

Entwicklung eines Systems zur Kontrolle des „Vascular
Endothelial Growth Factor“ Spiegels im Auge

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Wimmer, Tobias
aus Pfarrkirchen

Gießen 2018

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
unter der Leitung von Prof. Dr. med. Birgit Lorenz,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger
2. Gutachter: PD Dr. Elena Neumann

Tag der Disputation: 29.11.2018

gewidmet

meinen Eltern

Angelika und Rudolf Wimmer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das menschliche Auge.....	1
1.1.1	Aufbau des Auges.....	1
1.1.2	Das Gefäßsystem des Auges.....	2
1.1.3	Neovaskuläre Erkrankungen des Auges.....	2
1.1.4	Therapie von VEGF induzierten, neovaskulären Erkrankungen des Auges.....	4
1.2	VEGF und VEGF Rezeptoren.....	6
1.2.1	„Vascular Endothelial Growth Factor“-VEGF.....	6
1.2.2	VEGF-Rezeptoren und deren Liganden.....	8
1.3	Das TetOn System zur regulierbaren Expression von Transgenen.....	11
1.4	Antikörper und deren Fragmente.....	12
1.5	Retinale Gentherapie.....	14
1.5.1	Retinaler Gentransfer.....	15
1.6	Resonanz Energie Transfer.....	17
1.6.1	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET).....	18
1.6.2	Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET).....	18
1.7	Zielsetzung.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material.....	23
2.1.1	Geräte.....	23
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3	Chemikalien.....	24
2.1.4	Software.....	25
2.1.5	Enzyme und Antikörper.....	26
2.1.5.1	Enzyme.....	26
2.1.5.2	Antikörper.....	26
2.1.6	Plasmide.....	27
2.1.7	AAV Produktion.....	27
2.1.8	DNA- und Protein-Größenstandards.....	27
2.1.9	Kit Systeme.....	27
2.1.10	Antibiotika in Bakterienkulturen.....	28
2.1.11	Organismen.....	28
2.1.12	Oligonukleotide.....	29
2.1.13	Kulturmedien.....	30
2.1.14	Puffer und Lösungen.....	31
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Klonierungen.....	35
2.2.2	Arbeiten mit DNA.....	36

2.2.2.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.2.2	Restriktionsverdau.....	37
2.2.2.3	Dephosphorylierung von DNA Fragmenten	38
2.2.2.4	Ligation von DNA Molekülen	38
2.2.2.5	Sequenzierung von Plasmidklonen	39
2.2.2.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	39
2.2.2.7	Agarosegelelektrophorese	39
2.2.2.8	DNA Extraktion aus Agarosegelen	40
2.2.3	Arbeiten mit Zellen	40
2.2.3.1	Arbeiten mit Bakterien.....	40
2.2.3.1.1	Isolation von Plasmid DNA	41
2.2.3.2	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	42
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen	45
2.2.4.1	Präparation von Gesamtproteinextrakten	45
2.2.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	45
2.2.4.3	Western-Blot	46
2.2.4.4	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) Systeme	46
2.2.4.5	VEGF-Binde Assay.....	47
2.2.4.6	Luziferase Assay	47
2.2.4.7	Spektrale Analyse des BRET	48
2.2.4.8	BRET Assay.....	48
2.2.4.9	Kinetik der BRET Ratio.....	48
2.2.4.10	VEGF induzierte BRET Änderung	49
2.2.5	Statistische Auswertung	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Herstellung der Anti-VEGF Vektorkonstrukte	50
3.1.1	Herstellung des Anti-VEGF Fab Fragmentes Ra01	50
3.1.2	Herstellung der Anti-VEGF scFab Ra02–Ra05	52
3.2	Charakterisierung der Anti-VEGF Moleküle.....	53
3.2.1	Vergleich der biologischen Aktivität der Anti-VEGF Moleküle Ra01–Ra05	53
3.2.2	Dosisabhängiger Vergleich der biologischen Aktivität der Anti-VEGF Moleküle Ra01 und Ra02	55
3.2.3	VEGF Bindeeigenschaften der Ani-VEGF Moleküle Ra01 und Ra02	56
3.2.4	Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d sowie der maximalen Bindekapazität B_{max}	57
3.3	Herstellung und Funktionalität der regulierbaren SSV9-TetOn-Ra01/Ra02 Vektor Konstrukte	57
3.3.1	Herstellung und Funktionalität des AAV2/5-TetOn-Ra02 Konstruktes	59
3.4	Herstellung und Charakterisierung der BRET Biosensor Varianten.....	61
3.4.1	Klonierung der BRET Biosensor Varianten.....	61

3.4.2	Expression der BRET Biosensorvarianten.....	62
3.4.2.1	Expressionskontrolle der fusionierten Renilla Luziferase.....	62
3.4.2.2	Expressionskontrolle des fusionierten GFP2	63
3.4.2.3	Kontrolle der Volllängenexpression der BRET2 Biosensor Varianten, des Korrekturfaktors und der Maximum Kontrolle	64
3.4.3	Charakterisierung des BRET der BRET Biosensorvarianten.....	65
3.4.3.1	Spektrale Analyse der BRET Biosensorvarianten.....	65
3.4.3.2	Quantifizierung der BRET Ratio der BRET Biosensorvarianten.....	66
3.4.3.3	Kinetik der BRET Ratio der Biosensorvarianten	68
3.4.3.4	Konzentrationsabhängigkeit der BRET Ratio	68
3.4.4	VEGF induzierte Änderung der BRET Ratio der Biosensoren.....	69
4	Diskussion	71
4.1	Das Anti-VEGF Expressionssystem	71
4.2	Herstellung der auf BRET basierten VEGF Biosensoren	75
5	Zusammenfassung.....	80
6	Summary	81
7	Abkürzungsverzeichnis.....	82
8	Abbildungsverzeichnis	84
9	Tabellenverzeichnis.....	85
10	Literaturverzeichnis.....	86
	Publikationsverzeichnis	102
	Erklärung zur Dissertation.....	103

1 Einleitung

1.1 Das menschliche Auge

1.1.1 Aufbau des Auges

Das menschliche Auge besteht im Wesentlichen aus drei verschiedenen Schichten mit unterschiedlicher Funktion. Die undurchsichtige Lederhaut (Sklera) bildet zusammen mit der durchsichtigen Hornhaut (Cornea) die Hülle des Auges (siehe Abbildung 1). Verantwortlich für die Versorgung des Auges, z.B. mit Sauerstoff, ist die Aderhaut (Choroidia), die zusammen mit der Regenbogenhaut (Iris) und dem Ziliarkörper die Gefäßhaut bildet (siehe Abbildung 1). Die Sauerstoffversorgung des Auges wird dabei durch das retinale und choroidale Gefäßbett sichergestellt. Die Netzhaut (Retina), bestehend aus der Fotorezeptorschicht (Pars nervosa) und dem retinalen Pigmentepithel (RPE, Pars Pigmentosa), bildet den sensorischen Teil des Auges. Entwicklungsgeschichtlich und funktionell bildet die Netzhaut, als ein Teil des Diencephalons, einen vorgeschobenen Gehirnteil. Das 1. Neuron besteht aus den Fotorezeptoren (Stäbchen und Zapfen), wobei peripher Stäbchen sowie Zapfen zu finden sind, im Zentrum der Netzhaut (Fovea mit Makula lutea) ausschließlich Zapfen. Das 2. Neuron bilden die bipolaren Zellen, die zusammen mit den Horizontalzellen und den amakrinen Zellen die innere Körnerschicht bilden. Die Signale des 2. Neuron werden an die Ganglienzellschicht (3. Neuron) weitergegeben, deren Axone das Auge über den Sehnerv verlassen. Die Signale werden dann weiter über den optischen Nerv (Nervus opticus) in den visuellen Kortex des Gehirns geleitet (4. Neuron) [1].

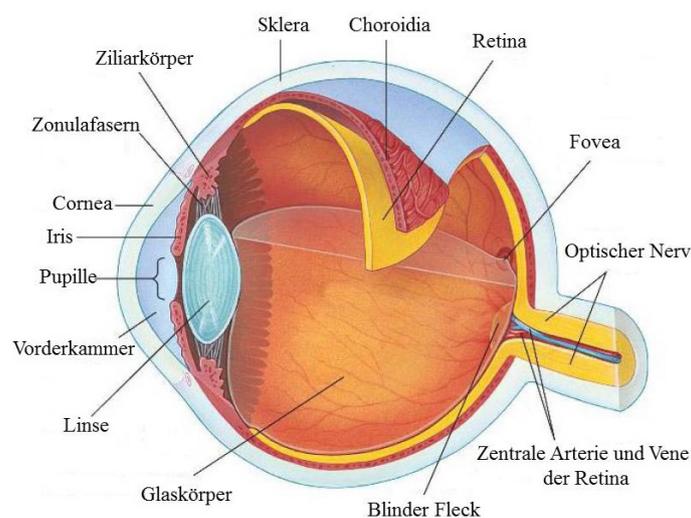


Abbildung 1: Anatomie des menschlichen Auges (verändert nach [2]).

1.1.2 Das Gefäßsystem des Auges

Wie bereits im Kapitel Aufbau des Auges angesprochen, besteht das Gefäßsystem des Auges aus zwei Gefäßbetten, dem retinalen Gefäßbett, das die inneren retinalen Schichten versorgt, und dem choroidalen Gefäßbett, das die äußeren Schichten mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Das retinale Gefäßbett besteht zudem aus drei verschiedenen Schichtungen, der oberen, der mittleren und der tiefen Schicht. Während der embryonalen Entwicklung werden die Linse und der Glaskörper des Auges durch die Hyaloidarterie versorgt, die jedoch bereits kurz vor Geburt wieder zurückgebildet und durch retinale Gefäße ersetzt wird. Das neue Gefäßsystem breitet sich dann in der Nervenfaserschicht der Retina aus. Die äußere Retina bleibt avaskulär, da Blutgefäße das die Retina durchdringende Licht absorbieren und Schatten hervorrufen würden. Das choroidale Gefäßbett, anatomisch hinter dem RPE und der Bruch'schen Membran, in der Choriokapillaris angeordnet, versorgt die innere Retina, d.h. die Fotorezeptoren und das RPE [3]. Störungen der physiologischen Prozesse im Auge können zu Erkrankungen, ausgelöst durch pathologische Gefäßneubildung (Neovaskularisation, NV), führen [3].

1.1.3 Neovaskuläre Erkrankungen des Auges

Durch die doppelt angelegte Blutversorgung des Auges können zwei unterschiedliche Arten der Neovaskularisation (choroidale und retinale Neovaskularisation) und deren typische Krankheitsbilder unterschieden werden [4].

Bei der retinalen Neovaskularisation (RNV) wachsen neue Blutgefäße zuerst innerhalb der Retina, später in den Glaskörper (Vitreus), ausgehend vom retinalen Gefäßbett. Ausgelöst wird das Wachstum durch ischämische Bedingungen innerhalb der Retina [5]. Diese neu gebildeten Gefäße sind allerdings, im Vergleich zu normalen retinalen Gefäßen, bedingt durch das Fehlen der „tight junctions“ des Blutgefäßendothels undicht und es kommt zum Flüssigkeitsaustritt in die inneren retinalen Schichten und den Glaskörper. Das austretende Plasma kann dann zu einer Degeneration des Glaskörpers führen [3]. Zusätzlich kann das Einwachsen neuer Blutgefäße zu einem Schrumpfen des Glaskörpers und in Kombination mit einer Dehnung der Blutgefäße zu retinalen Blutungen und Netzhautablösungen führen [6,7].

Erkrankungen, wie etwa die Diabetische Retinopathie (DR), die Frühgeborenenretinopathie (ROP) oder der retinale Venenverschluß (RVV), die als Ursache eine Bildung von neuen

Blutgefäßen ausgehend vom retinalen Gefäßbett haben, beruhen alle auf retinalen Ischämien, d.h. auf Durchblutungsstörungen bzw. ganzen Blutgefäßverschlüssen.

Die Diabetische Retinopathie, eine schwere Komplikation bei Diabetes, ist die häufigste, erworbene Ursache für Blindheit bei jungen Erwachsenen. Im frühen Stadium werden die Blutgefäße durch mikrovaskuläre Veränderungen geschädigt und somit der Blutfluss vermindert, wodurch hypoxische Zustände in der Retina auftreten. Diese lokalen hypoxischen Bedingungen führen zur vermehrten Ausschüttung von pro-angiogenen Wachstumsfaktoren, wie etwa dem „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF). In der proliferativen Phase der DR kommt es dann, ausgelöst durch das VEGF, zu Neovaskularisationen ausgehend vom retinalen Bett in den Glaskörper [8,9].

Auch bei der Frühgeborenenretinopathie führt eine Sauerstoffunterversorgung zu einer Stimulation des Blutgefäßwachstums. Die Ausbildung des retinalen Gefäßbetts findet um die 36. Schwangerschaftswoche ihren Abschluss. Kommt es vor dem Abschluss der retinalen Gefäßbildung zu einer Frühgeburt, verursacht eine Hyperoxie im Brutkasten bei 55-80 mmHg PO₂ zuerst eine vasooblitative Phase, wodurch das Gewebe mit Sauerstoff überversorgt ist und es zu einem Stopp oder einer Hemmung des Gefäßwachstums kommt. Wird das zu früh Geborene wieder der normalen Raumluft bei ca. 35 mmHg PO₂ ausgesetzt, kommt es, im Vergleich zum Brutkasten, zu einer relativen Hypoxie [10]. Der relativen Hypoxie und somit einer relativen Sauerstoffunterversorgung wird auch hier mit einer Erhöhung der VEGF Expression entgegengewirkt. Die vermehrte Ausschüttung von VEGF in der vasoproliferativen Phase bewirkt dann ein erhöhtes Wachstum neuer Blutgefäße in die avaskulären Bereiche der Retina [11].

Der retinale Venenverschluss ist nach der Diabetischen Retinopathie die zweit häufigste Erkrankung retinaler Gefäße im Auge [12]. Durch eine Venenthrombose kommt es auch hier zu einer lokalen Sauerstoffunterversorgung, der auch mit einer Erhöhung der VEGF Expression entgegengewirkt wird [13].

Die choroidale Neovaskularisation (CNV) bezeichnet die Bildung von neuen Blutgefäßen ausgehend von choroidalen Gefäßen des Auges. Sie entsteht durch einen Bruch oder einen Defekt der Bruch'schen Membran, ausgelöst durch degenerative Prozesse oder entzündliche Reaktionen [14,15]. Dadurch können Blutgefäßendothelzellen, Perizyten und Entzündungszellen in den subretinalen Raum eindringen. Die Entwicklung der CNV erfolgt in drei Schritten, der Entzündung, dem Blutgefäßwachstums und der Proteolyse [16]. Die einzelnen Phasen der CNV (Aktivierung, Erhaltung, Entwicklung) sind abhängig von dem

Zusammenspiel der einzelnen entzündlichen, angiogenen und proteolytischen Faktoren. Auch hier spielt VEGF als Initiator der Bildung von Blutgefäßen eine Hauptrolle [17,18].

Die altersabhängige Makula Degeneration (AMD), als choroidale Gefäßerkrankung, ist die Hauptursache für Erblindung in den westlichen Industrienationen [19]. Es werden zwei Formen der AMD unterschieden, die trockene und die feuchte/exsudative bzw. neovaskuläre Form. Die trockene Form, charakterisiert durch Defekte im RPE, Drusen und einer geographischen Atrophie steht zu Beginn der Erkrankung [20]. Aus der trockenen Form kann sich die feuchte Form entwickeln, bei der choroidale Neovaskularisationen im Bereich der Makula auftreten, sowie Hämorrhagien und seröse Abhebungen der Neuroretina. Diese feuchte Form verursacht die meisten Fälle von schwerem Visusverlust. Die Patienten haben zentrale Gesichtsfeldausfälle, Verzehrtsehen, ein reduziertes Kontrastsehen und Probleme bei der Farbwahrnehmung, da sich die Erkrankung meist im Bereich der Makula manifestiert, dem Ort des schärfsten Sehens und des Farbsehens. Eine Schädigung der Bruch'schen Membran führt zu einem verstärkten Einwachsen von Gefäßen an der rupturierten Stelle aus der Choroidia in die Retina. Die CNV als häufigstes Problem der feuchten AMD entsteht durch eine Änderung des Wachstumsfaktorgleichgewichts (z.B.: VEGF, PEDF (Pigment epithelium-derived factor)) im Auge, das die normale Gefäßbildung der Choroidea und der Retina steuert [21].

1.1.4 Therapie von VEGF induzierten, neovaskulären Erkrankungen des Auges

Aufgrund der neuen Erkenntnisse über die Wirkung von VEGF bei neovaskulären Erkrankungen des Auges wurden in den letzten Jahren Therapien entwickelt, die die Blockade der VEGF Aktivität zum Ziel haben [22,23]. Verschiedene sogenannte Anti-VEGF Moleküle wurden entwickelt, die die Translation von VEGF unterbinden oder das VEGF vor dem Andocken an den Rezeptor binden und somit blockieren (siehe Abbildung 2). Als wirksame Anti-VEGF Moleküle wurde das RNA-Aptamer Pegaptanib (Macugen[®]) (A), sowie der monoklonale Anti-VEGF Antikörper Bevacizumab (Avastin[®]) (B), das optimierte Fab Fragment des Anti-VEGF Antikörpers Bevacizumab, Ranibizumab (Lucentis[®]) (C) und das Fusionsprotein Aflibercept (Eyelea[®]) (D) entwickelt [24–27]. Die Wirksamkeit, sowie die langfristige, antiproliferative Wirkung und mögliche Nebenwirkungen, wurden an mehreren tausend Patienten in verschiedenen klinischen Studien wie z.B. MARINA, ANCHOR, HORIZON, PIER, SAILOR, PRONTO und SUSTAIN evaluiert [27–33].

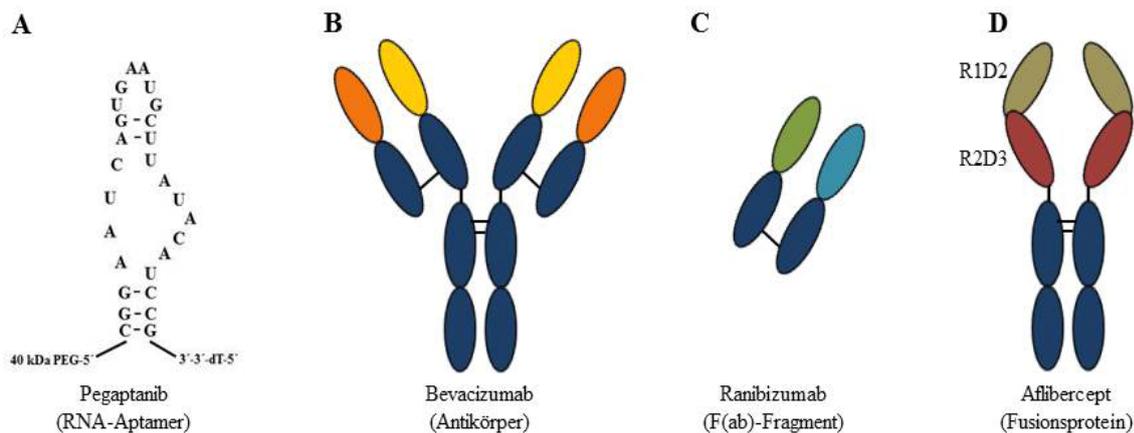
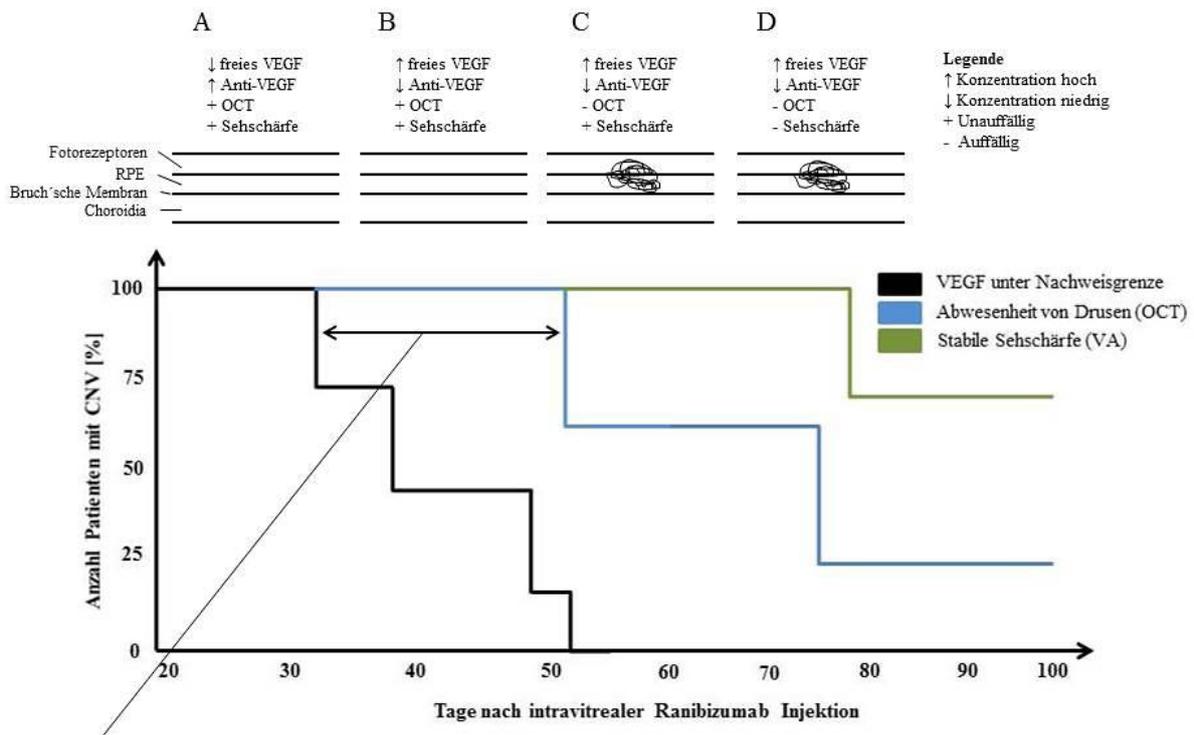


Abbildung 2: Anti-VEGF Moleküle. (A) Das RNA-Aptamer Pegaptanib (Macugen[®]), (B) Bevacizumab (Avastin[®]) als Anti-VEGF Antikörper, (C) Anti-VEGF Fab Fragment Ranibizumab (Lucentis[®]) und das Anti-VEGF Fusionsprotein Aflibercept (Eylea[®]), bestehend aus dem konstanten Fragment eines IgG-Antikörpers und der Domäne 2 des VEGF Rezeptors 1(R1D2) und der Domäne 3 des VEGF Rezeptors 2 (R2D3).

Der entscheidende Nachteil der Therapie ist die Tatsache, dass das Medikament mehrmals hintereinander intraokular appliziert werden muss, da die Halbwertszeit und damit die Anti-VEGF Aktivität im Auge relativ kurz ist (z.B. Ranibizumab 3,2 Tage). Im Rahmen der SUSTAIN Studie wurden als häufigste Nebenwirkungen durch intraokuläre Injektionen eine vorübergehend reduzierte Sehschärfe, retinale Blutungen und ein erhöhter intraokulärer Druck beschrieben [34]. Zu den schweren Nebeneffekten zählten retinale und vitreale Hämorrhagien und vorübergehende Katarakte. Zudem sind diese mehrmaligen intraokularen Injektionen mit großem Stress für die oft älteren Patienten verbunden, wodurch sich das Risiko für das Eintreten von nichtokulären Komplikationen stark erhöht [34].

Die Kontrolle des Therapieerfolges bei Anti-VEGF Therapien erfolgt durch die Sehschärfe sowie die Aufnahme der Dicken der einzelnen Schichten des hinteren Augenabschnittes mit Hilfe der Optischen Kohärenz Tomographie (OCT) (siehe Abbildung 3). Der wichtigste diagnostische Parameter ist die An- oder Abwesenheit von Flüssigkeitsansammlungen im Bereich des RPE und der Netzhaut. Bei nicht ausreichender VEGF Inhibition kommt es zur Bildung dieser Ansammlungen. Es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in den diagnostischen Parametern erst zeitverzögert auftreten und eine diagnostische Lücke entsteht (C und D), nachdem die Inhibition von VEGF durch Anti-VEGF Moleküle bereits vollständig abgenommen hat (B). Weitere Probleme bestehen darin, dass die initiale VEGF Konzentration

im Auge, von Patient zu Patient teils stark variiert und die einzelnen Patienten unterschiedlich auf die Anti-VEGF Therapie ansprechen [35].



Diagnostische Lücke

Abbildung 3: Diagnostische Lücke bei der Behandlung neovaskulärer Erkrankungen. Trockenes OCT (blau) und die Sehschärfe (grün) treten zeitverzögert auf nachdem die VEGF Inhibition (schwarz) bereits abgenommen hat. (A) Zeigt eine vollständige Inhibition von VEGF, die diagnostischen Parameter sind unauffällig. (B) Die Inhibition von VEGF nimmt bereits ab, die diagnostischen Parameter bleiben jedoch unauffällig. (C) Keine VEGF Inhibition mehr vorhanden, Sehschärfe unauffällig, das OCT zeigt bereits Auffälligkeiten. (D) Keine VEGF Inhibition mehr, OCT und Sehschärfe auffällig.

1.2 VEGF und VEGF Rezeptoren

1.2.1 „Vascular Endothelial Growth Factor“-VEGF

Der „Vascular Endothelial Growth Factor“, oder VEGF wurde als zentraler Faktor neovaskulärer Erkrankungen des Auges identifiziert. VEGF als gefäßstimulierender Wachstumsfaktor reguliert die normale Angiogenese, die Tumorangioenese, die Lymphangiogenese sowie die pathologische Neovaskularisation. VEGF wurde zuerst als „Vascular Permeability Factor“-VPF, als Heparin bindendes Endothelzellmitogen beschrieben

[36,37]. Später stellte sich jedoch heraus, dass VPF selektiv nur das Wachstum von Gefäßendothelzellen stimuliert. VEGF besteht aus fünf verschiedenen Subgruppen, VEGF-A-VEGF-D und PlGF (Placental Growth Factor) [21]. Dazu kommen die beiden Subgruppen VEGF-E und VEGF-F, die jedoch von einem ORF Virus codiert oder in Schlangengiften und somit nicht physiologisch vorkommen [38,39]. Die Expression von VEGF wird direkt über den Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor) gesteuert. Das hierauf beruhende Prinzip ist die Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung von ischämischen Geweben [40]. VEGF-A, die Hauptvariante der VEGF Familie ist ein über Disulfidbrücken verbundenes antiparalleles Homodimer, es wurden aber auch natürlich vorkommende Heterodimere bestehend aus VEGF-A und PlGF beschrieben [41]. VEGF-A besitzt neben der Bindestellen für die Bindung an die beiden VEGF-Rezeptoren 1 und 2 eine Bindestelle für Heparin an Heperansulfat sowie am C-Terminalen Ende eine Bindestelle für Neuropilin Rezeptoren. VEGF-A wird zudem alternativ gespleißt und erzeugt somit verschieden lange Isoformen, die nach ihrer Aminosäureanzahl (z.B.: VEGF-A165, VEGF-A121) benannt wurden [42]. Durch alternatives Spleißen des terminalen Exons 8 können weitere VEGF-A Subgruppen erzeugt werden, VEGF-A_{xxx}a und VEGF-A_{xxx}b (z.B. VEGF-A165a und VEGF-A165b), wobei xxx wieder die Anzahl der Aminosäuren wiedergibt. Diese Varianten besitzen dieselbe Anzahl von Aminosäuren, aber unterschiedliche C-terminale Sequenzen (siehe Abbildung 4) [43]. Des Weiteren wurden VEGF-A Varianten bestätigt, bei denen durch den Mechanismus des „Posttranslationalen Readthroughs (PTR)“, das Stopcodon in Exon 8a als Selenocystein gelesen wird und die Translation erst am nächsten Stopcodon terminiert wird (siehe Abbildung 4). Um diese Varianten zu generieren wird eine Sequenz in 3'-Richtung des ersten Stopcodons benötigt, die als cis-Element dient, außerdem ein als trans-Element fungierender Proteinkomplex hnRNPA2/B1 (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1). Die Terminologie des VEGF wird dadurch zusätzlich VEGF-A_{xxx}x (z.B. VEGF-A165x) erweitert [44]. Die verschiedenen VEGF Varianten und deren Isoformen binden mit hoher Affinität an VEGF Rezeptoren und leiten intrazellulär Signale über verschiedene Signalwege weiter, die zu unterschiedlichen Reaktionen der Zellen führen.

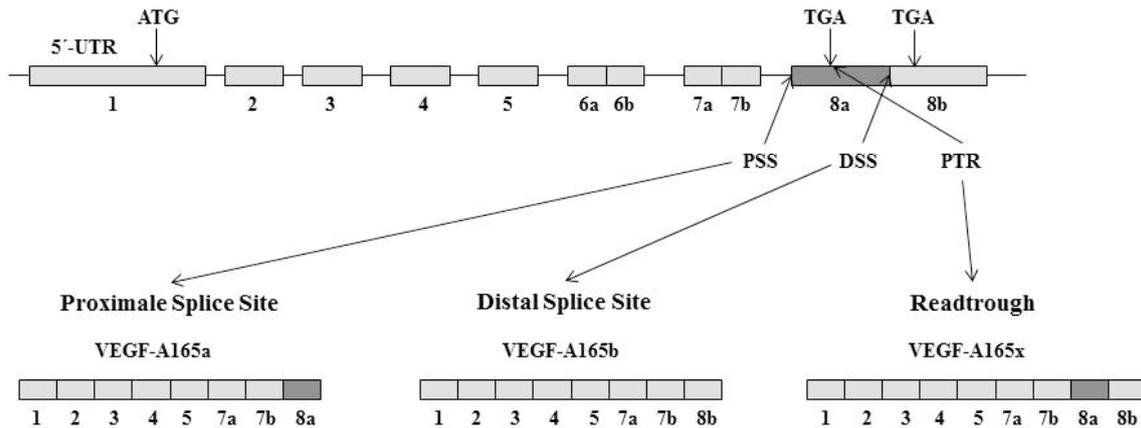


Abbildung 4: Generierung verschiedener VEGF-A Splicevarianten am Beispiel VEGF-A165. VEGF-A165a durch die Verwendung der proximalen Splice site (PSS), VEGF-A165b durch die Nutzung der distalen Splice site (DSS) und VEGF-A165x durch den programmierten „Posttranslationalen Readthrough“.

1.2.2 VEGF-Rezeptoren und deren Liganden

Die drei VEGF Rezeptoren 1, 2 und 3 gehören zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Endothelzellspezifische Rezeptoren bilden die Hauptfaktoren bei der Bildung von Blut- und Lymphgefäßen während der embryonalen Entwicklung [45]. Die beiden VEGF Rezeptoren 1 und 2 steuern hierbei die Entwicklung von Blutgefäßen, während der VEGF Rezeptor 3 an der Lymphgefäßentwicklung beteiligt ist. Alle VEGF Rezeptoren bestehen aus einem extrazellulären Bereich, der aus sieben immunoglobulinähnlichen Domänen besteht, einer Transmembrandomäne und den regulatorischen, intrazellulären Bereichen. Der regulatorische, intrazelluläre Bereich besteht dabei aus einer regulatorischen Juxtamembrandomäne sowie aus der Tyrosinkinasedomäne. Die Tyrosinkinasedomäne beinhaltet mehrere Tyrosine, die intrazelluläre Signalwege durch Phosphorylierung steuern (siehe Abbildung 5) [46]. Bindet ein spezifischer Ligand an den Rezeptor kommt es zunächst zu einer Dimerisierung der extrazellulären Domänen zweier Rezeptormoleküle zu einem Homodimer, bestehend aus zwei identischen Rezeptormolekülen oder zu einem Heterodimer, bestehend aus zwei unterschiedlichen Rezeptormolekülen. Die Interaktionen der beiden extrazellulären Bereiche mit dem Liganden bewirken eine Positionierung der intrazellulären Domänen, wodurch Phosphorylierungstellen frei werden und durch Autophosphorylierung Signaltransduktionskaskaden angeschaltet werden [47].

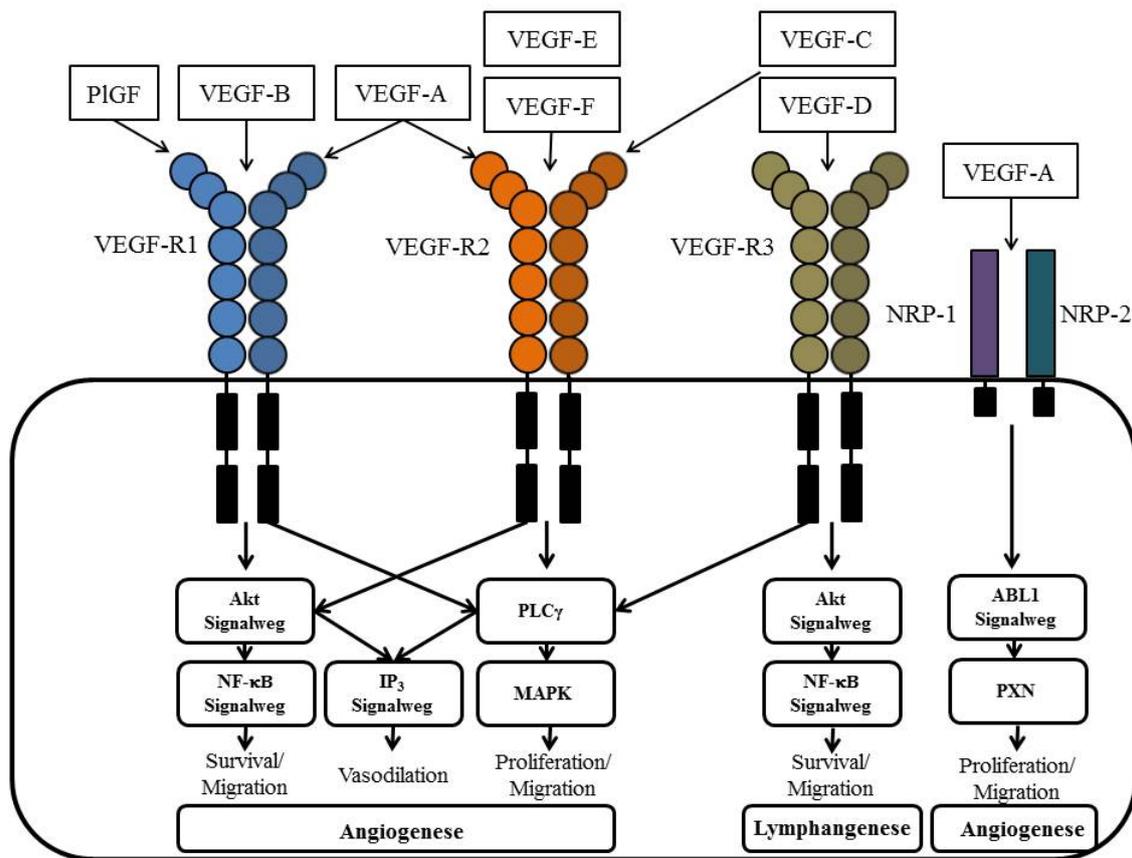


Abbildung 5: VEGF Rezeptoren, deren Signalwege und Liganden. Durch die extrazelluläre Bindung von VEGF A-F oder PIGF an VEGF Rezeptoren 1-3 oder NRP-1,2 kommt es zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege und dadurch zur Steuerung der Migration, der Proliferation, der Vasodilatation und des Überlebens (Survival) von Endothelzellen.

Der VEGF Rezeptor 1 (FLT1, fms like tyrosinekinase 1) ist ein etwa 180 kDa großes Glykoprotein, das vor allem in der Embryogenese eine wichtige Rolle spielt [48]. Der VEGF Rezeptor 1 besitzt im Vergleich zum VEGF Rezeptor 2 eine schwächere Kinaseaktivität, die durch einen Repressor in der Juxtamembrandomäne erklärt wird. Durch die Bindung verschiedener Liganden an den VEGF Rezeptor 1 werden spezifisch Tyrosine, wie Tyr1213, Tyr1333, Tyr 1242 oder Tyr 1327 phosphoryliert und somit selektiv verschiedene Signaltransduktionskaskaden aktiviert, die sich auf das Proliferations- und Migrationsverhalten sowie das Überleben von Zellen auswirken [49]. Der lösliche VEGF Rezeptor 1 (sFLT1, soluble FLT1) mit ca. 100 kDa Molekulargewicht besitzt durch das Fehlen der intrazellulären und der Transmembrandomäne keine Tyrosinkinaseaktivität und wird aus der Zelle geschleust, wodurch eine Modulation der Ligandenkonzentration (VEGF) erreicht wird

[50]. Klinisch wird die lösliche Form des VEGF Rezeptors 1 mit der Präeklampsie assoziiert [51].

Der VEGF Rezeptor 2, mit einer Größe von ca. 210 kDa, ist der dominanteste, an der Angiogenese beteiligte Rezeptor und wird in hematopoetischen, neuronalen und retinalen Zellen exprimiert [52–54]. Der VEGF Rezeptor 2 reguliert die Endothelzellproliferation, Migration, das Überleben und die Permeabilität durch die Trans- oder Autophosphorylierung einer der sieben intrazellulären Phosphorylierungsstellen.

Die intrazelluläre Phosphorylierung des VEGF Rezeptors 2 bewirkt eine Aktivierung der MAP (mitogen activated protein) Kinase und dadurch eine Translokation in den Nukleus. Durch die anschließende Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren werden Gene, zuständig für die Proliferation, reguliert [55,56].

Die Migration von Endothelzellen wird über verschiedene Signalwege reguliert. Die Aktivierung erfolgt über die Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosine an den Positionen 951, 1175 und 1214 und bewirkt eine Reorganisation des Aktins gesteuert durch den FAK- (focal adhesion kinase) und den MAP-Kinase Signalweg [57–59].

Gegen Apoptose schützen sich Endothelzellen durch die Phosphorylierung des VEGF Rezeptors 2 und die dadurch verursachte Aktivierung der Akt-Kinase (Proteinkinase B) [60].

Die Permeabilität von Endothelzellen wird über zwei verschiedene Signalwege reguliert, die durch die Aktivierung des VEGF Rezeptors 2 gesteuert wird [61].

Der VEGF Rezeptor 3 (~195 kDa) reguliert über seine Aktivierung die Lymphangiogenese. Während der embryonalen Entwicklung wird dieser Rezeptortyp in Lymphgefäßen und Venen exprimiert, mit fortnehmender Dauer der embryonalen Entwicklung beschränkt sich die Expression jedoch zunehmend auf die Lymphgefäße [47].

Die Aktivierung des VEGF Rezeptors 3 bewirkt die Migration und das Überleben von lymphatischen Endothelzellen über den MAP-Kinase Signalweg [62].

Wie bereits erwähnt, besteht die VEGF Familie aus verschiedenen Subgruppen. Die Zugehörigkeit zu diesen Gruppen beeinflusst auch die Bindung an die bereits genannten verschiedenen VEGF Rezeptoren. Der VEGF Rezeptor 1 ist in der Lage PlGF, VEGF-A und VEGF-B zu binden, der VEGF Rezeptor 2 bindet VEGF-A, VEGF- C und VEGF-D und der VEGF Rezeptor 3, zuständig für die Lymphangiogenese, bindet die Subgruppen VEGF-C und VEGF-D. Die nicht physiologisch vorkommenden Subgruppen VEGF-E und VEGF-F werden nur vom VEGF Rezeptor 2 gebunden [49].

Die Neuropilin (NRP) Rezeptor Familie, besteht aus NRP-1 (~130 kDa) und dem Homolog NRP-2 (~120 kDa). Neuropilin Rezeptoren werden auf Neuronen, Blutgefäßen, Immunzellen

und vielen weiteren Zellen exprimiert und sind an der Angiogenese sowie an der Leitung von Axonen während der embryonalen Entwicklung beteiligt. Neuropiline, als Glykoproteine sind Transmembranrezeptoren, mit einer extrazellulären, einer Transmembran und einer kurzen intrazellulären Domäne bestehend aus 44 Aminosäuren ohne eigene katalytische Eigenschaften [63]. Aus diesem Grund wurde lange Zeit von Neuropilinrezeptoren angenommen, dass sie lediglich als Korezeptoren der VEGF Rezeptoren dienen und die Bindung des VEGF zu den VEGF Rezeptoren stabilisieren [64]. Allerdings beinhaltet die intrazelluläre Domäne eine SEA (Serin-Glutamin-Alanin) Sequenz, die die PDZ Domäne (auch bekannt unter Discs-large homologous regions (DHR) des Synectins GIPC1 (GIPC PDZ domain containing family member 1)) rekrutieren kann. Eine weitere Möglichkeit der Signalweitergabe durch Neuropiline ist die Rekrutierung der „Non-Receptor“ Tyrosinkinase ABL1 (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) die durch Signalweitergabe die Proliferation, die Migration und das Überleben von Zellen steuern kann [65–67]. Alternatives Spleißen erzeugt neben dem membranständigen Rezeptor lösliche Varianten ohne Transmembran- und intrazellulärer Domäne. Die extrazelluläre Domäne von Neuropilinen ist durch ihren modularen Aufbau in der Lage neben dem VEGF Liganden aus der Gruppe der Semaphorine zu binden [68]. Die Interaktion, zusammen mit Rezeptoren der Plexin Familie, wird zur Kontrolle der Leitung der Axone neuronaler Zellen während der embryonalen Entwicklung eingesetzt [69].

Aus der VEGF Familie binden lediglich die Subgruppen VEGF-A und eine Isoform des VEGF-C an Neuropiline [70]. Voraussetzung für die Bindung der VEGF-A Varianten an NRP-1 ist eine Arginin-haltige C-Terminale Sequenz die in allen angiogen wirkenden VEGF-A_{xxx}a Varianten vorkommt [71]. Die durch alternatives Spleißen erzeugten VEGF-A_{xxx}b Isoformen sind durch das Fehlen des Arginin-haltigen C-Terminus nicht in der Lage NRP-1 zu binden. Eine Isoform des VEGF-C ist nach spezifischer proteolytischer Spaltung fähig, mit dem NRP-2 Rezeptor zu interagieren [72].

1.3 Das TetOn System zur regulierbaren Expression von Transgenen

Viele bisherige Strategien zur Expression von Transgenen in Zellen des Auges basieren auf einer kontinuierlichen Expression mit Hilfe von starken viralen (z.B.: CMV-Promotor) oder spezifisch in den Zellen des Auges aktiven Promotoren, wie etwa dem Rhodopsinkinase Promotor [73,74].

Da es aber mitunter unvorteilhaft ist, eine andauernde, starke Expression von z.B. Anti-VEGF und somit eine vollständige Inhibition von VEGF in Bezug auf die Aufrechterhaltung von physiologischen Prozessen zu gewährleisten, wäre eine regulierbare Expression der kontinuierlichen vorzuziehen. Das aus Bakterien stammende TetOn System dient der Regulation der Transgenexpression und besteht aus zwei separaten Expressionskassetten. Die erste Expressionskassette kodiert für den reversen Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle des Ptet Promotors. Nach Zugabe des Tetracyclin Derivates Doxycyclin bindet dieses an den rtTA und ändert dessen Konformation, so dass dieser Komplex an den Tet Operator binden kann und somit die Expression des Transgens initiiert (siehe Abbildung 6). Nach AAV vermitteltem Gentransfer im Auge konnte eine Regulation der Transgenexpression über Jahre hinweg gezeigt werden [75].

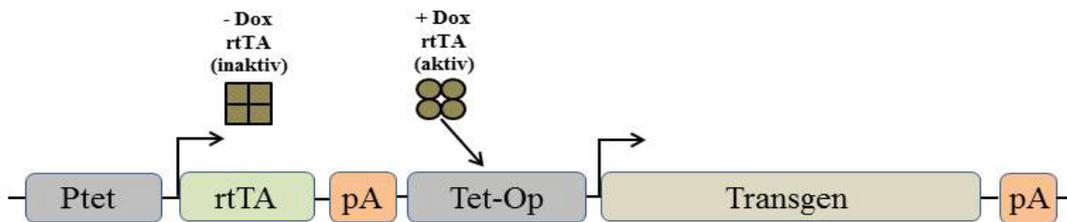


Abbildung 6: Das TetOn System. Reverser Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle des Ptet Promotors (Ptet). Konformationsänderung des rtTA durch Zugabe von Doxycyclin und Induktion der Transgenexpression nach Interaktion mit dem Tet Operator (Tet-Op).

1.4 Antikörper und deren Fragmente

Hochspezifische, rekombinante Antikörper finden nicht nur in der Forschung und Diagnostik, sondern auch zunehmend in der Therapie von Erkrankungen Anwendung. Die Struktur eines IgG Antikörpers erinnert durch die Anordnung von zwei schweren und zwei leichten Antikörperketten an den Buchstaben Y (siehe Abbildung 7A). Die schweren Antikörperketten bestehen jeweils aus einer langen, konstanten (Fc) und einer kürzeren variablen (Fv) Region. Jeweils zwei dieser schweren Antikörperketten sind durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die leichten Ketten, bestehend aus einer kurzen konstanten und der variablen Region sind über eine Disulfidbrücke an die lange Kette gebunden (siehe Abbildung 7A).

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern (mAbs) mit Hilfe der Hybridoma Technologie war ein Meilenstein in der Entwicklung von Antikörpern für therapeutische

Ansätze. Die rekombinante DNA Technologie, eine Weiterentwicklung der Hybridoma Technologie, erlaubt es funktionelle Fragmente von Antikörpern zu exprimieren. Somit ist es möglich, z.B. nur den Antigen bindenden Teil von Antikörpern, sogenannte Fab Fragmente, herzustellen (siehe Abbildung 7B). Fab Fragmente bestehen nur aus der leichten und einem Teil der schweren Antikörperkette die wiederum durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden werden. In der Augenheilkunde wird neben dem „off-label“ genutzten IgG Antikörper Bevacizumab (Avastin[®]) das Fab Fragment Ranibizumab (Lucentis[®]) zur Behandlung neovaskulärer Erkrankungen eingesetzt. Bei der eukaryotischen Expression von Fab Fragmenten werden beide Ketten separat exprimiert, die Ausbildung der Disulfidbrücken findet im sekretorischen Vesikel, kurz vor der Ausschleusung aus der Zelle, statt. Limitierender Faktor ist hierbei das molare Verhältnis beider Ketten. Bei einem Überschuss einer der beiden Ketten kann es zu einer Anreicherung oder einer Ausbildung von Fragmenten mit identischen Ketten ohne biologische Aktivität kommen. Um dieses Problem zu umgehen, können beiden Ketten des Fab Fragmentes durch einen Peptidlinker verbunden werden um sogenannte „single chain“ Fragmente herzustellen. Aus einem Fab Fragment wird somit ein scFab (single chain Fab Fragment) generiert das als einzelnes Molekül exprimiert werden kann (siehe Abbildung 7C). Wird nur der variable Bereich (Fv) durch einen Peptidlinker verbunden, entsteht ein scFv (single chain variable Fragment) (siehe Abbildung 7D). Die verwendeten Peptidlinker bestehen überwiegend aus den Aminosäuren Glyzin (Gly) und Serin (Ser) die meist modular als Kassetten aufgebaut werden. Glyzin und Serin gewährleisten hierbei die Flexibilität der genutzten Linker. Um die Löslichkeit der Moleküle zu erhöhen können zudem Glutamin (Glu) und Lysin (Lys) in Peptidlinkern verwendet werden [76,77].

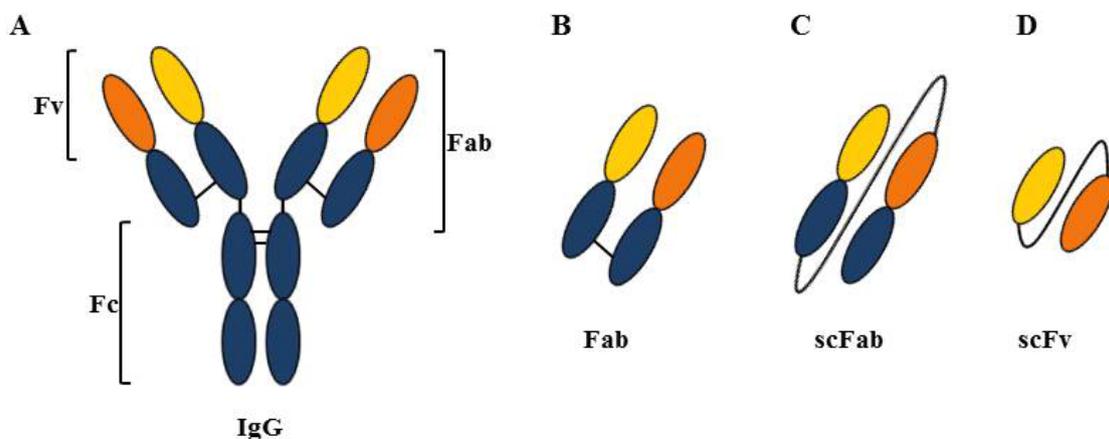


Abbildung 7: Aufbau von Antikörpern und deren Fragmenten. (A) IgG Antikörper mit konstanter Region (konstantes Fragment, Fc), einer Antigen bindenden Region (Antigen bindendes Fragment, Fab) und dem variablen Bereich (variables Fragment, Fv). (B) Fab Fragment eines IgG Antikörpers.

(C) Single chain Fab Fragment (scFab), ein durch einen Peptidlinker verbundenes Fab Fragment. (D) Single chain variable Fragment (scFv), variable Region (Fv) eines IgG Antikörpers, verbunden durch einen Peptidlinker.

1.5 Retinale Gentherapie

Bereits 1987 wurde unter Verwendung eines retroviralen Vektors die erste Gentherapie am Auge bei Mäusen beschrieben [78]. Das Auge, als abgeschlossenes Organ, bietet gegenüber anderen Organen Vorteile was die Sicherheit der Anwendung, die Effizienz und die Applikation betrifft [79]. Somit fand die Gentherapie am Auge Anwendung bei den verschiedensten Krankheitsbildern genetischer Ursache.

Bei der Gentherapie wird zwischen „gene silencing“, „gene replacement“ oder „gene addition“ und „gene edition“ unterschieden.

Das „gene silencing“ wird bei dominanten Erbgängen eingesetzt, um ein Translation des schädlichen Proteins auf RNA Ebene, wie etwa bei RHO (Rhodopsin) Mutationen, zu blockieren. Bei dieser Strategie übernimmt das nicht betroffene Allel die physiologische Funktion [80,81].

„Gene replacement“ wird bei rezessiv vererbten Erkrankungen angewandt und wird durch „loss-of-function“ Mutationen in Genen charakterisiert. Es wird ein gesundes Gen eingeschleust, das die physiologische Funktion übernimmt. Als Beispiel zu nennen wäre die RPE65 (retinales Pigmentepithel Protein 65 kDa)- und MERTK (Tyrosine-Protein Kinase MER) Gentherapie [82,83].

Die „gene addition“ Therapie, wie etwa die Expression von Anti-VEGF Molekülen (sFlt1 als löslicher VEGF Rezeptor 1) nach AAV (Adeno assoziierter Virus) oder LV (Lentivirus) vermitteltem Gentransfer, wird z.B. zur Therapie neovaskulärer Erkrankungen wie der AMD oder der DR eingesetzt [23,84]. Alle Ansätze beruhen jedoch auf einer kontinuierlichen Expression dieser Moleküle, was eine anhaltende Inhibition von VEGF zur Folge hat. Da aber das VEGF auch physiologische und neuroprotektive Eigenschaften besitzt, ist eine andauernde Inhibition nicht wünschenswert.

Die „gene editing“ Therapie nutzt Nukleasen, die spezifisch an einem zuvor definierten Locus der genomischen DNA einen Doppelstrangbruch erzeugen. Als Nukleasen kommen hier Zinkfinger, TALENs (Transcription Activator-like Effector Nucleases) oder Cas Nukleasen

(CRISPR-associated Endonuclease) oder Fusionsproteine aus den DNA bindenden Domänen von Nukleasen und katalytischen Domänen von Restriktionsenzymen zum Einsatz.

Das vom bakteriellen Immunsystem abgeleitete CRISPR/Cas9 Nuklease (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) System erzeugt sehr spezifisch Doppelstrangbrüche in genomischer DNA. Unter Nutzung der zelleigenen Reparatursysteme NHEJ (non homologous end joining), MMEJ (microhomology mediated end joining) oder HDR (homologous directed repair) werden die durch die Nuklease erzeugten Doppelstrangbrüche wieder repariert.

NHEJ ist dabei ein sehr fehleranfälliger Reparaturweg bei dem die beiden Enden des Doppelstrangbruchs wieder miteinander verknüpft werden. Es kommt jedoch dabei zu Insertionen und Deletionen von Nukleotiden wodurch der Leserahmen gestört werden kann. Diese Strategie findet hauptsächlich beim Ausschalten von Genen Anwendung. Eine DNA Vorlage (template DNA) nutzen die MMEJ und HDR Reparaturwege. Homologe Bereiche an den Doppelstrangbrüchen und der DNA Vorlage werden verknüpft. Lediglich die Länge der homologen Bereiche unterscheidet die beiden Reparaturwege. Somit ist es möglich fehlerhafte Gene durch korrekte zu ersetzen. Diese Strategie ist sozusagen der „Königsweg“, da Mutation repariert werden können und sonst kein therapeutisches Eingreifen mehr benötigt wird [85].

1.5.1 Retinaler Gentransfer

Um in vitro hergestellte Expressionskassetten in die Zellen des Auges einzuschleusen, können verschiedene Methoden (nichtviraler und viraler Gentransfer) verwendet werden.

Der nichtvirale Gentransfer in die Zellen des Auges beruht hauptsächlich auf physikalischen Methoden (Elektroporation und Iontophorese). Die Vorteile dieser Methoden bestehen in der sehr niedrigen Immunogenität, außerdem findet keine Integration des Vektors ins Genom des Wirts und somit auch keine insertionelle Mutagenese statt. Die bei dieser Methode verwendeten Vektoren können im großen Maßstab produziert werden und es gibt keine Beschränkungen in der Größe des Vektors [86].

Bei der Elektroporation wird DNA intravitreal, d.h. in den Glaskörper appliziert und ein elektrischer Impuls generiert, der dafür sorgt, dass die Zellen transfiziert werden [87].

Die Iontophorese nutzt geladene Moleküle, die in einem schwachen elektrischen Feld in Gewebe oder Zellen eindringen können. Auch hier werden die zu transferierenden Moleküle zuvor in den Glaskörper injiziert [88].

Zum viralen Gentransfer in die Zellen des Auges werden hauptsächlich AAV, LV und Ad-Viren (Adenoviren) verwendet [79].

AAVs, als einzelsträngige DNA Viren, gehören zur Gattung der Dependoviren, d.h. sie benötigen einen Helfervirus aus den Familien der Adeno,- Herpes, oder Papillomaviren um sich replizieren zu können. Das Genom der AAV besteht aus mehreren Leserahmen, die für das Kapsid und für die DNA Replikation verantwortlich sind [89]. AAVs werden nicht in das Genom des Wirtes integriert und liegen nach Transduktion episomal vor [90]. Von AAVs wurden unterschiedliche Serotypen charakterisiert, die die Fähigkeit besitzen im Auge verschiedene Zelltypen zu transduzieren [91,92]. Wegen der limitierten Kapazität von ~4,7 kbp sind AAVs jedoch nur begrenzt bei der Verwendung großer Gene einsetzbar [93]. Aus diesem Grunde finden bei größeren Genen Ad und LV zunehmend Verwendung beim Gentransfer in Tiermodellen oder klinischen Versuchen [94,95].

Lentiviren sind einzelsträngige RNA Viren die sich teilende und nicht teilende Zellen transduzieren können. Sie integrieren ihr Genom in das Genom des Wirtes und erlauben somit eine lang anhaltende Expression des transferierten Gens. Im Vergleich zu AAVs besitzen LV mit ~8 kbp eine höhere Kapazität Transgene aufzunehmen. Um die Sicherheit der lentiviralen Anwendung zu erhöhen, wurden „self-inactivating“ (SIN) Vektoren generiert, bei denen es zu einer Inaktivierung des 3'-LTR (Lentiviral terminal repeats) nach erfolgter Transduktion kommt [96].

Adenovirale Vektoren beinhalten lineare, doppelsträngige DNA und besitzen eine sehr hohe Kapazität von ~37 kbp. Bedingt durch die hohe Kapazität sind Ad mit etwa 100nm relativ groß, was zu einer schlechteren Passierbarkeit im subretinalen Spalt führt [97]. Ein weiterer Nachteil ist die Immunogenität, was zu Immunreaktionen, auch im immunprivilegierten Auge, führen kann.

1.6 Resonanz Energie Transfer

Der Resonanz Energie Transfer (RET), bereits 1948 von Theodore Förster in den Annalen der Physik charakterisiert, beschreibt das quantenmechanische Phänomen des strahlungslosen Energieübertrags von einem Energiedonor auf einen Energieakzeptor [98]. Dieser Energieübertrag ist dabei hauptsächlich von drei verschiedenen Faktoren abhängig (siehe Abbildung 8), dem Abstand zwischen Energiedonor und Energieakzeptor (A), der Qualität der Überlappung der Emission des Energiedonors und der Anregung des Energieakzeptors (B) und der Parallellität bzw. dem Winkeln zwischen dem Dipolmomenten des Energiedonors und Energieakzeptors zueinander (C) [99,100].

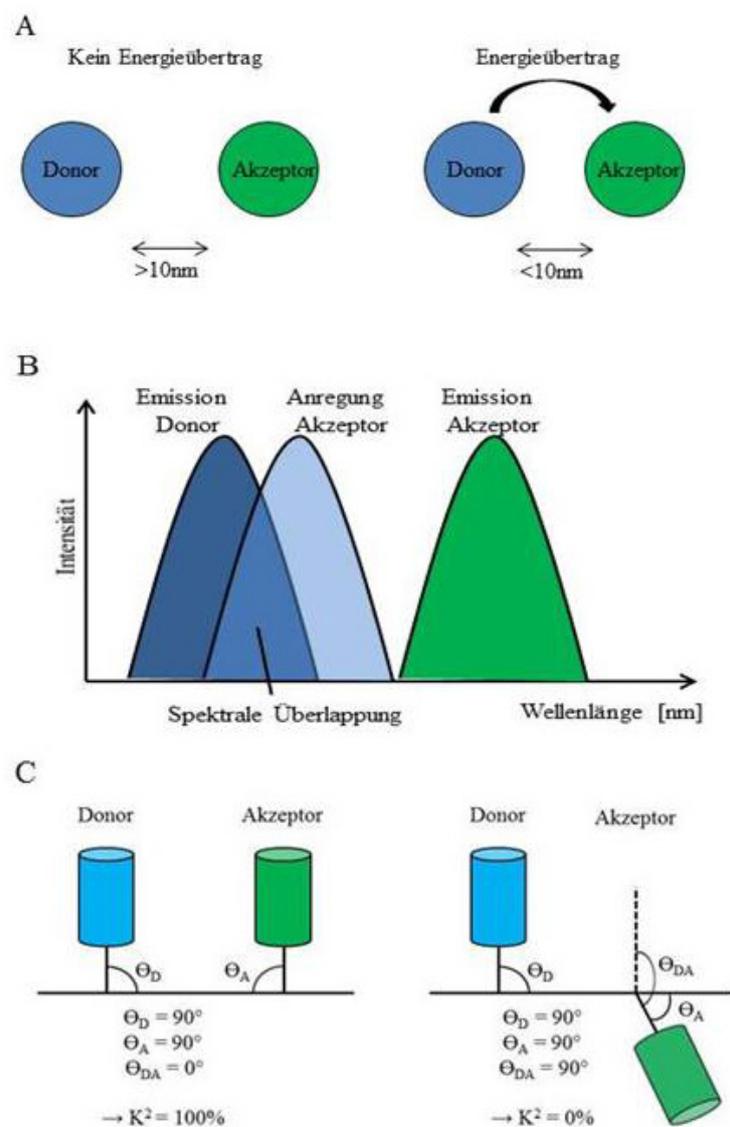


Abbildung 8: Abhängigkeiten des Resonanz Energie Transfers. (A) Distanz zwischen Energiedonor und Energieakzeptor. (B) Spektrale Überlappung Energiedonor Emission und Anregung

Energieakzeptor. (C) Parallelität bzw. Winkel zwischen den Dipolmomenten von Energiedonor und Energieakzeptor (K^2 : Übertragungskoeffizient).

1.6.1 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

Beim Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) wird Energie von einem angeregten Fluorophor auf ein weiteres Fluorophor, mit passender, überlappender Anregungswellenlänge übertragen, das wiederum Licht im höherwelligen Wellenlängenbereich emittiert [101]. Ursprünglich wurden cyan und gelbe Fluorophorvarianten bei FRET-Experimenten verwendet. Da diese Kombinationen eine schlechte spektrale Separation der beiden Emissions-Maxima und einen schwachen Donor/Akzeptor-Emissions Quotienten aufwiesen, wurden sie durch orange und rote Fluorophore, mit höherwelligeren Anregungs- und Emissions-Wellenlängen ersetzt, die eine reduzierte zelluläre Autofluoreszenz, eine verminderte Fototoxizität und eine niedrigere Lichtstreuung aufwiesen [102].

Da sich biologische Prozesse wie etwa Protein-Protein Wechselwirkungen im Bereich der FRET-Distanz (~ 10 nm) abspielen, wurde dieses Prinzip zunehmend dazu verwendet, um Proteininteraktionen qualitativ aufzuklären [103]. Basierend auf FRET Experimenten wurden so Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren, die Dimerisierung von Rezeptoren oder Wechselwirkungen zwischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit verschiedenen Liganden nachgewiesen [104–106]. Ein sehr großer Vorteil von FRET besteht darin, nicht nur Protein-Protein Interaktionen qualitativ nachweisen zu können, sondern auch Quantifikationen mit Hilfe der Berechnung des Donor/Akzeptor-Emissions Quotienten durchzuführen [107].

1.6.2 Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET)

Der Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET) basiert im Grunde auf demselben Prinzip wie FRET. Hier wird allerdings das Donorfluorophor durch eine Luziferase ersetzt, die als Energiedonor dient. Ein großer Vorteil von Luziferasen gegenüber Fluorophoren ist, dass Luziferasen als katalytische Enzyme die Lichtemission sehr spezifischer Wellenlänge, durch die Umwandlung ihres Substrates selbst erzeugen und somit keine Anregung von außen notwendig ist. Aus diesem Grund eignet sich BRET vorzüglich zum Einsatz in Zellkulturen sowie in lebenden Organismen [108,109]. Auch bei BRET wird die Energie durch Überlappung (Resonanz) des Emissionsmaximums der Luziferase mit dem

Anregungsmaximums des Akzeptorfluorophors übertragen, das wiederum Licht emittiert. Die Maxima der Emissions- und Anregungswellenlängen sind hierbei von der Luziferase als Energiedonor, dem verwendeten Luziferasesubstrat sowie vom gewählten Energieakzeptor abhängig.

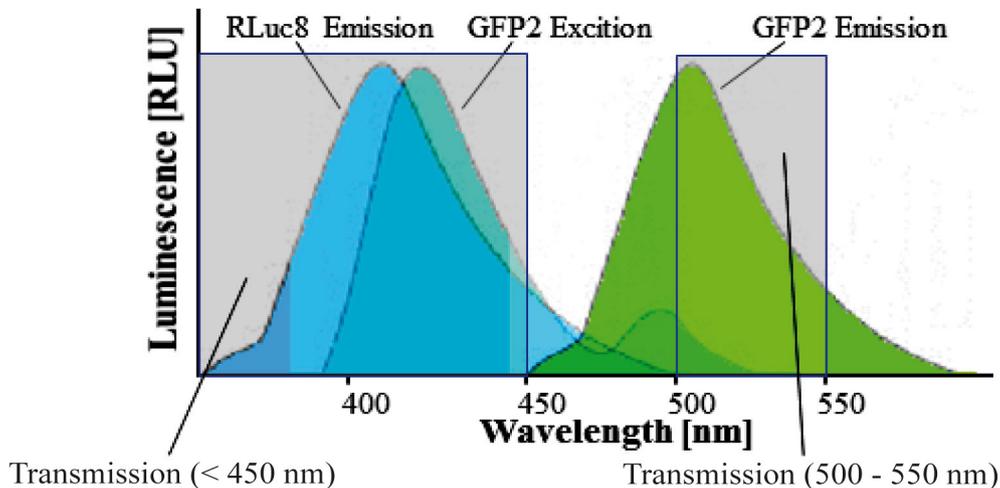


Abbildung 9: BRET Prinzip der RLuc8-GFP2 Kombination. RLuc8 erzeugt durch Substratumsatz eine Emission bei $\lambda_{em} \sim 410\text{ nm}$, die dazu genutzt wird GFP2 ($\lambda_{Exc} \sim 420\text{ nm}$) anzuregen. GFP2 seinerseits emittiert Strahlung bei $\lambda_{em} \sim 513\text{ nm}$. Die Messung erfolgt mit Hilfe geeigneter Transmissionsfilter.

Analog zu FRET wird auch BRET nicht nur zum qualitativen Studium von Protein-Protein Interaktion, sondern auch zur Quantifizierung von Analyten *in vitro* als auch *in vivo*, benutzt [110]. Es konnte bereits die *in vivo* und *in vitro* Konzentrationsbestimmung von Rapamycin mit Hilfe eines auf zwei Molekülen basierendes BRET Systems gezeigt werden [111]. Ein weiteres auf zwei Molekülen basierendes BRET System wurde unter der Verwendung der VEGF-Rezeptor und Neuropilin Rezeptor Bindestellen zur Detektion und Quantifizierung von VEGF beschrieben [112]. *In vitro* konnten, mit Hilfe von Einzelmolekül-BRET Biosensoren, Methotexat und Maltose erfolgreich quantifiziert werden [113,114].

Bei BRET kommen verschiedene Luziferasen, wie etwa die *Renilla reniformis* Luziferase (RLuc), die Firefly Luziferasen aus *Photinus pyralis* oder die im Vergleich zu den beiden bereits genannten sehr kleinen Nano-Luziferase (NLuc) aus *Oplophorus gracilirostris* zum Einsatz [108,115,116]. Der Vorteil der Firefly Luziferasen gegenüber der RLuc und NLuc liegt in ihrer niedrigeren zellulären Autofluoreszenz und der länger anhaltenden Emission, die Nachteile besteht in ihrer Abhängigkeit von ATP (Adeninriphosphat), molekularem Sauerstoff sowie Magnesium und ihrer Größe [117].

Luziferasen emittieren Licht, abhängig vom verwendeten Substrat, in sehr definierten Wellenlängenbereichen. Durch gezielte, direkte Mutagenesen konnten die Emissionsmaxima der Luziferasen verschoben und durch die Synthetisierung alternativer Substratanaloga deren Lichtausbeute erhöht werden [118]. Durch die Verbesserung der Sensitivität von Lumineszenzmessungen und der Entwicklung verbesserter Substratanaloga setzte sich jedoch die *Renilla reniformis* Luziferase bei BRET Anwendungen bis auf wenige Ausnahmen durch [119].

Renilla reniformis Luziferasen katalysieren die oxidative Decarboxylierung von Coelenterazin (CLZ) in Anwesenheit von Sauerstoff O_2 und Ca^{2+} zu Coelenteramid und CO_2 (siehe Abbildung 10) [120].

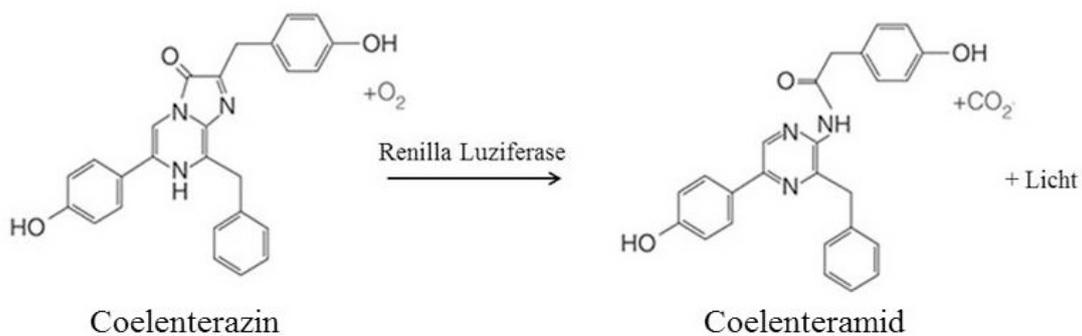


Abbildung 10: Umsetzung des Luziferase Substrates durch die *Renilla reniformis* Luziferase. Katalytische Decarboxylierung von Coelenterazin zu Coelenteramid unter Freisetzung von Licht durch die *Renilla reniformis* Luziferase.

Coelenterazin durchdringt die Zellmembran von eukaryotischen Zellen und diffundiert durch das Zytosol, die dazugehörigen Mechanismen sind allerdings noch nicht vollständig geklärt. Es konnten für Coelenterazine keine toxischen Effekte auf Zellen gezeigt werden, was eine Anwendung *in vitro* als auch *in vivo* ermöglicht. Im Laufe der Entwicklung wurden verschiedene Coelenterazinvarianten mit unterschiedlichen Eigenschaften chemisch synthetisiert. Es konnten Varianten mit erhöhter Lichtausbeute, veränderten und sogar mehreren Emissionmaxima hergestellt werden. Besondere Aufmerksamkeit wurde auf Varianten mit Emissionsmaxima im höheren Wellenlängenbereich gerichtet da rotes Licht *in vivo*, im Gegensatz zu blauem oder grünem Licht, nicht durch das Gewebe abgeschwächt wird [120–122].

Um BRET optimal nutzen zu können, muss neben der Auswahl des Energiedonors, ein geeignetes Akzeptorfluorophor mit passender Anregungswellenlänge gewählt werden. Bei der Verwendung von RLuc und deren Mutanten stehen verschiedene Varianten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) zur Verfügung. Klasse 1 GFP Varianten, abgeleitet vom wildtyp GFP besitzen zwei, eine Haupt- und Neben-Anregungswellenlänge, Klasse 2 und 3 GFPs besitzen lediglich eine der beiden Anregungswellenlängen. Während Klasse 1-3 GFPs im Grunde identische Emissionswellenlängen, aber unterschiedliche Anregungswellenlängen haben, besitzen Klasse 4 GFPs, wie etwa das gelb fluoreszierende Protein YFP unterschiedliche Anregungs- und Emissionswellenlängen [119]. Die Palette nutzbarer, proteinbasierter Fluorophore wurde durch direkte Mutagenesen verschiedenster GFP Varianten, was zu blauen, orangen und roten Varianten führte, noch vergrößert [123]. Neben den proteinbasierten Akzeptorfluorophoren stehen auch chemisch synthetisierte Fluorophore mit geeigneten Anregungs- und Emissionswellenlängen zur Verfügung [112]. Somit bestehen unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten bei der Auswahl der BRET Komponenten, die unterschiedliche Vor- und Nachteile besitzen.

Tabelle 1 zeigt bereits beschriebene BRET Donor-Akzeptor Kombinationen und die dazu verwendeten Coelenterazin Substratanaloga [109,111,112,124].

Tabelle 1: RLuc basierte BRET Kombinationen. (Renilla reniformis luciferase (RLuc), Gelb (yellow) fluoreszierendes Protein (YFP), Grün fluoreszierendes Protein (GFP), Rot fluoreszierendes Protein (RFP), Fluoreszierendes Protein (FP), Coelenterazin (CLZ), Mutierte RLuc Varianten: RLuc8 und RLuc8.6

Name	Energie-Donor	Energie-Akzeptor	Luziferase-Substrat	Spektrale Separation $\Delta\lambda$ [nm]	Referenz
BRET 1	RLuc	YFP	n-CLZ	50	[124]
BRET 2	RLuc	GFP2	CLZ400a	115	[125]
eBRET 2	RLuc8	GFP2	CLZ400a	115	[109]
BRET 3	RLuc8	mOrange	n-CLZ	85	[111]
BRET 3.1	RLuc8	mOrgange	CLZ-v	50	[111]
BRET 4.1	RLuc8	TagRFP	CLZ-v	70	[111]
BRET 5	RLuc8.6	TagRFP	n-CLZ	50	[111]
BRET 6	RLuc8.6	TurboFP	n-CLZ	100	[111]
BRET 6.1	RLuc8.6	TurboFP	CLZ-v	65	[111]
BRET 7	RLuc8	PerCP-Cy5.5	n-CLZ	300	[112]

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines auf zwei Komponenten basierenden Systems zur Kontrolle des VEGF Spiegels im Auge.

Eine Komponente besteht aus einem System zur regulierbaren Expression von Anti-VEGF Molekülen verpackt in einem AAV Vektor. Die Kombination dieser Komponente mit einem System zur Bestimmung der VEGF Konzentration im Auge würde eine minimalinvasive Anti-VEGF Versorgung von Patienten mit neovaskulären Erkrankungen des Auges gewährleisten.

Dazu sollten „single chain Fab Fragmente“, durch Peptidlinker verbundene Fab Fragmente auf der Basis von Ranibizumab generiert werden. Die generierten scFabs sollten auf ihre biologische, VEGF inhibierende Aktivität charakterisiert und unter der Kontrolle des TetOn-Systems reguliert exprimiert werden. Die Expressionkassette der wirksamsten und kürzesten Variante wurde in AAV verpackt und die regulierbare Expression nach Zellkulturtransfektion und Transduktion überprüft. Ziel der AAV Transduktion ist die regulierbare Expression des Anti-VEGF Moleküls von den Zellen des Auges selbst.

Zur Quantifizierung des VEGF Spiegels im Auge sollte ein in vivo kompatibles System, auf der Basis des Biolumineszenz Resonanz Energie Transfers entwickelt werden mit dem es möglich ist die Konzentration des freien VEGFs sensitiv, aber minimalinvasiv bestimmen zu können. Als VEGF Bindedomäne sollte eine scFab Variante dienen an die die Bestandteile des BRET Systems fusioniert wurden. Die auf diese Weise hergestellten VEGF Biosensor Moleküle sollten charakterisiert und die Quantifikation von VEGF in vitro dargestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	System DX-65, Linden, Deutschland
Blotter für Western-Blots	Biometra FastBlot, Göttingen, Deutschland
Dest. H ₂ O Anlage	Sartorius Arium 611DI, Göttingen, Deutschland
Eismaschine	Scotsman AF80, Berlin, Deutschland
Fluoreszenz Mikroskop	Keyence BioZero, Essen, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr Premium, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	Hera Freeze, Hanau, Deutschland
Gelkammer für Agarosegele	Biometra Compact XS/S und M, Göttingen, Deutschland
Gelkammer für SDS-Gele	Biometra Mini, Göttingen, Deutschland
Heizblock	Biometra TB2, Göttingen, Deutschland
Inkubator für eukaryotische Zellen	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Inkubator für prokaryotische Zellen	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Kühlschrank (4 °C)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Magnetrührer	IKA RCT classic, Staufen, Deutschland
Mikroskop	VWR, Darmstadt, Deutschland
Multimode Platereader	Tecan Infinite M1000Pro, Gröding, Österreich
Multiporator für Transformationen	Eppendorf Multiporator, Hamburg, Deutschland
PCR Thermocycler	Biometra T-Professional/T-Personal, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	Deutsches Institut für Fernstudien, Gießen, Deutschland
Photometer	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf BioPhotometer, Hamburg, Deutschland Eppendorf Research/Reference, Hamburg, Deutschland Brand, Wertheim, Deutschland
Power-Supply für Elektrophoresen	Whatman-Biometra PS305T, Göttingen, Deutschland
Schüttler	Sartorius Centromat H/MOII, Göttingen, Deutschland Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Deutschland Biometra WT17, Göttingen, Deutschland
Spülmaschine	Miele Professional, Gütersloh, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific MSC-Advantage, Darmstadt, Deutschland
Stickstofftonne (-196 °C)	Thermolyne Locator Plus 6, Pfullingen, Deutschland

Trockenschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
UV-Transilluminator	Biometra BioDoc Analyze, Göttingen, Deutschland
Waage	Ohaus, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
Zentrifugen (AK15, 1-15 PK)	Sigma, München, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Brand (Wertheim), Nunc/Thermo Fisher Scientific (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Ansell (Brüssel, Belgien), Braun (Melsungen), Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickenhäuser), Eppendorf (Hamburg) oder Corning (Kaiserslautern) bezogen.

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bis-acrylamid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agar	Life Technologies/Thermo Fisher (Darmstadt, Deutschland)
Agarose	Genaxxon (Ulm, Deutschland)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Borsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Calciumchlorid * 2 H ₂ O	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Coelenterazin 400a	Nanolight Inc. (Pinetop, AZ, USA)
D-Glukose * H ₂ O	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DMSO	Merck (Darmstadt, Deutschland)
EDTA	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Iso-Propanol	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Kalium-dihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Luria Broth (LB)	Life Technologies/Thermo Fisher (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchlorid * 7 H ₂ O	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Rekombinantes humanes VEGF	Acro Biosystems, Newark USA
Salzsäure 37 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
SDS	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TEMED	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tetracyclin	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
TMB-Substrat	Cell Signaling, Frankfurt Deutschland
Tris-NH ₃	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bezogen.

2.1.4 Software

Die aufgeführte Software wurde zur Auswertung von DNA- und Aminosäure-Sequenzen sowie zur statistischen Auswertung von Messergebnissen benutzt.

Software	Hersteller
Chromas Lite	Technelysium, Brisbane, Australien
FinchTV	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
VektorNTI	Thermo Fisher, Darmstadt, Deutschland
SigmaPlot	Systat, Erkrath, Deutschland

2.1.5 Enzyme und Antikörper

2.1.5.1 Enzyme

Enzym	Hersteller
Phusion® High-Fidelity Polymerase	Life Technologies/Thermo Fisher (Darmstadt, Deutschland)
T4 DNA Ligase	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
Antarctic Phosphatase	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
InFusion® Rekombinase	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
AvaI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
BamHI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
BsaI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
EcoRI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
EcoRV (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
HindIII (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
KpnI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
NcoI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
NheI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
PstI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
SalI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
SmaI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
SpeI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)
XhoI (Restriktionsenzym)	NEB (Frankfurt a. M., Deutschland)

2.1.5.2 Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller
Anti-Renilla Luciferase	Rabbit	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-GAPDH	Rabbit	Cell Signalling (Frankfurt, Deutschland)

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller
Anti-Rabbit-IgG-HRP	Goat	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)
Anti-Human-IgG-HRP	Mouse	Rockland Inc. (Limerick, PA, USA)

2.1.6 Plasmide

Plasmid	Hersteller
pBluescript SK(+)	Stratagene, Berlin, Deutschland
pIREShrGFP1a	Stratagene, Berlin, Deutschland
pBAD-RLuc8	Prof. S.S. Gambhir, Stanford, USA
pTagGFP2-N	Evrogen, Moskau, Russland

2.1.7 AAV Produktion

Die Produktion der beiden viralen Vektoren AAV2/5-TetOn-Ra02 und AAV-CMV-eGFP wurde von der Universität Nantes, INSERM UMR 1089 übernommen. Die Konzentrationen der Vektorlösungen wurden mit $8,9 \times 10^{12}$ vg/ml und $8,2 \times 10^{12}$ vg/ml bestimmt.

2.1.8 DNA- und Protein-Größenstandards

Als DNA Größenstandard wurde die 1 kbp DNA Ladder von Fermentas (St.Leon-Roth, Deutschland) benutzt, als Protein Größenstandard wurde die Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.1.9 Kit Systeme

Kit	Hersteller
InFusion [®] HD Cloning Kit	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
PCR Clean-Up and Gel Extraction Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Lipofectamine LTX Transfection Kit	Invitrogen/Thermo Scientific (Darmstadt, Deutschland)
ECL Western Detection Kit	Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK)

2.1.10 Antibiotika in Bakterienkulturen

Antibiotika	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml

2.1.11 Organismen

Bakterienstämme

Nachfolgend sind die, bei Klonierungen, eingesetzten *E.coli* Stämme aufgeführt.

<i>E.coli</i> Stamm	Marker
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]
Stellar	F-, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA - argF) U169, Δ (mrr - hsdRMS - mcrBC), ΔmcrA, λ-

Eukaryotische Zellen

Nachfolgend werden alle verwendeten humanen Zelllinien aufgelistet die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Alle Zelllinien wurden von ATCC (American Type Culture Collection) bzw. deren Distributor LGC Standards geordert.

Zelllinie

HEK293 (ATCC: CRL-1573)	Humane embryonale Nierenzelllinie
HEK293-T (ATCC: CRL-3216)	Humane embryonale Nierenzelllinie
HUVEC (ATCC: CRL-1730)	Humane Endothelzelllinie Nabelschnur
HELA (ATCC: CCL-2)	Humanes Cervixkarzinom Zelllinie

2.1.12 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden extern, von der Firma Metabion (Planegg) synthetisiert. Primer für Mutagenesen (Deletion, Insertion, Mutation) wurden an den 5'-Enden phosphoryliert um das entstehende PCR Produkt direkt ligieren zu können. Sequenzierprimer wurden mit „Seq“ benannt.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
pLH3xGlyf2	GCC GCC GCC GCA TTC ACC TCG ATT GAA AGA
pLH3xGlyr2	GGA GGA GGA GAG GTG CAG CTC GTC GAA AGT
pLH5xProf1	CGG TGG CGG AGG TGG GCA TTC ACC TCG ATT GAA AGA
pLHRRWf1	CGG AGG TGG GCA TTC ACC TCG ATT GAA AGA
DelkapRa02f1	ATG GAT ATT CAG CTG ACC CAG AGC CCG
DelkapRa02r1	GCT GCA TGC GAA TTC GGA TCC GCC CGG GCT
InFRa02f1	CTG AAG AAC GAG CAG GAT ATT CAG CTG ACC CAG AGC CCG
InFRa02r1	CAC CTT GGA AGC CAT GCT GCA TGC GAA TTC GGA TCC GCC
Ra02linf1	GAG ATG TGT CTT GTC GCA GGA T
Ra02linr1	TGA TGG AGG GTC GAC ACT AGT TCA
RLuc8f1	ATG GCT TCC AAG GTG TAC GAC CCC GAG
RLuc8r1	CTG CTC GTT CTT CAG CAC GCG CT
GFP2f1	GAC AAG ACA CAT CTC CAG CGG GGG CGA GGA GCT GTT C
GFP2r1	GTC GAC CCT CCA TCA CCT GTA CAG CTC GTC CAT GCC
RLuc8Glyf1	GGA GGA GAC ATA CAG CTG ACT CAG TCT
RLuc8Glyr1	TCC TCC CTG CTC GTT CTT CAG CAC GCG
GFP2Glyf1	GGA GGA AGC GGG GGC GAG GAG CTG TTC
GFP2Glyr1	TCC TCC GAG ATG TGT CTT GTC GCA GGA
GFP2Prof1	CGG GAG ATG TGT CTT GTC GCA GGA
GFP2Pror1	AGC GGG GGC GAG GAG CTG TTC
RLuc8Prof1	CTG CTC GTT CTT CAG CAC GCG
RLuc8Pror1	CCA GAC ATA CAG CTG ACT CAG TCT
SeqGly	TGC CTT GGA CAT TTG GAC AAG
SeqRRG1	AAG AAG TTC CCT AAC ACC GAG TT
SeqRRG2	CAA GTG TGG TTT GCC TTC TCA ACA
SeqRRG3	TGG CTA TGA CTT CAC ACA CTA TGG
SeqRRG4	TGA CAT CGA GGA GGA TAT CGC
SeqRRG5	AGC GAA CTC CTC AGG CTC CAG

SeqRRG6	TGC TAC GGC ATC CAG TGC TTC
SeqRRG7	TCT TGT ACT TGC CGT CGT CCT
SeqRRG8	CTC AAG GGC AAG GAC TTC AAG
SeqRRG9	GGC CCC GAG CTG AAG GAT TTC
SeqRRG10	GGA CTC GAT GAA CAG CTT AGG

2.1.13 Kulturmedien

Medien für eukaryotische Zellen

HEK293, HEK293-T und HELA Zelllinien wurden in DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium), supplementiert mit L-Glutamin (2 mM), Penicillin/Streptomycin (200 U/ml/0,2 mg/ml) und FCS (10 %), kultiviert.

Die HUVEC Zelllinie wurde in M200 Endothelzellmedium, supplementiert mit Hydrocortison (1,0 µg/ml), hEGF (10,0 ng/ml), bFGF (3,0 ng/ml) Heparin (10 µg/ml), Gentamycin/Amphotericin und FKS (2 % (v/v)) kultiviert.

Einfriermedium wurde benutzt um eukaryotische Zellen für einen längeren Zeitraum bei –80°C zu lagern.

Einfriermedium

DMSO	10 %
FKS	90 %

Bakterienmedien

Die Medien für *E.coli* wurden mit Fertigmischungen angesetzt und anschließend autoklaviert. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium (Luria Broth) oder auf LB-Agar, bei Transformationen wurde fertig gemischtes, steriles SOC-Medium (Super Optimal Broth mit Katabolitrepression durch Glukose) benutzt.

LB-Medium

Luria-Broth Base 25,0 g
ad 1000 ml mit ddH₂O

LB-Agar

Luria-Broth Base 12,5 g
Luria-Broth Agar 7,5 g
ad 500 ml mit ddH₂O

2.1.14 Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer

10x Phosphatpuffer (PBS)

NaCl 80,0 g
KCl 2,0 g
Na₂HPO₄ 14,4 g
KH₂PO₄ 2,4 g
ad 1000 ml mit ddH₂O, pH 7,4 mit HCl

Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

10x TBE Puffer

Tris-NH₃ 121,0 g
Borsäure 51,5 g
EDTA 3,5 g
ad 1000 ml mit ddH₂O

Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

1 M Tris Puffer, pH 6,8

Tris-NH₃ 12,1 g
ad 100 ml mit ddH₂O, pH 6,8 mit HCl

0,5 M Tris Puffer, pH 6,8

Tris-NH₃ 30,3 g
ad 500 ml mit ddH₂O, pH 6,8 mit HCl

1,5 M Tris Puffer, pH 8,8

Tris-NH₃ 90,8 g
ad 500 ml mit ddH₂O, pH 8,8 mit HCl

10x SDS-PAGE Laufpuffer

Tris-NH₃ 30,3 g
Glyzin 144 g
20 % SDS 50 ml
ad 1000 ml mit ddH₂O

5x Laemmli Probenpuffer (nicht reduzierend)

SDS 1,0 g
Glycerol 5,0 ml
1 M Tris Puffer, pH 6,8 3,0 ml
Bromphenolblau 0,05 g
ddH₂O 2,0 ml

5x Laemmli Probenpuffer (reduzierend)

5x Laemmli Probenpuffer 500 µl
β-Mercaptoethanol 25 µl

Die Probenpuffer wurden im Verhältnis 1:4 mit den zu analysierenden Proben vermischt.

Acryamid-Gele	10 % Trenngel (25 ml)	4 % Sammelgel (10 ml)
1,5 M Tris/HCl; pH 8,8	6,25 ml	-----
0,5 M Tris/HCl; pH 6,8	-----	5,0 ml
20 % SDS	125 µl	50 µl
30 % Acrylamid (37,5:1)	9,0 ml	2,2 ml
ddH ₂ O	9,75 ml	2,8 ml
10 % APS	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	15 µl

Puffer und Lösungen für Western Blots

20% SDS-Lösung

SDS 50 g
ad 250 ml mit ddH₂O

10x Transferpuffer

Tris-NH₃ 30,3 g
Glyzin 144 g
20% SDS 50 ml
ad 1000 ml mit ddH₂O

1x Transferpuffer

10x Transferpuffer 100 ml
Methanol 200 ml
ad 1000 ml mit ddH₂O

Ponceau-S Lösung

0,1 % (w/v) in 5 % Essigsäure

10x TBS, pH 7,6

Tris-NH₃ 24,2 g
20% SDS 80 ml

TBS-T20 (Waschpuffer II)

Tween 20 0,5 ml
ad 1000ml mit 1x TBS

TBS-T100 (Waschpuffer I)

Triton-X 100 1,0 ml
ad 1000 ml mit 1x TBS

Blockierlösung

Magermilchpulver 3,0 g
ad 1000 ml mit 1x TBS

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierungen

Restriktions-Klonierung

Bei der Restriktions-Klonierung wurden Restriktionsschnittstellen verwendet um DNA Fragmente in Plasmidvektoren zu integrieren. Hierfür war es nötig die beiden geschnittenen DNA Fragmente zu reinigen und zu dephosphorylieren, bevor man diese mit Hilfe einer Ligase verknüpft und im Anschluss in *E.coli* transformieren konnte.

InFusion[®]-Klonierung

Die InFusion[®]-Klonierungsstrategie wurde verwendet, um DNA Fragmente in Plasmidvektoren zu integrieren, wenn keine geeigneten Restriktionsschnittstellen vorhanden waren. Der zirkuläre Plasmidvektor wurde mit Hilfe der PCR und zwei gegenläufigen Primern linearisiert. Das zu klonierende DNA Fragment wurde PCR amplifiziert mit Primern die zusätzliche 15 bp Überhänge anfügten, komplementär zu den Enden des linearisierten Plasmidvektors. Diese Strategie verwendet statt einer Ligase eine Rekombinase die terminale homologe Sequenzen erkennen und verknüpfen kann. Anschließend konnten die entstandenen Konstrukte in *E.coli* transformiert werden.

Blunt End-Klonierung

Diese Strategie wurde alternativ zu InFusion[®]-Klonierung verwendet. Auch hier wurde der Plasmidvektor mit Hilfe der PCR und gegenläufigen Primern amplifiziert. Auch das DNA Fragment wurde mit Hilfe der PCR amplifiziert, aber ohne DNA Überhänge. Lediglich das 5'-Ende der beiden Primer war phosphoryliert. Somit konnten der lineare Plasmidvektor und das amplifizierte 5'-Phosphorylierte Fragment mit einer Ligase verknüpft und transformiert werden.

2.2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen Amplifikation von spezifischen DNA Fragmenten. Die PCR besteht aus drei Schritten, die Denaturierung der doppelsträngigen DNA (Template DNA) in Einzelstränge bei 98 °C, der Hybridisierung der einzelsträngigen DNA mit jeweils einem der beiden PCR Primern bei Temperaturen die von den Schmelztemperaturen der beiden Primer abhängig sind und der Elongation, d.h. der Zweitstrangsynthese, durch den Einbau komplementärer Nukleotide ausgehend von den Primern als Startermoleküle in 3'- Richtung der DNA durch die Polymerase bei 72°C. Es wurde ausschließlich die Phusion[®] Polymerase (siehe: 2.1.5.1) mit „proof-reading“ Aktivität benutzt.

PCR für die Blunt-End Klonierung

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR dazu benutzt, spezifische DNA-Inserts zur Blunt-End Klonierung zu amplifizieren. Hierfür mussten die beiden Primer am 5'-Ende phosphoryliert sein.

PCR für die InFusion[®] Klonierung

Um spezifische DNA-Inserts für die InFusion[®]-Klonierung zu amplifizieren, wurden an die 5'-Enden beider PCR Primer 15 bp lange Sequenzen angefügt, die homolog zu den beiden Enden des Klonierungsvektors sind.

PCR zur Amplifikation der Klonierungsvektoren

Lagen im Klonierungsvektor keine geeigneten Schnittstellen für Restriktionsenzyme vor, wurde der Klonierungsvektor mit zwei gegenläufigen Primern linearisiert und anschließend zur Ligation/Rekombination mit dem entsprechenden DNA-Insert eingesetzt. Da die beiden gegenläufigen Primer nicht 5'-Phosphoryliert waren, konnte eine Religation des Vektors ausgeschlossen werden.

PCR zur Insertion von Peptidlinkern

Zur gerichteten Insertion der Peptidlinker zwischen die einzelnen Domänen der Biosensorkonstrukte wurde ebenfalls mit gegenläufigen Primern, jeweils am 5'-Ende verlängert mit Sequenzen und zusätzlicher Phosphorylierung, codierend für die entsprechenden Linker Aminosäuren amplifiziert. Das so hergestellte, lineare und phosphorylierte DNA Molekül konnte anschließend direkt ligiert werden.

Ansatz (20 µl)

Plasmid-DNA (~ 5ng)	1,0 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,3 µl
5x HF-Puffer	4,0 µl
dNTP's (10mM)	0,4 µl
Primer I (10pmol/µl)	1,0 µl
Primer II (10pmol/µl)	1,0 µl
ddH ₂ O	12,1 µl
Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl

PCR-Programme

3-step Programm

98 °C	30 s
98 °C	7 s
55–71 °C	7 s
72 °C	210 s
72 °C	600 s
10 °C	600 s

2-step Programm

98 °C	30 s
98 °C	7 s
72 °C	210 s
72 °C	600 s
10 °C	600 s

2.2.2.2 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme oder auch Restriktionsendonukleasen schneiden sehr spezifisch, doppelsträngige DNA. Meist werden Typ II Restriktionsenzyme verwendet, die palindromische Erkennungssequenzen besitzen (siehe: 2.1.5.1). Der Strangbruch kann hier zwei verschiedenen Formen erzeugen, sogenannte „Blunt-Ends“ (stumpfe Enden), d.h. die DNA wird auf beiden Strängen an gleicher Position geschnitten, oder „Sticky-Ends“ (klebrige Enden), d.h. der Bruch findet an verschiedenen Position statt und es kommt somit zu

einzelsträngigen Überhängen. Die entsprechenden Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Ansatz (10 µl)

DNA	x µl
10x Restriktionspuffer	1,0 µl
Restriktionsenzym I	1,0 µl
(Restriktionsenzym II)	1,0 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

2.2.2.3 Dephosphorylierung von DNA Fragmenten

Um 5'-Phosphat Gruppen linearer DNA zu entfernen (Dephosphorylierung) wurde die Antarktische Phosphatase (siehe: 2.1.5.1) nach Herstellerangaben verwendet. Die Dephosphorylierung dient der Verhinderung der Religation des linearen DNA Fragmentes. Der Ansatz wurde hierfür 15 min. bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde die Phosphatase 5 min. bei 70 °C inaktiviert.

Ansatz (20µl)

DNA (150 ng)	x µl
10x Ant.Phos. Puffer	1,5 µl
Anarktische Phosphatase	1,0 µl
ddH ₂ O	ad 15 µl

2.2.2.4 Ligation von DNA Molekülen

Zur Ligation von DNA Fragmenten wurde die T4 DNA Ligase (siehe: 2.1.5.1) verwendet. Die T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden doppelsträngiger DNA. Die Ligationsansätze wurden nach Herstellerangaben hergestellt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei der Ligationen von linearem Klonierungsvektor mit einem DNA Insert wurden standardmäßig 100 ng des Vektors mit 50–75 ng des DNA Insert inkubiert, bei Mutagenesen 100 ng des linearen, zu ligierenden Vektors.

Ansatz (20 µl)

Vektor (100 ng)	x µl
(Insert (50–75 ng))	y µl
10x T4 DNA Ligase Puffer	2,0 µl
T4 DNA Ligase	1,0 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

2.2.2.5 Sequenzierung von Plasmidklonen

Die Sequenzierung der hergestellten Plasmidklone wurde von Microsynth AG (Lindau, Deutschland) durchgeführt und mit pDraw, FinchTV und Vektor NTI ausgewertet.

Ansatz (15 µl)

Plasmid DNA	6-12 µl
Primer (10 pmol/µl)	3,0 µl
ddH ₂ O	ad 15 µl

2.2.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Unbekannte Konzentrationen von DNA Proben wurden photometrisch nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt. Lagen die gemessenen Absorptionswerte oberhalb des linearen Bereichs von 0,1-1,0 wurden die Proben verdünnt.

2.2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente der Auftrennung von PCR Produkten oder hydrolysierten Plasmiden der Größe nach im elektrischen Feld. Es wurden 1,0 %ige Agarosegele mit 5 µl GelRed gegossen und die DNA bei 100 V für 60 min. in 1x TBE Puffer aufgetrennt. Zuvor wurden die zu analysierenden Proben mit 5x Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Um die Größen vergleichen zu können wurde ein 1 kbp DNA Marker (siehe: 2.1.8) verwendet. Die Auswertung der Gele erfolgte optisch mit Hilfe eines UV-Transilluminators.

2.2.2.8 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Nach erfolgter Agarosegelelektrophorese wurden entsprechende Banden auf dem UV-Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Extraktion der DNA aus dem Gel wurde das PCR Clean-Up and Gel Extraction Kit (siehe: 2.1.9) nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurde die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt.

2.2.3 Arbeiten mit Zellen

2.2.3.1 Arbeiten mit Bakterien

Herstellung elektrokompetenter *E.coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter *E.coli* wurde eine 5 ml LB-Übernachtskultur (Tetracyclin-Konz.: 10 µg/ml) mit 5 µl eines Glycerolstocks beimpft und bei 37 °C, 180 rpm für 16 h inkubiert. Die Tetracyclin haltige Hauptkultur (200 ml) wurde am darauffolgenden Tag mit der Übernachtskultur beimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,6–0,8 bei 37 °C, 180 rpm weiter inkubiert. Nach dem aliquotieren in 50 ml Falcon Tubes wurde die Kultur für 30 min. auf Eis vorgekühlt und dann bei 4 °C, 5000 g für 10 min. abzentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde in 50 ml HEPES Puffer (1 mM) resuspendiert und anschließend wieder wie oben bereits beschrieben, abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde anschließend ein weiteres Mal mit 25 ml HEPES Puffer wiederholt. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten mit 10 ml und 5 ml 10%iger Glycerinlösung wurde das Bakterienpellet in 0,5 ml Glycerinlösung resuspendiert, zu je 50 µl aliquotiert und bis zur späteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

Transformation elektrokompetenter *E.coli*

Elektrokompetente *E.coli* wurden auf Eis aufgetaut. Der Ligationsansatz (1–4 µl) wurde in die aufgetauten *E.coli* (50 µl) pipettiert und für 15 min. auf Eis inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und anschließend elektroporiert. Direkt im Anschluss wurde der elektroporierte Ansatz mit 1 ml SOC-Medium aus der Küvette gespült und bei 37 °C, 180 rpm für mindestens 45 min. inkubiert. Um den Ansatz zu konzentrieren wurde dieser nach erfolgter Inkubation bei 11000 x g, 4 °C für 5 min. zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden 800 µl abgenommen und verworfen. Der

restliche Ansatz wurde resuspendiert und komplett auf LB-Agar ausplattiert. Die LB-Agar Platten enthielten das zur Selektion notwendige Antibiotikum. Die beimpften LB-Agar Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Herstellung von Glycerolstocks

Glycerolstocks wurden zur Lagerung von Bakterienkulturen bei –80°C hergestellt. Hierfür wurden 700 µl Bakterienkultur mit 300 µl sterilem Glycerol vermischt und eingefroren.

Beimpfen von LB-Flüssigkulturen

Das Beimpfen von LB-Flüssigkulturen im kleinen (5 ml) und im großen Maßstab (100 ml) erfolgte unter sterilen Bedingungen mit autoklaviertem LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Plasmide mit Ampicillin Resistenz verwendet, deswegen wurde das Ampicillin aus einer Stock-Lösung (100 mg/ml) 1:1000 in LB-Medium verdünnt (100 µg/ml). Wurden LB-Flüssigkulturen mit auf LB-Agar gewachsenen Bakterienklonen beimpft, wurden sterile Pipettenspitzen verwendet. Wurden LB-Flüssigkulturen aus Glycerolstocks beimpft, wurde ca. 5 µl des Stocks verwendet.

2.2.3.1.1 Isolation von Plasmid DNA

Mini-Preparation mit Plasmid Kit

Für die Isolation von Plasmid DNA aus LB-Flüssigkulturen wurde das kommerziell erhältliche Plasmid Mini Kit (siehe: 2.1.9) verwendet. Das Kit basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien mit Klärung des Plasmid haltigen Überstandes und anschließender Säulenaufreinigung. Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet, lediglich der Elutionsschritt wurde nicht wie im Kit beschrieben mit TE-Puffer durchgeführt, sondern mit identischem Volumen ddH₂O.

Mini-Preparation mit Puffern

Alternativ zum kommerziell erhältlichen Plasmid Mini-Kit wurden die Plasmide ohne Säulenaufreinigung isoliert. Das Prinzip der alkalischen Lyse kam auch hier zum Einsatz. Nach der Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation wurde der Überstand dazu verwendet um die Plasmid DNA mit Hilfe von Isopropanol zu präzipitieren und per

Zentrifugation zu pelletieren. Das DNA Pellet wurde anschließend einmal mit 70 %igen Ethanol gewaschen und dann in ddH₂O gelöst.

Maxi-Preparation von Plasmid DNA

Um hochreine Plasmid DNA mit größeren Volumens und höherer DNA Konzentration zu erhalten wurde das Plasmid Maxi Kit (siehe: 2.1.9) nach Herstellerangaben verwendet. Lediglich das lösen des gereinigten DNA Pellets erfolgte nicht mit TE-Puffer sondern in ddH₂O.

2.2.3.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Kultivierung von HEK293, HEK293-T und HELA

Die adhären Zellen HEK293, HEK293-T und HELA wurden in supplementiertem DMEM (siehe: 2.1.13) bei einer konstanten Temperatur von 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das gesamte Volumen (1,0 ml) der gelieferten und eingefrorenen Zellen wurde in 9,0 ml Kulturmedium verdünnt und in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Nach 24 h wurde das Kulturmedium durch frisches Wachstumsmedium ersetzt um Reste des Einfriermediums zu entfernen. Die Zellen wurden standardmäßig alle vier Tage mit 1,0 ml Accutase abgelöst, mit zusätzlichen 9,0 ml Kulturmedium suspendiert und 1:10 geteilt, d.h. 1,0 ml der Suspension wurde in eine frische Zellkulturschale überführt und wieder mit 9,0 ml Kulturmedium aufgefüllt. Alle Zelltypen wurden bis maximal Passage 25 verwendet.

Kultivierung von HUVEC Zellen

HUVEC Zellen wurden in M200 Endothelzellmedium (siehe: 2.1.13) im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Die gelieferten Zellen wurden im Wasserbad aufgetaut und mit 9,0 ml M200 vermischt. Nach 24 h wurde das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt um nicht angeheftete Zellen und Reste des Einfriermediums zu entfernen. Die Zellen wurden alle 4 Tage geteilt. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und mit 1,0 ml Accutase von der Zellkulturschale abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in 9,0 ml M200 resuspendiert. Jeweils 1,0 ml dieser Zellsuspension wurde in frische Zellkulturschalen übertragen und wiederum mit 9,0 ml M200 aufgefüllt. Das

Kulturmedium wurde alle 2 Tage durch frisches Medium ersetzt. HUVEC Zellen wurden bis maximal Passage 20 verwendet.

Einfrieren von eukaryotischen Zellen

Um eukaryotische Zellen einzufrieren, wurde das Kulturmedium abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden einmal mit 1x PBS gewaschen und mit 1,0 ml Accutase abgelöst. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten wurden sie mit 9,0 ml Kulturmedium resuspendiert und in ein 15 ml Falcon übertragen. Nach einer Zentrifugation bei 280x g, 4 °C für 10 min. wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in Einfriermedium (siehe: 2.1.13) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Einfrier Röhrchen übertragen und für zwei Tage in Isopropanol bei –80 °C gelagert. Nach diesen zwei Tagen wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei –196 °C gelagert.

Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion bezeichnet das Einführen von DNA in eukaryotische Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Transfektionsmethoden, die Lipofektion und die Polyethylenimin (PEI) Transfektion, verwendet. Bei der Lipofektion wurde auf das kommerziell erhältliche Lipofectamin LTX zurückgegriffen, während für die PEI sämtliche Komponenten selbst hergestellt wurden. Vor der eigentlichen Transfektion wurde das Kulturmedium der Zellen durch frisches ersetzt, um die Zellteilung anzuregen. Die Ansätze der beiden Transfektionen wurden wie folgt angesetzt.

Lipofektion		PEI Transfektion	
DNA	4,0 µg	DNA	4,0 µg
PLUS Reagent	7,5 µl	NaCl (150 mM)	150 µl
Lipofectamine LTX	22,5 µl	PEI (0,1 mg/ml)	200 µl

Die Ansätze wurden anschließend für 10 min. bei RT inkubiert und tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und für 4–6 h im Zellkulturinkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Kulturmedium durch frisches ersetzt.

Transduktion eukaryotischer Zellen

Als Transduktion wird die virusvermittelte Infektion eukaryotischer Zellen mit einem rekombinanten viralen Vektor bezeichnet. In dieser Arbeit wurden AAV zur Transduktion verwendet. HELA Zellen wurden einen Tag vor der Transduktion ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei einer Konfluenz von 60–80 % wurde das Kulturmedium abgenommen und kurzzeitig mit 1 ml 1x PBS ersetzt. Im Anschluss wurden die Zellen mit UV Licht (30 J/m²) bestrahlt um die zelleigenen Reparaturmechanismen und somit auch die Zweitstrangsynthese anzuregen, da bei AAV als einzelsträngige Viren, dieser Schritt den limitierenden Faktor bei der Expression von rekombinanten Proteinen nach AAV vermitteltem Gentransfer darstellt. Die Intensität der Bestrahlung wurde so eingestellt, dass etwa 50 % der Zellen absterben. Das Viruskonstrukt AAV2/5-TetOn-Ra02 und der als Transduktionskontrolle verwendete AAV2/5-CMV-eGFP wurden mit einer MOI von 1:50000 vg/Zelle in Serumreduzierten (2 % FKS) DMEM verdünnt und auf die Zellen pipettiert. Die Transduktion erfolgte für 4 h bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend wurde das virushaltige Medium durch Kulturmedium ersetzt und für 4 weitere Tage im Brutschrank inkubiert.

Fluoreszenz Mikroskopie

Die Fluoreszenz Mikroskopie wurde in dieser Arbeit benutzt um die Fusion des GFP2 an den Biosensor zu kontrollieren. Hierfür wurden die Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und nach 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ ausgewertet. Die Exposition der Zellen lag stets unter einer Sekunde.

Doxycyclin Induktion der TetOn abhängigen Transgenexpression in eukaryotischen Zellen

Zum Nachweis der TetOn abhängigen Transgenexpression nach der Transduktion mit AAV2/5-TetOn-Ra02 und der Transfektion mit SSV9-TetOn-Ra02 wurden verschiedene Konzentrationen von Doxycyclin in DMEM verdünnt und auf die entsprechenden Zellen pipettiert. Das Doxycyclin haltige Medium wurde täglich ausgetauscht.

HUVEC Migration Assay

Das HUVEC Migration Assay wurde benutzt um die biologische, inhibitorische Aktivität der verschiedenen Ranibizumabvarianten (Ra01–Ra05) auf das VEGF induzierte Wanderungsverhalten der endothelialen Zelllinie zu untersuchen. Hierfür wurden HUVEC in

24-well Platten ausplattiert und in M200 Endothelzellmedium (siehe: 2.1.13) bis zur Konfluenz im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Bei Konfluenz wurde ein zellfreier Bereich mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze erzeugt und mit zwei Waschschrritten mit 1x PBS abgelöste Zellen entfernt. M200 Endothelzellmedium jedoch mit VEGF (10 ng/ml) und aussteigende Konzentrationen der jeweiligen Ranibizumabvarianten zu den Zellen gegeben und für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Abstand, abhängig von inhibitorischen Aktivität der Ranibizumabvarianten, zwischen den beiden Zellfronten an drei unterschiedlichen Stellen digital gemessen.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 Präparation von Gesamtproteinextrakten

Zur Präparation von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen und einmal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde 150 µl des 1x Lysispuffers (siehe: 2.1.14) auf die Zellen pipettiert und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, durch auf- und ab-pipettiert resuspendiert und in ein 1,5 ml Tube übertragen. Nach zwei Einfrier-Auftau Zyklen in flüssigem Stickstoff wurden die Zelltrümmer bei 17968x g, 4 °C für 5 min. abzentrifugiert. Der Proteinhaltige Überstand wurde in ein frisches Tube übertragen und bis zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nach deren Größe. Die diskontinuierliche SDS-Page besteht aus zwei unterschiedlichen Gelen, dem Sammelgel und dem Trenngel. Im Sammelgel werden die Proteine der Proben konzentriert um dann im Trenngel aufgetrennt zu werden. Es wurden in dieser Arbeit ausschließlich Gele mit 4 %igen Sammelgelen und 10 %igen Trenngelen verwendet. Die proteinhaltigen Lysatproben wurden mit reduzierendem (5 % β-Mercaptoethanol) 5x Probenpuffer versetzt, für 10 min. bei 96 °C denaturiert und auf des SDS-Gel geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 150 V für 75 min. in 1x Laufpuffer. Als Größenstandard wurden 15 µl des Spectra Multicolor BR Protein Ladder (siehe: 2.1.8) verwendet. Anschließend wurden die Gele für Western-Blots verwendet.

2.2.4.3 Western-Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels „semi-dry“ Verfahren auf eine Nitrocellulose Membran übertragen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern spezifisch nachgewiesen. Der Western-Blot wurde aus einer Lage dickem Whatmann-Papier, zwei Lagen dünnem Whatmann-Papier, der Nitrocellulose Membran, dem Gel der SDS-PAGE, wieder gefolgt von zwei Lagen dünnem und einer Lage dickem Whatmann-Papier aufgebaut. Sämtliche Bestandteile des Blots wurden zuvor in 1x Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei aufgebaut. Der Transfer erfolgte in einem Blotter bei $1,2 \text{ mA/cm}^2$ für 60 min. Der Erfolg des Blots wurde mit Hilfe von 0,1 %iger Ponceau-S Lösung kontrolliert. Nach der Entfärbung mit ddH₂O wurde die Nitrocellulose Membran entnommen und über Nacht in Blockierlösung inkubiert um die freien Bindungsstellen der Nitrocellulose Membran zu sättigen. Nach einmaligem Waschen in Waschpuffer I (siehe: 2.1.14) und zweimaligem Waschen in Waschpuffer II (siehe: 2.1.14), für je 15 min., erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper verdünnt in Blockierlösung (1:1500). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C oder bei Raumtemperatur für 120 min. Die Nitrocellulose Membran wurde anschließend gewaschen um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Darauf folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in 1x TBS (1:12000) für 60–90 min. gefolgt von drei Waschschritten. Zur Detektion der Peroxidase wurde das ECL Plus Western Blotting Reagent Kit (siehe: 2.1.9) nach Herstellerangaben verwendet. Die Detektionslösung (1,0 ml) wurde auf die Membran gegeben und für 5 min. inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die überschüssige Lösung entfernt, die Membran in einer Klarsichtfolie verpackt und in eine lichtundurchlässige Filmkassette gelegt. Die Detektion des Chemilumineszenzsignales erfolgte auf Hyperfilm ECL, abhängig von der Signalstärke für 3–15 min.

2.2.4.4 Enzyme-Linked-Imunosorbent-Assay (ELISA) Systeme

VEGF ELISA

Zur Konzentrationsbestimmung von VEGF wurde das Human VEGF Quantikine ELISA Kit nach Herstellerangaben verwendet. Eine Besonderheit dieses Kits liegt darin, dass es gebundenes VEGF nicht und somit nur freies, ungebundenes VEGF quantifiziert, da der im Kit enthaltene Fängerantikörper die VEGF Rezeptor Bindestellen erkennt, die auch von Anti-VEGF Molekülen gebunden werden.

Ranibizumab ELISA

Transparente 96-well Platten wurden mit rekombinanten, humanen VEGF (2,0 µg/ml) (siehe: 2.1.3) verdünnt in 1x Coating Puffer (siehe: 2.1.14) über Nacht für 16 h beschichtet. Der Überstand wurde verworfen und die einzelnen Wells dreimal mit Waschpuffer (siehe: 2.1.14) gewaschen. Darauf folgend wurden die freien Bindestellen der Wells mit Blockierlösung (siehe: 2.1.14) gesättigt und nach zweistündiger Inkubation bei RT dreimal mit Waschpuffer (siehe: 2.1.14) gewaschen. Lucentis[®] wurde in einer Konzentration von 0,98–62,5 ng/ml als Standard verwendet. Nach dem Waschen wurden die Proben, wie auch der Standard für 2 h, RT unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde der Detektionsantikörper (Anti-Human-IgG-HRP) gelöst in 1x TBS für 2 h bei RT und 300 rpm inkubiert. Nach einem letzten Waschen der Wells wurde das HRP Substrat TMB (siehe: 2.1.3) in die Wells pipettiert und nach einer 20 minütigen Inkubation die Stärke des Farbumschlags bei 450 nm im Multimode Plate Reader gemessen.

2.2.4.5 VEGF-Binde Assay

Um die konzentrationsabhängige VEGF Bindung der Ranibizumab Varianten (Ra01 und Ra02) zu bestimmen, wurde eine konstante Menge VEGF (250 pg/ml) verdünnt in DMEM Kulturmedium mit ansteigenden Konzentrationen der beiden Varianten Ra01 und Ra02 bei 37 °C für 1 h inkubiert. Dann wurde mit Hilfe des Quantikine VEGF ELISA Kits die Konzentration des freien, ungebunden VEGF bestimmt.

2.2.4.6 Luziferase Assay

Die Expression der Luziferase wurde durch ihre katalytische Aktivität nachgewiesen. Die entsprechenden Zelllysate (10 µl) wurden hierfür in weiße 96-well Lumineszenz Platten pipettiert. Zur Messung wurde der Lumineszenz Modus des Tecan Infinite Multimode Plateraders, mit automatischer Abschwächung und ohne Wellenlängenfilter, benutzt. Das in BRET Puffer (siehe: 2.1.14) verdünnte Substrat CLZ400a wurde über einen Injektor automatisch vor jeder Messung in die einzelnen Wells pipettiert (100 µl).

2.2.4.7 Spektrale Analyse des BRET

Um die Emissionsmaxima der verwendeten Biosensorkonstrukte sowie des Korrekturfaktors zu bestimmen, wurde ein spektraler Scan von 350–600 nm mit Hilfe des Lumineszenz Scan Modes des Multimode Plateraders durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 10 µl der entsprechenden Zellysate in weiße Lumineszenz 96-well Platten pipettiert. Nach Zugabe des in BRET Puffer (siehe: 2.1.14) verdünnten CLZ400a (100 µl) wurden die Lichtausbeuten in 1 nm Schritten, jeweils mit einer Bandweite von 20 nm gemessen.

2.2.4.8 BRET Assay

Zur Bestimmung der BRET Ratio wurden die Zellysate der entsprechenden Biosensoren und des Korrekturfaktors cF (je 20 µl) in weiße Lumineszenz 96-well Platten pipettiert. Nach automatischer Injektion des Substrates, gelöst in BRET Puffer (siehe: 2.1.14), wurden im Dual-Luminescence Mode des Plateraders die Lichtausbeuten in zwei Bereichen des Spektrums bestimmt. Die Emission der Luziferase wurde mit dem Filter „Lumi Magenta“ bestimmt. Dieser Filter erlaubt eine Transmission <450 nm, das Emissionsmaximum der Luziferase bei ~400 nm wird durch diesen Filter erfasst. Das Maximum, des durch die Luziferase angeregten GFP2, wird mit Hilfe der Filters „Lumi Green“ mit einer Transmission von etwa 500–550 nm erfasst. Aus den beiden korrespondierenden Emissionsmessungen wurden die Quotienten der Werte nach Gleichung (1) bestimmt. Um diesen Wert zu normalisieren, wurde der Korrekturfaktor herangezogen, der aus der Messung der Donor Luziferase ohne Akzeptorfluorophor bestand.

$$BRET\ Ratio = \frac{Biosensor\ Em(Green)}{Biosensor\ Em(Magenta)} - \frac{cF(Green)}{cF(Magenta)} \quad (1)$$

2.2.4.9 Kinetik der BRET Ratio

Zur Bestimmung der Kinetischen Eigenschaften der BRET Ratio der Biosensorvarianten wurde die Änderung der BRET Ratio über die Zeit gemessen. Hierfür wurden identische Mengen (20µl) jedes Biosensors in Lumineszenz Platten pipettiert und die BRET Ratio, nach Substratzugabe, in drei Minuten Schritten gemessen und errechnet.

2.2.4.10 VEGF induzierte BRET Änderung

Um die VEGF induzierte Änderung der BRET Ratio der Biosensoren zu messen, wurden identische Mengen (20 µl) jedes Biosensors mit einem seriell verdünnten VEGF Standard (10 µl) (100 fg/ml-10 ng/ml) vermischt und bei 4 °C unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Die Proben wurden in weiße Lumineszenz 96-well Platten pipettiert. Substrathaltiger BRET Assay Puffer (100 µl) wurde automatisch über den Injektor des Multimode Plate Readers injiziert. Die Lichtemissionen der RLuc8 und des Akzeptors GFP2 wurden mit den Filtern „Lumi Magenta“ und Lumi Green“ bestimmt. Die VEGF induzierte Änderung der BRET Ratio wurde durch Normalisierung, mit der negativen Kontrolle (QVEGF: 0,0 ng/ml) nach Formel (2) bestimmt.

$$BRET\ Ratio = \frac{Biosensor\ Em(Green)+VEGF}{Biosensor\ Em(Magenta)+VEGF} - \frac{Biosensor\ Em(Green)QVEGF}{Biosensor\ Em(Magenta)QVEGF} \quad (2)$$

2.2.5 Statistische Auswertung

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Experimente in Triplikaten gemessen. Es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente zur Ermittlung des Mittelwertes und Standardabweichung herangezogen. Der Paired t-test und ANOVA wurden zur statistischen Auswertung herangezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaPlot (siehe: 2.1.4). P-Werte ab <0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte ein Anti-VEGF scFab Molekül auf der Basis von Ranibizumab unter der Kontrolle des regulierbaren TetOn Systems hergestellt werden. Dazu sollten aus dem Fab Fragment Ranibizumab scFabs hergestellt werden, die als einzelne Moleküle exprimiert werden können. Die regulierbare Expression und die biologische Aktivität der scFabs sollten anschließend charakterisiert werden. Das so hergestellte Expressionskonstrukt sollte zudem klein genug sein, um in einen AAV verpackt werden zu können.

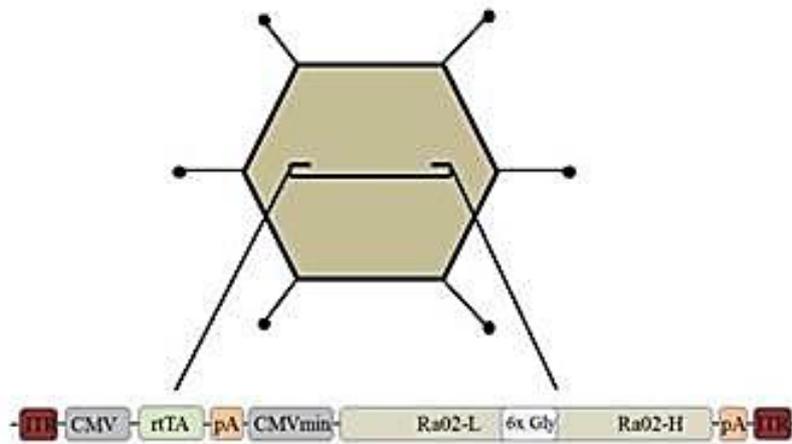


Abbildung 11: Herstellung eines Systems zur regulierbaren Anti-VEGF Expression nach AAV vermitteltem Gentransfer. Anti-VEGF Molekül unter der Kontrolle des TetOn Promotors verpackt in einen AAV.

3.1 Herstellung der Anti-VEGF Vektorkonstrukte

3.1.1 Herstellung des Anti-VEGF Fab Fragmentes Ra01

Die beiden Aminosäuresequenzen der leichten und der schweren Kette des Fab Fragmentes Ranibizumab wurden in ihre DNA Sequenz rücktranslatiert, für die Expression in eukaryotischen Zellen codonoptimiert und mit der sekretorischen IgG-Kappa Leader Sequenz fusioniert, zuständig für die Ausschleusung des exprimierten Proteins im sekretorischen Vesikel aus der Zelle. Anschließend wurden beide Sequenzen extern synthetisiert und in pBluescript SK(+) (siehe 2.1.6) subkloniert. Beide DNA Sequenzen wurden in den pIREShrGFP1a Vektor (siehe 2.1.6) kloniert, dabei wurde die leichte Kette über die Multiple Cloning Site (MCS) am 5'-Ende der IRES Sequenz (Internal Ribosomal Entry Site)

eingeführt (siehe Abbildung 12A). Die alleinige Expression der leichten Ranibizumab Kette bewirkt sowohl eine Ausschleusung von Monomeren mit einem Molekulargewicht von etwa 24 kDa, als auch eine von Homodimeren mit einem Molekulargewicht von ca. 48 kDa (siehe Abbildung 12B).

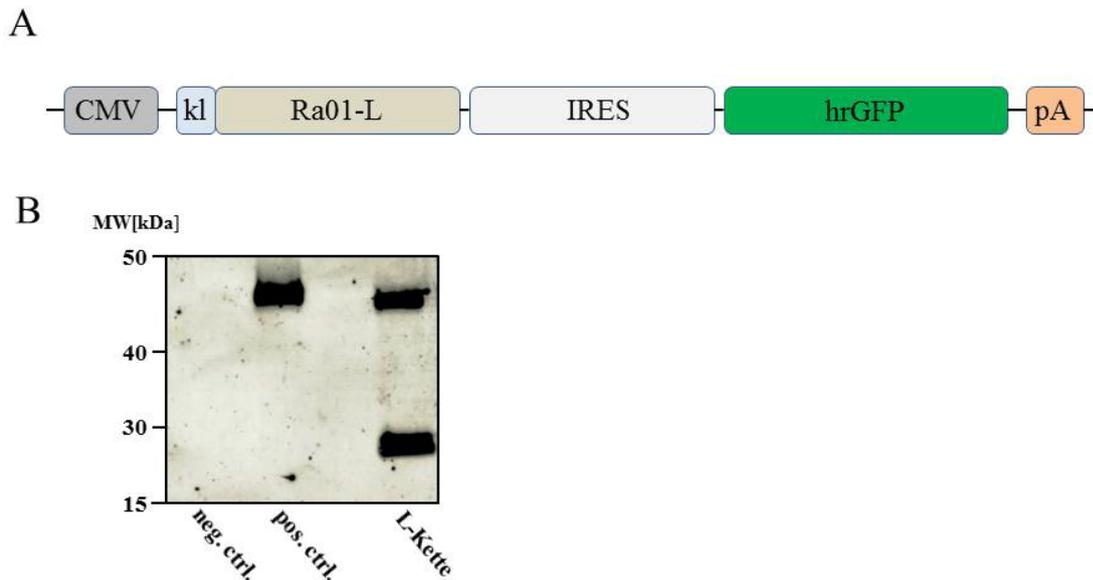


Abbildung 12: Expressionskontrolle leichte Fab Fragment Kette Ra01. (A) Expressionskonstrukt der leichten Ranibizumab Fab Fragment Kette unter der Kontrolle des CMV Promotors. (kl: kappa-leader Ausschleusungssequenz; pA: Polyadenylierungssequenz; IRES: Internal ribosomal entry site; Ra01-L: leichte Fab Fragment Kette Ranibizumab; CMV: Cytomegalie Virus Promotor; hrGFP: humanisiertes rekombinantes GFP). (B) Nachweis der exprimierten und aus den Zellen geschleusten leichten Fab Fragment Kette als Monomer und Homodimer. Als positive Kontrolle (pos. ctrl.) diente Lucentis[®], als negative Kontrolle (neg. ctrl.) der Überstand von nicht transfizierten Zellen (HEK293). (Antikörper: Anti-Human-IgG-HRP 1:10000)

Die schwere Kette wurde an Stelle des rhGFP am 3'-Ende des IRES kloniert (siehe Abbildung 13A). Die IRES bildet eine komplexe sekundär Struktur, die eine Bindung der Ribosomen und somit die Initiation der Translation erlaubt. Somit war es möglich, beide Ketten unter der Verwendung von nur einem Promotor, jedoch in einem Verhältnis von etwa 3:1, zu exprimieren. Im sekretorischen Vesikel werden funktionelle Moleküle verbunden mit einer intermolekularen Disulfidbrücke gebildet und aus der Zelle geschleust. Das exprimierte und aus den Zellen geschleuste Protein war im Western Blot durch die Verwendung eines Anti-Human-IgG-HRP Antikörpers (1:10000) mit einer molekularen Masse von 48 kDa, ebenso wie das kommerziell erhältliche Lucentis[®], als positive Kontrolle (48 kDa)

nachweisbar. Neben der entsprechenden Bande befand sich eine weitere immunreaktive Bande leicht niedrigeren Molekulargewichtes auf dem Blot (siehe Abbildung 13B).

A



B

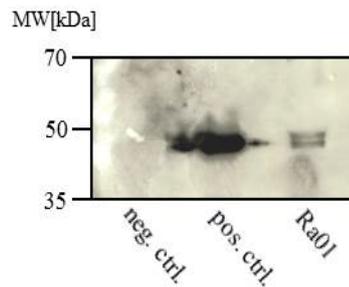


Abbildung 13: Expressionskontrolle Fab Fragment Ra01. (A) Expressionskonstrukt der leichten und schweren Kette des F(ab) Ranibizumab unter der Verwendung der IRES Sequenz zur gleichzeitigen Expression mit nur einem Promotor. (B) Expressionskontrolle zeigt neben dem Heterodimer Ra01 ein Homodimer leicht niedrigeren Molekulargewichtes. Als pos. ctrl. diente Lucentis[®], als neg. ctrl. der Überstand von nicht transfizierten Zellen (HEK293). (Antikörper: Anti-Human-IgG-HRP 1:10000)

3.1.2 Herstellung der Anti-VEGF scFab Ra02–Ra05

Um das unterschiedliche Expressionsverhältnis der beiden Ketten, welches durch die IRES Sequenz verursacht wird zu umgehen, wurden beiden Ketten mit Sequenzen codierend für verschiedene Peptidlinker verbunden. Hierfür wurden mit Hilfe der PCR die IRES Sequenz und die IgG-kappa leader Sequenz der schweren Fab Fragment Kette deletiert und gleichzeitig Überhänge codierend für verschiedene Peptidlinker inseriert (siehe Abbildung 14A). Somit wurden Moleküle (Ra02–Ra05) generiert die über einen einzigen, durchgehenden Leserahmen verfügen und somit auch als einzelnes Molekül exprimiert und auch aus der Zelle geschleust wurden. Die Analyse der Zellkulturüberstände im Western Blot zeigte für alle Moleküle einzelne immunreaktive Banden bei einem Molekulargewicht von 48 (siehe Abbildung 14B).

A



B

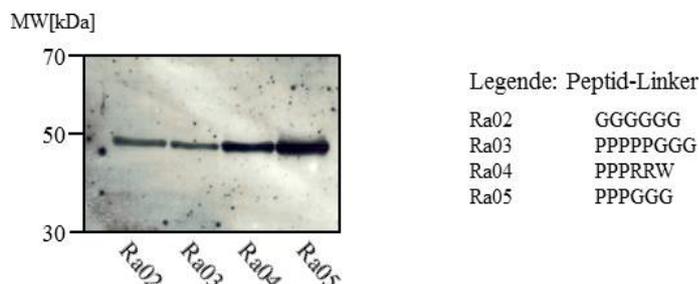


Abbildung 14: Expressionskontrolle scFab Ra02-Ra05. (A) Expressionskonstrukte der scFab Ra02-Ra05 mit Peptidlinker verbundene leichte und schwere Fab Ketten. (B) Expressionskontrolle der Konstrukte Ra02-Ra05 durch Western-Blot. (G: Glycin; P: Prolin; R: Arginin; W: Tryptophan) (Antikörper: Anti-Human-IgG-HRP 1:10000)

3.2 Charakterisierung der Anti-VEGF Moleküle

3.2.1 Vergleich der biologischen Aktivität der Anti-VEGF Moleküle Ra01–Ra05

Die biologische Aktivität der exprimierten Anti-VEGF Varianten Ra01-Ra05 wurde in einem zellbasierten HUVEC Migrationsassay bestimmt (siehe Abbildung 15). In dem Assay wird das VEGF induzierte Migrationsverhalten von Endothelzellen gemessen um eine Aussage über die VEGF Inhibition zu treffen. Die Migration wird durch die Bindung des VEGF an die VEGF Rezeptoren induziert. Wird diese Wechselwirkung durch die Zugabe eines inhibitorischen Agens gestört, verringert sich auch die Migration der Endothelzellen. Die Grenzen dieses Assays werden durch die beiden Kontrollen festgelegt. Die Ansätze ohne VEGF Induktion des Migrationsverhaltens wurden als 100 % Inhibition (siehe Abbildung 15A) erachtet, Ansätze mit VEGF Induktion, aber ohne Anti-VEGF Moleküle als 0 % Inhibition (siehe Abbildung 15B) Mit Hilfe dieses Ansatzes wurden die gemessenen Proben normalisiert. Als zusätzliche Kontrolle des Assays fungierte Lucentis[®] mit einer Konzentration von 10 ng/ml. Die exprimierten Anti-VEGF Moleküle Ra01-Ra05 wurden im Assay in einer Konzentration von 5,0 ng/ml eingesetzt. Alle hergestellten Anti-VEGF Varianten zeigten im Vergleich zu der 0% Inhibitionskontrolle signifikante höhere inhibitorische Aktivitäten (siehe Abbildung: 15I). Die Ausgangsvariante Ra01 zeigte mit

86,03 % \pm 4,83 % die höchste gemessene biologische Aktivität. Ra02 und Ra03 als scFab's mit 70,19 % \pm 6,12 % bzw. 79,17 % \pm 6,67 % beide ähnliche Aktivitäten wie Ra01. Signifikant niedrigere biologische Aktivitäten wurden mit 31,40 % \pm 6,14 % und 27,07 % \pm 11,61 % für die beiden Moleküle Ra04 und Ra05 gemessen.

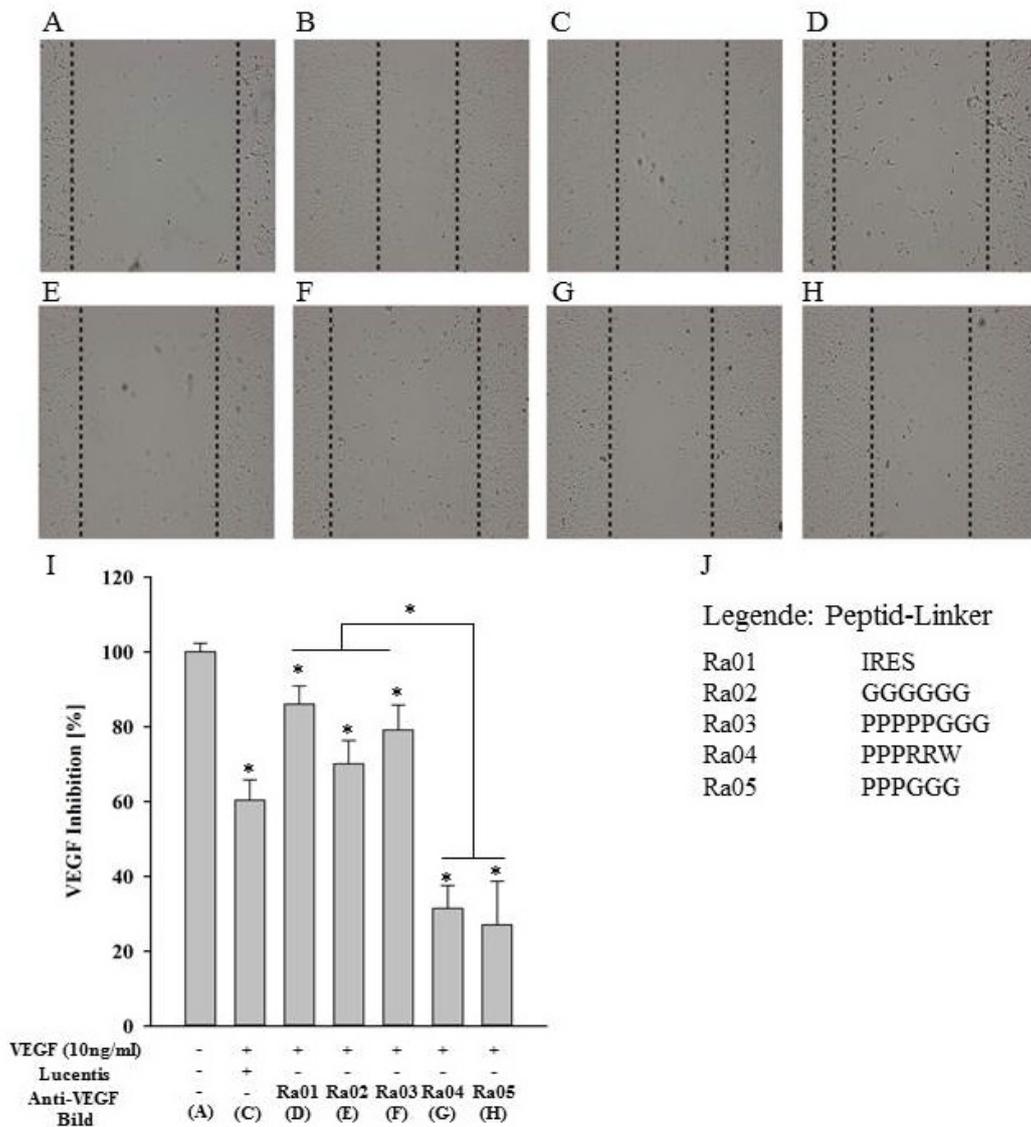


Abbildung 15: HUVEC Migration Assay Ra01-Ra05. (A-H) Abstände zwischen den HUVEC Zellen in Anwesenheit von VEGF und der verschiedenen Anti-VEGF Moleküle Ra01–Ra05. Ansatz ohne VEGF diente als 100 % Inhibitionskontrolle (A) und Ansatz mit VEGF aber kein Inhibitor als 0 % Inhibitionskontrolle (B). Bilder C-H zeigen die Ansätze mit VEGF und Ra01-Ra05 bzw. Lucentis® als Inhibitoren. (I) Inhibition der VEGF induzierten HUVEC Migration mit Lucentis® und Ra01-Ra05 in [%]. Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichung aus je drei Messungen in zwei verschiedenen voneinander unabhängigen Experimenten. (* $p < 0,001$) (J) Legende Peptidlinker für Ra02-Ra05 bzw. IRES Sequenz für Ra01.

3.2.2 Dosisabhängiger Vergleich der biologischen Aktivität der Anti-VEGF Moleküle Ra01 und Ra02

Zur dosisabhängigen Evaluation der biologischen Aktivität der beiden Anti-VEGF Moleküle Ra01 und Ra02 wurde das bereits im letzten Kapitel beschriebene HUVEC Migration Assay verwendet. Hierfür wurde das Migrationsverhalten bei ansteigenden Anti-VEGF Konzentrationen und gleichbleibender VEGF Konzentration bestimmt (siehe Abbildung 16). Verglichen mit dem als Kontrolle verwendeten Lucentis[®] besitzt das Fab Fragment Ra01 im niedrigen Konzentrationsbereich leicht bessere inhibitorische Eigenschaften, im höheren Konzentrationsbereich flacht die Dosiskurve jedoch ab und es wurde eine niedrigere inhibitorische Aktivität gemessen. Das scFab Ra02 hingegen besitzt über den ganzen gemessenen Konzentrationsbereich signifikant höhere inhibitorische Eigenschaften, als Ra01 und Lucentis[®]. Die maximale Inhibition von Ra02 und Lucentis[®] liegt etwa im gleichen Bereich, wird bei Ra02 jedoch schon bei niedriger Konzentration erreicht.

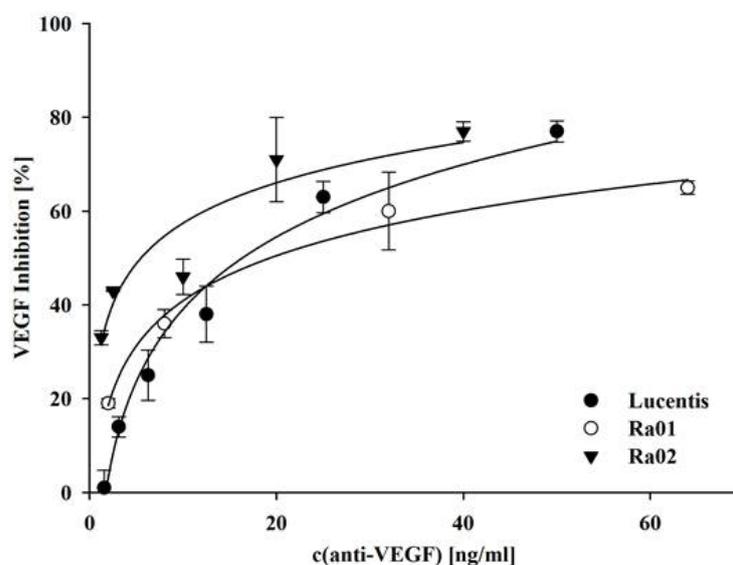


Abbildung 16: Konzentrationsabhängige Inhibition der VEGF induzierten Migration durch Ra01 und Ra02. Dosisabhängige Inhibition [%] der VEGF induzierten HUVEC Migration. (Konzentrationsbereich: Lucentis[®]: 1,56-50 ng/ml; Ra01: 2,0-60,0 ng/ml; Ra02: 1,3-40,0 ng/ml) Daten repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus je drei Messungen.

3.2.3 VEGF Bindeeigenschaften der Anti-VEGF Moleküle Ra01 und Ra02

Um die VEGF Bindeeigenschaften der beiden Anti-VEGF Moleküle Ra01 und Ra02 im Vergleich zu Lucentis® zu bestimmen, wurde ein zellfreier Assay, das VEGF Bindeassay verwendet (siehe Abbildung 17). Es wurden ansteigende Anti-VEGF Konzentrationen (0,0-72,2 ng/ml) mit gleichbleibender VEGF Konzentration (250 pg/ml) inkubiert und mit Hilfe eines VEGF ELISA (siehe:2.2.4.4) die Konzentration des freien, ungebundenen VEGF bestimmt. Die beiden Anti-VEGF Moleküle Ra01 und Ra02 zeigten über den ganzen, untersuchten Konzentrationsbereich vergleichbare VEGF Bindeeigenschaften. Das als Kontrolle verwendete Lucentis® hingegen zeigte im Vergleich zu den beiden Anti-VEGF Varianten Ra01 und Ra02 über den gesamten gemessenen Konzentrationsbereich signifikant höhere Bindeeigenschaften. Die Auftragung des freien, ungebundenen VEGF gegen die Anti-VEGF Konzentration wurde zur rechnerischen Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50) der beiden exprimierten Anti-VEGF Moleküle Ra01, Ra02 und der Kontrolle Lucentis® verwendet. Für die beiden Ranibizumab Varianten wurden IC50 Werte von 14,2 ng/ml für Ra01 und 63,9 ng/ml für Ra02 errechnet. Das als Kontrolle mitgeführte Lucentis® erreicht die IC50 hingegen schon bei einer Konzentration von 3,1 ng/ml.

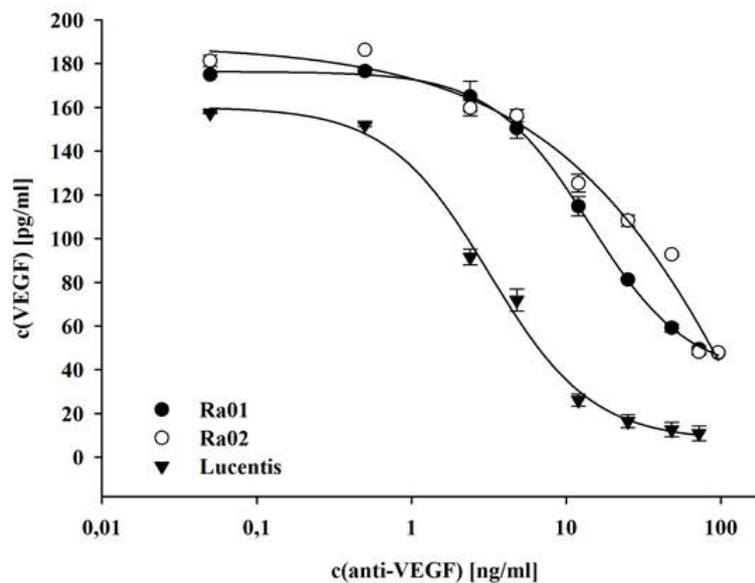


Abbildung 17: Zellfreies VEGF Bindeassay und Bestimmung der IC50. Quantifikation des freien, ungebundenen VEGF in Abhängigkeit der Anti-VEGF Konzentration und Berechnung der IC50. Daten repräsentieren Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Messungen.

3.2.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d sowie der maximalen Bindekapazität

B_{\max}

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d und der Maximalen Bindekapazität B_{\max} wurde ein Sättigungsexperiment mit gleichbleibender Anti-VEGF Konzentrationen und ansteigender VEGF Konzentration durchgeführt. Durch die Quantifikation des freien, ungebundenen VEGFs wurde das gebundene VEGF errechnet und in Abhängigkeit der eingesetzten VEGF Konzentration aufgetragen (siehe Abbildung 18). Die Berechnung der Dissoziationskonstanten K_d und der maximalen Bindekapazität B_{\max} wurde mit SigmaPlot durchgeführt. Für die Kontrolle Lucentis[®] wurde die K_d mit 915,9 pM, für Ra01 1299,0 pM und für Ra02 eine K_d mit 404,9 pM errechnet. Die maximale Beladung B_{\max} betrug für Lucentis[®] 1109,0 pM, für Ra01 1496,6 pM und für Ra02 609,4 pM.

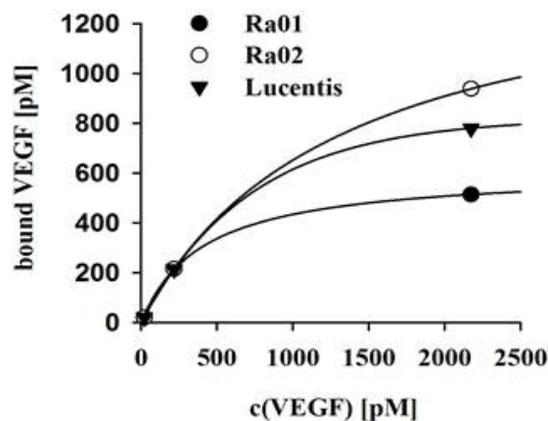


Abbildung 18: Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d und der maximalen Bindekapazität B_{\max} . Anti-VEGF Sättigung bei gegebener Anti-VEGF Konzentration in Abhängigkeit von der Konzentration des gebundenen VEGF. Daten repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen VEGF ELISA Messungen.

3.3 Herstellung und Funktionalität der regulierbaren SSV9-TetOn-Ra01/Ra02 Vektor Konstrukte

Um die beiden Anti-VEGF Varianten Ra01 und Ra02 regulierbar exprimieren zu können, wurden die beiden Sequenzen codierend für Ra01 und Ra02 unter die Kontrolle des TetOn-Systems kloniert (siehe Abbildung 19A). Mit Hilfe des Aktivators Doxycyclin, einem Tetracyclin Derivat, kann die Expression des Transgens nicht nur an- und abgeschaltet, sondern auch genau reguliert werden. Der verwendete Vektor SSV9-TetOn trägt nicht nur die

genetischen Informationen des TetOn-Systems, sondern auch die beiden für die spätere Verpackung in AAV nötigen ITR Sequenzen (inverted terminal repeats). Die Funktion des TetOn-Systems wurde bei unterschiedlichen Konzentrationen von Doxycyclin (0,0–5,0 µg/ml) nach Transfektion der beiden Varianten SSV9-TetOn-Ra01 und SSV9-TetOn-Ra02 überprüft. Hierfür wurden die aus der Zelle in das Kulturmedium geschleusten Konzentrationen der beiden Anti-VEGF Varianten in Abhängigkeit der Doxycyclinkonzentration bestimmt. Die Nachweisgrenze (0,98 ng/ml) des zur Konzentrationsbestimmung verwendeten ELISA limitierte die Bestimmung der Basisexpression der Variante Ra01. Die Basisexpression des nicht induzierten Ra02 Konstruktes lag hingegen bei $8,1 \pm 0,5$ ng/ml. Die maximale Expression der beiden Anti-VEGF Varianten wurde mit $242,6 \pm 4,6$ ng/ml für das SSV9-TetOn-Ra01 und $166,0 \pm 1,9$ ng/ml für das SSV9 TetOn-Ra02 Konstrukt bei einer Doxycyclin Konzentration von 2,5 µg/ml gemessen. Somit kann durch die Verwendung des TetOn-Systems die Expression der beiden Transgene Ra01 und Ra02 durch Doxycyclin in Zellkulturexperimenten reguliert werden. Ra01 zeigte verglichen mit Ra02 bei Doxycyclinkonzentrationen von 0,5 µg, 2,5 µg und 5,0 µg signifikant höhere Werte bei der Konzentrationsbestimmung.

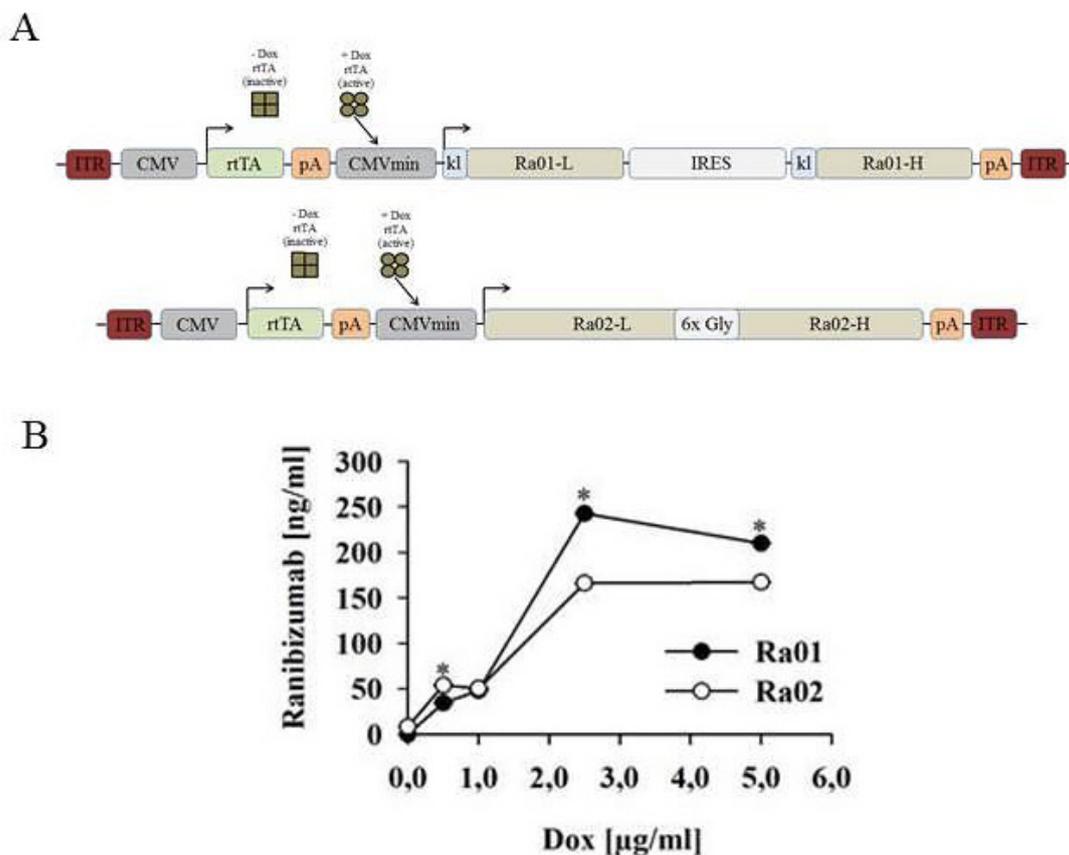


Abbildung 19: TetOn Expressionskonstrukte und Abhängigkeit der TetOn regulierten Ra01 und Ra02 Expression von der Doxycyclinkonzentration. (A) Expressionskonstrukte TetOn-Ra01 und TetOn-

Ra02. (B) Induktion der TetOn regulierten Ra01 und Ra02 Expression durch ansteigende Doxycyclinkonzentrationen nach SSV9-TetOn-Ra01/Ra02 Transfektion von HEK293. Daten repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Messungen. (*p<0,001)

3.3.1 Herstellung und Funktionalität des AAV2/5-TetOn-Ra02 Konstruktes

Die beiden viralen Vektoren AAV2/5-TetOn-RA02 und der zur Transduktionskontrolle verwendete AAV2/5-CMV-eGFP wurden von der Universität Nantes, Frankreich (INSERM UMR1089) hergestellt. Die Titer der rekombinanten viralen Vektoren wurden mit $8,2 \times 10^{12}$ vg/ml bzw. $8,0 \times 10^{12}$ vg/ml bestimmt. Die Transduktion der AAV wurde an der HELA Zelllinie mit den AAV2/5-CMV-eGFP durch die Expression des eGFP kontrolliert. Da bei Zellkulturtransduktionen mit einzelsträngigen AAVs die Zweitstrangsynthese zusammen mit der begrenzten Kulturdauer der Zellen den limitierenden Faktor dieses Experiments darstellt, wurde die Zweitstrangsynthese der Zellen vor der eigentlichen Transduktion durch UV-Bestrahlung angeregt. Da eine UV-Bestrahlung zu irreparablen Zellschäden gefolgt vom Zelltod führt, wurde die Intensität der Bestrahlung experimentell mit einer Zelltodrate von etwa 50 % bestimmt. Die MOI von 1:50000 wurde somit auf 50 % der ursprünglich ausplattierten Zellzahl bezogen. Die Expression des eGFP 72 h nach Transduktion der HELA Zelllinie mit AAV2/5-CMV-eGFP wurde durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die regulierbare Expression von Ra02 wurde im nicht induzierten und im induzierten Zustand durch die Gabe von Doxycyclin (5,0 µg/ml) nach Transduktion mit AAV2/5-TetOn-Ra02 nachgewiesen. Auch hier wurde die Konzentration des ausgeschleusten Transgens im Kulturmedium bestimmt und mit dem Regulationssystem des SSV9-TetOn Plasmids nach Transfektion der HELA Zelllinie verglichen (siehe Abbildung 20). Es konnte nach Plasmidtransfektion im induzierten Zustand eine Ra02 Konzentration von $96,5 \pm 1,5$ ng/ml, im nicht induzierten Zustand bei einem Detektionslimit von 0,98 ng/ml kein Ra02 mehr nachgewiesen werden. Basierend auf dem Detektionslimit konnte somit eine etwa 96 fache Induktion durch Doxycyclin erzielt werden. Die Doxycyclin induzierte Ra02 Expression wurde nach AAV vermitteltem Gentransfer mit $56,82 \pm 8,27$ ng/ml gemessen, die Basisexpression ohne Doxycyclingabe mit $8,94 \pm 1,07$ ng/ml was eine ca. 7 fache Expressionsinduktion bedeutet.

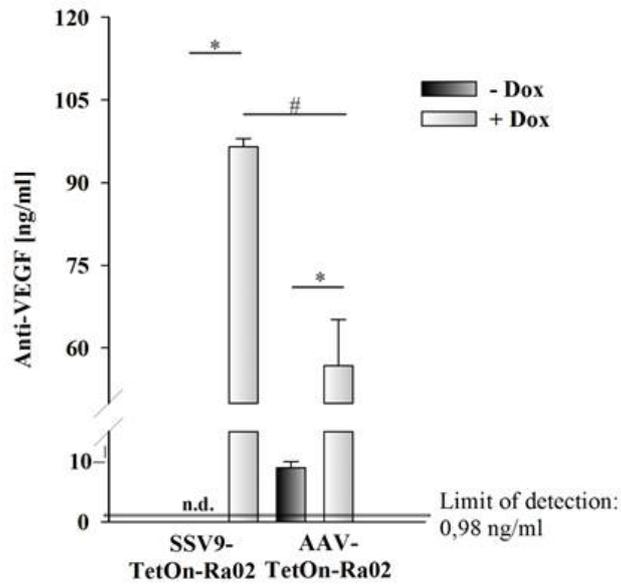


Abbildung 20: Regulierbare Ra02 Expression nach SSV9-TetOn-Ra02 Transfektion und AAV2/5-TetOn-Ra02 Transduktion. Hela Zellen transfiziert mit SSV9-TetOn-Ra02 und transduziert mit AAV2/5-TetOn-Ra02 und Induktion mit 5,0 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin. Daten repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Messungen. (* $p < 0,05$; # $p < 0,001$)

3.4 Herstellung und Charakterisierung der BRET Biosensor Varianten

Zusätzlich zur regulierbaren Anti-VEGF Expression sollte in dieser Arbeit die Möglichkeit der Generierung eines Protein basierenden Biosensors zur *in vivo* Quantifikation von VEGF geprüft werden. Das scFab Ra02 wurde, als Basis der verschiedenen Biosensoren als VEGF bindende Domäne benutzt an die die BRET Komponenten fusioniert wurden. BRET dient nicht nur der qualitativen Überprüfung von Protein-Protein Wechselwirkungen sondern kann auch zur Quantifikation dieser herangezogen werden. Die Interaktion von VEGF mit der VEGF Bindedomäne bewirkt eine konzentrationsabhängige Konformationsänderung, die sich in einer Änderung der BRET Ratio ausdrückt (siehe Abbildung 21).

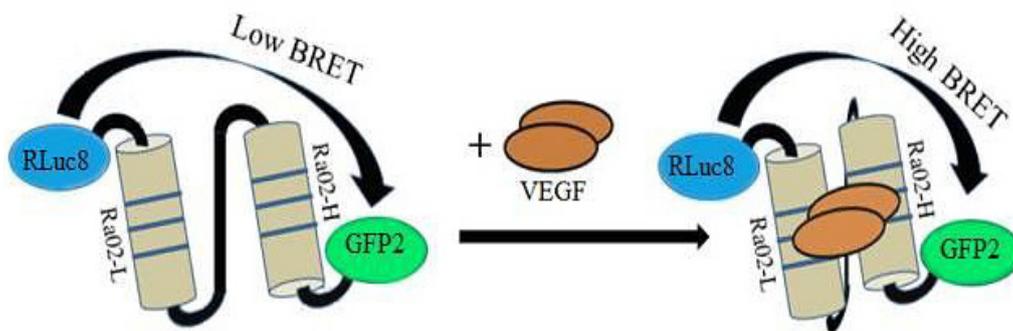


Abbildung 21: Herstellung eines Biosensors zur Quantifizierung von VEGF *in vivo*. Durch Bindung von VEGF an die VEGF Bindedomäne ändert sich die Konformation des Biosensors was zu einer Erhöhung der BRET Ratio führt.

3.4.1 Klonierung der BRET Biosensor Varianten

Ausgehend vom als einzelnes Molekül exprimierten scFab Ra02, wurden drei verschiedene BRET Biosensorvarianten hergestellt (siehe Abbildung 22). Hierfür wurden die IgG kappa leader Sequenz sowie das Startcodon des Ra02 ORF (open reading frame) deletiert. In weiteren Schritten wurde an das 5'-Ende des Ra02 der RLuc8 (Renilla Luziferase 8) ORF und an das 3'-Ende der GFP2 ORF fusioniert. Vor der Fusion des GFP2, ohne eigenes Startcodon, wurde das Stopcodon des Ra02 deletiert. Ausgehend von diesem direkt fusionierten Konstrukt (Biosensor D), wurden zusätzliche Varianten hergestellt, bei denen die einzelnen Domänen RLuc8/Ra02 und Ra02/GFP2 durch Peptidlinker (Prolin und 4x Glycin) getrennt wurden (Biosensor P und Biosensor G). Es konnten somit drei unterschiedliche Biosensorvarianten generiert werden die jeweils als einzelnes Molekül exprimiert werden, die Expression der einzelnen Domänen durch das Fehlen eigener Startcodons konnte ausgeschlossen werden.

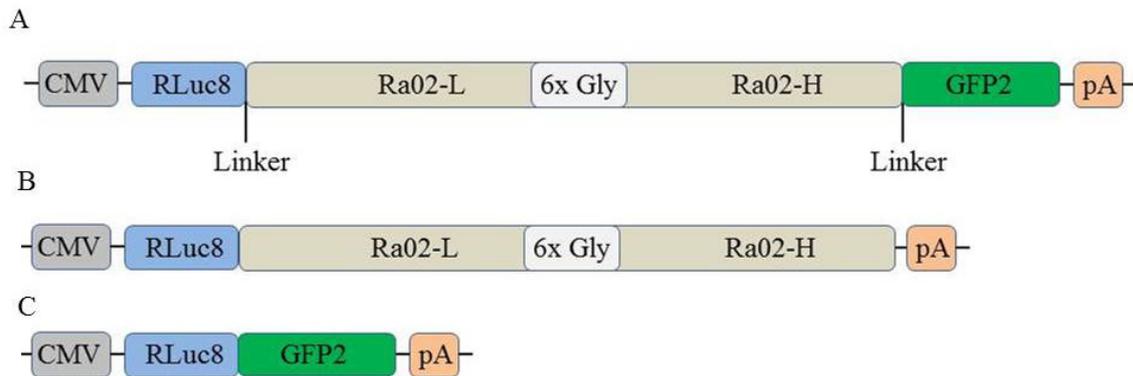


Abbildung 22: Biosensor Expressionskonstrukte (A), Korrekturfaktor (B) und Maximale Kontrolle (C). RLuc8 fusioniert an das 5'-Ende der VEGF Bindedomäne Ra02 und GFP2 fusioniert an das 3'-Ende von Ra02. Die einzelnen Domänen wurden direkt oder getrennt durch Peptidlinker (Prolin; 4x Glycin) kloniert. Der Korrekturfaktor ohne die Akzeptordomäne GFP2. RLuc8 direkt an das GFP2 fusioniert als maximale Kontrolle.

3.4.2 Expression der BRET Biosensorvarianten

3.4.2.1 Expressionskontrolle der fusionierten Renilla Luziferase

Um die Expression der an die Biosensorvarianten fusionierten RLuc8 darzustellen, wurde die Aktivität der Luziferase bestimmt. Nach Transfektion und Expression der BRET Biosensorvarianten, des Korrekturfaktors (cF) der positiven Kontrolle (RLuc8), der maximalen Kontrolle (Max.Ctrl.) und einer negativen Kontrolle, die aus einem untransfizierten Ansatz bestand, wurden die Zellen lysiert und die dabei entstandenen Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt. Jeweils 10 μ l der Überstände wurden in das Luziferaseassay eingesetzt. Die durch die Umsetzung des Substrats, aus der Luziferase, freigesetzten Lichtphotonen wurden quantifiziert. Es konnte durchwegs für alle Konstrukte eine signifikant höhere Aktivität und somit die Expression der Luziferase, verglichen mit der negativen Kontrolle, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23). Die Luziferase, als positive Kontrolle zeigte in diesen Versuchen mit $227,7 \cdot 10^6 \pm 1,7 \cdot 10^6$ RLU die höchste gemessene Aktivität, die negative Kontrolle aus Transfektionen ohne DNA mit 11990 ± 157 RLU die niedrigste gemessene Aktivität. Die Messungen der drei BRET Biosensorvarianten und des Korrekturfaktors zeigten mit $106,6 \cdot 10^6 \pm 0,7 \cdot 10^6$ RLU für die direkt fusionierte, $101,1 \cdot 10^6 \pm 0,4 \cdot 10^6$ RLU für die Prolin Variante, $60,3 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^6$ RLU für die 4x Glycin Variante und

für den Korrekturfaktor cF $91,4 \cdot 10^6 \pm 0,3 \cdot 10^6$ RLU vergleichbar hohe Luziferase Aktivitätswerte.

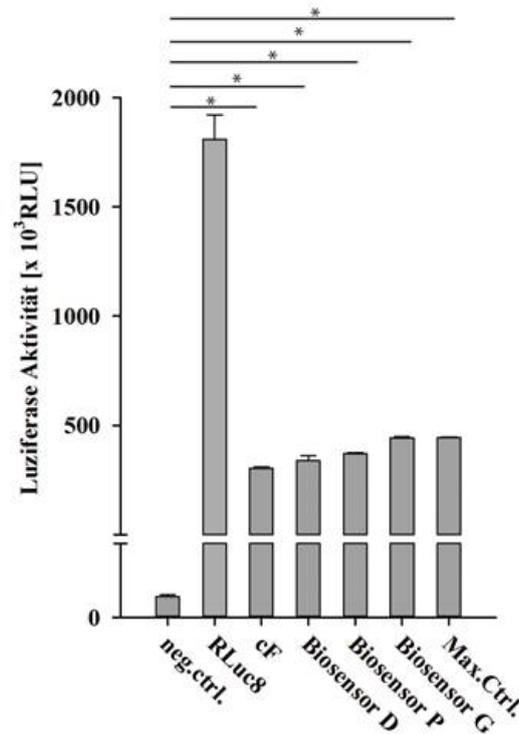


Abbildung 23: Expressionskontrolle Luziferasedomäne der Biosensoren und Kontrollen. Nachweis der an die VEGF Bindedomäne der Biosensoren und Kontrollen (Korrekturfaktor: cF; Maximale Kontrolle: Max. Ctrl.) fusionierten Luziferase. RLuc8. Positive Kontrolle (RLuc8) und eine nicht transfizierte probe als negative Kontrolle (neg. ctrl.) (Biosensor D: direkt fusioniert, Biosensor P: Prolinlinker, Biosensor G: 4x Glyzinlinker). (*p<0,001)

3.4.2.2 Expressionskontrolle des fusionierten GFP2

Die Fusion des GFP2 an die drei BRET Biosensorvarianten sowie der maximalen Kontrolle (Max. Ctrl.) wurde durch dessen Fluoreszenz nachgewiesen (siehe Abbildung 24). Hierbei zeigte sich im Vergleich zur negativen Transfektionskontrolle (nicht gezeigt), d.h. einer Transfektion ohne Plasmid DNA und auch zum Korrekturfaktor bei allen drei BRET Biosensor Varianten und der Max.Ctrl. eine deutliche GFP2 Fluoreszenz bei jeweils gleicher Exposition von 0,5 Sekunden. Da das Startcodon des GFP2 nicht kloniert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Biosensor Varianten im korrekten Leserahmen kloniert wurden.

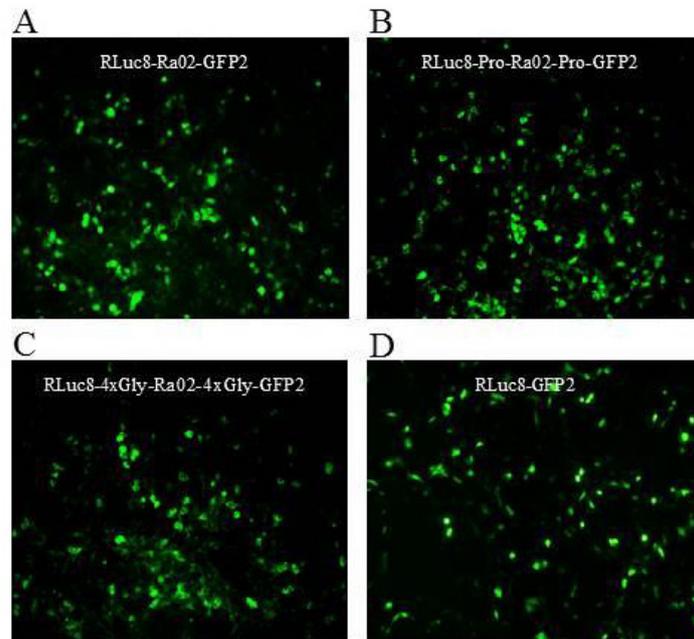


Abbildung 24: Expressionskontrolle des fusionierten GFP2. (A-C) Kontrolle der Expression des an die Biosensoren fusionierten GFP2. (D) Maximale Kontrolle (RLuc8-GFP2).

3.4.2.3 Kontrolle der Vollängenexpression der BRET2 Biosensor Varianten, des Korrekturfaktors und der Maximum Kontrolle

Die Vollängenexpression der drei Biosensorvarianten, des Korrekturfaktors und der maximalen Kontrolle wurden mittels Western-Blot überprüft (siehe Abbildung 25). Der verwendete Anti-RLuc Antikörper zeigte Immunreaktivität mit der Renilla Luziferase bei allen Biosensorvarianten, dem Korrekturfaktor, der maximalen Kontrolle sowie bei der positiven Kontrolle RLuc8. Die errechneten Molekulargewichte stimmen mit den experimentell ermittelten Daten überein. Zur zusätzlichen Ladekontrolle wurde auf einem separaten aber identischen Blot GAPDH in vergleichbaren Intensitäten nachgewiesen.

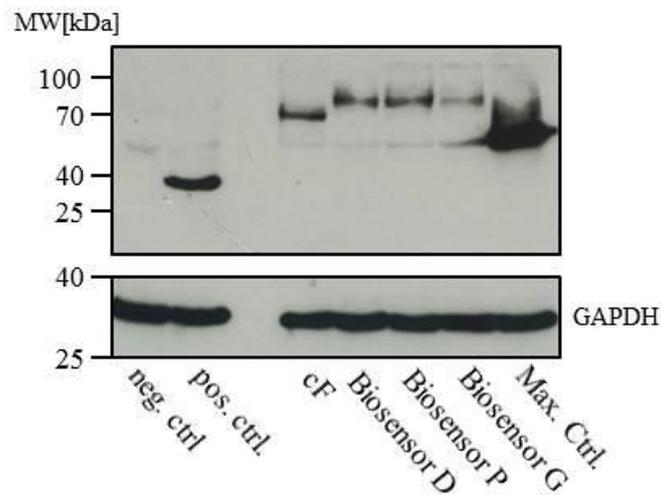


Abbildung 25: Kontrolle der Vollängenexpression. Western-Blot der exprimierten Biosensoren (D: Direkt fusioniert; P: Prolinlinker; G: 4xGlyzinlinker), des Korrekturfaktors (cF), der maximalen Kontrolle (Max.Ctrl), RLuc8 als positive Kontrolle (pos.ctrl.) und einer nicht transfizierten Probe als negative Kontrolle (neg.ctrl.). GAPDH diente als Ladekontrolle. (Anti-RLuc-IgG: 1:1000, Anti-GAPDH-IgG: 1:1000, Anti-Rabbit-IgG-HRP: 1:10000)

3.4.3 Charakterisierung des BRET der BRET Biosensorvarianten

3.4.3.1 Spektrale Analyse der BRET Biosensorvarianten

Um den Energieübertrag des Luziferasedonors auf den Akzeptor zu überprüfen, wurden die beiden Emissionsmaxima der Biosensorvarianten im Vergleich zum Korrekturfaktor cF in Abhängigkeit von der Wellenlänge nach Substratzugabe dargestellt (siehe Abbildung 26). Bei der direkt fusionierten, sowie bei der Prolin Biosensorvariante zeigten sich neben dem Emissionsmaximum der Luziferase bei ~410 nm ein weiteres Maximum bei ~510 nm, erzeugt durch die Übertragung eines Teils der Energie der Luziferase auf das GFP2 (siehe Abbildung 26B+C). Wegen dem Fehlen des Akzeptors GFP2 zeigt der Korrekturfaktor lediglich das Emissionsmaximum der Luziferase bei ~410 nm (siehe Abbildung 26A). Im Gegensatz zur direkt fusionierten und zur Prolinvariante zeigte die 4x Glyzinvariante im Vergleich zum Korrekturfaktor kein deutliches, zweites Emissionsmaximum bei ~510 nm (siehe Abbildung 26D).

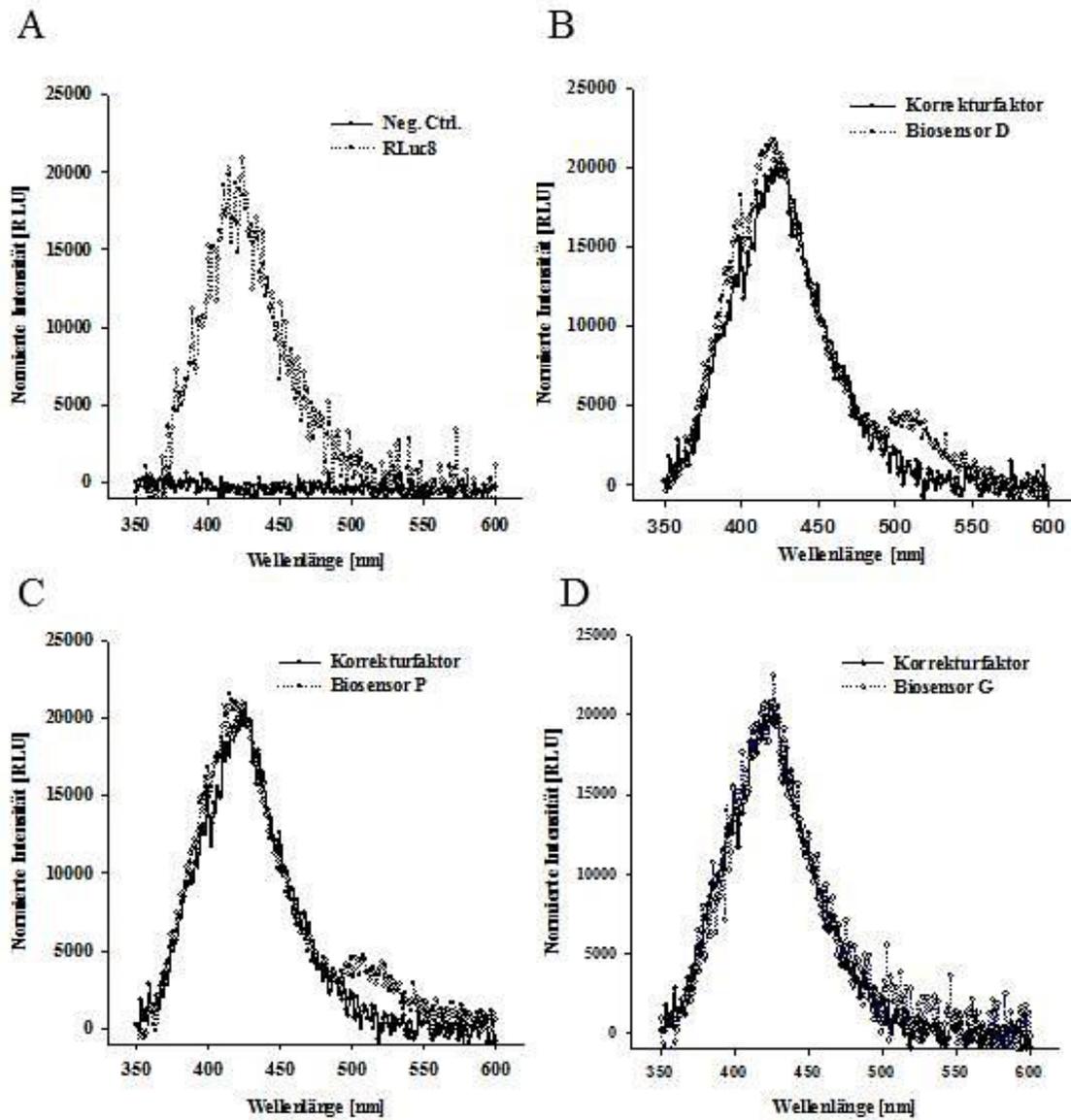


Abbildung 26: Spektrale Analyse der Biosensoren. (A) Spektren der Renilla Luziferase 8 (RLuc8) und einer nicht transfizierten Probe (Neg.Ctrl.) (B-D) Spektren der Biosensoren (D: Direkt fusioniert; P: Prolinlinker; G: 4xGlyzinlinker) im Wellenlängenbereich 350-600 nm, jeweils mit Korrekturfaktor (cF).

3.4.3.2 Quantifizierung der BRET Ratio der BRET Biosensorvarianten

Um den Energietransfer vom Luziferasedonor auf den GFP2 Akzeptor der BRET Biosensoren, verglichen mit dem Korrekturfaktor, zu quantifizieren, wurden die Lichtintensitäten der Luziferase und des GFP2 mit Hilfe zweier geeigneter Transmissionsfilter in RLU (relative Luziferase Units oder Photonen/sec) gemessen und nach Gleichung 1 (siehe: 2.2.4.8) berechnet. Zur Normalisierung diente hier der Korrekturfaktor

der in derselben Weise bestimmt wurde. Der einheitenlosen BRET Ratio wurde die Einheit BU bzw. mBU (BRET Units bzw. milli BRET Units) zugewiesen (siehe Abbildung 27). Für die direkt fusionierte Biosensorvariante wurde die BRET Ratio mit $82,2 \pm 1,8$ mBU berechnet, was eine statistisch signifikant höhere ($p < 0,001$) BRET Ratio im Vergleich zum Korrekturfaktor darstellt. Auch die Prolinvariante des Biosensors zeigte mit einer normalisierten BRET Ratio von $74,1 \pm 2,5$ mBU eine im Vergleich zum Korrekturfaktor eine signifikant höhere ($p < 0,001$) BRET Ratio. Die 4x Glyzinvariante des BRET Biosensors zeigte eine nach Normalisierung errechnete BRET Ratio von $10,5 \pm 1,8$ mBU und somit eine deutlich niedrigere, aber dennoch statistisch signifikant höhere ($p = 0,016$) BRET Ratio verglichen mit dem Korrekturfaktor. Die zusätzlich mitgeführte maximale Kontrolle (Max. Ctrl.) stellt durch die direkte Fusion des Luziferasedonors des Akzeptors GFP2 den maximalen Energieübertrag von der Luziferase auf das GFP2 dar und generiert eine im Vergleich zum Korrekturfaktor signifikant höhere ($p < 0,001$) normalisierte BRET Ratio von $140,4 \pm 9,5$ mBU.

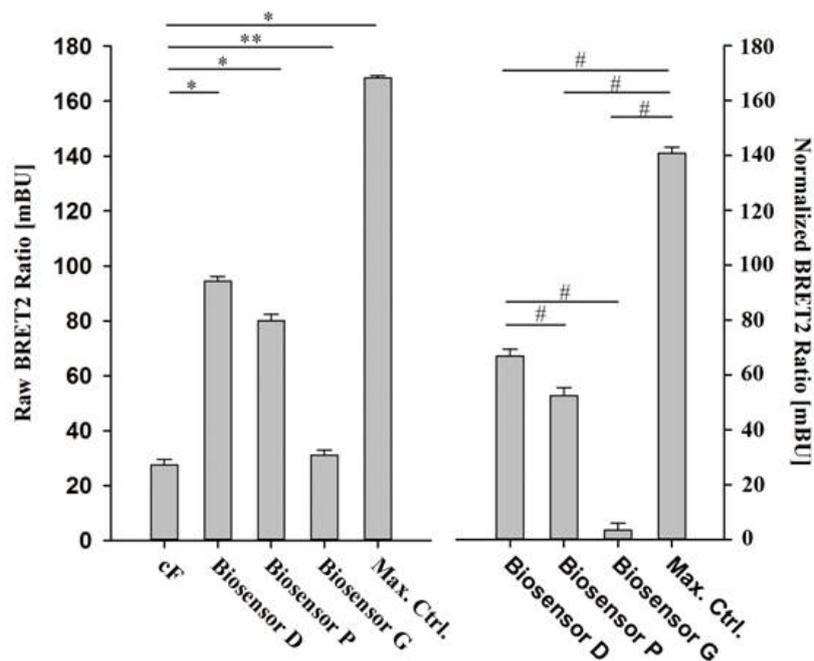


Abbildung 27: BRET Ratio der exprimierten Biosensoren. Nicht normalisierte und normalisierte BRET Ratio der Biosensoren und der maximalen Kontrolle (Max.Ctrl.). Normalisierung mit Korrekturfaktor (cF). (* $p < 0,001$; ** $p = 0,016$; # $p < 0,05-0,001$)

3.4.3.3 Kinetik der BRET Ratio der Biosensorvarianten

Der kinetische Verlauf der BRET Ratio nach Substratzugabe wurde für die verschiedenen BRET Biosensorvarianten, dem Korrekturfaktor und der maximalen Kontrolle, dargestellt (siehe Abbildung 28). Die Emissionen der beiden BRET Komponenten RLuc8 und GFP2 nehmen über die Zeit ab (siehe Abbildung 28A). Die zeitlichen Verläufe des Korrekturfaktors sowie der 4x Glyzinvariante des BRET Biosensors zeigen annähernd konstante BRET Ratios über den ganzen gemessenen Bereich. Die Max.Ctrl. zeigt einen leichten Anstieg der BRET Ratio bis ca. 25 Minuten. Im weiteren Verlauf flacht die Kurve jedoch ab und zeigt zwischen 25 und 30 Minuten einen annähernd konstante Werte. Ein ähnlicher Verlauf der BRET Ratio wurde für die direkt fusionierte sowie für die Prolinvariante des Biosensoren gemessen. Auch hier gab es zunächst einen leichten Anstieg, gefolgt von einem Abflachen (siehe Abbildung 28B).

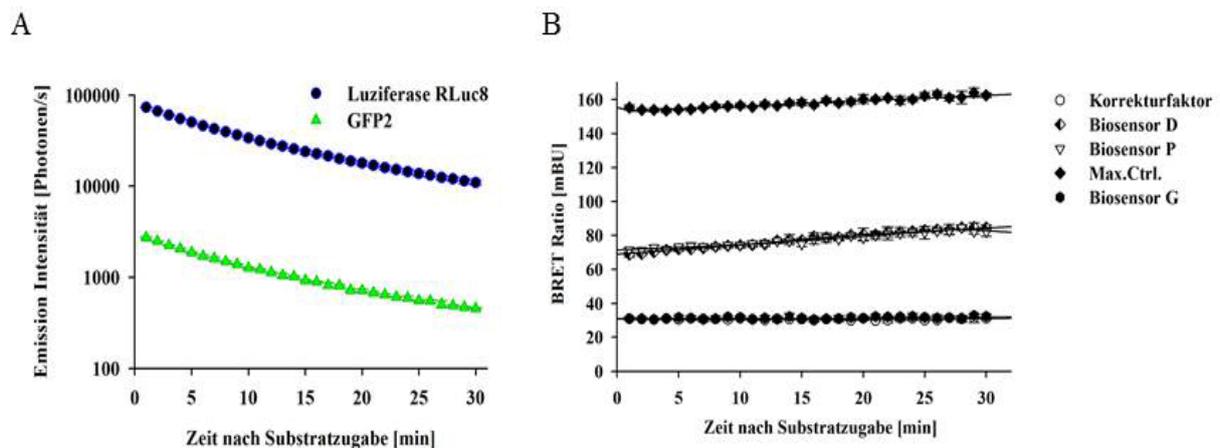


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der RLuc8 und GFP2 Emission und Kinetik der BRET Ratio nach Substratzugabe. (A) Abnahme des Luziferase und GFP2 Signales am Beispiel der Maximalen Kontrolle (Max.Ctrl.) nach Substratzugabe. (B) Zeitlicher Verlauf der BRET Ratio der Biosensoren, des Korrekturfaktors und der maximalen Kontrolle (Max.Ctrl.) nach Substratzugabe.

3.4.3.4 Konzentrationsabhängigkeit der BRET Ratio

Um den konzentrationsabhängigen Verlauf der BRET Ratio zu evaluieren, wurde die Max. Ctrl. seriell verdünnt und die Lichtausbeute der Luziferase und des GFP2 mit Hilfe der bereits beschriebenen Transmissionsfilter bestimmt und daraus die resultierende BRET Ratio in

Abhängigkeit der gewählten Verdünnung errechnet (siehe Abbildung 29). Es zeigte sich über den gesamten Verdünnungsbereich eine weitestgehend lineare Abnahme des Luziferase- und GFP2 Signales. Die Berechnung der BRET Ratio der verschiedenen Verdünnungsstufen zeigt zwar signifikant unterschiedliche Werte, die Steigungen der Trendlinien der BRET Ratio und der Luziferase/GFP2 Emission unterscheiden sich jedoch stark voneinander.

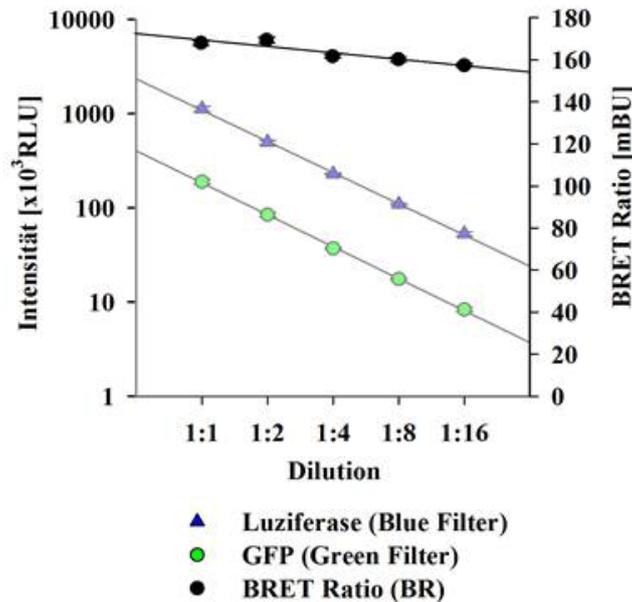


Abbildung 29: Konzentrationsunabhängigkeit der BRET Ratio. Linearer Verlauf der Intensitäten der Luziferase und des GFP2s bei verschiedenen Verdünnungsstufen und daraus resultierende BRET Ratio am Beispiel der maximalen Kontrolle (Max.Ctrl.).

3.4.4 VEGF induzierte Änderung der BRET Ratio der Biosensoren

Die VEGF abhängige Änderung der BRET Ratio der Biosensoren wurde bei steigender VEGF Konzentration bestimmt und berechnet (siehe Abbildung 30). Zur Normalisierung diente ein identischer Ansatz jedoch ohne VEGF. Die direkt fusionierte Biosensorvariante zeigte im Bereich von 1,0-100 pg/ml eine VEGF abhängige Änderung der BRET Ratio bei beiden gemessenen Biosensor Konzentrationen. Statistisch signifikante Unterschiede konnten bei einer VEGF Konzentration von 5 pg/ml und 100 pg/ml und einer Biosensor Konzentration von 180000 RLU beobachtet werden. Bei einer Biosensor Konzentration von 90000 RLU traten signifikante Unterschiede bei einer VEGF Konzentration von 10 pg/ml auf. Die Konzentration des Biosensors bestimmt offensichtlich den dynamischen Bereich der Messung. Die Prolinvariante des Biosensors zeigte ebenfalls eine VEGF abhängige Änderung

der BRET Ratio. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte allerdings erst bei einer VEGF Konzentration von 10000 pg/ml beobachtet werden. Somit unterscheiden sich die Messbereiche der direkt fusionierten Variante und der Prolinvariante deutlich. Die 4x Glyzinvariante zeigte keine Änderung der BRET Ratio in Abhängigkeit von VEGF.

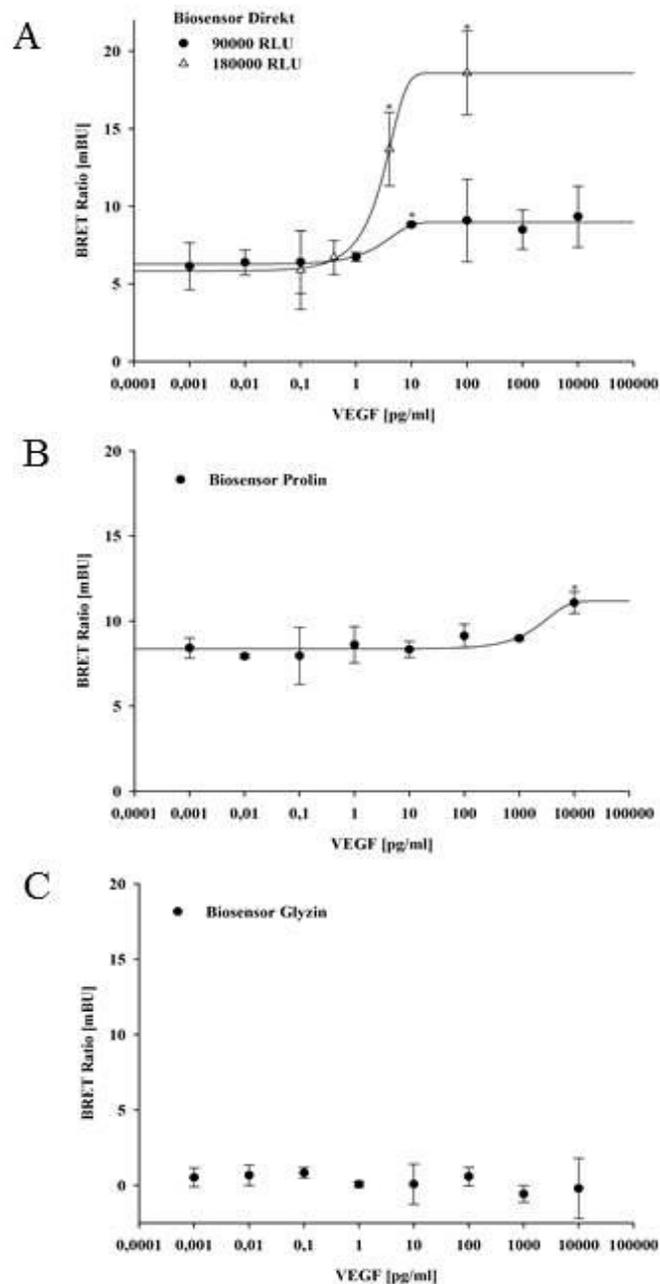


Abbildung 30: VEGF Induzierte Änderung der BRET Ratio der Biosensoren. (A) Direkt fusionierter Biosensor gemessen bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen (90000 und 180000 RLU) des Biosensors bezogen auf die Luziferase Aktivität. (B) Biosensor Variante mit Prolinlinker gemessen bei 180000 RLU. (C) Biosensorvariante mit 4x Glyzinlinker gemessen bei 180000 RLU. (A-C) VEGF Konzentrationsbereich: 0,0001-10000 pg/ml. (*p<0,001)

4 Diskussion

4.1 Das Anti-VEGF Expressionssystem

In dieser Arbeit wurde ein System zur Expression und Ausschleusung des Anti-VEGF Fab Fragmentes Ra01 aus eukaryotischen Zellen basierend auf Ranibizumab hergestellt. Dazu wurden die Aminosäuresequenzen beider Fab Fragmentketten rücktranslatiert, für die Expression in eukaryotischen Zellen optimiert und gemeinsam in einen Expressionsvektor kloniert. Die leichte Fab Fragmentkette wurde an das 5'-Ende der Expressionskassette gestellt, die IRES-Sequenz trennte die leichte von der schweren Fab Kette. Die Verwendung einer IRES-Sequenz zwischen den beiden ORFs der leichten und schweren Fab Kette, ermöglichte eine gleichzeitige Expression beider Ketten. Das Expressionsverhältnis der beiden Ketten zueinander liegt jedoch nicht 1:1 vor, sondern im Verhältnis von etwa 2:1 bis 5:1 (leichte Kette : schwere Kette), was in jedem Fall zu einer Anreicherung der leichten Fab Kette führt [126]. Die Expression der leichten Fab Fragment Kette alleine führte neben einer Bildung und Ausschleusung von Homodimeren, bestehend aus zwei leichten Fab Ketten auch zu einer Ausschleusung von Monomeren (siehe Abbildung 12).

Die kombinierte Expression beider Fab Ketten gleichzeitig führte neben der Bildung von gewollten Heterodimeren, bestehend aus leichter und schwerer Fab Kette auch zur Bildung von Homodimeren. Diese Homodimere bestehen aus zwei leichten Fab Ketten und bilden ein Fab Fragment leicht niedrigeren Molekulargewichts aus (siehe Abbildung 13).

Das oben beschriebene Ungleichgewicht der Expression könnte durch die Verwendung von sogenannten 2A Sequenzen (z.B.: F2A aus FMD virus, T2A aus *Thosea asigna* virus, etc.) umgangen werden [127]. Diese Sequenzen ermöglichen auch eine gleichzeitige Expression von zwei Transgenen unter der Verwendung eines Promotors. Erreicht das Ribosom während der Translation eine 2A Sequenz (konservierte Aminosäuresequenz: GDVEXNPGP), wird das bisher translatierte Polypeptid nach dem Glyzin abgelöst, die Translation aber mit dem nächsten mRNA Codon (Prolin) fortgesetzt [128]. Somit werden auch hier zwei separate Proteine translatiert. Das 5'-translatierte Protein wird jedoch um die durch die 2A Sequenz codierenden Aminosäuren verlängert, was zu einer Beeinträchtigung der Proteinfunktion führen kann [129]. Auch hier besteht, bedingt durch die Translation von zwei separaten Ketten, die Gefahr der Formierung von ungewünschten Homodimeren.

Ein Lösungsansatz besteht hier in der Generierung von single chain Fab Fragmenten (scFab). Hier werden anstelle der IRES-Sequenz oder der 2A Sequenzen, Peptidlinker zwischen die

beiden Fab Ketten inseriert. Somit werden die Ketten des Fab Fragmentes nicht mehr einzeln exprimiert und ein Heterodimer gebildet sondern als Heterodimer exprimiert. Der Vorteil der als einzelne Moleküle exprimierten scFab gegenüber der Expression von zwei separaten Fab Fragment Ketten ist die gezielte Herstellung von nur einer Molekülklasse (siehe Abbildung 14). Die zwischen die beiden Fab Ketten inserierten Peptidlinker können aus mehreren aneinandergereihten Glyzinen (z.B.: GGGGGG) bestehen. Es können aber auch modulare Kassetten bestehend aus Glyzinen und Serin (z.B.: [GGGGS]_n) oder Kompositionen aus mehreren verschiedenen Aminosäuren als Linker verwendet werden [130]. Die Aminosäuren Glyzin und Serin sind für die Flexibilität und geladene Aminosäuren wie etwa Lysin, Glutaminsäure oder Prolin für die bessere Löslichkeit verantwortlich [131,132]. Die Länge des Peptidlinkers ist verantwortlich für die Ausbildung der korrekten räumlichen 3D-Struktur und somit für die biologische Aktivität des scFab [133]. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen scFab Ra02-Ra05 wurden neben der Ra02 Variante mit 6x Glyzin Peptidlinker alternative Linker bestehend aus Prolin/Glyzin in verschiedenen Längen (6 AS und 8 AS) und Linkerkombinationen aus Prolin/Arginin/Tryptophan untersucht. Trotz der Verwendung relativ kurzer Peptidlinker wird die Ausbildung von funktionellen scFab durch zusätzliche, natürlich vorkommende Glyzin/Serin Kassetten (SGGGG und GGS) in der schweren Fab Kette unterstützt.

Die biologische, inhibitorische Aktivität des Fab Fragmentes Ra01 und der scFab's Ra02-Ra05 wurde mit einem zellbasierenden Assay untersucht. VEGF induziert über die Bindung an die beiden VEGF-Rezeptoren-1, -2 und Neuropilin die Migration von Endothelzellen. Die Inhibition von extrazellulären VEGF führt zu einer verminderten Bindung und somit zu einer verringerten Aktivierung der Rezeptoren. Hierbei zeigte das Anti-VEGF Fab Fragment Ra01, die eine nicht modifizierte Variante des Ranibizumab darstellt, die höchste inhibitorische Aktivität. Bei der Generierung von scFab aus Fab Fragmenten ist durch die Modifikation in Form von Peptidlinkern generell mit einer Abnahme der biologischen Aktivität zu rechnen. Dies beruht zum einen auf, der Länge der verwendeten Peptidlinker und zum anderen auf deren Zusammensetzung. Die beiden Anti-VEGF scFab Varianten Ra03 und Ra05 (5x Prolin/3x Glyzinlinker bzw. 3x Prolin/3x Glyzinlinker) unterscheiden sich nur in zwei Prolin Aminosäuren voneinander, die Variante Ra03 zeigt aber signifikant höhere inhibitorische Eigenschaften als Ra05. Dies liegt weniger an der Linkerlänge, da auch die Variante Ra02 auch verbunden mit einer 6x Aminosäurevariante eine signifikant höhere Aktivität aufweist. Die Abnahme der biologischen Aktivität ist hier eher der Struktur von Prolin als „Helixbrecher“ zuzuschreiben. Die scFab Variante Ra04 mit einem 3x Prolin/2x Arginin/1x

Tryptophanlinker zeigte ebenso signifikant niedrigere inhibitorische Aktivität, verglichen mit Ra01-Ra03, was eher an den unüblichen Linkeraminosäuren Arginin und Tryptophan liegen kann. Arginin als positiv geladene und Tryptophan als hydrophobe Aminosäure sind hauptsächlich an inter- und intra-molekularen Wechselwirkungen beteiligt. Intramolekulare Wechselwirkungen beeinflussen aber auch die räumliche Struktur von Proteinen was zu einer Verringerung der biologischen Aktivität führen kann (siehe Abbildung 15).

Die Anti-VEGF Varianten Ra01 als Fab Fragment und die kürzeste, aktive scFab Variante Ra02 wurde im Hinblick auf die spätere Verpackung in AAV und die limitierte Kapazität gewählt und weiterhin charakterisiert. In einem konzentrationsabhängigen HUVEC Migrationsassay konnten die Ergebnisse und somit die inhibitorische Aktivität beider Molekülvarianten konzentrationsabhängig bestätigt werden (siehe Abbildung 16). Die Ergebnisse zeigen eine Erhöhung der Inhibition mit ansteigender Anti-VEGF Konzentration bis eine Sättigungsphase bei ca. 80% eintrat. Um eine vollständige Inhibition des VEGF und somit der VEGF induzierten Migration von HUVEC zu erreichen sind jedoch höhere Konzentrationen, als der untersuchte Konzentrationsbereich, notwendig [134].

Auch der zellfreie VEGF Binde-Assay (siehe Abbildung 17) zeigt für Ra01 und Ra02 eine höhere VEGF Bindung bei höheren Anti-VEGF Konzentrationen. Jedoch zeigen beide Anti-VEGF Molekül-Varianten fast identische Bindeeigenschaften über den ganzen untersuchten Konzentrationsbereich.

Die meisten gentherapeutischen Strategien zur Expression von Anti-VEGF Molekülen in vivo nach viralem Gentransfer basieren auf einer kontinuierlichen Expression mit zellspezifischen oder viralen Promotoren [135–137]. Eine andauernde Expression dieser Molekülgruppe ist aber, wegen der anhaltenden Inhibition von VEGF, nicht wünschenswert. Eine anhaltende Expression und somit VEGF Inhibition führt zwangsläufig auch zu einer ständigen Blockierung der durch VEGF bewirkten physiologischen, neuroprotektiven und neurotrophischen Eigenschaften [138,139]. Aus diesem Grund wurde das „Tetracyclin Inducible System-TetOn“ zur regulierbaren Expression der beiden Anti-VEGF Moleküle Ra01 und Ra02 untersucht. Die durch Doxycyclin induzierbare Regulation der Transgenexpression wurde nach Plasmid Transfektion und AAV Transduktion untersucht und die Konzentration des exprimierten Anti-VEGF in Abhängigkeit der Doxycyclin Konzentration bestimmt (siehe Abbildung 19 und 20). Das TetOn-System ist hinsichtlich der Induzierbarkeit, der Verpackung in AAV-Partikel und der generellen Anwendbarkeit am Auge gut charakterisiert [140]. Es wurde erfolgreich gezeigt, dass der neuroprotektive Faktor Erythropoetin (EPO) nach erfolgtem AAV vermitteltem Gentransfer regulierbar mit Hilfe des

TetOn-Systems über Jahre nicht nur an- und abgeschaltet, sondern auch reguliert exprimiert werden kann [75].

Ein weiterer Vorteil der regulierbaren Anti-VEGF Expression gegenüber der intraokulären Injektion von Anti-VEGF oder deren kontinuierlichen Expression nach viralem Gentransfer ist die Abstimmung der Konzentration der exprimierten Anti-VEGF Moleküle auf die Bedürfnisse jedes einzelnen Patienten. Konzentrationsbestimmungen von VEGF in Proben genommen aus der vorderen Kammer des Auges bei Patienten mit AMD oder DR, behandelt mit Ranibizumab (Lucentis[®]), beweisen eine starke Variation der initialen VEGF Konzentration sowie ein unterschiedliches Ansprechen der Patienten auf die Therapie. Außerdem könnte die Variation der VEGF Konzentration in verschiedenen Stadien der z.B. AMD mit einer regulierbaren Expression der hergestellten Expressionssysteme ausgeglichen werden [35,141,142].

Durch eine Regulation wäre es somit möglich, die Anti-VEGF Dosis sowie Kadenz besser auf den jeweiligen Patienten, dessen Krankheitsbild und das Ansprechen auf die Therapie, abzustimmen.

Da die normale Angiogenese nicht nur durch einen Wachstumsfaktor wie das VEGF gesteuert wird, sondern von einer Vielzahl angiogener und anti-angiogener Faktoren fein reguliert wird, muss bei der Entwicklung von inhibitorischen Substanzen die Spezifität berücksichtigt werden. Untersuchungen zur Verteilung von angiogenen und anti-angiogenen Wachstumsfaktoren im Auge zeigen ein komplexes Zusammenspiel von anti-angiogenen Faktoren wie etwa Endostatin oder Thrombosporin und angiogenen Faktoren wie dem VEGF [35,142]. Die beiden untersuchten Anti-VEGF Varianten Ra01 und Ra02 binden VEGF im Bereich der Bindestellen für die beiden VEGF Rezeptoren 1 und 2 und verhindern somit eine Aktivierung dieser. Es konnten für die am Auge verwendeten, kommerziell erhältlichen, Anti-VEGF Medikamente Bevacizumab (Avastin[®]) und Ranibizumab (Lucentis[®]) experimentell keine Wechselwirkungen mit anderen Wachstumsfaktoren aus der VEGF Familie wie PlGF oder VEGF bestimmt werden. Lediglich für Aflibercept (Eylea[®]) wurden Wechselwirkungen mit PlGF und VEGF-B nicht nur humanen Ursprungs beschrieben [143]. Aflibercept ist jedoch kein auf Antikörpern basierendes Molekül, es besteht vielmehr aus einer Fusion von Rezeptordomänen der beiden VEGF-Rezeptoren 1 und 2. Nur der nicht aktive Teil dieses Moleküls besteht aus dem konstanten Fragment (Fc) eines IgG-Antikörpers.

Des Weiteren sind bei alternativ gespleißten Proteinen wie dem VEGF auf die verschiedenen Isoformen und deren physiologischen Eigenschaften zu achten. Die hauptsächlich im Auge vorkommenden VEGF Isoformen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ besitzen eine identische N-terminale

Aminosäuresequenz und somit Rezeptorbindestellen für die beiden VEGF-Rezeptoren 1 und 2, aber verschiedene C-terminale Sequenzen. Da Ranibizumab und deren verwandte Moleküle Bevacizumab und Aflibercept die Rezeptorbindestellen des VEGF erkennt, wird somit nicht zwischen den einzelnen VEGF Isoformen unterschieden [144,145].

Da es sich bei allen weiter untersuchten VEGF Biosensorvarianten um Fusionsproteine des Ra02 handelt, kann von einer identischen Spezifität gegenüber Mitgliedern der VEGF Familie und den VEGF Isoformen ausgegangen werden.

Es konnte somit in dieser Arbeit ein System zur regulierbaren Expression von Anti-VEGF Molekülen nach AAV vermitteltem Gentransfer *in vitro* hergestellt werden.

4.2 Herstellung der auf BRET basierten VEGF Biosensoren

BRET beschreibt das Prinzip des Übertrags von Strahlung ausgehend von einer Luziferase auf ein Fluorophor. Änderungen im Messsignal, der BRET Ratio, können zur Quantifikation von Analyten herangezogen werden [146]. Es bestehen generell zwei unterschiedliche Strategien um mit Hilfe des BRET Analyten quantifizieren zu können. Eine Strategie beruht auf einem Zwei-Komponenten-System, bei der die Luziferase und das Fluorophor an zwei unterschiedliche Bindedomänen fusioniert sind, die aber den gleichen Analyten erkennen können [112]. Dem gegenüber steht die Ein-Komponenten-Strategie, bei der die Luziferase und das Fluorophor an dieselbe Bindedomäne fusioniert werden [147].

Als Bindedomäne des VEGF-Biosensors wurde das in dieser Arbeit bereits beschriebene und charakterisierte scFab Ra02 verwendet, an dessen N-Terminus die Luziferase und an den C-Terminus das Fluorophor GFP2 fusioniert wurden. Zwischen die einzelnen Domänen wurden unterschiedliche Peptidlinker (4x Glyzin und Prolin) inseriert und somit zwei weitere VEGF-Biosensorvarianten generiert. Die Verwendung der Ein-Komponenten-Strategie wurde durch die BRET gestützte Quantifizierung von Maltose, mit Hilfe des „Maltose Binding Proteins-MBP“, einem periplastischen Bindeprotein aus Gram-negativen Bakterien bewiesen [114].

Die Bindedomäne sollte durch die Wechselwirkungen mit dem Analyten VEGF eine Konformationsänderung eingehen. Die Änderung der dreidimensionalen Struktur des Biosensors und die damit verbundene Neuordnung der Luziferase und des GFP2 zueinander ruft eine Änderung der BRET Ratio hervor. Das Phänomen der Konformationsänderung, verursacht Protein-Protein Wechselwirkungen, wurde nicht nur bei Antikörpern, bei ganzen,

membranständigen Rezeptoren und einzelnen Domänen dieser, sondern auch bei regulierten Transkriptionsfaktoren sowie bakteriellen Proteinen beobachtet [114,148,149].

Die verwendete VEGF Bindedomäne Ra02 wurde bezüglich der Bindung an VEGF in dieser Arbeit bereits ausgiebig charakterisiert. Die Aktivität der Luziferase RLuc8 (siehe Abbildung 23) und die Funktionalität des Fluorophors GFP2 (siehe Abbildung 24) sowie die Expression der Biosensorvarianten als einzelne Moleküle (siehe Abbildung 25) wurden nachgewiesen.

Der durch Substratumsatz erzeugte Energieübertrag von der Luziferase auf den Energieakzeptor der drei VEGF Biosensorvarianten wurde durch die Messung der Intensität der Strahlung der Luziferase und des angeregten GFP2 und Berechnung des Quotienten, der BRET Ratio, beider Messwerte ermittelt (siehe Abbildung 27). Um die korrekte, normalisierte BRET Ratio zu erhalten, wurde der Quotient bzw. die BRET Ratio der Luziferase alleine von der VEGF Biosensor BRET Ratio subtrahiert [111]. Wie in Abbildung 26A, der spektralen Analyse dargestellt, besitzt die Luziferase alleine (Korrekturfaktor; cF) lediglich ein Emissionsmaximum, d.h. die daraus berechnete BRET Ratio sollte somit niedriger sein als der Quotient der beiden Emissions-Maxima der untersuchten Biosensoren. Nach Abzug des Korrekturfaktors muss die Ratio einen Wert größer Null annehmen. Als zusätzliche Kontrolle diente ein direkt an die Luziferase konjugiertes GFP2, das den maximal möglichen Energieübertrag repräsentiert.

Die spektrale Analyse (siehe Abbildung 26) zeigt für die direkt fusionierte und die Prolin Biosensorvariante ein deutliches Signal im Emissionsbereich des GFP2, während die Glyzinvariante kein deutliches Maximum, sondern eher ein „Rauschen“ erzeugt. Die Funktionalität des GFP2 wurde aber durch Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abbildung 24) bewiesen. Es findet somit bei dieser Variante nur ein sehr verringerter Energietransfer auf das GFP2 statt (siehe Abbildung 27). Drei Faktoren beeinflussen maßgeblich den Energieübertrag von der Luziferase auf das Fluorophor bei BRET Experimenten (siehe Abbildung 8).

Die Qualität der Überlappung der Luziferase Emissionwellenlänge mit der GFP2 Anregungswellenlänge, die aber bei allen untersuchten Biosensorvarianten durch die Wahl der Renilla Luziferase 8 (RLuc8) und des Fluorophors GFP2 identisch sind [150].

Die mittlere Distanz zwischen der Luziferase als Energiedonor und dem GFP2 als Energieakzeptor. Diese unterscheidet sich aber bei der 4x Glyzin Variante nicht signifikant genug von der direkt fusionierten und der Prolin Variante um die deutliche Abnahme der BRET Ratio zu begründen [151,152].

Die räumliche Orientierung des Energiedonors zum Energieakzeptor beeinflusst die BRET Ratio und kann die BRET Ratio abhängig vom Winkel zueinander abschwächen oder sogar

komplett unterdrücken [153]. Bei optimalem Energieübertrag liegt der Emissionsdipol des Donors in einer Ebene mit dem Anregungsdipol des Akzeptors ($\Theta_D = \Theta_A = 90^\circ$) (siehe Abbildung 31A). Der Übertragungskoeffizient (K^2) trägt somit den Wert eins, was einer Übertragungseffizienz von 100% entspricht. Verschieben sich der Winkel des Dipols ($\Theta_D = \Theta_A = \Theta_{DA} = 90^\circ$) einer Komponente nimmt die übertragene Energie ab und wird bei einem Winkel von 90° Null, d.h. die BRET Ratio unterscheidet sich nicht mehr vom Korrekturfaktor (siehe Abbildung 31B). Somit kann die im Vergleich zur direkt fusionierten und zur Prolinvariante des VEGF-Biosensors signifikant niedrigere BRET Ratio nur durch die nicht optimale Lage des Luziferase Energiedonors oder des Energieakzeptor Fluorophors GFP2 erklärt werden. Letztendlich würde aber nur eine Auflösung der Proteinstruktur diese These sicher beweisen.

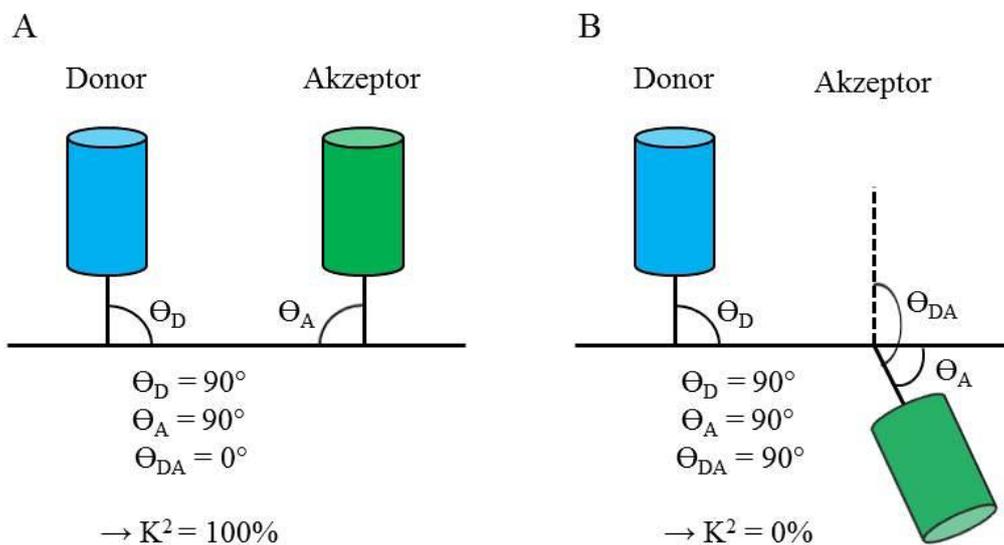


Abbildung 31: Abhängigkeit der BRET Ratio von der räumlichen Lage des Energiedonors zum Energieakzeptor.

Um im Hinblick auf die Messungen der VEGF induzierten Änderung der BRET Ratio der VEGF-Biosensoren die optimalen Messzeitparameter zu bestimmen, wurde der zeitliche Verlauf der Emission der Luziferase RLuc8 und des GFP2 am Beispiel der Maximalen Kontrolle (Max.Ctrl.) nach Zugabe des Luziferase Substrates ermittelt. Die Emission der Luziferase RLuc8 nimmt nach Substratgabe über die Zeit durch den Verbrauch des Substrates ab. In gleicher Weise verhält sich die Emission des durch die Luziferase angeregten GFP2, da über die Zeit weniger Energie von der Luziferase auf das GFP2 übertragen wird (siehe Abbildung 28A). Die BRET Ratio, berechnet als Quotient der Emission von GFP2 und der Luziferase, bleibt weitestgehend konstant über den ganzen gemessenen Bereich, da eine

Abnahme der Luziferase Emission, durch den geringeren Energieübertrag, gleichzeitig eine Abnahme der GFP2 Emission bewirkt (siehe Abbildung 28B). Dies deckt sich mit kinetischen BRET Studien die die Dimerisierung und Aktivierung von Rezeptoren untersuchten [154].

In ähnlicher Weise verhält sich die BRET Ratio im Grundzustand der VEGF-Biosensoren bei unterschiedlichen Verdünnungen (siehe Abbildung 29). Die Emissionsmessungen der Luziferase und des GFP2 bei aufsteigender Verdünnungsstufe nimmt linear ab, die daraus errechneten BRET Ratios, als Quotienten der GFP Emission und der Luziferase Emission, bleiben aber relativ konstant. Dies bewirkt die gleichartige Abnahme von Luziferase und GFP Emission. Letztendlich ist die BRET Ratio somit Unabhängig von der Konzentration der VEGF-Biosensoren und vom Zeitpunkt der Messung nach Substratzugabe. Das Signal des GFP2 sollte aber einen minimalen Wert nicht unterschreiten, da er sich immer weiter dem Hintergrundsignal der Luziferase im entsprechenden, grünen Wellenlängenbereich annähert.

Um VEGF mit den untersuchten BRET basierenden VEGF Biosensoren quantifizieren zu können, muss sich die Konformation der VEGF Bindedomäne durch die Wechselwirkung mit VEGF so ändern, dass eine Verschiebung der beiden BRET Komponenten zu einer Änderung BRET Ratio führt. Diese VEGF induzierte Änderung der räumlichen Konformation kann so zu einer Reduktion oder auch zu einer Erhöhung der BRET Ratio, verglichen mit dem Grundzustand der VEGF Biosensoren, führen. Dies wurde durch die Arbeiten zur Quantifizierung von ATP und zur Signalweitergabe bei G-gekoppelten Rezeptoren bestätigt [146,155]. Letztendlich führte bei den untersuchten VEGF Biosensoren die Bindung von VEGF an die Biosensor Bindedomäne zu einer Erhöhung der BRET Ratio und somit des Messsignals (siehe Abbildung 30). Während die 4x Glyzinvariante keine VEGF induzierte Änderung der BRET Ratio messbar war, zeigten die Prolin- sowie die direkt fusionierte Variante signifikante Erhöhungen der BRET Ratio. Die bei diesen beiden Varianten stattgefundenen Erhöhung lässt somit auf eine Konformationsänderung durch die Bindung von VEGF schließen [156]. Da bei allen drei Biosensorvarianten die gleiche Bindedomäne verwendet wurde, lässt das Fehlen einer Erhöhung der BRET Ratio der 4x Glyzin Variante eine Änderung des Winkels eines der beiden Dipole der Luziferase oder des GFP2 schließen. Ein weiterer Grund wäre eine sterische Inhibition der VEGF Bindung an die VEGF Bindedomäne durch die Luziferase und/oder des GFP2 möglich. Somit kommt es zu keiner Konformationsänderung des Sensors, da kein VEGF binden kann. Wichtig im Hinblick auf in vitro und in vivo VEGF Messungen ist auch der Konzentrationsbereich in dem VEGF quantifiziert werden kann. Bei der Prolin Biosensorvariante lässt sich eine signifikante Erhöhung bei einer VEGF Konzentration von 10 ng/ml im Vergleich zu einer Konzentration

von 1,0 ng/ml erkennen, was diese Variante für Messungen in vivo, wegen der sehr niedrigen VEGF Konzentrationen im Auge, die im Bereich von etwa 70 pg/ml liegen [142]. Alleine die direkt fusionierte Variante zeigt im interessierenden Konzentrationsbereich eine signifikante Änderung der BRET Ratio, durch VEGF Bindung an den Biosensor (siehe Abbildung 30).

Die Biosensor Konzentration (in dieser Arbeit bezogen auf die Luziferase Aktivität) des direkt fusionierten VEGF Biosensors hat einen Einfluss auf die Höhe der Änderung der BRET Ratio. Die Sättigung und somit die maximale Änderung der BRET Ratio führt bei niedrigeren Biosensor Konzentrationen zu einer niedrigeren Änderung, bei höheren Biosensor Konzentrationen zu einer höheren Änderung [157].

Somit konnte eine Biosensorvariante zur potentiellen Anwendung in vivo im interessierenden Konzentrationsbereichs zur Bestimmung von VEGF im Auge generiert werden.

5 Zusammenfassung

Neovaskuläre Erkrankungen des Auges basieren auf einer hypoxieinduzierten Hochregulation der VEGF Expression. Die Therapie besteht deswegen in der intraokulären Injektion von sogenannten Anti-VEGF Molekülen die das VEGF binden und somit eine Interaktion und Aktivierung mit dessen Rezeptoren verhindern.

In dieser Arbeit sollte ein System zur regulierbaren Expression von Anti-VEGF Molekülen nach viralem Adeno-assoziierten Gentransfer generiert und in vitro charakterisiert werden. Ein System zur regulierbaren Anti-VEGF Expression von den Zellen des Auges würde wiederholte intraokuläre Injektionen und die damit verbundenen Probleme vermeiden. Des Weiteren sollte ein in vivo kompatibles Messsystem zur Quantifikation von VEGF im Auge hergestellt und in vitro charakterisiert werden.

Es wurde ein Anti-VEGF Fab Fragment und unterschiedliche scFab Fragmente generiert und biologisch charakterisiert. Das Fab Fragment und die kürzeste, aktivste scFab Molekülvariante wurden unter die Kontrolle des TetOn Systems gestellt. Die scFab Expressionskassette wurde in AAV (Adenoassoziierter Virus) verpackt. Die durch das Tetracyclinderivat Doxycyclin regulierbare Expression wurde nach Plasmidtransfektion und AAV Transduktion verifiziert. Es konnte erfolgreich ein Anti-VEGF Molekül reguliert als scFab Fragment nach AAV vermitteltem Gentransfer exprimiert werden das VEGF inhibierende Eigenschaften aufweist. Es kann potentiell als Therapeutikum genutzt werden um nach einmaliger subretinaler Injektion und AAV Transduktion von Photorezeptoren und RPE nur durch die orale Gabe von Doxycyclin das Anti-VEGF Molekül gezielt exprimiert zu können.

Das bereits charakterisierte scFab Fragment wurde dazu benutzt um proteinbasierte Biosensoren auf dem Prinzip des Biolumineszenz Resonanz Energie Transfers (BRET) herzustellen. Die Expression wurde verifiziert und die Quantifikation von VEGF in vitro überprüft. Es konnte so eine auf BRET basierende VEGF Biosensorvariante hergestellt und charakterisiert werden mit der eine sensitive Quantifikation von VEGF möglich ist. Da es sich bei dem Biosensor um ein exprimierbares Protein handelt kann er potentiell in vivo zum Beispiel verankert auf der Oberfläche von Zellen in implantierbaren Systemen verwendet werden.

6 Summary

Neovascular disorders of the eye are caused through a hypoxia induced upregulation of VEGF expression. These disorders are treated with repeated intraocular injections of so called Anti-VEGF molecules. These molecules are binding to VEGF so that an interaction with its receptors is inhibited. In this work a system for the regulated expression of the Anti-VEGF molecule Ranibizumab after adeno-associated gene transfer should be generated and characterized *in vitro*. This system would reduce the repeated injections of Anti-VEGF molecules into the eye used in neovascular diseases and the side effects caused through the therapy. Furthermore an *in vivo* compatible quantification system to measure the VEGF concentration *in vivo* should be generated and characterized.

One Anti-VEGF Fab Fragment and different scFab Fragments were generated and characterized. The shortest, most active scFab molecule variant was cloned under the control of the TetOn system. The expression construct was packed into an AAV (adeno-associated virus). The doxycycline inducible expression was further verified after plasmid transfection and AAV transduction. The generated Anti-VEGF molecule shows inhibitory activity in the assays used in this dissertation. The expression of the scFab Anti-VEGF molecule could be regulated after AAV mediated gene transfer. It can be used potentially as a therapeutic agent to treat neovascular diseases after a single subretinal injection an AAV transduction. The photoreceptors and the RPE as targeted cells in the eye would be able to express the Anti-VEGF molecule after the induction of transgene expression with oral doxycycline.

The well characterized scFab Fragment was used to generate protein based biosensors on the principle of the bioluminescence resonance energy transfer (BRET). VEGF is inducing a conformational rearrangement of the biosensor which changes the energy transfer and can be used to quantify VEGF. The expression of the biosensors was verified and the quantification of VEGF was checked *in vitro*.

Furthermore a BRET based VEGF biosensor could be generated and characterized in this work that allows a sensitive quantification of VEGF *in vitro*. As an expressed protein the biosensor is potentially applicable *in vivo* for example anchored on cell surfaces which are immobilized in transplantable systems.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMV	Zytomegalievirus
CLZ400a	Coelenterazin 400a
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d.h.	das heißt
Da	Dalton
ddH ₂ O	bi-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin
dNTP	Desoxyribonukleotid (N=A,T,G,C)
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
f	femto
g	Gramm
G, Gly	Glycin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria-Broth
M	Molar (mol/L)
m	milli

ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOI	Multiplicity of infection
n	nano
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
P, Pro	Prolin
p	piko
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline)
pH	potential hydrogenii
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribunukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (standard deviation)
S, Ser	Serin
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Trispuffer (Tris Buffered Saline)
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminoethan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
UV	Ultraviolet
V	Volt
vg	Virusgenome
x g	mal Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celcius
μ	Mikro

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Anatomie des menschlichen Auges.	1
Abbildung 2:	Anti-VEGF Moleküle.	5
Abbildung 3:	Diagnostische Lücke bei der Behandlung neovaskulärer Erkrankungen.	6
Abbildung 4:	Generierung verschiedener VEGF-A Splice Varianten am Beispiel VEGF-A165.	8
Abbildung 5:	VEGF Rezeptoren, deren Signalwege und Liganden.	9
Abbildung 6:	Das TetOn System.	12
Abbildung 7:	Aufbau von Antikörpern und deren Fragmenten.	13
Abbildung 8:	Abhängigkeiten des Resonanz Energie Transfer.	17
Abbildung 9:	BRET Prinzip der RLuc8-GFP2 Kombination.	19
Abbildung 10:	Umsetzung des Luziferase Substrates durch die Renilla reniformis Luziferase.	20
Abbildung 11:	Herstellung eines Systems zur regulierbaren Anti-VEGF Expression nach AAV vermitteltem Gentransfer.	50
Abbildung 12:	Expressionskontrolle leichte Fab Kette Ra01.	51
Abbildung 13:	Expressionskontrolle Fab Ra01.	52
Abbildung 14:	Expressionskontrolle scFab Ra02-Ra05.	53
Abbildung 15:	HUVEC Migration Assay Ra01-Ra02.	54
Abbildung 16:	Konzentrationsabhängige Inhibition der VEGF induzierten Migration durch Ra01 und Ra02.	55
Abbildung 17:	Zellfreies VEGF Bindeassay und Bestimmung der IC ₅₀ .	56
Abbildung 18:	Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d und der maximalen Bindekapazität B_{max} .	57
Abbildung 19:	TetOn Expressionskonstrukte und Abhängigkeit der TetOn regulierten Ra01 und Ra02 Expression von der Doxycyclinkonzentration.	58
Abbildung 20:	Regulierbare Ra02 Expression nach SSV9-TetOn-Ra02 Transfektion und AAV2/5-TetOn-Ra02 Transduktion.	60
Abbildung 21:	Herstellung eines Biosensors zur Quantifizierung von VEGF in vivo.	61
Abbildung 22:	Biosensor Expressionkonstrukte.	62

Abbildung 23:	Expressionskontrolle Luziferasedomäne der Biosensoren und Kontrollen.	63
Abbildung 24:	Expressionskontrolle des fusionierten GFP2.	64
Abbildung 25:	Kontrolle der Vollängenexpression.	65
Abbildung 26:	Spektrale Analyse der Biosensoren.	66
Abbildung 27:	BRET Ratio der exprimierten Biosensoren.	67
Abbildung 28:	Zeitlicher Verlauf der RLuc8 und GFP2 Emission und Kinetik der BRET Ratio nach Substratzugabe.	68
Abbildung 29:	Konzentrationsunabhängigkeit der BRET Ratio.	69
Abbildung 30:	VEGF Induzierte Änderung der BRET Ratio der Biosensoren.	70
Abbildung 31:	Abhängigkeit der BRET Ratio von der räumlichen Lage des Energiedonors zum Energieakzeptor.	77

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	RLuc basierte BRET Kombinationen.	21
------------	-----------------------------------	----

1. Grehn, F. *Augenheilkunde: [neue Approbationsordnung]*, 29th ed; Springer: Berlin, 2006.
2. Chader, G.J.; Taylor, A. Preface: The aging eye: normal changes, age-related diseases, and sight-saving approaches. *Investigative ophthalmology & visual science* **2013**, *54*, ORSF1-4.
3. Campochiaro, P.A. Ocular neovascularization. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **2013**, *91*, 311–321.
4. Grossniklaus, H.E.; Kang, S.J.; Berglin, L. Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Progress in retinal and eye research* **2010**, *29*, 500–519.
5. Shimizu, K.; Kobayashi, Y.; Muraoka, K. Midperipheral fundus involvement in diabetic retinopathy. *Ophthalmology* **1981**, *88*, 601–612.
6. Liu, Z.; Yan, S.; Wang, J.; Xu, Y.; Wang, Y.; Zhang, S.; Xu, X.; Yang, Q.; Zeng, X.; Zhou, Y.; *et al.* Endothelial adenosine A2a receptor-mediated glycolysis is essential for pathological retinal angiogenesis. *Nature communications* **2017**, *8*, 584.
7. Penn, J.S.; Madan, A.; Caldwell, R.B.; Bartoli, M.; Caldwell, R.W.; Hartnett, M.E. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Progress in retinal and eye research* **2008**, *27*, 331–371.
8. Osaadon, P.; Fagan, X.J.; Lifshitz, T.; Levy, J. A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy. *Eye (London, England)* **2014**, *28*, 510–520.
9. Wang, X.; Wang, G.; Wang, Y. Intravitreal vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1a in patients with proliferative diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology* **2009**, *148*, 883–889.
10. Liegl, R.; Hellström, A.; Smith, L.E. Retinopathy of prematurity: the need for prevention. *Eye and brain* **2016**, *8*, 91–102.
11. Shah, P.K.; Prabhu, V.; Karandikar, S.S.; Ranjan, R.; Narendran, V.; Kalpana, N. Retinopathy of prematurity: Past, present and future. *World journal of clinical pediatrics* **2016**, *5*, 35–46.
12. Wong, T.Y.; Scott, I.U. Clinical practice. Retinal-vein occlusion. *The New England journal of medicine* **2010**, *363*, 2135–2144.
13. Glanville, J.; Patterson, J.; McCool, R.; Ferreira, A.; Gairy, K.; Pearce, I. Efficacy and safety of widely used treatments for macular oedema secondary to retinal vein occlusion: a systematic review. *BMC ophthalmology* **2014**, *14*, 7.

14. Kilarski, W.W.; Samolov, B.; Petersson, L.; Kvanta, A.; Gerwins, P. Biomechanical regulation of blood vessel growth during tissue vascularization. *Nature medicine* **2009**, *15*, 657–664.
15. Hollyfield, J.G.; Bonilha, V.L.; Rayborn, M.E.; Yang, X.; Shadrach, K.G.; Lu, L.; Ufret, R.L.; Salomon, R.G.; Perez, V.L. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nature medicine* **2008**, *14*, 194–198.
16. Hageman, G.S.; Luthert, P.J.; Victor Chong, N.H.; Johnson, L.V.; Anderson, D.H.; Mullins, R.F. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research* **2001**, *20*, 705–732.
17. Grossniklaus, H.E.; Ling, J.X.; Wallace, T.M.; Dithmar, S.; Lawson, D.H.; Cohen, C.; Elner, V.M.; Elner, S.G.; Sternberg, P. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Molecular vision* **2002**, *8*, 119–126.
18. Scholl, H.P.N.; Charbel Issa, P.; Walier, M.; Janzer, S.; Pollok-Kopp, B.; Börncke, F.; Fritsche, L.G.; Chong, N.V.; Fimmers, R.; Wienker, T.; *et al.* Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PloS one* **2008**, *3*, e2593.
19. Klein, R.; Klein, B.E.K. The prevalence of age-related eye diseases and visual impairment in aging: current estimates. *Investigative ophthalmology & visual science* **2013**, *54*, ORSF5-ORSF13.
20. Holz, F.G.; Pauleikhoff, D.; Klein, R.; Bird, A.C. Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *American journal of ophthalmology* **2004**, *137*, 504–510.
21. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews* **2004**, *25*, 581–611.
22. Ferrara, N.; Kerbel, R.S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **2005**, *438*, 967–974.
23. Campochiaro, P.A.; Lauer, A.K.; Sohn, E.H.; Mir, T.A.; Naylor, S.; Anderton, M.C.; Kelleher, M.; Harrop, R.; Ellis, S.; Mitrophanous, K.A. Lentiviral Vector Gene Transfer of Endostatin/Angiostatin for Macular Degeneration (GEM) Study. *Human gene therapy* **2017**, *28*, 99–111.
24. Ng, E.W.M.; Adamis, A.P. Anti-VEGF aptamer (pegaptanib) therapy for ocular vascular diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2006**, *1082*, 151–171.

25. Bashshur, Z.F.; Bazarbachi, A.; Schakal, A.; Haddad, Z.A.; El Haibi, C.P.; Nouredin, B.N. Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* **2006**, *142*, 1–9.
26. Rosenfeld, P.J.; Brown, D.M.; Heier, J.S.; Boyer, D.S.; Kaiser, P.K.; Chung, C.Y.; Kim, R.Y. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **2006**, *355*, 1419–1431.
27. Heier, J.S.; Brown, D.M.; Chong, V.; Korobelnik, J.-F.; Kaiser, P.K.; Nguyen, Q.D.; Kirchhof, B.; Ho, A.; Ogura, Y.; Yancopoulos, G.D.; *et al.* Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 2537–2548.
28. Brown, D.M.; Michels, M.; Kaiser, P.K.; Heier, J.S.; Sy, J.P.; Ianchulev, T. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology* **2009**, *116*, 57-65.e5.
29. Singer, M.A.; Awh, C.C.; Sadda, S.; Freeman, W.R.; Antoszyk, A.N.; Wong, P.; Tuomi, L. HORIZON: an open-label extension trial of ranibizumab for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 1175–1183.
30. Regillo, C.D.; Brown, D.M.; Abraham, P.; Yue, H.; Ianchulev, T.; Schneider, S.; Shams, N. Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER Study year 1. *American journal of ophthalmology* **2008**, *145*, 239–248.
31. Chen, Y.; Han, F. Profile of ranibizumab: efficacy and safety for the treatment of wet age-related macular degeneration. *Therapeutics and clinical risk management* **2012**, *8*, 343–351.
32. Lalwani, G.A.; Rosenfeld, P.J.; Fung, A.E.; Dubovy, S.R.; Michels, S.; Feuer, W.; Davis, J.L.; Flynn, H.W.; Esquiabro, M. A variable-dosing regimen with intravitreal ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: year 2 of the PrONTO Study. *American journal of ophthalmology* **2009**, *148*, 43-58.e1.
33. Holz, F.G.; Amoaku, W.; Donate, J.; Guymer, R.H.; Kellner, U.; Schlingemann, R.O.; Weichselberger, A.; Staurenghi, G. Safety and efficacy of a flexible dosing regimen of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration: the SUSTAIN study. *Ophthalmology* **2011**, *118*, 663–671.

34. Meyer, C.H.; Ziemssen, F.; Heimann, H. Intravitreale Injektion. Kontrollen zur Vermeidung von postoperativen Komplikationen. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* **2008**, *105*, 143-55, 157.
35. Muether, P.S.; Hermann, M.M.; Dröge, K.; Kirchhof, B.; Fauser, S. Long-term stability of vascular endothelial growth factor suppression time under ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology* **2013**, *156*, 989-993.e2.
36. Senger, D.R.; van de Water, L.; Brown, L.F.; Nagy, J.A.; Yeo, K.T.; Yeo, T.K.; Berse, B.; Jackman, R.W.; Dvorak, A.M.; Dvorak, H.F. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer metastasis reviews* **1993**, *12*, 303–324.
37. Ferrara, N. VEGF and Intraocular Neovascularization: From Discovery to Therapy. *Translational vision science & technology* **2016**, *5*, 10.
38. Yamazaki, Y.; Matsunaga, Y.; Tokunaga, Y.; Obayashi, S.; Saito, M.; Morita, T. Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284*, 9885–9891.
39. Wise, L.M.; Inder, M.K.; Real, N.C.; Stuart, G.S.; Fleming, S.B.; Mercer, A.A. The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. *Cellular microbiology* **2012**, *14*, 1376–1390.
40. Thangarajah, H.; Yao, D.; Chang, E.I.; Shi, Y.; Jazayeri, L.; Vial, I.N.; Galiano, R.D.; Du, X.-L.; Grogan, R.; Galvez, M.G.; *et al.* The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 13505–13510.
41. DiSalvo, J.; Bayne, M.L.; Conn, G.; Kwok, P.W.; Trivedi, P.G.; Soderman, D.D.; Palisi, T.M.; Sullivan, K.A.; Thomas, K.A. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor.placenta growth factor heterodimer. *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270*, 7717–7723.
42. Hulse, R.P.; Beazley-Long, N.; Hua, J.; Kennedy, H.; Prager, J.; Bevan, H.; Qiu, Y.; Fernandes, E.S.; Gammons, M.V.; Ballmer-Hofer, K.; *et al.* Regulation of alternative VEGF-A mRNA splicing is a therapeutic target for analgesia. *Neurobiology of disease* **2014**, *71*, 245–259.

43. Bates, D.O.; Mavrou, A.; Qiu, Y.; Carter, J.G.; Hamdollah-Zadeh, M.; Barratt, S.; Gammons, M.V.; Millar, A.B.; Salmon, A.H.J.; Oltean, S.; *et al.* Detection of VEGF-A(xxx)b isoforms in human tissues. *PloS one* **2013**, *8*, e68399.
44. Eswarappa, S.M.; Potdar, A.A.; Koch, W.J.; Fan, Y.; Vasu, K.; Lindner, D.; Willard, B.; Graham, L.M.; DiCorleto, P.E.; Fox, P.L. Programmed translational readthrough generates antiangiogenic VEGF-Ax. *Cell* **2014**, *157*, 1605–1618.
45. Jeltsch, M.; Leppänen, V.-M.; Saharinen, P.; Alitalo, K. Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2013**, *5*.
46. Vieira, J.M.; Ruhrberg, C.; Schwarz, Q. VEGF receptor signaling in vertebrate development. *Organogenesis* **2014**, *6*, 97–106.
47. Koch, S.; Tugues, S.; Li, X.; Gualandi, L.; Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical journal* **2011**, *437*, 169–183.
48. Fong, G.H.; Rossant, J.; Gertsenstein, M.; Breitman, M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **1995**, *376*, 66–70.
49. Cébe-Suarez, S.; Zehnder-Fjällman, A.; Ballmer-Hofer, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2006**, *63*, 601–615.
50. Di Marco, G.S.; Reuter, S.; Hillebrand, U.; Amler, S.; König, M.; Larger, E.; Oberleithner, H.; Brand, E.; Pavenstädt, H.; Brand, M. The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2009**, *20*, 2235–2245.
51. Lutun, A.; Carmeliet, P. Soluble VEGF receptor Flt1: The elusive preeclampsia factor discovered? *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 600–602.
52. Gille, H.; Kowalski, J.; Li, B.; LeCouter, J.; Moffat, B.; Zioncheck, T.F.; Pelletier, N.; Ferrara, N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 3222–3230.
53. Yang, X.; Cepko, C.L. Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **1996**, *16*, 6089–6099.

54. Shiote, M.; Nagano, I.; Ilieva, H.; Murakami, T.; Narai, H.; Ohta, Y.; Nagata, T.; Shoji, M.; Abe, K. Reduction of a vascular endothelial growth factor receptor, fetal liver kinase-1, by antisense oligonucleotides induces motor neuron death in rat spinal cord exposed to hypoxia. *Neuroscience* **2005**, *132*, 175–182.
55. Meadows, K.N.; Bryant, P.; Pumiglia, K. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 49289–49298.
56. Shu, X.; Wu, W.; Mosteller, R.D.; Broek, D. Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Molecular and cellular biology* **2002**, *22*, 7758–7768.
57. Matsumoto, T.; Bohman, S.; Dixelius, J.; Berge, T.; Dimberg, A.; Magnusson, P.; Wang, L.; Wikner, C.; Qi, J.H.; Wernstedt, C.; *et al.* VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *The EMBO journal* **2005**, *24*, 2342–2353.
58. Holmqvist, K.; Cross, M.; Riley, D.; Welsh, M. The Shb adaptor protein causes Src-dependent cell spreading and activation of focal adhesion kinase in murine brain endothelial cells. *Cellular signalling* **2003**, *15*, 171–179.
59. Lamalice, L.; Houle, F.; Jourdan, G.; Huot, J. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene* **2004**, *23*, 434–445.
60. Cantley, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)* **2002**, *296*, 1655–1657.
61. Fukumura, D.; Gohongi, T.; Kadambi, A.; Izumi, Y.; Ang, J.; Yun, C.O.; Buerk, D.G.; Huang, P.L.; Jain, R.K. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 2604–2609.
62. Mäkinen, T.; Veikkola, T.; Mustjoki, S.; Karpanen, T.; Catimel, B.; Nice, E.C.; Wise, L.; Mercer, A.; Kowalski, H.; Kerjaschki, D.; *et al.* Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *The EMBO journal* **2001**, *20*, 4762–4773.
63. Raimondi, C.; Brash, J.T.; Fantin, A.; Ruhrberg, C. NRP1 function and targeting in neurovascular development and eye disease. *Progress in retinal and eye research* **2016**, *52*, 64–83.

64. Gelfand, M.V.; Hagan, N.; Tata, A.; Oh, W.-J.; Lacoste, B.; Kang, K.-T.; Kopycinska, J.; Bischoff, J.; Wang, J.-H.; Gu, C. Neuropilin-1 functions as a VEGFR2 co-receptor to guide developmental angiogenesis independent of ligand binding. *eLife* **2014**, *3*, e03720.
65. Yaqoob, U.; Cao, S.; Shergill, U.; Jagavelu, K.; Geng, Z.; Yin, M.; Assuncao, T.M. de; Cao, Y.; Szabolcs, A.; Thorgeirsson, S.; *et al.* Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment. *Cancer research* **2012**, *72*, 4047–4059.
66. Fantin, A.; Lampropoulou, A.; Senatore, V.; Brash, J.T.; Prahst, C.; Lange, C.A.; Liyanage, S.E.; Raimondi, C.; Bainbridge, J.W.; Augustin, H.G.; *et al.* VEGF165-induced vascular permeability requires NRP1 for ABL-mediated SRC family kinase activation. *The Journal of experimental medicine* **2017**, *214*, 1049–1064.
67. Fantin, A.; Herzog, B.; Mahmoud, M.; Yamaji, M.; Plein, A.; Denti, L.; Ruhrberg, C.; Zachary, I. Neuropilin 1 (NRP1) hypomorphism combined with defective VEGF-A binding reveals novel roles for NRP1 in developmental and pathological angiogenesis. *Development (Cambridge, England)* **2014**, *141*, 556–562.
68. Guo, H.-F.; Vander Kooi, C.W. Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor. *The Journal of biological chemistry* **2015**, *290*, 29120–29126.
69. Parker, M.W.; Xu, P.; Guo, H.-F.; Vander Kooi, C.W. Mechanism of selective VEGF-A binding by neuropilin-1 reveals a basis for specific ligand inhibition. *PloS one* **2012**, *7*, e49177.
70. Herzog, B.; Pellet-Many, C.; Britton, G.; Hartzoulakis, B.; Zachary, I.C. VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407 phosphorylation. *Molecular biology of the cell* **2011**, *22*, 2766–2776.
71. Raimondi, C.; Fantin, A.; Lampropoulou, A.; Denti, L.; Chikh, A.; Ruhrberg, C. Imatinib inhibits VEGF-independent angiogenesis by targeting neuropilin 1-dependent ABL1 activation in endothelial cells. *The Journal of experimental medicine* **2014**, *211*, 1167–1183.
72. Vempati, P.; Popel, A.S.; Mac Gabhann, F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine & growth factor reviews* **2014**, *25*, 1–19.
73. Lai, C.-M.; Estcourt, M.J.; Wikstrom, M.; Himbeck, R.P.; Barnett, N.L.; Brankov, M.; Tee, L.B.G.; Dunlop, S.A.; Degli-Esposti, M.A.; Rakoczy, E.P. rAAV.sFlt-1 gene

- therapy achieves lasting reversal of retinal neovascularization in the absence of a strong immune response to the viral vector. *Investigative ophthalmology & visual science* **2009**, *50*, 4279–4287.
74. Lai, C.-M.; Estcourt, M.J.; Himbeck, R.P.; Lee, S.-Y.; Yew-San Yeo, I.; Luu, C.; Loh, B.K.; Lee, M.W.; Barathi, A.; Villano, J.; *et al.* Preclinical safety evaluation of subretinal AAV2.sFlt-1 in non-human primates. *Gene therapy* **2012**, *19*, 999–1009.
75. Stieger, K.; Le Meur, G.; Lasne, F.; Weber, M.; Deschamps, J.-Y.; Nivard, D.; Mendes-Madeira, A.; Provost, N.; Martin, L.; Moullier, P.; *et al.* Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2006**, *13*, 967–975.
76. Ahmad, Z.A.; Yeap, S.K.; Ali, A.M.; Ho, W.Y.; Alitheen, N.B.M.; Hamid, M. scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical & developmental immunology* **2012**, *2012*, 980250.
77. Frenzel, A.; Hust, M.; Schirrmann, T. Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in immunology* **2013**, *4*, 217.
78. Price, J.; Turner, D.; Cepko, C. Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 156–160.
79. Auricchio, A.; Smith, A.J.; Ali, R.R. The Future Looks Brighter After 25 Years of Retinal Gene Therapy. *Human gene therapy* **2017**, *28*, 982–987.
80. Tessitore, A.; Parisi, F.; Denti, M.A.; Allocca, M.; Di Vicino, U.; Domenici, L.; Bozzoni, I.; Auricchio, A. Preferential silencing of a common dominant rhodopsin mutation does not inhibit retinal degeneration in a transgenic model. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2006**, *14*, 692–699.
81. Burnett, J.C.; Rossi, J.J. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry & biology* **2012**, *19*, 60–71.
82. Deng, W.-T.; Dinculescu, A.; Li, Q.; Boye, S.L.; Li, J.; Gorbatyuk, M.S.; Pang, J.; Chiodo, V.A.; Matthes, M.T.; Yasumura, D.; *et al.* Tyrosine-mutant AAV8 delivery of human MERTK provides long-term retinal preservation in RCS rats. *Investigative ophthalmology & visual science* **2012**, *53*, 1895–1904.
83. Jacobson, S.G.; Cideciyan, A.V.; Ratnakaram, R.; Heon, E.; Schwartz, S.B.; Roman, A.J.; Peden, M.C.; Aleman, T.S.; Boye, S.L.; Sumaroka, A.; *et al.* Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15

- children and adults followed up to 3 years. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* **2012**, *130*, 9–24.
84. Constable, I.J.; Pierce, C.M.; Lai, C.-M.; Magno, A.L.; Degli-Esposti, M.A.; French, M.A.; McAllister, I.L.; Butler, S.; Barone, S.B.; Schwartz, S.D.; *et al.* Phase 2a Randomized Clinical Trial: Safety and Post Hoc Analysis of Subretinal rAAV.sFLT-1 for Wet Age-related Macular Degeneration. *EBioMedicine* **2016**, *14*, 168–175.
85. Yanik, M.; Müller, B.; Song, F.; Gall, J.; Wagner, F.; Wende, W.; Lorenz, B.; Stieger, K. In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. *Progress in retinal and eye research* **2017**, *56*, 1–18.
86. Charbel Issa, P.; MacLaren, R.E. Non-viral retinal gene therapy: a review. *Clinical & experimental ophthalmology* **2012**, *40*, 39–47.
87. Ellouze, S.; Augustin, S.; Bouaita, A.; Bonnet, C.; Simonutti, M.; Forster, V.; Picaud, S.; Sahel, J.-A.; Corral-Debrinski, M. Optimized allotopic expression of the human mitochondrial ND4 prevents blindness in a rat model of mitochondrial dysfunction. *American journal of human genetics* **2008**, *83*, 373–387.
88. Andrieu-Soler, C.; Halhal, M.; Boatright, J.H.; Padove, S.A.; Nickerson, J.M.; Stodulkova, E.; Stewart, R.E.; Ciavatta, V.T.; Doat, M.; Jeanny, J.-C.; *et al.* Single-stranded oligonucleotide-mediated in vivo gene repair in the rd1 retina. *Molecular vision* **2007**, *13*, 692–706.
89. Sonntag, F.; Schmidt, K.; Kleinschmidt, J.A. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 10220–10225.
90. Penaud-Budloo, M.; Le Guiner, C.; Nowrouzi, A.; Toromanoff, A.; Chérel, Y.; Chenuaud, P.; Schmidt, M.; Kalle, C. von; Rolling, F.; Moullier, P.; *et al.* Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *Journal of virology* **2008**, *82*, 7875–7885.
91. Stieger, K.; Colle, M.-A.; Dubreil, L.; Mendes-Madeira, A.; Weber, M.; Le Meur, G.; Deschamps, J.Y.; Provost, N.; Nivard, D.; Cherel, Y.; *et al.* Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2008**, *16*, 916–923.
92. Stieger, K.; Cronin, T.; Bennett, J.; Rolling, F. Adeno-associated virus mediated gene therapy for retinal degenerative diseases. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2011**, *807*, 179–218.

93. Berns, K.I.; Giraud, C. Biology of adeno-associated virus. *Current topics in microbiology and immunology* **1996**, *218*, 1–23.
94. Binley, K.; Widdowson, P.S.; Kelleher, M.; Belin, J. de; Loader, J.; Ferrige, G.; Carlucci, M.; Esapa, M.; Chipchase, D.; Angell-Manning, D.; *et al.* Safety and biodistribution of an equine infectious anemia virus-based gene therapy, RetinoStat(®), for age-related macular degeneration. *Human gene therapy* **2012**, *23*, 980–991.
95. Kalesnykas, G.; Kokki, E.; Alasaarela, L.; Lesch, H.P.; Tuulos, T.; Kinnunen, K.; Uusitalo, H.; Airene, K.; Ylä-Herttuala, S. Comparative Study Of Adeno-Associated Virus, Adenovirus, Baculovirus And Lentivirus Vectors For Gene Therapy Of The Eyes. *Current gene therapy* **2017**.
96. Zufferey, R.; Dull, T.; Mandel, R.J.; Bukovsky, A.; Quiroz, D.; Naldini, L.; Trono, D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology* **1998**, *72*, 9873–9880.
97. Pang, J.; Cheng, M.; Stevenson, D.; Trousdale, M.D.; Dorey, C.K.; Blanks, J.C. Adenoviral-mediated gene transfer to retinal explants during development and degeneration. *Experimental eye research* **2004**, *79*, 189–201.
98. Förster, T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 166–175.
99. Clegg, R.M. Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done, *33*, 1–57.
100. Lakowicz, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy **2006**.
101. Shrestha, D.; Jenei, A.; Nagy, P.; Vereb, G.; Szöllösi, J. Understanding FRET as a research tool for cellular studies. *International journal of molecular sciences* **2015**, *16*, 6718–6756.
102. George Abraham, B.; Sarkisyan, K.S.; Mishin, A.S.; Santala, V.; Tkachenko, N.V.; Karp, M. Fluorescent Protein Based FRET Pairs with Improved Dynamic Range for Fluorescence Lifetime Measurements. *PloS one* **2015**, *10*, e0134436.
103. Hochreiter, B.; Garcia, A.P.; Schmid, J.A. Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2015**, *15*, 26281–26314.
104. Shyu, Y.J.; Suarez, C.D.; Hu, C.-D. Visualization of AP-1 NF-kappaB ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 151–156.

105. Evans, N.J.; Walker, J.W. Endothelin receptor dimers evaluated by FRET, ligand binding, and calcium mobilization. *Biophysical journal* **2008**, *95*, 483–492.
106. Sridharan, R.; Zuber, J.; Connelly, S.M.; Mathew, E.; Dumont, M.E. Fluorescent approaches for understanding interactions of ligands with G protein coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, *1838*, 15–33.
107. Chakraborty, S.; Núñez, D.; Hu, S.-Y.; Domingo, M.P.; Pardo, J.; Karmenyan, A.; Chiou, A. FRET based quantification and screening technology platform for the interactions of leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *PloS one* **2014**, *9*, e102572.
108. De, A.; Ray, P.; Loening, A.M.; Gambhir, S.S. BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2009**, *23*, 2702–2709.
109. De, A.; Loening, A.M.; Gambhir, S.S. An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer research* **2007**, *67*, 7175–7183.
110. Sun, Y.; Rombola, C.; Jyothikumar, V.; Periasamy, A. Förster resonance energy transfer microscopy and spectroscopy for localizing protein-protein interactions in living cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **2013**, *83*, 780–793.
111. Dragulescu-Andrasi, A.; Chan, C.T.; De, A.; Massoud, T.F.; Gambhir, S.S. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 12060–12065.
112. Wimmer, T.; Schroeter, E.; Lorenz, B.; Stieger, K. Detection of the Vascular Endothelial Growth Factor with a Novel Bioluminescence Resonance Energy Transfer Pair Using a Two-Component System. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2017**, *17*.
113. Griss, R.; Schena, A.; Reymond, L.; Patiny, L.; Werner, D.; Tinberg, C.E.; Baker, D.; Johnsson, K. Bioluminescent sensor proteins for point-of-care therapeutic drug monitoring. *Nature chemical biology* **2014**, *10*, 598–603.
114. Le, N.C.H.; Gel, M.; Zhu, Y.; Dacres, H.; Anderson, A.; Trowell, S.C. Real-time, continuous detection of maltose using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) on a microfluidic system. *Biosensors & bioelectronics* **2014**, *62*, 177–181.

115. Smirnova, D.; Ugarova, N. Bioanalytical Systems Based on Bioluminescence Resonance Energy Transfer Using Firefly Luciferase. *CCHTS* **2015**, *18*, 946–951.
116. Boute, N.; Lowe, P.; Berger, S.; Malissard, M.; Robert, A.; Tesar, M. NanoLuc Luciferase - A Multifunctional Tool for High Throughput Antibody Screening. *Frontiers in pharmacology* **2016**, *7*, 27.
117. Borroto-Escuela, D.O.; Flajolet, M.; Agnati, L.F.; Greengard, P.; Fuxe, K. Bioluminescence resonance energy transfer methods to study G protein-coupled receptor-receptor tyrosine kinase heteroreceptor complexes. *Methods in cell biology* **2013**, *117*, 141–164.
118. Loening, A.M.; Fenn, T.D.; Wu, A.M.; Gambhir, S.S. Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein engineering, design & selection : PEDS* **2006**, *19*, 391–400.
119. Pfleger, K.D.G.; Eidne, K.A. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nature methods* **2006**, *3*, 165–174.
120. Zhao, H.; Doyle, T.C.; Wong, R.J.; Cao, Y.; Stevenson, D.K.; Piwnica-Worms, D.; Contag, C.H. Characterization of coelenterazine analogs for measurements of Renilla luciferase activity in live cells and living animals. *Molecular imaging* **2004**, *3*, 43–54.
121. Levi, J.; De, A.; Cheng, Z.; Gambhir, S.S. Bisdeoxycoelenterazine derivatives for improvement of bioluminescence resonance energy transfer assays. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 11900–11901.
122. Jiang, T.; Du, L.; Li, M. Lighting up bioluminescence with coelenterazine: strategies and applications. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **2016**, *15*, 466–480.
123. Day, R.N.; Davidson, M.W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society reviews* **2009**, *38*, 2887–2921.
124. Xu, Y.; Piston, D.W.; Johnson, C.H. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: Application to interacting circadian clock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 151–156.
125. van Dyke, K.; van Dyke, C.; Woodfork, K., Eds. *Luminescence biotechnology: Instruments and applications*; CRC Press: Boca Raton, Florida, op. 2002.
126. Mizuguchi, H.; Xu, Z.; Ishii-Watabe, A.; Uchida, E.; Hayakawa, T. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression

- in a bicistronic vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2000**, *1*, 376–382.
127. Ahier, A.; Jarriault, S. Simultaneous expression of multiple proteins under a single promoter in *Caenorhabditis elegans* via a versatile 2A-based toolkit. *Genetics* **2014**, *196*, 605–613.
 128. Luke, G.A.; Felipe, P. de; Lukashev, A.; Kallioinen, S.E.; Bruno, E.A.; Ryan, M.D. Occurrence, function and evolutionary origins of '2A-like' sequences in virus genomes. *The Journal of general virology* **2008**, *89*, 1036–1042.
 129. Liu, Z.; Chen, O.; Wall, J.B.J.; Zheng, M.; Zhou, Y.; Wang, L.; Ruth Vaseghi, H.; Qian, L.; Liu, J. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Scientific reports* **2017**, *7*, 2193.
 130. Chinestra, P.; Olichon, A.; Medale-Giamarchi, C.; Lajoie-Mazenc, I.; Gence, R.; Inard, C.; Ligat, L.; Faye, J.-C.; Favre, G. Generation of a single chain antibody variable fragment (scFv) to sense selectively RhoB activation. *PloS one* **2014**, *9*, e111034.
 131. Ahmad, Z.A.; Yeap, S.K.; Ali, A.M.; Ho, W.Y.; Alitheen, N.B.M.; Hamid, M. scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical & developmental immunology* **2012**, *2012*, 980250.
 132. Whitlow, M.; Bell, B.A.; Feng, S.L.; Filpula, D.; Hardman, K.D.; Hubert, S.L.; Rollence, M.L.; Wood, J.F.; Schott, M.E.; Milenic, D.E. An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein engineering* **1993**, *6*, 989–995.
 133. Argos, P. An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *Journal of Molecular Biology* **1990**, *211*, 943–958.
 134. Singleton, P.A.; Garcia, J.G.N.; Moss, J. Synergistic effects of methylaltrexone with 5-fluorouracil and bevacizumab on inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *Molecular cancer therapeutics* **2008**, *7*, 1669–1679.
 135. Pechan, P.; Rubin, H.; Lukason, M.; Ardinger, J.; DuFresne, E.; Hauswirth, W.W.; Wadsworth, S.C.; Scaria, A. Novel anti-VEGF chimeric molecules delivered by AAV vectors for inhibition of retinal neovascularization. *Gene therapy* **2009**, *16*, 10–16.
 136. Lai, Y.K.Y.; Shen, W.Y.; Brankov, M.; Lai, C.M.; Constable, I.J.; Rakoczy, P.E. Potential long-term inhibition of ocular neovascularisation by recombinant adeno-associated virus-mediated secretion gene therapy. *Gene therapy* **2002**, *9*, 804–813.

137. Maclachlan, T.K.; Lukason, M.; Collins, M.; Munger, R.; Isenberger, E.; Rogers, C.; Malatos, S.; Dufresne, E.; Morris, J.; Calcedo, R.; *et al.* Preclinical safety evaluation of AAV2-sFLT01- a gene therapy for age-related macular degeneration. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2011**, *19*, 326–334.
138. Jin, K.L.; Mao, X.O.; Greenberg, D.A. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 10242–10247.
139. Hombrebueno, J.R.; Ali, I.H.A.; Xu, H.; Chen, M. Sustained intraocular VEGF neutralization results in retinal neurodegeneration in the Ins2(Akita) diabetic mouse. *Scientific reports* **2015**, *5*, 18316.
140. Le Guiner, C.; Stieger, K.; Toromanoff, A.; Guilbaud, M.; Mendes-Madeira, A.; Devaux, M.; Guigand, L.; Cherel, Y.; Moullier, P.; Rolling, F.; *et al.* Transgene regulation using the tetracycline-inducible TetR-KRAB system after AAV-mediated gene transfer in rodents and nonhuman primates. *PloS one* **2014**, *9*, e102538.
141. Muether, P.S.; Hermann, M.M.; Viebahn, U.; Kirchhof, B.; Fauser, S. Vascular endothelial growth factor in patients with exudative age-related macular degeneration treated with ranibizumab. *Ophthalmology* **2012**, *119*, 2082–2086.
142. Muether, P.S.; Neuhann, I.; Buhl, C.; Hermann, M.M.; Kirchhof, B.; Fauser, S. Intraocular growth factors and cytokines in patients with dry and neovascular age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **2013**, *33*, 1809–1814.
143. Papadopoulos, N.; Martin, J.; Ruan, Q.; Rafique, A.; Rosconi, M.P.; Shi, E.; Pyles, E.A.; Yancopoulos, G.D.; Stahl, N.; Wiegand, S.J. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis* **2012**, *15*, 171–185.
144. Ferrara, N.; Damico, L.; Shams, N.; Lowman, H.; Kim, R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa.)* **2006**, *26*, 859–870.
145. Rudge, J.S.; Holash, J.; Hylton, D.; Russell, M.; Jiang, S.; Leidich, R.; Papadopoulos, N.; Pyles, E.A.; Torri, A.; Wiegand, S.J.; *et al.* VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 18363–18370.

146. Yoshida, T.; Kakizuka, A.; Imamura, H. BTeam, a Novel BRET-based Biosensor for the Accurate Quantification of ATP Concentration within Living Cells. *Scientific reports* **2016**, *6*, 39618.
147. Kuchimaru, T.; Suka, T.; Hirota, K.; Kadonosono, T.; Kizaka-Kondoh, S. A novel injectable BRET-based in vivo imaging probe for detecting the activity of hypoxia-inducible factor regulated by the ubiquitin-proteasome system. *Scientific reports* **2016**, *6*, 34311.
148. Leonard, P.G.; Golemi-Kotra, D.; Stock, A.M. Phosphorylation-dependent conformational changes and domain rearrangements in *Staphylococcus aureus* VraR activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, 8525–8530.
149. Lane, J.R.; Canals, M. Sequential conformational rearrangements dictate the dynamics of class C GPCR activation. *Science signaling* **2012**, *5*, pe51.
150. Sun, S.; Yang, X.; Wang, Y.; Shen, X. In Vivo Analysis of Protein-Protein Interactions with Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET): Progress and Prospects. *International journal of molecular sciences* **2016**, *17*.
151. Siddiqui, S.; Cong, W.-N.; Daimon, C.M.; Martin, B.; Maudsley, S. BRET Biosensor Analysis of Receptor Tyrosine Kinase Functionality. *Frontiers in endocrinology* **2013**, *4*, 46.
152. Dacres, H.; Michie, M.; Wang, J.; Pflieger, K.D.G.; Trowell, S.C. Effect of enhanced Renilla luciferase and fluorescent protein variants on the Förster distance of Bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Biochemical and biophysical research communications* **2012**, *425*, 625–629.
153. Gadella, T.W.J., Ed. *FRET and FLIM techniques*; Elsevier: Amsterdam, London, 2009.
154. Mulero, M.; Perroy, J.; Federici, C.; Cabello, G.; Ollendorff, V. Analysis of RXR/THR and RXR/PPARG2 heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *PloS one* **2013**, *8*, e84569.
155. Namkung, Y.; Radresa, O.; Armando, S.; Devost, D.; Beautrait, A.; Le Gouill, C.; Laporte, S.A. Quantifying biased signaling in GPCRs using BRET-based biosensors. *Methods (San Diego, Calif.)* **2016**, *92*, 5–10.
156. Sela-Culang, I.; Alon, S.; Ofra, Y. A systematic comparison of free and bound antibodies reveals binding-related conformational changes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2012**, *189*, 4890–4899.

157. Walker, J.M.; Crowther, J.R. *The ELISA Guidebook* **2009**, 516.

Publikationsverzeichnis

Publikationen

Wimmer T, Schroeter E, Lorenz B, Stieger K. Detection of the Vascular Endothelial Growth Factor with a Novel Bioluminescence Resonance Energy Transfer Pair Using a Two-Component System. *Sensors (Basel)*. 2017 Jan 13;17(1)

Wimmer T, Lorenz B, Stieger K. Quantification of the vascular endothelial growth factor with a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) based single molecule biosensor. *Biosens Bioelectron*. 2016 Dec 15;86:609-615.

Wimmer T, Lorenz B, Stieger K. Functional Characterization of AAV-Expressed Recombinant Anti-VEGF Single-Chain Variable Fragments In Vitro. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2015 Jun;31(5):269-76.

Posterpräsentationen

In vitro Activity of Transgenic Anti- VEGF Molecules

ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Meeting 2012 Ft. Lauderdale

Functional characterization of recombinant anti-VEGF variants in vitro

ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Meeting 2013 Ft. Lauderdale

Development of a BRET-based technique for VEGF quantification

ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Meeting 2016 Ft. Lauderdale

Vorträge

Regulated expression of recombinant Anti-VEGF single chain antibody fragments - towards personalized medicine in neovascular retinal disorders

ISOPT 2015 Berlin

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift