol.* 33, 2279-2287 (2015).
44. Marina, N.M., Smeland, S., Bielack, S.S., Bernstein, M., Jovic, G., Krailo, M.D., Hook, J.M., Arndt, C., van den Berg, H., Brennan, B., Brichard, B., Brown, K.L.B., Butterfass-Bahloul, T., Calaminus, G., Daldrup-Link, H.E., Eriksson, M., Gebhardt, M.C., Gelderblom, H., Gerss, J., Goldsby, R., Goorin, A., Gorlick, R., Grier, H.E., Hale, J.P., Hall, K.S., Hards, J., Hawkins, D.S., Helmke, K., Hogendoorn, P.C.W., Isakoff, M.S., Janeway, K.A., Jurgens, H., Kager, L., Kuhne, T., Lau, C.C., Leavey, P.J., Lessnick, S.L., Mascarenhas, L., Meyers, P.A., Mottl, H., Nathrath, M., Papai, Z., Randall, R.L., Reichardt, P., Renard, M., Safwat, A.A., Schwartz, C.L., Stevens, M.C.G., Strauss, S.J., Teot, L., Werner, M., Sydes, M.R. & Whelan, J.S. Comparison of MAPIE versus MAP in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 17, 1396-1408 (2016).
45. Fuchs, N., Bielack, S.S., Epler, D., Bieling, P., Delling, G., Korholz, D., Graf, N., Heise, U., Jurgens, H., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Weinel, P., Werner, M. & Winkler, K. Long-term results of the co-operative German-Austrian-Swiss osteosarcoma study group's protocol COSS-86 of intensive

- multidrug chemotherapy and surgery for osteosarcoma of the limbs. *Ann. Oncol.* 9, 893-899 (1998).
46. Meyers, P.A., Schwartz, C.L., Krailo, M.D., Healey, J.H., Bernstein, M.L., Betcher, D., Ferguson, W.S., Gebhardt, M.C., Goorin, A.M., Harris, M., Kleinerman, E., Link, M.P., Nadel, H., Nieder, M., Siegal, G.P., Weiner, M.A., Wells, R.J., Womer, R.B. & Grier, H.E. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival--a report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 26, 633-638 (2008).
  47. Hunsberger, S., Freidlin, B. & Smith, M.A. Complexities in interpretation of osteosarcoma clinical trial results. *J. Clin. Oncol.* 26, 3103-3104; author reply 3104-3105 (2008).
  48. Lilienthal, I. & Herold, N. Targeting Molecular Mechanisms Underlying Treatment Efficacy and Resistance in Osteosarcoma: A Review of Current and Future Strategies. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6885 (2020).
  49. Ebb, D., Meyers, P., Grier, H., Bernstein, M., Gorlick, R., Lipshultz, S.E., Krailo, M., Devidas, M., Barkauskas, D.A., Siegal, G.P., Ferguson, W.S., Letson, G.D., Marcus, K., Goorin, A., Beardsley, P. & Marina, N. Phase II Trial of Trastuzumab in Combination With Cytotoxic Chemotherapy for Treatment of Metastatic Osteosarcoma With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Overexpression: A Report From the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 30, 2545-2551 (2012).
  50. Lee, J.A., Ko, Y., Kim, D.H., Lim, J.S., Kong, C.-B., Cho, W.H., Jeon, D.-G., Lee, S.-Y. & Koh, J.-S. Epidermal Growth Factor Receptor: Is It a Feasible Target for the Treatment of Osteosarcoma? *Cancer Res. Treat.* 44, 202-209 (2012).
  51. Grignani, G., Palmerini, E., Dileo, P., Asaftei, S.D., D'Ambrosio, L., Pignochino, Y., Mercuri, M., Picci, P., Fagioli, F., Casali, P.G., Ferrari, S. & Aglietta, M. A phase II trial of sorafenib in relapsed and unresectable high-grade osteosarcoma after failure of standard multimodal therapy: an Italian Sarcoma Group study. *Ann. Oncol.* 23, 508-516 (2012).
  52. Duffaud, F., Mir, O., Boudou-Rouquette, P., Piperno-Neumann, S., Penel, N., Bompas, E., Delcambre, C., Kalbacher, E., Italiano, A., Collard, O., Chevreau, C., Saada, E., Isambert, N., Delaye, J., Schiffler, C., Bouvier, C., Vidal, V., Chabaud, S. & Blay, J.-Y. Efficacy and safety of regorafenib in



- adult patients with metastatic osteosarcoma: a non-comparative, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *The Lancet Oncology* 20, 120-133 (2019).
53. Italiano, A., Mir, O., Mathoulin-Pelissier, S., Penel, N., Piperno-Neumann, S., Bompas, E., Chevreau, C., Duffaud, F., Entz-Werlé, N., Saada, E., Ray-Coquard, I., Lervat, C., Gaspar, N., Marec-Berard, P., Pacquement, H., Wright, J., Toulmonde, M., Bessedé, A., Crombe, A., Kind, M., Bellera, C. & Blay, J.-Y. Cabozantinib in patients with advanced Ewing sarcoma or osteosarcoma (CABONE): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 21, 446-455 (2020).
54. Grignani, G., Palmerini, E., Ferraresi, V., D'Ambrosio, L., Bertulli, R., Asaftei, S.D., Tamburini, A., Pignochino, Y., Sangiolo, D., Marchesi, E., Capozzi, F., Biagini, R., Gambarotti, M., Fagioli, F., Casali, P.G., Picci, P., Ferrari, S. & Aglietta, M. Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progressing after standard treatment: a non-randomised phase 2 clinical trial. *The Lancet Oncology* 16, 98-107 (2015).
55. Piperno-Neumann, S., Le Deley, M.C., Redini, F., Pacquement, H., Marec-Berard, P., Petit, P., Brisse, H., Lervat, C., Gentet, J.C., Entz-Werle, N., Italiano, A., Corradini, N., Bompas, E., Penel, N., Tabone, M.D., Gomez-Brouchet, A., Guinebretiere, J.M., Mascard, E., Gouin, F., Chevance, A., Bonnet, N., Blay, J.Y., Brugieres, L., Sarcoma Group of, U., French Society of Pediatric, O. & French Sarcoma, G. Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 17, 1070-1080 (2016).
56. Whelan, J.S., Bielack, S.S., Marina, N., Smeland, S., Jovic, G., Hook, J.M., Krailo, M., Anninga, J., Butterfass-Bahloul, T., Bohling, T., Calaminus, G., Capra, M., Deffenbaugh, C., Dhooge, C., Eriksson, M., Flanagan, A.M., Gelderblom, H., Goorin, A., Gorlick, R., Gosheger, G., Grimer, R.J., Hall, K.S., Helmke, K., Hogendoorn, P.C., Jundt, G., Kager, L., Kuehne, T., Lau, C.C., Letson, G.D., Meyer, J., Meyers, P.A., Morris, C., Mottl, H., Nadel, H., Nagarajan, R., Randall, R.L., Schomberg, P., Schwarz, R., Teot, L.A., Sydes, M.R., Bernstein, M. & collaborators, E. EURAMOS-1, an

- international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment. *Ann. Oncol.* 26, 407-414 (2015).
57. Fridman, G., Friedman, G., Gutsol, A., Shekhter, A.B., Vasilets, V.N. & Fridman, A. Applied plasma medicine. *Plasma Process Polym* 5, 503-533 (2008).
  58. Conrads, H. & Schmidt, M. Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Sci T* 9, 441-454 (2000).
  59. Kletschkus, K., Haralambiev, L., Mustea, A., Bekeschus, S. & Stope, M.B. Review of Innovative Physical Therapy Methods: Introduction to the Principles of Cold Physical Plasma. *In Vivo* 34, 3103-3107 (2020).
  60. Lieberman, M.A. & Lichtenberg, A.J. *Principles of Plasma Discharges and Materials Processing*, (Wiley, New York, 1994).
  61. Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J. & Leprince, P. Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim Acta B* 61, 2-30 (2006).
  62. Yan, D., Sherman, J.H. & Keidar, M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* 8, 15977-15995 (2017).
  63. Ayliffe, G. Decontamination of minimally invasive surgical endoscopes and accessories. *J. Hosp. Infect.* 45, 263-277 (2000).
  64. Venkatesh, K.S. & Ramanujam, P. Endoscopic therapy for radiation proctitis-induced hemorrhage in patients with prostatic carcinoma using argon plasma coagulator application. *Surg. Endosc.* 16, 707-710 (2002).
  65. Klampfl, T.G., Isbary, G., Shimizu, T., Li, Y.F., Zimmermann, J.L., Stolz, W., Schlegel, J., Morfill, G.E. & Schmidt, H.U. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5077-5082 (2012).
  66. Kilmer, S., Semchyshyn, N., Shah, G. & Fitzpatrick, R. A pilot study on the use of a plasma skin regeneration device (Portrait PSR3) in full facial rejuvenation procedures. *Lasers Med. Sci.* 22, 101-109 (2007).
  67. Isbary, G., Shimizu, T., Li, Y.F., Stolz, W., Thomas, H.M., Morfill, G.E. & Zimmermann, J.L. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. *Expert Rev. Med. Devices* 10, 367-377 (2013).

68. Kong, M.G., Kroesen, G., Morfill, G., Nosenko, T., Shimizu, T., van Dijk, J. & Zimmermann, J.L. Plasma medicine: an introductory review. *New J Phys* 11(2009).
69. Setsuhara, Y. Low-temperature atmospheric-pressure plasma sources for plasma medicine. *Archives of biochemistry and biophysics* 605, 3-10 (2016).
70. Kogelschatz, U. Dielectric-Barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 23, 1-46 (2003).
71. Reuter, S., von Woedtke, T. & Weltmann, K.D. The kINPen—a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications. *J Phys D Appl Phys* 51(2018).
72. Weltmann, K.D. & von Woedtke, T. Plasma medicine—current state of research and medical application. *Plasma Physics and Controlled Fusion* 59, 014031 (2017).
73. Graves, D.B. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *J Phys D Appl Phys* 45(2012).
74. von Woedtke, T., Reuter, S., Masur, K. & Weltmann, K.D. Plasmas for medicine. *Phys. Rep.* 530, 291-320 (2013).
75. Bekeschus, S., Schmidt, A., Weltmann, K.-D. & von Woedtke, T. The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing. *Clinical Plasma Medicine* 4, 19-28 (2016).
76. Heuermann HF-Technik GmbH. Datasheet MiniJet PM-10.R Version 4.0. (2019).
77. Von Woedtke, T., Schmidt, A., Bekeschus, S., Wende, K. & Weltmann, K.-D. Plasma Medicine: A Field of Applied Redox Biology. *In Vivo* 33, 1011-1026 (2019).
78. Dobrynin, D., Fridman, G., Friedman, G. & Fridman, A. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J Phys* 11(2009).
79. von Woedtke, T., Metelmann, H.R. & Weltmann, K.D. Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of in Vivo Application of Cold Atmospheric Plasma. *Contributions to Plasma Physics* 54, 104-117 (2014).

80. Daeschlein, G., Napp, M., von Podewils, S., Lutze, S., Emmert, S., Lange, A., Klare, I., Haase, H., Gümbel, D., von Woedtke, T. & Jünger, M. In Vitro Susceptibility of Multidrug Resistant Skin and Wound Pathogens Against Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) and Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBD). *Plasma Process Polym* 11, 175-183 (2014).
81. Napp, M., Daeschlein, G., von Podewils, S., Hinz, P., Emmert, S., Haase, H., Spitzmueller, R., Gümbel, D., Kasch, R. & Jünger, M. In vitro susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus* to two different cold atmospheric plasma sources. *Infection* 44, 531-537 (2016).
82. Dobrynin, D., Wasko, K., Friedman, G., Fridman, A. & Fridman, G. Cold Plasma Sterilization of Open Wounds: Live Rat Model. *Plasma Medicine* 1, 109-114 (2011).
83. Hasse, S., Hahn, O., Kindler, S., Woedtke, T.v., Metelmann, H.-R. & Masur, K. Atmospheric Pressure Plasma Jet Application on Human Oral Mucosa Modulates Tissue Regeneration. 4, 117-129 (2014).
84. Haertel, B., Woedtke, T.v., Weltmann, K.-D. & Lindequist, U. Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma Possible Application in Wound Healing. *Biomol. Ther. (Seoul)* 22, 477-490 (2014).
85. Kramer, A., Lademann, J., Bender, C., Sckell, A., Hartmann, B., Münch, S., Hinz, P., Ekkernkamp, A., Matthes, R., Koban, I., Partecke, I., Heidecke, C.D., Masur, K., Reuter, S., Weltmann, K.D., Koch, S. & Assadian, O. Suitability of tissue tolerable plasmas (TTP) for the management of chronic wounds. *Clinical Plasma Medicine* 1, 11-18 (2013).
86. Haralambiev, L., Neuffer, O., Nitsch, A., Kross, N.C., Bekeschus, S., Hinz, P., Mustea, A., Ekkernkamp, A., Gümbel, D. & Stope, M.B. Inhibition of Angiogenesis by Treatment with Cold Atmospheric Plasma as a Promising Therapeutic Approach in Oncology. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7098 (2020).
87. Gumbel, D., Gelbrich, N., Weiss, M., Napp, M., Daeschlein, G., Sckell, A., Ender, S.A., Kramer, A., Burchardt, M., Ekkernkamp, A. & Stope, M.B. New Treatment Options for Osteosarcoma - Inactivation of Osteosarcoma Cells by Cold Atmospheric Plasma. *Anticancer Res.* 36, 5915-5922 (2016).

88. Kim, G.C., Lee, H.W., Byun, J.H., Chung, J., Jeon, Y.C. & Lee, J.K. Dental Applications of Low-Temperature Nonthermal Plasmas. *Plasma Process Polym* 10, 199-206 (2013).
89. Duarte, S. & Panariello, B.H.D. Comprehensive biomedical applications of low temperature plasmas. *Arch. Biochem. Biophys.* 693, 108560 (2020).
90. Hirst, A.M., Frame, F.M., Maitland, N.J. & O'Connell, D. Low Temperature Plasma Causes Double-Strand Break DNA Damage in Primary Epithelial Cells Cultured from a Human Prostate Tumour. *IEEE transactions on plasma science. IEEE Nuclear and Plasma Sciences Society* 42, 2740-2741 (2014).
91. Guerrero-Preston, R., Ogawa, T., Uemura, M., Shumulinsky, G., Valle, B.L., Pirini, F., Ravi, R., Sidransky, D., Keidar, M. & Trink, B. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.* 34, 941-946 (2014).
92. Weiss, M., Gumbel, D., Gelbrich, N., Brandenburg, L.O., Mandelkow, R., Zimmermann, U., Ziegler, P., Burchardt, M. & Stope, M.B. Inhibition of Cell Growth of the Prostate Cancer Cell Model LNCaP by Cold Atmospheric Plasma. *In Vivo* 29, 611-616 (2015).
93. Chang, J.W., Kang, S.U., Shin, Y.S., Kim, K.I., Seo, S.J., Yang, S.S., Lee, J.S., Moon, E., Baek, S.J., Lee, K. & Kim, C.H. Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: Involvement of DNA-damage-triggering sub-G(1) arrest via the ATM/p53 pathway. *Archives of biochemistry and biophysics* 545, 133-140 (2014).
94. Arndt, S., Wacker, E., Li, Y.F., Shimizu, T., Thomas, H.M., Morfill, G.E., Karrer, S., Zimmermann, J.L. & Bosserhoff, A.K. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Exp. Dermatol.* 22, 284-289 (2013).
95. Weiss, M., Gumbel, D., Hanschmann, E.M., Mandelkow, R., Gelbrich, N., Zimmermann, U., Walther, R., Ekkernkamp, A., Sckell, A., Kramer, A., Burchardt, M., Lillig, C.H. & Stope, M.B. Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways. *PLoS One* 10, e0130350 (2015).
96. Kang, S.U., Cho, J.H., Chang, J.W., Shin, Y.S., Kim, K.I., Park, J.K., Yang, S.S., Lee, J.S., Moon, E., Lee, K. & Kim, C.H. Nonthermal plasma induces

- head and neck cancer cell death: the potential involvement of mitogen-activated protein kinase-dependent mitochondrial reactive oxygen species. *Cell Death Dis.* 5, e1056 (2014).
97. Keidar, M., Walk, R., Shashurin, A., Srinivasan, P., Sandler, A., Dasgupta, S., Ravi, R., Guerrero-Preston, R. & Trink, B. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *British journal of cancer* 105, 1295-1301 (2011).
  98. Metelmann, H.-R., Nedrelow, D.S., Seebauer, C., Schuster, M., von Woedtke, T., Weltmann, K.-D., Kindler, S., Metelmann, P.H., Finkelstein, S.E., Von Hoff, D.D. & Podmelle, F. Head and neck cancer treatment and physical plasma. *Clinical Plasma Medicine* 3, 17-23 (2015).
  99. Semmler, M.L., Bekeschus, S., Schäfer, M., Bernhardt, T., Fischer, T., Witzke, K., Seebauer, C., Rebl, H., Grambow, E., Vollmar, B., Nebe, J.B., Metelmann, H.-R., Woedtke, T.v., Emmert, S. & Boeckmann, L. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* 12, 269 (2020).
  100. Ma, Y., Ha, C.S., Hwang, S.W., Lee, H.J., Kim, G.C., Lee, K.W. & Song, K. Non-thermal atmospheric pressure plasma preferentially induces apoptosis in p53-mutated cancer cells by activating ROS stress-response pathways. *PLoS One* 9, e91947 (2014).
  101. Gumbel, D., Gelbrich, N., Napp, M., Daeschlein, G., Kramer, A., Sckell, A., Burchardt, M., Ekkernkamp, A. & Stope, M.B. Peroxiredoxin Expression of Human Osteosarcoma Cells Is Influenced by Cold Atmospheric Plasma Treatment. *Anticancer Res.* 37, 1031-1038 (2017).
  102. Gumbel, D., Daeschlein, G., Ekkernkamp, A., Kramer, A. & Stope, M.B. Cold atmospheric plasma in orthopaedic and urologic tumor therapy. *GMS Hyg Infect Control* 12, Doc10 (2017).
  103. Meier, P., Finch, A. & Evan, G. Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801 (2000).
  104. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495-516 (2007).
  105. Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776 (2000).

106. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257 (1972).
107. Tang, D., Kang, R., Berghe, T.V., Vandenabeele, P. & Kroemer, G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* 29, 347-364 (2019).
108. Singh, R., Letai, A. & Sarosiek, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20, 175-193 (2019).
109. Tait, S.W. & Green, D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 621-632 (2010).
110. Cavalcante, G.C., Schaan, A.P., Cabral, G.F., Santana-da-Silva, M.N., Pinto, P., Vidal, A.F. & Ribeiro-Dos-Santos, A. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *International journal of molecular sciences* 20(2019).
111. Lopez, J. & Tait, S.W. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British journal of cancer* 112, 957-962 (2015).
112. Mohammad, R.M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.-Y., Lin, L.-T., Siegelin, M.D., Fimognari, C., Kumar, N.B., Dou, Q.P., Yang, H., Samadi, A.K., Russo, G.L., Spagnuolo, C., Ray, S.K., Chakrabarti, M., Morre, J.D., Coley, H.M., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A.G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S.S., Helferich, W.G., Yang, X., Boosani, C.S., Guha, G., Bhakta, D., Ciriolo, M.R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S.I., Keith, W.N., Bilsland, A., Halicka, D., Nowsheen, S. & Azmi, A.S. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 35, S78-S103 (2015).
113. Lauvrak, S.U., Munthe, E., Kresse, S.H., Stratford, E.W., Namlos, H.M., Meza-Zepeda, L.A. & Myklebost, O. Functional characterisation of osteosarcoma cell lines and identification of mRNAs and miRNAs associated with aggressive cancer phenotypes. *British journal of cancer* 109, 2228-2236 (2013).
114. Ponten, J. & Saksela, E. Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *International journal of cancer* 2, 434-447 (1967).
115. Raile, K., Hoflich, A., Kessler, U., Yang, Y., Pfuender, M., Blum, W.F., Kolb, H., Schwarz, H.P. & Kiess, W. Human osteosarcoma (U-2 OS) cells

- express both insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors and insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate (IGF-II/M6P) receptors and synthesize IGF-II: autocrine growth stimulation by IGF-II via the IGF-I receptor. *J. Cell. Physiol.* 159, 531-541 (1994).
116. Niforou, K.M., Anagnostopoulos, A.K., Vougas, K., Kittas, C., Gorgoulis, V.G. & Tsangaris, G.T. The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line. *Cancer Genomics Proteomics* 5, 63-78 (2008).
117. McAllister, R.M., Gardner, M.B., Greene, A.E., Bradt, C., Nichols, W.W. & Landing, B.H. Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma. *Cancer* 27, 397-402 (1971).
118. Rhim, J.S., Park, D.K., Arnstein, P., Huebner, R.J., Weisburger, E.K. & Nelson-Rees, W.A. Transformation of human cells in culture by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature* 256, 751-753 (1975).
119. Rhim, J.S., Putman, D.L., Arnstein, P., Huebner, R.J. & McAllister, R.M. Characterization of human cells transformed in vitro by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *International journal of cancer* 19, 505-510 (1977).
120. Yousfi, M., Merbahi, N., Pathak, A. & Eichwald, O. Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 28, 123-135 (2014).
121. Ratovitski, E.A., Cheng, X.Q., Yan, D.Y., Sherman, J.H., Canady, J., Trink, B. & Keidar, M. Anti-Cancer Therapies of 21st Century: Novel Approach to Treat Human Cancers Using Cold Atmospheric Plasma. *Plasma Process Polym* 11, 1128-1137 (2014).
122. Lunov, O., Zablotskii, V., Churpita, O., Chanova, E., Sykova, E., Dejneka, A. & Kubinova, S. Cell death induced by ozone and various non-thermal plasmas: therapeutic perspectives and limitations. *Sci. Rep.* 4(2014).
123. Vandamme, M., Robert, E., Lerondel, S., Sarron, V., Ries, D., Dozias, S., Sobilo, J., Gosset, D., Kieda, C., Legrain, B., Pouvesle, J.M. & Pape, A.L. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *International journal of cancer* 130, 2185-2194 (2012).
124. Graves, D.B. Reactive Species from Cold Atmospheric Plasma: Implications for Cancer Therapy. *Plasma Process Polym* 11, 1120-1127 (2014).



125. Hirst, A.M., Frame, F.M., Arya, M., Maitland, N.J. & O'Connell, D. Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future. *Tumour Biol.* 37, 7021-7031 (2016).
126. Binenbaum, Y., Ben-David, G., Gil, Z., Slutsker, Y.Z., Ryzhkov, M.A., Felsteiner, J., Krasik, Y.E. & Cohen, J.T. Cold Atmospheric Plasma, Created at the Tip of an Elongated Flexible Capillary Using Low Electric Current, Can Slow the Progression of Melanoma. *PLoS One* 12, e0169457 (2017).
127. Hattori, N., Yamada, S., Torii, K., Takeda, S., Nakamura, K., Tanaka, H., Kajiyama, H., Kanda, M., Fujii, T., Nakayama, G., Sugimoto, H., Koike, M., Nomoto, S., Fujiwara, M., Mizuno, M., Hori, M. & Kodera, Y. Effectiveness of plasma treatment on pancreatic cancer cells. *Int. J. Oncol.* 47, 1655-1662 (2015).
128. Winter, J., Brandenburg, R. & Weltmann, K.D. Atmospheric pressure plasma jets: an overview of devices and new directions. *Plasma Sources Sci T* 24(2015).
129. Laroussi, M. & Akan, T. Arc-free atmospheric pressure cold plasma jets: A review. *Plasma Process Polym* 4, 777-788 (2007).
130. Bekeschus, S., Masur, K., Kolata, J., Wende, K., Schmidt, A., Bundscherer, L., Barton, A., Kramer, A., Broker, B. & Weltmann, K.D. Human Mononuclear Cell Survival and Proliferation is Modulated by Cold Atmospheric Plasma Jet. *Plasma Process Polym* 10, 706-713 (2013).
131. Ishaq, M., Kumar, S., Varinli, H., Han, Z.J., Rider, A.E., Evans, M.D.M., Murphy, A.B. & Ostrikov, K. Atmospheric gas plasma-induced ROS production activates TNF-ASK1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 25, 1523-1531 (2014).
132. Samejima, K. & Earnshaw, W.C. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 677-688 (2005).
133. Lebon, C., Rodriguez, G.V., Zaoui, I.E., Jaadane, I., Behar-Cohen, F. & Torriglia, A. On the use of an appropriate TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay to identify apoptotic cells. *Analytical biochemistry* 480, 37-41 (2015).

134. Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493-501 (1992).
135. Choi, J.Y., Joh, H.M., Park, J.M., Kim, M.J., Chung, T.H. & Kang, T.H. Non-thermal plasma-induced apoptosis is modulated by ATR- and PARP1-mediated DNA damage responses and circadian clock. *Oncotarget* 7, 32980-32989 (2016).
136. Kaushik, N., Uddin, N., Sim, G.B., Hong, Y.J., Baik, K.Y., Kim, C.H., Lee, S.J., Kaushik, N.K. & Choi, E.H. Responses of solid tumor cells in DMEM to reactive oxygen species generated by non-thermal plasma and chemically induced ROS systems. *Sci Rep* 5, 8587 (2015).
137. Nguyen, N.H., Park, H.J., Yang, S.S., Choi, K.S. & Lee, J.S. Anti-cancer efficacy of nonthermal plasma dissolved in a liquid, liquid plasma in heterogeneous cancer cells. *Sci Rep* 6, 29020 (2016).
138. Circu, M.L. & Aw, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine* 48, 749-762 (2010).
139. Kalghatgi, S., Kelly, C.M., Cerchar, E., Torabi, B., Alekseev, O., Fridman, A., Friedman, G. & Azizkhan-Clifford, J. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS One* 6, e16270 (2011).
140. Arjunan, K.P., Sharma, V.K. & Ptasinska, S. Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA-a review. *International journal of molecular sciences* 16, 2971-3016 (2015).
141. Olive, P.L. & Banath, J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols* 1, 23-29 (2006).
142. Wende, K., Strassenburg, S., Haertel, B., Harms, M., Holtz, S., Barton, A., Masur, K., von Woedtke, T. & Lindequist, U. Atmospheric pressure plasma jet treatment evokes transient oxidative stress in HaCaT keratinocytes and influences cell physiology. *Cell Biol. Int.* 38, 412-425 (2014).
143. Blackert, S., Haertel, B., Wende, K., von Woedtke, T. & Lindequist, U. Influence of non-thermal atmospheric pressure plasma on cellular structures and processes in human keratinocytes (HaCaT). *J. Dermatol. Sci.* 70, 173-181 (2013).
144. Hirst, A.M., Simms, M.S., Mann, V.M., Maitland, N.J., O'Connell, D. & Frame, F.M. Low-temperature plasma treatment induces DNA damage

- leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. *Br. J. Cancer* 112, 1536-1545 (2015).
145. Morales-Ramirez, P., Cruz-Vallejo, V., Pena-Eguiluz, R., Lopez-Callejas, R., Rodriguez-Mendez, B.G., Valencia-Alvarado, R., Mercado-Cabrera, A. & Munoz-Castro, A.E. Assessing cellular DNA damage from a helium plasma needle. *Radiat. Res.* 179, 669-673 (2013).
  146. Sirbu, B.M. & Cortez, D. DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012724 (2013).
  147. Caldecott, K.W. Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays* 23, 447-455 (2001).
  148. Caldecott, K.W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature reviews. Genetics* 9, 619-631 (2008).
  149. Kuzminov, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8241-8246 (2001).
  150. Thompson, L.H. & Schild, D. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res-Fund Mol M* 477, 131-153 (2001).
  151. Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A. & Gorbunova, V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* 7, 2902-2906 (2008).
  152. Lieber, M.R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* 283, 1-5 (2008).
  153. Zhang, X., Zhang, C., Zhou, Q.Q., Zhang, X.F., Wang, L.Y., Chang, H.B., Li, H.P., Oda, Y. & Xing, X.H. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5639-5646 (2015).
  154. Zhang, X., Zhang, X.F., Li, H.P., Wang, L.Y., Zhang, C., Xing, X.H. & Bao, C.Y. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5387-5396 (2014).
  155. Johnson, G.E. Mammalian cell HPRT gene mutation assay: test methods. *Methods in molecular biology* 817, 55-67 (2012).

156. Boehm, D., Heslin, C., Cullen, P.J. & Bourke, P. Cytotoxic and mutagenic potential of solutions exposed to cold atmospheric plasma. *Sci Rep* 6, 21464 (2016).
157. Maisch, T., Bosserhoff, A.K., Unger, P., Heider, J., Shimizu, T., Zimmermann, J.L., Morfill, G.E., Landthaler, M. & Karrer, S. Investigation of toxicity and mutagenicity of cold atmospheric argon plasma. *Environmental and molecular mutagenesis* 58, 172-177 (2017).
158. Boxhammer, V., Li, Y.F., Koritzer, J., Shimizu, T., Maisch, T., Thomas, H.M., Schlegel, J., Morfill, G.E. & Zimmermann, J.L. Investigation of the mutagenic potential of cold atmospheric plasma at bactericidal dosages. *Mutation research* 753, 23-28 (2013).
159. Fenech, M. The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. *Methods in molecular biology* 410, 185-216 (2008).
160. Kaushik, N.K., Uhm, H. & Choi, E.H. Micronucleus formation induced by dielectric barrier discharge plasma exposure in brain cancer cells. *Appl Phys Lett* 100(2012).
161. Wende, K., Bekeschus, S., Schmidt, A., Jatsch, L., Hasse, S., Weltmann, K.D., Masur, K. & von Woedtke, T. Risk assessment of a cold argon plasma jet in respect to its mutagenicity. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis* 798-799, 48-54 (2016).
162. Kluge, S., Bekeschus, S., Bender, C., Benkhail, H., Sckell, A., Below, H., Stope, M.B. & Kramer, A. Investigating the Mutagenicity of a Cold Argon-Plasma Jet in an HET-MN Model. *PLoS One* 11, e0160667 (2016).
163. Metelmann, H.-R., Vu, T.T., Do, H.T., Le, T.N.B., Hoang, T.H.A., Phi, T.T.T., Luong, T.M.L., Doan, V.T., Nguyen, T.T.H., Nguyen, T.H.M., Nguyen, T.L., Le, D.Q., Le, T.K.X., von Woedtke, T., Bussiahn, R., Weltmann, K.-D., Khalili, R. & Podmelle, F. Scar formation of laser skin lesions after cold atmospheric pressure plasma (CAP) treatment: A clinical long term observation. *Clinical Plasma Medicine* 1, 30-35 (2013).
164. Mateu-Sanz, M., Tornín, J., Brulin, B., Khlyustova, A., Ginebra, M.-P., Layrolle, P. & Canal, C. Cold Plasma-Treated Ringer's Saline: A Weapon to Target Osteosarcoma. *Cancers (Basel)* 12, 227 (2020).

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden in nachfolgenden Publikationen bereits veröffentlicht:**

1. Haralambiev L.\*, **Wien L.\***, Gelbrich N., Lange J., Bakir S., Kramer A., Burchardt M., Ekkernkamp A., Gumbel D., Stope M. B. – Cold atmospheric plasma inhibits the growth of osteosarcoma cells by inducing apoptosis, independent of the device used. *Oncology letters* 19, 283-290 (2020).
2. Haralambiev L., **Wien L.**, Gelbrich N., Kramer A., Mustea A., Burchardt M., Ekkernkamp A., Stope M. B., Gumbel D. – Effects of Cold Atmospheric Plasma on the Expression of Chemokines, Growth Factors, TNF Superfamily Members, Interleukins, and Cytokines in Human Osteosarcoma Cells. *Anticancer Res.* 39, 151-157 (2019).
3. Gumbel D., Suchy B., **Wien L.**, Gelbrich N., Napp M., Kramer A., Ekkernkamp A., Daeschlein G., Stope M. B. – Comparison of Cold Atmospheric Plasma Devices' Efficacy on Osteosarcoma and Fibroblastic In Vitro Cell Models. *Anticancer Res.* 37, 5407-5414 (2017).

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden in nachfolgenden Vorträgen bereits veröffentlicht:**

1. **Wien L.**, Stope M. B., Gelbrich N., Napp M., Ekkernkamp A., Gumbel D. – Kaltes physikalisches Plasma (CAP) zur Behandlung des humanen Osteosarkoms – zelluläre und molekulare Analyse. *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (2017, Posterpräsentation)*

# Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas danke ich herzlichst Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Axel Ekkernkamp, Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Wiederherstellungschirurgie und Rehabilitative Medizin der Universitätsmedizin Greifswald. Ihre Unterstützung hat die Bearbeitung des Forschungsthemas überhaupt möglich gemacht.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. Denis Gümbel für die zuverlässige Betreuung. Die unzähligen motivierenden Impulse und der bereichernde Austausch haben wesentlich zur erfolgreichen Erstellung dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso gebührt mein besonderer Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias B Stope für die kontinuierliche Betreuung der laborchemischen Arbeit. Die Vermittlung laborchemischer Expertise und der konstruktive Austausch bilden die Grundlage, auf der mir die Erstellung dieser Arbeit möglich wurde.

Von Herzen danke ich meiner Frau Thea und unseren gemeinsamen Kindern Fritz und Margarete für deren jederzeit uneingeschränkte Liebe und Unterstützung. Ebenfalls von Herzen danke ich meiner zweiten Mutter Susanne für Ihre Hingabe für mich und meinen Bruder.

Für meine Eltern Bettina und Holger und für meinen Großvater Eberhard.