

Aus dem
Department für Frauengesundheit
Universitäts-Frauenklinik Tübingen

**In vitro Untersuchung zur indirekten physikalischen
Plasmatherapie bei Ovarialkarzinomen mit plasma-
aktiviertem Medium**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Oelkrug, Franziska Elena
2026**

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professorin Dr. K. Schenke-Layland

2. Berichterstatter: Professorin Dr. E. M. Grischke

Tag der Disputation: 12.03.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2	Histologie, Tumorklassifikation und Stadieneinteilung.....	2
1.1.3	Klinik und Diagnostik	6
1.1.4	Primärtherapie, Rezidiverkrankungen und Prognosefaktoren	7
1.1.5	Physikalisches Plasma und plasmaaktiviertes Medium (PAL).....	8
1.1.5.1	Plasmaanwendung in der Medizin	10
1.1.6	Zielsetzung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material.....	12
2.1.1	Laborgeräte	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3	Chemikalien.....	14
2.1.4	Gase.....	14
2.1.5	Kommerzielle Puffer und Lösungen	14
2.1.6	Kommerzielle Kits und Reagenzien	15
2.1.7	Zellkulturmedien und -zusätze	16
2.1.8	Softwares	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Kultivierung und Passagieren	17
2.2.2	Kryokonservierung und Auftauen kryokonservierter Zellen	18
2.2.3	Aufbereitung von Aszites	18
2.2.4	PAL-Herstellung und PAL-Behandlung	19
2.2.5	Viabilitätsassay	20
2.2.6	Bestimmung IC50	20
2.2.7	Caspase 3/7 Assay	21
2.2.8	DNA-Doppelstrangbruchanalyse.....	21
2.2.9	Zellzyklusanalyse	23
2.2.10	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy = FLIM)	24
2.2.11	Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials mithilfe der Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie.....	26
2.2.12	Immunfluoreszenz-Färbung	27
2.2.12.1	Calretinin/Paired-Box-Protein 8 (PAX8)	27

2.2.12.2	Annexin V	28
2.2.12.3	Statistische Analyse.....	29
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Isolierung und immunhistochemische Charakterisierung humaner Ovarialkarzinomzellen aus Aszites	30
3.2	Effekte der PAL-Behandlung auf die Zellviabilität in Abhängigkeit von der PAL-Verdünnung und PAL-Inkubationszeit.....	34
3.3	Apoptoseinduktion in Abhängigkeit von PAL-Konzentration und PAL-Behandlungsdauer	37
3.4	Effekte auf DNA-Doppelstränge in zeitlicher Abhängigkeit der PAL-Behandlung.....	39
3.5	Zeitabhängige Effekte der PAL-Behandlung auf den Zellzyklus	40
3.6	Einfluss der PAL-Behandlung auf die isolierten Asziteszellen	42
3.7	Effekte der PAL-Behandlung auf den zellulären Metabolismus	44
3.8	Einfluss der PAL-Behandlung auf das mitochondriale Transmembranpotential 46	
4	Diskussion	48
5	Zusammenfassung	64
6	Anhang	66
7	Literaturverzeichnis.....	67
8	Erklärung zum Eigenanteil	78
9	Danksagung	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Das Ovar mit seinen unterschiedlichen Zellentitäten
Abbildung 2	DBD versus Plasmajets
Abbildung 3	PAL-Herstellung und PAL-Behandlung
Abbildung 4	Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer (τ)
Abbildung 5	Morphologische Beurteilung der Asziteszellen
Abbildung 6	Repräsentative Darstellung der biomolekularen Charakterisierung der partiell trypsinisierten Asziteszellen
Abbildung 7	Zelluläre Viabilität in Abhängigkeit von PAL-Dosierung und PAL-Inkubationszeit
Abbildung 8	Dosis- und inkubationszeitabhängige Apoptoseinduktion nach PAL-Behandlung
Abbildung 9	Dosis- und inkubationszeitabhängige Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nach PAL-Behandlung
Abbildung 10	Effekte der PAL-Behandlung auf die Zellzyklusregulation
Abbildung 11	Einfluss der PAL-Behandlung auf primäres Ovarialkarzinomgewebe abhängig von PAL-Dosierung und PAL-Inkubationszeit
Abbildung 12	Effekte der PAL-Behandlung auf den Redoxstoffwechsel
Abbildung 13	Effekte der PAL-Behandlung auf das mitochondriale Transmembranpotential
Abbildung 14	Energiemetabolismus der Zelle
Abbildung 15	Zelluläre PAL-Effekte

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	TNM- und FIGO-Klassifikation nach dem Leitlinienprogramm
Tabelle 2	Verwendete Geräte
Tabelle 3	Verbrauchsmaterialien
Tabelle 4	Verwendete Chemikalien
Tabelle 5	Verwendete Gase
Tabelle 6	Verwendete kommerzielle Puffer und Lösungen
Tabelle 7	Verwendete kommerzielle Kits und Reagenzien
Tabelle 8	Verwendete Zellkulturmedien und -zusätze
Tabelle 9	Softwares
Tabelle 10	Zusammensetzung von Zellmedium und Puffer
Tabelle 11	Charakterisierung der Patientinnen
Tabelle 12	Repräsentative Charakterisierung der Asziteszellen nach partiellem Trypsinieren

Abkürzungsverzeichnis

ADC	Antibody-Drug-Conjugate (Antikörper-Konjugat-Wirkstoff)
APC	Argon-Plasma-Koagulation
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
CA 125	Cancer-Antigen125
ctrl	Kontrolle
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	dielektrische Barriereentladung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie)
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MFI	mittlere Intensität des Fluoreszenzsignals
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PAL	plasmaaktiviertes Medium
PARP-Inhibitoren	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Inhibitoren
PAX 8	Paired-Box-Protein 8
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium-Iodid
RNS	reaktive Stickstoffspezies
RONS	reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation (Standardabweichung)
STIC	Serous tubal intraepithelial carcinome (seröses tubares intraepitheliales Karzinom)

TMRM
UICC

Tetramethylrhodamine
Union internationale contre le cancer

1 Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Ovarialkarzinom stellt das am zweithäufigsten tödlich verlaufende gynäkologische Malignom dar. Es bildet ein Drittel der bösartigen Erkrankungen des weiblichen Genitales ab und ist damit nach dem Mamma- und Endometriumkarzinom das dritthäufigste gynäkologische Malignom. Die Erkrankungsraten steigen bis zum 85. Lebensjahr kontinuierlich an, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 68 Jahren liegt. 5 % bis 10 % aller bösartigen Erkrankungen des Eierstocks treten vor dem 45. Lebensjahr auf. Die früh auftretenden Ovarialkarzinome sind meist Keimzelltumore. Jede 74. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Eierstockkrebs, obwohl die Erkrankungen und Sterberaten in Deutschland seit der Jahrtausendwende abnehmen und auch die absoluten Zahlen der Neuerkrankungen rückläufig sind. Die 5-Jahresüberlebensrate über alle Stadien des Ovarialkarzinoms liegt aktuell bei 43 %. Somit leben weniger als die Hälfte der Patientinnen mehr als fünf Jahre nach der Diagnosestellung. Diese schlechte Prognose beruht in den meisten Fällen auf der späten Diagnose. In 73 % der Fälle wird die Erkrankung erst im fortgeschrittenen Stadium (FIGO IIB) festgestellt [1].

Das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter, Asbestexposition, Adipositas, hormonellen und hereditären Risikofaktoren [2, 3, 4]. Zu den hormonellen Risikofaktoren zählt eine hohe Anzahl an Ovulationen [5]. Somit stellen Nulliparität, eine frühe Menarche und eine späte Menopause ein erhöhtes Risiko dar. Die Erkrankung an Endometriose oder dem Polyzystischen Ovarialsyndrom geht ebenso mit einem erhöhten Risiko für Eierstockkrebs einher [6, 7]. Die postmenopausale Einnahme von weiblichen Geschlechtshormonen stellt einen weiteren Risikofaktor dar [8]. Als wichtige hereditäre Risikofaktoren sind Mutationen in den in der Keimbahn lokalisierten Genen BRCA1 und BRCA2 zu nennen [9]. Seltener Mutationen wie die BRIP1- und RAD51C-Mutation gehen ebenso mit einem erhöhten Lebenszeitrisiko für Ovarialkarzinome einher [10, 11]. Die Erkrankung am Lynch-Syndrom, welche überwiegend aus einer Mutation in den Genen MSH2 und MLH1 hervorgeht, ist ein weiterer erblicher Risikofaktor [12].

Protektiv zeigt sich eine geringe Anzahl an Ovulationen. Viele Schwangerschaften und eine lange Stillperiode gelten demnach als schützende Faktoren [13]. Gleichsam verhält sich die Einnahme von oralen Kontrazeptiva [14].

Das high-grade seröse Ovarialkarzinom entsteht aus einer okkulten Vorläuferläsion im Eileiter, dem sogenannten serösen tubaren intraepithelialen Karzinom (STIC) [15]. Das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, wird durch eine Tubenligatur um 34 % reduziert. Es wird angenommen, dass die Unterbindung der retrograden Menstruation und des Transports von karzinogenem Material aus der Vulva oder dem Peritoneum in die Peritonealhöhle für die Risikoreduktion verantwortlich ist [16]. Folglich zeigt eine bilaterale prophylaktische Salpingektomie ebenso protektive Effekte. Sie bewirkt eine Risikoreduktion von 80 % bis 90 % um an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [17].

Außerhalb von klinischen Studien ergibt sich derzeit keine therapeutische Konsequenz aus diesen protektiven Erkenntnissen. Eine Ausnahme stellt die Empfehlung bei BRCA1-Trägerinnen zu einer Salpingo-Oophorektomie ab einem Alter von 35 bis 40 Jahren dar. BRCA2-Trägerinnen wird selbige operative Maßnahme ab dem 41. bis 46. Lebensjahr empfohlen [18].

1.1.2 Histologie, Tumorklassifikation und Stadieneinteilung

Das Ovar besteht aus unterschiedlichen Zellentitäten wie in Abbildung (Abb.) 1 aufgezeigt. Aus jeder einzelnen können maligne Transformationen entstehen. Aus den Eizellen können Keimzelltumore entstehen. Aus den Granulosazellen, Thekazellen, Fibroblasten oder dem Keimstrangstroma können Keimstrangstromatumore entstehen. Borderlinetumore können bei jedem histologischen Subtyp auftreten. Die Dignität jener liegt zwischen einem benignen und malignen Tumor, da sie eine Malignität ohne invasives Wachstum aufweisen. Die häufigsten Ovarialkarzinome entstehen aus dem Oberflächenepithel (70 %) und werden als epitheliale Tumore bezeichnet. Diese können weiter in seröse (high-grade und low-grade), muzinöse, endometrioid, klarzellige, seromuzinöse Karzinome und den selten auftretenden Brenner-Tumor unterteilt werden. Hierbei stellt das high-grade seröse Ovarialkarzinom die am häufigsten auftretende und zugleich aggressivste Form dar. Es ist für 70 % bis 80 % der Todesfälle durch Eierstockkrebs verantwortlich [19].

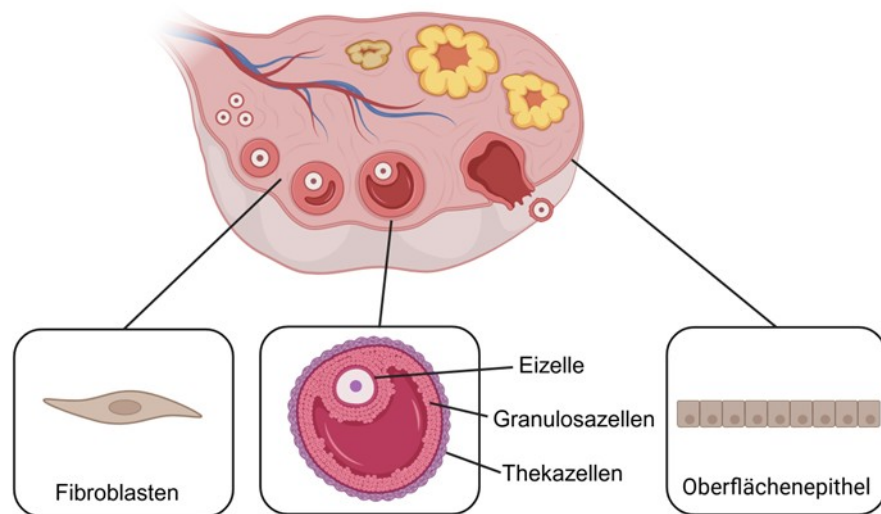


Abb. 1: Das Ovar mit seinen unterschiedlichen Zellentitäten. Das Ovar besteht aus einem Oberflächenepithel, einem Stroma mit Fibroblasten und präovulatorischen Follikeln mit Eizellen, Granulosa- und Thekazellen. Aus Eizellen können Keimzelltumore entstehen, aus Fibroblasten, Granulosa- und Thekazellen können Keimstrangstromatumore entstehen. Aus dem Oberflächenepithel können sich epitheliale Karzinome entwickeln. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Die Stadieneinteilung kann nach der FIGO-Klassifikation oder der TNM-Klassifikation der Union internationale contre le cancer (UICC) vorgenommen werden. Beide Klassifikationen berücksichtigen die Tumorausbreitung und das Tumorstadium und verhalten sich konkordant [20]. Die jeweiligen Kriterien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: TNM- und FIGO-Klassifikation nach dem Leitlinienprogramm [20]

	FIGO	Definition
TX		Primärtumor nicht bekannt, keine Angabe möglich
T0		Kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor auf die Ovarien oder Tuben beschränkt
T1a	IA	Auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1b	IB	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1c	IC	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte:
T1c1	IC1	Iatrogene Kapsel- (Serosa-)ruptur
pT1c2	IC2	Präoperative Kapsel- (Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
T1c3	IC3	Maligne Zellen im Aszites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
T2b	IIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des

		kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3		Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Metastasen ≤ 10mm
N1b	IIIA1ii	Metastasen > 10mm
T3a jedes N	IIIA2	Mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b jedes N	IIIB	Makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c jedes N	IIIC	Makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder Milzkapsel ein
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
M1a	IVA	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Das Ovarialkarzinom ist im Frühstadium in der Regel asymptomatisch und im Spätstadium sind die Symptome unspezifisch [21]. Deshalb wird es meist erst in einem späten Stadium diagnostiziert. Dennoch zeigen 93 % der Patientinnen vor der Diagnose unspezifische Symptome wie Völlegefühl, Blähungen, unklare abdominale Schmerzen, Zunahme der Miktionsfrequenz, Rückenschmerzen und eine abdominale Umfangsvermehrung aufgrund des meist schon vorhandenen Aszites [22]. Der typische Habitus einer Patientin mit fortgeschrittenem Eierstockkrebs wird *facies ovarica* genannt und definiert sich aus einer Tumorkachexie mit eingefallenem Gesicht und einem vorgewölbten Bauch. Frauen, insbesondere ab dem 50. Lebensjahr, sollten bei Persistenz oder Kombination solcher unspezifischen Symptome weiter diagnostisch abgeklärt werden. Aktuell gibt es keine empfohlene Screening-Methode. Die durchgeführten Screening-Studien bei gesunden Frauen mit regelmäßigen Ultraschallkontrollen und Bestimmung des Tumormarkers Cancer-Antigen125 (CA 125) konnten die Sterblichkeit nicht signifikant verringern [23]. Daher kann ein Screening für die Allgemeinbevölkerung nicht empfohlen werden. Bei Verdacht auf eine ovarielle Raumforderung soll eine gynäkologische Spiegel- und Tastuntersuchung erfolgen, an die eine Transvaginalsonographie angeschlossen wird [20]. Beim primären Staging bei gesichertem Ovarialkarzinom lässt der Ultraschall nur eine begrenzte Darstellung des Beckens zu, sodass die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie oder die Positronen-Emissions-Tomographie eine bessere Aussage über das restliche Abdomen erlauben [20].

1.1.4 Primärtherapie, Rezidiverkrankungen und Prognosefaktoren

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht aus einer Stagingoperation, welche eine Peritonealzytologie, Probenentnahmen des Peritoneums, die Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie, die infragastrische und -kolische Omentektomie sowie die pelvine und paraaortale Lymphonodektomie beinhaltet, und einer Systemtherapie [20]. Die vollständige Zytoreduktion aller makroskopisch sichtbaren Tumorherde ist signifikant mit längerem Überleben assoziiert [24]. Die Grenzen der Radikalität sind bei ausgedehntem Befall der Dünndarmwand oder ausgeprägtem Befall des Mesenteriums mit Infiltration der Mesenterialwurzel gegeben.

Durch die Chemotherapie mittels Carboplatin konnte eine Verbesserung sowohl des Gesamtüberlebens als auch des progressionsfreien Überlebens nachgewiesen werden [25]. Der zusätzliche Einsatz des Anti-Angiogenesehemmers Bevacizumab verlängerte das progressionsfreie Überleben als Erhaltungstherapie beginnend mit der Chemotherapie signifikant [26]. Daneben zeigten mehrere Phase-II-Studien bemerkenswerte Verbesserungen des progressionsfreien Überlebens bei neu diagnostiziertem Eierstockkrebs durch eine Therapie mit Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Inhibitoren (PARP-Inhibitoren) [27]. Nicht zu vernachlässigen sind die während der Primärtherapie teils schwerwiegenden Nebenwirkungen. Neben den typischen Nebenwirkungen einer Chemotherapie können durch Carboplatin Neuropathien und durch Bevacizumab gastrointestinale Perforationen ausgelöst werden [28, 29].

Die wichtigsten Prognosefaktoren stellen das Tumorstadium bei Diagnosesicherung, der postoperative Tumorrest nach der primären Staging-Operation, das Grading und die leitliniengerechte Therapie dar. Das Alter bei Erkrankungsbeginn und der Allgemeinzustand der Patientinnen spielen ebenso eine relevante Rolle [30]. 80 % der fortgeschrittenen Ovarialkarzinome entwickeln einen Progress oder ein Rezidiv [31].

Patientinnen mit einem platinsensitiven Rezidiv sollen eine platinhaltige Kombinationstherapie erhalten. Eine Erhaltungstherapie mit Bevacizumab oder PARP-Inhibitoren kann je nach Tumoreigenschaften erwogen werden. Platinresistente Ovarialkarzinomrezidive sollen eine nicht platinhaltige Monotherapie erhalten. Bei einer Kombination mit Bevacizumab konnte eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls festgestellt werden [32].

1.1.5 Physikalisches Plasma und plasmaaktiviertes Medium (PAL)

Das Gebiet der Plasmamedizin erlangte innerhalb des letzten Jahrzehnts immer mehr Aufmerksamkeit und erzielte erhebliche Fortschritte in unterschiedlichen Bereichen der medizinischen Anwendung. Plasma wurde erstmalig 1928 von Irving Langmuir beschrieben [33].

Plasma ist ein ionisiertes Gas, das aus geladenen Teilchen, Molekülen, Radikalen sowie ultravioletter und infraroter Strahlung besteht [34, 35]. Kaltes physikalisches Plasma wird durch die Zufuhr von Energie zu einem Gas gebildet. Der Energieübertragung an der Grenzfläche zwischen Plasmaentladung und der umgebenden Luftatmosphäre folgen sekundäre chemische Reaktionsprozesse und damit die Erzeugung von reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) (RONS) sowie verschiedenen anderen geladenen Teilchen, Ozon und UV-Licht.

Die wichtigste biologisch aktive Komponente von Plasma ist die Vielzahl reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die bei Reaktionen mit Molekülen der Umgebungsluft entstehen [36]. Wasserstoffperoxid spielt eine besonders zentrale Rolle im Wirkmechanismus [37]. Andere physikalische Komponenten, die durch Plasma erzeugt werden, wie ultraviolette Strahlung scheinen vernachlässigbare Effekte zu haben [38]. Die im Plasma vorhandenen RONS induzieren multiple zelluläre chemische und physikalische Effekte, die die Zellproliferation und Apoptose beeinflussen. Neben der Apoptoseinduktion durch die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 sowie der Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und anschließender Caspaseaktivierung konnten unterschiedliche Einflüsse auf den Zellzyklus beschrieben werden, die zu einem Zellzyklusarrest führen [39, 40]. Als zelluläre Folge auf den oxidativen Stress von RONS konnten außerdem Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden wie DNA-Doppelstrangbrüche festgestellt werden [41].

Es gibt zwei verschiedene Arten von Plasmaanwendungen: Die direkte Exposition von Plasma auf Gewebe und Zellen und die Applikation von plasmaaktiviertem Medium auf Gewebe oder Zellen [42]. Bei zweiterem wird ein Medium mit Plasma behandelt und anschließend auf die Zielzellen gegeben. Die Wirksamkeit beruht auf den im Medium befindlichen und durch die Plasmabehandlung erzeugten RONS. Diese Art der Anwendung bietet die Möglichkeit der Behandlung von großen und geschlossenen Körperbereichen. Hier könnte eine klinische Applikation in Form von Spülungen, Sprühen oder Injektionen eine Behandlung lokalisierter Bereiche und den Zugang zu

komplexen anatomischen Strukturen ermöglichen [43]. Der Wirkmechanismus der beiden Plasmaanwendungen ist vergleichbar [44]. PAL kann bei nahezu Raumtemperatur und unter atmosphärischem Druck hergestellt werden. Diese Eigenschaft ermöglicht die Anwendung von Plasma auf hitzesensiblen Materialien wie humanem, vitalem Gewebe [45].

Für die Herstellung von Plasma können zwei unterschiedliche Prinzipien herangezogen werden: Plasmajets (Abb. 2 (b)) und die dielektrische Barriereentladung (DBD) (Abb. 2 (a)). Bei der DBD werden zwei Elektroden, wovon eine geerdet ist, an ein Dielektrikum angebracht. Liegt eine Spannung zwischen diesen an und strömt Gas an, kann ein starkes elektrisches Feld erzeugt werden, um das Gas durch elektrische Entladungen zu Plasma zu ionisieren. Plasmajets hingegen bestehen aus einer Sonde, die eine zentrierte Elektrode besitzt, und einer zweiten Erdungselektrode, die an dem zu behandelnden Material anliegt. Strömt durch diese Sonde Gas und liegt eine Spannung zwischen den beiden Elektroden an, so wird das Gas zu Plasma ionisiert, welches anschließend mit Sauerstoff und Stickstoff der Umgebungsluft interagiert. Der Großteil des Plasmas wird innerhalb des Plasmageräts erzeugt. Dieses tritt aus der Öffnung des Geräts aus und wird mit dem biologischen Ziel in Kontakt gebracht [46]. PAL ermöglicht als Träger von RONS indirekte Plasmaeffekte.

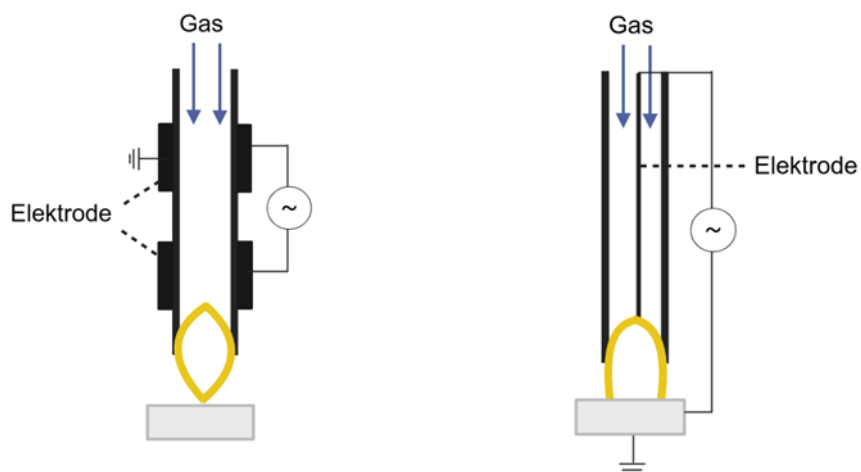


Abb. 2: DBD (a) versus Plasmajets (b). Zur Herstellung von Plasma kann zwischen DBD, bei welchem zwei Elektroden an das Dielektrikum angebracht sind, und Plasmajets, welches eine Sonde mit zentralisierter Elektrode und eine Erdungselektrode, die am zu behandelnden Material anliegt, unterschieden werden. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

1.1.5.1 Plasmaanwendung in der Medizin

Die Wirkung von PAL wird seit einigen Jahren in Studien untersucht und es zeigen sich vielversprechende Effekte. Die Plasmamedizin hat inzwischen vielfältige klinische Anwendungen. Durch die Inaktivierung eines breiten Spektrums von Mikroorganismen, einschließlich multi-resistenter Keime, kann es zur Sterilisation herangezogen werden. Dieser Effekt beruht auf Plasma-induzierter chromosomaler DNA-Schädigung, Proteindeaktivierung, Aminosäureoxidation und Lipidmembranperoxidation [47]. Durch die Stimulation von Zellproliferation und Förderung der Geweberegeneration bei geringer Plasmabehandlungszeit hat die Plasmatherapie einen festen Stellenwert in der Wundheilung gefunden [48]. Daneben wird es in weiteren dermatologischen Krankheitsbildern wie der Psoriasis angewendet [49, 50]. Blutgerinnungsfördernde Effekte konnten durch die Stimulation der Thrombozytenaggregationshemmung und Aktivierung von Gerinnungsfaktoren nachgewiesen werden [51]. Besondere Wichtigkeit erlangt die Plasmabehandlung heute in der Krebstherapie. Verschiedene Studien konnten antiproliferative Effekte durch die Auslösung des programmierten Zelltods bei unterschiedlichen Tumorzellen nachweisen [52, 53, 54]. Besonders bei gynäkologischen Tumoren konnten aussichtsreiche Ergebnisse nach PAL-Behandlung aufgezeigt werden [55]. Bei Krebsvorstufen des Cervixkarzinoms konnten hohe Remissionsraten nach Plasmabehandlung erzielt werden [56]. Des Weiteren konnte im Mausmodell die Metastasierung von Ovarialkarzinomen gehemmt werden, was zu einer verlängerten Überlebenszeit führte [57]. Auch die Kombinationstherapien aus PAL und bisherigen Chemotherapien zeigen zur Überwindung von Resistenzen neue Alternativen auf [58].

1.1.6 Zielsetzung

Das Ovarialkarzinom zeigt trotz multimodaler Therapieansätze weiterhin eine der schlechtesten Prognosen gynäkologischer Malignome. PAL hat sich als vielversprechende, selektive Therapieoption mit minimalen Nebenwirkungen erwiesen. Die praktischen Vorteile von PAL gegenüber direkter Plasmaanwendung machen es besonders interessant für intraoperative oder intraperitoneale Anwendungen bei Ovarialkarzinomerkrankungen.

Die Hauptziele dieser Arbeit waren:

- Isolierung und Charakterisierung primärer Ovarialkarzinomzellen aus Aszites mittels immunhistochemischer Marker (PAX8/Calretinin)
- Bestimmung der zelllinienspezifischen IC50-Werte für PAL an kommerziellen Zelllinien (OCVAR-29, HEY, OVCAR-3) und primären Asziteszellen
- Untersuchung der molekularen Wirkmechanismen von PAL durch Analyse von Apoptoseinduktion, DNA-Doppelstrangbrüchen und Zellzyklusregulation
- Charakterisierung metabolischer Veränderungen mittels FLIM und NADH/FAD und mitochondrialem Transmembranpotential.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen eine präklinische Grundlage für neue therapeutische Entwicklungen schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Durchflusszytometer	BD LSRFortessa™	BD Bioscience, Heidelberg (Germany)
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer Z1	Carl Zeiss AG, Oberkochen (Germany)
Gefrierbehälter	Mr. Frosty™	Thermo Scientific, Bothell (USA)
Inkubator	BBD6220	Thermo Scientific, Bothell (USA)
Lasermikroskop	Zeiss LSM 880	Carl Zeiss AG, Oberkochen (Germany)
Lichtmikroskop	Primovert	Carl Zeiss AG, Oberkochen (Germany)
Microplate Reader		Tecan Trading AG, Männedorf (Switzerland)
Neubauer-Zählkammer	Neubauer-improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen (Germany)
Pipettensatz	Eppendorf Research-Plus (0,1 - 1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg (Germany)
Pipettierhelfer	Stripettor plus	Corning®, New York (USA)
Plasmagerät	Erbe Vio®3	Erbe, Tübingen (Germany)
Sterile Werkbank	S2020 1.2	Thermo Scientific, Bothell (USA)
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)

Wasserbad	Corio C	Julabo, (Germany)	Seelbach
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X1R	Thermo Scientific, Bothell (USA)	

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.

Material	Produktnummer	Hersteller
96-well TC-treated Microplates	CLS3596	Corning®
Argon-Plasma-Koagulation-Sonde	20132-222	Erbe
Chamber slides 18 well	81517	ibidi
Chamber slides 8 well	80841	ibidi
Deckgläser	0107032	Marienfeld
Einwegpipetten 100 µl	686270	Greiner bio-one
Einwegpipetten 10 ml	356551	Corning®
Einwegpipetten 10 µl	765271	Greiner bio-one
Einwegpipetten 200 µl	685270	Greiner bio-one
Einwegpipetten 20 ml	356525	Corning®
Einwegpipetten 50 ml	357550	Corning®
Einwegpipetten 5 ml	356543	Corning®
Eppendorf Safe Lock Tubes 2 ml	0030120094	Eppendorf
Kryoröhrchen CRYO.S™	126263	Greiner bio-one
Steriflip	SCNY00060	Merck
Zellfilter 100 µm	542000	Greiner bio-one
Zellfilter 70 µm	542070	Greiner bio-one
Zellkulturflasche T175	660175	Greiner bio-one
Zellkulturflasche T25	690160	Greiner bio-one
Zellkulturflasche T75	658170	Greiner bio-one
Zellschaber	541070	Greiner bio-one
Zentrifugenröhrchen 15 ml	188261	Greiner bio-one
Zentrifugenröhrchen 50 ml	227261	Greiner bio-one

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.

Stoff	Reinheit	CAS- Nummer	Produktnummer	Hersteller
Bovines Serumalbumin	≥ 98,0 %	9048-46-8	8076	ROTH
Ethanol	≥ 99,8 %	64-17-5	A1613	AppliChem GmbH
Paraformaldehyd	95,0 %	30525-89-4	158127	Sigma-Aldrich
Resazurin	80 %	62758-13-8	R7017	Sigma-Aldrich
Triton X-100	≥ 99,0 %	9036-19-5	T9284	Sigma-Aldrich

2.1.4 Gase

Tabelle 5: Verwendete Gase.

Gas	Reinheit	CAS-Nummer	Produktnummer	Hersteller
Argon	≥ 99,996	7440-37-1	10100321	Linde GmbH, Pullach (Germany)

2.1.5 Kommerzielle Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Verwendete kommerzielle Puffer und Lösungen.

Produkt	Produktnummer	Hersteller
DPBS	14190-094	Gibco™

2.1.6 Kommerzielle Kits und Reagenzien

Tabelle 7: Verwendete kommerzielle Kits und Reagenzien.

Produkt	Produktnummer	Hersteller
Accutase	A6964	Sigma-Aldrich
AlexaFluor388 anti-mouse IgG2b	A21141	Invitrogen
AlexaFluor594 anti-rabbit IgG	A11037	Invitrogen
Annexin V Polyclonal Antibody	PA5-27872	ThermoFisher
Anti-Phosphohiston H2A.X (Ser139)-Antikörper	16-202A	Sigma-Aldrich
Calretinin	sc-365956	Santa Cruz
Caspase-Glo®3/7 Assay	G8090	Promega Corporation
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	G8080	Promega Corporation
Cold-water-fish-skin-gelatine	G7765	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	A994.1	ROTH
Paired-Box-Protein 8	10336-1-AP	Proteintech
ProLongGold	P36964	ThermoFisher
Propidium Iodid	P1304MP	Invitrogen
Resazurin	R7017-5G	Sigma-Aldrich
RNase A	19101	Qiagen
Tetramethylrhodamine	T668	Invitrogen
Trypanblau	T10282	Invitrogen
Trypsin/EDTA	T4049	Sigma-Aldrich
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich

2.1.7 Zellkulturmedien und -zusätze

Tabelle 8: Verwendete Zellkulturmedien- und zusätze.

Produkt	Produktnummer	Hersteller
Fetal Bovine Serum	16000-044	Gibco™
Insulin	I0516	Sigma-Aldrich
Penicillin, Streptomycin	15140-122	Gibco™
RPMI-1640 Medium	R7388	Sigma-Aldrich

2.1.8 Softwares

Tabelle 9: Verwendete Softwares.

Produkt	Hersteller
BD FACSDiva, Version 8.0.3	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
FlowJo, Version v10	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
GraphPad Prism, Version 9	GraphPad Software, La Jolla (USA)
ImageJ 1.52v	University of Wisconsin, Madison (USA)
Microsoft Excel Version 16.3	Microsoft, Redmond (USA)
Microsoft PowerPoint Version 16.3	Microsoft, Redmond (USA)
Microsoft Word Version 16.3	Microsoft, Redmond (USA)
SPCImage 8.3	Becker & Hickl GmbH, Berlin (Germany)
SPCM	Becker & Hickl GmbH, Berlin (Germany)
ZEN 2021 (blue edition)	Carl Zeiss, Jena (Germany)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Passagieren

In dieser Arbeit wurden die humanen Ovarialkarzinom-Zelllinien OVCAR-3 (American Type Culture Collection (ATCC), HTB-161), OVCAR-29 (Subklon von OVCAR-3) und HEY (ATCC, CRL-3252) im Rahmen der folgenden Versuche auf deren PAL-Anwendung hin untersucht. Die Zellen der OVCAR-3-Zelllinie stammen aus einer Patientin mit einem hochgradig serösen ovarialen Adenokarzinom. Die Zellen zeigten sich refraktär gegenüber Cisplatin. Bei der OVCAR-29-Zelllinie handelt es sich um einen Subklon der OVCAR-3-Zelllinie. Die HEY-Zelllinie stammt ursprünglich aus Zellen eines serösen Zystadenokarzinoms des Ovars, welche aus Peritonealproben aus kaukasischen Patientinnen gewonnen wurden.

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit wie in Tab. 10 aufgeführt kultiviert. Es erfolgten täglich lichtmikroskopische Kontrollen der Zellkonfluenz und makroskopische Beurteilungen des Farbindikators Phenolrot im Medium. Bei Verblässen des Farbindikators und einer Zellkonfluenz < 90 % fand ein Mediumwechsel statt. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit 5 ml (T-25 Zellkulturflasche) bzw. 10 ml (T-75 Zellkulturflasche) Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) gewaschen. Anschließend wurden 5 ml (T-25 Zellkulturflasche) bzw. 10 ml (T-75 Zellkulturflasche) des frischen Zellkulturmediums zu den Zellen hinzugefügt. Bei einer Zellkonfluenz > 90 % wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit 5 ml (T-25 Zellkulturflasche) bzw. 10 ml (T-75 Zellkulturflasche) DPBS gewaschen. Danach wurden die adhärennten Zellen mit einer adäquaten Menge an 0,25 %-igem Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für 3 min bei 37 °C im Brutschrank trypsinisiert um die Zellkontakte zur Zellkulturflasche zu lösen. Durch die Zugabe gleicher Menge Blockierpuffer (siehe Tab. 10) wurde die Trypsinreaktion gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt und bei 120 x g für 6 min zentrifugiert. Währenddessen wurden 4 ml (T-25 Zellkulturflasche) bzw. 9 ml (T-75 Zellkulturflasche) Medium in einer neuen Zellkulturflasche vorgelegt. Der Überstand im abzentrifugierten Falcon wurde abgesaugt, das Zellpellet wurde in 1 ml Medium resuspendiert und in die vorbereitete Zellkulturflasche überführt. Alle zellbehandelnden Komponenten wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

Tabelle 10: Zusammensetzung von Zellmedium und Puffer.

Medium	Bestandteile
Zellmedium für OVCAR-29, HEY und Aszites	RPMI-1640, 10 % hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin
Zellmedium für OVCAR-3	RPMI-1640, 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,01 $\frac{mg}{ml}$ Insulin
Einfriermedium	Zellmedium, 5 % Dimethylsulfoxid
Blockierpuffer	DPBS, 20 % hitzeinaktiviertes FBS

2.2.2 Kryokonservierung und Auftauen kryokonservierter Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst wie beim Passagieren gewaschen, trypsiniert und in ein Gefrierrohrchen mit Einfriermedium überführt. Dieses wurde für 24 h in einem Mr. Frosty™ bei - 80 °C eingefroren. Anschließend wurde das Gefrierrohrchen in einen Stickstofftank überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut, anschließend in 3 ml Blockierpuffer resuspendiert, in ein Falcon überführt und bei 120 x g für 6 min zentrifugiert. Währenddessen wurden 4 ml Zellkulturmedium (T-25 Zellkulturflasche) bzw. 9 ml (T-75 Zellkulturflasche) in einer Zellkulturflasche vorgelegt. Der flüssige Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet wurde in 1 ml entsprechendem Zellkulturmedium resuspendiert und in die vorbereitete Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.2.3 Aufbereitung von Aszites

Der Aszites wurde nach der operativen Gewinnung in 50 ml Falcons überführt und bei 120 x g für 6 min zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine T-25 Zellkulturflasche mit vorgelegten 4 ml Zellmedium überführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Bei einer Konfluenz > 90 % wurden die Zellen partiell trypsiniert. Hierfür wurden die Zellen vorsichtig gewaschen und es wurde 1 ml 0,05 %-iges Trypsin-EDTA hinzugefügt. Zur optimierten Enzymwirkung wurde die Zellkulturflasche mit repetitiven lichtmikroskopischen Kontrollen bei 37 °C inkubiert, bis sich erste Zellen lösten. Dann wurden 3 ml Blockierpuffer hinzugefügt, die non-adhären Zellen wurden mit dem

Blockierpuffer abgesaugt. Die adhärennten Zellen wurden zweimalig vorsichtig mit 5 ml DPBS gewaschen und es wurden zur weiteren Inkubation bei 37 °C im Brutschrank 5 ml Zellkulturmedium zugegeben. Alle zellbehandelnden Komponenten wurden in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, bis sich lichtmikroskopisch vorrangig ein Zelltyp erkennen ließ.

2.2.4 PAL-Herstellung und PAL-Behandlung

Zur PAL-Herstellung wurde der VIO3/APC3 (Erbe) mit 3,2 mm Argon-Plasma-Koagulation (APC)-Sonden verwendet. Bei der Plasmagenerierung wurde folgende Einstellung verwendet: PreciceAPC Modus Effekt 1. Als Trägergas wurde das Edelgas Argon mit einem Gasfluss von 1,8 sl/min verwendet.

Zur Herstellung der Verdünnungen wurde das kalkulierte Volumen an unbehandeltem Zellkulturmedium in Eppendorfgefäße vorgelegt. Anschließend wurden 2 ml Zellkulturmedium in eine sterile Metallwanne pipettiert und mit Argonplasma behandelt. Hierfür wurde die APC-Sonde in einer Distanz von 1,5 cm zentral und orthogonal zum Medium statisch positioniert. Die Plasmabehandlungszeit erfolgte für 2 min. Um eine homogene Wirkung zu erzielen, wurde das plasmabehandelte Medium in der Metallwanne dreimalig resuspendiert. Anschließend wurde das plasmabehandelte Medium zur Herstellung der benötigten Verdünnungen in entsprechender Menge in die vorgelegten Eppendorfgefäße überführt und erneut dreimalig resuspendiert.

Die mithilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählten und kultivierten Zellen wurden vor der PAL-Behandlung einmalig mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde die entsprechende PAL-Verdünnung auf die Zellen gegeben, die Kontrollen (ctrl) wurden mit der gleichen Menge an unbehandeltem Zellkulturmedium versehen. Die behandelten und unbehandelten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das PAL-Volumen wurde der Kulturfläche angepasst.

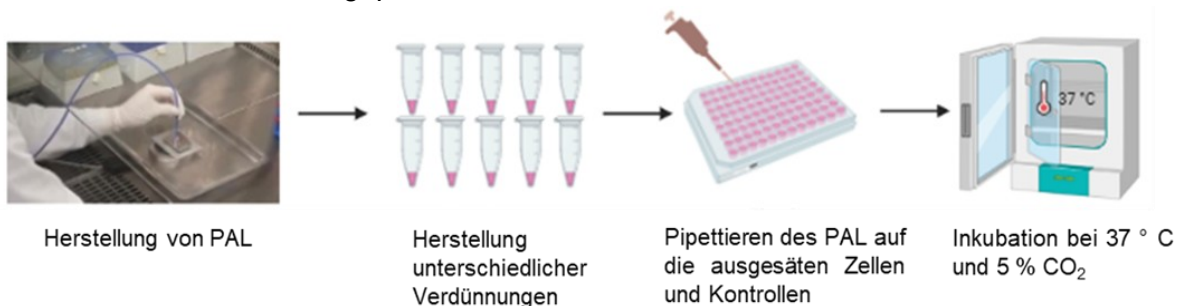


Abb. 3: PAL-Herstellung und PAL-Behandlung. Nach der Generierung von plasmaaktiviertem Medium werden die Verdünnungen zur Behandlung der kultivierten Zellen hergestellt. Diese werden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

2.2.5 Viabilitätsassay

Resazurin ist ein blaues, zellpermeables, ungiftiges Phenoxazin. Nach dem Eindringen in die Zelle wird Resazurin in vitalen Zellen zu Resorufin reduziert, welches pink fluoresziert. Die Menge an Resorufin kann durch die Bestimmung der Fluoreszenz mit einem Plate Reader ermittelt werden, welche proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist. Nicht lebende Zellen erzeugen durch ihre fehlende Stoffwechselkapazität kein Fluoreszenzsignal.

Es wurden jeweils 1×10^4 Zellen der Zelllinien OVCAR-29, HEY, OVCAR-3 und der aus dem Aszites isolierten Zellen pro well in eine 96-well Platte ausgesät und für 24 h inkubiert. Für die PAL-Behandlung wurden die Zellen mit jeweils 100 μ l der PAL-Verdünnungsstufen 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 und 1:10 behandelt und für 18 h inkubiert. Es wurde zusätzlich eine Kontrolle mit unbehandeltem Zellmedium (ctrl) (Arbeitsvolumen: 100 μ l) inkubiert. Zur exakteren Bestimmung der IC50 wurden weitere PAL-Verdünnungsstufen (Arbeitsvolumen: 100 μ l) untersucht (OVCAR-29: 1:1, 1:1,2, 1:1,4, 1:1,6, 1:1,8, 1:2, 1:2,2, 1:2,4, 1:2,6, 1:2,8, HEY und OVCAR-3: 1:1, 1:1,33, 1:1,66, 1:2, 1:2,33, 1:2,66, 1:3, 1:3,33, 1:3,66, 1:4). Der Versuch wurde pro Zelltyp mindestens dreimal ($n = 3$) mit je drei technischen Replikaten durchgeführt. Zur Ermittlung des Hintergrundsignals wurden zusätzliche Kontrollen ohne Zellen durchgeführt. Zum Zeitpunkt $t = 18$ h wurden in jedes well 10 μ l einer $0,15 \frac{mg}{ml}$ Resazurin-Lösung gegeben und für 1 h bei $37^\circ C$ und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung im Plate Reader.

Die gemessenen Signale wurden wie folgt mithilfe von Microsoft Excel ausgewertet: Das Hintergrundsignal wurde subtrahiert, die technischen Replikate wurden zu einem Messwert gemittelt und auf den Mittelwert der Kontrolle normiert.

2.2.6 Bestimmung IC50

Die IC50 wurde mithilfe der Viabilität nach PAL-Behandlung anhand folgender Formel berechnet:

$$IC50 = (PAL - \text{Konzentration} > 50) \frac{((PAL - \text{Konzentration} > 50) - (PAL - \text{Konzentration} < 50)) \times ((Viabilität [\%] > 50) - 50)}{((Viabilität [\%] > 50) - (Viabilität [\%] < 50))}$$

2.2.7 Caspase 3/7 Assay

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7, welche als Effektorcaspasen den programmierten Zelltod einleiten, ermittelt. Der Assay besteht aus einem Caspase 3/7 Substrat, dem DEVD-Aminoluciferin, und einer hitzebeständigen Luciferase. Die Zugabe des Caspase Glo® 3/7 Reagenz führt zur Zelllyse, gefolgt von der Caspase-abhängigen Spaltung des Substrats. Das hierbei freigesetzte ungebundene Aminoluciferin wird von der im Reagenz enthaltenen hitzebeständigen Luciferase in ein Lumineszenzsignal umgesetzt. Das messbare Signal ist proportional zur Caspase 3/7 Aktivität.

Es wurden Zellen der Zelllinien OVCAR-29, HEY, OVCAR-3 und Aszites mit 1×10^4 Zellen pro well in eine 96-well Platte ausgesät und für 24 h inkubiert. Nach der Kultivierung wurden die Zellen mit der zelltypspezifischen IC50-PAL-Dosierung, unverdünntem PAL und unbehandeltem Zellkulturmedium (ctrl) (Arbeitsvolumen: 100 μ l) behandelt. Der Versuch wurde pro Zelltyp mindestens dreimal ($n = 3$) mit je drei technischen Replikaten durchgeführt. Zur Ermittlung des Hintergrundsignals wurden zusätzliche Kontrollen ohne Zellen durchgeführt. Der Assay wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Zu den Zeitpunkten $t = 1$ h und $t = 18$ h wurden in jedes well 100 μ l des Assay-Ansatzes pipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Lumineszenzmessung erfolgte in einem Plate Reader.

Die gemessenen Signale wurden wie folgt mithilfe von Microsoft Excel ausgewertet: Das Hintergrundsignal wurde subtrahiert, die technischen Replikate wurden zu einem Messwert gemittelt und auf den Mittelwert der Kontrolle normiert.

2.2.8 DNA-Doppelstrangbruchanalyse

Das Histon H2AX ist an der DNA-Reparatur von Schäden durch Doppelstrangbrüche (DSB) beteiligt. Beim Vorhandensein dieser wird H2AX am Serin 139 phosphoryliert, um das betroffene Chromatin für DNA-Reparatur-Proteine zu markieren. Diese Phosphorylierung kann durch Antikörper (hier: γ H2AX) als Nachweis von DSB dienen.

Es wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen je well der Zelllinien OVCAR-29, HEY, OVCAR-3 und des Aszites in einer 6-well Platte ausgesät und für 24 h inkubiert. Vor der DSB-Analyse wurden die Zellen für 1 h, 4 h und 18 h mit 1,5 ml der zelltypspezifischen PAL-IC50 behandelt (Arbeitsvolumen: 1,5 ml). Zudem wurde eine Kontrolle mit Zellkulturmedium

(ctrl) durchgeführt (Arbeitsvolumen: 1,5 ml). Der Versuch wurde pro Zelltyp dreimal (n = 3) durchgeführt.

Die Zellen wurden auf folgende Weise bearbeitet: Die trypsinisierten Zellen wurden in 500 µl eiskaltem DPBS resuspendiert. Anschließend wurden ihnen 4 ml eiskaltes 1 %-iges Paraformaldehyd (PFA) hinzugefügt und sie wurden für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 300 x g und RT für 5 min zentrifugiert und in 1 ml DPBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 300 x g für 5 min wurden die Zellen in 0,2 ml DPBS resuspendiert. Die Zellen wurden tröpfchenweise in 2 ml eiskaltes 70 %-iges Ethanol gegeben und bei -20 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimalig in 2 ml BSA-Triton-DPBS-Puffer (1 % BSA, 0,2 % Triton-X gelöst in DPBS) gewaschen und in 2 ml BSA-Triton-DPBS-Puffer für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie nach erneuter Zentrifugation bei 300 x g für 5 min in 100 µl γH2AX-Färbepuffer ($1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ γH2AX Antikörper in BSA-Triton-DPBS-Puffer) resuspendiert. Die Färbedauer betrug 1 h bei RT im Dunkeln. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Um tote Zellen und Zellschrott aus der Analyse auszuschließen, wurden Forward- und Side-Scatter Charakteristiken angewendet. Um Doubletten zu exkludieren, wurden Forward-Scatter-Area und -Height Charakteristiken verwendet. Die übrigen Zellen wurden in Antikörper-positiv und -negativ aufgeteilt. Hierfür wurden die Gates so gesetzt, dass sich 1 % der ungefärbten Zellen im Antikörper-positiven Gate befanden.

Es wurde die mittlere Intensität des Fluoreszenzsignals (MFI) jeder Probe ermittelt und auf den Wert der Kontrolle (ctrl) normiert. Die statistische Auswertung fand mit der FlowJo Software statt.

2.2.9 Zellzyklusanalyse

Propidium-Iodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die DNA einlagert. Die Fluoreszenzintensität steht in proportionalem Verhältnis zum DNA-Gehalt. Während der G1-Phase zeigen die Zellen einen diploiden DNA-Gehalt, während der G2- und M-Phase weisen die Zellen einen tetraploiden DNA-Gehalt auf. Der DNA-Gehalt zwischen diesen Phasen wird der S-Phase zugeordnet. PI kann nicht in vitale Zellen eindringen, weshalb sie vorher fixiert werden müssen.

Es wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen je well der Zelllinien OVCAR-29, HEY, OVCAR-3 und des Aszites in einer 6-well Platte ausgesät und für 24 h kultiviert. Vor der Zellzyklusanalyse wurden sie für 1 h, 4 h und 18 h mit der zelltypspezifischen IC50-PAL-Konzentration behandelt (Arbeitsvolumen: 1,5 ml). Es wurde eine Kontrolle mit Zellmedium (ctrl) durchgeführt (Arbeitsvolumen 1,5ml). Der Versuch wurde pro Zelltyp dreimal ($n = 3$) durchgeführt.

Die Zellen wurden auf folgende Weise bearbeitet: Die trypsinisierten Zellen wurden in 500 μ l eiskaltem DPBS resuspendiert. Anschließend wurden ihnen 4 ml eiskaltes 1 %-iges PFA hinzugefügt und sie wurden für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 300 x g und RT für 5 min zentrifugiert und in 1 ml DPBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 300 x g für 5 min wurden die Zellen in 0,2 ml DPBS resuspendiert. Die Zellen wurden tröpfchenweise in 2 ml eiskaltes 70 %-iges Ethanol gegeben und bei -20 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in 2 ml BSA-Triton-DPBS-Puffer (1 % BSA, 0,2 % Triton-X gelöst in DPBS) gewaschen und in 2 ml BSA-Triton-DPBS-Puffer für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach erneuter Zentrifugation bei 300 x g für 5 min in 100 μ l PI-Färbepuffer ($1 \frac{mg}{ml}$ PI gelöst in destilliertem Wasser) resuspendiert und bei RT für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Die Auswertung erfolgte gleich der DNA-Doppelstrangbruchanalyse mit der FlowJo Software. Die PI-Färbung wurde als Histogramm dargestellt. Es wurde die Intensität des Signals auf der x-Achse gegen die Anzahl der gemessenen Counts auf der y-Achse dargestellt. Der erste Peak stellte den Anteil des diploiden DNA-Gehalts (G1-Phase) dar. Der zweite Peak stellte den Anteil des tetraploiden DNA-Gehalts (G2-/M-Phase) dar. Der Bereich zwischen den Peaks wurde der S-Phase zugerechnet.

2.2.10 Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy = FLIM)

Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) spielen in der zellulären Energiehomöostase eine wichtige Rolle. Vor allem bei der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung sind sie obligate Reaktionspartner und somit für den Gewinn von Adenosintriphosphat (ATP) relevant. NADH und FAD können frei oder proteingebunden vorliegen.

FLIM ist ein lasergestütztes Mikroskopieverfahren, bei welchem einzelne Moleküle durch einen Laser von ihrem Grundzustand (S_0) in einen angeregten elektronischen Energiezustand (S_1') versetzt werden. In diesem Zustand verändert das Molekül seine Form und molekularen Interaktionen. Hierdurch verliert es Energie und fällt in einen geringer angeregten Zustand (S_1) zurück. Fällt das Molekül wieder in den Grundzustand zurück, so wird Energie in Form von Photonen emittiert (Fluoreszenz). Die Fluoreszenzlebensdauer (τ) ist die durchschnittliche Verweilzeit eines Moleküls im S_1 -Zustand, bevor es in den Grundzustand zurückkehrt ($S_1 \rightarrow S_0$).

NADH und FAD sind autofluoreszierend und benötigen daher keine spezifische Markierung. Die Fluoreszenzlebensdauer ist davon abhängig, ob die Moleküle frei oder proteingebunden vorliegen. Beide Koenzyme haben eine Isoform mit einer kurzen (0,3 - 0,8 ns) und einer langen (1,0 - 6,5 ns) Fluoreszenzlebensdauer. Dies spiegelt freies NADH und gebundenes NADH bzw. gebundenes FAD und freies FAD wider.

Es wurden $10,74 \times 10^3$ Zellen der Zelllinien OVCAR-29, HEY und des Aszites in einem 12-well Chamber Slide ausgesät, für 24 h kultiviert und vor der FLIM-Messung für 1 h mit $107,4 \mu\text{l}$ PAL der zelltypspezifischen IC50-Konzentration behandelt. Es wurde eine Kontrolle mit unbehandeltem Zellkulturmedium (ctrl) durchgeführt. Der Versuch wurde pro Zelltyp dreimal ($n = 3$) durchgeführt. Es wurden in jedem well mindestens sechs unabhängige Messungen vorgenommen.

Für die Aufnahmen wurde das Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) mit einer Laserleistung von 5 % verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einem 63 x CPlan Apochromat/1,4 Ölimmersionsobjektiv angefertigt.

Das Emissionsspektrum von NADH liegt zwischen 425 nm bis 475 nm und 475 nm bis 600 nm für FAD. Es wurde die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (TCSPC) von Becker & Hickl verwendet, um NADH und FAD gleichzeitig zu messen. Die Messung wurde über die SPCM-Software koordiniert. Die reine Pixelverweilzeit betrug $32,77 \mu\text{s}$,

die Scanzeit betrug 2 min 41 s und die Bildgröße wurde auf 135,0 μm x 135,0 μm skaliert. Die Aufnahmen wurden bei völliger Dunkelheit zur Vermeidung von Störsignalen erstellt. Die generierten FLIM-Daten wurden als SDT-Datei gespeichert. Alle Daten wurden mit der Software SPCImage (Becker & Hickl) mit einem Binning Faktor von 6 und einem Schwellenwert von etwa 30 % des maximalen Signals ausgewertet. Die Software SPCImage (Becker & Hickl) optimierte den Algorithmus zur Anpassung des Abklingens der Fluoreszenzlebenszeiten mithilfe der biexponentiellen Zerfallsanpassung (biexponential decay fitting).

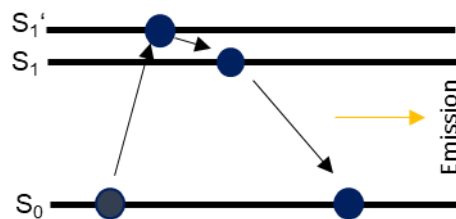


Abb. 4: Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer (τ). Durch Anregung eines Lasers wird das Molekül in einen höheren Energiezustand (S_1') gehoben. Von diesem fällt es durch Energieabgabe bei Konformationsänderung und Änderung von zellulären Interaktionen in einen etwas niedriger erhöhten Energiezustand (S_1). Die Zeit, in der das Molekül in diesem Zustand verweilt, bevor es unter messbarer Energieabgabe in Form von Photonen in den Grundzustand (S_0) fällt, ist die Fluoreszenzlebensdauer τ [ps]. Eigene Abbildung, erstellt mit Power Point.

2.2.11 Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials mithilfe der Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie

Durch Oxidations- und Reduktionsreaktionen im physiologischen Mitochondrium gelangen Protonen aus der mitochondrialen Matrix über die mitochondriale Innenmembran in den Membranzwischenraum. Auf diese Weise entsteht entlang der mitochondrialen Membran ein Spannungsgradient, welcher das mitochondriale Membranpotential darstellt. Dieses steht in direktem Zusammenhang mit der Stoffwechsellage des Mitochondriums und dem damit verbundenen zellulären Zustand.

Tetramethylrhodamine (TMRM) ist ein zelldurchlässiger Farbstoff. Er reichert sich in aktiven Mitochondrien mit intaktem Membranpotential an. Die Fluoreszenzlebensdauer von TMRM steht in direktem Zusammenhang mit dem mitochondrialen Membranpotential.

Es wurden $10,74 \times 10^3$ Zellen der Zelllinien OVCAR-29, HEY und des Aszites in einem 12-well Chamber Slide ausgesät, für 24 h inkubiert und vor der FLIM-Messung für 1 h mit PAL der zelltypspezifischen IC50 behandelt (Arbeitsvolumen: 107,4 μ l). Es wurde eine Kontrolle mit Zellmedium (ctrl) (Arbeitsvolumen: 107,4 μ l) durchgeführt. Der Färbepuffer wurde nach Herstellerangaben hergestellt. Nach der PAL-Behandlung wurde das plasmabehandelte Zellkulturmedium entfernt und die Zellen wurden mit 107,4 μ l des TMRM-Färbepuffers pro well für 30 min gefärbt. Der Versuch wurde pro Zelltyp dreimal ($n = 3$) durchgeführt. Es wurden in jedem well mindestens sechs unabhängige Messungen vorgenommen.

Für die Aufnahmen wurde das LSM mit einer Laserleistung von 0,2 % verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einem 63 x CPlan Apochromat/1,4 Ölimmersionsobjektiv angefertigt.

Die Messung wurde über die SPCM-Software koordiniert. Die reine Pixelverweilzeit betrug 32,77 μ s, die Scanzeit betrug 2 min 41 s und die Bildgröße wurde auf 135,0 μ m x 135,0 μ m skaliert. Die generierten FLIM-Daten wurden als SDT-Datei gespeichert. Alle Daten wurden mit der Software SPCImage (Becker & Hickl) mit einem Schwellenwert von etwa 30 % des maximalen Signals ausgewertet. Es wurde ein Binning-Faktor gewählt, der eine Abklingkurve mit einem Minimum von 1000 Photonen ergibt. Daraus resultierte ein Binning-Faktor oszillierend zwischen 4 und 7. Die Software SPCImage (Becker & Hickl) optimierte den Algorithmus zur Anpassung des Abklingens

der Fluoreszenzlebenszeiten mithilfe der biexponentiellen Zerfallsanpassung (biexponential decay fitting).

2.2.12 Immunfluoreszenz-Färbung

Die primär gewonnenen Zellen aus Aszites wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbungen analysiert.

2.2.12.1 Calretinin/Paired-Box-Protein 8 (PAX8)

Calretinin ist ein calciumbindendes Protein und deutet auf eine mesotheliale Herkunft hin. Es kann zur Differenzierung von serösem Ovarialkarzinom (Calretinin negativ) und peritonealem Mesotheliom (Calretinin positiv) verwendet werden. PAX8 ist ein nukleärer Marker mit Expression in u.a. ovarialen Tumoren (PAX8 positiv).

Es wurden Proben von zwei Patientinnen ($n = 2$) analysiert. Hierzu wurden pro Patientenprobe dreimalig 1×10^4 Zellen in einem 12 well Chamber Slide ausgesät und für 24 h inkubiert.

Die Färbung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden dreimalig für 3 min mit DPBS gewaschen. Zum Fixieren der Zellen wurden sie mit 4 %-igem PFA in DPBS bei RT für 10 min inkubiert und erneut dreimalig für 3 min mit DPBS gewaschen. Die Zellen wurden durch 0,2 % Triton X-100 verdünnt in DPBS für 5 min bei RT permeabilisiert. Es folgten erneut drei Waschschriffe mit DPBS zu je 3 min. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen in 5 %-igem Blockierpuffer (5 % BSA in DPBS) bei RT für 1 h inkubiert. Zur Färbung wurden die Zellen mit den jeweiligen Antikörpern für 1 h bei RT inkubiert. Bei dieser Färbung wurde der PAX8-Antikörper (Proteintech, 10336-1-AP, Quelle: Hase) in einer Verdünnung von 1:100 und der Calretinin-Antikörper (Santa Cruz, sc-365956, Quelle: Hase) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Die Zellen wurden erneut dreimalig 5 min mit DPBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit entsprechenden sekundären Antikörpern (Alexa Fluor 594, A11037, Anti-Hase IgG und Alexa Fluor 488, A21141, Anti-Maus IgG2b) in der Verdünnung 1:250 für 1 h bei RT in einer dunklen Feuchtkammer gefärbt. Es wurde zusätzlich eine Kontrolle mit Verdünnungspuffer (1 % BSA, 0,1 % Triton X-100, 0,1 % cold-water-fish-skin-gelatine und 0,05 % Tween 20 gelöst in DPBS) im ersten Färbeschritt und sekundärem Antikörper im zweiten Färbeschritt und eine Kontrolle mit Verdünnungspuffer in beiden Färbeschritten durchgeführt. Nach drei

Waschschritten zu je 5 min wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Färbelösung (1:500 DAPI in DPBS) für 18 min bei RT gefärbt. Anschließend wurde der Färbepuffer wieder dreimalig zu je 2 min ausgewaschen. Die Kammerung des Chamber Slides wurde entfernt und die Zellen wurden mit ProLong Gold eingebettet. Die Zellen wurden am darauffolgenden Tag mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 analysiert.

Die Auszählung der Zellen fand mittels der Software ZEN 2021 (blue edition) statt. Das ermittelte Hintergrundsignal des sekundären Antikörpers wurde subtrahiert. Die Auszählung der antikörper-positiven und -negativen Zellen wurde manuell durchgeführt.

2.2.12.2 Annexin V

Es wurde repräsentativ eine Probe von einer Patientin (n = 1) mit drei technischen Replikaten analysiert. Die entsprechende Abbildung ist im Anhang (Anhang 2: Effekte der PAL-Behandlung auf die frühe Apoptoseinduktion von primärem Ovariakarzinomgewebe isoliert aus Aszites.) zu finden. Hierzu wurden 1×10^4 Zellen in einem 12 well Chamber Slide ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden sie mit PAL der zelltypspezifischen IC50 für 1 h behandelt (Arbeitsvolumen: 107,4 μ l). Es wurde pro technischem Replikat eine Kontrolle mit Zellkulturmedium (ctrl) durchgeführt (Arbeitsvolumen: 107,4 μ l).

Die Zellen wurden dreimalig für 3 min mit DPBS gewaschen. Zum Fixieren der Zellen wurden sie mit 4 %-igem PFA in DPBS bei RT für 10 min inkubiert und erneut dreimalig für 3 min mit DPBS gewaschen. Die Zellen wurden durch 0,2 % Triton X-100 verdünnt in DPBS für 5 min bei RT permeabilisiert. Es folgten erneut drei Waschschritte mit DPBS zu je 3 min. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen in 5 %-igem Blockierpuffer (5 % BSA in DPBS) bei RT für 1 h inkubiert. Zur Färbung wurden die Zellen mit einem Annexin V Polyklonal-Antikörper (ThermoFisher, PA5-27872, Quelle: Hase) in einer Verdünnung von 1:100 für 1 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimalig 5 min mit DPBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit entsprechendem sekundärem Antikörper (Alexa Fluor 594, REF A11037, Anti-Hase IgG) in der Verdünnung 1:250 für 1 h bei RT in der dunklen Feuchtkammer gefärbt. Es wurden zusätzlich eine Kontrolle mit Verdünnungspuffer (1 % BSA, 0,1 % Triton X-100, 0,1 % cold-water-fish-skin-gelatine und 0,05 % Tween 20 gelöst in DPBS) im ersten Färbeschritt und sekundärem Antikörper im zweiten Färbeschritt und eine Kontrolle mit

Verdünnungspuffer in beiden Färbeschritten durchgeführt. Nach drei Waschschritten zu je 5 min wurden die Zellkerne mit DAPI-Färbelösung (1:500 DAPI in DPBS) für 18 min bei RT gefärbt. Anschließend wurde der Färbepuffer wieder dreimalig zu je 2 min ausgewaschen. Die Kammerung des Chamber Slides wurde entfernt und die Zellen wurden mit ProLong Gold eingebettet. Die Zellen wurden am darauffolgenden Tag mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 analysiert.

In der Auswertung wurde das ermittelte Hintergrundsignal des sekundären Antikörpers mithilfe der Software ZEN 2021 (blue edition) subtrahiert. Anschließend wurde mittels der Software ImageJ 1.52v die Helligkeit des Antikörpersignals über den gesamten Bereich der Aufnahme gemessen. Die Messwerte wurden mittels Microsoft Excel wie folgt ausgewertet: Die technischen Replikate wurden zu einem Messwert gemittelt und auf den Mittelwert der Kontrolle normiert.

2.2.12.3 Statistische Analyse

Für die statistischen Analysen wurden die Programme Microsoft Excel, Microsoft Power Point und GraphPad Prism verwendet. Die einzelnen Testverfahren sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt. Die statistische Signifikanz wurde folgendermaßen definiert: Nicht signifikant (ns) für p-Werte $> 0,05$, signifikant für p-Werte $< 0,05$ (*).

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und immunhistochemische Charakterisierung humaner Ovarialkarzinomzellen aus Aszites

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Aszitesproben von 8 Patientinnen am Department für Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Tübingen im Zeitraum von Oktober 2019 bis November 2021 aufbereitet. Die Gewinnung der Proben wurde aufgrund von therapeutischen oder diagnostischen Zwecken durchgeführt.

Der Altersdurchschnitt der Patientinnen lag zum Zeitpunkt der Aszitesentnahme bei 63,6 Jahren, wobei die Altersspanne von 34 Jahre bis 79 Jahre reichte. Bei 7 der 8 Patientinnen (87,5 %) konnte histologisch ein seröser Tumortyp diagnostiziert werden. Bei einer Patientin im Kollektiv (12,5 %) wurde histologisch eine sero-muzinöse Tumorklassifikation beschrieben. 5 der 8 Patientinnen (62,5 %) waren vor der Aszitespunktion nicht chemotherapeutisch vorbehandelt, bei 3 der 8 Patientinnen (37,5 %) war bereits eine Chemotherapie nach leitliniengerechtem Standard mittels Carboplatin und Paclitaxel durchgeführt worden. Bei der Hälfte der Patientinnen (50 %) lag zum Zeitpunkt der Probenentnahme keine Metastasierung vor. Bei einem Viertel der Patientinnen (25 %) lag eine Lymphknotenmetastasierung im Stadium N1 ohne Befall weiterer Organe vor. Bei einem weiteren Viertel des Patientenkollektivs (25 %) lag eine Fernmetastasierung über das Stadium N1 hinaus vor.

Tabelle 11: Charakterisierung der Patientinnen.

	Anzahl Patientinnen, n (%)
Histologischer Tumortyp	
Serös	7 (87,5)
Sero-muzinös	1 (12,5)
Chemotherapeutische Vorbehandlung	
Keine	5 (62,5)
Carboplatin/Paclitaxel	3 (37,5)
Metastasierung zum Zeitpunkt der Probenentnahme	
N0, M0	4 (50)
N1	2 (25)
Fernmetastasierung	2 (25)
Altersdurchschnitt, Jahre (min. - max.)	63,6 (34-76)

Um die aufbereiteten Zellen als Ovarialkarzinomzellen identifizieren zu können, erfolgte eine für Ovarialkarzinomzellen spezifische Immunfluoreszenzfärbung. Es wurden repräsentativ Proben von zwei Patientinnen (n = 2) auf die Expression von PAX8 und Calretinin untersucht. PAX8 wird als nukleärer Marker u.a. in Ovarialkarzinomzellen exprimiert. Calretinin kann zum histologischen Ausschluss eines peritonealen Mesothelioms (Calretinin positiv) genutzt werden. Als Ovarialkarzinomzellen wurden daher PAX8 positive und Calretinin negative Zellen definiert.

Für die Probe „Aszites I.“ konnten insgesamt 276 Zellen ausgezählt werden. Hier konnte bei 89,1 % der Zellen (246) eine alleinige Expression von PAX8 nachgewiesen werden, was dem Expressionsmuster eines serösen Ovarialkarzinoms entspricht. 5 % der Zellen (14) exprimierten sowohl PAX8 als auch Calretinin. 5,8 % der Zellen (16) waren weder positiv für Calretinin noch für PAX8. Die Zellen des „Aszites H.“ stellten sich nach der Aufbereitung vergleichbar dar. Hier konnten insgesamt 965 Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert werden. 90,7 % der Zellen (875) exprimierten nur PAX8. Bei 4,3 % der Zellen (42) konnte eine simultane Expression von PAX8 und Calretinin nachgewiesen werden. 5 % der Zellen (48) zeigten weder eine Expression von

PAX8 noch von Calretinin. In Abb. 6 sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen mit PAX8 und Calretinin der partiell trypsinisierten Asziteszellen dargestellt.

Diese repräsentative Charakterisierung des aufbereiteten Aszites lässt vermuten, dass der größte Anteil (~ 90 %) der analysierten Zellen aus Aszites primäre humane Ovarialkarzinomzellen sind.

Tabelle 12: Repräsentative Charakterisierung der Asziteszellen nach partiellem Trypsinieren.

Aszites I.	Absoluter Zellzahl	Relativer Anteil (%)
DAPI	16	5,8
DAPI + PAX8	246	89,1
DAPI + Calretinin	0	0
DAPI + Calretinin + PAX8	14	5,0

Aszites H.	Absolute Zellzahl	Relativer Anteil (%)
DAPI	48	5,0
DAPI + PAX8	875	90,7
DAPI + Calretinin	0	0
DAPI + Calretinin + PAX8	42	4,3

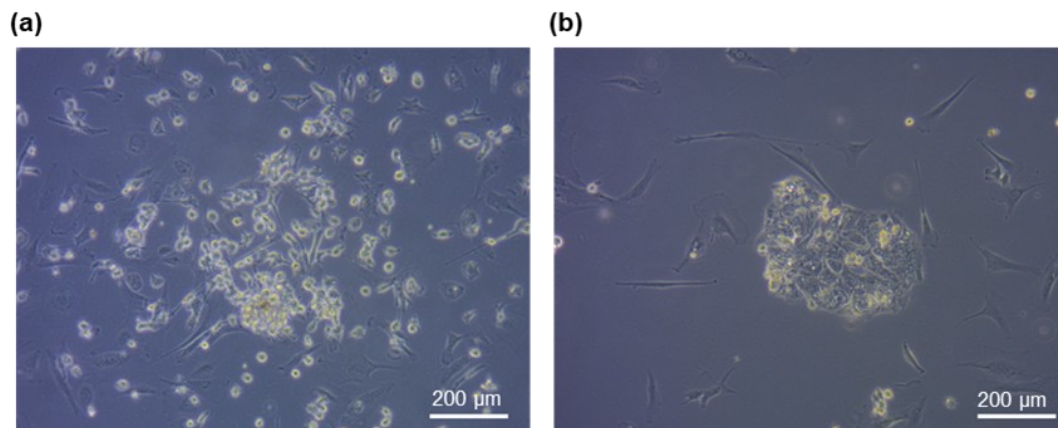


Abb. 5: Morphologische Beurteilung der Asziteszellen. Nach der Aussaat der abzentrifugierten Zellen aus Aszites wurden diese täglich bis zur Konfluenz von 90 % lichtmikroskopisch kontrolliert. (a) Nach 24 h konnten unterschiedliche Zelltypen erkannt werden. Es konnten spindelförmig, langgestreckte, einzeln gelagerte Zellen von runden, in Clustern gelagerten Zellen unterschieden werden. (b) Nach mehrmaligem partiellem Trypsinieren überwogen die zuvor in der Minderzahl vertretenen Zellen in Clusterformation. Es waren trotzdem auch weiter noch andere Zelltypen, v.a. spindelförmig, längliche Zellen, vorhanden.

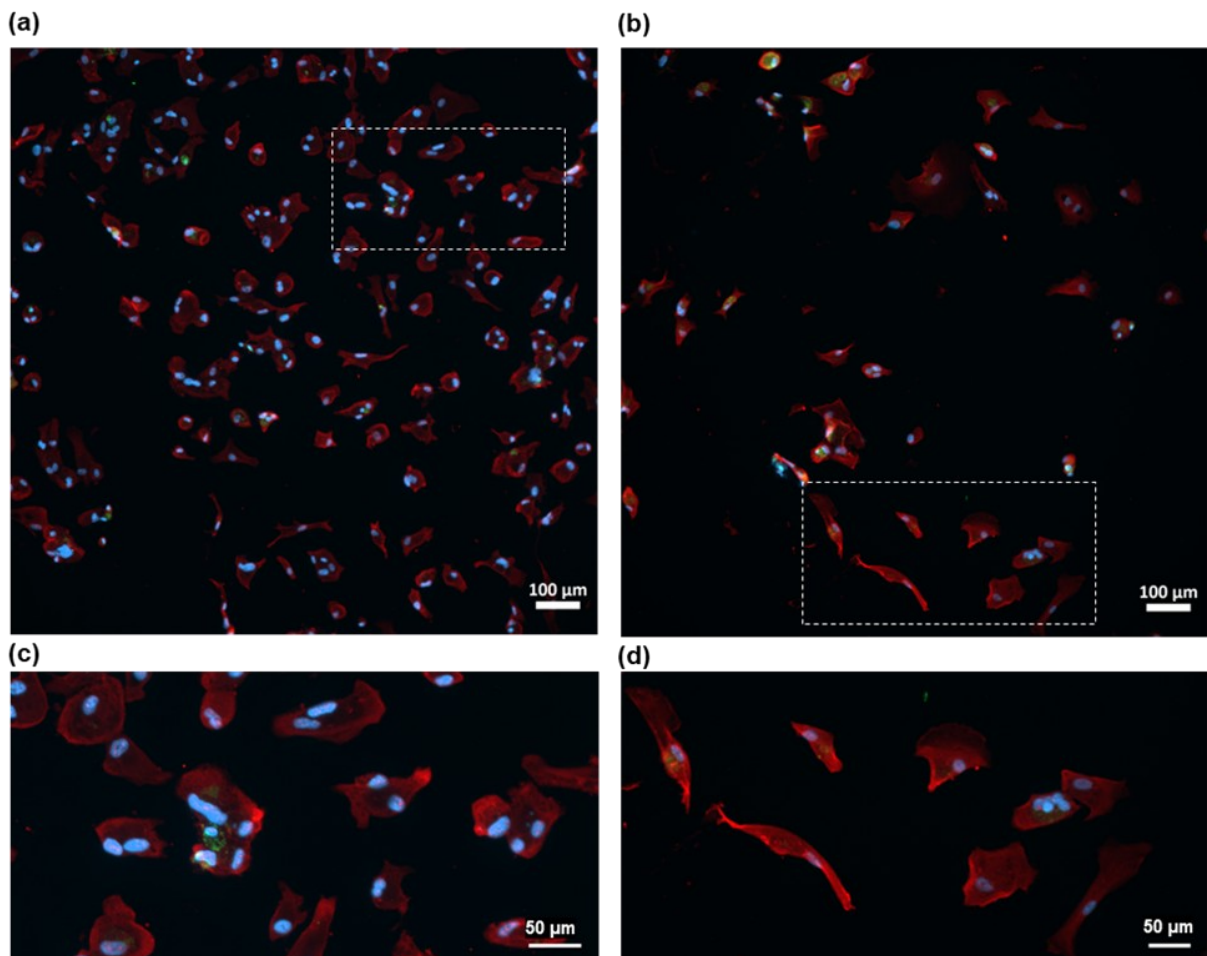


Abb. 6: Repräsentative Darstellung der biomolekularen Charakterisierung der partiell trypsinisierten Asziteszellen. Die Asziteszellen wurden kultiviert, rezidivierend partiell trypsinisiert und erneut kultiviert. Anschließend wurden Immunfluoreszenz-Färbungen gegen PAX8 und Calretinin durchgeführt. Es zeigte sich eine hohe Expression von PAX8 und geringe Expression von Calretinin. Exemplarische Darstellung der gefärbten Zellen in 10-facher Vergrößerung (a, b). Zusätzliche Vergrößerung der gefärbten Zellen (c aus a, d aus b).

3.2 Effekte der PAL-Behandlung auf die Zellviabilität in Abhängigkeit von der PAL-Verdünnung und PAL-Inkubationszeit

Im Folgenden wurden die Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-29, HEY und OVCAR-3 zur Darstellung des Dosiseffekts von PAL in unterschiedlichen Verdünnungsstufen behandelt.

Die Zelllinien wurden zunächst mit PAL in den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:10 behandelt und für $t = 18$ h inkubiert. Anschließend erfolgte die fluorometrische Messung der Viabilität. Zur exakten Berechnung der IC₅₀ wurden weitere Verdünnungen in angepassten Verdünnungsschritten (OVCAR-29: 1:1 bis 1:2,8, HEY und OVCAR-3: 1:1 bis 1:4) durchgeführt. Des Weiteren wurde der zeitliche Einfluss von PAL auf die Zelllinie OVCAR-29 untersucht.

Wie in Abb. 7 (a) aufgeführt, zeigte die Zelllinie OVCAR-29 kaum darstellbare Veränderungen der relativen Viabilität in den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:10. Aufgrund der hohen Standardabweichung ließ sich selbst ein Trendverhalten kaum beschreiben. Zur genaueren Berechnung der IC₅₀ wurden Verdünnungen zwischen 1:1 bis 1:2,8 detaillierter untersucht (Abb. 7 (d)). Hier konnte eine signifikant geringere Viabilität nach Behandlung mit den Verdünnungsstufen 1:1 ($p < 0,0001$) und 1:1,2 ($p = 0,0011$) im Vergleich zur Kontrolle ohne PAL-Behandlung gezeigt werden. In den weiteren Verdünnungsstufen stellte sich mit geringer werdender PAL-Konzentration eine höhere Zellviabilität dar. Durch die Behandlung mit der Verdünnungsstufe 1:2,2 ($p = 0,0092$) zeigte sich eine signifikant höhere Viabilität der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Anschließend wurde basierend auf diesen Ergebnissen die IC₅₀ berechnet.

Im nächsten Schritt wurde wie in Abb. 7 (b) dargestellt der dosisabhängige Effekt von PAL auf die relative Viabilität der Zelllinie HEY analysiert. Hierzu wurden wieder PAL-Verdünnungen von 1:1 bis 1:10 über $t = 18$ h im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Die Behandlung mit den Verdünnungen 1:1 ($p = 0,0211$) und 1:2 ($p = 0,0310$) bewirkte eine signifikant geringere relative Viabilität der Zellen im Vergleich zur PAL-unbehandelten Kontrolle. Die folgenden Verdünnungen bewirkten eine umso höhere Viabilität, desto geringer die PAL-Verdünnung war. Der Kurvenverlauf stellt sich sigmoidal dar, wobei die relative Viabilität der PAL-Behandlungen mit den Verdünnungen ab 1:5 nahezu asymptotisch zur relativen Viabilität der Kontrolle verläuft. Betrachtet man die Zellviabilität nach Behandlung mit den kleinen Verdünnungsstufen, zeigte sich die relative Viabilität der PAL-Verdünnungen 1:1 ($p = 0,0002$), 1:1,33 ($p = 0,0002$), 1:1,66 ($p = 0,0002$), 1:2 ($p = 0,0004$), 1:2,33 ($p = 0,002$), 1:2,66 ($p = 0,0059$) und 1:3 ($p = 0,0282$)

signifikant geringer als die relative Viabilität der PAL-unbehandelten Kontrolle (Abb. 7 (e)). Umso geringer die PAL-Verdünnung ist, desto höher wird die relative Zellviabilität.

Des Weiteren wurde der dosisabhängige Effekt von PAL auf die relative Viabilität der Zelllinie OVCAR-3 analysiert (Abb. 7 (c)). Hierzu wurden zunächst erneut die Verdünnungen 1:1 bis 1:10 betrachtet. Die relative Viabilität der Verdünnungen 1:1 ($p < 0,0001$), 1:2 ($p < 0,0001$) und 1:3 ($p = 0,0003$) war signifikant geringer als die der PAL-unbehandelten Kontrolle. In den weiteren Verdünnungsstufen zeigt die Kurve der relativen Viabilität eine Annäherung an den Wert der unbehandelten Kontrolle je höher die Verdünnungsstufe ist. Erneut wurden zur Bestimmung der IC50 die Effekte auf die relative Viabilität in geringeren Verdünnungsschritten untersucht. Es zeigte sich wie in Abb. 7 (f) dargestellt eine signifikant geringere relative Viabilität in den PAL-Verdünnungsstufen 1:1 ($p < 0,0001$), 1:1,33 ($p < 0,0001$), 1:1,66 ($p < 0,0001$), 1:2 ($p < 0,0001$), 1:2,33 ($p < 0,0001$), 1:2,66 ($p < 0,0001$), 1:3 ($p = 0,0007$), 1:3,33 ($p = 0,0042$), 1:3,66 ($p = 0,0087$) und 1:4 ($p = 0,0238$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der Kurvenverlauf stellt sich initial flach, dann schnell steigend dar.

Um den zeitabhängigen Effekt der PAL-Behandlung auf die Zelllinie OVCAR-29 zu untersuchen, wurde wie in Abb. 7 (g) aufgezeigt exemplarisch die relative Viabilität der Zelllinie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach PAL-Behandlung mit der IC50 dargestellt. Hier lässt sich zeigen, dass die PAL-Behandlungen zu allen Zeitpunkten eine geringere relative Viabilität im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Insgesamt zeigte sich ein annähernd linearer Verlauf bis zur PAL-Behandlungsdauer von $t = 18$ h. Eine signifikante Verringerung der relativen Viabilität ließ sich nach einer PAL-Behandlung von $t = 8$ h ($p = 0,0002$), $t = 18$ h ($p < 0,0001$) und $t = 24$ h ($p = 0,0002$) nachweisen. Nach $t = 24$ h PAL-Inkubationsdauer stieg die relative Viabilität der Zellen im Vergleich zur Behandlungsdauer von $t = 18$ h wieder an.

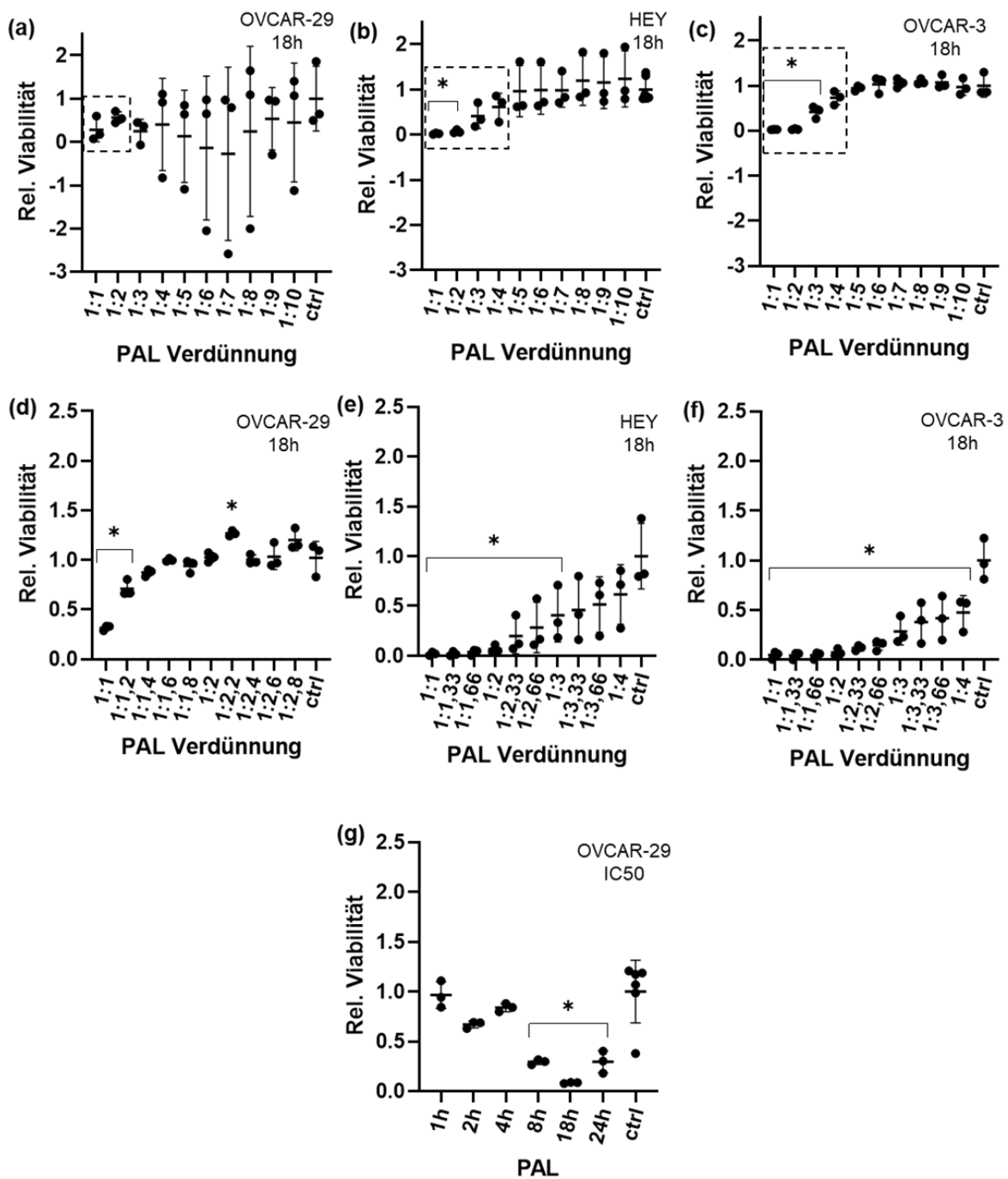


Abb. 7: Zelluläre Viabilität in Abhängigkeit von PAL-Dosierung und PAL-Inkubationszeit. Relative Zellviabilität nach dosisabhängiger PAL-Behandlung von (a, d) OVCAR-29, (b, e) HEY und (c, f) OVCAR-3 in den Verdünnungsstufen (a - c) 1:1 bis 1:10 sowie (d - f) zelltypspezifischer PAL-Dosisbereiche. Repräsentative relative Zellviabilität (g) von OVCAR-29 in Abhängigkeit von der PAL-Inkubationszeit von $t = 1$ h bis $t = 24$ h unter Verwendung der in (d) ermittelten IC₅₀ (89,50 %). Die Zellen wurden nach PAL-Behandlung mittels Resazurin Assay fluorometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SD (standard deviation = Standardabweichung) aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten relativ zur Kontrolle (ctrl). Signifikante Unterschiede sind dargestellt als $*p < 0,05$, unter Verwendung der One-way ANOVA.

3.3 Apoptoseinduktion in Abhängigkeit von PAL-Konzentration und PAL-Behandlungsdauer

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der PAL-Behandlung hinsichtlich des programmierten Zelltods in Abhängigkeit der verwendeten PAL-Konzentration und PAL-Behandlungsdauer untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit PAL für $t = 1$ h und $t = 18$ h mit der IC50 und 100 % PAL behandelt. Anschließend wurde die Aktivität des späten Apoptosemarkers Caspase 3/7 ermittelt und normiert dargestellt.

Die relative Caspase 3/7 Aktivität der Zelllinie OVCAR-29 zeigte nach 1 h Behandlungsdauer sowohl mit der IC50 als auch mit der Konzentration von 100 % PAL keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle wie in Abb. 8 (a) dargestellt. Nach 18 h Behandlungsdauer zeigten die Zellen der OVCAR-29-Zelllinie mit beiden hier verwendeten Konzentrationen (IC50, 100 % PAL) eine signifikant geringere relative Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (p (IC50) = 0,0182 und p (100% PAL) = 0,0114).

Bei der Zelllinie HEY ließ sich nach 1 h Behandlungsdauer kein signifikanter Unterschied der relativen Caspase 3/7 Aktivität nach Behandlung mit der IC50 darstellen (Abb. 8 (b)). Jedoch konnte nach 1 h Behandlungsdauer mit 100 % PAL eine signifikante Reduktion der relativen Caspase 3/7 Aktivität gemessen werden ($p = 0,04$). Nach 18 h zeigte sich eine signifikant höhere relative Caspase 3/7 Aktivität der HEY-Zelllinie mit Behandlung der IC50 ($p = 0,0128$). Nach gleicher Behandlungsdauer mit 100 % PAL ließ sich eine nicht signifikant geringere relative Caspase 3/7 Aktivität zeigen.

Die relative Caspase 3/7 Aktivität zeigte wie in Abb. 8 (c) aufgezeigt nach Behandlung mit der IC50 und 100 % PAL der Zellen der OVCAR-3-Zelllinie zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung. Nach $t = 1$ h waren keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Nach 18 h Behandlungsdauer stieg die relative Caspase 3/7 Aktivität nach der Behandlung mit der IC50. Nach gleicher Behandlungsdauer mit 100 % PAL sank die relative Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

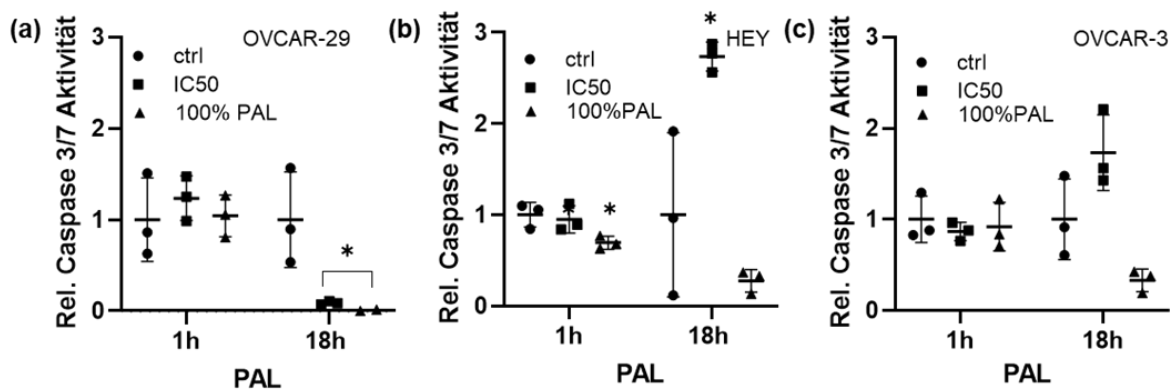


Abb. 8: Dosis- und inkubationszeitabhängige Apoptoseinduktion nach PAL-Behandlung. Relative Caspase 3/7 Aktivität von (a) OVCAR-29, (b) HEY und (c) OVCAR-3 in Abhängigkeit von PAL-Inkubationszeit (t = 1 h und t = 18 h) und PAL-Dosierung unter Verwendung der zelltypspezifischen IC50 (OVCAR-29: 89,50 %, HEY: 28,00 % und OVCAR-3: 25,00 %) und 100 % PAL. Die Zellen wurden nach PAL-Behandlung mittels Lumineszenzbestimmung analysiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SD aus n = 3 unabhängigen Experimenten relativ zur Kontrolle (ctrl). Signifikante Unterschiede sind dargestellt als *p < 0,05, unter Verwendung der One-way ANOVA.

3.4 Effekte auf DNA-Doppelstränge in zeitlicher Abhängigkeit der PAL-Behandlung

Nachfolgend wurde der Einfluss der PAL-Behandlung auf auftretende DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe der Detektion von H2AX-Phosphorylierung in Abhängigkeit der verwendeten PAL-Behandlungszeit untersucht. Hierfür wurden die Zellen für $t = 1$ h, $t = 4$ h und $t = 18$ h mit PAL (IC50) behandelt. Die Doppelstrangbrüche wurden danach mit Antikörpern detektiert und fluorometrisch mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. In der Darstellung wurde die H2AX Phosphorylierung normiert.

Die mit der IC50 behandelten Zellen der OVCAR-29-Zelllinie zeigten wie in Abb. 9 (a) dargestellt weder nach $t = 1$ h, $t = 4$ h noch nach $t = 18$ h einen signifikanten Unterschied der relativen H2AX Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle. Nach $t = 4$ h und $t = 18$ h zeigte sich jedoch ein nicht signifikanter Anstieg der relativen H2AX Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieser war umso größer, je länger die Zellen mit PAL behandelt worden waren.

Die relative H2AX Phosphorylierung der HEY-Zelllinie zeigte einen statistisch signifikanten Anstieg nach den PAL-Behandlungszeiten von $t = 4$ h ($p = 0,0126$) und $t = 18$ h ($p = 0,0152$) mit der zelltypspezifischen IC50 (Abb. 9 (b)). Nach $t = 1$ h war ein nicht signifikanter Anstieg zu verzeichnen.

Die relative H2AX Phosphorylierung der OVCAR-3-Zellen zeigte wie in Abb. 9 (c) zu sehen nach $t = 1$ h, $t = 4$ h und $t = 18$ h PAL-Behandlung mit der zelltypspezifischen IC50 keinen erkennbar signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

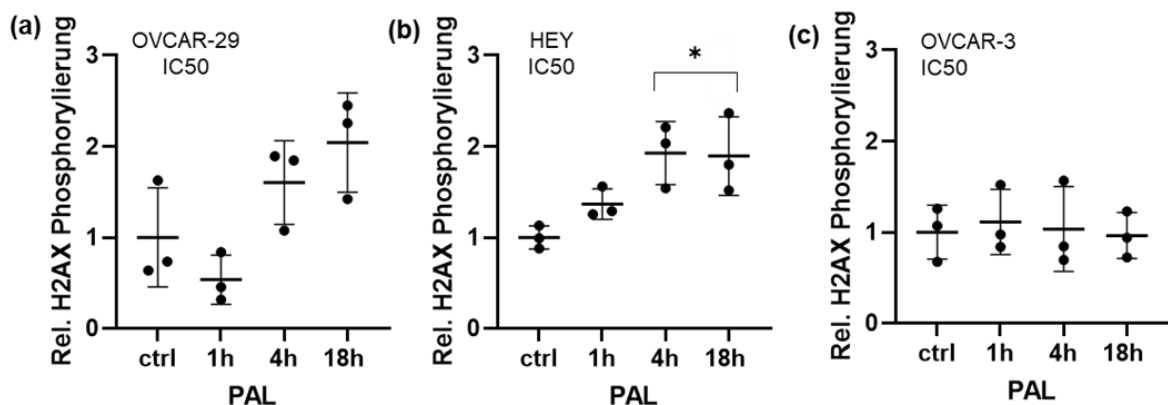


Abb. 9: Dosis- und inkubationszeitabhängige Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nach PAL-Behandlung. Relative H2AX Phosphorylierung nach PAL-Behandlung von (a) OVCAR-29, (b) HEY und (c) OVCAR-3 unter Verwendung der zelltypspezifischen IC50 (OVCAR-29: 89,50 %, HEY: 28,00 % und OVCAR-3: 25,00 %) abhängig von der PAL-Inkubationszeit ($t = 1$ h, $t = 4$ h und $t = 18$ h). Die Zellen wurden nach PAL-Behandlung fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen γ H2AX gefärbt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SD aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten relativ zur Kontrolle (ctrl). Signifikante Unterschiede sind dargestellt als * $p < 0,05$, unter Verwendung der One-way ANOVA.

3.5 Zeitabhängige Effekte der PAL-Behandlung auf den Zellzyklus

Zudem wurde auf zellulärer Ebene der Einfluss der PAL-Behandlung in Abhängigkeit der PAL-Behandlungsdauer auf die Zellzyklusphasen untersucht.

Hierfür wurden Zellen der Zelllinien OVCAR-29, HEY und OVCAR-3 mit PAL (IC50) für $t = 1$ h, $t = 4$ h und $t = 18$ h behandelt, anschließend mit PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es konnte bei keiner der Zelllinien ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Zellzyklusphasen nach PAL-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle aufgezeigt werden.

Bei den OVCAR-29-Zellen ließ sich nach 1 h und 4 h Behandlungsdauer ein Rückgang des Anteils der in der G1-Phase befindlichen Zellen und ein Anstieg des Anteils der Zellen, welche sich in der G2-Phase befanden, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen beobachten (Abb. 10 (a)). Die Verteilung der Zellzyklusphasen nach 18 h Behandlungsdauer ähnelte wieder der Kontrolle.

Bei den HEY-Zellen ließ sich nach 1 h PAL-Behandlung ebenso ein Rückgang des Anteils der sich in der G1-Phase befindlichen Zellen darstellen, andererseits konnte man einen Anstieg des Anteils der Zellen, welche sich in der G2-Phase des Zellzyklus befanden, erkennen (Abb. 10 (b)). Die Verteilung der Zellen im Zellzyklus nach 4 h PAL-Behandlungsdauer ähnelte der Kontrolle. Nach 18 h Behandlungsdauer ließ sich jedoch ein Anstieg der in der G1-Phase befindlichen Zellen vermerken und ein verminderter Anteil der in der G2-Phase befindlichen Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen aufzeigen.

Eine PAL-Behandlung von OVCAR-3-Zellen zeigte nach $t = 1$ h und $t = 4$ h keinen relevanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. Nach $t = 18$ h konnte ein Anstieg des Anteils der Zellen, welche sich in der G1-Phase befanden, und ein Rückgang des Anteils der Zellen, welche sich in der G2-Phase befanden, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen verzeichnet werden (Abb. 10 (c)).

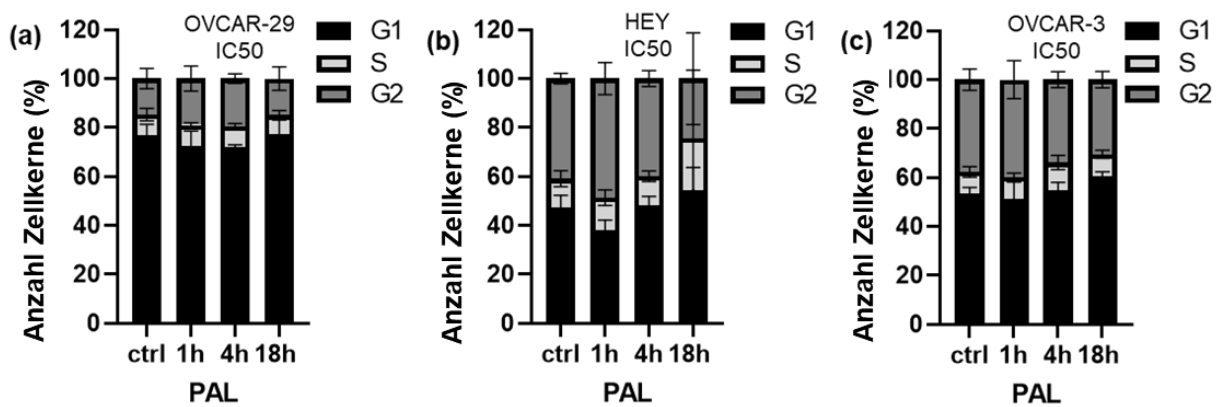


Abb. 10: Effekte der PAL-Behandlung auf die Zellzyklusregulation. Relativer Anteil der G1, S und G2 Zellzyklusphase nach PAL-Behandlung von (a) OVCAR-29, (b) HEY und (c) OVCAR-3 unter Verwendung der zelltypspezifischen IC50 (OVCAR-29: 89,50 %, HEY: 28,00 % und OVCAR-3: 25,00 %) abhängig von der PAL-Inkubationszeit ($t = 1$ h, $t = 4$ h und $t = 18$ h). Die Zellen wurden nach PAL-Behandlung fixiert, mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SD aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten relativ zur Kontrolle (ctrl).

3.6 Einfluss der PAL-Behandlung auf die isolierten Asziteszellen

Im Folgenden wurden die Asziteszellen zur Darstellung des Dosiseffekts von PAL mit unterschiedlichen PAL-Verdünnungsstufen behandelt. Anschließend wurde der Einfluss der PAL-Behandlung hinsichtlich des programmierten Zelltods in Abhängigkeit der verwendeten PAL-Konzentration und PAL-Behandlungsdauer untersucht sowie der Einfluss der PAL-Behandlung hinsichtlich auftretender DNA-Doppelstrangbrüche in Abhängigkeit der verwendeten PAL-Behandlungszeit. Abschließend wurde der Effekt der PAL-Behandlung auf den Zellzyklus dargestellt.

Wie in Abb. 11 (a) dargestellt wurde der dosisabhängige Effekt von PAL auf die relative Viabilität der Asziteszellen analysiert. Hierzu wurde die relative Viabilität nach PAL-Behandlung in Abhängigkeit der PAL-Verdünnungen 1:1 bis 1:10 über $t = 18$ h im Vergleich zur Kontrolle aufgezeigt. Die Behandlung mit den Verdünnungen 1:1 ($p < 0,0001$), 1:2 ($p < 0,0001$), 1:3 ($p < 0,0001$), 1:4 ($p = 0,0005$), 1:5 ($p = 0,0017$), 1:6 ($p = 0,0211$) und 1:7 ($p = 0,0410$) sowie mit der Verdünnung 1:9 ($p = 0,0366$) bewirkte eine signifikant geringere relative Viabilität der Zellen im Vergleich zur PAL-unbehandelten Kontrolle. Die PAL-Verdünnungen bewirkten eine umso höhere relative Viabilität der behandelten Zellen, desto geringer die PAL-Verdünnung war. Die relative Viabilität der behandelten Zellen mit den Verdünnungsstufen 1:8 und 1:10 stellte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle geringer dar, jedoch nicht signifikant.

Die relative Caspase 3/7 Aktivität der Asziteszellen zeigte wie in Abb. 11 (b) dargestellt weder nach einer PAL-Behandlungsdauer von 1 h noch nach 18 h mit den hier untersuchten PAL-Konzentrationen (IC50, 100 % PAL) einen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Nach 18 h PAL-Behandlungsdauer zeigten die Zellen nach der Behandlung mit unverdünntem PAL eine nicht signifikant geringere relative Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die mit der IC50 behandelten Aszites-Zellen zeigten bezüglich entstehender Doppelstrangbrüche weder nach $t = 1$ h, $t = 4$ h noch nach $t = 18$ h einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 11 (c)).

Abb. 11 (d) zeigt den Einfluss der PAL-Behandlung (IC50) bei Asziteszellen auf die Zellzyklusregulation. Ein signifikanter Unterschied konnte lediglich in einem Anstieg des Zellanteils der in der S-Phase befindlichen Zellen nach 18 h PAL-Behandlungsdauer im Vergleich zur Kontrolle dargestellt werden ($p = 0,0311$). Nach $t = 1$ h PAL-Behandlung kam es zu einem nicht signifikanten Rückgang des Anteils der Zellen, welche sich in der

G1-Phase befanden. Gleichzeitig kam es zu einem nicht signifikanten Anstieg des Anteils der sich in der S- und G2-Phase befindlichen Zellen. Nach $t = 4$ h stieg der Anteil der Zellen in der S- und G1-Phase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach 18 h PAL-Behandlungsdauer kam es aufgrund des signifikanten Unterschieds in der S-Phase zu einem Rückgang des Anteils der Zellen, welche sich in der G1- und G2-Phase befanden.

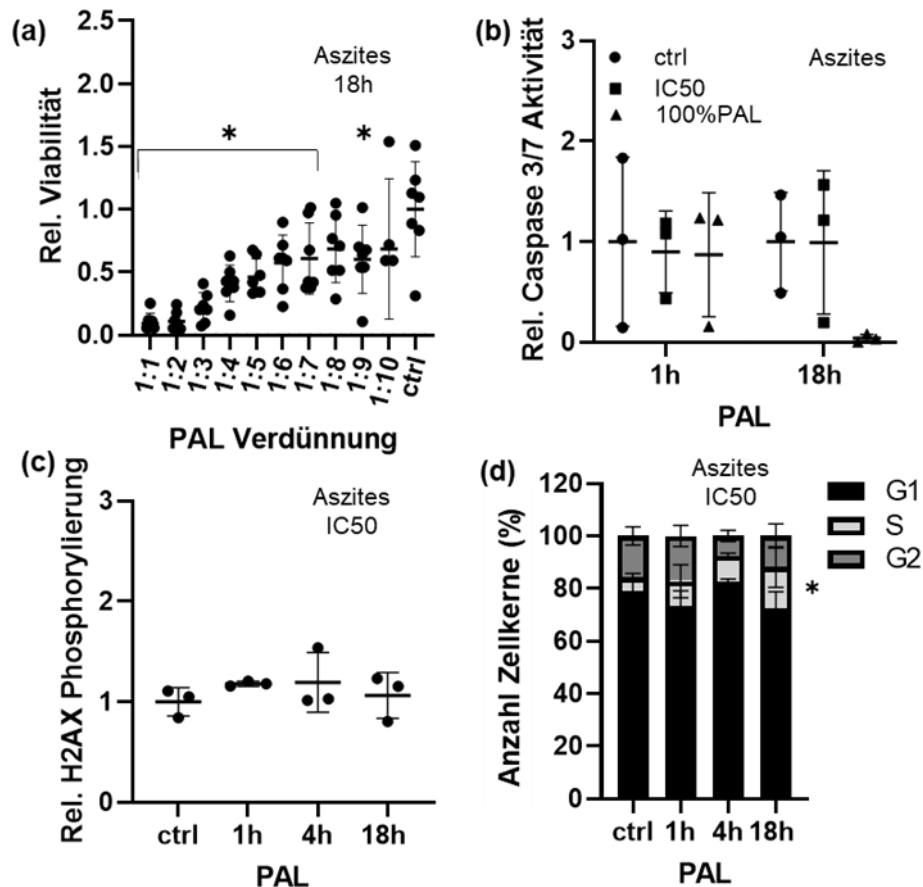


Abb. 11: Einfluss der PAL-Behandlung auf primäres Ovarialkarzinomgewebe abhängig von PAL-Dosierung und PAL-Inkubationszeit. (a) Relative Zellviabilität nach dosisabhängiger PAL-Behandlung von Aszites in den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:10. Die Zellen wurden nach PAL-Behandlung mittels Resazurin Assay fluorometrisch analysiert. (b) Relative Caspase 3/7 Aktivität von Aszites in Abhängigkeit von PAL-Inkubationszeit ($t = 1$ h und $t = 18$ h) und PAL-Dosierung unter Verwendung der gewebespezifischen IC50 (18,71 %) und 100 % PAL. Die Zellen wurden nach PAL-Behandlung mittels Lumineszenzbestimmung analysiert. (c) Relative H2AX Phosphorylierung nach PAL-Behandlung unter Verwendung der zelltypspezifischen IC50 (18,71 %) abhängig von der PAL-Inkubationszeit ($t = 1$ h, $t = 4$ h und $t = 18$ h). Die Zellen wurden nach PAL-Behandlung fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen γ H2AX gefärbt. (d) Relativer Anteil der G1-, S- und G2-Zellzyklusphase nach PAL-Behandlung von Aszites unter Verwendung der zelltypspezifischen IC50 (18,71 %) abhängig von der PAL-Inkubationszeit ($t = 1$ h, $t = 4$ h und $t = 18$ h). Die Zellen wurden nach PAL-Behandlung fixiert, mit PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse aus (a-d) sind dargestellt als Mittelwert \pm SD aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten relativ zur Kontrolle (ctrl). Signifikante Unterschiede sind dargestellt als $*p < 0,05$, unter Verwendung der Two-way ANOVA.

3.7 Effekte der PAL-Behandlung auf den zellulären Metabolismus

Zudem wurde der Einfluss von PAL auf NADH und FAD untersucht. Diese beiden Koenzyme spielen vor allem bei der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung als obligate Reaktionspartner eine wichtige Rolle und sind somit für den Gewinn von ATP relevant. Dies lässt auf die Aktivität des Energiestoffwechsels der Zelle schließen. Hierfür wurden Zellen der Zelllinien OVCAR-29 und HEY sowie Asziteszellen für $t = 1$ h mit der zelltypspezifischen IC₅₀ PAL-behandelt. Anschließend wurden sie mittels FLIM analysiert (Abb. 12).

Die PAL-Behandlung mit der zelltypspezifischen IC₅₀ führte in allen untersuchten Zelltypen zu einer statistisch signifikanten Reduktion des prozentualen Anteils an freiem NADH vom NADH-Gesamtvorkommen im Vergleich zur Kontrolle (OVCAR-29: $p = 0,0009$, HEY: $p = 0,0049$, Aszites: $p = 0,0472$).

Die Fluoreszenzlebensdauer des ungebundenen, vorrangig zytosolisch vorkommenden NADH wurde durch die PAL-Behandlung bei allen untersuchten Zelltypen statistisch signifikant erhöht (OVCAR-29: $p = 0,0011$, HEY: $p = 0,0082$, Aszites: $p = 0,0240$).

Nach der PAL-Behandlung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzlebensdauer des proteingebundenen, hauptsächlich mitochondrial vertretenen NADH bei OVCAR-29 ($p = 0,0125$) im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Zelllinie HEY stellte sich ein nicht signifikanter Anstieg der Fluoreszenzlebensdauer vom proteingebundenen NADH dar. Beim Aszites konnte kein relevanter Unterschied der Fluoreszenzlebensdauer des proteingebundenen NADH nach der PAL-Behandlung beschrieben werden.

Es konnte bei den Zelllinien OVCAR-29 und HEY eine statistisch signifikante Reduktion des prozentualen Anteils an gebundenem FAD vom FAD-Gesamtvorkommen nach PAL-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (OVCAR-29: $p = 0,0019$, HEY: $p = 0,0063$) beobachtet werden. Bei den Asziteszellen konnte ein nicht signifikanter Abfall des prozentualen Anteils an gebundenem FAD vom gesamten FAD gezeigt werden.

Die PAL-Behandlung führte zu einer signifikant längeren Fluoreszenzlebensdauer von freiem, ungebundenem FAD bei der Zelllinie HEY ($p = 0,0313$) und den Asziteszellen ($p = 0,0480$) im Vergleich zur Kontrolle. Bei den OVCAR-29-Zellen konnte kein wesentlicher Unterschied der Fluoreszenzlebensdauer von ungebundenem FAD nach PAL-Behandlung beobachtet werden.

Die Fluoreszenzlebensdauer des proteingebundenen, hauptsächlich mitochondrial vorkommenden FAD wurde durch die PAL-Behandlung bei den Zelllinien OVCAR-29 und HEY signifikant erhöht (OVCAR-29: $p = 0,0024$, HEY: $p = 0,0031$). Bei den extrahierten

Zellen aus Aszites konnte diesbezüglich kein wesentlicher Unterschied im Vergleich zur Kontrolle beschrieben werden.

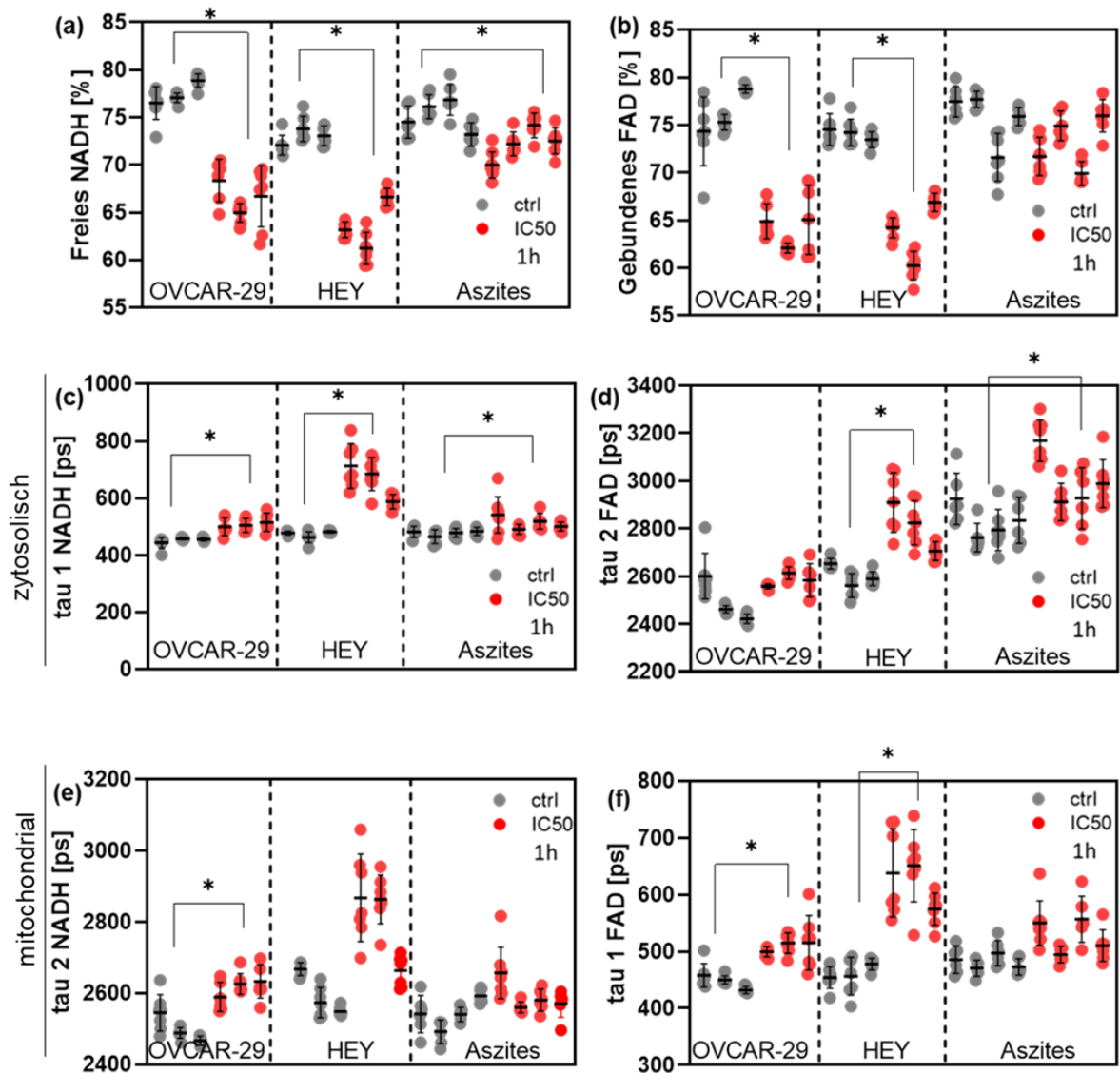


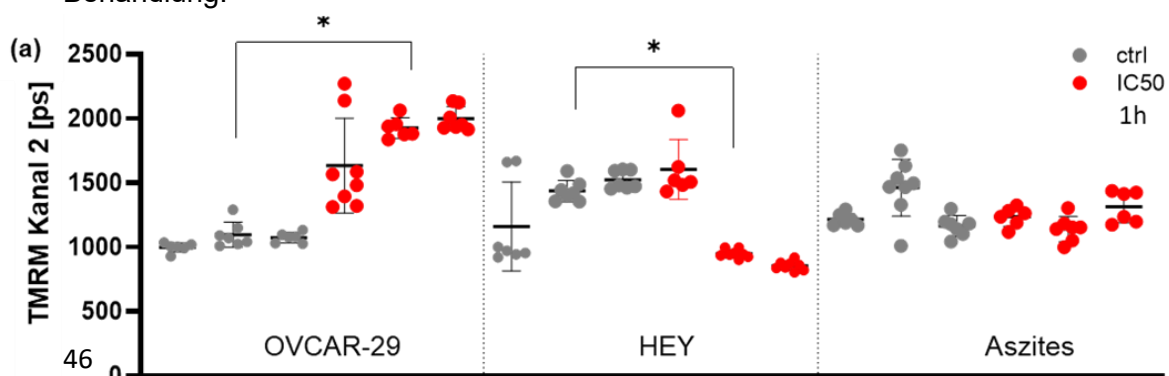
Abb. 12: Effekte der PAL-Behandlung auf den Redoxstoffwechsel. Prozentuale Anteile von (a) freiem NADH und (b) gebundenem FAD am Gesamtvorkommen, Fluoreszenzlebensdauer τ [ps] von freiem (c) NADH und (d) FAD und gebundenem (e) NADH und (f) FAD von OVCAR-29, HEY und Aszites nach PAL-Behandlung unter Verwendung der zelltypspezifischen IC50 (OVCAR-29: 89,50%, HEY: 28,00% und OVCAR-3: 25,00%) nach einer Inkubationszeit von $t = 1$ h. Die Zellen wurden nach PAL-Behandlung mittels Fluoreszenz gemessen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind dargestellt als $*p < 0,05$, ermittelt per ungepaartem t-Test.

3.8 Einfluss der PAL-Behandlung auf das mitochondriale Transmembranpotential

Um Veränderungen des mitochondrialen Transmembranpotentials nach PAL-Behandlung zu detektieren und somit Rückschlüsse auf den Zustand der Zelle zu schließen, wurden Zellen der Zelllinien OVCAR-29 und HEY sowie Asziteszellen für $t = 1$ h mit der zelltypspezifischen IC50 PAL-behandelt. Im Anschluss wurden sie mit TMRM gefärbt und dessen Fluoreszenzlebensdauer wurde mittels eines Laser-Scanning-Mikroskops analysiert. Die Ergebnisse sind als absolute Zeitangabe (Abb. 13 (a)) und farbkodiert (Abb. 13 (b) - (e)) nachfolgend dargestellt.

Die Fluoreszenzlebensdauer von TMRM zeigte im Vergleich zur Kontrolle nach PAL-Behandlung einen signifikanten Anstieg bei der Zelllinie OVCAR-29 ($p = 0,0065$). Bei der Zelllinie HEY konnte hingegen eine signifikant kürzere Fluoreszenzlebensdauer von TMRM im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden ($p = 0,0023$). Bei den Asziteszellen zeigte sich kein wesentlicher Unterschied der TMRM-Fluoreszenzlebensdauer nach PAL-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle.

In der farbkodierten Darstellung sind diese Beobachtungen an der Verschiebung des Farbspektrums zu erkennen. Zusätzlich wird hier eine morphologische Beurteilung der Mitochondrien möglich. Die repräsentativ dargestellten Zellen der Zelllinie OVCAR-29 bilden eine deutliche Farbverschiebung des Signals von orange (ctrl) zu gelb-grün nach PAL-Behandlung ab. Die Mitochondrien der unbehandelten OVCAR-29-Zellen präsentieren sich als physiologisches, fadenförmig verzweigtes Netzwerk. Wohingegen die PAL-behandelten Mitochondrien der Zelllinie OVCAR-29 punktförmige, teils vesikuläre Formationen annehmen. Die Verkürzung der TMRM-Fluoreszenzlebensdauer bei der HEY-Zelllinie lässt sich auf den hier dargestellten, farbkodierten Aufnahmen nicht eindeutig erkennen. Dennoch lässt sich auch hier der morphologische Wandel von fadenförmig konfigurierten Mitochondrien in netzwerkartigen Strukturen bei den Kontrollen hin zu punktförmigen Mitochondrien nach PAL-Behandlung zeigen. Die hier abgebildeten Asziteszellen zeigen weder in der Farbkodierung noch in der mitochondrialen Morphologie deutlich erkennbare Veränderungen nach der PAL-Behandlung.



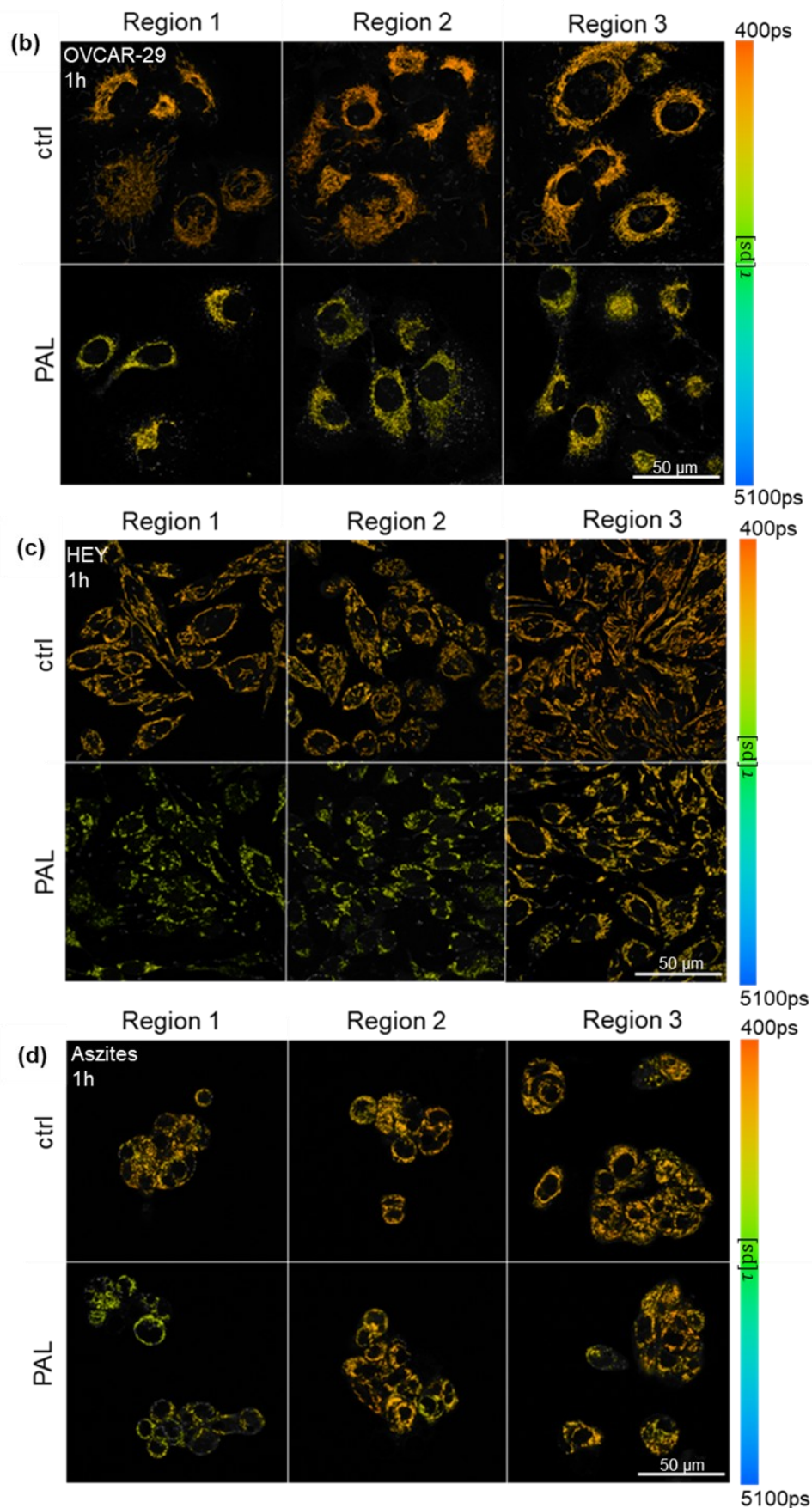


Abb. 13: Effekte der PAL-Behandlung auf das mitochondriale Transmembranpotential. (a) TMRM-Fluoreszenzlebensdauer τ [ps] von OVCAR-29, HEY und Aszites sowie (b-d) repräsentative Aufnahmen von (b) OVCAR-29, (c) HEY und (d) Aszites nach PAL-Behandlung unter Verwendung der zelltypspezifischen IC50 (OVCAR-29: 89,50 %, HEY: 28,00 % und OVCAR-3: 25,00 %) nach einer Inkubationszeit von $t = 1$ h. Die Zellen wurden nach PAL-Behandlung gegen TMRM gefärbt und mittels Fluoreszenz gemessen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SD aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind dargestellt als $*p < 0,05$, ermittelt per ungepaartem t-Test.

4 Diskussion

Das Ovarialkarzinom besitzt seit Jahren unter allen gynäkologischen Tumoren die größte Mortalität [59, 60]. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass das Ovarialkarzinom meist erst in einem späten Stadium diagnostiziert wird [61]. Ein erstes wegweisendes Symptom ist häufig eine abdominale Umfangsvermehrung, die durch Aszites bei bereits entstandener Peritonealkarzinose verursacht wird. In der UKCTOS-Screening-Studie konnten keine wirksamen Screening-Methoden festgestellt werden, um die Zahl der Todesfälle durch Ovarialkarzinome zu reduzieren [23].

Der Fokus der Behandlung liegt demnach auf der kurativen Therapie. Hierfür stehen die operative Zytoreduktion und die systemische Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel primär zur Verfügung. Die operative Zytoreduktion kann als primäre Debulking-Operation mit nachfolgender Chemotherapie oder als Intervalloperation nach neoadjuvanter Chemotherapie durchgeführt werden. Die TRUST-Studie konnte darlegen, dass bezogen auf das Gesamtüberleben kein signifikanter Vorteil aus der primären operativen Zytoreduktion im Vergleich zur Intervalloperation mit je begleitender Systemtherapie resultiert [62]. Daher kann diskutiert werden, dass die Abfolge der systemischen und operativen Therapie anhand der zu erwartenden postoperativen Morbidität zu entscheiden ist.

Trotz leitliniengerechter Therapie treten nach initialem Ansprechen häufig Rezidive und Resistenzen auf.

So konnten Lopez *et al.* hoch aktive DNA-Reparatursensoren wie das ATM-Protein und die Aktivierung der Axl-Rezeptor-Tyrosinkinase, die durch Einleitung des epithelial-mesenchymalen Übergangs Zellproliferation und Überleben fördert, als Resistenzmechanismen gegen die übliche Chemotherapie feststellen [63]. Neben der Chemotherapie steht bei platinsensiblen Ovarialkarzinomen die Erhaltungstherapie mit PARP-Inhibitoren wie Niraparib zur Verfügung. Die langfristige Therapie geht allerdings mit einem erhöhten Risiko für tödliche Erkrankungen wie der myeloischen Leukämie und dem myelodysplastischen Syndrom einher [64].

In der aktuellen Forschung werden unterschiedliche weitere Therapien diskutiert: Tumorimpfstoffe zielen auf tumorassoziierte Antigene ab, die vorwiegend in Tumorzellen vorkommen. Die Antigene werden von T-Zellen erkannt und lösen eine zytotoxische T-Zell-Reaktion aus, die eine immunvermittelte Tumorabtötung hervorruft. Die Herstellung

solcher Impfstoffe ist allerdings meist kostenintensiv und erfordert besondere Expertise aufgrund ihrer Komplexität [65]. Onkolytische Viren haben sich ebenfalls als Mittel zur Steigerung und Förderung einer starken tumorspezifischen Immunantwort bewährt [64]. Es konnte jedoch in einer nicht-randomisierten Phase-2-Studie mit dem Wirkstoff Olvi-Vec, der aus dem Vacciavirus hergestellt wird, und anschließender Chemotherapie mit Carboplatin in lediglich 8 % der behandelten Patientinnen ein vollständiges Ansprechen erreicht werden [66]. Des Weiteren werden Antibody-Drug-Conjugates (ADC) zur Therapie der Ovarialkarzinome diskutiert. Mirvetuximab Soravtansin, ein monoklonaler Antikörper gegen den Folatrezeptor α , an den das Zellgift Maytansinoid DM4 konjugiert ist, ist das einzige ADC, das derzeit von der U. S. Food and Drug Administration für Ovarialkarzinome zugelassen ist [67]. Nachdem das Konjugat an den Folatrezeptor α gebunden hat, welcher bei 60 - 90 % der serösen Ovarialkarzinome an der Zelloberfläche exprimiert ist, wird es in die Zelle internalisiert, der Wirkstoff wird entlassen, was zum Zellzyklusarrest führt und die Apoptose wird eingeleitet. Moore *et al.* konnten in der MIRASOL-Studie bei platinresistentem Ovarialkarzinom eine Erhöhung von 35 % des progressionsfreien Überlebens und 33 % des Gesamtüberlebens durch die Therapie mit Mirvetuximab Soravtansin aufzeigen. Jedoch traten Nebenwirkungen wie Keratitis, Neuropathie und interstitielle Lungenerkrankungen auf [68]. Immuntherapien versuchen die rezeptorvermittelte Immunsuppression der körpereigenen Immunabwehr durch Krebszellen aufzuheben. Meist werden Antikörper untersucht, die spezifische Immunantworten hervorrufen sollen. So konnten durch AXL-Inhibitoren DNA-Schäden und Replikationsstress bei Ovarialkarzinomen ausgelöst werden. Des Weiteren konnte eine Hochregulierung von Genen, die am Cholesterin-Biosyntheseweg beteiligt sind, festgestellt werden. Dies deutet auf eine schützende zelluläre Stoffwechselreaktion als Folge der induzierten DNA-Schäden hin [69].

Die Anwendbarkeit der neuartigen Therapien ist von der patientenspezifischen Tumorbiologie abhängig. Bisher zeigen die verfügbaren Therapien keine ausreichenden Heilungschancen und sind zudem mit z. T. lebensbedrohlichen Nebenwirkungen behaftet und äußerst kostenintensiv. Daher bedarf es dringlich Alternativen, welche praktisch durchführbar sind und möglichst keine Resistenzen und Nebenwirkungen verursachen.

Seit einigen Jahren wird PAL in präklinischen Studien als Möglichkeit zur Tumorbehandlung untersucht. Es konnte bereits bei einer Vielzahl von Krebszellen die zytotoxische Wirkung von PAL nachgewiesen werden. Bei Cervixkarzinomzellen wurde

nach PAL-Behandlung eine Abnahme der Zellzahl und Veränderung der Zellmorphologie beschrieben [52]. Daneben zeigten Lee *et al.*, dass die Proliferation von Melanomzellen durch die PAL-Behandlung aufgrund spezifischer Degradation von fokalen Adhäsionsmolekülen stark gehemmt wurde [53]. Bei Glioblastomen, einem neuroektodermalen Malignom, wurde die Induktion von Apoptose durch PAL aufgezeigt [55]. Auch bei hämatopoetischen Malignomen wie Leukämien konnten zytoreduktive Effekte durch die PAL-Behandlung nachgewiesen werden [70]. Chauvin *et al.* stellten bei soliden gastrointestinalen Tumoren nach PAL-Behandlung eine verringerte Lebensfähigkeit dieser fest [71].

Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits bei unterschiedlichen Karzinomzellen einen selektiven Effekt von PAL auf Krebszellen nachweisen [72, 73, 74]. Geht man von einer zukünftigen intraabdominalen PAL-Anwendung aus, so wäre der selektive PAL-Effekt auf Krebszellen ein enormer Vorteil, da hierdurch kaum Nebenwirkungen zu erwarten wären. Krebszellen haben grundsätzlich eine höhere intrazelluläre Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies [75]. Dies ist das Ergebnis eines grundlegend höheren Stoffwechsels im Vergleich zu normalen Zellen. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Unterschied der intrazellulären Konzentration von reaktiven Spezies Krebszellen gegen oxidativen Stress empfindlicher macht [76]. Zudem haben Karzinomzellen einen geringen Cholesteringehalt, welcher ebenso zu einer höheren ROS-Basiskonzentration führen könnte, da Cholesterin das Eindringen von ROS in die Zellen behindert und dadurch eine verminderte antioxidative Fähigkeit resultieren könnte [77]. Yan *et al.* beschrieben die vermehrte Expression von Aquaporinen in Karzinomzellen, über die ein vermehrter Einstrom von Wasserstoffperoxid in die Tumorzelle stattfindet, als den Grund für die selektive Antitumorwirkung [78]. Der selektive PAL-Effekt resultiert vermutlich aus einem Zusammenspiel vieler Faktoren. Bislang scheint es unklar, was der ausschlaggebende Grund für die Selektivität ist.

Neben den antitumoralen Effekten wird die Wirkung von PAL in weiteren zahlreichen Feldern untersucht. So konnten beispielsweise positive Effekte auf Fibroblasten im Sinne einer Adhäsionsprophylaxe dargestellt werden [79]. Ebenso wurden eine verbesserte Wundheilung durch vermehrte Zellproliferation [80], eine gesteigerte Blutgerinnung durch Stimulation der Gerinnungsfaktoren und der Thrombozytenaggregation [51, 81] sowie Veränderungen in der Zellmigration und Proteinexpression [82, 83] als Effekte von PAL aufgezeigt.

Die Anwendung von PAL zeigt im Vergleich zur direkten Plasmaapplikation eine vergleichbare Wirkung, bietet jedoch praktische Vorteile [44, 84]. PAL kann im Vergleich zu direktem Plasma homogen auf Flächen verteilt werden oder sogar in Gewebe injiziert werden. Dies könnte für die Applikation an chirurgisch schwierig zu explorierenden Bereichen von Nutzen sein. Die direkte Plasmaanwendung wirkt nur in den oberflächlichen Gewebeschichten, wohingegen PAL auch in tiefer gelegenen Gewebeschichten unmittelbare Effekte hervorruft [52, 85]. Außerdem sind bei der Anwendung von nicht-thermischem Plasma keine thermischen Nebeneffekte zu erwarten [52]. Diese Eigenschaften stellen sich besonders vorteilhaft dar, wenn man den prospektiven Einsatz *in vivo* bei Laparoskopien, offen chirurgischen Interventionen oder Peritonealdialysen bedenkt.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der TRUST-Studie lässt sich annehmen, dass die Wahl der Therapieabfolge von operativer und systemischer Therapie anhand der postoperativ zu erwartenden Morbidität beschlossen werden sollte [62]. Scheint diese hoch zu sein durch beispielsweise eine lange Operationsdauer oder komplexe Tumorformation, kann die Intervallchemotherapie eine Möglichkeit darstellen. Dieses Ergebnis unterstreicht die möglichen Chancen der PAL-Therapie. Die postoperative Morbidität könnte somit nicht nur durch die perioperative Anwendung gesenkt werden, sondern zusätzlich durch die neoadjuvante Anwendung von PAL, da tumorbehaftete lokalisierte Bereiche bereits präoperativ erfolgreich behandelt werden könnten. Besonders an chirurgisch schwierig zu explorierenden Bereichen könnte das Risiko der Operation gesenkt werden. Auch die Operationsdauer könnte durch bereits sanierte Tumorherde reduziert werden.

Yan *et al.* konnten ein optimales Arbeitsvolumen von 2 ml PAL feststellen [86]. Kähler *et al.* verglichen die unterschiedlichen Modi „pulsed effect 2-Modus“ und „precisemode“ des APCs. Hier konnten sie zeigen, dass der „precisemode“ hinsichtlich der thermischen Läsionen bei unterschiedlichen Abständen zwischen der Plasmasonde und dem Präparat eine größere Sicherheit bietet [87]. RPMI 1640 stellte sich als besonders guter Überträger der PAL-Effekte bei Ovarialkarzinomzelllinien heraus [88]. Jene Angaben wurden in dieser Arbeit übernommen.

In vielen Studien wurden bereits reduzierende Effekte auf die Zellviabilität durch PAL-Behandlung beschrieben [52, 58, 71, 89, 90]. Bei Ovarialkarzinomzellen wurde der Effekt abhängig vom Zelltyp, der Zellzahl und dem PAL-Verdünnungsverhältnis

beschrieben [57]. Die antiproliferative Wirkung von PAL geht aus den von Plasma erzeugten und auf das Medium übertragenen Komponenten hervor [89].

In dieser Arbeit konnte der größte Effekt auf die Zellviabilität wie erwartet in den geringsten PAL-Verdünnungsstufen beobachtet werden. Jede Zelllinie reagierte wie bereits in der Literatur beschrieben in den einzelnen PAL-Verdünnungsstufen unterschiedlich. So bewirkte PAL bei den OVCAR-29-Zellen in den Verdünnungen 1:1 bis 1:1,2, bei den HEY-Zellen in den Verdünnungen 1:1 bis 1:3 und bei den OVCAR-3-Zellen in den Verdünnungen 1:1 bis 1:4 einen signifikanten Rückgang der Viabilität. Die zelltypspezifische Reaktion könnte sich aufgrund der komplexen unterschiedlichen genomischen Eigenschaften und der damit verbundenen funktionellen Aktivität wichtiger zellulärer Stoffwechselwege der Zelllinien erklären lassen [91]. Bei den Asziteszellen zeichnete sich eine Reduktion der Viabilität näherungsweise umgekehrt proportional zur Verdünnung ab. Signifikant waren die PAL-Effekte auf die Zellviabilität bei den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:7 und 1:9. Diese Beobachtungen bestätigen die These von Jo *et al.*, dass die Lebensfähigkeit der Zellen mit zunehmenden ROS abnimmt [92]. Utsumi *et al.* verifizierten diese These ebenfalls, indem sie zeigten, dass länger behandeltes PAL, welches höhere ROS-Werte aufzeigte, die Zellproliferation vermehrt inhibierte. Eine ausreichende Menge an ROS in PAL ist für eine signifikante Wirkung jedoch unerlässlich [90]. Der näherungsweise exponentielle Anstieg der Zellviabilität bei steigender PAL-Verdünnung in allen drei hier untersuchten Zelllinien lässt darauf schließen, dass die Wirkung von PAL nicht einzig von der ROS-Menge abhängig ist. So wurde vorangehend durch die Erhöhung der mit PAL zu behandelnden Zellzahl bei gleicher PAL-Menge die relative Lebensfähigkeit der PAL-behandelten Zellen deutlich erhöht [90].

In früheren Studien wurde bereits die Dauer der PAL-Inkubation als weiterer Abhängigkeitsfaktor für die Wachstumsinhibition beschrieben [88, 89]. Diese These konnte exemplarisch mit der IC₅₀ von OVCAR-29 bestätigt werden. Eine signifikante Viabilitätsreduktion konnte nach einer PAL-Inkubationsdauer von 8 h, 18 h und 24 h erreicht werden. Die geringste Viabilität wurde bei 18 h nachgewiesen, weshalb diese Inkubationszeit für die folgenden Untersuchungen übernommen wurde. Erstaunlicherweise zeigten die OVCAR-29-Zellen nach 24 h PAL-Behandlungsdauer eine höhere Viabilität als nach 18 h. Dies lässt eine zeitliche Limitation der ROS-Wirkung vermuten. In einer anderen Studie ersetzte man bei bereits behandelten Zellen das primär aufgetragene PAL mit frischem PAL, woraufhin bei diesen die Zellproliferation

mehr gehemmt wurde, als wenn man das PAL von $t = 0$ belassen hatte [92]. Möglicherweise sind nach $t = 24$ h bereits die meisten ROS-Moleküle durch chemische Reaktionen abgefangen worden, sodass die verbleibenden Zellen eine Regeneration und erneute Zellproliferation durchlaufen [93].

Chauvin *et al.* zeigten vorangehend, dass die zytotoxische Wirkung von PAL nicht nur die Zellproliferation hemmt, sondern auch die Zellpopulation reduziert [71]. So wurde in dieser Arbeit konsekutiv neben dem PAL-Effekt der reduzierten Viabilität der Effekt auf den Zelltod untersucht. Plasma induziert weitgehend einen apoptotischen Zelltod, durch die RONS wird der intrinsische, mitochondrienabhängige proapoptische Signalweg aktiviert [94]. Die Apoptose geht im Vergleich zur Nekrose kontrolliert und nicht mit einer Entzündungsreaktion der Umgebung einher [95]. Dieser Effekt konnte bereits bei unterschiedlichen Karzinomzellen wie beispielsweise Cervixkarzinomen [92], Magenkarzinomen [96], Osteosarkomen [97] und Pankreaskarzinomen [71] aufgezeigt werden.

In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg der relativen Caspase 3/7 Aktivität bei der Zelllinie HEY nach 18 h PAL-Inkubationszeit nach Behandlung mit der IC50 festgestellt werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Bauer *et al.*, dass PAL als Auslöser für einen natürlichen ROS-basierten Apoptoseweg fungiert, der sich über längere Zeitskalen erstreckt als die ursprüngliche Stimulation. Die Konzentrationskurve der Caspasen 3/7 war bei diesen Untersuchungen von einem steilen Anstieg der Apoptoseinduktion bei niedrigen Plasma-Inkubationszeiten gefolgt von einem langanhaltenden Plateau gekennzeichnet [96]. Im Vergleich hierzu zeigten sich in dieser Arbeit zunächst geringe, meist nicht signifikante Anstiege der Caspase 3/7 Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach $t = 1$ h. Dies könnte darin begründet liegen, dass Bauer *et al.* frühe Apoptosezeichen wie Zellschrumpfung und Blasenbildung als Apoptoseindikatoren wählten. Die hier verwendeten Effektorcaspasen 3 und 7 werden in der Literatur als späte Apoptosemarker beschrieben [98, 99]. Höchst wahrscheinlich haben sich die hier behandelten Zellen noch nicht in dieser späten Phase befunden. Um Zellen in einer frühen Apoptosephase zu detektieren, könnten perspektivisch Färbungen des frühen Apoptosemarkers Annexin V oder die Detektion von Phosphatidylserin an der äußeren Plasmamembran durchgeführt werden. Ebenso könnten durch eine mikroskopische Begutachtung und Auswertung von typischen morphologischen Apoptosekriterien wie Kernfragmentierung und Bläschenbildung nach PAL-Behandlung frühere Anzeichen einer ablaufenden Apoptose erkannt werden. Ein nicht signifikanter

Anstieg der relativen Caspase 3/7 Aktivität zeigte sich nach einer PAL-Inkubationszeit (IC50) von 18 h bei der OVCAR-3-Zelllinie. Wie bei Bauer *et al.* stellt sich der apoptotische PAL-Effekt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dar. Sie konnten ebenso nachweisen, dass die PAL-Behandlungszeit und Dichte der Zielzellen weitere Abhängigkeitsfaktoren sind [96]. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Zellviabilitätsuntersuchungen dieser Arbeit überein. Nach 18 h PAL-Inkubationszeit zeigte sich auffälligerweise bei beiden untersuchten PAL-Konzentrationen eine signifikant verminderte Caspase 3/7 Aktivität bei den OVCAR-29-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Somit scheint nach 18 h Behandlungszeit bei den PAL-behandelten Zellen eine signifikant geringere apoptotische Aktivität als bei den unbehandelten Zellen vorherrschend zu sein. Dies könnte darin begründet liegen, dass Zellen eine PAL-Behandlung trotz Caspase-Expression überleben und sich nach Entfernung der Noxe wieder vermehren [100]. Diese These entspricht nicht den Erwartungen, denn eine längere Inkubation mit gar unverdünntem PAL ließe mehr Apoptoseeffekte erwarten. Vor allem in Anbetracht dessen, dass während der vorangegangenen Viabilitätsuntersuchungen nach 18 h PAL-Behandlung die geringste Viabilität festgestellt werden konnte. Daher könnte angenommen werden, dass die OVCAR-29-Zellen in beiden untersuchten PAL-Konzentrationen und HEY- und OVCAR-3-Zellen nach 100 %-PAL-Behandlung dosisabhängig nach 18 h PAL-Inkubationszeit zum größten Teil bereits den apoptotischen Prozess durchlaufen haben und im avitalen Stadium im Vergleich zu den unbehandelten Zellen kaum noch Caspase 3/7 exprimieren. Diese Vermutung lässt sich durch die Beobachtung von Chauvin *et al.* bekräftigen, da eine Externalisierung von Phosphatidylserin als Zeichen von Apoptose nach PAL-Behandlung nur vorübergehend erkennbar ist und nach längeren Inkubationszeiten verschwindet [71]. Nicht zu vernachlässigen ist allerdings, dass die wirksamen Radikale im Medium allmählich verstoffwechselt werden, was dazu führt, dass die Lebensfähigkeit der kultivierten Zellen mit fortschreitender Verbrauchszeit zunimmt [86]. Dieser Fakt scheint nach 18 h PAL-Behandlung von untergeordneter Rolle zu sein. Eine weitere Erklärung für die signifikant verminderte Caspase 3/7 Aktivität nach 18 h PAL-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und der gleichzeitig jedoch verminderten Viabilität könnte die Aktivierung anderer Zelltodmechanismen wie zum Beispiel Nekrose oder Ferroptose sein [101]. Ferroptose ist eine eisenabhängige, nicht-Caspase-abhängige, nicht-apoptotische Form des Zelltods, die auf der Oxidation von Membranphospholipiden durch beispielsweise RONS und anschließendem Zusammenbruch der Plasmamembran beruht [102]. Um eine Aussage über den Einfluss

anderer Zelltodmechanismen durch die PAL-Behandlung treffen zu können, um oben genannte These zu verifizieren, sollten ausblickend nekrotische und ferroptotische Prozesse durch entsprechende Assays nach PAL-Behandlung untersucht werden.

Bei der relativen Caspase 3/7 Expression sind die Effekte von PAL bei der Behandlung von Asziteszellen im Vergleich zu den untersuchten Zelllinien weniger ausgeprägt. Die hier untersuchten Asziteszellen sind keine Reinkultur, sondern bestehen weiterhin aus einer Mischung von mehreren Zelltypen. Darunter befinden sich hauptsächlich Tumorzellen, jedoch auch andere Zellen wie mesotheliale Zellen und Fibroblasten. Laut histologischen Untersuchungen wird das zelluläre Stroma aus u.a. Fibroblasten und mesothelialen Zellen durch die Plasmabehandlung aufgrund des selektiven Antitumoreffekts nicht beeinträchtigt [103]. Mesothelzellen initiieren nach PAL-Behandlung unter anderem das intrinsische Überlebensprogramm (AKT-Signalweg, HSP27 und Survivin) [79]. Erst bei einer langen Behandlungsdauer von 18 h und hohen PAL-Konzentration (100 % PAL) ist bei den Asziteszellen ein ähnlicher Effekt wie bei den Zelllinien zu erkennen. Konkordant hierzu zeigten die Asziteszellen bei den Viabilitätsuntersuchungen nach 18 h PAL-Behandlung signifikante Änderungen. Dies charakterisiert erneut die zelltypspezifische Resilienz und Wirkung von PAL. Um genauere Aussagen der PAL-Wirkung auf die isolierten Ovarialkarzinomzellen aus Aszites treffen zu können, sind ausblickend Untersuchungen an Reinkulturen sinnvoll. Die Reinkultur könnte durch eine antikörpervermittelte Markierung und Selektion der Ovarialkarzinomzellen mithilfe von FACS und anschließender Kultivierung dieser erreicht werden.

Nachdem apoptotische Effekte durch PAL nachgewiesen wurden, wurde im Folgenden ein möglicher Auslöser für diese, DNA-Doppelstrangbrüche, untersucht. Eines der wichtigsten Proteine, das für den Checkpoint-vermittelten Zellzyklusstillstand und die DNA-Reparatur nach doppelsträngigen DNA-Brüchen benötigt wird, ist H2AX [104, 105]. DNA-Schäden, die durch oxidativen Stress verursacht werden, führen zu einer schnellen Phosphorylierung von H2AX (γ H2AX) [103]. In der Literatur wurde mehrfach zelltypunabhängig eine erhöhte γ H2AX-Expression nach Plasmabehandlung beschrieben. Chang *et al.* konnten bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle nach bereits sehr kurzer Plasmabehandlung eine H2AX-Phosphorylierung feststellen, die anschließend zum Zellzyklusstillstand und zur Apoptose führte [106]. Auch bei Zervixkarzinomzellen konnte eine signifikante Zunahme von γ H2AX nach PAL-Behandlung aufgezeigt werden [41]. Judée *et al.* beschrieben ebenso eine DNA-

Schädigung nach PAL-Behandlung bei Colonkarzinomspheroiden. Sie konnten zudem zeigen, dass die genotoxische Aktivität mit der Zeit abzunehmen scheint und Wasserstoffperoxid als Hauptakteur der reaktiven Spezies für die DNA-Doppelstrangbrüche verantwortlich ist [107].

In dieser Studie konnten lediglich bei den Zellen der HEY-Zelllinie signifikante Anstiege der relativen H2AX-Phosphorylierung dargestellt werden. Unter Annahme, dass auf die induzierten Doppelstrangbrüche die Apoptose folgt, stimmen diese Daten mit denen der Caspase 3/7 Aktivität überein. Die Ergebnisse der OVCAR-29-Zellen zeigten nach PAL-Behandlung zwar keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung von Doppelstrangbrüchen, lassen sich jedoch mit ihrer steigenden Tendenz ebenso in die vorangegangenen Ergebnisse der Apoptosereaktion einordnen. Die Zellen der HEY-Zelllinie weisen im Vergleich zu denen der OVCAR-29-Zelllinie eine KRAS-Missensemutation auf [108]. Kalimutho *et al.* stellten fest, dass Zellen mit einer KRAS-Mutation eine höhere Belastung durch Replikationsstress aufweisen, was mit einer Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche einhergeht [109]. Dies könnte einen Grund für die vermehrte γ H2AX-Expression im Vergleich zu anderen Zelllinien darstellen.

In der Literatur herrscht Unklarheit darüber, ob die Tumorzell-DNA-Schäden direkt durch hohe Mengen an RONS verursacht werden und diese Schäden anschließend zur Apoptose führen, wie hier bislang angenommen, oder, ob Plasma über andere Signalwege Apoptose auslöst, was dann zur DNA-Fragmentierung und höheren H2AX-Histonphosphorylierungswerten führt [110]. Letztere These würde die nicht signifikant, jedoch erhöhte Caspase 3/7 Aktivität von OVCAR-3 bei gleichzeitig kaum veränderter relativer γ H2AX-Expression erklären. Schütz *et al.* bekräftigen dies, indem sie es für unwahrscheinlich halten, dass kurzlebige Spezies, die bei der Plasmaentladung entstehen, stabil und reaktiv genug sind, um intrazellulär große Distanzen zurückzulegen, um die DNA-schädigende Wirkung zu entfalten [111]. Gaur *et al.* konnten im Gegenzug bei niedriger Plasmaexpositionszeit DNA-Doppelstrangbrüche nachweisen ohne das gleichzeitige Vorhandensein von Apoptose. Bei hohen Plasmabehandlungszeiten konnte wie erwartet ein Nachweis von Apoptose gezeigt werden. Dies spricht dafür, dass Plasma eine direkte Einwirkung auf Doppelstrangbrüche hat [112].

DNA-Doppelstrangbrüche können zelluläre Checkpoints auslösen, die den Zellzyklus stoppen oder den apoptotischen Zelltod induzieren. Um den Zusammenhang zwischen DNA-Doppelstrangbrüchen und dem Zellzyklus zu beurteilen, wurden im Folgenden

Zellzyklusuntersuchungen durchgeführt. Diese zeigten nach kurzer PAL-Behandlungszeit ($t = 1$ h), dass der Zellzyklus am G2/M-DNA-Schadenskontrollpunkt angehalten wird, der dazu dient, Zellen mit genomischen DNA-Schädigungen daran zu hindern in die M-Phase einzutreten [89]. In der Literatur wurde bereits mehrfach über einen PAL-vermittelten Zellzyklusarrest bei benignen [113, 114] und malignen Zellen [89] berichtet. Jo *et al.* konnten nach PAL-Behandlung von Lungenkarzinomzellen und Volotskova *et al.* konnten nach Plasmabehandlung von Hautkrebszellen eine Abnahme des Zellanteils in der G0/G1- sowie S-Phase zeigen. Gleichzeitig wurde eine Zunahme der sich in der G2/M-Phase befindlichen Zellen nachgewiesen [89, 115]. Bei Ovarialkarzinomzellen konnte ein ROS-vermittelter G2/M-Phasenarrest durch die Anwendung von Kardamonin gezeigt werden [40]. Die Auswirkungen von ROS auf den Zellzyklus hängen von der Dosis ab und reichen von einem vorübergehenden Wachstumsstillstand bis hin zum Zelltod [116]. Die ROS-induzierte Hemmung der Proliferationsaktivität wird als Folge der Aktivierung von p53 beschrieben. Das aktivierte Tumorsuppressorgen p53 inhibiert die Bildung vom für den Eintritt in die Mitosephase relevanten B-Cyclin/CDK1-Komplex. Zudem fördert es den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21, welcher den Übergang der Zellen von der G0- in die G1-Phase hemmt [117]. Nach einer längeren PAL-Inkubationszeit von $t = 4$ h und $t = 18$ h konnte in dieser Arbeit eine Zunahme der G1-Phase aufgezeigt werden. RONS verstärken die Aktivität der Checkpointkinasen 1 und 2. Hierdurch folgt die Inaktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen, die den Eintritt in die G1/S-Phase fördern [118]. Lee *et al.* konnten bereits eine Proliferationshemmung nach PAL-Behandlung durch Zunahme der Wachstumsphase und Unterdrückung der DNA-Synthese bei Melanozyten beschreiben. Der Stillstand des Zellzyklus im G0/G1-Phasenarrest erfolgte je nach Grad der Stimulation. Nach 18 h PAL-Behandlungszeit konnte in dieser Arbeit eine signifikante Steigerung des Anteils der in der S-Phase befindlichen Asziteszellen festgestellt werden. Der Anteil der sich in der S-Phase befindlichen Zellen nahm auch in vorangegangenen Studien nach einiger Zeit wieder zu [113]. In der Literatur wurde ein Switch des vorherrschenden Zellzyklusarrestes nach PAL-Behandlung bereits beschrieben [114].

Viabilitätsveränderungen, Doppelstrangbrüche und vor allem die Induktion von Apoptose gehen mit Veränderungen des zellulären Stoffwechsels einher.

In der biomolekularen Forschung wird FLIM zur Untersuchung der Stoffwechselzustände von Zellen und Gewebe unter verschiedenen physiologischen Bedingungen eingesetzt, indem die autofluoreszierenden Eigenschaften von den endogenen metabolischen

Coenzymen Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), NADH und FAD genutzt werden [119]. NADH, NADPH und FAD werden während der im Zytosol ablaufenden Glykolyse und dem mitochondrial ablaufenden Citratzyklus gebildet [120]. Anschließend wandern sie zur inneren Mitochondrienmembran, sodass ATP durch die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette gewonnen werden kann. In Folge der Änderung des Elektronentransportes während der Atmungskette entsteht ein Protonengradient entlang der Mitochondrienmembran, dem sogenannten Transmembranpotential (siehe Abb. 14) [121]. Dieses Verfahren konnte bereits in zahlreichen Studien zur Bewertung des metabolischen Gleichgewichts zwischen Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung in lebenden Zellen angewendet werden [122, 123]. Die Methode ist markierungsfrei und nicht-invasiv, wodurch die Lebensfähigkeit der Zellen für *in-vivo*-Studien erhalten bleibt [124]. Die beiden Coenzyme NADH und NADPH haben die gleichen spektralen Eigenschaften, jedoch ist die intrazelluläre Konzentration von NADH um ein Vielfaches größer als die intrazelluläre Konzentration von NADPH [123, 125]. Daher werden sie im Folgenden zu NADH zusammengefasst.

Die Glykolyse ist für eine Zelle der einfachste Weg, um die in den Glucoseverbindungen gespeicherte chemische potenzielle Energie in nutzbare Energie umzuwandeln [123]. Schnell proliferierende Zellen wie Karzinomzellen sind auf die Glykolyse angewiesen [124]. Otto Warburg beschrieb 1956 den sogenannten Warburg-Effekt, der besagt, dass Krebszellen die Glykolyse im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung präferieren [126]. Während der Apoptose hingegen erhöht der Zellkern seinen Energiebedarf. Hierfür erfolgt eine Umverteilung von der freien zur gebundenen NADH-Form, sodass eine effiziente Energiegewinnung in den Mitochondrien gewährleistet werden kann [127]. Während der Apoptose kann dadurch eine erhöhte oxidative Phosphorylierung beobachtet werden.

In dieser Arbeit konnte bei allen drei Zelltypen nach PAL-Behandlung ein signifikanter Abfall des prozentualen freien NADHs gezeigt werden. Folglich führte die PAL-Behandlung zum Anstieg des prozentualen gebundenen NADHs. Freies NADH entsteht im zellulären Zytoplasma aus der Glykolyse. Sinkt dieser Anteil, kann angenommen werden, dass die Glykolyse durch die PAL-Behandlung herunterreguliert wird. Entweder, weil die Apoptose ausgelöst wird und die Zelle ihre mitochondriale oxidative Phosphorylierung verstärken muss. Oder, weil sie weiterhin versucht die Energiegewinnung aufrecht zu erhalten und auf andere Energiestoffwechselwege wie die Beta-Oxidation und den Citratzyklus im Mitochondrium zurückgreift. Hierzu werden

Amino- und Fettsäuren in den Mitochondrien abgebaut, was die Mikroumgebung im Mitochondrium und damit die Fluoreszenzlebensdauer von hauptsächlich mitochondrialem, proteingebundenem NADH verändert [128]. In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzlebensdauer von gebundenem NADH bei OVCAR-29 und ein nicht signifikanter Anstieg bei der HEY-Zelllinie gezeigt werden. Dies spricht für eine Verlagerung von einer glykolytischen Stoffwechselsituation zur oxidativen Phosphorylierung. Da Krebszellen sonst die Glykolyse präferieren, könnte dies ein Zeichen von apoptotischen Prozessen durch PAL-Behandlung sein [126]. Die unterschiedliche Ausprägung des Anstiegs der Fluoreszenzlebensdauer von gebundenem NADH der beiden hier untersuchten Zelllinien nach PAL-Behandlung könnte sich durch die unterschiedlich starke Apoptoseinduktion erklären lassen. Denn auch die relative Caspase 3/7 Aktivität zeigte sich nach $t = 1$ h PAL-Behandlungszeit bei den OVCAR-29-Zellen ausgeprägter als bei den HEY-Zellen. Dies könnte wiederum in den unterschiedlichen Proteinexpressionsprofilen und genomischen Ausstattungen der Zelllinien begründet sein [129].

Des Weiteren konnte hier eine Erhöhung der Fluoreszenzlebensdauer von freiem NADH aufgezeigt werden. Alturkistany *et al.* konnten bereits darlegen, dass sich während eines apoptotischen Prozesses die Fluoreszenzlebensdauern von gebundenem und freiem NADH ändern. Dies erklärt sich durch die Änderung des mitochondrialen Transmembranpotentials während der Apoptose. Somit kommt es folglich zu Veränderungen der zytosolischen und mitochondrialen Mikroumgebung. Außerdem erhöht sich die Fluoreszenzlebensdauer je länger die Zellen einem apoptoseauslösenden Wirkstoff ausgesetzt sind [130]. Auch Heikal *et al.* beschrieben nach Apoptoseinduktion eine unmittelbare Erhöhung der Fluoreszenzlebensdauer [121]. Die Asziteszellen zeigten die geringsten Veränderungen der Fluoreszenzlebensdauern und damit die geringsten Veränderungen in deren zellulären Mikroumgebung nach PAL-Behandlung. Dies entspricht den übrigen bisher vorgestellten Ergebnissen in dieser Arbeit.

Das Coenzym FAD ist außerhalb der mitochondrialen Energiegewinnung bei vielen weiteren Reaktionen, wie z.B. dem Elektronentransport, der DNA-Reparatur und der Nukleotidbiosynthese, beteiligt [131, 132, 133]. Daher sind die Ergebnisse der FAD-Untersuchungen auch von anderen Faktoren wie der PAL-Behandlung und ihrer Effekte abhängig. In dieser Arbeit konnte ein signifikanter prozentualer Abfall des gebundenen FADs bei den Zelllinien OVCAR-29 und HEY und ein nicht signifikanter prozentualer

Abfall des gebundenen FADs bei den Asziteszellen beobachtet werden. Folglich kann von einem prozentualen Anstieg des freien, mitochondrialen FADs ausgegangen werden. Diese Beobachtung reiht sich in die bereits beschriebene These ein, dass die Zelle versucht, verstärkt Beta-Oxidation im Mitochondrium zu betreiben. Die Fluoreszenzlebensdauern von gebundenem und freiem FAD steigerten sich ebenso beide nach PAL-Behandlung, was nochmals die parallele Veränderung der Mikroumgebung im Mitochondrium und im Zytosol unterstreicht.

Um die signifikanten Anstiege der Fluoreszenzlebensdauern von FAD als valide Zeichen einer Veränderung im Energiemetabolismus werten zu können, sollten ausblickend zum Ausschluss anderer Einflüsse auf die FAD-Fluoreszenzlebensdauer Untersuchungen bezüglich des Elektronentransports, der DNA-Reparatur und Nukleotidbiosynthese angestrebt werden, da FAD hier ebenso eine Rolle spielt. Dies könnte zum Beispiel durch eine Expressionsanalyse von DNA-Reparaturproteinen erreicht werden.

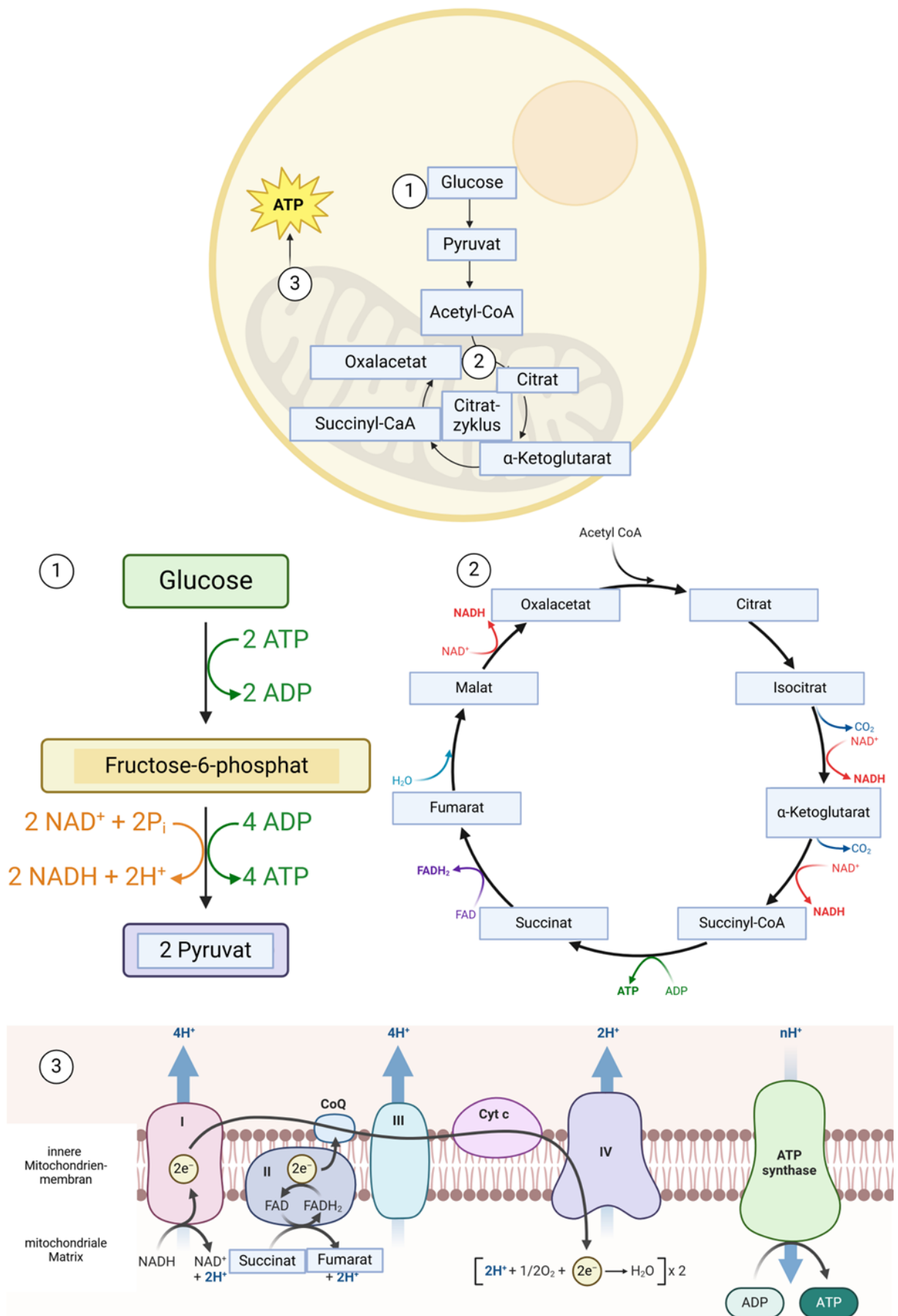


Abb. 14: Energiemetabolismus der Zelle. Während der im Zytoplasma ablaufenden Glykolyse (1) wird Glucose unter Bildung von 2 NADH in 2 Moleküle Pyruvat umgewandelt. Bei dem im Mitochondrium ablaufenden Citratzyklus (2) werden Acetyl-CoA und Oxalacetat unter Bildung von 3 NADH und 1 FADH₂ zu Citrat umgewandelt. Die Atmungskette (3) befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und stellt das Endorgan der Energiegewinnung im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung unter Verbrauch von 1 NADH und Bildung von 1 FADH₂ dar. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Im nächsten Schritt wurde die Änderung des mitochondrialen Transmembranpotentials, ein Indikator der Apoptose, nach PAL-Behandlung verifiziert. Plasma bewirkt durch reaktive Spezies eine Veränderung des mitochondrialen Transmembranpotentials, die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren wie Cytochrom C und führt nach Aktivierung von Caspasen zur mitochondrienvermittelten Apoptose [134, 135]. Bei Cervixkarzinomzellen konnte nach Plasmabehandlung eine Depolarisation des mitochondrialen Transmembranpotentials demonstriert werden [94]. Die Depolarisation der Mitochondrienmembran nimmt in Abhängigkeit der Plasmaexpositionszeit zu [92].

Die Anwendung von FLIM mit TMRM als Sonde wurde von Okkelman *et al.* als eine valide Methode zur Messung des mitochondrialen Transmembranpotentials beschrieben [136]. In dieser Studie konnte ein signifikanter Anstieg des mitochondrialen Transmembranpotentials, also eine Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran, nach PAL-Behandlung bei den Zelllinien OVCAR-29 und HEY festgestellt werden. Beim Aszites konnte keine signifikante Änderung des mitochondrialen Transmembranpotentials dargelegt werden. In der Literatur wurde eine transiente Zunahme der Hyperpolarisation der mitochondrialen Membran nach Exposition von PAL beziehungsweise oxidativem Stress vor der Depolarisation der mitochondrialen Membran mit anschließender Freisetzung von Cytochrom C bereits beschrieben [137, 138]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der signifikanten Änderung der sowohl zytosolischen als auch mitochondrialen Mikroumgebung der beiden kommerziellen Zelllinien im vorangegangenen Versuch. Da die Asziteszellen keine signifikante Änderung im mitochondrialen Transmembranpotential aufweisen, scheint es konsequent, dass lediglich in der zytosolischen Mikroumgebung eine signifikante Veränderung zu sehen war. Wäre eine signifikante Änderung des mitochondrialen Transmembranpotentials vorhanden, wäre eine Veränderung der mitochondrialen und zytosolischen Mikroumgebung zu erwarten.

Um die These einer transienten Hyperpolarisation vor der Depolarisation der mitochondrialen Membran nach PAL-Behandlung zu verifizieren, könnte zukünftig dieselbe Studie mit einer längeren PAL-Behandlungszeit wie zum Beispiel $t = 18$ h durchgeführt werden, um die Ergebnisse mit denen der Caspase 3/7 Aktivität vergleichen zu können. Auch könnte eine antikörpervermittelte Färbung von Cytochrom C mehr Aufschluss über den Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials, als Indikator für die Apoptose, geben.

Die aufgezeigten repräsentativen TMRM-Färbungen lassen bei den Kontrollen ein hauptsächlich faserförmiges, physiologisch angeordnetes Netzwerk erkennen. Betrachtet man die TMRM-Färbungen nach PAL-Behandlung scheint sich dieses faserförmige Netzwerk zum Teil in punktförmige, vesikuläre Strukturen umzugestalten. Sun *et al.* beschrieben eine morphologische Umgestaltung der inneren Mitochondrienmembran in viele vesikuläre Matrixkompartimente als Zeichen eines apoptotischen Prozesses [139].

5 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom stellt nach wie vor eine der tödlichsten Karzinomerkrankungen der Frau dar. Die Primäroperation hat das Ziel der maximalen Zytoreduktion, kann jedoch häufig nicht ohne prognostisch relevanten intraabdominellen Tumorrest beendet werden. Die bislang verfügbaren konservativen Therapien sind mit Nebenwirkungen oder unzureichendem Therapieansprechen vergesellschaftet.

Plasmaaktiviertes Medium (PAL) wird in einer Vielzahl von präklinischen Studien aufgrund seiner selektiven Antitumoreffekte als eine besonders interessante Therapieform untersucht, die ohne schwerwiegende Nebenwirkungen angewendet werden kann. Durch die flüssige Aggregatsform scheint die intraabdominale Anwendung im Sinne einer intraoperativen Spülung oder Peritonealdialyse vielversprechend zu sein, um inoperable Metastasen behandeln zu können.

In dieser Arbeit wird die PAL-Wirksamkeit anhand drei kommerziellen Ovarialkarzinomzelllinien und isolierten Ovarialkarzinomzellen aus humanem Aszites untersucht. Der in der Literatur bereits bei diversen Krebsentitäten beschriebene dosisabhängige PAL-Effekt wurde durch Viabilitätsuntersuchungen bei allen untersuchten Ovarialkarzinomzelltypen bestätigt. Für Folgeexperimente konnte für jedes Gewebe eine zelltypspezifische IC50 bestimmt werden. Die stärkste Zytotoxizität wurde nach 18-stündiger PAL-Exposition bei OVCAR-29-Zellen beobachtet. Mechanistische Untersuchungen zeigten eine signifikante Apoptoseinduktion in OVCAR-29- und HEY-Zelllinien, wobei HEY-Zellen zusätzlich signifikante DNA-Doppelstrangbrüche aufwiesen. Während kommerzielle Zelllinien keine signifikanten Zellzyklusveränderungen zeigten, induzierte PAL einen S-Phasen-Arrest in primären Asziteszellen. FLIM-Analysen von NADH und FAD belegten metabolische Reprogrammierung in allen Zelltypen, charakterisiert durch eine Verschiebung von glykolytischem zu oxidativem Metabolismus. Diese metabolischen Veränderungen korrelierten mit mitochondrialer Membranpotential-Modulation, was den apoptotischen Mechanismus unterstützt. Die konvergierenden Befunde – dosisabhängige Zytotoxizität, Apoptoseinduktion, DNA-Schädigung und metabolische Dysregulation – demonstrieren das therapeutische Potential von PAL für Ovarialkarzinome. Vor klinischer Translation sind jedoch systematische Validierungen in 3D-Modellen, Tumor-Organoiden und präklinischen in-vivo-Studien erforderlich, um Wirksamkeit, Selektivität und Sicherheitsprofile zu etablieren.

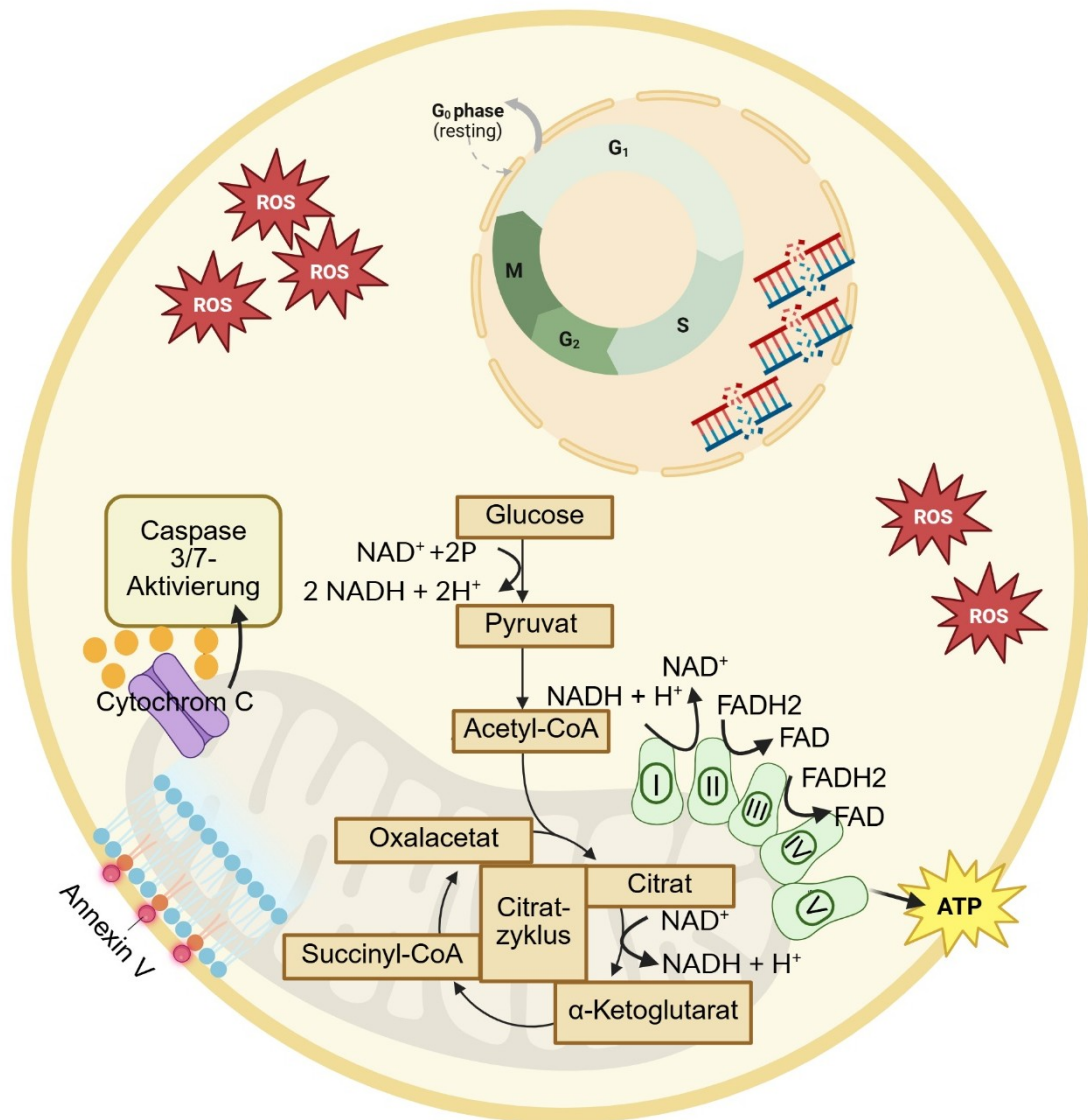
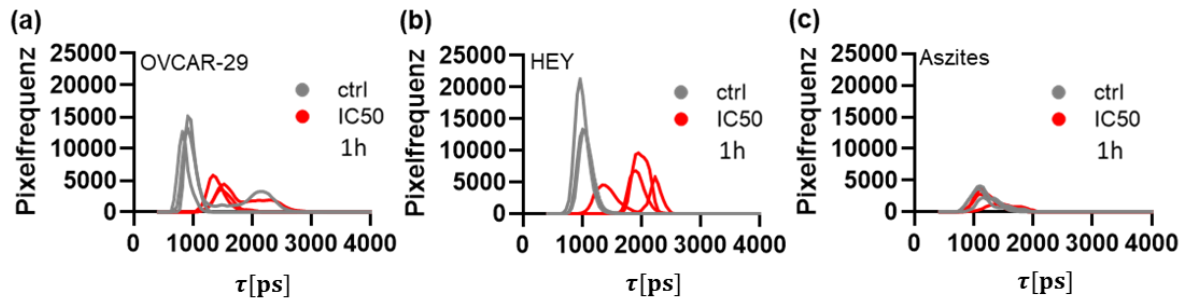
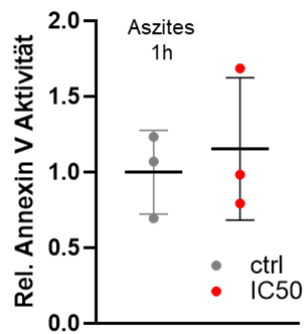


Abb. 15: Zelluläre PAL-Effekte. Zusammenfassend konnten Effekte nach PAL-Behandlung auf die Aktivität der Apoptosemarker Caspase 3/7 und Annexin V, die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, die Regulation des Zellzyklus, den Metabolismus von NADH und FAD und das mitochondriale Transmembranpotential gezeigt werden. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

6 Anhang



Anhang 1: Verhalten der Fluoreszenzlebensdauer τ [ps] im Bezug auf die Pixelfrequenz. Verteilungshistogramme der TMRM-Fluoreszenzlebensdauer τ [ps] von (a) OVCAR-29 (b) HEY und (c) Aszites nach PAL-Behandlung unter Verwendung der IC50 (OVCAR-29 = 89,5 %, HEY = 28,00 % und Aszites = 18,71 %) nach einer Inkubationszeit $t = 1$ h.



Anhang 2: Effekte der PAL-Behandlung auf die frühe Apoptoseinduktion von primärem Ovarialkarzinomgewebe isoliert aus Aszites. Relative Annexin V Aktivität von primärem Ovarialkarzinomgewebe aus Aszites nach PAL-Inkubation für $t = 1$ h unter Verwendung der gewebsspezifischen IC50 (18,71 %). Die Zellen wurden nach PAL-Behandlung fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Annexin V gefärbt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SD aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten relativ zur Kontrolle (ctrl).

7 Literaturverzeichnis

1. Ronckers, C., C.Spix, C. Trübenbach, A. Katalinic, M. Christ, A. Cicero, J. Folkerts, J. Hansmann, K. Kranzhöfer, B. Kunz, K. Manegold, U. Meyer zum Büschenfelde, A. Penzkofer, G. Vollmer, S. Weg-Remers, B. Barnes, N. Buttman-Schweiger, S. Dahm, M. Franke, I. Schönfeld, K. Kraywinkel, A. Wienecke, *Krebs in Deutschland für 2019/2020*. 14. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2023.
2. Pullen, R., *Ovarian cancer*. Nursing, 2024. **54**(6): p.17-28.
3. Olsen, C.M., A.C. Green, D.C. Whiteman, S. Sadeghi, F. Kolaheer, P.M. Webb, *Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis*. European Journal of Cancer, 2007. **43**(4): p. 690-709.
4. Kim, S.Y., H.K. Chang, O. Kwon, J. Park, J.-P. Myong, *Asbestos Exposure and Ovarian Cancer: A Meta-analysis*. Safety and Health at Work, 2024. **15**(1): p. 1-8.
5. Gong, T.-T., Q.-J. Wu, E. Vogtmann, B. Lin, Y.-L. Wang, *Age at menarche and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of epidemiological studies*. International Journal of Cancer, 2013. **132**(12): p. 2894-2900.
6. Barnard, M.E., L.V. Farland, B. Yan, J. Wang, B. Trabert, J.A. Doherty, H.D. Meeks, M. Madsen, E. Guinto, L.J. Collin, K.A. Maurer, J.M. Page, A.C. Kiser, M.W. Varner, K. Allen-Brady, A.Z. Pollack, K.R. Peterson, C.M. Peterson, K.C. Schliep, *Endometriosis Typology and Ovarian Cancer Risk*. Journal of the American Medical Association, 2024. **332**(6): p.482-489.
7. Yin, W., H. Falconer, L. Yin, L. Xu, W. Ye, *Association Between Polycystic Ovary Syndrome and Cancer Risk*. Journal of the American Medical Association, 2019. **5**(1): p.106-107.
8. Shi, L., Y. Wu, C. Li, *Hormone therapy and risk of ovarian cancer in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis*. Menopause, 2016. **23**(4): p.417-424.
9. Moschetta M., A. George, S.B. Kaye, S. Banerjee, *BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer*. Annals of Oncology, 2016. **27**(8): p.1449-1455.
10. Weber-Lassalle, N., J. Hauke, J. Ramser, L. Richters, E. Groß, B. Blümcke, A. Gehrig, A.-K. Kahlert, C.R. Müller, K. Hackmann, E. Honisch, K. Weber-Lasalle, D. Niederacher, J. Borde, H. Thiele, C. Ernst, J. Altmüller, G. Neidhardt, P. Nürnberg, K. Klaschik, C. Schroeder, K. Platzer, A.E. Volk, S. Wang-Gohrke, W. Just, B. Auber, C. Kubisch, G. Schmidt, J. Horvath, B. Wappenschmidt, C. Engel, N. Arnold, B. Dworniczak, K. Rhiem, A. Meindl, R.K. Schmutzler, E. Hahnen, *BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer*. Breast Cancer Research, 2018. **20**(1): p.7.
11. Pelttari, L.M., T. Heikkinen, D. Thompson, A. Kallioniemi, J. Schleutker, K. Holli, C. Blomqvist, K. Aittomäki, R. Bützow, H. Nevanlinna, *RAD51C is a susceptibility gene for ovarian cancer*. Human Molecular Genetics, 2011. **20**(16): p. 3278-3288.
12. Bonadona, V., B. Bonaiti, S. Olschwang, S. Grandjouan, L. Huiart, M. Longy, R. Guimbaud, B. Buecher, Y.-J. Bignon, O. Caron, C. Colas, C. Nogués, S. Lejeune-Dumoulin, L. Olivier-Faivre, F. Polycarpe-Osaer, T.D. Nguyen, F. Desseigne, J.-C. Saurin, P. Berthet, D. Leroux, J. Duffour, S. Manouvrier, T. Frébourg, H. Sobol, C. Lasset, C. Bonaiti-Pellié, *Cancer risks associated with germline mutations in MLH1,*

- MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome.* Journal of the American Medical Association, 2011. **305**(22): p.2304-2310.
13. Jordan, S.J., A.C. Green, D.C. Whiteman, S.P. Moore, C.J. Bain, D.M. Gertig, P.M. Webb, *Serous ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancers: a comparative epidemiological analysis.* International Journal of Cancer, 2008. **122**(7): p.1598-1603.
 14. Lurie, G., P. Thompson, K.E. McDuffie, M.E. Carney, K.Y. Terade, M.T. Goodman, *Association of estrogen and progestin potency of oral contraceptives with ovarian carcinoma risk.* Obstetrics and Gynecology, 2007. **109**(3): p.597-607.
 15. Kurman, R.J., L.-M. Shih, *The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded.* The American Journal of Pathology, 2016. **186**(4): p.733-747.
 16. Cibula, D., M. Widschwendtner, O. Májek, L. Dusek, *Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: review and meta-analysis.* Human reproduction update, 2011. **17**(1): p.55-67.
 17. Kahn, R.M., S. Gordhandas, K. Godwin, R.L. Stone, M.J. Worley, K.H. Lu, K.C. Long Roche, *Salpingectomy for the Primary Prevention of Ovarian Cancer: A Systematic Review.* JAMA surgery, 2023. **158**(11): p.1204-1244.
 18. Antoniou, A.C., M. Rookus, N. Andrieu, R. Brohet, J. Chang-Claude, S. Peock, M. Cook, D.G. Ebans, R. Eeles, C. Nogues, L. Faivre, P. Gesta, F.I.E. can Leewen, M.G.E.M. Ausems, A. Osorio, T. Caldes, J. Simard, J. Lubinski, A.-M. Gerdes, E. Olah, C. Fürhauser, H. Olsson, B. Arver, P. Radice, D.F. Easton, D.E. Goldgar, *Reproductive and hormonal factors, and ovarian cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study.* Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2009. **18**(2): p. 601-610.
 19. Lisio, M.-A., L. Fu, A. Goyeneche, Z.-H. Gao, C. Telleria, *High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints.* International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(4): p.952.
 20. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 6.0, 2024, AWMF-Registernummer: 032-035OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>; Zugriff am 08.11.2024
 21. Doubeni, C.A., A.R. Doubeni, A.E. Myers, *Diagnosis and Management of Ovarian Cancer.* American Family Physician, 2016. **93**(1): p. 937-944.
 22. Bankhead, C.R., S.T. Kehoe, J. Austoker, *Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review.* BJOG – An International Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2005. **112**(7): p. 857-865.
 23. Menon, U., A. Gentry-Maharaj, M. Burnell, N. Singh, A. Ryan, C. Karpinskyi, G. Carlino, J. Taylor, S.K. Massingham, M. Raikou, J.K. Kalsi, R. Woolas, R. Manchanda, R. Arora, L. Casey, A. dawnay, S. Dobbs, S. Leeson, T. Mould, M.W. Seif, A. Sharma, K. Williamson, Y. Liu, L. Fallowfield, A.J. McGuire, S. Campbell, S.J. Skates, I.J. Jacobs, M. Parmar, *Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial.* Lancet, 2021. **397**(10290): p. 2185-2193.
 24. Chang, S.-J., M. Hodeib, J. Chang, R.E. Bristow, *Survival impact of complete cytoreduction on gross residual disease for advanced-stage ovarian cancer: a meta-analysis.* Gynecologic Oncology, 2013. **130**(3): p. 493-498.

25. Trimbos, B., P. Timmers, S. Pecorelli, C. Coens, K. Ven, M. van der Burg, A. Casado, *Surgical staging and treatment of early ovarian cancer: long-term analysis from a randomized trial*. Journal of the National Cancer Institute, 2010. **102**(13): p. 982-987.
26. Haunschild, C.E., K.S. Tewari, *Bevacizumab use in the frontline, maintenance and recurrent settings for ovarian cancer*. Future Oncology, 2020. **16**(7): p. 225-246.
27. Mirza, M.R., R.L. Coleman, A. González-Martín, K.N. Moore, N. Colombo, I. Ray-Coquard, S. Pignata, *The forefront of ovarian cancer therapy: update on PARP inhibitors*. Annals of Oncology, 2020. **31**(9): p. 1148-1159.
28. Staff, N.P., J.C. Fehrenbacher, M. Caillaud, M.Imad Damaj, R. A. Segal, S. Rieger, *Pathogenesis of paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A current review of in vitro and in vivo findings using rodent and human model systems*. Experimental Neurology, 2020. **324**: p. 113121.
29. Zhang, Wenwen, Z. Shen, H. Luo, X. Hu, L. Zheng, X. Zhu, *The Benefits and Side Effects of Bevacizumab for the Treatment of Recurrent Ovarian Cancer*. Current Drug Targets, 2017. **18**(10): p. 1125-1131.
30. Holschneider, C.H., J.J. Berek, *Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors*. Seminars in Surgical Oncology, 2000. **19**(1): p. 3-10.
31. Luvero, D., A. Milani, J.A: Ledermann, *Treatment options in recurrent ovarian cancer: latest evidence and clinical potential*. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2014. **6**(5): p. 229-239.
32. Pujade-Lauraine, E., F. Hilpert, B. Weber, A. Reuss, A. Poveda, G. Kristensen, R. Sorio, I. Vergote, P. Witteveen, A. Bamias, D. Pereira, P. Wimberger, A. Oaknin, M. Raza Mirza, P. Follana, D. Bollag, I. Ray-Coquard, *Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial*. Journal of Clinical Oncology, 2014. **32**(12): p. 1302-1308.
33. Langmuir, I., *Oscillations in Ionized Gases*. Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America, 1928. **14**(8): p.627-637.
34. Gay-Mimbrera, J., M.C. García, B. Isla-Tejera, A. Rodero-Serrano, A.V. García-Nieto, J. Ruano, *Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer*. Advances in Therapy, 2016. **33**(6): 894-909.
35. Weiss, M., R. Utz, M. Ackermann, F.-A. Taran, B. Krämer, M. Hahn, D. Wallwiener, S. Brucker, M. Haupt, J. Barz, C. Oehr, *Characterization of a non-thermally operated electrosurgical argon plasma source by electron spin resonance spectroscopy*. Plasma Processes and Polymers, 2018. **16**: p. 1800150.
36. 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*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2010. **45**(26): p.3001.
37. Adachi, T., H. Tanaka, S. Nonomura, H. Hara, S. Kondo, M. Hori, *Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial-nuclear network*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. **73**: p.18-44.
38. Lin, A., B. Truong, S. Patel, N. Kaushik, E.H. Choi, G. Fridman, A. Fridman, V. Miller, *Nanosecond-Pulsed DBD Plasma-Generated Reactive Oxygen Species Trigger Immunogenic Cell Death in A549 Lung Carcinoma Cells through Intracellular Oxidative Stress*. International Journal of Molecular Sciences, 2017. **18**(5): p.966.
39. Zubor, P., Y. Wang, A. Liskova, M. Samec, L. Koklesova, Z. Dankova, A. Dorum, K. Kajo, D. Dvorska, V. Lucansky, B. Malicherova, I. Kasubova, J. Bujnak, M. Mlyncek, C.A. Dussan, P. Kubatka, D. Büsselberg, O. Golubnitschaja, *Cold Atmospheric*

- Pressure Plasma (CAP) as a New Tool for the Management of Vulva Cancer and Vulvar Premalignant Lesions in Gynaecological Oncology*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(21): p.7988.
40. Ruibin, J., J. Bo, W. Danying, F. Jianguo, G. Linhui, *Cardamonin induces G2/M phase arrest and apoptosis through inhibition of NF- κ B and mTOR pathways in ovarian cancer*. Aging, 2020. **12**(24): p.25730-25743.
 41. Marzi, J., M.B. Stope, M. Henes, A. Koch, T. Wenzel, M. Holl, S.L. Layland, F. Neis, H. Bösmüller, F. Ruoff, M. Templin, B. Krämer, A. Staebler, J. Barz, D.A. Carjaval Berrio, M. Enderle, P.M. Loskill, S.Y. Brucker, K. Schenke-Layland, M. Weiss, *Noninvasive Physical Plasma as Innovative and Tissue-Preserving Therapy for Women Positive for Cervical Intraepithelial Neoplasia*. Cancers, 2022. **14**(8): 1933.
 42. Abdo, A.I., Z. Kopecki, *Comparing Redox and Intracellular Signalling Responses to Cold Plasma in Wound Healing and Cancer*. Current Issues in Molecular Biology, 2024. **46**(5): 4885-4923.
 43. Keßler, F., J. Chuchuy, M. Renner, T. Lutz, H. Decool, S.Y. Brucker, M. Arnholdt, M. Weiss, *Scalable and Continuous Generation of Plasma-Treated Solutions Designed for Healthcare Applications*. Applied Engineering Materials, 2025. **3**: 2199-2210.
 44. Utsumi, F., H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, H. Kondo, H. Kano, M. Hori, F. Kikkawa, *Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo*. PLoS One, 2013. **8**(12): p.e81576.
 45. Hirst, A.M., F.M. Frame, M. Arya, N.J. Maitland, D. O'Connell, *Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future*. Tumour Biology, 2016. **37**(6): p.7021-7031.
 46. Privat-Maldonado, A., A. Schmidt, A. Lin, K.-D. Weltmann, K. Wende, A. Boaerts, S. Bekeschus, *ROS from Physical Plasmas: Redox Chemistry for Biomedical Therapy*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019. **2019**: p.9062098.
 47. Kaushik, N., S. Mitra, E.J. Baek, L.N. Nguyen, P. Bhartiya, J.H. Kim, E.H. Choi, N.K. Kaushik, *The inactivation and destruction of viruses by reactive oxygen species generated through physical and cold atmospheric plasma techniques: Current status and perspectives*. Journal of Advanced Research, 2022. **43**: p.59-71.
 48. Braný, D., D. Dvorská, E. Halasová, H. Skovierová, *Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(8): p.2932.
 49. Gan, L., J. Jiang, J.W. Duan, X.J.Z. Wu, S. Zhang, X.R. Duan, J.W. Song, H.X. Chen, *Cold atmospheric plasma applications in dermatology: A systematic review*. Journal of Biophotonics, 2021. **14**(3): p.e202000415.
 50. Kim, Y.-J., B.J. Kim, J. Seok, H.S. Han, K.H. Yoo, S.Y. Choi, *Cold Plasma Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice*. Skin Research and Technology, 2024. **30**(10): p.e70071.
 51. Miyamoto, K., S. Ikehara, H. Takei, Y. Akimoto, H. Sakakita, K. Ishikawa, M. Ueda, J. Ikeda, M. Yamagishi, J. Kim, T. Yamaguchi, H. Nakanishi, T. Shimizu, N. Simizu, M. Hori, Y. Ikehara, *Red blood cell coagulation induced by low-temperature plasma treatment*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2016. **405**: p.95-101.
 52. Wenzel, T., D.A.C. Berrio, C. Reisenauer, S. Layland, A. Koch, D. Wallwiener, S.Y. Brucker, K. Schenke-Layland, E.-M. Brauchle, M. Weiss, *Trans-Mucosal Efficacy of Non-Thermal Plasma Treatment on Cervical Cancer Tissue and Human Cervix Uteri by a Next Generation Electrosurgical Argon Plasma Device*. Cancers, 2020. **12**(2): p.267.

53. Lee, H.J., C.H. Shon, Y.S. Kim, S. Kim, G.C. Kim, M.G. Kong, *Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma*. New Journal of Physics, 2009. **11**: p.115026.
54. Tanaka, H., M. Mizuno, Y. Katsumata, K. Ishikawa, H. Kondo, H. Hashizume, Y. Okazaki, S. Toyokuni, K. Nakamura, N. Yoshikawa, H. Kajiyama, F. Kikkawa, M. Hori, *Oxidative stress-dependent and -independent death of glioblastoma cells induced by non-thermal plasma-exposed solutions*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p.13657.
55. Terefinko, D., A. Dzimitrowicz, A. Bielawska-Pohl, A. Klimczak, P. Pohl, P. Jamroz, *The Influence of Cold Atmospheric Pressure Plasma-Treated Media on the Cell Viability, Motility, and Induction of Apoptosis in Human Non-Metastatic (MCF7) and Metastatic (MDA-MB-231) Breast Cancer Cell Lines*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(8): p.3855.
56. Weiss, M., M. Arnholdt, A. Hißnauer, I. Fischer, B. Schönfisch, J. Andress, S. Gerstner, D. Dannehl, H. Bösmüller, A. Staebler, S.Y. Brucker, M. Henes, *Tissue-preserving treatment with non-invasive physical plasma of verrucal intraepithelial neoplasia – a prospective controlled clinical trial*. Frontiers in Medicine, 2023. **10**: p.1242732.
57. Nakamura, K., Y. Peng, F. Utsumi, H. Tanaka, M. Mizuno, S. Toyokuni, M. Hori, F. Kikkawa, H. Kajiyama, *Novel Intraperitoneal Treatment With Non-Thermal Plasma-Activated Medium Inhibits Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p.6085.
58. Li, Y., T. Tang, H.J. Lee, K. Song, *Selective Anti-Cancer Effects of Plasma-Activated medium and Its High Efficacy with Cisplatin on Hepatocellular Carcinoma with Cancer Stem Cell Characteristics*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. **22**(8): p.3956.
59. Siegel, R.L., K.D. Miller, N. Sandeep Wagle, A. Jemal, *Cancer statistics, 2023*. A Cancer Journal for Clinicians, 2023. **73**(1): p.17-48.
60. Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. A Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(6): p.394-426.
61. Roett, M.A., P. Evans, *Ovarian Cancer: An Overview*. American Family Physician, 2009. **80**(6): p.609-616.
62. Mahner, S., F. Heitz, S. Salehi, A. Reuss, F. Guyon, A. Du Bois, P. Harter, C. Fotopoulou, D. Querleu, B.J. Mosgaard, B. Kraemer, F. Raspagliesi, B. Lampe, A. Burges, B. Schmalfeldt, P. Wimberger, H. Bronger, D.S. Chi, J. Sehouli, G.D. Aletti, *TRUST: Trial of radical upfront surgical therapy in advanced ovarian cancer (ENGOT ov33/AGO-OVAR OP7)*. Journal of Clinical Oncology, 2025. **43**(17): p.5500.
63. Lopez, J., S. Banerjee, S.B. Kaye, *New developments in the treatment of ovarian cancer--future perspectives*. Annals of Oncology, 2013. **24**(10): p.69-76.
64. Moufarrij, S., R.E. O’Cearbhaill, *Novel Therapeutics in Ovarian Cancer: Expanding the Toolbox*. Current Oncology, 2023. **31**(1): p.97-114.
65. Chow, S., J.S. Berek, O. Dorigo, *Development of Therapeutic Vaccines for Ovarian Cancer*. Vaccines, 2020. **8**(4): p.657.
66. Holloway, R.W., A.A. Mendivil, J.E. Kendrick, L.N. Abaid, J.V. Brown, J. LeBlanc, N.D. McKenzie, K.M. Mori, S. Ahmad, *Clinical Activity of Olvimulogene Nanivacirepvec-Primed Immunochemotherapy in Heavily Pretreated Patients With Platinum-Resistant or Platinum-Refractory Ovarian Cancer: The Nonrandomized Phase 2 VIRO-15 Clinical Trial*. JAMA Oncology, 2023. **9**(7): p.903-908.

67. Nwabufu, C.K., *Mirvetuximab soravtansine in ovarian cancer therapy: expert opinion on pharmacological considerations*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2024. **93**(2): p.89-105.
68. Moore, K., G. Konecny, L. Martin, A. Floquet, D. O'Malley, N. Colombo, G. Mantia-Smaldone, S. Banerjee, L. Gilbert, N. de Gregorio, J. Tromp, J. Wang, B. Esteves, M. Method, T. Van Gorp, *MIRASOL: A randomized, open-label, phase 3 study of mirvetuximab soravtansine vs. investigator's choice of chemotherapy in advanced high-grade epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancers with high folate-alpha (FR α) expression (297)*. Gynecologic Oncology, 2022. **166**(1): p.156-157.
69. Sersenová, D., Z. Machala, V. Repiská, H. Gbelcová, *Selective Apoptotic Effect of Plasma Activated Liquids on Human Cancer Cell Lines*. Molecules, 2021. **26**(14): 4254.
70. Thiagarajan, M., L. Waldbeser, A. Whitmill, *THP-1 leukemia cancer treatment using a portable plasma device*. Studies in Health Technology and Informatics, 2012. **173**: p.515-517.
71. Chauvin, J., L. Gibot, E. Griseti, M. Golzio, M.-P. Rols, N. Merbahi, P. Vicendo, *Elucidation of in vitro cellular steps induced by antitumor treatment with plasma-activated medium*. Scientific Report, 2019. **9**(1): p.4866.
72. Iseki, S., K. Nakamura, M. Hayashi, H. Tanaka, H. Kondo, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa, M. Hori, *Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma*. Applied Physics Letters, 2012. **100**(11): p.3702.
73. Utsumi, F., H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Hori, F. Kikkawa, *Selective cytotoxicity of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma against ovarian clear-cell carcinoma*. Springerplus, 2015. **3**: p.398.
74. Tanaka, H., M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa, M. Hori, *Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase*. Plasma Medicine, 2011. **1**: p.265-277.
75. Zhao, Y., X. Ye, Z. Xiong, A. Ihsan, I. Ares, M. Martínez, B. Lopez-Torres, M.-R. Martínez-Larranaga, A. Anadón, X. Wang, M. Martínez, *Cancer Metabolism: The Role of ROS in DNA Damage and Induction of Apoptosis in Cancer Cells*. Metabolites, 2023. **13**(7): p.796.
76. Schumacker, P.T., *Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword*. Cancer Cell, 2006. **10**(3): p.175-176.
77. Van der Paal, J., C. Verheyen, E.C. Neyts, A. Bogaerts, *Hampering Effect of Cholesterol on the Permeation of Reactive Oxygen Species through Phospholipids Bilayer: Possible Explanation for Plasma Cancer Selectivity*. Scientific Reports, 2017. **7**: p.39526.
78. Yan, D., A. Talbot, N. Nourmohammadi, J.H. Sherman, X. Cheng, M. Keidar, *Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma -- a model based on aquaporins (Review)*. Biointerphases, 2015. **10**(4): p. 040801.
79. Holl, M., M.-L. Rasch, L. Becker, A.-L. Keller, L. Schultze-Rhonhof, F. Ruoff, M. Templin, S. Keller, F. Neis, F. Keßler, J. Andress, C. Bachmann, B. Krämer, K. Schenke-Layland, S.Y. Brucker, J. Marzi, M. Weiss, *Cell Type-Specific Anti-Adhesion Properties of Peritoneal Cell Treatment with Plasma-Activated Medium (PAM)*. Biomedicines, 2022. **10**(4): p. 927.

80. Kalghatgi, S., G. Friedman, A. Fridman, A.M. Clyne, *Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2010. **38**(3): p. 748-757.
81. Bergler, W., K. Huber, N. Hammerschmitt, K. Hörmann, *Tonsillectomy with argon plasma coagulation (APC): evaluation of pain and hemorrhage*. *Laryngoscope*, 2001. **111**(8): p.1423-1428.
82. Kong, M.K., G. Kroesen, G. Morfill, T. Nosenko, T. Shimizu, J. van Dijk, J.L. Zimmermann, *Plasma medicine: an introductory review*. *New Journal of Physics*, 2009. **11**: p.5012.
83. Morfill, G.E., T. Shimizu, B. Steffes, H.-U. Schmidt, *Nosocomial infections—a new approach towards preventive medicine using plasmas*. *New Journal of Physics*, 2009. **11**: p.5019.
84. Kalghatgi, S., C.M. Kelly, E. Cerchar, B. Torabi, O. Alekseev, A. Fridman, G. Friedman, J. Azizkhan-Clifford, *Effects of non-thermal plasma on mammalian cells*. *PLOS ONE*, 2011. **6**(1): p.e16270.
85. Partecke, L.I., K. Evert, J. Haugk, F. Doering, L. Normann, S. Diedrich, F.-U. Weiss, M. Evert, N.O. Huebner, C. Guenther, C.D. Heidecke, A. Kramer, R. Bussiahn, K.-D. Weltmann, O. Pati, C. Bender, W. von Bernstorff, *Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p.473.
86. Yan, D., A. Talbot, N. Nourmohammadi, X. Cheng, J. Canady, J. Sherman, M. Keidar, *Principles of using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment*. *Scientific reports*, 2015. **5**: p.18399.
87. Kähler, G.F., M.N.I. Szyrach, A. hieronymus, R. Grobholz, M.D. Enderle, *Investigation of the thermal tissue effects of the argon plasma coagulation modes “pulsed” and “precise” on the porcine esophagus, ex vivo and in vivo*. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2009. **70**(2): p.362-368.
88. Koensgen, D., I. Besic, D. Gumbel, A. Kaul, M. Weiss, K. Diesing, A. Kramer, S. Bekeschus, A. Mustea, M.B. Stope, *Cold Atmospheric Plasma (CAP) and CAP-Stimulated Cell Culture Media Suppress Ovarian Cancer Cell Growth – A Putative Treatment Option in Ovarian Cancer Therapy*. *Anticancer research*, 2017. **37**(12): 6739-6744.
89. Jo, A., H.M. Joh, T.H. Chung, J.W. Chung, *Anticancer Effects of Plasma-Activated Medium Produced by a Microwave-Excited Atmospheric Pressure Argon Plasma Jet*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. **2020**: p.4205640.
90. Utsumi, F., H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Mizuno, S. Toyokuni, M. Hori, F. Kikkawa, *Variable susceptibility of ovarian cancer cells to non-thermal plasma-activated medium*. *Oncology Reports*, 2016. **35**(6): p.3169-3177.
91. Bradbury, A., R. O'Donnell, Y. Drew, N.J. Curtin, S.S. Saha, *Characterisation of Ovarian Cancer Cell Line NIH-OVCAR3 and Implications of Genomic, Transcriptomic, Proteomic and Functional DNA Damage Response Biomarkers for Therapeutic Targeting*. *Cancers*, 2020. **12**(7): p.1939.
92. Jo, A., H.M. Joh, J.H. Bae, S.J. Kim, T.H. Chung, J.W. Chung, *Plasma activated medium prepared by a bipolar microsecond-pulsed atmospheric pressure plasma jet array induced mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer cells*. *PLOS ONE*, 2022. **17**(8): p.e0272805.
93. Krumova, K., Chapter 1: Overview of Reactive Oxygen Species. In: Nonell, S., Singlet Oxygen: Application in Biosciences and Nonoscience. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2016. S.1-21.

94. Ahn, H.J., K.I. Kim, G. Kim, E. Moon, S.S. Yang, J.-S. Lee, *Atmospheric-pressure plasma jet induces apoptosis involving mitochondria via generation of free radicals*. PLOS ONE, 2011. **4**(11): p.e28154.
95. Ventura, J.-J., A.R. Nebreda, *Protein kinases and phosphatases as therapeutic targets in cancer*. *Clinical and Translational Medicine*, 2006. **8**(3): p.153-160.
96. Bauer, G., D. Sersenová, D.B. Graves, Z. Machala, *Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Medium Trigger RONS-Based Tumor Cell Apoptosis*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p.14210.
97. Mateu-Sanz, M., J. Tornín, B. Brulin, A. Khlyustova, M.-P. Ginebra, P. Layrolle, C. Canal, *Cold Plasma-Treated Ringer's Saline: A Weapon to Target Osteosarcoma*. *Cancers*, 2020. **12**(1): p.227.
98. Taylor, R.C., S.P. Cullen, S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008. **9**(3): p.231-241.
99. Zhra, Mahmoud, R.J: Qasem, F. Aldossari, R. Saleem, A. Aljada, *A Comprehensive Explanation of Caspase Detection Methods: From Classical Approaches to Cutting-Edge Innovations*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024. **25**(10): p.5460.
100. Smart, A.D., R.A. Pache, N.D. Thomsen, T. Kortemme, G.W. Davis, J.A. Wells, *Engineering a light-activated caspase-3 for precise ablation of neurons in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017. **114**(39): p.e8174-e8183.
101. Furuta, T., L. Shi, S. Toyokuni, *Non-thermal plasma as a simple ferroptosis inducer in cancer cells: A possible role of ferritin*. *Pathology International*, 2018. **68**(7): p.442-443.
102. Berndt, C., H. Alborzina, V.S. Amen, S. Ayton, U. Barayeu, A. Bartelt, H. Bayir, C.M. Bebbler, K. Birsoy, J.P. Böttcher, S. Brabletz, T. Brabletz, A.R. Brown, B. Brüne, G. Bulli, A. Bruneau, Q. Chen, G.M. DeNicola, T.P. Dick, A. Distéfano, S.J. Dixon, J.B. Engler, J. Esser-von Bieren, M. Fedorova, J. Pedro Friedmann Angeli, M.A: Friese, D.C: Fuhrmann, A.J. García-Sáez, K. Garbowicz, M. Götz, W. Gu, L. Hammerich, B. Hassannia, X. Jiang, A. Jeridi, Y. Pyo Kang, V.E. Kagan, D.B. Konrad, S. Kotschi, P. Lei, M. Le Tertre, S. Lev, D. Liang, A. Linkermann, C. Lohr, S. Lorenz, T. Luedde, A. Methner, B. Michalke, A.V. Milton, J. Min, E. Mishima, S. Müller, H. Motohashi, M.U. Muckenthaler, S. Murakami, J.A. Olzmann, G. Pagnussat, Z. Pan, T. Papagiannakopoulos, L. Pedrera Puentes, D.A: Pratt, B. Proneth, L. Ramsauer, R. Rodriguez, YA. Saito, F. Schmidt, C. Schmitt, A. Schulze, A. Schwab, A. Schwantes, M. Soula, B. Spitzlberger, B.R: Stockwell, L. Thewes, O. Thorn-Seshold, S. Toyokuni, W. Tonnus, A. Trumpp, P. Vandenabeele, T. Vanden Berghe, V. Venkataramani, F.C.E. Vogel, S. von Karstedt, F. Wang, F. Westermann, C. Wientjens, C. Wilhelm, M. Wölk, K. Wu, X. Yang, F. Yu, Y. Zou, M. Conrad, *Ferroptosis in health and disease*. *Redox Biology*, 2024. **75**: p.103211.
103. Vaquero, J., F. Judée, M. Vallette, H. Decauchy, A. Arbelaiz, L. Aoudjehane, O. Scatton, E. Gonzalez-Sanchez, F. Merabtene, J. Augustin, C. Housset, T. Dufour, L. Fouassier, *Cold-Atmospheric Plasma Induces Tumor Cell Death in Preclinical In Vivo and In Vitro Models of Human Cholangiocarcinoma*. *Cancers*, 2020. **12**(5): p.1280.
104. Fillingham, J., M.-C. Keogh, N.J. Krogan, *GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair*. *Biochemistry and Cell Biology*, 2006. **84**(4): p.568-577.
105. Dickey, J.S., C.E. Redon, A.J. Nakamura, B.J. Baird, O.A. Sedelnikova, W.M. Bonner, *H2AX: functional roles and potential applications*. *Chromosoma*, 2009. **8**(6): p.683-692.

106. Chang, J.W., S.U. Kang, Y.S. Shin, K.I. Kim, S.J. Seo, S.S. Yang, J.-S. Lee, E. Moon, S.J. Baek, K. Lee, C.H. Kim, *Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: Involvement of DNA-damage-triggering sub-G(1) arrest via the ATM/p53 pathway*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014. **545**: p.133-140.
107. Judée, F., C. Fongia, B. Ducommun, M. Yousfi, V. Lobjois, N. Merbahi, *Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids*. Scientific Reports, 2016. **6**: p.21421.
108. Hernandez, L., M.K. Kim, L. Tiffany Lyle, K.P. Bunch, C.D. House, F. Ning, A.M. Noonan, C.M. Annunziata, *Characterization of ovarian cancer cell lines as in vivo models for preclinical studies*. Gynecologic Oncology, 2016. **142**(2): p.332-340.
109. Kalimutho, M., A.L. Bain, B. Mukherjee, P. Nag, D.M. Nanayakkara, S.K. Harten, J.L. Harris, G.N. Subramanian, D. Sinha, S. Shirasawa, S. Srihari, S. Burma, K. Kum Khanna, *Enhanced dependency of KRAS-mutant colorectal cancer cells on RAD51-dependent homologous recombination repair identified from genetic interactions in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Oncology, 2017. **11**(5): p.470-490.
110. Braný, D., D. Dvorská, J. Strnádel, T. Matáková, E. Halsová, H. Skovierová, *Effect of Cold Atmospheric Plasma on Epigenetic Changes, DNA Damage, and Possibilities for Its Use in Synergistic Cancer Therapy*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(22): p.12252.
111. Schütz, C.S., M.B. Stope, S. Bekeschus, *H2A.X Phosphorylation in Oxidative Stress and Risk Assessment in Plasma Medicine*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021. **2021**: p.2060986
112. Gaur, N., H. Kurita, J.-S. Oh, S. Miyachika, M. Ito, A. Mizuno, A.J. Cowin, S. Allison, R.D. Short, E.J. Szili, *On cold atmospheric-pressure plasma jet induced DNA damage in cells*. Journal of Physics, 2020. **54**(3): p.5203.
113. Lee, J.-W., S.J. Han, H.Y. Kang, S.-S. Wi, M.-H. Jung, K.S. Kim, *On-off switching of cell cycle and melanogenesis regulation of melanocytes by non-thermal atmospheric pressure plasma-activated medium*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p.13400.
114. Lee, J.-W., K. Kim, M. Jung, Y. Kim, *Cell cycle regulation in human hair follicle dermal papilla cells using nonthermal atmospheric pressure plasma-activated medium*. Medicine, 2021. **100**(13): p.e25409.
115. Volotskova, O., T.S. Hawley, M.A. Stepp, M. Keidar, *Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma*. Scientific Reports, 2012. **2**: p.636.
116. Li, Y., Y. Qin, C. Yang, H. Zhang, Y. Li, B. Wu, J. Huang, X. Zhou, B. Huang, K. Yang, G. Wu, *Retraction Note: Cardamonin induces ROS-mediated G2/M phase arrest and apoptosis through inhibition in NF- κ B pathway in nasopharyngeal carcinoma*. Cell Death and Disease, 2019. **10**(4): p.289
117. Yan, X., F. Zou, S. Zhao, X. Lu, G. He, Z. Xiong, *On the Mechanism of Plasma Inducing Cell Apoptosis*. IEEE Transactions on Plasma Science, 2010. **38**(9): p.2451-2457.
118. Han, S., H. Shin, J.-K. Lee, Z. Liu, R. Rabadan, J. Lee, J. Shin, C. Lee, H. Yang, D. Kim, S.H. Kim, J. Kim, J.-W. Oh, D.-S. Kong, J.-I. Lee, H.J. Seol, J.W. Choi, H.J. Kang, D.-H. Nam, *Secretome analysis of patient-derived GBM tumor spheres identifies midkine as a potent therapeutic target*. Experimental and Molecular Medicine, 2019. **51**(12): p.1-11.
119. Becker, L., N. Janssen, S.L. Layland, T.E. Mürdter, A.T. Nies, K. Schenke-Layland, J. Marzi, *Raman Imaging and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*

- for Diagnosis of Cancer State and Metabolic Monitoring. *Cancers*, 2021. **12**(22): p.5682.
120. Ouyang, Y., Y. Liu, Z.M. Wang, Z. Liu, M. Wu, FLIM as a Promising Tool for Cancer Diagnosis and Treatment Monitoring. *Nono-Micro Letters*, 2021. **13**(1): p.133.
 121. Heikal, A.A., *Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies*. *Biomarkers in Medicine*, 2010. **4**(2): p.241-263.
 122. Zbinden, A., D.A. Carvajal Berrio, M. Urbanczyk, S.L. Layland, M. Bosch, S. Fliri, C.-E. Lu, A. Jeyagaran, P. Loskill, G.P. Duffy, K. Schenke-Layland, *Fluorescence lifetime metabolic mapping of hypoxia-induced damage in pancreatic pseudo-islets*. *Journal of Biophotonics*, 2020. **13**(12): p.e20200375
 123. Blacker, T.S., M.R. Duchon, *Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2016. **100**: p.53-65.
 124. Stringari, C., J.L. Nourse, L.A. Flanagan, E. Gratton, *Phasor fluorescence lifetime microscopy of free and protein-bound NADH reveals neural stem cell differentiation potential*. *PLOS ONE*, 2012. **7**(11): p.e48014.
 125. Klaidman, L.K., A.C. Leung, J.D Adams Jr, *High-performance liquid chromatography analysis of oxidized and reduced pyridine dinucleotides in specific brain regions*. *Analytical Biochemistry*, 1995. **228**(2): p.312-317.
 126. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. *Science*, 1956. **123**(3191): p.309-314.
 127. Levitt, J.M., A. Baldwin, A. Papadakis, S. Puri, J. Xylas, K. Münger, I. Georgakoudi, *Intrinsic fluorescence and redox changes associated with apoptosis of primary human epithelial cells*. *Journal of Biomedical Optics*, 2006. **11**(6): p.4012.
 128. Ishikawa, M., D. Tsuchiya, T. Oyama, Y. Tsunaka, K. Morikawa, *Structural basis for channelling mechanism of a fatty acid beta-oxidation multienzyme complex*. *The EMBO Journal*, 2004. **23**(14): p.2745-2754.
 129. Wang, Y., R. Wu, K.R. Cho, K.A. Shedden, T.J. Barder, D.M. Lubman, *Classification of cancer cell lines using an automated two-dimensional liquid mapping method with hierarchical clustering techniques*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2006. **5**(1): p.43-52.
 130. Alturkistany, F., K. Nichani, K.D. Houston, J.P. Houston, *Fluorescence lifetime shifts of NAD(P)H during apoptosis measured by time-resolved flow cytometry*. *Cytometry A*, 2018. **95**(1): p.70-79.
 131. Hitomi, K., L. DiTacchio, A.S. Arvai, J. Yamamoto, S.-T. Kim, T. Todo, J.A. Tainer, S. Iwai, S. Panda, E.D. Getzoff, *Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(17): p.6962-6967.
 132. Ueda, T., A. Kato, Y. Ogawa, T. Torizawa, S. Kuramitsu, S. Iwai, H. Terasawa, I. Shimada, *NMR study of repair mechanism of DNA photolyase by FAD-induced paramagnetic relaxation enhancement*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(50): p.52574-52579.
 133. Wang, Y., J. Palmfeldt, N. Gregersen, A.M. Makhov, J.F. Conway, M. Wang, S.P. McCalley, S. Basu, H. Alharbi, C. St. Croix, M.J. Calderon, S. Watkins, J. Vockley, *Mitochondrial fatty acid oxidation and the electron transport chain comprise a multifunctional mitochondrial protein complex*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019. **294**(33): p.12390-12391.

134. Kaushik, N., N. Uddin, G.B. Sim, Y.J. Hong, K.Y. Baik, C. H. Kim, S.J. Lee, N.K. Kaushik, E.H. Choi, *Responses of solid tumor cells in DMEM to reactive oxygen species generated by non-thermal plasma and chemically induced ROS systems*. Scientific Reports, 2015. **5**: p.8587.
135. Brüne, B., *Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON?*. Cell Death and Differentiation, 2003. **10**(8): p.864-869.
136. Okkelman, I.A., D.B. Papkovsky, R.I. Dmitriev, *Estimation of the Mitochondrial Membrane Potential using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*. Cytometry, 2020. **97**(5): p.471-482.
137. Cook, S.A., P.H. Sugden, A. Clerk, *Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential*. Circulation Research, 1999. **85**(10): p.940-949.
138. Ahn, H.J., K.I. Kim, N.N. Hoan, C.H. Kim, E. Moon, K.S. Choi, S.S. Yang, J.-S. Lee, *Targeting cancer cells with reactive oxygen and nitrogen species generated by atmospheric-pressure air plasma*. PLOS ONE, 2014. **9**(1): p.86173.
139. Sun, M.G., J. Williams, C. Munoz-Pinedo, G.A. Perkins, J.M. Brown, M.H. Ellisman, D.R. Green, T.G. Frey, *Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis*. Nature Cell Biology, 2007. **9**(9): p.1057-1065.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Department für Frauengesundheit Tübingen in der AG Schenke-Layland sowie am NMI Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen in Reutlingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Katja Schenke-Layland durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Martin Weiss und mich.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Daniel Alejandro Carvajal Berrio, Simone Liebscher, Sandro Fliri, Myriam Holl und Prof. Dr. Martin Weiss) von mir selbst durchgeführt.

Die Auswertung der Doppelstrangbruch- und Zellzyklusuntersuchung erfolgte von mir in Supervision und mit Unterstützung von Myriam Holl. Bei der Auswertung der Ergebnisse der FLIM-Bildgebung und der TMRM-Färbung wurde ich von Daniel Alejandro Carvajal Berrio unterstützt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig, nach Rücksprache mit Prof. Dr. Martin Weiss, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 17. Oktober 2025

Franziska Elena Oelkrug

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu Beginn möchte ich meinen Dank den Mitgliedern der AG Schenke-Layland aussprechen. Ein besonderer Dank gilt Daniel Alejandro Carvajal Berrio, der mich bei der Auswertung und statistischen Analytik betreute. Ebenso danke ich Myriam Holl, die mich bei den Versuchen im NMI unterstützte. Auch möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Katja Schenke-Layland bedanken.

Einen großen Dank spreche ich Franziska Keßler aus, die bei Fragen und Diskussionen stets wertvolle Ratschläge gab.

Des Weiteren gilt mein Dank in besonderer Weise Prof. Dr. Martin Weiss, welcher mir von Beginn an mit seiner Expertise zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Großvater bedanken, ohne die diese Arbeit, mein Studium und Werdegang nicht möglich gewesen wären.