



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Biomedizinische Optik
Der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Alfred Vogel

Reaktionen von Zellen des retinalen Pigmentepithels auf transiente Hyperthermie

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

Vorgelegt von
Katharina Kern
Aus Werther (Westf.)

Lübeck, 22.11.2018

1. Berichterstatter/-in: PD Dr. Yoko Miura

2. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. Hauke Busch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2019

Zum Druck genehmigt: 16.04.2019

„GRAU IST IM ALLTAG ALLE THEORIE.
ENTSCHEIDEND IST AUF DEM PLATZ.“

Alfred Preißler

ZUSAMMENFASSUNG

Motivation: Laserinduzierte Hyperthermie in Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) wird als neue Therapie für verschiedene Erkrankungen des Augenhintergrunds, wie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD), diskutiert. Insbesondere im Zusammenhang mit unsichtbaren (minimal schädlichen) bis unschädlichen Laserbehandlungen des Augenhintergrunds gewinnen die fundamentalen Auswirkungen von Temperaturänderungen auf Zellen dieses Gewebetyps immer mehr an Bedeutung. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Reaktionen von RPE-Zellen auf kurzzeitige Hyperthermie zu untersuchen.

Methoden: Die Bestrahlung der Zellkulturen erfolgte mittels eines Bestrahlungsaufbaus, mit dem die Zellen in der Zellkulturschale innerhalb eines kurzen Zeitraums erhitzt werden konnten. Bei dem verwendeten Laser handelte es sich um einen Dauerstrich Thuliumlaser mit einer Wellenlänge von 1940 nm. Unterschiedliche Maximaltemperaturen (T_{\max}) zwischen 40 °C bis 59 °C wurden an zentraler Position der Zellkulturschale für 10 s angelegt. Die erzeugte Temperaturverteilung war gaußförmig, wodurch die T_{\max} nur an zentraler Position anlag und nach außen abfiel. Alle experimentellen Arbeiten erfolgten mit primären RPE-Zellen der P2-Generation. Die Zellen wurden hierfür aus enukleierten Schweineaugen gewonnen. Nach der Bestrahlung wurden Vitalitätsänderungen, die Expression und Sekretion von Proteinen (HSP70, VEGF), sowie die Veränderungen der zellulären Proliferation und Auswirkungen auf den Wundverschluss evaluiert.

Ergebnisse: Es konnte angenommen werden, dass nicht nur die tatsächlich einwirkende T_{\max} , sondern auch die nach der Bestrahlung vergangene Zeit einen großen Einfluss auf die beobachtete Zellantwort hatte. So könnten die ermittelten Daten als Grundlage genommen werden, um eine deutliche Zeitabhängigkeit apoptotischer Prozesse hinreichend zu bestätigen. Auch die Expression von HSP70 schien stark temperaturabhängig zu sein, wobei ein großer Unterschied zwischen subletaler (nicht tödlicher) und letaler (tödlicher) Bestrahlung auffiel. Zudem hatte auch die nach der Bestrahlung vergangene Zeit einen großen Einfluss auf die Expression des Proteins. Aufgrund der Überlappung der HSP70-Überexpression mit apoptotischen Bereichen am Rand der zentralen toten Areale nach letaler Bestrahlung, konnte davon ausgegangen werden, dass die Überexpression von HSP70 auch in Zellen auftritt, die im zeitlichen Verlauf in die Apoptose gehen. Immunzytochemische Färbungen zeigten teilweise Anzeichen einer Translokation von HSP70 in den Zellkern, wodurch ein Rückschluss auf protektive Effekte durch HSP70 möglich war. Allerdings konnte angenommen werden, dass die schützende Funktion des molekularen Chaperons nur ausreichte, wenn der Schaden den die Zellen durch die transiente Hyperthermie erfahren hatten, in keinem letalen Ausmaß vorlag. Die Untersuchung der VEGF-Sekretion und -Expression legte die Vermutung nahe, dass transiente Hyperthermie die VEGF-Sekretion stimulieren kann, aber nicht die Expression des Wachstumsfaktors. Des Weiteren ließen die Ergebnisse den Rückschluss zu, dass eine leichte Temperaturerhöhung zu einer Verbesserung der Wundheilung führen könnten. Es gab Hinweise darauf, dass im niedrigen Temperaturbereich ($T_{\max}=40$ °C) eher proliferative und im höheren Temperaturbereich ($T_{\max}=45$ °C) migratorische Prozesse zu tragen kamen.

Schlussfolgerung: Da es bisher keine Studie gegeben hat, in der die Wirkung der subletalen bis letalen transienten Hyperthermie auf RPE-Zellen so umfassend untersucht wurde, wie in der vorliegenden Arbeit, können die Ergebnisse wertvolle Einblicke in das grundlegende Verständnis retinaler Laserbehandlungen liefern, einschließlich der kürzlich diskutierten subletalen RPE Hyperthermie. Darüber hinaus könnten sie genutzt werden, um die Behandlungsstrategien bei temperaturkontrollierten Netzhaut-Laserbehandlungen zu planen.

ABSTRACT

Purpose: Laser-induced hyperthermia in retinal pigment epithelial (RPE) cells is being discussed as a new therapy for various diseases of the ocular fundus, such as the age-related macular degeneration (AMD). Particularly in connection with invisible (minimally harmful) to non-harmful laser treatments of the ocular fundus, the fundamental effects of temperature changes on cells gain more and more importance. Thus, the purpose of this thesis was to investigate the reactions of RPE cells to transient hyperthermia.

Methods: A continuous wave Thuliumlaser with a wavelength of 1940 nm was used as a heating source. The irradiation of the cell cultures was performed with an irradiation setup which can heat cells in a culture dish within a short period of time. Different maximal temperatures (T_{\max}), between 40 °C to 69 °C, were applied to the central position of the cell culture dish for 10 s. All experiments were performed with primary RPE cells (P2-Generation) derived from enucleated pig eyes. After irradiation different experimental methods were performed. These methods covered changes in cellular vitality, the expression and secretion of proteins (HSP70, VEGF), as well as effects on wound closure (proliferation, migration).

Results: The obtained results allowed a well-founded statement about the responses of RPE cells to transient hyperthermia. Such that certain assumptions, about the influence of the actual T_{\max} and the elapsed time after the irradiation on the observed cell response, could be considered. Thus, the data obtained could be used as a basis to sufficiently confirm a clear time dependence of apoptotic processes. The expression of HSP70 also appeared to be strongly temperature dependent, with a large difference between sublethal (non-fatal) and lethal (fatal) irradiation. In addition, the time that had passed after the irradiation seemed to have a major influence on the expression of the protein. Overlapping of HSP70 overexpression with apoptotic areas at the edge of the central dead areas after lethal irradiation was observed, such that it could be assumed that the overexpression of HSP70 also occurs in cells that might go into apoptosis at a later point in time. Immunocytochemical staining showed partial evidence of HSP70 translocation into the nucleus. Thus, a conclusion on protective effects by HSP70 was possible. The study of VEGF secretion and expression suggested that transient hyperthermia may increase VEGF secretion but not expression within the first 48 h after irradiation. Furthermore, the results suggested that a slight increase in temperature could lead to an improvement in wound healing. There was evidence that in the low temperature range ($T_{\max}=40$ ° C) proliferative and in the higher temperature range ($T_{\max}=45$ ° C) migratory processes came to bear.

Conclusion: Since there had been no study to date that investigated the effect of sublethal to lethal transient hyperthermia on RPE-cells so comprehensive as this study, the results of this work can provide valuable in-depth insights into the basic understanding of the therapeutic mechanism of retinal laser treatment, including the recently discussed sublethal RPE hyperthermia. In addition, they could be useful in planning of the treatment strategy in temperature-controlled retinal laser treatment.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis XI

I. Abbildungsverzeichnis XV

II. Tabellenverzeichnis XVII

III. Formelverzeichnis XIX

IV. Abkürzungsverzeichnis XXI

1. Einleitung 1

 1.1. Zellvitalität 3

 1.2. Expression und Sekretion von VEGF 3

 1.3. HSP70 Expression 4

 1.4. Wundheilung 4

2. Grundlagen 7

 2.1. Das Auge 7

 2.1.1. Die Retina 8

 2.2. Das retinale Pigmentepithel (RPE) 10

 2.2.1. Lichtabsorption 11

 2.2.2. Visueller Zyklus 12

 2.2.3. Phagozytose von Fotorezeptor Außensegmenten 13

 2.2.4. Das RPE als Barriere und Transportmedium 14

 2.2.5. Sekretion 15

 2.3. Pathologische Veränderungen am Augenhintergrund 15

 2.3.1. Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) 16

 2.4. Therapieverfahren bei AMD 18

 2.4.1. Pharmazeutische Behandlungen 18

 2.4.2. Laser 20

 2.4.3. Strahlentherapie 20

 2.4.4. Stammzelltherapie 20

 2.5. Medizinischer Einsatz von Temperatur im Gewebe 21

 2.6. Grundlagen zum Einsatz von Lasern in der Medizin 22

 2.6.1. Einsatz von Lasern in der Augenheilkunde 25

 2.7. Reaktionen von Zellen auf Temperatur-Stimuli 31

3. Material und Methoden 33

 3.1. Bestrahlungsaufbau 33

3.1.1.	Optische Messung der Füllhöhe des Mediums.....	35
3.1.2.	Messung der Bestrahlungstemperatur	35
3.2.	Zellkultur	37
3.2.1.	Präparation primärer RPE-Zellen aus enukleierten Schweineaugen	37
3.2.2.	Säubern primärer RPE-Kulturen.....	37
3.2.3.	Subkultivierung primärer RPE-Kulturen	38
3.2.4.	Kultivierung primärer RPE-Zellen.....	38
3.2.5.	Bestimmung der Zellzahl.....	38
3.2.6.	Bestrahlung primärer RPE-Kulturen mit einem Thuliumlaser	39
3.3.	Zellvitalität	39
3.3.1.	Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen in Kulturen.....	39
3.4.	Immunzytochemie	42
3.5.	Nachweis intrazellulärer Proteine (HSP70, VEGF)	43
3.5.1.	Proteinisolierung bei adhärenenten Zellen	43
3.5.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
3.5.3.	SDS-PAGE	44
3.5.4.	Western Blot	44
3.5.5.	Immunologische Proteindetektion	45
3.6.	Nachweis sekretierter Proteine (VEGF)	45
3.6.1.	ELISA.....	45
3.7.	Nachweis zellulärer Proliferation nach Laserbestrahlung	46
3.8.	Einfluss von Hyperthermie auf die Wundheilung von RPE-Kulturen.....	48
3.8.1.	Bestimmung der Zellfrontgeschwindigkeit	48
3.8.2.	Bestimmung zellulärer Proliferation.....	50
3.9.	Statistik.....	51
4.	Ergebnisse	53
4.1.	Vorversuche zur Festlegung der Bestrahlungsbedingungen	53
4.1.1.	Füllhöhe des Mediums.....	53
4.1.2.	Temperatur-Kalibrierung	54
4.2.	Zellvitalität nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen	57
4.2.1.	Nachweis von Apoptose und Nekrose bei Zellen in Suspension	57
4.2.2.	Nachweis von Apoptose und Nekrose in adhärenenten Zellen.....	60
4.3.	Expression und Sekretion von VEGF nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen.....	63
4.3.1.	Sekretion von VEGF.....	63

4.3.2.	Expression von VEGF	65
4.4.	HSP70 Expression nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen	67
4.4.1.	Nachweis der Proteinexpression über Western Blot	67
4.4.2.	Immunzytochemischer Nachweis von HSP70	71
4.5.	Zelluläre Proliferation nach der Bestrahlung primärer RPE-Kulturen	75
4.6.	Einfluss subletaler Hyperthermie auf den Wundverschluss eines Gewebsdefektes	78
5.	Diskussion	81
5.1.	Laserparameter	81
5.2.	Zelltod nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen	83
5.3.	Expression und Sekretion von VEGF nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen	84
5.4.	HSP70 Expression nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen	87
5.5.	Zelluläre Proliferation nach der Bestrahlung primärer RPE-Kulturen	90
5.6.	Einfluss subletaler Hyperthermie auf den Wundverschluss eines Gewebsdefektes	91
5.7.	Zusammenspiel von Apoptose, Proliferation und HSP70-Expression	93
6.	Literaturverzeichnis	97
1.	Anhang	i
1.1.	Herstellernachweise	i
1.2.	Geräte und Hilfsmittel	ii
1.3.	Spezifikationen Laser	iv
1.4.	Software	iv
1.5.	Chemikalien	v
1.6.	Verbrauchsmaterialien	v
1.7.	Kitsysteme	vi
1.8.	Puffer und Lösungen	vii
1.9.	Antikörper	ix
1.10.	Protease-Inhibitoren	ix
2.	Danksagungen	xi

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Querschnitts eines Säugetierauges und des Augenhintergrundes.....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der Retina	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Lage und des Aufbaus des retinalen Pigmentepithels sowie dessen räumliche Organisation.....	10
Abbildung 4: Darstellung unterschiedlicher Funktionen des retinalen Pigmentepithels	11
Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung des visuellen Zyklus.....	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Phagozytose von Fotorezeptor Außensegmenten...	13
Abbildung 7: Fundusaufnahme und Fluoreszenzangiographie	17
Abbildung 8: Strategien der Anti-VEGF-Therapie.....	19
Abbildung 9: Wirkung von Laserstrahlung auf Gewebe.....	23
Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung des Zusammenhangs zwischen Energie, Zeit und dem Zustand eines Proteins	24
Abbildung 11: Durchlässigkeit des Auges in Abhängigkeit von der Wellenlänge	26
Abbildung 12: Absorptionskoeffizienten unterschiedlicher Gewebebestandteile	27
Abbildung 13: Berechnete Temperaturprofile in der Retina und der Aderhaut während der Photokoagulation	28
Abbildung 14: Eingesetzte Laser mit Wellenlänge und Ort an dem sie am Augenhintergrund absorbiert werden.....	29
Abbildung 15: Fundus Aufnahmen nach SRT und Photokoagulation des Augenhintergrundes....	30
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Bestrahlung von Zellkulturen.....	34
Abbildung 17: Darstellung einer für die Temperaturmessung verwendeten Zellkulturschale.....	35
Abbildung 18: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Temperaturmessung	36
Abbildung 19: Schematische Darstellung der „Apoptotic/Necrotic/Healthy“-Zellfärbung.....	40
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Auswertung der Durchflusszytometrie	41
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Sandwich ELISA gegen VEGF	45
Abbildung 22: Markierung der DNS mit EdU und anschließender Anbindung der Fluorophore...	47
Abbildung 23: Schematische Darstellung des JuLI™ FL Aufnahmesystems	49
Abbildung 24: Darstellung der Konfluenz über die Zeit und einer Zellkultur mit Wunde in vertikaler Richtung.....	49
Abbildung 25: Darstellung der verwendeten standardisierten Zellkulturschale für Wundheilungs-Assays	50
Abbildung 26: Beispielhafte Darstellung der Temperaturmessung an zentraler Position der Zellkulturschale bei einer Leistung von 5 W.....	54
Abbildung 27: Darstellung des Zusammenhangs von Leistung und Temperaturanstieg.....	55
Abbildung 28: Verteilung der Temperatur bei unterschiedlichen eingestellten Leistungen	56
Abbildung 29: Ergebnisse der Untersuchung des Anteils lebender, toter und apoptotischer Zellen am Durchflusszytometer	58
Abbildung 30: Anteil lebender Zellen im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle (37 °C) über die einzelnen angelegten Maximaltemperaturen (T_{max})	59
Abbildung 31: Darstellung der fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenen Färbemuster.....	60

Abbildung 32: Darstellung der berechneten Schwellenwert Temperaturen	62
Abbildung 33: Ergebnisse des ELISA-Tests zum Nachweis des sekretierten VEGF	63
Abbildung 34: Ergebnisse der ELISA-Tests zum Nachweis des sekretierten VEGF nach Normalisierung auf die Zellzahl	64
Abbildung 35: Ergebnisse des Western Blots zum Nachweis von intrazellulärem VEGF 3, 24 und 48 h nach Bestrahlung	65
Abbildung 36: Vergleich des intrazellulären und sekretierten VEGF 24 h nach der Bestrahlung .	66
Abbildung 37: Ergebnisse der Western Blots zum Nachweis von HSP70 3, 24 und 48 h nach Bestrahlung	68
Abbildung 38: Ergebnisse der Western Blots zum Nachweis von HSP70 3, 6 und 9 h nach der Bestrahlung	69
Abbildung 39: Beispielhafte Darstellung der beobachteten HSP70-Färbemuster nach der Bestrahlung	71
Abbildung 40: Auswertung der Fluoreszenzintensität der HSP70-Färbung über eine definierte Fläche	72
Abbildung 41: Detaillierte Darstellung der HSP70 Immunfluoreszenz im Bereich der Schädigung	73
Abbildung 42: Darstellung des Temperaturbereichs in dem HSP70 überexprimiert wurde im Vergleich zur Schwellenwerttemperatur für Apoptose und kompletten Zelltod	74
Abbildung 43: Beispielhafte Darstellung der beobachteten Färbemuster EdU-positiver Zellen nach der Bestrahlung	75
Abbildung 44: Darstellung der Schwellenwert-Temperatur für proliferative Zellen, im Vergleich zur Schwellenwert-Temperatur für Apoptose und kompletten Zelltod	76
Abbildung 45: Darstellung der Schwellenwert-Temperatur für proliferative Zellen im Vergleich zur Schwellenwert-Temperatur für Apoptose und kompletten Zelltod sowie der Überexpression von HSP70	77
Abbildung 46: Darstellung der berechneten CFV und der berechneten Dauer bis zum kompletten Wundverschluss	78
Abbildung 47: Beispielhafte Darstellung der mikroskopisch Dokumentierten Wundbilder 24 h nach der Bestrahlung	79
Abbildung 48: Darstellung der gemessenen Wundbreite und dem Anteil an EdU-positiven Zellen nach der Bestrahlung	80
Abbildung 49: Graphische Darstellung der Ergebnisse	95

II. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht über eine Auswahl der vom RPE sekretierten Wachstumsfaktoren.....	15
Tabelle 2: Übersicht über Methoden thermischer Medizin, die genutzten Wärmequellen und das Ziel der Behandlung.....	21
Tabelle 3: Berechnete Parameter nach der Temperatur-Kalibrierung	55
Tabelle 4: Berechnete Parameter zum Einsetzen in die Gauß-Funktion (Formel 9).....	56
Tabelle 5: Ausprägung der beobachteten Färbemuster	61
Tabelle 6: Herstellernachweise	i
Tabelle 7: Verwendete Geräte und Hilfsmittel	ii
Tabelle 8: Spezifikationen des verwendeten Laseraufbaus	iv
Tabelle 9: Verwendete Software.....	iv
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien	v
Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien	v
Tabelle 12: Verwendete Kitsysteme.....	vi
Tabelle 13: Zellbiologische Puffer und Lösungen.....	vii
Tabelle 14: Verwendete Puffer und Lösungen für Zelllysate	vii
Tabelle 15: Immunzytochemische Puffer und Lösungen	vii
Tabelle 16: Proteinbiochemische Puffer und Lösungen.....	viii
Tabelle 17: Eingesetzte Primärantikörper	ix
Tabelle 18: Eingesetzte Sekundärantikörper.....	ix
Tabelle 19: Protease-Inhibitoren.....	ix

III. FORMELVERZEICHNIS

Formel 1: Gesetz von Lambert-Beer.....	22
Formel 2: Formel zur Berechnung der thermischen Relaxationsdauer	22
Formel 3: Bedingungen für thermischen Einschluss und Wärmeleitung.....	23
Formel 4: Modifizierte Arrhenius-Gleichung.....	24
Formel 5: Berechnung der optischen Eindringtiefe	33
Formel 6: Formel zur Volumenberechnung von Flüssigkeiten.....	34
Formel 7: Formel zur Berechnung der Gesamtzellzahl einer Zellkultur.....	38
Formel 8: Formel zur Berechnung der Zellfrontgeschwindigkeit.....	50
Formel 9: Verwendete Gauß-Funktion.....	55
Formel 10: Formel zur Berechnung der Abhängigkeit vom Temperaturanstieg (ΔT) zur Leistung des Lasers (P)	56

IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent (v/v)/(w/v)
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μb	Mikrobläschen
A	Ampere
A	Amakrinzelle
A	Apikal
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
ARM	Altersabhängige Makulopathie
AutoPhoN	Optoakustische Methode zur Bestimmung der Temperatur im Gewebe
Ax	Axon
B	Basolateral
BAG-1	<i>Bcl-2-associated athanogene-1</i>
Bi	Bipolarzelle
BM	Bruchmembran
BSA	Bovine Serum Albumin
CFV	Zellfront Geschwindigkeit
CNV	Choroidale Gefäßneubildungen
COR	Choroidea, Aderhaut
CPC	Zytophotokoagulation
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
dAMD	Trockene Form der altersabhängigen Makuladegeneration
dH ₂ O	Nanopur gefiltertes Wasser
DMÖ	Diabetisches Makulaödem
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DR	Diabetische Retinopathie
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EpM	Endpoint Management
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Durch Extrazelluläresignale regulierte Kinase 1/2
EthD-III	Ethidium Homodimer III

EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Infusion mit gewärmter Flüssigkeit
FDA	Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FLA	Fluoreszenzangiographie
FM	Funktionelle Modulation
G	Ganglienzelle
GC	Ganglien Zellschicht
h	Stunde
H	Horizontalzelle
HIPEC	Hypertherme Intraoperative Intraperitoneale Chemotherapie
HSC70	Konstitutiv exprimierte Form von HSP70 (Protein)
HSE	Hitzeschock Element
HSF	Hitzeschock Faktor
HSP70	Induzierbare Form des Hitzeschock Protein 70 (Protein)
Hsp70	Hitzeschock Protein 70 (Gen)
HSPs	Hitzeschock Proteine
I/R	Ischämie/Reperfusionsschaden
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i> , Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
iMR	Integraler Membranrezeptor
INL	Innere Körnerschicht
IPL	Innere plexiforme Schichte
IR	Infrarotes Licht
iRPE	Induziertes retinales Pigmentepithel
kDa	Kilo Dalton
KT/GT	Körper-/Gewebstemperatur
LASIK	Laser-in-situ Keratomileusis
LH	Lokale Hyperthermie
LLLT	<i>Low level laser therapy</i>
LTP	Lasertrabekuloplastik
m	Milli/ Meter
M	Mol
M	Müllerglia
m/v	Masseanteil am Volumen

MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MerTK	Rezeptor Tyrosinkinase MER
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Boten-RNA
MV	Mikrovilli
MW	Mikrowellenstrahlung
n/a	Unbekannt
Nd:YAG	Festkörper Laser aus Neodym-dotiertem Yttrium-Alluminium-Granat
Nd:YLF	Festkörper Laser aus Neodym-dotierten Yttrium-Lithium-Fluorid
OCT	Optische Kohärenztomographie
ONL	Äußere Körnerschicht
OPL	Äußere plexiforme Schicht
P	Phosphat
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Zusatz von MgCl ₂ und CaCl ₂
PDT	Photodynamische Therapie
PED	Pigmentepithelablösung
PEDF	<i>Pigment Epithelium Derived Factor</i> ; Wachstumsfaktor mit Ursprung im retina- len Pigmentepithel
POS	Außensegmente der Fotorezeptoren
RF	Radiofrequenz Bestrahlung
RNA	Ribonukleinsäure
RNM	Radikales Stickstoffmolekül
RPE	Retinales Pigmentepithel
RSM	Radikales Sauerstoffmolekül
RT	Regionale Hyperthermie
s	Sekunde
S	Stäbchen
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SRT	Selektive Retinatherapie (Laser)
SRT_r	Stereotaktische Radiotherapie (Röntgen)
T_{10s}	Temperatur die während einer Bestrahlung von 10s erreicht wurde
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor

TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteases</i> , Inhibitor für Metalloproteasen
TJ	<i>Tight Junctions</i> ; engste Verbindungen zwischen zwei Zellen
T_{max}	Maximaltemperatur
TMR	Transmembranrezeptor
TRP	Transienter Rezeptorpotential Kanal
TRPV1	Transienter Rezeptorpotential Kanal, Subfamilie V (Vanilloid), Mitglied 1
TTT	Transpupilläre Thermoerapie
UPR	Ungefaltete Proteinantwort
US	Ultraschall
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Volumen
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
W	Watt
wAMD	Feuchte Form der altersabhängigen Makuladegeneration
WBHT	<i>Whole Body Hyperthermia</i> , Ganzkörper Hyperthermie
Z	Zapfen
Za	Zonula Adherens, Adhäsionsverbindungen
ΔT	Temperaturanstieg
λ	Wellenlänge

1. EINLEITUNG

Pathologische Veränderungen des Augenhintergrundes können sich in verschiedenen, progressiven Erkrankungen manifestieren und oftmals bildet eine Störung in der Funktionalität des retinalen Pigmentepithels (RPE) die Grundlage für die Pathogenese der Erkrankungen [1-3]. Bei dem RPE handelt es sich um eine stark pigmentierte Einzelzellschicht aus hexagonalen Zellen die über *Tight-Junctions* (TJ) und Adhäsionsverbindungen (*Zonula Adherens*; za) in engem Kontakt stehen. Das Gewebe spielt eine wichtige Rolle für die Funktionalität der neuronalen Retina und erfüllt eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben. Die dunkle Färbung der RPE-Zellen lässt die Annahme zu, dass die Absorption des Streulichtes die grundlegende Funktion des Gewebes darstellt [3]. Tatsächlich spielt die starke Pigmentierung eine wichtige Rolle bei der optischen Perzeption und dient dem Schutz der restlichen Gewebe im Auge vor photooxidativem Stress [4, 5]. Zudem trägt das Gewebe entscheidend zum fehlerfreien Ablauf des Sehprozesses bei. Es ermöglicht, im Rahmen des visuellen Zyklus, die Regeneration von Rhodopsin [4, 6, 7] und übernimmt zudem die Phagozytose und Verdauung von abgeschilferten Fotorezeptor Außensegmenten (photoreceptor outer segment; POS) [4, 8]. Störungen dieser Prozesse können massive Auswirkungen auf die Retina haben [3].

Aufgrund der umfangreichen Aufgaben des RPEs ist es im Laufe des Lebens einem hohen Risiko durch photooxidativem Stress ausgesetzt [9, 10]. Funktionsstörungen im Stoffwechsel und der Phagozytose von POS im RPE fördern die Entstehung der altersbedingten Makulopathie (ARM) und der altersbedingten Makuladegeneration (AMD), die Hauptursache für Neuerblindungen im Erwachsenenalter in Deutschland. Ein Ungleichgewicht vaskoproliferativer und -inhibitorischer Sekretionsprodukte kann eine AMD mit Atrophie oder Neovaskularisationen zur Folge haben [3, 11, 12]. Des Weiteren begünstigen chronisch nicht-physiologische Stoffwechselzustände des RPEs im Rahmen eines *Diabetes mellitus* die Entwicklung verschiedener Erkrankungen des Augenhintergrundes, wie der diabetischen Retinopathie (DR) oder dem diabetischen Makulaödem (DMÖ) [13-16]. Es wird angenommen, dass auch die choroidale seröse Chorioretinopathie (CSC) durch einen lokalen Funktionsverlust des RPEs verursacht wird [17].

Durch die Stellung des Auges als ein immunprivilegiertes Raum bleiben die meisten Therapien die über den Blutstrom erfolgen wirkungslos, da das RPE-Gewebe durch seine Barrierefunktion das Organ weitestgehend von systemischen Einflüssen abschirmt [3, 18, 19]. Verschiedene Therapieverfahren wurden und werden am Augenhintergrund praktiziert [20]. Diese umfassen Laserbehandlungen, die intravitreale Gabe von Medikamenten, fokussierte Röntgenstrahlen und neuartige Stammzelltherapien. Das Therapieverfahren wird hierbei entsprechend der Art und Ausprägung der vorliegenden Erkrankung gewählt und angepasst.

Mit dem RPE als Therapieziel stellt die Lasertherapie die beste Option dar, da die Melanosomen der RPE-Zellen das Laserlicht, das durch das Augenmedium bis zu diesem Gewebe vordringen kann, innerhalb eines breiten Wellenlängenbereichs stark absorbieren. Laserbehandlungen werden in der Ophthalmologie seit langer Zeit zur Behandlung verschiedener Netzhauterkrankungen angewendet [21]. Seit fast 60 Jahren wird die Laser-Photokoagulation zur Behandlung verschiedener Netzhauterkrankungen eingesetzt. Das Ziel dieses Verfahrens ist jedoch die lokale Zerstörung

des Zielgewebes. Auf diese Weise kann der lokale Sauerstoffverbrauch im Rahmen der DR verringert, oder neovaskuläre Gewebe bei der AMD zu zerstört werden.

In letzter Zeit weckten langfristige Behandlungen chronischer progressiver Krankheiten wie der AMD, die mit dem Funktionsverlust des RPEs einhergeht [3, 11, 12], das Interesse an Laserbehandlungen des Augenhintergrundes die zu einer Funktions- und/oder Stoffwechselverbesserung des RPEs führen könnten. Durch technischen Fortschritt konnten mittlerweile Behandlungsmodi geschaffen werden, die eine automatische temperaturgeregelte Laserbehandlung der Netzhaut erlauben [22-26] und somit subletale, nicht zellschädliche Laserbehandlungen der Netzhaut ermöglichen.

In den letzten Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen positive Ergebnisse in klinischen Studien zur Behandlung verschiedener Erkrankungen der Makula durch Laserbestrahlung mit geringer Leistung publiziert. Bei denen allerdings die exakte Auswirkung der Behandlung auf die Zellen des RPEs nicht eindeutig geklärt werden konnte, da keinerlei Temperaturmessung auf Ebene des Gewebes durchgeführt wurde. Die temperaturabhängigen Reaktionen des RPEs erlangten daher vermehrte Aufmerksamkeit, wobei insbesondere die Reaktionen im subletalen Temperaturbereich von besonderem Interesse sind. Da subletale Therapiestrategien in der langen Geschichte der retinalen Laserbehandlung eher neuerer Natur sind ist bislang nur wenig über die Reaktion von RPE-Zellen auf subletale Hyperthermie bekannt. Zu diesem Thema wurden bisher nur wenige *in-vitro* Studien durchgeführt und publiziert [27-29].

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher genauere Untersuchungen bezüglich der Reaktionen von Zellen des RPEs auf transiente Hyperthermie, also auf kurzzeitige Temperaturerhöhungen, erfolgen. Für die experimentellen Arbeiten wurden ausschließlich primäre RPE-Kulturen verwendet die aus frischen, enukleierten Schweineaugen gewonnen wurden. Als Wärmequelle wurde ein Thuliumlaser mit einer Wellenlänge von 1940 nm verwendet, dessen Strahlung stark von Wasser absorbiert wird. Der Bestrahlungsaufbau ermöglichte die Einstrahlung des Lichtes von oben auf das Kulturmedium. So konnte sichergestellt werden, dass das Licht vollständig an der Oberfläche des Kulturmediums absorbiert wurde, und die Erwärmung der Zellen ausschließlich durch thermische Diffusion erfolgte.

Der für die Bestrahlung der Zellkulturen verwendete Aufbau wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Miura entwickelt und bereits veröffentlicht [29, 30]. Das Profil des Laserstrahls war annähernd gaußförmig, wodurch in der Mitte der Zellkulturschale die höchste Temperatur erreicht wurde und die Temperatur nach außen abfiel. Bei den an zentraler Position der Zellkulturschale angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) nach 10 sekundiger Bestrahlung handelte es sich um 40°C, 44°C, 47°C, 51°C und 59°C. Zusätzlich wurden nicht bestrahlte (37 °C) Zellkulturen als Kontrollsituation betrachtet.

Nach der Bestrahlung erfolgte die experimentelle Untersuchung verschiedener Parameter, die dazu dienen sollten die zellulären Antworten auf kurzzeitige Hyperthermie genauer zu beurteilen. In diesem Rahmen sollte auch geklärt werden, ob unterschiedliche Erhöhungen der zentral angelegten Temperatur zu veränderten Ergebnissen führen könnten.

1.1. Zellvitalität

Apoptose und Nekrose stellen Formen des zellulären Sterbens dar. Während es sich bei der Apoptose um einen stark kontrollierten Prozess, den sogenannten programmierten Zelltod, handelt, läuft die Nekrose passiv und unkontrolliert (physiologischer Zelltod) ab [31].

Apoptotische Vorgänge können auf unterschiedliche Arten auftreten und eine Vielzahl verschiedener Stoffwechselwege dabei beteiligt sein, sodass die Apoptose nicht als ein definierter und abgrenzbarer Weg des Zelltodes betrachtet werden kann [31-36].

Zelltodmechanismen die nach der Photokoagulation durch Laser eintreten können wurden zu Beginn der 2000er Jahre noch nicht tiefgreifend beachtet und untersucht. Da der Zweck der Behandlung zunächst ausschließlich darin bestand, das RPE inklusive der äußeren Netzhautschichten zu zerstören, wurde der Effekt der Behandlung nur anhand des entstandenen Schadens bewertet. Im klinischen Einsatz wurde die weiß Färbung des Gewebes als Anhaltspunkt genommen, experimentell erfolgte die Beurteilung anhand von histologischen Untersuchungen.

Zusätzlich zum sofortigen nekrotischen Zelltod wurde die Beteiligung von Apoptose an laserinduzierten Schäden des RPEs erstmals 2005 von Barak et al. postuliert [37]. Da die Temperaturverteilung an der bestrahlten Stelle normalerweise nicht homogen über eine Fläche auftritt, sondern gaußförmig vorliegt, könnten Zelltodreaktionen auf Laserbestrahlung in Abhängigkeit von der Entfernung zum Bestrahlungszentrum stehen. Die tatsächlich vorliegende Temperatur hängt so stark von der Entfernung zum Bestrahlungszentrum ab.

Bisher gibt es keine Studien, in denen detaillierte Zelltodreaktionen von RPE-Zellen nach unterschiedlichem Ausmaß thermischer Einflüsse untersucht wurden. Darüber hinaus wurde die Zelltodkinetik nach thermischer Laserbestrahlung am RPE unzureichend aufgeklärt. Die Aufklärung dieser Effekte ist jedoch entscheidend für das Verständnis zellulärer Reaktionen des RPE-Gewebes nach unterschiedlichen thermischen Stimulationen.

Im Rahmen dieser Arbeit diente der Nachweis von Apoptose und Nekrose nach transientser Hyperthermie der Einordnung der unterschiedlichen zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{\max}) in das Schema subletal (nicht tödlich) und letal (tödlich).

1.2. Expression und Sekretion von VEGF

Der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) spielt eine wichtige Rolle bei der physiologischen Funktion von RPE-Zellen [38, 39]. Kann allerdings auch die Neubildung pathologischer Blutgefäße fördern [12, 40-42], wodurch er einen wichtigen Angriffspunkt in der Therapie der AMD darstellt [20, 43-46].

Im Zusammenhang mit Laser-Photokoagulation konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Menge an sekretiertem VEGF kurzzeitig erhöht [47]. Allerdings wurden noch keine tiefgreifenden Untersuchungen bezüglich der Auswirkung subletaler Hyperthermie auf die Sekretion von VEGF durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Auswirkung transientser Hyperthermie auf die Sekretion und Expression von VEGF tiefgreifender untersucht werden.

1.3. HSP70 Expression

HSPs stellen eine hoch konservierte und ubiquitär vorkommende Proteinfamilie molekularer Chaperone dar [48, 49]. Sie helfen dabei fehlgefaltete Proteine wieder in die physiologische Formation zu bringen [50]. Allerdings erfüllen sie diese Aufgabe nicht nur bei geschädigten Proteinen, sondern sorgen auch während der Neusynthese für die korrekte Faltung [49]. Sie werden sowohl konstitutiv als auch als zelluläre Antwort auf unterschiedlichste Stressoren gebildet [49, 51]. HSPs werden aufgrund ihres Molekulargewichts und/ oder ihrer Funktion in unterschiedliche Unterfamilien aufgeteilt [52-54]. HSPs mit einem molekularen Gewicht von etwa 70 kDa werden als Hitzeschock Protein 70 (HSP70) bezeichnet, die Unterfamilie der HSP70 besteht aus einem konstitutiv exprimierten Protein mit 73 kDa (HSC70) und der induzierbaren Form mit 72 kDa (HSP70) [55]. Der genaue Mechanismus, der zur Expression von HSP70 durch Stressoren führt ist noch nicht eindeutig aufgeklärt worden, es wird vermutet, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren hierbei eine Rolle spielen [49, 56]. HSP70 ist zudem an zellulären Schutzprozessen beteiligt [57-62].

Insbesondere seitdem subletale Laserbehandlungen für die Behandlung von Netzhauterkrankungen eingesetzt werden, gewinnt HSP70 zunehmend an Aufmerksamkeit. Obwohl bereits einige Veröffentlichungen von einer erhöhten HSP70 Expression nach subletaler Bestrahlung berichten [28, 63-65], haben sich bislang keine Studien mit der HSP70-Expression nach unterschiedlicher thermischer Stimulation befasst. Zudem wurden noch keine Untersuchungen vorgenommen die die HSP70-Expression mit Zellvitalität und zellulärer Proliferation in Zusammenhang setzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des Proteins HSP70 nach unterschiedlichen Temperaturerhöhungen untersucht. Es wurde auch überprüft ob anhand der Menge, beziehungsweise der Lokalisation des exprimierten Proteins eine Aussage über den Stoffwechszustand der betroffenen Zellen getroffen werden könnte.

1.4. Wundheilung

Die Wundheilung beschreibt einen Prozess, der nach Schädigung eines Gewebes zu dessen Verschluss führt. Sie umfasst unter anderem zwei unabhängigen Prozesse, der zellulären Migration und der Proliferation von Zellen [66, 67].

Die zelluläre Migration kann in vier komplexe Phasen unterteilt werden. Zunächst kommt es einer Ausstülpung der Lamellipodien, die zur Stabilisation am Substrat adhären. Es folgt die Kontraktion und nach dem Lösen alter Fokalkontakte dem Nachziehen des Zellkörpers [68, 69]. Unter Zellproliferation versteht man die Vermehrung von Zellen innerhalb eines Gewebes. In adulten Organismen liegt die Majorität der Zellen in einer Art mitotischem Ruhezustand (G_0 -Phase) vor und es findet keine Zellteilung statt. Allerdings können bestimmte Wachstumsfaktoren oder Zell-Zell-Interaktionen eine erneute Zellteilung anregen [70]. Der Zellzyklus lässt sich in fünf Phasen unterteilen, die G_0 -Phase (Ruhezustand), die G_1 -Phase (Regulation des Fortschreitens der Zellteilung), der S-Phase (Replikation der Desoxyribonukleinsäure (DNA)), der G_2 -Phase (Regulation des Fortschreitens der Zellteilung) und M-Phase (Mitose, Teilung der Zellen) [70]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass subletale Laserbestrahlung die Proliferation unterschiedlicher Zelltypen anregen kann [71].

Ein schneller und effektiver Wundverschluss des RPEs als Einzelzellschicht spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Netzhautfunktion. Bezüglich der Wirkung von subletaler Hyperthermie auf die Wundheilung von RPE-Zellen gibt es nur wenige bislang publizierte experimentelle Arbeiten [72, 73]. Diese Veröffentlichungen konnten nachweisen, dass Laserbestrahlungen mit niedrigerer Leistung den Wundschluss bei kultivierten RPE-Zellen deutlich beschleunigten. Allerdings wurden im Rahmen dieser Studien keine Temperaturangaben getroffen und bisher wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Im Zusammenhang mit subletalen Laserbehandlungen des RPEs, sollte dieses Thema erneut und mit einer besseren Temperaturbeurteilung diskutiert und genauer untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von subletaler Laserbestrahlung auf die Wundheilung, unter Betrachtung der zellulären Proliferation und Migration, untersucht.

2. GRUNDLAGEN

2.1. Das Auge

Organe zur Lichtperzeption finden sich, in unterschiedlichen Ausprägungen, bei etwa 95 % der rezenten Tierarten [74]. Betrachtet man das Auge eines Säugetiers (Abbildung 1), so zeigen sich äußerlich folgende Merkmale: Das Auge ist ein annähernd kugelförmiges Gebilde, das von einer weißen Haut (Sklera) umspannt ist. Auf der einen Seite liegt die farbige Regenbogenhaut (Iris) und auf der gegenüberliegenden der Sehnerv. In der Mitte der Iris befindet sich die Pupille die von der Hornhaut (Cornea) überzogen ist. Die Cornea ermöglicht, zusammen mit der kristallinen Linse, eine scharfe Abbildung von Bildern auf der Retina, die am Augenhintergrund liegt. Der Innere Raum des Auges wird durch eine gelartige Masse, den Glaskörper, ausgefüllt [75].

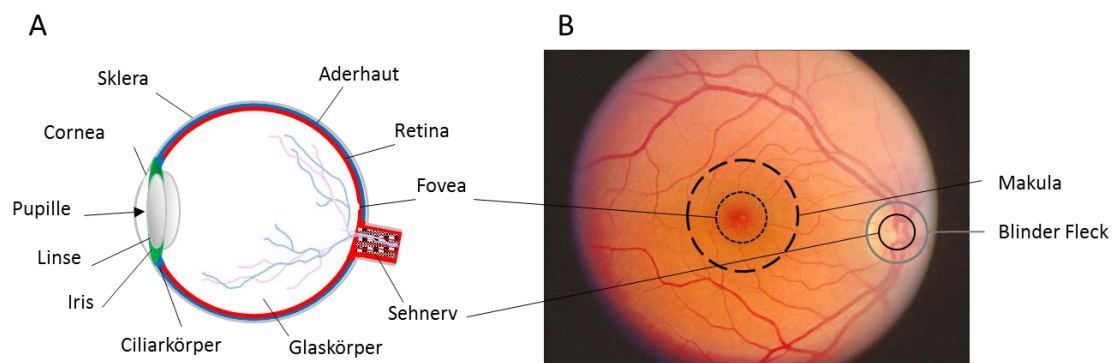


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Querschnitts eines Säugetierauges und des Augenhintergrundes

A: Die drei konzentrischen Schichten Lederhaut, Aderhaut und Retina bilden die Hülle des Auges. Der Innenraum wird durch den Glaskörper ausgefüllt, dieser bildet zusammen mit der Linse, dem Kammerwasser und der Hornhaut das dioptrische Apparate. Modifiziert nach Abramoff [76]. B: Fundusaufnahme des Augenhintergrundes. Eingezeichnet sind die Fovea (gepunkteter Kreis), die Makula (Bereich mit vielen Stäbchen; gestrichelter Kreis), der blinde Fleck (grauer Kreis) und die Sehnervpapille (schwarzer Kreis). Modifiziert nach Kolb [77].

Neuere molekularbiologische Arbeiten konnten eine grundlegende Verwandtschaft einzelner Bestandteile der Lichtsinnesorgane zwischen unterschiedlichen phylogenetischen Stämmen aufzeigen, und es wird vermutet, dass bestimmte Faktoren, welche die Entstehung von Augen begünstigen, bereits bei den ersten Metazoen (etwa zur Zeit der Entstehung der Cnidarier) vorhanden waren [78, 79]. Bei Vertebraten erfolgt die Anlage des Auges zu einem frühen Zeitpunkt in der Embryonalentwicklung [80, 81], während der aus einer Gruppe von Zellen am anterioren Ende der Neuralleiste die Retina hervorgeht [82].

Allgemein dient das Auge der Aufnahme und Vorverarbeitung von Lichtsinnesreizen. Die physikalischen Lichtreize werden von spezialisierten Zellen (Zapfen und Stäbchen) in chemisch/elektrische Signale umgewandelt und diese entlang des Sehnervs in das visuelle Zentrum des Gehirns weitergeleitet [76].

2.1.1. Die Retina

Die Retina dient im Auge der Perzeption des Lichtes. Sie stellt ein hochspezialisiertes, laminar aufgebautes Gewebe dar, in dem histologisch unterschiedlicher Zellen spezifische Aufgaben erfüllen (Abbildung 2) [77]. Der Aufbau der Retina ist bei allen Vertebraten prinzipiell gleich. Das in das Auge eintretende Licht (Abbildung 2; gelbe Pfeile) durchquert zunächst den Glaskörper (Abbildung 2; GK) und anschließend die unterschiedlichen Schichten der Retina, bis es schlussendlich die Fotorezeptoren erreicht [76].

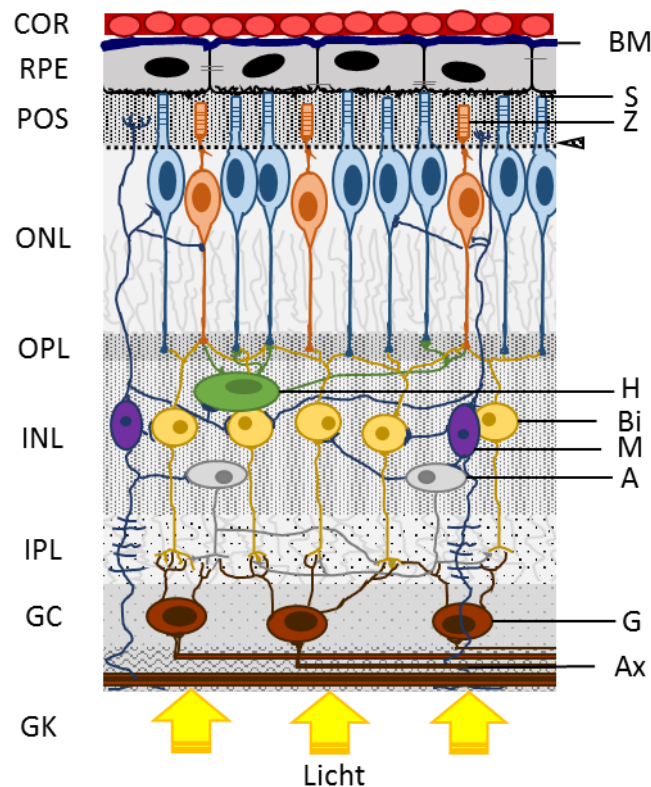


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der Retina

Der Aufbau der vertebraten Retina ist laminar und invers, so dass das Licht zunächst die unterschiedlichen Schichten der Retina durchdringen muss bis es schlussendlich an den Fotorezeptoren ankommt und detektiert werden kann. Rechte Seite der Abbildung: COR: Choroidea (Aderhaut), RPE: Retinales Pigmentepithel, POS: Außensegmente der Fotorezeptoren, ONL: Äußere Körnerschicht, OPL: Äußere plexiforme Schicht, INL: Innere Körnerschicht, IPL: Innere plexiforme Schicht, GC: Ganglienzellschicht, GK: Glaskörper. Rechte Seite der Abbildung: BM: Bruchmembran, S: Stäbchen, Z: Zapfen, H: Horizontalzellen, Bi: Bipolarzellen, M: Müllerglia, A: Amakrinzellen, G: Ganglienzellen, Ax: Axone. Die schraffierte Pfeilspitze spiegelt die Lage der subretinalen Membran wider [83], die gelben Pfeile geben die Richtung, in der das Licht auf die Retina trifft an. Modifiziert nach Abramoff [76] und Kolb [77].

Die Umwandlung des physikalischen Lichtreizes in ein chemisch/elektrisches Signal findet an den POS (Abbildung 2) statt. Die umgewandelten Reize werden in der äußeren plexiformen Schicht (OPL: *outer plexiform layer*; Abbildung 2) über die synaptischen Enden der Fotorezeptoren auf die Bipolar- (Abbildung 2; Bi; gelb) und Horizontalzellen (Abbildung 2; H; grün), verschaltet. Die Körper dieser Zellen erstrecken sich in die innere Körnerschicht (INL: *inner nuclear layer*; Abbildung 2).

Neben den Bipolar- und Horizontalzellen enthält die INL die Zellkörper der Amakrinzellen (Abbildung 2; A; grau) und der Müllerglia (Abbildung 2; M; violett). Die einzelnen Zelltypen stehen in der INL über synaptische Verbindungen im Kontakt. Das Signal gelangt anschließend in die innere plexiforme Schicht (IPL: *inner plexiform layer*; Abbildung 2). In dieser befinden sich die Axonenden der Bipolarzellen (Abbildung 2; Bi; gelb), sowie die Dendriten der Amakrinzellen (Abbildung 2; A; grau) und Ganglienzellen (Abbildung 2; G, braun). Die IPL dient der Vorverarbeitung neurologischer Signale und der Signalweitergabe an die Ganglienzellen. Die Zellkörper der Ganglienzellen liegen in der Ganglienzellschicht (GC: *ganglion cell layer*; Abbildung 2), die Axone der Ganglienzellen (Abbildung 2, Ax; braun) bilden in ihrer Gesamtheit den Sehnerv über den das umgewandelte Signal schlussendlich an das visuelle Zentrum des Gehirns weitergeleitet und dort verarbeitet wird.

Die Verteilung von Zapfen und Stäbchen variiert beim Menschen stark in unterschiedlichen Bereichen der Retina. Während im Großteil der Retina mehr Stäbchen (schwarz/weiß-Sehen) vorkommen, liegen im Bereich der Makula (auch: gelber Fleck; Abbildung 1 B) mehr Zapfen (Farbsehen) vor. Das Zentrum der Makula bildet ein trichterförmig eingesenkter Bereich, die Fovea (Abbildung 1). In dem Areal, in dem die Axone der Ganglienzellen zum Sehnerv zusammengefasst werden (Sehnervpapille) befinden sich keine Fotorezeptoren (Blinder Fleck; Abbildung 1 B).

Die POS stehen zudem mit dem stark pigmentierten RPE-Gewebe in Kontakt. Das RPE Gewebe dient hier nicht nur Absorption von Licht, sondern auch der Phagozytose des gebleichten Retinals aus dem Rhodopsin der Fotorezeptoren. Das RPE wird durch die Bruchmembran (Abbildung 2; BM) von der Aderhaut abgegrenzt.

2.2. Das retinale Pigmentepithel (RPE)

Bei dem RPE handelt es sich um eine stark pigmentierte Einzelzellschicht aus hexagonalen Zellen, die lateral über verschiedene Zell-Zell-Verbindungen in engem Kontakt stehen (Abbildung 3 B). Auf der apikalen Seite steht es über Mikrovilli in direktem Kontakt mit den POS [3, 16]. Auf der basalen Seite wird es durch die Bruchmembran von der Aderhaut abgegrenzt (Abbildung 3 A) [3]. Unter physiologischen Bedingungen halten die Zell-Zell-Verbindungen die RPE-Zellen eng beieinander. Durch die so entstehende Kontaktinhibition wird eine weitere Proliferation der Zellen verhindert [4, 84].

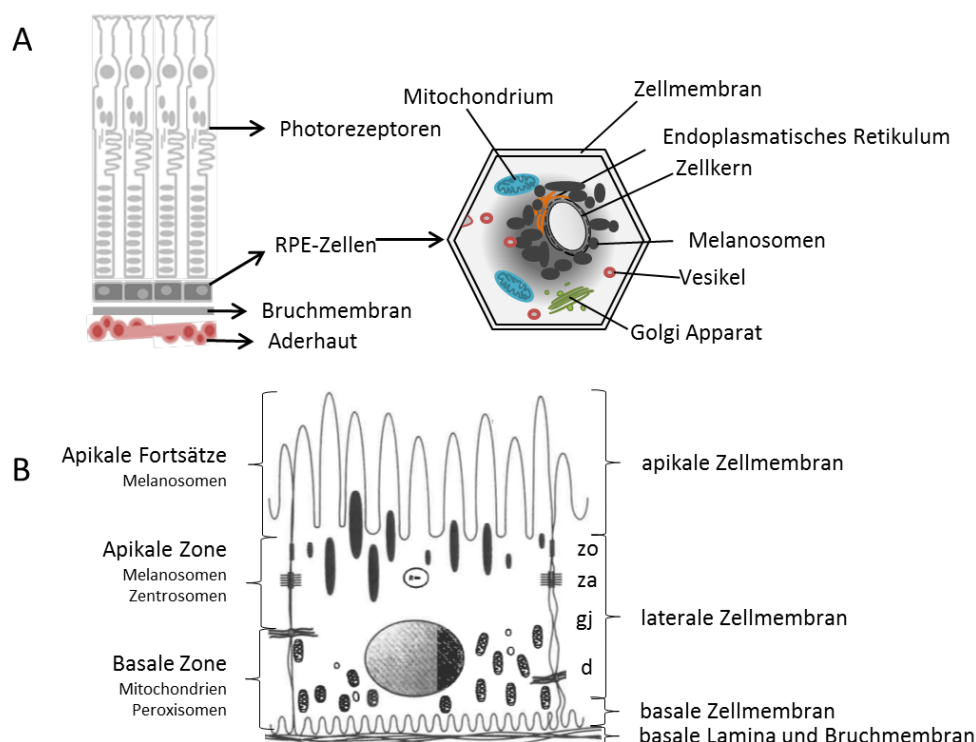


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Lage und des Aufbaus des retinalen Pigmentepithels sowie dessen räumliche Organisation

A: Das RPE Gewebe wird durch die Bruchmembran von der Aderhaut abgegrenzt und steht in direktem Kontakt mit der neuronalen Retina. Die hexagonal aufgebauten RPE-Zellen enthalten neben den klassischen Zellorganellen melaninhaltige Melanosomen, durch welche die dunkle Färbung des Zellkörpers entsteht. B: Räumliche Organisation einer RPE-Zelle. Die Zellen des RPEs lassen sich in eine apikale und eine basale Zone unterteilen. Die apikale Zone enthält hierbei die Melanosomen und Zentrosomen, die basale die Mitochondrien und Peroxisomen. Apikale Fortsätze (Mikrovilli), die von der apikalen Zellmembran gebildet werden, treten mit den POS in Verbindung. Im lateralen Bereich der Zellmembran liegen verschiedene Zell-Zell Verbindungen (zo: Zonula occludens, *Tight Junctions*; za: Zonula adhaerens, Adhäsionsverbindungen; gj: Gap Junctions, Zell-Zell-Kanäle; d: Desmosomen), durch die die Zellen des RPEs in engem Kontakt stehen. Entnommen aus und modifiziert nach Marmor und Wolfsberger [85].

Neben den normalen Zellorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) oder den Mitochondrien enthalten RPE-Zellen zudem dunkel pigmentierte Melanosomen. Die starke Pigmentierung des Gewebes spielt eine wichtige Rolle bei der optischen Perzeption und dient zudem dem Schutz der restlichen Gewebe im Auge (2.2.1) [4, 5].

Während der Embryogenese geht das RPE aus der äußeren Zellschicht des Augenbechers (Mesoderm des Kopfes) hervor, wohingegen die Retina von der inneren Schicht des Augenbechers (Neuroektoderm des Vorderhirns) gebildet wird [86]. Bereits zu diesem Zeitpunkt stehen die beiden Gewebe in direkter Abhängigkeit zueinander [3, 86, 87]. Wobei davon ausgegangen wird, dass bei Störungen der retinalen Entwicklung das RPE in der Lage ist durch Transdifferenzierung eine mehrschichtige Retina hervorzubringen [88]. Es besteht keine direkte Verbindung zwischen Retina und RPE. Einzig der Abtransport von Wasser, durch das RPE-Gewebe und der dadurch entstehende Sog, fördert die Adhäsion der Retina und hält sie im physiologischen Abstand zum retinalen Pigmentepithel [87].

Das RPE erfüllt eine Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben (Abbildung 4), wobei es sich wie drei unterschiedliche Zelltypen (Epithel, Makrophagen, Gliazellen) verhält [8]. Die Hauptfunktionen des RPEs werden im Folgenden detailliert beschrieben.

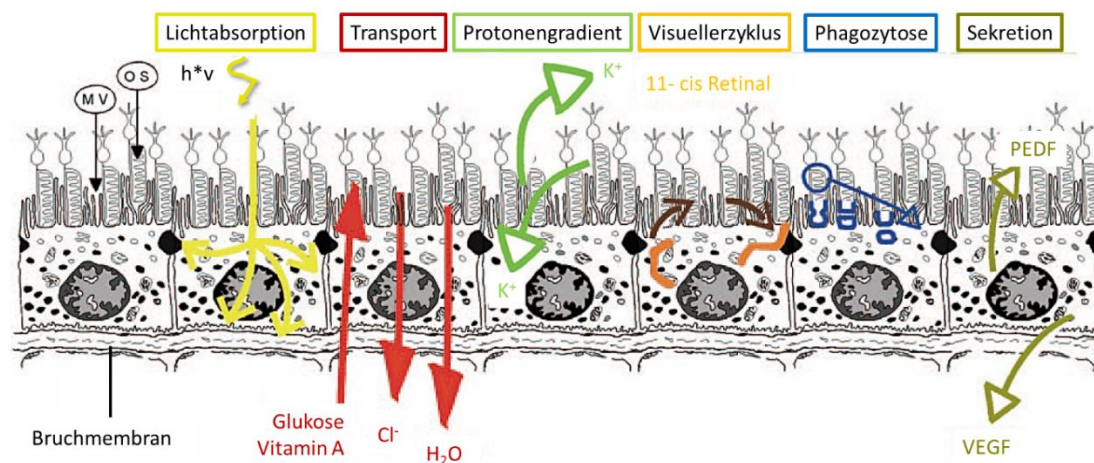


Abbildung 4: Darstellung unterschiedlicher Funktionen des retinalen Pigmentepithels

Bei den Funktionen des RPE handelt es sich um Lichtabsorption, epithelialen Transport, den Aufbau eines Protonengradienten, bestimmte Schritte des visuellen Zyklus, der Phagozytose der Fotorezeptor Außensegmente und der Sekretion verschiedener Faktoren. Abkürzungen: MV=Mikrovilli; OS=Fotorezeptor Außensegmente. Übernommen aus und modifiziert nach Strauss [3].

2.2.1. Lichtabsorption

Durch die dunkle Färbung des RPE-Gewebes ist es naheliegend die Absorption des Lichtes als grundlegende Funktion des Gewebes anzunehmen [3]. Das in den Melanosomen vorliegende Melanin verhindert die Rückstreuung des auf die Fovea fokussierten Lichtes und ermöglicht so eine Schärfung des abgebildeten Bildes.

In adulten RPE-Zellen liegen die Melanosomen auf der apikalen Seite bis zur zentralen Ebene der Zelle vor, wohingegen sie nicht auf der basalen Seite vorkommen. Zudem lässt sich eine Bewegung der Melanosomen, im Zusammenhang mit dem Hell-Dunkel Zyklus, innerhalb des Zytoplasmas beobachten, wobei sie bei Anwesenheit von Licht näher an die apikale Membran der Zelle wandern [89, 90]. Über den gesamten Augenhintergrund betrachtet nimmt der Melaningehalt der RPE-Zellen von der Peripherie hin zum posterioren Teil hin ab, wobei es im Bereich der Makula zu einer starken Erhöhung an Melanin kommt [84].

Neben dem Melanin enthalten die RPE Zellen zudem Lutein und Zeaxanthin [84], die blaues Licht absorbieren und so einen Schutz vor lichtinduziertem oxidativem Stress darstellen. Da Licht dieser Wellenlänge ansonsten die Radikalbildung durch Photooxidation des Lipofuszin begünstigen würde ist der Anteil dieser Pigmente insbesondere im Bereich der Makula (Abbildung 1 B) erhöht [3]. Der Anteil von Lutein und Zeaxanthin innerhalb der Zellen verhält sich dabei im Menschen invers zum Melaningehalt [84].

Während der Absorption von Umgebungslicht können die Melanosomen zu einer Aufheizung (bis zu 40 °C) des RPE-Gewebes führen [91, 92]. Die so entstehende Temperaturerhöhung wird vermutlich von der Aderhaut abgefangen und durch Wärmediffusion von der Retina weggeführt [92]. Aufgrund der starken Lichtabsorption durch die Melanosomen stellt das RPE-Gewebe den Hauptabsorber bei der Behandlung des Augenhintergrundes mit Laserstrahlen dar [93-96].

2.2.2. Visueller Zyklus

Das RPE-Gewebe spielt zudem eine wichtige Rolle beim Sehprozess. So nimmt das RPE eine wichtige Rolle im visuellen Zyklus ein. Allgemein gesprochen beginnt der Sehprozess mit der Absorption eines Photons an der Chromophore, 11-cis Retinal, des retinalen Rhodopsins [97].

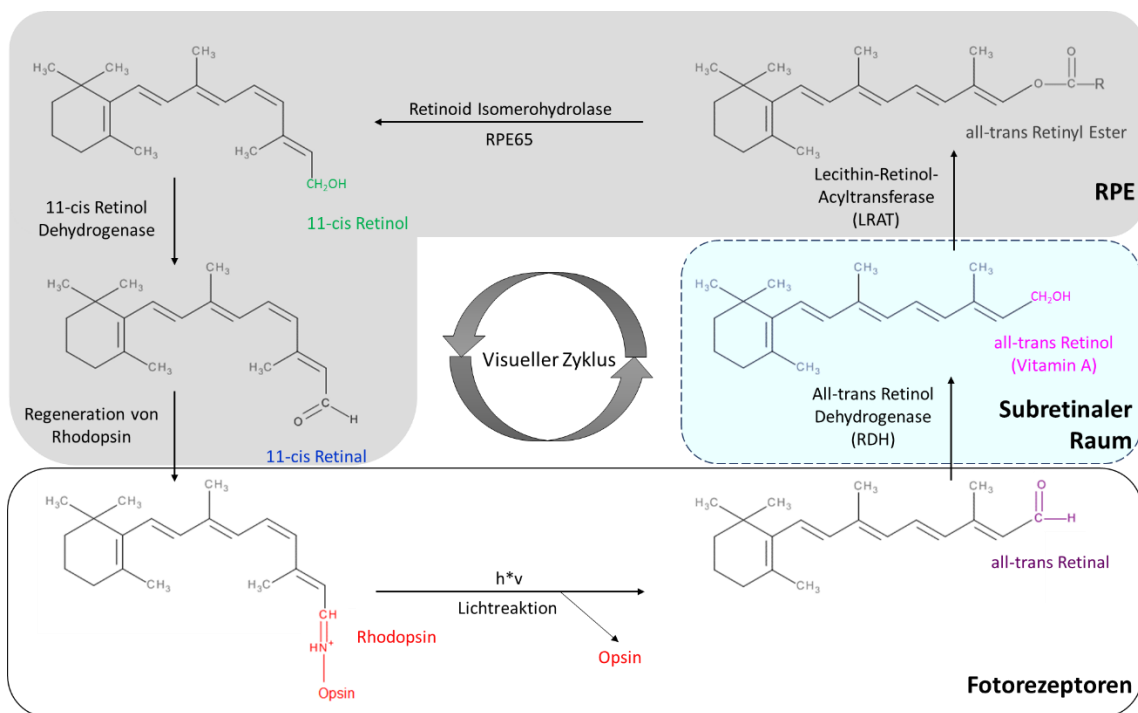


Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung des visuellen Zyklus

Die Umsetzung von Rhodopsin zu all-trans Retinal erfolgt in den Fotorezeptoren (schwarz umrandeter Bereich) durch die Absorption eines Photons. All-trans Retinol wird über den subretinalen Raum (blauer Bereich) und gelangt in das RPE (graue Bereich). Im RPE erfolgt die Re-Isomerisierung des all-trans Retinols zu 11-cis Retinal. Modifiziert nach Thompson [6], Bok [4] und Xue [7].

Während dieser Reaktion wird das 11-cis Retinal zu all-trans Retinal umgesetzt, der Stoff wird anschließend innerhalb der Stäbchen in die Außensegmente transportiert wo er durch die Reaktion mit einer Membranständigen Dehydrogenase zu all-trans Retinol (Vitamin A) reduziert und in den subretinalen Raum transportiert wird (Abbildung 5) [4]. Von dort gelangt es in die RPE-Zellen und wird über eine Abfolge mehrerer Enzyme zu 11-cis Retinal (Abbildung 5, blau) umgesetzt. Das 11-cis Retinal wird anschließend wieder zu den Fotorezeptoren transportiert, wo es zur Regeneration des Rhodopsins genutzt wird und durch die Absorption eines weiteren Photons einen neuen visuellen Zyklus starten kann [4, 6, 7]. Die Regeneration des Rhodopsins und die damit verbundene Re-Isomerisierung von all-trans Retinal zu 11-cis Retinal sind somit entscheidend für die Funktion des Sehprozesses [79]. Insbesondere die Funktionalität des Enzyms RPE65 nimmt hierbei eine entscheidende Rolle ein [7] und Störungen dieses Enzyms haben massive Auswirkung auf die Lichtperzeption [3, 7, 98].

2.2.3. Phagozytose von Fotorezeptor Außensegmenten

Neben dem visuellen Zyklus hat das RPE einen weiteren wichtigen Anteil am Sehprozess, die Phagozytose abgeschilfter POS [4, 8]. Während der Absorption von Licht kommt es fortlaufend zu photooxidativem Schäden an den POS [3], wodurch diese immer wieder erneuert werden müssen. Dieser Prozess ist stark an den zirkadianen Rhythmus (Tagesrhythmus) gekoppelt und wird in den Morgenstunden durch das Einwirken von Licht hervorgerufen [99, 100].

Die Phagozytose im RPE lässt sich prinzipiell in vier nacheinander ablaufende Phasen unterteilen, das Erkennen, die Anbindung, die Aufnahme und den Verdau der POS (Abbildung 6) [101]. Es wird davon ausgegangen, dass die Phagozytose aktiv sowohl vom RPE, als auch von den Fotorezeptoren gesteuert wird [102]. Die Spitze des zu verdauenden POS wird durch vom RPE ausgebildete Pseudopodien umschlungen (Abbildung 6 A-D) und schließlich abgetrennt (Abbildung 6 E). Die aufgenommene Spitze wird in der RPE-Zelle in Phagosomen verpackt und verdaut.

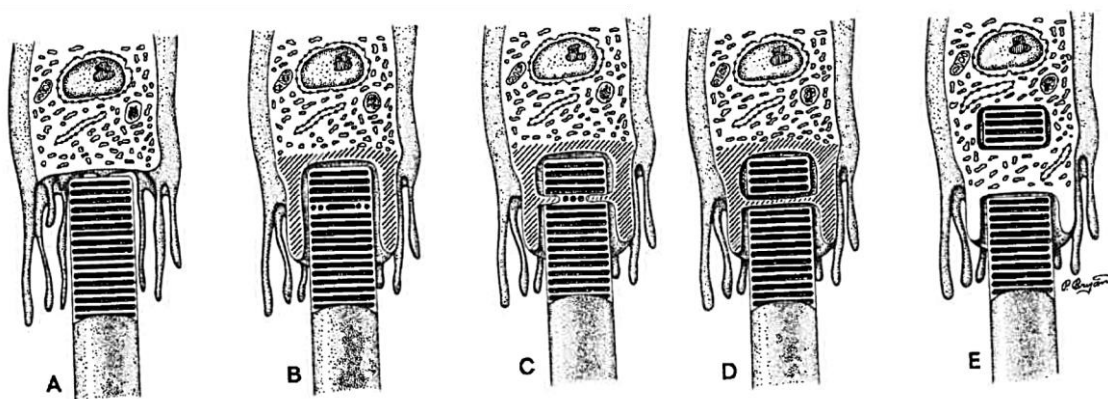


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Phagozytose von Fotorezeptor Außensegmenten

Die Spitze des zu verdauenden POS wird durch vom RPE ausgebildete Pseudopodien umschlungen (A-D) und schließlich abgetrennt (E). Entnommen aus und modifiziert nach Marmor und Wolfsberg [85].

Eine Beteiligung von drei Membran-assoziierten Rezeptoren, an der apikalen Membran der RPE-Zellen, konnte bereits nachgewiesen werden. Bei diesen handelt es sich um CD36, die Rezeptor Tyrosinkinase MER (MerTK) und $\alpha_v\beta_5$ Integrin. Das Zusammenspiel der drei Rezeptoren ist entscheidend für die erfolgreiche Phagozytose der POS [103, 104]. Eine Störung dieses Prozesses steht in direktem Zusammenhang mit degenerativen Veränderungen der Retina [3].

2.2.4. Das RPE als Barriere und Transportmedium

Die enge Verbindung zwischen den RPE-Zellen durch TJ und andere Zell-Zell-Verbindungen ermöglicht die Bildung des immunprivilegierten Raumes des Auges. Das RPE dient hierbei als tatsächliche physiologische Barriere, die das Auge vom Blutstrom des Gesamtorganismus trennt und bildet somit die Grundlage der äußeren Blut-Retina Schranke. Auf der anderen Seite kommuniziert das RPE-Gewebe mit dem Immunsystem und steuert so die Immunantwort unter physiologischen und pathologischen Umständen [18, 19] und ermöglicht einen hoch selektiven Transport von unterschiedlichen Substanzen zwischen Blut und Retina [99].

In Richtung vom Blutstrom zur Retina transportiert das RPE vor allem Nährstoffe wie Glukose (Stabilisierung des retinalen Stoffwechsels), 11-cis Retinal (visueller Zyklus) und ω -3 Fettsäuren (Aufbau der Membran der Fotorezeptoren) [8, 105]. Durch die Bereitstellung dieser Komponenten sorgt das RPE maßgeblich für die Funktionalität der Retina und ermöglicht einen kontinuierlichen Ablauf des visuellen Zyklus (2.2.2).

In der entgegengesetzten Richtung sorgt das RPE-Gewebe für den Abtransport von Wasser (Vermeidung von Ödemen und Wasserablagerungen im intra/subretinalen Raum), Ionen (Aufrechterhaltung des Erregungspotentials der Zellen aus der neuronalen Retina) und Stoffwechselendprodukten vom subretinalen Raum in Richtung des Blutstroms [8, 106-108].

2.2.5. Sekretion

Das RPE sekretiert eine Vielzahl verschiedener Faktoren mit unterschiedlichen Aufgaben [16]. Eine Übersicht über ausgewählte Faktoren ist in Tabelle 1 aufgeführt. Die Tabelle gibt zudem eine grobe Übersicht über die Aufgabe des jeweiligen Wachstumsfaktors und falls bekannt, ob die Abgabe in Richtung der Retina (Apikal) oder der Aderhaut (Basolateral) erfolgt.

Tabelle 1: Übersicht über eine Auswahl der vom RPE sekretierten Wachstumsfaktoren

FGF: *Fibroblast Growth Factor*, Fibroblasten-Wachstumsfaktor; IGF: *Insulin-like Growth Factor*, Insulinähnlicher Wachstumsfaktor; NGF: *Nerve Growth Factor*, Nervenwachstumsfaktor; MMP: Matrix-Metalloprotease; PEDF: *Pigment Epithelium Derived Factor*, Wachstumsfaktor mit Ursprung im retinalen Pigmentepithel; TGF- β : *Transforming Growth Factor*, Transformierender Wachstumsfaktor; TIMP: *Tissue inhibitor of metalloproteases*, Inhibitor für Metalloproteasen; VEGF: Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; α B: Basolateral; A: Apikal; n/a: Unbekannt.

Bezeichnung	Sekretion	Aufgabe	Quelle
FGF-Familie (FGF-1,2,5)	B	Antiangiogenetischer Effekt, Mitogene Effekte, Zellüberleben	[109-111]
IGF-1	n/a	Wachstum und Entwicklung	[104, 112, 113]
NGF	n/a	Schutz vor oxidativem Stress	[110, 114]
MMP-2	A	Abbau der EZM	[115-117]
PEDF	A	Stabilisierung Retina, Antiangiogenetischer Effekt	[42, 118-120].
TGF-β	n/a	Proliferation, Differenzierung, Schutz vor oxidativem Stress	[121-123]
TIMP-1	A	Inhibition von MMPs	[115-117]
VEGF-Familie	B	Schutz der Aderhaut, Permeabilität RPE-Gewebe, Gefäßneubildungen (CNV)	[11, 12, 38-41]
α-B-Crystallin	A	Zytoprotektiver Effekt	[124, 125]

2.3. Pathologische Veränderungen am Augenhintergrund

Eine Störung in der Funktionalität des RPEs führt zur Entstehung unterschiedlicher Netzhauterkrankungen [1-3]. So konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress eine langfristige Auswirkung auf den Zusammenhalt zwischen den RPE-Zellen hat [9, 10], wodurch es zu einem Verlust von Zellen aus dem Verband kommen kann. Die verbleibenden Zellen sind einer stärkeren metabolischen Belastung ausgesetzt, zudem nimmt die Pigmentierung der Zellen ab, wodurch die protektiven Eigenschaften des Gewebes limitiert werden [126, 127]. Beeinträchtigungen der Pumpfunktion des RPEs können zum einen zu einer Netzhautablösung und zum anderen zu der Bildung von intraretinalen Ödemen führen [128]. Chronisch nicht-physiologische Stoffwechszustände im Rahmen eines *Diabetes mellitus* begünstigen die Entwicklung verschiedener Erkrankungen des Augenhintergrundes, wie der DR oder dem DMÖ [13-16]. Funktionsstörungen im Stoffwechsel und der Phagozytose von äußeren Fotorezeptorsegmenten im RPE fördern die Entstehung der ARM

und der AMD. Ein Ungleichgewicht vasoproliferativer und -inhibitorischer Sekretionsprodukte kann eine AMD mit Atrophie oder Neovaskularisationen zur Folge haben [3, 11, 12].

2.3.1. Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)

Die AMD stellt in westlichen Industrienationen die häufigste Ursache für Neuerblindungen im Erwachsenenalter dar [129]. Bei der Entstehung der Erkrankung gibt es einen klaren Zusammenhang mit dem Alter der betroffenen Patienten [130]. So sind 2-3% der 50-jährigen und 25% der über 80-jährigen von der Erkrankung betroffen [86, 129].

Weitere Risikofaktoren umfassen genetische Vorbelastungen, lebensstilabhängige Faktoren (Rauchen, Ernährung), systemische Erkrankungen wie Bluthochdruck und die Exposition von UV-Licht [131-133]. Zudem begünstigt oxidativer Stress das Fortschreiten der Erkrankung [9].

Es wird angenommen, dass eine Verschlechterung des metabolischen Zustands [3], beziehungsweise ein Verlust an RPE-Zellen [134-136] maßgeblich an der Entstehung der Erkrankung beteiligt sind. Wie bereits unter dem Abschnitt 2.2 aufgeführt, spielt das RPE eine wichtige Rolle für die physiologische Funktion der Retina. Im Zusammenhang mit AMD stellt insbesondere die Beteiligung des RPEs am visuellen Zyklus [4, 6, 7] und die Versorgung der Retina mit Metaboliten und Ionen die wichtigsten Funktionen dar [8, 106-108]. Der Verlust einzelner RPE-Zellen aus dem Zellverband wird zudem mit dem Einwachsen von Blutgefäßen von der Aderhaut in Richtung der Retina in Zusammenhang gebracht [3, 11, 12].

Die pathologischen Veränderungen die während der AMD auftreten betreffen den Bereich der Makula (Abbildung 1; Abbildung 7) und haben daher massive Auswirkungen auf die visuelle Wahrnehmung der betroffenen Patienten [137].

Der Verlauf der Erkrankung lässt sich in zwei Stadien, das frühe (*early AMD*) und das späte (*late AMD*), unterteilen. Im frühen Stadium der AMD treten erste Drusen (Abbildung 7) auf [138]. Bei weichen Drusen handelt es sich um extrazelluläre Ablagerungen, die sich zwischen der basalen Membran der RPE-Zellen und der Bruchmembran ansammeln und eine Störung des Stoffaustauschs zwischen Aderhaut und RPE bedingen [139]. Weiche Drusen können im Laufe der Zeit verkalken (kalzifizieren) und sich zu größeren Drusen zusammenfassen [140].

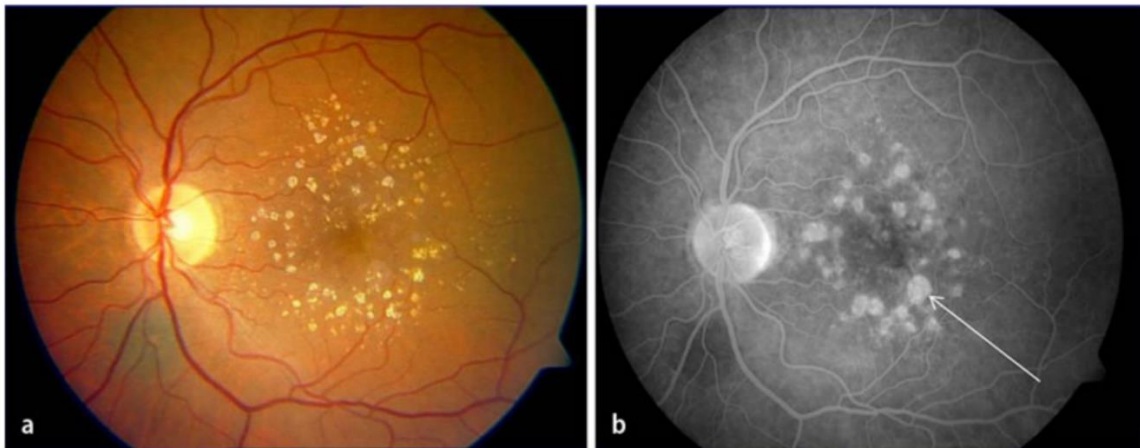


Abbildung 7: Fundusaufnahme und Fluoreszenzangiographie

Beide Aufnahmen zeigen den Befund aus demselben Auge. A: Fundusaufnahme manifestierter kalzifizierter Drusen; b: Fluoreszenzangiographie (FLA), der Pfeil zeigt Areale geographischer Atrophie an. Entnommen aus von Strachwitz [138].

Im späten Verlauf der AMD kommt es zu geographischer Atrophie des RPEs, einer Ablösung der Pigmentepithelzellen (*pigment epithelial detachment*; PED) und choroidalen Gefäßneubildungen (*choroidal neovascularization*; CNV) [11]. Die Entstehung der CNV markiert eine weitere Unterscheidbarkeit innerhalb der AMD. So kann die AMD trocken (*dry AMD*; dAMD) oder feucht (*wet AMD*, wAMD) verlaufen. Bei etwa 10-15% der Patienten mit dAMD entwickelt sich die Erkrankung zur feuchten Form.

Im Rahmen der wAMD kommt es zu einer Überproduktion von angiogenen Faktoren, insbesondere VEGF spielt hier eine entscheidende Rolle [12, 141, 142]. Die neugebildeten Blutgefäße brechen durch die Bruchmembran in den subretinalen Raum dort kommt es durch Hyperpermeabilität der Gefäße zu Leckagen [102]. Wodurch es zu einer Abhebung des RPEs und der Retina sowie die Akkumulation von extrazellulärer Flüssigkeit (Makulaödem) kommt. Zugleich wird die Proliferation der RPE-Zellen stimuliert und der Anteil des Bindegewebes vermehrt sich (Fibrosierung), wodurch die Bildung eines zumeist irreversiblen zentralen Skotoms begünstigt wird [127].

Diese Entwicklung stellt bei 80-85% der Patienten den häufigsten Grund für eine massive Verschlechterung des Visus dar [143, 144].

Bisher gibt es keine Möglichkeit die trockene Form der AMD grundlegend zu behandeln. Viele unterschiedliche therapeutische Maßnahmen zur Behandlung der feuchten AMD wurden bereits ausprobiert. In den späten 1980er Jahren wurde damit begonnen die neovaskulären Membranen in chirurgische Eingriffe zu entfernen [145], dieser Eingriff stellt eine hoch-invasive Therapieform dar und wird, außer bei Patienten mit besonders ausgeprägten submakularen Hämorrhagien, nicht mehr eingesetzt [146, 147]. Bis in die frühen 2000er Jahre wurden vor allem Laser therapeutisch eingesetzt. Bei den hier angewandten Behandlungsmodi handelte es sich um die Photokoagulation [95, 96, 148-150], die photodynamische Therapie (PDT) [151-153], die transpupilläre Thermotheapie (TTT) [154, 155]. Seit 2005 stellt die intravitreale Gabe von VEGF Inhibitoren dar [41, 156].

2.4. Therapieverfahren bei AMD

Das RPE spielt eine wichtige Rolle für die Funktionalität der neuronalen Retina und Veränderungen in diesem Gewebe stehen in direktem Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener Erkrankungen wie der AMD [88, 128, 157]. Durch die Stellung des Auges als einen immunprivilegierten Raum bleiben die meisten Therapien die über den Blutstrom erfolgen wirkungslos, da das RPE-Gewebe durch seine Barrierefunktion das Organ weitestgehend von systemischen Einflüssen abschirmt [3, 18, 19]. Verschiedene Therapieverfahren wurden und werden am Augenhintergrund praktiziert [20]. Diese umfassen die intravitreale Gabe von Antikörpern oder Kortikosteroiden, Laserbehandlungen, fokussierte Röntgenstrahlen, und neuartige Stammzelltherapien. Das Therapieverfahren wird hierbei entsprechend der Art und Ausprägung der vorliegenden Erkrankung gewählt und angepasst.

2.4.1. Pharmazeutische Behandlungen

Antikörper gegen VEGF

Auf der Suche nach Therapiemaßnahmen, die die Neubildung von Blutgefäßen (CNV) verringern könnten, wurde die intravitreale Flüssigkeit von Patienten mit AMD untersucht und erhöhte Konzentrationen des Wachstumsfaktors VEGF festgestellt [142, 158]. Da dieser Wachstumsfaktor einen maßgeblichen Einfluss auf die Neubildung von Blutgefäßen hat [12, 40-42], wurden Therapeutika entwickelt, die dazu dienen sollten die Konzentration an VEGF im Auge zu reduzieren. Als erstes Medikament dieser Art wurde Pegaptanib (Abbildung 8; B), ein Aptamer, 2004 von der Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten (FDA) zugelassen [159].

Der Einsatz von anti-VEGF-Medikation gilt derzeit als Goldstandard für die Therapie der fAMD und kommt mittlerweile auch bei anderen Erkrankungen des Augenhintergrundes, wie dem DMÖ und der DR, zum Einsatz [41, 156]. Die Gabe der Medikamente erfolgt intravitreal, wird also direkt in den Glaskörper injiziert.

Mittlerweile steht eine Vielzahl unterschiedlicher anti-VEGF Medikamente zur Verfügung (Abbildung 8). Diese fangen das VEGF entweder direkt ab (Abbildung 8; A-C), oder dienen dazu VEGF-Rezeptoren extrazellulär (Abbildung 8; D,E) oder intrazellulär (Abbildung 8; F) zu blockieren. Auch siRNA (*small interfering RNA*) kann hier zum Einsatz kommen [46].

Die direkte Auswirkung der Medikamente auf das Fortschreiten der behandelten Erkrankungen wird derzeit evaluiert [20, 43-46] und auch der Einsatz von Kombinationstherapien aus Laserbestrahlung und anti-VEGF Medikation berücksichtigt [160]. Abseits der pro-angiogenetischen Eigenschaften von VEGF spielt der Wachstumsfaktor eine Entscheidende Rolle für die Funktionalität des RPE-Gewebes [38, 39], wodurch der Einsatz der Medikamente infrage gestellt wurde [161, 162]. Eine klinische Langzeitstudie aus dem Jahr 2015 belegte das Auftreten von Atrophie des RPE-Gewebes unter langfristiger Gabe von anti-VEGF Medikation [163].

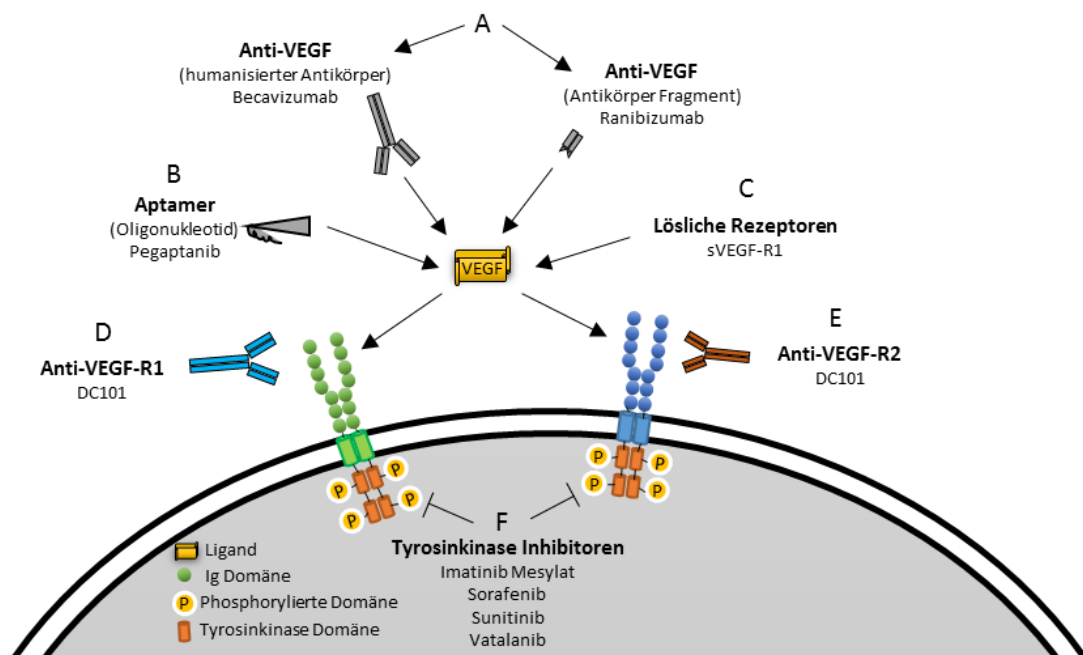


Abbildung 8: Strategien der Anti-VEGF-Therapie

Dargestellt sind unterschiedliche Strategien zur Inhibition des VEGF-Signalwegs mit den geläufigsten Wirkstoffen. A: Monoklonale Antikörper gegen VEGF-A; B: Aptamere, Oligonukleotide die an die Heparin-bindende Domäne von VEGF-165 binden; C: Lösliche Rezeptoren, eine alternative gespleißte Form des Rezeptors VEGFR-1; D: Monoklonale Antikörper gegen VEGFR-1; E: Monoklonale Antikörper gegen VEGFR-2; F: Inhibitoren die die Ligand-gesteuerte Phosphorylierung der VEGF-Rezeptoren verhindern und so die Signalweiterleitung unterbinden. Nicht gezeigt: Der Einsatz von siRNA. Modifiziert nach Noël [46].

Die Art der Medikation stellen zudem einen empfindlichen Kostenfaktor dar und auch die psychologische Belastung der Patienten durch die intravitreale Injektion der Medikamente ist nicht zu vernachlässigen. Zusätzlich steigert die Art der Darreichung die Gefahr für intraokulare Infektionen [156]. Durch eine Kombinationstherapie mit Laserbestrahlung oder Strahlentherapie kann die Anzahl der Einzelgaben verringert beziehungsweise der Abstand zwischen den Einzelgaben erhöht [156, 160, 164, 165] und das Auftreten einer Toleranz gegenüber der Anti-VEGF-Medikamente gemindert werden [166].

Kortikosteroide

Kortikosteroide stellen eine Wirkstoffgruppe dar, die in der Nebennierenrinde aus Cholesterin gebildet werden [167]. In der Augenheilkunde werden sie im Rahmen der Behandlung von DMÖ, retinalen Venenverschlüssen oder der AMD eingesetzt [168]. Die Gabe der Medikamente erfolgt durch wiederholte Injektionen in den Glaskörper (intravitreale Gabe), oder durch das chirurgische Einsetzen eines Implantats, durch das der Wirkstoff über längere Zeit freisetzt wird [169, 170]. Im Rahmen der AMD Therapie werden vor allem Triamcinolonacetonid und Dexamethason verwendet [170-172]. Es wird davon ausgegangen, dass die Kortikosteroide über eine Einflussnahme auf das Komplement-System entzündliche Prozesse, die im Verlauf der Erkrankung auftreten, abklingen lässt und so zu einer Verbesserung der Symptome führt [168, 170, 173].

2.4.2. Laser

Eine der ersten Therapien für pathologische Veränderungen am Augenhintergrund stellt der Einsatz von Lasern dar [21]. Hierbei muss zwischen unterschiedlichen Therapieverfahren unterschieden werden: Der konventionellen Laserphotokoagulation, der transpupillären Thermotherapie (TTT), der selektiven Retinatherapie (SRT), der photodynamischen Therapie (PDT) und subletalen, also nicht tödliche (in diesem Fall nicht zellschädlich), Laserbehandlungen der Netzhaut.

Eine genauere Beschreibung der unterschiedlichen Methoden erfolgt unter 2.6.1.

2.4.3. Strahlentherapie

Bei der Strahlentherapie handelt es sich um eine stereotaktische Radiotherapie (SRT_r), bei der stark fokussierte Röntgenstrahlen eingesetzt werden. Ihre Anwendung wird bei Patienten mit fortgeschrittener AMD in Betracht gezogen, bei denen kaum oder keine Wirksamkeit der eingesetzten anti-VEGF Medikation nachgewiesen werden kann [174]. Die eingesetzte Röntgenstrahlung wird bei diesem Verfahren so eingestellt, dass Schäden des Gewebes minimal bleiben [174-176]. Den theoretischen Hintergrund dieser Therapie bildet die Annahme, dass gesunde Zellen in der Lage sind die entstehenden Schäden zu kompensieren, während stark proliferative Zellen zugrunde gehen [177]. Erste klinische Studien, in denen die SRT_r als einziges Therapiemittel eingesetzt wurde, führten zu widersprüchlichen Resultaten [174]. Neuere Studien, die in Kombination mit der Gabe von anti-VEGF Medikamenten erfolgte, konnten zeigen, dass unter der Strahlentherapie deutlich weniger intravitreale Injektionen benötigt wurden [164, 165].

2.4.4. Stammzelltherapie

Im Rahmen degenerativer Erkrankungen des Augenhintergrundes wird der Einsatz embryonaler Stammzellen seit einiger Zeit diskutiert [178]. Jedoch besteht durch den spezifischen Charakter von Stammzellen die Gefahr, dass diese unkontrollierbar proliferieren oder in andere Gewebe einwandern könnten. Erste Ergebnisse klinischer Studien in der induzierte RPE Zellen (iRPE), zur Therapie von Patienten mit Stargardt-Syndrom, zum Einsatz kamen, wurden im August 2018 veröffentlicht [179]. Auch eine potentielle Therapie verschiedener Erkrankungen des Augenhintergrundes mit Hilfe von CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), ein Verfahren, dass die genetische Manipulation von adulten Organismen ermöglicht, wird in Erwägung gezogen [180, 181].

2.5. Medizinischer Einsatz von Temperatur im Gewebe

Der Einfluss von Temperatur auf die Progression unterschiedlicher Erkrankungen ist seit langem bekannt und wird in der Humanmedizin bei unterschiedlichsten Behandlungsmethoden eingesetzt. Hierbei werden elektromagnetische Verfahren wie Radiofrequenz Bestrahlung (RF), Mikrowellenstrahlung, Laserbestrahlung (*low level laser therapy*; LLLT) und infrarotes Licht, oder Ultraschall sowie Infusionen mit gewärmter Flüssigkeit genutzt.

Eine Übersicht über die einzelnen Methoden, die genutzten Wärmequellen und das Ziel der Behandlung ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Übersicht über Methoden thermischer Medizin, die genutzten Wärmequellen und das Ziel der Behandlung

WBHT: *Whole Body Hyperthermia*, Ganzkörper Hyperthermie; HIPEC: Hypertherme Intraoperative Intraperitoneale Chemotherapie; LH: Lokale Hyperthermie; RH: Regionale Hyperthermie FM: Funktionelle Modulation; RF: Radiofrequenz Bestrahlung; MW: Mikrowellenstrahlung; LLLT: Low level laser therapy, Kaltlichtlaser; IR: Infrarotes Licht; F: Infusion mit gewärmter Flüssigkeit; US: Ultraschall; n/a: Unbekannt.

Me- thode	Modus	Temperatur	Dauer	Ziel	Quelle
WBHT	IR	41-42 C	60-90min	Immuntherapie,	[182, 183]
		39-40 °C	4-8 h	Aktivierung von Medikamenten	
HIPEC	F	42 °C	Variiert	Eingesetzt nach Resektion abdominaler Tumore	[184]
LH	RF	n/a	Variiert	Ablation oberflächlicher Tumore	[185]
	US	n/a	Variiert		
RH	LLLT	≈40 °C	n/a	Schmerzlinderung, Wundheilung	[186-189]
FM	IR	+ 1 °C	1 min	Modulation axonales Wachstum	[190]
		40-43 °C	≤ 10 s	Aktivierung protektiver Prozesse	[29, 72]

Insbesondere im Bereich der Krebstherapie wird Hyperthermie für die Freisetzung, beziehungsweise zur Verstärkung von Chemotherapeutika angewandt [191-193]. Einer der ersten dokumentierten, therapeutischen Einsätze von Hyperthermie zur Behandlung von Tumorerkrankungen erfolgte im Jahre 1900. William Bradley Coley injizierte hierbei Suspensionen abgetöteter Bakterienstämme der Gattung *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* direkt in inoperable Sarkome ein, die daraufhin entstehende Infektion führte zu einer lokalen Hyperthermie, die dabei half den Umfang der Tumore zu verringern [194]. Mittlerweile ist bekannt, dass insbesondere der in Tumorgewebe erniedrigte pH-Wert, sowie weniger enge Zell-Zellkontakte eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf Hyperthermie spielen [195, 196].

2.6. Grundlagen zum Einsatz von Lasern in der Medizin

Das Akronym „Laser“ (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) beschreibt das zugrundeliegende physikalische Prinzip der Lichtverstärkung durch stimulierte Emission, im Rahmen der 1917 von Albert Einstein für elektromagnetische Wellen postulierte Eigenschaften [197]. Die exakte Vorhersage stimulierter Emission von Licht im sichtbaren Spektrum erfolgte 1958 von Schawlow und Townes [198]. Stimuliert Emission tritt auf, wenn ein in einem höheren energetischen Zustand befindliches Atom von einem Photon getroffen wird, dessen Energie genau der Differenz zu einem energetisch niedrigeren Zustand entspricht. Dabei wird ein weiteres Photon ausgesendet, welches in Wellenlänge, Frequenz, Phase und Richtung mit dem einfallenden Photon übereinstimmt. Auf diese Weise kommt es zu einer Verstärkung des Lichtes [199]. Laserlicht ist weitgehend monochromatisch und kohärent. Darüber hinaus können Laser-Strahlen nur eine geringe Divergenz aufweisen. Der erste Laser (Rubin-Laser; $\lambda=694,3$ nm) wurde 1960 von T.H. Maiman realisiert [200].

Bei dem Einsatz von Laserstrahlung in der Medizin müssen die Interaktionen des Lichtes mit dem Gewebe berücksichtigt werden. Die Wirkung wird hier durch die Eigenschaften des Lasers wie Wellenlänge (λ), Leistungsdichte und Einwirkzeit [199], die optischen Parameter des Gewebes wie Absorption, Streuung und Reflexion und dessen thermische Eigenschaften wie Wärmeleitung und Wärmekapazität beeinflusst [201].

Formel 1: Gesetz von Lambert-Beer

$I(d)$: Intensität in Abhängigkeit der Eindringtiefe; μ : Extinktionskoeffizient, d : Eindringtiefe

$$I(d) = I_0 \cdot e^{-\mu d}$$

Die Absorption des Lichtes im Medium erfolgt exponentiell nach dem Gesetz von Lambert-Beer (Formel 1) [202]. In biologischen Geweben erfolgt die Absorption, in Abhängigkeit von der Wellenlänge, hauptsächlich durch Proteine, DNA, Melanin, Hämoglobin und Wasser (Abbildung 12) [203]. Das Wissen um die Absorptionseigenschaften der einzelnen Gewebebestandteile ermöglicht die Auswahl eines Lasers, dessen spezifische, emittierte Wellenlänge von der gewünschten Komponente absorbiert wird. Auf diese Weise lässt sich der genaue Ort der Einwirkung des Laserlichtes und der gewünschte Effekt festlegen [204, 205].

Wärmekapazität und Wärmeleitfähigkeit stellen Parameter der thermischen Gewebeeigenschaften dar und bestimmen die Geschwindigkeit der Ausbreitung und Verteilung der Temperatur im Gewebe nach der Laserbestrahlung. Die thermische Relaxationsdauer (Formel 2) beschreibt hierbei die Wärmediffusion innerhalb eines Mediums.

Formel 2: Formel zur Berechnung der thermischen Relaxationsdauer

τ_R : Thermische Relaxationsdauer; κ : Thermische Diffusion; d : Schichtdicke

$$\tau_R = \frac{d^2}{4\kappa}$$

Wählt man die Bestrahlungszeit kurz genug, kann es dazu kommen, dass die im Gewebe eingebrachte Wärme während der Bestrahlungszeit nur in einem vernachlässigbar geringen Anteil in das umliegende Gewebe abfließt („thermischer Einschluss“). Dies kann dazu genutzt werden Absorber innerhalb transparenter Schichten gezielt zu beeinflussen [206]. Für den konkreten Fall der Laserbehandlung des Augenhintergrundes konnte gezeigt werden, dass bei einer Pulsdauer von 200ns bis 5µs RPE Zellen gezielt beeinflusst werden können ohne Fotorezeptoren thermisch zu schädigen [207-209]. Eine Abschätzung ob man im thermischen Einschluss operiert kann folgendermaßen getroffen werden:

Formel 3: Bedingungen für thermischen Einschluss und Wärmeleitung

Unter Berücksichtigung von Formel 2 A: Thermischer Einschluss; B: Kein thermischer Einschluss.

$$A: \tau \ll \frac{d^2}{4\kappa} \quad B: \tau \gg \frac{d^2}{4\kappa}$$

Die in den absorbierenden Bestandteilen deponierte Energie kann in Abhängigkeit von der Expositionszeit, Leistungsdichte und Absorption unterschiedliche Effekte herbeiführen. Bei diesen handelt es sich um Effekte photochemischer, photothermischer oder photomechanischer Natur (Abbildung 9) [210]. Zu den photothermischen Effekten gehören hier Vaporisation und Koagulation, die photomechanischen Prozesse lassen sich in Photodisruption und Photoablation unterteilen [210, 211].

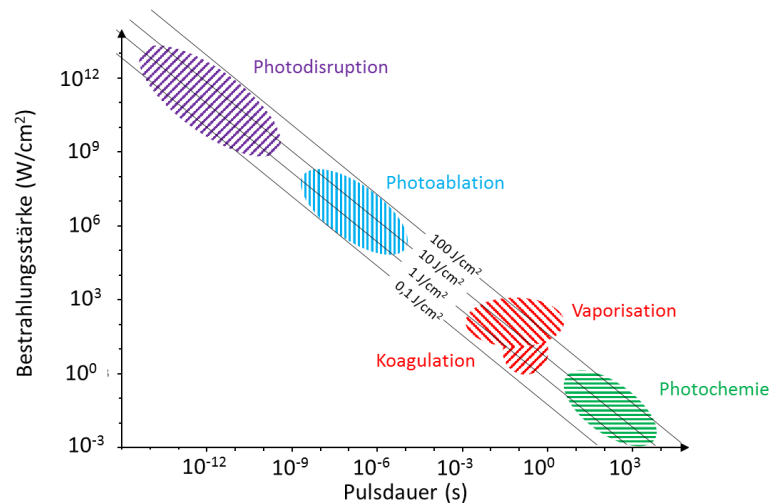


Abbildung 9: Wirkung von Laserstrahlung auf Gewebe

A: Darstellung der thermischen (rot) und photochemischer (grün) Wirkung sowie der nichtlinearen Prozesse der Photoablation (blau) und Photodisruption (violett) in Abhängigkeit von der Pulsdauer und Bestrahlungsstärke. Die farbigen Flächen geben etwaige Bereiche wieder. Modifiziert nach Schneeweiss [204].

Die unterschiedlichen Effekte lassen sich durch Modulation der Bestrahlungsstärke und Expositionszeiten erreichen (Abbildung 9) [204].

Die auftretenden thermischen Gewebsschäden sind maßgeblich von der Dauer und Höhe (ΔT) des Temperaturanstiegs abhängig und beruhen größtenteils auf der Denaturierung von Proteinen. Die

Denaturierung kann hierbei als Ratenprozess beschrieben werden, bei dem ein linearer Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Temperatur besteht [212]. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 10 dargestellt. Moleküle im Zustand A können in einem reversiblen Schritt durch Energiezufuhr in einen aktivierten Übergangszustand A* gebracht werden, bleibt die Energiezufuhr über die Zeit bestehen denaturieren die Proteine und fallen in den energetisch niedrigeren Zustand B (Abbildung 10) [213]. Der Prozess der Denaturierung ist hierbei irreversibel.

Der im Gewebe erzeugte thermische Schaden kann über die Arrhenius-Gleichung quantifiziert werden (Formel 4) [214, 215]. In dieser modifizierten Arrhenius-Gleichung wird die Temperaturabhängigkeit des Frequenzfaktors B nicht berücksichtigt, da diese im Vergleich zum exponentiellen Einfluss der Temperatur zu vernachlässigen ist [212].

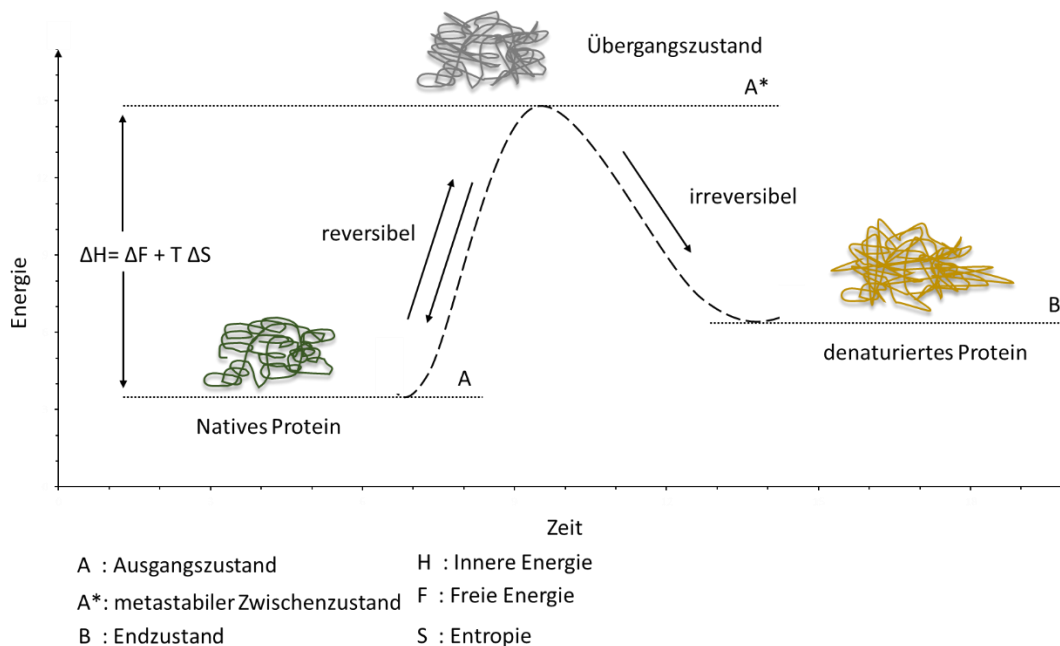


Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung des Zusammenhangs zwischen Energie, Zeit und dem Zustand eines Proteins

Die temperaturabhängige Denaturierung von Proteinen stellt einen Ratenprozess dar. Native Proteine (A) können durch Energiezufuhr in einen aktivierten Übergangszustand (A*) gebracht werden. Dieser Vorgang ist reversibel. Denaturieren die Proteine durch die einwirkende Energie fallen sie auf ein niedrigeres Energieniveau (B). Der Vorgang der Denaturierung ist nicht reversibel. ΔH stellt den Unterschied im Energieniveau (innere Energie) dar, der sich aus der freien Energie (ΔF), der Temperatur (T) und der Entropie (ΔS) ergibt. Modifiziert nach Birngruber [212, 213] und Bischof [216].

Formel 4: Modifizierte Arrhenius-Gleichung

$\Omega_0(t)$: Dimensionsloser Koeffizient der den thermischen Schaden quantifiziert; B: Frequenzfaktor; E_α : Für die Proteindenaturierung benötigte Aktivierungsenergie; R: Allgemeine Gaskonstante; T(t): Zeitlicher Temperaturverlauf.

$$\Omega_0(t) = \ln \left(\frac{C_M(0)}{C_M(t)} \right) = B \int_0^t \exp \left(- \frac{E_\alpha}{RT(t')} \right) \cdot dt'$$

$\Omega(t)$ stellt hier einen Maßstab für die Gewebsschädigung dar, die auf die Denaturierung von Proteinen zurückzuführen ist. Bei $\Omega(t)=1$ liegen in einem Gewebe, dass sich ausschließlich aus dem gleichen Protein zusammensetzt, 63 % der Moleküle in denaturierter Form vor. Ein $\Omega(t)=0,53$ stellt hierbei die Grenze für eine irreversible Gewebsschädigung dar [214, 217].

Unter Berücksichtigung der optischen und thermischen Eigenschaften des zu behandelnden Gewebes und dem erwünschten therapeutischen Effekt kann so ein geeigneter Laser und ein passender Bestrahlungsmodus für die Verwendung in der Medizin gefunden werden.

Der Einsatz von Lasern in der Medizin ist vielfältig. So kommen sie in der viszeralen Chirurgie als Laserskalpelle [218] oder bei der Laserlithotripsie (Zertrümmerung von Harnsteinen) [219] zum Einsatz. Im Rahmen dermatologischer Behandlungen werden Laser unter anderem genutzt um Pigmentflecken, sichtbare Blutgefäße [220], Tätowierungen [221] und Haare oder Narben zu entfernen [222]. Zudem kommen sie bei der Therapie verschiedener Tumore der Haut zum Einsatz [223, 224], oder um die Freisetzung beziehungsweise Aufnahme von Medikamenten zu beschleunigen [225]. In der Zahnmedizin können sie bei der Entfernung von Karies [226] oder Parodontitis [227] zur Anwendung kommen.

Ein Haupteinsatzgebiet von Lasern in der Medizin stellt die Augenheilkunde dar, die genauen Therapiemöglichkeiten sind im Folgenden (2.6.1) dargestellt.

2.6.1. Einsatz von Lasern in der Augenheilkunde

Dadurch, dass das Auge im sichtbaren Bereich (380 nm-750 nm) stark durchlässig für Laserstrahlung ist können diese relativ einfach für die Therapie unterschiedlicher Erkrankungen beziehungsweise pathologischer Veränderungen genutzt werden (Abbildung 11; Abbildung 12). Laser können in der Behandlung von Veränderungen des Augenvorderabschnitts (Linse, Hornhaut, Ziliarkörper, Iris, Kammerwinkel) und des Augenhintergrundes (Netzhaut, retinales Pigmentepithel, Aderhaut) zum Einsatz kommen.

Die bekannteste Laserbehandlung am Vorderabschnitt des Auges stellt LASIK (Laser-in-situ Keratomileusis) dar. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren zur Korrektur von Fehlsichtigkeit. LASIK stellt eine Methode innerhalb der refraktiven Chirurgie dar. Während des Eingriffs wird mithilfe eines Mikrokeratoms die Hornhaut geschnitten und der so entstehende Hornhautlappen (Flap) geöffnet. Mittels eines Excimerlasers (192 nm) werden anschließend Teile des vorderen Stromas entfernt und nach einer gründlichen Spülung der Schnittfläche der Flap zurückgeklappt [228]. Die Operationsmethode ist mittlerweile auch ohne Flap möglich.

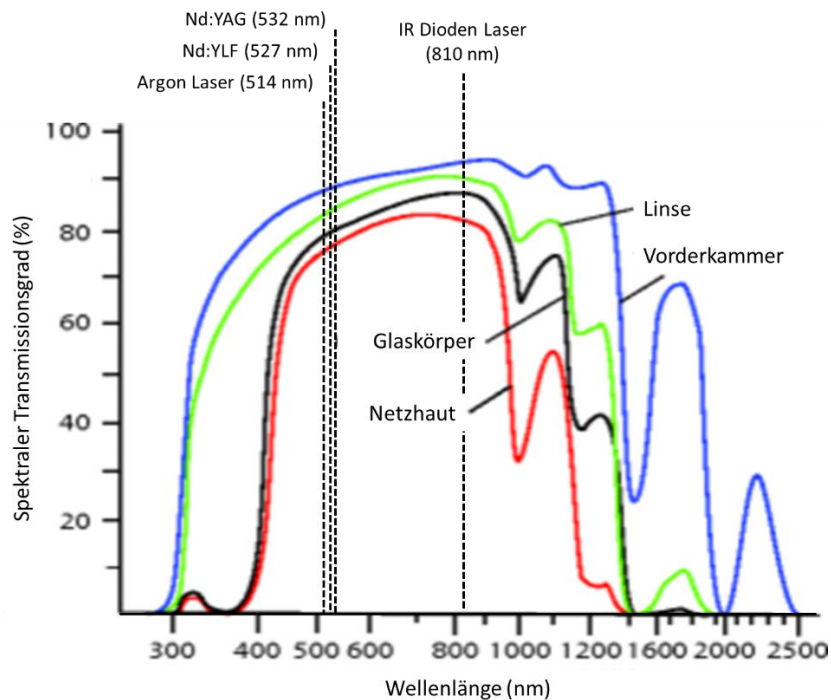


Abbildung 11: Durchlässigkeit des Auges in Abhängigkeit von der Wellenlänge

Angegeben sind zusätzlich die Wellenlängen ausgewählter Laser (Nd:YAG (532 nm); Nd:YLF (527 nm); Argon Laser (514 nm); Infrarot (IR) und Dioden Laser (810 nm)). Entnommen aus und Modifiziert nach Schneeweiss [204].

Einen weiteren Einsatz am Vorderabschnitt stellt die therapeutische Laserbehandlung chronischer Glaukome dar. Bei den hierbei eingesetzten Methoden handelt es sich um photodisruptive Verfahren (Abbildung 9). Zwei unterschiedliche Methoden kommen zum Einsatz [229]. Bei der selektiven Lasertrabekuloplastik (SLT) werden mit einem Argon Laser ($\lambda=514$ nm; Spotgröße: 50 μm ; Expositionszeit 100 ms; Abbildung 11; Abbildung 12) 100 Herde über 360 ° am Übergang zwischen pigmentiertem und nicht pigmentiertem Trabekelwerk appliziert [229]. Ein therapeutischer Effekt der SLT ist nachweisbar [230]. Die Zytophotokuagulation (CPC) wird transskleral unter Verwendung eines Diodenlasers ($\lambda=810$ nm; Leistung: 1-2 W; Abbildung 11; Abbildung 12) eingesetzt um die Produktion des Kammerwassers zu reduzieren und so den Augeninnendruck zu senken [231, 232]. Bei der transskleralen Applikation werden 20 bis 40 Laserherde direkt hinter dem Limbus platziert [229]. Die Methode stellt ein hoch invasives Verfahren dar und wird daher nur im Notfall eingesetzt.

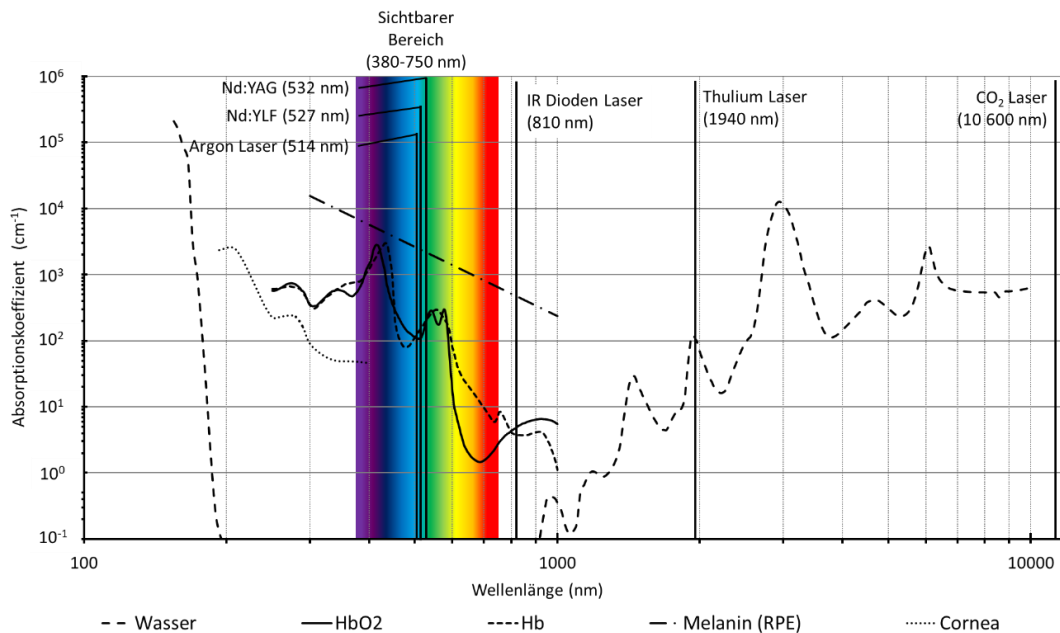


Abbildung 12: Absorptionskoeffizienten unterschiedlicher Gewebebestandteile

Dargestellt sind die Absorptionskoeffizienten von Wasser [233], oxygeniertem Hämoglobin (HbO_2) und reduziertem Hämoglobin (Hb) (Kurve kompiliert von Scott A. Prahl aus Daten von W.B. Gratzler und N. Kollias [234]), Melanin [235] und der Cornea [236]. Des Weiteren ist der sichtbare Bereich des Lichtes farbig hinterlegt (380-750 nm) und die Wellenlängen ausgewählter Laser (Nd:YAG (532 nm); Nd:YLF (527 nm); Argon Laser (514 nm); Infrarot (IR) Dioden Laser (810 nm); Thuliumlaser (1940 nm) und CO_2 Laser (10600 nm)) angegeben. Modifiziert nach Vogel und Venugopalan [203].

Eine der ersten Therapien für pathologische Veränderungen am Augenhintergrund stellt der Einsatz von Lasern dar [21], wobei die Melanosomen der RPE-Zellen als einer der Hauptabsorber betrachtet werden müssen (Abbildung 13) [237]. Bei Behandlungen des Augenhintergrundes muss zwischen unterschiedlichen Therapieverfahren unterschieden werden: Der konventionellen Laserphotokoagulation, der transpupillären Thermotherapie (TTT), der selektiven Retinatherapie (SRT), der photodynamischen Therapie (PDT) und subletalen, also nicht tödlichen (in diesem Fall nicht zellschädlich), Laserbehandlungen der Netzhaut.

Die Photokoagulation der Netzhaut wurde in den 1950er Jahren erstmals von Meyer-Schwickenrath als therapeutische Maßnahme am Augenhintergrund publiziert [95, 96]. Bei diesem Verfahren wird ein Laserstrahl mit definierter Wellenlänge über eine Spaltlampe in das Auge des Patienten fokussiert. Bei den verwendeten Lasern handelt es sich heutzutage in den meisten Fällen um frequenzverdoppelte Festkörper-Laser aus Neodym-dotiertem Yttrium-Alluminium-Granat (Nd:YAG Laser) ($\lambda=532$ nm) [238]. Durch die Absorption des Lichtes im Zielgewebe (RPE) kommt es zu einer lokalen Temperaturerhöhung, wodurch die dort befindlichen Proteine denaturieren [239] (Abbildung 14, Abbildung 15 C). Das Verfahren wurde in unterschiedlichen Studien evaluiert [148-150, 240]. Es konnte eine Vielzahl negativer Effekte, wie massive Narbenbildung oder starke Atrophie des Gewebes, festgestellt werden [65, 241-246]. Trotz der Gefahren, die das Verfahren mit sich bringt stellt es eine wichtige therapeutische Instanz dar und diente als Grundlage zur Weiterentwicklung unterschiedlicher Lasertherapien.

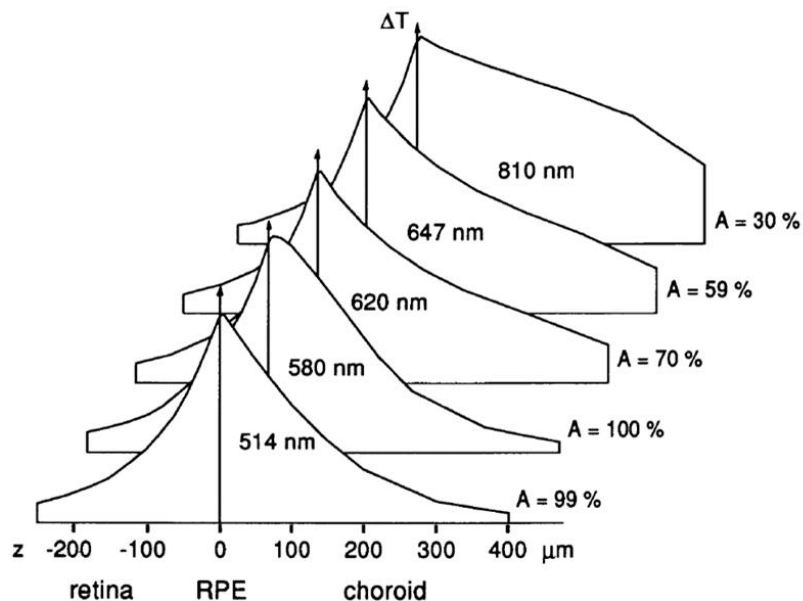


Abbildung 13: Berechnete Temperaturprofile in der Retina und der Aderhaut während der Photokoagulation

Die Berechnung der Temperaturprofile erfolgte für verschiedene Wellenlängen bei einer Spotgröße von 500 µm und einer Bestrahlungsdauer von 100 ms. Die Werte für ΔT spiegeln die zu erwartende Maximaltemperatur an der betrachteten Position wider. Die Kurven wurden auf dieselbe Temperaturerhöhung im RPE-Gewebe normiert. Die prozentuale Absorption von Licht (A) durch das RPE und die Aderhaut sind an der rechten Seite der Kurven angegeben. Entnommen aus Vogel [237].

Ab dem Jahr 1995 kam die transpupilläre Thermoerapie (TTT) als Therapiemethode bei chorioidalen Neovaskularisationen (CNV) zum Einsatz [154, 155]. Ein Infrarotdiodenlaser ($\lambda=810$ nm) wird hierbei durch die erweiterte Pupille des Patienten auf den Augenhintergrund abgebildet und so eine großflächige Bestrahlung des Gewebes erreicht (Abbildung 14). Hierbei wird nur eine geringe Erhöhung der Temperatur (ΔT) des Zielgewebes erzielt, wodurch es zu keiner Denaturierung der Proteine kommen sollte [155, 240, 247]. Der genaue Wirkmechanismus der TTT ist noch nicht völlig geklärt [239]. Es wird davon ausgegangen, dass der Verschluss der CNV durch Migration, Transformation und Proliferation des RPE zustande kommt [248]. Trotz der Schonung der Aderhaut und der Retina konnten aufgrund lokal erzielter hoher Temperaturen massive Schädigungen im RPE-Gewebe auftreten [248, 249]. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass die im Gewebe erzielte Temperatur höher war als zunächst angenommen. Die grundlegende Durchführung der TTT erfolgte unabhängig von der Pigmentation des Augenhintergrundes der Patienten, wodurch in Abhängigkeit vom Pigmentierungsgrad unterschiedliche Endtemperaturen im Gewebe erzielt wurden. Diese Erkenntnis führte zu der Entwicklung neuartiger, temperaturgeregelter Methoden [250].

Ein photochemisches Verfahren (Abbildung 9) zur Behandlung am Augenhintergrund stellt die photodynamische Therapie (PDT) dar. Hierbei wird der durch Licht aktivierbare Wirkstoff Visudyne™ (Verteporfin; Absorptionsspitze; 680-695 nm) intravitreal injiziert und nach 15 min mittels einer Spaltlampe für 83 s bestrahlt ($\lambda=689$ nm; Lichtdosis: 50 J/cm², Bestrahlungsstärke: 600 mW/cm²) [152, 153, 251]. Der in den Blutgefäßen angereicherte Wirkstoff absorbiert das eingestrahelte Licht und führt hier zur Bildung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff (Typ-II-Reaktion), durch den die Gefäße der CNV geschädigt und die Bildung kleiner Thrombosen gefördert

wird [152]. Die Schädigung tritt hier nur im Zielbereich auf und das umliegende Gewebe bleibt verschont.

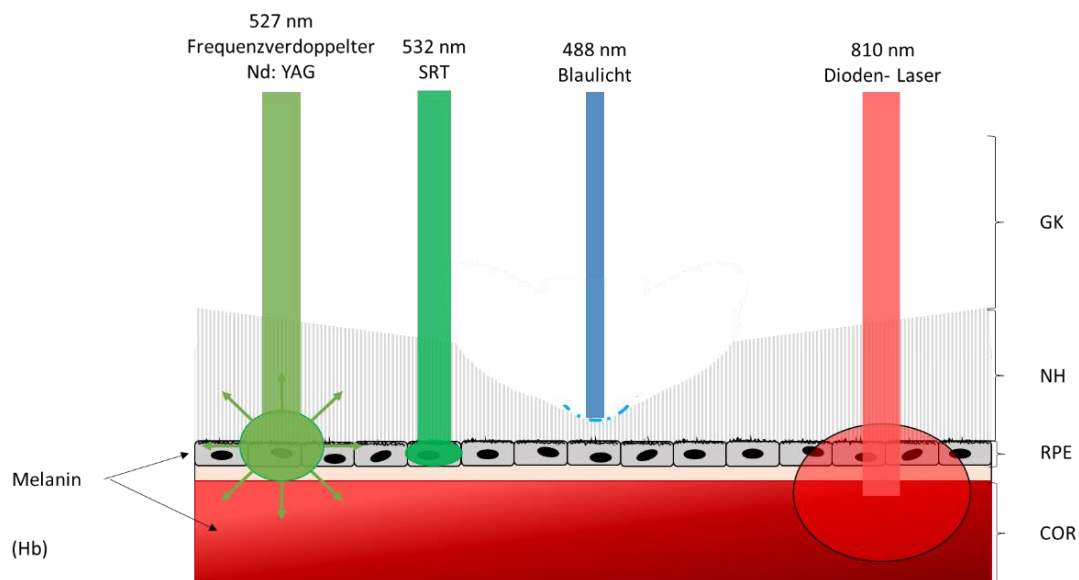


Abbildung 14: Eingesetzte Laser mit Wellenlänge und Ort an dem sie am Augenhintergrund absorbiert werden

Dargestellt sind die hauptsächlich eingesetzten Lasersysteme (Nd:YAG: 527 nm; SRT: 532 nm; Blaulicht: 488 nm; Dioden-Laser: 810 nm) und die Gewebe des Augenhintergrundes in denen sie absorbiert werden. Linke Seite: Absorber (Melanin, Hämoglobin (Hb)); rechte Seite: Gewebe (Glaskörper (GK), Netzhaut/Retina (NH), retinales Pigmentepithel (RPE), Choroidea/Aderhaut (COR)).

Bei der selektiven Retinatherapie (SRT) wird, gepulste Laserbestrahlung (im unteren Mikrosekundenbereich; $\leq 5 \mu\text{s}$) eingesetzt, so dass der Schaden im RPE-Gewebe kontrolliert erreicht und eine Schädigung der umliegenden Gewebe inklusive der neuronalen Retina vermieden wird [252]. Es werden frequenzverdoppelte Festkörper-Laser aus Neodym-dotierten Yttrium-Lithium-Fluorid (Nd:YLF; $\lambda=527 \text{ nm}$; Pulsdauer $1,7 \mu\text{s}$; Repetitionsrate 100 Hz) eingesetzt. Das Licht wird direkt vom Melanin der RPE-Zellen absorbiert (Abbildung 14) und die Dauer der Laserpulse so kurz gewählt, dass keine Wärmediffusion auftreten kann (Formel 3; $\tau_{R(RPE)}=10 \mu\text{s}$). Es kommen hierbei unterschwellige (*subthreshold*) Laserdosen zum Einsatz, die zu einer lokalen Erwärmung der Melanosomen des RPEs führen. Die während der Bestrahlung entstehenden Schädigungen sind fundoskopisch nicht erkennbar (Abbildung 15 A, B). Dennoch können durch die Erhitzung der Melanosomen in den RPE-Zellen lokal hohe Temperaturen erreicht werden, durch die es während der Bestrahlung zur Entstehung von Mikroblasen kommt [93]. Die ungleichmäßige Pigmentierung des RPEs innerhalb eines Auges [94] stellt ein Problem in der klinischen Anwendung dar. Dieses Problem kann jedoch durch verschiedene Systeme zur Mikroblasenerkennung umgangen werden [253, 254]. Histologische Studien belegten, dass auftretende Schäden während der SRT größtenteils das RPE-Gewebe betreffen. Kurzfristige Veränderungen an den Fotorezeptor Außensegmenten treten zwar auf, allerdings waren diese nicht von Dauer und eine permanente Schädigung der Retina resultierte nicht aus der Behandlung [255].

Weitere Überlegungen führten zu der Annahme, dass nicht tödliche (subletale) Hyperthermie einen positiv stimulierenden Effekt auf das bestrahlte Gewebe haben könnte. Erste Grundlagenstudien am RPE konnten verschiedene Effekte subletaler Temperaturerhöhungen in diesem Gewebe nachweisen [28, 29], klinische Studien bestätigten diese Annahme [150, 256, 257].

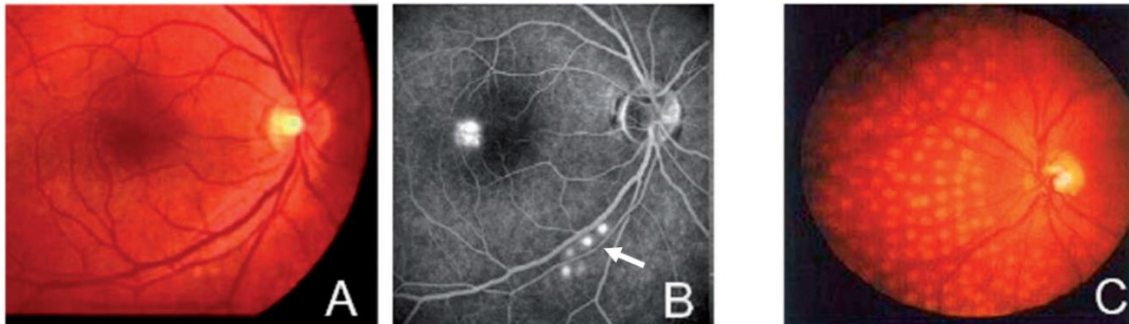


Abbildung 15: Fundus Aufnahmen nach SRT und Photokoagulation des Augenhintergrundes

Fundus Aufnahme (A) und Aufnahme des Fundus nach einem Fluoreszenzangiogramm (FFA; B) nach einer SRT-Behandlung bei einem Patienten mit zentraler seriöser Netzhautschädigung. In der FFA sind die durch SRT entstandenen Schädigungen deutlich erkennbar (B, weiße Flecken, Pfeil) in der Fundus Aufnahme nicht (A). Zum Vergleich eine Fundus Aufnahme nach Photokoagulation (C). Entnommen aus Brinkmann [93].

Im Rahmen unterschwelliger, nicht sichtbarer, beziehungsweise Niedertemperatur Bestrahlungen treten keine optisch wahrnehmbaren Veränderungen während der Behandlung am Augenhintergrund auf. Daher mussten Verfahren entwickelt werden, die eine Leistungskontrolle und -anpassung in Bezug auf die Beschaffenheit des bestrahlten Gewebes ermöglichen. Bei der optoakustischen Methode wird die durch thermische Expansion auftretende Stoßwelle genutzt, um eine Aussage über die im Gewebe entstandene Temperatur treffen zu können [22-26]. Auch optische Kohärenztomographie (OCT) kann für die Bestimmung der Temperatur im Gewebe genutzt werden. Im Rahmen dieser Methode wird phasen-sensitive OCT genutzt, um kleinste Bewegungen im Gewebe darstellen zu können. Über die gewonnenen Daten wird dann ein Rückschluss auf die im Gewebe erreichte Temperatur getroffen [258, 259].

2.7.Reaktionen von Zellen auf Temperatur-Stimuli

Zelluläre Reaktionen auf Temperaturerhöhungen können innerhalb weniger Millisekunden bis hin zu Stunden oder Tagen nach dem Stimulus auftreten [54, 260]. Eine der ersten Reaktionen stellt die Freisetzung von Ca^{2+} dar [261-263]. Im Rahmen subletaler Temperaturerhöhungen sind insbesondere transiente Rezeptorpotential Kanäle (TRP) interessant. Zu diesen gehört die Unterfamilie der Vanilloid-Rezeptoren (TRPV-Kanäle), die eine erhöhte Permeabilität für Ca^{2+} aufweisen. Ionenkanäle der Klasse TRPV-1 öffnen ab einer Temperatur von über 43 °C [261, 263-267]. Zudem konnte eine temperaturabhängige Erhöhung von enzymbasierten Transportvorgängen in Zellen nachgewiesen werden [268]. Langfristigere Reaktionen lassen sich auf das gehäufte Auftreten denaturierter, also nicht gefalteter, Proteine zurückführen. Die Akkumulation fehlerhafter Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) kann zu Fehlfunktionen der Mitochondrien führen und dadurch apoptotische Vorgänge begünstigen [269], die Zellen reagieren auf eine solche Anhäufung mit der ungefalteten Proteinantwort (UPR) [270]. Im Rahmen der UPR kommt es zu einer Hochregulation von Hitzeschock Proteinen (HSPs), die in ihrer Aufgabe als molekulare Chaperone, eine Neufaltung der fehlerhaften Proteine begünstigen [271, 272]. Können die aufgetretene Schäden nicht mehr repariert werden gehen die betroffenen Zellen, zum Schutz des umliegenden Gewebes, in den Prozess der Apoptose ein [34], an deren Ende der Tod der entsprechenden Zelle steht [30, 37, 240, 273]. Vermehrter Zelltod führt im Weiteren zum Prozess der Wundheilung [65], also einer Erneuerung des geschädigten Gewebes. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass unterschwellige Laserbestrahlung die Proliferation unterschiedlicher Zelltypen anregen kann [71]. Zudem ist bekannt, dass eine thermische Stimulation die Expression weiterer Proteine stimuliert [274], sowie einen Einfluss auf den Umgang der Zellen mit oxidativem Stress hat [29, 65, 162].

Der Einfluss von Hyperthermie auf das RPE konnte bislang noch nicht tiefgreifend beantwortet werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Bestrahlungsaufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Bestrahlung der Zellkulturen ein Dauerstrich Thuliumlaser (Model TLR-20, StarMedTec) mit einer Wellenlänge von 1940 nm verwendet. Die Leistung des Lasers war variabel einstellbar (0,5 W bis 20 W) und die Strahlung trat durch eine Laserfaser (All Silica, Low OH, Laser Components, Olching) mit einer numerischen Apertur von 0,22 und einem Durchmesser von 365 μm ohne weitere optische Elemente aus. Der Laserkopf wurde in einer Höhe von 12 cm oberhalb der Zellkulturschale montiert, wodurch sich ein Strahldurchmesser von etwa 3 cm ergab, der in etwa dem Durchmesser der verwendeten Zellkulturschalen entsprach. Das Profil des Laserstrahls war annähernd gaußförmig, wodurch in der Mitte der Schale die höchste Temperatur T_{max} erreicht wurde und die Temperatur nach außen abfiel. Dieser Aufbau wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Miura entwickelt und bereits veröffentlicht [29, 30]. Der Laser wurde gewählt um eine pigmentierungs-unabhängige Temperaturerhöhung durch thermische Diffusion herbeizuführen (Abbildung 10).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Kulturen über thermische Diffusion erwärmt, wofür es entscheidend war, dass die komplette Laserstrahlung im Zellkulturmedium absorbiert wurde. Der Absorptionskoeffizient wässriger Lösungen beträgt bei 1940 nm und 40 °C circa $127,5 \text{ cm}^{-1}$ [275, 276]. Zunächst wurde die maximale optische Eindringtiefe d für elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge von 1940 nm über das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmt. Die optische Eindringtiefe ist als die Tiefe definiert, bei der die Intensität der elektromagnetischen Strahlung auf das 1/e-fache der Ausgangsintensität abgefallen ist.

Formel 5: Berechnung der optischen Eindringtiefe

I_0 : Ausgangsintensität, α : Absorptionskoeffizient von Wasser bei 40 °C, d : Eindringtiefe, $I(d)$: Intensität in Abhängigkeit der Eindringtiefe

$$I(d) = I_0 \cdot e^{-\alpha \cdot d} \leftrightarrow d = \frac{1}{\alpha} = \frac{1}{127,5 \text{ cm}^{-1}} = 80 \mu\text{m}$$

Ausgehend von dieser Berechnung konnte darauf geschlossen werden, dass ab einer Eindringtiefe von circa 80 μm der Großteil der eingestrahlten Energie absorbiert wurde und es somit zu einer rein thermischen Bestrahlung kam. Um sicher gehen zu können, dass die benötigte Füllhöhe des Mediums während der gesamten Bestrahlung (Vaporisationseffekte) bestehen bleibt wurden 1,2 ml DMEM-Vollmedium auf die Kulturen gegeben. Auf diese Weise wurde ausgehend von einem Durchmesser der Kulturschalen von 35 mm eine theoretische Flüssigkeitssäule von 1370 μm in zentraler Position erreicht.

Formel 6: Formel zur Volumenberechnung von Flüssigkeiten

V: Volumen, r: Radius der Zellkulturschale, h: Füllhöhe des Mediums

$$V = r^2 \cdot \pi \cdot h = \left(\frac{3,5}{2} \text{ cm}\right)^2 \cdot \pi \cdot 0,137 \text{ cm} \approx 1,2 \text{ ml}$$

Die Ansteuerung des Lasers erfolgte über das in der Software LabVIEW® geschriebene Programm „120601-Temperaturmesser.vi“. Das Programm dokumentiert und plottet zudem den gemessenen Temperaturverlauf über die Zeit und regelt die Bestrahlungsdauer, sowie die Dauer der Aufwärm- und Abkühlzeit. Die zu bestrahlende Zellkulturschale befindet sich während des gesamten Versuchsablaufs auf einer Heizplatte (OTS 40, MEDITE GmbH), die auf 39 °C temperiert wurde. Die am Gerät eingestellte Temperatur ergab sich aus den während der Kalibrierung gemessenen Temperaturen vor der Bestrahlung und wurde so als Grundlage der Erhaltung einer Basistemperatur von 37 °C genutzt.

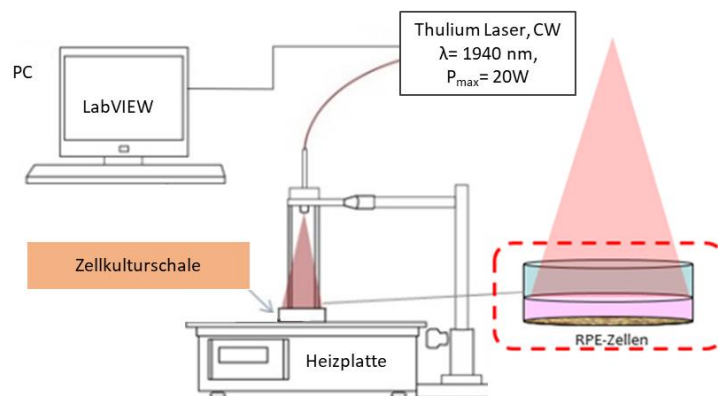


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Bestrahlung von Zellkulturen

Schematische Darstellung des Bestrahlungsaufbaus. Die Strahlung des Thuliumlasers tritt ohne weitere optische Elemente aus der Laserfaser aus und trifft auf die auf der Heizplatte stehende Zellkulturschale. Die Steuerung der Bestrahlung erfolgt über ein LabVIEW® Programm.

Die Position der Zellkulturschale wurde vor Beginn der Bestrahlung auf der Heizplatte eingezeichnet. Hierfür wurde der Laserkopf auf die berechnete Höhe (12 cm) oberhalb des Heizelements eingestellt und der Vorstrahl des Lasers eingeschaltet. Eine leere Zellkulturschale mit 35 mm Durchmesser wurde genutzt, um zu kontrollieren, ob der Strahldurchmesser den gesamten Boden der Schale ausfüllte. Wenn eine komplette Bestrahlung der Zellkulturschale gewährleistet war, wurde mit einem permanenten Markierschicht entlang der Schale deren Position markiert.

3.1.1. Optische Messung der Füllhöhe des Mediums

Die Füllhöhe des Zellkulturmediums an zentraler Position der Kulturschale wurde mit Hilfe von optischer Kohärenz Tomographie (OCT) bestimmt. Hierfür wurde das OCT-Gerät Callisto verwendet (Thorlabs; High-Sensity 930 nm Spectral Domain OCT Imaging System). Die Mitte der Zellkulturschale wurde ausgemessen und mit Hilfe eines Skalpellens angeritzt. 1,2 ml DMEM-Vollmedium wurden auf die Schale gegeben und die Oberfläche der Flüssigkeit am OCT scharf gestellt. Die Mitte der Zellkulturschale wurde in den Aufnahmebereich des OCT gebracht und erneut die einzelnen Schichten scharf gestellt. Die Füllhöhe des Mediums konnte anschließend ausgemessen werden.

3.1.2. Messung der Bestrahlungstemperatur

Um die Kalibrierungsdaten der Temperatur am Boden der Zellkulturschale während der Laserbestrahlung messen zu können, wurde ein Thermoelement (Cat. No.: HYP-0-33-1-T-G-60-SMPW-M, Omega® Engineering Inc.) mit einer 200 µm dicken Spitze verwendet.

Bei der Verwendung der Thermoelemente muss beachtet werden, dass sie sehr empfindlich für infrarote Strahlung sind und somit keiner direkten oder transmittierten Strahlung ausgesetzt werden dürfen. Da die Basaltemperatur des Mediums gemessen werden und eine direkte Bestrahlung des verwendeten Thermoelements verhindert werden sollte, wurde auf Ebene des Bodens der Zellkulturschale ein Loch in die Wand der Zellkulturschale gebohrt und das Thermoelement so waagrecht von außen bis zur Mitte der Schale eingeschoben.

Die Temperaturmessung erfolgte wie bereits beschrieben [30]. Es wurden Zellkulturschalen präpariert, bei denen ein Achsenkreuz auf die Unterseite des Zellkulturschalenbodens eingezeichnet wurde. Das Zentrum stellte den Nullpunkt dar, des Weiteren wurden 21 Punkte im Abstand von 3mm (-15 mm bis +15 mm) in x- und y-Richtung eingezeichnet. An den Endpunkten wurden die Bohrungen für das Thermoelement gesetzt und durch Elektro-Isolierband abgedichtet. So konnten alle eingezeichneten Punkte mit dem Thermoelement erreicht werden.

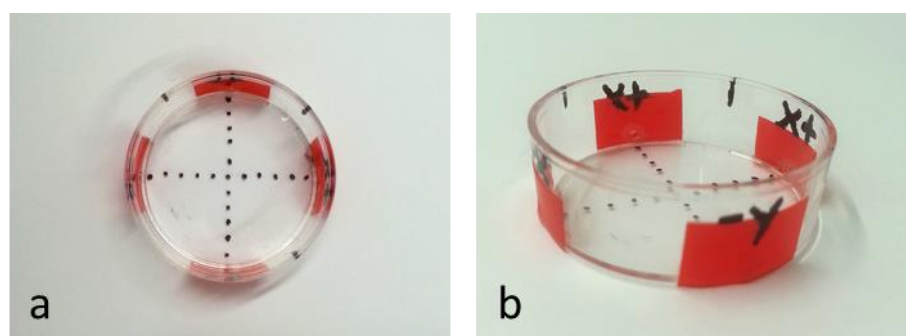


Abbildung 17: Darstellung einer für die Temperaturmessung verwendeten Zellkulturschale

Ein Achsenkreuz mit 21 Punkten im Abstand von 33 mm wurde auf die Unterseite der Zellkulturschale aufgetragen. (a) An den Endpunkten wurden die Bohrungen für das Thermoelement gesetzt. (b) Die Bohrungen wurden mit Isolierband abgedichtet um ein Auslaufen des Mediums während der Messung zu verhindern.

Für die Messung wurden 1,2 ml, auf 37 °C vortemperiertes, DMEM-Vollmedium (Anhang 1.8, Tabelle 13) in die Schale gegeben und die Schale auf der Heizplatte platziert. Mit Hilfe des Thermoelements wurde die Temperatur der Flüssigkeit gemessen, sobald eine Temperatur von 37 °C erreicht war wurde die Schale auf die vorher eingezeichnete Markierung geschoben und das Thermoelement an der gewünschten Position auf dem Achsenkreuz platziert. Es musste hierbei darauf geachtet werden, dass die Spitze des Thermoelements den Boden der Zellkulturschale berührt, da so gewährleistet werden konnte, dass die gemessene Temperatur der am Boden der Zellkulturschale entsprach. Zudem konnte so vermieden werden, dass die Orientierung des Thermoelements in der z-Ebene die gemessene Temperatur an der spezifischen Position verfälscht.

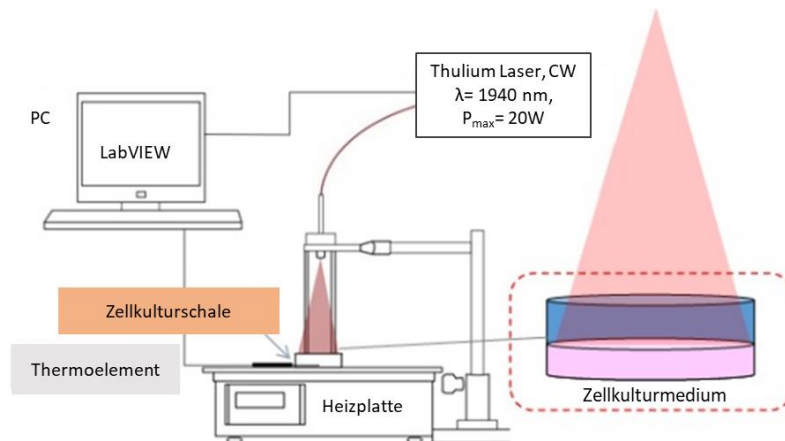


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Temperaturmessung

Das Zellkulturmedium in der Zellkulturschale wurde für 10 s bestrahlt und die Temperaturentwicklung über die Zeit von einem LabVIEW®-Programm aufgezeichnet.

Die Bestrahlung zur Temperaturmessung wurde mit Hilfe des LabVIEW®-Programms gesteuert (Wartezeit 1=120 s, Wartezeit 2=8 s, Heizphase=10 s, Abkühlzeit=2 s). Während der Bestrahlung wurde die Temperatur alle 100 ms gemessen und der Temperaturverlauf über die Zeit aufgezeichnet.

Alle Punkte des Achsenkreuzes wurden bei unterschiedlichen Leistungen vermessen (1 W, 5 W, 10 W, 15 W). Zwischen den einzelnen Messungen wurde jedes Mal das verwendete Medium durch 1,2 ml frisches Medium ersetzt.

Die gemessenen Temperaturverläufe wurden anschließend genutzt, um die am Laser einzustellende Leistung für die gewünschten Bestrahlungstemperaturen (40 °C, 44 °C, 47 °C, 51 °C, 59 °C) zu berechnen.

3.2. Zellkultur

Um mikrobielle Kontaminationen der Zellkulturen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, die durch Desinfektion und Umluft-Filtration in einen keimfreien Zustand gebracht wurde. Die benutzten Arbeitsgeräte wurden zudem vor Arbeitsbeginn mit 70 % (v/v) EtOH desinfiziert und alle verwendeten Lösungen steril filtriert oder autoklaviert. Die verwendeten Medien, Zusätze und Reagenzien wurden vor Gebrauch im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt.

Für alle Experimente wurden, falls nicht anders angegeben, primäre Zellkulturen der P2-Generation verwendet.

3.2.1. Präparation primärer RPE-Zellen aus enukleierten Schweineaugen

Für die Präparation primärer RPE-Zellen wurden enukleierte Schweineaugen genutzt, die am Tag der Präparation von lokalen Schlachtereien bezogen wurden.

Zunächst wurden die Augen von überschüssigem Binde- und Muskelgewebe befreit und anschließend unter die sterile Werkbank gebracht, unter der eine Desinfektion in 5% Betaisodona-Lösung für mindestens 10 s erfolgte. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Augen in sterilem PBS⁻ gelagert. Die Eröffnung der Augen erfolgte mittels eines Schnitts drei bis fünf mm im Abstand zum Hornhautlimbus, von dem aus kreisförmig um den Limbus geschnitten wurde. Nach der Entfernung des Glaskörpers wurden die Augen bis zu einer Füllhöhe von etwa 80 % mit PBS⁻ gefüllt und anschließend die Retina vorsichtig mittels einer Feinpinzette und Feinschere entfernt. Das PBS⁻ wurde rückstandslos aus dem Augapfel entfernt und durch 1 ml Trypsin (T; 0,25%; Tabelle 13) ersetzt, anschließend erfolgte eine fünfminütige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Das Trypsin wurde mit einer Pipette abgenommen und durch Trypsin (0,25%)/EDTA (0,2%) (T/E; Tabelle 13) ersetzt, es folgte eine weitere einstündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Das Ablösen der RPE-Zellen vom Augenhintergrund erfolgte durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren, die Zellen wurden in DMEM-Vollmedium gesammelt. Die Zellsuspension wurde bei 824 g für fünf Minuten zentrifugiert, der Zellkulturüberstand verworfen und die sedimentierten Zellen resuspendiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 824 g für fünf Minuten. Abschließend wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen DMEM-Vollmedium resuspendiert und zu je 3 ml pro 60 mm Kulturschale ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zu einer Konfluenz von 90-95 % im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.2.2. Säubern primärer RPE-Kulturen

Nach 24 h in Kultur wurde der komplette Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen einmal mit PBS⁻ gewaschen und abschließend mit 3 ml frischem DMEM-Vollmedium versorgt. Dieser Schritt diente dazu Verschmutzungen und tote Zellen aus den Kulturen zu entfernen und so ein besseres Wachstum der Zellen, so wie eine Vermeidung möglicher Kontaminationen, zu gewährleisten.

3.2.3. Subkultivierung primärer RPE-Kulturen

Nach sieben Tagen in Kultur erfolgte die erste Subkultivierung zur P1-Generation, hierfür wurden die Zellkulturen einmal mit sterilem PBS⁻ gewaschen und anschließend je 1 ml T/E auf die Schalen gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gelöst und in DMEM-Vollmedium gesammelt. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 824 g für fünf Minuten. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Zellen in einem geeigneten Volumen DMEM-Vollmedium resuspendiert und zu je 3 ml pro 60 mm Zellkulturschale ausgesät. Die Subkultivierung zur P2 Generation erfolgte in gleicher Weise, allerdings wurden die Zellen im letzten Schritt zu je 2 ml auf 35 mm Zellkulturschalen ausgesät. Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Subkultivierung der RPE-Kulturen wurde ohne vorherige Bestimmung der Zellzahl durchgeführt. In Kulturen der P2 Generation konnte, aufgrund der Wuchsfläche der Zellkulturschalen, bei 90-95% Konfluenz von einer Gesamtzellzahl von $1,1 \cdot 10^6$ ausgegangen werden.

3.2.4. Kultivierung primärer RPE-Zellen

Um eine gleichmäßige Versorgung mit Nährstoffen gewährleisten zu können wurden die Zellkulturen alle zwei Tage mit frischem DMEM-Vollmedium versorgt. Da RPE-Zellkulturen konditionierte Medien benötigen wurde nur ein Teil des Zellkulturmediums ersetzt. Bei den Kulturen der P0 und P1 Generation wurden 2 ml des Zellkulturüberstands ersetzt, bei Zellkulturen der P2 Generation 1 ml.

3.2.5. Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der resuspendierten sedimentierten Zellen in eine Neubauer Zählkammer gegeben und unter dem Stereomikroskop ausgezählt. Es wurden vier definierte Bereiche ausgezählt und aus diesen der Mittelwert gebildet. Die Berechnung der Gesamtzellzahl erfolgte nach Formel 7.

Formel 7: Formel zur Berechnung der Gesamtzellzahl einer Zellkultur

$$\text{Mittelwert} \cdot 10^4 \cdot \text{Resuspensionsvolumen} = \text{Gesamtzellzahl}_{/ml}$$

Dieses Verfahren wurde bei der Auswertung der VEGF-Sekretion genutzt um die Gesamtzellzahl der adhärenen Zellen einer Kultur zu bestimmen ohne eine Aussage über die Vitalität der Kultur zu treffen.

3.2.6. Bestrahlung primärer RPE-Kulturen mit einem Thuliumlaser

Die Bestrahlung der Kulturen erfolgte wie bereits beschrieben [30]. Eine Stunde vor der geplanten Bestrahlung wurde der komplette Zellkulturüberstand der verwendeten Kulturen der P2-Generation abgenommen und durch 1,2 ml frisches DMEM-Vollmedium ersetzt und die Kulturen bis zu Bestrahlung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Bestrahlungsstation (3.1) wurde unter die sterile Werkbank gebracht, der Heizblock auf 39 °C vortemperiert und die Position der Kulturschale eingezeichnet. Das LabVIEW®-Programm wurde am PC gestartet und die Kulturschalen einzeln, wie vom Programm vorgesehen, bestrahlt.

Die Durchführung der Bestrahlung erfolgte nach folgendem Schema: Die zu bestrahlende Kulturschale wurde aus dem Brutschrank geholt und mit geschlossenem Deckel auf die Heizplatte gestellt. Die Bestrahlung wurde zeitgleich im LabVIEW®-Programm gestartet. Die Aufwärmphase dauerte 120 s, ihr Ablauf wurde durch einen Signalton angezeigt. Der Deckel der Zellkulturschale wurde abgenommen und diese in den Lichtstrahl gebracht. Die Bestrahlung erfolgte für 10 s. Die gewünschten Maximaltemperaturen wurden anhand der vorher ermittelten benötigten Leistungen (3.1.1) am Laser eingestellt (2.7 W für 40 °C, 4.9 W für 44 °C, 7.7 W für 47 °C, 10.4 W für 51 °C und 15.9 W für 59 °C). Der Deckel wurde nach Ablauf der Abkühlphase 2 s wieder auf die Zellkulturschale gesetzt und diese bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die bestrahlten Zellkulturen wurden für unterschiedliche Experimente genutzt.

3.3. Zellvitalität

Zellvitalität spielt eine wichtige Rolle bei der Beurteilung von Schäden, die durch chemische oder physikalische Stressoren ausgelöst werden könnten. Es muss hierbei zwischen dem Nachweis der metabolischen Aktivität und dem Nachweis des Anteils toter, sterbender und lebender Zellen innerhalb einer Kultur unterschieden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Anteil lebender, sterbender und toter Zellen berücksichtigt.

3.3.1. Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen in Kulturen

Der Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer Kultur kann dafür genutzt werden die Überlebensrate von Zellen nach einer Behandlung (Laserbestrahlung, Substanzen oder Ähnliches) abzuschätzen. In dem verwendeten Kitsystem *Apoptotic Necrotic/Healthy Cells Detection Kit* von PromoKine, werden hierfür die Farbstoffe FITC-Annexin-V (Annexin-V, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=492/514$ nm), Ethidium Homodimer III (EthD-III, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=528/617$ nm) und Hoechst 33342 (Hoechst, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=350/461$ nm) verwendet.

Hoechst ist ein zellpermeabler DNS-Farbstoff, der den Zellkern aller lebenden und toten Zellen markiert. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin (PS), das im Rahmen apoptotischer Vorgänge an der Außenseite apoptotischer Zellen präsentiert wird. Zu späteren Zeitpunkten der Apoptose verlieren Zellen ihre Membranintegrität und Annexin-V kann an intrazelluläres PS binden. EthD-III ist

ein DNS-Farbstoff, der ausschließlich in nekrotischen oder toten Zellen zu einer stabilen roten Färbung der DNS führt. Daraus ergibt sich, dass lebende Zellen nur blau gefärbt, apoptotische Zellen grün/blau und nekrotische Zellen rot/blau gefärbt werden. Bei Zellen, die alle drei Färbungen rot/grün/blau zeigen handelt es sich um tote Zellen die großteilig aus der apoptotischen Zellpopulation hervorgegangen sind (Abbildung 19).

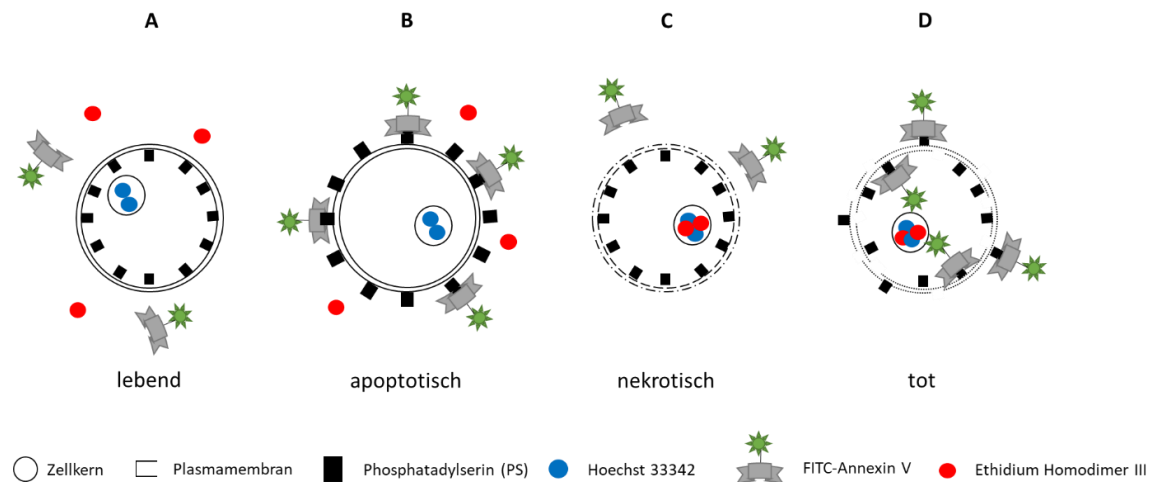


Abbildung 19: Schematische Darstellung der „Apoptotic/Necrotic/Healthy“-Zellfärbung

Lebende Zellen fluoreszieren nur blau (A), apoptotische Zellen grün und blau (B), nekrotische Zellen rot (C) und tote Zellen rot, grün und blau (D).

Nachweis von Apoptose und Nekrose bei adhärennten Zellen

Für den Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen innerhalb adhärennten Kulturen wurden primäre RPE-Kulturen der P2-Generation verwendet. Diese Kulturen wurden mit unterschiedlichen Leistungen bestrahlt (3.2.6) und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten (3 h, 24 h, 48 h) entsprechend den Angaben des Herstellers gefärbt. Zunächst wurden die Kulturen einmal vorsichtig mit 1 x *Binding Buffer* gewaschen und dann mit je 200 µl Färbelösung (5 µl Annexin V, 5 µl EthD III, 5 µl Hoechst/100 µl 1x *Binding Buffer*) für 15 min abgedunkelt bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nachdem die Kulturen zweimal mit 1x *Binding Buffer* gewaschen wurden, wurden die Schalen mit 1x *Binding Buffer* überschichtet und die Färbung am Mikroskop (Eclipse Ti, Nikon) dokumentiert.

Es wurden drei unterschiedliche Filter ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ =340-380 nm/435-485 nm für Hoechst, 465-495 nm/515-555 nm für Annexin V, 528-553 nm/577-632 nm für EthD III) genutzt. Die dabei generierte Großaufnahme bestand aus 23x23 Einzelbildern, die mit einer 10x Vergrößerung aufgenommen und einer 5 % igen Überlappung mit Hilfe der *stitching*-Funktion einer spezifischen Mikroskop-Software (NIS-Elements) zusammengesetzt wurden.

Der Durchmesser des Bereichs mit apoptotischen oder toten Zellen wurde bei jeder Aufnahme mehrfach bestimmt und über die einzelnen Bestrahlungsbedingungen gemittelt. Die Daten wurden anschließend auf die Temperaturverteilung über die Kulturschale angewendet (Formel 9, 3.1.1) und so die Schwellenwerttemperaturen für Apoptose und kompletten Zelltod bestimmt.

Nachweis von Apoptose und Nekrose bei Zellen in Suspension

Für die Untersuchung im Durchflusszytometer mussten die einzelnen Zellkulturen zunächst in Suspension gebracht werden. Zu definierten Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit dem Thuliumlaser (Spezifikationen in Kapitel: 3.2.6) wurden die Kulturen einmal mit PBS⁻ gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit je 500 µl T/E im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gelöst und in ihrem ursprünglichen Zellkulturüberstand gesammelt, es folgte eine Zentrifugation bei 4.700 g für 5 Minuten in einer Mikrozentrifuge, anschließend wurde der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen in je 1 ml eiskaltem PBS⁻ resuspendiert.

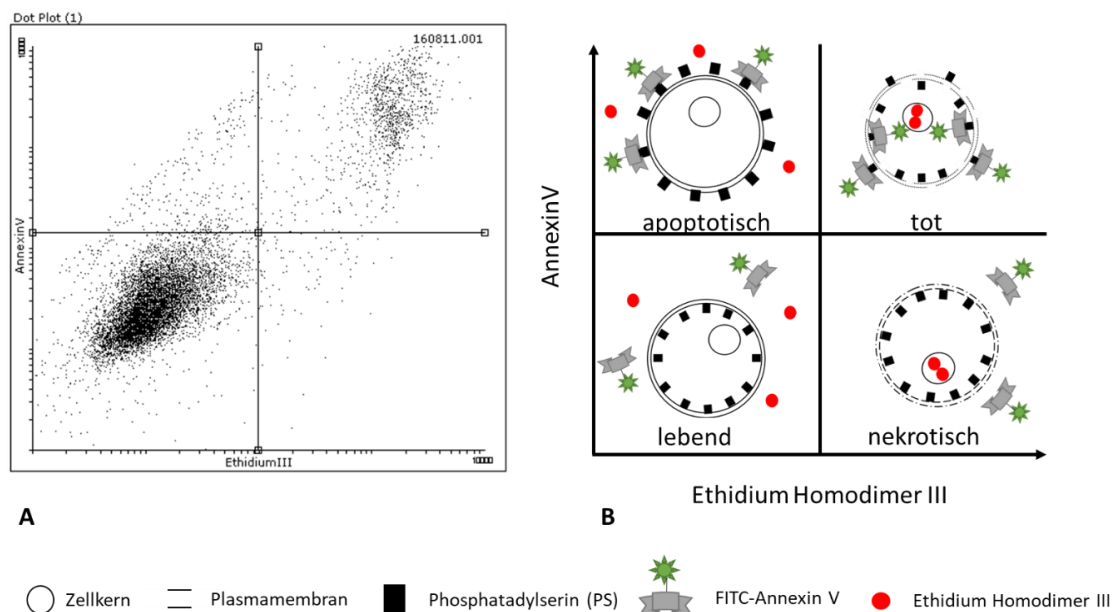


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Auswertung der Durchflusszytometrie

Die Darstellung der gemessenen Daten erfolgte in der Flowing Software 2 als Dot Plot (A). Ungefärbte Zellen wurden als lebend, FITC-Annexin V positive Zellen als apoptotisch, FITC-Annexin V und Ethidium Homodimer III positive Zellen als tot und Ethidium Homodimer III positive Zellen als nekrotisch angesehen (B).

Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4.700 g, der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 200 µl 1x *Binding Buffer* resuspendiert und je 100 µl der Suspension in ein FACS-Röhrchen gegeben. Die Ansätze wurden mit je 5 µl Annexin V und EthD III versetzt und für 15 min abgedunkelt bei RT inkubiert. Anschließend wurden je 400 µl 1x *Binding Buffer* zugegeben und die Suspensionen am Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson) vermessen. Pro Probe wurden 10.000 Zellen ausgezählt und diese den Populationen lebend (ungefärbt), apoptotisch (grün), nekrotisch (rot) und tot (rot/grün) zugeteilt.

Die Darstellung und Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software Flowing Software 2 (2.5.1, Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology University of Turku, Finnland) (Abbildung 20).

3.4. Immunzytochemie

Für die immunzytochemischen Färbungen wurden die zu färbenden Zellen einmal vorsichtig mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen und anschließend mit 4,5 % Formaldehyd-Lösung für 15 Minuten bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten mit PBS⁻ wurden die Zellen mit 0,05 % Triton-X100 in PBS⁻ für 5 Minuten bei RT permeabilisiert und danach erneut für fünf Minuten mit PBS⁻ gewaschen. Es folgte eine Inkubation in 1 % BSA-Lösung, in deren Anschluss die Zellen über Nacht mit einem primären Antikörper (Bezeichnungen und Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind Tabelle 17 zu entnehmen) in 1 % BSA-Lösung bei 4 °C inkubiert wurden.

Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS⁻ für fünf Minuten gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten im Dunklen bei RT.

Die Inkubation mit dem korrespondierenden sekundären Antikörper in PBS (Bezeichnungen und Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind der Tabelle 18 zu entnehmen) erfolgte für 1 h bei RT, ihr folgte dreimaliges Waschen mit PBS⁻ für 5 Minuten. Nach Bedarf wurden die Zellen anschließend mit FITC-Phalloidin (1 µg/ml) und/ oder DAPI (1 µg/ml) in PBS⁻ für 40 Minuten inkubiert und erneut dreimal für je 5 Minuten mit PBS⁻ gewaschen.

Die vorher bestrahlten Kulturen wurden abschließend mit 1 ml PBS⁻ überschichtet und die Deckel der 35 mm Zellkulturschalen mit Parafilm versiegelt. Die Zellen, die in den Deckglas-Kultivierungssystemen gefärbt wurden, wurden abschließend aus dem Kammersystem gelöst und mit Dako-ImmoMount aus einem Objektträger eingedeckelt.

Die Aufnahme der Immunfluoreszenz erfolgte am Nikon Eclipse Ti Mikroskop unter Verwendung unterschiedlicher Filter und Belichtungszeiten.

3.5. Nachweis intrazellulärer Proteine (HSP70, VEGF)

3.5.1. Proteinisolierung bei adhärennten Zellen

Für die Isolation intrazellulärer Proteine wurde, das RIPA-Proteinisolations-System verwendet. Die Isolation der Proteine erfolgte zu definierten Zeitpunkten nach der Bestrahlung mit dem Thuliumlaser (Spezifikationen in Kapitel: 3.2.6). Zunächst wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die RPE-Kulturen einmal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen, nach dem Verwerfen des Waschpuffers wurden pro Schale 200 µl des RIPA-Lysis Puffer (Tabelle 16) auf die Zellen gegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden der verwendeten Zellkulturschale gelöst, die gewonnenen Suspensionen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und kurz auf dem Rührschüttler homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4700 g für fünf Minuten in einer auf 4 °C vorgekühlten Mikrozentrifuge, anschließend wurden die Überstände abgenommen und in vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und der sedimentierte Zellschrott verworfen. Die Lagerung der Zellysate erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C.

3.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Um für die weiteren proteinbiochemischen Arbeiten definierte Mengen an Gesamtzellprotein einsetzen zu können, wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte, unter Abwandlung, wie von Bradford beschrieben [277]. Für die Messung wurden die zu bestimmenden Proben aufgetaut und 1: 10 mit dH₂O verdünnt, des Weiteren wurde eine Verdünnungsreihe aus BSA in dH₂O (1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0 mg/ml) angesetzt. Je 10 µl der Verdünnungsreihe und die zu vermessenden Proben wurden dreifach auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen pipettiert und anschließend mit je 200 µl Bio-Rad Protein Assay Reagenz, 1: 5 in dH₂O, versetzt. Als Nullwert wurde zusätzlich die Bio-Rad Protein Assay Reagenz, ohne Substrat, dreifach auf die Platte gegeben. Es wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und die Absorption bei 450 nm im Spektrophotometer Spektramax M4 ausgelesen.

Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde zunächst die Mittelwerte der dreifach bestimmten Einzelbedingungen (Standardreihe, Nullwert, Probelösungen) gebildet und der Mittelwert des Blank von den anderen Mittelwerten subtrahiert. Aus der Standardreihe wurde anschließend ein Punkt-Diagramm gebildet (y =Absorption; x =Konzentration), durch das eine Ausgleichsgerade gelegt wurde. Die Formel der Ausgleichsgeraden konnte anschließend genutzt werden um die Konzentration der Proben in Abhängigkeit zu ihrer Absorption zu berechnen.

3.5.3. SDS-PAGE

Die Auftrennung der Protein-Proben erfolgte mittels einer *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), anhand derer die Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld separiert werden können.

Um eine Auftrennung der Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung zu ermöglichen, mussten die Proteine zunächst denaturiert und ihre Eigenladung durch SDS maskiert werden. Für die Elektrophorese wurden je 10 µg Protein eingesetzt, das benötigte Probenvolumen mit 5 µl 5x Probenpuffer gemischt und die Lösung mit H₂O bidest auf 25 µl aufgefüllt. Das Gemenge wurde kurz mit einem Rührschüttler gemischt, dann mittels einer Tischzentrifuge abgesetzt und für fünf Minuten bei 97 °C im Heizblock erwärmt. Die Proben wurden rückstandslos in die Taschen der verwendeten 4-15 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels (10 Taschen, 30 µl) pipettiert, pro Gel wurden zusätzlich 5 µl *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* in eine der Taschen gegeben. Das Gel lief anschließend im mit 1x TGS Puffer gefüllten Mini-PROTEAN® Terta System bei 200 V für 30 Minuten.

Vor der weiteren Verwendung der Gele wurden diese im ChemiDoc™ XRS+ System unter UV-Licht aktiviert und dokumentiert.

3.5.4. Western Blot

Für die Übertragung der Proteine aus der SDS-PAGE wurde das *semidry* Verfahren genutzt. Die hier verwendeten TransBlot® Turbo™ *Mini-size* PVDF-Membranen wurden kurz in 100 % (v/v) EtOH aktiviert und bis zur weiteren Verwendung zusammen mit den TransBlot® Turbo™ *Mini-size Transfer Stacks* in 1x TransBlot® Turbo™ Transfer Puffer gelagert. Der Aufbau des Blots erfolgte in folgender Form, auf die Anodenplatte des TransBlot® Turbo™ Blotting Systems wurde ein TransBlot® Turbo™ *Mini-size Transfer Stack*, eine TransBlot® Turbo™ *Mini-size* PVDF-Membran, das 4-15 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gel und ein weiterer TransBlot® Turbo™ *Mini-size Transfer Stack* gelegt. Der Deckel des TransBlot® Turbo™ Blotting Systems diente hierbei als Kathode mit der die Blot-Kammer, luftblasenfrei, verschlossen wurde. Die Laufzeit des TransBlot® Turbo™ Blotting Systems hing von der Anzahl der zeitgleich verarbeiteten Blots ab (25 V, 2,5 A; 1 Blot/Kammer: 2 Minuten; 2 Blots/Kammer: 7 Minuten).

Anschließend wurden die Membranen im ChemiDoc™ XRS+ System unter UV-Licht aktiviert und dokumentiert.

3.5.5. Immunologische Proteindetektion

Die aus 3.5.4 resultierenden PVDF-Membranen wurden anschließend für die immunologische Proteindetektion verwendet. Nach einem 10-minütigen Waschschrift in TBST wurden die Membranen für 1 h in 5 % Milchlösung in TBST blockiert. Es folgte eine Inkubation mit dem gewünschten Primärantikörper (Verdünnungen zu entnehmen aus Tabelle 17) über Nacht bei 4 °C. Vor der einstündigen Inkubation mit dem korrespondierenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung zu entnehmen aus Tabelle 18) wurden die Membranen dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Abschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit TBST für 10 Minuten. Die Membranen wurden mit Immobilon™ *Western Chemiluminescent HRP Substrate* entwickelt und anschließend im ChemiDoc™ XRS+ System dokumentiert.

Die Auswertung der Blots erfolgte mit Hilfe der Software Image Lab™ 6.0. Durch diese Software konnte der Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben auf die Intensität der korrespondierenden Antikörper-Bande bezogen werden. Die Intensitäts-normierten Banden wurden anschließend auf die korrespondierende Kontrollsituation normiert und die Werte für weitere Berechnungen genutzt.

3.6. Nachweis sekretierter Proteine (VEGF)

3.6.1. ELISA

Um einen möglichen Einfluss der verschiedensten Laserbestrahlungen auf die Sekretion von VEGF zu überprüfen, wurde ein *Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Bei einem ELISA handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren für Proteine, die über eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung detektiert und vermessen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Kitsystem *Quantikine ELISA Human VEGF* der Firma R&D Systems® verwendet.

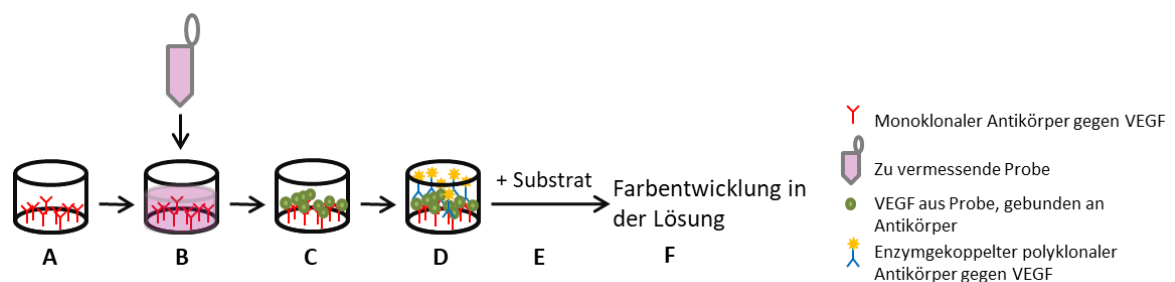


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Sandwich ELISA gegen VEGF

Die Vertiefungen der ELISA-Platte sind mit einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF beschichtet (A). Die zu vermessenden Proben werden in die Vertiefungen gegeben (B) und das, in den Proben befindliche, VEGF bindet an den monoklonalen Antikörper (C). Ein enzymgekoppelter, polyklonaler Antikörper gegen VEGF wird in die Vertiefungen gegeben und bindet an das VEGF (D). Nach der Zugabe des Substrates (E) kommt es zu einer enzymatischen Reaktion die zu einer Farbentwicklung (blau) in der Lösung führt. Nach Zugabe der Stopp-Lösung (Farbumschlag von blau nach gelb) kann die Absorption photometrisch bei 450 nm quantifiziert werden.

Die Testungen wurden mit den Zellkulturüberständen unterschiedlich behandelte und bestrahlte Zellen durchgeführt. Die Behandlung und Bestrahlung erfolgten, wie unter 3.2.6 beschrieben. Die Zellkulturüberstände der Ansätze wurden zu den spezifizierten Zeitpunkten der einzelnen Versuchsansätze gesammelt (Spezifikationen zu entnehmen unter 3.2.6) und bis zur Untersuchung bei -70 °C weggefroren. Die Handhabung des Kitsystems erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Standardreihe sowie die zu vermessenden Proben und das verwendete Zellkulturmedium (ohne vorherigen Kontakt mit Zellkulturen) wurden doppelt in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wurde die Platte dreimal, unter Verwendung der Waschstation für Mikrotiterplatten, mit 400 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend das VEGF-Konjugat auf die Proben gegeben und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte, bevor das Substrat auf die Zellen gegeben wurde. Die Umsetzung des Substrates führte zu einer blauen Farbentwicklung der Proben. Durch die Zugabe der Stopp-Lösung wurde die Reaktion abgestoppt und es kam zu einem Farbumschlag ins Gelbe. Die Absorption der Proben konnte anschließend im Spektrophotometer SpektraMax bei 450 nm vermessen werden (Abbildung 21).

3.7. Nachweis zellulärer Proliferation nach Laserbestrahlung

Die Proliferation einzelner Zellen einer Kultur kann über die Messung der DNS-Synthese nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Click-iT[®] EdU Alexa Fluor[®] 647 Imaging Kit (Invitrogen) verwendet. Bei EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) handelt es sich um ein Thymin-analogon, das in neu-synthetisierte DNS anstelle von Thymin eingebaut wird. Auf diese Weise wurden Zellen, in denen eine Replikation der DNS stattgefunden hat markiert. In dem hier verwendeten Kit-System wird der Farbstoff Alexa Fluor[®] 647 über eine „Klickreaktion“, die durch Kupfer katalysiert wird, kovalent an das in die DNS eingebaute EdU gebunden [278]. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 22 aufgeführt.

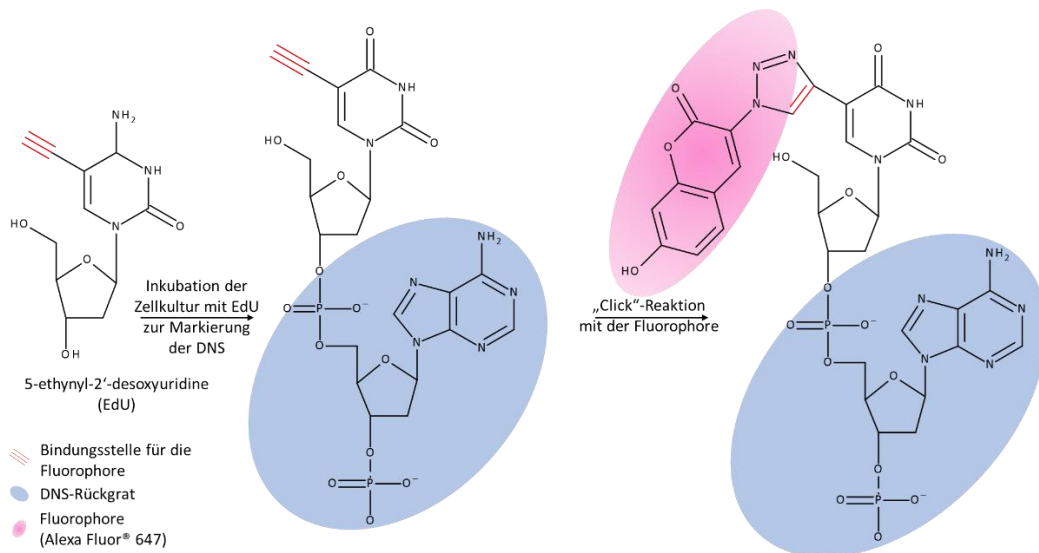


Abbildung 22: Markierung der DNS mit EdU und anschließender Anbindung der Fluorophore

EdU wird anstelle der Base Thymin an das Rückgrat neusynthetisierte DNS (blau) eingebaut. Durch eine Kupfer-vermittelte „Click“-Reaktion wird die Fluorophore (Alexa Fluor® 647, Magenta) an die Bindungsstelle (rot) angebonden. Modifiziert nach [278].

Für den Nachweis der Proliferation wurden stets primäre RPE Kulturen der P2-Generation verwendet. Die mit dem Bestrahlungsaufbau bestrahlt wurden (3.2.6). Es wurde eine doppelkonzentrierte EdU-Arbeitslösung in DMEM-Vollmedium angesetzt (eingesetzte Endkonzentration: 10 μM EdU, doppelkonzentrierte Arbeitslösung: 20 μM EdU in DMEM-Vollmedium) und bis zur Verwendung abgedunkelt im Wasserbad (37 °C) erwärmt. Der Zellkulturüberstand der zu versorgenden Kulturen wurde abgenommen und die Schalen einmal mit PBS⁻ gewaschen. Auf die Kulturschalen wurde zunächst 1 ml vorgewärmtes DMEM-Vollmedium gegeben und anschließend 1 ml der doppelkonzentrierten EdU-Arbeitslösung. Die Kulturen wurden anschließend für 4 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die EdU-Lösung wurde abgenommen und die Kulturen zur Fixation für 15 min bei RT mit 3,7 % Formaldehyd inkubiert und anschließend zweimal mit 3 % BSA-Lösung gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 0,5 % Triton X-100 in PBS⁻ für 20 min bei RT. Anschließend wurde zweimal mit 3 % BSA in PBS⁻ gewaschen. Danach wurde die Klickreaktion durchgeführt, hierfür wurden je 500 μl der Reaktionslösung, bestehend aus Reaktionspuffer, CuSO₄, dem Alexa Fluor®-Azid und einem Pufferzusatz (Zusammensetzung nach Angaben des Herstellers, abhängig von der Anzahl an Reaktionen), auf die Schalen gegeben und für 30 min abgedunkelt bei RT inkubiert. Die Reaktionslösung wurde abgenommen und die Kulturen zweimal mit 3 % BSA in PBS⁻ gewaschen. Die Zellkerne aller Zellen wurden mit Hoechst 33342 in PBS⁻ (Verdünnung 1: 2.000) für 30 min, abgedunkelt bei RT, angefärbt. Anschließend wurden die Kulturen zweimal mit PBS⁻ gewaschen, abschließend mit 1 ml PBS⁻ überschichtet und die Kulturschalen mit Parafilm abgedichtet. Die Kulturen wurden bis zur Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Bei der Dokumentation am Fluoreszenzmikroskop (Eclipse Ti, Nikon) wurden zwei unterschiedliche Filter ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=340-380 \text{ nm}/435-485 \text{ nm}$ für Hoechst, und $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=628 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}/692 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ für Alexa Fluor® 647) genutzt. Die dabei generierte Großaufnahme bestand aus 23x23 Einzelbildern, die mit einer 10x Vergrößerung aufgenommen und einer 5 % igen Überlappung mit

Hilfe der *stitching*-Funktion einer spezifischen Mikroskop-Software (NIS-Elements) zusammengesetzt wurden.

Zur Kontrolle wurden zusätzlich Kulturen mit mechanischen Verletzungen gefärbt und dokumentiert.

3.8. Einfluss von Hyperthermie auf die Wundheilung von RPE-Kulturen

3.8.1. Bestimmung der Zellfrontgeschwindigkeit

Um mögliche Veränderungen des Wundschlusses in Abhängigkeit von transienter Hyperthermie beurteilen zu können wurden Experimente durchgeführt welche die Zellfrontgeschwindigkeit (*Cell Front Velocity*, CFV) des Wundrandes betrachten. Hierfür wurden *scratch assays* in RPE-Kulturen der P2-Generation durchgeführt die für 60 h mittels Videomikroskopie (*Live Cell Analyser* JuLI™ FL, NanoEnTek Inc.) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ dokumentiert wurden.

Zwei verschiedene Versuchsansätze wurden durchgeführt. Der eine Ansatz beinhaltet keine weiteren Einflüsse, wohingegen bei dem zweiten Ansatz die Kulturen vor dem setzen des Kratzers transient mit dem Thuliumlaser auf 44 °C erwärmt wurden. Für die Ansätze ohne transiente Erwärmung wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen einmal mit PBS⁻ gewaschen, der Kratzer wurde mit einer 1 ml Pipettenspitze in den Zellrasen der Kultur gesetzt. Der etwa 500 µm breite Kratzer wurde über die komplette Breite der Zellkulturschale gezogen und die Kultur anschließend mit 1,2 ml frischem DMEM-Vollmedium versorgt. Bei den Ansätzen die vor der Verletzung des Zellrasens transient erwärmt werden sollten wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen einmal mit PBS⁻ gewaschen, die Kultur anschließend mit 1,2 ml frischem DMEM-Vollmedium versorgt und für 10 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Bestrahlung erfolgte wie unter 3.2.6 beschreiben. Allerdings wurde hier ausschließlich eine T_{max}=44 °C angelegt. Nach der Bestrahlung wurde die Kultur für 1 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Setzen des Kratzers erfolgte wie bei den nicht bestrahlten Kulturen beschrieben. Für die Dokumentation wurde die Kultur so auf dem JuLI™ FL platziert, dass der Kratzer bei 4x Vergrößerung in zentraler Position lag und der aufgenommene Ausschnitt scharf gestellt. Anschließend wurde die Aufnahme über 60 h gestartet, alle 90 s wurde ein Bild dokumentiert und die Konfluenz der beobachteten Kultur bestimmt. Eine schematische Darstellung des Aufbaus findet sich in Abbildung 23.

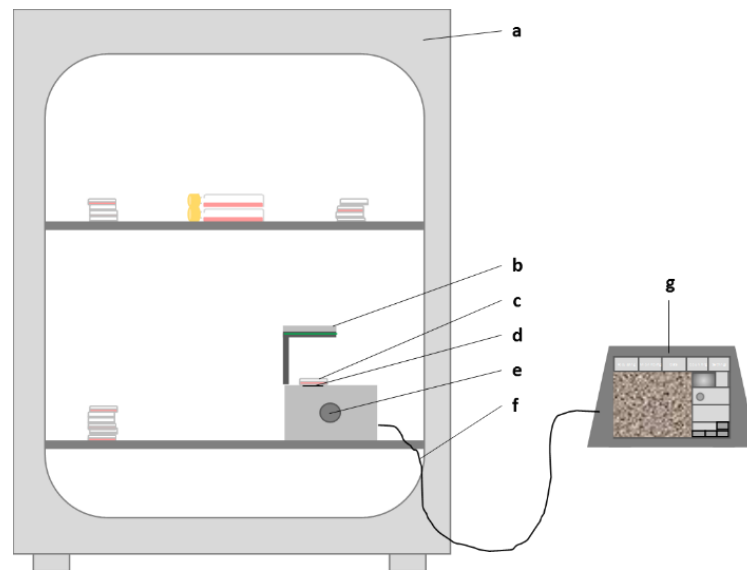


Abbildung 23: Schematische Darstellung des JuLI™ FL Aufnahmesystems

Das JuLI™ FL Aufnahmegerät wurde im Brutschrank (a) platziert, das LED (b) diente der Belichtung der Probe (c), die so von der Kamera (d) aufgenommen werden konnte. Die Bilddaten wurden über das Verbindungskabel (f) an die Kontroll-/Steuereinheit (g) weitergeleitet. Das Scharfstellen der zu beobachteten Probe erfolgte entweder direkt am Feintrieb des JuLI™ FL (e) oder an der Kontroll-/Steuereinheit außerhalb des Inkubators.

Für die Bestimmung der CFV wurden die von JuLI™ FL aufgenommenen Konfluenz-Daten genutzt. Bei der Konfluenz handelt es sich um das Flächenverhältnis zwischen bewachsener und unbewachsener Fläche einer Kulturschale, hier also das Verhältnis zwischen Zellrasen und Wunde. Im Allgemeinen lässt sich die Wundheilung in drei unterschiedliche Wachstumsphasen unterteilen. Zunächst kommt es zu einem verzögerten Anstieg der Konfluenz (lag-Phase), die in eine Wachstumsphase mit annähernd exponentiellem Wachstum (log-Phase) übergeht. Gegen Ende des Wundschlusses kommt es zu einem Abfallen der Wachstumsrate (stationäre-Phase) in der die meisten Zellen bereits Zell-Zell-Kontakte ausgebildet haben und die Wunde fast vollständig geschlossen ist (Abbildung 24 A).

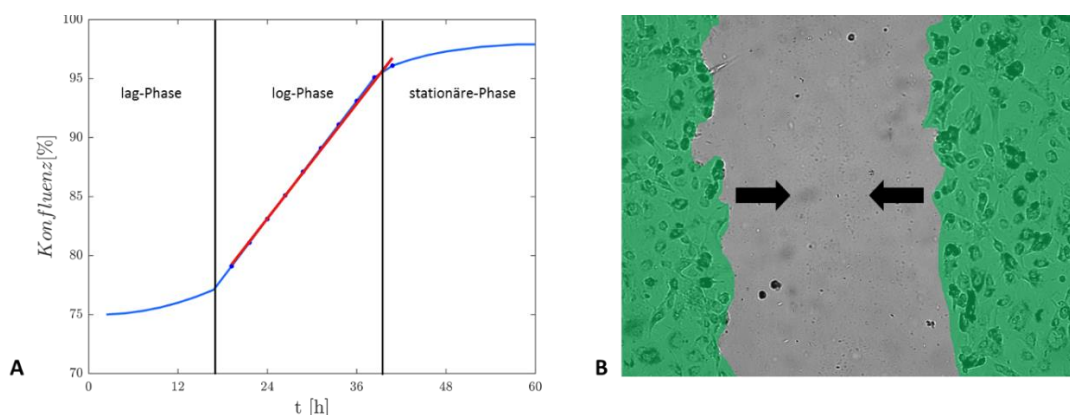


Abbildung 24: Darstellung der Konfluenz über die Zeit und einer Zellkultur mit Wunde in vertikaler Richtung

Beispielhafte Darstellung der gemessenen Konfluenz-Daten über die Zeit (A), die gemessene Konfluenz ist in blau dargestellt, die Approximation (*Center Piece Approximation*) des Anstiegs der Konfluenz im mittleren Zeitbereich der Aufnahme. Und einer PRE-Kultur mit einer Verletzung in vertikaler Richtung, die intakte Einzelzellschicht der Kultur ist grün dargestellt und stellen die Zellfronten dar, die Pfeile zeigen die erwartete Bewegungsrichtung der beiden Zellfronten an.

Für die Bestimmung der CFV wurde die log-Phase genutzt (Abbildung 24 A). Da die gewonnenen Konfluenz-Daten stark von dem aufgenommenen Ausschnitt abhängen, mussten die Messdaten normiert werden. Zunächst wurde die Steigung der Konfluenz in der log-Phase an 10 Messpunkten approximiert (*Center Piece Approximation*, CPA) (Abbildung 24 A, rote Gerade), mit der so gewonnenen Steigung wurde anschließend die Fläche des Detektors der verwendeten Kamera multipliziert. In Abhängigkeit von der Orientierung (horizontal, vertikal) wurde durch die Höhe oder Breite des Kratzers dividiert, da in diesem Versuchsaufbau zwei Zellfronten existieren musste zudem durch zwei geteilt werden (Abbildung 24 B, Formel 8).

Formel 8: Formel zur Berechnung der Zellfrontgeschwindigkeit

Die Zellfrontgeschwindigkeit wird berechnet indem die Fläche des Kamerasensors (h, b) mit dem Anstieg der *Center Piece Approximation* (CPA) multipliziert wird. Anschließend wird durch 2 und die Höhe (h) oder Breite (b) der Wunde geteilt.

$$CFV = \frac{h \cdot b \cdot CPA}{(h \text{ oder } b)/2}$$

Der so berechnete Wert stellte einen Maßstab für die Verschlussrate der Wunde dar (Abbildung 24 B). Es wurde nur die Bewegung in vertikale oder horizontale Richtung (abhängig von der Orientierung der Wunde) berücksichtigt, seitliche Bewegungen wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

3.8.2. Bestimmung zellulärer Proliferation

Zusätzlich wurden Versuche durchgeführt um den Einfluss subletaler Hyperthermie auf die Wundheilung und Proliferation zu untersuchen. Hierfür wurden spezielle Zellkulturschalen (Culture-insert 3-well dishes, ibidi) (Abbildung 25) verwendet in die die RPE-Zellen zur P2-Generation gesät wurden. Diese Kulturschalen enthielten einen Einsatz mit drei Kammern (je 3,14 mm x 7 mm) in denen die Zellen kultiviert wurden. Kurz vor der Bestrahlung wurde der Einsatz entfernt und 1,2 ml DMEM-Vollmedium auf die Zellen gegeben. Die Bestrahlung erfolgte wie unter 3.2.6 beschrieben.

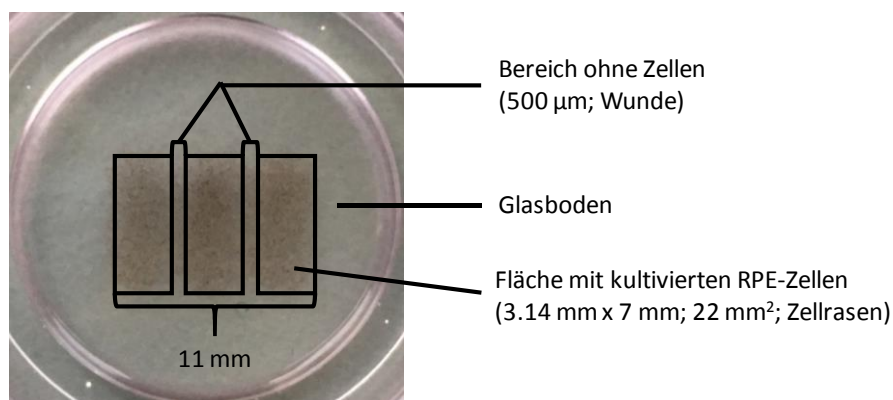


Abbildung 25: Darstellung der verwendeten standardisierten Zellkulturschale für Wundheilungs-Assays

Nach der Entnahme des Einsatzes ergaben sich drei unabhängige Flächen mit RPE-Zellen (3,14 mm x 7 mm; Zellrasen), die durch eine Lücke von 500 µm (Wunde) unterbrochen wurden. Die Gesamtfläche des bewachsenen Bereichs betrug 11 mm.

24 h nach der Bestrahlung wurden proliferative Zellen innerhalb der Kulturen wie unter 3.7 beschrieben nachgewiesen (hier wurde Alexa Fluor® 488 markiertes EdU verwendet) und die Kulturen anschließend am Fluoreszenzmikroskop (Eclipse Ti, Nikon) dokumentiert. Pro Wundspalte wurden je 6 Aufnahmen im Hellfeld, Hoechst 33342 (blau; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=340\text{-}380\text{ nm}/435\text{-}485\text{ nm}$) und Alexa Fluor® 488 (grün; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=490/525\text{ nm}$) bei 10x Vergrößerung gemacht. Bei den dokumentierten Hellfeldaufnahmen wurde anschließend an sechs, gleichmäßig verteilten, Stellen die Breite der verbleibenden Wunde bestimmt, die Fluoreszenzaufnahmen dienten der Bestimmung des Anteils EdU-positiver Zellen innerhalb des Wundrandes.

3.9.Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal an unabhängigen Zellkulturen unter gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt. Der zeitliche Verbleib der primären Kulturen als P0- P1- und P2- Generation wurde strikt eingehalten. Es wurden ausschließlich, falls nicht anders angegeben, konfluente Kulturen der P2-Generation verwendet.

Die Angabe der Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Analyse wurde der Student'sche t-Test angewendet, hierbei wurden zweiseitige p-Werte von $\leq 0,05$ als signifikant (*), von $\leq 0,01$ als hoch signifikant (**) und von $\leq 0,001$ als höchst signifikant (***) angesehen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Vorversuche zur Festlegung der Bestrahlungsbedingungen

4.1.1. Füllhöhe des Mediums

Mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Formel 5) wurde die optische Eindringtiefe des verwendeten Thuliumlasers berechnet. Bei einer Füllhöhe von 80 μm ist die Strahlungsintensität auf $1/e \approx 37\%$ der ursprünglichen Intensität abgefallen [275, 276]. Als Absorptionskoeffizient von Wasser wurde $127,5 \text{ cm}^{-1}$ angenommen. Um sicher gehen zu können, dass eine komplette Absorption des emittierten Lichtes im Medium erreicht werden konnte, wurde die tatsächliche Füllhöhe des Mediums an zentraler Position der Zellkulturschale mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) bestimmt.

Die Füllhöhe des Mediums an zentraler Position variierte abhängig davon, ob die Zellkulturschale zuvor trocken war, oder vorab bereits benetzt wurde. Bei den Messungen ergab sich nach der Zugabe von 1200 μl DMEM-Vollmedium bei Kulturschalen die vorher trocken waren eine Füllhöhe von 738 μm und bei Kulturschalen die vorher bereits benetzt wurden eine Füllhöhe von 877 μm . Bei Zellkulturschalen auf denen konfluente Zellkulturen kultiviert wurden lag die Füllhöhe bei 935 μm . Die hier gemessene Füllhöhe reichte aus um die komplette Strahlung des verwendeten Thuliumlasers zu absorbieren. Dadurch konnte eine direkte Absorption durch die Zellen ausgeschlossen werden.

4.1.2. Temperatur-Kalibrierung

Um die benötigte Laserleistung für das Erreichen der gewünschten zentral anliegenden Maximaltemperatur (T_{\max}) berechnen zu können, musste zunächst die tatsächlich erreichte Temperatur bei verschiedenen Laserleistungen gemessen werden. Der zeitliche Verlauf einer solchen Messung ist beispielhaft für eine Leistung von 5 W und an zentraler Position der Zellkulturschale gemessen in Abbildung 26 dargestellt.

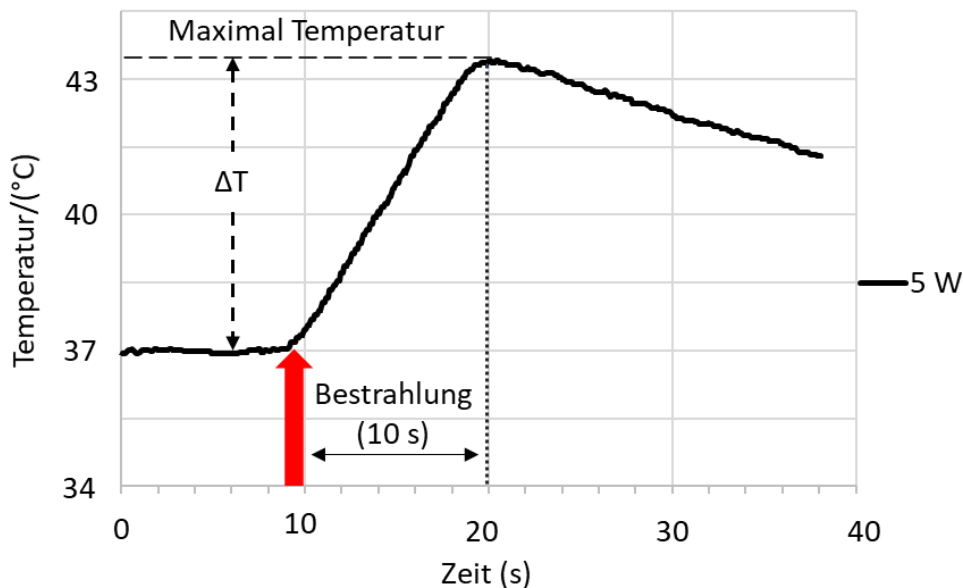


Abbildung 26: Beispielhafte Darstellung der Temperaturmessung an zentraler Position der Zellkulturschale bei einer Leistung von 5 W

Dargestellt ist eine beispielhafte Messung der Temperaturentwicklung bei einer Bestrahlung mit 5 W Leistung. Die Messung erfolgte mit einem Thermoelement (Cat. No.: HYP-0-33-1-T-G-60-SMPW-M, Omega® Engineering Inc.) an zentraler Position auf der Kulturschale. Der rote Pfeil markiert den Beginn, die gepunktete Linie das Ende der Bestrahlung (10 s). Das Maximum der Kurve stellt die Maximaltemperatur (T_{\max}) an der Messposition dar (gestrichelte Linie).

Der gemessene Temperaturanstieg (ΔT) nach einer Bestrahlungsdauer von 10 s war proportional zur Leistung des Lasers. Somit war es möglich, beliebige Temperaturanstiege mittels linearer Regression zu berechnen. Hierfür wurden zunächst Leistungen von 1, 5, 10 und 15 W am Thuliumlaser eingestellt und diese gegen das damit erzielte ΔT aufgetragen (Abbildung 27).

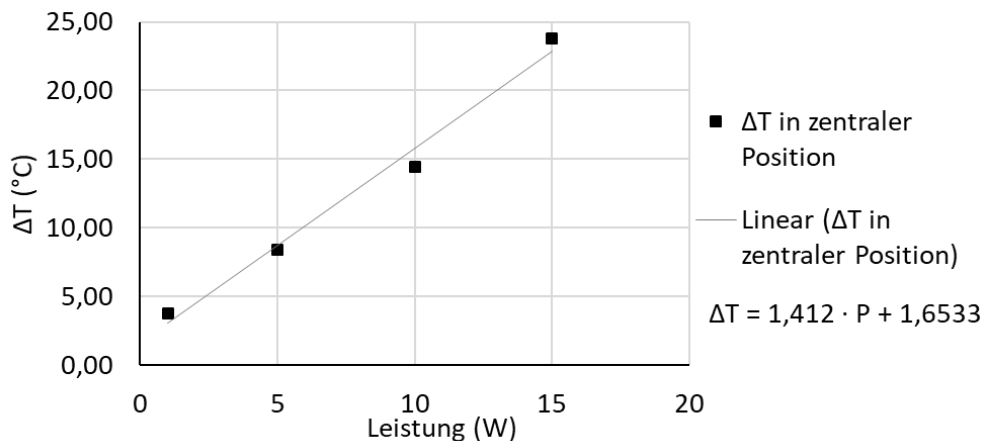


Abbildung 27: Darstellung des Zusammenhangs von Leistung und Temperaturanstieg

Dargestellt ist die an zentraler Position und in Bodennähe der Schale gemessene Temperaturerhöhung (ΔT) in Abhängigkeit von der am Laser eingestellten Leistung P . $\Delta T = 1,412 \cdot P + 1,6533$ gibt den funktionalen Zusammenhang zwischen Temperaturerhöhung (ΔT) und Laserleistung P an. Bei einer Ausgangstemperatur von 37 °C führen 1 W Laserleistung zu einer Erwärmung um $1,412\text{ °C}$.

Die Steigung der Ausgleichsgeraden (Abbildung 27) wurde genutzt, um die tatsächlich benötigte Leistung P zum Erreichen der gewünschten Maximaltemperatur (T_{max}) an zentraler Position zu berechnen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Berechnete Parameter nach der Temperatur-Kalibrierung

Berechnete Leistungen, die benötigt wurden, um die gewünschte Maximaltemperatur (T_{max}) an zentraler Position der Zellkulturschale zu erreichen. Als Grundlage der Berechnungen diente der in Abbildung 27 ermittelte funktionale Zusammenhang zwischen Temperaturerhöhung (ΔT) und Laserleistung P : $\Delta T = 1,412 \cdot P + 1,6533$.

Ziel-Temperatur ($T_{\text{max}}/\text{°C}$)	40	43	47	51	59
Basis Temperatur (°C)	34,28	34,28	34,28	34,28	34,28
ΔT (°C)	5,72	8,72	12,72	16,72	24,72
Leistung P (W)	2,9	5,0	7,8	10,7	16,4

Mittels linearer Regression wurden die benötigte Leistungen zum Erreichen der gewünschten Maximaltemperaturen an zentraler Position der Zellkulturschale ($T_{\text{max}} = 40\text{ °C}$, 43 °C , 47 °C , 51 °C , 59 °C) berechnet (Abbildung 27). Die so erstellten Temperaturverläufe zeigten einen annähernd gaußförmigen Verlauf. Die höchste Temperatur lag im Zentrum und fiel mit zunehmendem Abstand ab. Die Temperaturverteilung, auf Zellebene, nach einer Bestrahlung von 10 s ($T_{10\text{s}}$) (Abbildung 28) zeigte eine glockenartige Form, die einer Gauß-Funktion entsprach. Für den Fit wurde Formel 9 verwendet.

Formel 9: Verwendete Gauß-Funktion

$T(r)$: Temperatur an einer bestimmten Position der Zellkulturschale; r : Entfernung vom Zentrum; T_{basis} : Temperatur des Mediums vor der Bestrahlung (°C); P : Leistung des Lasers; C : Rate der Erwärmung; ω : Aufweitung der Kurve.

$$T(r) = T_{\text{basis}} + P \cdot C \cdot e^{-\frac{2r^2}{\omega^2}}$$

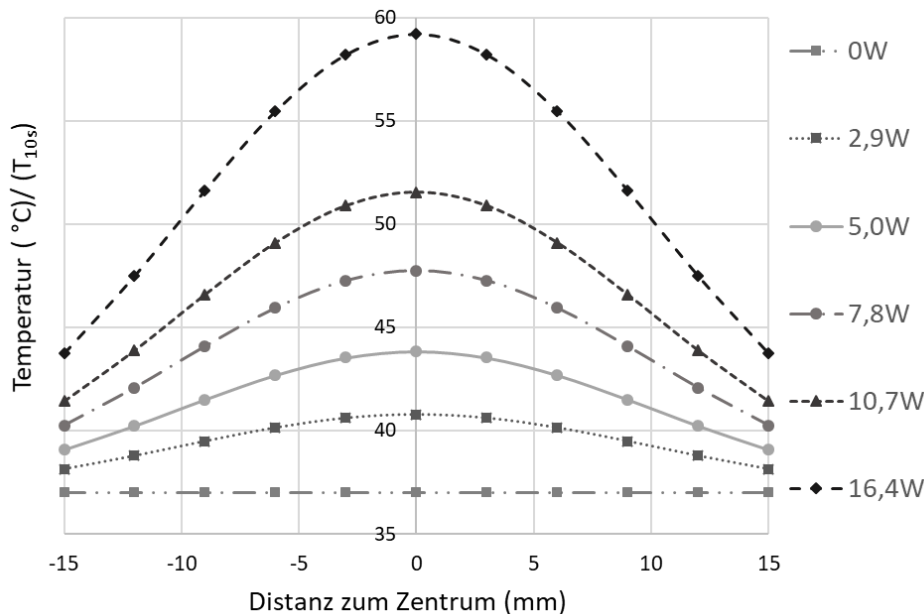


Abbildung 28: Verteilung der Temperatur bei unterschiedlichen eingestellten Leistungen

Temperaturverteilung an unterschiedlichen Positionen auf der Platte zur zehnten Sekunde (T_{10s}) während der Bestrahlung. Die angelegten Leistungen resultierten in unterschiedlichen Maximaltemperaturen (T_{max}) an zentraler Position der Zellkulturschale. Die Temperaturverteilungen wurden auf die Gauß-Funktion gefittet.

Bei dieser Formel (Formel 9) stehen r und T_{basis} für die Distanz zum Zentrum sowie die Temperatur ($^{\circ}C$) des Mediums vor der Bestrahlung. P , C und ω stellen hier die ausgegebene Leistung (W), die Rate der Erwärmung ($C=1,46(^{\circ}C/W)$) und die Aufweitung der Kurve ($\omega=10,13$) (Tabelle 4). Der Temperaturanstieg ΔT war proportional zur Leistung des Lasers P (Formel 10).

Formel 10: Formel zur Berechnung der Abhängigkeit vom Temperaturanstieg (ΔT) zur Leistung des Lasers (P)

ΔT_{max} : Maximaler Temperaturanstieg; r : Abstand zum Zentrum; P : Leistung des Lasers; C : Rate der Erwärmung

$$\Delta T_{max}(r = 0) = P \cdot C$$

Tabelle 4: Berechnete Parameter zum Einsetzen in die Gauß-Funktion (Formel 9)

T_{max} : Erreichte Maximaltemperatur; $T_{basis(^{\circ}C)}$: Gemessene Grundtemperatur; ΔT_{max} : Entspricht in Formel 9 dem Term $P \cdot C$; ω : Aufweitung der Kurve

T_{max}	$T_{basis} (^{\circ}C)$	ΔT_{max}	ω
40 $^{\circ}C$	34,28	5,72	10,13
43 $^{\circ}C$	34,28	8,72	10,13
47 $^{\circ}C$	34,28	12,72	10,13
51 $^{\circ}C$	34,28	16,72	10,13
59 $^{\circ}C$	34,28	24,72	10,13

4.2. Zellvitalität nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen

Die Bestimmung der zellulären Vitalität in transient erwärmten primären RPE-Zellkulturen diente der Einordnung der unterschiedlichen zentral angelegten Zieltemperaturen (T_{\max}) in das Schema subletal und letal. Bei den Maximaltemperaturen (T_{\max}) die an zentraler Position der Zellkulturschale angelegt wurden handelte es sich um 40°C, 44°C, 47°C, 51°C und 59°C. Zur Untersuchung der Zellvitalität in Kulturen nach transientser thermischer Erwärmung wurden die Substanzen FITC-Annexin-V und Ethidium Homodimer III (EthD-III) verwendet. Nach der Färbung erfolgten entweder fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des Färbemusters oder die Bestimmung des Anteils lebender, toter und apoptotischer Zellen, an der Gesamtkultur, im Durchflusszytometer.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Auswertungen aufgeführt.

4.2.1. Nachweis von Apoptose und Nekrose bei Zellen in Suspension

In Abbildung 29 sind die ermittelten Anteile lebender, apoptotischer und toter Zellen an der Gesamtpopulation bestrahlter Zellkulturen aufgeführt. Der Prozentsatz lebender Zellen in der nicht bestrahlten Kontrolle (37 °C) wurde als 100 % und die Anteile apoptotischer und toter Zellen als 0% festgelegt. Die entsprechenden Anteile der bestrahlten Kulturen wurden anschließend zu dem Wert der nicht bestrahlten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Bei der Auswertung der Daten zeigte sich, dass es drei Stunden nach der Bestrahlung erst ab einer zentralen Maximaltemperatur (T_{\max}) von 47 °C zu einer Abnahme an lebenden Zellen (-4,3%) und einer relativen Zunahme apoptotischer (+ 4,8%) kam, wohingegen der Anteil toter Zellen (-0,5%) im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle unverändert blieb (Abbildung 29). Bei T_{\max} unterhalb von 47 °C kam es, im Verhältnis zur nicht bestrahlten Kontrolle zu einer leichten Zunahme des Anteils lebender Zellen ($T_{\max}=40\text{ °C}=+ 5,9\%$; $T_{\max}=44\text{ °C}=+ 5,1\%$) und folglich zu einer Abnahme apoptotischer ($T_{\max}=40\text{ °C}=-4,1\%$; $T_{\max}=44\text{ °C}=-1,2\%$) und toter ($T_{\max}=40\text{ °C}=-1,8\%$; $T_{\max}=44\text{ °C}=-4\%$) Zellen (Abbildung 29). Der Anteil lebender Zellen in Kulturen, die mit $T_{\max}\geq 47\text{ °C}$ bestrahlt wurden nahm drei Stunden nach der Bestrahlung, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle, deutlich ab ($T_{\max}=51\text{ °C}=-13,1\%$; $T_{\max}=59\text{ °C}=-22\%$). Wohingegen der Anteil apoptotischer ($T_{\max}=51\text{ °C}=+8,2\%$; $T_{\max}=59\text{ °C}=+12,4\%$) und nekrotischer ($T_{\max}=51\text{ °C}=+5\%$; $T_{\max}=59\text{ °C}=+9,6\%$) Zellen zunahm (Abbildung 29).

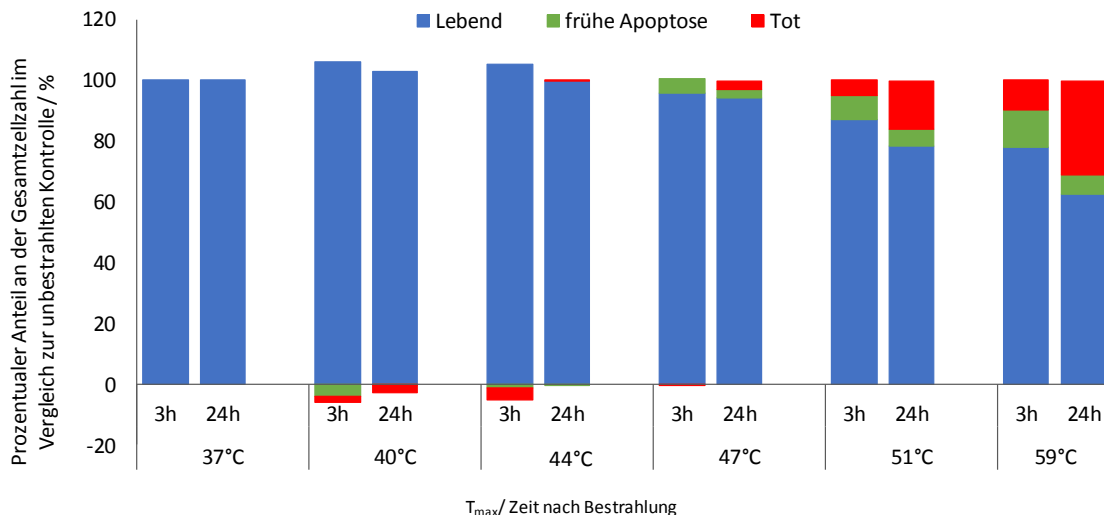


Abbildung 29: Ergebnisse der Untersuchung des Anteils lebender, toter und apoptotischer Zellen am Durchflusszytometer

Dargestellt sind die gemittelten Anteile lebender (blau), früh apoptotischer (grün) und toter (rot) Zellen über insgesamt drei unabhängigen Messungen. Die Ergebnisse der einzelnen zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) wurden ins Verhältnis zur nicht bestrahlten Kontrolle (37 °C) gestellt. Die Ermittlung des Anteils lebender, apoptotischer und toter Zellen an der Gesamtpopulation erfolgte nach drei oder 24 h, da es sich um finale Versuche handelte sind die Ergebnisse für drei und 24 h als unabhängig anzusehen.

24 Stunden nach der Bestrahlung zeigte sich bei Kulturen die mit einem T_{max} von 40 °C bestrahlt wurden nur eine geringe Zunahme lebender Zellen (+3%) und toter Zellen (-2,9%), der Anteil apoptotischer Zellen änderte sich im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle nur geringfügig (+ 0,1%) (Abbildung 29). Bei Kulturen, die mit einem T_{max} von 44 °C bestrahlt wurden kam es zu einer geringen Abnahme des Anteils lebender Zellen (-0,37%) und einer Zunahme des Anteils toter Zellen (+0,38%), der Anteil apoptotischer Zellen blieb im Verhältnis zur nicht bestrahlten Kontrolle unverändert (Abbildung 29). Bei Kulturen, die mit einem T_{max} von 47 °C bestrahlt wurden, zeigte sich 24 Stunden nach der Bestrahlung ein ähnliches Bild wie bei den Kulturen die nach 3 h untersucht wurden. Der Anteil lebender Zellen sank um etwa 6% ab, wohingegen der Anteil apoptotischer Zellen (+ 3%) und toter Zellen (+ 3%) gleichförmig zunahm (Abbildung 29). Bei Kulturen, die mit $T_{max} \geq 47$ °C bestrahlt wurden nahm drei Stunden nach der Bestrahlung, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle, der Anteil lebender Zellen deutlich ab ($T_{max}=51$ °C=-21,5%; $T_{max}=59$ °C=-37,3%). Wohingegen der Anteil apoptotischer ($T_{max}=51$ °C=+5,4%; $T_{max}=59$ °C=+6,1%) und nekrotischer ($T_{max}=51$ °C=+15,9%; $T_{max}=59$ °C=+31,2%) Zellen zunahm. Es konnte somit im zeitlichen Verlauf bei $T_{max} \geq 47$ °C eine Verschiebung von apoptotischen Prozessen hin zum finalen Absterben der Zellen vermutet werden.

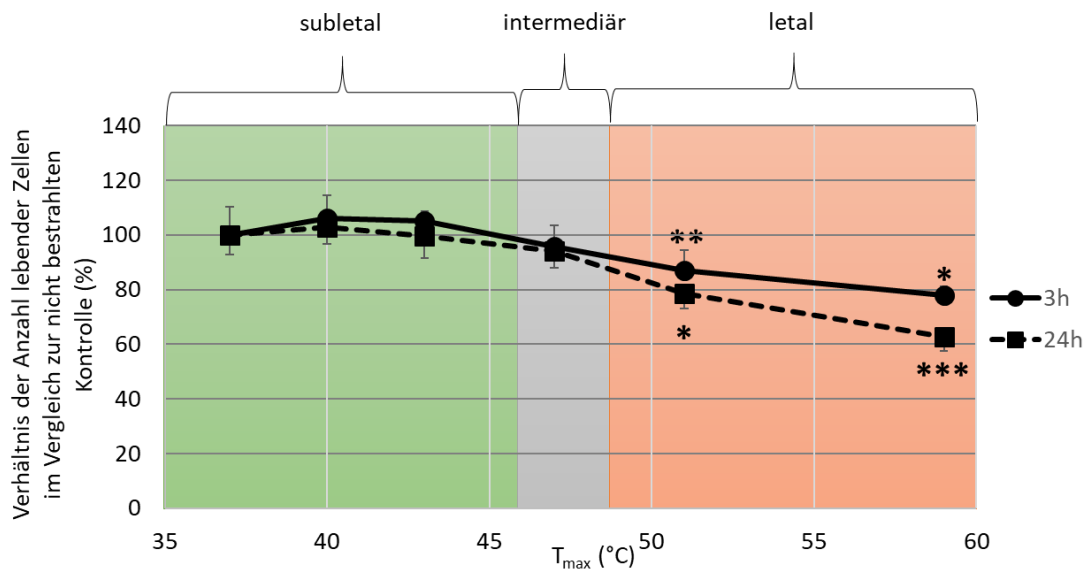


Abbildung 30: Anteil lebender Zellen im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle (37 °C) über die einzelnen angelegten Maximaltemperaturen (T_{max})

Dargestellt ist die statistische Auswertung des Anteils lebender Zellen nach drei und 24 h im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle (37 °C) über die zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}). Eine statistisch signifikante Abnahme des Anteils lebender Zellen trat nach drei und 24 h ab einem T_{max} von 50 °C auf. Anhand dieser Daten wurde eine Unterteilung der zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) in subletal (grün; nicht tödlich), letal (orange; tödlich) und intermediär (mittelgrau; in geringem Maße tödlich) vorgenommen. $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***)

Bei der Betrachtung des Anteils lebender Zellen an einer Kultur im Verlauf (von niedrig bis hoch) der angelegten zentralen Maximaltemperatur (T_{max}) ließ sich eine deutliche Tendenz erkennen (Abbildung 30). Bei $T_{max} \geq 47$ °C kam es sowohl nach drei, als auch nach 24 Stunden zu keiner Veränderung im Anteil lebender Zellen (Abbildung 30), zwar traten Schwankungen auf, die Werte lagen unter Berücksichtigung ihrer Standardabweichung (3 h: $T_{max}=40$ °C=106,2% ± 4,9%; $T_{max}=44$ °C=105,8% ± 10,6%; $T_{max}=47$ °C=96,6% ± 14,4%) (24 h: $T_{max}=40$ °C=102% ± 3,2%; $T_{max}=44$ °C=99,6% ± 4,7%; $T_{max}=47$ °C=94,1% ± 4%) im Bereich der nicht bestrahlten Kontrollen (Abbildung 30). Bei $T_{max} \geq 47$ °C kam es zu einer statistisch signifikanten Abnahme des Anteils lebender Zellen. Drei Stunden nach der Bestrahlung mit $T_{max}=51$ °C fiel der prozentuale Anteil lebender Zellen auf 87,1% ± 4,4% ($p=0,0073$) und nach einer Bestrahlung mit $T_{max}=59$ °C auf 78,8% ± 12% ($p=0,0375$) (Abbildung 30). 24 Stunden nach der Bestrahlung fiel der Anteil bei einer zentral angelegten Maximaltemperatur von 51 °C auf 78,8% ± 8,6% ($p=0,0131$) und bei einer T_{max} von 59 °C auf 62,9% ± 7% ($p=0,0008$) (Abbildung 30).

Aufgrund dieser statistischen Auswertung wurden im Weiteren Temperaturen unterhalb 47 °C als subletal (nicht tödlich) und oberhalb von 47 °C als letal (tödlich) angenommen. Bei Kulturen die mit einer T_{max} von 47 °C bestrahlt wurden kam es zwar zu keinem signifikanten Abfall des Anteils lebender Zellen, allerdings war der Anteil apoptotischer Zellen nach drei Stunden deutlich erhöht. Zentral angelegte Maximaltemperaturen von 47 °C wurden tendenziell als letal angenommen.

4.2.2. Nachweis von Apoptose und Nekrose in adhärennten Zellen

Adhärennte Zellen wurden drei, 24 und 48 Stunden nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) mit FITC-Annexin-V, Ethidium Homodimer III (EthD-III) und Hoechst 33342 gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Zellen die nur FITC-Annexin-V (grün) positiv waren wurden als apoptotisch und EthD-III (nur rot) sowie EthD-III und FITC-Annexin-V (rot/grün) positive Zellen als tot angesehen. Zellen die ausschließlich mit Hoechst 33342 (blau) angefärbt waren wurden als lebend eingeordnet. In Abbildung 31 sind die beobachteten Färbemuster dargestellt.

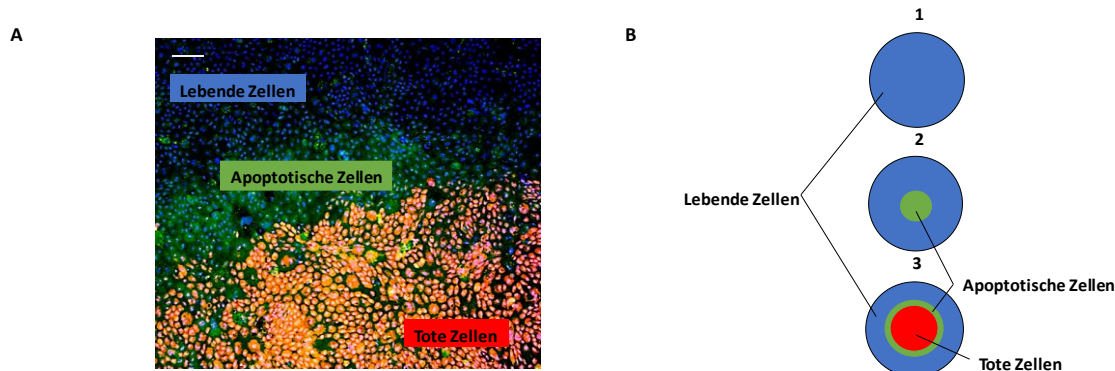


Abbildung 31: Darstellung der fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenen Färbemuster

(A) Beispielhafte Darstellung der beobachteten Färbemuster nach Bestrahlung mit einer angelegten zentralen Maximaltemperatur ≥ 47 °C; es lassen sich drei distinkte Bereiche erkennen, einen inneren Bereich mit rot beziehungsweise rot/ grün gefärbten Zellen (tote Zellen), einen Ring mit ausschließlich grün gefärbten Zellen (apoptotische Zellen), der sich an den Bereich mit toten Zellen anschließt und um diesen ein Bereich in dem sich ausschließlich blau gefärbte Zellen befinden (lebende Zellen). (B) Beispielhafte Darstellung der unterschiedlichen beobachtbaren Färbemuster; insgesamt ließen sich drei unterschiedliche Färbemuster beobachten (1) ausschließlich blaugefärbte Zellen; (2) in zentraler Position eine kreisförmige Gruppe grüngefärbter Zellen die von ausschließlich blaugefärbten Zellen umgeben waren; (3) [27] in zentraler Position rot beziehungsweise rot/ grün gefärbte Zellen die von einem Ring ausschließlich grüngefärbter Zellen umgeben waren, der wiederum von einer Population ausschließlich blau gefärbter Zellen umschlossen war. (Maßstab: 100 μ m)

Bei Kulturen die mit einer zentral angelegten Maximaltemperatur (T_{max}) von größer als 47 °C bestrahlt wurden zeigte sich ein distinktes Färbemuster, wie beispielhaft in Abbildung 31 (A) dargestellt. Hierbei konnte eine kreisförmige Population rot und/ oder rot/ grün (EthD-III; EthD-III/FITC-Annexin-V) gefärbter Zellen in zentraler Position beobachtet werden die von einem Ring aus ausschließlich grüngefärbten Zellen (FITC-Annexin-V) umgeben war. Die rot und rot/ grünen Zellen wurden als tot angenommen und die ausschließlich grünen Zellen als apoptotisch. An den Ring grüngefärbter Zellen schloss sich ein Bereich ausschließlich blaugefärbter Zellen (Hoechst 33342) an, der sich bis in die Peripherie der Zellkulturschale erstreckte. Diese Zellen wurden als lebend eingeordnet. Über alle gefärbten Zellkulturschalen ließen sich insgesamt drei unterschiedliche Färbemuster beobachten. Bei dem einen Färbemuster kamen ausschließlich blaugefärbte Zellen vor (Abbildung 31 B (1)), bei dem zweiten trat an zentraler Position eine kreisförmige Population grüngefärbter Zellen auf, die von ausschließlich blaugefärbten Zellen umgeben waren (Abbildung 31 B (2)) und bei dem dritten zeigte sich an zentraler Position eine kreisförmige Population rot und/oder rot/grün gefärbter Zellen die von einem Ring aus ausschließlich grüngefärbten Zellen

umgeben waren, an diesen Bereich schlossen sich ausschließlich blaugefärbte Zellen an (Abbildung 31 B).

Die Bewertung der Färbemuster erfolgte zunächst nach rein subjektiver Empfindung des Experimentators und diente dazu zu dokumentieren ob rein visuell Unterschiede erkennbar sind. Hierfür wurden die Färbungsintensitäten der Farbstoffe FITC-Annexin-V und EthD-III bewertet, wobei keine Färbung mit einem -, eine geringe bis mäßige Färbung mit ± und eine deutliche bis starke Färbung mit + gekennzeichnet wurde (Tabelle 5). Bei der Betrachtung der so gewonnenen Daten konnte eine zeit- und temperaturabhängige Intensivierung der Färbungen beobachtet werden.

Tabelle 5: Ausprägung der beobachteten Färbemuster

Rein subjektive Auswertung der Färbemuster, der Experimentator beurteilte ob keine Färbung (-), eine geringe bis mäßige Färbung (±) oder eine deutliche bis starke Färbung (+) der Zellen vorlag.

T_{\max}	FITC-Annexin-V (apoptotische Zellen)			EthD-III (tote Zellen)		
	3h	24h	48h	3h	24h	48h
37°C	-	-	-	-	-	-
40°C	-	-	-	-	-	-
44°C	-	-	-	-	-	-
47°C	±	±	+	-	+	+
51°C	+	+	+	+	+	+
59°C	+	+	+	+	+	+

Die Beurteilung dieser Ergebnisse bestätigte die Einordnung der T_{\max} in das Schema subletal und letal (4.2.1). Ausgehend von den in Tabelle 5 aufgeführten Färbemustern wurden $T_{\max} \leq 44$ °C als komplett subletal und $T_{\max} \geq 47$ °C als letal angenommen.

Des Weiteren wurden die gefärbten Zellkulturschalen genutzt um die Schwellenwert Temperaturen für Apoptose und kompletten Zelltod zu berechnen. Für die Berechnung wurden die äußeren Radien für Apoptose (grün) und kompletten Zelltod (rot und rot/grün) aller zentral angelegten Maximaltemperaturen ($T_{\max} = 40$ °C, 44 °C, 47 °C, 51 °C, 59 °C) zu einem Messzeitpunkt (3, 24, 48 h) gemittelt und in Formel 9, unter Verwendung der Daten aus Tabelle 4, eingefügt. So konnte die minimale Temperatur bestimmt werden, welche nach einer Bestrahlung von zehn Sekunden (T_{10s}) nach 3, 24 oder 48 h zu apoptotischen Veränderungen in Zellen oder zum kompletten Zelltod führte (Abbildung 32).

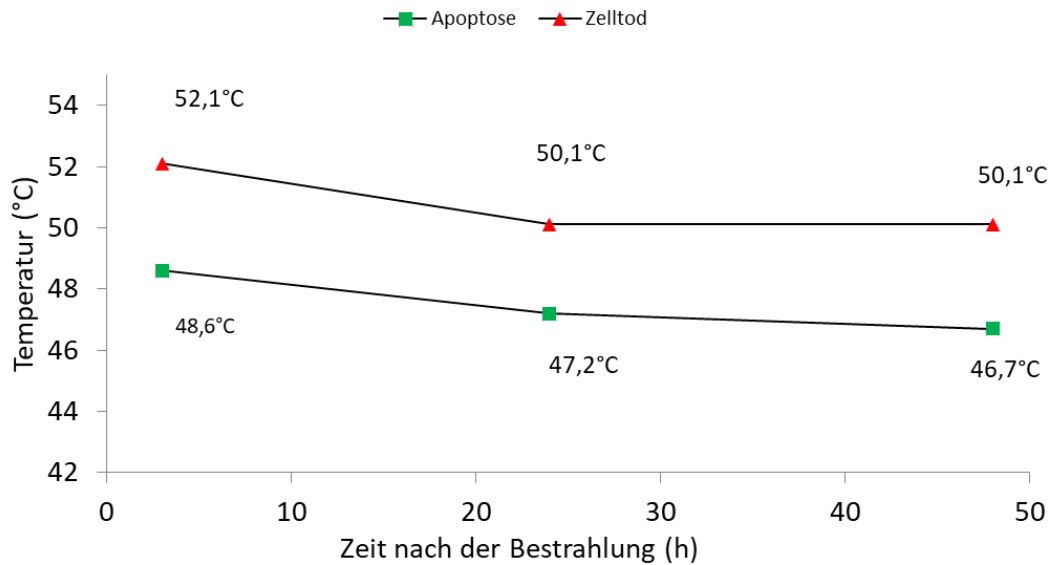


Abbildung 32: Darstellung der berechneten Schwellenwert Temperaturen

Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Schwellenwerttemperatur, die nach einer Bestrahlung von 10 s (T_{10s}) zu apoptotischen Veränderungen der Zellen (grünes Quadrat), oder komplettem Zelltod (rotes Dreieck) führt.

Die Berechnungen ergaben, dass die initiale T_{10s} , die zu apoptotischen Veränderungen in Zellen führte, in Abhängigkeit von der Zeit nach der Bestrahlung (3 h bis 48 h) absank. Dies galt auch für die initiale T_{10s} die kompletten Zelltod hervorrief (Abbildung 32). Drei Stunden nach der Bestrahlung lag die T_{10s} für Apoptose bei $48,6 \pm 1,8$ °C und für kompletten Zelltod bei $52,1 \pm 0,6$ °C. 24 h nach der Bestrahlung sank die T_{10s} für apoptotische Veränderungen auf $47,2 \pm 1,3$ °C (-1,4 °C) und für kompletten Zelltod auf $50,1 \pm 1,4$ °C (-2 °C) (Abbildung 32). 48 h nach der Bestrahlung zeigte sich ein ähnliches Bild. Zu diesem Zeitpunkt sank die T_{10s} die ausreichte um zu apoptotischen Veränderungen zu führen auf $46,7 \pm 0,9$ °C (-1,9 °C im Vergleich zu drei Stunden; -0,5 °C im Vergleich zu 24 h) und auf $50,1 \pm 0,8$ °C für kompletten Zelltod (-2 °C im Vergleich zu drei Stunden; gleichbleibend im Vergleich zu 24 h).

4.3.Expression und Sekretion von VEGF nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen

4.3.1. Sekretion von VEGF

Die Bestimmung der Menge an sekretiertem VEGF in RPE-Zellkulturen nach transientser Erwärmung erfolgte anhand von ELISA-Tests. Es wurden Kulturen der P2-Generation verwendet und diese mit dem unter 3.1 beschriebenen Bestrahlungsaufbau bestrahlt. Die Durchführung erfolgte wie unter 3.2.6 beschrieben. Bei den Maximaltemperaturen (T_{max}) die an zentraler Position der Zellkulturschale angelegt wurden handelte es sich um 40°C, 44°C, 47°C, 51°C und 59°C. Die Zellkulturüberstände wurden 24 h nach der Bestrahlung abgenommen und die ELISA-Tests wie unter 3.6 beschrieben durchgeführt. Auf diese Weise konnte das innerhalb von 24 h sekretierte VEGF bestimmt werden (Abbildung 33).

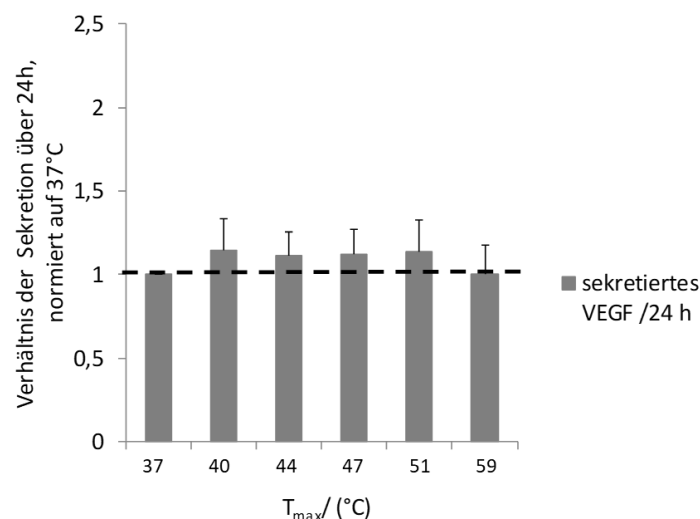


Abbildung 33: Ergebnisse des ELISA-Tests zum Nachweis des sekretierten VEGF

Darstellung der berechneten Mittelwerte für das innerhalb von 24 h sekretierte VEGF. Die unterschiedlichen zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) sind aufsteigend (von links nach rechts) von 37 °C (nicht bestrahlt) bis hin zu 59 °C aufgeführt. Die schwarze gestrichelte Linie gibt die auf 1 gesetzte, nicht bestrahlte Kontrolle (37 °C) wieder.

Bei der Berechnung der Mittelwerte ergab sich keine eindeutige Temperaturabhängigkeit der VEGF-Sekretion im Vergleich der einzelnen T_{max} untereinander (Abbildung 33). Da in vorherigen Testungen gezeigt werden konnte, dass es bei $T_{max} \geq 47$ °C zu vermehrtem Zelltod kam, sollte die Abnahme des Anteils lebender Zellen an der Gesamtkultur in Betracht gezogen werden.

Hierfür wurde zusätzlich, zum Zeitpunkt der Entnahme des Zellkulturüberstands, die Zellzahl (Abbildung 34 A) der entsprechenden Kultur bestimmt (3.2.5) und das sekretierte VEGF anschließend auf die nicht bestrahlte Kontrolle (37 °C) und die ermittelte Zellzahl normiert (Abbildung 34 B). Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass die Abnahme der Anzahl der Zellen die VEGF sekretieren in Betracht gezogen wurde.

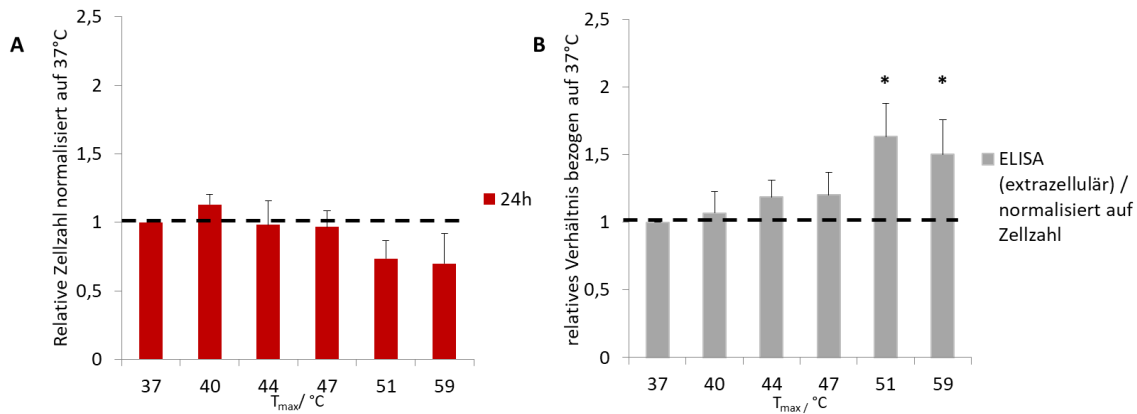


Abbildung 34: Ergebnisse der ELISA-Tests zum Nachweis des sekretierten VEGF nach Normalisierung auf die Zellzahl
 (A): Darstellung der ausgezählten Zellzahlen 24 h nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen zentral angelegten Temperaturmaxima (T_{max}). Die T_{max} sind aufsteigend (von links nach rechts) von 37 °C (nicht bestrahlt) bis hin zu 59 °C aufgeführt. Die schwarze gestrichelte Linie gibt die auf 1 gesetzte nicht bestrahlte Kontrolle (37 °C) wieder. (B): Darstellung der drein unabhängigen Messungen des innerhalb von 24 h sekretierten VEGF nach Normalisierung auf die Zellzahl (A). (C): Darstellung der berechneten Mittelwerte für das innerhalb von 24 h nach Bestrahlung sekretierte VEGF, normiert auf 37 °C und die Zellzahl. Die schwarze gestrichelte Linie gibt die auf 1 gesetzte nicht bestrahlte Kontrolle (37 °C) wieder. $p \leq 0,05$ (*)

Die Bestimmung der Zellzahl 24 h nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen T_{max} zeigte eine deutliche Tendenz (Abbildung 34 A) an. Im Vergleich zur nicht Bestrahlten Kontrolle (37 °C) ergab sich für Kulturen die mit einem $T_{max} \geq 51$ °C bestrahlt wurden eine Abnahme der Gesamtzellzahl ($T_{max}=51$ °C: $0,734 \pm 0,132$, $p=0,025$; $T_{max}=59$ °C: $0,698 \pm 0,221$) verifiziert, wobei nur bei den Kulturen die mit einer T_{max} von 51 °C bestrahlt wurden eine statistisch signifikante Abnahme feststellbar war. Die ermittelten Zellzahlen wurden anschließend für die Normalisierung der VEGF-Sekretion genutzt (Abbildung 34 B). Bei dieser Art der Betrachtung zeigte sich für Kulturen die mit einem $T_{max} \geq 51$ °C bestrahlt wurden eine statistisch signifikante Zunahme an sekretiertem VEGF, während Kulturen die mit einem $T_{max} \leq 47$ °C bestrahlt wurden nur eine dezente Erhöhung feststellbar war. Für Kulturen die mit einer $T_{max}=51$ °C bestrahlt wurden ergab sich im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle eine 1,632-fache Erhöhung ($\pm 0,243$, $p=0,011$) und bei Kulturen die mit einer $T_{max}=59$ °C bestrahlt wurden war die Sekretion um das 1,502-fache ($\pm 0,256$; $p=0,027$) erhöht.

4.3.2. Expression von VEGF

In Abbildung 35 A sind beispielhafte Aufnahmen des Proteingehalts der Membranen und der korrespondierenden VEGF-Proteinbanden aufgeführt. Die Intensitäts-normierten Banden wurden anschließend auf die korrespondierende Kontrollsituation (nicht bestrahlt: 37 °C) normiert und die Werte für weitere Berechnungen genutzt (Abbildung 35 B). Die Angaben der Proteinkonzentration beziehen sich hier auf die Vermehrung in Bezug auf die nicht bestrahlte Kontrolle (37 °C) und wurden im Weiteren als -fach angegeben.

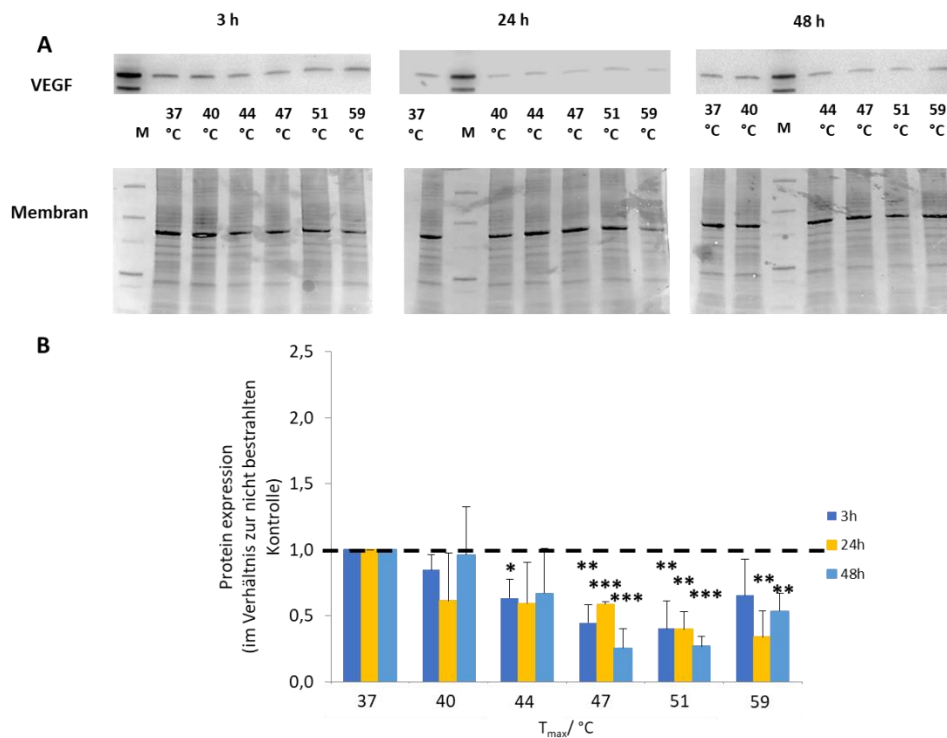


Abbildung 35: Ergebnisse des Western Blots zum Nachweis von intrazellulärem VEGF 3, 24 und 48 h nach Bestrahlung
 (A): Darstellung beispielhafter Membranen und detektierter Antikörper Banden 3, 24 und 48 h nach der Bestrahlung. Die zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) sind aufsteigend (von links nach rechts) von 37 °C (nicht bestrahlt) bis hin zu 59 °C aufgeführt. (B) Säulendiagramm der gemittelten und auf die nicht bestrahlte Kontrolle (37 °C) normierten Daten nach drei (dunkel blau), 24 (gelb) und 48 h (hell blau). Die schwarz gestrichelte Linie gibt die auf 1 gesetzte Kontrolle (37 °C) wieder. $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***)

Bei der Auswertung der Daten zeigte sich im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle (37 °C) in Kulturen die mit einer $T_{max} \geq 44$ °C bestrahlt wurden eine deutliche zeit- und temperaturabhängige Abnahme des intrazellulären VEGF (Abbildung 35 B). In Kulturen die mit einem T_{max} von 44 °C bestrahlt wurden ließ sich nur nach 3 h ein statistisch signifikanter Abfall (0,633-fach \pm 0,142; $p=0,011$) feststellen, wohingegen Kulturen, die mit einem $T_{max}=47$ °C bestrahlt wurden, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle (37 °C), zu allen untersuchten Zeitpunkten (3, 24 und 48 h) nach der Bestrahlung eine statistisch signifikante Absenkung des intrazellulären VEGF feststellen ließ (3h: 0,447-fach \pm 0,134, $p=0,002$; 24h: 0,588-fach \pm 0,018, $p=0,000002$; 48h: 0,253-fach \pm 0,147, $p=0,0009$). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Kulturen die mit einer $T_{max}=51$ °C bestrahlt wurden (3h: 0,402-fach \pm 0,21, $p=0,008$; 24h: 0,397-fach \pm 0,134, $p=0,0015$; 48h: 0,267-fach \pm 0,076, $p=0,00007$). Für Zellkulturen die mit einer zentral angelegten Maximaltemperatur von 59 °C bestrahlt wurden trat eine statistisch signifikante Abnahme an intrazellulärem VEGF erst 24 h nach

der Bestrahlung auf (24h: 0,339-fach \pm 0,197, $p=0,004$; 48h: 0,534-fach \pm 0,134, $p=0,0038$). Des Weiteren fiel auf, dass im zeitlichen Verlauf, tendenziell die niedrigste Konzentration an intrazellulärem VEGF 24 h nach der Bestrahlung auftrat, wohingegen zum selben Zeitpunkt die Menge an sekretiertem VEGF erhöht war (Abbildung 35 B; Abbildung 36).

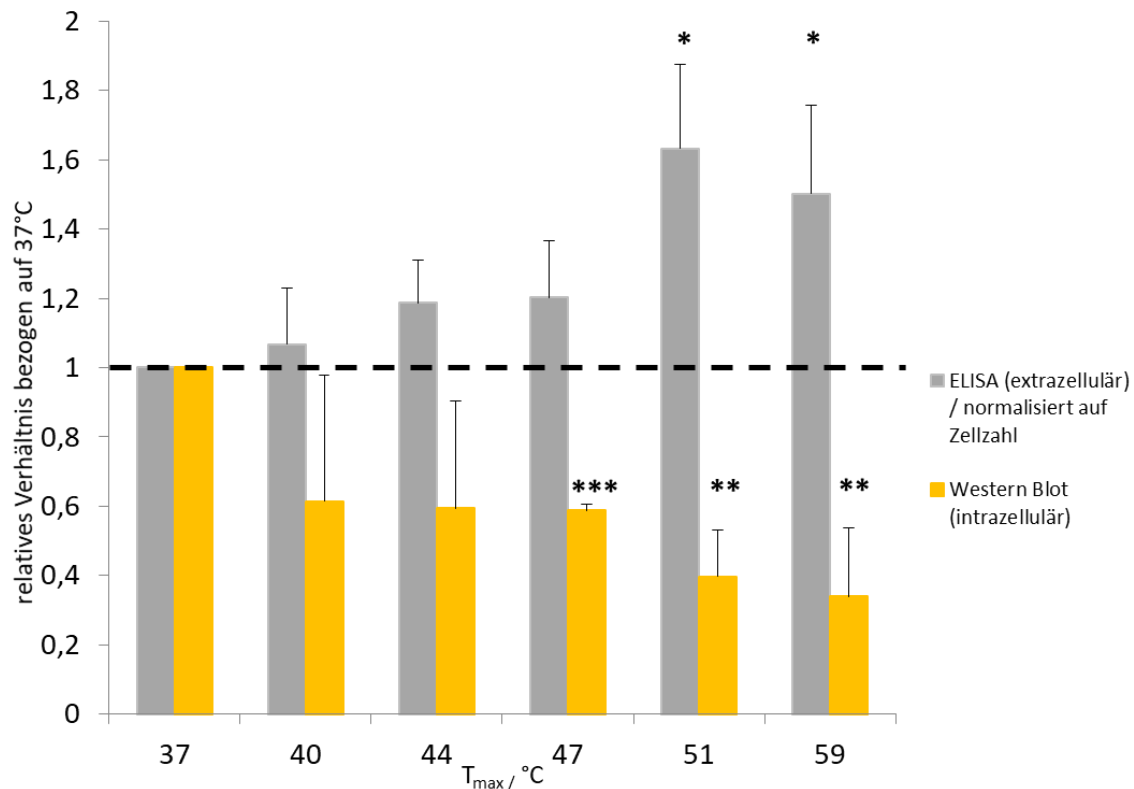


Abbildung 36: Vergleich des intrazellulären und sekretierten VEGF 24 h nach der Bestrahlung

Dargestellt sind die gemittelten Werte des relativen Verhältnisses des sekretiertem VEGF, normiert auf 37 °C und die bestimmte Zellzahl, (Abbildung 34 A) (ELISA; extrazellulär; hellgrau) und dem intrazellulär vorkommenden VEGF, normiert auf 37 °C, (Abbildung 35 B) (Western Blot; intrazellulär; gelb) 24 h nach der Bestrahlung. Die zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) sind aufsteigend (von links nach rechts) von 37 °C (nicht bestrahlt) bis hin zu 59 °C aufgeführt. Die schwarze gestrichelte Linie gibt die auf 1 gesetzte nicht bestrahlte Kontrolle (37 °C) wieder. $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***)

Ein direkter Vergleich der beiden Parameter (Abbildung 36; sekretiert grau; intrazellulär gelb) bestätigte diese Wahrnehmung. Es fiel bei dieser Art des Vergleichs zudem eine temperaturabhängige annähernd treppenförmige Abnahme an intrazellulärem VEGF, sowie eine, im gleichen Maße, zunehmende Sekretion an VEGF auf.

4.4.HSP70 Expression nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des Proteins HSP70 zunächst genutzt um nachzuweisen, dass die bestrahlten Zellkulturen auf eine Temperaturerhöhung reagieren. Da HSP70 aber auch an zellulären Schutzprozessen beteiligt ist, sollte zudem überprüft werden, ob anhand der Menge, beziehungsweise der Lokalisation des exprimierten Proteins eine Aussage über den Stoffwechselzustand der betroffenen Zellen getroffen werden könnte.

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der temperaturabhängigen HSP70 Expression wurden im Jahre 2018 bereits teilweise *Peer-Reviewed* publiziert [279].

4.4.1. Nachweis der Proteinexpression über Western Blot

Zunächst wurden Versuche durchgeführt bei denen drei, 24 und 48 h nach der Bestrahlung Zellysate angefertigt und der Proteingehalt an HSP70 bestimmt wurde (Abbildung 37). Bei der Auswertung der Daten zeigte sich im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle (37 °C) eine deutliche zeit- und temperaturabhängige Zunahme des intrazellulären HSP70 in allen bestrahlten Kulturen (Abbildung 37 B). In Kulturen die mit einem T_{max} von 47 °C bestrahlt wurden kam es nach 48 h zu einem statistisch signifikanten Anstieg (3,12-fach \pm 1,31; $p=0,048$), wohingegen Kulturen, die mit einem T_{max} von 51 °C behandelt wurden, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle (37 °C), bereits drei Stunden nach der Bestrahlung einen statistisch relevanten Anstieg an intrazellulärem HSP70 (1,32-fach \pm 0,34; $p=0,014$) zeigten. Die Überexpression erreichte nach 24 h einen Hochpunkt (7,52-fach \pm 5,83, $p=0,021$) und sank nach 48 h wieder ab (4,79-fach \pm 2,87; $p=0,015$), wobei der Wert im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle weiterhin stark erhöht blieb (Abbildung 37 B). Bei Kulturen die mit einem T_{max} von 59 °C bestrahlt wurden zeigte sich, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle, ein treppenähnlicher Anstieg der intrazellulären HSP70-Konzentration (Abbildung 37 B). Drei Stunden nach der Bestrahlung zeigte sich die bereits ein statistisch relevanter Anstieg (1,78-fach \pm 0,91, $p=0,02$), der nach 24 h (11,15-fach \pm 4,11; $p=0,00012$) und 48 h (19,03-fach \pm 2,21; $p=0,00016$) weiter anstieg. Eine Ausnahme bildeten Kulturen die mit einem T_{max} von 44 °C bestrahlt wurden, bei diesen zeigte sich drei Stunden nach der Bestrahlung, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle, eine statistisch signifikante Erniedrigung des intrazellulären HSP70 (0,78-fach \pm 0,17; $p=0,00064$)

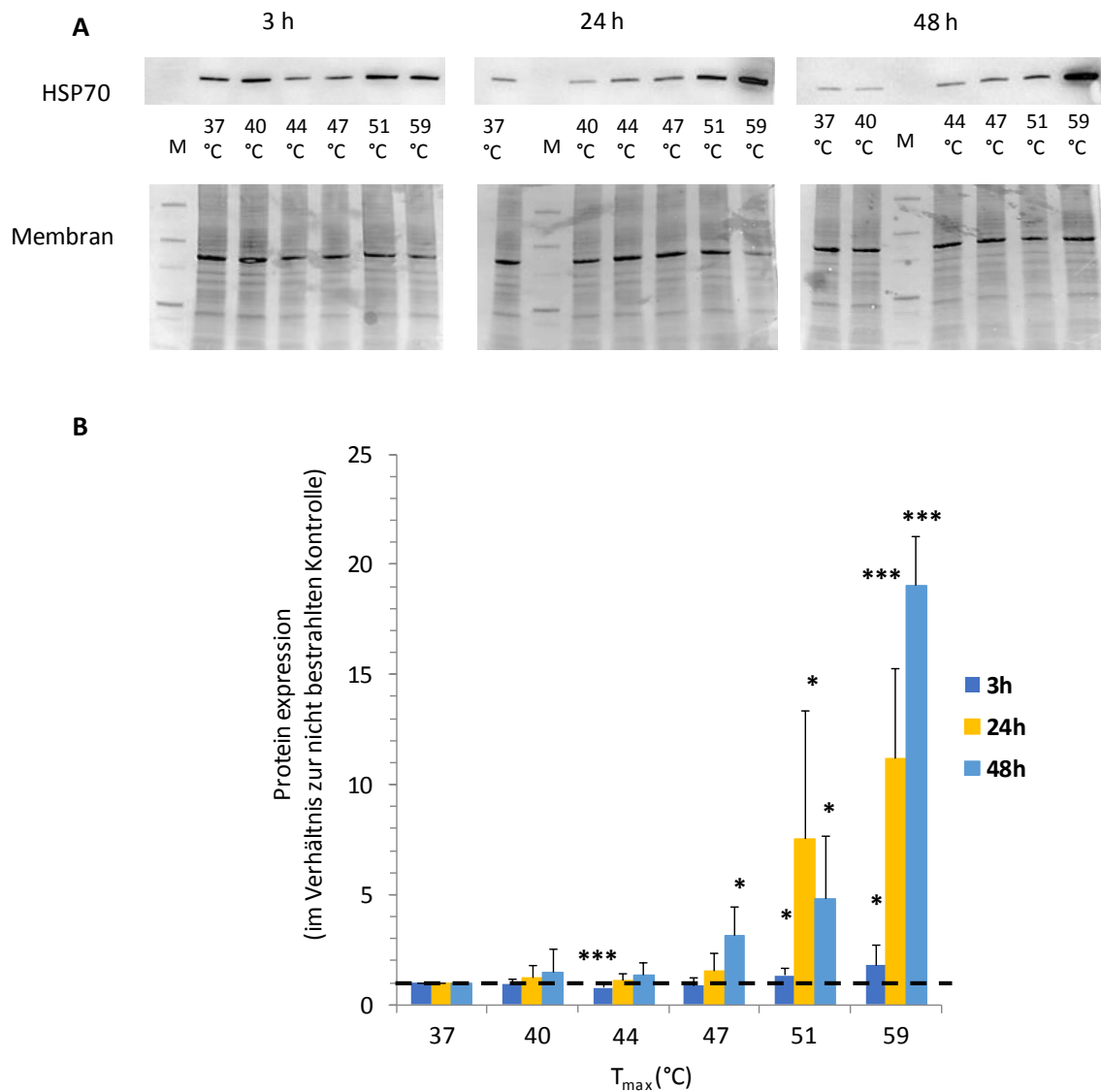


Abbildung 37: Ergebnisse der Western Blots zum Nachweis von HSP70 3, 24 und 48 h nach Bestrahlung

(A) Darstellung beispielhafter Membranen und detektierter Antikörper Banden 3, 24 und 48 h nach der Bestrahlung. Die zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) sind aufsteigend (von links nach rechts) von 37 °C (nicht bestrahlt) bis hin zu 59 °C aufgeführt. (B) Säulendiagramm der gemittelten und auf die nicht bestrahlte Kontrolle (37 °C) normierten Daten nach drei (dunkel blau), 24 (gelb) und 48 h (hell blau). Die schwarz gestrichelte Linie gibt die auf 1 gesetzte Kontrolle (37 °C) wieder. $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**); $p \leq 0,001$ (***)

Um einen genaueren Einblick in die HSP70-Expression im Zeitraum vor 24 h nach der jeweiligen Bestrahlung zu erhalten wurden weitere Experimente geplant. Bei diesen Ansätzen wurden Zellysate drei, sechs und neun Stunden nach der Bestrahlung gewonnen und mit Hilfe von Western Blots der intrazelluläre HSP70-Gehalt bestimmt (Abbildung 38).

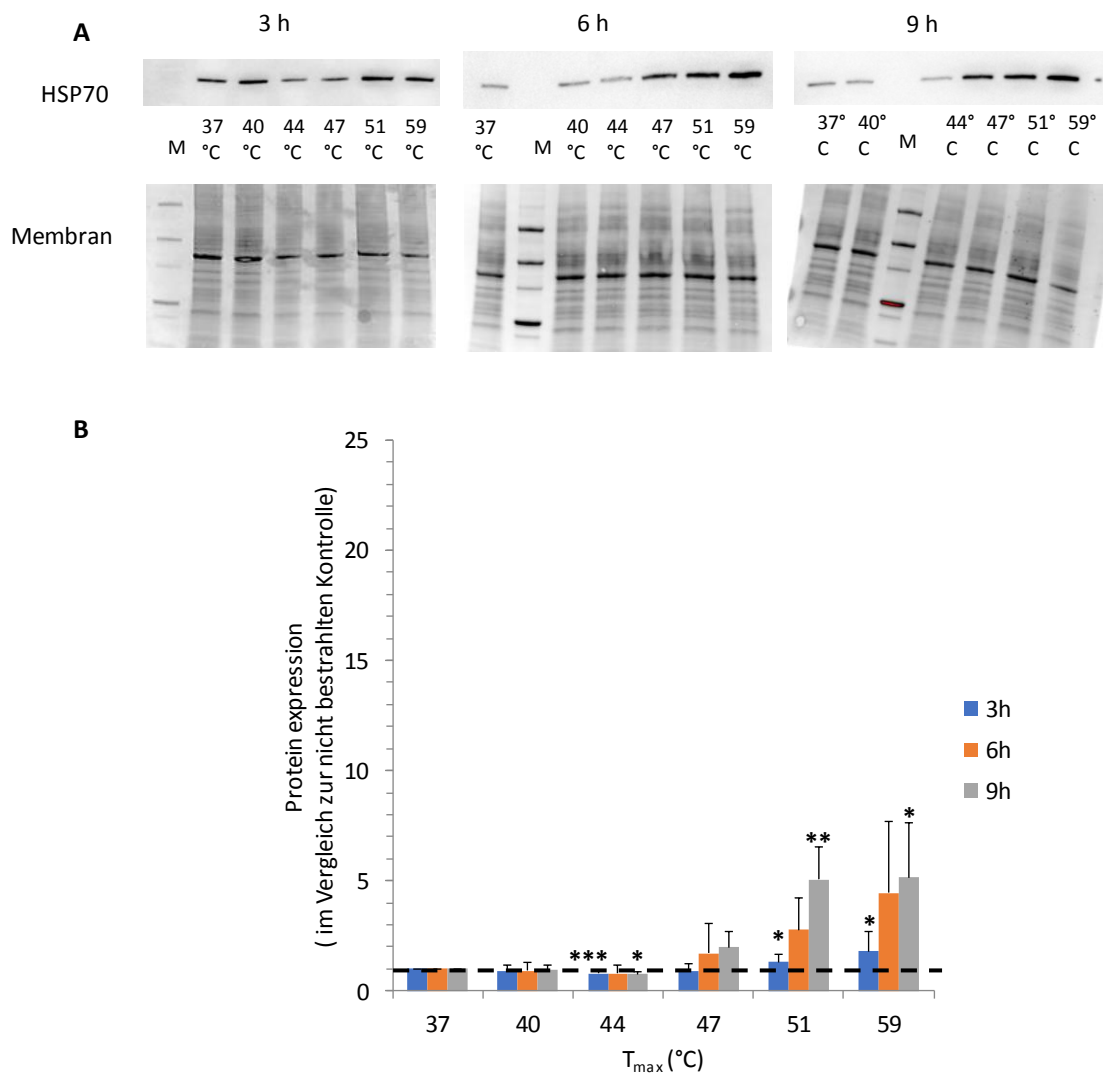


Abbildung 38: Ergebnisse der Western Blots zum Nachweis von HSP70 3, 6 und 9 h nach der Bestrahlung

(A) Darstellung beispielhafter Membranen und detektierter Antikörper Banden 3, 6 und 9 h nach der Bestrahlung. Die zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) sind aufsteigend (von links nach rechts) von 37 °C (nicht bestrahlt) bis hin zu 59 °C aufgeführt. (B) Säulendiagramm der gemittelten und auf die nicht bestrahlte Kontrolle (37 °C) normierten Daten nach drei (dunkel blau), 6 (orange) und 9 h (hell grau). Die schwarz gestrichelte Linie gibt die auf 1 gesetzte Kontrolle (37 °C) wieder. $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***)

Auch im Zeitraum von drei bis neun Stunden nach der Bestrahlung kam es bei Kulturen die mit einem $T_{max} \geq 51$ °C bestrahlt wurden, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle (37 °C), zu einer deutlichen Erhöhung des intrazellulären HSP70 (Abbildung 38 B). Hierbei ist zu erwähnen, dass die Erhöhung nach drei Stunden gleich blieb. Bei Kulturen die mit einem T_{max} von 51 °C bestrahlt wurden zeigte sich zwar nach sechs Stunden eine Erhöhung der intrazellulären HSP70-Konzentration (2,78-fach \pm 5,83), jedoch war der Wert nicht statistisch relevant. Neben der statistisch signifikanten Erhöhung nach drei Stunden (1,32-fach \pm 0,34; $p = 0,014$) war auch der Wert nach neun Stunden signifikant erhöht (5,07-fach \pm 1,48; $p = 0,0089$). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei Kulturen die mit einer T_{max} von 59 °C bestrahlt wurden. Die Erhöhung drei Stunden nach der Bestrahlung blieb gleich (1,78-fach \pm 0,91, $p = 0,02$), sechs Stunden nach der Bestrahlung stieg die intrazelluläre Konzentration zwar deutlich an, war aber nicht statistisch relevant (4,45-fach \pm 3,25) (Abbildung 38 B). Nach neun Stunden zeigte sich auch hier eine signifikante Erhöhung der intrazellulären

HSP70-Konzentration (5,15-fach \pm 2,45; $p=0,043$). Bei den Kulturen, die mit einer T_{\max} von 44 °C bestrahlt wurden zeigte sich auch im Zeitraum bis neun Stunden nach der Bestrahlung, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle, eine statistisch signifikante Erniedrigung des intrazellulären HSP70. Drei Stunden nach der Bestrahlung sank der Wert auf das 0,78-fache (\pm 0,17; $p=0,00065$) vom Kontrollwert, nach sechs Stunden war der Wert immer noch leicht erniedrigt, jedoch nicht in signifikantem Ausmaß (0,79-fach \pm 0,39; $p=0,42$). Wohingegen die Erniedrigung der intrazellulären HSP70 Konzentration neun Stunden nach der Bestrahlung statistisch relevant war (0,77-fach \pm 0,11; $p=0,019$).

Abschließend ließ sich anhand der Western Blot Ergebnisse feststellen, dass es ab einer zentral angelegten Maximaltemperatur von ≥ 47 °C zeitabhängig zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von HSP70 kam. Bei Kulturen die mit einer T_{\max} von 44°C bestrahlt wurden sank die intrazelluläre HSP70-Konzentration hingegen in Zeitraum von 3-9 h nach der Bestrahlung ab. Somit konnte von einer zeit- und temperaturabhängigen HSP70-Expression ausgegangen werden.

4.4.2. Immunzytochemischer Nachweis von HSP70

Anhand der Western Blot Ergebnisse ließ sich eine zeit- und temperaturabhängigen Überexpression von HSP70 annehmen. Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte anschließend die Frage geklärt werden ob die Expression homolog in allen Zellen der Kultur auftritt, oder ob nur bestimmte Zellen der Kultur HSP70 in starkem Ausmaß über exprimieren. Um diese Fragestellung zu klären, wurden die Kulturen bestrahlt und drei, 24, oder 48 h nach der Bestrahlung immunzytochemisch gegen HSP70 gefärbt.

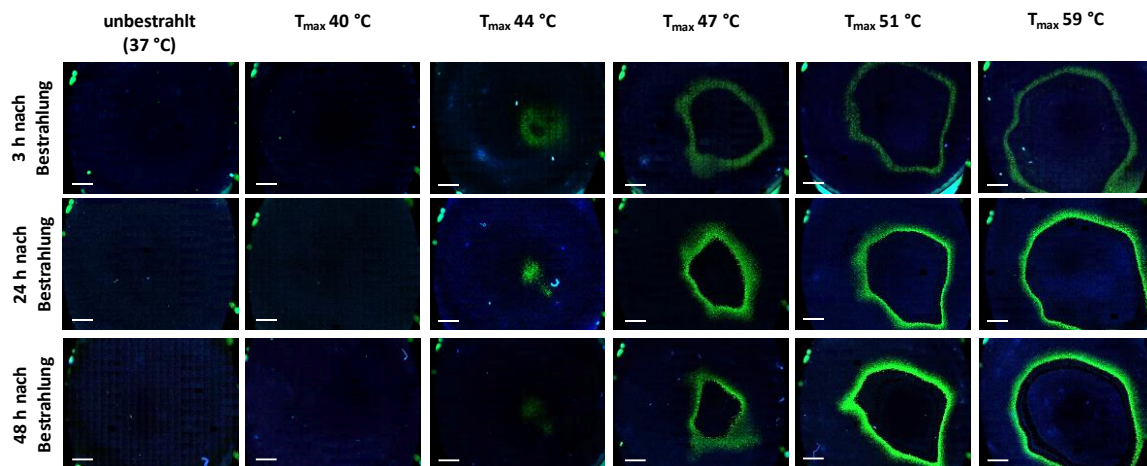


Abbildung 39: Beispielhafte Darstellung der beobachteten HSP70-Färbemuster nach der Bestrahlung

Dargestellt sind die aus Einzelbildern zusammengesetzten Übersichtsbilder der HSP70-Färbung von bestrahlten Zellkulturen (Durchmesser Zellkulturschale: 33 mm). Für die einzelnen Übersichtsbilder wurden 23 x 23 Einzelbilder mit 10-facher Vergrößerung am Mikroskop Nikon Eclipse Ti aufgenommen. Bei den aufgenommenen Kanälen handelt es sich um Alexa Fluor® 488 markiertes HSP70 (grün; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=490/525$ nm) und den Kernfarbstoff DAPI (blau; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=350/470$ nm). Die zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) sind aufsteigend von nicht bestrahlt (37 °C, links) bis 59 °C (rechts, die unterschiedlichen Zeitpunkte, zu denen die Färbungen durchgeführt wurden sind aufsteigend von 3 h nach der Bestrahlung (oben) bis 48h nach der Bestrahlung (unten) aufgeführt. Maßstab: 5 mm.

Bei der Betrachtung der einzelnen Übersichtsbilder (Abbildung 39) ließ sich erkennen, dass nicht die gesamte Kultur zur Überexpression von HSP70 beiträgt. Es zeigte sich ein deutliches Färbemuster, zunächst fiel auf, dass bei Kulturen die mit einem $T_{max} \geq 47$ °C bestrahlt wurden, im zentralen Bereich eine ungefärbte Fläche auftrat die durch einen visuell erkennbaren Riss im Zellrasen von dem gefärbten Bereich abgegrenzt wurde. Dieser ungefärbte Bereich deckte sich gut mit den Arealen apoptotischer und toter Zellen die in vorherigen Experimenten dokumentiert wurden (4.2.2; Abbildung 31) und wurde als geschädigt angenommen. Unabhängig von der Zeit nach der Bestrahlung ließ sich bei angelegten $T_{max} \geq 44$ °C eine Ringstruktur, außerhalb des geschädigten Kulturbereiches erkennen, die sich bei steigendem T_{max} in Richtung der Zellkulturschalen-Peripherie aufweitete (Abbildung 39; obere/ mittlere/ untere Spalte von links nach rechts). Bei Kulturen die mit einem $T_{max} \leq 40$ °C bestrahlt wurden zeigte sich keine erkennbare Färbung (Abbildung 39; obere/mittlere/untere Spalte; 37 °C, 40 °C). Vergleich man anschließend die Färbemuster der einzelnen T_{max} im zeitlichen Verlauf, so fiel auf, dass die Ringstruktur auch im zeitlichen Verlauf nach außen propagierte und die Fluoreszenzintensität scheinbar zunahm (Abbildung 39; T_{max} 59 °C von oben (3h) nach unten (48h)).

Zur genaueren Beurteilung der Fluoreszenzintensität der einzelnen Färbungen in Bezug auf angelegte T_{max} und Zeit nach der Bestrahlung wurden die Fluoreszenz über eine definierte Fläche bestimmt (Abbildung 40). Die zu analysierende Fläche wurde so gewählt, dass sie innerhalb des Areals erhöhter HSP70-Expression lag. Auf diese Weise konnte die Fluoreszenzintensität unabhängig von der Anzahl beteiligter Zellen bestimmt und eine semi-quantitative Aussage über eine Lokalisations-Abhängige HSP70-Expression getroffen werden

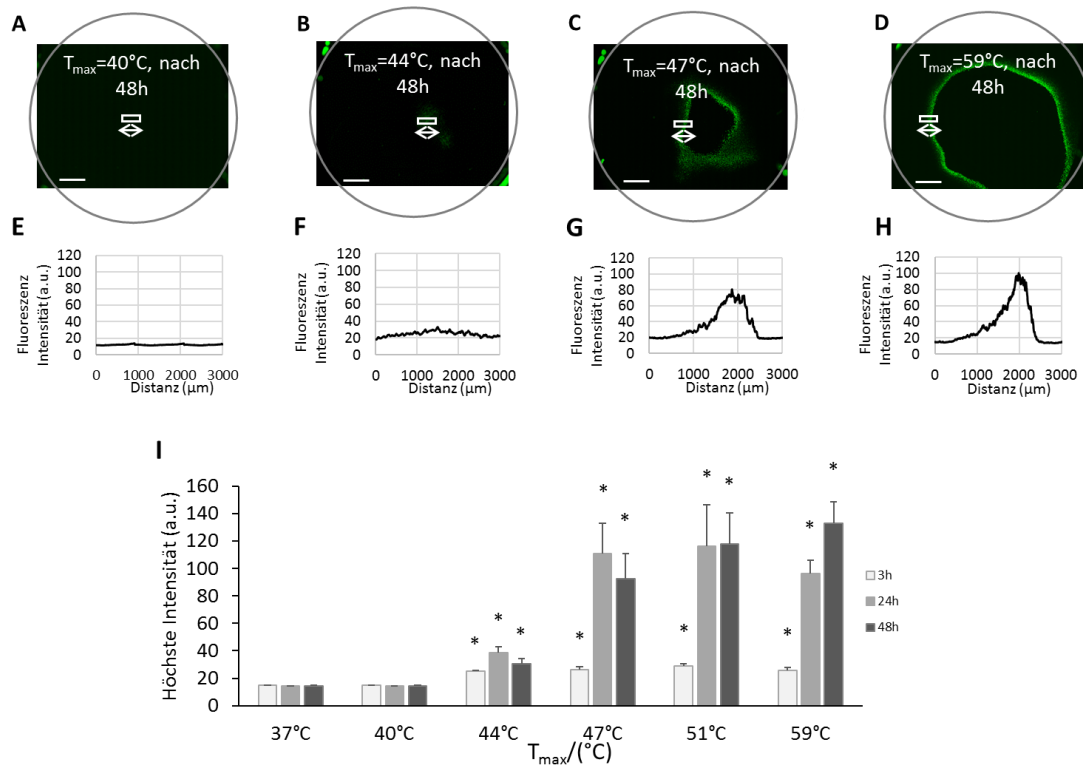


Abbildung 40: Auswertung der Fluoreszenzintensität der HSP70-Färbung über eine definierte Fläche

(A-D) Immunfluoreszenz-Färbungen auf HSP70 48 h nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) (A: $T_{max}=40^{\circ}\text{C}$; B: $T_{max}=44^{\circ}\text{C}$; C: $T_{max}=47^{\circ}\text{C}$; D: $T_{max}=59^{\circ}\text{C}$). Der graue Ring stellt die Kulturschale auf der kultiviert wurde (Durchmesser: 33 mm) dar. Maßstab: 5 mm. (E-H): Beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzintensitätsprofile innerhalb der eingezeichneten weißen Kästchen (horizontale Orientierung angegeben durch Doppelpfeil) aus den in A-D dargestellten Fluoreszenzaufnahmen (A/E; B/F; C/G; D/H). Im Bereich letaler Bestrahlungen ($T_{max} \geq 47^{\circ}\text{C}$; G, H) steigt die Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den subletalen Bestrahlungen ($T_{max} \leq 44^{\circ}\text{C}$; E, F) an. (I): Vergleich der unter E-H bestimmten Hochpunkte der HSP70-Fluoreszenzintensität nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen T_{max} und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung. Die Intensität der HSP70 Färbung nach der Bestrahlung mit letalen T_{max} ($T_{max}=47^{\circ}\text{C}$, 51°C , 59°C) ist, im Vergleich zu subletalen T_{max} ($T_{max}=44^{\circ}\text{C}$) statistisch signifikant erhöht. $p \leq 0,05$ (*)

Bei der Auswertung fiel eine klare Unterscheidbarkeit subletaler ($T_{max}=37^{\circ}\text{C}$, 40°C , 44°C) und letaler ($T_{max}=47^{\circ}\text{C}$, 51°C , 59°C) zentral angelegter Maximaltemperaturen (T_{max}) auf (Abbildung 40; E-I). Während bei Kulturen, die mit einer $T_{max} \leq 44^{\circ}\text{C}$ bestrahlt wurden die Fluoreszenzintensität kaum zunahm, zeigte sich bei Kulturen die mit einem $T_{max} \geq 47^{\circ}\text{C}$ bestrahlt wurden eine deutliche Erhöhung der gemessenen Fluoreszenzintensität (Abbildung 40 I).

Bei genauerer Betrachtung der Zellen am Rand des Schädigungsbereiches (Abbildung 41) fielen Zellen mit unterschiedlicher Morphologie auf.

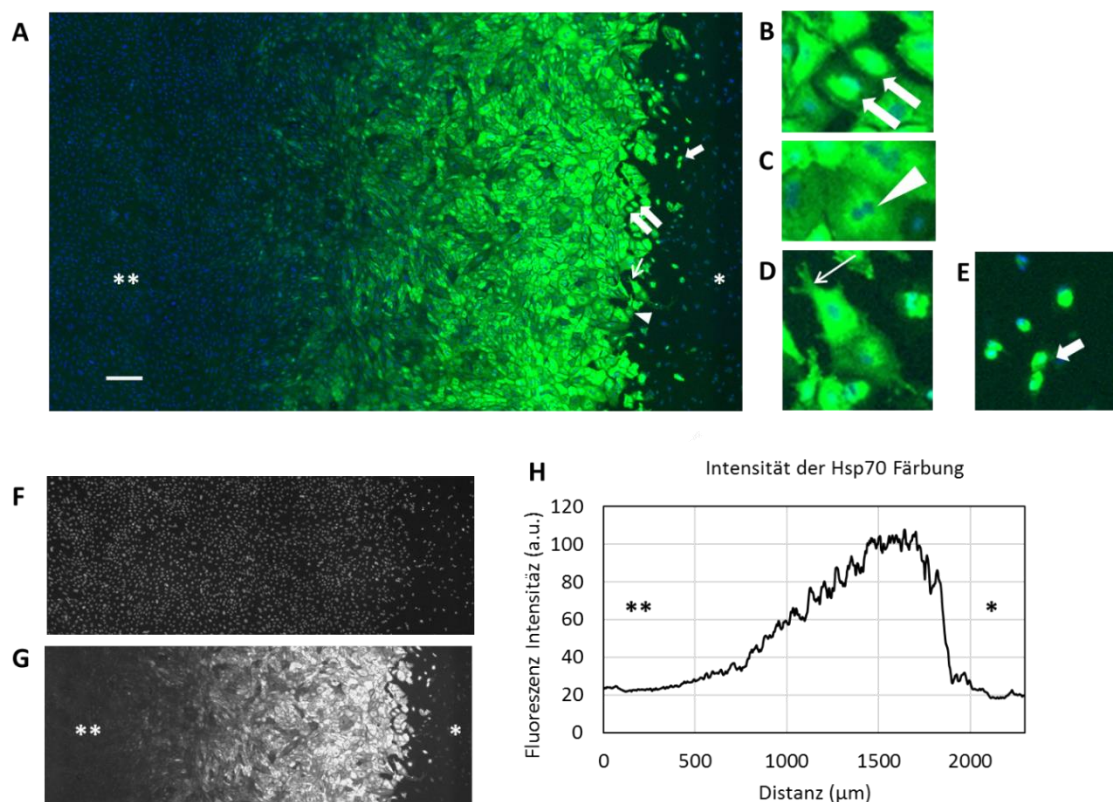


Abbildung 41: Detaillierte Darstellung der HSP70 Immunfluoreszenz im Bereich der Schädigung

(A): Vergrößerte Darstellung der Fluoreszenzaufnahme an der Grenze des geschädigten Bereichs 24 h nach der Bestrahlung mit einer zentral angelegten Maximaltemperatur (T_{\max}) von 59 °C. Das Bild setzt sich zusammen aus der HSP70-Färbung (grün) und der Zellkernfärbung (Hoechst 33342). Die rechte Seite (*) stellt den Bereich der Schädigung an zentraler Position, die linke (**) die Peripherie der Zellkulturschale dar. Die meisten Zellen zeigten eine starke HSP70 Färbung im Zytoplasma, einige Zellen zeigten jedoch eine Färbung des Zellkerns (Doppelpfeil; B), einen doppelten Zellkern (Pfeilspitze; C), oder Zellkörper mit Filopodien (dünner Pfeil, D). Zudem fielen kugelige Zellen auf (einzelner Pfeil, E) deren Morphologie Anzeichen für Apoptose zeigte. Maßstab: 100 μm . (F-G) Darstellung der separierten Fluoreszenzintensitäten der Zellkernfärbung (F) und der HSP70-Färbung (G). Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität der HSP70-Färbung (H) von links nach rechts über das Bild (G). Die dargestellten Sterne (*, **) entsprechen den Sternen in (A) und (G).

Die meisten Zellen zeigte eine starke HSP70-Färbung im Zytoplasma (Abbildung 41 A), einige Zellen zeigten jedoch eine Färbung des Zellkerns (Abbildung 41 B; Doppelpfeil), einen doppelten Zellkern (Abbildung 41 C; Pfeilspitze), oder Zellkörper mit Filopodien (Abbildung 41 D; dünner Pfeil). Zudem fielen kugelige Zellen auf (Abbildung 41 E; einzelner Pfeil) deren Morphologie Anzeichen für Apoptose zeigte. Zellen die diese morphologischen Besonderheiten zeigten befanden sich im Bereich hoher Fluoreszenzintensität (Abbildung 41 A; G; H; markiert durch einzelnen Stern (*)), der an den durch die Bestrahlung geschädigten Bereich angrenzte.

Die gefärbten Zellkulturschalen (Abbildung 39) wurden zudem genutzt um die Temperaturbereiche für HSP70-Überexpression zu berechnen. Hierfür wurden die Radien der inneren und äußeren Grenze des beobachteten Rings bei allen zentral angelegten Maximaltemperaturen ($T_{\max}=40$ °C,

44 °C, 47 °C, 51 °C, 59 °C) zu einem Messzeitpunkt (3, 24, 48 h) gemessen, gemittelt und unter Verwendung der Daten aus Tabelle 4, auf Formel 9 angewendet. Als Grenzen der Radian wurden Bereiche gewählt in dem die Fluoreszenzintensität, im Vergleich zu der der benachbarten Zellen, um das 2-fache erhöht war. So konnte der Temperaturbereich bestimmt werden der bei einer Bestrahlung von 10 s (T_{10s}) zu einer Überexpression von HSP70 führt (Abbildung 42; Box Plot).

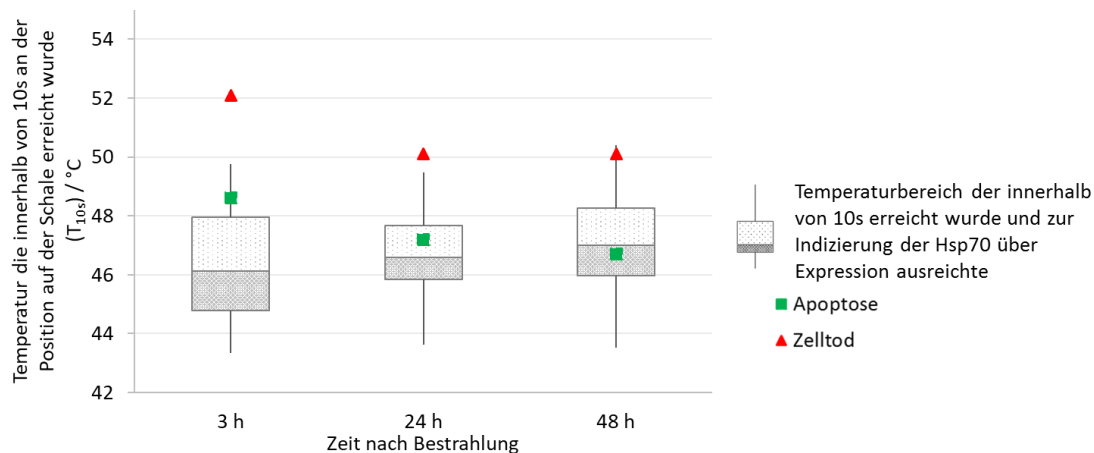


Abbildung 42: Darstellung des Temperaturbereichs in dem HSP70 überexprimiert wurde im Vergleich zur Schwellenwerttemperatur für Apoptose und kompletten Zelltod

Der Temperaturbereich der innerhalb einer Bestrahlung von 10s (T_{10s}) für das Hervorrufen der HSP70 Expression, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung, ausreichte wurde anhand der Immunfluoreszenzfärbungen ermittelt (Boxplot). Als Areal mit „HSP70-Überexpression“ wurde der Bereich an Zellen definiert in denen die Fluoreszenzintensität um das zwei-fache erhöht war (Abbildung 40). Die Berechnung wurde mittels Formel 9, unter Verwendung der Daten aus Tabelle 4, berechnet. Die Schwellenwert Temperaturen (T_{10s}) für Apoptose (grün) und kompletten Zelltod (rot) zum gleichen Zeitpunkt nach der Bestrahlung (Daten entnommen aus Abbildung 32) wurden zusätzlich angegeben.

Um die T_{10s} Schwellenwerte für HSP70-Überexpression (Abbildung 42; Box Plot) mit den Schwellenwerten für Apoptose (Abbildung 42; grünes Quadrat) und kompletten Zelltod (Abbildung 42; rotes Dreieck) vergleichen zu können, wurden diese Daten aus Abbildung 32 (4.2.2) entnommen und in Abbildung 42 zusätzlich aufgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass die Überexpression von HSP70 an den drei untersuchten Zeitpunkten (3, 24, 48 h) in einem relativ ähnlichen Temperaturbereich auftrat.

3 h nach der Bestrahlung ergab sich in den untersuchten Kulturen eine mittlere T_{10s} von 46,12 °C (Minimum 43,35 °C; erstes Quartil 44,79 °C; drittes Quartil 47,95 °C; Maximum 49,75 °C), 24 h nach der Bestrahlung eine mittlere T_{10s} von 46,59 °C (Minimum 43,63 °C; erstes Quartil 45,85 °C; drittes Quartil 47,68 °C; Maximum 49,48 °C) und 48 h nach der Bestrahlung ein mittlerer T_{10s} von 46,99 °C (Minimum 43,53 °C; erstes Quartil 45,96 °C; drittes Quartil 48,26 °C; Maximum 50,41 °C) (Abbildung 42; Box Plot). Beim Vergleich der T_{10s} Daten für die Schwellenwerte für die HSP70-Überexpression mit den T_{10s} Schwellenwerten für Apoptose (Abbildung 42; grünes Quadrat) und kompletten Zelltod (Abbildung 42; rotes Dreieck) so zeigte sich, dass 3h nach der Bestrahlung nur ein geringer Anteil der Zellen die HSP70 überexprimierten ebenso von apoptotischen Vorgängen betroffen sein könnte, wohingegen es nach 24 und 48 h zu einer deutlichen Überschneidung des T_{10s} für HSP70-Überexpression und dem T_{10s} Schwellenwert für Apoptose kam (Abbildung 42;

HSP70: Box Plot; Apoptose: grünes Quadrat). Die T_{10s} Schwellenwerte für kompletten Zelltod überschritten sich zu keinem der untersuchten Vorgänge deutlich mit dem T_{10s} Bereich in dem es zu einer HSP70 Überexpression kam (Abbildung 42; HSP70: Box Plot; kompletter Zelltod: rotes Dreieck).

4.5. Zelluläre Proliferation nach der Bestrahlung primärer RPE-Kulturen

Zunächst sollte überprüft werden, ob transiente Hyperthermie zu zellulärer Proliferation führen kann. Hierfür wurden Zellkulturen der P2-Generation bestrahlt. Bei den Maximaltemperaturen (T_{max}) die an zentraler Position der Zellkulturschale angelegt wurden handelte es sich um 40°C, 44°C, 47°C, 51°C und 59°C.

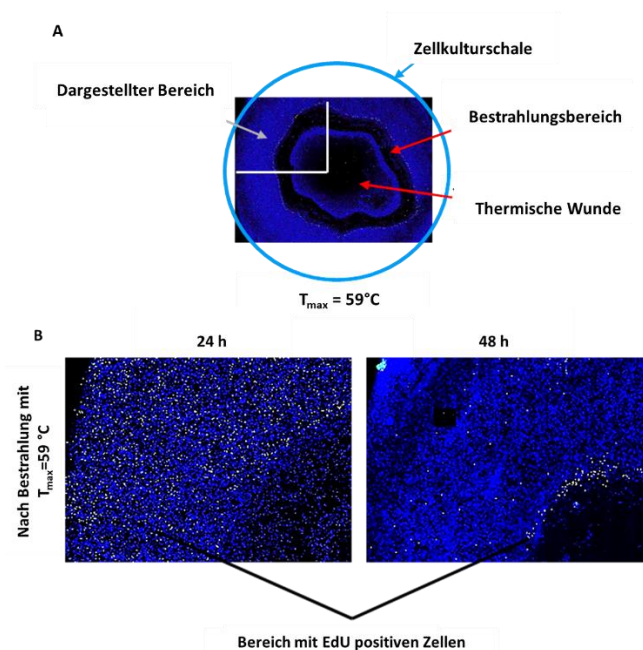


Abbildung 43: Beispielhafte Darstellung der beobachteten Färbemuster EdU-positiver Zellen nach der Bestrahlung
 (A): Beispielhafte Darstellung eines Übersichtsbildes der EdU-Färbung von bestrahlten Zellkulturen (Durchmesser Zellkulturschale: 33 mm). Für die einzelnen Übersichtsbilder wurden 23x23 Einzelbilder mit 10-facher Vergrößerung am Mikroskop Nikon Eclipse Ti aufgenommen. Bei den aufgenommenen Kanälen handelt es sich um Alexa Fluor® 647 markiertes EdU (rot/violett; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=628 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}/692 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$) und den Kernfarbstoff DAPI (blau; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=350/470 \text{ nm}$). (B): Detaillierte Darstellung des in Abbildung 43 A eingezeichneten Ausschnitts (weißes Quadrat) nach 24 und 48 h. Die EdU-positiven Zellen sind hier, für eine Verbesserung des Kontrastes, in weiß dargestellt.

Bei der Auswertung der zusammengesetzten Bilder (Abbildung 43 A) zeigte sich, wie bei den immunzytochemischen Färbungen gegen HSP70 (Abbildung 39), bei Kulturen die mit einer $T_{max} \geq 47^\circ\text{C}$ bestrahlt wurden in zentraler Position ein ringartiger Riss im Zellrasen. Der Bereich innerhalb des Risses deckte sich auch hier gut mit den Arealen apoptotischer und toter Zellen (4.2.2; Abbildung 31) und wurde als geschädigt angenommen. Die Auswertung der zellulären Proliferation ergab, dass 24 h nach der Bestrahlung Proliferation im peripheren Bereich der Zellkulturschale auftrat, wohingegen sich nach 48 h direkt am Rand des geschädigten Bereichs Zellen teilten (Abbildung 43 B). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch drei Stunden nach der Bestrahlung, allerdings

waren hier weniger Zellen EdU-Positiv. Dies galt für alle Kulturen, die mit zentral $T_{\max} \geq 47^\circ\text{C}$ bestrahlt wurden.

Des Weiteren wurden die gefärbten Zellkulturschalen genutzt um die Schwellenwert Temperaturen für zelluläre Proliferation zu berechnen. Für die Berechnung wurden die inneren Radien aller zentral angelegten Maximaltemperaturen ($T_{\max} = 40^\circ\text{C}, 44^\circ\text{C}, 47^\circ\text{C}, 51^\circ\text{C}, 59^\circ\text{C}$) zu einem Messzeitpunkt (3, 24, 48 h) gemittelt und auf Formel 9, unter Verwendung der Daten aus Tabelle 4, angewendet. So konnte die Grenztemperatur berechnet werden die ausreichte um drei, 24 oder 48 h nach einer Bestrahlung von zehn Sekunden (T_{10s}) Prozesse der Zellteilung zu fördern (Abbildung 44).

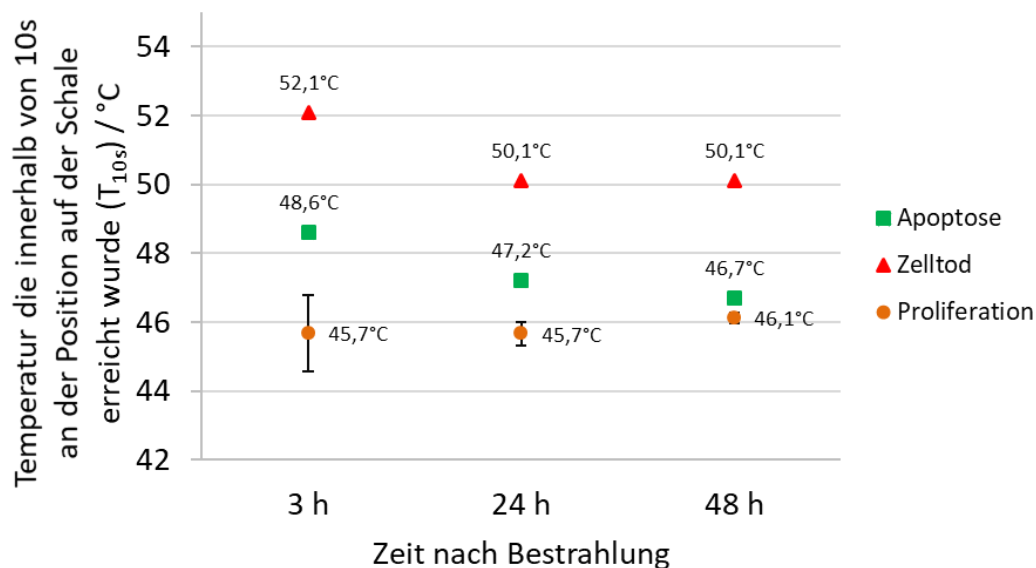


Abbildung 44: Darstellung der Schwellenwert-Temperatur für proliferative Zellen, im Vergleich zur Schwellenwert-Temperatur für Apoptose und kompletten Zelltod

Der Temperaturbereich der innerhalb einer Bestrahlung von 10s (T_{10s}) Proliferation bei Zellen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung, hervorruft wurde anhand der EdU-Färbungen ermittelt (Abbildung 43; orange Kugel). Als Messpunkt wurde der Bereich an Zellen definiert in dem die ersten EdU-positiven Zellen auftraten. Die Berechnung wurde anhand der Steigung aus Abbildung 27 berechnet. Die Schwellenwert Temperaturen (T_{10s}) für Apoptose (grünes Quadrat) und kompletten Zelltod (rotes Dreieck) zum gleichen Zeitpunkt nach der Bestrahlung (Daten entnommen aus Abbildung 32) wurden zusätzlich angegeben. Die tatsächlichen Mittelwerte für die einzelnen Vorkommnisse (Apoptose, Zelltod, Proliferation) sind als Dezimalzahlen angegeben.

Die Berechnung der T_{10s} für die Stimulation der Proliferation (Abbildung 44; orange Kugel) ergab sich nach drei Stunden eine Schwellenwert-Temperatur von $45,7^\circ\text{C} \pm 1,13$, nach 24 h von $45,7^\circ\text{C} \pm 0,36$ und 48 h nach der Bestrahlung von $46,1^\circ\text{C} \pm 0,15$. Anhand des Vergleichs zur Schwellenwert-Temperatur für Apoptose (Abbildung 44; grünes Quadrat) und kompletten Zelltod (Abbildung 44; rotes Dreieck) ließ sich vermuten, dass Zellen die proliferieren im zeitlichen Verlauf bis 48 h nach der Bestrahlung nicht in die Apoptose gingen. Zwar näherten sich die Schwellenwert-Temperaturen für apoptotische Veränderungen und Proliferation im Zeitverlauf bis zu 48 h an, jedoch kam es hier zu keiner Überlagerung der berechneten T_{10s} -Werte. Vergleich man anschließend alle ermittelten T_{10s} -Werte miteinander (Abbildung 45) so zeigte sich, dass die berechneten Schwellenwert-Temperaturen für zelluläre Proliferation (Abbildung 45; orangene Kugel) nach 3,

24 und 48 h innerhalb des Bereiches lagen in dem es zu einer HSP70 Überexpression kam (Abbildung 45; Box Plot).

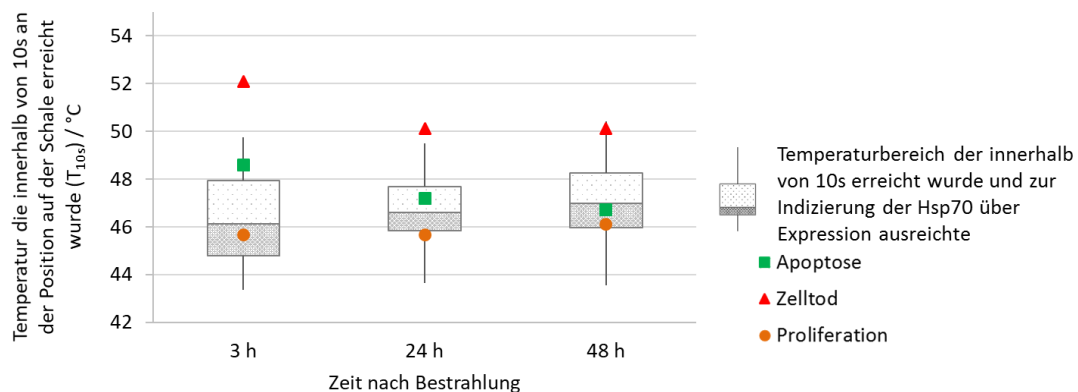


Abbildung 45: Darstellung der Schwellenwert-Temperatur für proliferative Zellen im Vergleich zur Schwellenwert-Temperatur für Apoptose und kompletten Zelltod sowie der Überexpression von HSP70

Der Temperaturbereich der innerhalb einer Bestrahlung von 10s (T_{10s}) Proliferation bei Zellen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung, hervorruft wurde anhand der EdU-Färbungen ermittelt (Abbildung 43; orange Kugel). Als Messpunkt wurde der Bereich an Zellen definiert in dem die ersten EdU-positiven Zellen auftraten. Die Berechnung wurde anhand der Steigung aus Abbildung 27 berechnet. Die Schwellenwert Temperaturen (T_{10s}) für Apoptose (grünes Quadrat) und kompletten Zelltod (rotes Dreieck) zum gleichen Zeitpunkt nach der Bestrahlung (Daten entnommen aus Abbildung 32), sowie die Auswertung der HSP70 Überexpression (Daten entnommen aus Abbildung 42) dargestellt.

Bei dem Vergleich der T_{10s} Schwellenwert-Temperaturen für zelluläre Proliferation (Abbildung 45; orangene Kugel) mit den T_{10s} -Werten für HSP70-Überexpression (Abbildung 45; Box Plot) zeigte sich, dass die Schwellenwert-Temperaturen für Proliferation zu allen untersuchten Zeitpunkten (3, 24, 48 h) im Bereich des ersten Quartils der T_{10s} -Box Plots der HSP70-Überexpression lagen. Drei Stunden nach der Bestrahlung zeigte sich hier die deutlichste Überschneidung, wohingegen die Überschneidung nach 24 und 48 h weniger stark ausgeprägt war.

4.6. Einfluss subletaler Hyperthermie auf den Wundverschluss eines Gewebsdefektes

Die Untersuchung des Wundverschlusses eines Gewebsdefektes nach der Bestrahlung erfolgte anhand von zwei unabhängigen Experimenten. Zunächst wurde die Zellfront-Geschwindigkeit (CFV) (Abbildung 24) anhand gewonnener Konfluenz-Daten ermittelt. Es wurden nicht bestrahlte und Kulturen die mit einer zentral angelegten Maximaltemperatur (T_{max}) von 43 °C bestrahlt wurden verwendet.

Aus den gewonnenen Konfluenz-Daten wurde anhand der Formel 8 die CFV für die jeweilige Kultur berechnet, die gewonnenen Daten wurden gemittelt und die statistische Aussagekraft mittels des Student'schen t-Tests bestimmt (Abbildung 46 A). Die Daten wurden zudem genutzt um die Dauer bis zum kompletten Wundverschluss der mechanischen Wunde zu berechnen (Abbildung 46 B).

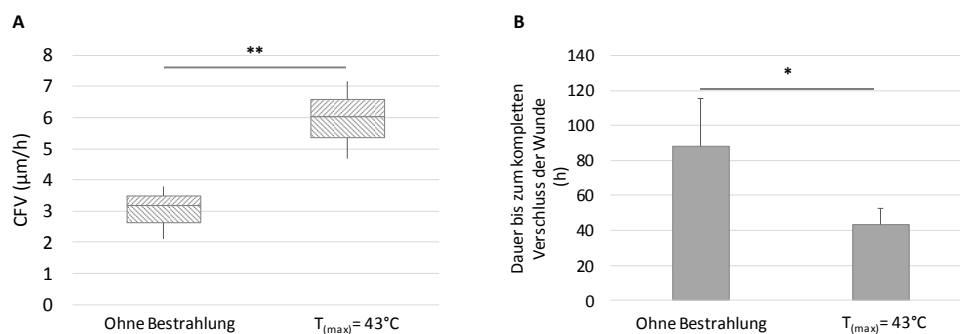


Abbildung 46: Darstellung der berechneten CFV und der berechneten Dauer bis zum kompletten Wundverschluss

(A): Box Plot Darstellung der Wundverschluss-Geschwindigkeit (CFV) von nicht bestrahlten Kulturen und Kulturen die mit einer zentral angelegten Maximaltemperatur (T_{max}) von 34 °C bestrahlt wurden. Die CFV wurden anhand der *Center Piece Approximation* (CPA; Abbildung 24A) von Kulturen ermittelt, die für 60 h mittels Videomikroskopie (*Live Cell Analyser JuLI™ FL*, NanoEnTek Inc.) dokumentiert wurden. Es zeigte sich hierbei eine Verdoppelung der CFV für bestrahlte Kulturen. (B): Die berechnete CFV wurde genutzt um die Dauer bis zum vollständigen Verschluss der mechanischen Wunde zu berechnen. Hierbei ergab sich eine Halbierung der Dauer des Wundverschlusses für bestrahlte Kulturen. $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**).

Die Berechnung der Box Plot Verteilung ergab eine Verdoppelung der CFV bei Kulturen die mit einer T_{max} von 43 °C bestrahlt wurden. Bei nicht bestrahlte Kulturen ergab sich hier ein Median von 3,18 µm/h (Minimum 2,1; erstes Quartil 2,64; drittes Quartil 3,48; Maximum 3,78) und für Kulturen die mit einer T_{max} von 43 °C bestrahlt wurden ein Median von 6,02 µm/h (Minimum 4,7; erstes Quartil 5,36; drittes Quartil 6,59; Maximum 7,16) (Abbildung 46 A). Der Unterschied zwischen den beiden Bedingungen erwies sich als hoch signifikant ($p=0,014$). Die Berechnung der Dauer bis zum kompletten Verschluss der mechanisch erzeugten Wunde ergab eine Halbierung der benötigten Zeit (Abbildung 46 B). Hierbei ergab sich für nicht bestrahlte Kulturen eine Wundverschlussdauer von 87,92 h \pm 27,68 und für Kulturen die mit einer T_{max} von 43 °C bestrahlt wurden von 43,21 h \pm 9,29. Der Vergleich der beiden Bedingungen erwies sich als signifikant ($p=0,028$).

Anschließend erfolgte eine statische Bestimmung des Wundverschlusses. Die gemessenen Daten wurden anhand der Vergrößerung (10x) und der bekannten initialen Wunde (500 μm) berechnet. Beispielhafte Aufnahmen sind in Abbildung 47 aufgeführt. Die gewählten zentral angelegten Maximaltemperaturen (T_{max}) entsprechen hierbei nicht den ansonsten gewählten Parametern. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Kulturen auf gläsernen Kulturschalen kultiviert wurden, bei denen der gläserne Teil etwa einen Millimeter unterhalb des Plastikbodens lag. Messungen ergaben hier einer zentral angelegten Leistung von 5,0 W eine T_{max} von 40 °C und bei einer Leistung von 10,7 W eine T_{max} von 45 °C.

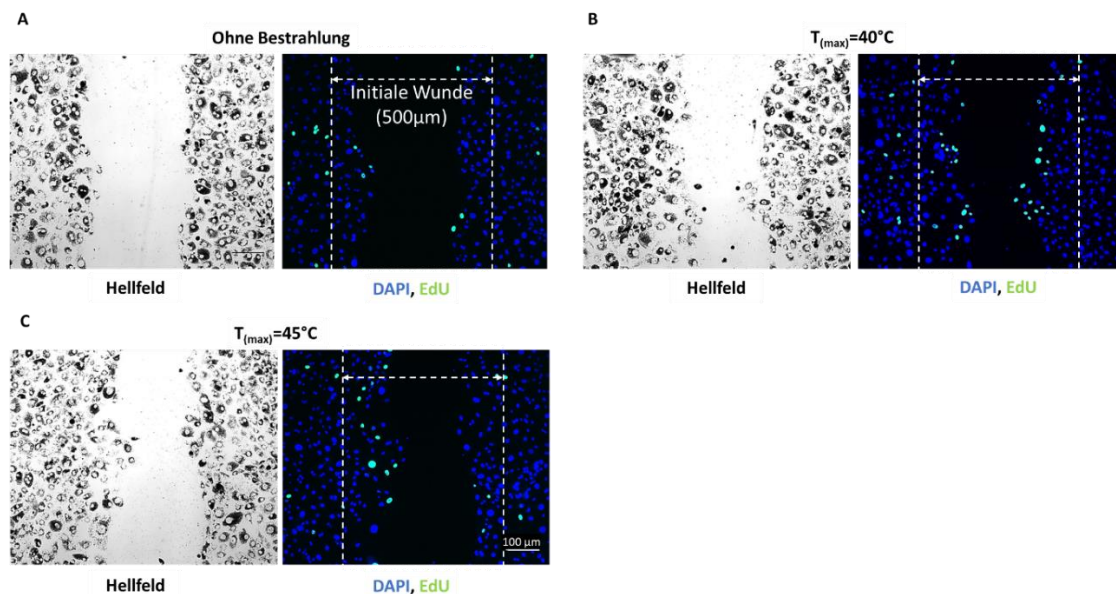


Abbildung 47: Beispielhafte Darstellung der mikroskopisch Dokumentierten Wundbilder 24 h nach der Bestrahlung
 Darstellung beispielhafter Aufnahmen von Kulturen 24 h nachdem das *Insert* aus nicht bestrahlten (A) Kulturen oder Kulturen die mit einer zentral angelegten Maximaltemperatur (T_{max}) von 40 °C (B) oder 45 °C (C) entfernt wurden. Bei den abgebildeten Aufnahmen handelt es sich um Einzelbilder, die mit 10-facher Vergrößerung am Mikroskop Nikon Eclipse Ti aufgenommen wurden. Bei den aufgenommenen Kanälen handelt es sich um Alexa Fluor® 488 markiertes EdU (grün; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=490/525$ nm) und den Kernfarbstoff DAPI (blau; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=350/470$ nm), sowie das Hellfeldbild der jeweiligen Aufnahme. Der Bereich der initialen Wunde (500 μm) ist durch gestrichelte Linien dargestellt. Maßstab 100 μm .

Bereits aus der subjektiven Betrachtung der Bilder (Abbildung 47 A-C) ergab sich 24 h nach der Bestrahlung ein deutlich unterscheidbares Ergebnis. Zunächst fiel auf, dass sich der Bereich innerhalb der initialen Wunde (Abbildung 47 A-C; weiß gestrichelte Linien) deutlich verringert war. Des Weiteren konnten mehr EdU positive Zellen (Abbildung 47 A-C: grün) in Kulturen die bestrahlt wurden (Abbildung 47 B; C) beobachtet werden. Die Berechnung dieser beobachteten Phänomene sind in Abbildung 48 dargestellt.

Für die Breite der Wunde nach 24 h in Kulturen die nicht bestrahlt wurden ergab sich hier ein Median von 256,08 μm (Minimum 117,39; erstes Quartil 232,534; drittes Quartil 281,09; Maximum 380,36), für Kulturen die mit einer T_{max} von 40 °C bestrahlt wurde ein Median von 166,52 μm (Minimum 68,97; erstes Quartil 135,37; drittes Quartil 199,35; Maximum 291,38) und in Kulturen die mit einem T_{max} von 45 °C bestrahlt wurden ein Median von 178,79 μm (Minimum 52,14; erstes

Quartil 134,11; drittes Quartil 220,01; Maximum 318,01). Im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle verringerte sich die Wundbreite höchst signifikant kleiner ($T_{\max}=40\text{ °C}$: $p\leq 0,0001$; $T_{\max}=45\text{ °C}$, $p\leq 0,0001$) (Abbildung 48 A).

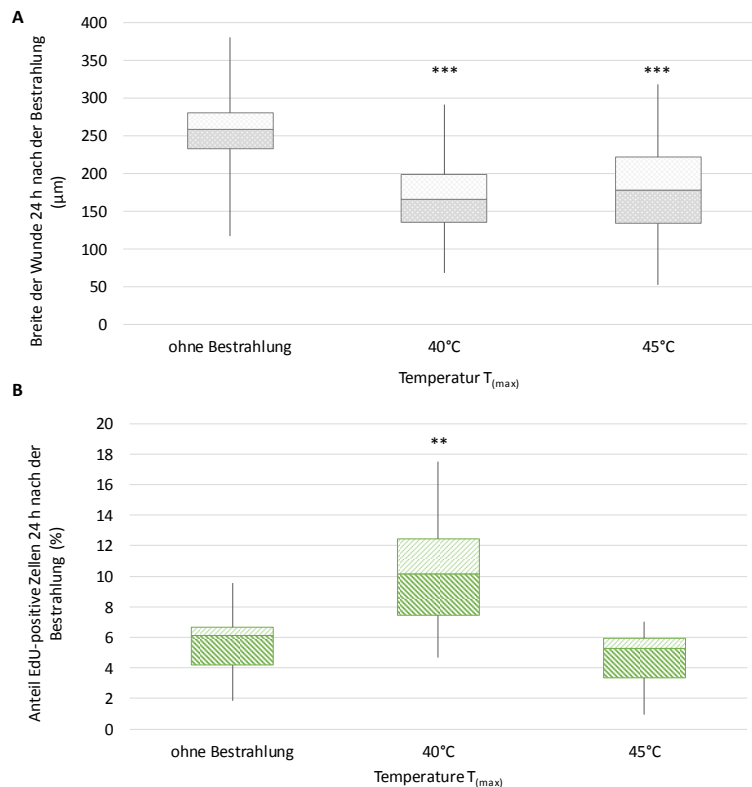


Abbildung 48: Darstellung der gemessenen Wundbreite und dem Anteil an EdU-positiven Zellen nach der Bestrahlung (A): Darstellung der gemittelten Wundbreiten als Box Plot, 24 h nachdem der Einsatz entfernt wurde. Verglichen werden hier nicht bestrahlte Kulturen und Kulturen die mit einer zentral angelegten Maximaltemperatur (T_{\max}) von 40 °C und 45 °C bestrahlt wurden. Die Ursprüngliche Breite der Wunde betrug 500 µm (Abbildung 47 A-C). (B): Box Plot-Darstellung des gemittelten Anteils EdU-positiver Zellen an den ausgewerteten mikroskopischen Aufnahmen. Verglichen werden hier nicht bestrahlte Kulturen und Kulturen die mit einer T_{\max} von 40 °C und 45 °C bestrahlt wurden. $p\leq 0,01$ (**); $p\leq 0,001$ (***)).

Des Weiteren wurde der Anteil EdU positiver Zellen berücksichtigt. Die händische Auszählung der EdU positiven Zellen innerhalb des aufgenommenen Sichtfelds (Abbildung 48 B) wurde als prozentualer Anteil aller im Sichtfeld befindlichen Zellen bestimmt. Für nicht bestrahlte Kulturen ergab sich hier ein Median von 6,10 % (Minimum 1,82; erstes Quartil 4,18; drittes Quartil 6,66; Maximum 9,57), für Kulturen die mit einer T_{\max} von 40 °C bestrahlt wurde ein Median von 10,15 % (Minimum 4,70; erstes Quartil 7,46; drittes Quartil 12,43; Maximum 17,52) und in Kulturen die mit einem T_{\max} von 45 °C bestrahlt wurden ein Median von 5,31 % (Minimum 0,96; erstes Quartil 3,37; drittes Quartil 5,96; Maximum 7,00) (Abbildung 48 B). Wobei der Anteil EdU-positiver Zellen im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle bei Kulturen die mit einer $T_{\max}=40\text{ °C}$ bestrahlt wurden hoch signifikant erhöht war ($p=0,01$).

5. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkung kurzzeitiger Temperaturerhöhungen auf Zellen des RPEs untersucht. In vorhergehenden Arbeiten konnten bereits einen Effekt von Temperatur auf den zellulären Umgang mit oxidativem Stress [10, 29, 280], Motilität, Wundheilung und zelluläre Proliferation [65, 281], die Aktivierung endoplasmatischer Vorgänge wie der ungefalteten Proteinantwort (UPR) [270], die Expression molekularer Chaperone [271, 272], den intrazellulären enzymbasierten Transport [268], sowie das Auftreten apoptotischer Veränderungen [30] nachgewiesen werden. Der Einfluss von verschiedenen Temperaturen auf RPE-Zellen wurde jedoch noch nicht eindeutig geklärt und tiefgreifend untersucht.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen handelte es sich um primäre RPE-Kulturen, die aus enukleierten Schweineaugen gewonnen wurden. Nach der Bestrahlung der Zellkulturen erfolgte die Testung unterschiedlichen Parameter wie das Auftreten apoptotischer Veränderungen, die Expression und Sekretion von Proteinen (HSP70, VEGF), sowie die zelluläre Proliferation und der Wundverschluss nach mechanischer Verletzung der Kulturen.

Die erzielten Ergebnisse werden im Folgenden eingehend diskutiert.

5.1. Laserparameter

Durch den im Bestrahlungsaufbau verwendeten Thuliumlaser konnte eine pigmentierungs-unabhängige Erwärmung der primären porzinen RPE-Kulturen erreicht werden. Die vom Laser emittierte Wellenlänge von 1940 nm liegt in einem Bereich in dem Wasser hochgradig absorbiert, wodurch die Strahlung komplett im wässrigen Medium der Zellkultur absorbiert wurde. Durch die Wahl der Bestrahlungsparameter konnten zudem photochemische Effekte ausgeschlossen werden. In bereits publizierten Arbeiten, bei denen Laser mit Wellenlängen genutzt wurden, die in den Melanosomen absorbiert werden, musste die ungleichmäßige Pigmentierung der Zellen durch den Einsatz schwarzer Papiere, die unter die Zellkulturschalen gelegt wurden, ausgeglichen werden [282]. In anderen Arbeiten wurden die Zellkulturen vor der Bestrahlung mit Melanin angefütert, um einen gleichmäßigen Melanin-Gehalt zu gewährleisten [283]. Durch die vollständige Absorption des Laserlichtes im wässrigen Medium konnte bei dem verwendeten Aufbau davon ausgegangen werden, dass die Temperaturerhöhung ausschließlich durch thermische Diffusion zustande kam.

Die Validierung der erreichten Maximaltemperaturen (T_{\max}) an zentraler Position der Zellkulturschale musste bei dieser Methode unabhängig von der Bestrahlung der Zellkulturschalen erfolgen, da aufgrund der Einhaltung steriler Arbeitstechniken keine Thermolemente zur Überprüfung der anfallenden Temperaturänderung (ΔT) eingesetzt werden konnten. Die Messung der tatsächlichen Maximaltemperaturen (T_{\max}) erfolgte somit separat, wodurch sich die genutzten Laserleistungen ergaben. Diese wurden in regelmäßigen Abständen nachgemessen und gegebenenfalls eine Anpassung der Leistung vorgenommen, um das Erreichen der gewünschten T_{\max} garantieren zu können. Für die Temperaturkalibrierung wurden Zellkulturschalen ohne adhärenzte Zellen genutzt und das berechnete Volumen von 1200 μl , auf 37 °C vorgewärmtes, Zellkulturmedium auf

diese gegeben. Die Messung erfolgte an 21 radial angeordneten Punkten auf Bodenebene mit Hilfe eines Thermoelements. OCT-Messungen der Füllhöhe des Mediums an zentraler Position der Zellkulturschale ergab eine Abweichung von etwa 58 μm im Vergleich zwischen Zellkulturschalen mit kultivierten Zellen (935 μm) und Kulturschalen ohne adhärente Zellen (877 μm). Der Unterschied in der Höhe der Flüssigkeitssäule lässt sich möglicherweise anhand von Veränderungen der Oberflächenspannung der Flüssigkeit und Kapillarität der Zellkulturschale durch die Zellen erklären. Die Abweichung der Füllhöhe birgt Möglichkeiten für die Abweichungen zwischen der ohne Zellen gemessenen Temperatur sowie der auf Zellebene erreichten Temperatur. Von daher wäre hier eine Weiterentwicklung der Messmethode zur Temperaturkalibrierung während der Bestrahlung der Zellkulturen wünschenswert. Eine mögliche Alternative bieten hierbei die simultane Aufnahme der Temperaturentwicklung über die Oberfläche mittels Infrarot-Bildgebung (Thermographie) [27, 284]. Um eine ortsunabhängige Bestrahlung mit zeitgleicher Messung der erreichten Temperatur unter sterilen Bedingungen, also ohne das Öffnen der Zellkulturschale, zu ermöglichen wurde kürzlich im Institut für biomedizinische Optik eine optoakustische Methode realisiert. Bei diesem Ansatz erfolgt die Temperaturmessung mit Hilfe eines Messkopfes, welcher außerhalb der Zellkulturschale angebracht werden kann. Erste Vergleiche der optoakustisch vermittelten Temperaturmessung mit konventionellen Messungen durch Thermoelemente wiesen eine hohe Auflösbarkeit der lokal auftretenden Temperaturänderungen auf [285].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein gleichmäßiges Bestrahlungsprofil (Spotdurchmesser: 35 mm) gewählt, das durch thermische Diffusion zu einer gaußförmigen Temperaturverteilung über die Zellkulturschale führte. Die Temperaturverteilung konnte durch Messungen der lokalen Temperaturen während der Bestrahlung bestätigt werden. Der gewählte Bestrahlungsmodus erlaubte eine Untersuchung der zellulären Reaktionen der Zellen die sich in den Grenzbereichen um stark erhöhte Temperaturspots befanden. Auf diese Weise konnte die Reaktion des Gewebes um einen einzelnen Laserspot, wie er bei der Behandlung des Augenhintergrunds entsteht, simuliert werden.

Eine gleichmäßige Temperaturverteilung über die Kulturschale könnte genauere Rückschlüsse auf die zelluläre Reaktion in Bezug auf distinkte Temperaturen ermöglichen. Ein Bestrahlungsaufbau, der eine homogene Temperaturverteilung über die Zellkulturschale erzeugt wird derzeit realisiert. Die Homogenisierung des Gaußstrahlprofils erfolgte hierbei durch eine plankonvexe Linse aus Borosilikat-Kronglas.

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bestrahlungsaufbau ermöglichte eine genaue Kontrolle von Dauer und Höhe (ΔT) der gewünschten Temperaturänderung. In vorausgehenden Publikationen wurden teilweise Heizplatten, Wasserbäder oder Mikrowellen genutzt um das Gewebe zu erwärmen [261, 286, 287]. Die Dauer der angelegten Hyperthermie betrug bei diesen Ansätzen etwa 30 Minuten. Im Vergleich zu diesen Ansätzen bietet der im Rahmen dieser Arbeit genutzte Ansatz den Vorteil, dass der Anstieg und Abfall der angelegten Maximaltemperatur genau bestimmt und variiert werden konnte, wodurch eine genauere Untersuchung temperatur- und zeitabhängiger Veränderungen möglich war.

5.2. Zelltod nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen

Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass der durch den thermischen Laser induzierte Zelltod nicht nur den sofortigen (frühen) Zelltod, der vermutlich durch nekrotische Veränderungen verursacht wird, induzieren kann, sondern auch in geringem Maß zu einem apoptotischen Zelltod führt. Diese Art des Zelltods ist wesentlich langsamer und kann bis zu 48 h dauern. Dieses Ergebnis ließ die Annahme zu, dass transiente Hyperthermie nicht nur direkt nach der Bestrahlung zum Absterben von Zellen führt, sondern auch einen langfristigen Effekt auf die zelluläre Vitalität haben kann.

Hyperthermie kann zur vermehrten Denaturierung einzelner oder mehrerer Proteine innerhalb kurzer Zeit führen, wobei der Denaturierungsgrad stark von der tatsächlichen Temperaturänderung (ΔT) und ihrer Dauer abhängt [27, 260, 283]. Denkbare Faktoren, die einen entscheidenden Einfluss auf die zelluläre Reaktion haben könnten, sind mannigfaltig. Einen grundlegenden Einfluss könnte die Funktionalität beziehungsweise die Stabilität des ER haben [288]. Das ER spielt eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf fehlgefaltete Proteine durch die Steuerung der ungefalteten Proteinantwort (UPR). Fallen zu viele fehlerhafte Proteine auf einmal an gehen die betroffenen Zellen in die Apoptose [270]. Die Kapazität des ER könnte hierbei entscheidend für das Überleben der betroffenen Zellen sein. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass mitochondriale Vorschädigungen einen Einfluss auf früheres Eintreten in apoptotische Prozesse haben könnten [289, 290]. Diese könnten durch oxidativen Stress begünstigt werden [291-293]. Insbesondere Veränderungen die während des Alterungsprozesses der RPE-Zellen auftreten haben massive Auswirkungen auf apoptotische Reaktionen der Zellen [294]. Juvenile und adoleszente RPE-Zellen exprimieren unter physiologischen Bedingungen große Mengen antiapoptotischer und entzündungshemmender Faktoren, durch die die Zellen vor schädlichen Einflüssen geschützt werden [295-298]. Im Laufe der Zeit kommt es zu Änderungen in der posttranslationalen Modifikation des Tumorsuppressor-Gens p53. Es wird vermutet, dass diese Verschiebung die p53-abhängigen Apoptose begünstigen könnte [294, 295]. Da es sich bei den hier verwendeten Kulturen nicht um stabile, sondern um primäre Zellkulturen die direkt nach der Schlachtung aus enukleierten Schweineaugen gewonnen wurden, handelte konnten Alterungseffekte ausgeschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit diente der Nachweis von Apoptose und Nekrose nach transientser Hyperthermie der Einordnung der unterschiedlichen zentral angelegten T_{max} in das Schema subletal (nicht tödlich) und letal (tödlich). Es wurden Kulturen der P2-Generation verwendet und diese bestrahlt. Für den Nachweis apoptotischer Vorgänge in Kulturen nach transientser thermischer Erwärmung wurden die Substanzen FITC-Annexin-V und Ethidium Homodimer III (EthD-III) verwendet. Für die Bestimmung des subletalen, beziehungsweise letalen Temperaturbereich wurden Messungen am Durchflusszytometer durchgeführt. Insbesondere bei Kulturen die mit $T_{max} \geq 47^\circ\text{C}$ bestrahlt wurden kam es sowohl nach drei als auch nach 24h, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle, zu einer signifikanten Abnahme des Anteils lebender Zellen. Diese Ergebnisse ließen eine Unterteilung zu, wodurch $T_{max} \leq 47^\circ\text{C}$ als subletal und $T_{max} \geq 47^\circ\text{C}$ als letal angenommen werden konnten.

Zusätzlich wurden adhärenzte Zellkulturen genutzt um die Schwellenwerttemperaturen für Apoptose und kompletten Zelltod zu bestimmen. Die ermittelten Schwellenwerttemperaturen nach einer Bestrahlung von 10 s für Apoptose lagen zwischen $48,6^\circ\text{C} \pm 1,8^\circ\text{C}$ (3 h) und $46,7^\circ\text{C} \pm 0,9^\circ\text{C}$ (48 h) und für kompletten Zelltod zwischen $52,9^\circ\text{C} \pm 0,6^\circ\text{C}$ (3 h) und $50,7^\circ\text{C} \pm 1,4^\circ\text{C}$ (48 h).

Wie bereits erwähnt hängt die Schädigung des RPE-Gewebes durch Laserbestrahlung stark von der Höhe der einwirkenden Temperatur und ihrer Dauer ab. Im klinischen Zusammenhang werden zumeist höhere Temperaturen im Gewebe angestrebt. So lag die von Brinkmann et al. gemessene Temperatur, die bei der Behandlung von Patienten zu einer milden Koagulation der Retina führt, zwischen 70- 85 °C nach einer Bestrahlung für 200 ms [23]. Allerdings kam es bei dieser Art der Bestrahlung zu einer starken Schädigung des RPE-Gewebes. Sramke et al. konnten in Mausversuchen eine Schwellenwerttemperatur bei einer Bestrahlungsdauer von 100 ms von 57 °C für apoptotische Veränderungen im RPE-Gewebe darstellen [64]. Bei dem Vergleich die klinischen und experimentellen Ansätze anderer Forschungsgruppen ist zu beachten, dass bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Versuchen die physiologischen Nachbargewebe der RPE-Zellen wie die neuronale Retina oder die Aderhaut fehlten. Wodurch die tatsächliche Aussagekraft der Ergebnisse in Bezug auf klinische Applikationen begrenzt ist, da es unter physiologischen Bedingungen durch das Zusammenspiel mit den umliegenden Geweben zu einem dreidimensionalen Abtransport der anfallenden Temperatur kommen würde. Auch durch die Annahme, dass die Schädigung des RPE-Gewebes durch Laserbestrahlung nicht nur von der tatsächlichen Höhe der einwirkenden Temperatur und ihrer Dauer abhängt [27, 260, 283], ist ein exakter Vergleich der Ergebnisse schwierig.

Trotz der genannten Einschränkungen des Versuchsaufbaus sollten weitere Studien durchgeführt werden, um die genauen Mechanismen und die Kinetik des temperaturinduzierten Zelltods in RPE-Geweben tiefgreifender zu untersuchen. Auf diese Weise sollten neue Erkenntnisse gefunden werden, welche als Orientierungspunkte auf dem Weg zu einer temperaturgesteuerten Hyperthermie-Therapie des RPEs genutzt werden könnten.

5.3.Expression und Sekretion von VEGF nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen

Im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen des Augenhintergrundes liegt ein Hauptaugenmerk auf dem Wachstumsfaktor VEGF [141]. VEGF wird auf der basalen Seite von den Zellen des RPE-Gewebes sekretiert [3]. Der Faktor schützt unter physiologischen Bedingungen die Endothelzellen der Aderhaut vor Apoptose [38] und erhält den Aufbau sowie die Permeabilität des RPEs [39]. Unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer Hochregulation von VEGF, wodurch eine Neubildung von Blutgefäßen begünstigt werden kann [11, 12, 40, 41]. Die Reduktion der VEGF-Konzentration im Auge stellt derzeit den Goldstandard in der Therapie der fAMD, dem DMÖ und der DR dar [41, 156]. Abseits der pro-angiogenetischen Eigenschaften von VEGF spielt der Wachstumsfaktor eine entscheidende Rolle für die Funktionalität des RPE-Gewebes [38, 39], wodurch der Einsatz der Medikamente infrage gestellt wurde [161, 162]. Eine klinische Langzeitstudie aus dem Jahr 2015 belegte das Auftreten von Atrophie des RPE-Gewebes unter langfristiger Gabe von anti-VEGF Medikation [163].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung transientser Hyperthermie auf die Sekretion und Expression von VEGF untersucht. Die Bestimmung der Menge an sekretiertem VEGF in RPE-Zellkulturen nach transientser Erwärmung erfolgte anhand von ELISA-Tests. Es wurden Kulturen der P2-Generation verwendet und diese mit dem Bestrahlungsaufbau bestrahlt.

Bei der Bewertung der sekretierten Mengen an VEGF ließen sich in den gemittelten Werten zunächst keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle feststellen. Aufgrund der beobachteten Zelltodraten, die in den Zellkulturen nach der Bestrahlung auftraten, wurde zusätzlich die Zellzahl der untersuchten Kulturen bestimmt. Dieser Schritt diente dazu etwaige Unterschiede in der tatsächlichen Zellzahl ausgleichen zu können. Die bestimmten Zellzahlen bestätigten die erhöhten Zelltodraten und es konnte eine deutliche temperaturabhängige Abnahme der Zellzahl gezeigt werden. Nach der Normierung auf die bestimmte Gesamtzellzahl stieg die sekretierte Menge an VEGF bei $T_{\max} \geq 51$ °C innerhalb von 24 h nach der Bestrahlung signifikant an. Eine signifikante Erhöhung der VEGF Sekretion als Reaktion auf Hitzestimuli konnte auch von anderen Forschungsgruppen gezeigt werden [47, 261]. Eine mögliche Erklärung für die temperaturabhängige VEGF Sekretion kann in den Sekretionsmechanismen des Proteins gefunden werden. Die Sekretion von VEGF hängt stark von der Freisetzung des Ions Ca^{2+} ab [299]. Intrazelluläre Kalziumströme stellen eine der ersten Reaktion von Zellen auf Erwärmung dar und wird durch die Öffnung temperaursensitiver Kanäle, den TRPV-1-Kanälen, gesteuert [261, 263, 300, 301]. Diese Kanäle öffnen innerhalb eines Temperaturbereiches von 43 °C-53 °C [300]. Es wird zudem vermutet, dass die Freisetzung von VEGF stark von dem S 100 Kalzium-bindenden Protein B (S100B) abhängt [302, 303].

Bei $T_{\max} \leq 47$ °C kam es zu keiner statistisch relevanten Erhöhung an VEGF im Zellkulturüberstand. Auch nach der Berücksichtigung der tatsächlichen Zellzahl der Kultur traten bei diesen Temperaturen keine statistisch relevanten Änderungen auf. Diese Ergebnisse deckten sich gut mit den im oberen Teil diskutierten Arbeiten, da diese von Temperaturen im letalen Bereich ausgingen. Bei der Bewertung der Ergebnisse muss zudem der Versuchsaufbau berücksichtigt werden. Die Aktivierung der thermosensitiven TRPV-1-Kanäle tritt ab einer Temperatur von 43 °C auf [300], somit könnte erwartet werden, dass auch $T_{\max} = 43$ °C zu einer Stimulation der VEGF Sekretion führt. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bestrahlungsaufbau führte jedoch zu einer gaußförmigen Temperaturerhöhung in den bestrahlten Kulturen. Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass nur ein relativ kleiner Anteil der Zellkultur der zentralgelegten Maximaltemperatur ausgesetzt waren. Und somit nur in wenigen Zellen der Gesamtkultur die benötigte Temperatur für eine Aktivierung der thermosensitiven TRPV1-Kanäle erreicht wurde. Diese Fragestellung könnte mit dem unter 5.1 beschriebenen neuen Versuchsaufbau mit Flat-Top Bestrahlungsprofil genauer untersucht werden.

Die Aufgaben die VEGF auf die Funktionalität der RPE-Zellen hat sind mannigfaltig. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Faktor wichtige autokrine Funktionen erfüllt [3, 38, 39] und eine Depletion des VEGFs durch Antagonisten zu einem verschlechterten Umgang mit zellulärem Stress führen könnte [29, 162].

Des Weiteren erfolgte eine Untersuchung der intrazellulären Proteinkonzentration an VEGF über Western Blot. Betrachtet man die Ergebnisse der VEGF Expression, also den intrazellulären Proteingehalt, so zeigte sich ein Interessantes Ergebnis. Bereits 3 h nach der Bestrahlung kam es bei Kulturen die mit einer $T_{\max} \geq 47$ °C behandelt wurden, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle (37 °C), zu einer signifikanten Erniedrigung des intrazellulären VEGF. Die erniedrigten Werte blieben innerhalb des beobachteten Zeitraums von 48 h bestehen. Bei einer $T_{\max} = 43$ °C trat nur nach drei Stunden eine statistisch relevante Reduktion des intrazellulären VEGF auf. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass sich die intrazelluläre Menge an VEGF im zeitlichen Verlauf, nach

einer Hyperthermie mit $T_{\max}=43\text{ °C}$, an das Niveau der nicht bestrahlten Kontrolle anglich. Bei Kulturen die mit $T_{\max}\leq 43\text{ °C}$ bestrahlt wurden ließ sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung feststellen.

Da die ELISA-Testungen auf sekretiertes VEGF mit denselben Zellkulturen wie die Western Blots nach 24 h erfolgten konnten diese Ergebnisse direkt miteinander verglichen werden (Abbildung 36). Hierbei zeigte sich mit steigender T_{\max} eine treppenartige Zunahme der VEGF Sekretion, die Abnahme des intrazellulären VEGF folgte in annähernd gleichem Ausmaß. Die Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die Abnahme an intrazellulärem VEGF mit der Sekretion des Proteins zusammenhing. Da die Erniedrigung allerdings über 48 h bestehen blieb (Abbildung 35), konnte zudem davon ausgegangen werden, dass transiente Hyperthermie innerhalb der ersten 48 h nach der Bestrahlung nicht zur Steigerung der VEGF-Produktion führte. Wodurch wiederum vermutet werden konnte, dass im weiteren Verlauf die VEGF-Sekretion nicht weiter steigen würde.

Die Frage, die in diesem Zusammenhang offen bleibt ist, wie lange der lokale Einfluss der Zunahme von sekretiertem VEGF aus überlebenden RPE-Zellen bestehen bleibt. Der ermittelte Wert war, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle, um das 1,5-fache erhöht. In der Literatur wird die VEGF-Konzentration im Glaskörper unter pathologischen ischämischen Bedingungen durchschnittlich als fünfmal so hoch wie der Wert der nicht bestrahlten Kontrollsituation angegeben [304-306]. Im Vergleich zu diesen Ergebnissen war die in dieser Studie bestimmte Menge an sekretiertem VEGF nach letaler Bestrahlung signifikant erniedrigt. Diese Annahme lässt die Vermutung zu, dass der im Rahmen dieser Arbeit gezeigte milde Anstieg an sekretiertem VEGF möglicherweise mit autokrinem Selbstschutz der Zellen zusammenhängen könnte. Um diese Hypothese überprüfen zu können ist es notwendig den Effekt einer Inhibition von extrazellulärem VEGF genauer zu untersuchen. So wäre es möglich zu beurteilen ob das sekretierte VEGF direkt auf die sekretierenden Zellen wirkt und dort schützende Mechanismen auslöst.

Von Interesse ist hierbei auch eine Untersuchung wie lange die transiente Hyperthermie einen Einfluss auf die VEGF-Sekretion hat. Ein weiteres Augenmerk gilt der längeren Wirkung einer Laserbestrahlung auf die Sekretion von VEGF. Da im Rahmen dieser Arbeit eine deutliche Erniedrigung an intrazellulärem VEGF nachgewiesen werden konnte besteht die Möglichkeit, dass es im zeitlichen Verlauf nach der Bestrahlung auch zu einer Abnahme an sekretiertem VEGF kommen könnte. Insbesondere in der Therapie von Erkrankungen mit pathologisch erhöhten VEGF-Werten im Gewebe, wie der AMD und der DR, könnte dieser Effekt einer Laserbehandlung von großem Interesse sein. Um diese Vermutung zu bestätigen sind weitere Experimente, die längere Zeiträume in Betracht ziehen, dringend notwendig.

Die hierbei betrachtete Zeitspanne sollte allerdings nicht Tage, sondern Monate umfassen, wodurch es notwendig wäre die Experimente in Tiermodellen (*in-vivo*) oder klinischen Studien durchzuführen.

5.4.HSP70 Expression nach Bestrahlung primärer RPE-Kulturen

Molekulare Chaperone wie HSP70 spielen eine wichtige Rolle bei der zellulären Antwort auf Hyperthermie. Hierbei übernehmen sie Aufgaben wie die Faltung neuer oder geschädigter Proteine [48-50], der Stabilisierung des Zytoskeletts [58], dem Transport von Proteinen [59] oder der Zellzykluskontrolle [61]. Eine Beteiligung an zellulären Reaktionen auf Laserbehandlungen des RPEs konnte bereits nachgewiesen werden [28, 63, 64, 307]. Eine zelluläre Erhöhung von HSP70 durch kurz- oder langfristige Hyperthermie ist bereits lange bekannt [308], die Untersuchung der intrazellulären HSP70 Konzentration diente demnach zunächst dem Nachweis, dass tatsächlich eine Wärmeeinwirkung auf die Zellkulturen vorlag.

Bezüglich der HSP70-Expression in RPE-Zellen nach subletaler bis letaler Hyperthermie liegen bisher keine ausreichenden Daten vor. Daher wurden, im Rahmen dieser Arbeit, RPE-Zellkulturen mit verschiedenen Maximaltemperaturen erwärmt und quantitative sowie qualitative Nachweise der HSP70 Expression durchgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der temperaturabhängigen HSP70 Expression wurden im Jahre 2018 bereits teilweise *Peer-Reviewed* publiziert [279] und werden an dieser Stelle in Anlehnung an die Veröffentlichung diskutiert.

Es zeigte sich hier nicht nur die erwartete durch Hitze induzierte Erhöhung, sondern auch eine annähernd treppenförmige Erhöhung an intrazellulärem HSP70 über die Zeit und steigenden Temperaturen. Im letalen Temperaubereich ($T_{\max} > 47^{\circ}\text{C}$) zeigte sich zu allen Zeitpunkten ein signifikanter Anstieg des Proteins, wobei die Proteinexpression nach 24 und 48 h die stärkste Zunahme zeigte. Eine Auffälligkeit zeigte sich bei Kulturen die mit $T_{\max}=43^{\circ}\text{C}$ bestrahlt wurden, hier kam es, im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle ($T_{\max}=37^{\circ}\text{C}$) nach 3 und 9 h zu einer signifikanten Erniedrigung des intrazellulären HSP70, wohingegen bei Kulturen die mit $T_{\max}\leq 40^{\circ}\text{C}$ keine signifikanten Änderungen über die Zeit auftraten. Bei der Bewertung der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Zelllysate über die gesamte Kulturfläche gewonnen wurden und daher die gewonnenen Expressionsdaten als Mittelwert über die Gesamtkultur anzusehen sind. Da die Maximaltemperatur T_{\max} hierbei nur an zentraler Position anlag und über die Kulturschale ein gaußförmiger, radialer Abfall der Temperatur auftrat wurde hier eher die Reaktion des umliegenden Gewebes bewertet.

Die gewonnenen Daten ließen dennoch Rückschlüsse zu. Zum einen stellte sich die Temperaturabhängige HSP70-Expression nicht nur, wie bereits Beschrieben [49, 51, 56], als induzierbar dar. Die Treppenförmigen Anstiege ließen zudem eine starke Zeitabhängigkeit annehmen. Wodurch von einer langfristigen Einflussnahme der Temperatur auf die HSP70-Expression ausgegangen werden konnte. Des Weiteren konnte davon ausgegangen werden, dass die Hochregulation des Proteins nicht gleichförmig in allen Zellen der Kultur auftrat. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits 2011 von Mackanos und Contag diskutiert. In ihrer Veröffentlichung untersuchten Sie langfristige Auswirkungen von Laserstrahlung auf die HSP70-Expression, wobei Sie zudem die Pulsdauer eines CO_2 Lasers ($\lambda=1060\text{ nm}$; Pulsdauer=1000 ms-1 ms) variierten. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Wissenschaftler zeigen, dass die HSP70-Expression nicht nur Leistungs- sondern auch stark Zeitabhängig war [309].

Um weitere Informationen über die temperaturabhängige Steigerung der Expressionsrate und deren Zuordnung zu distinkten Temperaturveränderungen (ΔT) zu erhalten wurden immunzytochemische Färbungen auf HSP70 nach Bestrahlung vorgenommen. Die Erste Begutachtung der aufgenommenen Fluoreszenzbilder zeigte am einer $T_{\max}=44$ °C einen fluoreszierenden Ring, der sich mit steigender Temperatur nach außen hin aufweitete. Diese Aufweitung war auch im zeitlichen Verlauf zu beobachten. Bei einer genaueren Betrachtung der Färbung fiel auf, dass die Fluoreszenzintensität innerhalb des beobachteten Ringes nicht gleichförmig war, sondern zur Mitte hin tendenziell höher erschien. Der innere, nicht gefärbte Anteil der Kulturen passte zudem recht gut mit den apoptotischen und nekrotischen Flächen, die nach der Bestrahlung beobachtet werden konnten, überein. Der Bereich der HSP70-Expression grenzte hierbei tendenziell an den Bereich apoptotischer Zellen an.

Zur genaueren Beurteilung der Fluoreszenzintensität der einzelnen Färbungen in Bezug auf angelegte T_{\max} und Zeit nach der Bestrahlung wurden die Fluoreszenz über eine definierte Fläche bestimmt. Die zu analysierende Fläche wurde so gewählt, dass sie innerhalb des Areals erhöhter HSP70-Expression lag. Auf diese Weise konnte die Fluoreszenzintensität unabhängig von der Anzahl beteiligter Zellen bestimmt und eine semi-quantitative Aussage über eine Lokalisations-Abhängige HSP70-Expression getroffen werden. Die Auswertung ließ eine Unterscheidbarkeit subletaler ($T_{\max}=37$ °C, 40 °C, 44 °C) und letaler ($T_{\max}=47$ °C, 51 °C, 59 °C) zentral angelegter Maximaltemperaturen zu. Diese Unterscheidbarkeit kam dadurch zustande, dass bei Kulturen die mit einer $T_{\max}\leq 44$ °C bestrahlt wurden die Fluoreszenzintensität kaum zunahm, wohingegen bei Kulturen die mit einem $T_{\max}\geq 47$ °C bestrahlt wurden, eine deutliche Erhöhung der gemessenen Fluoreszenzintensität festgestellt werden konnte. Da bei dem im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Bestrahlungsaufbau ein gaußförmiger Temperaturabfall erreicht wurde, ließen diese Beobachtungen die Vermutung zu, dass die Höhe der HSP70-Expression stark von der lokal einwirkenden Temperatur abhängen könnte. Wodurch die Annahme, dass die Induktion von HSP70 möglicherweise eine temperaturabhängige Modulierbarkeit aufweist, als plausibel betrachtet werden konnte.

Des Weiteren konnten im Randbereich erhöhter Fluoreszenzintensitäten Zellen mit unterschiedlicher Morphologie beobachtet werden. Die meisten Zellen zeigte eine starke HSP70-Färbung im Zytoplasma, bei einigen Zellen trat eine starke Färbung des Zellkerns auf, manche Zellen zeigten einen doppelten Zellkern oder Zellkörper mit Filopodien. Der doppelte Zellkern kann hier als Hinweis auf Proliferation betrachtet werden und das Auftreten von Filopodien ließen eine erhöhte zelluläre Motilität, beziehungsweise migratorische Prozesse, vermuten. Des Weiteren fielen kugelige Zellen auf deren Morphologie Anzeichen für Apoptose zeigte. Zellen, die diese morphologischen Besonderheiten zeigten befanden sich im Bereich hoher Fluoreszenzintensität, der an den durch die Bestrahlung geschädigten Bereich angrenzte. Die temperaturabhängig stimulierte Akkumulation von HSP70 im Zellkern wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben [55], und lässt sich anhand des Transportproteins Hikeshi erklären. Hikeshi stellt einen HSP70 spezifischen Transportfaktor, der die Translokation von HSP70 in Richtung des Zellkerns fördert, dar. Es wird vermutet, dass dieser Faktor eine entscheidende Rolle beim zellulären Schutz vor Hitzeinduzierten Schäden des Zellkerns, beziehungsweise der DNS, spielt [310, 311].

Zur Bestimmung des Temperaturbereiches, in dem es zu einer erhöhten HSP70-Expression kam, wurden die inneren und äußeren Radien des sichtbaren Ringes vermessen. Als Grenzen der Radien wurden Bereiche gewählt in dem die Fluoreszenzintensität, im Vergleich zu der der benachbarten Zellen, um das 2-fache erhöht war. So konnte der Temperaturbereich bestimmt werden der bei

einer Bestrahlung von 10 s (T_{10s}) zu einer Überexpression von HSP70 führt. 3 h nach der Bestrahlung ergab sich in den untersuchten Kulturen eine mittlere T_{10s} von 46,12 °C, nach 24 h von 46,59 °C und 48 h nach der Bestrahlung eine mittlere T_{10s} von 46,99 °C. Im Vergleich hierzu konnten Sramek et al. in Mausversuchen eine Schwellenwerttemperatur für die Expression von HSP70, bei einer Bestrahlungsdauer von 0,1 s, von 49 °C feststellen [64]. Auch wenn die Bestrahlungsdauer (0,1 s gegen 10 s) von der hier verwendeten abwich und zudem das bestrahlte System (*in vivo* gegen *in vitro*) ein anderes war, deckten sich die Berechneten Schwellenwerttemperaturen für die HSP70-Expression gut.

Bei dem Vergleich der Schwellenwerttemperaturen für Apoptose und komplettem Zelltod 24 h nach der Bestrahlung im Temperaturbereich einer zweifach erhöhten HSP70-Überexpression, ergab sich eine Überschneidung der beiden Bereiche. Wodurch vermutet werden konnte, dass es insbesondere in den Bereichen mit stark erhöhter HSP70-Expression im zeitlichen Verlauf nach der Bestrahlung zu apoptotischen Veränderungen kam und somit kein eindeutiger Schutz vor dem programmierten Zelltod durch HSP70 nachgewiesen werden konnte. Eine Doppelfärbung gegen Apoptose und HSP70 war technisch leider nicht realisierbar.

Dieses Ergebnis stand in direktem Widerspruch zu vorherigen Veröffentlichungen in denen davon ausgegangen wurde, dass ausschließlich überlebende Zellen nach der Bestrahlung HSP70 überexprimieren und somit der therapeutische Effekt der Laserbehandlung direkt anhand der HSP70-Expression gemessen werden kann [63]. Lavinsky et al. beschrieben ein ringförmiges Färbemuster, allerdings sahen sie die HSP70-exprimierenden Zellen als obligat lebend an [63], wohingegen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass auch apoptotische Zellen an der Expression von HSP70 beteiligt sein könnten. Der Vergleich mit den Ergebnissen von Lavinsky et al. muss allerdings mit Vorsicht geschehen, da die Ansätze beider Arbeiten grundlegend verschieden waren. Insbesondere Unterschiede im Bestrahlungsmodus (Gepulst gegen Dauerstrich), die Dauer der Behandlung (Millisekunden gegen Sekunden) und das behandelte System (*in vivo* gegen *in vitro*) bieten die Möglichkeit starker Abweichungen. Im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden bei Lavinsky et al. die Antwort von Zellen des RPEs bei Kaninchen *in vivo* beurteilt, die Bestrahlung der Augen erfolgte mit einem 557 nm PASCAL Streamline Laser (Topcon Medical Laser Systems, Santa Clara, USA) mit einer Pulsdauer von 20 ms, die Behandlungsdauer wurde mittels eines *Endpoint Management* (EpM) Algorithmus titriert und berechnet [63]. Eine Veröffentlichung von Wang et al. aus dem Jahr 2017 beschreibt ähnliche Ergebnisse und nutzte die HSP70-Expression um eine mögliche Schädigung des Gewebes ausschließen zu können, im Rahmen dieser Veröffentlichung wurden die gleichen Bedingungen wie bei Lavinsky et al. verwendet [307].

In einer Veröffentlichung aus dem Jahre 2015 untersuchte eine Arbeitsgruppe um Keiji Inagaki die Auswirkungen unterschiedlicher Laserbehandlungen auf kultivierte Einzelzellschichten der stabilen, humanen RPE-Zellkulturlinie ARPE19. Im Rahmen dieser Veröffentlichung wurden Dauerstrich (CW) und gepulste Laserstrahlen unterschiedlicher Intensität eingesetzt und die HSP70-Expression immunzytochemisch und molekularbiologisch über qRT-PCR (quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion; ein Verfahren bei dem der mRNA Gehalt der Zellen Aufschluss über den Expressionsstatus einzelner Proteine geben kann) überprüft [28]. Die Wissenschaftler waren in der Lage erstmals die Expression von HSP70 über 24 h nach subletaler mikropuls Bestrahlung nachzuweisen und beschrieben zudem ein ringförmiges Färbemuster um geschädigte Bereiche.

Allerdings wurden hier keine Aussage über das mögliche Auftreten apoptotischer Veränderungen im Bereich der HSP70-exprimierenden Zellen getroffen.

5.5.Zelluläre Proliferation nach der Bestrahlung primärer RPE-Kulturen

Eine schnelle und funktionelle Wundheilung des Gewebes stellt eine wichtige Größe bei der Erhaltung der Gewebefunktion dar. Für die Beurteilung proliferativer Vorgänge um die Laserherde nach letaler Bestrahlung wurden Zellkulturen der P2-Generation mit dem Bestrahlungsaufbau bestrahlt. Der Nachweis der Proliferation erfolgte mittel EdU drei, 24 oder 48 h nach der Bestrahlung.

Bezüglich der Wirkung von subletaler Hyperthermie auf die Wundheilung von RPE-Zellen gibt es nur wenige experimentelle Arbeiten, in denen eine gesteigerte Proliferation bei RPE-Zellen als Folge einer Laserbestrahlung nachgewiesen wurde [72, 73]. Diese Veröffentlichungen konnten zeigen, dass Laserbestrahlungen mit niedrigerer Leistung den Wundschluss bei kultivierten RPE-Zellen deutlich beschleunigten. Tababat-Khani et al. konnten hingegen im Rahmen einer Studie eine verringerte zelluläre Proliferation von ARPE-19 Zellen in den ersten Stunden nach einer Laserbestrahlung zeigen. Die Proliferationsraten der Kontrolle und der bestrahlten Kultur glichen sich jedoch innerhalb von 24 h wieder einander an [65]. Im Rahmen dieser Studien wurden keine exakten Temperaturangaben getroffen, wodurch die Frage offenbleibt, ob unterschiedliche Temperaturstimuli verschiedenen Einfluss auf die Proliferation des RPEs haben könnten.

Bei der Bewertung der experimentellen Ergebnisse zeigte sich, dass 24 h nach der Bestrahlung Proliferation im peripheren Bereich der Zellkulturschale auftrat, wohingegen sich nach 48 h direkt am Rand des geschädigten Bereichs Zellen teilten. Die proliferierenden Zellen traten hierbei stets um den bereits beschriebenen geschädigten Bereich auf. Drei Stunden nach der Bestrahlung ergaben die Berechnungen eine Schwellentemperatur von $45,7\text{ °C} \pm 1,13$, nach 24 h von $45,7\text{ °C} \pm 0,36$ und nach 48 h von $46,1\text{ °C} \pm 0,15$. Wie zu erwarten kam es zu keiner Überschneidung von proliferierenden und apoptotischen Zellen. Bei dem Vergleich der Schwellenwerttemperatur, die zu einer Hochregulation der HSP70-Expression führte und den Schwellenwerttemperaturen für Proliferation, zeigte sich eine deutliche Überschneidung.

Die Ergebnisse ermöglichen einen tieferen Einblick in die Zusammenhänge zwischen einwirkender Temperatur und Proliferation. Zwar wurde aufgrund der Versuchsplanung nicht explizit nachgewiesen, ob die einwirkende Hyperthermie proliferationsstimulierend war, aber die berechneten Schwellenwerttemperaturen lieferten einen guten Anhaltspunkt, in welchen Temperaturbereichen zelluläre Proliferation potentiell auftreten könnte.

5.6. Einfluss subletaler Hyperthermie auf den Wundverschluss eines Gewebsdefektes

Die Untersuchung des Wundverschlusses mechanischer Wunden nach der Bestrahlung erfolgte anhand von zwei unabhängigen Experimenten. Zunächst wurde die Zellfront-Geschwindigkeit (CFV) anhand gewonnener Konfluenz-Daten ermittelt. Es kamen hierbei nicht bestrahlte Kulturen und Kulturen die mit einer zentral angelegten T_{\max} von 43 °C bestrahlt wurden zum Einsatz. Bei den hier gewonnenen Daten handelte es sich um dynamische Informationen. Bezüglich der Geschwindigkeit des Wundverschlusses ergab sich bei den mit $T_{\max}=43$ °C bestrahlten Kulturen eine mediane CFV von 6,02 $\mu\text{m}/\text{h}$. Bei Kulturen, die nicht bestrahlt wurden lag die CFV hingegen bei 3,18 $\mu\text{m}/\text{h}$. Es konnte somit angenommen werden, dass subletale Erwärmungen zu einer Halbierung der Dauer des Wundverschlusses im RPE führen könnte. Weitere Versuche mittels spezieller Zellkulturschalen konnten diese Hypothese unterstützen.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigten eine hoch signifikante Zunahme der Zellteilung bei Kulturen die mit einer $T_{\max}=40$ °C bestrahlt wurden im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe (37 °C). Der Anteil proliferativer Zellen in der nicht bestrahlten Kontrollgruppe und in Kulturen die mit einer $T_{\max}=45$ °C bestrahlt wurden wick hingegen kaum voneinander ab. Dieses Ergebnis bestätigte die Hypothese, dass milde Hyperthermie zu einer Aktivierung der Proliferation führen könnte. Wohingegen bei der Bestrahlung mit $T_{\max}=45$ °C der Wundverschluss theoretisch durch eine erhöhte Migrationsfähigkeit der Zellen beschleunigt hätte werden können. Um die Auswirkung transienter subletaler Hyperthermie auf Vorgänge der Wundheilung an Gewebsdefekten untersuchen zu können wurden spezielle Zellkulturschalen verwendet. Der Zellkultureinsatz wurde kurz vor der Bestrahlung entfernt und auf diese Weise ein definierter Gewebsdefekt erzeugt.

Bei dem Vergleich der Schwellenwerttemperaturen (T_{10s}) für Proliferation bei thermischen Wunden und der Erhöhung der Proliferation durch transiente Hyperthermie mechanischer Wunden zeigte sich eine Abweichung. Drei Stunden nach der Bestrahlung ergaben die Berechnungen eine Schwellenwert-Temperatur von $45,7$ °C \pm 1,13, nach 24 h von $45,7$ °C \pm 0,36 und nach 48 h von $46,1$ °C \pm 0,15 (Abbildung 44). Wohingegen die stärkste Erhöhung der Proliferation 24 h nach der Bestrahlung mit einer $T_{\max}=40$ °C festgestellt werden konnte (Abbildung 48). Es hätte vermutet werden können, dass die Ergebnisse einander widersprechen, da bei einer $T_{\max}=45$ °C keine erhöhten Proliferationsraten nachgewiesen werden konnten, obwohl die Schwellenwerttemperaturen die Vermutung zulassen, dass Proliferation hätte auftreten müssen. Eine Erklärung für diese Abweichung könnte das angewendete Verfahren an sich darstellen. Die Zugabe von EdU erfolgte für 4 h, es wurden somit alle Zellen markiert, die in diesem Zeitraum in die Mitose eingegangen sind. Der Zeitraum, in dem die Zellen EdU ausgesetzt waren wurde vorab experimentell bestimmt. Hierfür wurden nicht bestrahlte, konfluente RPE-Zellen für unterschiedliche Zeiträume mit EdU inkubiert. Auf diese Weise sollte abgeschätzt werden wie viel Zeit vergeht bis RPE-Zellen in die Mitose gehen. Nach 4 h traten hierbei erste EdU-positive Zellen auf. Auch wenn davon ausgegangen werden konnte, dass Zellen des RPE-Gewebes durch Kontaktinhibition nicht mitotisch aktiv sein sollten [4, 84], besteht bei einer Inkubationsdauer von 4 h dennoch die Möglichkeit, dass einzelne Zellen unabhängig von thermischer Stimulation in den Prozess der Mitose eingegangen waren. Allerdings muss dieses Verfahren als Momentaufnahme betrachtet werden, da hier nicht alle Zellen, die sich nach der Bestrahlung teilten berücksichtigt werden konnten. Der Nachweis der

proliferativen Aktivität beschränkte sich viel mehr ausschließlich auf die Zellen, die sich während der Zugabe von EdU teilten.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit statische Wundverschlussdaten gewonnen, für diese Experimente wurden ebenfalls spezielle Zellkulturschalen verwendet. Der Zellkultureinsatz wurde kurz vor der Bestrahlung entfernt und auf diese Weise eine definierte mechanische Wunde erzeugt. Die Dokumentation der Schalen erfolgte 24 h nach der Bestrahlung am Fluoreszenzmikroskop. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen wurde der verbleibende Abstand zwischen die Zellfronten bestimmt, die Berechnung des Wundverschlusses erfolgte anhand der Vergrößerung (10x) und der bekannten initialen Wunde (500 µm). Es zeigte sich hier, dass sich die verbleibende Wundbreite bei beiden bestrahlten Bedingungen ($T_{\max}=40\text{ °C}/45\text{ °C}$) im Vergleich zu, der nicht bestrahlten Kontrolle höchst signifikant verringert hatte.

In der Literatur wird ein Einfluss lokaler Hyperthermie auf die Wundheilung bereits eingehend diskutiert [312-314]. In einer Arbeit aus dem Jahr 2017 verglich eine Arbeitsgruppe um Suter et al. die Auswirkungen unterschiedlicher Lasersysteme auf Wundheilung und Schmerztherapie bei rezidivierenden Aphtosen [313]. Bei den hier verglichenen Lasersystemen und Behandlungsmethoden handelte es sich um Nd:YAG Laserablation [315], nicht-ablative CO₂-Laser (Applikation durch Gel) [316-318] und den Dioden-Lasern die im Rahmen von LLLT (low-level laser treatment) zum Einsatz kommen [319, 320]. Es wird davon ausgegangen, dass die Stimulation der Wundheilung durch eine Hochregulation zellulärer Proliferation, Veränderungen der Kollagensynthese und erhöhtem ATP Umsatz in den Mitochondrien bedingt wird [321, 322]. Als Ursache für die beobachteten Phänomene werden hier Effekte im Gewebe angesehen in deren Verlauf es zur Aktivierung zweier Kinasen, der Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) und der durch extrazelluläre Signale regulierten Kinase 1/2 (ERK1/2) kommt [188, 189]. Es wird angenommen, dass die beiden Kinasen wichtige regulatorische Schritte bei der Zellzykluskontrolle einnehmen und dadurch direkt Einfluss auf zelluläre Proliferation nehmen können [323, 324]. Allerdings konnten die Effekte bislang nur für Zeiträume bis 48 h nachgewiesen werden [325, 326]. Jedoch wurden im Rahmen dieser Arbeiten keine erreichten Temperaturbereiche angegeben, wodurch ein direkter Vergleich mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen vorsichtig erfolgen musste. Trotzdem lag die Vermutung nahe, dass die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Erhöhung der Proliferation durch ähnliche Effekte hervorgerufen worden sein könnte. Bei der Auswertung der unterschiedlichen Bedingungen zeigte sich zudem, dass ein klarer Zusammenhang zwischen den erzeugten Effekten und der eingesetzten Wellenlänge, der Bestrahlungsleistung und -Dichte, sowie den behandelten Zellen gab. Insbesondere die eingesetzte Leistungsdichte hatte hierbei entscheidende Auswirkungen auf die Stimulation der Wundheilung [321, 327].

Zusammenfassend bestätigten sich die dynamischen und statischen Daten. Die Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass subletale transiente Laser-induzierte Hyperthermie einen beschleunigenden Effekt auf den Wundverschluss des RPEs haben könnte. Es kann zudem davon ausgegangen werden, dass die Stimulation der Wundheilung bei niedrigeren Temperaturen großteilig durch zelluläre Proliferation erfolgt. Wohingegen die Wundheilung bei höheren Bestrahlungstemperaturen möglicherweise eher durch migratorische Prozesse ermöglicht wurde.

5.7. Zusammenspiel von Apoptose, Proliferation und HSP70-Expression

In diesem Teil der Diskussion sollen mögliche Zusammenhänge der einzelnen Ergebnisse herausgearbeitet und die daraus gewinnbaren Erkenntnisse bewertet werden. Unter Betrachtung der Gegenüberstellungen der Ergebnisse für Apoptose/Nekrose, der örtlichen Begrenzung der HSP70-Überexpression und der zellulären Proliferation nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen zentral angelegten Maximaltemperaturen, ließen sich einige Hinweise auf das Zusammenspiel der einzelnen Phänomene nach thermischer Stimulation ableiten.

Die gewonnenen Daten für Apoptose und kompletten Zelltod zeigte einen eindeutigen Zusammenhang zwischen zentral angelegter Maximaltemperatur (T_{max}) und der nach der Bestrahlung vergangenen Zeit. Im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle kam es insbesondere bei Kulturen, die mit $T_{max} \geq 47$ °C bestrahlt wurden, sowohl nach 3 h als auch nach 24 h zu einer signifikanten Abnahme des Anteils lebender Zellen. Diese Ergebnisse ließen eine Unterteilung zu, durch die $T_{max} \leq 47$ °C als subletal und $T_{max} \geq 47$ °C als letal angenommen werden konnten.

Insbesondere der zeitliche Verlauf der apoptotischen Veränderungen deckte sich gut mit Annahmen aus der Literatur [27, 284]. Auch die Berechnung der benötigten Schwellenwerttemperaturen, die innerhalb einer Bestrahlung von 10 s (T_{10s}) zu apoptotischen Veränderungen oder komplettem Zelltod führten, wiesen darauf hin, dass die durch thermische Bestrahlung ausgelöste Apoptose erst nach einiger Zeit auftritt und über Tage andauern könnte.

Bei dem Vergleich der Schwellenwerttemperaturen für Apoptose und komplettem Zelltod mit den Schwellenwerttemperaturen für HSP70-Expression zeigte sich, dass es 24 h nach der Bestrahlung zu einer Überschneidung von HSP70-Überexpression und Apoptose kam (Abbildung 42). Dadurch konnte vermutet werden, dass es insbesondere in den Bereichen mit stark erhöhter HSP70-Expression im zeitlichen Verlauf nach der Bestrahlung zu apoptotischen Veränderungen kam.

Dieses Ergebnis stand in direktem Widerspruch zu der vorherigen Annahme von Lavinsky et al., die davon ausgehen, dass ausschließlich überlebende RPE-Zellen nach der Laserbestrahlung HSP70 überexprimieren und somit der therapeutische Effekt der Laserbehandlung direkt anhand der HSP70-Expression gemessen werden kann [28, 63]. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass HSP70 in der Lage ist, die Zelle vor stressbedingter Apoptose zu schützen [60].

Andererseits konnten bereits mehrere Studien zeigen, dass das hitzeinduzierte HSP70 potentiell in der Lage ist Zelltod hervorzurufen. So stimuliert die Überexpression von HSF1 (Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1, ein Transkriptionsfaktor, der die Hitzeschockantwort steuert) Fas-induzierte Apoptose [328]. Außerdem fördert eine Erhöhung an intrazellulärem HSP70 die TCR/CD3- und Fas/Apo-1/CD95 vermittelte Jurkat-T-Zell-Apoptose [329]. Auch konnte bereits nachgewiesen werden, dass Hyperthermie nach der Gabe bestimmter Chemotherapeutika oder einer vorhergehenden Strahlenbehandlung die Sterblichkeit der Zellen erhöhen kann [330]. Gu et al berichteten, dass ein transkriptionsunabhängiger p53-vermittelte mitochondrialer Stoffwechselweg, der durch oxidativen Stress als Reaktion auf starke Hyperthermie hervorgerufen wird, Apoptose in HUVEC-Zellen herbeiführen könnte [331]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Hitze und eine erhöhte HSP70 Konzentration Signalsteuerungskaskaden und Transkriptionsfaktoren stören können und auf diese Weise in der Lage sind Tumore für Strahlung zu sensibilisieren [332]. HSP70 hemmt zudem die Zellproliferation [333]. Diese Ergebnisse implizieren, dass Wärme oder hohe

HSP70-Konzentrationen das Signal zum Überleben einer Zelle unter distinkten Umständen beeinträchtigen könnten. Als Mechanismus postulierten Ran et al., dass HSP70 die TNF-vermittelte Apoptose durch eine Störung der NF- κ B-Überlebenssignale fördert. Des Weiteren stellten sie die Vermutung auf, dass die TNF-vermittelte Apoptose möglicherweise durch hohe HSP70-Konzentrationen initiiert oder vorangetrieben werden könnte [334].

Diese Annahmen bieten eine gute Grundlage für die Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit und stellen eine mögliche Erklärung für die Überlappung der Hsp70-Überexpression und Apoptose am Wundrand dar.

Darüber hinaus ist eine Verknüpfung der Mechanismen zwischen zellulärer Apoptose und Proliferation von großem Interesse. In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass proapoptotische Proteine die Proliferation benachbarter überlebender Zellen induzieren können. Dieser Vorgang wird als "durch Apoptose-induzierte Proliferation" bezeichnet. So berichtete die Arbeitsgruppe um Ryoo et al. von möglichen Mechanismen der „durch Apoptose-induzierten Proliferation“ unter Einbeziehung von IL-6-Rückkopplungen im CD95/Fad/ApoA1-Signalweg [335]. Dieser Prozess könnte theoretisch auch als Reaktion auf letale Bestrahlung in RPE-Zellen auftreten.

Bei der Betrachtung der Grenztemperatur, die nach einer Bestrahlung von 10 s (T_{10s}) Proliferation hervorrief fiel wie erwartet auf, dass es zu keiner Überschneidung apoptotischer und proliferativer Zellen kam. Es wird angenommen, dass subletale Hyperthermie zu einer Hochregulation der Kinasen MARK/ERK1/2 führt [188, 189]. Diese Kinasen sind maßgeblich für die Aktivierung der zellulären Mitose verantwortlich [323, 324]. Eine weitere Studie konnte jedoch zeigen, dass eine wiederholte Aktivierung von MAPK/ERK1/2 eher apoptotische Veränderungen begünstigt [336].

Im Vergleich mit der T_{10s} , die benötigt wurde, um eine Hochregulation der HSP70-Expression zu erreichen, fiel auf, dass es zu einer Überschneidung zellulärer Proliferation und HSP70-Überexpression kam. Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Doppelfärbungen gegen HSP70 und dem Nachweis von Proliferation durch EdU durchgeführt. Dadurch konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, wie viele der proliferierenden Zellen HSP70 überexprimieren. Allerdings fielen im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbungen HSP70-positive Zellen mit doppeltem Zellkern auf, wodurch die Annahme zellulärer Proliferation im Bereich erhöhter HSP70-Expression realistisch und die berechneten Grenztemperaturen glaubhaft waren.

Eine Einflussnahme von HSP70 und anderen Mitgliedern der HSP-Familie auf zelluläre Proliferation wird bereits eingehend diskutiert. So konnte ein stimulierender Effekt von HSP70 auf das Wachstum verschiedener Tumorzellen nachgewiesen werden [337, 338]. Im Zusammenhang mit RPE-Zellen wurde das Zusammenspiel von HSP70 und Proliferation noch nicht ausreichend untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern hier neue Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen HSP70 und Zellproliferation nach Laserbestrahlung. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um das genaue Zusammenspiel aufklären zu können.

Abschließend ließen die ermittelten Ergebnisse eine fundierte Aussage über die Reaktionen von Zellen des RPEs auf transiente Hyperthermie zu. So lag die Annahme nahe, dass nicht nur die tatsächlich einwirkende Maximaltemperatur, sondern auch die nach der Bestrahlung vergangene Zeit einen großen Einfluss auf die beobachtete Zellantwort hatte. So könnten die ermittelten Daten als Grundlage genommen werden, um eine deutliche Zeitabhängigkeit apoptotischer Prozesse hinreichend zu bestätigen [27, 284]. Auch die Expression von HSP70 schien stark temperatur- und

zeitabhängig zu sein. Die Überlappung der HSP70-Überexpression mit apoptotischen und proliferativen Bereichen deutet sowohl auf eine schützende Funktion des molekularen Chaperons, als auch auf eine potentielle Apoptose-Induktion durch HSP70 hin. Des Weiteren ließen die Ergebnisse den Rückschluss zu, dass leichte Temperaturerhöhungen zu einer Verbesserung der Wundheilung führen könnten. Es gab Hinweise darauf, dass im niedrigen Temperaturbereich eher proliferative und im höheren Temperaturbereich migratorische Prozesse zu tragen kamen.

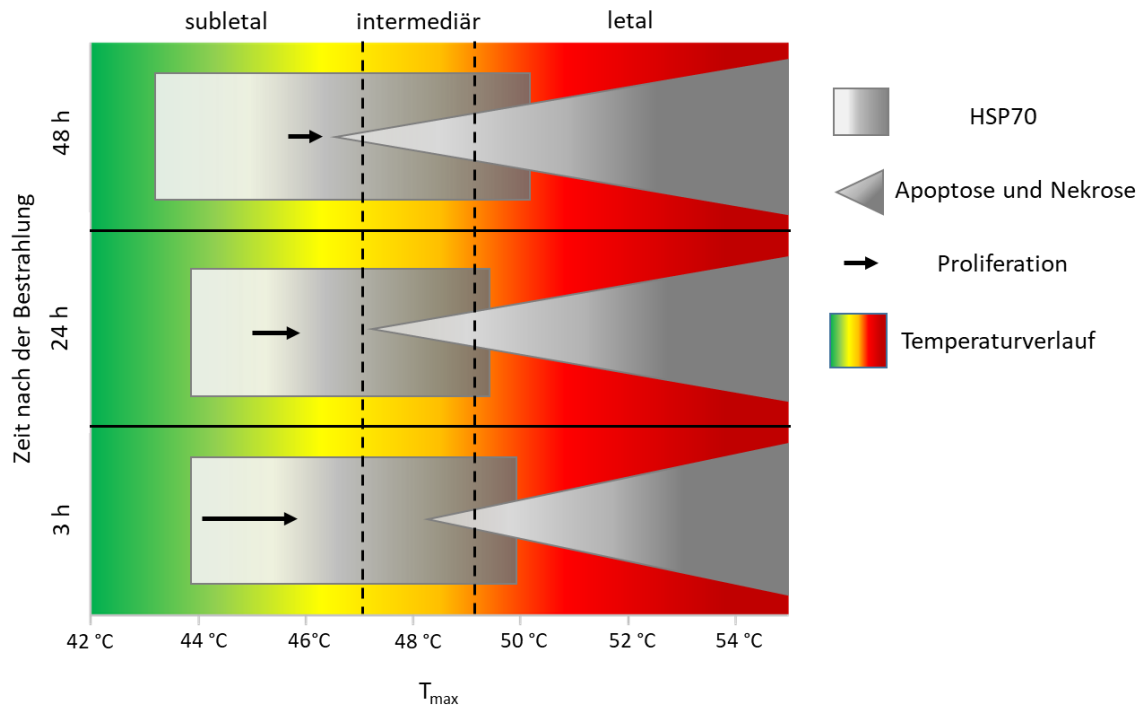


Abbildung 49: Graphische Darstellung der Ergebnisse

Schematische Darstellung der Ergebnisse für das Zusammenspiel von Apoptose, zellulärer Proliferation und HSP70-Expression. Der Temperaturverlauf über die Zellkulturschale ist von subletal (nicht tödlich, grün) über intermediär (Zwischenbereich, gelb) und letal (tödlich, rot) entsprechend der T_{\max} die benötigt wurde, um eine entsprechende Zellreaktion innerhalb einer Bestrahlung von 10 s (T_{10s}) hervorzurufen. Der Bereich in dem HSP70-Expression immunzytochemisch nachgewiesen werden konnte ist als graues Quadrat dargestellt (Abbildung 42). Der Farbverlauf von hellgrau bis dunkelgrau spiegelt hierbei die Fluoreszenzintensität der Färbung wider (Abbildung 40). Apoptotische und nekrotische Veränderungen innerhalb der Zellkulturen (Abbildung 32) sind als Dreieck dargestellt, wobei die Spitze des Dreiecks die T_{10s} für das Einsetzen von Apoptose darstellt und die Breite die zu erwartende Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation (Tabelle 5). Der Bereich der T_{10s} in dem es nach drei, 24 oder 48h zu Proliferation kam ist als schwarzer Pfeil dargestellt. Die Pfeilspitze spiegelt die Grenztemperatur wider bis zu der proliferierende Zellen auftraten (Abbildung 44).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen umfangreiche Rückschlüsse auf den grundlegenden therapeutischen Wirkmechanismus von Netzhaut-Laserbehandlung zu. Insbesondere im Zusammenhang mit der kürzlich diskutierten subletalen Hyperthermie des RPEs als Therapieform könnten sie Anhaltspunkte liefern, um die Planung der Behandlungsstrategie in der temperaturkontrollierten Netzhaut-Laserbehandlung zu unterstützen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Guymer, R., P. Luthert, and A. Bird, *Changes in Bruch's membrane and related structures with age*. Prog Retin Eye Res, 1999. **18**(1): p. 59-90.
2. Roberts, P.K., et al., *Retinal pigment epithelial features indicative of neovascular progression in age-related macular degeneration*. Br J Ophthalmol, 2017.
3. Strauss, O., *The retinal pigment epithelium in visual function*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 845-81.
4. Bok, D., *The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision*. J Cell Sci Suppl, 1993. **17**: p. 189-95.
5. Song, W., et al., *Wavelength-dependent optical properties of melanosomes in retinal pigmented epithelium and their changes with melanin bleaching: a numerical study*. Biomed Opt Express, 2017. **8**(9): p. 3966-3980.
6. Thompson, D.A. and A. Gal, *Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases*. Prog Retin Eye Res, 2003. **22**(5): p. 683-703.
7. Xue, L., et al., *A palmitoylation switch mechanism in the regulation of the visual cycle*. Cell, 2004. **117**(6): p. 761-71.
8. Steinberg, R.H., *Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina*. Doc Ophthalmol, 1985. **60**(4): p. 327-46.
9. Beatty, S., et al., *The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration*. Surv Ophthalmol, 2000. **45**(2): p. 115-34.
10. Miura, Y. and J. Roider, *Triamcinolone acetonide prevents oxidative stress-induced tight junction disruption of retinal pigment epithelial cells*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2009. **247**(5): p. 641-9.
11. Ambati, J., et al., *Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies*. Surv Ophthalmol, 2003. **48**(3): p. 257-93.
12. Campochiaro, P.A., *Retinal and choroidal neovascularization*. J Cell Physiol, 2000. **184**(3): p. 301-10.
13. Chous, A.P., et al., *The Diabetes Visual Function Supplement Study (DiVFuSS)*. Br J Ophthalmol, 2016. **100**(2): p. 227-34.
14. Kowluru, R.A., et al., *Oxidative stress and epigenetic modifications in the pathogenesis of diabetic retinopathy*. Prog Retin Eye Res, 2015. **48**: p. 40-61.
15. Kowluru, R.A. and M. Mishra, *Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(11): p. 2474-83.
16. Ponnalagu, M., et al., *Retinal pigment epithelium-secretome: A diabetic retinopathy perspective*. Cytokine, 2017. **95**: p. 126-135.
17. Nicholson, B., et al., *Central serous chorioretinopathy: update on pathophysiology and treatment*. Surv Ophthalmol, 2013. **58**(2): p. 103-26.
18. Ishida, K., et al., *Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms*. Ocul Immunol Inflamm, 2003. **11**(2): p. 91-105.
19. Streilein, J.W., et al., *Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants*. Vision Res, 2002. **42**(4): p. 487-95.
20. Nowak, M.S., et al., *A prospective study on different methods for the treatment of choroidal neovascularization. The efficacy of verteporfin photodynamic therapy, intravitreal bevacizumab and transpupillary thermotherapy in patients with neovascular age-related macular degeneration*. Medical Science Monitor, 2012. **18**(6): p. Cr374-Cr380.
21. Palanker, D., *Evolution of Concepts and Technologies in Ophthalmic Laser Therapy*. Annual Review of Vision Science, Vol 2, 2016. **2**: p. 295-319.

22. Baade, A., et al., *Power-controlled temperature guided retinal laser therapy*. J Biomed Opt, 2017. **22**(11): p. 1-11.
23. Brinkmann, R., et al., *Real-time temperature determination during retinal photocoagulation on patients*. J Biomed Opt, 2012. **17**(6): p. 061219.
24. Schlott, K., et al., *Lesion strength control by automatic temperature guided retinal photocoagulation*. J Biomed Opt, 2016. **21**(9): p. 98001.
25. Schlott, K., et al., *Automatic temperature controlled retinal photocoagulation*. J Biomed Opt, 2012. **17**(6): p. 061223.
26. Koinzer, S., et al., *Temperature-controlled retinal photocoagulation--a step toward automated laser treatment*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(7): p. 3605-14.
27. Denton, M.L., et al., *Spatially correlated microthermography maps threshold temperature in laser-induced damage*. J Biomed Opt, 2011. **16**(3): p. 036003.
28. Inagaki, K., et al., *Sublethal Photothermal Stimulation with a Micropulse Laser Induces Heat Shock Protein Expression in ARPE-19 Cells*. J Ophthalmol, 2015. **2015**: p. 729792.
29. Iwami, H., et al., *Protective effect of a laser-induced sub-lethal temperature rise on RPE cells from oxidative stress*. Exp Eye Res, 2014. **124**: p. 37-47.
30. Miura, Y., et al., *Continuous-wave Thulium Laser for Heating Cultured Cells to Investigate Cellular Thermal Effects*. J Vis Exp, 2017(124).
31. Zimmermann, K.C. and D.R. Green, *How cells die: apoptosis pathways*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(4 Suppl): p. S99-103.
32. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
33. Green, D.R. and G.I. Evan, *A matter of life and death*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 19-30.
34. Slovirer, R.S., *Apoptosis: a guide for the perplexed*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(1): p. 19-24.
35. Zimmermann, K.C., C. Bonzon, and D.R. Green, *The machinery of programmed cell death*. Pharmacol Ther, 2001. **92**(1): p. 57-70.
36. Blatt, N.B. and G.D. Glick, *Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death*. Bioorg Med Chem, 2001. **9**(6): p. 1371-84.
37. Barak, A., T. Goldkorn, and L.S. Morse, *Laser induces apoptosis and ceramide production in human retinal pigment epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(7): p. 2587-91.
38. Burns, M.S. and M.J. Hartz, *The retinal pigment epithelium induces fenestration of endothelial cells in vivo*. Curr Eye Res, 1992. **11**(9): p. 863-73.
39. Roberts, W.G. and G.E. Palade, *Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 6)**: p. 2369-79.
40. Amin, R., J.E. Puklin, and R.N. Frank, *Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994. **35**(8): p. 3178-88.
41. Das, A. and P.G. McGuire, *Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition*. Prog Retin Eye Res, 2003. **22**(6): p. 721-48.
42. Dawson, D.W., et al., *Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis*. Science, 1999. **285**(5425): p. 245-8.
43. Avery, R.L., et al., *Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration*. Ophthalmology, 2006. **113**(3): p. 363-372 e5.
44. de Oliveira Dias, J.R., et al., *Cytokines in neovascular age-related macular degeneration: fundamentals of targeted combination therapy*. Br J Ophthalmol, 2011. **95**(12): p. 1631-7.
45. Klettner, A. and J. Roeder, *Comparison of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(10): p. 4523-7.

46. Noel, A., et al., *Anti-angiogenic therapy of exudative age-related macular degeneration: current progress and emerging concepts*. Trends Mol Med, 2007. **13**(8): p. 345-52.
47. Ogata, N., et al., *Expression of cytokines and transcription factors in photocoagulated human retinal pigment epithelial cells*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2001. **239**(2): p. 87-95.
48. Kiang, J.G. and G.C. Tsokos, *Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology*. Pharmacol Ther, 1998. **80**(2): p. 183-201.
49. Kregel, K.C., *Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance*. J Appl Physiol (1985), 2002. **92**(5): p. 2177-86.
50. Whitley, D., S.P. Goldberg, and W.D. Jordan, *Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones*. J Vasc Surg, 1999. **29**(4): p. 748-51.
51. Aufricht, C., *Heat-shock protein 70: molecular supertool?* Pediatr Nephrol, 2005. **20**(6): p. 707-13.
52. Hightower, L.E. and L.M. Hendershot, *Molecular chaperones and the heat shock response at Cold Spring Harbor*. Cell Stress Chaperones, 1997. **2**(1): p. 1-11.
53. Schlesinger, M.J., *Heat shock proteins*. J Biol Chem, 1990. **265**(21): p. 12111-4.
54. Welch, W.J., *Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease*. Physiol Rev, 1992. **72**(4): p. 1063-81.
55. Welch, W.J. and L.A. Mizzen, *Characterization of the thermotolerant cell. II. Effects on the intracellular distribution of heat-shock protein 70, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes*. J Cell Biol, 1988. **106**(4): p. 1117-30.
56. Mizzen, L.A. and W.J. Welch, *Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression*. J Cell Biol, 1988. **106**(4): p. 1105-16.
57. Dreiseidler, M., N. Dick, and J. Hohfeld, *Analysis of chaperone-assisted ubiquitylation*. Methods Mol Biol, 2012. **832**: p. 473-87.
58. Gil Lorenzo, A.F., et al., *Hsp70 regulation on Nox4/p22phox and cytoskeletal integrity as an effect of losartan in vascular smooth muscle cells*. Cell Stress and Chaperones, 2014. **19**(1): p. 115-134.
59. Kang, P.J., et al., *Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins*. Nature, 1990. **348**(6297): p. 137-43.
60. Morimoto, R.I. and M.G. Santoro, *Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(9): p. 833-8.
61. Nollen, E.A. and R.I. Morimoto, *Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 14): p. 2809-16.
62. Ryhanen, T., et al., *Crosstalk between Hsp70 molecular chaperone, lysosomes and proteasomes in autophagy-mediated proteolysis in human retinal pigment epithelial cells*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9B): p. 3616-31.
63. Lavinsky, D., et al., *Nondamaging Retinal Laser Therapy: Rationale and Applications to the Macula*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016. **57**(6): p. 2488-500.
64. Sramek, C., et al., *Non-damaging retinal phototherapy: dynamic range of heat shock protein expression*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(3): p. 1780-7.
65. Tababat-Khani, P., et al., *Photocoagulation of human retinal pigment epithelial cells in vitro: evaluation of necrosis, apoptosis, cell migration, cell proliferation and expression of tissue repairing and cytoprotective genes*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70465.
66. He, L. and A.G. Marneros, *Macrophages are essential for the early wound healing response and the formation of a fibrovascular scar*. Am J Pathol, 2013. **182**(6): p. 2407-17.
67. Sugino, I.K., H. Wang, and M.A. Zarbin, *Age-related macular degeneration and retinal pigment epithelium wound healing*. Mol Neurobiol, 2003. **28**(2): p. 177-94.
68. Schwartz, M.A. and A.R. Horwitz, *Integrating adhesion, protrusion, and contraction during cell migration*. Cell, 2006. **125**(7): p. 1223-5.

69. Vicente-Manzanares, M., D.J. Webb, and A.R. Horwitz, *Cell migration at a glance*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 21): p. 4917-9.
70. Hipfner, D.R. and S.M. Cohen, *Connecting proliferation and apoptosis in development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 805-15.
71. Ginani, F., et al., *Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review*. Lasers Med Sci, 2015. **30**(8): p. 2189-94.
72. Sekiyama, E., et al., *Heat treatment of retinal pigment epithelium induces production of elastic lamina components and antiangiogenic activity*. FASEB J, 2012. **26**(2): p. 567-75.
73. Song, Q., et al., *Low Power Laser Irradiation Stimulates the Proliferation of Adult Human Retinal Pigment Epithelial Cells in Culture*. Cell Mol Bioeng, 2009. **2**(1): p. 87-103.
74. Land, M.F. and D.-E. Nilsson, *Animal eyes*. 2nd ed. Oxford animal biology series. 2012, Oxford ; New York: Oxford University Press. xiii, 271 p., 4 p. of plates.
75. Bear, M.F.C., B. W.; Paradiso; M. A., *Neurowissenschaften*, ed. A.K. Engel. Vol. 3. 2009: Spektrum Akademischer Verlag.
76. Abramoff, M.D., M.K. Garvin, and M. Sonka, *Retinal imaging and image analysis*. IEEE Rev Biomed Eng, 2010. **3**: p. 169-208.
77. Kolb, H., *How the retina works - Much of the construction of an image takes place in the retina itself through the use of specialized neural circuits*. American Scientist, 2003. **91**(1): p. 28-35.
78. Lamb, T.D., D. Arendt, and S.P. Collin, *The evolution of phototransduction and eyes*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1531): p. 2791-3.
79. Lamb, T.D., S.P. Collin, and E.N. Pugh, Jr., *Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(12): p. 960-76.
80. Mangold, O., *Über die Induktionsfähigkeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen*. Die Naturwissenschaften, 1933. **43**(21): p. 761- 766.
81. Spemann, H., *Ueber den Anteil von Implantat und Wirtskeim an der Orientierung und Beschaffenheit der induzierten Embryonalanlage*. Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org, 1931. **123**(3-4): p. 389-517.
82. Lupo, G., et al., *Induction and patterning of the telencephalon in Xenopus laevis*. Development, 2002. **129**(23): p. 5421-36.
83. Shen, Y., K. Liu, and X. Xu, *Correlation Between Visual Function and Photoreceptor Integrity in Diabetic Macular Edema: Spectral-Domain Optical Coherence Tomography*. Curr Eye Res, 2016. **41**(3): p. 391-9.
84. Schraermeyer, U. and K. Heimann, *Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation*. Pigment Cell Res, 1999. **12**(4): p. 219-36.
85. Marmor, M.F. and T.J. Wolfensberger, *The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease*. 1998: Oxford University Press.
86. Marmorstein, A.D., et al., *Morphogenesis of the retinal pigment epithelium: toward understanding retinal degenerative diseases*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **857**: p. 1-12.
87. Rizzolo, L.J., *Development and role of tight junctions in the retinal pigment epithelium*. Int Rev Cytol, 2007. **258**: p. 195-234.
88. Wang, S.Z. and R.T. Yan, *The Retinal Pigment Epithelium: a Convenient Source of New Photoreceptor cells?* J Ophthalmic Vis Res, 2014. **9**(1): p. 83-93.
89. Marmor, M.F., *Structure and function of the retinal pigment epithelium*. Int Ophthalmol Clin, 1975. **15**(1): p. 115-30.
90. Feeney, L., *Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1978. **17**(7): p. 583-600.
91. Auker, C.R., et al., *Choroidal blood flow. I. Ocular tissue temperature as a measure of flow*. Arch Ophthalmol, 1982. **100**(8): p. 1323-6.

92. Parver, L.M., *Temperature modulating action of choroidal blood flow*. Eye (Lond), 1991. **5 (Pt 2)**: p. 181-5.
93. Brinkmann, R., J. Roider, and R. Birngruber, *Selective retina therapy (SRT): a review on methods, techniques, preclinical and first clinical results*. Bull Soc Belge Ophtalmol, 2006(302): p. 51-69.
94. Schmidt, S.Y. and R.D. Peisch, *Melanin concentration in normal human retinal pigment epithelium. Regional variation and age-related reduction*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1986. **27(7)**: p. 1063-7.
95. Meyer-Schwickerath, G., *[Light coagulation; a method for treatment and prevention of the retinal detachment]*. Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol, 1954. **156(1)**: p. 2-34.
96. Meyer-Schwickerath, G.R.E., *The history of photocoagulation*. Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology, 1989. **17(4)**: p. 427-434.
97. Baylor, D., *How photons start vision*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93(2)**: p. 560-5.
98. Thompson, D.A. and A. Gal, *Genetic defects in vitamin A metabolism of the retinal pigment epithelium*. Dev Ophthalmol, 2003. **37**: p. 141-54.
99. Kevany, B.M. and K. Palczewski, *Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors*. Physiology (Bethesda), 2010. **25(1)**: p. 8-15.
100. LaVail, M.M., *Rod outer segment disc shedding in relation to cyclic lighting*. Exp Eye Res, 1976. **23(2)**: p. 277-80.
101. Hall, M.O. and T. Abrams, *Kinetic studies of rod outer segment binding and ingestion by cultured rat RPE cells*. Exp Eye Res, 1987. **45(6)**: p. 907-22.
102. Bok, D., *Retinal photoreceptor-pigment epithelium interactions. Friedenwald lecture*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985. **26(12)**: p. 1659-94.
103. Finnemann, S.C., et al., *Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94(24)**: p. 12932-7.
104. Mao, Y. and S.C. Finnemann, *Essential diurnal Rac1 activation during retinal phagocytosis requires alphavbeta5 integrin but not tyrosine kinases focal adhesion kinase or Mer tyrosine kinase*. Mol Biol Cell, 2012. **23(6)**: p. 1104-14.
105. Ban, Y. and L.J. Rizzolo, *Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium*. Brain Res Dev Brain Res, 2000. **121(1)**: p. 89-95.
106. Hamann, S., *Molecular mechanisms of water transport in the eye*. International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 215, 2002. **215**: p. 395-431.
107. Miller, S.S. and R.H. Steinberg, *Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium*. J Membr Biol, 1977. **36(4)**: p. 337-72.
108. Miller, S.S. and R.H. Steinberg, *Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium*. Exp Eye Res, 1977. **25(3)**: p. 235-48.
109. Dunn, K.C., et al., *Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1998. **39(13)**: p. 2744-2749.
110. Kolomeyer, A.M., I.K. Sugino, and M.A. Zarbin, *Characterization of Conditioned Media Collected from Cultured Adult versus Fetal Retinal Pigment Epithelial Cells*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2011. **52(8)**: p. 5973-5986.
111. Rosenthal, R., et al., *The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **337(1)**: p. 241-247.
112. Moriarty, P., et al., *Production of IGF-I and IGF binding proteins by retinal cells in vitro*. British Journal of Ophthalmology, 1994. **78(8)**: p. 638-642.
113. Rosenthal, R., et al., *Insulin-like growth factor-1 contributes to neovascularization in age-related macular degeneration*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **323(4)**: p. 1203-1208.

114. Cao, G.-F., et al., *Rapamycin sensitive mTOR activation mediates nerve growth factor (NGF) induced cell migration and pro-survival effects against hydrogen peroxide in retinal pigment epithelial cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **414**(3): p. 499-505.
115. Hoffmann, S., et al., *MMP-2 and MMP-9 secretion by rpe is stimulated by angiogenic molecules found in choroidal neovascular membranes*. Retina, 2006. **26**(4): p. 454-61.
116. Hussain, A.A., et al., *Disturbed Matrix Metalloproteinase Activity of Bruch's Membrane in Age-Related Macular Degeneration*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2011. **52**(7): p. 4459-4466.
117. Padgett, L.C., et al., *Matrix Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in the Retinal Pigment Epithelium and Interphotoreceptor Matrix: Vectorial Secretion and Regulation*. Experimental Eye Research, 1997. **64**(6): p. 927-938.
118. Becerra, S.P., et al., *Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution*. Exp Eye Res, 2004. **78**(2): p. 223-34.
119. Cayouette, M., et al., *Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations*. Neurobiol Dis, 1999. **6**(6): p. 523-32.
120. Ogata, N., et al., *Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury*. Curr Eye Res, 2001. **22**(4): p. 245-52.
121. Li, R., et al., *CNTF Mediates Neurotrophic Factor Secretion and Fluid Absorption in Human Retinal Pigment Epithelium*. PLOS ONE, 2011. **6**(9): p. e23148.
122. Tan, J., et al., *TGF- β 2 in Human Retinal Pigment Epithelial Cells: Expression and Secretion Regulated by Cholinergic Signals In Vitro*. Current Eye Research, 2010. **35**(1): p. 37-44.
123. Yu, A.L., et al., *Subtoxic Oxidative Stress Induces Senescence in Retinal Pigment Epithelial Cells via TGF- β Release*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009. **50**(2): p. 926-935.
124. De, S., et al., *Human retinal pigment epithelium cell changes and expression of α -crystallin: A biomarker for retinal pigment epithelium cell change in age-related macular degeneration*. Archives of Ophthalmology, 2007. **125**(5): p. 641-645.
125. Sreekumar, P.G., et al., *α B Crystallin Is Apically Secreted within Exosomes by Polarized Human Retinal Pigment Epithelium and Provides Neuroprotection to Adjacent Cells*. PLOS ONE, 2010. **5**(10): p. e12578.
126. Beatty, S., et al., *Macular pigment and age related macular degeneration*. Br J Ophthalmol, 1999. **83**(7): p. 867-77.
127. Holz, F.G., et al., *Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease*. Am J Ophthalmol, 2004. **137**(3): p. 504-10.
128. Gamulescu, M.A., A.B. Renner, and H. Helbig, *[Clinical manifestations of functional disturbances of the retinal pigment epithelium]*. Ophthalmologie, 2009. **106**(4): p. 305-10.
129. Friedman, D.S., et al., *Prevalence of age-related macular degeneration in the United States*. Arch Ophthalmol, 2004. **122**(4): p. 564-72.
130. Sharma, K., N.K. Sharma, and A. Anand, *Why AMD is a disease of ageing and not of development: mechanisms and insights*. Front Aging Neurosci, 2014. **6**: p. 151.
131. Beatty, S., et al., *Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(2): p. 439-46.
132. Kishan, A.U., et al., *Lipids and age-related macular degeneration*. Surv Ophthalmol, 2011. **56**(3): p. 195-213.
133. Lim, L.S., et al., *Age-related macular degeneration*. Lancet, 2012. **379**(9827): p. 1728-38.
134. Dorey, C.K., et al., *Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989. **30**(8): p. 1691-9.

135. Hogan, M.J., *Role of the retinal pigment epithelium in macular disease*. Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol, 1972. **76**(1): p. 64-80.
136. Okubo, A., et al., *The relationships of age changes in retinal pigment epithelium and Bruch's membrane*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(2): p. 443-9.
137. Gehrs, K.M., et al., *Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts*. Ann Med, 2006. **38**(7): p. 450-71.
138. von Strachwitz, C.N., [*Atrophic age-related macular degeneration*]. Ophthalmologie, 2013. **110**(6): p. 555-65; quiz 566-7.
139. Sarks, J.P., S.H. Sarks, and M.C. Killingsworth, *Evolution of soft drusen in age-related macular degeneration*. Eye (Lond), 1994. **8** (Pt 3): p. 269-83.
140. Sarks, J.P., S.H. Sarks, and M.C. Killingsworth, *Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium*. Eye (Lond), 1988. **2** (Pt 5): p. 552-77.
141. Adamis, A.P., et al., *Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **193**(2): p. 631-8.
142. Aiello, L.P., et al., *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders*. N Engl J Med, 1994. **331**(22): p. 1480-7.
143. Abugreen, S., et al., *CNV subtype in first eyes predicts severity of ARM in fellow eyes*. British Journal of Ophthalmology, 2003. **87**(3): p. 307-311.
144. Pauleikhoff, D., F.J.G.M. van Kuijk, and A.C. Bird, *Makuläres Pigment und altersabhängige Makuladegeneration*. Der Ophthalmologe, 2001. **98**(6): p. 511-519.
145. Coscas, G. and I. Meunier, [*Surgery of macular neovascular subretinal membranes*]. J Fr Ophthalmol, 1993. **16**(11): p. 633-41.
146. Submacular Surgery Trials Research, G., *Surgery for Subfoveal Choroidal Neovascularization in Age-Related Macular Degeneration: Ophthalmic Findings: SST Report No. 11*. Ophthalmology, 2004. **111**(11): p. 1967-1980.
147. Submacular Surgery Trials Research, G., *Surgery for Hemorrhagic Choroidal Neovascular Lesions of Age-Related Macular Degeneration: Ophthalmic Findings: SST Report No. 13*. Ophthalmology, 2004. **111**(11): p. 1993-2006.
148. Gitter, K.A., G. Cohen, and B.W. Baber, *Photocoagulation in venous occlusive disease*. Am J Ophthalmol, 1975. **79**(4): p. 578-81.
149. Koinzer, S., et al., *Comprehensive detection, grading, and growth behavior evaluation of subthreshold and low intensity photocoagulation lesions by optical coherence tomographic and infrared image analysis*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 492679.
150. Luttrull, J.K. and G. Dorin, *Subthreshold diode micropulse laser photocoagulation (SDM) as invisible retinal phototherapy for diabetic macular edema: a review*. Curr Diabetes Rev, 2012. **8**(4): p. 274-84.
151. *Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no classic choroidal neovascularization—verteporfin in photodynamic therapy report 2*. American Journal of Ophthalmology, 2001. **131**(5): p. 541-560.
152. Schmidt-Erfurth, U. and T. Hasan, *Mechanisms of Action of Photodynamic Therapy with Verteporfin for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration*. Survey of Ophthalmology, 2000. **45**(3): p. 195-214.
153. *Treatment of Age-Related Macular Degeneration With Photodynamic Therapy Study, G., Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration: Additional information regarding baseline lesion composition; impact on vision outcomes—tap report no. 3*. Archives of Ophthalmology, 2002. **120**(11): p. 1443-1454.
154. Journee-de Korver, J.G. and J.E. Keunen, *Thermotherapy in the management of choroidal melanoma*. Prog Retin Eye Res, 2002. **21**(3): p. 303-17.

155. Reichel, E., et al., *Transpupillary thermotherapy of occult subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration*. *Ophthalmology*, 1999. **106**(10): p. 1908-14.
156. Freund, K.B., et al., *TREAT-AND-EXTEND REGIMENS WITH ANTI-VEGF AGENTS IN RETINAL DISEASES: A Literature Review and Consensus Recommendations*. *Retina*, 2015. **35**(8): p. 1489-506.
157. Mazzoni, F., H. Safa, and S.C. Finnemann, *Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture*. *Exp Eye Res*, 2014. **126**: p. 51-60.
158. Adamis, A.P., et al., *Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy*. *Am J Ophthalmol*, 1994. **118**(4): p. 445-50.
159. Gragoudas, E.S., et al., *Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(27): p. 2805-16.
160. Soderberg, A.C., et al., *Combination therapy with low-dose transpupillary thermotherapy and intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: a 24-month prospective randomised clinical study*. *British Journal of Ophthalmology*, 2012. **96**(5): p. 714-718.
161. Byeon, S.H., et al., *Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. **51**(2): p. 1190-7.
162. Miura, Y., A. Klettner, and J. Roider, *VEGF antagonists decrease barrier function of retinal pigment epithelium in vitro: possible participation of intracellular glutathione*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. **51**(9): p. 4848-55.
163. Channa, R., et al., *Regression of choroidal neovascularization results in macular atrophy in anti-vascular endothelial growth factor-treated eyes*. *Am J Ophthalmol*, 2015. **159**(1): p. 9-19 e1-2.
164. Freiberg, F.J., et al., *Microvascular abnormalities secondary to radiation therapy in neovascular age-related macular degeneration: findings from the INTREPID clinical trial*. *Br J Ophthalmol*, 2018.
165. Jackson, T.L., et al., *Stereotactic radiotherapy for neovascular age-related macular degeneration: year 2 results of the INTREPID study*. *Ophthalmology*, 2015. **122**(1): p. 138-45.
166. Luttrull, J.K., et al., *LASER RESENSITIZATION OF MEDICALLY UNRESPONSIVE NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION: Efficacy and Implications*. *Retina*, 2015. **35**(6): p. 1184-94.
167. Nussey, S. and S. Whitehead, in *Endocrinology: An Integrated Approach*. 2001: Oxford.
168. Narayanan, R. and B.D. Kuppermann, *Corticosteroids and Anti-Complement Therapy in Retinal Diseases*, in *Pharmacologic Therapy of Ocular Disease*, S.M. Whitcup and D.T. Azar, Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 309-320.
169. Kiernan, D.F. and W.F. Mieler, *The use of intraocular corticosteroids*. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2009. **10**(15): p. 2511-2525.
170. Kiernan, D.F. and W.F. Mieler, *Intraocular corticosteroids for posterior segment disease: 2012 update*. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2012. **13**(12): p. 1679-1694.
171. Brady, C.J., et al., *Corticosteroid implants for chronic non-infectious uveitis*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(2).
172. Geltzer, A., A. Turalba, and S.S. Vedula, *Surgical implantation of steroids with antiangiogenic characteristics for treating neovascular age-related macular degeneration*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013(1).
173. Ciulla, T.A., et al., *Corticosteroids in posterior segment disease: an update on new delivery systems and new indications*. *Curr Opin Ophthalmol*, 2004. **15**(3): p. 211-20.

174. Pollithy, S., et al., [*Adjuvant stereotactic low energy radiation therapy of exudative age-dependent macular degeneration (Oraya system)*]. *Ophthalmologe*, 2013. **110**(5): p. 460-3.
175. Char, D.H., et al., *Randomized trial of radiation for age-related macular degeneration*. *Am J Ophthalmol*, 1999. **127**(5): p. 574-8.
176. Tholen, A.M., et al., [*Radiotherapy for choroidal neovascularization (CNV) in age-related macular degeneration (AMD)*]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2000. **216**(2): p. 112-5.
177. Trikha, R., et al., *Ten-year follow-up of eyes treated with stereotactic fractionated external beam radiation for neovascular age-related macular degeneration*. *Retina*, 2011. **31**(7): p. 1303-15.
178. Mead, B., et al., *Stem cell treatment of degenerative eye disease*. *Stem Cell Res*, 2015. **14**(3): p. 243-57.
179. Mehat, M.S., et al., *Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration*. *Ophthalmology*, 2018.
180. Koo, T., et al., *CRISPR-LbCpf1 prevents choroidal neovascularization in a mouse model of age-related macular degeneration*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 1855.
181. Wu, W., et al., *Application of CRISPR-Cas9 in eye disease*. *Exp Eye Res*, 2017. **161**: p. 116-123.
182. Hildebrandt, B., et al., *The cellular and molecular basis of hyperthermia*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002. **43**(1): p. 33-56.
183. van der Zee, J., *Heating the patient: a promising approach?* *Ann Oncol*, 2002. **13**(8): p. 1173-84.
184. Newton, A.D., E.K. Bartlett, and G.C. Karakousis, *Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: a review of factors contributing to morbidity and mortality*. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2015. **7**(1): p. 99-111.
185. Mallory, M., et al., *Therapeutic hyperthermia: The old, the new, and the upcoming*. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 2016. **97**: p. 56-64.
186. Knotkova, H., M. Pappagallo, and A. Szallasi, *Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival?* *Clin J Pain*, 2008. **24**(2): p. 142-54.
187. Sikandar, S., et al., *Genes, molecules and patients—Emerging topics to guide clinical pain research*. *European Journal of Pharmacology*, 2013. **716**(1): p. 188-202.
188. Miyata, H., et al., *Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation of cultured human dental pulp cells by low-power gallium-aluminium-arsenic laser irradiation*. *Int Endod J*, 2006. **39**(3): p. 238-44.
189. Shefer, G., et al., *Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway*. *J Cell Physiol*, 2001. **187**(1): p. 73-80.
190. Black, B.J., L. Gu, and S.K. Mohanty, *Highly effective photonic cue for repulsive axonal guidance*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e86292.
191. Ohtake, M., et al., *Hyperthermia and chemotherapy using Fe(Salen) nanoparticles might impact glioblastoma treatment*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 42783.
192. Sato, I., et al., *Simultaneous hyperthermia-chemotherapy with controlled drug delivery using single-drug nanoparticles*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 24629.
193. Sato, I., et al., *Hyperthermia generated with ferucarbotran (Resovist(R)) in an alternating magnetic field enhances cisplatin-induced apoptosis of cultured human oral cancer cells*. *J Physiol Sci*, 2014. **64**(3): p. 177-83.
194. Coley, W.B., *The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)*. *Proc R Soc Med*, 1910. **3**(Surg Sect): p. 1-48.
195. Dobrucki, J. and N.M. Bleehen, *Cell-cell contact affects cellular sensitivity to hyperthermia*. *Br J Cancer*, 1985. **52**(6): p. 849-55.

196. Levine, E.M. and E.B. Robbins, *Differential temperature sensitivity of normal and cancer cells in culture*. J Cell Physiol, 1970. **76**(3): p. 373-9.
197. Einstein, A., *Zur quantentheorie der strahlung*. Phys. Z., 1917. **18**: p. 121-128.
198. Schawlow, A.L. and C.H. Townes, *Infrared and Optical Masers*. Physical Review, 1958. **112**(6): p. 1940-1949.
199. *Lasers in medicine and surgery*. JAMA, 1986. **256**(7): p. 900-907.
200. Maiman, T.H., *Stimulated Optical Radiation in Ruby*. Nature, 1960. **187**: p. 493.
201. Stern, J., S. Enders, and F. Frank, [*Biological effect of the thermal laser*]. Chirurg, 1988. **59**(2): p. 61-7.
202. Dinstl, K. and P.L.R. Fischer, *Geschichte*, in *Der Laser: Grundlagen und klinische Anwendung*, K. Dinstl and P.L.R. Fischer, Editors. 1981, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-11.
203. Vogel, A. and V. Venugopalan, *Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues*. Chem Rev, 2003. **103**(2): p. 577-644.
204. Schneeweiss, C., J. Eichler, and M. Brose, *Biologische Wirkung von Laserstrahlung*, in *Leitfaden für Laserschutzbeauftragte: Ausbildung und Praxis*. 2017, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 25-47.
205. Schneeweiss, C., J. Eichler, and M. Brose, *Physikalische Eigenschaften von Laserstrahlung*, in *Leitfaden für Laserschutzbeauftragte: Ausbildung und Praxis*. 2017, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-24.
206. Anderson, R.R. and J.A. Parrish, *Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation*. Science, 1983. **220**(4596): p. 524-7.
207. Roider, J., et al., *Microphotocoagulation: selective effects of repetitive short laser pulses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8643-7.
208. Roider, J., et al., [*Histology of retinal lesions after continuous irradiation and selective micro-coagulation of the retinal pigment epithelium*]. Ophthalmologie, 1993. **90**(3): p. 274-8.
209. Framme, C., et al., *Threshold determinations for selective retinal pigment epithelium damage with repetitive pulsed microsecond laser systems in rabbits*. Ophthalmic Surg Lasers, 2002. **33**(5): p. 400-9.
210. Jacques, S.L., *Laser-tissue interactions. Photochemical, photothermal, and photomechanical*. Surg Clin North Am, 1992. **72**(3): p. 531-58.
211. Boulnois, J.-L., *Photophysical processes in recent medical laser developments: A review*. Lasers in Medical Science, 1986. **1**(1): p. 47-66.
212. Birngruber, R., F. Hillenkamp, and V.P. Gabel, *Theoretical investigations of laser thermal retinal injury*. Health Phys, 1985. **48**(6): p. 781-96.
213. Birngruber, R., *Thermal Modeling in Biological Tissues*, in *Lasers in Biology and Medicine*, F. Hillenkamp, R. Pratesi, and C.A. Sacchi, Editors. 1980, Springer US: Boston, MA. p. 77-97.
214. Henriques, F.C., Jr., *Studies of thermal injury; the predictability and the significance of thermally induced rate processes leading to irreversible epidermal injury*. Arch Pathol (Chic), 1947. **43**(5): p. 489-502.
215. Pfefer, T.J., et al., *Pulsed laser-induced thermal damage in whole blood*. J Biomech Eng, 2000. **122**(2): p. 196-202.
216. BISCHOF, J.C. and X. HE, *Thermal Stability of Proteins*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1066**(1): p. 12-33.
217. Welch, A., *The thermal response of laser irradiated tissue*. IEEE Journal of Quantum Electronics, 1984. **20**(12): p. 1471-1481.
218. Sliney, D.H. and S.L. Trokel, *Medical lasers and their safe use*. 2012.
219. Alexander, B., A.I. Fishman, and M. Grasso, *Ureteroscopy and laser lithotripsy: technologic advancements*. World Journal of Urology, 2015. **33**(2): p. 247-256.

220. Meesters, A.A., et al., *Transcutaneous laser treatment of leg veins*. Lasers in Medical Science, 2014. **29**(2): p. 481-492.
221. Luebberding, S. and M. Alexiades-Armenakas, *New Tattoo Approaches in Dermatology*. Dermatologic Clinics, 2014. **32**(1): p. 91-96.
222. Anderson, R.R., *Lasers for Dermatology and Skin Biology*. Journal of Investigative Dermatology, 2013. **133**: p. E21-E23.
223. Arora, H., et al., *Lasers for nevi: a review*. Lasers in Medical Science, 2015. **30**(7): p. 1991-2001.
224. Yates, B., et al., *Laser treatment of periocular skin conditions*. Clinics in Dermatology, 2015. **33**(2): p. 197-206.
225. Ali, F.R. and F. Al-Niaimi, *Laser-assisted drug delivery in dermatology: from animal models to clinical practice*. Lasers in Medical Science, 2016. **31**(2): p. 373-381.
226. Jacobsen, T., et al., *Application of laser technology for removal of caries: A systematic review of controlled clinical trials*. Acta Odontologica Scandinavica, 2011. **69**(2): p. 65-74.
227. Sgolastra, F., et al., *Effectiveness of diode laser as adjunctive therapy to scaling root planning in the treatment of chronic periodontitis: a meta-analysis*. Lasers in Medical Science, 2013. **28**(5): p. 1393-1402.
228. Lawless, M. and C. Hodge, *Lasik*. Int Ophthalmol Clin, 2013. **53**(1): p. 111-28.
229. Kampik, A. and F. Grehn, *Chirurgie mit thermischen Lasern*, in *Augenärztliche Therapie*, J. Roider, Editor. 2002, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 125- 141.
230. Glaucoma Laser Trial Research, G., *The Glaucoma Laser Trial (GLT) and Glaucoma Laser Trial Follow-up Study: 7. Results*. American Journal of Ophthalmology, 1995. **120**(6): p. 718-731.
231. Golan, S. and S. Kurtz, *Diode laser cyclophotocoagulation for nanophthalmic chronic angle closure glaucoma*. J Glaucoma, 2015. **24**(2): p. 127-9.
232. Gorsler, I., H. Thieme, and C. Meltendorf, *Cyclophotocoagulation and cyclocryocoagulation as primary surgical procedures for open-angle glaucoma*. Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2015. **253**(12): p. 2273-2277.
233. Hale, G.M. and M.R. Querry, *Optical Constants of Water in the 200-nm to 200-microm Wavelength Region*. Appl Opt, 1973. **12**(3): p. 555-63.
234. Prah, S.A. *Optical absorption of Hemoglobin*. [Web based] 1999 [cited 2018 01.09.]; Scott Prah sammelte und bewertete Daten um eine ideale Absorptionskurve für Hämoglobin erstellen zu können. Die genutzten Daten stammten von W.B. Gratzer (Med. Res. Concl Labs, Kolly Hill, London) und N. Kollias (Wellman Laboratories, Harvard Medical School, Boston).]. Available from: <https://omlc.org/spectra/hemoglobin/>.
235. Jacques, S.L. and D.J. McAuliffe, *The melanosome: threshold temperature for explosive vaporization and internal absorption coefficient during pulsed laser irradiation*. Photochem Photobiol, 1991. **53**(6): p. 769-75.
236. Kolozsvari, L., et al., *UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(7): p. 2165-8.
237. Vogel, A. and R. Birngruber, *Temperature profiles in human retina and choroid during laser coagulation with different wavelengths ranging from 514 to 810 nm*. Lasers Light Ophthalmol, 1992. **5**: p. 9-16.
238. Mainster, M.A., *Wavelength selection in macular photocoagulation. Tissue optics, thermal effects, and laser systems*. Ophthalmology, 1986. **93**(7): p. 952-8.
239. Framme, C., et al., *[Basic principles and clinical application of retinal laser therapy]*. Klin Monbl Augenheilkd, 2008. **225**(4): p. 259-68.
240. Mainster, M.A. and E. Reichel, *Transpupillary thermotherapy for age-related macular degeneration: long-pulse photocoagulation, apoptosis, and heat shock proteins*. Ophthalmic Surg Lasers, 2000. **31**(5): p. 359-73.

241. Brancato, R., et al., *Photocoagulation scar expansion after laser therapy for choroidal neovascularization in degenerative myopia*. *Retina*, 1990. **10**(4): p. 239-43.
242. Guyer, D.R., D.J. D'Amico, and C.W. Smith, *Subretinal fibrosis after laser photocoagulation for diabetic macular edema*. *Am J Ophthalmol*, 1992. **113**(6): p. 652-6.
243. Hudson, C., et al., *Correlation of a scanning laser derived oedema index and visual function following grid laser treatment for diabetic macular oedema*. *Br J Ophthalmol*, 2003. **87**(4): p. 455-61.
244. Lewis, H., et al., *Choroidal neovascularization after laser photocoagulation for diabetic macular edema*. *Ophthalmology*, 1990. **97**(4): p. 503-10; discussion 510-1.
245. Shimura, M., et al., *Quantifying alterations of macular thickness before and after panretinal photocoagulation in patients with severe diabetic retinopathy and good vision*. *Ophthalmology*, 2003. **110**(12): p. 2386-94.
246. Shimura, M., et al., *Visual dysfunction after panretinal photocoagulation in patients with severe diabetic retinopathy and good vision*. *Am J Ophthalmol*, 2005. **140**(1): p. 8-15.
247. Auer, C., V. Tao Tran, and C.P. Herbort, *Transpupillary thermotherapy for occult subfoveal neovessels in age-related macular degeneration: importance of patient pigmentation for the determination of laser settings*. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2002. **219**(4): p. 250-3.
248. Feucht, M., B. Fuisting, and G. Richard, *[Status of TTT in the therapy for CNV]*. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2006. **223**(10): p. 802-7.
249. Connolly, B.P., et al., *The histopathologic effects of transpupillary thermotherapy in human eyes*. *Ophthalmology*, 2003. **110**(2): p. 415-20.
250. Kandulla, J., et al., *Noninvasive optoacoustic online retinal temperature determination during continuous-wave laser irradiation*. *J Biomed Opt*, 2006. **11**(4): p. 041111.
251. Nowak-Sliwinska, P., et al., *Photodynamic therapy for polypoidal choroidal vasculopathy*. *Prog Retin Eye Res*, 2013. **37**: p. 182-99.
252. Kim, H.D., et al., *Retinal Pigment Epithelium Responses to Selective Retina Therapy in Mouse Eyes*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016. **57**(7): p. 3486-95.
253. Schule, G., et al., *Noninvasive optoacoustic temperature determination at the fundus of the eye during laser irradiation*. *J Biomed Opt*, 2004. **9**(1): p. 173-9.
254. Seifert, E., et al. *Selective retina therapy: toward an optically controlled automatic dosing*. 2018. SPIE.
255. Yang, J.H., et al., *Morphologic changes in the retina after selective retina therapy*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2016. **254**(6): p. 1099-109.
256. Koss, M.J., I. Beger, and F.H. Koch, *Subthreshold diode laser micropulse photocoagulation versus intravitreal injections of bevacizumab in the treatment of central serous chorioretinopathy*. *Eye*, 2011. **26**: p. 307.
257. Kretz, F.T., et al., *Randomized Clinical Trial to Compare Micropulse Photocoagulation Versus Half-dose Verteporfin Photodynamic Therapy in the Treatment of Central Serous Chorioretinopathy*. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*, 2015. **46**(8): p. 837-43.
258. Müller, H.H., et al., *Imaging thermal expansion and retinal tissue changes during photocoagulation by high speed OCT*. *Biomedical optics express*, 2012. **3**(5): p. 1025-1046.
259. Wang, T., et al., *Thermo-elastic optical coherence tomography*. *Opt Lett*, 2017. **42**(17): p. 3466-3469.
260. Park, H.G., et al., *Cellular responses to mild heat stress*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(1): p. 10-23.
261. Cordeiro, S., et al., *Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. **51**(11): p. 6001-8.
262. Itoh, H., et al., *Microscopic heat pulse-induced calcium dynamics in single WI-38 fibroblasts*. *Biophysics (Nagoya-shi)*, 2014. **10**: p. 109-19.
263. Abeele, F.V., et al., *TRPV1 variants impair intracellular Ca(2+) signaling and may confer susceptibility to malignant hyperthermia*. *Genet Med*, 2018.

264. Bertin, S., et al., *The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4(+) T cells*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(11): p. 1055-1063.
265. Cao, E., et al., *TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids*. *Neuron*, 2013. **77**(4): p. 667-79.
266. Cao, E., et al., *TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms*. *Nature*, 2013. **504**(7478): p. 113-8.
267. Caterina, M.J., et al., *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. *Nature*, 1997. **389**(6653): p. 816-24.
268. Oyama, K., et al., *Walking nanothermometers: spatiotemporal temperature measurement of transported acidic organelles in single living cells*. *Lab Chip*, 2012. **12**(9): p. 1591-3.
269. Li, J., et al., *Involvement of endoplasmic reticulum stress in all-trans-retinal-induced retinal pigment epithelium degeneration*. *Toxicol Sci*, 2015. **143**(1): p. 196-208.
270. Storniolo, A., et al., *Quercetin affects Hsp70/IRE1alpha mediated protection from death induced by endoplasmic reticulum stress*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015. **2015**: p. 645157.
271. Garbuz, D.G., *[Regulation of heat shock gene expression in response to stress]*. *Mol Biol (Mosk)*, 2017. **51**(3): p. 400-417.
272. Santoro, M.G., *Heat shock factors and the control of the stress response*. *Biochem Pharmacol*, 2000. **59**(1): p. 55-63.
273. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
274. Blessing, N.A., et al., *Osmotic and heat stress-dependent regulation of MLK4beta and MLK3 by the CHIP E3 ligase in ovarian cancer cells*. *Cell Signal*, 2017. **39**: p. 66-73.
275. Jansen, E.D., et al., *Temperature dependence of the absorption coefficient of water for midinfrared laser radiation*. *Lasers Surg Med*, 1994. **14**(3): p. 258-68.
276. Theisen-Kunde, D., et al., *Comparison between a 1.92-mum fiber laser and a standard HF-dissection device for nephron-sparing kidney resection in a porcine in vivo study*. *Lasers Med Sci*, 2011. **26**(4): p. 509-14.
277. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
278. Li, K., et al., *Fluorogenic "click" reaction for labeling and detection of DNA in proliferating cells*. *Biotechniques*, 2010. **49**(1): p. 525-7.
279. Kern, K., et al., *Expression of heat shock protein 70 and cell death kinetics after different thermal impacts on cultured retinal pigment epithelial cells*. *Exp Eye Res*, 2018. **170**: p. 117-126.
280. Oksala, N.K., et al., *Natural thermal adaptation increases heat shock protein levels and decreases oxidative stress*. *Redox Biol*, 2014. **3**: p. 25-8.
281. Lang, B.J., et al., *Heat stress induces epithelial plasticity and cell migration independent of heat shock factor 1*. *Cell Stress Chaperones*, 2012. **17**(6): p. 765-78.
282. Yoshimura, N., et al., *Photocoagulated human retinal pigment epithelial cells produce an inhibitor of vascular endothelial cell proliferation*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1995. **36**(8): p. 1686-1691.
283. Denton, M.L., et al., *Damage Thresholds for Exposure to NIR and Blue Lasers in an In Vitro RPE Cell System*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006. **47**(7): p. 3065-3073.
284. Denton, M.L., et al. *Errata: Spatially correlated microthermography maps threshold temperature in laser-induced damage*. 2015. SPIE.
285. Miura, Y., et al., *Real-time optoacoustic temperature determination on cell cultures during heat exposure: a feasibility study*. *Int J Hyperthermia*, 2019: p. 1-7.
286. Gao, F., et al., *Water bath hyperthermia reduces stemness of colon cancer cells*. *Clinical Biochemistry*, 2013. **46**(16): p. 1747-1750.
287. Yang, K.-L., et al., *In vitro comparison of conventional hyperthermia and modulated electro-hyperthermia*. *Oncotarget*, 2016. **7**(51): p. 84082-84092.

288. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
289. Gottlob, K., et al., *Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase*. Genes & Development, 2001. **15**(11): p. 1406-1418.
290. Vander Heiden, M.G., et al., *Growth Factors Can Influence Cell Growth and Survival through Effects on Glucose Metabolism*. Molecular and Cellular Biology, 2001. **21**(17): p. 5899-5912.
291. Fukagawa, N.K., et al., *Aging and high concentrations of glucose potentiate injury to mitochondrial DNA*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **27**(11): p. 1437-1443.
292. Miceli, M.V., M.R. Liles, and D.A. Newsome, *Evaluation of Oxidative Processes in Human Pigment Epithelial Cells Associated with Retinal Outer Segment Phagocytosis*. Experimental Cell Research, 1994. **214**(1): p. 242-249.
293. Ballinger, S.W., et al., *Hydrogen Peroxide Causes Significant Mitochondrial DNA Damage in Human RPE Cells*. Experimental Eye Research, 1999. **68**(6): p. 765-772.
294. Bhattacharya, S., et al., *Age-Related Susceptibility to Apoptosis in Human Retinal Pigment Epithelial Cells Is Triggered by Disruption of p53–Mdm2 Association*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2012. **53**(13): p. 8350-8366.
295. Bhattacharya, S., et al., *Inhibition of Mdm2 Sensitizes Human Retinal Pigment Epithelial Cells to Apoptosis*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2011. **52**(6): p. 3368-3380.
296. Yang, P., et al., *Caspase-8–Mediated Apoptosis in Human RPE Cells*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007. **48**(7): p. 3341-3349.
297. Zhang, N., et al., *The Importance of Bcl-xL in the Survival of Human RPE Cells*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007. **48**(8): p. 3846-3853.
298. Antony, R., W.J. Lukiw, and N.G. Bazan, *Neuroprotectin D1 Induces Dephosphorylation of Bcl-x(L) in a PP2A-dependent Manner during Oxidative Stress and Promotes Retinal Pigment Epithelial Cell Survival*. The Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(24): p. 18301-18308.
299. Rosenthal, R., et al., *Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease*. Mol Vis, 2007. **13**: p. 443-56.
300. Caterina, M.J., et al., *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. Nature, 1997. **389**: p. 816.
301. Wimmers, S. and O. Strauss, *Basal calcium entry in retinal pigment epithelial cells is mediated by TRPC channels*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(12): p. 5767-72.
302. Ma, W., et al., *RAGE Ligand Upregulation of VEGF Secretion in ARPE-19 Cells*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007. **48**(3): p. 1355-1361.
303. Tsoporis, J.N., et al., *S100B-RAGE dependent VEGF secretion by cardiac myocytes induces myofibroblast proliferation*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(2): p. 464-73.
304. Brzovic-Saric, V., et al., *Levels of selected oxidative stress markers in the vitreous and serum of diabetic retinopathy patients*. Mol Vis, 2015. **21**: p. 649-64.
305. Ishida, S., et al., *VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization*. J Exp Med, 2003. **198**(3): p. 483-9.
306. Yoshimura, T., et al., *Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8158.
307. Wang, J., et al., *Comparison of Continuous-Wave and Micropulse Modulation in Retinal Laser Therapy*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2017. **58**(11): p. 4722-4732.

308. Tissieres, A., H.K. Mitchell, and U.M. Tracy, *Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs*. J Mol Biol, 1974. **84**(3): p. 389-98.
309. Mackanos, M.A. and C.H. Contag. *Pulse duration determines levels of Hsp70 induction in tissues following laser irradiation*. 2011. SPIE.
310. Kose, S., M. Furuta, and N. Imamoto, *Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat shock-induced nuclear damage*. Cell, 2012. **149**(3): p. 578-89.
311. Kose, S. and N. Imamoto, *Nucleocytoplasmic transport under stress conditions and its role in HSP70 chaperone systems*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(9): p. 2953-60.
312. Petersen, H., et al., *Comparative study of wound healing in rat skin following incision with a novel picosecond infrared laser (PIRL) and different surgical modalities*. Lasers Surg Med, 2016. **48**(4): p. 385-91.
313. Suter, V.G.A., S. Sjolund, and M.M. Bornstein, *Effect of laser on pain relief and wound healing of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review*. Lasers Med Sci, 2017. **32**(4): p. 953-963.
314. Tatmatsu-Rocha, J.C., et al., *Mitochondrial dynamics (fission and fusion) and collagen production in a rat model of diabetic wound healing treated by photobiomodulation: comparison of 904 nm laser and 850 nm light-emitting diode (LED)*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2018. **187**: p. 41-47.
315. Tezel, A., et al., *An evaluation of different treatments for recurrent aphthous stomatitis and patient perceptions: Nd:YAG laser versus medication*. Photomed Laser Surg, 2009. **27**(1): p. 101-6.
316. Prasad, R.S. and A. Pai, *Assessment of immediate pain relief with laser treatment in recurrent aphthous stomatitis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2013. **116**(2): p. 189-93.
317. Zand, N., et al., *Relieving pain in minor aphthous stomatitis by a single session of non-thermal carbon dioxide laser irradiation*. Lasers Med Sci, 2009. **24**(4): p. 515-20.
318. Zand, N., et al., *Promoting wound healing in minor recurrent aphthous stomatitis by non-thermal, non-ablative CO(2) laser therapy: a pilot study*. Photomed Laser Surg, 2012. **30**(12): p. 719-23.
319. Aggarwal, H., et al., *Efficacy of low-level laser therapy in treatment of recurrent aphthous ulcers - a sham controlled, split mouth follow up study*. J Clin Diagn Res, 2014. **8**(2): p. 218-21.
320. De Souza, T.O., et al., *Clinical evaluation of low-level laser treatment for recurring aphthous stomatitis*. Photomed Laser Surg, 2010. **28 Suppl 2**: p. S85-8.
321. de Freitas, L.F. and M.R. Hamblin, *Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy*. IEEE J Sel Top Quantum Electron, 2016. **22**(3).
322. Enwemeka, C.S., et al., *The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study*. Photomed Laser Surg, 2004. **22**(4): p. 323-9.
323. MacCorkle, R.A. and T.H. Tan, *Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control*. Cell Biochem Biophys, 2005. **43**(3): p. 451-61.
324. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell Research, 2002. **12**: p. 9.
325. Barolet, D., *Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology*. Semin Cutan Med Surg, 2008. **27**(4): p. 227-38.
326. Tuby, H., L. Maltz, and U. Oron, *Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture*. Lasers in Surgery and Medicine, 2007. **39**(4): p. 373-378.
327. Wagner, V.P., et al., *Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing*. J Biomed Opt, 2013. **18**(12): p. 128002.

328. Xia, W., R. Voellmy, and N.L. Spector, *Sensitization of tumor cells to fas killing through overexpression of heat-shock transcription factor 1*. J Cell Physiol, 2000. **183**(3): p. 425-31.
329. Liossis, S.N., et al., *Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells*. J Immunol, 1997. **158**(12): p. 5668-75.
330. Dewey, W.C., *Interaction of heat with radiation and chemotherapy*. Cancer Res, 1984. **44**(10 Suppl): p. 4714s-4720s.
331. Gu, Z.T., et al., *Heat stress induces apoptosis through transcription-independent p53-mediated mitochondrial pathways in human umbilical vein endothelial cell*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 4469.
332. Curry, H.A., et al., *Heat shock inhibits radiation-induced activation of NF-kappaB via inhibition of I-kappaB kinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23061-7.
333. Maheswaran, S., et al., *Inhibition of cellular proliferation by the Wilms tumor suppressor WT1 requires association with the inducible chaperone Hsp70*. Genes Dev, 1998. **12**(8): p. 1108-20.
334. Ran, R., et al., *Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling*. Genes Dev, 2004. **18**(12): p. 1466-81.
335. Ryoo, H.D. and A. Bergmann, *The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(8): p. a008797.
336. Stanciu, M., et al., *Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 12200-6.
337. Yao, J.Q., et al., *Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin inhibits the proliferation of ARPE-19 cells*. J Biomed Sci, 2010. **17**: p. 30.
338. Jagadish, N., et al., *Heat shock protein 70-2 (HSP70-2) is a novel therapeutic target for colorectal cancer and is associated with tumor growth*. BMC cancer, 2016. **16**: p. 561-561.

1. ANHANG

1.1. Herstellernachweise

Tabelle 6: Herstellernachweise

Hersteller	Sitz
Assistent	Sonderheim/Rhön; Deutschland
Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Berner	Elmshorn, Deutschland
Bio-Rad	Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
BioSan Sia	Riga, Lettland
Brand	Wertheim, Deutschland
Braun	Melsungen, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Dassault Systèmes	Vélizy-Villacoublay, Frankreich
Dumont	Montignez, Schweiz
DWK Life Sciences	Mainz, Deutschland
Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Fisher Scientific	Hampton, New Hampshire, Vereinigte Staaten von Amerika
Geuder GmbH	Heidelberg, Deutschland
Gorenje	Velenje, Slowenien
Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Heathrow Scientific	Vernon Hills, Illinois, Vereinigte Staaten von Amerika
Heidolph	Schwabach, Deutschland
Heirler Cenovis GmbH	Radolfzell, Deutschland
Hereaus Sepatech	Hanau, Deutschland
Hermle	Gosheim, Deutschland
Hilgenberg	Malsfeld, Deutschland
Ibidi	Planegg, Deutschland
IKA-Werke	Staufen im Breisgau, Deutschland
Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
Kern & Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Köttermann Labortechnik	Uetze, Deutschland
Laser Components	Olching, Deutschland
Liebherr	Bulle FR, Schweiz
Life technologies	Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
Manitowoc	Manitowoc, Wisconsin, Vereinigte Staaten von Amerika
MEDITE GmbH	Burgdorf, Deutschland
MeduTex	Bremen, Deutschland
Merck Millipore	Burlington, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
Microsoft Corporation	Redmond, Washington, Vereinigte Staaten von Amerika
Millipore Corporation	Billerica Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
Molecular Devices	San José, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika

Nano EnTek	Seoul, Südkorea
National Instruments	Austin, Texas, Vereinigte Staaten von Amerika
Nikon	Tokio, Japan
Omega® Engineering Inc	Stamford, Connecticut, Vereinigte Staaten von Amerika
Perttu Terho	Universität zu Turku, Turku, Finnland (jetzt: Auria Biobank)
Prior Scientific, Inc.	Rockland, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
PromoKine	Heidelberg, Deutschland
R&D Systems	Minneapolis, Minnesota, Vereinigte Staaten von Amerika
Santa Cruz Biotechnology	Dallas, Texas, Vereinigte Staaten von Amerika
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika
StarMedTec GmbH	Starnberg, Deutschland
Thermo Scientific	Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika
Thomson Reuters	Toronto, Kanada
Thorlabs Inc.	New Jersey, Vereinigte Staaten von Amerika
Vitlab	Grossostheim, Deutschland
Zwilling	Solingen, Deutschland

1.2. Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 7: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absaughilfen	FTA-1	BioSan Sia
(Divers)	Kataspit 20 Eco	MeduTex
Becherglas	Duran™ Bechergläser mit Ausguss (unterschiedliche Volumina)	Fisher Scientific
Blot Kammer	TransBlot® Turbo™ Blotting System	Bio-Rad
Dokumentationshilfe für Western Blots	ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad
Durchflusszytometer	FACScan	Becton Dickinson
Erlenmeyerkolben	Fisherbrand™ Erlenmeyerkolben (unterschiedliche Volumina)	Fisher Scientific
Feinpinzette	18856	Geuder GmbH
Feinschere	545	Hermle
Feinwaage	CP64	Sartorius AG
Feuchtbrutschrank	Heracell™ 204i	Thermo Scientific
Flachpinzette	Dumoxel® E	Dumont
Flockeneisbereiter	RF 0244 A	Manitowoc
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse Ti	Nikon

Fluoreszenzspektrometer	SpectraMAX M4	Molecular Devices
Gelkammer	Mini-PROTEAN® Terta System	Bio-Rad
Gewebsschere	19355	Geuder GmbH
Heizblock	Thermomoxer 5437	Eppendorf
Heizplatte	OTS 40	MEDITE GmbH
Kippschüttler	Polymax 1040	Heidolph
Kühlschränke	Comfort	Liebherr
(Divers)	RF4248W	Gorenje
Messkolben	BLAUBRAND® Messkolben (unterschiedliche Volumina)	Brand
Messzylinder Glas	DURAN® Messzylinder mit Sechskantfuß (unterschiedliche Volumina)	DWK Life Sciences GmbH
Messzylinder Plastik	Messzylinder, PMP, Klasse A	Vitlab
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse 2	B-[MaxPro] ³ -190	Berner
Mikroskop Hand Teil	PS3J100	Prior Scientific, Inc.
Objekttischmotor		
Mikroskop Hellfeld-Lampe	TI-PS 100 W/A	Nikon
Mikroskop Kamera	Digital Slight DS-U3	Nikon
Mikroskop Lichtquelle	IntensLight C-HG FIE	Nikon
Mikroskop Motor für Objekttisch	ProScan III (V31XYZE)	Prior Scientific, Inc.
Neubauer-Zählkammer	Zählkammer Neubauer	Assistent
OCT	Callisto	Thorlabs Inc.
Pinzette	B-1355 INOX	Zwilling
Pipette 10 µl (grau)	Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel 0.5-10 µl mittelgrau	Eppendorf
Pipette 1000 µl (blau)	Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel 100-1000 µl blau	Eppendorf
Pipette 20 µl (gelb)	Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel 2-20 µl gelb	Eppendorf
Pipette 200 µl (gelb)	Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel 20-200 µl gelb	Eppendorf
Pumpfaser	All Silica, Low OH365	Laser Components
Rührschüttler	MS2 Minishaker	IKA-Werke
Schott-Flasche	DURAN® Laborglasflaschen (unterschiedliche Volumina)	DWK Life Sciences GmbH
Skalpell	Cutfix Stainless Sterile Scalpel #21/ #24	Braun
Stromversorgung für Gelkammer	PowerPac™ Basic	Bio-Rad

System zum Filtern von Wasser	Synergy®	Merck Millipore
Thermoelement	HYP-0-33-1-T-G-60-SMPW-M	Omega® Engineering Inc.
Thuliumlaser	Vela	StarMedTec GmbH
Tischzentrifuge	Sprout™	Heathrow Scientific
Videomikroskop	JuLi™ FL	Nano EnTek
Waage	PCB2000-1	Kern & Sohn GmbH
Wascheinheit	Wellwash	Thermo Scientific
Wasserbad		Köttermann Labortechnik
Zentrifuge (groß)	Varifuge 20RS	Heraeus Sepatech
Zentrifuge (klein)	Hereaus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific

1.3. Spezifikationen Laser

Tabelle 8: Spezifikationen des verwendeten Laseraufbaus

Gerät	Parameter	Eigenschaften
Thuliumlaser	Wellenlänge	1940 nm
	Leistungsbereich	0-20 W
	Absorptionskoeffizient	127 cm ⁻¹
	Eindringtiefe	1/e (≈ 36%)=80 µm
Pumpfaser	Numerische Apertur	0,22
	Kern Durchmesser	365 µm ± 10 µm
	Mantel Durchmesser	400 µm ± 8 µm
	Coating Durchmesser	425 µm ± 8 µm
	Buffer Durchmesser	730 µm ± 30 µm

1.4. Software

Tabelle 9: Verwendete Software

Name	Herausgeber	Version
BIOVIA Draw 2018	Dassault Systèmes	18.1.0.1412
EndNote	Thomson Reuters	X7.8
Flowing Software 2	Perrtu Terho	2.5.1
Image Lab™	BioRad	6.0
LabVIEW®	National Instruments	8.6
Mikrosoft Excel	Microsoft Corporation	Excel 2016
NIS-Elements	Nikon	AR 4.1305 64-bit

1.5. Chemikalien

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Bromphenolblau	Roth
BSA	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline w/o CaCl₂/ MgCl₂ (PBS⁻)	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Glukose	Sigma-Aldrich
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Sigma-Aldrich
H₂O bidest.	n/a
Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH
NaCl	Sigma-Aldrich
Penicillin/ Streptomycin	Sigma-Aldrich
Porcine Serum	Sigma-Aldrich
Sodium Pyruvat	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
TrismaBase	Sigma-Aldrich
Triton-X 100	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich
Tween20	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

1.6. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
μ-Dish 35 mm high, Glass Bottom	Ibidi
Culture-Insert 3 Well in μ-Dish	Ibidi
Einwegspritze 10 ml	Braun
Einwegspritzen 5 ml	Braun
Filtriereinheit 0,2μm (blau)	Roth
Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen	Sarstedt
Pasteurpipetten (Glas)	Hilgenberg
Pasteurpipetten (Plastik)	Brand
Pipettenspitzen 1 ml (blau)	Sarstedt
Pipettenspitzen 10μl (weiß)	Sarstedt

Pipettenspitzen 200 µl (gelb)	Sarstedt
Trans-Blot® Turbo™ Mini-size PVDF Membrane	Bio Rad
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 15 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 200 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäß 50 ml	Sarstedt
Röhre 5 ml	Sarstedt
Rotilabo®-Verschlussclips	Roth
Serologische Pipetten 1 ml (Plastik)	Sarstedt
Serologische Pipetten 10 ml (Plastik)	Sarstedt
Serologische Pipetten 5 ml (Plastik)	Sarstedt
Zellkulturschale 10 cm	Greiner Bio-One
Zellkulturschale 35 mm	Greiner Bio-One
Zellkulturschale 35 mm sechsfach	Greiner Bio-One
Zellkulturschale 66 mm	Greiner Bio-One
Zellschaber	Sarstedt
Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Transfer Stacks	Bio Rad

1.7.Kitsysteme

Tabelle 12: Verwendete Kitsysteme

Bezeichnung	Hersteller
10x TGS Buffer (Tris/ Glycine/ SDS buffer)	Bio Rad
4-15 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels	Bio Rad
Apoptotic/ Necrotic/ Healthy Cells Detection Kit	PromoKine
BCA-Protein Assay Kit	Bio Rad
Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Imaging Kit	Invitrogen
Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 Imaging Kit	Invitrogen
Immobilion™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore Corporation
Precision Plus Protein™ Unstained Standard	Bio Rad
Precision Protein™ Strep Tactin-HRP Conjugate	Bio Rad
Quantikine ELISA Human VEGF	R&D Systems
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific
Trans-Blot® Turbo™ 5x Transfer Buffer	Bio Rad

1.8.Puffer und Lösungen

Tabelle 13: Zellbiologische Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoff	Konzentration
DMEM-Vollmedium	DMEM Medium High Glucose (4500 mg/l)	
	Schweine Serum	10 %(v/v)
	Sodium-Pyruvate Lösung	100 mM
	Penicillin	10000 units/ ml
	Streptomycin	10 mg/ ml
T (Trypsin)	PBS ⁻	
	Trypsin	0,25 % (w/v)
T/E (Trypsin/ EDTA)	PBS ⁻	
	Trypsin	0,25 % (w/v)
	EDTA	0,2 % (w/v)

Tabelle 14: Verwendete Puffer und Lösungen für Zellysate

Bezeichnung	Zusatz	Zusammensetzung	Hersteller
RIPA Lysis Buffer System		965 µl	Santa Cruz
	Protease Inhibitor Cocktail	15 µl	Biotechnology
	PMSF	10 µl	
	Na-Orhtovandate	10 µl	

Tabelle 15: Immunzytochemische Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Konzentration
0,05% Triton-X 100	1% Triton-X 100 dH ₂ O	
Blockierlösung	BSA dH ₂ O	1% (w/v)
Primärantikörper	1% BSA Primärantikörper	Tabelle 17
Sekundärantikörper	PBS ⁻ Sekundärantikörper	Tabelle 18
Fixierlösung	4,5% Formaldehyd	

Tabelle 16: Proteinbiochemische Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoff	Konzentration
10x TBS	NaCl	1,5 M
	TrisBase	100 mM
	dH ₂ O	ad 1 l (pH=7,5)
Antikörperlö- sung	TBST	
	Magermilchpulver	5 % (w/v)
	Antikörper	Primärantikörper (Tabelle 17) Sekundärantikörper (Tabelle 18)
Blockierlösung	TBST	
	Magermilchpulver	5 % (w/v)
Laufpuffer	10x TGS Buffer	100 ml
	dH ₂ O	900ml
Probenpuffer	Tris-HCl	600 µl
	Glycerol (50%)	5 ml
	SDS (10%)	2 ml
	Bromphenol Blau (1%)	1 ml
	dH ₂ O	900 µl
	Arbeitslösung	
	Probenpuffer	950 µl
TBST	β-Mercaptoethanol	50 µl
	1x TBS	
Transferpuffer	Tween20	0,1 % (v/v)
	Trans-Blot® Turbo™ 5x Transfer Buffer	200 ml
	dH ₂ O	
	Ethanol	600 ml
		200 ml
Entwicklerlö- sung	Immobilion™ Western Chemiluminescent	50% (v/v)
	HRP Substrate A	
	Immobilion™ Western Chemiluminescent	50% (v/v)
	HRP Substrate B	

1.9. Antikörper

Tabelle 17: Eingesetzte Primärantikörper

Bezeichnung	Organismus	Konzentration		Hersteller
		Western Blot	Immunzytochemie	
HSP70 (sc-66048)	Maus	1: 1000	1: 200	Santa Cruz Biotechnology
VEGF (sc-507)	Rabbit	1:250		Santa Cruz Biotechnology

Tabelle 18: Eingesetzte Sekundärantikörper

Bezeichnung	Kopplung	Konzentration	Hersteller
Donkey Anti-Mouse IgG (sc-2314)	HRP	1: 1000	Santa Cruz Biotechnology
Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	HRP	1: 1000	Life technologies
Goat Anti-Mouse IgG, IgM (H+L)	Alexa Fluor® 488	1: 250	Life technologies
Donkey Anti-Rabbit IgG (sc-2313)	HRP	1: 250	Santa Cruz

1.10. Protease-Inhibitoren

Tabelle 19: Protease-Inhibitoren

Bezeichnung	Konzentration/ Lösungsmittel	Hersteller
Protease Inhibitor Cocktail	o.A./ DMSO	Santa Cruz
PMSF	200 mM/ DMSO	Santa Cruz
Na-Orthovanadate	100 mM/ dH ₂ O	Santa Cruz

2. DANKSAGUNGEN

三浦央子先生の素晴らしいご指導に感謝いたします。新しいことを習い、知識を広げるのに苦勞していた際に応援いただいたことについては、感謝してもしきれません。いつも熱意を持ち、信頼できる先生でした。三浦先生と過ごした様々な思い出は忘れません。これまでに受けたご厚意と信頼に対して、厚くお礼申し上げます。

Den Kolleginnen und Kollegen vom BMO und MLL danke ich für die schöne Pläusche in der Kaffeecke, den interdisziplinären Austausch und das angenehme Arbeitsklima.

Ich danke auch den Mitgliedern der AG Miura, Yoko, Erdal, Alessa, Britta, Jacqueline und Chris. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit. Es war mir eine Ehre mit euch zusammen arbeiten zu dürfen.

Daniel Weng, Carla-Lotta Mertineit, Saskia Baier und Richard Schäfer (Britta Lewke) danke ich dafür, dass ich die Betreuung eurer Abschlussarbeiten im Rahmen eures Bachelor- oder Master-Studiums übernehmen durfte. Ich hoffe, dass nicht nur ich aus der Zusammenarbeit an den Projekten gelernt habe.

Auch möchte ich Frau Astrid Link danken. Vielen Dank dafür, dass du immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast. Insbesondere möchte ich dir dafür danken, dass du irgendwie immer Zeit für zwischenmenschliches aufbringen kannst. Und dein Hund ist einfach super cool.

Vielen Dank an Eric Seifert für die vielen Gespräche und die Korrektur meiner Arbeit.

Liebe Mama, es ist mir ein besonderes Anliegen dir zu danken. Die letzten Jahre waren hart und trotzdem hattest du noch genug Kraft mich moralisch zu unterstützen. Ich bewundere wie stark du bist und hoffe, dass ein Teil von dem was dich so stark macht auch in mir ist. Vielen Dank für deine Unterstützung und all die aufbauenden Worte die du immer wieder für mich bereithältst.

Lieber Papa, vielen Dank für die Unterstützung die du mir all die Jahre entgegengebracht hast. Ich bin sehr glücklich, dass du und Lena ein Teil meines Lebens seid und wir uns trotz der räumlichen Entfernung nah sein können. Es bedeutet mir viel, dass du ein Teil meines Lebens bist.

