



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

**Aus der Klinik für Augenheilkunde  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Salvatore Grisanti**

**Einfluss von oxidativem Stress auf den Metabolismus humaner retinaler  
Endothelzellen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von  
Justus-Satoshi Ernesti  
aus Marburg

Lübeck, 2025

Erstberichterstatter: Prof. Dr. med. Mahdy Ranjbar

Zweitberichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2026

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31.03.2026

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1 Der Augapfel als Rezeptororgan	2
2.2 Die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Retina	3
2.2.1 Äußere und innere Blut-Retina-Schranke	4
2.3 Molekulare Mechanismen der Angiogenese	6
2.3.1 <i>Sprouting</i> Angiogenese	7
2.3.2 Intussuszeptive Angiogenese	8
2.3.3 Regulation der Ligandenbindung von VEGFA an VEGFR2	9
2.4 Hypoxie induzierte molekulare Mechanismen	10
2.4.1 Kanonischer Signalweg der Anpassung an Hypoxie	11
2.5 Die mitochondriale Atmungskette	12
2.5.1 Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs durch reaktive Sauerstoffspezies	14
2.6 Altersbedingte Makuladegeneration	16
2.6.1 Retinale angiomatöse Proliferation	18
2.7 Erstlinientherapie und alternative Therapieoptionen bei AMD	20
2.7.1 Stereotaktische Radiotherapie bei nAMD	20
2.7.2 Die Auswirkungen von ionisierender Strahlung auf Zellen	21
2.7.3 Hyperbare Sauerstofftherapie in der Ophthalmologie	23
2.7.4 Physiologische Adaptation an HBOT	24
2.8 Fragestellung	26
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>27</b>
3.1 Material	27
3.2 Methoden	35
3.2.1 Kultivierung humaner retinaler mikrovaskulärer Endothelzellen	35
3.2.2 Zellernte und Zellyse in 8 M Urea Lysepuffer	35
3.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bio-Rad DC Protein Assay	36
3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
3.2.5 Western-Blot	37
3.2.6 Lipofektion von siRNA in HRMECs	39
3.2.7 ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Assay	40

3.2.8 Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay.....	44
3.2.9 Quantifizierung der Zellzahl mittels DAPI-Färbung in 8-Well $\mu$ -slides .....	46
3.2.10 <i>In-vitro</i> Zellmigrationsassay .....	49
3.2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration von sVEGFR1, PlGF und VEGFA mittels ELISA.....	51
3.2.12 Massenspektrometrische Analyse.....	51
3.2.13 Statistische Datenauswertung.....	54
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>58</b>
4.1 Sauerstoffabhängige Proteinstabilisierung von HIF1 $\alpha$ und HIF2 $\alpha$ .....	58
4.2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung in HRMECs nach HIF1 $\alpha$ - <i>knockdown</i> in Abhängigkeit von der Sauerstoffatmosphäre.....	59
4.3 Zeitabhängige Veränderung der Zellviabilität mit bzw. ohne HIF1 $\alpha$ -mRNA <i>knockdown</i> bei unterschiedlicher Sauerstoffatmosphäre .....	61
4.4 Vergleich des Proteoms von HRMECs bei verschiedenen Sauerstoffatmosphären .....	63
4.5 Zellzahlbestimmung nach Röntgenstrahlenbehandlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.....	69
4.6 Bestimmung der Zellviabilität nach Röntgenstrahlenbehandlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	70
4.7 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung nach Röntgenbestrahlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	71
4.8 Intrazelluläres Proteinlevel von HIF1 $\alpha$ und HIF2 $\alpha$ nach Röntgenstrahlenbehandlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.....	72
4.9 Zellmigration nach Röntgenbestrahlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	74
4.10 Intra- und extrazelluläres VEGFA, sVEGFR1 und PlGF nach Röntgenbestrahlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.....	75
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>79</b>
5.1 Einfluss von Hypoxie auf HRMECs .....	79
5.1.1 HIF1 $\alpha$ beeinträchtigt die Zellviabilität von hypoxischen Zellen nicht .....	80
5.1.2 Hypoxie hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellteilung, -migration oder die Sekretion von VEGFA oder sVEGFR1 .....	84
5.2 Einfluss von Hypoxie auf bestrahlte HRMECs .....	85
5.2.1 Einfluss der Strahlenbehandlung auf die Zellteilung und die Zellmigration von hypoxischen HRMECs.....	85
5.2.2 Ionisierende Strahlung induziert eine signifikante Zunahme der PlGF- und sVEGFR1-Sekretion.....	87

<b>5.3 Einfluss von Hyperoxie auf HRMECs</b>	<b>88</b>
5.3.1 In hyperoxischen HRMECs kommt es zu einer HIF1 $\alpha$ -Stabilisierung bei gleichzeitigem Anstieg von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	88
5.3.2 Hyperoxie beeinflusst die Zusammensetzung der mitochondrialen Elektronentransportkette in HRMECs .....	90
5.3.3 Die Hyperoxie beeinflusst die Zellviabilität – unabhängig von der HIF1 $\alpha$ -Proteinstabilisierung .....	94
5.3.4 Die Inkubation in Hyperoxie inhibiert die Zellmigration .....	95
<b>5.4. Einfluss von Hyperoxie auf bestrahlte HRMECs</b>	<b>96</b>
5.4.1 Welche Daten sprechen für eine Kombinationstherapie? .....	96
5.4.2 Welche Daten sprechen gegen die Kombinationstherapie? .....	99
<b>5.5 Konklusion und Ausblick</b>	<b>100</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>121</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>Anhang</b>	<b>124</b>
<b>Danksagung</b>	<b>140</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>141</b>

# 1. Zusammenfassung

Wenn das zentrale Sehen im höheren Lebensalter zunehmend nachlässt, kann eine Erkrankung der Makula vorliegen. Die retinale angiomatöse Proliferation (RAP) ist eine Sonderform der neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration (nAMD), bei der durch retinale Neovaskularisation (Typ 3) eine Schädigung der Netzhaut resultiert. Der Leidensdruck für Betroffene mit nAMD ist groß; Obwohl eine wirksame Therapie zur Verfügung steht, kann der Krankheitsprozess lediglich verlangsamt werden und unbehandelt zum totalen Sehverlust führen.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob sich klinisch etablierte Behandlungsverfahren wie die stereotaktische Radiotherapie (SRT), die hyperbare Sauerstofftherapie (HBOT) oder eine Kombination beider, auf retinale Endothelzellen *in vitro* günstig auswirken. Dazu wurden primäre humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen (HRMECs) nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung und/oder der Inkubation in einer hyperoxischen Umgebung untersucht. Da die Ätiologie der RAP mit chronischem Sauerstoffmangel im retinalen Gewebe assoziiert ist, wurden zudem hypoxische retinale Endothelzellen und wichtige Proteine des zellulären O<sub>2</sub>-Sensors einbezogen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Stabilisierung des Proteins *hypoxia-inducible factor 1α* (HIF1α) als Marker für den hypoxischen Zellzustand nicht nur bei Sauerstoffmangel, sondern auch nach der Inkubation in Hyperoxie nachweisbar ist. Der zugrundeliegende Mechanismus scheint auf oxidativen Stress zurückzuführen zu sein und mit der sauerstoffabhängigen Adaptation der mitochondrialen Elektronentransportkette zusammenzuhängen. Die paarweisen Vergleiche zwischen HRMECs, die bei 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden, belegen weitere sauerstoffabhängige Trends: Die Zellviabilität und die Zellmigration sanken mit ansteigendem Sauerstoffanteil, während die Bildung von Wasserstoffperoxid zunahm. Die höchsten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Werte wurden im Zellkulturmedium von hyperoxischen Zellen gemessen, die zuvor ionisierender Strahlung ausgesetzt wurden.

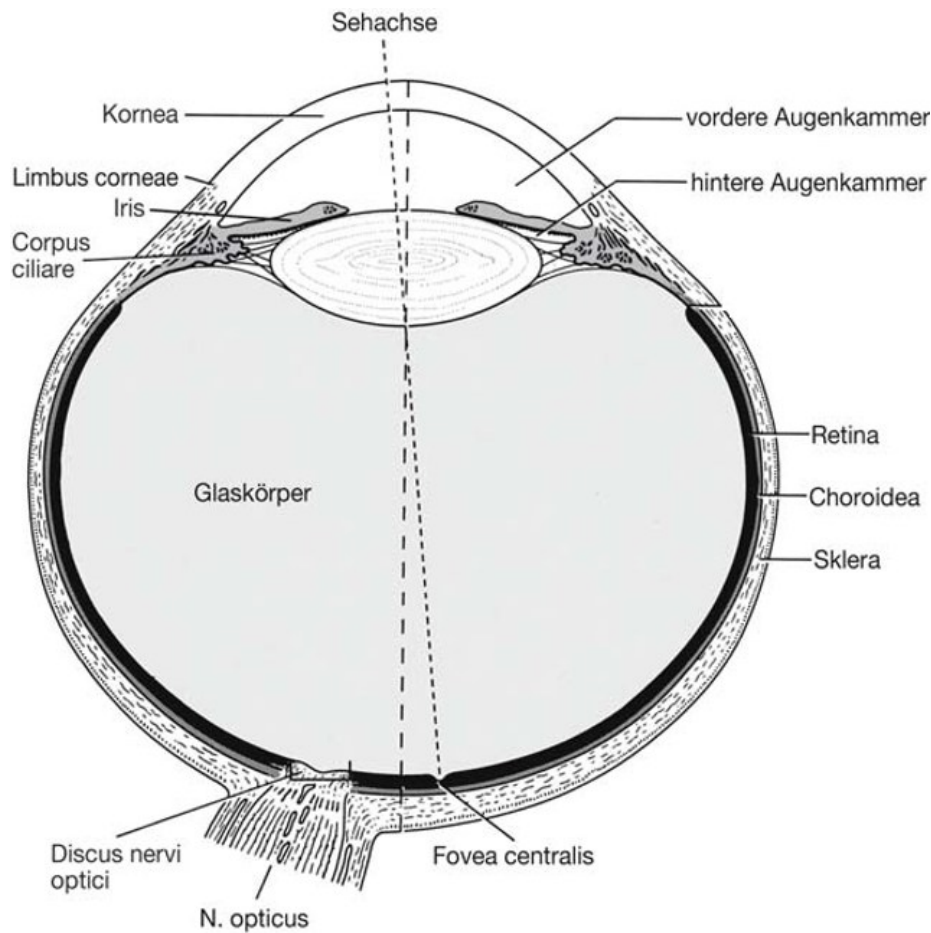
Die Zunahme von oxidativem Stress als zentraler Wirkmechanismus der Strahlentherapie spricht für die Kombination aus SRT und HBOT. Weiterführende Arbeiten könnten sich daher mit der Frage beschäftigen, ob eine geringere, nebenwirkungsärmere Strahlendosis der adjuvanten SRT bei einer gleichzeitigen Anwendung von HBOT ausreicht, um gleiche anti-angiogene Effekte zu erzielen.

## 2. Einleitung

Das Auge ist ein Lichtsinnesorgan und ermöglicht die Perzeption von sichtbarem Licht. Nach Anregung der Sinneszellen durch Photonen werden Nervenimpulse zur primären Sehrinde weitergeleitet, in der die Verarbeitung der Informationen stattfindet. Für diesen hochspezialisierten und energieintensiven Prozess wird eine Vielzahl unterschiedlicher Regulationsmechanismen benötigt, die das Auge zu einem komplexen Organ machen [1].

### 2.1 Der Augapfel als Rezeptororgan

Die äußerste Schicht des Augapfels besteht aus einer formgebenden Bindegewebsschicht, die als Lederhaut (Sklera) bezeichnet wird (Abbildung 2.1). Anterior, dringt das Licht durch die transparente Hornhaut (Kornea) in das Augeninnere. Die Hornhaut wird durch den Limbus cornea von der Sklera getrennt und stellt eine linsenähnliche Struktur dar, durch die das Licht in die vordere Augenkammer gelangt. Die Aderhaut (Chorioidea) grenzt an den Ziliarkörper (Corpus ciliare) und geht in die ringförmige Regenbogenhaut (Iris) über. Gemeinsam werden sie als Uvea bezeichnet. Das Licht fällt durch die kreisförmige Pupille und trifft in der hinteren Augenkammer auf die Linse, die über Zonulafasern mit den Ziliarmuskeln des Ziliarkörpers verbunden ist. Ein Wechselspiel aus Kontraktion und Relaxation der Ziliarmuskeln ermöglicht Formveränderungen der Linse und beeinflusst hierdurch ihre Brechkraft, wodurch das Licht fokussiert auf die Netzhaut (Retina), die innerste Schicht des Augapfels, treffen kann [1]. Ihre Funktion ergibt sich aus den eingelagerten Photorezeptoren, den Stäbchen und Zapfen, die die visuelle Wahrnehmung der Umwelt ermöglichen [2]. Trifft das fokussierte Licht in ausreichender Intensität auf die Rezeptorzellen werden Aktionspotentiale über Synapsen an weitere Nervenzellen weitergeleitet. Diese laufen an der Papille (Papilla nervi optici), dem Austrittsort der Nervenfasern, zusammen und bilden dort den Sehnerv (Nervus opticus). Hier befindet sich, neben der Eintritts- und Austrittsort der Zentralarterie, die die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der inneren Retinaschichten sichern. Da sich im Bereich der Papille keine Photorezeptoren befinden, wird einfallendes Licht in dieser Region nicht zu elektrischen Impulsen umgewandelt. Es entsteht ein namensgebender „blinder Fleck“ im entsprechenden Gesichtsfeld. Die Sehgrube (Fovea centralis) im Zentrum des Gelben Flecks (Macula lutea) gilt als Punkt des schärfsten Sehens [1]. Hier ist mit etwa 150.000 Zapfen pro Quadratmillimeter die größte Rezeptordichte im menschlichen Auge zu finden [2].



*Abbildung 2.1: Aufbau des Augapfels. N. opticus: Nervus opticus. Modifiziert nach Schieber et al. [1].*

## 2.2 Die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Retina

Zwei wesentliche Voraussetzungen müssen erfüllt sein, um die Funktionalität des Auges ohne Beeinträchtigung zu ermöglichen. Zum einen ist es für die Anregung der primären Photorezeptoren notwendig, dass fokussiertes Licht ungestört auf die Außensegmente der primären Sinneszellen treffen kann, zum anderen muss die Versorgung mit Sauerstoff und Metaboliten in alle Regionen der Retina gewährleistet sein. Ein grundsätzliches Problem sind somit die Blutgefäße. Die sauerstofftransportierenden Erythrozyten enthalten Hämoglobin, welches das Licht absorbiert und auf diese Weise die Anregung der Photorezeptoren behindert. Um diese unerwünschte Wechselwirkung zu vermeiden, ist die Retina im Bereich des Außensegments der Photorezeptoren frei von Blutgefäßen [3]. Dies macht sich besonders in der Sehgrube, dem Zentrum des schärfsten Sehens im gelben Fleck, bemerkbar.

In dieser avaskulären Zone findet eine Verlagerung der retinalen Strukturen über dem Photorezeptor-Außensegment an den Rand der Sehgrube statt. Störende Strukturen, die mit dem Licht in Wechselwirkung treten könnten, sind somit minimiert [4]. Demgegenüber steht allerdings der hohe Energiebedarf der Retina, welcher im Wesentlichen auf dem enormen Adenosintriphosphat (ATP)-Umsatz der primären Photorezeptoren zurückzuführen ist [5, 6]. Die Versorgung der Retina mit Nährstoffen bzw. Sauerstoff bei gleichzeitigem Fehlen von Blutgefäßen in den tieferen Schichten stellt eine grundsätzliche Herausforderung dar, die durch die Systeme der äußeren und inneren Blut-Retina-Schranke (BRS) gelöst wird [3].

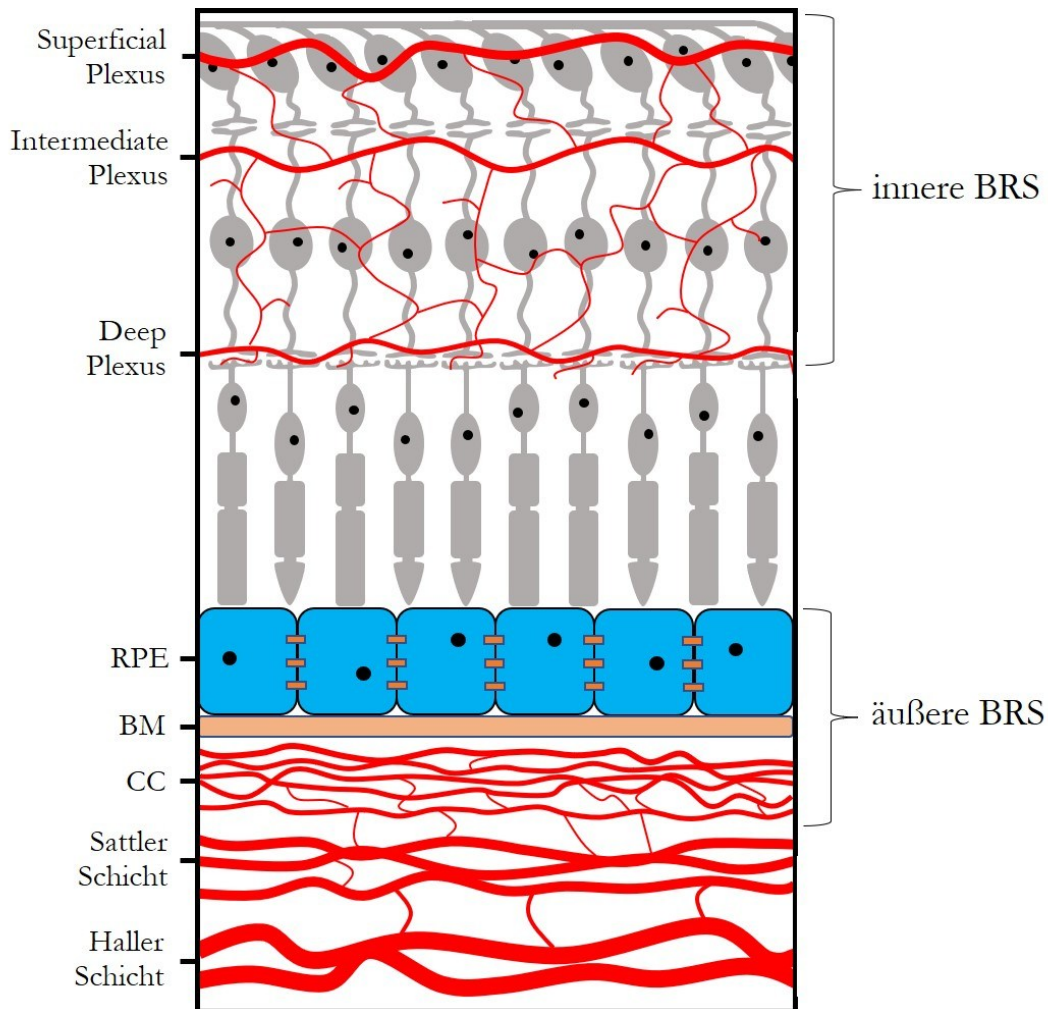
### **2.2.1 Äußere und innere Blut-Retina-Schranke**

Die äußere BRS besteht aus drei Komponenten, die zusammen den kontrollierten Austausch von Metaboliten und Sauerstoff ermöglichen. Hierzu gehören die Choriocapillaris der Aderhaut, die Basalmembran (BM) sowie die retinalen Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen) aus dem Stratum pigmentosum [7]. Abbildung 2.2 stellt die äußere und innere BRS schematisch dar. Das Choroid lässt sich in Abhängigkeit von Größe und Dichte ihrer Blutgefäße in mehrere Schichten unterteilen. In der Lamina suprachoroidea, der äußersten Schicht des Choroids, verlaufen die größeren Gefäße und Nerven des Augapfels in Richtung des Ziliarkörpers und der Iris [1]. Darunter liegen zwei vaskuläre Schichten (Haller- und Sattler-Schicht). Während die Haller-Schicht große Arterien und Venen beinhaltet, besteht die darunterliegende Sattler-Schicht aus mittleren und kleinen Arteriolen. Ihre Aufgabe ist die Versorgung des Kapillarnetzwerks nahe der Retina, der sogenannten Choriocapillaris (CC). Das dichte Netz aus fenestrierten Kapillaren zeichnet sich durch eine hohe Permeabilität für Proteine sowie Makromoleküle aus und unterscheidet sich auf diese Weise deutlich von den verschlossenen mikrovaskulären Kapillaren der inneren BRS [8]. Ein weiteres Element der äußeren BRS ist die BM. Als extrazelluläre Matrix trennt sie zusammen mit den RPE-Zellen die Aderhaut von der Netzhaut. Sie setzt sich aus mehreren Schichten zusammen, deren Hauptkomponenten verschiedene Kollagene sowie weitere extrazelluläre Faktoren wie Laminin, Fibronectin, Elastin und unterschiedliche Lipoproteine sind [9]. Zu ihren Eigenschaften gehört, dass sie als Barriere fungieren und ein dichtes Netzwerk spannen, das die Passage von größeren Molekülen verhindert. Sauerstoff, Elektrolyte, Nährstoffe sowie Zytokine können hingegen durch die Schichten diffundieren. Umgekehrt gelangen metabolische Abfallprodukte aus der Retina, speziell von Photorezeptoren und den aufliegenden RPE-Zellen, in die Choriocapillaris, wo der Abtransport für weiterführende Abbauprozesse stattfindet [7].

Die Regulation durch die RPE-Zellen geschieht mittels dichter Zell-Zell-Verbindungen aus einer Vielzahl von *Tight Junctions*, die Diffusion zwischen den Epithelzellen verhindern. Der parazelluläre Transport ist somit auf die semi-selektiven *Tight Junctions* und die bestehenden elektrochemischen Gradienten beschränkt [10].

Im Gegensatz zu der Choriocapillaris sind an der inneren BRS intraretinale Kapillaren beteiligt, die große Teile der inneren Retina mit Nährstoffen versorgen (Abbildung 2.2). Sie setzen sich aus vaskulären Netzwerken zusammen, die durch die weitläufige Verzweigung aus der Zentralarterie des Auges entstehen. Die Arteriolen des Superficial Plexus sind im Gegensatz zu tieferliegenden vaskulären Verzweigungen durch die Ummantelung von Astrozyten und Müller Zellen zusätzlich stabilisiert und geschützt. Arteriolen des Intermediate Plexus und Deep Plexus hingegen sind ausschließlich von Müller Zellen umgeben. Gemeinsam bilden Astrozyten und Müller Zellen eine Barriere zwischen den retinalen Arteriolen und dem umliegenden Gewebe [7]. Hinzu kommt, dass die Zell-Zell Verbindungen im Gegensatz zu der fenestrierten Choriocapillaris durch eine Vielzahl von *Tight Junctions*, *adherens junctions*, *gap junctions* und Desmosomen eng miteinander verbunden sind. Der Transport von Molekülen aus dem Blut in die Retina und *vice versa* erfolgt daher hauptsächlich über transzelluläre Mechanismen [11].

Pathologische Prozesse, die die Barrierefunktion der retinalen Blutgefäße stören, können Netzhautschäden auslösen. Eine häufige Ursache ist der Sauerstoffmangel durch die Minderdurchblutung retinaler Arteriolen, die im hypoxischen Gewebe die Freisetzung proangiogener Faktoren auslöst. Als Folge kann es zu einer Neovaskularisation der intraretinalen Arteriolen kommen. Die Neubildung dieser instabilen und durchlässigen Blutgefäße ruft im schlimmsten Fall exzessive Einblutungen hervor [12]. Auf molekularer Ebene finden in diesem Prozess eine Reihe von komplexen Proteininteraktionen statt, die in den folgenden Abschnitten genauer erläutert werden.



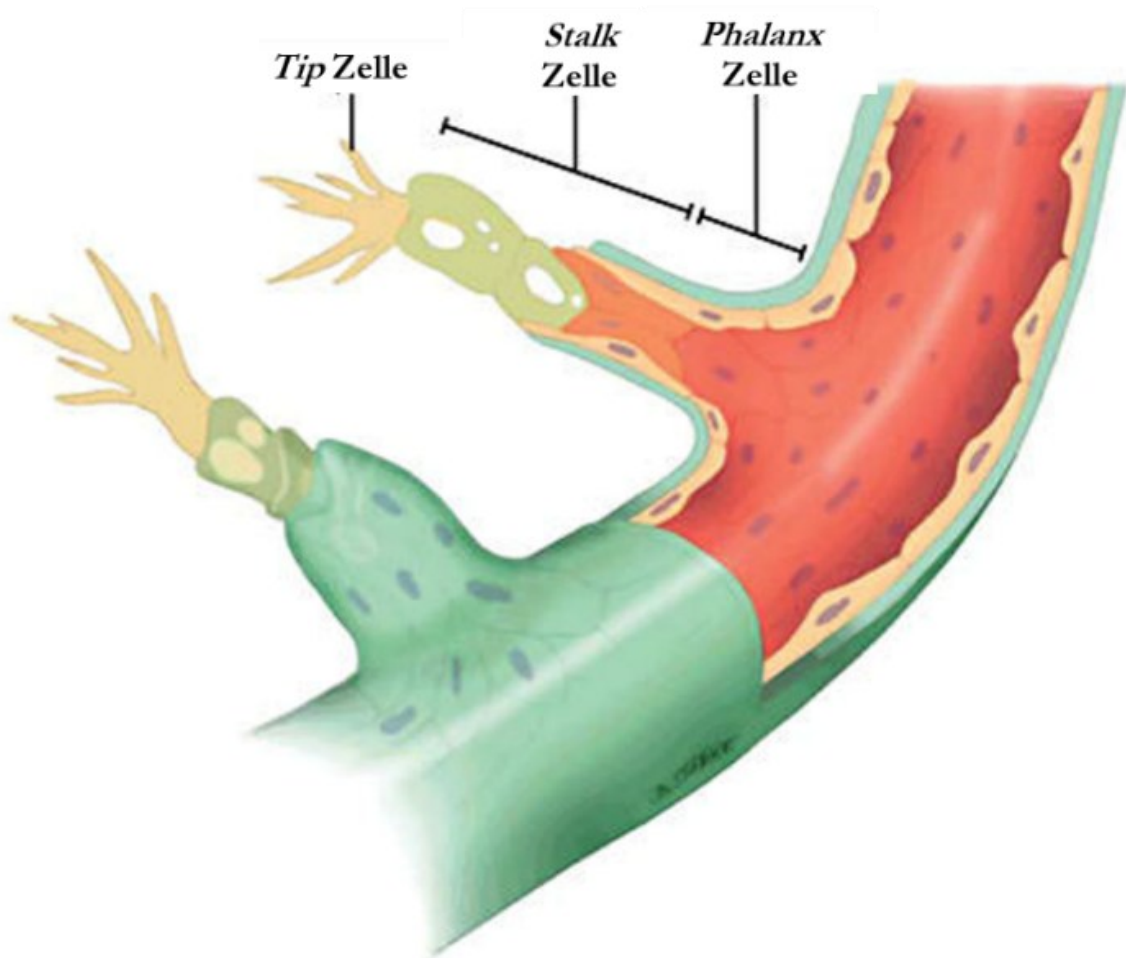
**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der funktionalen Komponenten der inneren und äußeren BRS.** Die Haller- und Sattler-Schicht im Choroid versorgt die CC mit Nährstoffen. Die CC bildet mit der BM und dem RPE die äußere BRS. Die innere BRS wird durch ein feines Netzwerk aus intraretinalen Kapillaren gebildet, deren Ebenen als Deep Plexus, Intermediate Plexus und Superficial Plexus bezeichnet werden. BM: Basalmembran, BRS: Blut-Retina-Schranke, CC: Choriocapillaris, RPE: retinales Pigmentepithel.

### 2.3 Molekulare Mechanismen der Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Entwicklung und das Wachstum von Blutgefäßen. Sie tritt unter physiologischen Bedingungen z.B. bei der Wundheilung oder während der Embryonalentwicklung auf, spielt aber auch bei diversen Tumorerkrankungen oder chronischen Entzündungen eine wichtige Rolle. Nach aktuellem Konsens sind zwei Typen der Angiogenese bekannt, deren zugrundeliegender Mechanismus die Erweiterung des Kapillarnetzwerks induzieren: die *sprouting* Angiogenese (SA) und die intussuszeptive Angiogenese (IA) [13].

### 2.3.1 *Sprouting* Angiogenese

Die SA ist ein mehrstufiger und hochgradig koordinierter Prozess, der durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren ausgelöst wird. Einer der wichtigsten proangiogenen Wachstumsfaktoren ist der *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA) [14]. Als Ligand bindet VEGFA an dem VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) und aktiviert die Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Infolgedessen werden proangiogene Signalkaskaden aktiviert [15]. Im Laufe des SA-Initiationsprozesses kommt es nach der Aktivierung durch die VEGFA-VEGFR2-Interaktion zu einer Differenzierung der Endothelzellen in Tip-Zellen, Stalk-Zellen und Phalanx-Zellen, die sich durch verschiedene Proteinexpressionsmuster unterscheiden (Abbildung 2.3) [14].



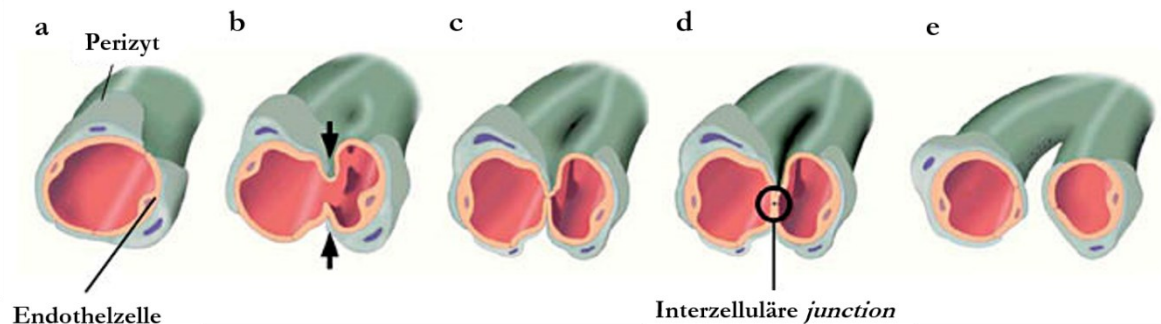
**Abbildung 2.3: Zelldifferenzierung während der sprouting Angiogenese.** Als Reaktion auf ansteigende Gradienten verschiedener Wachstumsfaktoren differenzieren Endothelzellen zu Tip-Zellen, Stalk-Zellen und Phalanx-Zellen aus. Mit unterschiedlichen Proliferations- und Migrationseigenschaften stellen sie die Strukturen dar, aus denen im weiteren Verlauf der SA neue Blutgefäße heranreifen. Modifiziert nach De Spiegelaere et al. [16].

Die Tip-Zellen migrieren als VEGFR2-geführte Sensoren entlang steigender VEGFA-Gradienten. Die Differenzierung zu einer Tip-Zelle ist ein dynamischer Prozess, der abhängig von lokalen VEGFA-Konzentrationen sowie dem individuellen Expressionslevel von VEGFR1, VEGFR2 und VEGFR3 ist [14, 17]. Morphologisch zeichnen sich Tip-Zellen durch eine Vielzahl von Filopodia aus, die maßgeblich an der Zellmigration entlang chemotaktischer Signale beteiligt sind [18]. Die umliegenden Endothelzellen hingegen differenzieren infolge eines inter- bzw. intrazellulären Regulationsmechanismus zu sogenannten Stalk-Zellen. Sie zeichnen sich durch eine gesteigerte Proliferationsrate und hohe VEGF1-Expression aus. Es folgen weitere Reifungsprozesse wie die Tubulogenese und die Bildung von einer Basalmembran. Anschließend transformieren die Stalk-Zellen zu sogenannten Phalanx-Zellen. Diese proliferieren langsamer und entsprechen als Monolayer mit dichten Tight Junction zunehmend stabilen Kapillarwänden, die in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus verbleiben [14].

### **2.3.2 Intussuszeptive Angiogenese**

Im Gegensatz zur *sprouting* Angiogenese werden in der IA bereits ausgebildete Kapillargefäße durch eine koordinierte Umstrukturierung der Gefäßwand geteilt. Der Teilungsprozess beginnt mit der Migration von gegenüberliegenden Endothelzellen aufeinander (Abbildung 2.4). Nach dem ersten Zellkontakt kommt es durch die Reorganisation der Gefäßwand zur Ausweitung der neuen endothelialen Verbindung und der Bildung einer interzellulären Junction. Parallel dazu perforiert die Gefäßwand und ermöglicht es Zellen wie Fibroblasten und Perizyten in die freigewordene Lücke vorzudringen. Diese erzeugen durch die Sekretion von Kollagenfibrillen sowie weiterer Komponenten die ummantelnde Basalmembran der Gefäßwand. Die Fusion mehrerer Areale mit interzellulären Junctions und der Perforation entsprechender Bereiche ermöglicht die Spaltung des initialen Gefäßes in zwei nebeneinandergeschaltete Strukturen [16].

Wie schon bei der SA konnte nachgewiesen werden, dass der Wachstumsfaktor VEGFA einen wesentlichen Treiber der IA ist. Dies stellten Ali *et al.* mittels *gain-* und *loss-of-function*-Modellen bei Zebrafischen und der Analyse primärer menschlicher Choriocapillaris-Endothelzellen fest [19]. Sie führten die IA-Beteiligung bei der Hypoxie-induzierten pathologischen vaskulären Umstrukturierung auf die *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 $\alpha$ -VEGFA-VEGFR2-Signalkaskade zurück (Abschnitt 2.4) [19].



**Abbildung 2.4: Schematische Darstellung einer intussuszeptiven Angiogenese.** Die gegenüberliegenden Gefäßwandareale der abgebildeten Endothelzelle migrieren aufeinander zu (a, b). Der primäre Zell-Zell Kontakt (c) wird durch die Reorganisation und einer fortlaufenden Zellmigration zu einer interzellulären Junction (d). Die gleichzeitige Perforation der Gefäßwand, die Fusion weiterer interzellulärer Junctions und die Migration von Perizyten führen schließlich zur Bildung von zwei unabhängigen Strukturen (e). Modifiziert nach De Spiegelaere et al. [16].

### 2.3.3 Regulation der Ligandenbindung von VEGFA an VEGFR2

Wie bereits in Abschnitt 2.3.1 und Abschnitt 2.3.2 beschrieben wurde, spielen die VEGF-Proteine und deren Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Neubildung von Blutgefäßen. Vor allem zur SA liegen umfangreiche Daten vor, die ein genaues Bild des zugrundeliegenden Mechanismus zeichnen und in einer Übersichtsarbeit von Lee *et al.* zusammengetragen wurden [20]. In den zellulären Prozessen der SA sind einige Proteine aus der VEGF-Gruppe und deren Rezeptoren als zentrale Schaltstellen beteiligt. Hierzu gehören die Liganden VEGFA und *placental growth factor* (PlGF), die mit unterschiedlicher Affinität an Proteine der VEGF-Rezeptorfamilie binden (VEGFR1, VEGFR2 und VEGFR3) [20].

Während der SA bindet VEGFA an VEGFR2 potenzieller Tip-Zellen und aktiviert eine proangiogene Signalkaskade [20]. Demgegenüber steht die induzierte Expression von VEGFR1 in Stalk-Zellen. Trotz der starken Homologie zur VEGFR2-Kinasedomäne (70,1 %) findet bei VEGFR1 nach Bindung des Liganden lediglich eine geringe enzymatische Aktivität der intrazellulären Kinasedomäne statt [21]. Die Bindungsaffinität von VEGFA an den Rezeptor ist sowohl in seiner membrangebundenen (*membrane-bound* VEGFR1, mVEGFR1) als auch sekretierten (*soluble* VEGFR1, sVEGFR1) Form 10-mal höher als bei VEGFR2 [22, 23]. Diese Eigenschaften machen den Rezeptor zu einem Inhibitor der VEGFA-VEGFR2 Interaktion. VEGFA wird durch die erhöhte Expression von VEGFR1 häufiger „abgefangen“. Das Protein trägt somit als Decoy-Rezeptor zur Regulation der VEGFR2-Signalkaskaden bei. Während mVEGFR1 die Angiogenese über weitere Mechanismen reguliert, ist bei sVEGFR1 ohne zytoplasmatische oder transmembrane

Domäne ausschließlich der Decoy-Effekt, also die Ligandenbindung mit hoher Affinität ohne Signalweiterleitung, bekannt [20].

Im Gegensatz zu VEGFA können dem Wachstumsfaktor PlGF aus der VEGF-Proteinfamilie keine eindeutigen pro- oder antiangiogenen Eigenschaften zugeordnet werden. Vielmehr scheint das Protein eine regulatorische Funktion zu haben, die womöglich auf die Interaktion mit VEGFR1 als PlGF-Homodimer [24, 25] und der Bildung von Heterodimeren mit VEGFA zurückzuführen sind [26, 27]. VEGFA und PlGF können, in derselben Zelle exprimiert, Heterodimere bilden und auf diese Weise die Konzentration von homodimeren VEGFA regulieren [28]. Gleichzeitig beeinflussen die PlGF-VEGFA-Dimere den Zugang zu VEGFR2-Bindungsstellen, da sie ausschließlich an VEGFR1 binden können und somit die Bindungswahrscheinlichkeit für VEGFA-Homodimere an VEGFR2 erhöhen [29–31]. Die Bildung von Homo- und Heterodimeren gilt als mögliche Ursache für die widersprüchlichen Beobachtungen *in-vivo* [32].

## 2.4 Hypoxie induzierte molekulare Mechanismen

Aerobe Lebensformen benötigen Sauerstoff für eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Besonders während der Energieproduktion in der mitochondrialen Atmungskette spielt es eine zentrale Rolle. Chronischer Sauerstoffmangel führt daher zu schwerwiegenden Zellschäden und Organausfällen [33]. Der konvektive Transport von Sauerstoff im Körper findet über den Blutkreislauf statt. Ein überwiegender Teil des O<sub>2</sub> ist dabei an Hämoglobin gebunden. Ein deutlich kleinerer Anteil ist im Blutplasma physikalisch gelöst [33, 34]. Der physiologische Normalzustand der Zellen wird aufrechterhalten, indem der Sauerstoff aus den Arteriolen und Kapillaren in das umliegende Gewebe diffundiert. In Abhängigkeit des Zugangs zum kapillären Blutfluss und der metabolischen Aktivität der jeweiligen Zellen entstehen dadurch organspezifische Sauerstoffpartialdrücke (Physioxie) mit stark variierenden lokalen Abweichungen [33]. So wird aus einem Sauerstoffanteil von 21 % O<sub>2</sub> in der Atemluft nach Aufnahme in der Lunge ein Sauerstoffpartialdruck von 100 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) im Blut, was einem Sauerstoffanteil von 14 % O<sub>2</sub> entspricht. Während in Lunge, Leber und Niere ein Sauerstoffanteil von 4 % bis 14 % nachgewiesen wurde [35], zeigen Messungen an unterschiedlichen Regionen des Auges verschiedener Säugetiere deutlich geringere Werte (~0,5 – 4 % O<sub>2</sub>) [36, 37]. Die Sauerstoff-Diffusion setzt sich auf zellulärer Ebene fort und endet schließlich in den Mitochondrien, den Zellorganellen mit dem größten Sauerstoffverbrauch [38]. Obwohl die Sauerstoffkonzentrationen in allen Organen von dem

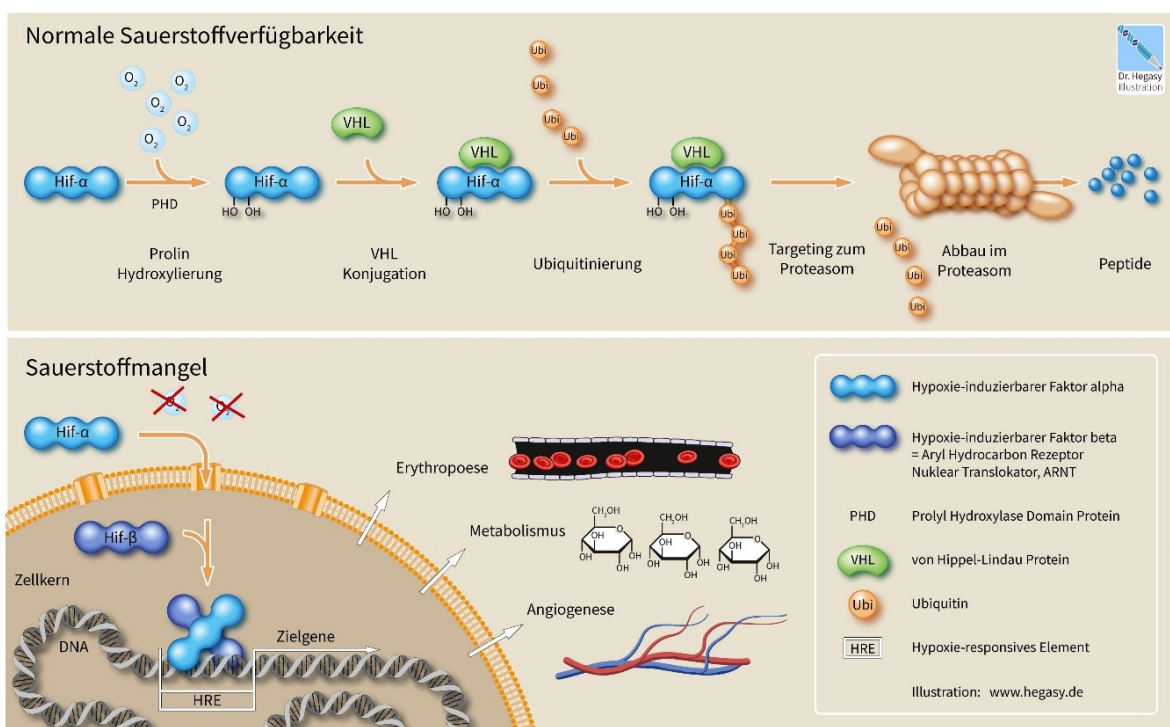
momentanen Energieverbrauch abhängen, sind die Zellen unter physiologischen Bedingungen normalerweise ausreichend versorgt. Dennoch kann es aus verschiedenen Gründen zu einer Unterversorgung des Gewebes kommen. Dazu gehört die Beschädigung der Atemwege, das Auftreten einer Ischämie oder ein Hämoglobinmangel [33].

#### 2.4.1 Kanonischer Signalweg der Anpassung an Hypoxie

Der Stoffwechselzustand mit einem stark begrenzten Sauerstoffangebot wird als Hypoxie bezeichnet [39]. Ein länger anhaltender Sauerstoffmangel führt in betroffenen Zellen auf molekularer Ebene zu einer umfangreichen Anpassung an die neuen pathophysiologischen Bedingungen. Die transkriptionelle Adaptation an den chronischen Sauerstoffmangel findet durch die Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs statt. Das HIF-Protein ist ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Es stellt als zentraler Transkriptionsfaktor den molekularen Hebel der zellulären Anpassung an hypoxische Bedingungen dar [40]. Aus der Gruppe der  $\alpha$ -Untereinheiten sind die zwei Isoformen HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  besonders relevant. Während HIF1 $\alpha$  in allen humanen Zellen exprimiert wird [41], sind die HIF2 $\alpha$ -Untereinheiten ausschließlich in Endothelzellen sowie hoch vaskularisiertem Gewebe nachgewiesen [42]. Die  $\beta$ -Untereinheit wird auch als Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor nuklearer Translokator (*aryl hydrocarbon receptor [AhR] nuclear translocator*, ARNT) bezeichnet und bindet an die unterschiedlichen Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit. Im Gegensatz zu HIF $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ ) ist die Expression von ARNT nur in wenigen Tumorzelllinien abhängig vom Sauerstoffgehalt der Zelle [43].

Der kanonische Hypoxie-Signalweg ist in Abbildung 2.5 illustriert. Unter physioxischen Bedingungen hydroxylieren die Prolyl-4-Hydroxylase-Proteine 1 bis 3 (*prolyl hydroxylase domain protein*, PHD 1-3) mindestens einen von zwei möglichen Prolinresten der  $\alpha$ -Untereinheiten durch einen Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Mechanismus [44, 45]. Die hydroxylierten Prolinreste werden von dem Von Hippel-Lindau Tumorsuppressor-Protein (VHL), einer E3 Ubiquitinligase erkannt. VHL bindet als Teil eines E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes mit seiner  $\beta$ -Domäne direkt an die hydroxylierte Region der HIF $\alpha$ -Untereinheit und markiert es für den Ubiquitin-Proteasom Abbauprozess [46, 47]. Tritt hingegen ein Sauerstoffmangel in der Zelle auf, führt dies zu einer Inhibierung der O<sub>2</sub>-abhängigen Hydroxylierungen. Die HIF $\alpha$ -Untereinheiten werden nicht mehr degradiert und gelangen über den Importin- $\alpha/\beta$  Transportweg in den Zellkern [48]. Dort Dimerisieren sie mit ARNT und binden an konservierten Sequenzen (RCGTG) in der Promotor Region der

HIF-regulierten Gene, den sogenannten *hypoxia-response elements* (HRE) [42, 49, 50]. Die Transkription der Zielgene wird nach Rekrutierung weiterer transkriptioneller Koaktivatoren wie *CREB-binding protein/adenovirus E1A-binding protein p300* (CBP/p300) induziert und ermöglicht die Adaptation der Zelle an die neue Sauerstoffumgebung [51]. Neben der sauerstoffabhängigen Regulation der HIF-Stabilisierung existieren zusätzlich nicht-kanonische Signalwege, die durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) in Mitochondrien aktiviert werden [52]. Die Entstehung von ROS wurde in mehreren Studien auf die Adaptation der mitochondrialen Elektronentransportkette bei Sauerstoffmangel zurückgeführt [52].

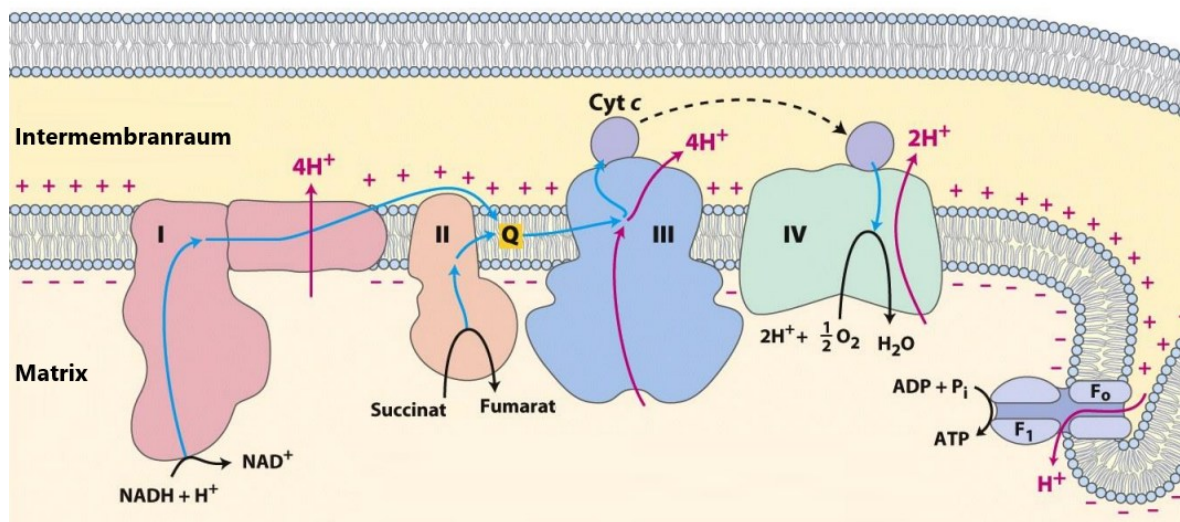


**Abbildung 2.5: Darstellung der HIF-Aktivierung.** Bei ausreichender Sauerstoffverfügbarkeit hydroxyliert PHD die HIF $\alpha$ -Untereinheiten. Hydroxyliertes HIF wird durch VHL, eine Ubiquitinligase, erkannt und für den proteasomalen Abbau ubiquitinyliert. Bei Sauerstoffmangel fehlen PHDs das notwendige  $O_2$  für die Hydroxylierung. Die HIF $\alpha$ -Untereinheiten werden nicht mehr von VHL erkannt und die Degradation des Proteins nicht induziert. Infolgedessen wird das stabile HIF in den Zellkern transportiert und bindet dort als Transkriptionsfaktor an HRE. Illustration von www.hegasy.de.

## 2.5 Die mitochondriale Atmungskette

Die Mitochondrien haben von allen Zellorganellen den größten Sauerstoffverbrauch. Dabei wird ein Großteil der  $O_2$ -Moleküle zur Generierung von ATP in biochemischen Prozessen der Atmungskette aufgewendet [53, 54]. Abbildung 2.6 stellt schematisch den Elektronentransport in den Mitochondrien dar. Die Atmungskette besteht aus vier

Enzymkomplexen, die durch Elektronentransporte einen Protonengradienten entlang der inneren Mitochondrienmembran aufbauen. Das entstehende Protonen-Ungleichgewicht schafft eine protonenmotorische Kraft, welche durch die ATP-Synthase für die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) genutzt wird (oxidative Phosphorylierung) [53]. Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) und Flavinadenindinucleotid (FADH<sub>2</sub>), eigentlich reduzierte Koenzyme aus der Glykolyse und dem Citratzyklus, liefern die dafür notwendigen Elektronen durch ihre Oxidation zu NAD<sup>+</sup> und FAD. Die Übertragung der Elektronen von NADH auf O<sub>2</sub> findet schrittweise über die NADH-Q-Oxidoreduktase (Komplex I), die Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) und die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) statt. Die Succinatdehydrogenase (Succinat-Q-Reduktase, Komplex II) führt weitere Elektronen durch die Oxidation von Succinat zu Fumarat und der Reduktion von FAD zu FADH<sub>2</sub> in die Elektronentransportkette ein. Von dort werden die Elektronen auf die Cytochrom-c-Oxidoreduktase übertragen. Obwohl Komplex I, II und III zu einer übergeordneten Struktur, dem Respirasom, zusammengesetzt sind, werden dennoch zwei spezifische Elektronencarrier (Coenzym Q und Cytochrom c) für den Transport zwischen den Komplexen benötigt.



**Abbildung 2.6: Aufbau der mitochondrialen Elektronentransportkette.** Die Atmungskette besteht aus vier Enzymkomplexen, die einen Protonengradienten entlang der inneren Mitochondrienmembran aufbauen. Die Elektronen gelangen in Komplex I und II durch die Oxidation von NADH und Succinat in die Elektronentransportkette. Während der Transport der Elektronen zu Komplex III über Q stattfindet, werden die Elektronen von Komplex III auf Komplex IV über Cyt c transportiert. Die frei gewordene Energie wird in den Protonenpumpen (Komplex I, III und IV) dazu genutzt, H<sup>+</sup> in den Intermembranraum zu pumpen. Der Protonengradient erzeugt eine protonenmotorische Kraft, die von der ATP-Synthase zur Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt wird. Modifiziert nach Lehninger Principles of Biochemistry [55]. ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, Cyt c: Cytochrom c, H<sub>2</sub>O: Wassermolekül, H<sup>+</sup>: Protonen, NADH: Nicotinamidadenindinucleotid, Q: Ubichinon.

Coenzym Q, auch als Ubichinon bezeichnet, ist hydrophob und kann durch die innere Mitochondrienmembran diffundieren. Dabei überträgt es Elektronen in seiner reduzierten Form von Komplex I und Komplex II auf Komplex III. Von der Cytochrom-c-Oxidoreduktase werden die Elektronen wiederum an Cytochrom c, ein hydrophiles Protein mit einem Häm als prosthetische Gruppe, weitergegeben. In Komplex IV findet schließlich die Reduktion von molekularem Sauerstoff als Endelektronenakzeptor zu Wasser statt [53].

### 2.5.1 Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs durch reaktive Sauerstoffspezies

Zum zellulären O<sub>2</sub>-Sensor gehört die Stabilisierung der HIF $\alpha$ -Untereinheiten durch mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (*mitochondrial reactive oxygen species*, mROS), die in der Elektronentransportkette als Nebenprodukte entstehen können. Eine Reihe von Publikationen zeigte, dass die Komplexe I, II, III und IV in der inneren Mitochondrienmembran eine zentrale Rolle bei der Bildung von mROS spielen [52].

#### NADH-Q-Oxidoreduktase (Komplex I)

Die NADH-Q-Oxidoreduktase ist eine Protonenpumpe aus 42 verschiedenen Polypeptidketten. Sie beinhaltet ein Flavinmononukleotid (FMN)-haltiges Flavoprotein als prosthetische Gruppe im aktiven Zentrum und mindestens sechs Eisen-Schwefel-Cluster [55]. Mehrere Studienergebnisse deuten daraufhin, dass FMN und die Eisen-Schwefel-Cluster an der Bildung von Superoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) beteiligt sind [56–58].

#### Succinatdehydrogenase (Succinat-Q-Reduktase, Komplex II)

Die Succinatdehydrogenase (SDH) besteht aus vier Proteinuntereinheiten (SDHA, B, C und D) mit insgesamt fünf prosthetischen Gruppen [59]. SDHA stellt die zytoplasmatische Domäne des Komplexes dar und beinhaltet das katalytische Zentrum zur Oxidation von Succinat zu Fumarat. Über ein kovalent gebundenes FAD, das infolge der Umsetzung von Fumarat zu FADH<sub>2</sub> reduziert wird, gelangen die Elektronen zur SDHB-Untereinheit mit drei Eisen-Schwefel-Clustern. In den Untereinheiten SDHC und SDHD findet schließlich die Übertragung auf Ubichinon statt und damit der Elektronentransport zu Komplex III [60]. Experimente an *Saccharomyces cerevisiae* wiesen die Coenzym-Q-Bindungsstelle als Hauptquelle für die Bildung von ROS aus [61, 62]. Paranagama *et al.* führte die Bildung von ROS in *Ascaris suum* auf das FAD und die Q-Bindungsstelle des Komplex II zurück [63]. Die Daten von Manhas *et al.* aus dem Jahr 2020 deuteten hingegen auf das [3FE-4S]-Eisen-

Schwefel-Cluster der SDHB-Untereinheit als primäre ROS-Quelle in isolierten Mitochondrien der Herzmuskelzellen von Meerschweinchen. Allerdings führte laut den Autoren die Inhibition der Q-Bindungsstelle sowie ein stark reduzierter Pool von Coenzym-Q zur Verschiebung der  $O_2^{\bullet-}$ -Produktion bevorzugt auf FAD [64].

#### Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III)

Die Q-Cytochrom-c-Oxidoreduktase ist ein Dimer aus gleichen Monomeren, die wiederum aus 11 verschiedenen funktionalen Untereinheiten zusammengesetzt sind. Während der Elektronenübertragung von Cytochrom c auf Coenzym Q entstehen kurzzeitig in Komplex III Semichinonradikale ( $Q^{\bullet-}$ ) [60]. Laut Bell *et al.* ist die Oxidationsstelle des  $QH_2$  ( $Q_0$ -Stelle) gleichzeitig auch Ort an dem ROS gebildet wurde. Anhand von Zellkulturexperimenten mit der humanen Osteosarkom-Zelllinie 143B bewiesen die Autoren zudem, dass die Bildung freier Sauerstoffspezies an der  $Q_0$ -Stelle eine Stabilisierung der HIF1 $\alpha$ -Untereinheit induziert [65].

#### Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)

Die Arbeitsgruppe rund um Thomas *et al.* führte in einer Übersichtsarbeit aus, dass die Hypoxie-induzierte Adaptation des Elektronentransfers (u.a. durch die verringerte Komplex IV-Aktivität) eine Übertragung des aufgenommenen Elektrons von  $Q^{\bullet-}$  auf Sauerstoffmoleküle begünstigt. Infolgedessen entstehen  $O_2^{\bullet-}$ -Radikale, die durch Superoxiddismutasen (SOD) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) katalysiert werden. Von einer Bildung von ROS in Komplex IV gehen die Autoren hingegen nicht aus [52].

Reaktive Sauerstoffspezies haben sich sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* als Regulatoren der HIF $\alpha$ -Proteinspiegel erwiesen. Die aktuelle Studienlage wurde von Bae *et al.* in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst [66]. Der Ablauf der ROS-vermittelten HIF-Stabilisierung wird unter anderem über die Oxidation von Aminosäureresten im PHD-Protein reguliert. Die Studie von Lee *et al.* belegte dies mit Daten, die die Aktivität der PHD-Proteine mit dem Redoxstatus der Zelle in Verbindung brachten [67]. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass oxidativer Stress die Oxidation eines Cysteins im PHD2-Protein, der primären HIF1 $\alpha$ -Hydroxylase, induzierte. Laut den Autoren führte dies zur Dimerisierung und Inaktivierung des Proteins, wodurch die Degradation des HIF-Proteins inhibiert wurde [67]. Weitere Belege zur Rolle von Wasserstoffperoxid trugen die Ergebnisse von Brunelle *et al.* bei [68]. Durch eine Überexpression von Proteinen in humanen Lungenepithelzellen, die am

Abbau von  $O_2^{\bullet-}$  zu  $H_2O_2$  und schließlich zu  $H_2O$  beteiligt sind, konnten die Autoren zeigen, dass Wasserstoffperoxid für die ROS-abhängige Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  notwendig ist [68].

Eine Reihe von Studien geben Aufschluss über die Auswirkungen der HIF-Signalkaskade auf die mitochondriale Aktivität. Fukuda *et al.* zeigten in HEK-293- und HeLa-Zellen, dass HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  die intrazelluläre ROS-Konzentration senkten, indem sie die Hypoxie-abhängige Adaptation von Komplex IV durch die Regulation der Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 4 (COX4) induzierten [69]. Laut Regueira *et al.* führten die induzierte Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  durch Cobalt(II)-chlorid ( $CoCl_2$ ) oder der Zugabe von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 zu einer Reduktion des mitochondrialen Sauerstoffverbrauch an den Komplex I, II und IV [70]. Fu *et al.* und Madhu *et al.* zeigten, dass die Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  die Induktion und die Translokation von Bcl-2/Adenovirus E1B 19kDa-interagierendes Protein 3 (BNIP3) in die Mitochondrien auslöst [71, 72]. Die Folge waren Mitophagien und die damit einhergehende Regulation der Mitochondrienzahl [71, 72]. Chan *et al.* untersuchte den HIF-abhängigen Anstieg von microRNA-210 bei chronischem Sauerstoffmangel in mehreren endothelialen Zelllinien [73]. Die Autoren konnten belegen, dass die Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern über microRNA-210 inhibiert und die oxidative Phosphorylierung eingeschränkt wurde [73]. Weitere komplexe Wechselwirkungen, die die Interaktion zwischen HIF1 $\alpha$  und der mitochondrialen Aktivität betreffen, wurden in einem Übersichtsartikel von Huang *et al.* zusammengetragen [74]. Die Autoren führten an, dass die Studienlage auf eine HIF1 $\alpha$ -vermittelte Adaptation an hypoxische Bedingungen hindeutet, die die Regulation der mitochondrialen Aktivität und des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs miteinschließt. Allerdings sind laut den Autoren weitere Studien notwendig, um die molekularen Mechanismen hinter der wechselseitigen Beziehung von Mitochondrien und HIF besser nachvollziehen zu können [74].

## **2.6 Altersbedingte Makuladegeneration**

Die Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine der häufigsten Ursachen für eine Erblindung bei Personen über 50 Jahren in Europa und Nordamerika [75]. Weltweit sind schätzungsweise 196 Millionen Menschen von AMD betroffen und allein in Deutschland kommen jährlich mehr als 30.000 Neuerkrankungen hinzu [75, 76]. Aufgrund der demographischen Entwicklung in den westlichen Ländern stellt die hierdurch bedingte

Sehbehinderung älterer Menschen ein stark zunehmendes Problem dar, das schon heute ein beträchtliches Ausmaß erreicht hat [77].

Die AMD ist eine progrediente, neurodegenerative Erkrankung der zentralen Netzhaut, des darunter befindlichen retinalen Pigmentepithels (RPE) sowie der Choriokapillaris. In den frühen und intermediären Stadien sind extrazelluläre Ablagerungen zwischen dem RPE und der Aderhaut, sogenannte Drusen, sowie Pigmentstörungen und morphologische Veränderungen des RPE typisch [78]. Entsprechend der *Age-Related Eye Disease Study* (AREDS) lässt sich der Krankheitsverlauf folgendermaßen klassifizieren [78]:

1. Keine AMD: Weniger als 5 kleine ( $< 63 \mu\text{m}$ ) Drusen.
2. Frühe AMD: Multiple kleine Drusen, einige mittelgroße ( $63\text{--}124 \mu\text{m}$ ) Drusen oder milde RPE-Veränderungen.
3. Intermediäre AMD: Beträchtliche Anzahl mittelgroßer Drusen, mindestens eine große ( $> 125 \mu\text{m}$ ) Druse oder geographische Atrophie (GA, flächige RPE-Atrophie) ohne Beteiligung der Fovea.
4. Fortgeschrittene AMD: GA mit Beteiligung der Fovea oder choroidale Neovaskularisation (CNV).

Bei fortgeschrittenen Krankheitsverläufen (Stufe 4) wird die späte AMD in zwei Gruppen unterteilt: trockene AMD bzw. GA und neovaskuläre AMD (nAMD). Etwa 80–90 % der AMD-Fälle, einschließlich der intermediären und späten GA-Stadien, gehören zur trockenen, atrophischen Form. Die trockene AMD schreitet langsam voran und zeichnet sich durch atrophe Bereiche in der Netzhaut aus, die sich im weiteren Krankheitsprozess vergrößern. Die nAMD ist hingegen mit der Neovaskularisation choroidaler Blutgefäße assoziiert. Die abnormalen und hämorrhagischen Gefäße aus der Aderhaut wachsen unter das retinale Pigmentepithel (RPE) oder durch dieses hindurch bis in die Retina. Die retinalen Blutungen und Pigmentepithelabhebungen (*pigment epithelial detachment*, PED) führen zur Schädigung der Photorezeptoren. Im Laufe der Zeit entstehen fibröse Narben, die zum totalen Sehverlust führen können [79].

Laut einer Übersichtsarbeit von Derveniz *et al.* ist die Ätiologie der CNV hauptsächlich auf lokale Inflammationen zurückzuführen, die infolge einer Schädigung des choroidalen Gefäßsystems durch die Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen entstehen [28]. Dies schafft ein proinflammatorisches Milieu, das die Rekrutierung von Immunzellen

fördert und mit der Entstehung von Drusenablagerungen einhergeht. Infolgedessen sekretieren Neutrophile, Makrophagen, Mastzellen und aktivierte Mikroglia eine Reihe von proangiogenen Faktoren, einschließlich VEGF, als molekulare Treiber der Neovaskularisation [28]. Basierend auf dem Ursprung des abnormalen Gefäßwachstums kann die nAMD in drei Subtypen unterteilt werden: Typ I und Typ II mit choroidalem Ursprung sowie Typ III, der als retinale angiomatöse Proliferation (RAP) bezeichnet wird und sich durch eine initial retinale Neovaskularisation auszeichnet [80].

### **2.6.1 Retinale angiomatöse Proliferation**

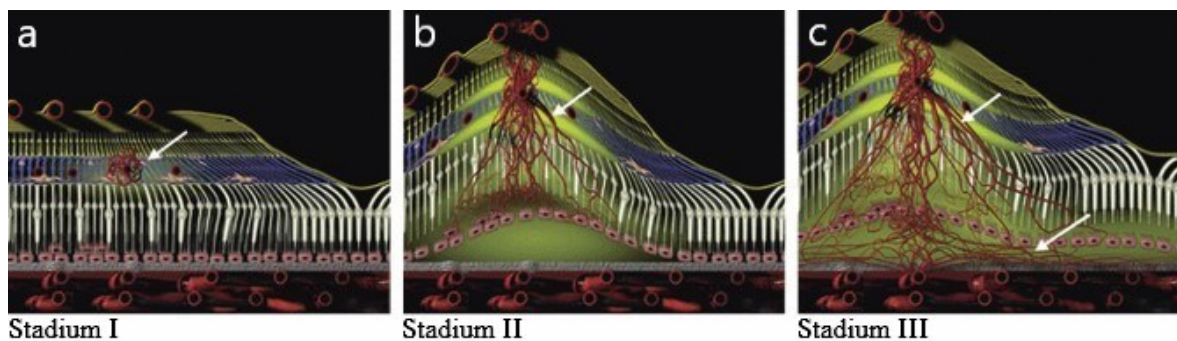
Die RAP ist eine exsudative Makulopathie, die als Untergruppe der nAMD je nach Studie 21–38 % der diagnostizierten nAMD-Fälle ausmacht [81–83]. Die Erkrankung tritt häufiger bei älteren Patienten auf (ca. 75 Lebensjahre) und betrifft überwiegend Frauen (ca. 90 % der Betroffenen) [84]. Im Vergleich zu den übrigen Formen der AMD geht sie auf eine Neovaskularisation der retinalen Blutgefäße zurück, die in den subretinalen Raum übergehen und eine chorioretinale Anastomose auslösen. Eine von Yannuzzi *et al.* im Jahr 2001 vorgeschlagene Klassifizierung des Krankheitsprogresses wird noch heute genutzt und teilt die RAP in drei Stadien ein (Abbildung 2.7) [85]:

- Stadium 1: Intraretinale Neovaskularisation: Proliferation von intraretinalen Kapillaren, die ihren Ursprung im *Deep Plexus* der Netzhaut haben [85].
- Stadium 2: Subretinale Neovaskularisation: Wachstum der retinalen Blutgefäße in den subretinalen Raum. Die Folge sind präretinale und intraretinale Ödeme sowie PEDs, die eine frühe klinische Manifestation des Krankheitsprozesses darstellen [85].
- Stadium 3: Klinische oder angiographisch-detektierbare CNV mit chorioretinaler Anastomose [85].

Unbehandelt weist die RAP einen besonders schnellen und schweren Krankheitsverlauf auf. So zeigten Viola *et al.* in einer prospektiven Studie, dass die Krankheitsprogression bei den untersuchten RAP-Patienten zu einer schweren Sehbehinderung innerhalb von 3 Monaten bis zu einem Jahr führte. Bei 13 von 16 Augen (81 %) verschlechterte sich die Sehschärfe bis zur Kontrolluntersuchung nach 6 Monaten um  $\geq 2$  Linien in der *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*-Sehschärfetafel (ETDRS). 31 % der Patienten erlitten einen schweren Sehverlust (6 oder mehr Linien gemäß EDTRS). Nur in 19 % der Augen blieben die vaskulären Schäden auf ein extrafoveales Areal begrenzt, sodass im

Nachbeobachtungszeitraum ein stabiler klinischer Verlauf vorlag [87]. Wie bei den anderen Formen der AMD ist die intravitreale operative Medikamentengabe (IVOM) von Anti-VEGFA-Präparaten die empfohlene Erstlinientherapie, deren Behandlung auch bei RAP-Patienten gut belegt ist, aber den Krankheitsprozess lediglich verlangsamt. So bestätigte die Analyse von Huang *et al.* eine vergleichbare Wirksamkeit von Aflibercept, einem Anti-VEGF-Fusionsprotein, bei Patienten mit RAP vs. Patienten mit nAMD-Typ I oder II [88].

Die Ätiologie der Erkrankung ist Gegenstand aktueller Forschung und konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Mögliche Mechanismen wurden in der Übersichtsarbeit von Clemens *et al.* diskutiert [89]. Nach Auffassung der Autoren gibt es Hinweise darauf, dass eine Insuffizienz der Choriokapillaris Bestandteil des Pathomechanismus der RAP sein kann [89, 90]. Mehrere Arbeitsgruppen postulierten außerdem, dass ein Ungleichgewicht zwischen VEGF und weiteren, an der apikalen Seite der RPE-Zellen freigesetzten angiogenen Faktoren die Entwicklung der RAP begünstigen können [91, 92]. Auch eine übergeordnete Rolle des HIF-Signalwegs wird diskutiert. Qiang *et al.* wiesen darauf hin [93], dass in RAP-Läsionen und den umliegenden Zellen eine hohe VEGF-/HIF-Expression vorliegt [94], während die Expression von sVEGFR1 vermindert ist [95]. Darüber hinaus zeigten retinaspezifische VHL-*knockout*-Mausmodelle (verminderte Degradation von HIF in retinalen Vorläuferzellen) einen Phänotyp, der der Frühphase der RAP ähnelt [93]. Die Autoren vermuten daher eine Beteiligung des HIF- Signalwegs an der Entstehung des Krankheitsprozesses, der von retinalen Zellstrukturen ausgeht [93].



**Abbildung 2.7: Klassifizierung des Krankheitsprozesses der retinalen angiomatösen Proliferation (RAP, nAMD Typ III) nach Yannuzzi *et al.* [85].** Die intraretinale Neovaskularisation (A, Pfeil) im Deep Plexus der Retina (Stadium I) führt zu einem fortschreitenden Wachstum der retinalen Blutgefäße in den subretinalen Raum (B, Pfeil), der prä- und intraretinale Ödeme sowie Pigmentepithelabhebungen (PED) zur Folge hat (B, Stadium II). In Stadium III kommt es durch die chororetinale Anastomose (Pfeil unten) zu einer choroidalen Neovaskularisation (CNV) mit klinischer Manifestation (C). Modifiziert nach Krebs *et al.* [86].

## 2.7 Erstlinientherapie und alternative Therapieoptionen bei AMD

Der Identifikation von VEGFA als entscheidendes Zytokin in der Pathogenese der nAMD folgte die Markteinführung von Anti-VEGFA-Medikamenten, nachdem in klinischen Studien erstmals eine signifikante Verbesserung der Sehschärfe nachgewiesen wurde. Mittlerweile gilt die IVOM dieser Präparate als Goldstandard in der nAMD-Therapie. In den meisten Fällen kommt es jedoch zu Rezidiven der CNV-Aktivität, sodass wiederholte IVOMs in regelmäßigen Abständen für einen nachhaltigen Therapieerfolg notwendig sind [96]. Bei älteren Patienten können die damit einhergehenden regelmäßigen Untersuchungstermine die Therapieadhärenz maßgeblich beeinträchtigen [97]. Darüber hinaus liegen Hinweise für eine Progression der GA unter Anti-VEGFA-Behandlungen vor, die langfristig zu einem schlechteren Visus führen kann [98]. Aus genannten Gründen besteht in der ophthalmologischen Forschung ein unvermindertes Interesse für alternative oder adjuvante Therapieformen in der nAMD-Behandlung.

### 2.7.1 Stereotaktische Radiotherapie bei nAMD

Die stereotaktische Radiotherapie (SRT) ist ein Sammelbegriff für Bestrahlungstechniken, die eine hochpräzise Behandlung mit ionisierender Strahlung (Gamma- und Röntgenstrahlen) möglich machen. Die Therapien finden üblicherweise mit einer hohen Strahlendosis pro Sitzung statt, die in einzelne oder mehrere Fraktionen aufgeteilt wird. Der Behandlungsansatz wird bereits seit über 60 Jahren, vor allem im Kontext verschiedener Tumorerkrankungen, angewandt [99]. Seit kurzem nimmt die Relevanz der SRT in der Ophthalmologie zu. So legten Studienergebnisse von Jackson *et al.* [100], Serova *et al.* [101] und Michael *et al.* [102] nahe, dass sich die SRT aufgrund ihrer hohen Präzision und dem damit verbundenem minimalen Schaden im umliegenden Gewebe bei nAMD, dem Meningeom des Sehnervs und dem Aderhautmelanom als begleitende Therapie eignen könnte.

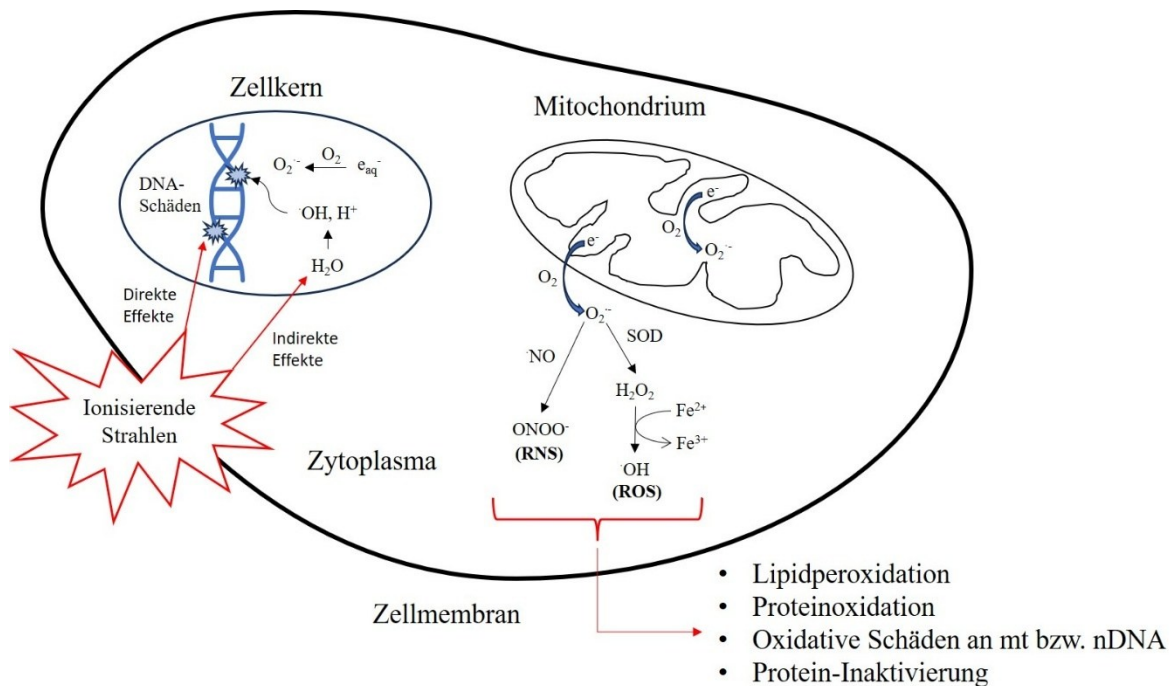
In der Behandlung von nAMD gilt die multizentrische STAR-Studie als bisher umfangreichste randomisierte klinische Studie mit 411 Studienteilnehmern [100]. Die nAMD-Patienten wurden entweder mit einer Strahlendosis von 16 Gray (Gy) behandelt (n = 274) oder erhielten im Kontrollarm eine Scheinbestrahlung mit 0 Gy (n = 137). Beide Behandlungsgruppen erhielten zudem eine IVOM-Behandlung mit Anti-VEGFA-Antikörpern. Nach einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren zeigte sich, dass die

IVOM-Folgebehandlungen bei Patienten mit SRT, bei vergleichbarer Sehschärfe und Lebensqualitätsscore, signifikant seltener notwendig wurden als in der Kontrollgruppe ( $10,7 \pm 6,3$  vs.  $13,3 \pm 5,8$  Injektionen; 95%-Konfidenzintervall:  $-4,2-0,8$ ). Da die Injektion in den Glaskörper meist als sehr unangenehm empfunden wird und die kostenintensive Behandlung mit einem erheblichen organisatorischen Aufwand für die meist älteren Betroffenen verbunden ist, kann sich die Reduktion der Injektionen positiv auf die Therapieadhärenz auswirken. Die Ergebnisse der STAR-Studie bestätigen die Beobachtungen der Phase-II-Studie INTREPID mit 230 Studienteilnehmern, die zu ähnlichen Ergebnissen führte [100].

### 2.7.2 Die Auswirkungen von ionisierender Strahlung auf Zellen

Treffen ionisierende Strahlen auf Zellen führt dies zur Entstehung intrazellulärer Strahlenschäden [103]. Initial stehen vor allem die DNA-Schäden im Vordergrund (Abbildung 2.8). Die direkte Energiedisposition auf atomare DNA-Bestandteile während des Behandlungsprozesses führt zunächst zur unmittelbaren Schädigung des genetischen Materials. Darüber hinaus entstehen indirekte Defekte am Genom, die durch reaktive Sauerstoffspezies infolge der Radiolyse von Wassermolekülen induziert werden [103]. Reagieren die ROS mit den Bestandteilen der DNA entstehen Läsionen, deren Reparatur durch DNA-Reparaturmechanismen mit vergleichsweise niedriger *proof-reading* Aktivität durchgeführt wird. Akkumulieren die Mutationen so sehr, dass die fehleranfälligen DNA-Reparaturmechanismen die Entstehung von Chromosomenaberrationen induzieren bzw. wichtige Schlüsselproteine in ihrer Aktivität stark beeinträchtigt werden, kann entweder eine Apoptose oder die Zellentartung zu einer Tumorzelle ausgelöst werden [103].

Der strahleninduzierte oxidative Stress schädigt nicht nur das Erbgut, sondern beeinflusst die zellulären Mechanismen auf Proteinebene. So führt die ionisierende Strahlung zur Aktivierung der Stickstoffmonoxid-Synthase (*nitric oxide synthase*, NOS), die mit  $O_2^{\cdot-}$  aus der mitochondrialen Atmungskette und Stickstoffmonoxid ( $^{\cdot}NO$ ) die Bildung von Peroxinitrit-Anionen ( $ONOO^-$ ) induzieren. Peroxinitrit-Anionen sind starke Oxidantien und reagieren ähnlich wie ROS mit Lipiden, Thiol-Gruppen, Sulfiden, Aminosäureresten von Proteinen und DNA-Basen [104]. Die Strahlenbehandlung kann zudem die verstärkte Bildung von mROS, vor allem  $O_2^{\cdot-}$ , induzieren, die ebenfalls eine Reihe von zellulären Prozessen auslösen bzw. stören [103]. Auslöser der mROS-Bildung sind unter anderem die Beeinträchtigung des mitochondrialen Proteintransports [103, 105] sowie die Schädigung



**Abbildung 2.8: Schematische Darstellung intrazellulärer Effekte nach der Absorption ionisierender Strahlung.** Die Schädigung der nukleären DNA (nDNA) erfolgt durch direkte Reaktionen mit DNA-Bestandteilen und mittels indirekter Oxidation durch Hydroxyl-Radikale (OH<sup>•</sup>), die infolge der Radiolyse mit Wassermolekülen (H<sub>2</sub>O) entstehen. Ionisierende Strahlung stört zudem die mitochondriale Aktivität. Die Entkopplung der Atmungskette führt zur verstärkten Freisetzung von Elektronen, die mit Sauerstoff zu Superoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) reagieren. Die Superoxid-Anionen werden entweder durch Stickstoffmonoxid-Synthase zu Peroxynitrit-Anionen (ONOO<sup>-</sup>) umgesetzt oder reagieren nach der Umwandlung in Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durch die Superoxiddismutase (SOD) mit Eisen-Ionen (Fe<sup>2+</sup> bzw. Fe<sup>3+</sup>) zu OH<sup>•</sup>. Die Folgen sind Lipidperoxidationen, Proteinoxidationen, oxidative Schäden nukleärer und mitochondrialer (mt) DNA und Protein-Inaktivierungen. Modifiziert nach Azzam et al. [103]. e<sup>-</sup>: Elektron, e<sub>aq</sub><sup>-</sup>: freigesetztes Elektron aus Wasserradiolyse, H<sup>+</sup>: Proton; O<sub>2</sub>: Sauerstoff, RNS: reactive nitrogen species, reaktive Stickstoffspezies, ROS; reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies.

der mitochondrialen DNA, die sich lang- und kurzfristig auf den Elektronentransport auswirken [103, 106]. Während des protektiven Abbaumechanismus wird O<sub>2</sub><sup>•-</sup> durch SOD in das weniger zelltoxische Wasserstoffperoxid umgewandelt. Die Reaktion mit freien Eisenionen führt allerdings zur Entstehung von sehr reaktiven Hydroxyl-Radikalen (OH<sup>•</sup>), die verschiedene Zellstrukturen schädigen können [107]. Neben den angeführten zellulären Schäden, kann ionisierende Strahlung auch Einfluss auf verschiedene Signalkaskaden nehmen. Reaktiven Sauerstoffspezies fungieren als wichtige Signalmoleküle für verschiedene zelluläre Prozesse und beeinflussen auf diese Weise die Expression spezifischer Gene [108–111], die Modulation von Ionenkanälen [112] und die Signaltransduktion als Second-Messenger-Moleküle [113].

In gesunden Zellen wird die ROS-Konzentration daher durch ein komplexes System aus Pro- und Antioxidantien reguliert, deren Ungleichgewicht einen Zellzyklusarrest induzieren kann [103]. In welchem Maße die Strahlenbehandlung die zellulären Prozesse beeinträchtigt und welche Effekte auftreten, hängt von vielen Faktoren ab und unterscheidet sich je nach Zelltyp, Gewebestruktur und der Dosis des verwendeten Strahlungstyps [103, 114]. Die Folgen einer niedrig-dosierten 16 Gy-SRT, wie sie in der in Abschnitt 2.7.1 beschriebenen STAR-Studie angewandt wurde, wurden auf zellulärer Ebene von Vounotrypidis *et al.* in Zellkulturexperimenten untersucht [115]. Die Arbeitsgruppe behandelte drei primäre Zellkulturlinien (primäre humane RPE-Zellen, menschliche Nabelvenen-Endothelzellen und humane Pericyten aus der Plazenta), die im Hinblick auf nAMD relevant sind bzw. den bestrahlten Zelltypen in den choroidalen Strukturen ähneln. Sie stellten fest, dass die Bestrahlung der Zelllinien mit 16 Gy zu einer Reduktion der Zellviabilität und der metabolischen Aktivität führte, während die Apoptoserate mit der Kontrollgruppe aus scheinbestrahlten Zellen auf gleichem Niveau blieb [115].

### **2.7.3 Hyperbare Sauerstofftherapie in der Ophthalmologie**

Die hyperbare Sauerstofftherapie (*hyperbaric oxygen therapy*, HBOT) ist eine medizinische Behandlung, die vor allem bei der arteriellen Gasembolie, dem Dekompressionsunfall oder der Kohlenstoffmonoxid-Intoxikation angewandt wird. Während der HBOT atmen die Patienten in speziellen Druckkammern Luft mit hohem Sauerstoffanteil ein (bis zu 100 % O<sub>2</sub>), die über eine Atemmaske unter erhöhtem Umgebungsdruck zugeführt wird [116]. Die Zunahme der Sauerstoffkonzentration im Blutkreislauf ist auf den Anteil von gelöstem O<sub>2</sub> im Blutplasma zurückzuführen, da die Sauerstoffbindungsstellen des Hämoglobins durch das Einatmen von Raumluft auf Meereshöhe bereits ohne HBOT nahezu gesättigt (bis zu 98 %) sind [117]. Die Kombination aus höherem Druck und erhöhter Sauerstoffatmosphäre in der Atemluft steigert die Konzentration von gelöstem O<sub>2</sub> im Blutplasma. Der erhöhte Umgebungsdruck in der Druckkammer dient somit als physikalisches Hilfsmittel zur Steigerung des gelösten Sauerstoffanteils im Blut [116]. Laut einer Übersichtsarbeit von Calvert *et al.* kann auf diese Weise bei einer HBOT-Behandlung mit 100 % O<sub>2</sub> in der Atemluft und einem Umgebungsdruck von 2,5 absoluten Atmosphären (ATA) ein arterieller Sauerstoffpartialdruck (PO<sub>2</sub>) von 2.000 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) erreicht werden. Der PO<sub>2</sub>-Wert während einer HBOT steigt im Vergleich dem PO<sub>2</sub>-Wert unter Atemluft (90 mmHg) somit um den 20-fachen Wert [118].

Da HBOT darauf abzielt, die Sauerstoffkonzentration im Gewebe zu erhöhen, ist die Anwendung in der Ophthalmologie naheliegend. Der enorme ATP-Umsatz der primären Photorezeptoren in der Retina ist auf die kontinuierliche Sauerstoffversorgung angewiesen und kann bei einer anhaltenden Unterversorgung zu einem Sehverlust führen [119]. Laut einer Übersichtsarbeit von Micun *et al.* ist die HBOT bei Augenerkrankungen allerdings nicht zugelassen. Sie erklären dies mit der unzureichenden Datenlage und den teils widersprüchlichen Ergebnissen, die eine Zulassung der HBOT im Kontext Hypoxie-assoziiierter Augenerkrankungen nicht rechtfertigt [119]. Unseres Wissen nach liegt nur eine klinische Pilotstudie mit geringer Patientenzahl vor, die die begleitende Anwendung der HBOT zur Anti-VEGFA-Behandlung bei Patienten mit AMD und aktiver CNV untersuchte, ohne dass eine Differenzierung der nAMD-Subkategorien stattfand. In der Studie von Malerbi *et al.* erhielten sieben AMD-Patienten bei zehn täglichen Sitzungen eine HBOT-Behandlung über 120 Minuten bei einem Umgebungsdruck von 2 ATA [120]. Studienteilnehmer, die klinische oder tomografische Anzeichen einer CNV-Aktivität zeigten, erhielten zudem eine Standard-Anti-VEGFA-Behandlung. Untersucht wurden die CNV-Flächen, die zentrale Netzhautdicke und das Netzhautvolumen. Am Ende des Beobachtungszeitraums von durchschnittlich 150 Tagen zeigten fünf Betroffene eine anatomische Verbesserung und ein Patient eine anatomische Verschlechterung. Bei einem Teilnehmer blieb der Zustand unverändert. Laut den Autoren könnte die HBOT eine sichere und verträgliche Behandlungsoption für Patienten mit aktiver CNV sein, die möglicherweise das Fortschreiten der Erkrankung verzögert, sei es als Monotherapie oder in Kombination mit intravitreal-injiziertem Bevacizumab (Anti-VEGFA-Antikörperpräparat) [120].

#### **2.7.4 Physiologische Adaptation an HBOT**

Die HBOT wird mit positiven Auswirkungen auf die mitochondriale Aktivität, die Angiogenese, die Zellproliferation, die Kollagen-Synthese und die Osteogenese in Verbindung gebracht [121]. Darüber hinaus deuten Daten von Gut *et al.* und Sun *et al.* auf einen neuroprotektiven Effekt hin [122, 123]. Die dokumentierten Beobachtungen sind allerdings von dem jeweiligen HBOT-Behandlungssetting (Sitzungsdauer, Umgebungsdruck, Sitzungsintervall) abhängig und widersprechen sich teilweise [122–124]. So beeinträchtigt die Anzahl der HBOT-Sitzung laut einer Übersichtsarbeit von Schottlender *et al.* die mitochondriale Aktivität der Zellen [125]. Nach der Auswertung von zehn Studien

mit verschiedenen Tiermodellen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die Anwendung der HBOT mit einer bis fünf Sitzungen die Reduktion der mitochondrialen Funktionalität induziert, während 20 bis 60 HBOT-Sitzungen zu einer signifikanten Verbesserung der mitochondrialen Aktivität beitragen [125]. Einige positive Effekte der HBOT werden auf die Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  zurückgeführt, die vor allem bei wiederkehrenden Behandlungen in kurzen Zeitintervallen, der intermittierenden HBOT, auftrat. Im Rahmen dieser intermittierenden HBOT wurde von Balestra *et al.* ein möglicher Mechanismus postuliert, der als Hyperoxie-Hypoxie-Paradox bezeichnet wird [126]. Der postulierte Mechanismus wurde in den Übersichtsarbeiten von Cannellotto *et al.*, Salvagno *et al.* und Hadanny *et al.* diskutiert und tritt laut den Autoren nach mehrfacher Anwendung der HBOT im Rahmen eines zellulären Gewöhnungseffekts an die wechselnde Sauerstoffumgebung auf [121, 127, 128]. Demnach induziert der wiederkehrende Wechsel aus der Hyperoxie-Phase zurück in die Normoxie eine Verschiebung des zellulären Gleichgewichts zwischen ROS und Antioxidantien. Die Folge sei ein hypoxie-imitierender Zustand unter normaler Sauerstoffatmosphäre, in dem wenig ROS auf viele Antioxidantien treffen und infolgedessen die proteosomale Degradation der HIF-Untereinheiten vermindert ist [121, 127, 128].

Obwohl das Hyperoxie-Hypoxie-Paradox häufig zitiert wird, liegen eine Reihe von Daten vor, die der postulierten zellulären Adaptationen entgegenstehen und in der Übersichtsarbeit von Salvagno *et al.* diskutiert wurden [128]. Unabhängig vom genauen Mechanismus treten zelluläre Effekte auf, die bereits nach einer Sitzung zu beobachten wurden und von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt werden konnten. Im Zentrum steht der oxidative Stress, der durch die Inkubation in Hyperoxie ausgelöst wird. Laut Balestra *et al.* induziert der hyperoxische Zustand die ROS-Bildung als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette [126]. Dies bestätigten Studien von Leveque *et al.* anhand von Messungen der ROS-Konzentration im Blutplasma gesunder Studienteilnehmer, die bis zu 48 Stunden nach einer HBOT-Sitzung mit 1,4 ATA bzw. 2,5 ATA deutlich über den gemessenen Werten vor der Behandlung erhalten blieb [129]. Die Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  tritt in einigen Studien bereits nach einer HBOT-Sitzung auf und wird mit dem induzierten oxidativen Stress sowie den Wechsel zurück in den physioxischen Grundzustand assoziiert [129].

## 2.8 Fragestellung

Die zelluläre Adaptation an chronischen Sauerstoffmangel ist ein wichtiger Treiber des pathogenen Gefäßwachstums und maßgeblich an der zunehmenden Sekretion proangiogener Wachstumsfaktoren wie VEGFA beteiligt (Abschnitt 2.3). Daher ist es naheliegend, verschiedene Sauerstoffbedingungen bei der Untersuchung der zellbiologischen Prozesse in geeigneten Zellkulturexperimenten zu berücksichtigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zellteilung, Zellviabilität, Zellmigration und die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung von primären humanen retinalen Endothelzellen (HRMECs) unter hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen Bedingungen untersucht. Die Quantifizierung relevanter Proteine des intrazellulären Sauerstoff-Sensors sollten Erklärungsansätze für die erhobenen Daten liefern. Zur Interpretation der durchgeführten Zellkulturexperimente wurden die Ergebnisse von massenspektrometrischen Analysen hinzugezogen, in denen das Proteom von HRMECs nach unterschiedlicher Sauerstoffbehandlung verglichen wurde. Ziel war es, mit den Zellkulturexperimenten bei Sauerstoffmangel den pathologischen Zustand der HRMECs zu simulieren, der mit der Neovaskularisation *in-vivo* assoziiert ist. Die Inkubation der HRMECs unter hyperoxischen Bedingungen sollte dagegen Daten über die Auswirkungen eines anhaltenden Sauerstoffüberangebots liefern, die zur Einschätzung der therapeutischen Anwendbarkeit von Hyperoxie (z.B. HBOT) bei RAP beitragen soll.

Unter den möglichen therapeutischen Alternativen finden sich neben der HBOT die SRT. Während die HBOT noch ein experimenteller Ansatz ist, zu dem in der Ophthalmologie nur wenige klinische Studien zur Verfügung stehen, ist die SRT bereits etabliert und Gegenstand umfangreicher Phase-II-Studien [100]. Nichtsdestotrotz liegen nur wenige Studien vor, die die Folgen der ionisierenden Strahlung in HRMECs anhand von Zellkulturexperimenten untersuchten. In dieser Arbeit wurden daher hypoxische, normoxische und hyperoxische HRMECs mit Röntgenstrahlen (Energiedosis: 16 Gray) behandelt und anschließend im Hinblick auf zelluläre Prozesse und Mechanismen, die relevante Faktoren in der Neovaskularisation darstellen, untersucht.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

*Tabelle 3.1: Primäre Zellkultur*

Zelllinie	Typ	Hersteller
Humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen	Primäre Zelllinie	PELOBiotech, Deutschland

*Tabelle 3.2: Zellkulturmedium*

Bezeichnung	Medium	Supplement	Hersteller
<b>MECG-Inkubationsmedium</b>	Cellovations® MECG Basalmedium mit 5 % FBS	Hydrocortison, L-Glutamin, Amphotericin, Gentamicin	PELOBiotech, Deutschland
<b>MECG-Kulturmedium</b>	Cellovations® MECG Basalmedium mit 5 % FBS	bFGF (10 ng/mL, EGF (5 ng/mL), Long R3 IGF-1 (20 ng/ml), VEGF (5 ng/mL), Hydrocortison, L-Glutamin, Amphotericin, 50 µg/mL Gentamicin	PELOBiotech, Deutschland
<b>MECG-Transfektionsmedium</b>	Cellovations® MECG Basalmedium mit 5 % FBS	bFGF (10 ng/mL, EGF (5 ng/mL), Long R3 IGF-1 (20 ng/ml), VEGF (5 ng/mL), Hydrocortison, L-Glutamin	PELOBiotech, Deutschland
<b>Zellkulturmedium für Lipofektion</b>	Gibco® OptiMEM® serumreduziertes Medium	-	Thermo Fisher Scientific, USA

*bFGF: basic fibroblast growth factor, EGF: epidermal growth factor, FBS: fetal bovine serum, fetales Kälberserum, IGF: insulin-like growth factor, MECG: microvascular endothelial cell growth, VEGF: vascular endothelial growth factor.*

**Tabelle 3.3: Puffer und Chemikalien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Komponenten und Konzentrationen</b>	<b>Komponenten- und Produkthersteller</b>
Acrylamidstammlösung	30% Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid	Roth, Deutschland
Anodenpuffer I	0,3 M Tris-Base, 20 % MeOH in tridest. H <sub>2</sub> O	Merck, Deutschland; Roth, Deutschland
Anodenpuffer II	25 mM Tris-Base, 10 % MeOH in tridest. H <sub>2</sub> O	Merck, Deutschland; Roth, Deutschland
APS Lösung (10 %)	1 g APS, ad 10 mL bidest. H <sub>2</sub> O	ThermoFisher Scientific, USA
DAPI (1 µg/mL)	20 µL DAPI-Stammlösung (5 mg/mL in PBS), 100 ml PBS	Invitrogen, USA
DC Protein Assay	DC Protein Assay A, B, S	BIO-RAD, USA
DharmaFECT® (Transfektionsreagenz)	-	Horizon Discovery, England
DMSO	-	Roth, Deutschland
EasyPep® MS Sample Prep Kit	Lyselösung, Universelle Nuklease, Reduktionslösung, Alkylierungslösung, Pierce™ Trypsin/Lys-C Protease-Mix, Stopplösung, Peptid-Reinigungssäulen, Waschlösung A, Waschlösung B, Elutionslösung,	ThermoFisher Scientific, USA
Gibco™ Trypanblau Lösung (0,4 %)	-	Gibco, Deutschland
Gibco™ Trypsin-EDTA (0,5 %)	-	Gibco, Deutschland
Ibidi Mounting Medium (Befestigungsmedium)	-	Ibidi, Deutschland
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base, 40 mM Glycin, 10 % MeOH, pH 9,4	Merck, Deutschland; Roth, Deutschland
Laemmli Probenpuffer (5x)	62,5 mM Tris pH 6,8, 18 % Glycerol, 2 % SDS, 0,1 % Bromphenolblau, 5 % β-Mercaptoethanol	Merck, Deutschland; Roth, Deutschland
MTT-Lösung (5 mg/ml)	50 mg MTT, ad 10 ml PBS	Sigma-Aldrich, USA
PFA (4 %) in PBS (pH 7,4)	4 g PFA, ad 100 ml PBS	Merck, Deutschland

PBS für Puffer (pH 7,4)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Deutschland; Roth, Deutschland; Fluka, Schweiz
PBS für Zellkulturanwendung (pH 7,4)	155 mM NaCl, 3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	ThermoFisher Scientific, USA
Pierce™ Mikrotiterplate BCA Protein Assay Kit	-	ThermoFisher Scientific, USA
Ponceau-S-Lösung	0,1 % PonceauS (w/v) in 5 % (v/v) Essigsäure	Sigma-Aldrich, USA
Calbiochem® Protease Inhibitor Cocktail Set V, EDTA free	500 µM AEBSF, 1 µM E-64, 1 µM Leupeptin-Hemisulfat in H <sub>2</sub> O	Merck, Deutschland
Restore™ Western-Blot Stripping Buffer	-	ThermoFisher Scientific, USA
Rinderserumalbumin	Proteinstandard	BIO-RAD, USA
SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (Komponente I)	5,5 mL Acrylamid-Stammlösung, 10,35 mL 1,5 M Tris-HCl, 25,5 mL H <sub>2</sub> O, 405 µL 10 % SDS Lösung, 206,25 µL 10 % APS Lösung, 20,63 µL TEMED	Roth, Deutschland
SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (Komponente II)	27,525 mL Acrylamid-Stammlösung, 10,35 mL 1,5 M Tris-HCl, 3,375 mL H <sub>2</sub> O, 405 µL 10 % SDS Lösung, 206,25 µL 10 % APS Lösung, 20,63 µL TEMED	Roth, Deutschland
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer	15 mM Tris-Base, 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS	Merck, Deutschland; Roth, Deutschland
SDS-PAGE Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	Roth, Deutschland
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrat	Chemolumineszenz-Meerrettich-Peroxidase-Substrat	ThermoFisher Scientific, USA
TEMED	-	Roth, Deutschland
Triton-x in PBS (0,1 %)	0,1 mL Triton-x, ad 100 ml PBS	Merck, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung	-	Merck, Deutschland
Western-Blot Blockpuffer	5 % Milchpulver in PBS	Sucofin, Deutschland
8 M Urea Puffer (Lysepuffer für Ganzzelllysate)	48 g Urea, ad 100 mL tridest. H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, USA

*AEBSF: 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid Hydrochlorid, APS: Ammoniumpersulfat, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DMSO: Dimethylsulfoxid, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, HCl: Salzsäure, KCl: Kaliumchlorid, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Kaliumdihydrogenphosphat, MeOH: Methanol, MTT: Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, NaCl: Natriumchlorid, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Dinatriumhydrogenphosphat, PBS: phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung; PFA: Paraformaldehyd, SDS: sodium dodecyl sulfate, SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide polyacrylamid gel electrophoresis, TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan.*

**Tabelle 3.4: Primär- und Sekundärantikörper für Western-Blots**

Antikörper	Verdünnung	Molekulargewicht	Immunisierung	Hersteller
anti-HIF1 $\alpha$ (610958)	1:1000	~120 kDa	Maus	BD Biosciences, USA
anti-HIF2 $\alpha$ (ab199)	1:1000	~110 kDa	Kaninchen	Abcam, England
anti-VEGF (VG76e)	1:500	~25 kDa	Maus	ThermoFisher Scientific, USA
anti-SDHB (21A11E7)	1:500	~30 kDa	Maus	Abcam, England
anti-PlGF (24G3)	1:500	~25 kDa	Maus	Invitrogen, USA
anti-VEGFR1 (720043)	1:1000	~48 kDa	Kaninchen	ThermoFisher Scientific, USA
anti- $\beta$ -Actin (8H10D10)	1:5000	~42 kDa	Maus	Cell Signaling, England
Polyklonal Ziege anti-Maus Sekundärantikörper	1:5000	-	Maus	Dako, Dänemark
Polyklonal Ziege anti-Kaninchen Sekundärantikörper	1:5000	-	Kaninchen	Dako, Dänemark

*HIF: hypoxia-inducible factor, PlGF: placental growth factor, SDHB: Succinatdehydrogenase B, VEGF: vascular endothelial growth factor, VEGFR1: vascular endothelial growth factor receptor 1.*

**Tabelle 3.5: Verbrauchsmaterialien**

Produktname	Funktion	Hersteller
Amersham™ Protran™ Premium 0.45 $\mu$ m NC	Nitrozellulosemembran für Western-Blots	GE Healthcare Life Science, USA
Cell Culture Flask, 25 cm <sup>2</sup> , Cellstar	Zellkulturflasche für adhärenter Zellen	Greiner bio-one, Österreich
Cell Culture Microplate, 96 Well, white	96-Lochplatte (weiß, opak) für quantitative/qualitative Assays	Greiner bio-one, Österreich
Cell Scraper 25/36,4 cm	Zellschaber für Zellernte	Sarstedt, Deutschland
Culture-Inserts 2 Well	Silikoneinsatz zur Definierung des zellfreien Raums bei Zellmigrationsassays	Ibidi, Deutschland
Greiner Bio-One Reaction Tubes (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Deutschland

Human PlGF ELISA Kit	Proteinkonzentrationsbestimmung PlGF	Abcam, England
Human VEGF Quantikine ELISA Kit	Proteinkonzentrationsbestimmung VEGF A	R&D Systems, USA
Human VEGFR1/Flt-1 Quantikine ELISA Kit	Proteinkonzentrationsbestimmung VEGFR1/Flt-1	R&D Systems, USA
Minisart Filter unit 0.2 µm	Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) für kleine/mittlere Volumina	Sartorius, Deutschland
Pipette Cellstar, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Serologische Pipette	Greiner bio-one, Österreich
ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Assay Kit	Messung H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Zellkulturmedium	Promega, USA
ROTILABO® Blottingpapier	Blottingpapier für Wester-Blot Verfahren	Roth, Deutschland
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Mehrfarbige Breitband-Proteinleiter für SDS-PAGE und Western-Blot (10 bis 260 kDa)	ThermoFisher Scientific, USA
TC-Zellkulturschale Cellstar, 60x15 mm, 100x15 mm	Zellwachstum adhärenter Zellen	Sarstedt, Deutschland
Zellkulturröhrchen, 15 mL, 50 mL	Aufbewahrung/Transport von Zellsuspensionen	Sarstedt, Deutschland
8-Well-µ-Slide	8-Well-Zellkulturkammer für quantitative/qualitative Assays	Ibidi, Deutschland

*ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, Flt-1 = Fms related receptor tyrosine kinase 1, PlGF: placental growth factor, ROS: reactive oxygen species, reactive Sauerstoffspezies; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis, VEGF: vascular endothelial growth factor, VEGFR = vascular endothelial growth factor receptor.*

**Tabelle 3.6: Laborgeräte**

Gerätename	Funktion	Hersteller
SpectraMax i3	Mikroplattenleser	Molecular Devices, USA
Acclaim™ PepMap™ 100 C18-HPLC-Säulen	Trap-Säule HPLC	ThermoFisher Scientific, USA
Omnia Reinstwassersystem Typ 1	Reinstwassersystem	Stakpure, Deutschland
Thermo Scientific™ MSC-Advantage™ biologische Sicherheitswerkbank Klasse 2	Biologische Sicherheitswerkbank	ThermoFisher Scientific, USA
Microflow Klasse 2 Sicherheitswerkbank	Biologische Sicherheitswerkbank	Spie, Frankreich

SONOPULS Ultraschall-Homogenisator HD3200	Ultraschall-Homogenisator für Ganzzelllysate-Proben	Bandelin, Deutschland
BP2100 S	Plattformwaage	Sartorius, Deutschland
Biostep Celvin S 420	Chemilumineszenz-Detektor	Biostep, Deutschland
Ruskinn InvivoO2 <sup>®</sup> 400	Hypoxie Werk-/Brutbank	Baker Ruskinn, England
Centrifuge 5819R	Zentrifuge zur Separierung von Zellen/Zellbestandteilen in Suspensionen	Eppendorf, USA
Olympus CKX53	Durchlicht-Mikroskop	Olympus, Japan
HERACell VIOS 160i	Brutschrank	ThermoFisher Scientific, USA
Centrifuge 5417R	Zentrifuge zur Separierung von Zellen/Zellbestandteilen in Suspensionen	Eppendorf, USA
Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell	Semy-dry Blot	BIO-RAD, USA
EASIA Shaker	Schüttler für 96-Lochplatten	Medgenix, USA
Centrifuge Sigma 2-16PK	Zentrifuge zur Separierung von Zellen/Zellbestandteilen in Suspensionen	Sigma-Aldrich, USA
Petri Dish Irradiator	Petrishalen-Irradiator zur Röntgenstrahlenbehandlung von Zellen	Carl Zeiss, Deutschland
BP 121 S	Feinwaage	Sartorius, Deutschland
Titramax 100	Schüttler für 96-Lochplatten	Heidolph Instruments, Deutschland
Reine Werkbank L50002298	Biologische Sicherheitswerkbank	Spie, Frankreich
GFL 1083 Schüttelwasserbad	Schüttelwasserbad	GFL Technology, Deutschland
Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader	96-Lochplattenleser, Luminometer	Berthold Technologies, Deutschland
Eppendorf Research <sup>®</sup> plus, 0,5-10 µl	Pipette	Eppendorf, USA
Calvin <sup>®</sup> S 420	Chemolumineszenz-Imager	Biostep, Deutschland
Eppendorf Research <sup>®</sup> plus, 5-100 µl	Pipette	Eppendorf, USA
Eppendorf Research <sup>®</sup> plus, 100-1000 µl	Pipette	Eppendorf, USA

Accu-jet® pro	Pipettierhelfer	ThermoFisher Scientific, USA
Neubauer-Zählkammer	Zellzahlbestimmung in Zellsuspension	Glaswarenfabrik Karl Hecht Assistent, Deutschland
Gradient Former, Model 458	Gradientengellerstellung	BIO-RAD, USA
Mini-PROTEAN® 3 Cell	SDS-PAGE Elektrophoresesystem	BIO-RAD, USA
Dionex Ultimate 3000 HPLC	HPLC System	ThermoFisher Scientific, USA
TripleTOF 5600+	Massenspektrometer	SCIEX, Kanada
LUNA 3 µm C18(2) 100 A LC Column 150 x 0,3 mm	HPLC-Säule	Phenomenex, USA

*HPLC: high-performance liquid chromatography, LC: liquid chromatography column, SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide polyacrylamid gel electrophoresis.*

**Tabelle 3.7: Software**

Software	Funktion	Hersteller
SnapAndGo	Aufnahme Chemolumineszenz	Biostep, Deutschland
GraphPad Prism 10	Statistik-Software	GraphPad Software Inc., USA
R (Version 4.4.0),	Statistik-Software	R_Foundation (Freie Software)
Optika Vision Lite 2.1 (Version 2.13)	Mikroskopische Aufnahme Zellmigration	Optika Microscopes Italy, Italy
Leica LASA AF (Version 3.0)	Mikroskopische Aufnahmen Zellzahlbestimmung	Leica Biosystems, Deutschland
MikroWin 2010 (Version 5.24)	Datenbestimmung Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Deutschland
DIA-NN v1.7.16	Datenauswertung Massenspektrometrie	Aptila Biotech GmbH, Deutschland
Omics Playground v3	Datenanalysesoftware, massenspektrometrische Analysen	Big Omics Analytics, Schweiz

**Tabelle 3.8: siRNA**

Produkt	siRNA	Targetsequenz	Hersteller
ON-TARGETplus Human HIF1A (3091) siRNA- SMARTpool	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-004018-07, HIF1 $\alpha$	GAACAAAUACA UGGGAUUA	Horizon Discovery, England
	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-004018-08, HIF1 $\alpha$	AGAAUGAAGU GUACCCUAA	
	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-004018-09, HIF1 $\alpha$	GAUGGAAGCAC UAGACAAA	
	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-004018-10, HIF1 $\alpha$	CAAGUAGCCUC UUUGACAA	
BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo	Oligonukleotide mit FITC-Marker	-	ThermoFisher Scientific, USA

*HIF1 $\alpha$ : hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , FITC: Fluoresceinisothiocyanat, siRNA: small interfering ribonucleic acid.*

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung humaner retinaler mikrovaskulärer Endothelzellen

Für alle Zellkulturexperimente wurden humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen (HRMECs) der Firma PelloBiotech untersucht (Tabelle 3.1). Da es sich um eine primäre, nicht-immortalisierte Zelllinie handelt, konnte nur eine bestimmte Anzahl von Subkulturen angelegt werden. Alle Versuche fanden mit Zellen statt, die mindestens fünf bis höchstens 11-mal passagiert wurden. Die adhärennten Zellen wurden in Cellovations® Microvascular Endothelial Cell Growth (MECG)-Medium kultiviert, das aus einem Basalmedium und einem Supplement-Kit (Wachstumsfaktoren, L-Glutamin, Hydrocortison, Antibiotika) zusammengestellt war (Tabelle 3.2). Für die Experimente wurde das Basalmedium durch unterschiedliche Bestandteile des Supplements ergänzt. Die Endothelzellen wurden in Zellkulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche (Tabelle 3.5) über einen Zeitraum von zwei bis vier Tagen bis zu einer Konfluenz von 70–90 % kultiviert, anschließend wurde eine neue Subkultur angelegt.

Zum Passagieren der Zellen wurde zunächst ein Waschschrift mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) durchgeführt. Anschließend wurde das PBS verworfen und durch 1 mL Trypsin-EDTA-Lösung ersetzt (Tabelle 3.3). Trypsin spaltet als Endopeptidase Lysin- und Argininbindungen, während EDTA als Chelatbildner zweiwertige Kationen komplexiert [130]. Nach 2 min bei 37 °C kam es zu einer Ablösung des Zellrasens von der Oberfläche der Zellkulturflasche. Es folgten die Neutralisierung der Trypsin-EDTA Lösung durch Zugabe von 3 mL MECG-Kulturmedium und die Zentrifugation der Zellsuspension (200 g, 5 min bei Raumtemperatur). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet je nach Größe in 300-500 µL MECG-Kulturmedium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl fand mit einer Neubauer-Zählkammer statt.

### 3.2.2 Zellernte und Zellyse in 8 M Urea Lysepuffer

Die Herstellung von Ganzzelllysaten basiert auf dem Protokoll, das im Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck entwickelt wurde [131, 132]. Das Protokoll wurde angewandt, nachdem die HRMECs in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser ( $\varnothing$ ) von 60 mm bzw. 100 mm (Tabelle 3.5) kultiviert worden waren, bis eine Konfluenz von 50–70 % erreicht war.

Um den schnellen proteasomalen Abbau intrazellulärer Proteine zu verhindern, wurde der Überstand der Zellkulturschalen zu Beginn der Zellernte verworfen und durch eiskaltes PBS ersetzt. Alle weiteren Schritte der Zellernte und Zellyse wurden auf Eis durchgeführt. Das PBS aus dem Waschschrift wurde durch 1 mL PBS (100 mm Zellkulturschale) bzw. 0,5 mL PBS (60 mm Zellkulturschale) ersetzt. Die HRMECs wurden daraufhin mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Es folgten die Zentrifugation des Zellysats (3.000 g, 5 min, 4 °C) und die Entfernung des Überstandes. Je nach Größe des Zellpellets wurden unterschiedliche Volumina des 8 M Urea-Lysepuffers hinzugegeben (20–60 µL Lysepuffer), bevor ein Zellaufschluss mittels Ultraschall erfolgte (Tabelle 3.6). Die Zellysate wurden erneut zentrifugiert (20.500 g, 20 min, 4 °C) und am Boden sedimentierte Zellreste entfernt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration des Ganzzelllysates ermittelt (Abschnitt 3.2.3).

### **3.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bio-Rad DC Protein Assay**

Das Bio-Rad DC Protein Assay ist eine kolorimetrische Messung für Proteinkonzentrationen, basierend auf dem Lowry-Assay (Tabelle 3.3) [133, 134]. Da nur geringe Mengen des Zellysats zur Verfügung standen, wurde das Mikroplatten-Assay-Protokoll angewandt [135]. Auf einer 96-Lochplatte wurden jeweils 5 µL des zu untersuchenden Zellysats pro Vertiefung pipettiert. Anschließend wurden 20 µL Reagenz A und 200 µL Reagenz B hinzugegeben. Die quantitative Messung erfolgte nach einer Inkubationszeit von 20 min bei einer Wellenlänge von 750 nm mittels eines 96-Lochplattenlesers (Tabelle 3.6). Die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben wurden als Doppelbestimmung durch lineare Regression mit einer Eichgerade aus Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) mit ansteigender Proteinkonzentration bestimmt (Tabelle 3.3).

### **3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse erfolgte mittels *sodium dodecyl sulfate* (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [136]. Nach Durchführung des Bio-Rad DC Protein Assays (Abschnitt 3.2.3) wurden die Ganzzelllysate zunächst mit 5× Lämmli-Puffer versetzt (Tabelle 3.3) und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die SDS-PAGE wurde mit Gradientengelen durchgeführt, die einen graduell ansteigenden Polyacrylamidanteil von 4 bis 20 % aufwiesen (Tabelle 3.3). Die Herstellung erfolgte mit

einer Gradientengel-Gießapparatur (Tabelle 3.6). Auf diese Weise ließen sich Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 bis 200 kDa auf einem gemeinsamen Polyacrylamidgel auftrennen [137]. Die elektrophoretische Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte bei 100 V über einer Laufzeit von zwei Stunden.

### 3.2.5 Western-Blot

Die Western-Blot-Methode dient der Detektion und semiquantitativen Bestimmung ausgewählter Proteine aus Zelllysaten und umfasst zwei Schritte: Den Elektroproteintransfer aus einem Polyacrylamidgel (hier: Gradientengel) auf eine feste Trägermembran (hier: Nitrozellulosemembran) und der Visualisierung von Zielproteinen durch Immunonachweis mittels spezifischer Antikörper [138]. Der Transfer auf die Nitrozellulosemembran basierte auf dem halbtrockenen Blotverfahren [139]. Die Zusammensetzung der Transferpuffer (Anodenpuffer I, II und Kathodenpuffer) ist in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Der Proteintransfer fand bei 10 V über einen Zeitraum von 2 h statt. Zur Kontrolle wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau-S-Lösung (Tabelle 3.3), einem roten Azofarbstoff, der die transferierten Proteine durch eine rote Färbung reversibel sichtbar macht, angefärbt [140]. Die angefärbte Nitrozellulosemembran wurde im Anschluss so lange in PBS gewaschen, bis sich der Farbstoff von den Proteinen vollständig löste. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern, wurde die Nitrozellulosemembran für 2 h in Western-Blot Blockpuffer (Tabelle 3.3) inkubiert. Es folgte die Zugabe von Primärantikörpern in Western-Blot Blockpuffer bei 4 °C über Nacht. Die Verdünnung für Primär- und Sekundärantikörper ist in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBS wurde der Sekundärantikörper in Western-Blot Blockpuffer hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über 2 h bei Raumtemperatur. Die Nitrozellulosemembran wurde im Anschluss erneut dreifach in PBS gewaschen, bevor die Proteinbanden via Chemolumineszenz detektiert wurden. Die Chemolumineszenz wurde mit SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrat induziert (Tabelle 3.3). Die Signalintensitäten wurden mittels eines Chemolumineszenz-Detektors erfasst (Tabelle 3.6).

#### Semiquantitative Western-Blot-Analyse mit Ganzzelllysaten aus hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen HRMECs

Die semiquantitative Bestimmung von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  erfolgte durch Western-Blots mit Ganzzelllysaten aus HRMECs. Dazu wurden 150.000 HRMECs in Zellkulturschalen

(ø 10 cm) mit 7 mL MEGC-Kulturmedium kultiviert. Nach 48 h wurde überprüft, ob eine Konfluenz von 50–70 % erreicht werden konnte, bevor ein Mediumwechsel zu MEGC-Basalmedium stattfand. Die Zellen wurden für weitere 24 h in verschiedenen Sauerstoffanteilen (1 % O<sub>2</sub> [n = 5], 3 % O<sub>2</sub> [n = 5], 5 % O<sub>2</sub> [n = 5], 10 % O<sub>2</sub> [n = 5], 15 % O<sub>2</sub> [n = 5], 21 % O<sub>2</sub> [n = 7], 30 % O<sub>2</sub> [n = 5], 40 % O<sub>2</sub> [n = 5], 50 % O<sub>2</sub> [n = 5], 60 % O<sub>2</sub> [n = 5]) bei 37 °C sowie 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und im Anschluss geerntet (Abschnitt 3.2.2). Die SDS-PAGE ist in Abschnitt 3.2.4 zusammengefasst. Die Geltaschen der Gradientengele wurden zur Quantifizierung der Replikate mit jeweils 50 µg Ganzzelllysate beladen. Für die Immundetektion wurden die HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -Antikörper aus Tabelle 3.4 in den angegebenen Verdünnungen und Detektionszeiten verwendet. Die Analyse der Proteinmengen fand mit den Quotienten aus der gemessenen Signalintensität der Proteinbanden und der Signalintensität von  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle (*Housekeeping-Protein*) statt.

#### Deskriptive Western-Blot-Analyse mit Ganzzelllysaten aus HRMECs mit unterschiedlich langer Sauerstoffbehandlung

Zur qualitativen Auswertung der Proteinsignalintensität von HIF1 $\alpha$  wurden Western-Blots mit Ganzzelllysaten durchgeführt. Untersucht wurden HRMECs, die mit BLOCK-iT™ siRNA (Kontroll-siRNA) transfiziert und über 6 h, 12 h, 18 h und 24 h unter normoxischen (21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C), hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) und hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) Bedingungen inkubiert wurden. Dazu wurden 150.000 HRMECs in Zellkulturschalen (ø 10 cm) mit MEGC-Kulturmedium kultiviert. Nach 24 h wurde eine Lipofektion mit Kontroll-siRNA durchgeführt (Abschnitt 3.2.6). Die Volumina der Transfektionsreagenzien und des Zellkulturmediums orientierten sich an dem in Abschnitt 3.2.6 beschriebenen Protokoll für die 96-Lochplatte und wurde dementsprechend an die Zellkulturschalen angepasst. Nach der Transfektion wurde ein Waschschrift mit 10 ml PBS je Zellkulturschale durchgeführt, bevor die HRMECs in 7 ml MEGC-Inkubationsmedium über einen Zeitraum von 6 h, 12 h, 18 h und 24 h in 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> oder 50 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden. Die Zellernte und -lyse erfolgte nach dem Protokoll in Abschnitt 3.2.2. Die Geltaschen der Gradientengele wurden vor der SDS-PAGE mit je 50 µg Protein aus den Ganzzelllysaten beladen (Abschnitt 3.2.4). Für die Immundetektion wurden die HIF1 $\alpha$ -Antikörper aus Tabelle 3.4 mit den angegebenen Verdünnungen und Detektionszeiten verwendet. Als Ladekontrolle wurden die Signalintensitäten von  $\beta$ -Aktin gemessen.

### Deskriptive Western-Blot Analyse mit Ganzzelllysaten aus hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen HRMECs nach einer Röntgenstrahlenbehandlung

Die qualitative Auswertung der Proteinsignalintensität von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in HRMECs nach Röntgenstrahlenbehandlung wurde mit Ganzzelllysaten aus Zellkulturschalen ( $\varnothing$  6 cm) durchgeführt. Es wurden HRMECs verglichen, die entweder mit einer Energiedosis von 16 Gy bestrahlt wurden oder keine Röntgenbestrahlung erhielten, bevor die Zellen für 24 h unter normoxischen (21 % O<sub>2</sub>), hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>) oder hyperoxischen Bedingungen (50 % O<sub>2</sub>) inkubiert wurden (jeweils bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>). Dazu wurden je Zellkulturschale 90.000 HRMECs ausplattiert und für 48 h bis zu einer Konfluenz von 50-70 % in MECCG-Kulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden in dem Petri Dish Irradiator (Tabelle 3.6) mit Röntgenstrahlen behandelt. Die Bestrahlung mit einer Energiedosis von 16 Gy dauerte in Abhängigkeit von Umgebungstemperatur und -druck 1.025-1.050 s. Unbehandelte HRMECs wurden bei gleicher Umgebungstemperatur und gleichen Druckverhältnissen ohne Strahlenbehandlung (Scheinbestrahlung) inkubiert. Nach der Röntgenbestrahlung wurde das MECCG-Kulturmedium verworfen und nach einem dreifachen Waschschrift mit PBS durch MECCG-Basalmedium ersetzt. Anschließend wurden die Zellkulturschalen in einem Brutschrank mit 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> oder 50 % O<sub>2</sub> (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Versuche wurden dreifach mit drei gepoolten biologischen Replikaten je Behandlung wiederholt. Die Zellernte und -lyse erfolgte nach dem Protokoll, das in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde. Die Geltaschen der Gradientengele wurden vor der SDS-PAGE mit je 50  $\mu$ g Protein aus den gepoolten Ganzzelllysaten beladen (Abschnitt 3.2.4). Für die Immundetektion wurden die HIF1 $\alpha$ -, HIF2 $\alpha$ -, PlGF-, VEGFA-, sVEGFR1- und SDHB-Antikörper aus Tabelle 3.4 mit den angegebenen Verdünnungen und Detektionszeiten verwendet. Als Ladekontrolle wurden die Signalintensitäten von  $\beta$ -Aktin gemessen.

### **3.2.6 Lipofektion von siRNA in HRMECs**

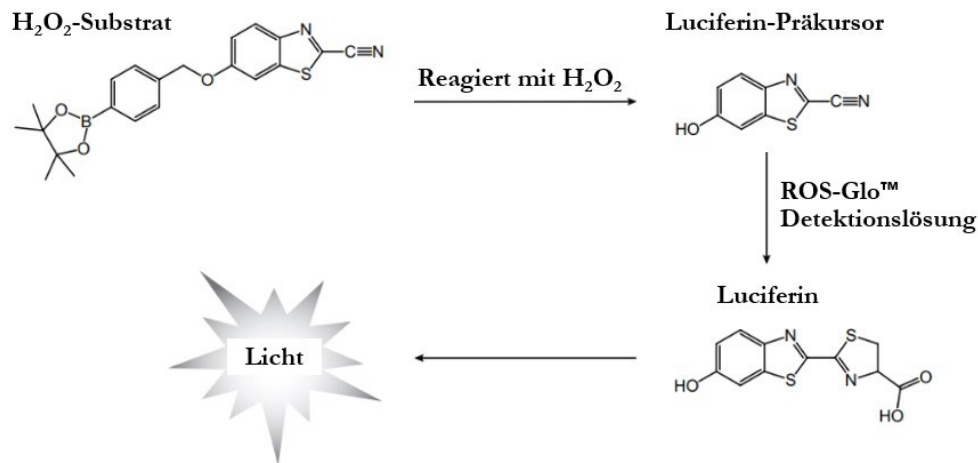
Die Lipofektion ist eine Transfektion von *small interfering RNA* (siRNA), die auf der zellulären Aufnahme von Nukleinsäure-Lipid-Komplexen (Lipoplexe) aus siRNA und kationischen Lipiden basiert [141]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Methode genutzt, um die Rolle von HIF1 $\alpha$  auf die Bildung freier Sauerstoffradikale sowie die Zellviabilität in HRMECs unter hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen Bedingungen zu untersuchen (Abschnitt 3.2.7 und Abschnitt 3.2.8).

Der *knockdown* des HIF1 $\alpha$ -Proteins wurde mithilfe von ON-TARGETplus Human HIF1A (3091) siRNA-SMARTpool (Tabelle 3.8), einem *pool* aus HIF1 $\alpha$ -siRNA mit vier verschiedenen Zielsequenzen, induziert. Als Negativ-Kontrolle wurden die Zellen mit BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo transfiziert (Tabelle 3.8), die ohne Homologie zu bekannten Genen keinen Einfluss auf die zelluläre RNA-Interferenz nehmen. Die Lipofektion der siRNA fand mit dem DharmaFECT® Transfektionsreagenz (Tabelle 3.3) statt. Das etablierte Protokoll basiert auf dem Standardprotokoll der Firma Horizon Discovery. Im Folgenden wird das Vorgehen zur Transfektion von HIF1 $\alpha$ -siRNA anhand einer Vertiefung aus der 96-Lochplatte beschrieben [142].

Zur Transfektion von HIF1 $\alpha$ -siRNA bzw. Kontroll-siRNA wurde 0,1  $\mu$ L DharmaFECT® Transfektionsreagenz in 10  $\mu$ L OptiMEM (Tabelle 3.1) gegeben. In weitere 10  $\mu$ L OptiMEM wurde HIF1 $\alpha$  siRNA bzw. Kontroll-siRNA zu einer Endkonzentration von 50 nM siRNA pipettiert. Die beiden Komponenten wurden gemischt. In diesem Transfektionsmix bildeten sich, während einer 20-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur, Lipoplexe, die anschließend in den Überstand (80  $\mu$ L MEGM-Transfektionsmedium) der HRMECs gegeben wurden. Die Endkonzentration der siRNA im Zellkulturmedium betrug 5 nM. Die Lipofektion wurde nach 6 h im Brutschrank (37 °C, 5 % O<sub>2</sub>) durch einen Mediumwechsel zu MEGM-Inkubationsmedium beendet. Nach einer Inkubationszeit von 18 h wurden die Experimente nach einem erneuten Mediumwechsel fortgesetzt (Abschnitt 3.2.7 und Abschnitt 3.2.8).

### 3.2.7 ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay

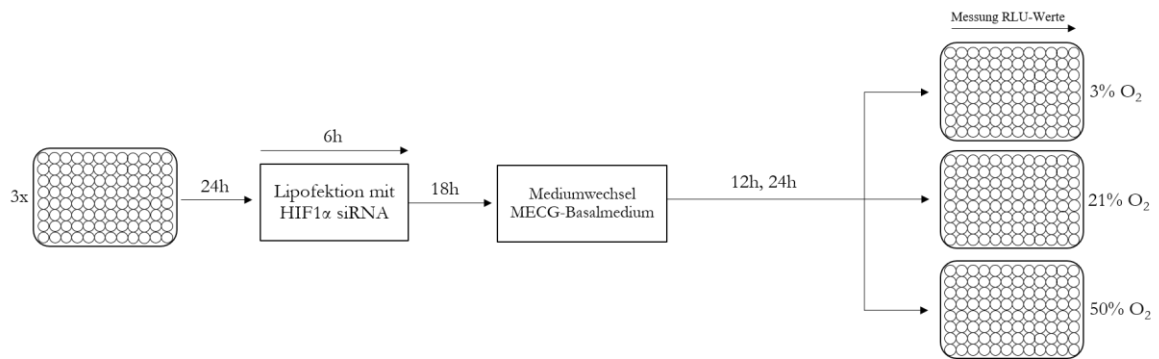
Das ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay (Tabelle 3.5) basiert auf der Spaltung eines H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substrats durch Wasserstoffperoxid, die in einer Reihe chemischer Schritte Biolumineszenz auslöst (Abbildung 3.1). Die Biolumineszenz-Intensität wurde als relative Lumineszenz-Unit (*relative luminescence unit*, RLU) gemessen. Die Signalstärke der RLU steht in Relation zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im untersuchten Zellkulturmedium und dient somit zur Bestimmung der ROS-Bildung [142]. Wasserstoffperoxid entsteht intrazellulär aus anderen Sauerstoffradikalen, die als Nebenprodukt in verschiedenen zellulären Stoffwechselwegen wie der mitochondrialen Atmungskette gebildet werden (Abschnitt 2.5). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist ein membrandurchlässiges Molekül mit vergleichsweise langer Halbwertszeit und wird deshalb zur Analyse der zellulären ROS-Produktion genutzt [143, 144].



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der chemischen Reaktionen im ROS-Glo<sup>TM</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay.** Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substrat reagiert mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem Luciferin-Präkursor. Durch Zugabe von ROS-Glo<sup>TM</sup> Detektionslösung mit D-Cystein und Ultra-Glo<sup>TM</sup> Luciferase entsteht Luciferin, welches durch die enzymatische Aktivität der Luciferase zu Oxyluciferin gespalten wird. Dabei wird Energie in Form von detektierbarem lumineszierendem Licht freigesetzt. ROS: reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies.

### ROS-Glo<sup>TM</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assays auf der 96-Lochplatte

Die Semiquantifizierung von Wasserstoffperoxid im Zellkulturüberstand von HRMECs wurde auf weißen, opaken 96-Lochplatten (Tabelle 3.5) nach der Transfektion mit ON-TARGETplus Human HIF1A (3091) siRNA-SMARTpool (HIF1 $\alpha$ -siRNA) bzw. BLOCK-iT<sup>TM</sup> Fluorescent Oligo (Kontroll-siRNA) durchgeführt. Die HRMECs wurden zuvor über 12 h bzw. 24 h in 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub> (jeweils bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) im Brutschrank inkubiert. Abbildung 3.2 illustriert den experimentellen Aufbau. Je 96-Lochplatte wurden in 8 Vertiefungen 2.000 HRMECs ausplattiert und über 24 h in 200  $\mu$ L MECG-Kulturmedium kultiviert. Die Transfektion mit HIF1 $\alpha$ -siRNA und Kontroll-siRNA ist in Abschnitt 3.2.6 beschrieben. Die Zellen wurden 6 h nach Zugabe der Lipoplexe für weitere 18 h in MECG-Basalmedium inkubiert. Nach einem dreifachen Waschschrift mit PBS erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ L MECG-Basalmedium und die Verteilung der 96-Lochplatten auf die Brutschränke mit unterschiedlichem Sauerstoffanteilen (3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub>) bei gleicher Temperatur (37 °C) und gleichem CO<sub>2</sub>-Anteil (5 %). Um die HRMECs im gleichen Versuchsdurchlauf unter hypoxischen, normoxischen oder hyperoxischen Bedingungen zu inkubieren, wurden die Zellen auf drei 96-Lochplatten ausplattiert. Die Vervollständigung des lytischen ROS-Glo<sup>TM</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assays durch Zugabe von 100  $\mu$ L ROS-Glo<sup>TM</sup> Detektionslösung erfolgte nach 12 h und 24 h. Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substrat wurde 6 h vor der ROS-Glo<sup>TM</sup> Detektionslösung bis zu einer Endkonzentration von 125  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substrat je Vertiefung hinzu pipettiert.



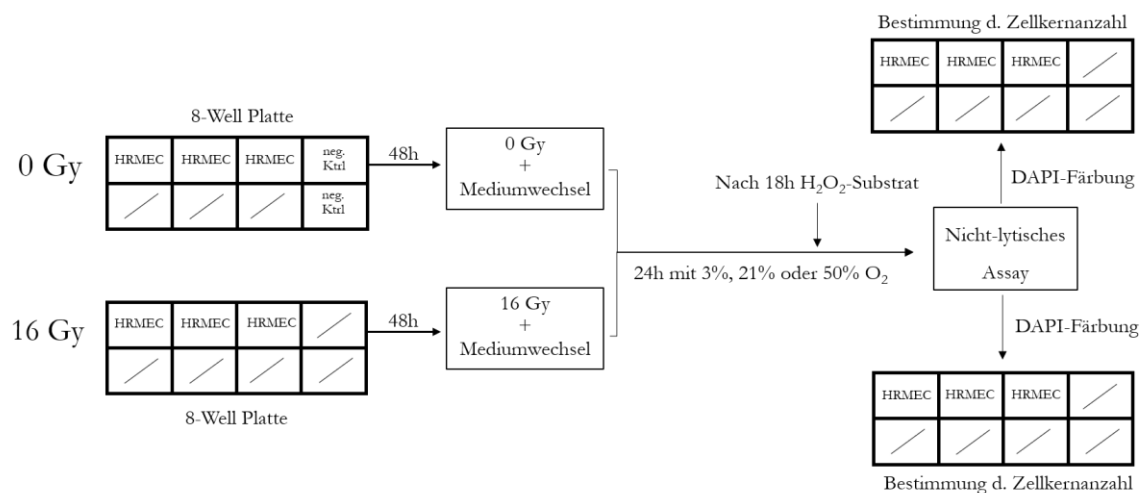
**Abbildung 3.2: Lytische ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assays auf 96-Lochplatten.** HRMECs wurden nach der Lipofektion mit ON-TARGETplus Human HIF1A (3091) siRNA-SMARTpool (HIF1 $\alpha$ -siRNA) bzw. BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo (Kontroll-siRNA) in Brutschränken mit einem Sauerstoffanteil von 3 %, 21 % oder 50 % (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Das Protokoll zur Lipofektion wurde in Abschnitt 3.2.6 beschrieben. Nach der Zugabe von MECC-Basalmedium wurden die HRMECs auf Brutschränke mit unterschiedlichen O<sub>2</sub>-Bedingungen verteilt. Die Messung der RLU-Werte fand nach 12 h bzw. 24 h statt. HIF1 $\alpha$ : hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, MECC: microvascular endothelial cell growth, RLU: Relative Lumineszenz-Unit, ROS: reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies, siRNA: small interfering ribonucleic acid.

Bei allen Versuchsdurchläufen wurden mindestens drei Vertiefungen mit MECC-Basalmedium ohne HRMECs mitgeführt. Die entsprechenden RLU-Werte wurden von den gemessenen RLU-Werten in Vertiefungen mit Zellen subtrahiert, um den Einfluss der Sauerstoffbehandlung auf das Zellkulturmedium als Negativkontrolle zu berücksichtigen.

#### ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assays auf der 8-Well $\mu$ -slide

Das ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assay wurde angewandt, um die Bildung von Wasserstoffperoxid in HRMECs nach der Röntgenstrahlenbehandlung mit einer Energiedosis von 16 Gy und der anschließenden Inkubation unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) bzw. hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen zu vergleichen. Hierzu wurden 4.800 Zellen pro Vertiefung auf einer 8-Well  $\mu$ -slide (Tabelle 3.5) über einen Zeitraum von 48 h in 300  $\mu$ L MECC-Kulturmedium kultiviert, bis eine Konfluenz von 50–60 % erreicht wurde (Abbildung 3.3). Die scheinbestrahlten HRMECs wurden bei Raumtemperatur und gleichen Druckverhältnissen inkubiert. Nach der Röntgenbestrahlung wurde das MECC-Kulturmedium verworfen und nach einem dreifachen Waschschrift mit jeweils 400  $\mu$ L PBS durch 160  $\mu$ L MECC-Basalmedium ersetzt. Anschließend wurden die  $\mu$ -slides in einem Brutschrank mit 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> oder 50 % O<sub>2</sub> (jeweils bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert.

Nach 18 h wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substrat-Lösung in das Zellkulturmedium hinzugegeben (Endkonzentration 125 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substrat). Nach weiteren 6 h Inkubation wurde 50 µL Überstand aus jeweils einer Vertiefung der 8-Well µ-slide auf zwei Vertiefungen (Doppelbestimmung) einer weißen, opaken 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und 50 µL ROS-Glo™ Detektionslösung hinzugegeben. Nach 20 min bei Raumtemperatur wurden die RLU-Werte bestimmt. Bei den Versuchsdurchläufen wurden zwei Vertiefungen mit MECCG-Basalmedium ohne HRMECs mitgeführt. Die entsprechenden RLU-Werte wurden von den gemessenen RLU-Werten mit Zellen subtrahiert. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die gemessene relative Lumineszenz im konditionierten Zellkulturmedium mit der Zellkernzahl in der untersuchten Vertiefung normiert. Die Bestimmung der Zellkernzahl wurde in Abschnitt 3.2.9 beschrieben. Die Replikate wurden als Doppel- bis Dreifachbestimmung (technische Replikate) mindestens dreifach wiederholt (biologische Replikate), sodass sieben bis acht Replikate je Behandlung für die statistische Datenauswertung zur Verfügung standen.



**Abbildung 3.3: Nicht-lytische ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assays auf 8-Well µ-slides.** HRMECs wurden über zwei Tage kultiviert, bevor sie mit einer Energiedosis von 16 Gy bestrahlt wurden oder ohne Strahlenbehandlung unter gleichen Druck- und Temperaturverhältnissen inkubiert wurden. Nach einem Waschschrift mit PBS folgte ein Mediumwechsel zu MECCG-Basalmedium und die Überführung in Brutschränke mit 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> oder 50 % O<sub>2</sub> (bei jeweils 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>). Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substrat wurde nach 18 h in das Zellkulturmedium gegeben. Die Messung des relativen Lumineszenzsignals erfolgte nach weiteren 6 h Inkubation. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, MECCG: microvascular endothelial cell growth, neg. Ktrl.: Negativkontrolle, PBS: phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung, ROS: reactive oxygen species, reactive Sauerstoffspezies.

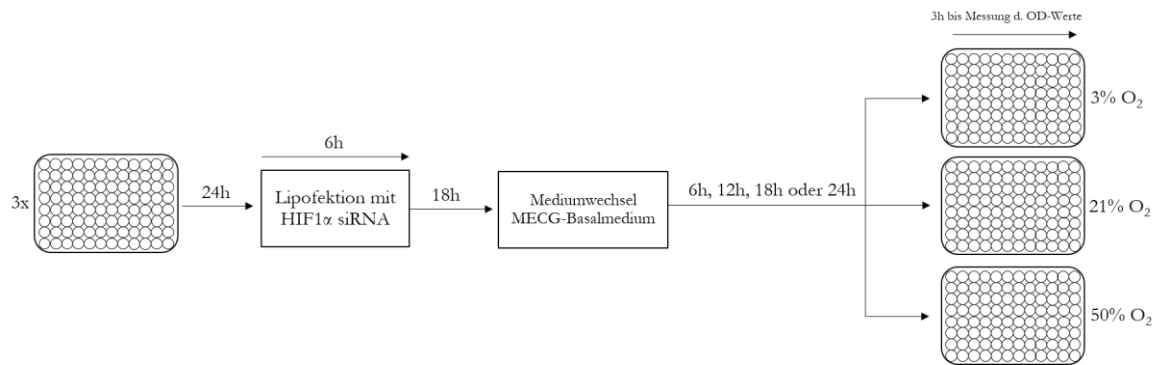
### 3.2.8 Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay

Das MTT-Assay basiert auf dem Farbumschlag des Mono-Tetrazolium-Salz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT). Der Farbstoff wird in Mitochondrien, aber auch anderen Zellorganellen, mittels Reduktionsäquivalenten wie NADH und NADPH durch eine Vielzahl von Interaktionspartnern (Oxidoreduktasen, Dehydrogenasen und Peroxidasen) zu Formazan reduziert. Die Messung der Zellviabilität erfolgt daher anhand der metabolischen Reduktionskapazität [145–147].

#### MTT-Assays auf 96-Lochplatten

Die MTT-Assays wurden genutzt, um die Zellviabilität in HRMECs nach *knockdown* der HIF1 $\alpha$ -mRNA mit anschließender Inkubation unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) oder hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Sauerstoffverhältnissen zu messen. Der experimentelle Ablauf ist in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt. Je 96-Lochplatte wurden in 12 Vertiefungen jeweils 2.000 HRMECs ausplattiert und über 24 h in 200  $\mu$ L MECCG-Kulturmedium kultiviert. Anschließend erfolgte die Lipofektion, wobei sechs Vertiefungen mit ON-TARGETplus Human HIF1A (3091) siRNA-SMARTpool und sechs Vertiefungen mit BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo behandelt wurden. Die Zellen wurden 6 h nach Zugabe der Lipoplexe für weitere 18 h in MECCG-Basalmedium inkubiert. Nach einem dreifachen Waschschrift mit PBS erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ L MECCG-Basalmedium und die Verteilung der 96-Lochplatten auf die Brutschränke mit unterschiedlichen Sauerstoffanteilen (3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub>) bei gleicher Temperatur (37 °C) und gleichem CO<sub>2</sub>-Anteil (5 %). Die Zugabe der MTT-Lösung mit einer Endkonzentration von 1,44 mM MTT (Tabelle 3.3) erfolgte nach 6 h, 12 h, 18 h oder 24 h. Die Inkubation der mit MTT behandelten Zellen fand über einen Zeitraum von 3 h in den jeweiligen Brutschränken statt. Der Überstand wurde anschließend verworfen und durch 100  $\mu$ L DMSO ersetzt (Tabelle 3.3). Die OD-Werte wurden mit einem 96-Lochplattenleser bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt (Tabelle 3.6).

Die technischen Replikate (n = 6 je Sauerstoffumgebung) wurden dreifach (biologische Replikate) wiederholt. Für die statistische Auswertung wurden die OD-Werte von behandelten HRMECs auf die gemittelten OD-Werte der normoxischen HRMECs mit Kontroll-siRNA normiert. Für Vertiefungen, in denen mittels Durchlichtmikroskop eine abweichende Zellzahl festgestellt wurde, wurde keine Auswertung vorgenommen.

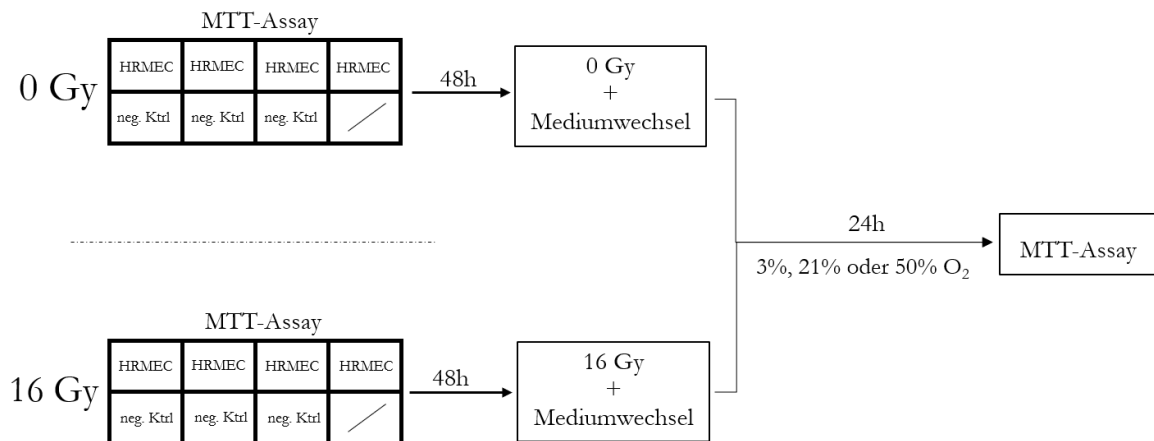


**Abbildung 3.4: MTT-Assays auf 96-Lochplatten nach Lipofektion mit siRNA.** Die HRMECs wurden auf 96-Lochplatten ausgesät und nach 24 h mit ON-TARGETplus Human HIF1A (3091) siRNA-SMARTpool (HIF1 $\alpha$ -siRNA) oder BLOCK-iT<sup>TM</sup> Fluorescent Oligo (Kontroll-siRNA) für 6 h in Transfektionsmedium inkubiert. Nach 18 h wurde ein Mediumwechsel zu MECC-Basalmedium vorgenommen. Die Zellen wurden im Anschluss auf Brutschränke mit unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen verteilt (3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> oder 50 % O<sub>2</sub> bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>). Die Zugabe von MTT erfolgte nach 6 h, 12 h, 18 h und 24 h. Die OD-Werte wurden nach weiteren 3 h Inkubation mittels 96-Lochplattenleser bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt. HIF1 $\alpha$ : hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, MECC: microvascular endothelial cell growth, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, OD: optische Dichte, siRNA: small interfering ribonucleic acid.

### MTT-Assays auf 8-Well $\mu$ -slides

Zur Bestimmung der Zellviabilität von bestrahlten und scheinbestrahlten HRMECs mit anschließender Inkubation in 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub> wurden MTT-Assays auf 8-Well  $\mu$ -slides durchgeführt. Der experimentelle Ablauf ähnelt dem in Abschnitt 3.2.7 beschriebenen Protokoll des ROS-Glo<sup>TM</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assays und ist in Abbildung 3.5 schematisch dargestellt. Auf vier Vertiefungen wurden jeweils 4.800 HRMECs in 300  $\mu$ L MECC-Kulturmedium verteilt. Drei Vertiefungen dienten als Negativkontrolle und enthielten ausschließlich Zellkulturmedium. Nach 48 h wurden die Zellen in 200  $\mu$ L MECC-Kulturmedium mit 16 Gy bestrahlt oder ohne Röntgenbestrahlung bei gleichen Druck- und Temperaturverhältnissen inkubiert. Es folgte ein dreifacher Waschschriff mit 400  $\mu$ L PBS. Der Überstand wurde anschließend durch 200  $\mu$ L MECC-Basalmedium je Vertiefung ersetzt, bevor die 8-Well  $\mu$ -slides auf Brutschränke mit Sauerstoffanteilen von 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> oder 50 % O<sub>2</sub> bei gleicher Temperatur (37 °C) und gleichem CO<sub>2</sub>-Anteil (5 %) verteilt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden 40  $\mu$ L einer 12 mM MTT-Lösung für 3 h in die Vertiefungen hinzupipettiert. Der Überstand wurde verworfen und durch 200  $\mu$ L DMSO ersetzt. Aus dem DMSO-Überstand mit dem gelösten Formazan wurden zweimal je 50  $\mu$ L auf zwei Vertiefungen einer 96-Lochplatte übertragen und die OD-Werte der Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einem 96-Lochplattenleser (Tabelle 3.5) bestimmt. Die MTT-Assays wurden mit mindestens vier

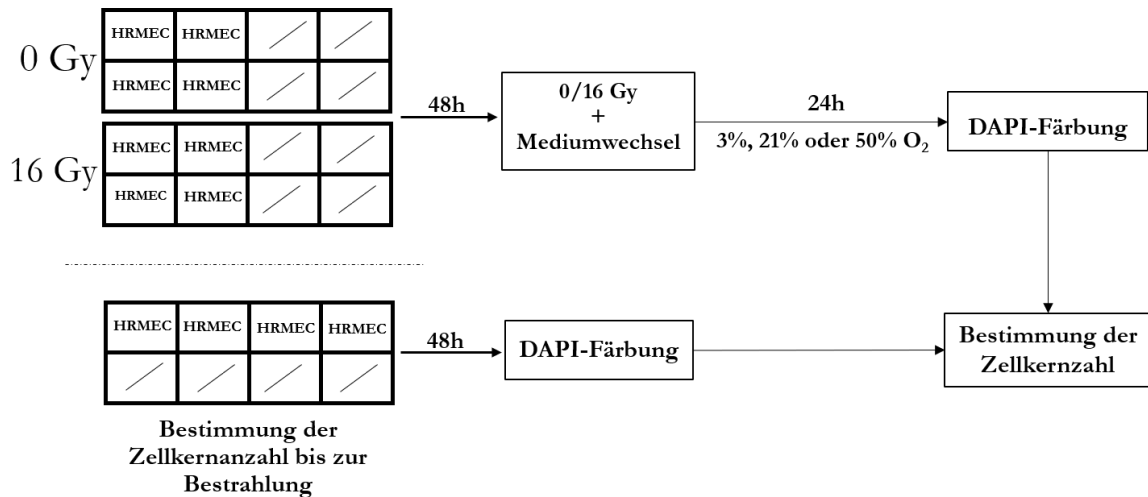
technischen Replikaten dreifach wiederholt (3 % O<sub>2</sub>: n<sub>0 Gy</sub> = 11, n<sub>16 Gy</sub> = 11; 21 % O<sub>2</sub>: n<sub>0 Gy</sub> = 13, n<sub>16 Gy</sub> = 13; 50 % O<sub>2</sub>: n<sub>0 Gy</sub> = 12, n<sub>16 Gy</sub> = 12).



**Abbildung 3.5: MTT-Assays auf 8-Well  $\mu$ -slides mit bzw. ohne Röntgenbestrahlung.** HRMECs wurden 48 h in MECC-Kulturmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen einer Röntgenbestrahlung mit 16 Gy ausgesetzt oder unter den gleichen Temperatur- und Druckverhältnissen bei Raumtemperatur inkubiert. Die bestrahlten bzw. scheinbestrahlten HRMECs wurden in MECC-Basalmedium in Brutschränken mit einem Sauerstoffanteil von 3 %, 21 % oder 50 % O<sub>2</sub> (bei jeweils 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Zugabe von 12 mM MTT (Endkonzentration 1,44 mM) erfolgte nach 24 h. Die OD-Werte wurden nach weiteren 3 h Inkubation mittels 96-Lochplattenleser bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt. HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, MECC: microvascular endothelial cell growth, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid, neg. Ktrl: Negativkontrolle.

### 3.2.9 Quantifizierung der Zellzahl mittels DAPI-Färbung in 8-Well $\mu$ -slides

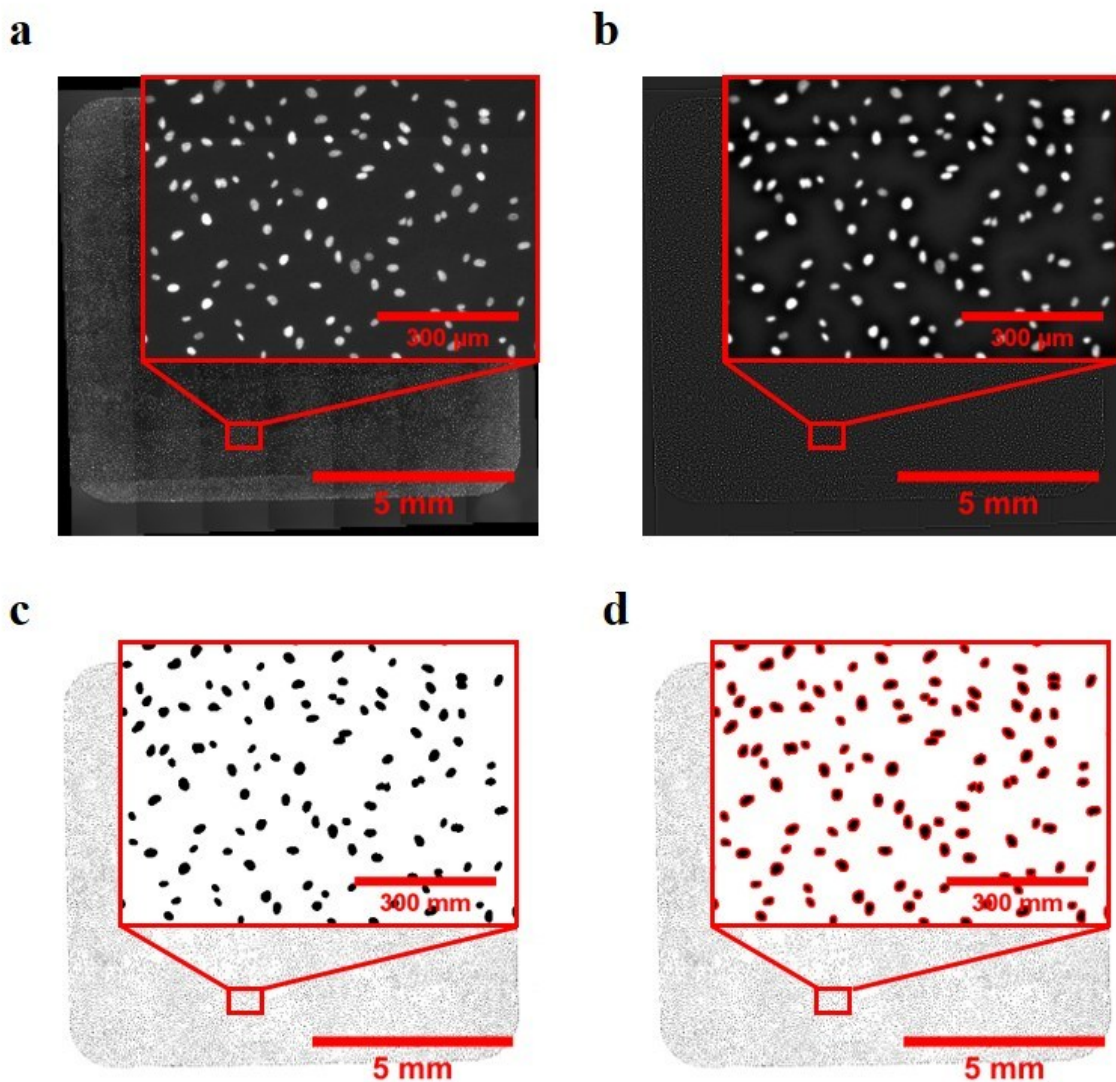
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff (Tabelle 3.3), der ein Absorptionsmaximum bei 358 nm aufweist und in AT-reiche Regionen der DNA interkaliert [148]. Durch die DAPI-abhängige Bestimmung der Zellzahl konnten Rückschlüsse auf die Zellteilung der HRMECs gezogen werden. Die Anzahl der ausgezählten Zellkerne stimmte dabei mit der ermittelten Zellzahl im Durchlichtmikroskop (Tabelle 3.6) überein, die mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt wurde (Daten nicht gezeigt). Untersucht wurde die Anzahl der Zellkerne nach Röntgenbestrahlung mit 16 Gy bzw. Scheinbestrahlung und Inkubation in 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub> (bei je 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) über einen Zeitraum von 24 h. Die Zellkerne wurden darüber hinaus bei den in den Abschnitten 3.2.7 und 3.2.11 beschriebenen Experimenten ausgezählt, um die gemessenen RLU-Werte bzw. Proteinkonzentrationen in Relation zur Anzahl der HRMECs zu setzen. Für die Experimente wurden 4.800 HRMECs in vier Vertiefungen auf je drei 8-Well  $\mu$ -slides verteilt (Abbildung 3.6). Die Zellen wurden für 48 h in je 300  $\mu$ L MECC-Kulturmedium kultiviert, bis eine Konfluenz von 50 bis 60 % erreicht wurde.



**Abbildung 3.6: DAPI-abhängige Bestimmung der Zellzahl auf 8-Well  $\mu$ -slides mit bzw. ohne Röntgenbestrahlung.** HRMECs wurden auf  $3 \times 8$ -Well  $\mu$ -slides ausgesät und 48 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Eines der  $\mu$ -slides wurde nach 48 h in 4 % PFA in PBS fixiert und mit DAPI angefärbt. Sie wurde zur Bestimmung der Zellkernanzahl vor Beginn der Strahlenbehandlung genutzt. Die übrigen zwei  $\mu$ -slides wurden entweder mit 16 Gy bestrahlt oder über denselben Zeitraum bei gleichen Temperatur- und Druckverhältnissen inkubiert. Nach einem dreifachen Waschschrift mit PBS wurde MECG-Basalmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend über einen Zeitraum von 24 h in 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> oder 50 % O<sub>2</sub> (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert, bevor sie ebenfalls fixiert und angefärbt wurden. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, MECG: microvascular endothelial cell growth, PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, phosphate buffered saline, PFA: Paraformaldehyd.

Auf einer der drei 8-Well  $\mu$ -slides wurden die HRMECs mit einer Energiedosis von 16 Gy in einem Petri Dish Irradiator bestrahlt (Tabelle 3.6). Die unbehandelten Zellen auf der zweiten 8-Well  $\mu$ -slide wurden bei identischen Temperatur- und Druckverhältnissen inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in den Vertiefungen verworfen. Es folgte ein dreifacher Waschschrift mit 400  $\mu$ L PBS, bevor MECG-Basalmedium (200  $\mu$ L) hinzugegeben wurde. Die 8-Well  $\mu$ -slides wurden entweder unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) oder hyperoxischen Bedingungen (50 % O<sub>2</sub>, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert und nach 24 h in 4 % PFA in PBS fixiert (Tabelle 3.3). Die HRMECs der dritten 8-Well  $\mu$ -slide wurden bereits vor der Strahlenbehandlung bzw. Scheinbestrahlung mit 4 % PFA in PBS fixiert. Die gemittelte Zellkernzahl aus diesen vier Vertiefungen repräsentiert die Zellzahl vor Beginn der Strahlenbehandlung und dient in der statistischen Analyse als Bezugswert. Es folgte ein dreifacher Waschschrift mit 400  $\mu$ L PBS je Vertiefung, bevor 200  $\mu$ L 0,1 % Triton-x in PBS hinzugegeben und 10 min inkubiert wurde (Tabelle 3.3). Triton-x permeabilisiert als Detergenz die Membran der Zellen und verbessert auf diese Weise die Zugänglichkeit des DAPI-Farbstoffs. Nach einem weiteren dreifachen Waschschrift wurden die HRMECs für 10 min in 5 mg/mL DAPI in PBS inkubiert und anschließend mit Ibidi Mounting Medium

überschichtet (Tabelle 3.3). Die Anregung des Farbstoffs erfolgte bei einer Wellenlänge von 350 nm. Die mikroskopischen Aufnahmen der DAPI-gefärbten Zellkerne wurden mit dem DMI6000 Mikroskop (Tabelle 3.6) durchgeführt. Um die gesamten Vertiefungen mit hoher Auflösung visualisieren zu können, wurde die Merge-Funktion des Leica LASA AF Programms genutzt (Tabelle 3.7). Diese Funktion ermöglicht es ein Feld aus  $7 \times 9$  Einzelbildern mit dem  $10\times$  Objektiv aufzunehmen und zu einem Gesamtbild zusammenzusetzen.



**Abbildung 3.7: Quantitative Bestimmung der Zellkernzahl mittels ImageJ.** a) Zusammengefügtes Gesamtbild ( $7 \times 9$  Einzelaufnahmen). Rot umkreistes Rechteck stellt die Nahaufnahme eines Areals aus dem Gesamtbild dar. b) FFT-Bandpassfilter Plugin zur algorithmischen Angleichung der Grauwerte des Hintergrunds bzw. der fluoreszierenden Areale. c) Umwandlung der Aufnahme in ein 8-bit Format mit threshold-Funktion. d) Trennung dicht einander liegender Zellkerne mittels watershed-Funktion und automatisierte Bestimmung der Zellkernzahl. Rot umkreiste schwarze Areale stellen die ausgezählten Zellkerne dar.

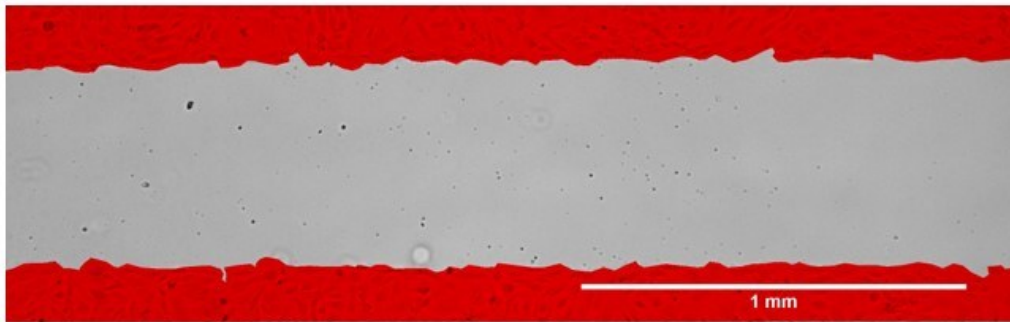
Die Bearbeitung der zusammengesetzten Einzelbilder wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ durchgeführt und in Abbildung 3.8 dargestellt (Tabelle 3.7). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden zunächst mit dem Plugin *FFT Bandpassfilter* bearbeitet, der die Grauwerte des Hintergrunds bzw. der fluoreszierenden Zellkerne untereinander angleicht. Die 16-bit Aufnahmen wurden anschließend mittels *threshol*-Funktion auf 8-bit Aufnahmen mit zwei Pixelintensitäten reduziert. Alle Pixel-Grauwerte oberhalb eines empirisch ermittelten Wertes (20.000 bei einem Maximalwert von 65.535) wurden als Bereich des fluoreszierenden Zellkerns definiert. Die darunter liegenden Grauwerte bildeten den Hintergrund ab. Aneinandergrenzende Zellkerne wurden mit der Funktion *watershed separation method* als individuelle Einheiten voneinander getrennt. Die Auszählung der Zellkerne fand schließlich mit dem Plugin *analyze particles* statt. Die Minimalgröße eines Zellkerns wurde mit zehn Quadratpixeln definiert, um Artefakte und Zellfragmente auszuschließen. Die vier technischen Replikate wurden bei allen Behandlungen dreifach wiederholt.

### **3.2.10 *In-vitro* Zellmigrationsassay**

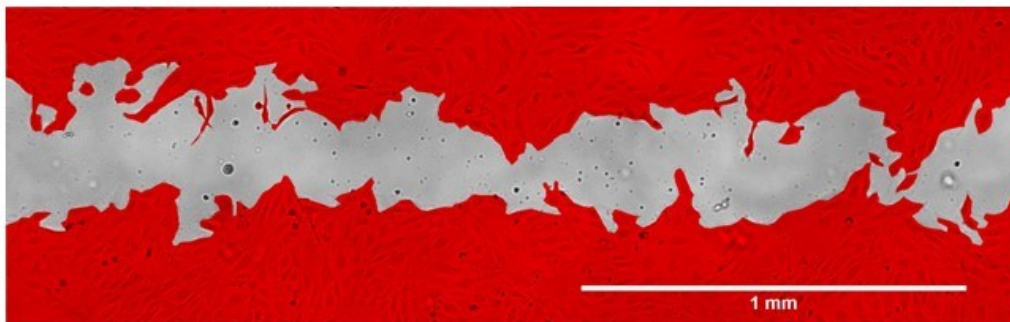
Zur Bestimmung des Einflusses von Röntgenstrahlenbehandlung und Sauerstoffgehalt auf die Motilität von HRMECs wurden *in-vitro* Zellmigrationsassays durchgeführt [149]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit 2-Well Culture-Inserts gearbeitet und diese auf 8-Well  $\mu$ -slides aufgelegt (Tabelle 3.5). Je Insert-Kammer wurden 7.000 HRMECs in MECCG-Kulturmedium ausplattiert und für 24 Stunden kultiviert, sodass ein konfluenter Zellrasen vorlag. Um während der Zellmigrationsphase die Proliferation der Zellen zu minimieren, erfolgte ein Mediumwechsel zu MECCG-Kulturmedium mit 1 % fetalem Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS) für 24 Stunden unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) oder hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) Bedingungen. Die Röntgenbestrahlung der HRMECs wurde mit dem Petri Dish Irradiator durchgeführt, während die Zellen ohne Strahlenbehandlung unter denselben Temperatur- und Druckverhältnissen inkubiert wurden. Dabei erfolgte die Bestrahlung der HRMECs aus technischen Gründen unter normoxischen Bedingungen. Nach Zugabe von MECCG-Zellkulturmedium mit 1 % FBS wurden mikroskopische Aufnahmen des nun freiliegenden Areals zwischen den beiden Insert-Kammern aufgenommen (Abbildung 3.8a). Die 8-Well  $\mu$ -slides wurden für weitere 9 h bei vorherigem Sauerstoffanteil (3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> oder 50 % O<sub>2</sub>) inkubiert, bevor eine weitere mikroskopische Aufnahme durchgeführt wurde

(Abbildung 3.8b). Zur Quantifizierung der Zellmotilität wurde die *region of interest* (ROI)-Funktion in ImageJ genutzt. Konfluente Regionen entlang des Spaltes zwischen den Insert-Kammern wurden markiert und durch die Fläche zum Start des Experiments dividiert. Je Versuchsdurchführung wurden zwei bis drei technische Replikate untersucht. Die Experimente wurden dreifach wiederholt, sodass mindestens sechs Replikate je Behandlung ausgewertet werden konnten.

**a**



**b**



**Abbildung 3.8: In-vitro Zellmigrationsassays mit 2-Well Culture-Inserts auf 8-Well  $\mu$ -slides mit bzw. ohne Röntgenstrahlenbehandlung.** HRMECs wurden 24 h in MCEG-Kulturmedium mit 5 % FBS in Culture-Inserts kultiviert. Bei einer Konfluenz von 100 % wurden die Zellen in MCEG-Kulturmedium mit 1 % FBS unter hypoxischen (3 %  $O_2$ ), normoxischen (21 %  $O_2$ ) und hyperoxischen (50 %  $O_2$ ) Bedingungen inkubiert, um die Zellproliferation zu minimieren. Es folgte die Röntgenbestrahlung der HRMECs mit 16 Gy oder eine Inkubation unter den gleichen Druck- und Temperaturverhältnissen. (a) zeigt eine mikroskopische Aufnahme von hyperoxischen HRMECs zum Startzeitpunkt des Zellmigrationsassays. Nach weiteren 9 h Inkubation unter hyperoxischen Sauerstoffbedingungen folgte die zweite mikroskopische Aufnahme (b). Die Fläche des rot markierten Zellrasens wurde mittels *region of interest* (ROI)-Funktion der ImageJ Analysesoftware berechnet. FBS: fetal bovine serum, fetales Kälberserum, HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, MCEG: microvascular endothelial cell growth.

### **3.2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration von sVEGFR1, PlGF und VEGFA mittels ELISA**

Zur Quantifizierung von Proteinen, die die Zellproliferation, -migration und Angiogenese von HRMECs maßgeblich regulieren, wurden *sandwich enzyme-linked immunosorbent assays* (Sandwich-ELISAs) mit dem Zellkulturüberstand von HRMECs aus 8-Well  $\mu$ -slides durchgeführt (Tabelle 3.5) [150]. Die Zellen wurden entweder mit 16 Gy Röntgenstrahlung behandelt oder bei gleichen Temperatur- und Druckverhältnissen inkubiert. Es folgten 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) oder hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen in MECCG-Basalmedium. Das Protokoll zur Kultivierung der HRMECs auf 8-Well  $\mu$ -slides und deren Behandlung mit Röntgenstrahlung und verschiedenen Sauerstoffanteilen wurde in den Abschnitten 4.2.7 bis 4.2.9 beschrieben. Nachdem die Inkubation unter hypoxischen, normoxischen bzw. hyperoxischen Bedingungen nach 24 h abgeschlossen wurde, konnte der Überstand aus konditioniertem Zellkulturmedium in 1,5 mL Reaktionsgefäßen gesammelt werden (Tabelle 3.5). Die Proben wurden anschließend bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration von sVEGFR1, PlGF und VEGFA mittels ELISAs bei -60 °C aufbewahrt. Neben der Konzentration der sekretierten Proteine wurde die Zellzahl in den Vertiefungen ausgewertet, aus denen das konditionierte Zellkulturmedium abgenommen wurde. Die Zellzahl wurde anhand der DAPI-abhängige Zellkernanzahl bestimmt (Abschnitt 3.2.9). Die Replikate (dreifach wiederholt bis  $n_{sFlt-1} = 8-12$  bzw.  $n_{PlGF} = 6-11$  je Behandlungsgruppe) wurden auf der ELISA-Platte als Doppelbestimmung aufgetragen. Da in HRMECs keine Proteinsekretion von VEGFA beobachtet werden konnte, wurde keine Wiederholung des VEGFA-ELISAs durchgeführt.

### **3.2.12 Massenspektrometrische Analyse**

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine analytische Technik, die nach Ionisation der Analyten sowohl qualitative (Struktur) als auch quantitative (Molekülmasse oder Konzentration) Informationen liefern kann [151]. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Genomische Instabilität und Proteom-Analytik“ der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) wurde das Proteom von HRMECs mit massenspektrometrischen Analysemethoden untersucht.

### Inkubation der HRMECs unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Die HRMECs wurden entsprechend des in Abschnitt 3.2.5 („Semi quantitative Western-Blot Analyse mit Ganzzelllysaten aus hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen HRMECs“) beschriebenen Protokolls bei 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> oder 50 % O<sub>2</sub> für 24 h inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Die Zellernte wurde mit einem Zellschaber in eiskaltem PBS durchgeführt. Es folgte ein dreifacher Waschschrift in eiskaltem PBS mit Zentrifugation der Zellsuspension (200 g, 5 min bei Raumtemperatur). Insgesamt wurden fünf Proben je Sauerstoffbehandlung für die massenspektrometrischen Analysen ausgewertet.

### High-performance liquid chromatography (HPLC) und electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS/MS)

Die Vorbereitung der Ganzzelllysate sowie die Anwendung von HPLC und ESI-MS/MS erfolgte durch Julia Horn aus der chirurgischen Forschung der Klinik für Chirurgie. Zur Probenaufbereitung wurde das EasyPep<sup>®</sup> MS Sample Prep Kit verwendet (Tabelle 3.3) [152]. Die Zellpellets wurden zunächst bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 20 µL Lysepuffer hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C eingefroren. Sobald alle Proben vorlagen, wurde das Zelllysate wieder aufgetaut und 30 µL Lysepuffer mit 1 µL Universal-Nuklease hinzupipettiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Pierce<sup>™</sup> Mikrotiterplate BCA Protein Assay Kit (Tabelle 3.3). Das Protokoll des Assays entspricht den Herstellerangaben [153]. Es basiert auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> durch Proteine in alkalischen Lösungen und dem kolorimetrischen Nachweis der Kupfer(I)-Kationen mittels Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) [154]. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand eines BSA-Standards. Das Protokoll des EasyPep<sup>®</sup> MS Sample Prep Kit wurde mit 100 µg Protein in 100 µL Lysepuffer fortgesetzt. Es folgte die Reduktion der Disulfidbrücken in Reduktionslösung und die Alkylierung der entstandenen Thiolgruppen in Alkylierungslösung. Der Verdauungsprozess der Peptide wurde durch die Zugabe von Trypsin/Lys-C-Mix vervollständigt. Die Peptidmischung wurde auf die Peptid-Cleanup-Säule geladen. Die Aufreinigung der Proben von hydrophilen/hydrophoben Verunreinigungen und unerwünschten Biomolekülen fand durch Zentrifugation in mehreren Waschpuffern statt. Die Proben wurden anschließend lyophilisiert und bei -80 °C eingefroren.

Die chromatographische Trennung und Aufbereitung der Peptide nach Hydrophobizität erfolgte mittels Dionex UltiMate 3000 HPLC, die dem Massenspektrometer (TripleTOF 5600+) vorgeschaltet wurde (Tabelle 3.6). Die Proben wurden in 90 µL H<sub>2</sub>O mit 0,1 % Methansäure (Lösung A) gelöst, 1 min im Ultraschallbad inkubiert und anschließend 3 min bei 14.000 g zentrifugiert. Die rekonstituierte Peptidmischung wurde auf der Trap-Säule (Tabelle 3.6) entsalzen und vorkonzentriert (10 µL/min, 4 min), bevor die Auftrennung nach Hydrophobizität auf der HPLC-Säule mit einem graduellen Anstieg von Lösung B (0,1 % Methansäure in Acetonitril) in Lösung A stattfand (eluiert über 86 min bei 5 µL/min). Die im HPLC-Eluat gelösten Peptide wurden mittels ESI ionisiert und aus der Lösung in die Gasphase überführt, bevor die Trennung der Ionen nach Masse-zu-Ladung (m/z) erfolgte (Tabelle 3.6). Die Datenerfassung geschah im *data-independent acquisition* (DIA, SWATH)-Modus [155].

Die massenspektrometrischen Parameter sind hier zusammengefasst und wurden bereits durch die Arbeitsgruppe „Genomische Instabilität und Proteom-Analytik“ für ähnliche Analysen veröffentlicht [156, 157]: *ion spray voltage floating*, 5000 V; *ion source gas*, 15; *ion source gas*, 0; *curtain gas*, 30; Quellentemperatur, 0 °C. Das optimierte Declustering-Potential (DP) wurde auf 100 V gesetzt; Kollisionsenergie auf 19,2; *collision energy spread* (CES), 5,0; *ion release delay*, 67; *ion release width*, 25. Für die Datenerfassung wurde ein MS-Scan von 0,049965 s (m/z 350–1250 Da) durchgeführt, gefolgt von 100 variablen Q1-Fenstern mit einer Fensterbreite von 5–91,3 Da, jeweils mit 0,030 s Akkumulationszeit und CES von 5 eV. Die Precursor-Isolationsfenster wurden mit dem SWATH Variable Window Calculator v1.1 (AB Sciex) auf Basis von Precursor-m/z-Dichten aus *data-dependent acquisition* (DDA)-Spektren definiert.

### Präprozessierung und Datenanalyse

Die Präprozessierung der SWATH-Rohdaten sowie die Datenanalyse der Proteinquantitäten erfolgten durch M.Sc. Thorben Sauer aus der Arbeitsgruppe „Genomische Instabilität und Proteom-Analytik“. Die Arbeitsschritte wurden bereits veröffentlicht und für die detektierten Peptide aus HRMECs wiederholt [156, 157]. Die Rohdaten wurden mit DIA-NN v1.7.16 (*data-independent acquisition by neural networks*) nach Demichev et al. verarbeitet (Tabelle 3.7) [158]. Die Software wurde im *high-accuracy LC* Modus mit angewählter *real-time* (RT) *cross-normalization* genutzt. Die *match-between-runs*-Funktion wurde verwendet, um mittels *smart profiling*-Strategie aus den SWATH-Rohdaten eine

Spektralbibliothek zusammensetzen. Für die Proteininferenz wurden die Datensätze der Human-UniProtKB/Swiss-Prot-Datenbank (Version 2020/12/6) hinzugezogen [159]. Es wurde Trypsin (Spaltung zwischen Lysin/Arginin, außer vor Prolin) als Spaltspezifität angegeben. Das *precursor ion generation*-Setting war auf 7–52 Aminosäuren eingestellt. Die maximale Anzahl an *missed cleavages* wurde auf eins gestellt. Das Maximum für variable Modifikationen wurde auf null gesetzt. Die N-terminale Methionin-Exzision und die Carbamidomethylierung von Cysteinresten waren als feste Modifikationen vorgegeben.

Aus den generierten Datensätzen wurde mit dem DIA-NN-R-Paket eine duplikatfreie Proteintabelle erzeugt (Tabelle 3.7). Die Tabelle umfasste ausschließlich Proteine, die über proteotypische Peptide identifiziert und quantifiziert wurden. Der *false discovery rate* (FDR)-Schwellenwert wurde auf 0,01 festgelegt. Die Proteinmenge wurde mit dem MaxLFQ-Algorithmus berechnet [160]. Die relativen quantitativen Daten wurden nach dem Abgleich der UniProt-IDs, der Filterung fehlender Werte und der Imputation mithilfe des R-Pakets DEP weiterverarbeitet (Tabelle 3.7) [161]. Ein Protein wurde im Datensatz nur dann beibehalten, wenn es in allen Replikaten mindestens einer Sauerstoffbedingung identifiziert wurde. Anschließend wurde eine varianzstabilisierende Normalisierung (einschließlich  $\log_2$ -Transformation) durchgeführt, bevor die verbleibenden fehlenden Werte mittels eines *k-nearest-neighbor*-Imputationsmodells ersetzt wurden [162]. Es wurden keine *missing not at random* (MNAR)-Werte festgestellt. Insgesamt konnten 3.944 Proteine detektiert und zugeordnet werden, von denen 3.869 Proteine nach der *missing value* (MV)-Filterung für die massenspektrometrischen Analysen berücksichtigt wurden. Es wurde eine niedrige MV-Rate festgestellt (insgesamt 1,3 % MVs, verteilt auf 402 Proteine). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Proteom von HRMECs anhand von differentiellen Proteinexpressionsanalysen (*differential protein expression analysis*, DPE-Analysen), Genmengen-Anreicherungsanalysen (*gene set enrichment analysis*, GSEAs) sowie Pathway-Analysen diskutiert. Die Details zur statistischen Auswertung der Daten wurden in Abschnitt 3.2.13 zusammengefasst.

### 3.2.13 Statistische Datenauswertung

#### H-Test-Variante: Vergleich eines Standards mit mehreren Behandlungen

Im Rahmen einer Rang-Varianzanalyse mit  $n \geq 5$  kann die H-Test-Variante zum Vergleich aller Behandlungen mit einer Kontrolle nach der Beschreibung in der Formel- und

Methodensammlung „Angewandte Statistik“ von Hedderich und Sachs von 2018 durchgeführt werden, wenn die Voraussetzungen für eine einfaktorische Varianzanalyse nicht erfüllt sind [163]. Für den nichtparametrischen Test muss keine Normalverteilung vorliegen. Die Daten müssen lediglich ein ordinales Skalenniveau aufweisen. In der Western-Blot-Analyse mit Ganzzelllysaten aus hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen HRMECs (Abschnitt 3.2.5) wurde die H-Test-Variante verwendet, um die HRMECs in 21 % O<sub>2</sub> mit den neun übrigen Gruppen (HRMECs in 3 % O<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub>, 10 % O<sub>2</sub>, 15 % O<sub>2</sub>, 30 % O<sub>2</sub>, 40 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub>) bei einem Signifikanzniveau von 5 % zu vergleichen. Die Berechnung des H-Tests wurde handschriftlich durchgeführt und in Microsoft Excel übertragen. Die statistische Auswertung aller Vergleiche wurde in Anhang Abbildung 3 hinterlegt. Die graphische Darstellung sowie die Berechnung des Medians und des 25./75. Perzentils wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 10 erstellt (Tabelle 3.7).

#### H-Test von Kruskal und Wallis

Der H-Test (Kruskal-Wallis-Test) ist eine Verallgemeinerung des U-Tests [163]. Der Test basiert auf Rangplatznummern mit ordinalskalierten Variablen, die für den Vergleich von mehreren Gruppen angewandt werden. Mit dieser Testvariante kann bestimmt werden, ob die betrachteten Stichproben aus einem gemeinsamen Pool stammen oder mindestens eine Stichprobe unabhängig von den übrigen ist [164]. Der Kruskal-Wallis-Test wurde in der Auswertung von mehreren Experimenten angewandt, um zu prüfen, ob die gemessenen Stichproben bei einem Signifikanzniveau von 5 % Unterschiede aufwiesen. Hierzu gehörten die ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assays auf 8-Well  $\mu$ -slides (Abschnitt 3.2.7), MTT-Assays auf 8-Well  $\mu$ -slides und 96-Lochplatten (Abschnitt 3.2.8), Zellzahlbestimmungen (Abschnitt 3.2.9), *in-vitro* Zellmigrationsassays (Abschnitt 3.2.10) und Proteinkonzentrationsbestimmungen von sVEGFR1 und PlGF (Abschnitt 3.2.11). Die Berechnung des Kruskal-Wallis-Tests erfolgte mit dem Statistikprogramm R (Tabelle 3.7). Bei p-Werten < 0,05 wurde anschließend der Dunn's-Test als Post-Hoc-Test durchgeführt, um die einzelnen Stichproben paarweise zu vergleichen.

### Dunn's-Test für Mehrfachvergleiche

Der Dunn's-Test wurde als nichtparametrischer Post-Hoc-Test nach signifikanten Ergebnissen im Kruskal-Wallis-Test durchgeführt [165]. Zu den Zellkulturexperimenten, in denen der Dunn's-Test Anwendung fand, gehören die ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assays auf 8-Well  $\mu$ -slides (Abschnitt 3.2.7), MTT-Assays auf 8-Well  $\mu$ -slides und 96-Lochplatten (Abschnitt 3.2.8), Zellzahlbestimmungen (Abschnitt 3.2.9), *in-vitro* Zellmigrationsassays (Abschnitt 3.2.10) und Proteinkonzentrationsbestimmungen von sVEGFR1 und PlGF (Abschnitt 3.2.11). Durch paarweise Vergleiche zwischen den unabhängigen Gruppen konnte ermittelt werden, welche behandelten bzw. unbehandelten HRMECs sich auf einem bestimmten  $\alpha$ -Niveau statistisch signifikant unterscheiden. Um  $\alpha$ -Fehler-Kumulierung zu vermeiden, wurde eine Adjustierung der p-Werte mit der Bonferroni-Korrektur vorgenommen. Zur Berechnung des Tests wurde das Statistikprogramm R verwendet. Die statistische Auswertung der paarweisen Vergleiche mit Daten aus den ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assays (Anhang Tabelle 2), MTT-Assays auf 8-Well  $\mu$ -slides (Anhang Tabelle 3) und 96-Lochplatten (Anhang Tabelle 4), Zellzahlbestimmungen (Anhang Tabelle 5), *in-vitro* Zellmigrationsassays (Anhang Tabelle 6) und Proteinkonzentrationsbestimmungen von sVEGFR1 (Anhang Tabelle 7) und PlGF (Anhang Tabelle 8) wurde im Anhang zusammengetragen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 10.

### Differentielle Expressionsanalyse

Im Rahmen der DPE-Analysen wurden die Proteinquantitäten von HRMECs, die bei 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden, miteinander verglichen (Abschnitt 3.2.12). Die statistische Auswertung erfolgte mit einer parametrischen Analyse für multiple Vergleiche. Zunächst wurden einfaktorielle *analysis of variance* (ANOVAs) zum Vergleich der Gruppenmittelwerte mittels F-Statistik in R berechnet (Tabelle 3.7) [163]. Als Post-Hoc-Test wurde das Tukey-HSD-Verfahren (*Tukey's honestly significant difference*) genutzt, um die  $\alpha$ -Fehlerkumulierung der paarweisen Mittelwertvergleiche, die als logarithmische Differenz der Expressionsmittelwerte (*log fold change*, log<sub>2</sub>FC) angegeben wurden, zu kontrollieren [166]. Die Berechnung des Tukey-HSD erfolgte ebenfalls mit R. Als Signifikanzschwelle wurden ein adjustierte p-Wert (q-Wert)  $\leq 0,05$  und  $|\log_2\text{FC}| > 0,59$  (entspricht 1,5-fachen Signalintensität) festgelegt.

## Genmengen-Anreicherungsanalyse und Pathway-Analyse

Die Auswertung von GSEAs und Pathway-Analysen erfolgten mit der Datenanalytische Software Omics Playground Version 3 (Tabelle 3.7). Im Gegensatz zur DPE-Analyse wurden in der GSEA und der Pathway-Analyse Gensets identifiziert, in denen differentiell exprimierte Proteine einer funktionalen Gruppe angereichert waren. Der in dieser Arbeit verwendete Ausdruck „Gensets“ steht hier für Proteingruppen und basiert auf der Zuordnung von MS-Peptidsignalen zu Gensymbolen der Human-UniProtKB/Swiss-Prot-Datenbank, der während der Präprozessierung erfolgte (Abschnitt 3.2.12). Die Gensymbole wurden im weiteren Verlauf als Proteinkennung genutzt und sind in Anhang Tabelle 9 für die Gensets mit signifikant differentiell exprimierten Proteinen aufgelistet. Die statistischen Tests der GSEA fanden automatisiert statt und basierten auf der Zusammenführung der Ergebnisse aus dem Fisher-Exakt-Test [167], der *fast gene set enrichment analysis* (fGSEA) [168] und der *gene set variation analysis* (GSVA) [169]. Der größte q-Wert dieser drei Tests wurde als Meta-q-Wert bezeichnet und definiert den niedrigsten erwarteten FDR. Für die GSEAs wurden COMPARTMENTS als Zieldatenbank gewählt, deren Gensets auf kuratierten frei zugänglichen Datenbanken basieren und subzelluläre Strukturen und Proteinkomplexe repräsentieren [170]. Als Signifikanzschwelle wurde ein Meta-q-Wert  $\leq 0,05$  und ein  $|\log_2FC| > 0,1$  festgelegt. Dabei entspricht der  $\log_2FC$ -Wert eines Gensets dem Mittelwert der  $\log_2FC$ -Werte aller darin identifizierten Protein. Die Pathway-Analysen basieren auf den Datensets von WikiPathway, einer öffentlichen Datenbank mit manuell kuratierten Signalwegen [171]. Als statistischer Test wurde der Fisher-Exakt-Test mittels Omics-Playground-Software durchgeführt [167]. Bei Pathway-Analysen wurde ein q-Wert  $\leq 0,05$  als Signifikanzschwelle definiert.

## Deskriptive Statistik

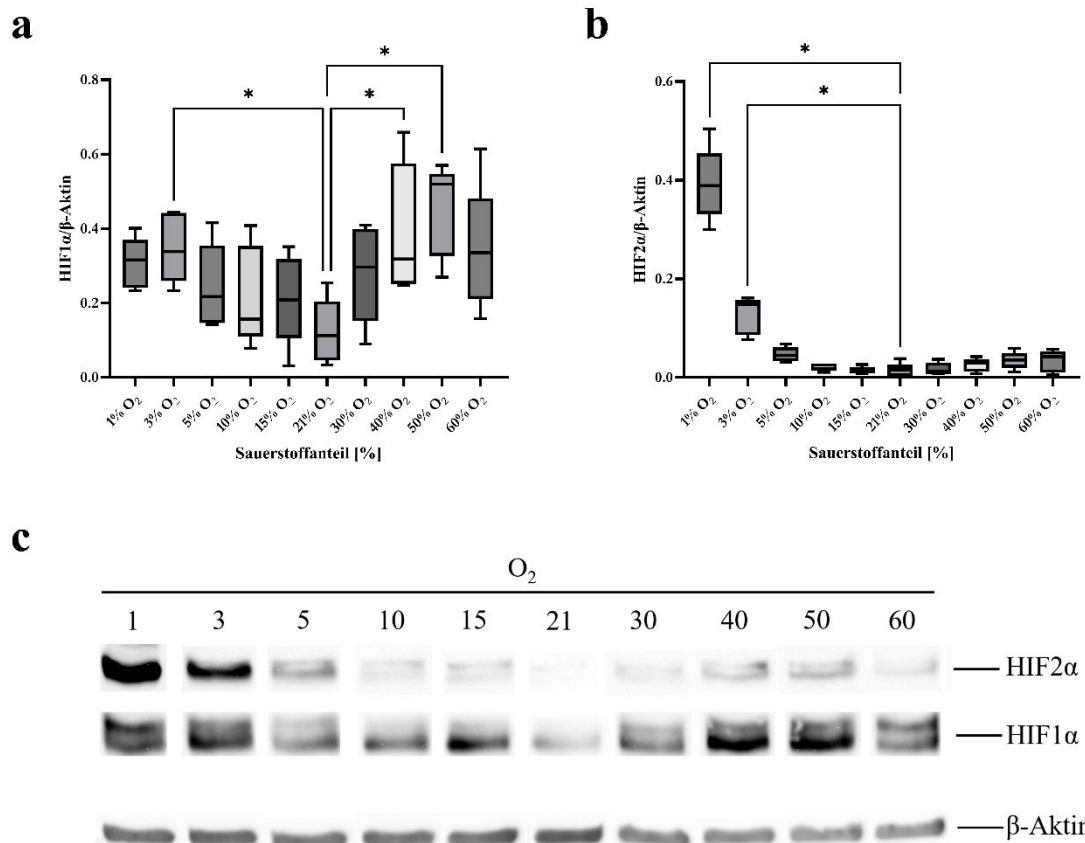
Aufgrund der limitierten Anzahl an biologischen Replikaten wurde bei der Auswertung und Beschreibung einiger Ergebnisse auf eine deskriptive Statistik zurückgegriffen. Zu diesen Zellkulturexperimenten gehörte die Western-Blot-Analyse mit Ganzzelllysaten aus HRMECs mit unterschiedlich langer Sauerstoffbehandlung (Abschnitt 3.2.5), die Western-Blot-Analyse mit Ganzzelllysaten aus hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen HRMECs nach einer Röntgenstrahlenbehandlung (Abschnitt 3.2.5) sowie die ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assays auf 96-Lochplatten (Abschnitt 3.2.7). Die Beurteilung der Experimente ist daher mit der nötigen Vorsicht zu bewerten.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Sauerstoffabhängige Proteinstabilisierung von HIF1 $\alpha$ und HIF2 $\alpha$

Zunächst wurde untersucht, bei welcher Sauerstoffumgebung eine Proteinstabilisierung der Hypoxie-Marker HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in HRMECs auftritt. Mittels Western-Blot Verfahren wurden die relativen Proteinmengen der beiden HIF $\alpha$ -Untereinheiten in Ganzzelllysaten aus hypoxischen bzw. hyperoxischen HRMECs mit den Proteinmengen normoxischer HRMECs verglichen (Abschnitt 3.2.5). Die HIF1 $\alpha$ -Signalintensitäten auf der Nitrozellulosemembran sind in Abbildung 4.1c gezeigt und deuten auf eine Zunahme des Proteins nach einer hypoxischen bzw. hyperoxischen Behandlung der HRMECs hin. Die graphische Darstellung der Ergebnisse aller Western-Blots ist mit den Medianen und den 25./75. Perzentilen (Md [25.;75. Perzentil]) als Box-Whisker-Plot in Abbildung 4.1a und Abbildung 4.1b dargestellt. Die statistische Auswertung zeigte, dass ein signifikanter Anstieg von HIF1 $\alpha$  nach der Inkubation in 40 % O<sub>2</sub> (0,319 [0,251; 0,576], 50 % O<sub>2</sub> (0,520 [0,327; 0,548]) und 3 % O<sub>2</sub> (0,339 [0,295; 0,443]) im Vergleich zu normoxischen HRMECs bei 21 % O<sub>2</sub> (0,113 [0,046; 0,204]) auftrat (Abbildung 4.1a). Bei einer Sauerstoffatmosphäre von 60 % O<sub>2</sub> (0,333 [0,211; 0,482]), 10 % O<sub>2</sub> (0,156 [0,111; 0,354]), 5 % O<sub>2</sub> (0,217 [0,147; 0,355]) und 1 % O<sub>2</sub> (0,316 [0,241; 0,370]) stieg die gemessene HIF1 $\alpha$ -Proteinintensität ohne ein Signifikanzniveau von 5 % zu erreichen.

Die HIF2 $\alpha$ -Signalintensitäten auf der Nitrozellulosemembran in Abbildung 4.1c deuten auf eine Zunahme des Proteins nach einer hypoxischen Behandlung der HRMECs hin. Bei zunehmender hyperoxischer Sauerstoffatmosphäre kommt es nur zu einer geringfügigen Veränderung in der detektierten HIF2 $\alpha$ -Proteinmenge. Die Auswertung aller Ganzzelllysate zeigte, dass ein signifikanter Anstieg von HIF2 $\alpha$  bei einem Sauerstoffanteil von 3 % (0,148 [0,086; 0,157]) bzw. 1 % (0,389 [0,331; 0,454]) vs. einem Sauerstoffanteil von 21 % (0,016 [0,003; 0,026]) zu beobachten war (Abbildung 4.1b). Der größte Median-Wert nach einer hyperoxischen Sauerstoffbehandlung wurde bei 50 % O<sub>2</sub> (0,036 [0,019; 0,049]) gemessen. Ein statistisch signifikanter Unterschied mit  $p \leq 0,05$  konnte nach einer hyperoxischen Behandlung der HRMECs nicht beobachtet werden.



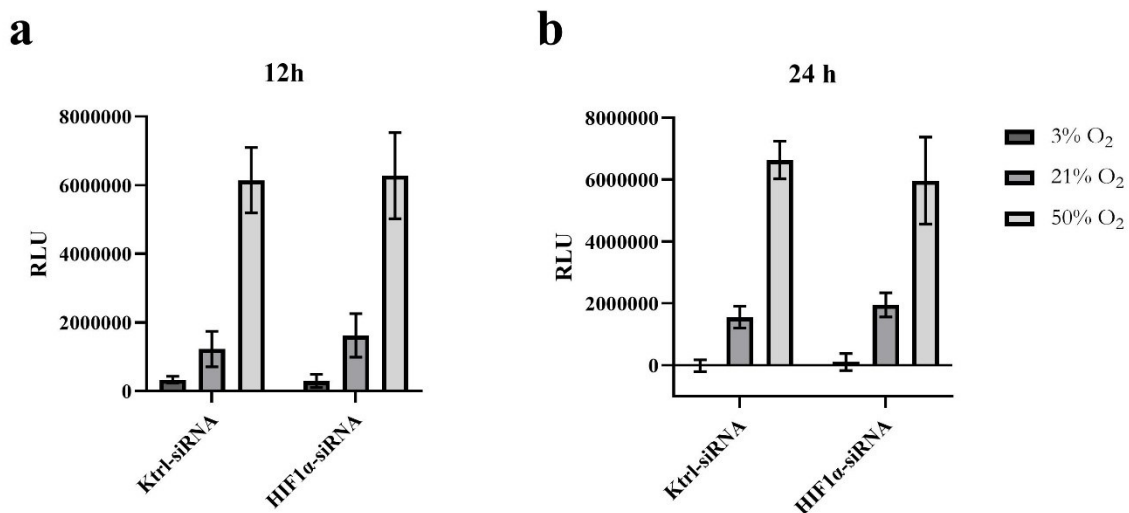
**Abbildung 4.1: Semiquantitative Western-Blot-Analyse der Proteine HIF1α und HIF2α.** HRMECs wurden über 24 h in hypoxischer, normoxischer oder hyperoxischer Sauerstoffumgebung bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert, bevor die Ganzzelllysate gesammelt wurden. Die Proteinmengen von HIF1α (a) und HIF2α (b) sind als Box-Whisker-Plots mit Median und 25./75. Perzentilen dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit einer H-Test-Variante zum Vergleich eines Standards (hier: 21 % O<sub>2</sub>, n = 7) mit den Signalintensitäten nach einer Sauerstoffbehandlung der HRMECs mit 1 % O<sub>2</sub> [n = 5], 3 % O<sub>2</sub> [n = 5], 5 % O<sub>2</sub> [n = 5], 10 % O<sub>2</sub> [n = 5], 15 % O<sub>2</sub> [n = 5], 30 % O<sub>2</sub> [n = 5], 40 % O<sub>2</sub> [n = 5], 50 % O<sub>2</sub> [n = 5] und 60 % O<sub>2</sub> [n = 5] bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C. (c) Nitrozellulosemembran aus Western-Blots nach der Immunodetektion von HIF1α und HIF2α. Das Housekeeping-Protein β-Aktin wurde als Proteinladekontrolle verwendet. \*p ≤ 0,05. HIF: hypoxia-inducible factor, HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen.

## 4.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in HRMECs nach HIF1α-knockdown in Abhängigkeit von der Sauerstoffatmosphäre

Die Versuchsreihe sollte Aufschluss darüber geben, ob die Bildung von freien Sauerstoffspezies in HRMECs durch die Inkubation unter hypoxischen bzw. hyperoxischen Bedingungen beeinträchtigt wird. Desweiteren wurde überprüft, ob ein *knockdown* der HIF1α-mRNA Einfluss auf die ROS-Entstehung nehmen kann.

Die semiquantitative Bestimmung von  $H_2O_2$  im Zellkulturmedium erfolgte mittels ROS-Glo™  $H_2O_2$  Assay, das in Abschnitt 3.2.7 beschrieben wurde. Um festzustellen, ob eine HIF1 $\alpha$ -induzierende bzw. -inhibierende Wirkung im Hinblick auf ROS denkbar ist, wurden Lipofektionen von HIF1 $\alpha$ -siRNA bzw. Kontroll-siRNA durchgeführt (Abschnitt 3.2.6).

Nachdem die HRMECs mit Kontroll-siRNA über einen Zeitraum von 12 h unter den vorgegebenen Sauerstoffbedingungen inkubiert wurden, zeigten die RLU-Mittelwerte mit Standardabweichung (MW  $\pm$  SD) der hyperoxischen HRMECs (50 %  $O_2$ : 6.143.482  $\pm$  956.212) eine deutliche Zunahme der detektierten extrazellulären  $H_2O_2$ -Moleküle gegenüber normoxischen (21 %  $O_2$ : 1.228.483  $\pm$  516.245) und hypoxischen (3 %  $O_2$ : 333.953  $\pm$  96.350) HRMECs auf (Abbildung 4.2a). Der deutliche Anstieg der  $H_2O_2$ -Menge im Zellkulturmedium nach der Inkubation in Hyperoxie wurde auch nach *knockdown* von HIF1 $\alpha$ -mRNA beobachtet (21 %  $O_2$ : 1.624.413  $\pm$  634.760 vs. 3 %  $O_2$ : 297.365  $\pm$  193.916 vs. 50 %  $O_2$ : 6.275.119  $\pm$  1.253.592). Die Messungen des konditionierten Zellkulturmediums ergaben nach 24 h gemittelte RLU-Werte, die mit denen nach 12 h vergleichbar waren (Abbildung 4.2b). Bei einer normoxischen Behandlung der Zellen mit Kontroll-siRNA wurde im Zellkulturmedium nach 24 h ein gemittelter RLU-Wert von 1.553.296  $\pm$  352.371 gemessen.



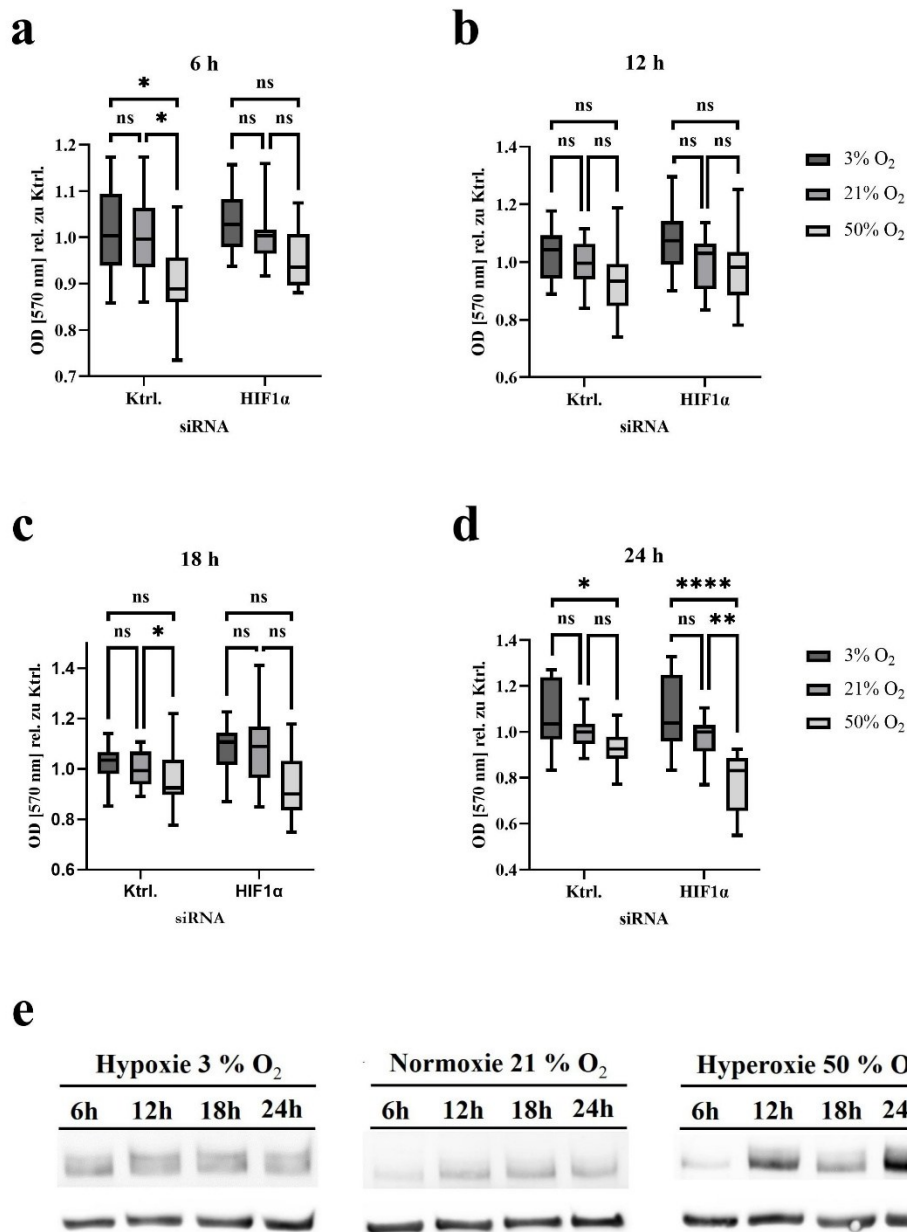
**Abbildung 4.2: ROS-Glo™  $H_2O_2$  Assays zur Bestimmung der  $H_2O_2$ -Bildung in HRMECs mit und ohne HIF1 $\alpha$ -knockdown.** Die HRMECs wurden entweder mit BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo (Kontroll-siRNA) oder ON-TARGETplus Human HIF1A (3091) siRNA-SMARTpool (HIF1 $\alpha$ -siRNA) transfiziert. Anschließend wurden die RLU-Werte nach 12 h Inkubation (a) und 24 h Inkubation (b) unter unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen (3 %  $O_2$ , 21 %  $O_2$  oder 50 %  $O_2$ ) mit 5 %  $CO_2$  bei 37 °C gemessen. Die RLU-Werte sind als Balkendiagramme mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. HIF: Hypoxia-inducible factor, HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, RLU: relative Lumineszenz-Unit, siRNA: small interfering ribonucleic acid.

Bei einem Sauerstoffanteil von 3 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub> wurden klar erkennbare niedrigere, respektive höhere RLU-Werte ermittelt (3 % O<sub>2</sub>: -18.260 ± 192.653 bzw. 50 % O<sub>2</sub>: 6.631.368 ± 610.662). Nach *knockdown* von HIF1α konnte kein wesentlicher Unterschied in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (21 % O<sub>2</sub>: 1.950.688 ± 391.190, 3 % O<sub>2</sub>: 103.868 ± 276.126, 50 % O<sub>2</sub>: 5.967.200 ± 1.406.573). Bei der Betrachtung der Daten muss berücksichtigt werden, dass die Experimente mit vier technischen Replikaten bei einmaliger Durchführung abgeschlossen wurden. Die Beschreibung der Ergebnisse basiert daher auf einer deskriptiven Statistik (Abschnitt 3.2.13).

### **4.3 Zeitabhängige Veränderung der Zellviabilität mit bzw. ohne HIF1α-mRNA *knockdown* bei unterschiedlicher Sauerstoffatmosphäre**

Ziel war es, die Veränderung der Zellviabilität von HRMECs nach dem Wechsel in eine hypoxische bzw. hyperoxische Atmosphäre zu untersuchen. Zudem wurde die Rolle der HIF1α-Proteinakkumulation für die Aufrechterhaltung der Zellviabilität betrachtet. Zur semiquantitativen Bestimmung der Zellviabilität wurden MTT-Assays durchgeführt, die in Abschnitt 3.2.8 beschrieben wurden. Die Auswirkungen des HIF1α-Proteins wurden nach dem *knockdown* der HIF1α-mRNA mittels Lipofektion untersucht (Abschnitt 3.2.6). Die graphische Darstellung erfolgte in Abbildung 4.3a-d durch Box-Whisker-Plots mit Medianen und 25./75 Perzentilen (Md [25.;75. Perzentil]). Um die Proteinmenge von HIF1α zu den Zeitpunkten der MTT-Assays zu überprüfen, wurde das Western-Blot-Verfahren mit Ganzzelllysaten aus HRMECs angewandt, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden (Abbildung 4.3e).

Signifikante Unterschiede zwischen den OD-Werten der behandelten HRMECs traten nach 6 h, 18 h und 24 h Inkubation auf. Die OD-Werte von HRMECs, die mit Kontroll-siRNA 6 h unter hyperoxischen Bedingungen inkubiert wurden (Abbildung 4.3a), zeigten signifikante Unterschiede gegenüber HRMECs bei 21 % O<sub>2</sub> (Kontroll-siRNA 21 % O<sub>2</sub>: 0,997 [0,935; 1,063] vs. 50 % O<sub>2</sub>: 0,888 [0,860; 0,957];  $p \leq 0,01$ ) bzw. 3 % O<sub>2</sub> (Kontroll-siRNA mit 3 % O<sub>2</sub>: 1,003 [0,939; 1,003] vs. 50 % O<sub>2</sub>: 0,888 [0,860; 0,957];  $p \leq 0,01$ ). In HRMECs, die mit HIF1α-siRNA transfiziert wurden, konnte in Abhängigkeit von der Sauerstoffbehandlung kein signifikanter Unterschied zwischen den OD-Werten beobachtet werden.



**Abbildung 4.3: MTT-Assays von HRMECs mit bzw. ohne HIF1α-mRNA-knockdown und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** Die HRMECs wurden mit BLOCK-iT™ siRNA (Kontroll-siRNA) oder ON-TARGETplus Human HIF1A (3091) siRNA-SMARTpool (HIF1α-siRNA) transfiziert. Nach 6 h (a), 12 h (b), 18 h (c) oder 24 h (d) Inkubation unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) oder hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen (jeweils bei 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) wurden MTT-Assays durchgeführt und die OD-Werte gemessen. Die Ergebnisse sind als Quotient aus den OD-Werten und den gemittelten OD-Werten nach einer Transfektion von normoxischen HRMECs mit Kontroll-siRNA angegeben. Die sechs technischen Replikate einer Versuchsdurchführung wurden dreifach wiederholt. Ausgewertet wurden insgesamt 15-18 Replikate je Behandlung (einzelne Ausreißer ausgeschlossen). Die Daten sind mit Median und dem 25./75. Perzentil angegeben. Die statistische Auswertung der Daten fand mittels Rang-Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's -Test (Post-Hoc-Test) statt. \**p* ≤ 0,05; \*\**p* ≤ 0,01; \*\*\*\**p* ≤ 0,0001. Zur qualitativen Auswertung der intrazellulären Proteinmenge von HIF1α wurden Western-Blots mit Ganzzelllysaten aus HRMECs ohne HIF1α-knockdown durchgeführt (e). HIF: hypoxia-inducible factor, HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid, ns: nicht signifikant, OD: optical density, optische Dichte, siRNA: small interfering ribonucleic acid.

Die höchsten OD-Werte wurden in beiden Fällen nach einer Inkubation in einer hypoxischen Atmosphäre ermittelt. Die niedrigsten OD-Werte wurden hingegen nach einer hyperoxischen Behandlung beobachtet worden. Der Trend von tendenziell hohen OD-Einzelwerten nach hypoxischer Behandlung (3 % O<sub>2</sub>) und tendenziell niedrigen OD-Einzelwerten nach hyperoxischer Behandlung (50 % O<sub>2</sub>) zeigte sich auch nach 12 h, 18 h und 24 h Inkubation (Abbildung 4.3b-d). Nach 18 h Inkubation bei 50 % O<sub>2</sub> wurden in HRMECs ohne HIF1 $\alpha$ -knockdown signifikant niedrigere relative OD-Werte gegenüber Zellen in Normoxie beobachtet (21 % O<sub>2</sub>: 0,993 [0,939; 1,069]) vs. 50 % O<sub>2</sub>: 0,924 [0,897; 1,037];  $p \leq 0,001$ ). In der Gruppe aus HRMECs, die mit HIF1 $\alpha$ -siRNA transfiziert wurden, konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den Sauerstoffbehandlungen ermittelt werden (Abbildung 4.3c). Nach einer 24-stündigen Sauerstoffbehandlung der HRMECs wurden sowohl mit als auch ohne HIF1 $\alpha$ -siRNA-Transfektion signifikante Unterschiede beobachtet (Abbildung 4.3d). Ein Sauerstoffanteil von 50 % O<sub>2</sub> führte gegenüber einer hypoxischen Behandlung (3 % O<sub>2</sub>) zu einer Reduktion der relativen OD-Werte. (Kontroll-siRNA 3 % O<sub>2</sub> 0,998 [0,948; 1,036] vs. 50 % O<sub>2</sub> 0,926 [0,882; 0,979];  $p \leq 0,05$ ; HIF1 $\alpha$ -siRNA: 3 % O<sub>2</sub> 1,039 [0,959; 1,249] vs. 50 % O<sub>2</sub> 0,832 [0,655; 0,886];  $p \leq 0,0001$ ). In HRMECs, die mit HIF1 $\alpha$ -siRNA transfiziert wurden, ergab sich zudem ein signifikanter Unterschied zwischen den relativen OD-Werten nach der Inkubation in 21 % O<sub>2</sub> vs. 50 % O<sub>2</sub> (HIF1 $\alpha$ -siRNA: 21 % O<sub>2</sub> 0,998 [0,915; 1,030] vs. 50 % O<sub>2</sub> 0,832 [0,655; 0,886];  $p \leq 0,01$ ).

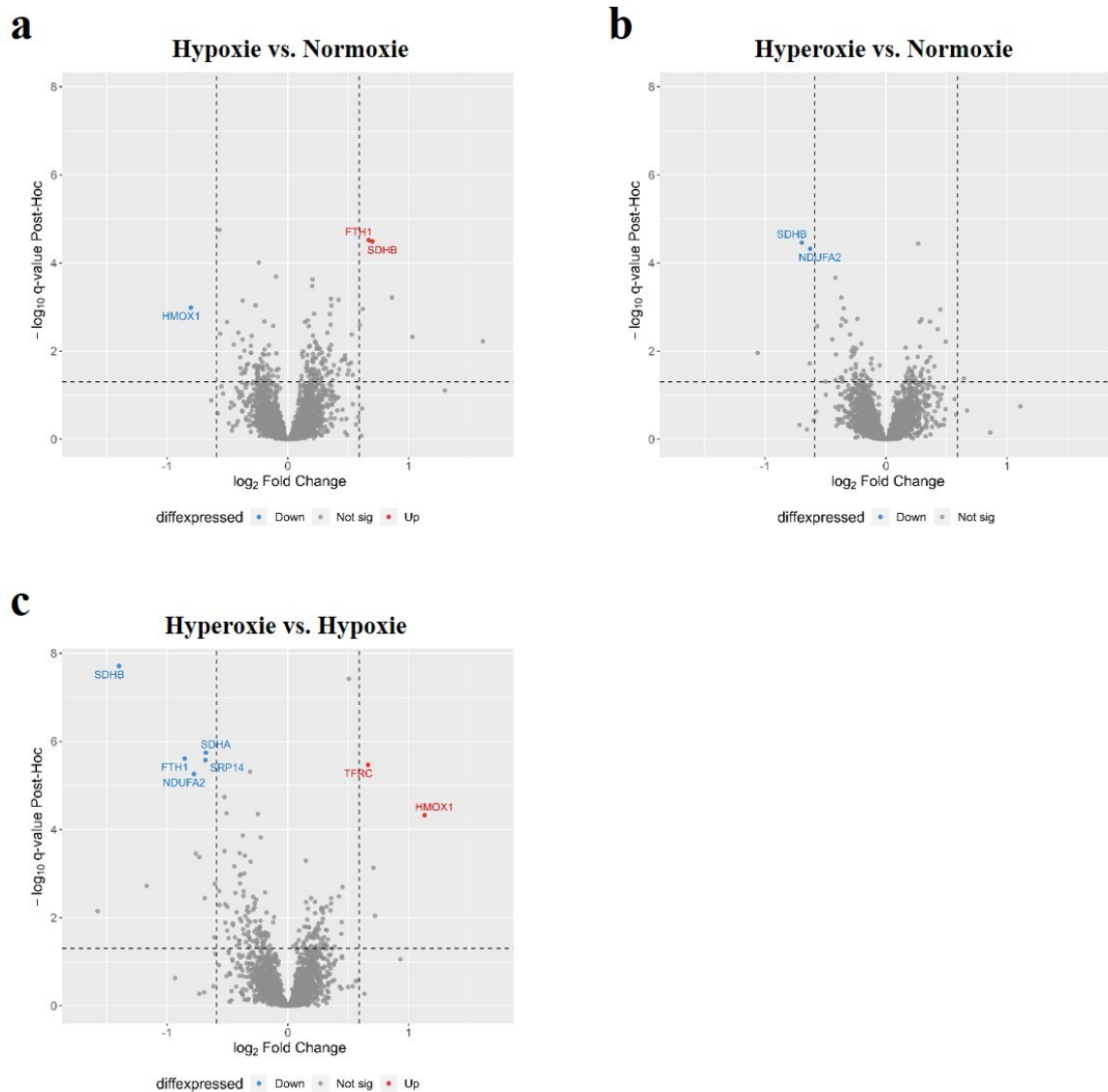
Die Ergebnisse der Western-Blots aus Ganzzelllysaten mit HRMECs zeigen, dass das Proteinlevel von HIF1 $\alpha$  nach einer Inkubation bei 3 % O<sub>2</sub> bereits nach 6 h anhaltend anstieg (Abbildung 4.3e). In der hyperoxischen Atmosphäre von 50 % O<sub>2</sub> wurde ein deutlicher Anstieg des intrazellulären HIF1 $\alpha$ -Levels dagegen erst nach 12 h beobachtet. In den ersten 6 h zeigte sich kein sichtbarer Unterschied zu HRMECs, die bei 21 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden.

#### **4.4 Vergleich des Proteoms von HRMECs bei verschiedenen Sauerstoffatmosphären**

##### Differentielle Proteinexpressionsanalyse

Eine Sauerstoffumgebung, die den physioxischen Bedingungen der Zellen nicht entspricht, führt in der Regel zu einer proteomweiten Adaptation. Die Identifikation von signifikanten Abweichungen zwischen den Expressionsmittelwerten von Proteinquantitäten hypoxischer,

normoxischer und hyperoxischen HRMECs war deshalb von großem Interesse und wurde mit DPE-Analysen durchgeführt (Abschnitt 3.2.12). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 als Streudiagramm dargestellt.



**Abbildung 4.4: Streudiagramm zur Visualisierung der DPE-Analysen mit HRMECs unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** Es wurden die differentiellen Expressionsmittelwerte von HRMECs nach der Inkubation in 3 % O<sub>2</sub> vs. 21 % O<sub>2</sub> (a), 50 % O<sub>2</sub> vs. 21 % O<sub>2</sub> (b) und 50 % O<sub>2</sub> vs. 3 % O<sub>2</sub> (c) verglichen. Die Daten der massenspektrometrischen Analysen wurden entsprechend des in Abschnitt 3.2.12 beschriebenen Protokolls generiert. Insgesamt wurden fünf Ganzzelllysat-Proben mit 3.869 Proteinquantitäten je Sauerstoffumgebung ausgewertet. Blaue (herunterreguliert) und rote (hochreguliert) Punkte repräsentieren signifikante differentielle Proteinexpressionen bei einem q-Wert  $\leq 0,05$  und einem  $|\log_2FC| > 0,59$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA-Test mit anschließendem Tukey-HSD-Post-hoc-Test. ANOVA: analysis of variance, DPE-Analyse: Differentielle Proteinexpressionsanalyse, FTH1: Ferritin heavy chain 1, HMOX1: Hämoxygenase 1, HRMECs: Humane retinale Endothelialzellen, HSD: honestly significant difference, log<sub>2</sub>FC: log<sub>2</sub> fold change, Logarithmischen Differenz der Expressionsmittelwerte, NDUFA2: NADH-Q-Oxidoreduktase Untereinheit A2, SDHA: Succinatdehydrogenase A, SDHB: Succinatdehydrogenase B, SRP14: signal-recognition-particle-Protein 14, TFRC: Transferrinrezeptorprotein 1.

Die signifikanten differentiellen Expressionsmittelwerte wurden in Anhang Abbildung 1 als Box-Whisker-Plots visualisiert. Abbildung 4.4a zeigt den paarweisen Vergleich zwischen normoxischen und hypoxischen HRMECs. Unter dem gewählten Signifikanzniveau ( $q$ -Wert  $\leq 0,05$  und  $|\log_2FC| > 0,59$ ) konnten die drei Proteine *ferritin-heavy-chain 1* (FTH1), Hämoxygenase 1 (HMOX1) und Succinatdehydrogenase B (SDHB) mit signifikanten Abweichungen in ihrem Expressionsniveau nachgewiesen werden. Die Proteine SDHB ( $\log_2FC = 0,701$ ) und FTH1 ( $\log_2FC = 0,669$ ) wurden unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert, während HMOX1 ( $\log_2FC = -0,803$ ) signifikant häufiger in normoxischen HRMECs exprimiert wurde. Bei der DPE-Analyse von hyperoxischen vs. normoxischen HRMECs wurden zwei Proteine identifiziert, deren differentielle Expressionsmittelwerte bei Inkubation in 50 % O<sub>2</sub> zunahm (Abbildung 4.4b). Die NADH-Q-Oxidoreduktase-Untereinheit A2 (*NADH dehydrogenase 1 $\alpha$  subcomplex subunit 2*, NDUFA2) wies einen  $\log_2FC$ -Wert von -0,627 auf. Bei SDHB wurde im paarweisen Vergleich ein  $\log_2FC$ -Wert von -0,697 festgestellt. Die meisten signifikanten differentiellen Proteinexpressionen traten zwischen hyperoxischen und hypoxischen HRMECs auf. Bei sieben Proteinen ergab die statistische Auswertung eine Zu- bzw. Abnahme der differentiellen Expressionsmittelwerte (Abbildung 4.4c). Unter hyperoxischen Bedingungen wurden HMOX1 ( $\log_2FC = 1,133$ ) und *transferrin receptor protein 1* (TFR1,  $\log_2FC = 0,665$ ) häufiger exprimiert. Die Proteine SDHB ( $\log_2FC = -1,397$ ), Succinatdehydrogenase A (SDHA,  $\log_2FC = -0,679$ ), FTH1 ( $\log_2FC = -0,855$ ), NDUFA2 ( $\log_2FC = -0,778$ ) und *signal recognition particle 14* (SRP14,  $\log_2FC = -0,682$ ) wurden hingegen unter hypoxischen Bedingungen signifikant häufiger exprimiert.

### Genmengen-Anreicherungsanalyse

Die Adaptation an eine niedrige bzw. hohe Sauerstoffumgebung betrifft nicht nur einzelne Proteine, sondern auch größere Proteinkomplexe oder ganze Zellkompartimente. Um die Veränderung des Expressionsmusters in den subzellulären Strukturen zu identifizieren, wurden GSEAs durchgeführt (Abschnitt 3.2.12). Die angereicherten Gensets der COMPARTMENTS-Datenbank, die in der statistischen Auswertung der differentiellen Proteinexpression von normoxischen vs. hypoxischen, hyperoxischen vs. normoxischen und hyperoxischen vs. hypoxischen HRMECs detektiert wurden (Abschnitt 3.2.13), sind in Tabelle 4.1 hinterlegt (Meta- $q$ -Wert  $\leq 0,05$  und  $|\log_2FC| > 0,1$ ). Die einzelnen Proteine der Gensets wurden in Anhang Tabelle 9 zusammengetragen.

**Tabelle 4.1: Auflistung signifikanter Genmengen aus paarweisen Vergleichen mit Proteinquantitäten von HRMECs unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** Insgesamt wurden 3.869 Proteinquantitäten aus fünf Ganzzelllysat-Proben je Sauerstoffumgebung für die GSEA berücksichtigt. Die untersuchten Gensets sind in der COMPARTMENT-Datenbank hinterlegt. Es wurden alle Gensets aufgelistet, die einen Meta-q-Wert  $\leq 0,05$  und  $|\log_2FC| > 0,1$  aufwiesen. Neben den Gensets mit signifikanter Anreicherung differentieller Proteine, wurden die  $\log_2FC$ -Werte der paarweisen Vergleiche, die ermittelten Meta-q-Werte, die Anzahl der Proteine in den untersuchten Gensets und die Durchschnittsexpressionen über alle Proben einer Behandlungsgruppe (Expr. Mittelw.) zusammengetragen. Die Expressionsmittelwerte (hier: gemittelte  $\log_2$ -Intensitäten) von hypoxischen vs. normoxischen HRMECs ergaben in den betrachteten Gensets keine signifikanten Expressionsunterschiede, sodass nur die paarweisen Vergleiche der hyperoxischen und normoxischen HRMECs bzw. der hyperoxischen und hypoxischen HRMECs angegeben wurden. GSEA: gene set enrichment analysis, Genmengen-Anreicherungsanalyse, HRMEC: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen,  $\log_2FC$ :  $\log_2$  fold change, logarithmische Differenz der Expressionsmittelwerte.

<b>Genset</b>	<b>Log<sub>2</sub>FC 50 O<sub>2</sub> vs. 21 O<sub>2</sub></b>	<b>Meta-q- Wert</b>	<b>Anzahl Proteine</b>	<b>Expr. Mittelw. Hyper</b>	<b>Expr. Mittelw. Norm</b>
Respiratory_chain_complex_I	-0.16573	0.008537	31	6.483	6.318
NADH_dehydrogenase_complex	-0.17216	0.008537	31	7.081	6.909
Mitochondrial_respiratory_chain_complex_I	-0.16208	0.009383	31	7.542	7.380
Mitochondrial_respiratory_chain	-0.12193	0.013220	51	6.941	6.819
Respiratory_chain	-0.11379	0.016743	52	8.297	8.183
GO0098803	-0.12535	0.027612	45	6.941	6.816
<b>Genset</b>	<b>Log<sub>2</sub>FC 3 O<sub>2</sub> vs. 50 O<sub>2</sub></b>	<b>Meta-q- Wert</b>	<b>Anzahl Proteine</b>	<b>Expr. Mittelw. Hypo</b>	<b>Expr. Mittelw. Hyper</b>
NADH_dehydrogenase_complex	0.249957	0.004670	31	6.896	7.146
Respiratory_chain_complex_I	0.247262	0.004670	31	6.295	6.542
Mitochondrial_respiratory_chain_complex_I	0.244289	0.004670	31	7.322	7.567
GO0098803	0.205410	0.004670	45	6.795	7.000
Mitochondrial_respiratory_chain	0.190797	0.004670	51	6.834	7.025
Respiratory_chain	0.179277	0.004670	52	8.135	8.314
Oxidoreductase_complex	0.143226	0.004670	64	7.936	8.079
GO0098800	0.121921	0.004670	63	7.488	7.610

Es konnten keine signifikant angereicherten Gensets im paarweisen Vergleich von hypoxischen und normoxischen HRMECs identifiziert werden. Den niedrigsten Meta-q-Wert erreichte das Genset mit der Bezeichnung GO0098800, die die Proteine der inneren Mitochondrienmembran umfasst (Meta-q-Wert = 0,099,  $\log_2FC = 0,0889$ ). Bei hyperoxischen vs. normoxischen HRMECs wurden sechs relevante Gensets identifiziert. Die drei Gensets mit dem höchsten gemittelten  $|\log_2FC|$ -Wert sind redundant und lassen sich dem Komplex I in der Elektronentransportkette zuordnen (Respiratory\_chain\_complex\_I, NADH\_dehydrogenase\_complex, Mitochondrial\_respiratory\_chain\_complex\_I). Die übrigen drei Gensets weisen ebenfalls starke Überschneidungen auf und beinhalten Proteine, die der mitochondrialen Atmungskette als Ganzes zugeordnet werden (Mitochondrial\_respiratory\_chain, Respiratory\_chain, GO0098803). Die GSEA von hyperoxischen vs. hypoxischen HRMECs ergab acht signifikant angereicherte Gensets, die entweder Komplex I (NADH\_dehydrogenase\_complex, Respiratory\_chain\_complex\_I, Mitochondrial\_respiratory\_chain\_complex\_I), Komplex II (Oxidoreductase\_complex) oder der mitochondrialen Atmungskette (GO0098803, Mitochondrial\_respiratory\_chain, Respiratory\_chain, GO0098800) zugeordnet sind. Die Visualisierung der Ergebnisse aus den GSEAs erfolgte als Enrichment-Plots in Anhang Abbildung 2.

### Pathway-Analyse

Neben der Auswertung von individuellen differentiell exprimierten Proteinen und der Anreicherung von Proteingruppen wurden auch signifikante Veränderungen in der Proteinexpression untersucht, die verschiedenen Signalwegen zugeordnet werden können. Analog zu den DPE-Analysen und den GSEAs wurden Pathway-Analysen mit den differentiell exprimierten Proteinen von HRMECs nach der Inkubation in 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub> durchgeführt (Abschnitt 3.2.12). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Fisher Exakt Test [167] (Abschnitt 3.2.13). Bei einer Signifikanzschwelle von  $q \leq 0,05$  konnte zwischen hypoxischen und normoxischen HRMECs keine Anreicherung von Signalwegen festgestellt werden, die in der WikiPathway Datenbank hinterlegt sind. Der niedrigste q-Wert wurde beim *Electron Transport Chain\_Homo sapiens\_WP1111*-Datenset ( $\log_2FC = 0,1005$ ,  $q = 0,2566$ ) festgestellt. Es umfasst den Signalweg der mitochondrialen Elektronentransportkette. Die signifikanten Ergebnisse der Pathway-Analyse von hyperoxischen vs. normoxischen HRMECs und hypoxischen vs. hyperoxischen HRMECs sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Sie beinhalten Signalwege der oxidativen

Phosphorylierung (Pathway ID WP624) und Proteine bzw. Proteinkomplexe, die an der mitochondrialen Elektronentransportkette beteiligt sind.

**Tabelle 4.2: Auflistung signifikanter Genmengen in Pathway-Analysen mit HRMECs unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** Das Protokoll für massenspektrometrische Analysen wurde in Abschnitt 3.2.12 zusammengetragen. Die statistische Auswertung wurde in Abschnitt 3.2.13 beschrieben. Insgesamt konnten 3.869 Proteinquantitäten aus fünf Ganzzelllysat-Proben je Sauerstoffumgebung für die Pathway-Analysen berücksichtigt werden. Die untersuchten Signalwege sind in der WikiPathways-Datenbank hinterlegt. Es wurden alle Signalwege aufgelistet, die eine Anreicherung von differentiellen Proteinexpressionen mit einem  $q$ -Wert  $\leq 0,05$  aufwiesen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Fisher-Exakt-Test [167]. Neben der Pathway-ID und dem Signalweg, wurden die  $\log_2FC$ -Werte der paarweisen Vergleiche und die ermittelten  $q$ -Werte zusammengetragen. Die statistische Auswertung der Expressionsmittelwerte von hypoxischen vs. normoxischen HRMECs ergab keine angereicherten Signalwege, sodass nur die paarweisen Vergleiche der hyperoxischen vs. normoxischen HRMECs bzw. der hypoxischen vs. hyperoxischen HRMECs angegeben wurden. HRMEC: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen,  $\log_2FC$ :  $\log_2$  fold change, logarithmischen Differenz der Expressionsmittelwerte.

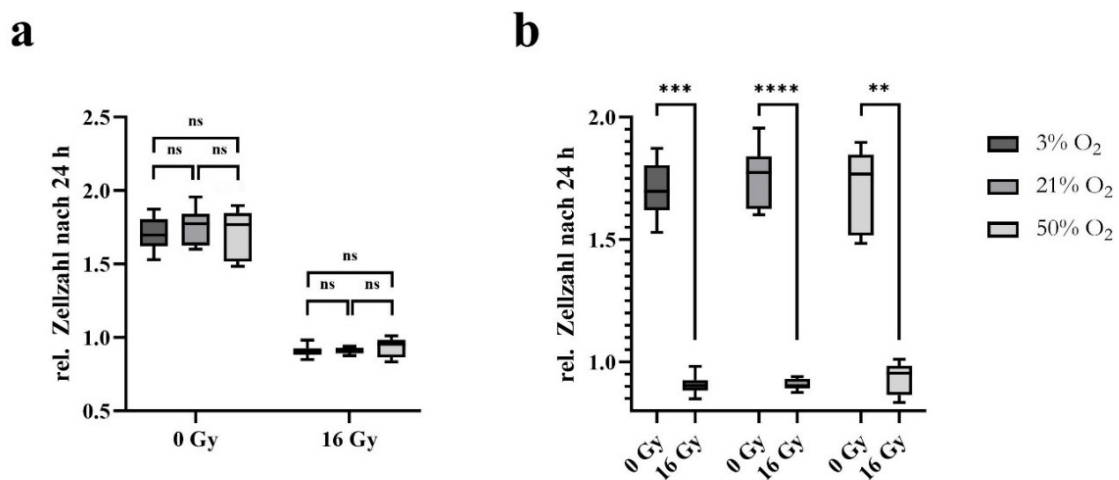
Pathway.id	Pathway	Log <sub>2</sub> FC Hyper vs. Norm	Meta-q-Wert Hyper vs. Norm
WP623	Oxidative phosphorylation_Homo sapiens_WP623	-0.0970	0.0336
WP111	Electron Transport Chain_Homo sapiens_WP111	-0.0800	0.0473

Pathway.id	Pathway	Log <sub>2</sub> FC Hypo vs. Hyper	Meta-q-Wert Hypo vs. Hyper
WP623	Oxidative phosphorylation_Homo sapiens_WP623	0.1410	0.0047
WP111	Electron Transport Chain_Homo sapiens_WP111	0.1302	0.0047

## 4.5 Zellzahlbestimmung nach Röntgenstrahlenbehandlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

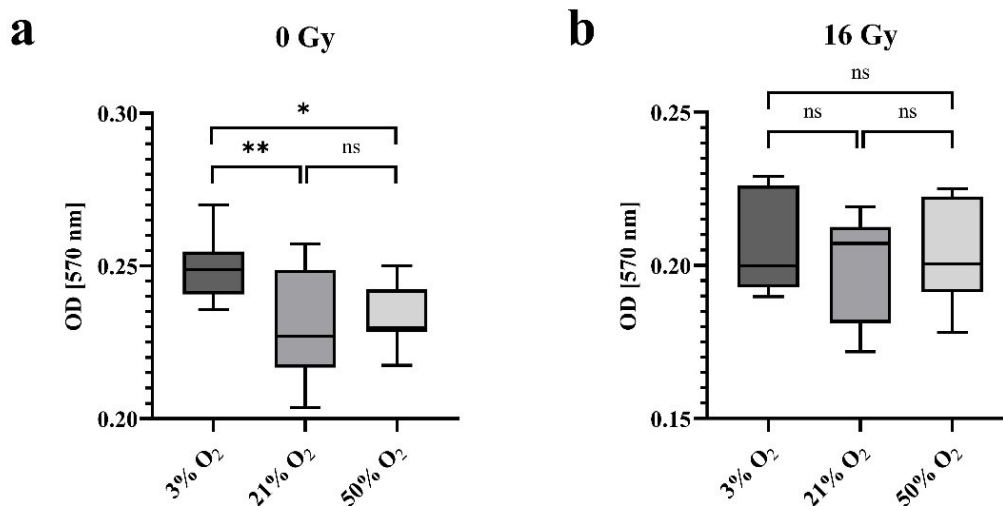
Mit dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Zellteilung von HRMECs nach einer Röntgenstrahlenbehandlung durch die zelluläre Adaptation an eine hypoxische bzw. hyperoxische Umgebung beeinträchtigt wird. Das Protokoll zur quantitativen Bestimmung der Zellzahl wurde in Abschnitt 3.2.9 beschrieben. Die Mediane der Zellzahlzunahme nach 24 h (Md [25.,75. Perzentil]) unterschieden sich bei scheinbestrahlten HRMECs, die in 21 % O<sub>2</sub>, 3 % O<sub>2</sub> oder 50 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden, nicht signifikant (Abbildung 4.5a). Auch nach vorheriger Bestrahlung der HRMECs mit 16 Gy konnte kein Unterschied zwischen den Zellzahlen festgestellt werden. Deutliche Unterschiede wurden hingegen im paarweisen Vergleich der bestrahlten und scheinbestrahlten Zellen bei gleicher Sauerstoffatmosphäre festgestellt (Abbildung 4.5b). Hier zeigt sich eine signifikante Abnahme der Zellzahl in Normoxie (21 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 1,77 [1,63; 1,84] vs. 16 Gy 0,90 [0,89; 0,93];  $p \leq 0,00001$ ), Hypoxie (3 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 1,70 [1,62; 1,80] vs. 16 Gy 0,90 [0,88; 0,93];  $p \leq 0,0001$ ) und Hyperoxie (50 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 1,76 [1,51; 1,84] vs. 16 Gy 0,95 [0,87; 0,98];  $p \leq 0,01$ ).



**Abbildung 4.5: Zellzahlbestimmung von HRMECs mit und ohne Röntgenbestrahlung sowie Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** Die HRMECs wurden ohne bzw. mit 16 Gy bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) oder hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubiert. Die Quantifizierung der Zellzahl fand mittels DAPI-Färbung statt. a) stellt die prozentuale Zellkernzunahme nach der 24-stündigen Sauerstoffinkubation dar. In b) wurden die Daten als paarweise Vergleiche zwischen den scheinbestrahlten und bestrahlten HRMECs bei gleicher Sauerstoffbehandlung dargestellt. Die Experimente wurden dreifach mit jeweils vier technischen Replikaten pro Versuchsdurchführung wiederholt. Die statistische Auswertung der Daten fand mittels Rang-Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's -Test (Post-Hoc-Test) statt. \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . Die Daten sind mit Median und dem 25./75. Perzentil dargestellt. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen.

## 4.6 Bestimmung der Zellviabilität nach Röntgenstrahlenbehandlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Die Zellviabilität von bestrahlten bzw. scheinbestrahlten HRMECs bei anschließender Inkubation in Hypoxie oder Hyperoxie sollte aufzeigen, ob die metabolische Aktivität durch die Adaptation an eine neue Sauerstoffatmosphäre beeinträchtigt wird. Ziel war es potenziell protektive oder verstärkende Effekten infolge der Anpassung an eine neue Sauerstoffumgebung nach der Strahlenbehandlung herauszuarbeiten. Hierzu wurden MTT-Assays mit HRMECs durchgeführt, deren Protokoll in Abschnitt 3.2.8 beschrieben wurde. Die statistische Auswertung der OD-Werte von HRMECs ohne Röntgenbestrahlung, deren Mediane mit den 25./75. Perzentilen (Md [25.;75. Perzentil]) in Abbildung 4.6a dargestellt sind, zeigte signifikante Unterschiede bei hypoxischen (0,249 [0,255; 0,241]) vs. normoxischen HRMECs (0,227 [0,2170; 249]) mit  $p \leq 0,01$  bzw. hypoxischen vs. hyperoxischen HRMECs (0,230 [0,2280; 242;]) mit  $p \leq 0,05$ . In der Gruppe der bestrahlten HRMECs konnte hingegen kein statistisch relevanter Unterschied zwischen den experimentellen Ansätzen mit jeweils spezifischen Sauerstoffkonzentrationen festgestellt werden (Abbildung 4.6b).

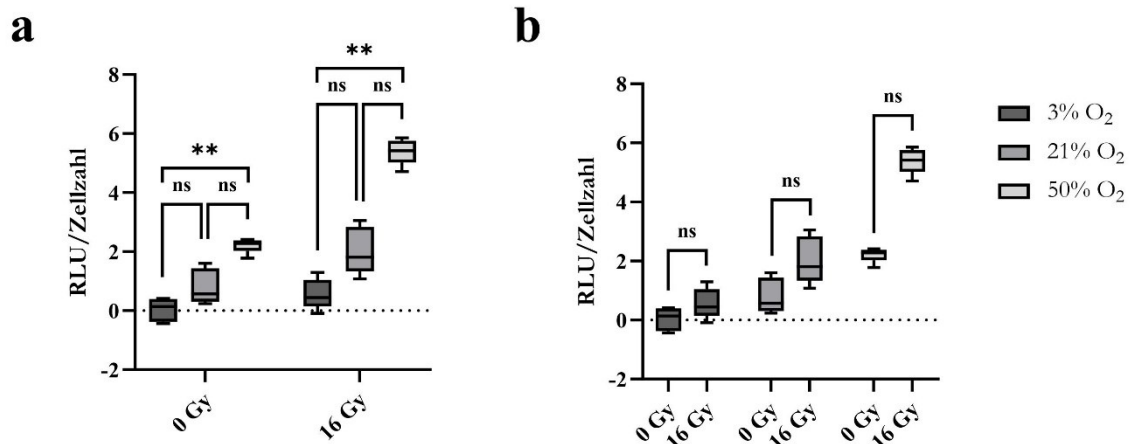


**Abbildung 4.6: MTT-Assays von HRMECs mit und ohne Röntgenbestrahlung sowie Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** Die HRMECs wurden ohne bzw. mit 16 Gy Röntgenstrahlung behandelt. Anschließend wurden die Zellen unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) und hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubiert (37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>). a) illustriert die gemessenen OD-Werte von scheinbestrahlten HRMECs nach der 24-stündigen Sauerstoffbehandlung. Die OD-Werte der bestrahlten HRMECs wurden in b) dargestellt. Die Experimente wurden mit vier bis fünf technischen Replikaten je Behandlung wiederholt. Die statistische Auswertung der Daten fand mittels Rang-Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's -Test (Post-Hoc-Test) statt. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . Die Daten sind mit Median und dem 25./75. Perzentil dargestellt. HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, OD: optical density, optische Dichte.

## 4.7 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nach Röntgenbestrahlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in bestrahlten bzw. scheinbestrahlten HRMECs wurde nach der Inkubation in Hypoxie, Normoxie oder Hyperoxie untersucht, um zu prüfen, ob die jeweilige O<sub>2</sub>-Konzentration protektive oder potenzierende Folgen für die Sauerstoffradikalbildung haben kann. Die paarweisen Vergleiche zwischen bestrahlten und scheinbestrahlten HRMECs (hier: 0 Gy vs. 16 Gy) dienten der Unterscheidung zwischen rein sauerstoffbedingten Effekten und solchen, die erst in Kombination mit der Bestrahlung auftreten. Die semiquantitative Bestimmung von extrazellulärem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgte mittels ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assays, die mit Zellkulturmedium aus 8-Well  $\mu$ -slides durchgeführt wurden (Abschnitt 3.2.7).

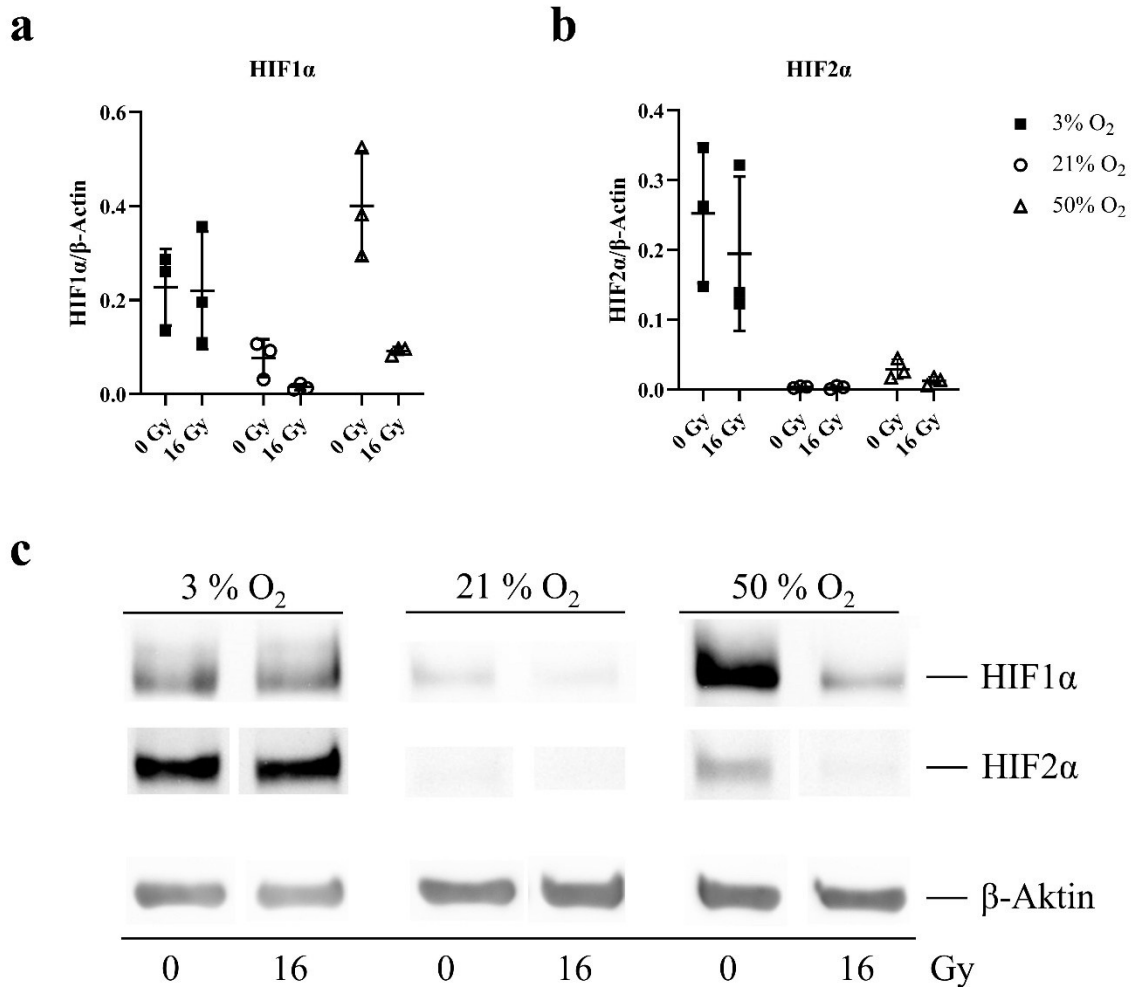
Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plots mit Medianen und 25./75. Perzentilen (Md [25.;75. Perzentil]) in Abbildung 4.7a, b dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Quotienten aus ermittelten RLU-Werten und der quantifizierten Zellzahl (Abschnitt 3.2.9). Bei hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>) vs. hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) HRMECs mit gleicher Strahlenbehandlung wurden signifikante Unterschiede festgestellt. Die statistische Auswertung zeigte einen deutlichen und signifikanten Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nach einer Inkubation der HRMECs in 50 % O<sub>2</sub> im Vergleich zur Inkubation in einer hypoxischen Sauerstoffumgebung (0 Gy: 3 % O<sub>2</sub> 0,140 [-0,375; 0,399] vs. 50 % O<sub>2</sub> 2,282 [2,028; 2,377];  $p \leq 0,01$  und 16 Gy: 3 % O<sub>2</sub> 0,444 [0,143; 1,044] vs. 50 % O<sub>2</sub> 5,420 [5,017; 5,755];  $p \leq 0,001$ ). Im Gegensatz dazu zeigten die paarweisen Vergleiche zwischen 0 Gy und 16 Gy bei jeweils gleichem Sauerstoffanteil keine signifikanten Unterschiede in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung (Abbildung 4.7b). Die Messungen tendierten allerdings zu einem Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge bei allen untersuchten Sauerstoffbehandlungen. Dabei ist der Median der relativen RLU-Werte nach einer Sauerstoffbehandlung von 3 % O<sub>2</sub> (0 Gy: 0,140 [0,375; 0,399] vs. 16 Gy: 0,444 [0,143; 1,044]) und 21 % O<sub>2</sub> (0 Gy: 0,572 [0,304; 1,439] vs. 16 Gy: 1,961 [1,305; 3,169]) im Vergleich zu einer Inkubation in 50 % O<sub>2</sub> (0 Gy: 2,282 [2,028; 2,377] und 16 Gy: 5,420 [5,017; 5,755]) auf einem deutlich niedrigeren Niveau.



**Abbildung 4.7: ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assay von HRMECs mit bzw. ohne Röntgenstrahlenbehandlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** HRMECs wurden ohne bzw. mit 16 Gy Röntgenstrahlung behandelt. Anschließend wurden die Zellen unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) und hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Verglichen wurden die Zellgruppen mit unterschiedlicher Sauerstoffinkubation bei gleicher Strahlenbehandlung (a). Der paarweise Vergleich zwischen bestrahlten und scheinbestrahlten HRMECs bei gleichbleibendem Sauerstoffanteil ist in (b) dargestellt. Die statistische Analyse der Quotienten aus RLU-Werten und DAPI-abhängige Zellzahl fand mittels Rang-Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's-Test (Post-Hoc-Test) statt. Das Experiment wurde dreifach mit n = 2–3 technischen Replikaten pro Versuchsdurchführung wiederholt. Ausgewertet wurden mindestens 7 RLU-Werte je Behandlung. \*\*p ≤ 0,01. HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, ns: nicht signifikant, RLU: relative luminescence units, ROS: reactive oxygen species, reactive Sauerstoffspezies.

#### 4.8 Intrazelluläres Proteinlevel von HIF1α und HIF2α nach Röntgenstrahlenbehandlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

In dieser Versuchsreihe wurden die Auswirkungen der Strahlenbehandlung auf das intrazelluläre Proteinlevel der HIFα-Untereinheiten untersucht. Die paarweisen Vergleiche der relativen Proteinmengen aus bestrahlten und scheinbestrahlten HRMECs bei gleicher Sauerstoffumgebung dienen zur Einschätzung, inwiefern die Proteinakkumulation von HIFα nach der Strahlenbehandlung beeinträchtigt wurde. Die Proteinmenge von HIF1α und HIF2α wurde mittels Western-Blot-Verfahren in Ganzzelllysaten aus HRMECs verglichen. Die HRMECs wurden nach einer Röntgenbestrahlung bzw. Scheinbestrahlung und der anschließenden Inkubation unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) und hyperoxischen Bedingungen (50 % O<sub>2</sub>) untersucht. Der experimentelle Ablauf ist in Abschnitt 3.2.5 zusammengefasst.



**Abbildung 4.8: Qualitative Western-Blot-Analyse der Proteinakkumulation von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in HRMECs mit bzw. ohne Röntgenstrahlenbehandlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** Die HRMECs wurden mit einer Röntgenbestrahlung von 16 Gy behandelt oder bei den gleichen Druck- und Temperaturverhältnissen scheinbestrahlt. Die Zellen wurden anschließend über einen Zeitraum von 24 h unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) und hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Die individuellen Werte der Proteinmengen von HIF1 $\alpha$  (a) und HIF2 $\alpha$  (b) sind mit den Mittelwerten und der Standardabweichung dargestellt. (c) zeigt die Signalintensitäten der Proteine HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  sowie der Proteinladekontrolle  $\beta$ -Aktin auf einer Nitrozellulosemembran. Aufgrund der geringen Anzahl an biologischen Replikaten (drei biologische Replikate mit je drei gepoolten Zelllysatsproben) wurde eine deskriptive Analyse der Daten durchgeführt. HIF: hypoxia-inducible factor, HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen.

Die HIF1 $\alpha$ -Proteinbanden aus Ganzzelllysaten scheinbestrahlter HRMECs zeigten eine deutliche Zunahme der Signalintensitäten nach einer Inkubation unter hypoxischen bzw. hyperoxischen Bedingungen im Vergleich zur Inkubation in Normoxie (Abbildung 4.8c). Die Mittelwerte (MW  $\pm$  SD) der HIF1 $\alpha$ -Signalintensitäten von scheinbestrahlten vs. bestrahlten Zellen (Abbildung 4.8a) lagen nach der normoxischen und hypoxischen Sauerstoffbehandlung auf einem vergleichbaren Niveau (21 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 0,077  $\pm$  0,040 vs. 16 Gy 0,015  $\pm$  0,006 und 3 % O<sub>2</sub>: 0 Gy: 0,228  $\pm$  0,081 vs. 16 Gy: 0,220  $\pm$  0,125).

Hingegen sank die HIF1 $\alpha$ -Signalintensität in hyperoxischen HRMECs nach der Strahlenbehandlung deutlich (0 Gy:  $0,401 \pm 0,116$  vs. 16 Gy:  $0,092 \pm 0,008$ ).

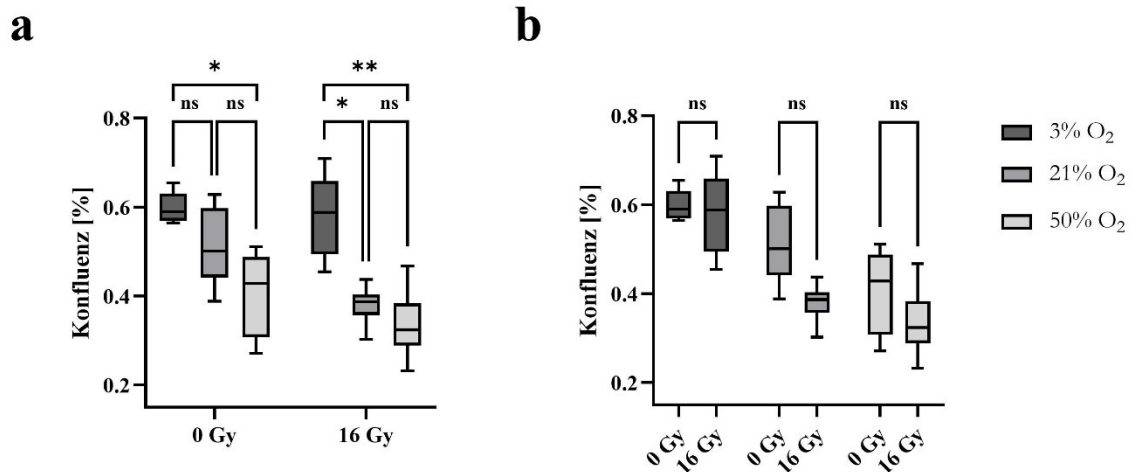
Die Auswertung der HIF2 $\alpha$ -Proteinbanden zeigte sowohl bei 0 Gy als auch bei 16 Gy einen tendenziellen Anstieg der Proteinmenge in hyperoxischen und hypoxischen HRMECs (Abbildung 4.8b). Die gemessene Signalintensität der HIF2 $\alpha$ -Proteinbande war nach der Inkubation in 3 % O<sub>2</sub> (0 Gy:  $0,252 \pm 0,100$  und 16 Gy:  $0,195 \pm 0,110$ ) deutlich höher als in HRMEC-Zelllysaten nach einer normoxischen (0 Gy:  $0,004 \pm 0,001$  und 16 Gy:  $0,003 \pm 0,002$ ) bzw. nach einer hyperoxischen Behandlung (0 Gy:  $0,029 \pm 0,014$  und 16 Gy:  $0,013 \pm 0,006$ ). Unabhängig von der Sauerstoffbehandlung blieb die Signalintensität von HIF2 $\alpha$  trotz einer geringen tendenziellen Abnahme der gemessenen Werte in bestrahlten vs. scheinbestrahlten Zellen auf einem vergleichbaren Niveau. Bei der Betrachtung der Daten muss berücksichtigt werden, dass die Experimente mit drei biologischen Replikaten aus je drei gepoolten Zelllysaten abgeschlossen wurden. Die Beschreibung der Ergebnisse basiert daher auf einer deskriptiven Statistik (Abschnitt 4.2.13).

#### **4.9 Zellmigration nach Röntgenbestrahlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen**

Ziel war es, die Auswirkungen der Strahlenbehandlung auf die Zellmigration von HRMECs in Abhängigkeit von der Sauerstoffatmosphäre, in der die Zellen inkubiert wurden, zu untersuchen. Die Motilität von bestrahlten bzw. scheinbestrahlten HRMECs während einer Inkubation unter normoxischer (21 % O<sub>2</sub>), hypoxischer (3 % O<sub>2</sub>) oder hyperoxischer (50 % O<sub>2</sub>) Bedingung wurde mittels *in-vitro* Zellmigrationsassay bestimmt (Abschnitt 3.2.10). In Abbildung 4.9 ist die relative Konfluenz der zellbesetzten Areale nach einer neunstündigen Inkubation aller Versuchsdurchführungen als Box-Whisker-Plot mit Medianen und 25./75. Perzentilen (Md [25.;75. Perzentil]) illustriert.

Die hypoxischen HRMECs zeigten gegenüber den hyperoxischen HRMECs eine signifikante Zunahme ihrer Zellmotilität, sowohl bei einer Strahlenbehandlung mit 0 Gy als auch mit 16 Gy (0 Gy: 3 % O<sub>2</sub>  $0,590 [0,569; 0,630]$  vs. 50 % O<sub>2</sub>  $0,428 [0,308; 0,488]$ ;  $p \leq 0,05$  und 16 Gy: 3 % O<sub>2</sub>  $0,589 [0,494; 0,659]$  vs. 50 % O<sub>2</sub>  $0,324 [0,288; 0,383]$ ;  $p \leq 0,01$ ) (Abbildung 4.9a). Der paarweise Vergleich zwischen scheinbestrahlten und bestrahlten HRMECs, die unter denselben Sauerstoffbedingungen inkubiert wurden, ergab keine signifikanten Unterschiede in der *in-vitro* Zellmigration (Abbildung 4.9b).

Bei allen untersuchten Sauerstoffbehandlungen ließ sich eine (teils deutliche) tendenzielle Abnahme des Medians nach der Strahlenbehandlung im Vergleich zur Scheinbestrahlung nachweisen (3 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 0,590 [0,569; 0,630] vs. 16 Gy 0,589 [0,494; 0,659], 21 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 0,501 [0,442; 0,598] vs. 16 Gy 0,387 [0,357; 0,403] und 50 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 0,428 [0,307; 0,488] vs. 50 % O<sub>2</sub>: 16 Gy 0,324 [0,288; 0,383]).

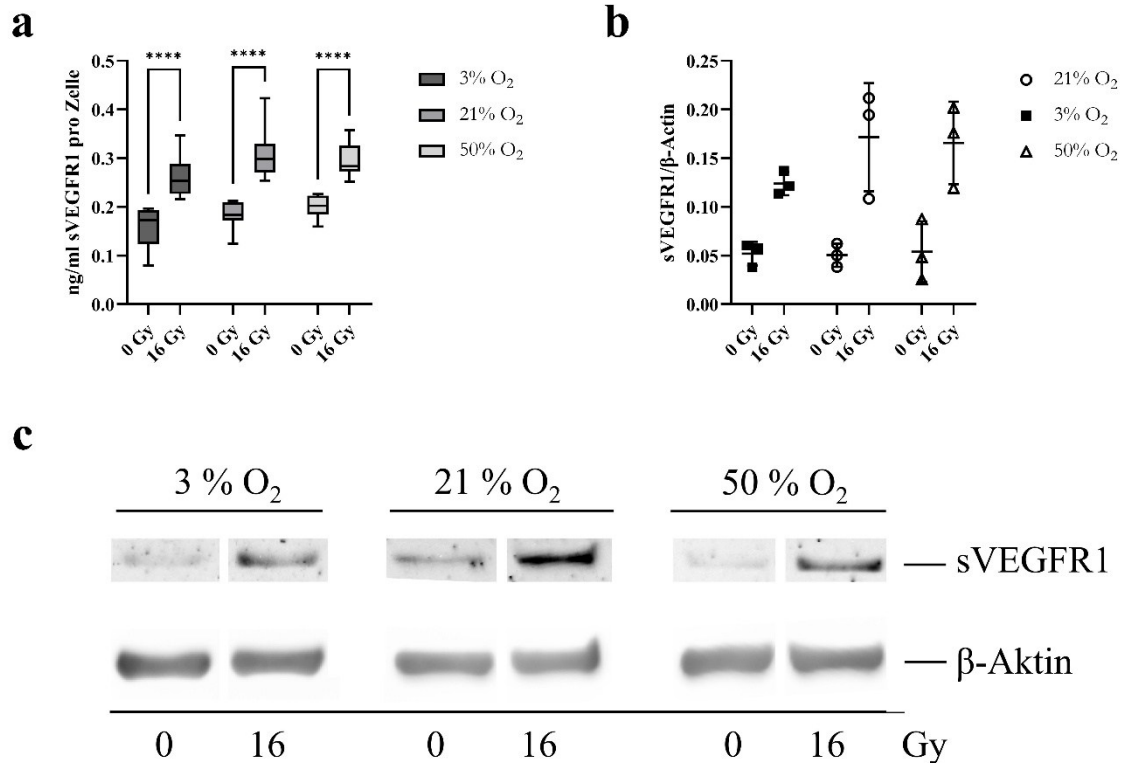


**Abbildung 4.9: In-vitro Zellmigrationsassays mit HRMECs 9 h nach Behandlung mit bzw. ohne Röntgenbestrahlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** Dargestellt ist die relative Konfluenz der untersuchten Fläche 9 h nach Bestrahlung mit 16 Gy bzw. nach Scheinbestrahlung. Die HRMECs wurden vor dem Start des in-vitro Zellmigrationsassay über einen Zeitraum von 24 h unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) oder hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C inkubiert (Abschnitt 3.2.10). Die statistische Analyse der Daten fand mittels Rang-Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's-Test (Post-Hoc-Test) statt. Das Experiment wurde mit 2–3 technischen Replikaten in drei unabhängigen Versuchen wiederholt, sodass jeweils acht Vertiefungen pro Zellbehandlung ausgewertete wurden. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , ns = nicht signifikant. HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen.

#### 4.10 Intra- und extrazelluläres VEGFA, sVEGFR1 und PlGF nach Röntgenbestrahlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Röntgenbestrahlung auf die Translation und Sekretion wichtiger angiogener Proteine in HRMECs in Abhängigkeit der Sauerstoffumgebung untersucht. Dazu wurde die intrazelluläre relative Proteinmenge und die extrazelluläre Proteinkonzentration im Zellkulturmedium aus hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen HRMECs mit bzw. ohne Strahlenbehandlung gegenübergestellt. Zur Untersuchung der Proteinsekretionen von sVEGFR1, VEGFA und PlGF wurden ELISAs durchgeführt und durch qualitative Western-Blot-Analysen von Ganzzelllysaten ergänzt (Abschnitt 3.2.5 und Abschnitt 3.2.11). Die Ergebnisse der ELISAs

sind mit Median und dem 25./75. Perzentil (Md [25.;75. Perzentil]) angegeben und als Box-Whisker-Plot dargestellt (Abbildung 4.10a und Abbildung 4.11). Die Analyse der Western-Blots wurde hingegen mit Mittelwert und Standardabweichung (MW  $\pm$  SD) illustriert (Abbildung 4.10b).



**Abbildung 4.10: Bestimmung der extrazellulären sVEGFR1-Proteinkonzentration und der relativen intrazellulären sVEGFR1-Proteinmenge von hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen HRMECs mit bzw. ohne Strahlenbehandlung.** HRMECs wurden mit Röntgenstrahlen behandelt (16 Gy) oder unter den gleichen Druck- und Temperaturverhältnissen scheinbestrahlt. Die HRMECs wurden anschließend über einen Zeitraum von 24 h unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) und hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C aufbewahrt. Der Box-Whisker-Plot in a) illustriert die ELISA-Daten als Quotient aus gemessener sVEGFR1-Konzentration und der DAPI-abhängige Zellkernzahl der jeweiligen Vertiefung im paarweisen Vergleich zwischen 0 Gy und 16 Gy bei gleichbleibender Sauerstoffinkubation. Die statistische Analyse der Daten fand mittels Rang-Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's-Test (Post-Hoc-Test) statt. Je Versuchsdurchführung wurden 2–3 technische Replikate ausgewertet. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt (Hypoxie: 0 Gy n = 10, 16 Gy n = 6; Normoxie: 0 Gy n = 11, 16 Gy n = 12; Hyperoxie: 0 Gy n = 8, 16 Gy n = 9). b) illustriert die qualitative Western-Blot-Analyse von sVEGFR1 in HRMECs. Die individuellen Werte der Proteinmengen von sVEGFR1 sind mit den Mittelwerten und der Standardabweichung analog zu a) als paarweise Vergleiche von 0 Gy und 16 Gy dargestellt. Aufgrund der geringen Anzahl an biologischen Replikaten (3 biologische Replikate mit je 3 gepoolten Zelllysatsproben) wurde eine deskriptive Statistik zur Auswertung durchgeführt. c) zeigt eine Nitrozellulosemembran nach Immunodetektion von sVEGFR1 und der Proteinladekontrolle  $\beta$ -Aktin. \*\*\*\*p  $\leq$  0,0001. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, sVEGFR1: soluble vascular endothelial growth factor receptor 1.

### Analyse der extrazellulären Proteinsekretion und intrazellulären Proteinmenge von sVEGFR1 in HRMECs

Die statistische Auswertung der sVEGFR1-Konzentrationen im konditionierten Zellkulturmedium ergab weder bei 0 Gy noch bei 16 Gy signifikante Unterschiede zwischen HRMECs in 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub>. Der paarweise Vergleich von HRMECs nach der Strahlenbehandlung mit 0 Gy vs. 16 Gy zeigte hingegen bei allen Sauerstoffatmosphären eine signifikante Zunahme der sVEGFR1-Proteinkonzentration (Abbildung 10a). Die Auswertung der Quotienten aus Proteinkonzentration und gemessener Zellzahl ergab eine signifikante Zunahme der sVEGFR1-Proteinkonzentrationen für 21 % O<sub>2</sub> mit 0,184 ng/mL·Zelle [0,172; 0,209] bei 0 Gy vs. 0,299 ng/mL·Zelle [0,271; 0,330] bei 16 Gy mit  $p \leq 0,001$ . Ähnliche Unterschiede wurden nach der Inkubation bei 3 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub> beobachtet (3 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 0,173 ng/mL·Zelle [0,124; 0,194] vs. 16 Gy 0,254 ng/mL·Zelle [0,227; 0,288];  $p \leq 0,05$  und 50 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 0,203 ng/mL·Zelle [0,184; 0,223] vs. 16 Gy 0,284 ng/mL·Zelle [0,273; 0,326];  $p \leq 0,05$ ). Abbildung 10b illustriert die individuellen Werte der sVEGFR1-Signalintensitäten aus den Western-Blot-Analysen von scheinbestrahlten vs. bestrahlten HRMECs unter gleicher Sauerstoffbedingungen im paarweisen Vergleich. Dabei zeigen die individuellen normierten sVEGFR1-Proteinbanden, die beispielhaft in Abbildung 10c dargestellt wurden, eine deutliche Zunahme der Mittelwerte nach einer Strahlenbehandlung mit 16 Gy (21 % O<sub>2</sub>: 0 Gy  $0,050 \pm 0,012$  vs. 16 Gy  $0,172 \pm 0,055$ ; 3 % O<sub>2</sub>: 0 Gy  $0,052 \pm 0,012$  vs. 16 Gy  $0,124 \pm 0,012$ ; 50 % O<sub>2</sub>: 0 Gy  $0,054 \pm 0,031$  vs. 16 Gy  $0,166 \pm 0,042$ ).

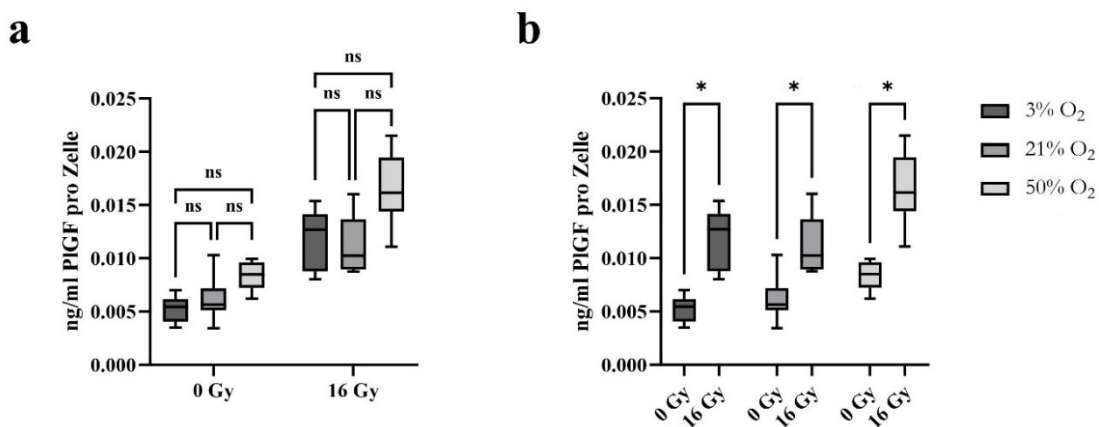
### Analyse der extrazellulären Proteinsekretion und intrazellulären Proteinmenge von PlGF in HRMECs

Die ELISA-Daten zur Bestimmung der sekretierten PlGF-Proteinkonzentration im konditionierten Zellkulturmedium von HRMECs sind in Abbildung 4.11 graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung der Quotienten aus gemessener Proteinkonzentration und der ausgezählten Zellzahl zeigte keine signifikanten Veränderungen bei gleicher Röntgenstrahlenbehandlung und unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen. Dennoch konnte eine tendenzielle PlGF-Konzentrationszunahme bei zunehmendem Sauerstoffanteil gemessen werden, die sowohl bei scheinbestrahlten als auch bei bestrahlten HRMECs auftrat (Abbildung 4.11a). Die paarweisen Vergleiche der bestrahlten vs. der scheinbestrahlten HRMECs bei gleichen Sauerstoffbedingungen sind in

Abbildung 4.11b illustriert und zeigen, dass es nach Röntgenbestrahlung zu einem signifikanten Anstieg der Quotienten aus Proteinkonzentration und Zellzahl kam (21 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 0,006 ng/mL·Zelle [0,005; 0,007] vs. 16 Gy 0,010 ng/(mL·Zelle) [0,009; 0,014];  $p \leq 0,05$ ; 3 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 0,005 ng/mL·Zelle [0,004; 0,006] vs. 16 Gy 0,013 ng/mL·Zelle [0,009; 0,014];  $p \leq 0,05$  und 50 % O<sub>2</sub>: 0 Gy 0,008 ng/mL·Zelle [0,007; 0,009] vs. 16 Gy 0,016 ng/mL·Zelle [0,014; 0,019];  $p \leq 0,05$ ). Die qualitative Western-Blot-Analyse der PlGF-Signalintensitäten zeigte hingegen keinen tendenziellen Anstieg der intrazellulären Proteinkonzentration (Anhang Abbildung 3).

### Analyse der extrazellulären Proteinsekretion und intrazellulären Proteinmenge von VEGFA in HRMECs

Das Protein VEGFA war im untersuchten Zellkulturmedium unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). Zur Messung der intrazellulären Proteinmenge wurden Western-Blots durchgeführt (Abschnitt 3.2.5). Es konnten auch intrazellulär keine VEGFA-Proteine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.11: ELISA zur Bestimmung der extrazellulären PlGF-Proteinkonzentration mit bzw. ohne Röntgenbestrahlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** Die HRMECs wurden mit Röntgenstrahlen behandelt (16 Gy) oder scheinbestrahlt. Die Zellen wurden anschließend über einen Zeitraum von 24 h unter normoxischen (21 % O<sub>2</sub>), hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>) und hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert. Zur statistischen Auswertung der Daten wurden die Quotienten aus der PlGF-Konzentration in ng/(mL·Zelle) und der DAPI-abhängige Zellkernzahl bei gleicher Röntgenstrahlbehandlung, aber unter unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen (a), sowie den Zellgruppen mit und ohne Röntgenbestrahlung bei gleichbleibender Sauerstoffinkubation (b) verglichen. Die Replikate wurden mit  $n = 2$  mindestens dreifach wiederholt (Hypoxie: 0 Gy  $n = 8$ , 16 Gy  $n = 8$ ; Normoxie: 0 Gy  $n = 8$ , 16 Gy  $n = 9$ ; Hyperoxie: 0 Gy  $n = 8$ , 16 Gy  $n = 9$ ). Die statistische Auswertung der Daten fand mittels Rang-Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) und Dunn's Test statt. \* $p \leq 0,05$ . DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, ns: nicht signifikant, PlGF: placental growth factor.

## 5. Diskussion

Die neovaskuläre Form der altersbedingten Makuladegeneration (nAMD) zeichnet sich durch einen besonders aggressiven Krankheitsverlauf aus, der unbehandelt zur Erblindung führen kann. Die retinale angiomatöse Proliferation (RAP) ist eine Sonderform der nAMD und geht auf die Neovaskularisation retinaler Gefäße zurück (Abschnitt 2.6.1). Obwohl eine wirksame Therapie zur Verfügung steht, kann der Krankheitsprozess lediglich verlangsamt werden. Die Suche nach adjuvanten Therapieoptionen ist daher wesentlicher Bestandteil aktueller Forschung.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit dem Ziel diskutiert, den Einfluss von Sauerstoffmangel und -übersversorgung auf zelluläre Prozesse und Proteine, die maßgeblich an der retinalen Neovaskularisation beteiligt sind, anhand von Zellkulturmodellen mit primären HRMECs nachzuvollziehen. Zunächst werden die Beobachtungen bei hypoxischen HRMECs thematisiert (Abschnitt 5.1), bevor die Ergebnisse aus Experimenten mit Röntgenbestrahlung hinzugezogen werden (Abschnitt 5.2). Im weiteren Diskussionsverlauf wird auf die Beobachtungen bei hyperoxischen HRMECs eingegangen (Abschnitt 5.3). Im Hinblick auf die Anwendbarkeit der Therapieoptionen SRT und HBOT wird anschließend diskutiert, welche zellulären Effekte durch die fortschreitende Behandlung mit niedrig dosierter Röntgenbestrahlung und Hyperoxie im Zellkulturmodell zu sehen waren, und ob diese für bzw. gegen den Einsatz von SRT bzw. HBOT sprechen (Abschnitt 5.4). Es folgt Abschnitt 5.5 mit der Konklusion und dem weiteren Ausblick.

### 5.1 Einfluss von Hypoxie auf HRMECs

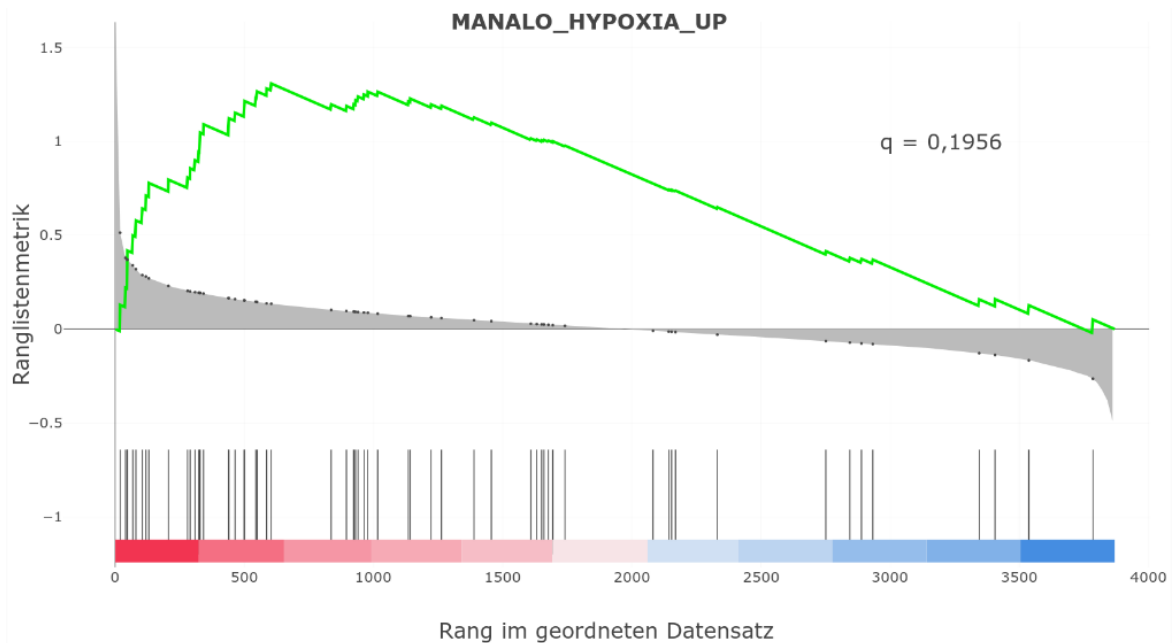
Chronischer Sauerstoffmangel induziert die Freisetzung von proangiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGFA, die eine bedeutende Rolle bei der Neovaskularisation spielen. Die zelluläre Adaptation erfolgt über die Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs, an dessen Ende die Expression von HIF-induzierten Zielgenen steht (Abschnitt 2.3 und Abschnitt 2.4). Während die Rolle von Hypoxie bei CNV in der Spätphase der nAMD ausführlich untersucht wurde, ist wenig über die Hypoxie-induzierte Neovaskularisation retinaler Endothelzellen bei RAP und deren Auswirkungen auf die Expression von pro- und antiangiogenen Wachstumsfaktoren, die Zellmigration sowie die Zellviabilität bekannt [89,172]. Die Untersuchung von retinalen Endothelzellen *in-vitro* unter hypoxischen

Bedingungen kann helfen, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die zur Pathogenese der RAP beitragen.

### **5.1.1 HIF1 $\alpha$ beeinträchtigt die Zellviabilität von hypoxischen Zellen nicht**

Die semiquantitative Analyse der beiden  $\alpha$ -Untereinheiten, HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$ , stellt einen wichtigen Schritt dar, um die Folgen einer Hypoxie auf zellbiologischer Ebene einschätzen zu können. Trotz der hohen Aminosäuresequenzhomologie von 80 % werden die beiden Untereinheiten je nach Zelltyp unterschiedlich stark exprimiert. Während HIF1 $\alpha$  in allen humanen Zellen exprimiert wird, sind die HIF2 $\alpha$ -Untereinheiten ausschließlich in Endothelzellen sowie hoch vaskularisiertem Gewebe nachweisbar (Abschnitt 2.4). Daten von Liu *et al.* zeigten, dass HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  in HRMECs unter hypoxischer Umgebung stabilisiert wurden [173].

In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Proteinakkumulation der beiden  $\alpha$ -Untereinheiten HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die Inkubation von HRMECs in verschiedenen hypoxischen Sauerstoffumgebungen über einen Zeitraum von 24 h führte zu tendenziellen bzw. signifikanten Anstiegen des HIF1 $\alpha$ -Proteinlevels (Abschnitt 4.1). Es fiel auf, dass die HIF1 $\alpha$ -Proteinmenge unter ausgeprägten hypoxischen Bedingungen (3 % O<sub>2</sub> und 1 % O<sub>2</sub>) im Vergleich zur Inkubation unter normoxischen Bedingungen lediglich um den Faktor 3 zunahm. Die eingeschränkte Proteinstabilisierung von HIF1 $\alpha$  könnte mit der tendenziellen Konzentrationsabnahme von Wasserstoffperoxid assoziiert sein (Abschnitt 4.2 und Abschnitt 4.7). Laut Literaturangaben wird die Stabilisierung der HIF $\alpha$ -Untereinheiten nicht nur durch Sauerstoffmangel, sondern auch durch ROS, die in der Elektronentransportkette als Nebenprodukte unter hypoxischen Bedingungen entstehen, ausgelöst (Abschnitt 2.5.1). In dieser Arbeit führte Hypoxie in HRMECs zu keinem Anstieg von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Zellkulturmedium. Im Gegenteil: Tendenziell sank der relative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Anteil im Vergleich zum konditionierten Zellkulturmedium normoxischer bzw. hyperoxischer HRMECs. Das Ausbleiben einer ROS-induzierten HIF1 $\alpha$ -Stabilisierung unter hypoxischen Bedingungen, die die sauerstoffabhängige Hydroxylierung der HIF $\alpha$ -Untereinheiten durch die Prolylhydroxylasen PHD1-3 ergänzt, ist daher denkbar. Die Stabilisierung von HIF2 $\alpha$  konnte bei zunehmender Hypoxie mit einer signifikanten zehnfachen (3% O<sub>2</sub>) bzw. 25-fachen (1 % O<sub>2</sub>) Intensitätszunahme im Median nachgewiesen werden (Abschnitt 4.1c). Hier scheint das niedrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Niveau im Vergleich zur Inkubation in einer normoxischen Umgebung keine Rolle zu spielen.



**Abbildung 5.1: Graphische Darstellung des GSEA als Enrichment-Plot.** Untersucht wurde die Anreicherung von differentiellen Proteinexpressionen aus hypoxischen vs. normoxischen HRMECs im C2:Manalo\_Hypoxia\_Up-Genset der MSigDB. Der angegebene  $q$ -Wert entspricht dem Meta- $q$ -Wert in der statistischen Analyse, der nach Abschnitt 4.2.13 berechnet wurde. Die Proteine wurden anhand der Effektgröße ( $\log_2FC$ ) nach Rängen geordnet. Die Peaks entsprechen den differentiell exprimierten Proteinen aus dem Datensatz, die im betrachteten Genset vorkommen. Die Häufung von Proteinen im geordneten Datensatz wurde mittels running enrichment score (grün) dargestellt. MSigDB: Molecular signatures database,  $\log_2FC$ : Logarithmischen Differenz der Expressionsmittelwerte.

Um festzustellen, ob die signifikante Akkumulation der HIF $\alpha$ -Untereinheiten eine Aktivierung bekannter HREs zur Folge hat, wurden die massenspektrometrischen Analysen hinzugezogen. Interessanterweise deuten die Ergebnisse der GSEAs daraufhin, dass die Hypoxie bei 3 % O<sub>2</sub> lediglich eine tendenzielle Aktivierung der HIF-Signalkaskade induzierte. Wie in Abschnitt 4.4 beschrieben wurde, konnte zwischen hypoxischen und normoxischen HRMECs keine signifikante Veränderung des Proteinexpressionsmusters festgestellt werden, die zur Anreicherung eines bestimmten Gensets führte. Die Stichwort-Suche nach Gensets, die mit Hypoxie assoziiert sind und auf der Analysesoftware Omics Playground zur Verfügung standen, führte zu neun Treffern. Den niedrigsten Meta- $q$ -Wert erreichte das MANALO\_HYPOXIA\_UP-Genset aus der C2-Untergruppe der kuratierten *molecular signatures database* (MSigDB) mit 60 eingeschlossenen Proteinen, deren Expression nach Manalo *et al.* durch die Aktivierung von HIF1 $\alpha$  in humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen hochreguliert wurde ( $\log_2FC = 0,0309$ , Meta- $q$ -Wert = 0,1956) [174]. Das MANALO\_HYPOXIA\_UP-Genset war darüber hinaus die einzige Proteingruppe, deren Zusammensetzung auf der Analyse von humanen Endothelzellen in Zellkultur basierte und daher am besten zu den untersuchten HRMECs passte (Anhang

Tabelle 9). Trotz des Meta-q-Werts  $> 0,05$  bestätigt der *running enrichment score* die Tendenz hin zur zunehmenden Expression von Proteinen des HIF-Signalwegs (Abbildung 5.1). Ein tendenzieller Anstieg von Proteinquantitäten des HIF-Signalwegs ist daher weiterhin denkbar.

Die Auswirkungen des *knockdowns* der HIF1 $\alpha$ -mRNA auf die Zellviabilität wurden in Abschnitt 4.3 zusammengetragen. Die Daten zeigen, dass die Inhibition der HIF1 $\alpha$ -Proteinexpression in hypoxischen HRMECs keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität hat (Abbildung 4.3a-d). Es ist naheliegend die unveränderte Zellviabilität auf die eingeschränkte HIF1 $\alpha$ -Proteinstabilisierung zurückzuführen. Womöglich reichte die Hypoxie-induzierte Aktivierung von HIF1 $\alpha$  nicht aus, um die Transkription der Zielgene, die die Zellviabilität beeinflussen, im ausreichenden Maße zu induzieren. Denkbar ist auch, dass die Adaptation an eine veränderte Sauerstoffumgebung durch HIF2 $\alpha$  reguliert wurde und die Rolle von HIF1 $\alpha$  zu vernachlässigen ist. Der gewählte Beobachtungszeitraum der Zellkulturexperimente kann ebenfalls eine Rolle spielen. Proteine, die durch HIF1 $\alpha$  reguliert werden, wurden unter Umständen noch nicht im vollen Umfang translatiert. Weitere Erklärungsansätze für die geringen Auswirkungen des HIF-1 $\alpha$ -miRNA-*knockdowns* in sauerstoffarmer Umgebung lassen sich anhand massenspektrometrischer Analysen diskutieren. Die Ergebnisse der GSEAs legen nahe, dass die Beeinträchtigung der Zellviabilität womöglich durch die sauerstoffabhängige Regulation der mitochondrialen Elektronentransportkette ausgelöst wird. Entsprechende Beobachtungen werden anhand des Vergleichs von hyperoxischen und hypoxischen HRMECs in Abschnitt 5.3 diskutiert. Mittels DPE-Analysen von hypoxischen vs. normoxischen HRMECs ließen sich lediglich drei von 3.869 Proteinen mit differentieller Expression identifizieren. Im Hinblick auf die schwache zelluläre Adaptation an die hypoxischen Bedingungen und die tendenzielle Abnahme von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Vergleich zur Inkubation in Normoxie sind vor allem FTH1 und SDHB von Relevanz. Die mögliche Rolle von SDHB bei der Bildung von mROS wird in Abschnitt 5.3.2 im Detail thematisiert.

### Ferritin heavy chain 1

Ferritin spielt intra- und extrazellulär eine zentrale Rolle bei der Eisenregulation und besteht aus zwei Untereinheiten, der FTH1 und der Ferritin *light chain* (FTL1). Die FTH1-Untereinheit ist eine Ferroxidase, die Fe<sup>2+</sup> in Fe<sup>3+</sup> umwandelt. Bei oxidativem Stress wird die Expression von FTH1 über den Transkriptionsfaktor Nrf2 (*Nuclear factor erythroid-2-*

*related factor 2*) induziert und wirkt durch starke Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Antioxidans [175]. Diese antioxidative Wirkung lässt vermuten, dass die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in hypoxischen HRMECs (Abschnitt 4.2 und Abschnitt 4.6) unter anderem durch den Konzentrationsanstieg der FTH1-Proteine um 59 % reguliert wurde. Die Zunahme von FTH1 unter hypoxischen Bedingungen kann somit ein Erklärungsansatz für die gemessene Abnahme von Wasserstoffperoxid im Medium darstellen.

Neben den antioxidativen Effekten konnten Jin *et al.* zeigen, dass FTH1 die Hydroxylierung eines Asparaginrests der HIF1 $\alpha$ -Untereinheiten in HCT116-Zellen inhibiert, wodurch die Bindung der transkriptionellen Koaktivatoren p300/CBP an das HIF1 $\alpha$ -Protein verhindert wird [176]. FTH1 beeinträchtigte auf diese Weise unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen die transkriptionelle Aktivität von HIF1 $\alpha$  in der untersuchten Zelllinie. Wichtige HIF1-Zielgene wie VEGFA, Carbonanhydrase 9 (CA9) und Erythrozyten/Hirn-Hexose-Facilitator 1 (GLUT1) können durch FTH1 herunterreguliert werden, so die Autoren. Die Studienergebnisse von Jin *et al.* liefern einen Erklärungsansatz für den Mangel an endogenem VEGFA im Zellkulturmedium bzw. im Ganzzelllysate bei Sauerstoffmangel, wie er in dieser Arbeit beobachtet wurde [176].

### Hämoxygenase 1

Das Protein Hämoxygenase (HMOX) ist am Abbau von Häm beteiligt und katalysiert dessen Spaltung zu Biliverdin, Eisenionen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) und Kohlenstoffmonoxid (*carbon monoxide*, CO) [177]. Hämoxygenase 1 ist eine von drei Isoformen, die als einzige durch eine Vielzahl von Stimuli induzierbar ist [178]. In Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass Hämoxygenase 1 zellulär vor einer Vielzahl von apoptotischen Stimuli schützt und u.a. den Zellzyklus, die Proliferation, die Sekretion von VEGFA und die Angiogenese reguliert [179–181]. Weitere Studien belegen, dass die Abbauprodukte von HMOX1 als Antioxidantien bei oxidativem Stress protektiv wirken. Allerdings wurden auch gegenteilige Effekte beschrieben. Demnach kann die Aktivierung des HMOX1-Gens sowohl pro- als auch antioxidative Folgen haben, die vor allem die Redox-Homöostase und den Eisenstoffwechsel betreffen [182]. Interessanterweise ist die HMOX-Proteinmenge in hypoxischen HRMECs gegenüber normoxischen HRMECs um ca. 43 % reduziert ( $\log_2\text{FC} = -0,803$ ) und steht damit im Widerspruch zur aktuellen Studienlage.

Laut einer Übersichtsarbeit von Medina *et al.* wird die Transkription des HMOX-Gens durch die Transkriptionsfaktoren Nrf2, Aktivator-Protein 1 (AP-1) und die HIF1-Untereinheiten ausgelöst. Die Transkriptionsfaktoren Nrf2 und AP-1 werden durch oxidativen Stress und die Bildung von ROS aktiviert [182]. Die tendenzielle Abnahme von freien Sauerstoffradikalen, die im ROS-Glo<sup>TM</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assay bei hypoxischen HRMECs detektiert wurde, kann deshalb keinen möglichen Zusammenhang liefern. Hinzu kommt, dass eine Proteinakkumulation von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  bei hypoxischen HRMECs nachweisbar ist, was vielmehr eine Induktion von Hämoxygenase 1 bei Hypoxie zur Folge hätte. Die komplexe Rolle von HMOX1 und deren verminderte Proteinexpression unter hypoxischen Bedingungen kann daher nur mit weiterführenden Experimenten geklärt werden.

### **5.1.2 Hypoxie hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellteilung, -migration oder die Sekretion von VEGFA oder sVEGFR1**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Zellmotilität zwischen normoxischen und hypoxischen HRMECs festgestellt werden (Abschnitt 4.9). Die Ergebnisse der Zellmigrationsassays zeigen allerdings einen moderaten Anstieg um das 1,18-Fache im Medians unter Sauerstoffmangel und Scheinbestrahlung (Abbildung 4.9a). Die Auswertung der Zellzahl deutet weder auf signifikante noch tendenzielle Veränderungen in der Zellteilung innerhalb des Untersuchungszeitraums hin (Abschnitt 4.5). Sowohl die Zellteilung als auch die Zellmigration sind zentrale angiogene Mechanismen der Endothelzellen (Abschnitt 2.3). Laut aktueller Studienlage verbessert die Inkubation unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen bei diversen Zelllinien die Motilität deutlich [183–185]. Die zelluläre Adaptation an Sauerstoffmangel steht in der Regel im Zusammenhang mit der Aktivierung von HIF $\alpha$ -Signalwegen [39]. Ein gut untersuchtes Beispiel ist in diesem Kontext die Rolle von VEGFA, das mit einer zunehmenden Zellmigration assoziiert ist (Abschnitt 2.3.3).

Interessanterweise bietet die Auswertung des VEGFA-ELISA eine plausible Erklärung für das Ausbleiben signifikanter Effekte in Hypoxie. Im untersuchten Zellkulturmedium wurde VEGFA als wichtiger proangiogener Wachstumsfaktor nicht detektiert (Abschnitt 4.9). Auch intrazellulär wurde mittels Western-Blot-Analyse kein VEGFA nachgewiesen. Die untersuchten HRMECs sekretierten allerdings sVEGFR1, einen löslichen VEGFA-Inhibitor mit hoher Bindungsaffinität zu VEGFA [22, 23]. Das antiangiogene sVEGFR1 wurde im konditionierten Zellkulturmedium in sehr hohen Konzentrationen detektiert. Dies lässt

darauf schließen, dass die Zellmigration der HRMECs als essentieller Schritt im Prozess der Neovaskularisation *in-vivo* auf die VEGFA-Expression aus anderen hypoxischen Zelllinien angewiesen ist oder andere proangiogene Wachstumsfaktoren eine tragende Rolle spielen. Im untersuchten Zellkultursystem mit HRMECs fehlten daher andere Zelltypen, deren VEGFA-Sekretion infolge der Hypoxie-Inkubation induziert wird. Die Zunahme der Migration von HRMECs unter hypoxischen Bedingungen war daher womöglich eingeschränkt.

## **5.2 Einfluss von Hypoxie auf bestrahlte HRMECs**

Unseres Wissens nach liegen keine Studiendaten zu Zellkulturexperimenten mit HRMECs vor, die die Auswirkungen einer Röntgenbestrahlung mit 16 Gy auf wichtige zelluläre Prozesse wie Zellmigration, -teilung und -viabilität unter hypoxischen Bedingungen untersuchten. Auch die Auswirkungen auf die Sekretion wichtiger Wachstumsfaktoren, die die Angiogenese der Endothelzellen beeinflussen könnten, liegen unter den genannten Bedingungen bislang nicht vor. Die Analyse von hypoxischen HRMECs, die einer Strahlenbehandlung mit 16 Gy ausgesetzt wurden, könnte daher neue Erkenntnisse zur Anwendbarkeit der SRT mit 16 Gy (16 Gy-SRT) bei nAMD beitragen, die bereits in umfangreichen klinischen Phase-II-Studien Anwendung fand (Abschnitt 2.7.1). Bei den erhobenen Daten dieser Arbeit muss berücksichtigt werden, dass die Bestrahlung der HRMECs unter normoxischen Bedingungen stattfand und die Inkubation in einer hypoxischen Atmosphäre erst im Anschluss durchgeführt wurde (Abschnitt 4.5–4.8 und Abschnitt 4.10). Eine Ausnahme bildeten die HRMECs der Zellmigrationsassays aus Abschnitt 4.9, die bereits vor der Strahlenbehandlung über 24 h bei 3 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden. Auch hier erfolgte die Zellbestrahlung aus technischen Gründen unter normoxischen Bedingungen, sodass eine Atmosphäre von 3 % O<sub>2</sub> nicht durchgehend aufrechterhalten wurde (Abschnitt 3.2.10). Die Interpretation der Daten muss daher mit Vorsicht betrachtet werden.

### **5.2.1 Einfluss der Strahlenbehandlung auf die Zellteilung und die Zellmigration von hypoxischen HRMECs**

Die Ergebnisse in Abschnitt 4.5 zeigen, dass eine Bestrahlung von HRMECs unabhängig von der Sauerstoffbehandlung zu einer deutlichen und signifikanten Inhibition der

Zellteilung führte. Dabei decken sich die Daten mit der aktuellen Studienlage. Die Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Energiedosen führte in mehreren Zelltypen und -linien zur Inhibition der Zellproliferation, die auf DNA-Schäden, Zellzyklusarrest und Apoptose zurückzuführen ist [115, 186]. So zeigten Zhao *et al.*, dass die Bestrahlung der HeLa-Zelllinie mit 2–20 Gy zu einem signifikanten Anstieg von apoptoseassoziierten Proteinen führte, die die Inhibition der Zellproliferation auslösten [186]. Eine Studie von Vounotrypidis *et al.* untersuchte die Folgen einer Behandlung mit ionisierender Strahlung in drei primären Zellkulturlinien (primäre humane RPE-Zellen, HUVECs und humane Pericyten aus der Plazenta), die in der Pathogenese der nAMD relevant sind bzw. relevanten Zelltypen ähneln [115]. Die Studienautoren stellten fest, dass die Bestrahlung der Zelllinien mit 16 Gy zu einer Reduktion der Zellproliferation führte. Die Apoptoserate blieb im Vergleich zur Kontrollgruppe aus scheinbestrahlten Zellen auf einem vergleichbaren Niveau [115]. Es gilt zu berücksichtigen, dass der experimentelle Aufbau der genannten Studien von der Versuchsdurchführung in dieser Arbeit abwich. So bestimmten Zhao *et al.* die Zellproliferation mittels CCK-8-Assays einige Stunden nach Bestrahlung der Tumorzelllinie [186], während Vounotrypidis *et al.* BrdU-Assays nutzten, um die Proliferation in ihren primären Zellkulturlinien sieben Tage nach der Strahlenbehandlung zu ermitteln [115]. Die Bestimmung der Zellzahl mittels DAPI-Färbung entspricht hingegen keinem Proliferationsassay und kann lediglich Aufschluss über die Zellteilung im gewählten Beobachtungszeitraum geben, ohne die frühen Stadien der Apoptose zu berücksichtigen.

Interessanterweise zeigte die Auswertung der DAPI-abhängige Zellkernzahl im Median, dass lediglich 90,2 % (16 Gy, Inkubation in 21 % O<sub>2</sub>) und 90,3 % (16 Gy, Inkubation in 3 % O<sub>2</sub>) der Zellen 24 h nach der Strahlenbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgezählt wurden. Dies ist vermutlich auf apoptotische Zellen zurückzuführen, die nach der initialen Strahlenbelastung entstanden. Weitere Zellen befanden sich nach 24 h Inkubation womöglich in der späten Phase der Apoptose und wurden nach der DNA-Kondensation nicht mehr ausgezählt. Vergleicht man die DAPI-abhängige Zellzahl der normoxischen und hypoxischen HRMECs bei gleicher Strahlenbehandlung, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Eine veränderte Zellteilung unter Sauerstoffmangel ereignet sich womöglich erst nach längeren Inkubationszeiten und ist in dem gewählten experimentellen Setting zu vernachlässigen. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die 16 Gy-SRT als adjuvante Therapie neben der Anwendung von Anti-VEGF-Präparaten eine Auswirkung auf die Neovaskularisation retinaler Endothelzellen durch die Inhibition der Zellteilung haben kann.

Die Röntgenbestrahlung induzierte bei hypoxischen HRMECs keine Veränderung in der Zellmigration, wohingegen eine deutliche Abnahme des Medians um 24 % nach Zellbestrahlung in normoxischen HRMECs zu beobachten war (Abschnitt 4.9). Die bekannten Folgen von Röntgenstrahlen wie DNA-Schäden, Zellzyklusarrest und Apoptose scheinen die Zellmotilität daher unter Hypoxie nicht zu beeinträchtigen [186], obwohl die ionisierende Strahlung laut anderer Studien eine reduzierte Zellmigration herbeiführen kann [115, 186, 187]. Eine naheliegende Erklärung ist die eingeschränkte Bildung freier Sauerstoffspezies unter hypoxischen Bedingungen, die in Abschnitt 4.7 dokumentiert wurde. Aus einer Vielzahl von Studien ist bekannt, dass die Röntgenbestrahlung zur erhöhten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies führt (Abschnitt 2.7.2). Die Daten aus den ROS-Glo<sup>TM</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assays zeigten einen erwartbaren Anstieg von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Zellkulturmedium bestrahlter HRMECs im Vergleich zu den scheinbestrahlten HRMECs. Allerdings war der detektierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Anstieg bei HRMECs, die anschließend in 3 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden, vergleichsweise gering und blieb im Median unter dem Niveau von scheinbestrahlten HRMECs, die bei 21 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden (Abbildung 4.7b). Die antioxidativen Eigenschaften von FTH1 und HMOX1, die bereits in Abschnitt 5.1.1 diskutiert wurden, können an der Regulation reaktiver Sauerstoffspezies unter Hypoxie beteiligt sein. Ein Zusammenhang zwischen der geringen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in bestrahlten HRMECs, die anschließend einem Sauerstoffmangel ausgesetzt wurden, und der unbeeinträchtigten Zellmigration von bestrahlten HRMECs unter hypoxischen Bedingungen, ist daher denkbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in HRMECs unter Sauerstoffmangel zelluläre Prozesse stattfinden, die zu einer Zunahme der Radioresistenz führen könnten. Entsprechende Beobachtungen sind aus diversen Tumorzelllinien bekannt und wurden in einer aktuellen Übersichtsarbeit von Son et al. zusammengetragen [188].

### **5.2.2 Ionisierende Strahlung induziert eine signifikante Zunahme der PlGF- und sVEGFR1-Sekretion**

Die Bestrahlung der HRMECs führte zu einem signifikanten und deutlichen Anstieg der sekretierten Proteine sVEGFR1 und PlGF im Zellkulturmedium (Abschnitt 4.10). Beide Proteine modulieren die Interaktion von VEGFA mit VEGFR2 und beeinflussen auf diese Weise die angiogenen Eigenschaften der Zellen (Abschnitt 2.3.3). Der 2,8-fache (3 % O<sub>2</sub>) bzw. 1,6-fache (21 % O<sub>2</sub>) Konzentrationsanstieg des *Decoy-Rezeptors* sVEGFR1 nach einer 16 Gy-Strahlenbehandlung in HRMECs lässt auf eine zunehmende VEGFA-Inhibition bei

der SRT schließen. Die Daten untermauern die möglichen Vorteile einer 16 Gy-SRT neben der Erstlinientherapie mit Anti-VEGF-Therapeutika. Es bleibt allerdings offen, welche Rolle der Konzentrationsanstieg von PlGF im Hinblick auf die retinale Neovaskularisation spielt. Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, handelt es sich bei dem Protein PlGF um einen angiogenese-modulierenden Faktor, dessen Wechselwirkung mit VEGFR1, VEGFA und VEGFR2 ohne eindeutige pro- bzw. antiangiogenen Effekten assoziiert ist. Weiterführende Experimente mit exogenem VEGFA im Zellkulturmedium sind daher notwendig, um die Auswirkungen einer Induktion der PlGF-Sekretion in HRMECs besser beurteilen zu können.

## **5.3 Einfluss von Hyperoxie auf HRMECs**

Wie bereits in Abschnitt 2.7.3 erörtert, ist die Anwendung einer HBOT bei nAMD ein experimenteller Ansatz, zu dem bis dato nur wenige Daten vorliegen. Die Untersuchung humaner retinaler Endothelzellen unter hyperoxischen Bedingungen *in-vitro* kann dazu beitragen, wichtige Informationen über die therapeutische Anwendbarkeit von Hyperoxie bei RAP zu sammeln und einen detaillierteren Einblick in die molekularen Mechanismen zu gewinnen.

### **5.3.1 In hyperoxischen HRMECs kommt es zu einer HIF1 $\alpha$ -Stabilisierung bei gleichzeitigem Anstieg von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Die Western-Blot-Analysen bestätigen, dass eine signifikante Zunahme des HIF1 $\alpha$ -Proteins bei einem Sauerstoffanteil von 40 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub> in HRMECs stattfand (Abschnitt 4.1). Interessanterweise trat ein solcher Effekt nicht bei HIF2 $\alpha$  auf. Die selektive Stabilisierung der HIF1 $\alpha$ -Untereinheit während einer moderaten Hyperoxie widerspricht dem postulierten Modell des Hyperoxie-Hypoxie-Paradoxons aus der Literatur (Abschnitt 2.7.4). Tatsächlich konnten einige Publikationen zeigen, dass es unter hyperoxischen Bedingungen zu einer Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  kommt [189–191]. So beobachteten Terraneo *et al.*, dass die hyperoxische Exposition eine HIF1 $\alpha$ -Stabilisierung von LNCaP-Tumorzellen in Xenograft-Mausmodellen förderte [191]. Die Autoren wiesen auf ähnliche Ergebnisse im embryonalen Myokard in einer Studie von Wikenheiser *et al.* hin und führten ihre Beobachtungen auf die zunehmende Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien zurück [190]. Tatsächlich ist aus einer Vielzahl von Publikationen bekannt, dass Hyperoxie einen Anstieg von mROS induziert und oxidativen Stress auslöst [192–194]. Die Proteinakkumulation von

HIF1 $\alpha$  durch die induzierte mROS-Bildung wurde bereits in Abschnitt 2.5.1 beschrieben und ist auch unter hyperoxischen Bedingungen naheliegend.

Um zu überprüfen, ob eine Induktion der HIF1 $\alpha$ -Proteinstabilisierung durch einen ROS-induzierten Signalweg auch bei HRMECs denkbar wäre, wurde die relative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge im Zellkulturmedium gemessen. Es zeigte sich, dass die Inkubation in 50 % O<sub>2</sub> im Vergleich zur Inkubation in Normoxie nach 12 h zu einem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Anstieg führte, der nach 24 h auf einem ähnlich hohen Niveau verblieb (Abbildung 4.2). Die Messungen des Wasserstoffperoxids im Zellkulturmedium von hyperoxischen HRMECs, die zuvor einer Scheinbestrahlung ausgesetzt wurden, untermauern diese Ergebnisse. Hier konnte ein tendenzieller bzw. signifikanter Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge im Vergleich zu normoxischen HRMECs (4-fach) und zu hypoxischen HRMECs (16-fach) gezeigt werden. Weitere Hinweise für die Abhängigkeit des HIF1 $\alpha$ -Proteins von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration ergaben sich aus Experimenten mit dem Antioxidans Glutathion (GSH) und verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen, die nach dem in Abschnitt 3.2.5 beschriebenen Protokoll „Quantitative Western-Blot-Analyse mit Ganzzelllysaten aus hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen HRMECs“ stattfanden (Anhang Abbildung 4). Laut der Übersichtsarbeit von Forman *et al.* wird GSH in einem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängigen Mechanismus durch die enzymatische Aktivität der Glutathionperoxidase zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert und senkt infolgedessen die extra- und intrazelluläre Konzentration von Wasserstoffperoxid [195]. Die Analyse der Ganzzelllysate zeigt, dass die HIF1 $\alpha$ -Signalintensitäten nach Zugabe von GSH ausschließlich in hyperoxischen HRMECs abnahmen, während sie unter Sauerstoffmangel und unter Normoxie unverändert blieben. Die Beobachtungen bei hyperoxischen Zellen untermauern die Theorie eines ROS-abhängigen Mechanismus, da die Reduktion des HIF1 $\alpha$ -Proteinlevels bei steigender GSH-Konzentration auf die Senkung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration zurückzuführen sein kann. Die Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  in hyperoxischen HRMECs durch einen ROS-induzierten Signalweg, der für hypoxische Zellen aus der Literatur bekannt ist (Abschnitt 2.5.1), scheint daher denkbar. Bei Sauerstoffmangel scheinen hingegen ROS-unabhängige Mechanismen die Stabilisierung des HIF1 $\alpha$ -Proteins auszulösen. Darauf weist zum einen die geringe relative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge im Zellkulturmedium bei hypoxischen HRMECs hin, die bereits in Abschnitt 5.2.1 diskutiert wurde. Zum anderen beeinträchtigt die Zugabe von GSH in hypoxischen HRMECs nicht das gemessene HIF1 $\alpha$ -Proteinlevel. In diesem Fall ist die HIF1 $\alpha$ -Proteinstabilisierung durch den kanonischen Hypoxie-Signalweg naheliegend, der auf eine Hemmung der O<sub>2</sub>-abhängigen Hydroxylierung von PHD-Proteinen zurückzuführen ist und in Abschnitt 2.4.1 im Detail

beschrieben wurde. Aufgrund der limitierten Anzahl an Replikaten muss die Interpretation der Western-Blot-Analysen mit Zurückhaltung betrachtet werden. Weitere Experimente zur genauen Einordnung der Rolle von Glutathion in den relevanten Signalkaskaden wären angeraten.

Interessanterweise führt ein *HIF1 $\alpha$ -knockdown* in hyperoxischen HRMECs zu keiner Veränderung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge im Zellkulturmedium (Abschnitt 4.2). Auch wenn die Interpretation der Daten aufgrund fehlender biologischer Replikate mit Vorsicht zu genießen ist, implizieren diese Ergebnisse, dass das HIF1 $\alpha$ -Protein die Bildung von Wasserstoffperoxid nicht beeinträchtigt. Es gibt somit keine Hinweise auf eine HIF1 $\alpha$ -induzierte ROS-Bildung bzw. -Inhibition, die eine potentielle ROS-induzierte HIF1 $\alpha$ -Proteinstabilisierung als positiven (oder negativen) Feedbackmechanismus reguliert. Inwiefern die Akkumulation von HIF1 $\alpha$  mit der Aktivierung von HREs assoziiert ist, bleibt ebenfalls unklar. Die Ergebnisse der GSEAs zeigen, dass es zu keiner signifikanten Anreicherung von differentiellen Proteinexpressionen in Gensets kam, die mit HIF1 $\alpha$  oder der zellulären Adaptation an Hypoxie assoziiert sind (Daten nicht gezeigt). Auch die GSEA von hyperoxischen vs. normoxischen HRMECs mit dem Genset MANALO\_HYPOXIA\_UP aus der C2-Untergruppe der kuratierten MSigDB, die bereits in Abschnitt 5.1.1 herangezogen wurde, weist mit einem Meta-q-Wert von 0,778 und einem log<sub>2</sub>FC von 0,018 auf keine Veränderungen in der Expression von Proteinen des HIF-Signalwegs hin.

### **5.3.2 Hyperoxie beeinflusst die Zusammensetzung der mitochondrialen Elektronentransportkette in HRMECs**

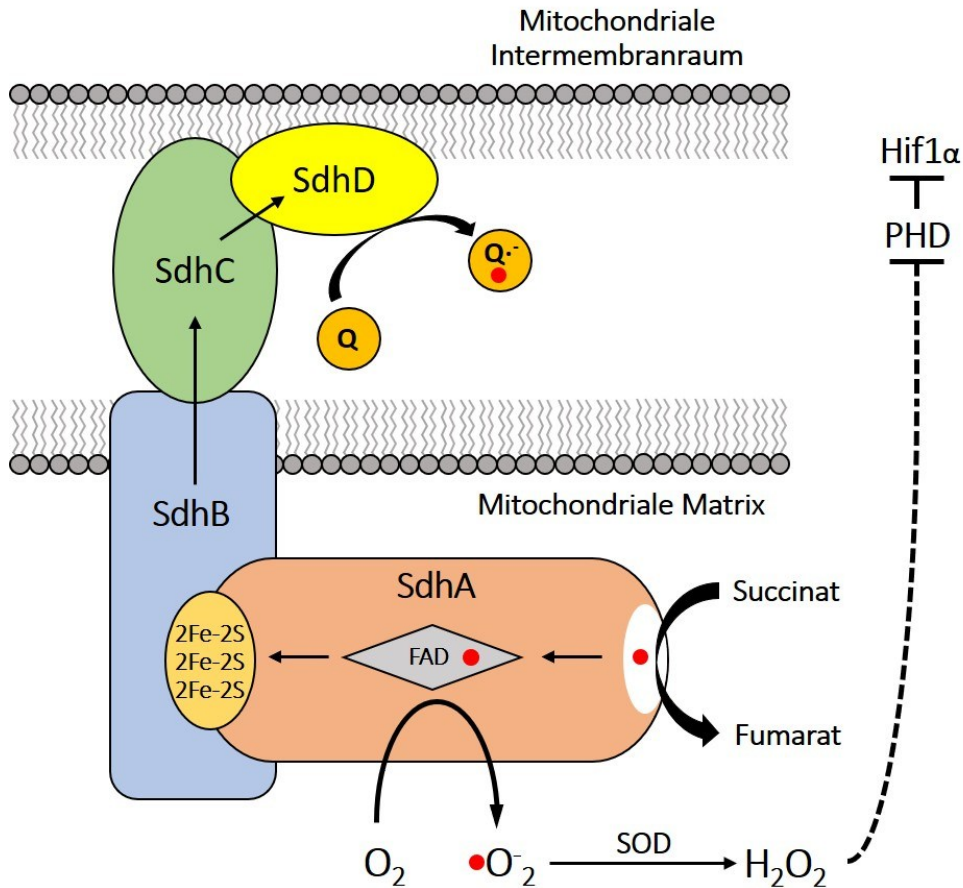
Die Messungen der extrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge geben keinen Aufschluss darüber, welche Zellkompartimente oder welche zellulären Prozesse für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies unter hyperoxischen Bedingungen maßgeblich sind. Wichtige Hinweise auf eine Beteiligung der mitochondrialen Elektronentransportkette liefern die in Abschnitt 4.4 beschriebenen Ergebnisse der GSEAs und Pathway-Analysen. Die GSEAs von hyperoxischen vs. normoxischen HRMECs bestätigen, dass ausschließlich signifikante Meta-q-Werte in angereicherten Gensets auftraten, wenn die eingeschlossenen Proteine mit Komplex I oder der mitochondrialen Atmungskette als Ganzes assoziiert sind (Tabelle 4.1). Interessanterweise sind die identischen Gensets auch in der GSEA-Auswertung von hyperoxischen vs. hypoxischen HRMECs signifikant angereichert.



(Abbildung 4.4). Die Proteinquantitäten der Succinatdehydrogenase-Untereinheit unterschieden sich sowohl bei hypoxischen vs. normoxischen HRMECs (Faktor 1,62), als auch bei hyperoxischen vs. normoxischen HRMECs (Faktor 0,62) sowie hyperoxischen vs. hypoxischen HRMECs (Faktor 0,38) deutlich. Die Western-Blot-Analysen scheinbestrahlter HRMECs bestätigen die massenspektrometrischen Daten zur Expression von SDHB (Anhang Abbildung 5). Die Funktion der Succinatdehydrogenase als Bestandteil der mitochondrialen Elektronentransportkette wurde in Abschnitt 2.5 beschrieben. Verschiedene Studien belegen zudem, dass SDHB eine wichtige Rolle in der mROS-Bildung und der Hif1 $\alpha$ -Proteinakkumulation einnimmt. So konnten Chen *et al.* an Ovarialkarzinom-Zelllinien zeigen, dass eine wechselseitige Beziehung zwischen SDHB und HIF1 $\alpha$  vorliegt [196]. Die HIF1 $\alpha$ -Proteine wurden nach einem SDHB *knock-down* stabilisiert, während die Proteinmenge nach einer SDHB-Überexpression abnahm. Demgegenüber stand die Akkumulation von HIF1 $\alpha$  nach Zugabe von CoCl<sub>2</sub>, die zur Reduktion von SDHB führte [196]. Guzy *et al.* bestätigten die Ergebnisse in verschiedenen Tumorzelllinien und ergänzten sie durch Untersuchungen an reaktiven Sauerstoffspezies (Abbildung 5.3) [59]. Nach *knockdown* bzw. chemischer Inhibition von SDHB beobachteten die Autoren eine Stabilisierung der HIF $\alpha$ -Untereinheiten und einen ROS-Anstieg. Hinweise, dass entsprechende Beobachtungen mit Tumorerkrankungen, die infolge von *loss-of-function*-Mutationen von SDHB auftreten können, in Verbindung stehen wurden durch Experimente mit Xenograft-Modellen *in-vivo* untermauert. Demnach verhalten sich Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie 143B nach *knock-down* von SDHB in Ratten deutlich tumorigener. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Reduktion von SDHB eine HIF1 $\alpha$ -Stabilisierung über einen ROS-vermittelten Mechanismus induzierte, wodurch tumorigene Effekte infolge der HIF1 $\alpha$ - und HIF2 $\alpha$ -Zielgenaktivität verstärkt wurden [59].

Die Beobachtungen von Chen *et al.* und Guzy *et al.* weisen auf einen Zusammenhang zwischen der SDHB-Proteinexpression und der Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  hin [59, 196]. Ähnliche Effekte wären bei einem Sauerstoffüberangebot in HRMECs denkbar, da die signifikante Zunahme der HIF1 $\alpha$ -Proteinmenge bei steigender Hyperoxie in Ganzzelllysaten ebenfalls beobachtet wurde und mit der Abnahme von SDHB einhergeht (Abbildung 5.2). Allerdings sind die Schlussfolgerungen der Autoren nur bedingt auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente übertragbar. Abgesehen davon, dass in den Studien vor allem Tumorzelllinien analysiert wurden, untersuchten sie die molekularen Mechanismen nach einer Induktion von HIF1 unter Sauerstoffmangel [69, 71, 73]. Die Auswirkungen von mROS auf einzelnen Komponenten der mitochondrialen Atmungskette wurden in der Regel

durch die Zugabe von chemischen Substanzen oder der Transfektion von siRNA bzw. Plasmiden untersucht [56, 57, 62, 71]. In keiner der genannten Studien wurden die zellulären Folgen einer Inkubation unter hyperoxischen Bedingungen untersucht. Eine Aussage über den Zusammenhang zwischen SDHB und HIF1 $\alpha$  lässt sich daher erst nach weiteren Experimenten treffen.



**Abbildung 5.3: Darstellung der Succinatdehydrogenase (SDH), zusammengesetzt aus den vier Untereinheiten SDHA, B, C und D.** Succinat wird in SDHA zu Fumarat oxidiert. Das frei gesetzte Elektron (rot) wird über ein Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und mehrere 2Eisen-2Schwefel Cluster (2FE-2S) auf Coenzym Q (Q) übertragen. Übergangsweise entsteht ein Semichinonradikalion (Q<sup>•</sup>). Nach Reduktion mit einem zweiten Elektron entsteht Ubichinol (QH<sub>2</sub>, hier nicht dargestellt). Die Entstehung freier Sauerstoffradikale findet entweder bei FAD, den 2Eisen-2Schwefel-Clustern oder an der Q Bindungsstelle statt. Das dabei entstandene Superoxidion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) wird durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) umgewandelt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibiert die Aktivität von Prolyl-Hydroxylasen (PHDs) und stabilisiert auf diese Weise die hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ -Untereinheit (HIF1 $\alpha$ ). Modifiziert nach Guzy et al. [59].

### **5.3.3 Die Hyperoxie beeinflusst die Zellviabilität – unabhängig von der HIF1 $\alpha$ -Proteinstabilisierung**

#### Hyperoxie verändert die Zellviabilität von HRMECs

Die Daten aus den MTT-Assays in Abschnitt 4.3 bestätigen, dass die Inkubation von HRMECs unter hyperoxischen Bedingungen zu einer Reduktion der Zellviabilität führt (Abbildung 4.3). Bei allen gemessenen Zeitpunkten (6, 12, 18 und 24 h) wurde mindestens eine tendenzielle Abnahme der relativen OD-Werte im Vergleich zu normoxischen oder hypoxischen HRMECs ermittelt. In den MTT-Assays auf 8-Well  $\mu$ -slides, die in Abschnitt 4.5 zusammengetragen wurden, zeigen sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den gemessenen OD-Werten von hypoxischen und hyperoxischen HRMECs nach Scheinbestrahlung, obwohl die Differenzen zwischen den Behandlungsgruppen geringer ausfielen als bei den Versuchsdurchführungen auf einer 96-Lochplatte (Abbildung 4.6).

Eine naheliegende Erklärung für die abnehmenden OD-Werte nach der Inkubation von HRMECs in 50 % O<sub>2</sub> ist auf Reaktion von MTT zurückzuführen. Der gemessene MTT-Farbumschlag ist von Reduktionsäquivalenten wie NADH, NADPH abhängig, sodass in diesem Assay die metabolische Reduktionskapazität als Maßstab für die Zellviabilität genommen wird (Abschnitt 3.2.8). Obwohl das Ausmaß des mitochondrialen Beitrags zur MTT-(Formazan-)Bildung kontrovers diskutiert wird [197], sind die Komplexe I und II an der MTT-Reduktion wahrscheinlich beteiligt [198, 199]. Eine Reihe von Studien nutzte MTT-Assays daher als Methode, um die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette zu messen [200–204]. Die massenspektrometrischen Analysen, deren Ergebnisse im Hinblick auf hyperoxische HRMECs in Abschnitt 5.3.2 thematisiert wurden, bestätigen, dass es infolge des Sauerstoffüberangebots zu einer Reduktion der Proteinexpression mehrerer Komplex-I- und Komplex-II-Untereinheiten kommt. Besonders deutlich wird diese Beobachtung, wenn der paarweise Vergleich von HRMECs in 3 % O<sub>2</sub> vs. 50 % O<sub>2</sub> hinzugezogen wird (Abbildung 4.4 und Abbildung 5.2). Ein Zusammenhang zwischen der MTT-abhängigen Zellviabilität sowie der Regulation wichtiger Proteinkomplexe in der mitochondrialen Elektronentransportkette ist daher wahrscheinlich und könnte den Trend einer ansteigenden MTT-abhängigen Zellviabilität bei abnehmendem Sauerstoffanteil erklären.

### Die Rolle von HIF1 $\alpha$ in Hyperoxie bleibt unklar

In Anbetracht der diskutierten Ergebnisse in den Abschnitten 5.3.1–5.3.2 lag es nahe zu prüfen, ob der *knockdown* von HIF1 $\alpha$  zu einer Veränderung der Zellviabilität unter hyperoxischen Bedingungen führen kann. Die Auswertung der MTT-Assays zeigte keine signifikanten Abweichungen zwischen hyperoxischen HRMECs mit bzw. ohne HIF1 $\alpha$ -*knockdown* (Anhang Tabelle 4). Ob die Stabilisierung der HIF-Untereinheit unter hyperoxischen Bedingungen eine Rolle für die Zellviabilität spielt, bleibt somit unklar. Interessanterweise wurden auch keine signifikanten Veränderungen in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge nach einem HIF1 $\alpha$ -*knockdown* festgestellt. Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben signifikanter Effekte auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung und die Zellviabilität könnten die untersuchten Zeitpunkte von maximal 24 h sein. Obwohl die Proteinexpressionsanalysen einige zentrale Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette in diesem Zeitraum bestätigten, treten stärkere Effekte womöglich erst später auf und werden erst nach längeren Inkubationszeiten nachweisbar. Zu diesem Erklärungsansatz passt, dass das HIF1 $\alpha$ -Proteinlevel in hyperoxische HRMECs erst nach 12 h anstieg, während die Akkumulation von HIF1 $\alpha$  bei 3 % O<sub>2</sub> bereits nach 6 h detektiert wurde (Abbildung 4.3e). Weiterführende Experimente mit HIF1 $\alpha$ -siRNA-*knockdown* sollten daher einen größeren Zeitrahmen umfassen und weitere zelluläre Prozesse wie die Angiogenese miteinschließen, die maßgeblich durch die Aktivierung von HREs beeinflusst werden.

### **5.3.4 Die Inkubation in Hyperoxie inhibiert die Zellmigration**

Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von HRMECs unter hyperoxischen Bedingungen keine signifikanten Veränderungen in der Zellteilung oder der Sekretion wichtiger Proteine wie PlGF oder sVEGFR1 über einen Zeitraum von 24 h auslösten. Allerdings zeigte sich eine deutliche und signifikante Abnahme der Zellmigration im Vergleich zu HRMECs, die unter Sauerstoffmangel inkubiert wurden (Abbildung 4.9a) Die Ergebnisse korrelieren mit der in dieser Arbeit festgestellten Abnahme der Zellviabilität nach Inkubation in Hyperoxie vs. Hypoxie. Ein möglicher Grund für die Reduktion der Zellmigration könnte daher auf die Adaptation der mitochondrialen Aktivität und/oder die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei der Inkubation der HRMECs in 50 % O<sub>2</sub> zurückzuführen sein (Abschnitt 5.3.1). Beide Effekte traten im Vergleich zu hypoxischen HRMECs mit einer deutlichen Signifikanz auf und stehen in Verbindung mit einer eingeschränkten Zellmotilität [205–207].

## 5.4. Einfluss von Hyperoxie auf bestrahlte HRMECs

Die aktuelle Studienlage zur HBOT und zur 16 Gy-SRT als ergänzende Behandlungsoptionen für die nAMD-Erstlinientherapie mit Anti-VEGFA-Präparaten wurde in Abschnitt 2.7 zusammengefasst. Obwohl eine Reihe von Daten zur Anwendung der beiden Therapien in klinischen Studien und aus der Grundlagenforschung bekannt sind, liegen unseres Wissens nach keine Daten vor, die eine Kombination von HBOT und 16 Gy-SRT bei ophthalmologischen Erkrankungen thematisieren. Ähnlich sieht es mit den Auswirkungen auf zelluläre Prozesse in retinalen Endothelzellen aus, die in der Pathophysiologie der RAP eine zentrale Rolle spielen. In dieser Arbeit wurden diese Themen näher beleuchtet. Anhand von Zellkulturexperimenten mit HRMECs wurde überprüft, ob relevante zelluläre Prozesse durch die Röntgenstrahlenbehandlung mit 16 Gy und anschließender Inkubation bei 50 % O<sub>2</sub> beeinträchtigt werden.

### 5.4.1 Welche Daten sprechen für eine Kombinationstherapie?

#### Hyperoxie induziert die deutliche Zunahme von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Die Ergebnisse in Abschnitt 4.7 zeigen, dass eine deutliche Zunahme von extrazellulärem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei hyperoxischen HRMECs nach Bestrahlung mit 16 Gy im Vergleich zu scheinbestrahlten HRMECs in 50 % O<sub>2</sub> zu beobachten war (2,45-fach erhöhter Median nach Bestrahlung mit 16 Gy). Auffällig ist die Größenordnung, in der sich die Mediane der hyperoxischen HRMECs (bestrahlt vs. scheinbestrahlt) unterscheiden. Die Effekte der Strahlenbehandlung wirkten sich in normoxischen und hypoxischen HRMECs deutlich geringer aus. So nahm der Median der RLU-Werte nach einer Scheinbestrahlung und anschließenden Inkubation bei hyperoxischen Bedingungen im Vergleich zur Inkubation in Hypoxie signifikant um den Faktor 16 zu. Der paarweise Vergleich von bestrahlten HRMECs in 50 % O<sub>2</sub> vs. 3 % O<sub>2</sub> wies auf eine zwölffache Zunahme von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Zellkulturmedium. Die erhobenen Daten implizieren, dass die ROS-Bildung nach der Strahlenbehandlung durch die Inkubation in Hyperoxie nochmals verstärkt wurde, auch wenn diese Schlussfolgerung aufgrund der fehlenden signifikanten Ergebnisse mit Vorsicht zu behandeln ist.

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtungen könnte die Entstehung von ROS in unterschiedlichen Zellkompartimenten sein, die die extrazelluläre Konzentration von

Wasserstoffperoxid erhöhen. In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass die intrazelluläre ROS-Bildung nach einer Strahlenbehandlung auf verschiedene direkte und indirekte Effekte der ionisierenden Strahlung zurückzuführen ist (Abschnitt 2.7.2). Die Auswertung der massenspektrometrischen Analysen deutet in HRMECs bei 50 % O<sub>2</sub> auf eine Hyperoxie-induzierte ROS-Bildung hin, die speziell von der mitochondrialen Atmungskette ausgehen könnte (Abschnitt 5.3.2). Die zelluläre Adaptation an eine hyperoxische Umgebung in Kombination mit zytotoxischen Prozessen, die durch die 16 Gy-Bestrahlung induziert wurden, könnte zu einem additiven Effekt in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung führen. Sollte die ROS-Konzentration durch weitere Experimente und eine robuste statistische Auswertung bestätigt werden, würde der Anstieg von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die Kombination von Hyperoxie und Strahlenbehandlung für die Anwendung von HBOT und SRT sprechen, da der oxidative Stress in bestrahlten HRMECs mit anschließender Inkubation in 50 % O<sub>2</sub> am höchsten war. In diesem Fall sollte überprüft werden, ob niedrigere Strahlendosen denkbar sind, um ähnliche ROS-induzierte Therapieeffekte bei geringerer Strahlenbelastung zu erreichen.

#### Die Strahlenbehandlung reduziert nur in hyperoxischen HRMECs das HIF1 $\alpha$ -Proteinlevel

Qualitative Western-Blot-Analysen zeigen, dass die fortschreitende Behandlung von niedrig dosierter Röntgenbestrahlung und Hyperoxie in HRMECs eine deutliche Abnahme der HIF1 $\alpha$ -Proteinmenge induzierte (Abbildung 4.8a). Dieser Effekt trat lediglich bei HRMECs auf, die bei 50 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden. Die Röntgenbestrahlung von HRMECs, die in Hypoxie oder Normoxie inkubiert wurden, beeinträchtigte das HIF1 $\alpha$ -Proteinlevel hingegen kaum (Abbildung 4.8a, c). Dass eine Reduktion von HIF1 $\alpha$  nach der Strahlenbehandlung relevant sein kann, zeigen Studien, die die Entwicklung von Radioresistenzen in hypoxischem Tumorgewebe mit der erhöhten Expression von HIF1 $\alpha$  in Verbindung bringen. Für diesen Effekt sind HIF1 $\alpha$ -Zielgene ausschlaggebend, die proangiogene bzw. antiapoptotische Eigenschaften aufweisen (z.B. VEGFA), die an der Adaptation des Glukosemetabolismus beteiligt sind (z.B. GLUT1) oder direkte/indirekte antioxidative Eigenschaften aufweisen (z.B. durch die Aktivierung des Pentosephosphatwegs). Obwohl die Retina nicht mit Tumorgewebe vergleichbar ist, sind entsprechende Effekte der Hif1 $\alpha$ -Zielgene im Kontext einer SRT bei nAMD ebenfalls kontraproduktiv. Sollte die Reduktion der HIF1 $\alpha$ -Proteinakkumulation durch weitere Experimente bestätigt werden, würde dies für die kombinierte Anwendung von HBOT und SRT sprechen, da die HIF-Aktivierung nur auf einem geringen Niveau zu erwarten wäre.

## Die deutlichste Reduktion der Zellmigration trat nach der Strahlenbehandlung von hyperoxischen Zellen auf

Die Zellmigration wurde am deutlichsten bei hyperoxischen HRMECs reduziert, die zuvor einer 16 Gy-Röntgenbestrahlung ausgesetzt wurden (Abbildung 4.9a). Besonders große und signifikante Unterschiede zeigen sich in den paarweisen Vergleichen von bestrahlten HRMECs nach der Inkubation in 3 % O<sub>2</sub> vs. 50 % O<sub>2</sub>, bei denen der Median um 44,9 % sank. Im Gegensatz zu bestrahlten vs. scheinbestrahlten HRMECs in 3 % O<sub>2</sub> konnte in hyperoxischen HRMECs eine tendenzielle Abnahme der Zellmigration nach einer Röntgenbestrahlung (Faktor 0,75) beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die ionisierende Strahlung bei hyperoxischen HRMECs stärkere Auswirkungen auf die Zellmotilität hat, als unter Sauerstoffmangel. Entsprechende Beobachtungen wurden für HRMECs, die bei 3 % O<sub>2</sub> inkubiert wurden, in Abschnitt 5.2.1 diskutiert und auf die geringe Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeführt. Dieser Argumentation folgend ist der deutliche ROS-Anstieg für die reduzierte Zellmigration von hyperoxischen HRMECs mitverantwortlich und wird durch den strahleninduzierten oxidativen Stress nach der Röntgenstrahlenbehandlung mit 16 Gy nochmals verstärkt. Effekte, die auf eine sauerstoffabhängige Radioresistenz schließen lassen, blieben hingegen aus und traten ausschließlich bei Sauerstoffmangel auf.

Die reduzierte Zellmigration von hyperoxischen HRMECs muss allerdings mit Vorsicht betrachtet werden. Zum einen konnte in den paarweisen Vergleichen zwischen scheinbestrahlten und bestrahlten HRMECs unter gleichen Sauerstoffbedingungen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, zum anderen wurde der kausale Zusammenhang zwischen Zellmigration und ROS-Bildung in dieser Arbeit nicht untersucht. Darüber hinaus gelten für die hyperoxischen HRMECs in den durchgeführten *in-vitro* Zellmigrationsassays dieselben technischen Limitationen, die für hypoxische HRMECs bereits in Abschnitt 5.2 und Abschnitt 3.2.10 diskutiert wurden. Die Bestrahlung der Zellen wurde bei Raumluft durchgeführt, sodass die Hyperoxie nicht durchgehend vorlag. Die Aufrechterhaltung einer konstanten Sauerstoffatmosphäre konnte daher nicht gewährleistet werden. Sofern die Ergebnisse durch weitere Assays, die die Zellmotilität von bestrahlten hyperoxischen HRMECs betreffen, bestätigt werden können, ist die Reduktion der Zellmigration dennoch ein weiterer Aspekt, der für die Anwendung einer Kombination aus HBOT und SRT spricht.

## 5.4.2 Welche Daten sprechen gegen die Kombinationstherapie?

### Die Sauerstoffatmosphäre beeinträchtigt weder die Zellteilung noch die Zellviabilität von bestrahlten HRMECs

Die Auswertung der DAPI-abhängige Zellzahl zeigt, dass die Zellteilung ausschließlich durch die ionisierende Strahlung beeinträchtigt wurde (Abschnitt 4.5). Die Sauerstoffatmosphäre, in der HRMECs nach der Röntgenstrahlenbehandlung inkubiert wurden, hatte hingegen keinen Einfluss auf die Proliferation. Entsprechende Beobachtungen wurden bereits in Abschnitt 5.1.2 beschrieben und im Kontext der angewandten Methode und deren Limitationen diskutiert. Die Messung der Zellviabilität erfolgte mittels MTT-Assays (Abschnitt 4.6). Die paarweisen Vergleiche von bestrahlten HRMECs bei 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub> wiesen keine signifikanten Unterschiede in der metabolischen Aktivität auf. Weiterführende Experimente, die einen größeren Inkubationszeitraum berücksichtigen und/oder andere Methoden zur Messung der Zellviabilität (z.B. ATP-abhängige Zellviabilitätsassays) und der Zellproliferation (z.B. BrdU-Assays) nutzen, sind notwendig, um die Folgen einer Kombination aus Hyperoxie und Röntgenbestrahlung besser einschätzen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit bekräftigen die diesbezüglich erhobenen Daten nicht für den Einsatz beider Behandlungen, sondern bekräftigen die Vorzüge einer 16 Gy-SRT.

### Die Inkubation in Hyperoxie führt nach der Strahlenbehandlung zu keinen signifikanten Unterschieden in der Sekretion von sVEGFR1

Wie bereits in Abschnitt 5.2.2 erläutert, führte die Bestrahlung der normoxischen und hypoxischen HRMECs zu einer Induktion der sVEGFR1-Proteinsekretion. Ähnliche Effekte ließen sich auch in hyperoxischen HRMECs nachweisen. Es wurde allerdings kein signifikanter Unterschied im paarweisen Vergleich der scheinbestrahlten normoxischen, hypoxischen und hyperoxischen HRMECs beobachtet (Abbildung 4.10a). Während die Strahlenbehandlung zu einer signifikanten Veränderung der Proteinsekretion führte, bewirkte die anschließende Inkubation in verschiedenen Sauerstoffatmosphären keine Veränderung in der Freisetzung von sVEGFR1. Passend zu den Beobachtungen der sVEGFR1-Proteinsekretion war auch kein Anstieg der intrazellulären sVEGFR1-Proteinmenge nach einer Inkubation in Hyperoxie nachweisbar (Abbildung 4.10b, c). Die erhöhte Sekretion von sVEGFR1 und die damit einhergehende VEGFA-Inhibition durch den

*Decoy-Rezeptor* ist daher auf die Strahlenbehandlung mit 16 Gy zurückzuführen. Dies spricht gegen eine Anwendung der Behandlungskombination aus Röntgenstrahlen und Hyperoxie. Ähnliche Effekte ließen sich auch bei der PlGF-Sekretion nachweisen. Die Auswertung der extrazellulären PlGF-Konzentrationen zeigt keine signifikanten Veränderungen zwischen den HRMECs unter unterschiedlichen Sauerstoffumgebungen (Abbildung 4.11a). Lediglich ein moderater, aber nicht signifikanter Anstieg des Medians der PlGF-Proteinkonzentration im Zellkulturmedium von hyperoxischen HRMECs wurde im Vergleich zur Inkubation bei 3 % O<sub>2</sub> bzw. 21 % O<sub>2</sub> beobachtet. Die Auswirkungen der ionisierenden Strahlung sind hingegen signifikant und deutlich (Abbildung 4.11b), wobei die Strahlenbehandlung von hyperoxischen HRMECs den deutlichsten PlGF-Konzentrationsanstieg induzierte. Die Beurteilung von Vor- bzw. Nachteilen der PlGF-Sekretion ist im Hinblick auf eine Kombinationstherapie nicht eindeutig möglich. Bei PlGF handelt es sich um einen angiogenese-modulierenden Faktor, dessen Bedeutung in der Neovaskularisation nicht eindeutig pro- bzw. antiangiogenen Effekten zugeordnet werden kann (Abschnitt 2.3.3).

## **5.5 Konklusion und Ausblick**

Die nAMD ist nach heutigem Wissensstand nicht heilbar und die Therapie basiert auf einer symptomatischen Behandlung der Beschwerden. Somit bestehen die Notwendigkeit und der Bedarf an effektiveren, kausalen Behandlungsoptionen. Eine relevante Untergruppe der nAMD ist die RAP, deren Krankheitsverlauf mit der Neovaskularisation retinaler Gefäßstrukturen assoziiert ist. In dieser Arbeit wurde deshalb auf primäre HRMECs zurückgegriffen. Ziel war es, die Pathomechanismen der RAP zu untersuchen und die Wirksamkeit von Therapieoptionen wie SRT und HBOT zu prüfen.

In Zellkulturexperimenten ließ sich zeigen, dass die zelluläre Adaptation der HRMECs an eine hypoxische Umgebung ohne signifikante Aktivierung typischer HREs stattfand, obwohl die Stabilisierung der HIF $\alpha$ -Proteine nachgewiesen wurde. Auch die Auswirkungen auf die Zellviabilität und die Zellmigration waren im Vergleich zu normoxischen HRMECs nur als Tendenzen nachzuweisen. Die Unterschiede wurden erst im paarweisen Vergleich mit hyperoxischen HRMECs deutlich sichtbar und statistisch relevant. Bei Sauerstoffmangel wurde zudem festgestellt, dass eine Strahlenbehandlung der HRMECs keinen Einfluss auf die Zellmigration hatte. Diese Beobachtung spricht für radioresistente Effekte, die

womöglich auf die geringe ROS-Bildung bei Sauerstoffmangel zurückzuführen sind. Die zunehmende Sekretion von sVEGFR1 nach der Zellbestrahlung impliziert einen strahleninduzierten antiangiogenen Effekt, da sVEGFR1 als löslicher *Decoy-Rezeptor* einer ansteigenden VEGFA-Expression in Hypoxie entgegensteht. Zudem wurde eine deutliche Reduktion der Zellteilung beobachtet, die eine erwartbare Folge der Strahlenbehandlung darstellt. Die signifikante Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  ohne statistisch relevante Proteinakkumulation von HIF2 $\alpha$ , die in HRMECs nach einer Hyperoxygenierung beobachtet wurde, wurde unseres Wissens nach bisher nicht beschrieben. Der gleichzeitige Anstieg der relativen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge im Zellkulturmedium lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine ROS-abhängige Stabilisierung des HIF1 $\alpha$ -Proteins stattfand. Die Beteiligung der Mitochondrien ist naheliegend, da die massenspektrometrischen Analysen Veränderungen in der Elektronentransportkette aufzeigen. Hier sind vor allem die Untereinheiten der Komplexe I und II zu nennen, deren Inhibition laut Literaturangaben mit einer vermehrten ROS-Bildung assoziiert ist. Welche Auswirkungen die HIF1 $\alpha$ -Stabilisierung auf die zellulären Prozesse hat, bleibt unklar. Die durchgeführten Zellkulturexperimente deuten zumindest nicht auf Veränderungen der Zellviabilität oder der Bildung freier Sauerstoffspezies durch die Inhibition von HIF1 $\alpha$  hin. Für die HBOT als adjuvante Therapieoption sprechen die Inhibition der Zellmigration und die Abnahme der Zellviabilität, die vor allem im direkten Vergleich mit hypoxischen HRMECs deutlich wurden und vermutlich mit der sauerstoffabhängigen Regulation der mitochondrialen Atmungskette assoziiert sind. Zuletzt wurden die Auswirkungen einer fortschreitenden Behandlung mit 16 Gy-Röntgenstrahlen und anschließender Inkubation in Hyperoxie thematisiert. Ziel war es, zu untersuchen, ob additive zelluläre Effekte, die für die Anwendung beider Therapien sprechen, auftreten. Die erhobenen Daten weisen auf einige mögliche Vorteile bei der Anwendung der Kombinationstherapie hin. Besonders relevant erscheinen in diesem Kontext die deutliche und signifikante Zunahme von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die Degradation des HIF1 $\alpha$ -Proteins und die Reduktion der Zellmigration. Gegen die Anwendung einer Kombinationstherapie spricht, dass signifikante Unterschiede in der Zellteilung sowie in der Expression und Sekretion von sVEGFR1 als relevantem Faktor der Neovaskularisation unabhängig von der Sauerstoffinkubation waren und ausschließlich auf die ionisierende Strahlung zurückzuführen sind.

Bei allen Ergebnissen dieser Arbeit gilt es zu berücksichtigen, dass die erhobenen Daten aus Zellkulturexperimenten stammen. Eine Aussage darüber, welche Beobachtungen auch in Tiermodellen oder in klinischen Studien wirklich auftreten, kann nicht getroffen werden.

Weiterführende Experimente sind zunächst notwendig, um die Daten und Analysen zu bestätigen, bevor die relevanten molekularen Mechanismen bzw. Signalkaskaden in HRMECs im Detail untersucht werden können. Nichtsdestotrotz liefern die erhobenen Daten interessante Einblicke in die sauerstoffabhängige Adaptation der HRMECs und geben Aufschluss darüber, welche Folgen die ionisierende Strahlung auf zelluläre Prozesse haben kann. Auf Grundlage der bisherigen Erkenntnisse könnten weiterführende Experimente in *in-vivo* Modellen untersuchen, ob eine Reduktion der Strahlendosis bei gleicher Wirksamkeit möglich ist, wenn die ionisierende Strahlung mit einer Inkubation in Hyperoxie kombiniert wird.

## Literaturverzeichnis

- [1] Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K. Sehorgan, Hör- und Gleichgewichtsorgan. In: Anatomie. 8. Auflage. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg. 1995:685–718.
- [2] Campbell NA, Reece JB. Biologie von Neil A. Campbell und Jane B. Reece - 6. Auflage Pearson Studium - Biologie 2006:1264–99.
- [3] Campochiaro PA. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res* 2015;49.
- [4] Shiihara H, Terasaki H, Sonoda S, Kakiuchi N, Shinohara Y, Tomita M, et al. Objective evaluation of size and shape of superficial foveal avascular zone in normal subjects by optical coherence tomography angiography. *Sci Rep* 2018;8:10143.
- [5] Ames A, Li Y, Heher E, Kimble C. Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na<sup>+</sup> transport. *The Journal of Neuroscience* 1992;12:840–53.
- [6] Wong-Riley M. Energy metabolism of the visual system. *Eye Brain* 2010;2:99.
- [7] Tisi A, Feligioni M, Passacantando M, Ciancaglini M, Maccarone R. The Impact of Oxidative Stress on Blood-Retinal Barrier Physiology in Age-Related Macular Degeneration. *Cells* 2021;10:1–21.
- [8] Kur J, Newman EA, Chan-Ling T. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 2012;31:377–406.
- [9] Curcio CA, Johnson M. Structure, Function, and Pathology of Bruch's Membrane. *Retina Fifth Edition* 2012;1:465–81.
- [10] Lehmann GL, Benedicto I, Philp NJ, Rodriguez-Boulan E. Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: Past, present and future. *Exp Eye Res* 2014;126:5–15.
- [11] Díaz-Coránguez M, Ramos C, Antonetti DA. The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision Res* 2017;139:123–37.
- [12] Krishna Vadlapatla R, Dutt Vadlapudi A, Mitra AK. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1): A Potential Target for Intervention in Ocular Neovascular Diseases HHS Public Access. *Curr Drug Targets* 2013;14:919–35.
- [13] Korablev A V, Sesorova IS, Sesorov V V, Vavilov PS, Mironov A, Zaitseva A V, et al. New Interpretations for Sprouting, Intussusception, Ansiform, and Coalescent Types of Angiogenesis. *Int J Mol Sci* 2024;25.
- [14] Guo Y, Zhang S, Wang D, Heng BC, Deng X. Role of cell rearrangement and related signaling pathways in the dynamic process of tip cell selection. *Cell Commun Signal* 2024;22:24.

- [15] Kendall RL, Rutledge RZ, Mao X, Tebben AJ, Hungate RW, Thomas KA. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor KDR Tyrosine Kinase Activity Is Increased by Autophosphorylation of Two Activation Loop Tyrosine Residues. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:6453–60.
- [16] De Spiegelaere W, Casteleyn C, Van den Broeck W, Plendl J, Bahramsoltani M, Simoens P, et al. Intussusceptive Angiogenesis: A Biologically Relevant Form of Angiogenesis. *J Vasc Res* 2012;49:390–404.
- [17] Hellström M, Phng L-K, Gerhardt H. VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adh Migr* 2007;1:133–6.
- [18] Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;161:1163–77.
- [19] Ali Z, Mukwaya A, Biesemeier A, Ntzouni M, Ramsköld D, Giatrellis S, et al. Intussusceptive Vascular Remodeling Precedes Pathological Neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;39:1402–18.
- [20] Lee C, Kim M-J, Kumar A, Lee H-W, Yang Y, Kim Y. Vascular endothelial growth factor signaling in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic perspectives. *Signal Transduct Target Ther* 2025;10:170.
- [21] Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Frontiers in Bioscience* 2006;11:11.
- [22] Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1998;273:31283–8.
- [23] Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ* 1996;7:213–21.
- [24] Xu L, Cochran DM, Tong RT, Winkler F, Kashiwagi S, Jain RK, et al. Placenta growth factor overexpression inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis by depleting vascular endothelial growth factor homodimers in orthotopic mouse models. *Cancer Res* 2006;66:3971–7.
- [25] Yang X, Zhang Y, Yang Y, Lim S, Cao Z, Rak J, et al. Vascular endothelial growth factor-dependent spatiotemporal dual roles of placental growth factor in modulation of angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:13932–7.
- [26] DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, et al. Purification and Characterization of a Naturally Occurring Vascular Endothelial Growth Factor · Placenta Growth Factor Heterodimer. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:7717–23.
- [27] Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang M-K, Anand-Apte B, Weatherbee JA, et al. Heterodimers of Placenta Growth Factor/Vascular Endothelial Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:3154–62..

- [28] Dervenis N, Dervenis P, Agorogiannis E. Neovascular age-related macular degeneration: disease pathogenesis and current state of molecular biomarkers predicting treatment response-a scoping review. *BMJ Open Ophthalmol* 2024;9.
- [29] Yang X, Zhang Y, Yang Y, Lim S, Cao Z, Rak J, et al. Vascular endothelial growth factor-dependent spatiotemporal dual roles of placental growth factor in modulation of angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013;110:13932–7.
- [30] Tarallo V, Vesci L, Capasso O, Esposito MT, Riccioni T, Pastore L, et al. A Placental Growth Factor Variant Unable to Recognize Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-1 Inhibits VEGF-Dependent Tumor Angiogenesis via Heterodimerization. *Cancer Res* 2010;70:1804–13.
- [31] Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;9:936–43.
- [32] Uemura A, Fruttiger M, D'Amore PA, de Falco S, Joussen AM, Sennlaub F, et al. VEGFR1 signaling in retinal angiogenesis and microinflammation. *Prog Retin Eye Res* 2021;84:100954.
- [33] Pohl U, de Wit C. Der Sauerstoff im Gewebe. In: *Physiologie des Menschen. Springer-Lehrbuch*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2019: 365–75.
- [34] Kaufman DP, Kandle PF, Murray I V., Dhmoon AS. *Physiology, Oxyhemoglobin Dissociation Curve*. 2025.
- [35] Jagannathan L, Cuddapah S, Costa M. Oxidative Stress Under Ambient and Physiological Oxygen Tension in Tissue Culture. *Curr Pharmacol Rep* 2016;2:64–72.
- [36] Siegfried CJ, Shui Y-B, Holekamp NM, Bai F, Beebe DC. Oxygen Distribution in the Human Eye: Relevance to the Etiology of Open-Angle Glaucoma after Vitrectomy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010;51:5731.
- [37] Sakaue H, Negi A, Honda Y. Comparative study of vitreous oxygen tension in human and rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1933–7.
- [38] Biro GP. From the Atmosphere to the Mitochondrion: The Oxygen Cascade. *Hemoglobin-Based Oxygen Carriers as Red Cell Substitutes and Oxygen Therapeutics*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013, S. 27–53.
- [39] Lee JW, Ko J, Ju C, Eltzschig HK. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Exp Mol Med* 2019;51.
- [40] Luo Z, Tian M, Yang G, Tan Q, Chen Y, Li G, et al. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7:218.
- [41] Wiener CM, Booth G, Semenza GL. In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:485–8.

- [42] Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997;11:72–82.
- [43] Mandl M, Depping R. Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1 $\beta$ ): Is it a rare exception? *Molecular Medicine* 2014;20:215–20.
- [44] Markolovic S, Wilkins SE, Schofield CJ. Protein Hydroxylation Catalyzed by 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases. *J Biol Chem* 2015;290:20712–22.
- [45] Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 2001;292:464–8. <https://doi.org/10.1126/science.1059817>.
- [46] Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the  $\beta$ -domain of the von Hippel–Lindau protein. *Nature Cell Biology* 2000 2:7 2000;2:423–7.
- [47] Maxwell PH, Wlesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999 399:6733 1999;399:271–5.
- [48] Depping R, Steinhoff A, Schindler SG, Friedrich B, Fagerlund R, Metzen E, et al. Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin  $\alpha/\beta$  pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2008;1783:394–404.
- [49] Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: Similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:6496–500.
- [50] Madan A, Curtin PT. A 24-base-pair sequence 3' to the human erythropoietin gene contains a hypoxia-responsive transcriptional enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3928–32.
- [51] Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12969–73.
- [52] Thomas LW, Ashcroft M. Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2019;76:1759–77.
- [53] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Die oxidative Phosphorylierung. *Stryer Biochemie*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013, p. 528–68.
- [54] Degn H, Wohlrab H. Measurement of steady-state values of respiration rate and oxidation levels of respiratory pigments at low oxygen tensions. A new technique. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1971;245:347–55.
- [55] Nelson DL, Cox MM. Oxidative Phosphorylierung und Photophosphorylierung. In: *Lehninger Biochemie*. 4. Auflage. Springer Berlin Heidelberg. 2011:935–1022.

- [56] Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002;80:780–7.
- [57] Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem J* 2002;368:545–53.
- [58] Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, et al. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* 2001;505:364–8.
- [59] Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, Schumacker PT. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, Subunit of Complex II Triggers Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia-Inducible Factor Activation and Tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2008;28:718–31.
- [60] Nelson DL, Cox MM. Oxidative Phosphorylierung und Photophosphorylierung. In: *Lehninger Biochemie*. 4. Auflage. Springer Berlin Heidelberg. 2011:935–1022.
- [61] Guo J, Lemire BD. The Ubiquinone-binding Site of the *Saccharomyces cerevisiae* Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase Is a Source of Superoxide. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:47629–35.
- [62] Szeto SSW, Reinke SN, Sykes BD, Lemire BD. Ubiquinone-binding Site Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* Succinate Dehydrogenase Generate Superoxide and Lead to the Accumulation of Succinate. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:27518–26.
- [63] Paranagama MP, Sakamoto K, Amino H, Awano M, Miyoshi H, Kita K. Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species from *Ascaris suum* mitochondrial complex II. *Mitochondrion* 2010;10:158–65.
- [64] Manhas N, Duong Q v., Lee P, Richardson JD, Robertson JD, Moxley MA, et al. Computationally modeling mammalian succinate dehydrogenase kinetics identifies the origins and primary determinants of ROS production. *J Biol Chem* 2020;295:15262–79.
- [65] Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Moraes CT, Murphy MP, Budinger GRS, et al. The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J Cell Biol* 2007;177:1029–36.
- [66] Bae T, Hallis SP, Kwak M-K. Hypoxia, oxidative stress, and the interplay of HIFs and NRF2 signaling in cancer. *Exp Mol Med* 2024;56:501–14.
- [67] Lee G, Won H-S, Lee Y-M, Choi J-W, Oh T-I, Jang J-H, et al. Oxidative Dimerization of PHD2 is Responsible for its Inactivation and Contributes to Metabolic Reprogramming via HIF-1 $\alpha$  Activation. *Sci Rep* 2016;6:18928.
- [68] Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, et al. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 2005;1:409–14.

- [69] Fukuda R, Zhang H, Kim J, Shimoda L, Dang C V, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 2007;129:111–22.
- [70] Regueira T, Lepper PM, Brandt S, Ochs M, Vuda M, Takala J, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha induction by tumour necrosis factor-alpha, but not by toll-like receptor agonists, modulates cellular respiration in cultured human hepatocytes. *Liver Int* 2009;29:1582–92.
- [71] Madhu V, Boneski PK, Silagi E, Qiu Y, Kurland I, Guntur AR, et al. Hypoxic Regulation of Mitochondrial Metabolism and Mitophagy in Nucleus Pulposus Cells Is Dependent on HIF-1 $\alpha$ -BNIP3 Axis. *J Bone Miner Res* 2020;35:1504–24.
- [72] Fu Z-J, Wang Z-Y, Xu L, Chen X-H, Li X-X, Liao W-T, et al. HIF-1 $\alpha$ -BNIP3-mediated mitophagy in tubular cells protects against renal ischemia/reperfusion injury. *Redox Biol* 2020;36:101671.
- [73] Chan SY, Zhang Y-Y, Hemann C, Mahoney CE, Zweier JL, Loscalzo J. MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2. *Cell Metab* 2009;10:273–84.
- [74] Huang X, Zhao L, Peng R. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Mitochondria: An Intimate Connection. *Biomolecules* 2022;13. <https://doi.org/10.3390/biom13010050>.
- [75] Bourne RRA, Jonas JB, Bron AM, Cicinelli MV, Das A, Flaxman SR, et al. Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe in 2015: magnitude, temporal trends and projections. *Br J Ophthalmol* 2018;102:575–85.
- [76] Pauleikhoff D, Scheider A, Wiedmann P, Gelissen F, Scholl HPN, Roeder I, et al. [Neovascular age-related macular degeneration in Germany. Encroachment on the quality of life and the financial implications]. *Ophthalmologie* 2009;106:242–51.
- [77] Li JQ, Welchowski T, Schmid M, Mauschwitz MM, Holz FG, Finger RP. Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol* 2020;104:1077–84.
- [78] Age-Related Eye Disease Study Research Group. The Age-Related Eye Disease Study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: the Age-Related Eye Disease Study Report Number 6. *Am J Ophthalmol* 2001;132.
- [79] Wong JHC, Ma JYW, Jobling AI, Brandli A, Greferath U, Fletcher EL, et al. Exploring the pathogenesis of age-related macular degeneration: A review of the interplay between retinal pigment epithelium dysfunction and the innate immune system. *Front Neurosci* 2022;16:1009599.
- [80] Spaide RF, Jaffe GJ, Sarraf D, Freund KB, Sadda SR, Staurenghi G, et al. Consensus Nomenclature for Reporting Neovascular Age-Related Macular Degeneration Data: Consensus on Neovascular Age-Related Macular Degeneration Nomenclature Study Group. *Ophthalmology* 2020;127:616–36.

- [81] Freund KB, Staurenghi G, Jung JJ, Zweifel SA, Cozzi M, Hill L, et al. Macular neovascularization lesion type and vision outcomes in neovascular age-related macular degeneration: post hoc analysis of HARBOR. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2022;260:2437–47.
- [82] Jung JJ, Chen CY, Mrejen S, Gallego-Pinazo R, Xu L, Marsiglia M, et al. The incidence of neovascular subtypes in newly diagnosed neovascular age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2014;158:769-779.e2.
- [83] Mrejen S, Jung JJ, Chen C, Patel SN, Gallego-Pinazo R, Yannuzzi N, et al. Long-Term Visual Outcomes for a Treat and Extend Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Regimen in Eyes with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *J Clin Med* 2015;4:1380–402.
- [84] Marticorena J, Di Leva V, Cennamo GL, de Crecchio G. Retinal angiomatous proliferation. *Curr Drug Targets* 2011;12:199–205.
- [85] Yannuzzi LA, Negrão S, Iida T, Carvalho C, Rodriguez-Coleman H, Slakter J, et al. Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina* 2001;21:416–34.
- [86] Krebs I, Binder S, Stolba U, Kellner L, Glittenberg C, Goll A. Subretinal surgery and transplantation of autologous pigment epithelial cells in retinal angiomatous proliferation. *Acta Ophthalmol* 2008;86:504–9.
- [87] Viola F, Massacesi A, Orzalesi N, Ratiglia R, Staurenghi G. Retinal angiomatous proliferation: natural history and progression of visual loss. *Retina* 2009;29:732–9.
- [88] Huang Y-Y, Lo W-J, Chang H-Y, Chou Y-B, Lin T-C. Three-Year Outcomes of Intravitreal Aflibercept Injections for Retinal Angiomatous Proliferation According to Disease Stage. *Ophthalmol Ther* 2022;11:1503–16.
- [89] Clemens CR, Eter N, Alten F. Current Perspectives on Type 3 Macular Neovascularization due to Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmologica* 2024;247:73–84.
- [90] Stefánsson E, Geirsdóttir A, Sigurdsson H. Metabolic physiology in age related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2011;30:72–80.
- [91] Spaide RF. Fundus autofluorescence and age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2003;110:392–9.
- [92] Holz FG, Pauleikhoff D, Klein R, Bird AC. Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am J Ophthalmol* 2004;137:504–10.
- [93] Qiang W, Wei R, Chen Y, Chen D. Clinical Pathological Features and Current Animal Models of Type 3 Macular Neovascularization. *Front Neurosci* 2021;15:734860.
- [94] Shimada H, Kawamura A, Mori R, Yuzawa M. Clinicopathological findings of retinal angiomatous proliferation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:295–300.
- [95] Luo L, Uehara H, Zhang X, Das SK, Olsen T, Holt D, et al. Photoreceptor avascular privilege is shielded by soluble VEGF receptor-1. *Elife* 2013;2:e00324.

- [96] Lanzetta P, Loewenstein A, Vision Academy Steering Committee. Fundamental principles of an anti-VEGF treatment regimen: optimal application of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor therapy of macular diseases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017;255.
- [97] Obeid A, Gao X, Ali FS, Aderman CM, Shahlaee A, Adam MK, et al. Loss to Follow-up Among Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration Who Received Intravitreal Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Injections. *JAMA Ophthalmol* 2018;136:1251–9.
- [98] Grunwald JE, Pistilli M, Daniel E, Ying G-S, Pan W, Jaffe GJ, et al. Incidence and Growth of Geographic Atrophy during 5 Years of Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology* 2017;124:97–104.
- [99] Khan AMH, Hashmi SFA, Li B, Shaukat F, Ahmed Y, Alfishawy M, et al. Stereotactic radiotherapy: An educational narrative review. *Precis Radiat Oncol* 2024;8:47–58.
- [100] Jackson TL, Desai R, Wafa HA, Wang Y, Peacock J, Peto T, et al. Stereotactic radiotherapy for neovascular age-related macular degeneration (STAR): a pivotal, randomised, double-masked, sham-controlled device trial. *Lancet* 2024;404:44–54.
- [101] Serova NK, Sergeeva NA, Pronin IN, Galkin MV, Golanov AV. The role of stereotactic radiation therapy in the treatment of optic nerve meningioma. *Modern Technologies in Ophthalmology* 2024:120–1.
- [102] Michael E, Ferguson RA, Hadden PW. Dose-Related Visual Outcomes in the Treatment of Choroidal Melanoma with Stereotactic Radiotherapy. *Ocul Oncol Pathol* 2024;10:65–71.
- [103] Azzam EI, Jay-Gerin J-P, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett* 2012;327:48–60.
- [104] Jay-Gerin JP, Ferradini C. Are there protective enzymatic pathways to regulate high local nitric oxide (NO) concentrations in cells under stress conditions? *Biochimie* 2000;82:161–6.
- [105] Pandey BN, Gordon DM, De Toledo SM, Pain D, Azzam EI. Normal human fibroblasts exposed to high- or low-dose ionizing radiation: differential effects on mitochondrial protein import and membrane potential. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1253–61.
- [106] Prithivirajasingh S, Story MD, Bergh SA, Geara FB, Ang KK, Ismail SM, et al. Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Lett* 2004;571:227–32.
- [107] Lenzen S, Lushchak VI, Scholz F. The pro-radical hydrogen peroxide as a stable hydroxyl radical distributor: lessons from pancreatic beta cells. *Arch Toxicol* 2022;96:1915–20.
- [108] Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000;28:463–99.

- [109] Herrlich P, Böhmer FD. Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 2000;59:35–41.
- [110] Méplan C, Richard MJ, Hainaut P. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem Pharmacol* 2000;59:25–33.
- [111] Price BD, Calderwood SK. Gadd45 and Gadd153 messenger RNA levels are increased during hypoxia and after exposure of cells to agents which elevate the levels of the glucose-regulated proteins. *Cancer Res* 1992;52:3814–7.
- [112] López-Barneo J, López-López JR, Ureña J, González C. Chemotransduction in the carotid body: K<sup>+</sup> current modulated by PO<sub>2</sub> in type I chemoreceptor cells. *Science* 1988;241:580–2.
- [113] Tsubata T. Involvement of Reactive Oxygen Species (ROS) in BCR Signaling as a Second Messenger. *Adv Exp Med Biol* 2020;1254:37–46.
- [114] Carante MP, Ramos RL, Ballarini F. Radiation Damage in Biomolecules and Cells 2.0. *Int J Mol Sci* 2023;24.
- [115] Vounotrypidis E, Hillenmayer A, Wertheimer CM, Athanasiou A, Siedlecki J, Orth M, et al. In vitro evaluation of simulated stereotactic radiotherapy for wet age-related macular degeneration on three different cell lines. *Sci Rep* 2021;11:8068.
- [116] Wiese S, Beckers S, Siekmann U, Baltus T, Rossaint R, Schröder S. [Hyperbaric oxygenation: characteristics of intensive care and emergency therapy]. *Anaesthesist* 2006;55:693–705.
- [117] Collins J-A, Rudenski A, Gibson J, Howard L, O’Driscoll R. Relating oxygen partial pressure, saturation and content: the haemoglobin–oxygen dissociation curve. *Breathe* 2015;11:194–201.
- [118] Calvert JW, Cahill J, Zhang JH. Hyperbaric oxygen and cerebral physiology. *Neurol Res* 2007;29:132–41.
- [119] Micun Z, Dobrzyńska W, Sieškiewicz M, Zawadzka I, Dmuchowska DA, Wojewodzka-Zelezniakowicz M, et al. Hyperbaric Oxygen Therapy in Ophthalmology: A Narrative Review. *J Clin Med* 2023;13.
- [120] Malerbi FK, Novais EA, Emmerson Badaró, Bonomo PP de O, Pereira AJ, Lottenberg CL, et al. Hyperbaric oxygen therapy for choroidal neovascularization: a pilot study. *Undersea Hyperb Med* 2015;42:125–31.
- [121] Cannellotto M, Yasells García A, Landa MS. Hyperoxia: Effective Mechanism of Hyperbaric Treatment at Mild-Pressure. *Int J Mol Sci* 2024;25.
- [122] Sun L, Marti HH, Veltkamp R. Hyperbaric oxygen reduces tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in focal cerebral ischemia. *Stroke* 2008;39:1000–6.
- [123] Gu G-J, Li Y-P, Peng Z-Y, Xu J-J, Kang Z-M, Xu W-G, et al. Mechanism of ischemic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning involves upregulation of

- hypoxia-inducible factor-1alpha and erythropoietin in rats. *J Appl Physiol* (1985) 2008;104:1185–91.
- [124] De Wolde SD, Hulskes RH, Weenink RP, Hollmann MW, Van Hulst RA. The Effects of Hyperbaric Oxygenation on Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis. *Biomolecules* 2021;11.
- [125] Schottlender N, Gottfried I, Ashery U. Hyperbaric Oxygen Treatment: Effects on Mitochondrial Function and Oxidative Stress. *Biomolecules* 2021;11.
- [126] Balestra C, Germonpré P, Poortmans JR, Marroni A. Serum erythropoietin levels in healthy humans after a short period of normobaric and hyperbaric oxygen breathing: the “normobaric oxygen paradox”. *J Appl Physiol* (1985) 2006;100:512–8.
- [127] Hadanny A, Efrati S. The Hyperoxic-Hypoxic Paradox. *Biomolecules* 2020;10.
- [128] Salvagno M, Coppalini G, Taccone FS, Strapazzon G, Mrakic-Sposta S, Rocco M, et al. The Normobaric Oxygen Paradox-Hyperoxic Hypoxic Paradox: A Novel Expedient Strategy in Hematopoiesis Clinical Issues. *Int J Mol Sci* 2022;24.
- [129] Leveque C, Mrakic Sposta S, Theunissen S, Germonpré P, Lambrechts K, Vezzoli A, et al. Oxidative Stress Response Kinetics after 60 Minutes at Different (1.4 ATA and 2.5 ATA) Hyperbaric Hyperoxia Exposures. *Int J Mol Sci* 2023;24.
- [130] PRSS1 - Trypsin-1 precursor - Homo sapiens (Human) - PRSS1 gene & protein n.d. <https://www.uniprot.org/uniprot/P07477> (accessed November 24, 2021).
- [131] Ströfer M, Jelkmann W, Metzen E, Brockmeier U, Dunst J, Depping R. Stabilisation and Knockdown of HIF - Two Distinct Ways Comparably Important in Radiotherapy. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2011;28:805–12.
- [132] Wolff M, Jelkmann W, Dunst J, Depping R. The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1 $\alpha$ ) is Influenced by Hypoxia and Hypoxia-Mimetics. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2013;32:849–58.
- [133] Lowry OliverH, Rosebrough NiraJ, Farr AL, Randall RoseJ. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265–75.
- [134] Peterson GL. Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall. *Anal Biochem* 1979;100:201–20.
- [135] Bio-Rad. DC Protein Assay Instruction Manual. unter: <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf> (abgerufen am 03.01.2024) n.d.
- [136] Chrambach A, Rodbard D. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Science* (1979) 1971;172:440–51.
- [137] Hames BD. Gel electrophoresis of proteins : a practical approach. 3. Auflage. Oxford University Press. 1998:352.

- [138] Mahmood T, Yang PC. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci* 2012;4:429.
- [139] Gravel P. Protein Blotting by the Semidry Method. In: Walker, J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ. 2009:621–9.
- [140] Stochaj WR, Berkelman T, Laird N. Staining Membrane-Bound Proteins with Ponceau S. *Cold Spring Harb Protoc* 2006;2006:pdb.prot4543.
- [141] Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* 2010;397:3173–8.
- [142] Horizon inspired cell solutions. DharmaFECT™ Transfection Reagents—siRNA transfection protocol. Unter: <https://horizondiscovery.com/-/media/Files/Horizon/resources/Protocols/basic-dharmafect-protocol.pdf> (abgerufen am 11.09.2025).
- [143] Newsholme P, Rebelato E, Abdulkader F, Krause M, Carpinelli A, Curi R. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and  $\beta$ -cell function: a critical role for amino acids. *Journal of Endocrinology* 2012;214:11–20.
- [144] Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:936486.
- [145] Huet O, Petit JM, Ratinaud MH, Julien R. NADH-dependent dehydrogenase activity estimation by flow cytometric analysis of 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Cytometry* 1992;13:532–9.
- [146] Berridge M V., Tan AS. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993;303:474–82.
- [147] Berridge M V., Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005;11:127–52.
- [148] Kapuściński J, Szer W. Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. *Nucleic Acids Res* 1979;6:3519–34.
- [149] Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007;2:329–33.
- [150] Kohl TO, Ascoli CA. Immunometric Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2017;2017.
- [151] Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 2003;24:3–12.
- [152] Thermo Scientific, EasyPep™ Mini MS Sample Prep Kit User Guide. Unter: <https://documents.thermofisher.com/TFS->

Assets/LSG/manuals/MAN0018079\_2162714\_EasyPepMiniKit\_UG.pdf (abgerufen am 21.08.2025).

- [153] Thermo Scientific, Instruction Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible. Unter: [https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011614\\_Pierce\\_MicroplateBCAProteinAsy\\_ReducAgn tComp\\_UG.pdf](https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011614_Pierce_MicroplateBCAProteinAsy_ReducAgn tComp_UG.pdf) (abgerufen am 21.09.2025).
- [154] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76–85.
- [155] Ludwig C, Gillet L, Rosenberger G, Amon S, Collins BC, Aebersold R. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 2018;14:e8126.
- [156] Kakkassery V, Gemoll T, Kraemer MM, Sauer T, Tura A, Ranjbar M, et al. Protein Profiling of WERI-RB1 and Etoposide-Resistant WERI-ETOR Reveals New Insights into Topoisomerase Inhibitor Resistance in Retinoblastoma. *Int J Mol Sci* 2022;23.
- [157] Sauer T, Facchinetti G, Kohl M, Kowal JM, Rozanova S, Horn J, et al. Protein Expression of AEBP1, MCM4, and FABP4 Differentiate Osteogenic, Adipogenic, and Mesenchymal Stromal Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2022;23.
- [158] Demichev V, Messner CB, Vernardis SI, Lilley KS, Ralser M. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nat Methods* 2020;17:41–4.
- [159] UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* 2021;49:D480–9.
- [160] Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 2014;13:2513–26.
- [161] Zhang X, Smits AH, van Tilburg GB, Ovaas H, Huber W, Vermeulen M. Proteome-wide identification of ubiquitin interactions using UbIA-MS. *Nat Protoc* 2018;13:530–50.
- [162] Huber W, von Heydebreck A, Sültmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 2002;18 Suppl 1:S96-104.
- [163] Hedderich J, Sachs L. *Angewandte Statistik Methodensammlung mit R*. 16. Auflage. 2018.
- [164] Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc* 1952;47:583–621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>.
- [165] Dunn OJ. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 1964;6:241–52.
- [166] TUKEY JW. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* 1949;5:99–114.

- [167] Fisher RA. On the Interpretation of  $\chi^2$  from Contingency Tables, and the Calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* 1922;85:87.
- [168] Korotkevich G, Sukhov V, Budin N, Shpak B, Artyomov MN, Sergushichev A. Fast gene set enrichment analysis 2016.
- [169] Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 2013;14:7.
- [170] Binder JX, Pletscher-Frankild S, Tsafou K, Stolte C, O'Donoghue SI, Schneider R, et al. COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence. *Database (Oxford)* 2014;2014:bau012.
- [171] Agrawal A, Balci H, Hanspers K, Coort SL, Martens M, Slenter DN, et al. WikiPathways 2024: next generation pathway database. *Nucleic Acids Res* 2024;52:D679–89.
- [172] Barben M, Samardzija M, Grimm C. The Role of Hypoxia, Hypoxia-Inducible Factor (HIF), and VEGF in Retinal Angiomatous Proliferation. *Adv Exp Med Biol* 2018;1074:177–83.
- [173] Liu Z, Yan S, Wang J, Xu Y, Wang Y, Zhang S, et al. Endothelial adenosine A2a receptor-mediated glycolysis is essential for pathological retinal angiogenesis. *Nat Commun* 2017;8:584.
- [174] Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005;105:659–69.
- [175] Shesh BP, Connor JR. A novel view of ferritin in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2023;1878:188917.
- [176] Jin P, Kang J, Lee MK, Park J-W. Ferritin heavy chain controls the HIF-driven hypoxic response by activating the asparaginyl hydroxylase FIH. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;499:475–81.
- [177] Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517–54.
- [178] Consoli V, Sorrenti V, Grosso S, Vanella L. Heme Oxygenase-1 Signaling and Redox Homeostasis in Physiopathological Conditions. *Biomolecules* 2021;11.
- [179] Józkwicz A, Huk I, Nigisch A, Weigel G, Dietrich W, Motterlini R, et al. Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:155–62.
- [180] Li Volti G, Wang J, Traganos F, Kappas A, Abraham NG. Differential effect of heme oxygenase-1 in endothelial and smooth muscle cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:1077–82.

- [181] Liu X, Peyton KJ, Ensenat D, Wang H, Hannink M, Alam J, et al. Nitric oxide stimulates heme oxygenase-1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival. *Cardiovasc Res* 2007;75:381–9.
- [182] Medina MV, Sapochnik D, Garcia Solá M, Coso O. Regulation of the Expression of Heme Oxygenase-1: Signal Transduction, Gene Promoter Activation, and Beyond. *Antioxid Redox Signal* 2020;32:1033–44.
- [183] A Naveena H, Bhatia D. Hypoxia Modulates Cellular Endocytic Pathways and Organelles with Enhanced Cell Migration and 3D Cell Invasion. *Chembiochem* 2023;24:e202300506.
- [184] Williams PA, Stilhano RS, To VP, Tran L, Wong K, Silva EA. Hypoxia augments outgrowth endothelial cell (OEC) sprouting and directed migration in response to sphingosine-1-phosphate (S1P). *PLoS One* 2015;10:e0123437.
- [185] Tabata Y, Yoshino D, Funamoto K, Koens R, Kamm RD, Funamoto K. Migration of vascular endothelial cells in monolayers under hypoxic exposure. *Integr Biol (Camb)* 2019;11:26–35.
- [186] Zhao H, Zhuang Y, Li R, Liu Y, Mei Z, He Z, et al. Effects of different doses of X-ray irradiation on cell apoptosis, cell cycle, DNA damage repair and glycolysis in HeLa cells. *Oncol Lett* 2018.
- [187] Nisar H, Labonté FM, Roggan MD, Schmitz C, Chevalier F, Konda B, et al. Hypoxia Modulates Radiosensitivity and Response to Different Radiation Qualities in A549 Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cells. *Int J Mol Sci* 2024;25.
- [188] Song CW, Kim H, Kim M-S, Park HJ, Paek S-H, Terezakis S, et al. Role of HIF-1 $\alpha$  in the Responses of Tumors to Radiotherapy and Chemotherapy. *Cancer Res Treat* 2025;57:1–10.
- [189] Jin R, Gao Q, Yin C, Zou M, Lu K, Liu W, et al. The CD146-HIF-1 $\alpha$  axis regulates epithelial cell migration and alveolar maturation in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Lab Invest* 2022;102:794–804.
- [190] Wikenheiser J, Wolfram JA, Gargasha M, Yang K, Karunamuni G, Wilson DL, et al. Altered hypoxia-inducible factor-1 alpha expression levels correlate with coronary vessel anomalies. *Dev Dyn* 2009;238:2688–700.
- [191] Terraneo L, Virgili E, Caretti A, Bianciardi P, Samaja M. In vivo hyperoxia induces hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  overexpression in LNCaP tumors without affecting the tumor growth rate. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;51:65–74.
- [192] Kwak DJ, Kwak SD, Gauda EB. The Effect of Hyperoxia on Reactive Oxygen Species (ROS) in Rat Petrosal Ganglion Neurons During Development Using Organotypic Slices. *Pediatr Res* 2006;60:371–6.
- [193] Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, Habazettl H, Krombach F, Kuppe H, et al. Hyperoxia-Induced Reactive Oxygen Species Formation in Pulmonary Capillary Endothelial Cells *In Situ*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:453–63. <https://doi.org/10.1165/rmb.2005-0223OC>.

- [194] Barker GF, Manzo ND, Cotich KL, Shone RK, Waxman AB. DNA Damage Induced by Hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:277–88.
- [195] Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 2009;30:1–12.
- [196] Chen L, Liu T, Zhang S, Zhou J, Wang Y, Di W. Succinate dehydrogenase subunit B inhibits the AMPK-HIF-1 $\alpha$  pathway in human ovarian cancer in vitro. *J Ovarian Res* 2014;7.
- [197] Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* 2021;22.
- [198] Dong L-F, Low P, Dyason JC, Wang X-F, Prochazka L, Witting PK, et al. Alpha-tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II. *Oncogene* 2008;27:4324–35.
- [199] Surin AM, Sharipov RR, Krasil'nikova IA, Boyarkin DP, Lisina OY, Gorbacheva LR, et al. Disruption of Functional Activity of Mitochondria during MTT Assay of Viability of Cultured Neurons. *Biochemistry (Mosc)* 2017;82:737–49.
- [200] Małaczewska J, Kaczorek-Łukowska E, Kazuń B. High cytotoxicity of betulin towards fish and murine fibroblasts: Is betulin safe for nonneoplastic cells? *BMC Vet Res* 2021;17:198.
- [201] Nikoloff N, Carranza Martin AC, Fabra MC, Furnus CC. Amitraz induced cytotoxic effect on bovine cumulus cells and impaired oocyte maturation. *Environ Sci Pollut Res Int* 2021;28:29188–99.
- [202] Kok D, Peeters CMM, Mardina Z, Oterdoom DLM, Bulstra SK, Veldhuizen AG, et al. Is remaining intervertebral disc tissue interfering with bone generation during fusion of two vertebrae? *PLoS One* 2019;14:e0215536.
- [203] Mor-Yossef Moldovan L, Kislev N, Lustig M, Pomeranec L, Benayahu D. Biomechanical stimulation effects on the metabolism of adipocyte. *J Cell Physiol* 2020;235:8702–13.
- [204] Ghazali R, Mehta KJ, Bligh SA, Tewfik I, Clemens D, Patel VB. High omega arachidonic acid/docosahexaenoic acid ratio induces mitochondrial dysfunction and altered lipid metabolism in human hepatoma cells. *World J Hepatol* 2020;12:84–98.
- [205] Ball JA, Vlisidou I, Blunt MD, Wood W, Ward SG. Hydrogen Peroxide Triggers a Dual Signaling Axis To Selectively Suppress Activated Human T Lymphocyte Migration. *J Immunol* 2017;198:3679–89.
- [206] Xu P, Xue Y-N, Ji H-H, Tan C, Guo S. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress disrupts mitochondrial functions and impairs migratory potential of human epidermal melanocytes. *Exp Dermatol* 2020;29:733–41.
- [207] Schalch TD, Fernandes MH, Destro Rodrigues MFS, Guimarães DM, Nunes FD, Rodrigues JC, et al. Photobiomodulation is associated with a decrease in cell viability and migration in oral squamous cell carcinoma. *Lasers Med Sci* 2019;34:629–36.

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AHR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AP-1	Aktivator-Protein 1
ata	Absoluter Druck
ATP	Adenosintriphosphat
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration, <i>age-related macular degeneration</i>
AREDS	<i>Age-Related Eye Disease Study</i>
ARNT	Aryl Hydrocarbon Rezeptor nuklearer Translokator, <i>aryl hydrocarbon receptor (AhR) nuclear translocator</i>
BCVA	<i>best-corrected visual acuity</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BM	Basalmembran
BNIP3	Bcl-2/Adenovirus E1B 19kDa-interagierendes Protein 3
BRS	Blut-Retina-Schranke
CA9	Carbonanhydrase 9
CC	Choriocapillaris
CBP/p300	CREB-binding protein/adenovirus E1A-binding Protein p300
CES	<i>Collision energy spread</i>
CNV	Choroidale Neovaskularisation
CO	Kohlenstoffmonoxid, <i>carbon monoxide</i>
CoCl <sub>2</sub>	Cobalt(II)-chlorid
Cyt c	Cytochrom c
COX4-1	Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 4 Isoform 1
COX4-2	Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 4 Isoform 2
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDA	<i>data dependent acquisition</i>
DIA	<i>data independent acquisition</i>
DIA-NN	<i>data independent acquisition by neural networks</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DP	Declustering-Potential
DPE	Differentielle Proteinexpression
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTRS	<i>early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i> -Sehschärfetafel
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid
FBS	Fetales Kälberserum, <i>fetal bovine serum</i>
FC	<i>fold change</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
fGSEA	<i>fast genes et enrichment analysis</i>

FIH1	Hydroxylase Faktorhemmendes HIF-1 Protein, <i>factor-inhibiting HIF-1<math>\alpha</math></i>
FTH 1	Ferritin <i>heavy chain 1</i>
FTIC	Fluoresceinisothiocyanat
FTL	Ferritin <i>light chain</i>
Flt-1	<i>fms related receptor tyrosine kinase 1</i>
FMN	Flavinmononukleotid
GA	Geographische Atrophie
GSEA	Genmengen-Anreicherungsanalyse, <i>genes set enrichment analysis</i>
GLUT1	Erythrozyten/Hirn-Hexose- <i>facilitator 1</i>
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GSVA	<i>gene set variation analysis</i>
Gy	Gray
Log <sub>2</sub> FC	Logarithmische Differenz der Expressionsmittelwerte
HBOT	Hyperbare Sauerstofftherapie, <i>hyperbaric oxygen therapy</i>
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i> , Heterodimer aus einer $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit
HIF $\alpha$	$\alpha$ -Untereinheiten des <i>hypoxia-inducible factor</i>
HMOX	Hämoxygenase
HRE	<i>hypoxia-response element</i>
HRMECs	Humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
HSD	<i>honestly significant difference</i>
H <sub>2</sub> O	Wassermolekül
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sup>+</sup>	Proton
IA	Intussuszeptive Angiogenese
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IVOM	intravitreale operative Medikamentengabe
MECG	<i>microvascular endothelial cell growth</i>
MNAR	<i>missing not at random</i>
mROS	Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies, <i>mitochondrial reactive oxygen species</i>
MS	Massenspektrometrie
MSigDB	<i>molecular signatures database</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MV	<i>missing value</i>
<i>N. Opticus</i>	<i>nervus opticus</i>
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
nAMD	Neovaskuläre AMD
nDNA	Nukleäre DNA
NDUFA2	NADH-Q-Oxidoreduktase Untereinheit A2
Neg. Ktrl.	Negativkontrolle
NICD	<i>notch intracellular domain</i>
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase, <i>nitric oxide synthase</i>
•NO	Stickstoffmonoxid, <i>nitric oxide</i>
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid-2-related factor 2</i>
OH•	Hydroxylradikale
OIR	sauerstoffinduzierter Retinopathie, <i>oxygen-induced retinopathy</i>
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit-Anionen, <i>peroxynitrit</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff

O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
PBS	Phosphatgepufferter Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PDR	Proliferative Retinopathie
PED	Pigmentepithelabhebung, <i>pigment epithelial detachment</i> , PED
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolyl-4-Hydroxylase Protein, <i>prolyl hydroxylase domain protein</i>
PIGF	<i>placental growth factor</i>
Q	Ubichinon, Coenzym Q
QH <sub>2</sub>	Ubichinol, reduziertes Coenzym Q
Q• <sup>-</sup>	Semichinonradikalion
RAP	Retinale angiomatöse Proliferation
RLU	Relative Lumineszenz-Unit, <i>relative luminescence unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RNS	reaktive Stickstoffspezies, <i>reactive nitrogen species</i>
ROI	<i>region of interest</i>
RPE-Zellen	Retinale Pigmentepithelzellen
ROP	Frühgeborenenretinopathie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
SA	<i>sprouting</i> Angiogenese
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfat</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide polyacrylamid gel electrophoresis</i>
SRP14	<i>signal-recognition-particle-protein 14</i>
SRT	Stereotaktische Radiotherapie
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOD	Superoxiddismutase
sVEGFR1	<i>soluble vascular endothelial growth factor</i>
SWATH-MS	<i>sequential window acquisition of all theoretical mass spectra</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin.</i>
TFRC	Transferrinrezeptorprotein 1
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
VHL	Von Hippel-Lindau Tumorsuppressor-Protein
2FE-2S	2Eisen-2Schwefel Cluster

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 2.1:</b>	Aufbau des Augapfels.....	3
<b>Abb. 2.2:</b>	Schematische Darstellung der funktionalen Komponenten der inneren und äußeren BRS.....	6
<b>Abb. 2.3:</b>	Zelldifferenzierung während der sprouting Angiogenese.....	7
<b>Abb. 2.4:</b>	Schematische Darstellung einer intussuszeptiven Angiogenese.....	9
<b>Abb. 2.5:</b>	Darstellung der HIF-Aktivierung.....	12
<b>Abb. 2.6:</b>	Aufbau der mitochondrialen Elektronentransportkette.....	13
<b>Abb. 2.7:</b>	Klassifizierung des Krankheitsprozesses der retinalen angiomatösen Proliferation (RAP, nAMD Typ III) nach Yannuzzi et al. [85].....	19
<b>Abb. 2.8:</b>	Schematische Darstellung intrazellulärer Effekte nach der Absorption ionisierender Strahlung.....	22
<b>Abb. 3.1:</b>	Schematische Darstellung der zugrundeliegenden chemischen Reaktionen des ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Assays.....	41
<b>Abb. 3.2:</b>	Lytisches ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Assays auf 96-Lochplatten.....	42
<b>Abb. 3.3:</b>	Nicht-lytische ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Assay auf 8-Well µ-slides.....	43
<b>Abb. 3.4:</b>	MTT-Assays auf 96-Lochplatten nach Lipofektion mit siRNA.....	45
<b>Abb. 3.5:</b>	MTT-Assays auf 8-Well µ-slides mit bzw. ohne Röntgenbestrahlung	46
<b>Abb. 3.6:</b>	DAPI-abhängige Bestimmung der Zellzahl auf 8-Well µ-slides mit bzw. ohne Röntgenbestrahlung.....	47
<b>Abb. 3.7:</b>	Bestimmung der Zellkernzahl mittels ImageJ.....	48
<b>Abb. 3.8:</b>	<i>In-vitro</i> Zellmigrationsassays mit 2-Well Culture-Inserts auf 8-Well µ-slides mit bzw. ohne Röntgenstrahlenbehandlung.....	50
<b>Abb. 4.1:</b>	Semiquantitative Western-Blot-Analyse der Proteine HIF1α und HIF2α.....	59
<b>Abb. 4.2:</b>	ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Assays zur Bestimmung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung in HRMECs mit und ohne HIF1α-knockdown.....	60
<b>Abb. 4.3:</b>	MTT-Assays von HRMECs mit bzw. ohne HIF1α-knockdown und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.....	62
<b>Abb. 4.4:</b>	Streudiagramm zur Visualisierung der DPE-Analysen mit HRMECs unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	64

<b>Abb. 4.5:</b>	Zellzahlbestimmung von HRMECs mit und ohne Röntgenbestrahlung sowie Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	69
<b>Abb. 4.6:</b>	MTT-Assays von HRMECs mit und ohne Röntgenbestrahlung sowie Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	70
<b>Abb. 4.7:</b>	ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Assay von HRMECs mit bzw. ohne Röntgenstrahlenbehandlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	72
<b>Abb. 4.8:</b>	Qualitative Western-Blot-Analyse der Proteinakkumulation von HIF1 $\alpha$ und HIF2 $\alpha$ in HRMECs mit bzw. ohne Röntgenstrahlenbehandlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	73
<b>Abb. 4.9:</b>	<i>In-vitro</i> Zellmigrationsassays mit HRMECs 9 h nach Behandlung mit bzw. ohne Röntgenbestrahlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	75
<b>Abb. 4.10:</b>	Bestimmung der extrazellulären sVEGFR1-Proteinkonzentration und der relativen intrazellulären sVEGFR1-Proteinmenge von hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen HRMECs mit bzw. ohne Strahlenbehandlung .....	76
<b>Abb. 4.11:</b>	ELISA zur Bestimmung der extrazellulären PlGF-Proteinkonzentration mit bzw. ohne Röntgenbestrahlung und Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	78
<b>Abb. 5.1:</b>	Graphische Darstellung des GSEA als Enrichment-Plot .....	81
<b>Abb. 5.2:</b>	Illustration der Pathway-Analyse von hyperoxischen vs. hypoxischen HRMECs .....	91
<b>Abb. 5.3:</b>	Darstellung der Succinatdehydrogenase (SDH), zusammengesetzt aus den vier Untereinheiten SDHA, B, C und D .....	93
<b>Anhang</b>	Box-Whisker-Plot zur Darstellung der signifikant differentiell	
<b>Abb. 1:</b>	exprimierten Proteine .....	135
<b>Anhang</b>	Visualisierung der GSEAs von HREMECs unter verschiedenen	
<b>Abb. 2:</b>	Sauerstoffbedingungen als Enrichment-Plots .....	136
<b>Anhang</b>	Bestimmung der relativen intrazellulären PlGF-Proteinmenge von	
<b>Abb. 3:</b>	HRMECs nach Strahlen- und Sauerstoffbehandlung .....	137
<b>Anhang</b>	Qualitative Western-Blot-Analyse der Proteinakkumulation von HIF1 $\alpha$	
<b>Abb. 4:</b>	nach Inkubation in 0 mM, 1 mM und 3 mM GSH bei 3 % O <sub>2</sub> , 21 % O <sub>2</sub> und 50 % O <sub>2</sub> .....	138
<b>Anhang</b>	Qualitative Bestimmung von SDHB in Ganzzelllysaten aus HRMECs	
<b>Abb. 5:</b>	nach der Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen .....	139

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 3.1:</b> Primäre Zellkultur .....	27
<b>Tab. 3.2:</b> Zellkulturmedium .....	27
<b>Tab. 3.3:</b> Puffer und Chemikalien .....	28
<b>Tab. 3.4:</b> Primär- und Sekundärantikörper für Western-Blots .....	30
<b>Tab. 3.5:</b> Verbrauchsmaterialien .....	30
<b>Tab. 3.6:</b> Laborgeräte .....	31
<b>Tab. 3.7:</b> Software .....	33
<b>Tab. 3.8:</b> siRNA .....	34
<b>Tab. 4.1:</b> Auflistung signifikanter Genmengen aus paarweisen Vergleichen mit Proteinquantitäten von HRMECs unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.....	66
<b>Tab. 4.2:</b> Auflistung signifikanter Genmengen in Pathway-Analysen mit HRMECs unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.....	68
<b>Anhang</b> Paarweiser Vergleich mit Daten aus Western Blot Analyse mittels H- <b>Tab. 1:</b> Test-Variante „Vergleich eines Standards mit mehreren Behandlungen“	124
<b>Anhang</b> Paarweise Vergleiche mit Daten aus ROS-Glo™ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Assays <b>Tab. 2:</b> (Abschnitt 3.2.7). .....	125
<b>Anhang</b> Paarweise Vergleiche mit Daten aus MTT-Assays auf 8-Well $\mu$ -slides <b>Tab. 3:</b> (Abschnitt 3.2.8).....	126
<b>Anhang</b> Paarweise Vergleiche mit Daten aus MTT-Assays auf 96-Well- <b>Tab. 4:</b> Lochplatten (Abschnitt 3.2.8).....	126
<b>Anhang</b> Paarweise Vergleiche mit Daten aus der DAPI-abhängige <b>Tab. 5:</b> Zellzahlbestimmung (Abschnitt 3.2.9).....	129
<b>Anhang</b> Paarweise Vergleiche mit Daten aus <i>in-vitro</i> Zellmigrationsassays <b>Tab. 6:</b> (Abschnitt 3.2.10).....	130
<b>Anhang</b> Paarweise Vergleiche mit Daten aus sVEGFR1-ELISAs (Abschnitt <b>Tab. 7:</b> 3.2.10).....	131
<b>Anhang</b> Paarweise Vergleiche mit Daten aus PlGF-ELISAs (Abschnitt <b>Tab. 8:</b> 3.2.10).....	132
<b>Anhang</b> Zusammensetzung von Gensets aus der GSEA und Pathway-Analyse <b>Tab. 9:</b> .....	133

## Anhang

*Anhang Tabelle 1: Paarweiser Vergleich mit Daten aus Western Blot Analyse (Abschnitt 3.2.5) mittels H-Test-Variante „Vergleich eines Standards mit mehreren Behandlungen“ (Abschnitt 3.2.12). Aufgelistet sind die Rangsummen der Quotienten aus den Signalintensitäten von HIF1 $\alpha$  (a) bzw. HIF2 $\alpha$  (b) und  $\beta$ -Aktin, der ermittelte z-Wert und das daraus resultierende Erreichen eines 5 %-igen Signifikanzniveaus. HIF: hypoxia-inducible factor.*

<b>a</b>		<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	
O <sub>2</sub> -Anteil	Rangsumme	z-Wert	5 %-iges Signifikanzniveau bei z > 2,77
1	156	2,5	nein
3	182	3,09	ja
5	115	1,58	nein
10	104	1,33	nein
15	100	1,24	nein
21	63	/	/
30	142	2,19	nein
40	185	3,16	ja
50	220	3,94	ja
60	136	2,05	nein

<b>b</b>		<b>HIF2<math>\alpha</math></b>	
O <sub>2</sub> -Anteil	Rangsumme	z-Wert	5 %-iges Signifikanzniveau bei z > 2,77
1	255	4,07	ja
3	230	3,51	ja
5	182	2,43	nein
10	98	0,53	nein
15	68	0,14	nein
21	104	/	/
30	74	0,02	nein
40	115	0,92	nein
50	145	1,59	nein
60	131	1,28	nein

**Anhang Tabelle 2: Paarweise Vergleiche mit Daten aus ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Assays (Abschnitt 3.2.7).** Der Berechnung mittels Dunn's-Test ging ein Kruskal-Wallis-Test zur Bestimmung von signifikanten Gruppenunterschieden voraus (Abschnitt 3.2.13). Die HRMECs aus den Sauerstoff- und Bestrahlungsgruppen zeigten unterschiedliche relative Lumineszenz-Units (RLU) mit  $H(5) = 39,021$  (F-Wert und Freiheitsgrade) und  $p\text{-Wert} \leq 0,0001$ . adj.: adjustiert, ns: nicht signifikant, ROS: reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

G1	G2	n1	n2	z-Wert	p-Wert	adj. p-Wert	Signifikanz
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	2,0239	0,0430	0,6447	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	7	-1,3060	0,1915	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	-0,4194	0,6750	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	2,3338	0,0196	0,2941	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	3,9931	$\leq 0,0001$	0,0010	***
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	7	-3,2613	0,0011	0,01664	*
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	-2,4433	0,0146	0,2183	ns
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	0,3040	0,7566	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	1,9692	0,0489	0,7340	ns
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	7	8	0,9009	0,3677	1	ns
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	7	8	3,5607	0,0004	0,0055	**
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	7	8	5,1637	$\leq 0,0001$	$< 0,0001$	****
3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	2,7532	0,0059	0,0885	ns
3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	4,4124	$\leq 0,0001$	0,0002	***
50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	1,6592	0,0971	1	ns

**Anhang Tabelle 3: Paarweise Vergleiche mit Daten aus MTT-Assays auf 8-Well  $\mu$ -slides (Abschnitt 3.2.8).** Der Berechnung mittels Dunn's-Test ging ein Kruskal-Wallis-Test zur Bestimmung von signifikanten Gruppenunterschieden voraus (Abschnitt 3.2.13). Die scheinbestrahlten HRMECs (0 Gray) zeigten unterschiedliche optische Dichten mit  $H(2) = 10,85$  (F-Wert und Freiheitsgrade) und  $p$ -Wert  $\leq 0,0001$ . In der statistischen Auswertung von bestrahlten HRMECs (16 Gy) wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen ( $H[2] = 1,0046$  und  $p = 0,6051$ ). adj.: adjustiert, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, ns: nicht signifikant, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

G1	G2	n1	n2	z-Wert	p-Wert	adj. p-Wert	Signifikanz
21 % O <sub>2</sub>	3 % O <sub>2</sub>	13	11	3,0314	0,0024	0,0073	**
21 % O <sub>2</sub>	50 % O <sub>2</sub>	13	12	0,2502	0,8024	1	ns
3 % O <sub>2</sub>	50 % O <sub>2</sub>	11	12	-2,7350	0,0062	0,0187	*

**Anhang Tabelle 4: Paarweise Vergleiche mit Daten aus MTT-Assays auf 96-Well-Lochplatten (Abschnitt 3.2.8).** Die Tabellen a bis c enthalten die statistischen Auswertungen der relativen OD-Werte nach einer Inkubation der HRMECs unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen über einen Zeitraum von 6 h, 18 h und 24 h. Der Berechnung mittels Dunn's-Tests gingen Kruskal-Wallis-Tests zur Bestimmung von signifikanten Gruppenunterschieden voraus (Abschnitt 3.2.13). Die HRMECs aus den Sauerstoff- und Bestrahlungsgruppen zeigten unterschiedliche optische Dichten mit  $H(5) = 25,061$  (F-Wert und Freiheitsgrade) und  $p = 0,0001$  nach 6 h (a),  $H(5) = 26,03$  und  $p \leq 0,0001$  nach 18 h (b) sowie  $H(5) = 45,824$  und  $p \leq 0,0001$  nach 24 h (c). Die statistische Auswertung der relativen OD-Werte von HRMECs, die über einen Zeitraum von 12 h inkubiert wurden, ergab in der statistischen Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede ( $H[5] = 10,803$  und  $p = 0,056$ ). Ein paarweiser Vergleich mittels Dunn's Test wurde daher nicht durchgeführt. adj.: adjustiert, HIF: hypoxia-inducible factor, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, ns: nicht signifikant, n: Anzahl der Replikate, OD: Optische Dichte, siRNA: small interfering Ribonukleinsäure. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

**a**

Gruppe 1	Gruppe 1	n1	n2	z-Wert	p-Wert	adj. p-Wert	Signifikanz
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	18	0,2930	0,7695	1	ns
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	15	0,0871	0,9306	1	ns
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	16	1,1025	0,2702	1	ns
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	17	-3,2441	0,0013	0,0177	*
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	16	-1,8226	0,0684	1	ns
21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	15	-0,1923	0,8475	1	ns
21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	16	0,8183	0,4132	1	ns

21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	17	-3,5329	0,0004	0,0062	**
21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	16	-2,1068	0,0351	0,5270	ns
3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	15	16	0,9693	0,3324	1	ns
3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	15	17	-3,1831	0,0014	0,0219	*
3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	15	16	-1,8271	0,0677	1	ns
3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	16	17	-4,2375	$\leq 0,0001$	0,0003	***
3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	16	16	-2,8427	0,0044	0,0671	ns
50% O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	17	16	1,3520	0,1764	1	ns

## b

Gruppe 1	Gruppe 1	n1	n2	z-Wert	p-Wert	adj. p-Wert	Signifikanz
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	18	0,2930	0,0721	1	ns
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	15	0,0871	0,4807	1	ns
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	16	1,1025	0,0205	0,3071	ns
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	17	-3,2441	0,1960	1	ns
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	16	-1,8226	0,0937	1	ns
21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	15	-0,1923	0,2741	1	ns
21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	16	0,8183	0,6039	1	ns
21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	17	-3,5329	0,0020	0,0298	*
21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	16	-2,1068	0,0005	0,0077	**
3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	15	16	0,9693	0,1069	1	ns
3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	15	17	-3,1831	0,0457	0,6852	ns
3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	15	16	-1,8272	0,0172	0,2587	ns
3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	16	17	-4,2375	0,0003	0,0046	**
3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	16	16	-2,8427	$\leq 0,0001$	0,0019	***

50% O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	17	16	1,3520	0,7016	1	ns
-----------------------------------	---	----	----	--------	--------	---	----

### c

Gruppe 1	Gruppe 1	n1	n2	z-Wert	p-Wert	adj. p-Wert	Signifikanz
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	18	-0,5028	0,6151	1	ns
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	18	1,1106	0,2667	1	ns
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	17	1,2520	0,2106	1	ns
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	16	-2,1335	0,0329	0,4932	ns
21 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	17	-4,4107	$\leq 0,0001$	0,0002	***
21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	18	1,6135	0,1067	1	ns
21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	17	1,7475	0,0805	1	ns
21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	16	-1,6457	0,0998	1	ns
21 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	17	-3,9151	$\leq 0,0001$	0,0014	**
3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	17	0,1573	0,8750	1	ns
3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	18	16	-3,2110	0,0013	0,0198	*
3 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	18	17	-5,5053	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	****
3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	17	16	-3,3202	0,0009	0,0135	*
3 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	17	17	-5,5834	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	****
50% O <sub>2</sub> Ktrl.-siRNA	50 % O <sub>2</sub> HIF1 $\alpha$ -siRNA	16	17	-2,1780	0,0294	0,4411	ns

**Anhang Tabelle 5: Paarweise Vergleiche mit Daten aus der DAPI-abhängige Zellzahlbestimmung (Abschnitt 3.2.9).** Der Berechnung mittels Dunn's-Test ging ein Kruskal-Wallis-Test zur Bestimmung von signifikanten Gruppenunterschieden voraus (Abschnitt 3.2.13). Die HRMECs aus den Sauerstoff- und Bestrahlungsgruppen zeigten unterschiedliche prozentuale Zellkernzunahme nach einer 24-stündigen Sauerstoffinkubation mit  $H(5) = 53,83$  (F-Wert und Freiheitsgrade) und einem p-Wert  $\leq 0,0001$ . adj.: adjustiert, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, ns: nicht signifikant. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

G1	G2	n1	n2	z-Wert	p-Wert	adj. p-Wert	Signifikanz
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	12	12	-4,5939	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	****
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	12	12	-0,4877	0,6259	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	12	12	-4,6329	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	****
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	12	12	-0,2146	0,8301	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	12	12	-4,1160	$\leq 0,0001$	0,0006	***
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	12	12	4,1062	$\leq 0,0001$	0,0006	***
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	12	12	-0,0390	0,9689	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	12	12	4,3793	$\leq 0,0001$	0,0002	***
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	12	12	0,4780	0,6327	1	ns
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	12	12	-4,1452	$\leq 0,0001$	0,0005	***
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	12	12	0,2731	0,7848	1	ns
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	12	12	-3,6283	0,0003	0,0043	**
3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	12	12	4,4183	$\leq 0,0001$	0,0001	***
3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	12	12	0,5169	0,6052	1	ns
50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	12	12	-3,9014	$\leq 0,0001$	0,0014	**

**Anhang Tabelle 6: Paarweise Vergleiche mit Daten aus in-vitro Zellmigrationsassays (Abschnitt 3.2.10).** Der Berechnung mittels Dunn's-Test ging ein Kruskal-Wallis-Test zur Bestimmung von signifikanten Gruppenunterschieden voraus (Abschnitt 3.2.13). Die HRMECs aus den Sauerstoff- und Bestrahlungsgruppen zeigten unterschiedliche prozentuale Zellflächenzunahmen mit  $H(5) = 31,88$  (F-Wert und Freiheitsgrade) und einem p-Wert  $\leq 0,0001$ . adj.: adjustiert, ns: nicht signifikant, n: Anzahl der Replikate. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

G1	G2	n1	n2	z-Wert	p-Wert	adj. p-Wert	Signifikanz
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	-2,2857	0,0223	0,3341	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	1,3214	0,1864	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	1,0357	0,3003	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	-1,6429	0,1004	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	-2,9286	0,0034	0,0511	ns
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	3,6071	0,0003	0,0046	**
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	3,3214	0,0008	0,0134	*
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	0,6429	0,5203	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	-0,6429	0,5203	1	ns
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	-0,2857	0,7751	1	ns
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	-2,9643	0,0030	0,0455	*
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	-4,25	$\leq 0,0001$	0,0003	***
3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	-2,6786	0,0074	0,1109	ns
3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	-3,9643	$\leq 0,0001$	0,0011	**
50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	-1,2857	0,1985	1	ns

**Anhang Tabelle 7: Paarweise Vergleiche mit Daten aus sVEGFR1-ELISAs (Abschnitt 3.2.10).** Der Berechnung mittels Dunn's-Test ging ein Kruskal-Wallis-Test zur Bestimmung von signifikanten Gruppenunterschieden voraus (Abschnitt 3.2.13). Die HRMECs aus den Sauerstoff- und Bestrahlungsgruppen wiesen mit  $H(5) = 31,88$  (F-Wert und Freiheitsgrade) und einem p-Wert  $\leq 0,0001$  unterschiedliche Proteinkonzentrationen auf. adj.: adjustiert, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, ns: nicht signifikant, sVEGFR1: soluble vascular endothelial growth factor. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

G1	G2	n1	n2	z-Wert	p-Wert	adj. p-Wert	Signifikanz
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	11	12	4,3654	$\leq 0,0001$	0,0002	***
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	11	10	-0,7106	0,4773	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	11	6	2,5132	0,0120	0,1794	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	11	8	0,6943	0,4875	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	11	9	3,9822	$\leq 0,0001$	0,0010	**
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	12	10	-4,9809	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	****
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	12	6	-1,0934	0,2742	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	12	8	-3,2855	0,0010	0,0152	*
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	12	9	-0,0734	0,9415	1	ns
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	10	6	3,0713	0,0021	0,0320	*
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	10	8	1,3346	0,1820	1	ns
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	10	9	4,5712	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	****
3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	6	8	-1,7645	0,0777	1	ns
3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	6	9	0,9760	0,3291	1	ns
50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	9	3,0196	0,0025	0,0380	*

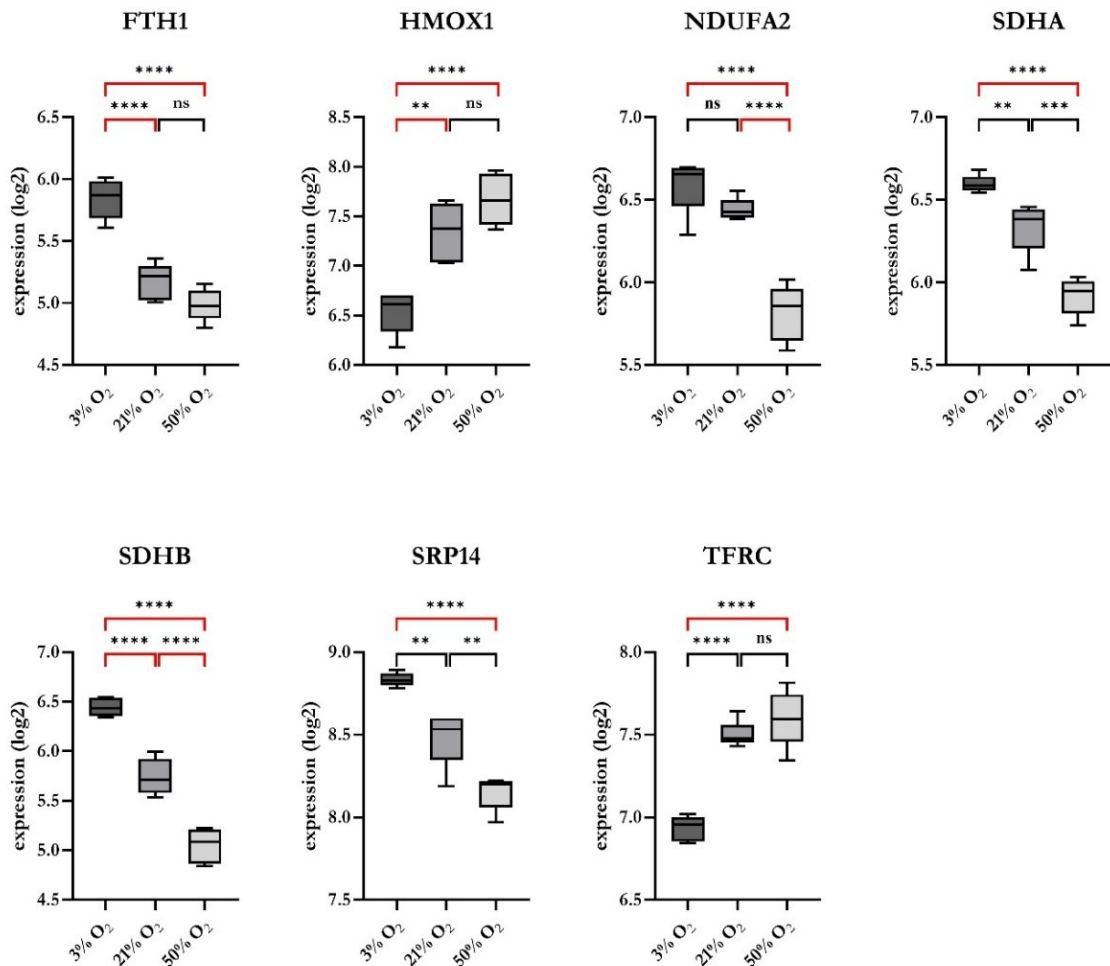
**Anhang Tabelle 8: Paarweise Vergleiche mit Daten aus PIGF-ELISAs (Abschnitt 3.2.10).** Der Berechnung mittels Dunn's-Test ging ein Kruskal-Wallis-Test zur Bestimmung von signifikanten Gruppenunterschieden voraus (Abschnitt 3.2.13). Die HRMECs aus den Sauerstoff- und Bestrahlungsgruppen wiesen mit  $H(5) = 38,22$  (F-Wert und Freiheitsgrade) und einem p-Wert  $\leq 0,0001$  unterschiedliche Proteinkonzentrationen auf. adj.: adjustiert, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, ns: nicht signifikant, PIGF: placental growth factor. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$

G1	G2	n1	n2	z-Wert	p-Wert	adj. p-Wert	Signifikanz
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	9	2,9745	0,0029	0,0440	*
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	-0,4459	0,6557	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	2,8812	0,0040	0,0594	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	1,3548	0,1755	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	9	4,6373	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	****
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	9	8	-3,4333	0,0006	0,0089	**
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	9	8	-0,0098	0,9922	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	9	8	-1,5804	0,1140	1	ns
21 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	9	9	1,7139	0,0865	1	ns
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	8	3,3271	0,0009	0,0131	*
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	1,8007	0,0717	1	ns
3 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	9	5,0961	$\leq 0,0001$	$\leq 0,0001$	****
3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	8	8	-1,5263	0,1269	1	ns
3 % O <sub>2</sub> 16 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	9	1,6725	0,0944	1	ns
50 % O <sub>2</sub> 0 Gy	50 % O <sub>2</sub> 16 Gy	8	9	3,2431	0,0012	0,0177	*

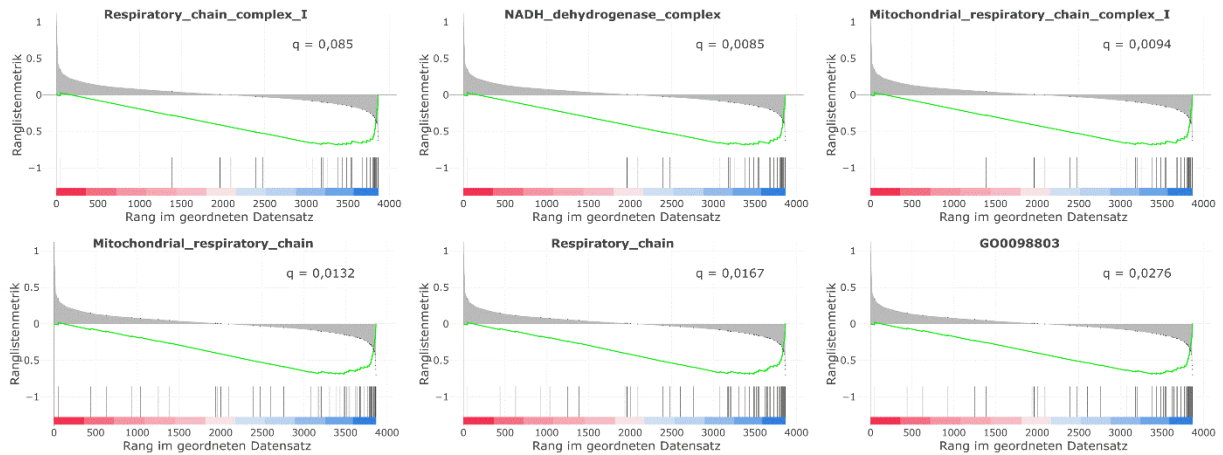
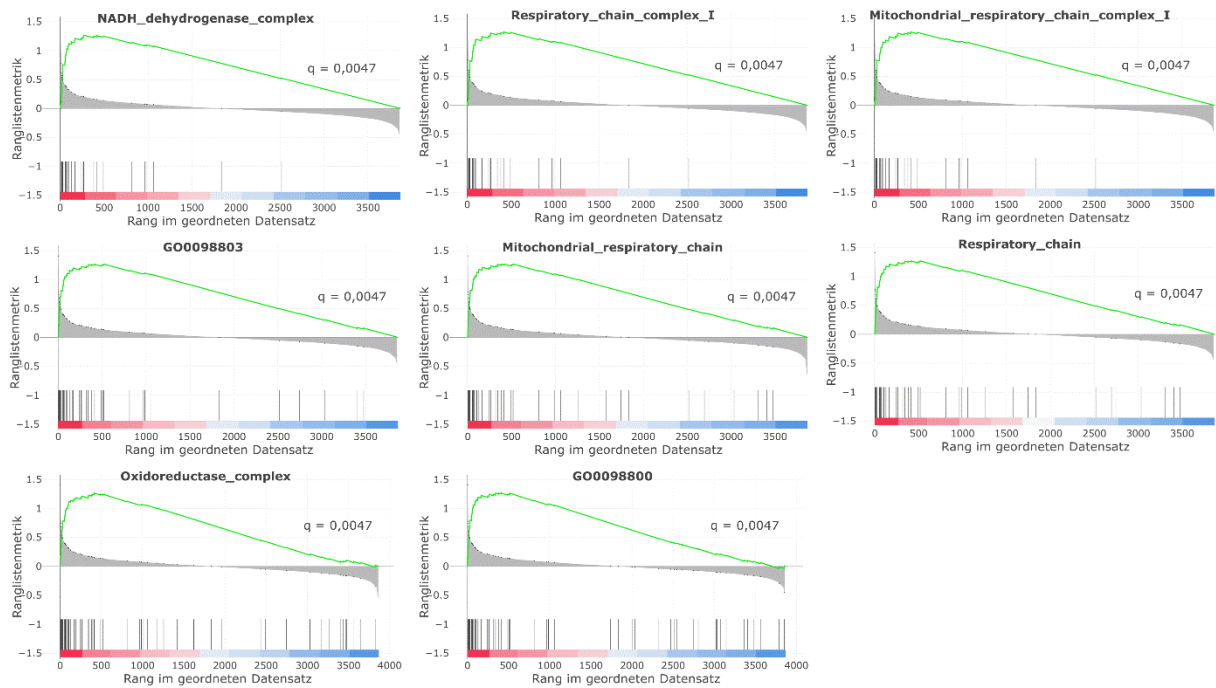
**Anhang Tabelle 9: Zusammensetzung von Gensets aus der GSEA und Pathway-Analyse.** Aufgelistet sind die Gensymbole der Proteine, die von den Gensets eingeschlossen sind und in den Datenbanken COMPARTMENTS, WikiPathway und MSigDB hinterlegt wurden. MSigDB: Molecular signatures database.

Datenbank/Genset	Gensymbole der Proteine
<b>COMPARTMENTS: Respiratory_chain_complex_I</b>	NDUFA2, NDUFS8, NDUFA8, NDUFA5, NDUFS7, NDUFV2, NDUFV1, NDUFAB1, NDUFB3, NDUFB8, NDUFA13, NDUFB9, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS5, NDUFA3, NDUFA7, NDUFA12, NDUFA10, NDUFS6, NDUFB11, NDUFA11, NDUFC2, NDUFA6, NDUFS4, NDUFB10, NDUFS3, FOXRED1, NDUFA4, NDUFB5, NDUFB6
<b>COMPARTMENTS: NADH_dehydrogenase_complex</b>	NDUFA2, NDUFS8, NDUFA8, NDUFA5, NDUFS7, NDUFV2, NDUFV1, NDUFAB1, NDUFB3, NDUFB8, NDUFA13, NDUFB9, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS5, NDUFA3, NDUFB7, NDUFA7, NDUFA12, NDUFA10, NDUFS6, NDUFB11, NDUFA11, NDUFC2, NDUFA6, NDUFS4, NDUFB10, FOXRED1, NDUFA4, NDUFB5, NDUFB6
<b>COMPARTMENTS: Mitochondrial_respiratory_chain_complex_I</b>	NDUFA2, NDUFS8, NDUFA8, NDUFA5, NDUFS7, NDUFV2, NDUFV1, NDUFAB1, NDUFB8, NDUFA13, NDUFB9, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS5, NDUFA3, NDUFB7, NDUFA7, NDUFA12, NDUFA10, NDUFS6, NDUFB11, NDUFA11, NDUFC2, NDUFA6, NDUFS4, NDUFB10, NDUFS3, FOXRED1, NDUFA4, NDUFB5, NDUFB6
<b>COMPARTMENTS: Mitochondrial_respiratory_chain</b>	SDHB, NDUFA2, NDUFS8, NDUFA8, SDHA, NDUFA5, NDUFS7, NDUFV2, NDUFV1, NDUFAB1, NDUFB3, NDUFB8, NDUFA13, NDUFB9, NDUFS1, SDHC, NDUFS2, BCS1L, NDUFS5, NDUFA3, NDUFB7, NDUFA7, NDUFA9, COX5B, NDUFA12, NDUFA10, UQCRQ, PMPCB, SURF1, NDUFS6, NDUFB11, NDUFA11, UQCRC1, UQCRH, COX7A2, NDUFA6, NDUFS4, NNT, UQCR10, OXA1L, COX7A2L, COX5A, UQCRB, NDUFS3, COX4I1, FOXRED1, NDUFA4, CYC1, NDUFB5, UQCRC2, NDUFB6
<b>COMPARTMENTS: Respiratory_chain</b>	SDHB, NDUFA2, NDUFS8, NDUFA8, SDHA, NDUFA5, NDUFS7, NDUFV2, NDUFV1, NDUFAB1, NDUFB3, NDUFB8, NDUFA13, NDUFB9, SDHC, NDUFS2, BCS1L, NDUFS5, NDUFA3, NDUFB7, NDUFA7, CYCS, NDUFA9, COX5B, NDUFA12, NDUFA10, UQCRQ, PMPCB, SURF1, NDUFS6, NDUFB11, NDUFA11, UQCRC1, UQCRH, COX7A2, NDUFA6, NDUFS4, NNT, UQCR10, OXA1L, NDUFB10, COX7A2L, COX5A, UQCRB, NDUFS3, COX4I1, FOXRED1, NDUFA4, CYC1, NDUFB5, UQCRC2, NDUFB6
<b>COMPARTMENTS: GO0098803</b>	SDHB, NDUFA2, NDUFS8, NDUFA8, SDHA, NDUFA5, NDUFV2, NDUFV1, NDUFAB1, NDUFB3, NDUFB8, NDUFA13, NDUFB9, NDUFS1, SDHC, NDUFS2, BCS1L, NDUFS5, NDUFA3, NDUFB7, NDUFA7, NDUFA9, COX5B, NDUFA12, NDUFA10, UQCRQ, PMPCB, NDUFS6, NDUFB11, NDUFA11, UQCRC1, NDUFA6, NDUFS4, UQCR10, NDUFB10, COX5A, UQCRB, NDUFS3, COX4I1, FOXRED1, NDUFA4, CYC1, NDUFB5, UQCRC2, NDUFB6
<b>COMPARTMENTS:</b>	SDHB, NDUFA2, SDHC, SDHA, NDUFS8, NDUFA5, NDUFS6, NDUFA12, NDUFS1, NDUFS7, NDUFB8, NDUFA8, UQCR10,

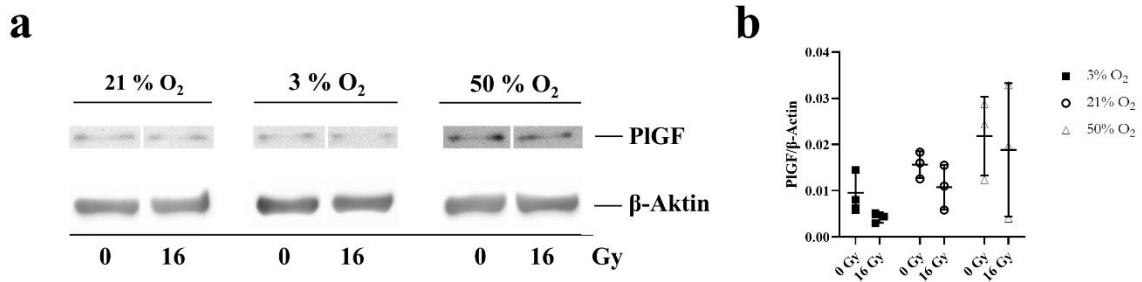
<b>Oxidoreductase_complex</b>	NDUFB3, NDUFV2, NDUFV1, NDUFA10, NDUFA7, RRM2, NDUFS2, NDUFC2, NDUFA9, PDK1, NDUFB7, NDUFA11, NDUFA13, P4HA1, NDUFA4, RRM1, NDUFB5, NDUFB9, DLAT, CYC1, NDUFS3, P4HB, NDUFS5, PMPCB, MRPS36, OGDH, GMPR2, BCKDHA, NDUFA6, UQCRC1, NDUFS4, UQCRQ, DLD, BCKDHB, UQCRC2, DBT, NDUFA3, NDUFB10, UQCRB, FOXRED1, PDHB, BCS1L, NDUFB11, GPD2, PDHA1, DLST, BCKDK, RRM2B, GCSH, GMPR, NDUFB6
<b>COMPARTMENTS: GO0098800</b>	SDHB, NDUFA2, SDHC, SDHA, NDUFS8, NDUFA5, NDUFS6, NDUFA12, NDUFS1, NDUFS7, NDUFB8, NDUFA8, MICU1, TIMM50, UQCR10, NDUFB3, NDUFV2, NDUFV1, NDUFA10, NDUFA7, NDUFS2, NDUFC2, NDUFA9, AFG3L2, NDUFB7, COX5B, NDUFA11, NDUFA13, NDUFA4, NDUFB5, NDUFB9, COX5A, APOO, CYC1, NDUFS3, NDUFS5, PMPCB, NDUFA6, UQCRC1, APOOL, NDUFS4, COX4I1, UQCRQ, TIMM9, SLC25A6, UQCRC2, MCU, NDUFA3, NDUFB10, TIMM22, UQCRB, FOXRED1, BCS1L, NDUFB11, PAM16, CHCHD3, NDUFAB1, GRPEL1, TIMM21, IMMT, CHCHD6, TIMM10, NDUFB6
<b>MSigDB: MANALO_HYPOXIA_UP</b>	HTRA1, PTPRB, COL4A2, PXN, PLOD2, SYNPO, SERPINE1, SORBS2, P4HA1, COL5A1, TNFRSF10B, EGLN1, BGN, FAM171A1, LOXL2, VWF, PTGS1, NDRG1, SEC24A, TPM1, PPP1R13L, TXNIP, PGM1, WASF2, NENF, AXL, GLCE, RGS3, HDLBP, GLS, COL18A1, MAFF, LIMS1, PGM3, MMP2, AFAP1, CELF2, GBE1, CDH2, TNS1, ENO2, AK4, P4HA2, RPL27A, IDH2, TRIO, ALDH2, FKBP9, CASK, PLOD1, ITPR2, LAMB1, RRAS, RAI14, PTPRF, COL4A1, FNDC3B, FILIP1L, MAGED2, ATP2C1
<b>WikiPathways: Oxidative phosphorylation (WP623)</b>	NDUFS7, ATP5D, ATP5G3, NDUFA4, NDUFB4, NDUFS5, B22, CI-75Kd, B9, ATP5G1, B18, NDUFB2, CI-SGDH, ATP6, NDUFS6, KFYI, NDUFV3, ASH1, NDUFA8, FASN2A, B13, B17, CI-42KD, NDUFA9, ATP5O, B14.5a, ATP5F1, B14.5b, ATP5L, MT-ATP6, MT-ATP8, AQDQ, ND4L, NUOMS, ATP5G2, NDUFB10, GZMB, ATP5H, NDUFS3, NDUFV2, ND5, ND3, NDUFA2, B15, NDUFS2, NDUFS8, ATP6AP1, CI-SGDH, ATP5E, ATP5I, ATP5B, ND1, ATP5S, ATP5J, ATP6AP2, ATP5J2, B14, ND6, NDUFA11, ATP5A1, CI-51kD, ND4, ND2
<b>WikiPathways: Electron Transport Chain_Homo sapiens_WP111</b>	ATP5A1, NDUFB6, ATP5I, SLC25A5, COX15, COX6B1, UCRC, COX6C, ATP5J2, ATP5O, ATP5G2, NDUFC1, ATP5B, NDUFA8, UQCR, NDUFA3, SLC25A14, NDUFV2, NDUFA6, COX2, NDUFB9, NDUFS6, UQCRFS1, NDUFA2, ND4L, ATP8, NDUFS5, COX5A, UQCRC2, COX11, ATP5J, SDHB, COX1, COX7A2L, NDUFS7, COX6A1, SLC25A27, NDUFS4, COX7A1, COX4I1, COX7A3, SLC25A6, ATP5L, NDUFB1, UCP3, UQCRH, NDUFA9, NDUFB3, ATP5G1, NDUFB4, COX7A2, ND6, ATP5S, SDHA, ND2, NDUFAB1, COX7B, QP-C, SLC25A4, UQCRB, ND5, DAP13, SCO1, SDHD, ATP5F1, NDUFB7, NDUFA1, UQCRC1, NDUFB5, COX5B, ATP6, COX3, NDUFS3, COX8A, ND1, NDUFV1, SDHC, ATP5G3, COX6A2, SURF1, NDUFS1, NDUFA7, ND4, ATP5H, NDUFC2, NDUFB2, NDUFS2, COX7C, ATP5D, NDUFB10, COX17, NDUFA4, NDUFA5, ATP5F1, ATP5E, ATP5C1, NDUFV3, NDUFA10, UCP2, ND3, NDUFS8, NDUFB8, CYTB, UCP1, NDUFA11, NDUFA13



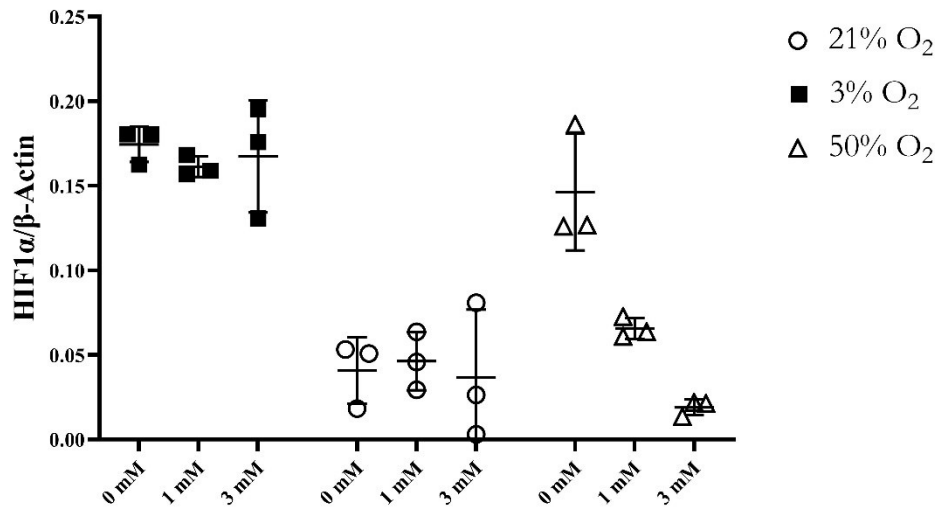
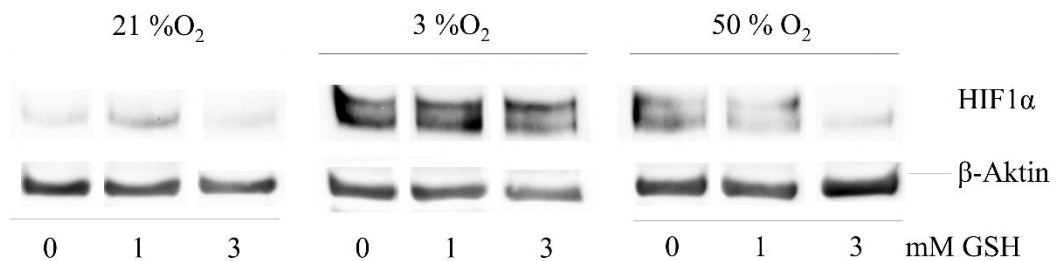
**Anhang Abbildung 1: Box-Whisker-Plot zur Darstellung der signifikant differentiell exprimierten Proteine.** Verglichen wurde die log<sub>2</sub>FC von Proteinquantitäten aus differentiellen Proteinexpressionsanalysen mit hypoxischen vs. normoxischen HRMECs (3 % O<sub>2</sub> vs. 21 % O<sub>2</sub>), hyperoxischen vs. normoxischen HRMECs (50 % O<sub>2</sub> vs. 21 % O<sub>2</sub>) und hypoxischen vs. hyperoxischen HRMECs (3 % O<sub>2</sub> vs. 50 % O<sub>2</sub>). Die Daten wurden entsprechend des in Abschnitt 3.2.12 beschriebenen Protokolls generiert. Insgesamt wurden fünf Ganzzellsat-Proben je Sauerstoffumgebung ausgewertet. Es wurden 3.869 Proteinquantitäten verglichen. Signifikante differentielle Proteinexpressionen wurden rot markiert. DPE: Differentielle Proteinexpression, FTH1: Ferritin-heavy-chain 1, HMOX1: Hämoxygenase 1, HRMECs: Humane retinale Endothelialzellen, HSD: Honestly significant difference, log<sub>2</sub>FC: Logarithmische Differenz der Expressionsmittelwerte, NDUFA2: NADH-Q-Oxidoreduktase Untereinheit A2, SDHA: Succinatdehydrogenase A, SDHB: Succinatdehydrogenase B, SRP14: Signal-Recognition-Particle-Protein 14, TFRC: Transferrinrezeptorprotein 1. \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001, \*\*\*\*p ≤ 0,0001.

**a****b**

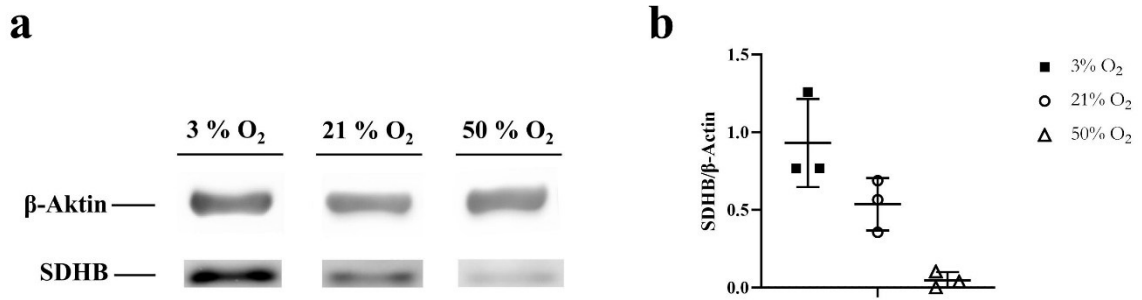
**Anhang Abbildung 2: Visualisierung der GSEAs von HREMECs unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen als Enrichment-Plots.** Ausgewertet wurden 3.869 identifizierte Proteine aus dem Proteom von hyperoxischen vs. normoxischen HRMECs (a) und hypoxischen vs. hyperoxischen HRMECs (b), deren Anreicherung in Gensets aus der COMPARTMENTS Datenbank untersucht wurde [169]. Der angegebene  $q$ -Werte entspricht dem Meta- $q$ -Wert aus der statistischen Analyse, die mittels Fisher Exakt Test [167], fast gene set enrichment analysis (fGSEA) [168] und gene set variation analysis (GSVA) berechnet wurde. Dargestellt sind alle GSEAs, die einen Meta- $q$ -Wert  $\leq 0,05$  und  $|\log_2FC| > 0,1$  aufwiesen. Die Proteine wurden anhand der Effektgröße ( $\log_2FC$ ) nach Rängen geordnet. Die Peaks entsprechen den Proteinen aus dem Datensatz, die mit den Proteinen im Genset übereinstimmen. Die Häufung von signifikant differentiell exprimierten Proteinen im geordneten Datensatz wurde mittels running enrichment score dargestellt. Die Auswertung der Proteinquantitäten aus hypoxischen vs. normoxischen HRMECs ergab keine signifikante Anreicherung in den vorgegebenen Gensets. GSEA: Gene set enrichment analysis, HRMECs: Humane retinale mikrovaskuläre Endothielzellen.



**Anhang Abbildung 3: Bestimmung der relativen intrazellulären PIGF-Proteinmenge von HRMECs nach Strahlen- und Sauerstoffbehandlung.** HRMECs wurden mit Röntgenstrahlen behandelt (16 Gy) oder unter den gleichen Druck- und Temperaturverhältnissen scheinbestrahlt. Die Zellen wurden anschließend über einen Zeitraum von 24 h unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) oder hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert (Abschnitt 3.2.5). a) zeigt eine Nitrozellulosemembran nach Immunodetektion von PIGF und der Proteinladekontrolle β-Aktin. b) illustriert die qualitative Western-Blot-Analyse von PIGF-Proteinmengen in HRMECs. Die individuellen Werte der PIGF-Signalintensitäten sind mit den Mittelwerten und der Standardabweichung als paarweise Vergleiche von 0 Gy und 16 Gy dargestellt. Aufgrund der geringen Anzahl an technischen Replikaten (3 biologische Replikate mit je 3 gepoolten Zelllysatsproben) wurde eine deskriptive Statistik zur Auswertung durchgeführt. HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, ns: nicht signifikant, PIGF: placental growth factor.

**a****b**

**Anhang Abbildung 4: Qualitative Western-Blot-Analyse der Proteinakkumulation von HIF1α nach Inkubation in 0 mM, 1 mM und 3 mM GSH bei 3 % O<sub>2</sub>, 21 % O<sub>2</sub> und 50 % O<sub>2</sub>.** Die Durchführung der Versuchsreihe entspricht dem Protokoll, dass in Abschnitt 3.2.5 unter „Semiquantitative Western-Blot-Analyse mit Ganzzelllysaten aus hypoxischen, normoxischen und hyperoxischen HRMECs“ beschrieben wurde. Die HRMECs wurden über 24 h in MEGG-Inkubationsmedium, das mit 0 mM GSH, 1 mM GSH oder 3 mM GSH versetzt wurde, bei verschiedenen Sauerstoffanteilen inkubiert. a) illustriert die Quotienten aus den HIF1α-Signalintensitäten und dem Housekeeping-Protein β-Aktin. Die normierten Proteinmengen sind mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Aufgrund der geringen Anzahl an technischen Replikaten (3 biologische Replikate mit je 3 gepoolten Ganzzelllysate-Proben) wurde eine deskriptive Statistik zur Auswertung durchgeführt. b) zeigt die Nitrozellulosemembrane nach Immunodetektion von HIF1α und der Proteinladekontrolle β-Aktin. HIF: hypoxia-inducible factor, HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, GSH: Glutathion.



**Anhang Abbildung 5: Qualitative Bestimmung von SDHB in Ganzzelllysaten aus HRMECs nach der Inkubation unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen.** Die Zellen wurden nach einer Scheinbestrahlung über einen Zeitraum von 24 h unter hypoxischen (3 % O<sub>2</sub>), normoxischen (21 % O<sub>2</sub>) und hyperoxischen (50 % O<sub>2</sub>) Bedingungen bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert (Abschnitt 3.2.5). a) zeigt eine Nitrozellulosemembran nach Immunodetektion von SDHB und der Proteinladekontrolle β-Aktin. b) illustriert die Quotienten aus den SDHB-Signalintensitäten und dem Housekeeping-Protein β-Aktin. Die normierten Proteinmengen sind mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Aufgrund der geringen Anzahl an technischen Replikaten (3 biologische Replikate mit je 3 gepoolten Zelllysatproben) wurde eine deskriptive Statistik zur Auswertung durchgeführt. HRMECs: humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen, SDHB: Succinatdehydrogenase B.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Mahdy Ranjbar und Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Depping für die fachliche Betreuung und Unterstützung bei der Entstehung dieser Doktorarbeit bedanken. Ohne ihr Engagement wäre der Abschluss der Dissertation sicherlich nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank für die schöne Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Salvatore Grisanti für die Möglichkeit, meine Dissertation an der Klinik für Augenheilkunde durchzuführen.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Team des Labors für experimentelle Ophthalmologie der Klinik für Augenheilkunde – allen voran Christine Örün, die mir bei vielen Kaffeepausen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Liebe Grüße gehen auch an das gesamte Team des Instituts für Physiologie. Ich möchte besonders die wertvolle Unterstützung durch das labortechnische Team hervorheben, das mir mit seiner großen Erfahrung zur Seite stand und immer für einen kurzen Plausch zu haben war.

Ich bedanke mich außerdem bei der Arbeitsgruppe Genomische Instabilität und Proteom-Analytik der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie für die kurze, aber effektive Zusammenarbeit.

Als Nächstes möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich die gesamte Zeit unterstützt hat. Liebe Grüße gehen an meine Eltern Miyuki und Egon, meinen Bruder Ewald, meine Schwägerin Claudia sowie ihren Freund Kevin und natürlich an Katarina und Mariusz, die mir regelmäßig Zeit zum Arbeiten verschafft haben.

Der größte Dank geht an meine Frau Natalie, die mich durch alle Phasen dieser Promotion mit großer Zuversicht, grenzenloser Geduld und viel Humor begleitet hat. Zu guter Letzt möchte ich meiner Tochter Emilia danken, die mir mit ihrer ansteckend guten Laune seit fast zwei Jahren den Tag versüßt und nun ganz offiziell Teil dieser Arbeit ist.

# Lebenslauf

## Justus-Satoshi Ernesti

### Akademische Ausbildung

---

2011/04 - 2014/08	<i>Bachelor of Science</i> , Studiengang <i>Molecular Life Science</i> , Universität zu Lübeck
2014/10 - 2017/07	<i>Master of Science</i> , Studiengang <i>Molecular Life Science</i> , Universität zu Lübeck
2017/10 – 2025/10	Promotionsstudent, Klinik für Augenheilkunde, AG Angiogenese und okulare Zelltransplantation, Lübeck

---

### Praktika

---

2015/12 - 2016/04	Praktikum im Institut für Biologie, Universität zu Lübeck
2016/05 - 2016/07	Praktikum im <i>Department of Neurobiology and Behaviour</i> , Gunma Universität in Maebashi, Japan

---

### Beruflicher Werdegang

---

2014/10 - 2015/08	Hilfswissenschaftler am Institut für Molekulare Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck
2017/10 – 2022/08	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, AG Angiogenese und okulare Zelltransplantation, Klinik für Augenheilkunde, Lübeck
2022/10 – heute	Tätigkeit als <i>Medical Writer</i>

---

