

Aus der Klinik für Ophthalmologie  
(Direktor: Prof. Dr. Johann Roider)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Temperaturabhängige VEGF Induktion im human RPE –  
Mögliche Bedeutung für die Transpupilläre Thermotherapie**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Hendrik Faby  
aus Bad Segeberg

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Bleich

Tag der mündlichen Prüfung: 11.08.2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 25.03.2016

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

# INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	4
TABELLENVERZEICHNIS.....	5
ABKÜRZUNGEN/LEGENDE.....	5
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
1.1 ALLGEMEINE ANATOMIE.....	7
1.2 ANATOMIE DER RETINA.....	7
1.3 DAS RETINALE PIGMENTEPITHEL (RPE).....	8
1.4 <i>VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR</i> (VEGF).....	10
1.5 MITOGEN AKTIVIERTE PROTEINKINASEN (MAPK).....	11
1.5.1 C-JUN N-TERMINALE KINASEN (JNK).....	12
1.5.2 P38-MITOGENAKTIVIERTE PROTEINKINASE (P38-MAPK).....	13
1.5.3 EXTRAZELLULÄR SIGNAL-REGULIERTE KINASEN (ERK 1/2).....	14
1.6 TRANSIENT REZEPTOR POTENTIAL-KANÄLE (TRP-KANÄLE).....	14
1.6.1 THERMOSENSIBLE TRP-KANÄLE.....	15
1.9 FRAGESTELLUNG.....	22
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>24</b>
2.1 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	24
2.2 ZELLKULTUR.....	26
2.2.1 KULTIVIERUNG.....	26
2.2.1.1 Kulturbedingungen.....	26
2.2.1.2 Vermehrung.....	27
2.3 STIMULATION.....	27
2.3.1 HITZESTIMULATION.....	27
2.3.2 HITZESTIMULATION UNTER ZUGABE VON INHIBITOREN.....	28
2.4 TOXIZITÄTSTEST.....	29
2.4.1 TRYPANBLAU-VITALFÄRBUNG.....	29
2.5 SANDWICH-ELISA (ENZYM-LINKED-IMMUNOSORBENT-ASSAY).....	30
2.5.1 VERWENDETE KOMPONENTEN.....	31
2.5.2 VORBEREITUNGEN.....	31
2.5.2.1 Vorbereitung der Proben.....	31
2.5.2.2 Herstellung einer Standardreihe.....	32
2.5.2.3 Durchführung des Sandwich-ELISAs.....	32
2.5.2.4 Auswertung der Messungen.....	33
2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	33
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>34</b>
3.1 ZELLÜBERLEBEN NACH HITZESTIMULATION.....	34
3.1.1 STIMULATION MIT 40°C.....	34
3.1.2 STIMULATION MIT 42°C.....	35
3.1.3 STIMULATION MIT 45°C.....	36
3.1.4 STIMULATION MIT 50°C.....	37
3.2 VEGF-SEKRETION NACH HITZESTIMULATION.....	38

3.2.1	VIER STUNDEN NACH STIMULATION.....	39
3.2.2	24 STUNDEN NACH STIMULATION .....	40
3.3	ZUGRUNDELIEGENDE SIGNALKASKADEN DER VEGF-SEKRETION .....	42
3.3.1	MAPK.....	42
3.3.2	TRPV.....	43
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>45</b>
4.1	TEMPERATURABHÄNGIGER ANSTIEG DER VEGF-SEKRETION.....	47
4.2	REGULATIONSMECHANISMEN DER VEGF-SYNTHESE IM RPE.....	48
4.2.1	EINFLUSS VON P38 AUF DIE VEGF-SYNTHESE IM RPE.....	48
4.2.2	EINFLUSS VON ERK 1/2 AUF DIE VEGF-SYNTHESE IM RPE.....	49
4.2.3	EINFLUSS VON JNK AUF DIE VEGF-SYNTHESE IM RPE.....	50
4.3	EINFLUSS DER TRPV-KANÄLE AUF DIE VEGF-SEKRETION IM RPE.....	51
4.4	MÖGLICHER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN HYPERTHERMER VEGF-HOCHREGULATION UND PATHOLOGISCHEN RETINALEN VERÄNDERUNGEN .....	52
4.5	SCHLUSSFOLGERUNGEN DIESER ARBEIT .....	54
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>PREISE UND VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>74</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Querschnitt des menschlichen Auges.....	7
Abbildung 2:	Schematischer Schnitt durch die Netzhaut.....	8
Abbildung 3:	Funktionen und Aufgaben des retinalen Pigmentepithels.....	9
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der MAPK-Signalkaskaden.....	12
Abbildung 5:	a) Schematische Darstellung aller TRPV-Mitglieder; (b)Aktivität der einzelnen Kanäle in Bezug auf die Temperatur.....	16
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des VEGF-ELISA.....	30
Abbildung 7:	Zellüberleben in % bei Stimulation mit 40°C.....	35
Abbildung 8:	Zellüberleben in % bei Stimulation mit 42°C.....	36
Abbildung 9:	Zellüberleben in % bei Stimulation mit 45°C.....	37

Abbildung 10: Zellüberleben in % bei Stimulation mit 50°C.....	38
Abbildung 11: VEGF Sekretion 4 Stunden nach Stimulation.....	40
Abbildung 12: VEGF Sekretion 24 Stunden nach Stimulation .....	41
Abbildung 13: Inhibition der VEGF Sekretion durch MAPK.....	43
Abbildung 14: Inhibition der VEGF Sekretion durch Hemmung der TRPV-Kanäle.....	44
Abbildung 15: stark vereinfachter Noxen spezifischer Einfluß der MAPK auf die VEGF-Expression.....	51

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte .....	24
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien .....	25
Tabelle 3: Sonstige verwendete Materialien.....	25
Tabelle 4: Zusammensetzung Nährmedium ARPE 19 .....	26
Tabelle 5: Übersicht über die Inhibitoren und deren Wirkorte .....	28
Tabelle 6: Antikörper des ELISA.....	31
Tabelle 7: Platten, Lösungen und Puffer für Sandwich-ELISA.....	31
Tabelle 8: Verdünnungsschema Sandwich-ELISA.....	32
Tabelle 9: Waschpuffer Sandwich-ELISA.....	32
Tabelle 10: Substrat-Lösung Sandwich-ELISA.....	32

## Abkürzungen/Legende

AGE	<i>Advanced glycation end products</i>
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
CNV	choroidale Neovaskularisation
CSF-1	<i>colony-stimulating factor 1</i>
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK1/2	extrazellulär signal-regulierte Kinasen
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor 1</i>

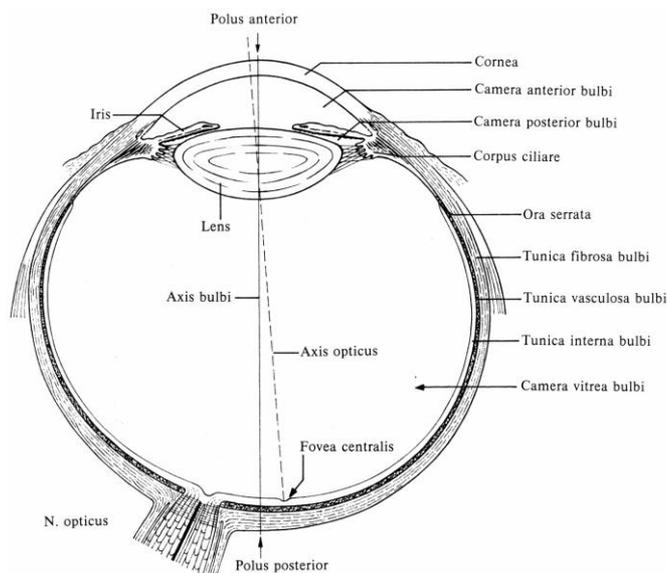
HRE	<i>hypoxia responsive element</i>
HuR	humanes Antigen R
IFN- $\gamma$	Interferon- gamma
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IL-1 $\beta$	Interleukin 1beta
IRS-1	Insulin Rezeptor Substrat 1
JNK	c-Jun <i>N</i> -terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MAPKK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen-Kinasen
MAPKKK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen-Kinasen-Kinasen
MKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
P38-MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
R10 $\mu$ M	Ruthenium Rot 10 $\mu$ M
R20 $\mu$ M	Ruthenium Rot 20 $\mu$ M
ROP	<i>Retinopathy of Prematurity</i>
RPE	Retinales Pigmentepithel
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinasen
TGF- $\beta$	<i>Tumor growth factor beta</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPC	<i>transient receptor potential classic</i>
TRPM	<i>transient receptor potential melastatin</i>
TRPV	<i>transient receptor potential vanilloid</i>
TTT	Tanspupilläre Thermotheapie
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular Endothel Growth Factor</i>
VEGFR-2	<i>Vascular Endothel Growth Factor Rezeptor-2</i>
VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor protein
VR1	Vanilloidrezeptor-1

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Anatomie

Das Auge besteht aus drei äußeren, übereinander angeordneten, Gewebsschichten und einem fast zellfreien Innenraum, welcher die lichtbrechenden Medien des Glaskörpers und der Linse beinhaltet.

Das sichtbare Licht passiert somit bevor es auf die Netzhaut trifft den sogenannten lichtbrechenden Apparat, bestehend aus Hornhaut, Vorderkammer, Linse und Glaskörper. Durch die Lichtbrechung wird ein verkleinertes, umgekehrtes Bild des Objektes auf die Retina projiziert.



**Abbildung 1: Querschnitt des menschlichen Auges**

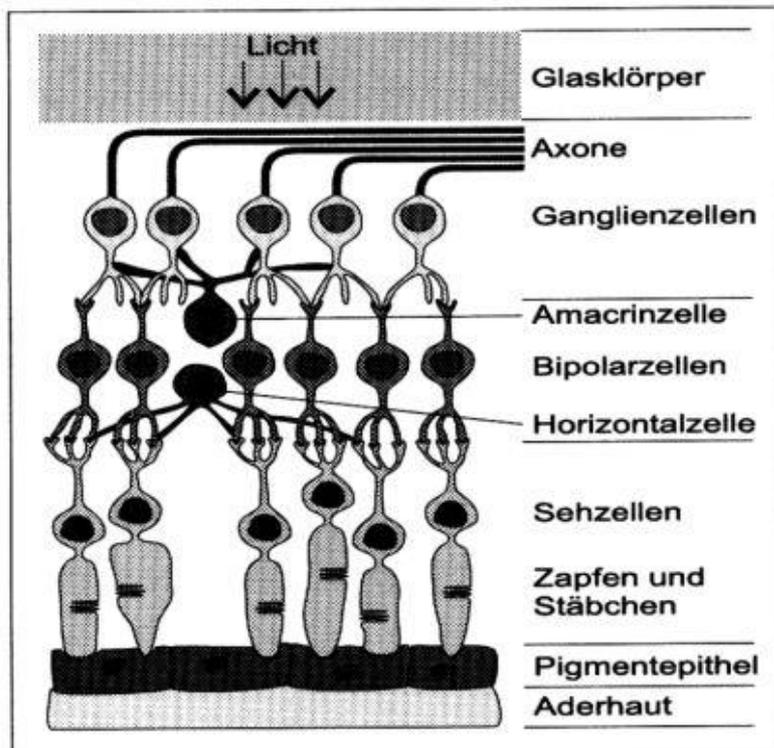
Quelle: (Schumacher 1991)

## 1.2 Anatomie der Retina

Die Netzhaut (Retina) ist die innerste der drei Schichten des Augapfels. Sie reicht vom Sehnervenkopf (Papille) bis zur Ora serrata und ist nur in diesen Bereichen fest mit der Tunica vasculosa verbunden, während ansonsten lediglich eine lockere Verbindung zum retinalen Pigmentepithel besteht.

Unterteilt wird die Netzhaut in zwei Abschnitte: die lichtempfindliche Pars optica retinae und die lichtunempfindliche Pars caeca retinae. Die Pars optica retinae wird

wiederum in zwei Funktionseinheiten gegliedert. Zum einen in die Pars pigmentosa, welche das retinale Pigmentepithel (RPE) einschließt, zum anderen in die Pars nervosa, in der sich ein Netzwerk von hintereinander geschalteten Neuronen befindet, welche für die Wahrnehmung und Weiterleitung von visuellen Reizen verantwortlich sind. Einen schematischen Schnitt durch die Netzhaut mit einer Übersicht über die einzelnen Zellschichten der Retina wird in Abbildung 2 gezeigt:



**Abbildung 2: Schematischer Schnitt durch die Netzhaut**

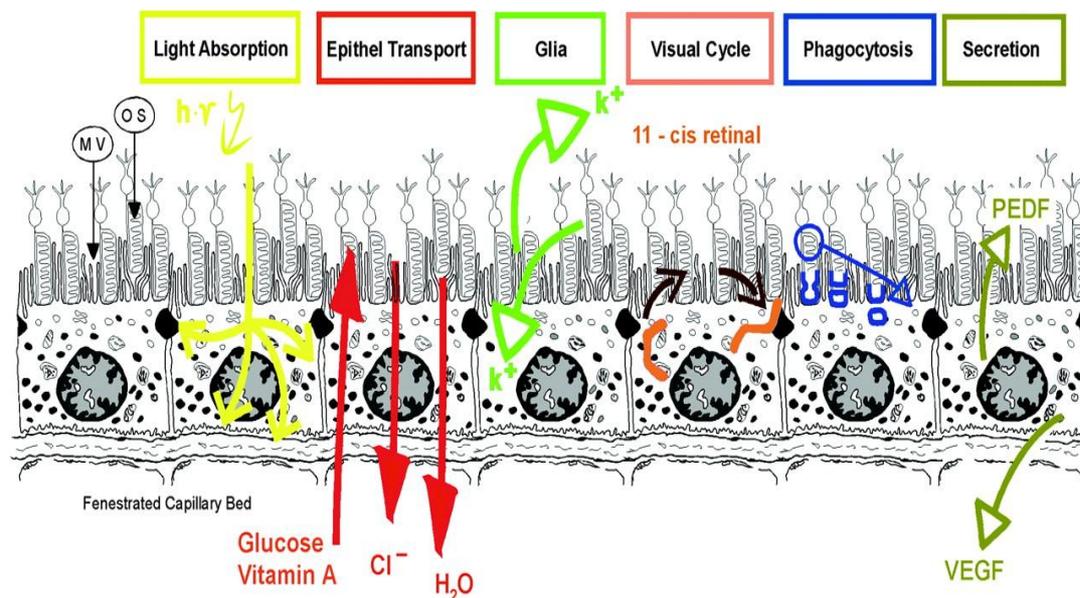
Quelle: (Scherf 1997)

### 1.3 Das retinale Pigmentepithel (RPE)

Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist eine einschichtige Zellschicht aus polarisierten Zellen, die über *Tight Junctions* miteinander verbunden sind. Wie in obiger Abbildung 2 schematisch dargestellt, liegt das RPE unmittelbar zwischen der Pars nervosa mit direktem Kontakt zu den Außensegmenten der Photorezeptorzellen und der Bruch-Membran. Dieser direkte Kontakt ist wichtig, da das RPE unerlässlich ist für die Funktion und den Metabolismus der Photorezeptorzellen und zusammen mit der Bruch-Membran die sogenannte Blut-Retina-Schranke bildet. Seinen Namen trägt das RPE

aufgrund seiner hohen Dichte an Melanin granula im Zytoplasma. Der hohe Melaningehalt lässt das Epithel in einer schwarz-braunen Farbe erscheinen. Diese dunkle Pigmentierung dient dazu, beim Lichteinfall auftretendes Streulicht zu absorbieren. Die apikale Oberfläche des RPE besitzt viele lange Mikrovilli, welche weit in den Bereich der Photorezeptoraußensegmente reichen und diese zum Teil umgreifen. Hierdurch entsteht ein enger Kontakt zwischen RPE und sensorischer Retina. Zu den Hauptaufgaben des RPE zählen die Regeneration von Vitamin A, die Phagozytose der abgeschnürten Außensegmente und der Stoffaustausch mit den Photorezeptoren. Die Ernährung der Rezeptorzellen wird durch die apikal umgreifenden Mikrovilli des Pigmentepithels gewährleistet (Strauss 2005). Zusätzlich ist das RPE für die Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren zuständig. Eine übergeordnete Rolle spielt hierbei der Botenstoff *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Dieser wird in der Netzhaut größtenteils vom RPE sezerniert (Blaauwegers et al. 1999). Die Regulation der VEGF-Ausschüttung kann über verschiedene Noxen reguliert werden. Es gibt Hinweise darauf, dass die Regulation auch über die Temperatur beeinflusst wird. (Moon et al. 2010; Gong et al. 2006).

Die Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über die Funktionen und Aufgaben des RPE:



**Abbildung 3: Funktionen und Aufgaben des retinalen Pigmentepithels**

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*; PEDF: *Pigment Epithelial Derived Factor*; OS: Außensegmente der Photorezeptorzellen; MV: Mikrovilli des RPE

Quelle: (Strauß 2005)

## **1.4 *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)***

Für die Bildung neuer Blutgefäße ist VEGF einer der entscheidenden Faktoren (Ferrara 2009). Die VEGF-Familie besteht aus den Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F und dem *Placenta Growth Factor* (Holmes et Zachary 2005, Yamazaki et Morita 2006). In dieser Arbeit steht bei allen Untersuchungen der Faktor VEGF-A im Zentrum des Interesses. Wie in der Literatur gebräuchlich, erfolgt eine synonyme Verwendung mit dem Begriff „VEGF“.

Das Glykoprotein VEGF hat ein Molekulargewicht von 45 Kilodalton (kDa) (Ferrara et Henzel 1989) und besteht aus zwei Untereinheiten von je 23kDa (Ferrara et Henzel 1989). Es existieren verschiedene Isoformen des VEGF-Moleküls. Diese entstehen durch alternatives Spleißen und unterscheiden sich durch die Anzahl ihrer Aminosäuren (Tischer et al. 1991). Im retinalen Gewebe findet sich fast ausschließlich die Isoform VEGF<sub>165</sub>, in wesentlich geringerem Maße auch VEGF<sub>121</sub> (Kim et al. 1999). Es konnten verschiedene Stimuli nachgewiesen werden, welche die Expression von VEGF modulieren können. Hierzu zählen oxidativer Stress (Klettner et Roider 2009), Hypoxie (Shweiki et al. 1992), erhöhte Zytokinkonzentrationen (Naginei et al. 2012) und Hyperthermie (Moon et al. 2010; Gong et al. 2006). Interessanterweise scheint eine Hyperthermie in manchen Tumoren die VEGF Sekretion zu reduzieren (Sawaji et al. 2002), in anderen Tumorzellen, sowie im gesunden Gewebe allerdings bewirkt eine Hyperthermie die Induktion der VEGF Sekretion (Moon et al. 2010; Gong et al. 2006). In einem Organkulturmodell mit porcinen RPE-Zellen konnte eine autokrine Regulation der VEGF Sekretion nachgewiesen werden. Neueste Studien weisen darauf hin, dass VEGF über den VEGF-Rezeptor 2, sowie der Phosphatidylinositol 3 kinase seine eigene Expression verstärken kann (Klettner et al 2013).

Im Speziellen in der Retina ist VEGF unverzichtbar für die Ausbildung der retinalen und choroidalen Vaskularisation (Alon et al. 1995; Marneros et al. 2005). Zusätzlich hat VEGF bei erwachsenen Menschen im Bereich der Retina weitere wichtige Funktionen, so zum Beispiel als Überlebensfaktor für Endothelzellen und die Unterstützung der Funktion der Choroidea (Gerber et al. 1998; Saint-Geniez et al 2009). Als Hauptbildungsort von VEGF in der Retina konnte das retinale Pigmentepithel (RPE) identifiziert werden (Blaauwegers et al. 1999; Klettner et Roider 2012). Das RPE schützt sich selbst durch autokrine Sekretion von VEGF vor oxidativem Stress und fördert das Zellüberleben (Byeon et al. 2010).

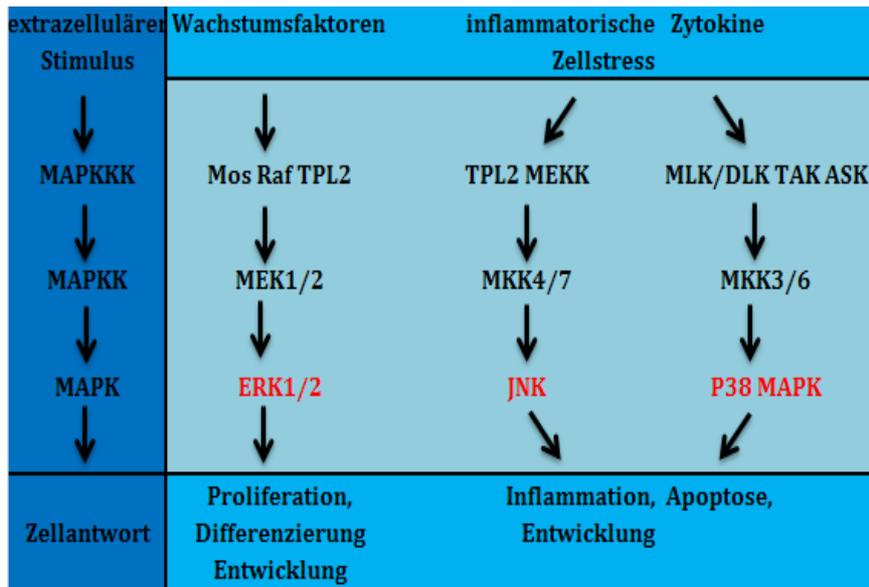
Neben der zentralen Bedeutung von VEGF in der Zellphysiologie der Retina wird VEGF gleichzeitig auch als Bestandteil diverser Pathomechanismen verstanden. So zum Beispiel konnte eine Beteiligung von VEGF bei der choroidalen Neovaskularisation (CNV) im Rahmen der feuchten altersbedingten Makuladegeneration (AMD), oder bei der Ausbildung eines Makulaödems bei Patienten mit diabetischer Retionopathie nachgewiesen werden (Kinnunen et al. 2011; Scholl et al. 2010). Desweiteren steht VEGF in dem Verdacht für das Auftreten von Mikrometastasen beim Aderhautmelanom mitverantwortlich zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von VEGF durch Bevacizumab einen Rückgang der Proliferation, der Invasion, so wie der Angiogenese von Aderhautmelanomen zur Folge hat (Yang et al. 2010).

Die Expression und Sekretion von VEGF wird intrazellulär über verschiedene Signalkaskaden reguliert. Wichtige Schlüsselenzyme dieser intrazellulären Kaskaden sind die sogenannten Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK).

## **1.5 Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK)**

Mitogen aktivierte Proteinkinasen gehören zur Gruppe der Serin-/Threonin-Proteinkinasen und sind Schlüsselenzyme bei verschiedenen Signalwegen in der Zelle (Robinson et Cobb 1997). MAP Kinasen aktivieren sowohl zytoplasmatische Proteine, als auch Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung. Hierfür müssen sie jedoch selber von MAP-Kinasen-Kinasen (MAP2K oder MAPKK) phosphoryliert werden. Diese wiederum werden von MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MAP3K oder MAPKKK) aktiviert. Die MAPK-Signalkaskade wird durch verschiedene physiologische oder pathophysiologische extrazelluläre Stimuli mittels G-Protein oder Rezeptor assoziierten Proteinen in Gang gesetzt.

Grundsätzlich werden drei Signalwege unterschieden, welche jedoch auf verschiedenen Ebenen interagieren können (Schaeffer et Weber 1999): extrazellulär signal-regulierte Kinasen (ERK 1 und 2), c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK). Die Abbildung 4 zeigt eine vereinfachte, schematische Übersicht über die drei Signalkaskaden:



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der MAPK-Signalkaskaden**

**Quelle:** Modifiziert nach (Schaeffer und Weber 1999):

### 1.5.1 c-Jun N-terminale Kinasen (JNK)

Zu der Gruppe der JNKs zählt man derzeit die Kinasen JNK1, JNK2 sowie JNK3. Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene Isoformen dieser Kinasen mit einem Molekulargewicht von 46kDa oder 54kDa (Gupta et al. 1996). Die Isoformen JNK1 und JNK2 kommen ubiquitär vor. Die Isoform JNK3 wird vor allem im Gehirn, den Hoden und im Herzen gebildet (Haeusgen et al. 2009, Kyriakis et Avruch 2001). Eine Aktivierung der JNKs erfolgt durch verschiedene MAP2K.

JNKs sind sowohl für physiologische als auch pathophysiologische Vorgänge in der Zelle ein entscheidender Faktor. Nachdem sie im Jahre 1993 durch (Hibi et al. 1993) entdeckt und als Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) beschrieben wurden, sind sie vor allem im Zusammenhang mit zellulärem Stress und Apoptose, ausgelöst beispielsweise durch UV-Strahlung, Hitzeschock (Ip et Davis 1998), ionisierende Strahlung, DNA-schädigende Substanzen und Chemotherapeutika, Zytokine sowie Wachstumsfaktoren (Kharbanda et al. 1995; Deng et al. 2001) untersucht worden. Eine Beteiligung an diversen Krankheiten, wie dem Morbus Alzheimer, Parkinson, Schlaganfall, Diabetes mellitus, Rheumatoider Arthritis oder der Atherosklerose konnte den JNKs in den letzten Jahren nachgewiesen werden (Waetzig et Herdegen 2005). Zusätzlich regulieren die einzelnen JNKs allerdings auch eine Reihe von wichtigen physiologischen Vorgängen in der Zelle.

Unter anderem haben sie Zell regenerative Eigenschaften in neuronalen Zellen (Waetzig et al. 2006).

In Bezug auf VEGF scheint JNK eine wichtige Rolle in der post-transkriptionalen Regulation zu haben. Unter Einfluss von JNK kommt es zu einer Stabilisierung der VEGF mRNA (Pagès et al. 2000). Weiterhin konnte bei der diabetischen Rethinopathie eine JNK abhängige VEGF- Expression durch den *Insulin-like Growth Faktor-1* (IGF-1) beobachtet werden (Poulaki et al. 2004).

### **1.5.2 p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK)**

Derzeit werden bei den p38-MAPK mindestens vier Isoformen unterschieden: p38 $\alpha$ -MAPK, p38 $\beta$ -MAPK, p38 $\gamma$ -MAPK und p38 $\delta$ -MAPK. Sie werden durch verschiedenste Stimuli aktiviert (Raignaud et al. 1995, Jiang et al. 1996). Hierzu zählen die Entzündungszytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Lipopolysaccharide, verschiedene andere Stressoren wie UV-Strahlung (Keyse 1995), der koloniestimulierende Wachstumsfaktor 1 (*colony-stimulating factor 1*, CSF-1) (Foltz et al. 1997), oxidativen Stress und Hyperosmolarität (Häussinger et al. 1999, Shapiro et al. 1995). Die p38-Kinasen werden ihrerseits durch spezifische MAP2K durch Phosphorylierung aktiviert, welche wiederum durch eine Vielzahl von MAP3Ks phosphoryliert werden können. Trotz der grundsätzlich voneinander unabhängigen Signalmodule geschieht eine Aktivierung meist parallel zu den JNKs (Mendelson et al. 1996). Interessanterweise kommt es je nach Stimulus und zellulärem Signalweg zu teilweise gegensätzlichen Effekten. Die Aktivierung in Zellen kann sowohl anti- (Park et al. 2002) als auch proapoptotisch (Xia et al. 1995) wirken. Lee et al. veröffentlichten 1994 die wichtige Bedeutung der p38-MAPK bei Entzündungsreaktionen. Sie konnten durch Hemmung der p38-MAPK eine verminderte Expression von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nachweisen (Lee et al. 1994). Der therapeutische Nutzen dieser Erkenntnis bei der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen wie Morbus Crohn oder der Rheumatoiden Arthritis ist Gegenstand zahlreicher Studien (Nishikawa et al. 2007, Arslan et al. 2006, Kaminska 2005). Darüber hinaus konnte in jüngerer Vergangenheit gezeigt werden, dass p38-MAPK eine wichtige Rolle bei der Entstehung von malignen Tumoren im Sinne eines Tumorsuppressors spielen, da ihre Inhibition oder Mutation zu einer vermehrten Proliferation führen kann (Brancho et al. 2003, Hui et al. 2007). Bei

Stimulation von RPE-Zellen mittels oxidativen Stress konnte die VEGF-Sekretion durch Hemmung von p38-MAPK signifikant reduziert werden (Klettner et Roider 2009, Kunchithapautham 2011).

### **1.5.3 Extrazellulär Signal-Regulierte Kinasen (ERK 1/2)**

Zu der am frühesten charakterisierten Gruppe der MAPK-Familie gehören die extrazellulär signal-regulierten Kinasen ERK1 und ERK2. Sie haben ein Molekulargewicht von 44kDa (ERK1) und 42kDa (ERK2) (Crews et al. 1992). Substrate der ERK's sind sowohl im Zytosol als auch im Kern der Zelle zu finden. So sind sie in der Lage sowohl direkt über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, als auch indirekt, über die Phosphorylierung anderer Kinasen, die Genexpression der Zelle zu modifizieren (Davie et Spencer 2001) Eine Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung eines Threonin- oder Tyrosin-Restes durch spezifische Kinasen der MAPKK- Familie. Die ganze Signalkaskade wird durch verschiedene extrazelluläre Stimuli ausgelöst. Vor allem scheinen Wachstums- und Differenzierungsreize ein entscheidender Stimulus der ERK 1/2-Kaskade zu sein. Zellulärer Stress dagegen scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen (Widmann et al. 1999, Cobb et Goldsmith 1995, Kyriakis et Avruch 2001). In Fibroblasten wurde ERK 1/2 als wichtiger Faktor bei der Expression von VEGF identifiziert (Milanini et al 1998). Im RPE erfolgt eine VEGF Induktion über TGF- $\beta$  und Thrombin (Nagineni et al 2003 ; Treins 2001). Der genaue Ablauf der Signalkaskade ist bisher noch unbekannt. Es wurde gezeigt, dass die VEGF-Expression bei oxidativem Stress über ERK 1/2 geregelt wird (Klettner et Roider 2009).

### **1.6 Transient Rezeptor Potential-Kanäle (TRP-Kanäle)**

Die Transient Rezeptor Potential-Kanäle sind einer großen Familie von Ionenkanälen zuzuordnen. Sie kommen sowohl in erregbaren und nicht erregbaren Zellen vor. Viele Mitglieder dieser Familie haben wichtige Positionen in primären Signalkaskaden, da sie den Einstrom von zweiwertigen Kationen in die Zelle regulieren. Obwohl für die meisten TRP-Kanäle die biophysikalischen Eigenschaften bereits beschrieben wurden, ist über ihre biologische Funktion jedoch noch sehr wenig bekannt (Vriens et al. 2004).

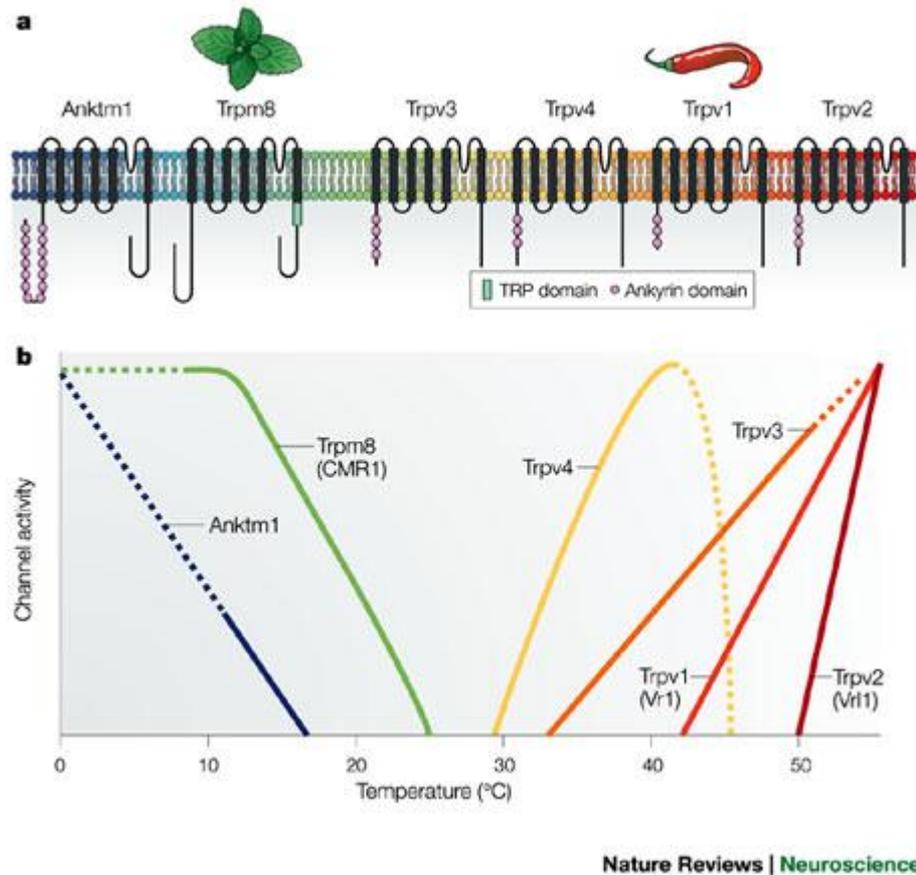
Viele der bekannten TRP-Kanäle vermitteln in der sensorischen Signaltransduktion. Beim Menschen sind sie beteiligt bei der Wahrnehmung und sensorischen Verarbeitung der Geschmacksqualitäten süß, bitter und umami, sowie von Hitze, Kälte und mechanischen Reizen (Zhang et al. 2003; Caterina et al. 1997; Peier et al. 2002; McKemy et al. 2002; Suzuki et al. 2003).

Die TRP-Familie wird derzeit in vier Subfamilien eingeteilt: die klassischen TRP-Kanäle mit sieben Mitgliedern (TRPC, „*classic*“ oder „*canonical-like*“ TRP), die Vanilloid-Rezeptor-ähnlichen TRP-Kanäle mit sechs Mitgliedern (TRPV, „*vanilloid*“ TRP), die Melastatin-ähnlichen TRP-Kanäle mit acht Mitgliedern (TRPM, „*melastatin*“ TRP), und ANKTM1 (TRPA, „*ankyrin-repeat*“ TRP) (Clapham 2003).

### 1.6.1 Thermosensible TRP-Kanäle

Die in dieser Arbeit untersuchten TRP-Kanäle sind, neben ihrer Eigenschaft chemosensitive Stimuli zu detektieren, auch für ihre Thermosensitivität bekannt. Ab einer Temperatur von  $> 45^{\circ}\text{C}$  wird bei einem Menschen Hitze als schmerzhaft wahrgenommen. Die Entdeckung des Capsaicin-Rezeptors (Vanilloid-Rezeptor 1, VR1) (Caterina et al. 1997), als erster thermosensitiver Kanal, führte zu einem neuen Verständnis molekularer Grundlagen der Detektion von thermischen und chemischen Reizen (Montell et al. 2002). Das Vanilloid Capsaicin (8-Methyl-N-vanillyl-6-noneamid) ist der scharf schmeckende Inhaltsstoff der Chilischote und der bekannteste Ligand dieses Kanals. Aufgrund seiner hohen Sequenzhomologie zu den TRP-Kanälen wurde der VR1-Rezeptor als erster Vertreter einer neuen TRP-Kanal Subfamilie als TRPV1 bezeichnet. Mittlerweile zählen sechs TRP-Kanäle zu dieser Subfamilie (Patapoutian et al. 2003; Tominaga et al. 2004). Die Empfindung von schmerzhafter Hitze wird wahrscheinlich durch die beiden Hitzerezeptoren TRPV1 und TRPV2 vermittelt. Auch die Wahrnehmung moderater, nicht-schmerzhafter Wärme ( $34\text{-}42^{\circ}\text{C}$ ) ist für jeden Organismus notwendig. Sie wird von spezialisierten sensorischen Fasern, die die Haut, die Zunge und die Nase innervieren, vermittelt (Hensel et al. 1971). Es wird davon ausgegangen, dass hierfür die Wärmerezeptoren TRPV3 und TRPV4 verantwortlich sind. Geringere Temperaturen werden über die Kälterezeptoren TRPM8 (nicht schmerzhaft Kälte  $< 25^{\circ}\text{C}$ ) und TRPA1 (schmerzhaft Kälte  $< 17^{\circ}\text{C}$ ) vermittelt (Patapoutian et al. 2003; Bautista et al. 2007; Zurborg et al. 2007).

Die Abbildung 5 zeigt schematisch alle Mitglieder der TRPV-Familie (a), sowie deren Aktivität in Bezug auf die Temperatur (b):



**Abbildung 5:** a) Schematische Darstellung aller TRPV-Mitglieder; (b) Aktivität der einzelnen Kanäle in Bezug auf die Temperatur

**Quelle:** (Patapoutian 2003)

Im Jahre 2010 konnten TRPV – Kanäle sowohl auf RPE-Zellen, als auch auf der Zelllinie ARPE 19 nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich ein TRPV-Kanal vermittelter Zusammenhang zwischen einer hyperthermen Stimulation und einer Induktion der VEGF-Sekretion (Coassin et al. 2010; Cordeiro et al. 2010). Diese gewonnenen Erkenntnisse ließen wir in die folgende formulierte Fragestellung mit einfließen.

## 1.7 Entstehung von Hyperthermie im Auge

Der komplexe Aufbau des Auges dient einzig dem Zweck, einen optimalen optischen Eindruck von unserer Umwelt zu erlangen. Hierfür wird das einfallende Sonnenlicht konstant auf die Fovea Centralis, dem Gebiet des schärfsten Sehens, fokussiert.

Durch den ständigen Einfall von Sonnenstrahlung entsteht als Nebenprodukt Wärmeenergie. Um eine Überwärmung der Retina zu vermeiden ist eine kontinuierliche Kühlung notwendig (Parver et al 1980; Nickla et Wallman 2009). Der Abtransport von Wärme erfolgt hämatogen über eine gute Durchblutung der Choroidea.

Es konnte gezeigt werden, dass im Laufe des Lebens und bei retinalen Erkrankungen wie der alterbedingten Makuladegeneration (AMD), die Durchblutung der Choroidea abnimmt (Metelitsina et al 2008; Boltz et al 2010), dies führt theoretisch zu einer verminderten Kühlung mit nachfolgender Erwärmung der Fovea centralis.

In einem in vitro Versuch mit der menschlichen RPE Zelllinie ARPE 19 konnte als Reaktion auf eine viertägige Erwärmung auf 40°C eine um 34% erhöhte VEGF Sekretion beobachtet werden (Coassin et al. 2010).

## **1.8 Hyperthermie als Therapieoption**

Eine lokale Hyperthermie wird, zum Beispiel im Rahmen einer transpupillären Thermotherapie (TTT), heutzutage als therapeutische Option bei verschiedenen Erkrankungen der Retina genutzt. So wurden Behandlungen beim uvealen Melanom (Oosterhuis et al 1995), bei der choroidalen Neovaskularisation (CNV), bei der alterbedingten Makuladegeneration (AMD) (Nowak et al 2012; Söderberg et al 2012), der Frühgeborenenretinopathie (ROP) (Shah et al 2011), dem Retinoblastom (Francis et al 2012), bei *subretinal fluids* (Caminal et al 2013) und dem choroidalen Hämangiom (Sharma et al 2011) beschrieben.

### **1.8.1 Transpupilläre Thermotherapie (TTT)**

Erstmals wurde über die TTT 1995 von Oosterhuis und Mitarbeitern berichtet (Oosterhuis et al. 1995). Hierbei werden durch das mydriatische Auge Laserstrahlen im Infrarotbereich (810 nm) mittels Diodenlaser appliziert. Hierdurch soll in dem bestrahlten Areal eine Hyperthermie von 45°C-65°C entstehen, was zu irreversiblen Zellschäden und nachfolgend zur Apoptose der bestrahlten Zellen führen soll. In Abhängigkeit von der Wellenlänge und der Expositionszeit der Bestrahlungsherde kann eine maximale effektive Eindringtiefe des Lasers bis auf 3,5 – 4 mm erreicht werden (Oosterhuis et al. 1995, Oosterhuis et al. 1998). Nach erfolgter Laserbestrahlung lässt sich sowohl klinisch als auch fluoreszenzangiographisch ein scharf begrenztes

Behandlungsareal abgrenzen, allerdings gibt es während der TTT keine direkte Therapiekontrolle, z.B. über die Gewebetemperatur oder über die Energieaufnahme im bestrahlten Areal. Aus diesem Grund ist die richtige Einstellung der Laserparameter nicht standardisierbar.

Es wurden als unerwünschte Nebenwirkungen vor allem das Makulaödem, die choroidale Neovascularisation, der Makulainfarkt, sowie Verbrennung der Makula beschrieben. (Stoffelns 2006, Currie et al. 2000, Schöpfer et Stoffelns 2010; Benner et al 2002; Benhamou et al 2004).

Nachfolgend wird die Anwendung der TTT beim uvealen Melanom und bei der choroidalen Neovaskularisation durch die feuchte altersbedingte Makuladegeneration exemplarisch erläutert. Bei allen anderen oben bereits genannten Erkrankungen erfolgt die Anwendung der TTT in ähnlicher Art und Weise. Allerdings ist zu erwähnen, dass die additiven Behandlungsoptionen für die anderen Erkrankungen stark variieren.

#### *1.8.1.1 Anwendung der TTT beim uvealen Melanom*

Der häufigste Primärtumor des Auges beim Erwachsenen ist das Aderhautmelanom. Bei der europäischen Bevölkerung liegt die Inzidenz (Neuerkrankungen pro 1.000.000 Einwohner pro Jahr) bei 2 bis 8. Dabei erkranken Männer und Frauen in etwa gleich häufig. Vermehrt betroffen sind Menschen mit heller Hautfarbe und blauer Irisfärbung (Damato 2010). Die Diagnose eines Aderhautmelanoms wird in der Regel nach dem 50. Lebensjahr gestellt. Das Maximum an Neuerkrankungen ist zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr erreicht. Okuläre Melanome im Kindesalter gelten als Raritäten.

In den meisten Fällen tritt das uveale Melanom primär in einem Auge auf. Ein beidseitiger Befall ist äußerst selten. So wurden in einer Studie von Singh 1996 bei 4500 Patienten mit einem Aderhautmelanom nur 8 Patienten mit einem primär beidseitigen Tumorbefund beschrieben (Singh et al 1996).

Bei fast der Hälfte aller Betroffenen treten extraokuläre Metastasen auf, welche mit einer deutlich schlechteren Überlebensprognose einhergehen (Diener-West et al 1992; Kujala et al 2003).

Über lange Zeit war die einzige Therapieoption zur Behandlung des Aderhautmelanoms die Enukleation des betroffenen Auges. Auch in der heutigen Zeit gibt es weiterhin Indikationen zur Enukleation und somit zur radikalen Tumorentfernung.

Dies gilt insbesondere bei besonders großen Tumoren, extraokulärem Wachstum, Invasion des Nervus opticus, Rezidiven, unzureichender Regression nach konservativer Therapie oder bei unbeherrschbaren behandlungsbedingten Komplikationen (Hungerford 1993). In der heutigen Zeit gibt es bei der Behandlung des uvealen Melanomes eine Reihe von alternativen Maßnahmen. Hierzu zählen unter anderem die Nahbestrahlung (Brachytherapie), die Protonenbestrahlung, die transsklerale Tumorresektion und die Thermotherapie.

Bei der Brachytherapie erfolgt eine hochdosierte Bestrahlung des Tumorgewebes mit einem Gamma- oder Betastrahler, unter Schonung des umliegenden gesunden Gewebes. Hierfür wird ein schalenförmiger Applikator von außen möglichst nahe auf das zu bestrahlende Areal genäht. Diese Technik wurde erstmals von Stallard im Jahre 1939 angewandt (Stallard 1966). Seitdem wurden mehrfach Verbesserungen durch Nutzung unterschiedlicher Strahlenquellen erzielt. Im Jahre 1966 führten Lommatzsch und Vollmar den Betastrahler Ruthenium-106 in die ophthalmologische Brachytherapie ein. Dieser wird auch heute noch in Europa am häufigsten eingesetzt. (Lommatzsch 1999). Bei der Protonenbestrahlung werden Protonen oder Heliumkerne mit hoher Geschwindigkeit auf ein vorher berechnetes Zielareal geschossen. Durch die geringe Masse und die hohe Geschwindigkeit kommt es nur in sehr geringem Maße zur Ablenkung der Teilchen, so dass der größte Teil der Energie am sogenannten Bragg-Peak, dem Ende der Laufstrecke freigesetzt wird. Durch den extrem hohen apparativen Aufwand kann diese Behandlungsoption nur an wenigen spezialisierten Zentren in Europa angewendet werden (Schuler et Bornfeld 2000).

Bei hochprominenten Tumoren, welche durch eine alleinige Brachytherapie nicht suffizienz zu behandeln wären, gibt es die Möglichkeit der transskleralen Tumorresektion. Bei diesem operativen Verfahren wird der makroskopisch sichtbare Tumor reseziert, nachdem über dem diaphanoskopisch lokalisierten Tumorbett eine Skleralamelle präpariert wurde, mit der später nach vollständiger Entfernung des Tumors und der tiefen Skleralamelle der entstandene Defekt gedeckt werden kann. Durch eine intraokulare Gastamponade erfolgt eine Stabilisierung der Netzhaut im ehemaligen Tumorareal. (Schuler and Bornfeld 2000)

Eine weitere Möglichkeit zur konservativen Therapie der uvealen Melanoms ist die in Kapitel 1.8.1 beschriebene Transpupilläre Thermotherapie.

Seit der Erstbeschreibung 1995 wird der Erfolg der TTT allerdings sehr kontrovers diskutiert. Die Therapieergebnisse der alleinigen TTT in Bezug auf die Tumorkontrolle

und dem Erhalt des Visus waren unzureichend. Es wurden einerseits positive Ergebnisse dieser Therapie veröffentlicht (Shields et al 2002), andererseits konnte histologisch nachgewiesen werden, dass Melanomzellen in der Sklera auch eine intensive mehrmalige TTT überleben können (Finger et al 2000). Aus diesem Grunde wird die TTT im Rahmen der onkologischen Therapie des uvealen Melanoms heutzutage nur noch adjuvant oder in Kombination mit einer Nahbestrahlung (Brachytherapie) angewandt.

Diese Kombination aus Brachytherapie und TTT wird als Sandwichtherapie bezeichnet. Erstmals wurde diese Kombination 1998 empfohlen (Oosterhuis et al 1998) und hat weiterhin einen Stellenwert in der klinischen Therapie (Anastassiou et al 2002, Badyian et al 2014). Durch die Kombination beider Verfahren wird es möglich, hochprominente Tumoren zu behandeln, welche der alleinigen Brachytherapie nicht mehr zugänglich wären. Die Strahler der Brachytherapie verlieren bei größer werdender Entfernung ihre Energie zum Quadrat. Die Folge bei hochprominenten Tumoren ist eine unzureichende Strahlendosis an der Tumorspitze und zusätzlich ein großes Nebenwirkungsspektrum durch die hoch zu wählende Strahlendosis. Durch die TTT am Tumorapex soll es nun möglich sein, das Tumolvolumen deutlich zu verkleinern und somit zum einen wieder in einen kurativ therapierbaren Bereich der Brachytherapie zu gelangen, zum anderen die Gesamtstrahlendosis und somit die Nebenwirkungsrate zu reduzieren.

Ob die Kombination beider Verfahren der alleinigen Brachytherapie überlegen ist, wurde mehrfach untersucht. Die Ergebnisse scheinen nicht eindeutig zu sein. Im Jahre 2010 konnte bei einem retrospektiven Vergleich an insgesamt 54 Patienten kein signifikanter Unterschied in der Tumorreduktion, der Nebenwirkungsrate und dem Erhalt der therapierten Augen gesehen werden (Gündüz et al. 2010). Neueste Studien ergaben dagegen Vorteile der Sandwichtherapie gegenüber der Brachytherapie alleine. Es zeigte sich eine bessere lokale Kontrolle und eine höhere Tumorregression während der Therapie. Die 5 Jahres Rezidiv-Tumorraten fiel signifikant kleiner aus und es konnten signifikant mehr Augen erhalten werden. In Bezug auf die Komplikationsrate, der Metastasenentwicklung und dem Gesamtüberleben waren beide Verfahren gleichwertig (Yarovoy et al. 2012).

### 1.8.1.2 Anwendung der TTT bei der CNV im Rahmen der AMD

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist derzeit die häufigste Ursache für eine Erblindung im höheren Lebensalter in den westlichen Industrieländern. Besonders in Europa und den USA ist eine hohe Anzahl an Menschen von dieser Augenerkrankung betroffen (Nowak et al. 2005). Schätzungen zur Folge leiden etwa viereinhalb Millionen Menschen alleine in der Bundesrepublik Deutschland an einer AMD (Kokotas et al. 2011; Ziemssen et al. 2006). Genauere Erhebungen der Erkranktenzahl gestaltet sich aufgrund der spät wahrgenommenen Symptome als schwierig (Coleman et al. 2008). Es werden bei der AMD zwei Verlaufsformen unterschieden. Die häufigere Verlaufsform wird als trockene AMD bezeichnet und liegt bei 80%- 90% aller AMD-Erkrankten vor. Als pathogenetischer Faktor bei der trockenen AMD gilt die Entstehung von Drusen zwischen dem RPE und der Bruch'schen Membran. Dies führt zur Atrophie des RPE was als letzte Instanz den Untergang der Photorezeptoren zur Folge hat. Trotz intensiver Forschung ist es bisher nicht gelungen ein umfassendes Model der pathophysiologischen Ursachen zu erstellen. Als mögliche Ursachen werden eine RPE Dysfunktion infolge von Umwelteinflüssen oder vererbaren Zellanomalien; eine Akkumulation von intrazellulären Substraten im RPE; eine pathologische Akkumulation von extrazellulärem Material am RPE; Veränderungen im Aufbau der Bruch-Membran und Veränderungen der Membranpermeabilität der Bruch-Membran diskutiert (Zarbin 1998).

Die zweite, mit 10% - 20%, seltenere Form der Erkrankung ist die feuchte AMD. Diese Form ist allerdings mit 80% - 90% für den Großteil der Erblindungen verantwortlich. Hierbei kommt es zum Einwachsen von Blutgefäßen der Aderhaut durch die Bruch'sche Membran in den an sich avasculären subretinalen Raum. Folge dieser choroidalen Neovaskularisation (CNV) ist ein Verlust der zentralen Sehkraft mit charakteristischen Sehstörungen, wie das Wahrnehmen von verzogenen Linien beim Betrachten eines Amsler-Netzes (DeWan et al. 2006). Als wichtigster Faktor für die Entstehung der CNV konnte der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) identifiziert werden. (Spilsbury et al. 2000). Auch im Rahmen der choroidalen Neovascularisation (CNV) bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) wird der Einsatz einer transpupillären Thermotherapie (TTT) beschrieben. Das Ziel der Therapie ist die Verödung von Neogefäßen in der Choroidea um einerseits Einblutungen zu stillen, andererseits das

Voranschreiten der Neovaskularisation zu stoppen. Aufgrund seiner biophysikalischen Eigenschaften hat der Diodenlaser den Vorteil, dass die Laserenergie nur in geringem Maße von Hämoglobin absorbiert wird. Dies ermöglicht den Einsatz auch bei bereits erfolgten subretinalen Einblutungen (Nowak et al 2012). Allerdings wird der Erfolg der Therapie auch bei der CNV kontrovers diskutiert. So wurden zum Einen positive Ergebnisse in Bezug auf das Voranschreiten der CNV, sowie den Erhalt des Visus veröffentlicht (Reichel et al 1999; Newsom et al 2001; Odergren et al 2008), andererseits wurde eine unzureichende Steuerbarkeit der Laserenergie mit hohen Komplikationsraten, wie einem Makulainfarkt (Benner et al. 2002) oder Verbrennungen der Makula (Bennhamou et al 2004) beschrieben.

## **1.9 Fragestellung**

Bei vielen Erkrankungen im Auge spielt VEGF eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie. So konnte VEGF als pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der feuchten Form der AMD mit Bildung von choroidalen Neogefäßen identifiziert werden (Spilsbury et al. 2000). Weiterhin konnte ein Anstieg der VEGF Sekretion in Augen mit einem uvealen Melanom nachgewiesen werden (Missotten et al. 2006). Interessanterweise lag hierbei der VEGF Gehalt in der aufliegenden Retina höher als im Tumorgewebe selbst und das retinale Pigmentepithel wurde als Hauptproduzent von VEGF ermittelt (Missotten et al. 2006). Beachtenswert ist auch, dass der VEGF Gehalt bei therapierten Augen mit Melanomen höher ist, als bei unbehandelten Augen mit Melanomen. Eine Therapieoption bei intraokkulären Erkrankungen, bei denen es Hinweise einer Beteiligung von VEGF gibt, wie beispielsweise das uveale Melanom, die CNV, das Retinoblastom oder choroidale Hämangiome, ist die TTT. In dieser Studie stellen wir uns die Frage, in wieweit Hyperthermie ein toxischer Reiz für RPE-Zellen ist und ob es einen Zusammenhang zwischen Höhe der Temperatur, Dauer der hyperthermen Stimulation und dem Ausmaß der toxischen Wirkung gibt. Nachdem neuere Veröffentlichungen einen Anstieg der VEGF Sekretion bei hyperthermen Bedingungen des RPE beschrieben haben (Coassin et al. 2010; Cordeiro 2010), waren wir weiterhin an der Frage interessiert, in wieweit eine hypertherme Behandlung, wie sie im Rahmen einer TTT auftritt, die VEGF Sekretion im RPE induzieren kann. Dies könnte dann als Hinweis gedeutet werden, in wieweit ein temperaturabhängiger VEGF-

Anstieg mit den Nebenwirkungen der TTT, wie dem Makulaödem oder der choroidalen Neovaskularisation, in Verbindung stehen.

In vorangegangenen Studien konnte für verschiedene andere Noxen ein Einfluss von MAPK auf die Regulation der VEGF-Sekretion nachgewiesen werden. Daher wollten wir Hinweise sammeln, über welche dieser intrazellulären Signalkaskaden eine Hitze-induzierte VEGF-Sekretion reguliert wird. Durch Beobachtungen von Cordeiro, in denen eine Beteiligung von hitzesensiblen TRPV-Kanälen an der VEGF-Sekretion beschrieben wurden (Cordeiro 2010), waren wir daran interessiert genauere temperaturspezifische Beobachtungen zu diesen Kanälen zu erheben.

In dieser Studie haben wir verschiedene Effekte einer Hyperthermie auf humane RPE Zellen analysiert. Hierbei haben wir zum einen die toxische Wirkung der Hyperthermie auf die RPE Zellen untersucht, zum anderen haben wir die Effekte der VEGF Sekretion und deren zugrunde liegenden Signalkaskaden erforscht. Den Fokus legten wir dabei auf MAPK und TRPV-Kanäle.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Geräte	Bezeichnung	Firma	Herkunft
Absorptions-Reader	ELx800	BioTek Instruments GmbH	Bad Friedrichshall
Abzüge	Antair BS	A. Sternkopf GmbH	Lübeck
	Abzug Systemlabor	Köttermann GmbH & Co. KG	Uetze/Hänigsen
Brutschrank	Brutschrank	Labotect	Göttingen
Bio-Imaging-System	MF-ChemiBis	Biotep® GmbH	Jahnsdorf
Falcon-Röhrchen	Centrifuge Tubes	VWR	USA, Pennsylvania
Gelkammersystem	Mini-Protean®	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
	Tetra-cell		
Glasplatten für Gelelektrophorese	Mini-Protean®	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
	Glass Plates		
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf AG	Hamburg
Magnetrührer	Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen
Mikroskop	Axiovert 100	Zeiss	Hennigsdorf
pH-meter	Microprocessor pH-Meter	Hanna Instruments Deutschland GmbH	Kehl
Photometer	Spectronic Genesys	Thermo Electron Corporation	Erlangen
Pinzette	Pinzette BD 314	Aesculap AG	Tuttlingen
Pipetten	Eppendorf Research®	Eppendorf AG	Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Reaktionsgefäße	Safe-Lock 1,5ml	Eppendorf AG	Hamburg
	Safe-Lock 2ml	Eppendorf AG	Hamburg
	Cryo Tubes™	Nunc A/S	Dänemark, Roskilde
Schere	Schere 545A	Hermle Labortechnik GmbH	Wehingen
Skalpell	Rasierklunge T585	Plano GmbH	Wetzlar
Saugpumpen	Vacusaft comfort	Integra Biosciences AG	Schweiz, Zizers
Schüttler	Rocking platform	VWR	USA, Pennsylvania
Semi-Dry Blotter	Semi-Dry Blotting System	C.B.Scientific Company	USA, Kalifornien
Streifenwasher	ELx50	BioTek Instruments GmbH	Bad Friedrichshall
Stromversorgungsgerät	Electrophoresis-power-supply	Consort nv	Belgien, Turnhout
Ultraschallgerät	Vibra cell	Sonics & Material	USA, Connecticut
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries	USA, New York
Waage	Waage	Kern&Sohn GmbH	Balingen
Wärmeplatte	Typ 12501	Medax GmbH & Co.KG	Neumünster
Zellkulturschalen	Nunclon™	Nunc A/S	Dänemark, Roskilde
	ΔSurface		
Zellschaber	Zellschaber	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht
Zentrifugen	Sorvall ST40	Thermo Fisher Scientific	Dreieich
	Centrifuge 5414	Eppendorf AG	Hamburg
	Heraeus Fresco 17	Thermo Electron Corporation	Erlangen

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien**

Chemikalien	Bezeichnung	Firma	Herkunft
Ethanol	Ethanol 99%	Büfa Chemikalien GmbH & Co. KG	Hude
APS	Ammonium-peroxodisulfat	Merck KGaA	Darmstadt
DMSO	Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
NaCl	Natriumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt

**Tabelle 3: Sonstige verwendete Materialien.**

Sonstige Materialien	Bezeichnung	Firma	Herkunft
Aqua bidest	Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi	Bad Homburg
BSF	Bovine Serum Fetal	Linaris Biologische Produkte GmbH	Wertheim- Bettingen
DMEM High Glucose	Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
ECL-Reagenz	Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore Corporation	USA, Massachusetts
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Inhibitoren	Calbiochem® U0126	Merck KGaA	Darmstadt
	Calbiochem® SB203580	Merck KGaA	Darmstadt
	Calbiochem® SP600125	Merck KGaA	Darmstadt
	Calbiochem® Ruthenium Red	Merck KGaA	Darmstadt
nicht essentielle Aminosäuren	MEM Non Essential Amino Acids	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Pe/St	Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Proteinassay	Biorad Proteinassay	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Sample buffer	4x SDS Sample Buffer	Merck KGaA	Darmstadt
Sodium Pyruvat	Sodium pyruvate	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Trypanblau	Trypan blue	Biochrom AG	Berlin
Trypsin	Trypsin	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA	Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
VEGF-ELISA KIT	Quantikine®	R&D Systems Inc.	USA, Minneapolis

## 2.2 Zellkultur

In dieser in vitro Studie wurde die Zelllinie ARPE 19, erworben von der *American Tissue Culture Collection Company*, verwendet. Diese Zelllinie entstammt humanen RPE-Zellen und weist weiterhin sowohl die strukturellen, wie auch die physiologischen Eigenschaften des humanen RPE auf (Dunn et al 1996). Daher dienen sie als in vitro Model für RPE-Zellen.

### 2.2.1 Kultivierung

#### 2.2.1.1 Kulturbedingungen

Alle Arbeitsschritte in der Zellkultur wurden unter der Sterilbank (Antair BS, A. Sternkopf GmbH, Lübeck) durchgeführt. Vor der Benutzung erfolgte die Erwärmung der verwendeten Lösungen im Wasserbad auf 37°C. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank (Brutschrank, Labotect, Göttingen) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unter Benutzung von Zellkulturschalen (Nunclon™, Nunc A/S, Dänemark) mit den Durchmessern 3 cm und 6 cm. Hinzugegeben wurden 2 ml bzw. 3 ml des verwendeten Mediums (Tabelle 4). Unter dem Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Hennigsdorf) wurden die Zellen auf Konfluenz untersucht.

**Tabelle 4: Zusammensetzung Nährmedium ARPE 19**

Inhaltsstoff	Konzentration / Menge
DMEM High Glucose	500ml
Penicilin / Streptomycin - Lösung	1%
foetales Kälberserum ( FCS )	50 ml
nicht essentielle Aminosäuren	5 ml

Es fand alle zwei bis drei Tage ein Wechsel des Nährmediums statt. Es wurden Zellen bis zur 28. Passage verwendet.

### *2.2.1.2 Vermehrung*

Bei Konfluenz der Zellkulturschalen erfolgte eine Vermehrung der Zellen im Verhältnis 1:4. Zunächst wurde hierfür das Nährmedium mit Hilfe einer Saugpumpe (Vacuase comfort, Integra Biosciences AG) abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA und Inkubation für 5 min bei 37°C im Brutschrank lösten sich die Zellen vom Schalenboden ab. Die entstandene Zellsuspension wurde mit 2 ml Nährmedium in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Centrifuge Tubes, VWR, USA, Pennsylvania) überführt. Nach einer 9 minütigen Zentrifugation bei 800 U/min (Sorvall ST40, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) und Absaugung des Überstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellet in 4 ml Nährmedium.

Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde in Zellkulturschalen von 6 cm Durchmesser mit 2 ml vorgelegtem Nährmedium ausgesät. Für die Quantifizierung des Zellüberlebens durch eine Trypanblau-Vitalfärbung (Kap.2.4.1) wurde die Zellsuspension in Zellkulturschalen von 3 cm Durchmesser mit 1 ml vorgelegtem Nährmedium ausgesät.

## **2.3 Stimulation**

### **2.3.1 Hitzestimulation**

Als Stimuli wurden verschiedene Temperaturen von 40° C, 42° C, 45° C und 50° C für 1 Minute, 5 Minuten und 15 Minuten verwendet. Hierfür wurde eine Wärmeplatte auf die jeweilige Temperatur vorgeheizt. Um einen sofortigen Stimulationsbeginn garantieren zu können, wurden 3 ml Nährmedium parallel in einem Wasserbad auf die gleiche Temperatur erwärmt. Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 3 cm wurden für die Trypanblau-Vitalfärbung verwendet (Kap.2.4.1). Der Überstand aus diesen Zellkulturschalen wurde für die VEGF-ELISA Technik verwendet (Kap. 2.5). Nach Absaugung des vorhandenen Nährmediums startete die Stimulationsdauer mit Zugabe des erwärmten Nährmediums. Während der Stimulationsdauer befanden sich die Kulturschalen auf der vorgeheizten Wärmeplatte. Zum Beenden der Stimulation wurde, nach Ablauf der veranschlagten Stimulationszeit, das erhitzte Nährmedium abgesaugt und durch 37°C warmes Nährmedium ersetzt. Die Kontrollkultur wurde während des Versuches nicht erwärmt und erhielt ausschließlich am Ende des Versuches 1 ml 37°C

warmes Nährmedium, nach Entfernen des vorhandenen Mediums. Die Zellen wurden bis zur weiteren Bearbeitung für 4 Stunden bzw. 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der 4 Stunden wurde bei den Versuchskulturen, welche für die Trypanblau-Vitalzählung (Kap. 2.4.1) bestimmt waren, das Nährmedium in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Standard Reaktionsgefäß 3810X, Eppendorf AG, Hamburg) überführt und bei 4°C und 13.000 U/min für 5 min zentrifugiert (Heraeus Fresco 17, Thermo Electron Corporation, Erlangen). Der Überstand wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und für die spätere Durchführung eines VEGF – ELISA (Kap. 2.5) bei -20°C eingefroren.

Sofern die Trypanblau-Vitalfärbung (Kap.2.4.1) nach 24 Stunden stattfinden sollte erhielten die Zellkulturen einen Mediumwechsel nach 4 Stunden und einen Wechsel 20 Stunden nach Stimulation. Der Überstand von Stunde 20 bis Stunde 24 wurde ebenfalls für eine VEGF-ELISA Untersuchung gesammelt und bei -20°C eingefroren.

### 2.3.2 Hitzestimulation unter Zugabe von Inhibitoren

Als Stimuli wurden Temperaturen von 40°C, 42°C und 45°C verwendet. Die Stimulationsdauer betrug 15 Minuten. 30 Minuten vor Stimulationsbeginn wurden die Zellen einer Kulturschale mit den zu untersuchenden Inhibitoren versetzt (10µM U0126; 10µM SB203580; 10µM SP600125; 10µM Ruthenium Rot; 20µM Ruthenium Rot). Alle verwendeten Inhibitoren wurden im Vorfeld auf ihr Toxizität untersucht. Hier zeigte sich für keinen der Inhibitoren ein toxischer Einfluss auf das RPE. Die Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Inhibitoren und deren zu hemmenden Zielenzyme:

**Tabelle 5: Übersicht über die Inhibitoren und deren Wirkorte**

<b>Substanz/Inhibitor</b>	<b>Wirkort/Zielenzym</b>
U0126	ERK 1/2
SB203580	p38-MAPK
SP600125	JNK
Ruthenium Rot	TRPV-Kanäle

Eine Zellschale wurde ausschließlich mit der geplanten Temperatur stimuliert. Nach Vorheizen der Wärmeplatte und Erhitzen des Mediums im Wasserbad auf die zu

untersuchende Stimulationstemperatur startete der Versuch mit dem Wechsel des vorhandenen Nährmediums durch das erhitzte Nährmedium. Die zu inhibierenden Versuchsproben erhielten vor Beginn der Hitzestimulation auf der Wärmeplatte die vorgesehenen Konzentrationen der Inhibitoren. Nach Ablauf der 15 minütigen Stimulation wurde das erhitzte Nährmedium abgesaugt und durch 37°C warmes Nährmedium ersetzt. Die inhibierten Zellkulturen erhielten nach dem Absaugen ebenfalls 37°C warmes Medium versetzt mit dem vorgesehenen Inhibitor. Die nicht stimulierte Kontrollprobe erhielt ebenfalls einen Wechsel des Nährmediums. Für die nächsten vier Stunden inkubierten die Zellen im Brutschrank. Das Nährmedium der Kulturschalen für die Trypanblau-Vitalzählung (Kap.2.4.1) wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße abpipettiert und mit 13.000 U/min bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -20°C für die spätere Durchführung eines VEGF – ELISA (Kap. 2.5) eingefroren.

## **2.4 Toxizitätstest**

### **2.4.1 Trypanblau-Vitalfärbung**

Zur Bestimmung der Zellzahl überlebender Zellen eignete sich Trypanblau, da Trypanblau in vitale Zellen nicht eindringen kann. Hingegen diffundiert Trypanblau leicht in den Intrazellulärraum derjenigen Zellen, deren Membranintegrität gestört ist und führt so zu einer Blaufärbung der Zellen. Durch diesen Farbunterschied ist es möglich vitale Zellen in einem definierten Volumen zu quantifizieren.

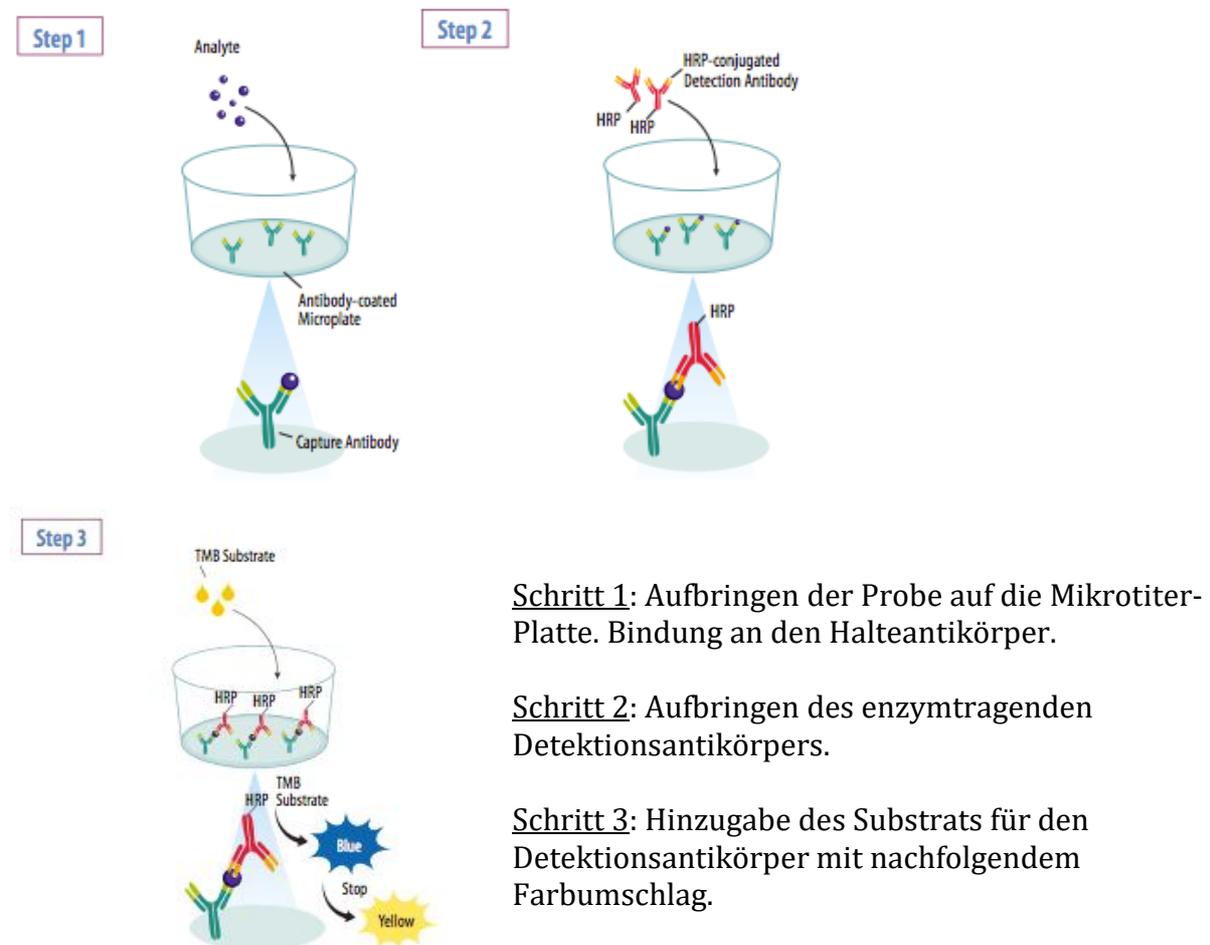
Die verwendeten Versuchsschalen (Kap.2.3.1) und (Kap.2.3.2) von 3 cm Durchmesser wurden mit 500 µl Trypsin –EDTA für 5 Minuten inkubiert und das Zellsuspensat anschließend in einem mit 1 ml Nährmedium vorgelegten 2ml Reaktionsgefäß für 9 min bei 800 U/min zentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Aus der entstandenen Zellsuspension wurden 10 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 µl Trypanblau vermischt. Im Anschluss wurden 10 µl des Zellsuspensat-Trypanblau-Gemisches in eine Zählkammer (Neubauer, Marienfeld) pipettiert, um zeitnah die Zahl der vitalen Zellen in einem definierten Volumen unter dem Mikroskop (Axiovert 100,

Zeiss, Hennigsdorf) zu quantifizieren. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt.

## 2.5 Sandwich-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Das Prinzip des ELISA bietet die Möglichkeit sezernierte Proteinmengen zu quantifizieren. Eine mit einem monoklonalen Halte-Antikörper beschichtete Mikrotiter-Platte bindet spezifisch das gesuchte Protein. Nach Zugabe eines löslichen Detektionsantikörpers gegen das gesuchte Protein entsteht ein Antikörper-Protein-Antikörper-Komplex. Die Quantifizierung der Proteinmenge wird durch ein an den Detektionsantikörper gekoppeltes Enzym ermöglicht, dessen Reaktion photometrisch messbar ist. Die nachfolgende Abbildung 6 zeigt schematisch das Prinzip eines Sandwich-ELISA:



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des VEGF-ELISA**

**Quelle:** R&D Systems, *ELISA Reference Guide & Catalog*, Minneapolis, USA, 2012

## 2.5.1 Verwendete Komponenten

Verwendet wurde das ELISA-Kit von R&D Systems GmbH (Quantikine®):  
Human VEGF Immunoassay

**Tabelle 6: Antikörper des ELISA**

Fangantikörper (capture antibody )	Maus anti VEGF Antikörper (monoklonal)
Detektionsantikörper (detektion antibody)	Anti VEGF Antikörper mit Merrettichperoxidase gekoppelt

**Tabelle 7: Platten, Lösungen und Puffer für Sandwich-ELISA**

Platte	96 well polystyrene Mikrotiterplatte beschichtet mit Fangantikörper
VEGF Standard	2000pg rekombinantes humanes VEGF165
VEGF Conjugate	Detektionsantikörper
Assay Diluent RD1W	
Calibrator Diluent RD5K	
Wash Buffer Concentrate	25 fach konzentrierte Waschpufferlösung
Color Reagent A	12,5 ml stabilisiertes Wasserstoffperoxid
Color Reagent B	12,5 ml stabilisiertes Chromogen (Tetramethylbenzidine)
Stop Solution	6 ml 2N Schwefelsäure

## 2.5.2 Vorbereitungen

### 2.5.2.1 Vorbereitung der Proben

Die eingefrorenen Proben (Kap. 2.3.1);(Kap.2.3.2) wurden aufgetaut und im Verhältnis 1:3 mit dem ARPE19 DMEM verdünnt (siehe Tabelle 8). Diese Verdünnung der Proben war erforderlich, da die VEGF-Konzentrationen der stimulierten ARPE19-Zellen ansonsten oberhalb des ELISA-Messbereiches liegen würden:

**Tabelle 8: Verdünnungsschema Sandwich-ELISA**

Inhaltsstoff	Konzentration / Menge
Versuchsprobe	150µl
DMEM	450µl

### 2.5.2.2 Herstellung einer Standardreihe

Hierfür wurde 1 ml RD5K in den VEGF-Standard pipettiert und dieser für 15 min auf einem Schüttler geschwenkt, bis sich das Granulat vollständig gelöst hat. Währenddessen wurden fünf 1,5 ml Reaktionsgefäße mit je 500 µl RD5K belegt und anschließend eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml und 62,5 pg/ml hergestellt. Als Leerwert wurde RD5K verwendet.

### 2.5.2.3 Durchführung des Sandwich-ELISAs

In jedes Well wurden 50 µl RD1W aufgetragen. Anschließend wurden 200 µl Leerwert, je 200 µl des Standards in aufsteigender Konzentration und je 200 µl aller Proben in doppelter Ausführung pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben aller Wells im Streifenwasher (ELx50, Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall), durch mehrfaches Spülen mit einem Waschpuffer (siehe Tabelle 9) entfernt.

**Tabelle 9: Waschpuffer Sandwich-ELISA**

Inhaltsstoff	Konzentration / Menge
Wash Buffer Concentrate	20 ml
Aqua dest.	480 ml

Es folgte das Zufügen von 200 µl VEGF Conjugate und anschließender Inkubation für zwei Stunden. Auch das VEGF Conjugate wurde im Streifenwasher entfernt und durch 200 µl Substrat-Lösung (siehe Tabelle 10) ersetzt.

**Tabelle 10: Substrat-Lösung Sandwich-ELISA**

Inhaltsstoff	Konzentration / Menge
Color Reagenz A	11 ml
Color Reagenz B	11 ml

Für die Inkubation mit der Substrat-Lösung wurde die Mikrotiter-Platte für 20 min lichtgeschützt gelagert. Die ablaufende Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Stop Solution in jedes Well gestoppt.

Der bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte Substratumsatz wurde photometrisch bei 450 nm Wellenlänge ermittelt und erlaubte Rückschlüsse auf die vorhandene VEGF-Konzentration.

#### *2.5.2.4 Auswertung der Messungen*

Die photometrisch bestimmten Extinktionen wurden im Absorptions-Reader (ELx800, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) ermittelt und die VEGF-Konzentrationen anhand der Regressionsgeraden der Standardkurve berechnet, welche eine Linearität bis 1000 pg/ml aufwies.

Die so ermittelten VEGF-Konzentrationen wurden im Anschluss daran durch die absolute Zellzahl aus der Trypanblau-Vitalzählung (Kap.2.4.1) geteilt. Diese Konzentration (VEGF/100 Zellen) wurde dann als prozentualer Wert im Vergleich zur Kontrolle angegeben.

## **2.6 Statistische Auswertung**

Jedes Experiment wurde mindestens 3 mal durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit ANOVA (Statistica) und einem anschließenden *Student's t-test* (Excel) ermittelt. Hierbei galt ein p-Wert von  $\leq 0,05$  als signifikant.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zellüberleben nach Hitzestimulation

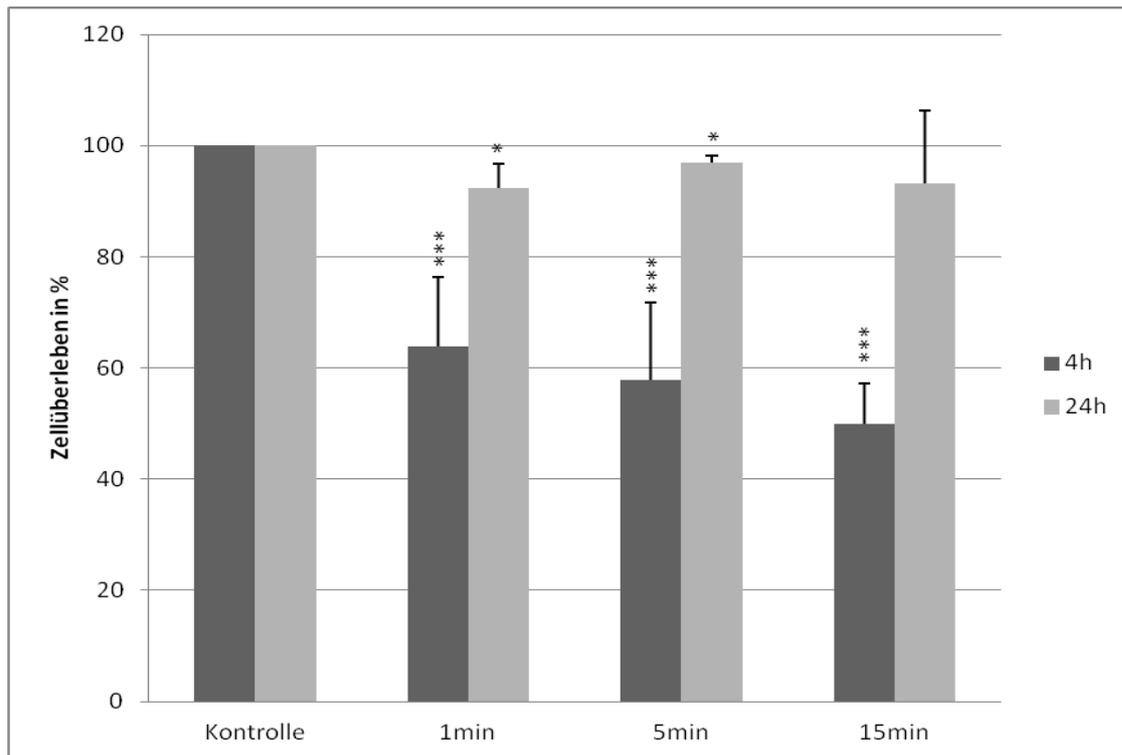
Mit Hilfe der Trypanblau-Vitalzählung wurde der Einfluss auf das Zellüberleben bei ARPE-19-Zellen durch Stimulation mit verschiedenen Temperaturen für unterschiedlich lange Stimulationszeiten untersucht.

Die Zellen wurden entsprechend dem Kapitel 2.3.1 stimuliert und anschließend wurde, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, die Anzahl der vitalen Zellen ermittelt.

#### 3.1.1 Stimulation mit 40°C

Eine Hitzestimulation von 40°C zeigte nach 24 Stunden signifikante Ergebnisse nach 1 minütiger und 5 minütiger Stimulation. Nach 1 minütiger Stimulation waren 92,4% der Zellen vital mit einer Standardabweichung von  $\pm 4,4\%$ . Dies entspricht einem  $p \leq 0,05$ . Nach 5 minütiger Stimulation überlebten 96,9%  $\pm 1,3\%$ , mit  $p \leq 0,05$  und nach 15 minütiger Erhitzung wurden 93,3%  $\pm 13\%$  vitale Zellen gezählt.

Die Zählungen 4 Stunden nach Hitzestimulation von 40°C ergaben zu allen Messpunkten einen signifikanten Zelltod. Bei einer 1 minütigen Stimulation überlebten 63,8% mit einer Standardabweichung von  $\pm 12,6\%$ . Dies entspricht einem  $p \leq 0,001$ . Nach 5 minütiger Stimulation überlebten 57,8%  $\pm 13,9\%$ ,  $p \leq 0,001$  und nach 15 Minuten 49,9%  $\pm 7,3\%$ ,  $p \leq 0,001$  (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Zellüberleben in % bei Stimulation mit 40°C**

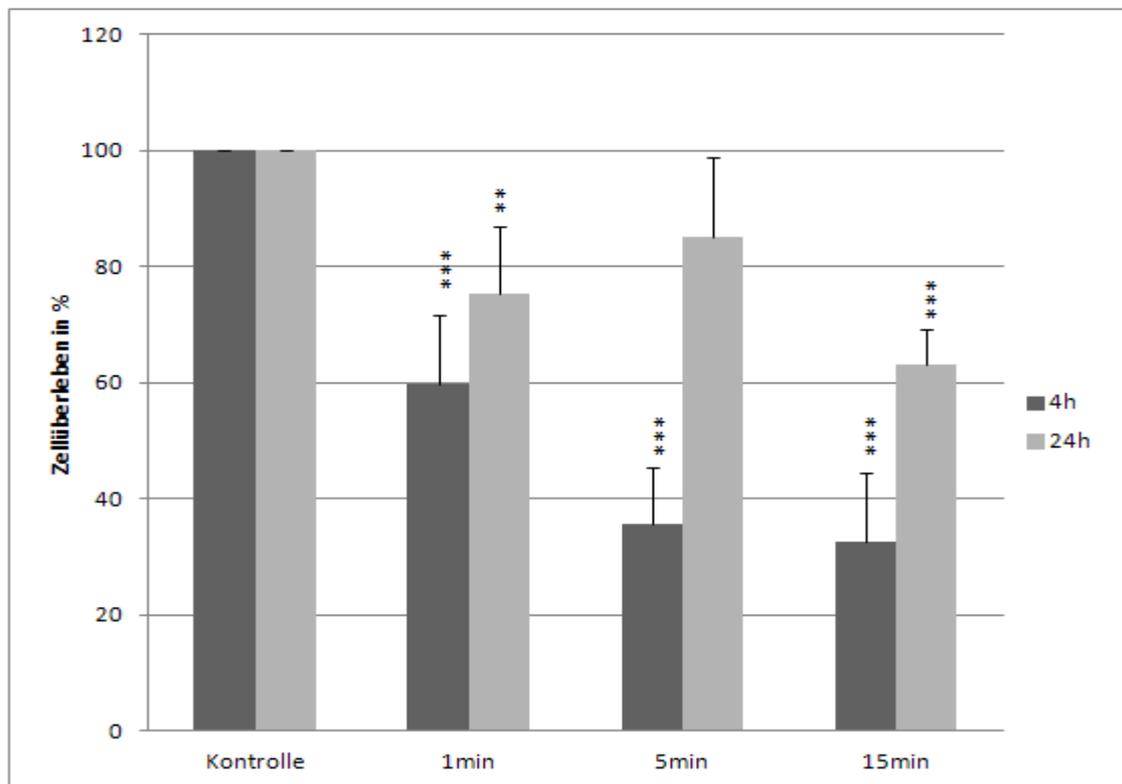
ARPE 19 Zellen wurden für 1 min, 5 min oder 15 min auf 40°C erwärmt. Nach 4 Stunden und 24 Stunden wurde das Zellüberleben ermittelt. Nach 4 Stunden konnte für alle Stimulationszeiten ein signifikanter Zelltod ermittelt werden. Nach 24 Stunden war ein signifikanter Zelltod nach 1 Minute und 5 Minuten sichtbar. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA und einem *Student's t-test* (Excel) ermittelt.

\* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$  verglichen zur unstimulierten Kontrolle.

### 3.1.2 Stimulation mit 42°C

Eine Hitzestimulation von 42°C zeigte nach 24 Stunden bei den Messpunkten 1 Minute und 15 Minuten signifikante Ergebnisse. Nach 1 minütiger Stimulation überlebten 75,3% der Zellen  $\pm 11,5\%$ ,  $p \leq 0,01$ , nach 5 minütiger Stimulation überlebten 85,2%  $\pm 13,8\%$  und nach 15 minütiger Erhitzung wurden 63,0%  $\pm 6,2\%$ ,  $p \leq 0,001$  vitale Zellen gezählt.

Die Zählungen 4 Stunden nach Hitzestimulation von 42°C ergaben wiederum zu allen Messpunkten einen signifikanten Zelltod. Bei einer 1 minütigen Stimulation überlebten 59,7% mit einer Standardabweichung von  $\pm 12,1\%$ . Dies entspricht einem  $p \leq 0,001$ . Nach 5 minütiger Stimulation überlebten 35,8%  $\pm 9,8\%$ ,  $p \leq 0,001$  und nach 15 Minuten 32,5%  $\pm 12\%$ ,  $p \leq 0,001$  (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Zellüberleben in % bei Stimulation mit 42°C**

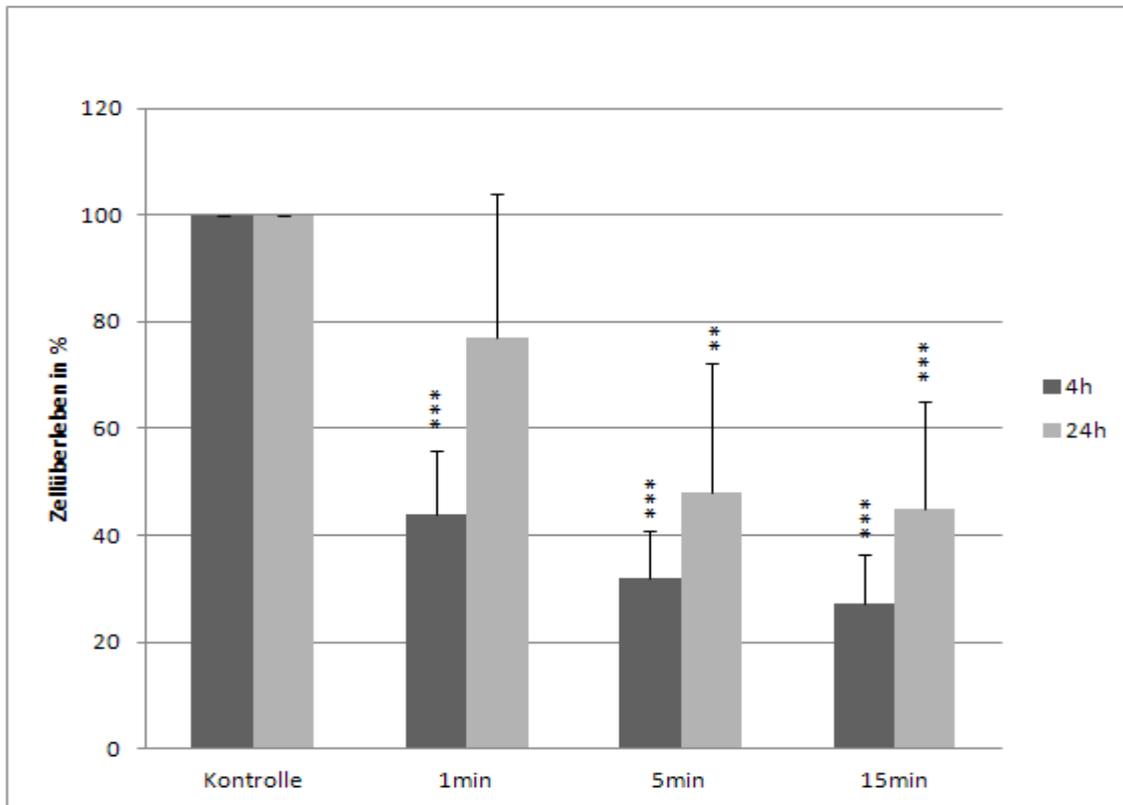
ARPE 19 Zellen wurden für 1 min, 5 min oder 15 min auf 42°C erwärmt. Nach 4 Stunden und 24 Stunden wurde das Zellüberleben ermittelt. Nach 4 Stunden konnte für alle Stimulationszeiten ein signifikanter Zelltod ermittelt werden. Nach 24 Stunden war ein signifikanter Zelltod nach 1 Minute und 15 Minuten sichtbar. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA und einem *Student's t-test* (Excel) ermittelt.

\* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$  verglichen zur unstimulierten Kontrolle.

### 3.1.3 Stimulation mit 45°C

Eine Hitzestimulation von 45°C zeigte nach 24 Stunden bei den Messungen nach 5 und 15 Minuten signifikante Ergebnisse. Nach 1 minütiger Stimulation überlebten 77,1 %  $\pm$  26,8 %, nach 5 minütiger Stimulation überlebten 5 min 48,1 %  $\pm$  24 %,  $p \leq 0,01$  und nach 15 minütiger Erhitzung wurden 15 min 45,1 %  $\pm$  20 %,  $p \leq 0,001$  vitale Zellen gezählt.

Die Zählungen 4 Stunden nach Hitzestimulation von 45°C ergaben ebenfalls zu allen Messpunkten einen signifikanten Zelltod. Bei einer 1 minütigen Stimulation überlebten 43,9 % mit einer Standardabweichung von  $\pm$  11,8 %. Dies entspricht einem  $p \leq 0,001$ . Nach 5 minütiger Stimulation überlebten 32 %  $\pm$  8,7 %,  $p \leq 0,001$  und nach 15 Minuten 27,3 %  $\pm$  8,9 %,  $p \leq 0,001$  (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Zellüberleben in % bei Stimulation mit 45°C**

ARPE 19 Zellen wurden für 1 min, 5 min oder 15 min auf 45°C erwärmt. Nach 4 Stunden und 24 Stunden wurde das Zellüberleben ermittelt. Nach 4 Stunden konnte für alle Stimulationszeiten ein signifikanter Zelltod ermittelt werden. Nach 24 Stunden war ein signifikanter Zelltod nach 5 Minuten und 15 Minuten sichtbar. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA und einem *Student's t-test* (Excel) ermittelt.

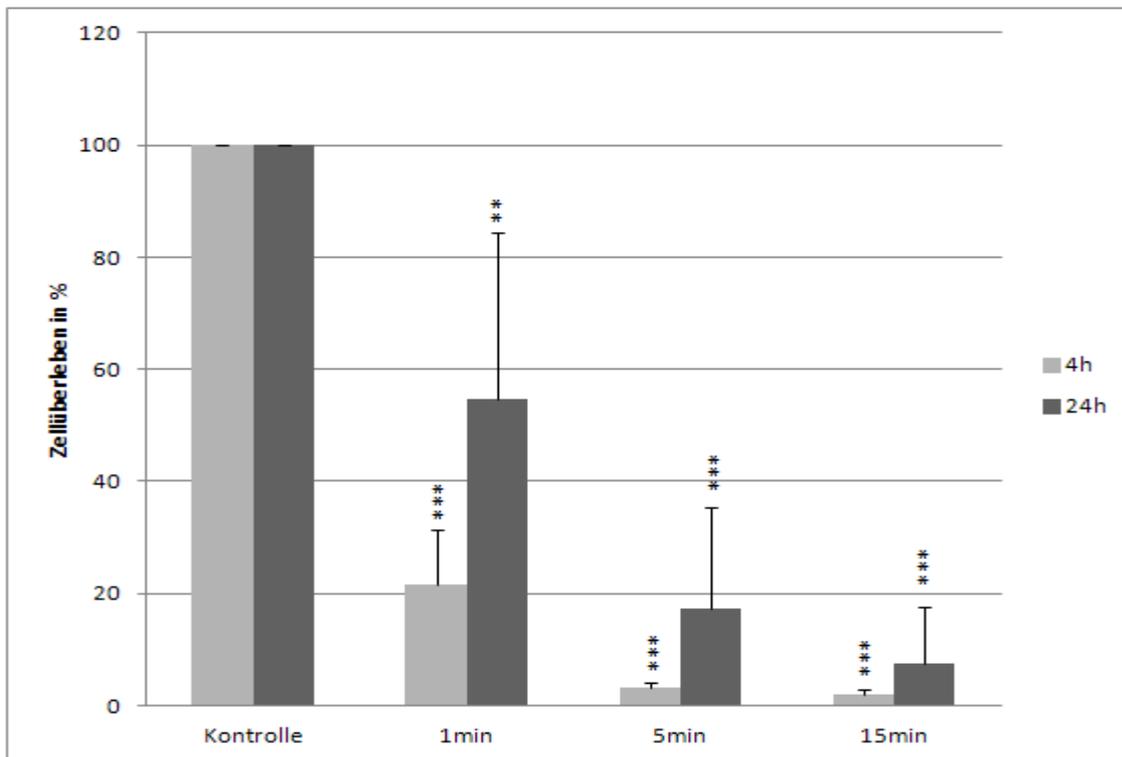
\* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$  verglichen zur unstimulierten Kontrolle.

### 3.1.4 Stimulation mit 50°C

Bei einer Temperatureinwirkung von 50°C reagierten die ARPE-19 Zellen am empfindlichsten. Der Zelltod konnte sowohl nach 4 Stunden, sowie nach 24 Stunden zu allen Messpunkten signifikant nachgewiesen werden.

Die Zählungen ergaben nach 24 Stunden bei 1 minütiger Stimulation einen Zellrückgang auf 1 min 54,7 % mit einer Standardabweichung von  $\pm 29,8$  %,  $p \leq 0,01$ . Nach 5 Minuten ging die Zellpopulation auf 17,3 %  $\pm 18,2$  %,  $p \leq 0,001$  zurück. Nach 15 Minuten konnten nur noch 7,7 %  $\pm 9,9$  %;  $p \leq 0,001$  gezählt werden. Die Zählungen 4 Stunden nach

Hitzestimulation von 50°C ergaben ebenfalls zu allen Messpunkten einen signifikanten Zelltod. Bei einer 1 minütigen Stimulation überlebten 21,76 % mit einer Standardabweichung von  $\pm 9,6$  %. Dies entspricht einem  $p \leq 0,001$ . Nach 5 minütiger Stimulation überlebten  $3,13 \% \pm 0,9 \%$ ,  $p \leq 0,001$  und nach 15 Minuten  $1,99 \% \pm 1 \%$ ,  $p \leq 0,001$  (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Zellüberleben in % bei Stimulation mit 50°C**

ARPE 19 Zellen wurden für 1 min, 5 min oder 15 min auf 50°C erwärmt. Nach 4 Stunden und 24 Stunden wurde das Zellüberleben ermittelt. Nach 4 Stunden konnte für alle Stimulationszeiten ein signifikanter Zelltod ermittelt werden. Nach 24 Stunden war ein signifikanter Zelltod ebenfalls für alle Stimulationszeiten sichtbar. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA und einem *Student's t-test* (Excel) ermittelt.

\* :  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$  verglichen zur unstimulierten Kontrolle.

### 3.2 VEGF-Sekretion nach Hitzestimulation

Durch einen enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) wurde die Reaktion der ARPE-19 Zellen auf die durchgeführte Hitzestimulation in Bezug auf die VEGF-Sekretion 4 Stunden und 24 Stunden nach Stimulation untersucht.

Die zu untersuchenden Probenüberstände wurden, wie in Kapitel 2.3.1 erläutert, asserviert und nach dem Protokoll in Kapitel 2.5 ausgewertet.

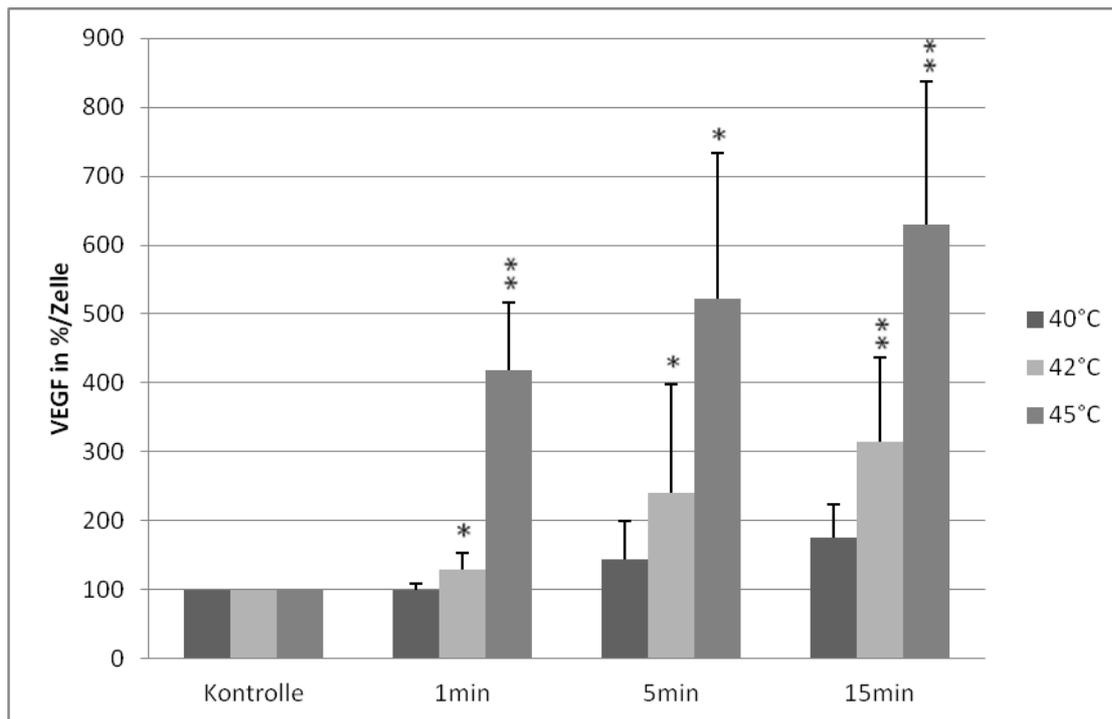
### **3.2.1 Vier Stunden nach Stimulation**

Eine Inkubation der Zellen bei 40°C für 1 Minute, 5 Minuten und 15 Minuten ließ nach 4 Stunden einen VEGF Anstieg pro Zelle im Überstand beobachten, welcher allerdings lediglich nach 15 Minuten eine Signifikanz erreichte. Eine 1 minütige Stimulation ergab eine VEGF-Sekretion von 99,44 %  $\pm$  9,7 %; nach 5 Minuten stieg die Sekretion auf 144,92 %  $\pm$  54,5 %; nach 15 Minuten wurde ein Anstieg auf 176,2%  $\pm$  48,2% mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  ermittelt.

Bei einer Temperatur von 42°C konnte eine signifikante Induktion der VEGF Sekretion für alle Zeitpunkte nach 4 Stunden ermittelt werden. Der Anstieg nach 1 Minute betrug 129,1 %  $\pm$  23,4 %. Dies entspricht einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$ . Nach 5 Minuten erreichte die VEGF Sekretion Werte von 240,59 %  $\pm$  156,6 %,  $p \leq 0,05$ . Nach 15 minütiger Stimulation stieg die VEGF Sekretion auf 314,7%  $\pm$  122,4 %  $p \leq 0,01$ .

Eine Stimulation mit 45°C fielen die Ergebnisse noch deutlicher aus. Es konnte eine signifikante VEGF Induktion zu allen Messpunkten nach 4 Stunden erreicht werden. Eine 1 minütige Stimulation ergab eine VEGF-Sekretion von 418,54 %  $\pm$  98,8 %  $p \leq 0,01$ ; nach 5 Minuten stieg die Sekretion auf 522,78 %  $\pm$  210,77 %  $p \leq 0,05$ ; nach 15 Minuten wurde ein Anstieg auf 629,1 %  $\pm$  208,89 %  $p \leq 0,01$  ermittelt.

Aufgrund des Zelltodes bei 50°C wurden keine ELISA Untersuchungen für diese Temperatur durchgeführt (Abbildung 11).



**Abbildung 11: VEGF Sekretion 4 Stunden nach Stimulation**

ARPE-19 Zellen wurden für 1 Minute, 5 Minuten oder 15 Minuten mit 40°C, 42°C oder 45°C inkubiert und der Überstand nach 4 Stunden mittels VEGF-ELISA untersucht. Es zeigt sich ein signifikanter, zeit- und temperaturabhängiger Anstieg der VEGF-Konzentration in %/Zelle. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA und einem *Student's t-test* (Excel) ermittelt.

\* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$  verglichen zur unstimulierten Kontrolle.

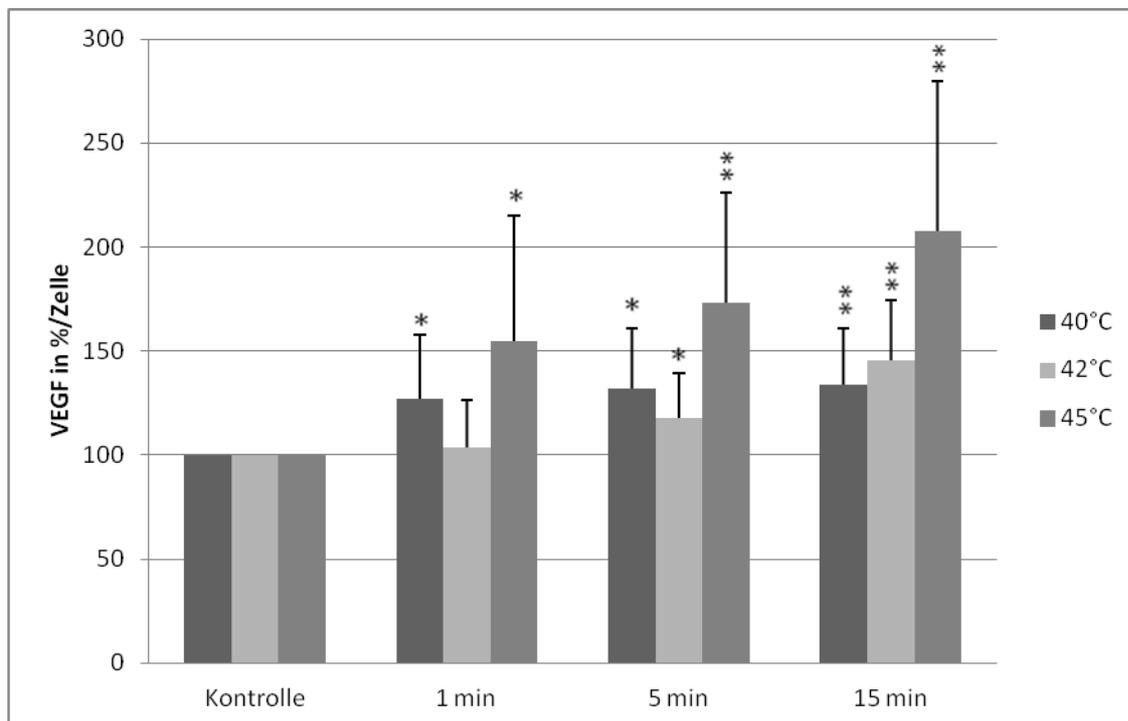
### 3.2.2 24 Stunden nach Stimulation

Eine Inkubation der Zellen bei 40°C für 1 Minute, 5 Minuten und 15 Minuten ließ nach 24 Stunden ebenfalls einen signifikanten VEGF Anstieg pro Zelle im Überstand beobachten. Eine 1 minütige Stimulation ergab eine VEGF-Sekretion von  $127,23 \% \pm 30,36 \%$  mit einem  $p \leq 0,05$ ; nach 5 Minuten stieg die Sekretion auf  $132,16 \% \pm 28,75 \%$  mit einem  $p \leq 0,05$ ; nach 15 Minuten wurde ein Anstieg auf  $134 \% \pm 26,86 \%$  ermittelt. Dies entspricht einem  $p \leq 0,01$ .

Bei einer Temperatur von 42°C konnte eine signifikante Induktion der VEGF Sekretion für die Zeitpunkte 5 Minuten und 15 Minuten nach 24 Stunden ermittelt werden. Der Anstieg nach 1 Minute betrug  $103,79 \% \pm 22,34 \%$ . Nach 5 Minuten erreichte die VEGF

Sekretion Werte von  $117,70 \% \pm 21,71 \%$ ,  $p \leq 0,05$ . Nach 15 minütiger Stimulation stieg die VEGF Sekretion auf  $145,61 \% \pm 29,1 \%$   $p \leq 0,01$ .

Eine Stimulation mit  $45^{\circ}\text{C}$  fielen die Ergebnisse weiterhin deutlich aus. Es konnte eine signifikante VEGF Induktion zu allen Messpunkten nach 24 Stunden erreicht werden. Eine 1 minütige Stimulation ergab eine VEGF-Sekretion von  $154,89 \% \pm 60,07 \%$   $p \leq 0,05$ ; nach 5 Minuten stieg die Sekretion auf  $173,18\% \pm 53,07\%$   $p \leq 0,01$ ; nach 15 Minuten wurde ein Anstieg auf  $207,46\% \pm 72,01\%$   $p \leq 0,01$  ermittelt (Abbildung 12).



**Abbildung 12: VEGF Sekretion 24 Stunden nach Stimulation**

ARPE-19 Zellen wurden für 1 Minute, 5 Minuten oder 15 Minuten mit  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $42^{\circ}\text{C}$  oder  $45^{\circ}\text{C}$  inkubiert und der Überstand nach 20 Stunden ausgetauscht, anschließend wurde für weitere 4 Stunden (20-24 Stunden nach Stimulation) inkubiert. Dieser Überstand wurde dann mittels VEGF-ELISA untersucht. Es zeigt sich ein signifikanter, zeit- und temperaturabhängiger Anstieg der VEGF-Konzentration in %/Zelle. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA und einem *Student's t-test* (Excel) ermittelt.

\* :  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$  verglichen zur unstimulierten Kontrolle.

## 3.3 Zugrundeliegende Signalkaskaden der VEGF-Sekretion

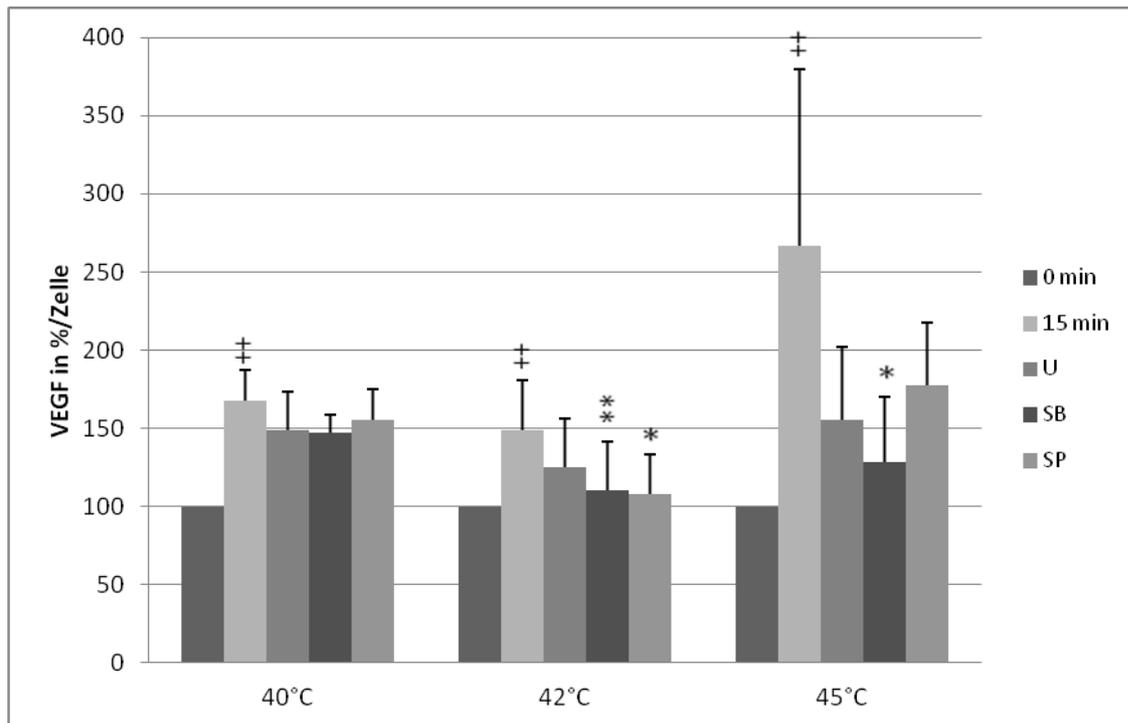
### 3.3.1 MAPK

Vorherige Studien konnten eine Rolle der MAPK ERK1/2 bei der Induktion von VEGF unter oxidativem Stress zeigen, allerdings nicht für die konstitutive VEGF-Regulation. Die MAPK p38 dagegen ist in die konstitutive Regulation der VEGF-Sekretion involviert (Klettner et Roider 2009, Kunchithapautam et al 2011). In dieser Studie haben wir den Einfluss der einzelnen MAPK ERK1/2, p38 und JNK auf die VEGF-Sekretion nach 15 minütiger Hitzestimulation bei verschiedenen Temperaturen untersucht.

Bei einer Temperatur von 40°C gab es keinen signifikanten Abfall durch die Inhibition der MAPK p38, JNK oder ERK1/2 im Vergleich zu einer nicht inhibierten Kontrollkultur (15 min 168 %  $\pm$  19,7 %  $p \leq 0,01$ ; ERK1/2 148,6 %  $\pm$  24,9 %; p38 147,3 %  $\pm$  11,5 %, JNK 155,7 %  $\pm$  19,7 %).

Eine Inkubation von 42°C für 15 Minuten führte zu einem signifikanten VEGF-Anstieg, welcher durch Inhibition der MAPK p38 und JNK signifikant reduziert werden konnte (15 min 160,0%  $\pm$  23,5%,  $p \leq 0,01$ ; ERK1/2 129,0%  $\pm$  34,6%; p38 103,3%  $\pm$  31,2%,  $p \leq 0,01$ ; JNK 112,7%  $\pm$  26,8 %,  $p \leq 0,05$ ).

Bei 45°C ist eine starke Induktion der VEGF-Sekretion zu beobachten, welche signifikant durch die Inhibition von p38 reduziert werden konnte (15 min 267%  $\pm$  112,3%,  $p \leq 0,01$ ; ERK1/2 155,2%  $\pm$  46,7%; p38 128,8%  $\pm$  41,7%  $p \leq 0,05$ ; JNK 177,6%  $\pm$  40,2%) (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Inhibition der VEGF Sekretion durch MAPK**

ARPE-19 Zellen wurden für 15 Minuten mit 40°C, 42°C oder 45°C stimuliert und mit spezifischen Inhibitoren versetzt. (U: 10µM U0126 Inhibition von ERK 1/2 ; SB: 10µM SB203580 Inhibition von p38 ; SP: 10µM SP600125 Inhibition von JNK). Der Überstand wurde nach 4 Stunden mittels VEGF-ELISA untersucht. Es zeigt sich ein signifikant geringere VEGF Sekretion bei Inhibition der MAPK p38 für 42°C und 45°C, sowie bei Inhibition der MAPK JNK für 42°C. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA und einem *Student's t-test* (Excel) ermittelt.

\* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$  verglichen zur unstimulierten Kontrolle.

### 3.3.2 TRPV

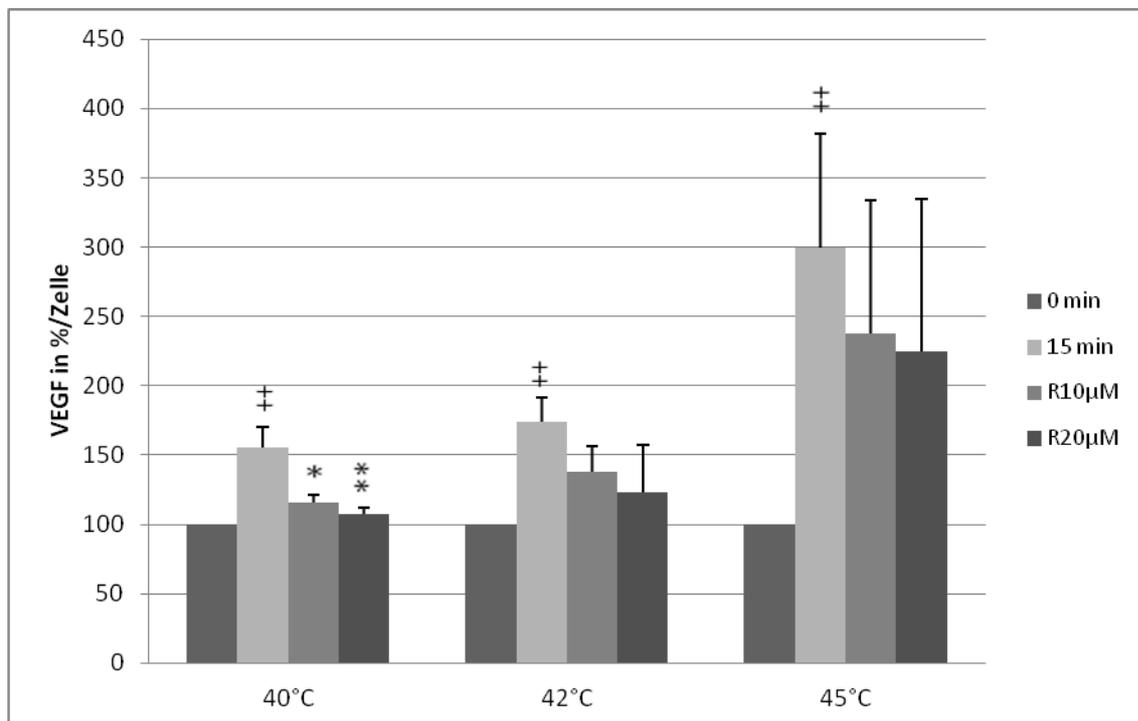
Ruthenium Rot ist ein nicht kompetitiver Inhibitor von TRPV-Kanälen (García-Martínez C. et al. 2000), welche eine Rolle in der Temperatur vermittelten Hochregulation von VEGF im RPE inne zu haben scheinen (Cordeiro et al 2010).

In unserer Studie zeigte sich ein signifikanter VEGF Anstieg nach 15 minütiger Inkubation auf 40°C, welcher durch Ruthenium Rot, sowohl in 10 µM (R10 µM) als auch in 20 µM (R20 µM) Konzentration signifikant reduziert werden konnte (15 min 155,1% ± 15,2%,  $p \leq 0,05$ ; R10 µM 116% ± 5,5%  $p \leq 0,05$ ; R20 µM 107% ± 4,8%,  $p \leq 0,01$ ).

Bei einer Stimulation von 15 Minuten auf 42°C kann ein VEGF-Anstieg durch Ruthenium Rot in 10 µM und 20 µM Konzentration zwar tendenziell reduziert werden, allerdings

wurde eine statistische Signifikanz hierbei nicht mehr erreicht (15 min  $174,4\% \pm 16,8\%$ ,  $p \leq 0,05$ , R10  $137,8\% \pm 18,3\%$ , R20  $123,6\% \pm 33,6\%$ ).

Bei einer Temperatur von  $45^\circ\text{C}$  und 15 Minuten konnte ein erheblicher Anstieg der VEGF-Konzentration beobachtet werden, welcher durch keine der beiden Konzentrationen von Ruthenium Rot signifikant gesenkt werden konnte (15 min  $299,4\% \pm 82,7\%$   $p \leq 0,01$ ; R10  $\mu\text{M}$   $237,7\% \pm 96,5\%$ ; R20  $\mu\text{M}$   $224,5\% \pm 110\%$ ) (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Inhibition der VEGF Sekretion durch Hemmung der TRPV-Kanäle**

ARPE-19 Zellen wurden für 15 Minuten mit  $40^\circ\text{C}$ ,  $42^\circ\text{C}$  oder  $45^\circ\text{C}$  stimuliert und mit einem spezifischen Inhibitor der TRPV Kanäle in zwei unterschiedlichen Konzentrationen versetzt (R10µM:  $10\ \mu\text{M}$  Ruthenium Rot ; R20µM:  $20\ \mu\text{M}$  Ruthenium Rot).

Der Überstand wurde nach 4 Stunden mittels VEGF-ELISA untersucht. Es zeigt sich eine signifikant geringere VEGF Sekretion bei Inhibition der TRPV-Kanäle für  $40^\circ\text{C}$ . Die Signifikanz wurde mittels ANOVA und einem *Student's t-test* (Excel) ermittelt.

\* :  $p \leq 0,05$ ; \*\* :  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$  verglichen zur unstimulierten Kontrolle.

## 4 Diskussion

Eine Erwärmung der Retina auf 40°C bis 50°C hat tiefgreifende Wirkungen auf das retinale Pigmentepithel. In dieser Studie konnte eine eindeutige zytotoxische Wirkung durch Hyperthermie nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen bestätigen die derzeitigen Zielsetzungen bei der klinischen Anwendung von Hyperthermie, z.B. im Rahmen einer transpupillären Thermotheapie, das bestrahlte Gewebe in den Zelltod zu führen (Journée et al 1991). Interessanterweise trat die zytotoxische Wirkung bereits bei geringen Temperaturanstiegen bis 40°C auf. Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung einer gut funktionierenden choroidalen Kühlung in Bezug auf die retinale Homöostase (Nickla et al 2010). Ob nun allerdings aufgrund von mangelnder choroidaler Durchblutung im Rahmen von pathologischen oder altersabhängigen Veränderungen der Choroidea ein verlängerter Temperaturanstieg in der Retina entsteht, was gegebenenfalls retinale Degenerationen auslösen und die Entstehung von retinalen Erkrankungen begünstigen könnte, bleibt spekulativ und sollte durch weitere Forschung objektiviert werden.

Um die Effekte des RPE's auf Hitzestimulation zu untersuchen, wurde eine in vitro Modellversuchsreihe durchgeführt. Hierfür eignete sich die humane, nicht transformierte Zelllinie ARPE 19, welche von adulten humanen RPE Zellen abstammt und weithin als in vitro Modell für humane RPE Zellen Verwendung findet (Dunn et al 1996; Zeng et al 2013; Yokojama et al 2012). Als anerkannte Zelllinie wird ARPE 19 für viele biochemische Studien, sowie für Untersuchungen der Signaltransduktion herangezogen (Ahmado et al 2011; Alge et al 2006). Bei der Interpretation der erhobenen Daten gilt es allerdings zu beachten, dass Unterschiede zwischen der Zelllinie und primären RPE Zellen existieren. Bei Analysen zur Protein- und Genexpression konnte in der Tat gezeigt werden, dass die Expressionsmuster der ARPE 19 Zellen von primären RPE Zellen abweichen (Alge et al 2006; Cai et Del Priore 2006; Tian et al 2005). Dennoch zeigten die Proteinanalysen eine hohe Übereinstimmung beider Zellreihen, in denen die Unterschiede größtenteils in Proteinen des Zytoskelets zu finden waren. Es konnten keine Unterschiede in Angiogenese und Apoptose assoziierten Proteinen nachgewiesen werden (Alge et al 2006). Für alle in dieser Studie untersuchten Proteine bestehen keine Unterschiede der Genexpression. ARPE 19 Zellen sind bereits in mehreren Studien zur Untersuchung der VEGF Expression (Ford et al 2011; Bergmann et al 2011), sowie für die Funktionsweisen der MAPK etabliert worden (Bai et al 2013;

Watanabe et al 2009; Chen et al 2011). Somit gilt die Zelllinie ARPE 19 als angemessenes Model zur Untersuchung der Regulationweisen der VEGF Sekretion, wohlwissend der limitierten Aussagekraft bei der Benutzung von Zelllinien.

Bei einer transpupillären Thermotherapie werden durch das mydriatische Auge Laserstrahlen im Infrarotbereich (810 nm) mittels Diodenlaser appliziert. Hierdurch soll in dem bestrahlten Areal eine Hyperthermie von 45°C-65°C entstehen, was zu irreversiblen Zellschäden und nachfolgend zur Apoptose der bestrahlten Zellen führen soll (siehe Kap. 1.8.1). In der ophthalmologischen Klinik wird die TTT-Behandlung heutzutage als therapeutische Option bei verschiedenen Erkrankungen der Retina genutzt. So wurden Behandlungen beim uvealen Melanom (Oosterhuis et al 1995), bei der choroidalen Neovaskularisation (CNV), bei der alterbedingten Makuladegeneration (AMD) (Nowak et al 2012; Söderberg et al 2012), der Frühgeborenenretinopathie (ROP) (Shah et al 2011), dem Retinoblastom (Francis et al 2012), bei *subretinal fluids* (Caminal et al 2013) und dem choroidalen Hämangiom (Sharma et al 2011) beschrieben.

Als effektive Zieltemperatur bei einer TTT-Behandlung wird in der Literatur ein Bereich von 45°C – 60°C vorgeschlagen (Oosterhuis et al 1995). Allerdings existieren keine Messungen der Temperatur an der humanen Retina während einer solchen Therapie. Eine Studie an Kaninchen ermittelte Temperaturen zwischen 42,3°C und 48,8°C während einer TTT (Ibarra et al 2004). Aus diesem Grunde wurde ein zu untersuchender Temperaturbereich zwischen 40°C und 50°C festgelegt. Dies entspricht dem unteren Bereich der von Oosterhuis vorgeschlagenen Zieltemperatur (Oosterhuis et al 1995) und überschneidet sich mit den im Tierversuch gemessenen Temperaturen (Ibarra et al 2004). Da sich während der Versuchsreihen herausstellte, dass eine Hitzestimulation mit 50°C zu einem erheblichen Zelltod führt, wurde davon abgesehen diese Temperatur für die weiteren Versuche einzubeziehen. Schlussfolgernd erschien ein Messbereich zwischen 40°C-45°C für die Beurteilung der Effekte des RPE auf eine Hitzestimulation als angemessen.

In der Literatur werden verschiedene Bestrahlungszeiten für eine TTT Behandlung empfohlen. Es werden Behandlungszeiten bis zu einer Minute (Currie et al 2000), aber auch Expositionszeiten von 8-35 Minuten publiziert (Stoffelns 2006). In diesen Versuchsreihen wurden Stimulationszeiten von 1 Minute, 5 Minuten und 15 Minuten gewählt. Mit diesem Zellkultur-Model wurde unter artifiziellen und konstruierten Bedingungen die Hitze induzierten Veränderungen des RPE, wie sie während einer TTT auftreten könnten, in einem in vitro Model nachgestellt.

Eine zelluläre Erhitzung ist für kultivierte RPE Zellen eindeutig ein toxischer Stimulus, in Abhängigkeit von der einwirkenden Temperatur und der Stimulationsdauer. In den hier durchgeführten Versuchen wurde sicher gestellt, dass die Zellen während des kompletten Versuchszeitraumes der gewählten Temperatur ausgesetzt wurden. Hier unterscheidet sich das gewählte in vitro Model von der in vivo Situation im Auge, denn dort würde das RPE durch den ständigen Blutstrom der Choroidea gekühlt werden (Parver et al 1980). Ebenfalls besteht ein Unterschied zu den Versuchsreihen von Cordeiro, da hier die Hitzeexposition nur für ein kurzen Zeitraum auf das RPE eingewirkt hat (Cordeiro et al 2010).

#### **4.1 Temperaturabhängiger Anstieg der VEGF-Sekretion**

Im Rahmen dieser Studie konnte ein temperaturabhängiger Anstieg der VEGF Sekretion in den stimulierten ARPE-19 Zellen nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in der Literatur beschrieben (Cordeiro et al 2010). Bisher nicht sicher geklärt bleibt die Frage, inwieweit dieser Anstieg eine spezifische Reaktion der RPE-Zellen auf den Stimulus Hyperthermie ist, oder ob dieser Anstieg als eine unspezifische Stressreaktion aufgrund des hohen Zellschadenspotentials zu deuten ist.

Im Rahmen der hyperthermen Stimulation bestand die theoretische Möglichkeit durch die toxische Wirkung mit nachfolgenden Zelllysatens falsch hohe VEGF-Konzentrationen im Medium zu messen. Wäre dies der Fall könnten keine validen Aussagen zur spezifischen Sekretion getroffen werden. Um diesen Faktor zu minimieren erfolgte eine zweite Versuchsreihe. Hier wurden nach identischer Stimulation die Überstände der stimulierten Zellen zwischen der 20. und 24. Stunde nach Stimulation untersucht. Hintergrund hierfür war, dass nach diesem Zeitraum nach Hitzestimulation nicht mehr von hohen Zelllyseraten ausgegangen werden kann und so der untersuchte Überstand nahezu frei von verfälschenden VEGF-Werten durch Lysen sein sollte. Diese These wird durch den erneuten Wiederanstieg an vitalen Zellen in der Trypanblaufärbung bekräftigt (Kapitel 2.4.1).

Weiterhin konnte eine Induktion der VEGF Expression in den RPE Zellen nachgewiesen werden (Faby et al 2014). Das bedeutet, dass durch den Stimulus Hyperthermie eine erhöhte Synthese von VEGF induziert wird. Diese Ergebnisse zeigen im Western Blot eindeutig einen Zelllyse- unabhängigen VEGF Anstieg. Zusätzlich sei vorab erwähnt, dass

sich die intrazelluläre Signalkaskade nach hyperthermer Stimulation klar von den Kaskaden anderer Stress induzierter VEGF Erhöhungen unterscheidet (siehe Kapitel 4.2.1-4.2.3). Somit zeigen sich in dieser Studie klare Indizien für eine spezifische VEGF Regulation durch hypertherme Stimulation.

## **4.2 Regulationsmechanismen der VEGF-Synthese im RPE**

Die Regulation der VEGF Synthese im RPE ist komplex und kann über eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli beeinflusst werden. Hierzu zählen unter anderem Hypoxie, Hyperglykämie, Hyperthermie, oxydativer Stress, sowie verschiedene Cytokine. Eine Stimulation führt zur Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalkaskaden. Schlüsselenzyme dieser Kaskaden sind die MAPK. In Abhängigkeit vom jeweiligen Stimulus erfolgt die Aktivierung einer anderen Kaskade, welche über unterschiedliche Zielenzyme die VEGF Synthese steuern. Die Entstehung von VEGF im RPE kann auf Ebene der Transkription, der Translation, sowie posttranslational beeinflusst werden. Die genauen Zusammenhänge sind derzeit noch unzureichend erforscht. Hier bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um die intrazellulären Kaskaden für jede Noxe besser zu verstehen. Ebenfalls konnte eine autokrine Stimulation durch extrazelluläres VEGF im Sinne eines positiven Feedback-Loops nachgewiesen werden. Dies erfolgt über den VEGFR-2 (Byeon et al, 2010; Klettner et al 2013).

### **4.2.1 Einfluss von p38 auf die VEGF-Synthese im RPE**

VEGF hat eine Schlüsselposition bei der Aufrechterhaltung einer physiologischen Homöostase in der Retina. Das RPE ist der Hauptbildungsort des VEGF in der Retina. Nach heutigem Stand der Forschung ist die MAPK p38 an der Regulierung der physiologischen VEGF-Sekretion beteiligt (Klettner et Roider 2009; Klettner et al 2013). Einen weiteren Einfluss der MAPK p38 auf die VEGF-Sekretion wurde im Rahmen der zellulären Inflammation beschrieben. Die zelluläre Inflammation ist eine Gemeinsamkeit bei retinalen Pathologien und löst in der Endstrecke eine Neovaskularisation, sowie eine zelluläre Leckage aus (Caldwell et al 2010). Es gibt eine Reihe von inflammatorischen Cytokinen, unter anderem TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  oder TGF- $\beta$ , welche eine VEGF Sekretion im humanen RPE induzieren können. Diese erhöhte

Sekretion verläuft unabhängig von den Transkriptionsfaktoren HIF-1, SP-1, SP-3 und STAT3. Ein Einfluss konnte für NFκB gesehen werden (Naginei et al 2012). Für das Cytokin TGF-β, welches ebenfalls eine vermehrte VEGF Synthese induziert (Darland et al 2003, Amadio et al 2010, Naginei et al 2003), konnte im RPE die Abhängigkeit von den MAPK p38 und ERK 1/2 nachgewiesen werden (Naginei et al 2003). Ein weiterer pathologischer Stimulus, welcher p38 und ERK 1/2 abhängig, eine Induktion der VEGF-Sekretion auslöst sind oxidierte Lipoproteine (Yin et al. 2011).

In dieser Studie konnte nun eine eindeutige zeit- und temperaturabhängige Induktion der VEGF Sekretion unter hyperthermen Bedingungen gezeigt werden. Es konnte für 42°C und 45°C eine Beteiligung der MAPK p38 an der Regulation nachgewiesen werden.

#### **4.2.2 Einfluss von ERK 1/2 auf die VEGF-Synthese im RPE**

Für die MAPK ERK 1/2 konnte eine Beteiligung an der Induktion von VEGF bei verschiedenen pathologischen Stimuli nachgewiesen werden. Die MAPK ERK 1/2 kann über verschiedene intrazelluläre Wege Einfluss auf die VEGF-Synthese nehmen. So konnte z.B. für die Aktivität der Transkriptionsfaktoren Sp1/Sp3 in mehreren Studien eine entscheidende Regulation über die MAPK ERK 1/2 gesehen werden. (Milanini-Mongiat et al 2002; Pagès 2007). Im Rahmen einer Hypoxie erfolgt die Hochregulation der VEGF Expression über mehrere Wege. Zum Einen bindet der Transkriptionsfaktor HIF-1α als Heterodimer mit HIF-1β an das hypoxia responsive element (HRE) in der Promotorregion des VEGF-Gens und initiiert eine vermehrte Transkription der VEGF DNA (Forsythe et al 1996; Schofield et Ratcliffe 2004; Wang et Semenza 1995).

Durch Phosphorylierung von HIF-1α durch ERK 1/2 kann die Transkriptionsaktivität noch weiter gesteigert werden (Richard et al, 1999). Unter normoxischen Bedingungen ist HIF-1α an das von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL) gebunden, was zu einem zügigen Abbau des Enzyms durch Proteasomen führt und somit eine vermehrte Transkription verhindert ( Mole et al, 2001).

Die Folge einer systemischen Hyperglykämie im Rahmen eines Diabetes mellitus ist unter anderem die Entstehung von advanced glycation end products (AGE). AGE induzieren im RPE eine VEGF Expression. Intrazellulär wird diese Induktion, ERK1/2 und JNK vermittelt, über die im vorherigen Absatz bereits beschriebene HIF-1 Kaskade gesteuert. Die MAPK p38 hat keinen Einfluss auf die VEGF Expression bei Hyperglykämie (Lu et al 1998; Treins et al 2001). Ein weiterer pathologischer Stimulus

ist oxidativer Stress. Oxidativer Stress ist an einer Vielfalt von retinalen Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie (Madsen-Bouterse et al 2008), der AMD (Ding et al 2009) oder der Retinopathy of Prematurity (ROP) (Hartnett 2010) beteiligt. Im RPE führt oxidativer Stress zu Hochregulation von VEGF (Klettner et Roider 2009, Kannan et al 2006). Es konnte bisher die Beteiligung von unterschiedlichen MAPK nachgewiesen werden. Unter oxidativem Stress erfolgt die Hochregulation der VEGF Expression lediglich über die ERK1/2 vermittelte Signalkaskade (Klettner et Roider 2009). Weiterhin erfolgt unter oxidativem Stress eine Phosphorylierung des VEGFR-2. Hierdurch wird die Wirkung des autokrinen VEGF-Feedback-loops noch weiter erhöht (Sreekumar et al 2006).

Interessanterweise ergaben die Daten dieser Studie keinen Einfluss der MAPK ERK1/2 auf die Regulation der VEGF Sekretion im Rahmen einer hyperthermen Stimulation.

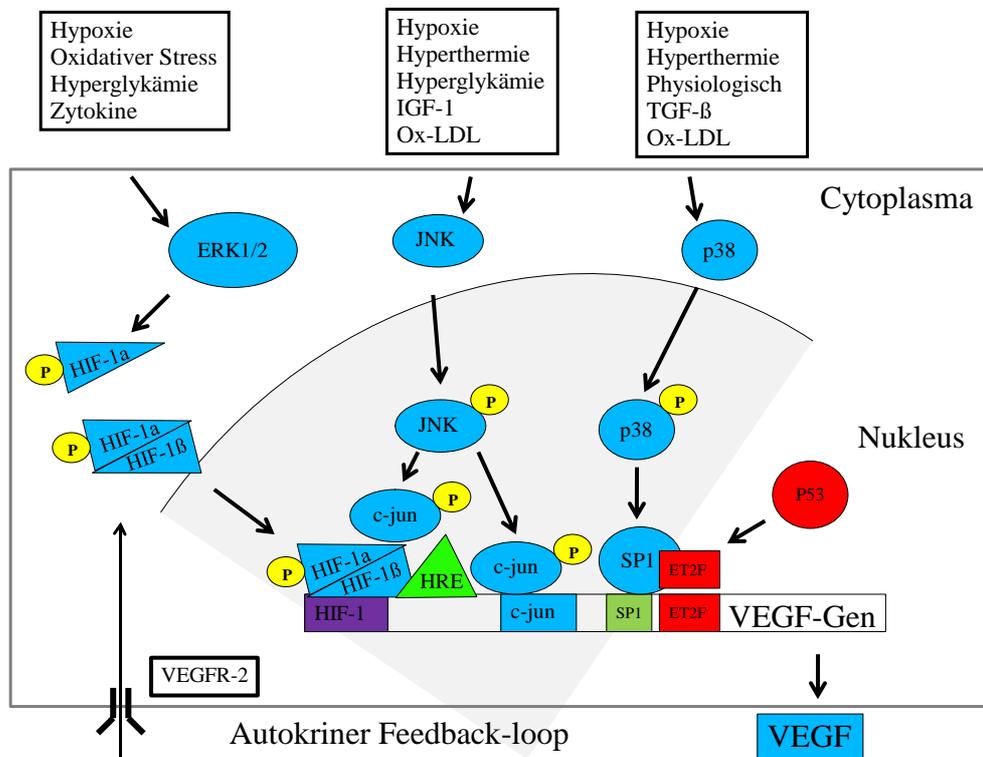
#### **4.2.3 Einfluss von JNK auf die VEGF-Synthese im RPE**

Die MAPK JNK hat im Rahmen verschiedener pathologischer Stimuli Einfluss auf die VEGF-Synthese. So erfolgt unter hypoxischen Bedingungen eine JNK vermittelte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor c-Jun. Hierdurch aktiviert, bindet Phospho-c-Jun an die Promotor-Region des VEGF-Gens und die VEGF Transkription wird induziert (Guma et al 2009). Wie bereits im Kapitel 4.2.1 erwähnt hat JNK weiterhin stimulierenden Einfluss auf die HIF-1 Kaskade, was bei Vorhandensein von AGE's im Rahmen einer Hyperglykämie ebenfalls eine Induktion der VEGF-Expression induziert. (Lu et al 1998; Treins et al 2001). Weiterhin hat die MAPK JNK Einfluss auf die VEGF Sekretion bei Vorhandensein oxidierender Lipoproteine (Yin et al 2011).

Bei hyperthermer Stimulation haben die Daten dieser Studie eine geringe Beteiligung der MAPK JNK an der Induktion der VEGF Sekretion bei 42°C nachgewiesen. Diese wird allerdings zu einem größeren Maße über die MAPK p38 reguliert, ohne Einfluss der MAPK ERK 1/2.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass spezifisch für jede Noxe die Regulation der VEGF Sekretion über eine Vielzahl an MAPK abhängigen Signalkaskaden gesteuert wird. Somit lässt sich eine generelle Aussage zur Regulation bei pathologischer Stimulation nicht treffen und muss für jede Noxe im Einzelnen untersucht werden.

Die Abbildung 15 zeigt stark vereinfacht den Noxen spezifischen Einfluss der MAPK auf die VEGF Expression.



**Abbildung 15: schematische Darstellung des Noxen spezifischen Einflusses der MAPK auf die VEGF-Expression**

IGF-1: *Insulin like growth faktor-1*; TGF-β: *Transforming growth faktor- β*; ERK 1/2: extrazellulär signal-regulierte Kinasen; JNK: c-Jun *N*-terminale Kinasen; p38: p38-mitogenaktivierte Proteinkinase; HIF-1a: *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*; HIF-1β: *Hypoxia-inducible factor 1-beta*; HRE: *hypoxia responsive element*; Ox-LDL: *oxidized low-density-lipoprotein*; SP-1: *specificity protein 1*; ET2F: Zellzyklus regulierenden Faktor; VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*; VEGFR-2: *Vascular Endothel Growth Factor Rezeptor-2*

### 4.3 Einfluss der TRPV-Kanäle auf die VEGF-Sekretion im RPE

Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung beschrieb TRPV Kanäle, welche als Reaktion auf Hitze oder durch Stimulation mit IGF-1 in der Lage waren die VEGF-Sekretion zu induzieren (Cordeiro 2010). Hierfür wurden TRPV2-Kanäle mit einer Aktivierungsschwelle bei 52°C auswindig gemacht (Vay et al 2012).

Im Rahmen unserer Versuche zeigte sich eine TRPV-Kanal vermittelte VEGF-Induktion durch Hitzeexposition nur bei geringen Temperaturerhöhungen (40°C). Für höhere

Temperaturen (42°C-45°C) konnte dieser Effekt nicht mehr beobachtet werden. Da die Temperaturen, in den durchgeführten Versuchen, die Aktivierungsschwelle von 52°C nicht erreichten, erfolgte wahrscheinlich keine Aktivierung der TRPV2-Kanäle und somit konnte folglich kein Einfluss auf die VEGF Sekretion gesehen werden. Da der Aktivitätsbereich der TRPV3-Kanäle bei 32°C bis 39°C liegt, scheinen die beobachteten Effekte bei niedrigeren Temperaturen bis 40°C am ehesten über TRPV3-Kanäle vermittelt zu werden.

#### **4.4 Möglicher Zusammenhang zwischen hyperthermer VEGF-Hochregulation und pathologischen retinalen Veränderungen**

VEGF ist ein wichtiger protektiver Faktor für die Zellen der Retina und der Choroidea, inklusive des Endothels, dem RPE, den retinalen Ganglienzellen, den Photorezeptoren und den Müller'schen-Zellen (Saint-Geniez et al 2009; Byeon et al 2010; Saint-Geniez et al 2008; Kurihara et al 2012; El-Remessy et al 2005; Kilic et al 2006). Eine Hochregulation von VEGF bei schädigender hyperthermer Stimulation könnte als protektive Antwort des RPE verstanden werden. Allerdings ist VEGF ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von okulären Erkrankungen, insbesondere beim Makulaödem, bei der choroidalen Neovaskularisation und der Frühgeborenenretinopathie (Miller et al 2003; Scholl et al. 2010; Tolentino et al 2009). Diskutiert wird VEGF auch als Faktor bei der Entstehung von Mikrometastasen beim uvealen Melanom (Yang et al 2010).

Kritisch anzumerken ist, dass die Daten dieser Studie mit Zellkulturen unter konstruierten in vitro Bedingungen erhoben wurden. Solche statischen Modelle sind weit entfernt von den physiologischen dynamischen Bedingungen in vivo. Allerdings könnte man durch die erhobenen Daten einen möglichen Einfluss einer Hyperthermie bei der Entstehung der feuchten Makuladegeneration deuten. So konnte bereits gezeigt werden, dass im Rahmen der AMD der choroidale Blutfluss abnimmt (Metelitsina 2008; Boltz 2010). Hieraus könnte eine mangelnde choroidale Kühlung und folglich die Entstehung einer Hyperthermie geschlossen werden. Im in vitro Modell führt eine solche Hyperthermie zu einer VEGF Induktion. In vivo konnten im Rahmen der CNV bei der AMD ebenfalls erhöhte VEGF-Spiegel nachgewiesen werden. In wieweit diese Mechanismen aber tatsächlich eine Rolle bei der Entstehung der AMD spielen, ist durch diese Arbeit nicht abzuschätzen und muss durch weitere Studien belegt werden.

Außerdem könnte eine starke VEGF Sekretion durch das RPE bei in vitro Stimulation mittels Hyperthermie ein Indiz für die möglichen Nebenwirkungen oder Komplikationen einer hyperthermen Therapie darstellen. Die transpupilläre Thermotherapie hat einen Stellenwert in der aktuellen Behandlung verschiedener Erkrankungen. Allerdings wurden in den durch eine TTT behandelten Augen auch Komplikationen beobachtet. So beschrieb Stoffelns das Auftreten von choroidaler Neovaskularisation im bestrahlten Areal von Augen mit einem uvealen Melanom (Stoffelns 2006). Ähnliche Komplikationen beobachtete Currie bereits zuvor. Hier wurde zusätzlich von arteriellen und venösen Gefäßokklusionen berichtet. Hierdurch kam es bei einigen Fällen zu einem Visusverlust durch die Therapie (Currie et al 2000). In einem Fallbeispiel berichteten Schöpfer und Stoffelns im Jahre 2010 erneut von der Ausbildung einer choroidalen Neovaskularisation nach intensiver Anwendung einer TTT (Schöpfer et Stoffelns 2010). Ein weiteres ophthalmologisches Krankheitsbild, bei der eine TTT derzeit therapeutisch eingesetzt wird, ist die choroidale Neovaskularisation bei der AMD. Benner et al beschrieb im Jahre 2002 das Auftreten von zwei Infarkten der Makula nach Anwendung einer TTT. Als prädisponierender Faktor wurde damals eine geographische Atrophie des RPE oder eine Narbe nach vorheriger Bestrahlung des Gebietes vermutet (Benner et al 2002). Weiterhin werden in der Literatur Komplikationen wie die Ausbildung eines Makulaödemes oder die Entstehung von subretinalen Hämorrhagien beschrieben (Parrozzani et al 2009).

Bei der Pathogenese dieser genannten Komplikationen wird in der Literatur VEGF eine entscheidene Rolle zugesprochen (Schlingemann 2004; Miller et al 2003; Scholl et al. 2010). Unsere Daten zeigen, dass in vitro durch eine hypertherme Bestrahlung eine VEGF-Induktion im RPE ausgelöst wird. Eventuell ergibt sich somit ein möglicher Zusammenhang zwischen der TTT und den beschriebenen Komplikationen.

Weiterführend müsste in Zusammenhang mit unseren Daten in Bezug auf die hypertherme Lasertherapie der CNV bei einer AMD die Indikationsstellung kritisch diskutiert werden, da sich Hinweise zeigen, dass die hypertherme Therapie die Induktion des pathogenetisch ursächlichen Faktors VEGF triggert.

Nach heutigem Stand der Forschung stehen erhöhte VEGF Spiegel im Verdacht die Entstehung von Mikrometastasen beim uvealen Melanom zu begünstigen. Diese These ist derzeit noch unzureichend erforscht und wird diskutiert. Sollte sich allerdings in der Zukunft ein Zusammenhang zwischen erhöhten VEGF Spiegeln und einer begünstigenden Entstehung von Mikrometastasen zeigen, wäre dies als negativer

prognostischer Faktor zu werten. Somit müsste dann der Einsatz einer TTT auch im Rahmen der onkologischen Behandlung des uvealen Melanoms kritisch bewertet werden und der Einsatz genauestens abgewogen werden.

## **4.5 Schlussfolgerungen dieser Arbeit**

Zusammenfassend zeigt unsere Studie, dass Hyperthermie eindeutig eine zeit- und temperaturabhängige toxische Wirkung auf RPE Zellen hat. Weiterhin konnte, ebenfalls zeit- und temperaturabhängig, eine Induktion der VEGF Sekretion durch das RPE beobachtet werden. Es wurde eine spezifische intrazelluläre Regulation der VEGF-Sekretion durch die MAPK p38, sowie zu einem geringeren Teil durch die MAPK JNK nachgewiesen. Eine Beteiligung der TRPV-Kanäle ließ sich nur für geringere Temperaturen (40°C) zeigen. Die Daten dieser Studie sind unter artifiziellen Bedingungen einer Zellkultur entstanden, jedoch sollten diese Daten mit der klinischen Situation im menschlichen Auge übereinstimmen, könnten hierdurch die bekannten Komplikationen einer hyperthermen Behandlung im Sinne einer transpupillären Thermotheapie zumindest zum Teil erklärt werden und sollten bei der klinischen Anwendung berücksichtigt werden.

## 5 Zusammenfassung

In der Retina ist der *Vascular Endothel Growth Faktor* (VEGF) ein entscheidender Botenstoff, welcher vom retinalen Pigmentepithel ausgeschüttet wird. VEGF führt zur Ausbildung von retinalen und choroidalen Neogefäßen, dient als Überlebensfaktor für Endothelzellen und sorgt physiologischerweise für ein Gleichgewicht der choroidalen Vaskularisation.

Bei vielen pathologischen Veränderungen im Auge, wie beispielsweise der feuchten Makuladegeneration, okulären Tumoren oder der Neugeborenenretinopathie, ist eine vermehrte choroidale Neovaskularisation als Ursache für den meist erheblichen Visusverlust beobachtet worden. Hierfür wird eine pathologische Induktion von VEGF verantwortlich gemacht. Eine solche Induktion kann über verschiedene Noxen erfolgen. Unter anderem konnte eine Hyperthermie als Noxe identifiziert werden.

Eine lokale Hyperthermie kann im Auge therapeutisch genutzt werden, zum Beispiel im Rahmen einer transpupillären Thermotherapie (TTT). In dieser Studie wurde der Einfluss von Hyperthermie auf das Zellüberleben und die VEGF Sekretion untersucht. Hierfür wurde die humane Zelllinie ARPE-19 mit verschiedenen Temperaturen (40°C, 42°C, 45°C und 50°C) bei unterschiedlichen Zeitintervallen stimuliert, um die zytotoxische Wirkung zu beobachten. Es zeigte sich ein signifikanter zeit- und temperaturabhängiger Zelltod. Im weiteren Verlauf wurde die VEGF-Konzentration bestimmt. Hier zeigte sich ein zeit- und temperaturabhängiger Anstieg der VEGF-Sekretion pro vitaler Zelle.

Die erhöhte VEGF-Sekretion bei Hitzestimulation wird zum größten Teil über die MAPK p38 vermittelt und zu einem geringen Teil über JNK. Ein Einfluss von ERK 1/2 konnte nicht gezeigt werden. TRPV-Kanäle hatten lediglich bei 40°C einen signifikanten Einfluss auf die Sekretion von VEGF.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Hyperthermie zeit- und temperaturabhängig eine VEGF-Sekretion im retinalen Pigmentepithel induziert, welche zum größten Teil über die MAPK p38 vermittelt wird. Hieraus ergeben sich Hinweise für mögliche Konsequenzen einer hyperthermen Behandlung der Retina.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahmado A, Carr AJ, Vugler AA, Semo M, Gias C, Lawrence JM, Chen LL, Chen FK, Turowski P, da Cruz L, Coffey PJ (2011): Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:7148–7159
- Alge CS, Hauck SM, Priglinger SG, Kampik A, Ueffing M (2006): Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res* 5:862–878
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E (1995): Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1: 1024–1028.
- Anastassiou G, Tschentscher F, Zeschnigk M (2002): [Prognostically relevant markers of malignant melanoma of the uvea]. *Ophthalmologe* 99: 327–332.
- Arslan MA, Kutuk O, Basaga H (2006): Protein kinases as drug targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 6: 623–634.
- Badiyan SN, Rao RC, Apicelli AJ, Acharya S, Verma V, Garsa AA, DeWees T, Speirs CK, Garcia-Ramirez J, Esthappan J, Grigsby PW, Harbour JW (2014): Outcomes of iodine-125 plaque brachytherapy for uveal melanoma with intraoperative ultrasonography and supplemental transpupillary thermotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 88: 801–805.
- Bai L, Zhu X, Ma T, Wang J, Wang F, Zhang S (2013) The p38 MAPK NF- $\kappa$ B pathway, not the ERK pathway, is involved in exogenous HIV-1 Tat-induced apoptotic cell death in retinal pigment epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 45:1794–1801
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt S-E & Julius D (2007): The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448: 204–208.
- Benhamou N, Cohen SY, Erginay A, Uzzan J, Brasseur G, Avni I & Gaudric A (2004): Macular burn after transpupillary thermotherapy for occult choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 137: 1132–1135.
- Benner JD, Ahuja RM & Butler JW (2002): Macular infarction after transpupillary thermotherapy for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 134: 765–768.

- Bergmann M, Holz F, Kopitz J (2011) Lysosomal stress and lipid peroxidation products induce VEGF-121 and VEGF-165 expression in ARPE-19 cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **249**:1477–1483
- Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, et al. (1999): Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* **155**: 421–428.
- Boltz A, Luksch A, Wimpissinger B, et al. (2010): Choroidal blood flow and progression of age-related macular degeneration in the fellow eye in patients with unilateral choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 4220–4225.
- Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, et al. (2003): Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* **17**: 1969–1978.
- Byeon SH, Lee SC, Choi SH, Lee H-K, Lee JH, Chu YK & Kwon OW (2010): 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* **51**: 1190–1197.
- Cai H, Del Priore LV (2006) Gene expression profile of cultured adult compared to immortalized human RPE. *Mol Vis* **12**:1–14
- Caldwell RB, Zhang W, Romero MJ & Caldwell RW (2010): Vascular dysfunction in retinopathy-an emerging role for arginase. *Brain Res Bull* **81**: 303–309.
- Caminal JM, Mejia-Castillo KA, Arias L, Catala J, Rubio M, Garcia P, Pujol O & Arruga J (2013): Subthreshold transpupillary thermotherapy in management of foveal subretinal fluid in small pigmented choroidal lesions. *Retina (Philadelphia, Pa)* **33**: 194–199.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD & Julius D (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816–824.
- Chen Y, Kijlstra A, Chen Y, Yang P (2011) IL-17A stimulates the production of inflammatory mediators via Erk1/2, p38 MAPK, PI3K/Akt, and NF- $\kappa$ B pathways in ARPE-19 cells. *Mol Vis* **17**: 3072–3077
- Clapham DE (2003): TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**: 517–524.
- Coassin M, Duncan KG, Bailey KR, Singh A & Schwartz DM (2010): Hypothermia reduces secretion of vascular endothelial growth factor by cultured retinal pigment epithelial cells. *Br J Ophthalmol* **94**: 1678–1683.

- Cobb MH et Goldsmith EJ (1995): How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**: 14843–14846.
- Coleman AL et Yu F (2008): Eye-related medicare costs for patients with age-related macular degeneration from 1995 to 1999. *Ophthalmology* **115**: 18–25.
- Cordeiro S, Seyler S, Stindl J, Milenkovic VM & Strauss O (2010): Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 6001–6008.
- Crews CM, Alessandrini A & Erikson RL (1992): Erks: their fifteen minutes has arrived. *Cell Growth Differ* **3**: 135–142.
- Currie ZI, Rennie IG & Talbot JF (2000): Retinal vascular changes associated with transpupillary thermotherapy for choroidal melanomas. *Retina (Philadelphia, Pa)* **20**: 620–626.
- Damato B (2010): Does ocular treatment of uveal melanoma influence survival? *Br J Cancer* **103**: 285–290.
- Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, Piek E, Saint-Geniez M & D'Amore PA (2003): Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol* **264**: 275–288.
- Davie JR et Spencer VA (2001): Signal transduction pathways and the modification of chromatin structure. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **65**: 299–340.
- Deng X, Xiao L, Lang W, Gao F, Ruvolo P & May WS (2001): Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase. *J Biol Chem* **276**: 23681–23688.
- Dewan A, Liu M, Hartman S, et al. (2006): HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* **314**: 989–992.
- Diener-West M, Hawkins BS, Markowitz JA & Schachat AP (1992): A review of mortality from choroidal melanoma. II. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988. *Arch Ophthalmol* **110**: 245–250.
- Ding X, Patel M & Chan C-C (2009): Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* **28**: 1–18.
- Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR & Hjelmeland LM (1996): ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* **62**: 155–169.
- el-Remessy AB, Bartoli M, Platt DH, Fulton D & Caldwell RB (2005): Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration. *J Cell Sci* **118**: 243–252.

Faby H, Hillenkamp J, Roeder J, Klettner A

Hyperthermia-induced upregulation of vascular endothelial growth factor in retinal pigment epithelial cells is regulated by mitogen-activated protein kinases. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 2014 Jul 22.

Ferrara N (2009): VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw* **20**: 158–163.

Ferrara N & Henzel WJ (2012): Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. 1989. *Biochem Biophys Res Commun* **425**: 540–547.

Finger PT, Lipka AC, Lipkowitz JL, Jofe M & McCormick SA (2000): Failure of transpupillary thermotherapy (TTT) for choroidal melanoma: two cases with histopathological correlation. *Br J Ophthalmol* **84**: 1075–1076.

Foltz IN et Schrader JW (1997): Activation of the stress-activated protein kinases by multiple hematopoietic growth factors with the exception of interleukin-4. *Blood* **89**: 3092–3096.

Ford KM, Saint-Geniez M, Walshe T, Zahr A, D'Amore PA (2011): Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:9478–9487

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD & Semenza GL (1996): Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**: 4604–4613.

Francis JH, Abramson DH, Brodie SE & Marr BP (2013): Indocyanine green enhanced transpupillary thermotherapy in combination with ophthalmic artery chemosurgery for retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* **97**: 164–168.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V & Ferrara N (1998): Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* **273**: 30336–30343.

Gong B, Asimakis GK, Chen Z, Albrecht TB, Boor PJ, Pappas TC, Bell B & Motamedi M (2006): Whole-body hyperthermia induces up-regulation of vascular endothelial growth factor accompanied by neovascularization in cardiac tissue. *Life Sci* **79**: 1781–1788.

Guma M, Rius J, Duong-Polk KX, Haddad GG, Lindsey JD & Karin M (2009): Genetic and pharmacological inhibition of JNK ameliorates hypoxia-induced retinopathy

- through interference with VEGF expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 8760–8765.
- Gündüz K, Kurt RA, Akmeşe HE, Köse K & Uçakhan-Gündüz O (2010): Ruthenium-106 plaque radiotherapy alone or in combination with transpupillary thermotherapy in the management of choroidal melanoma. *Jpn J Ophthalmol* **54**: 338–343.
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B & Davis RJ (1996): Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* **15**: 2760–2770.
- Haeusgen W, Boehm R, Zhao Y, Herdegen T & Waetzig V (2009): Specific activities of individual c-Jun N-terminal kinases in the brain. *Neuroscience* **161**: 951–959.
- Hartnett ME (2010): The effects of oxygen stresses on the development of features of severe retinopathy of prematurity: knowledge from the 50/10 OIR model. *Doc Ophthalmol* **120**: 25–39.
- Häussinger D, Schliess F, Dombrowski F & Vom Dahl S (1999): Involvement of p38MAPK in the regulation of proteolysis by liver cell hydration. *Gastroenterology* **116**: 921–935.
- Hensel H et Iggo A (1971): Analysis of cutaneous warm and cold fibres in primates. *Pflugers Arch* **329**: 1–8.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A & Karin M (1993): Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* **7**: 2135–2148.
- Holmes DIR et Zachary I (2005): The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol* **6**: 209.
- Hui L, Bakiri L, Stepniak E & Wagner EF (2007): p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* **6**: 2429–2433.
- Hungerford, J.L., *Surgical treatment of ocular melanoma*. *Melanoma Res*, 1993. **3**(5): p. 305-12.
- Ibarra MS, Hsu J, Mirza N, Wu I-H, Ying G, Mainster MA & Tolentino MJ (2004): Retinal temperature increase during transpupillary thermotherapy: effects of pigmentation, subretinal blood, and choroidal blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 3678–3682.
- Ip YT et Davis RJ (1998): Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 205–219.
- Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S & Han J (1996): Characterization of the

- structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* **271**: 17920–17926.
- Journée-de Korver JG, Oosterhuis JA, van Best JA & Fakkkel J (1991): Xenon arch photocoagulator used for transpupillary hyperthermia. *Doc Ophthalmol* **78**: 183–187.
- Kaminska B (2005): MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* **1754**: 253–262.
- Kannan R, Zhang N, Sreekumar PG, Spee CK, Rodriguez A, Barron E & Hinton DR (2006): Stimulation of apical and basolateral VEGF-A and VEGF-C secretion by oxidative stress in polarized retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis* **12**: 1649–1659.
- Keyse SM (1995): An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta* **1265**: 152–160.
- Kharbanda S, Saleem A, Shafman T, Emoto Y, Taneja N, Rubin E, Weichselbaum R, Woodgett J, Avruch J, Kyriakis J, et al. *J Biol Chem*. 1995 Aug 11;270(32):18871-4.
- Kilic U, Kilic E, Järve A, et al. (2006): Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *J Neurosci* **26**: 12439–12446.
- Kim I, Ryan AM, Rohan R, Amano S, Aguilar S, Miller JW & Adamis AP (1999): Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**: 2115–2121.
- Kinnunen K et Ylä-Herttuala S (2012): Vascular endothelial growth factors in retinal and choroidal neovascular diseases. *Ann Med* **44**: 1–17.
- Klettner A (n.d.). Physiological functions of VEGF in the retina and its possible implications of prolonged anti-VEGF therapy. In: Marecellus L. Parker (ed.) *Vascular Endothelial Growth Factor: Biology, Regulation and Clinical significance*. 117–136.
- Klettner A et Roider J (2009): Constitutive and oxidative-stress-induced expression of VEGF in the RPE are differently regulated by different Mitogen-activated protein kinases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **247**: 1487–1492.
- Klettner A et Roider J (2012): Mechanisms of Pathological VEGF Production in the Retina and Modification with VEGF-Antagonists. In: Stratton RD, Hauswirth WW & Gardner TW (eds.) *Studies on Retinal and Choroidal Disorders, Oxidative Stress*

- in Applied Basic Research and Clinical Practice. Humana Press 277–305.
- Klettner A, Westhues D, Lassen J, Bartsch S & Roider J (2013): Regulation of constitutive vascular endothelial growth factor secretion in retinal pigment epithelium/choroid organ cultures: p38, nuclear factor  $\kappa$ B, and the vascular endothelial growth factor receptor-2/phosphatidylinositol 3 kinase pathway. *Mol Vis* **19**: 281–291.
- Kokotas H, Grigoriadou M & Petersen MB (2011): Age-related macular degeneration: genetic and clinical findings. *Clin Chem Lab Med* **49**: 601–616.
- Kujala E, Mäkitie T & Kivelä T (2003): Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 4651–4659.
- Kunchithapautham K & Rohrer B (2011): Sublytic membrane-attack-complex (MAC) activation alters regulated rather than constitutive vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in retinal pigment epithelium monolayers. *J Biol Chem* **286**: 23717–23724.
- Kurihara T, Westenskow PD, Bravo S, Aguilar E & Friedlander M (2012): Targeted deletion of Vegfa in adult mice induces vision loss. *J Clin Invest* **122**: 4213–4217.
- Kyriakis JM et Avruch J (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**: 807–869.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, et al. (1994): A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**: 739–746.
- Lommatzsch, P.K., *Ophthalmologische Onkologie*. 1999, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 262-263.
- Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucala R & Adamis AP (1998): Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* **101**: 1219–1224.
- Madsen-Bouterse SA & Kowluru RA (2008): Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Rev Endocr Metab Disord* **9**: 315–327.
- Marneros AG, Fan J, Yokoyama Y, Gerber HP, Ferrara N, Crouch RK & Olsen BR (2005): Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. *Am J Pathol* **167**: 1451–1459.
- McKemy DD, Neuhausser WM & Julius D (2002): Identification of a cold receptor reveals

- a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**: 52–58.
- Mendelson KG, Contois LR, Tevosian SG, Davis RJ & Paulson KE (1996): Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12908–12913.
- Metelitsina TI, Grunwald JE, DuPont JC, Ying G-S, Brucker AJ & Dunaief JL (2008): Foveolar choroidal circulation and choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**: 358–363.
- Milanini J, Viñals F, Pouyssegur J & Pagès G (1998): p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem* **273**: 18165–18172.
- Milanini-Mongiati J, Pouyssegur J & Pagès G (2002): Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem* **277**: 20631–20639.
- Miller DW, Jousseaume AM & Holz FG (2003): [The molecular mechanisms of neovascular age-related macular degeneration]. *Ophthalmologie* **100**: 92–96.
- Missotten GSO, Notting IC, Schlingemann RO, Zijlmans HJ, Lau C, Eilers PHC, Keunen JEE & Jager MJ (2006): Vascular endothelial growth factor a in eyes with uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* **124**: 1428–1434.
- Mole DR, Maxwell PH, Pugh CW & Ratcliffe PJ (2001): Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life* **52**: 43–47.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, et al. (2002): A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* **9**: 229–231.
- Moon EJ, Sonveaux P, Porporato PE, et al. (2010): NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 20477–20482.
- Nagineeni CN, Kommineni VK, William A, Detrick B & Hooks JJ (2012): Regulation of VEGF expression in human retinal cells by cytokines: implications for the role of inflammation in age-related macular degeneration. *J Cell Physiol* **227**: 116–126.
- Nagineeni CN, Samuel W, Nagineni S, Pardhasaradhi K, Wiggert B, Detrick B & Hooks JJ (2003): Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement

- of mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol* **197**: 453–462.
- Newsom RS, McAlister JC, Saeed M & McHugh JD (2001): Transpupillary thermotherapy (TTT) for the treatment of choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* **85**: 173–178.
- Nickla DL et Wallman J (2010): The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res* **29**: 144–168.
- Nishikawa M, Myoui A, Tomita T, Takahi K, Nampei A & Yoshikawa H (2007): [p38 MAP Kinase inhibitor]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **30**: 390–397.
- Nowak M, Gnitecki W & Jurowski P (2005): [The role of retinal oxygen metabolism in origin of age-related macular degeneration (AMD)]. *Klin Oczna* **107**: 715–718.
- Nowak MS, Jurowski P, Grzybowski A, Goś R, Pastuszka M, Kapica A & Śmigielski J (2012): 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. *Med Sci Monit* **18**: CR374–380.
- Odergren A, Algvere PV, Seregard S & Kvanta A (2008): A prospective randomised study on low-dose transpupillary thermotherapy versus photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* **92**: 757–761.
- Oosterhuis JA, Journée-de Korver HG, Kakebeeke-Kemme HM & Bleeker JC (1995): Transpupillary thermotherapy in choroidal melanomas. *Arch Ophthalmol* **113**: 315–321.
- Oosterhuis JA, Journée-de Korver HG & Keunen JE (1998): Transpupillary thermotherapy: results in 50 patients with choroidal melanoma. *Arch Ophthalmol* **116**: 157–162.
- Pagès G (2007): Sp3-mediated VEGF regulation is dependent on phosphorylation by extra-cellular signals regulated kinases (Erk). *J Cell Physiol* **213**: 454–463.
- Pagès G, Berra E, Milanini J, Levy AP & Pouyssegur J (2000): Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability. *J Biol Chem* **275**: 26484–26491.
- Pagès G & Pouyssegur J (2005): Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc Res* **65**: 564–573.
- Parrozzani R, Boccassini B, De Belvis V, Radin PR, Midena E (2009)  
Long term outcome of transpupillary thermotherapy as primary treatment of selected choroidal melanoma. *Acta Ophthalmol* **87**:789–792

- Park JM, Greten FR, Li Z-W & Karin M (2002): Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science* **297**: 2048–2051.
- Parver LM, Auker C & Carpenter DO (1980): Choroidal blood flow as a heat dissipating mechanism in the macula. *Am J Ophthalmol* **89**: 641–646.
- Patapoutian A, Peier AM, Story GM & Viswanath V (2003): ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* **4**: 529–539.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, et al. (2002): A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**: 705–715.
- Poulaki V, Jousseaume AM, Mitsiades N, Mitsiades CS, Iliaki EF & Adamis AP (2004): Insulin-like growth factor-I plays a pathogenetic role in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* **165**: 457–469.
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ & Davis RJ (1995): Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* **270**: 7420–7426.
- R&D Systems, ELISA Reference Guide & Catalog, Minneapolis, USA, 2012
- Reichel E, Berrocal AM, Ip M, Kroll AJ, Desai V, Duker JS & Puliafito CA (1999): Transpupillary thermotherapy of occult subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **106**: 1908–1914.
- Richard DE, Berra E, Gothié E, Roux D & Pouyssegur J (1999): p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* **274**: 32631–32637.
- Robinson MJ et Cobb MH (1997): Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 180–186.
- Saint-Geniez M, Kurihara T, Sekiyama E, Maldonado AE & D'Amore PA (2009): An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 18751–18756.
- Saint-Geniez M, Maharaj ASR, Walshe TE, et al. (2008): Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on müller cells and photoreceptors. *PLoS ONE* **3**: e3554.
- Sawaji Y, Sato T, Takeuchi A, Hirata M & Ito A (2002): Anti-angiogenic action of hyperthermia by suppressing gene expression and production of tumour-derived

- vascular endothelial growth factor in vivo and in vitro. *Br J Cancer* **86**: 1597–1603.
- Schaeffer HJ et Weber MJ (1999): Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**: 2435–2444.
- Scherf G (1997): *Wörterbuch Biologie*, München: Deutscher Taschenbuchverlag
- Schlingemann RO (2004): Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **242**(1):91-10.
- Schöpfer K, Stoffelns B (2010): Development of choroidal neovascularisation following transpupillary thermotherapy (TTT) for a small malignant melanoma of the choroid at the posterior pole – a case report. *Med Laser Appl* **25**:223–228
- Schofield CJ et Ratcliffe PJ (2004): Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 343–354.
- Scholl S, Kirchhof J et Augustin AJ (2010): Pathophysiology of macular edema. *Ophthalmologica* **224 Suppl 1**: 8–15.
- Schuler, A.O. et N. Bornfeld, [*Current therapy aspects of intraocular tumors*]. *Ophthalmologie*, 2000. **97**(3): p. 207-22.; Lommatzsch, P.K., *Ophthalmologische Onkologie*. 1999, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 278-280.
- Schumacher GH (1991): *Anatomie: Lehrbuch und Atlas*. 1. Kopf,orofaziales System,Auge,Ohr, Leitungsbahnen 2. Auflage, J.A. Barth, Leipzig
- Shah PK, Narendran V & Kalpana N (2011): Large spot transpupillary thermotherapy: a quicker laser for treatment of high risk prethreshold retinopathy of prematurity - a randomized study. *Indian J Ophthalmol* **59**: 155–158.
- Shapiro L & Dinarello CA (1995): Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 12230–12234.
- Sharma T, Krishnan T, Gopal L, Nagpal A, Khetan V & Rishi P (2011): Transpupillary thermotherapy for circumscribed choroidal hemangioma: clinical profile and treatment outcome. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* **42**: 360–368.
- Shields CL, Shields JA, Milite J, De Potter P, Sabbagh R & Menduke H (1991): Uveal melanoma in teenagers and children. A report of 40 cases. *Ophthalmology* **98**: 1662–1666.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D et Keshet E (1992): Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**: 843–845.

- Singh AD, Shields CL, Shields JA & De Potter P (1996): Bilateral primary uveal melanoma. Bad luck or bad genes? *Ophthalmology* **103**: 256–262.
- Söderberg A-C, Algvere PV, Hengstler JC, Söderberg P, Seregard S & Kvanta A (2012): Combination therapy with low-dose transpupillary thermotherapy and intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: a 24-month prospective randomised clinical study. *Br J Ophthalmol* **96**: 714–718.
- Spilsbury K, Garrett KL, Shen WY, Constable IJ & Rakoczy PE (2000): Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am J Pathol* **157**: 135–144.
- Sreekumar PG, Kannan R, de Silva AT, Burton R, Ryan SJ & Hinton DR (2006): Thiol regulation of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **346**: 1200–1206.
- Stallard, H.B., *Radiotherapy for malignant melanoma of the choroid*.  
*Br J Ophthalmol*, 1966. **50**(3): p. 147-55
- Stoffelns BM (2006): [Tumor regression and visual outcome after transpupillary thermotherapy (TTT) for malignant choroidal melanoma]. *Klin Monbl Augenheilkd* **223**: 74–80.
- Strauss O (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* **85**: 845–881.
- Suzuki M, Watanabe Y, Oyama Y, Mizuno A, Kusano E, Hirao A & Ookawara S (2003): Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin. *Neurosci Lett* **353**: 189–192.
- Tian J, Ishibashi K, Honda S, Boylan SA, Hjelmeland LM, Handa JT (2005): The expression of native and cultured human retinal pigment epithelial cells grown in different culture conditions. *Br J Ophthalmol* **89**: 1510–1517
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC & Abraham JA (1991): The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* **266**: 11947–11954.
- Tolentino MJ (2009): Current molecular understanding and future treatment strategies for pathologic ocular neovascularization. *Curr Mol Med* **9**: 973–981.
- Tominaga M et Caterina MJ (2004): Thermosensation and pain. *J Neurobiol* **61**: 3–12.
- Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J & Van Obberghen E (2001): Regulation of

- vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation end products. *J Biol Chem* **276**: 43836–43841.
- Vay L, Gu C & McNaughton PA (2012): The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* **165**: 787–801.
- Vriens J, Owsianik G, Voets T, Droogmans G & Nilius B (2004): Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels. *Pflugers Arch* **449**: 213–226.
- Waetzig V & Herdegen T (2005): Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* **26**: 455–461.
- Waetzig V, Zhao Y Herdegen T (2006): The bright side of JNKs-Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog Neurobiol* **80**: 84–97.
- Wang GL & Semenza GL (1995): Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **270**: 1230–1237.
- Watanabe K, Zhang XY, Kitagawa K, Yunoki T, Hayashi A (2009): The effect of clonidine on VEGF expression in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **247**:207–213
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB et Johnson GL (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143–180.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ et Greenberg ME (1995): Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**: 1326–1331.
- Yamazaki Y et Morita T (2006): Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers* **10**: 515–527.
- Yang H, Jager MJ et Grossniklaus HE (2010): Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 2835–2842.
- Yarovoy AA, Magaramov DA & Bulgakova ES (2012): The comparison of ruthenium brachytherapy and simultaneous transpupillary thermotherapy of choroidal melanoma with brachytherapy alone. *Brachytherapy* **11**: 224–229.
- Yin L, Wu X, Gong Y, Shi Y, Qiu Y, Zhang H, Liu X & Gu Q (2011): OX-LDL up-regulates the vascular endothelial growth factor-to-pigment epithelium-derived factor ratio in human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* **36**: 379–385.
- Zarbin MA (1998) *Age related macular degeneration: review of pathogenesis. Eur J Ophthalmol. Oct-Dec; 8(4):199-206. Review.*

- Zeng F, Zhang M, Xu Y, Xu H (2013) ARMS2 interference leads to decrease of proinflammatory mediators. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 251:2539–2544
- Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS & Ryba NJP (2003): Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **112**: 293–301.
- Ziemssen F, Bartz-Schmidt KU & Grisanti S (2006): [(Side) effects of VEGF inhibition]. *Ophthalmologie* **103**: 484–492.
- Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O & Heppenstall PA (2007): Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca<sup>2+</sup>. *Nat Neurosci* **10**: 277–279.

## 7 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Johann Roider, Direktor der Klinik für Ophthalmologie, für die stetige Unterstützung und die konstruktiven Ratschläge, sowohl bei der Ausarbeitung der Daten, bei der Vorbereitung der gehaltenen Vorträge, sowie bei der Korrektur dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Alexa Klettner für die Überlassung dieses spannenden Themas, für die erstklassige, ehrliche und sehr engagierte wissenschaftliche Betreuung. Ich danke ihr dafür, dass sie mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand, dass ich durch sie die Begeisterung für die Forschung entdecken konnte und zu guter Letzt danke ich ihr für die schöne und spannende Zeit bei ihr im Labor.

Herrn Dr. Stefan Koinzer möchte ich meinen Dank aussprechen für die Hilfsbereitschaft bei allen aufgetretenen Problemen. Ich bin froh über jeden Ratschlag, den ich von ihm bekommen habe.

Weiterhin möchte ich mich bei M. Sc. Elisabeth Richert, Serap Luick, Monika Marquardt und Alexandra Pfaff für ihre geduldige Einarbeitung, ihre Tipps im Umgang mit der Zellkultur und ihrer gutmütigen Unterstützung in allen Bereichen des Laboralltages bedanken. Ich denke, ohne ihre Hilfe wäre der Weg weitaus steiniger geworden.

Bei meinem Freund Jens Lassen möchte ich mich bedanken für die tolle Zeit, die wir sowohl während des gesamten Studiums als auch im Labor hatten. Sein fröhliches Gemüt, sowie seine Gabe komplexe Inhalte ganz einfach darzustellen, haben mir das Studium und das Doktorandenleben extrem erleichtert. Die gemeinsamen Kaffeepausen in der Baristarie unseres Vertrauens werde ich vermissen. Ich hoffe, dass uns diese Zeit lange in positiver Erinnerung bleibt.

Meinen Freunden danke ich für das Verständnis und das Vertrauen, das sie mir während der letzten Jahre entgegen gebracht haben.

Von Herzen danke ich meiner Familie. Ihnen möchte ich diese Doktorarbeit widmen. Meinen Eltern Heike und Hans Heinrich danke ich dafür, dass sie stets an mich geglaubt und mich in allen Lebenslagen immer unterstützt haben. Ohne sie hätte ich das alles nicht geschafft. Meinen Großeltern danke ich für all die Herzlichkeit und Fürsorge, die

ich von ihnen bekomme und meinen Brüdern für die Verbundenheit und das Glück sie haben zu dürfen.

Zum Abschluss möchte ich meiner Frau Sarah von Herzen danke sagen, weil sie mich bei einem weiteren wichtigen Abschnitt meines Lebens begleitet und mich bei all meinen Vorhaben mit viel Geduld und Toleranz unterstützt hat. Ich freue mich auf die weiteren Aufgaben, die wir gemeinsam meistern können.

# 8 Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Hendrik Faby

Hauptstrasse 9b

24589 Borgdorf-Seedorf

eMail: hendrikfaby@gmx.de

geboren am 29.05.1982 in Bad Segeberg

## Schulbildung

1988-1992

Grundschule Hollern-Twielenfleth

1992-1994

Orientierungsstufe Grünendeich

1992-2001

Athenaeum Stade

Gymnasium des Landkreises Stade

2001                      Abitur

## Hochschulstudium

2006-2012

Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2008                      erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2012                      zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

24.10.2012              Approbation als Arzt

## berufliche Tätigkeit

2001-2003              Ausbildung zum Rettungsassistenten

2003-2012              Rettungsassistent im Kreis Rendsburg-Eckernförde

seit 02.2013            Assistenzarzt am Klinikum Itzehoe

## 9 Preise und Veröffentlichungen

### Preise

2012

#### Vortragspreis

**Faby H**, Hillenkamp J, Roider J, Klettner A  
Temperaturabhängiger Anstieg der VEGF-Ausschüttung im  
retinalen Pigmentepithel – mögliche Folgen der  
transpupillären Thermotherapie bei uvealem Melanom  
61. Tagung der Vereinigung Norddeutscher Augenärzte, 8.-9.  
Juni, Hamburg

### Veröffentlichungen

2014

**Faby H**, Hillenkamp J, Roider J, Klettner A  
Hyperthermia-induced upregulation of vascular  
endothelial growth factor in retinal pigment  
epithelial cells is regulated by mitogen-  
activated protein kinases. Grafes Arch.  
Clin.Exp.Ophthalmol. 2014 Jul 22.

2012

European Association for Vision and Eye Research (EVER),  
10.-13. October, Nizza, Frankreich  
Klettner A, **Faby H**, Hillenkamp J, Roider J. Temperature-  
dependent vascular endothelial growth factor (VEGF)  
induction in human retinal pigment epithelium --  
implications for transpupillary thermotherapy in  
melanoma. Acta Ophthalmol 2012, 90: s249

2012

#### Poster

Klettner A, **Faby H**, Hillenkamp J, Roider J  
Temperaturabhängiger Anstieg der VEGF-Ausschüttung im  
retinalen Pigmentepithel – mögliche Folgen der  
transpupillären Thermotherapie bei uvealem Melanom  
110. DOG Kongress 20.9.-23.9. 2012, Berlin

## 10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den.....

.....

(Hendrik Faby)