

**Klonierung und Expression des anti-VEGF-Moleküls RA-01**  
***in vitro***

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

vorgelegt von Nina Wagner Lima (geb. Wagner)

aus Bremen

Gießen 2012

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

(Frau Prof. Dr. med. Birgit Lorenz)

Gutachter: Herr PD Dr. Dr. med. vet. Knut Stieger

Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Braun

Tag der Disputation: 08.08.2013

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Angiogenese .....	1
1.2	Physiologische Angiogenese in der Retina.....	2
1.3	Neovaskularisation .....	3
1.4	Proliferative Retinopathien .....	3
1.5	Klassische Behandlungsmethoden der proliferativen Retinopathie.....	7
1.6	Vascular endothelial growth factor (VEGF).....	8
1.7	Antiangiogene Faktoren .....	10
1.7.1	Pegaptanib.....	11
1.7.2	Bevacizumab .....	13
1.7.3	Ranibizumab .....	14
1.7.4	VEGF-Trap.....	15
1.7.5	Vergleich.....	17
1.7.6	Vor- und Nachteile der okulären Injektion.....	18
1.8	In vivo Expression von Antikörpern .....	19
1.9	Ziel der Arbeit.....	20
2	Material .....	20
2.1	Chemikalien .....	20
2.2	Enzyme und Antikörper .....	21
2.3	Puffer .....	22
2.4	Reagenzien und Kits .....	22
2.5	Software.....	22
2.6	DNA-und Protein-Größenstandards .....	23
2.7	Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen .....	24
2.8	Röntgenfilme und Membranen .....	26
2.9	Geräte.....	27
2.10	Biologische Materialien .....	28
2.10.1	Vektoren und Plasmide .....	28

2.10.2	Antikörper.....	30
2.10.3	Zelllinien.....	30
2.10.4	<i>E.coli</i> -Stämme.....	31
3	Methoden.....	32
3.1	Zellbiologische Methoden.....	32
3.1.1	Zellkultur .....	32
3.1.2	Kryokonservierung von Zellen.....	32
3.1.3	Auftauen von Zellen .....	32
3.1.4	Auszählen von Zellen.....	33
3.2	Klonierung.....	33
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA mittels Säule (Mini, Medi).....	33
3.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation.....	33
3.2.3	Agarosegelelektrophorese .....	34
3.2.4	DNA-Extraktion aus Agarosegel.....	34
3.2.5	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration .....	34
3.2.6	Enzymatische Hydrolyse (Restriktion).....	35
3.2.7	Dephosphorylieren von DNA.....	35
3.2.8	Ligation mit der T4-DNA Ligase .....	36
3.2.9	DNA-Sequenzierung .....	36
3.2.10	Herstellung von Glycerin-Stocks .....	36
3.2.11	Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i> -Zellen .....	36
3.2.12	Transformation elektrokompetenter <i>E.coli</i> -Zellen .....	37
3.3	Transfektion .....	37
3.3.1	Lipofektion.....	37
3.3.2	Calcium-Phosphat-Präzipitation .....	38
3.4	Proteinextraktion aus HEK 293-, HeLa- und arpe19-Zellen.....	38
3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
3.5.1	Coomassie-Färbung.....	39
3.5.2	Silberfärbung.....	40
3.6	Western-Blot .....	40

3.6.1	Ponceau Rot-Färbung.....	41
3.6.2	Detektion mit Antikörpern.....	41
3.7	ELISA (Quantifizierung von Ranibizumab und RA-01).....	42
3.8	HUVEC- Planar Migration Assay.....	42
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Design von RA-01.....	43
4.2	Klonierung.....	45
4.3	Klonierung in pIRES-hrGFP1a.....	47
4.3.1	Klonierung der leichten Kette.....	47
4.3.2	Klonierung der schweren Kette.....	49
4.3.3	Klonierung der schweren Kette in den pIRES-L Vektor.....	49
4.4	Validierung der Positivkontrolle (Lucentis®) sowie des anti-IgG Antikörpers zur Detektion des rekombinanten Moleküls.....	52
4.5	Transfektionseffizienz in eukaryonten Zellen.....	54
4.6	In vitro Expression von RA-01.....	56
4.7	Darstellung von Ranibizumab unter reduzierten Bedingungen.....	58
4.8	Mischung der beiden Antikörper anti humanes/murines IgG.....	60
4.9	Expression von RA-01 in HEK 293-Zellen und Nachweis beider Ketten unter reduzierenden Bedingungen.....	62
4.10	Quantifizierung von Ranibizumab und RA-01 mittels ELISA.....	64
4.11	Biologische Aktivitätsmessung.....	66
5	Diskussion.....	69
5.1	Rationale für eine kontinuierliche Expression im Auge.....	69
5.2	Eigenschaften von RA-01.....	70
5.3	Vergleich zwischen Ranibizumab und RA-01.....	71
5.4	Ausblick.....	72
5.4.1	Transfer in die Retina.....	72
5.4.2	TetOn-System.....	73
6	Zusammenfassung.....	75
7	Summary.....	76

8	Anhang.....	77
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	77
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	83
8.3	Tabellenverzeichnis.....	84
9	Literaturteil .....	85
10	Erklärung zur Dissertation.....	94
11	Danksagung .....	95

# 1 Einleitung

## 1.1 Angiogenese

Der klassische Verlauf der Blutgefäßbildung umfasst die Mechanismen Vaskulogenese und Angiogenese. Blutgefäße entstehen während der frühen Embryonalentwicklung zunächst durch Vaskulogenese. Dabei bildet sich ein primitives vorläufiges Gefäßnetzwerk aus *in situ* differenzierenden Angioblasten (Risau and Flamme, 1995). Bei der Angiogenese bilden sich die neuen Gefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen. Die Phasen der Angiogenese beinhalten einen komplexen mehrstufigen Prozess und unterscheiden sich in zwei Arten. Bei der ersten Art sprossen Endothelzellen aus einem vorhandenen Blutgefäß aus und bilden ein neues Gefäßnetzwerk (sprouting) (Risau, 1997). Unter dem Einfluss von VEGF (vascular endothelial growth factor), als angiogener Stimulus, erhöht sich die Gefäßpermeabilität und bewirkt eine Vasodilatation. Die Basalmembran sowie die die Gefäße umgebende extrazelluläre Matrix werden abgebaut. Zusätzlich werden die Endothelzellen durch Sezernierung von Faktoren wie PDGF-B und TGF- $\beta$ 1 angeregt, glatte Muskelzellen und andere für den Aufbau der Gefäßwand benötigte murale Zellen zu rekrutieren (Hirschi *et al.*, 1998). Die neu entstehenden Gefäßsprossen werden durch VEGF angelockt und somit zu einer gerichteten Migration angeregt. Dabei sind besonders die Endothelzellen entscheidend, die sich auf der Spitze des neuen Gefäßsprosses befinden (*tip cells*). Durch ihre Filopodien finden die „tip cells“ den Weg für das neue Gefäß (Gerhardt *et al.*, 2003). Die neugebildeten Kapillare anastomosieren miteinander und die Durchblutung beginnt. Hierbei zeigt sich, dass VEGF zusammen mit den endothelialen Rezeptoren VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3 für die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege und die Induktion des angiogenen Phänotyps des Endothels sowie für die Gefäßführung der "tip cells" verantwortlich ist.

Die Gefäßneubildung bei der zweiten Art der Angiogenese erfolgt durch Intussuszeption. Ein bereits existierendes Gefäß spaltet sich durch Invagination von Bindegewebe, Perizyten und glatten Muskelzellen in zwei Tochtergefäße auf (Burri and Tarek, 1990).

Im gesunden adulten Organismus stellt die physiologische Funktion der Angiogenese einen Sonderfall dar, nur während des Reproduktionszyklus der Frau bilden sich neue Blutgefäße. Außerdem wird die Wundheilung durch Angiogenese herbeigeführt (Shweiki *et al.*, 1993). Unter pathologische Bedingungen hat die Angiogenese große Bedeutung bei der rheumatoiden Arthritis, der Psoriasis oder bei der

Tumurvaskularisation und Metastasierung (Folkman, 1995). Eine entscheidende Rolle spielt die Angiogenese bei verschiedenen angioproliferativen Netzhauterkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration, der diabetischen Retinopathie und der Frühgeborenenretinopathie (siehe 1.4).

Die Stimulation des Gefäßwachstums erfolgt vor allem durch Hypoxie der betroffenen Gewebe. Hierbei spielt die Gruppe der Hypoxie-induzierbaren Faktoren, insbesondere HIF-1, eine zentrale Rolle. Eine normale Embryogenese ist ohne diesen Faktor nicht möglich (Iyer *et al.*, 1998). Der Transkriptionsfaktor HIF-1 bewirkt die Ausschüttung von proangiogenen Faktoren, wie z.B. VEGF, die von minderversorgtem oder schnell wachsendem Gewebe abgegeben werden (Carmeliet, 2003). HIF-1 besteht aus 2 Anteilen, einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Einheit, wobei die alpha Untereinheit inaktiv im Zytosol vorliegt und die beta Untereinheit inaktiv im Zellkern lokalisiert ist (Semenza, 2000). Nach Einsetzen der Hypoxie wird HIF-1 $\alpha$  in den Zellkern transportiert und bildet dort funktionell aktive Heterodimere mit der beta Untereinheit, welche zu einer Steigerung der VEGF-mRNA-Transkription führen und damit die VEGF-Expression erhöhen (Levy *et al.*, 1996). In dieser Phase ist HIF-1 $\alpha$  durch Proteasomen vor dem Abbau geschützt. Ist jedoch die Sauerstoffversorgung wieder gewährleistet, verliert HIF-1 $\alpha$  diesen Schutz und ist bereits 30 Minuten später nicht mehr im Kern nachweisbar (Jewell *et al.*, 2001).

## 1.2 Physiologische Angiogenese in der Retina

Während der Embryogenese entwickelt sich die Retina aus einer Ausstülpung des Diencephalons ab der 6. Schwangerschaftswoche (Hughes *et al.*, 2000). Die retinale Gefäßentwicklung beginnt ab der 14. Schwangerschaftswoche und vollzieht sich in mehreren Schritten, woran Vaskulogenese und Angiogenese beteiligt sind (Fruttiger, 2002). Die retinale Vaskularisierung beginnt mit der Migration von spindelförmigen, mesenchymalen Vorläuferzellen von der Papille aus, die in Richtung Peripherie wachsen. Die mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren sich binnen einer Woche zu Endothelzellen und lassen sich von retinalen Astrozyten leiten. Die retinalen Astrozyten sekretieren lokal VEGF-A und stimulieren dabei die Endothelzellen sowohl in ihrer Wachstumsrichtung als auch in ihrer Zellteilungsaktivität (Fruttiger, 2007). Um die Papille entsteht ein oberflächliches primitives Gefäßnetzwerk. Zwischen der 15. und 20. SSW verlaufen Vaskulogenese und Angiogenese parallel. Die Vaskulogenese ist bis zur 21. SSW abgeschlossen. Die Angiogenese wird ab der 21. SSW durch Hypoxie und die damit verbundene Sekretion von VEGF stimuliert. Durch diesen Mechanismus entsteht der äußere Plexus des retinalen Gefäßsystems sowie das

komplette periphere und perifoveale Gefäßbett. Die Gefäßentwicklung ist bei der Geburt bis zum Rand der Netzhaut abgeschlossen.

### 1.3 Neovaskularisation

Wie oben beschrieben wird der Begriff Angiogenese zumeist als Überbegriff für die molekularen und zellulären Mechanismen, die für das Bestehen und Neuwachsen von Gefäßen verantwortlich sind, genutzt. Hingegen wird die pathologische Neubildung von Gefäßen als Neovaskularisation bezeichnet. Es können alle Gefäßbereiche des Auges von Neovaskularisation betroffen sein, die unkontrollierte Blutgefäßneubildung in der Netzhaut zieht jedoch die bedeutendsten Folgen nach sich. Die retinale Neovaskularisation führt zu schwerer Beeinträchtigung des Sehvermögens durch Glaskörperblutung, Netzhautablösung und Glaukombildung (Patz, 1980). Damit ist Neovaskularisation für den Großteil der irreversiblen Erblindungen in der westlichen Welt verantwortlich. Pathologische Gefäßneubildungen im Auge, wie z.B. bei der diabetischen Retinopathie oder der altersabhängigen Makuladegeneration, entstehen durch unterschiedliche Ursachen, die zu einer Minderperfusion und dadurch zu einer Ischämie führen. Ursache der Neovaskularisation ist ein Missverhältnis von angiogenen zu antiangiogenen Faktoren, die normalerweise in einem Gleichgewicht stehen, welches zeitlich und räumlich strikt reguliert wird. Bei Überwiegen der proangiogenen Einflüsse kommt es zum „*angiogenic switch*“. Die Neovaskularisation beginnt (Ribatti *et al.*, 2007). In den betroffenen Arealen werden durch Hypoxie vermehrt VEGF und andere angiogene Faktoren exprimiert (Pe'er *et al.*, 1995). Die Synthese und Sekretion von VEGF kann initial durch die Wiederherstellung normaler Sauerstoffversorgung rückgängig gemacht werden (Aiello *et al.*, 1994). Die gesteigerte Expression des VEGF führt allerdings nicht notwendigerweise zu einer Bildung von regulären Blutgefäßen, sondern kann zu einer abnormen angiogenen Reaktion mit Leckagen und Hämorrhagien führen (Adamis *et al.*, 1994). Die neu gebildeten Gefäße entstehen meist aus den Venolen und sind meist nicht ausgereift, was zu Funktionseinschränkungen führt und somit Komplikationen begünstigt.

### 1.4 Proliferative Retinopathien

#### **Altersbedingte Makuladegeneration (AMD)**

Die AMD ist heutzutage die häufigste Ursache für eine Erblindung jenseits des 55. Lebensjahr in den westlichen Industrienationen (Friedman *et al.*, 2004). Die

Prävalenz (12 % bei Menschen über 80 Jahre) nimmt mit ansteigendem Lebensalter kontinuierlich zu, daher gewinnt die AMD durch die gestiegene Lebenserwartung zunehmend an medizinischer Bedeutung (Cheung *et al.*, 2007). Einfluss auf die Entstehung einer AMD haben sowohl genetische Faktoren wie auch Umwelteinflüsse. Die Symptome beginnen schleichend mit einer progredienten Verschlechterung der zentralen Sehschärfe. Die Patienten leiden unter einem grauen Schatten über fixierten Objekten. Hinzu kommen ein reduziertes Kontrastsehen und Probleme mit dem Farbsehen. Bildet sich ein Ödem der zentralen Netzhaut, bemerken die Patienten eine Verzerrung von fixierten Objekten (Metamorphopsie). Die altersbedingte Makuladegeneration entsteht durch Anhäufung von Stoffwechselprodukten in der Retina. Hierbei sammelt sich im Laufe des Lebens im lysosomalen Kompartiment des retinalen Pigmentepithels Lipofuszin, welches sich mit weiteren Stoffwechselprodukten zwischen RPE und der Bruchschens Membran in Form von Drusen ablagert (Grunwald *et al.*, 1998). Die Drusen können die Versorgungswege zwischen RPE und Choroidea beeinträchtigen. Bricht die Stoffwechselleistung zusammen, gehen die Pigmentepithelzellen zugrunde und es entstehen Lücken in der Bruchschens Membran. Dies führt an den rupturierten Stellen zu einem verstärkten Einwachsen von Gefäßen aus der Aderhaut in die Retina (Holz *et al.*, 2004b). Unterteilt wird die AMD in die „trockene“ Frühform und die „feuchte“ oder exsudative Form. Die trockene Form mit RPE-Defekten zeichnet sich durch eine geographische Atrophie des Pigmentepithels und der sensorischen Netzhaut aus. Sie steht am Beginn der Erkrankung und kann sich zu der feuchten Form entwickeln (Bird *et al.*, 1995). Die feuchte Form der AMD, bei der durch choroidale Neovaskularisation (CNV) Blutgefäße unter die Netzhaut einwachsen, verursacht die meisten Fälle von schwerem Visusverlust (Campochiaro, 2000).

Die klassischen Therapiemöglichkeiten (siehe 1.5) sind nur bedingt wirksam und nur für bestimmte Stadien möglich. Es besteht die Möglichkeit der Laserkoagulation, wobei die Gefäßschlingen mit einem Argon-Grün Laser koaguliert werden. Jedoch muss hierbei die choroidale Neovaskularisation ausreichend von der Fovea entfernt sein, da die Koagulation zu einem Skotom führt. Für die meisten Patienten mit einer CNV kommt zum Zeitpunkt der Diagnose die Laserkoagulation nicht mehr in Frage, da das Gefäßwachstum zu weit fortgeschritten ist. In diesen Fällen ist die photodynamische Therapie (PDT) mit Verteporfin (Visudyne®) geeignet. In besonders schweren Fällen kann die CNV auch chirurgisch entfernt werden durch eine Vitrektomie oder eine Netzhautrotation (Lai *et al.*, 2002).

## **Diabetische Retinopathie (DR)**

Die DR ist in Europa die häufigste Ursache für Sehbehinderungen in der Altersklasse der arbeitenden Bevölkerung (25-60 Jahre) (Klein *et al.*, 1992). Die Zahl der Diabetiker nimmt stetig durch die Verlagerung der Ernährung auf fett- und kohlenhydratreiche Kost zu. Die Stoffwechsellage und die Erkrankungsdauer sind entscheidend für die Häufigkeit der diabetischen Retinopathie. Etwa 50% der Diabetiker haben nach 25 Jahren eine diabetische Retinopathie. Die Patienten leiden unter einer Verringerung des peripheren Gesichtsfelds und zentralen Visusverlusten. Hauptrisikofaktor ist hierbei eine schlechte Kontrolle des Blutzuckers. Außerdem beeinflussen arterielle Hypertension, Rauchen, Pubertät und Schwangerschaft die Entstehung oder Progression einer diabetischen Retinopathie. Die progressive Form der diabetischen Retinopathie, die für eine schwere Sehbehinderung durch retinale Neovaskularisation (RNV) verantwortlich ist, entwickeln ca. 20% der Patienten (Klein *et al.*, 1992).

Bei der DR kommt es durch die metabolischen Veränderungen zu einer Mikroangiopathie der präkapillären Arteriolen, der Kapillare und Venolen. Durch die Schädigung der mikrovaskulären Zirkulation kommt es zu Perizytenverlust, Verlust der Basalmembran und Verlust des Gefäßendothels und damit zu einer Verlegung des Blutgefäßlumens. Dieses Stadium der Krankheit wird als nichtproliferative DR bezeichnet (Frank, 2004). Im Weiteren kommt es zur Gefäßsklerose mit Kapillarverschlüssen und Ischämie im Bereich der Retina. Diese retinale Hypoxie führt zu einer Hyperexpression von Wachstumsfaktoren wie VEGF und IGF-1. Daraus folgt eine pathologisch gesteigerte Gefäßneubildung aus dem benachbarten Gewebe (progressive DR). Da die neuen Gefäße bereits vorgeschädigt sind, kommt es durch gesteigerte Gefäßpermeabilität zu Netzhautödemen und exsudativer Parenchymzerstörung. Zusätzlich kommt es aufgrund von fibrovaskulären Proliferationen zu traktiven Netzhautablösungen (Frank, 2004).

Vorraussetzung für eine Behandlung der DR sind eine gute Stoffwechselkontrolle und eine konsequente Einstellung der begleitenden Hypertonie. Klassische Behandlungsmöglichkeiten (siehe 1.5) sind die Laserkoagulation mit einem Argonlaser oder die Vitrektomie, siehe auch bei altersbedingter Makuladegeneration.

## **Frühgeborenenretinopathie (Retinopathia praematurorum)**

Auch die Frühgeborenenretinopathie (retinopathy of prematurity, ROP) entsteht durch retinale Neovaskularisation. Im Gegensatz zur diabetischen Retinopathie ist hier

jedoch eine generalisierte retinale Ischämie die treibende Kraft der Neovaskularisation, bei der lokale Ischämien zu Angioproliferationen führen. Die Krankheit wurde erstmals 1942 beschrieben als retrolentale Fibrose (Terry, 1942). Heutzutage leiden von ca. 460 000 Frühgeborenen pro Jahr ca. 2000 Kinder an ROP, damit ist die Frühgeborenenretinopathie eine der häufigsten Gründe für Sehbehinderungen bei Kindern (Smith, 2008).

Geht man davon aus, dass Angiogenese der Netzhaut überwiegend durch einen Sauerstoffmangel geregelt wird, dann ist es verständlich, dass ein Überangebot an Sauerstoff die retinale Vaskularisation bei Frühgeborenen verzögert beziehungsweise zum Stillstand bringt. Die ROP verläuft in zwei Phasen: In der ersten Phase, also zum Zeitpunkt der Geburt, besteht ein Wachstumsstillstand der Blutgefäße durch den Verlust der intrauterinen Faktoren wie z.B. VEGF, EPO und IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*). Bei einer Frühgeburt ist die Gefäßentwicklung, besonders in der Peripherie, noch nicht abgeschlossen. Nach der Geburt wachsen die Gefäße aufgrund der entstandenen Hyperoxie nicht weiter, das Gefäßwachstum bis zur Ora serrata bleibt aus. Nach einsetzender Atmung des Kindes stellt sich der fetale Kreislauf mit einem arteriellen Sauerstoffpartialdruck von weniger als 30 mmHg auf deutlich höhere Werte nach Geburt um. Diese Werte können über 80 mmHg erreichen, wenn das Frühgeborene zusätzlich mit Sauerstoff beatmet werden muss (Staubach and Lagrèze, 2002). Die Hyperoxie unterdrückt die Sekretion von VEGF (und anderen Wachstumsfaktoren), welches die Gefäße zum Wachstum benötigen und hier als *survival factor* fungiert (Alon *et al.*, 1995). In der zweiten Phase wird die Retina metabolisch aktiv und es entsteht eine Hypoxie, wodurch VEGF und IGF-1 verstärkt produziert werden. Es kommt zu einer pathologischen Gefäßeinsprossung in den Glaskörper und damit zu einer choroidalen Neovaskularisation. Die ROP wird klinisch in 5 Stadien eingeteilt, wobei das Spektrum vom Vorliegen einer Demarkationslinie (Stadium 1), prominente Leiste (Stadium 2), prominente Leiste und extraretinale fibrovaskuläre Proliferation (Stadium 3), partielle Amotio retinae mit und ohne Makulabeteiligung (Stadium 4) bis zu einer kompletten Netzhautablösung (Stadium 5) reicht (Jandeck *et al.*, 2008).

Die Therapie erfolgt ab Stadium 3, da ab diesem Stadium eine Netzhautablösung droht. Mildere Verläufe werden nur beobachtet. Die klassischen Therapiemöglichkeiten (siehe 1.5) sind zum einen die Laserkoagulation, Kryotherapie, Aufnähen einer Plombe (fokal), Anlegen einer Cerclage (zirkulär) oder die Vitrektomie (Staubach and Lagrèze, 2002).

## 1.5 Klassische Behandlungsmethoden der proliferativen Retinopathie

Die Behandlungsmöglichkeiten der proliferativen Retinopathien waren bis vor kurzem noch begrenzt. Bisher wurde hauptsächlich das Ziel verfolgt, den Krankheitsfortschritt aufzuhalten. Ende der neunziger Jahre wurde die photodynamische Therapie (PDT) mit Verteporfin (Visudyne®) durch die TAP-Studie etabliert (Meyer *et al.*, 2005). Hierbei werden Porphyrin-Farbstoffe (Verteporfin) durch Licht aktiviert. Nach intravenöser Anwendung wird der Farbstoff im Gefäßendothel angereichert und bildet Komplexe mit LDL. Anschließend erfolgt nach zehnmütiger Infusion eine Bestrahlung mit nicht-thermischem, rotem Licht einer definierten Wellenlänge über 80 Sekunden. Dabei entstehen reaktive Sauerstoffabkömmlinge, die die pathologischen Blutgefäße verschließen ohne das umliegende Gewebe zu beeinträchtigen. Ein weiterer Visusverlust wird zumindest vorübergehend aufgehalten. Jedoch zeigte die PDT nicht bei allen Formen der AMD Erfolg. Die Wiederholung der Behandlung ist häufig erforderlich.

Die zweite Möglichkeit der Behandlung einer proliferativen Retinopathie ist die Kryoder oder Laserkoagulation. Hierbei werden die ischämischen peripheren Netzhautareale zerstört und können somit keine angiogenen Faktoren mehr produzieren. Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist der irreversible Rezeptorschaden mit Neuronenverlust und ein hieraus resultierender Gesichtsfeldausfall. Rezidive sind nicht selten, die Netzhaut wird immer geschädigt. Außerdem kommt die Laserkoagulation nur für 10% bis 15% der Gefäßneubildungen in Betracht und kann zu einer Abnahme der zentralen Sehschärfe führen, wenn die Gefäßschlingen unterhalb des Zentrums der Makula (Fovea) liegen (Fine *et al.*, 2000).

An einigen Zentren in Deutschland wird die vitreoretinale Chirurgie mit 360-Grad-Makulatranslokation durchgeführt. Darunter versteht man die operative Entfernung des Glaskörpers mit kompletter Ablösung der Retina. Die Retina wird umgeklappt und die Neovaskularisationsmembran sorgfältig entfernt. Anschließend wird die Retina wieder zurückgeklappt und um den Kopf des Nervus opticus als Drehpunkt um ca. 15°-45° rotiert. Dadurch kommt die Stelle des schärfsten Sehens über einer morphologisch gesunden RPE-Chorioidea-Region zu liegen. Am Ende der Operation wird der Glaskörperraum mit Silikonöl aufgefüllt (Machemer and Laqua, 1978). Diese aufwendige Operation kommt bei Eintrübungen des Glaskörpers oder großen exsudativen Läsionen mit subretinalen Blutungen zum Einsatz, die zu einer Zerstörung oder einer Abhebung des Glaskörpers führen. Jedoch wird sie von zahlreichen

Komplikationen begleitet, wie z.B. Netzhautablösung, Entzündungsreaktionen, Katarakt oder auch Glaukom.

## 1.6 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Wie oben bereits beschrieben, stellt VEGF zusammen mit den dazugehörigen Rezeptoren das wesentliche Element für die Vaskulogenese und Angiogenese dar (Carmeliet and Collen, 2000). VEGF induziert über VEGF-R2 (siehe unten) die Teilung und Motilität von vaskulären Endothelzellen sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen. Zusätzlich fördert VEGF die Gefäßpermeabilität und ist essentiell für die postnatale Vaskulogenese (Ferrara, 1995). Aus pathologischer Sicht ist VEGF der Wachstumsfaktor mit der größten Relevanz für die Tumorangio-genese (Ferrara, 2004a). Bereits im Jahr 1948 stellte Michaelson die Hypothese auf, dass ein sog. „Faktor X“ retinalen Ursprungs eine Neovaskularisation im Auge induzieren könne (Michaelson I.C., 1948). Judah Folkman isolierte 1970 einen Wachstumsfaktor aus Tumorgewebe, den er für die Gefäßneubildung verantwortlich machte und hatte die zündende Idee, dass die Inhibierung dieses Faktors eine Option für die Tumorthherapie darstellen könnte (Folkman, 1971).

1983 wurde VEGF zum ersten Mal von Senger et al. isoliert und als *vascular permeability factor* (VPF) beschrieben (Senger et al., 1983). Seitdem sind folgende VEGF-Formen bekannt geworden: VEGF-A (häufig nur als VEGF bezeichnet), VEGF-B, VEGF-C/VRP (VEGF-related protein), VEGF-D und VEGF-E. Zusätzlich gehört der *plazenta growth factor* (PlGF) zur VEGF-Familie. VEGF-A, VEGF-B und PlGF sind vorwiegend Effektoren an vaskulären Endothelzellen, hingegen regulieren VEGF-C und VEGF-D die lymphatische Angiogenese (Stacker et al., 2002). VEGF-A wird im Gegensatz zu VEGF-B bis -E hypoxieabhängig exprimiert und hat somit die größte Relevanz für die intraokuläre Neovaskularisation (Ferrara, 1995). Bis heute wurden drei VEGF-Rezeptoren identifiziert, welche die angiogenetische Wirkung vermitteln: VEGF-R1, VEGF-R2 und VEGF-R3. Daneben gibt es noch eine lösliche Variante des VEGF-R1, das sogenannte sFlt1 (Kendall and Thomas, 1993), dessen biologische Funktion jedoch noch weitgehend unbekannt ist. Er scheint für die Avaskularität der Cornea verantwortlich zu sein (Ambati et al., 2006) und kommt bei Präeklampsie verstärkt in der Zirkulation vor (Rajakumar et al., 2005; Rajakumar et al., 2009).

VEGF ist ein homodimeres Glykoprotein, welches aus zwei Untereinheiten besteht mit einem Molekulargewicht von je 23 Kilodalton (kDa). Die Untereinheiten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Das menschliche VEGF(-A)-Gen ist auf

Chromosom 6p21.3 lokalisiert (Vincenti *et al.*, 1996). Durch alternatives Splicing der Messenger-RNA entstehen verschiedene Isoformen von VEGF-A (Tischer *et al.*, 1991). Die Isoformen unterscheiden sich nach der Länge der Polypeptidkette. Sie werden nach ihrer Anzahl der Aminosäuren eingeteilt in VEGF-A 121,145,148,162,165,183,189 und 206 (Lei *et al.*, 1998; Neufeld *et al.*, 1999; Poltorak *et al.*, 1997; Whittle *et al.*, 1999). Außerdem kann VEGF-165 in VEGF-110 und VEGF-113 gespalten werden (Ferrara *et al.*, 2006). Ein funktioneller Unterschied der Isoformen besteht in der Höhe der angiogenen Wirkung. Die hochdiffusiblen Isoformen (z.B. VEGF-121) haben, im Gegensatz zu den weniger diffusiblen Varianten (z.B. VEGF-189), ein ausgeprägteres angiogenes Potential (Park *et al.*, 1993).

Die angiogene Wirkung der verschiedenen VEGF Moleküle wird im wesentlichen durch zwei der drei Rezeptoren vermittelt, VEGFR-1 (Shibuya *et al.*, 1990) und VEGFR-2 (Terman *et al.*, 1991). Nur diese beiden Rezeptoren sind in der Lage, alle Isoformen zu binden. Die verschiedenen VEGF-Proteine haben eine unterschiedliche Affinität und Bindungsfähigkeit zu den jeweiligen Rezeptoren. VEGFR-1 (Flt-1=*fms-related tyrosine kinase 1*) und VEGFR-2 (Flk-1=*fetal liver kinase receptor*)/KDR=*kinase insert domain receptor*) lassen sich hauptsächlich auf Endothelzellen finden und haben eine hohe Affinität zu VEGF (Ferrara, 2004b). Im Gegensatz dazu ist VEGFR-3 (Flt-4=*fms-related tyrosin kinase 4*) auf Lymphgefäßen lokalisiert. VEGF-A besetzt die Rezeptoren VEGFR-1 und -2, VEGF-B hingegen ausschließlich den Rezeptor VEGFR-1 (Abb. 1). VEGF-C steuert die Lymphangiogenese und besitzt eine hohe Affinität zu den Rezeptoren VEGFR-2 und -3 (Olsson *et al.*, 2006). VEGF-D spielt bei der Lymphangiogenese und Angiogenese eine entscheidende Rolle und legt sich an die Rezeptoren VEGFR-2 und -3 (Olofsson *et al.*, 1998). VEGF-E wird von einem orf Virus (Parapox Virus) produziert und verbindet sich ausschließlich mit VEGFR-2 (Meyer *et al.*, 1999). (Siehe Abb. 1)

VEGF-Rezeptoren sind Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Sie bestehen aus einem extrazellulären Anteil mit sieben Immunglobulin (Ig)-artigen Domänen, einer Transmembranregion und einem zytoplasmatischen Anteil mit Tyrosin-Kinase Aktivität (Olsson *et al.*, 2006). Bindet ein VEGF-Dimer an einen VEGF-Rezeptor, erfolgt eine Dimerbildung zweier Rezeptoren, durch die sich die intrazellulär geteilten Tyrosinkinasen gegenseitig phosphorylieren. SH2-Domänen-tragende Signalproteine binden an die phosphorylierten Bereiche und lösen so die Signalkaskade aus. Diese führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Zellantwort in Form von z.B. Proliferation umsetzen.

Co-Rezeptoren für VEGF sind Neuropiline aus der Gruppe der Semaphorine/Collapsin-Rezeptoren. VEGF-165 bindet an Neuropilin-1 (NRP-1) und Neuropilin-2 (NRP-2). Eine Signaltransduktion wird nur ausgelöst, wenn Neuropilin als Co-Rezeptor von VEGFR-2 auftritt. Hierbei wird die VEGFR-2 vermittelte Signaltransduktion gesteigert (Soker *et al.*, 1998).

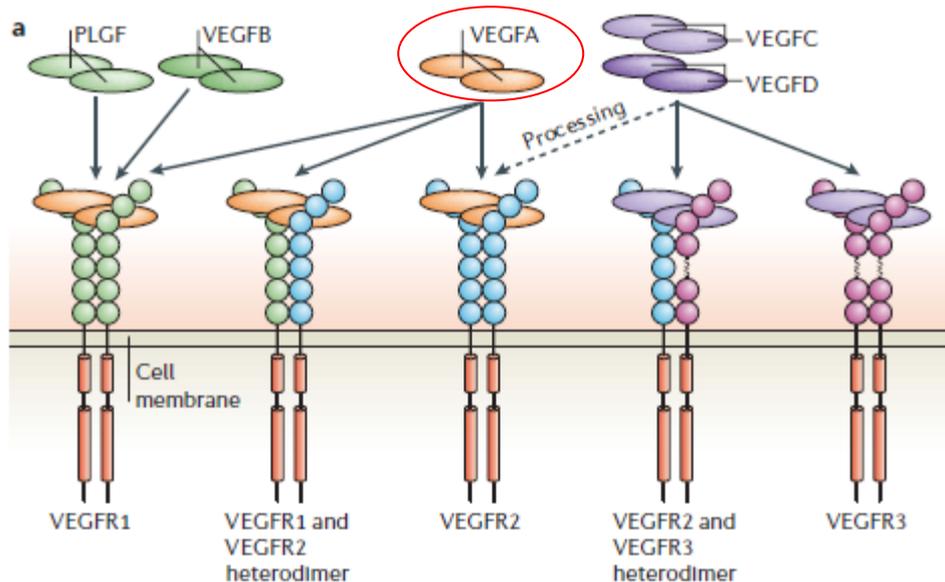


Abb. 1: Schema der VEGF-Formen und ihrer Rezeptoren. (Quelle: modifiziert nach Olsson *et al.*, 2006)

## 1.7 Antiangiogene Faktoren

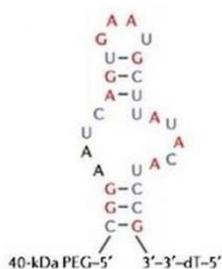
Die heutige Behandlung neovaskulärer Erkrankungen der Retina beruht auf Judah Folkmans Idee von 1970 (Folkman, 1971). Der zündende Gedanke für die pharmakologische VEGF-Blockade war der enge Zusammenhang zwischen Proliferation von choroidalen Gefäßen und erhöhtem VEGF. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF vermehrt in neovaskulären Membranen von AMD-Patienten vorhanden ist. Daraus folgte das Konzept, VEGF bei Patienten mit proliferativen Retinopathien vor der Bindung an den Rezeptor pharmakologisch zu neutralisieren, um somit den Verlauf der Erkrankung zu beeinflussen. Dieses Konzept führte zur Entwicklung von spezifischen Anti-VEGF-Medikamenten (Ladewig *et al.*, 2006).

Die intravitreale Injektion von anti-VEGF-Molekülen ist heute, neben der konventionellen Therapie durch Laserkoagulation, die Standardtherapie der intraokulären Neovaskularisationen. Zwischenzeitlich wurden vier verschiedene extrazellulär wirkende anti-VEGF-Medikamente entwickelt: Pegaptanib (Macugen®)



erhielten die Patienten alle 6 Wochen intravitreale Injektionen mit Pegaptanib in einer Dosis von 0,3 mg, 1,0 mg oder 3,0 mg. Die Vergleichsgruppe erhielt eine Placeboinjektion (Gragoudas *et al.*, 2004). Hierbei zeigten die 1-Jahres-Ergebnisse, dass höhere Dosierungen keine bessere Wirksamkeit erzielten. Der Visusverlust (<3 Zeilen) trat nach Pegaptanib signifikant weniger (30%) als in der Kontrollgruppe (45%) auf. Im zweiten Jahr der Studie wurde bei der Hälfte der Verumpatienten das Medikament abgesetzt. Danach wurde bei 26,5% der Patienten ein erneuter Visusverlust von mehr als 3 Zeilen festgestellt, verglichen mit 15,8% bei den mit Pegaptanib weiterbehandelten Patienten. Außerdem ergab die Studie, dass Pegaptanib bei allen Formen der exsudativen AMD eine vergleichbare Wirksamkeit hatte. Nebenwirkungen traten in Form von milden Augenschmerzen (34%), Keratitis punctata (32%), mäßiger Entzündung (1%) und leichter Glaskörperblutung (0,21%) auf. Hierbei birgt jedoch die Injektion das größte Risiko in Form von okulären Entzündungen oder der Möglichkeit der Netzhautablösung. Die Therapie musste bei keinem Patienten zu irgendeinem Zeitpunkt unterbrochen werden. Systemische Nebenwirkungen konnten in keinen Zusammenhang mit Pegaptanib gebracht werden [Clinical Trial Group]. Die Halbwertszeit von Pegaptanib wurde an Affen (94 h) und an Kaninchen (83 h) getestet (Meyer *et al.*, 2008a).

Die EMEA (Europäische Arzneimittel-Agentur) hat eine Dosierung mit 0,3 mg Macugen® mittels intravitrealer Injektion alle 6 Wochen (9 Injektionen pro Jahr) festgelegt.



**Abb. 3: Pegaptanib Struktur** (Quelle: (Ng and Adamis, 2006))

### 1.7.2 Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin®) ist ein gegen VEGF gerichteter humanisierter monoklonaler Antikörper (Abb. 4). Er richtet sich unselektiv gegen alle Isoformen von VEGF-A. Bevacizumab ist bislang nicht zugelassen für die intravitreale Behandlung der AMD. Das Medikament wird von der Schweizer Firma Roche für die Behandlung von Darmkrebs hergestellt. In einer Veröffentlichung in Australien hat die Firma Roche den intravitrealen Gebrauch offiziell missbilligt. Somit entfällt die Produkthaftung bei produktbedingten Nebenwirkungen (Meyer *et al.*, 2008c).

Alle bisherigen Erfahrungen stützen sich auf die Beschreibung des therapeutischen Effekts in unkontrollierten Fallserien, daher ist die Anwendung nur im Rahmen einer „Off-Label“-Behandlung möglich. Doch wurde der Erfolg dieses therapeutischen Ansatzes in zahlreichen Fallserien bestätigt (Avery *et al.*, 2006b; Avery *et al.*, 2006a; Michels *et al.*, 2005; Schaal *et al.*, 2008; Spaide and Fisher, 2006). Zum Beispiel untersuchten Avery und Kollegen 81 Augen von 79 Patienten mit neovaskulärer AMD (Avery *et al.*, 2006b). Die Patienten erhielten monatlich intravitreal Bevacizumab (1,25 mg). Nach 8 Wochen zeigte sich eine Visusverbesserung und eine Reduzierung der Netzhautdicke bei den meisten Patienten. Spaide *et al.* konnte ähnliche Ergebnisse an 266 AMD-Patienten in einem Zeitraum von 3 Monaten beobachten (Spaide and Fisher, 2006). Systemische Nebenwirkungen konnten bisher nicht bei intravitrealer Anwendung beobachtet werden. Die bisher beschriebenen okulären Komplikationen werden weniger auf den Wirkstoff sondern überwiegend auf die Injektion zurückgeführt (Ladewig *et al.*, 2006). 2008 wurde eine Studie von Kook *et al.* vorgestellt, in der sich zeigte, dass sich bei Patienten mit überwiegend seröser Pigmentepithelabhebung nach intravitrealer Bevacizumab Gabe im weiteren Verlauf ein Riss des retinalen Pigmentepithels bildete (Kook *et al.*, 2008).

Die Halbwertszeit von Bevacizumab wurde von Stewart und Kollegen in einer Studie an Kaninchen bestimmt und auf das menschliche Auge berechnet, dabei betrug die Halbwertszeit 8,25 Tage (Stewart *et al.*, 2012). In einer Studie an der Augenklinik in Bonn konnte eine exponentielle Abnahme der Konzentration am Menschen gezeigt werden (Meyer *et al.*, 2008a).

## Immunglobulin G (IgG)

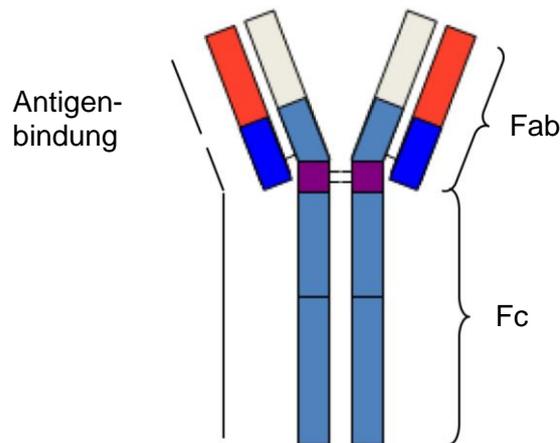


Abb. 4: Der molekulare Aufbau des monoklonalen IgG1 Antikörpers Bevacizumab.

### 1.7.3 Ranibizumab

Anfang 2007 wurde Ranibizumab (Lucentis®) als zweites Anti-VEGF-Medikament zugelassen. Ranibizumab ist ein optimiertes, rekombinant hergestelltes Antikörperfragment (F(ab)-Fragment) des IgG1 Antikörpers Bevacizumab. Die Optimierung besteht in einer Erhöhung der VEGF Bindungsaffinität durch Austausch bestimmter Aminosäuren (Ferrara *et al.*, 2006). Das F(ab)-Fragment besteht aus der leichten Aminosäurekette und einem Teil der schweren Aminosäurekette des IgG1 Antikörpers (Abb. 5). Die Ketten enthalten sogenannte, *complementarity determining regions* (CDR). Durch diese CDR kann das F(ab) Fragment mit dem komplementären Antigen interagieren (Ferrara *et al.*, 2006). Die Verkleinerung von einem vollständigen IgG Antikörper (Bevacizumab) auf ein F(ab)-Fragment (Ranibizumab) bewirkt eine Reduktion des Molekulargewichtes von 148 auf 48 kDa.

Entscheidend für die Zulassung von Ranibizumab als Therapie für neovaskuläre AMD waren die Studien MARINA (Minimally Classic/Occult trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular AMD) und ANCHOR (Anti-VEGF-Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularisation in AMD). In der MARINA Studie wurden 716 Patienten mit 300 bzw. 500 µg Ranibizumab, die Vergleichsgruppe mit einer Scheinbehandlung, über 24 Monate behandelt.

Ergebnis war eine Visusverbesserung von >3 Zeilen bei 24,8% der mit 0,3 mg und 33% der mit 0,5 mg intravitreal behandelten Patienten. In der Placebogruppe waren es 4,6% (Boyer *et al.*, 2007; Rosenfeld *et al.*, 2006b). Zum ersten Mal in der Therapie der AMD konnte eine Visusverbesserung für alle Typen der AMD erzielt werden. Intraokulare Entzündungen, Linsentrübung, leichte Glaskörperblutungen und Endophthalmitis traten in Form von Nebenwirkungen auf. Toxische Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet, systemische Nebenwirkungen waren in allen Gruppen ausgewogen verteilt (Meyer *et al.*, 2008a). Die errechnete Halbwertszeit im menschlichen Auge beträgt ca. 4,75 Tage (Stewart *et al.*, 2012). Die Behandlung mit Lucentis® wird mit 3 Injektionen von 0,5 mg in monatlichen Abständen während der „Aufsättigungsphase“ von der EMEA zugelassen. In der Erhaltungsphase ist eine erneute Behandlung indiziert, wenn es zu einem Visusverlust von mehr als einer Zeile kommt, obwohl diese Strategie gegenwärtig Gegenstand intensiver Diskussionen ist (Meyer *et al.*, 2008a).

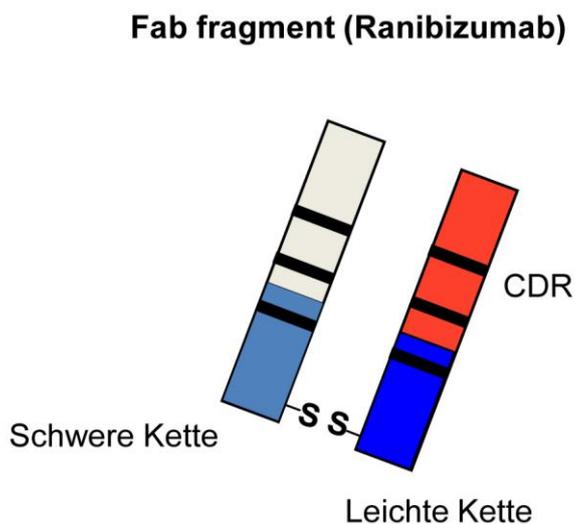


Abb. 5: F(ab) Fragment Ranibizumab mit schwerer und leichter Kette.

#### 1.7.4 VEGF-Trap

Im Rahmen weiterführender Forschungen zu Möglichkeiten der VEGF Hemmung wurde ein weiteres Molekül vorgestellt, VEGF-Trap (Chappelow and Kaiser, 2008). VEGF-Trap ist ein 110 kDa großes lösliches rekombinantes Fusionsprotein und besteht aus den extrazellulären Domänen des humanen VEGFR-1 und -2 mit dem Fc-Teil des humanen IgG (Holash *et al.*, 2002). Der Unterschied zu den vorgenannten VEGF-Inhibitoren liegt darin, dass VEGF-Trap (Aflibercept®) alle VEGF-A-Isoformen

und zusätzlich den Plazentawachstumsfaktor (PlGF) bindet. Es hat eine deutlich höhere Bindungsaffinität zu VEGF als Ranibizumab oder Bevacizumab (Stewart *et al.*, 2012).

In zahlreichen klinischen Studien wurde VEGF-Trap mit Erfolg bei soliden Tumoren, zum Beispiel Ovarialkarzinomen, eingesetzt. Außerdem wird es von Regeneron (New York, USA) in Kooperation mit Bayer Health Care (Leverkusen, Deutschland) als »VEGF-Trap-Eye« zur Behandlung der feuchten AMD klinisch entwickelt. Das Medikament wird intravitreal appliziert, im Auge gebunden und somit der Prozess der Gefäßeinsprossung in die Netzhaut unterbunden. In einer Phase-II-Studie (Clear-IT) konnten erste klinische Ergebnisse Sicherheit und therapeutische Wirksamkeit des Präparates zeigen (Nguyen *et al.*, 2006). Die Daten belegen eine signifikante Reduktion der retinalen Dicke und einen mittleren Visusanstieg von 10 Buchstaben nach zwölf Wochen bei einer monatlichen Applikation von 0,5 oder 2,0 mg ohne schwere Nebenwirkungen [<http://library.corporate-ir.net/>]. Gegenwärtig findet die Phase-III-Studie (View-1, Regeneron) in den USA und Kanada mit Lucentis® in der Kontrollgruppe statt. 1217 Patienten mit subfovealer Neovaskularisation bei AMD wurden in vier Gruppen aufgeteilt. Die ersten zwei Gruppen erhielten eine intravitreale Injektion mit Aflibercept® von entweder 0,5 mg (Gruppe 1) oder 2 mg (Gruppe 2) alle 4 Wochen. Patienten der Gruppe 3 erhielten 2 mg Aflibercept® in 8-wöchigen Abständen nach drei initialen monatlichen Dosen. Diese 3 Gruppen wurden mit der vierten Gruppe verglichen, der Kontrollgruppe, die 0,5 mg Lucentis® alle 4 Wochen erhielt. Nach 52 Wochen zeigte die VIEW 1-Studie, dass in den Aflibercept® Gruppen, die Sehkraft bei 96% der Patienten der Gruppe 1, bei 95% der Patienten der Gruppe 2 und bei 95% der Patienten der Gruppe 3 erhalten blieb. In der Gruppe 4 blieb bei 94% der Patienten die Sehkraft konstant. aufrechterhalten Vision. Eine vergleichbare Studie startete die Bayer Healthcare AG (View-2-Studie) mit demselben Studiendesign in Europa, Asien, und Lateinamerika. Die View-2-Studie kam zu ähnlichen Ergebnissen. Eylea (Aflibercept®) wurde von der FDA in Australien für die Behandlung der feuchten AMD im Jahre 2011 genehmigt. Die zugelassene Dosis beträgt 2 mg bei zunächst drei monatlichen Injektionen, gefolgt von weiteren Injektionen alle 8 Wochen (Ohr and Kaiser, 2012). In Europa ist das Medikament zurzeit noch nicht zugelassen.

### 1.7.5 Vergleich

Vergleicht man die vier anti-VEGF-Medikamente Bevacizumab, Pegaptanib, VEGF-Trap und Ranibizumab, lassen sich keine wesentlichen Unterschiede in der Wirksamkeit feststellen. Alle vier Medikamente unterdrücken die choroidale Endothelzellproliferation im Rahmen einer AMD signifikant. Einer der bedeutsamsten Unterschiede liegt im Preis. Die Kosten für die Behandlung gehen über die Leistung der gesetzlichen Krankenkassen hinaus und müssen somit vom Patienten selber getragen werden. Eine Injektionsdosis Avastin® kostet circa 43,30€, eine Injektionsdosis Lucentis® beträgt circa 1296,26€ [Patienteninformation Uniklinikum Gießen].

In Studien wurde jedoch bewiesen, dass Ranibizumab nicht nur eine Verlangsamung des Visusverlustes bewirkt, sondern sogar eine Visusverbesserung hervorrufen kann (Brown *et al.*, 2006; Rosenfeld *et al.*, 2006a). Im Gegensatz hierzu bewirkt Pegaptanib lediglich eine Stabilisation des Visus bei der Mehrheit der untersuchten Patienten (Gragoudas *et al.*, 2004). Daher empfehlen die Makulakommission der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), die Retinologische Gesellschaft (RG) und der Berufsverband der Augenärzte (BVA) bei subfovealer CNV als „First-line-Therapie“ Ranibizumab [Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, Retinologische Gesellschaft, Berufsverband der Augenärzte (2007)]. Bei Kindern und Jugendlichen wurde bislang nur Bevacizumab eingesetzt. In einer amerikanischen Studie an Kindern mit ROP ab Stadium 3 konnte nach intravitrealer Injektion von Bevacizumab eine signifikante Verbesserung gezeigt werden (Mintz-Hittner *et al.*, 2011). Auch in Deutschland wurde Bevacizumab mittlerweile bei Heilversuchen bei Kindern mit ROP eingesetzt [Lorenz, persönliche Mitteilung]. Pegaptanib und Ranibizumab wurden allerdings bislang nicht offiziell empfohlen, da keine Daten zur Sicherheit und Wirksamkeit im Kindesalter vorliegen.

Name	Molekül	Ziel-Molekül	Affinität	Molekular-gewicht	Halbwerts-zeit	Em-pfohlene Dosierung
<b>Pegaptanib</b> (Macugen®)	28kb RNA-Aptamer	VEGF-A 165	+	49 kDa	3,5-4d	0,3 mg alle 6 Wochen
<b>Ranibizumab</b> (Lucentis ®)	F(ab) Fragment des IgG1 AK Bevacizumab	Alle VEGF-A Isoformen	++	48 kDa	4,75d	0,5 mg alle 4 Wochen
<b>Bevacizumab</b> (Avastin®)	IgG1-Antikörper	Alle VEGF-A Isoformen	+	148 kDa	8,25d	off label
<b>VEGF-Trap</b> (Aflibercept®)	Rekombinantes Fusionsprotein	Alle VEGF-A Isoformen und PlGF	+++	110 kDa	7,13d	ca. alle 6 Wochen

Tab. 1: Vergleich der vier anti-VEGF-Medikamente.

### 1.7.6 Vor- und Nachteile der okulären Injektion

Die Vorteile der intravitrealen Therapie bestehen darin, dass der Wirkstoff direkt am Wirkungsort platziert wird, ein hoher Wirkspiegel und relativ wenig systemische Nebenwirkungen erzielt werden. Die Substanz penetriert nach ihrer Injektion die gesamte Retina. Dabei muss der Wirkstoff die Membrana limitans interna, die gesamte Neuroretina, das retinale Pigmentepithel (RPE) sowie die Bruch-Membran überwinden. Alle oben genannten Wirkstoffe sind in der Lage die Netzhautschichten zu passieren.

Die Nachteile liegen im invasiven Charakter der Behandlung (Meyer *et al.*, 2008b). Eine Reihe von Komplikationen wie z.B. Endophthalmitis, Ablatio retinae oder Uveitis können auftreten. Außerdem ist die applizierte Menge und damit die Dosis des Wirkstoffes durch das Volumen des Glaskörpers begrenzt. Aufgrund der schnellen Elimination der Medikamente aus dem Glaskörperaum sind regelmäßige Wiederholungen der intravitrealen Injektion nötig. Dies birgt zusätzlich eine Risikoerhöhung für Komplikationen (Jager *et al.*, 2004).

## 1.8 In vivo Expression von Antikörpern

Eine Alternative zur intraokulären Injektion stellt die Expression von anti-VEGF Molekülen im Auge selbst dar. In den letzten Jahren wurde schon mehrfach die Expression von künstlich generierten Antikörpern in eukaryotischen Zellen *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Bose *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2007). Bevacicumab wurde *in vitro* mithilfe eines adenoviralen Vektors in Tumorzellen exprimiert und *in vivo* zur Behandlung des VEGF induzierten Lungenödems in der Leber von Mäusen eingesetzt (Watanabe *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2009). Hierbei konnte eine deutliche Reduktion des Lungenödems beobachtet werden, was auf eine hohe biologische Aktivität des exprimierten Bevacizumab hindeutet.

Ein rekombinantes anti-VEGF Fusionsprotein wurde erfolgreich in der Retina nach intravitrealer Injektion durch adeno-assoziiertem virus (AAV) Vektoren bei Mäusen (Pechan *et al.*, 2009) und bei Primaten (Lukason *et al.*, 2011) exprimiert. Dieses anti-VEGF Molekül besteht aus einer Bindungsdomäne des VEGF-R1, welches über einen Glyzinlinker mit dem Fc Fragment eines humanen IgG Antikörpers verbunden ist (Bagley *et al.*, 2011). Dadurch entstehen biologisch aktive Homodimere, die bei der Maus eine Reduzierung der neovaskulären Läsionen im Sauerstoff-induzierten Retinopathiemodell (OIR) bewirkten, einem Modell für die Frühgeborenenretinopathie beim Menschen (Pechan *et al.*, 2009). Im Primatenmodell konnten die neovaskulären Läsionen im laser-induzierten CNV Modell verringert werden (Lukason *et al.*, 2011). Momentan laufen die Vorbereitungen zur Durchführung einer klinischen Studie mit diesem Molekül bei Patienten mit feuchter AMD (clinicaltrials.gov: NCT01024998).

Eine andere Gruppe entwickelte ein Therapiestrategie, bei welcher der lösliche Rezeptor sFlt1 durch AAV vermittelten Gentransfer in der Retina exprimiert wird, um die Aktivität von VEGF in der Retina zu hemmen. Dies konnte an einem Mausmodell gezeigt werden, das humanes VEGF spezifisch in der Retina überexprimiert, und dadurch neovaskuläre Läsionen verursacht (Lai *et al.*, 2009; li Rahman *et al.*, 2011). In einer weiteren Studie wurde die Sicherheit dieser Anwendung am Primaten gezeigt (Lai *et al.*, 2011). Momentan ist auch mit diesem Therapieansatz ein klinischer Versuch mit Patienten mit feuchter AMD geplant (clinicaltrials.gov: NCT01494805).

## 1.9 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung eines Expressionssystems für die Produktion des anti-VEGF Moleküls Ranibizumab (RA-01) in eukaryotischen Zellen *in vitro* als Vorarbeit für eine spätere Anwendung des Systems im Auge von Patienten mit proliferativen Netzhauterkrankungen. Der Vorteil eines solchen Systems ist der Wegfall der regelmäßigen intraokulären Injektionen des Moleküls, da es in retinalen Zellen selbst hergestellt wird und als sezerniertes lösliches Molekül alle Bereiche der Netzhaut erreicht. Nach Herstellung des Expressionssystem wurde es *in vitro* in verschiedenen Zelllinien getestet und die biologische Aktivität des exprimierten F(ab) Fragmentes mit dem kommerziell erhältlichen Lucentis verglichen.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Acrylamid (Rothiphorese Gel 30)	Carl Roth (Karlsruhe)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (10%)	Merck (Darmstadt)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Hepes	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)

L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin)
Lipofectamine LTX™ Reagents	Invitrogen (Karlsruhe)
Luria Broth Base	Invitrogen (Karlsruhe)
Magermilchpulver Sucofin	TSI GmbH
Methanol	Sigma-Aldrich (Seelzen)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumthiosulfat	Merck (Darmstadt)
Page Blue-Protein	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ponceau S Solution	Sigma (Seelzen)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
SDS ultra pure	Carl Roth (Karlsruhe)
Select Agar	Invitrogen (Karlsruhe)
Silbernitrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Stickstoff (flüssig)	Linde (Pullach)
TEMED	Carl Roth (Karlsruhe)
TMB Substrat	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
Tris (hydroxymethyl)aminomethan	Merck (Darmstadt)
Triton X	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe)
VEGF-A 165	Cell Signaling (Frankfurt am Main)

## 2.2 Enzyme und Antikörper

Antarktische Phosphatase	New England BioLabs (Schwalbach)
Kpn I	Fermentas (St. Leon-Rot)
Pst I	Fermentas (St. Leon-Rot)
Pvu I	Fermentas (St. Leon-Rot)
Sal I	New England BioLabs (Schwalbach)
Sph I	New England BioLabs (Schwalbach)
T4-DNA Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
Goat anti-human IgG HRP	Rockland Inc. (Madison IL)
Rabbit anti-human IgG H+L	Rockland Inc. (Madison IL)
Rabbit anti-mouse IgG H+L	Rockland Inc. (Madison IL)

## 2.3 Puffer

Antarktische Phosphatase Puffer	New England BioLabs (Schwalbach)
Coating Puffer	Candor Bioscience (Wengen)
Kpn-Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ladepuffer 6x Loading Dye	Fermentas (St. Leon-Rot)
NEB 3+ Puffer	New England BioLabs (Schwalbach)
NE-Puffer	Macherey-Nagel (Düren)
Orange-Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
S1 (Resuspensions)-Puffer	Macherey-Nagel (Düren)
S2 (Lyse)-Puffer	Macherey-Nagel (Düren)
S3 (Neutralisations)-Puffer	Macherey-Nagel (Düren)
SDS Probenpuffer Roti Load1 (reduziert)	Carl Roth (Karlsruhe)
SDS Probenpuffer Roti Load2 (nicht reduziert)	Carl Roth (Karlsruhe)
T4-DNA-Ligase 5x Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Tango-Puffer	Fermentas (St. Leon-Rot)

## 2.4 Reagenzien und Kits

Coomassie Plus-The Better Bradford™ Assay Kit	Pierce (Rockford, USA)
DMEM	PAA (Paschingen, Österreich)
ECL Westernblotting Detection Reagent	GE Healthcare (München)
FCS (fötale Kälberserum)	PAA (Paschingen, Österreich)
M-Per® Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Nucleo Spin® Plasmid Kit	Macherey Nagel (Düren)
Penicillin/Streptomycin	PAA (Paschingen, Österreich)
peqGOLD HP Plasmid Miniprep Kit I	peqLab (Erlangen)
peqGold Plasmid Mediprep Kit II	peqLab (Erlangen)
peqGold Plasmid Midi Kit	peqLab (Erlangen)

## 2.5 Software

Die rechnergestützte Auswertung von DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe von Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd, Irland) und Vektor NTI (Invitrogen, Deutschland).

Die Chromatogramm-Erstellung erfolgte mit dem Programm Chromas Lite und die Auswertung erfolgte mit der Software Vector NTI.

## 2.6 DNA- und Protein-Größenstandards

Die verwendeten DNA-Größenstandards für die Gelelektrophorese sind in Abb. 6a, 6b und Abb. 7 abgebildet.

### DNA-Größenstandard:

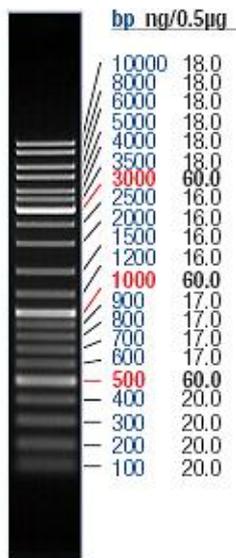


Abb. 6a: DNA-Größenstandard GeneRuler DNA-Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-Rot)

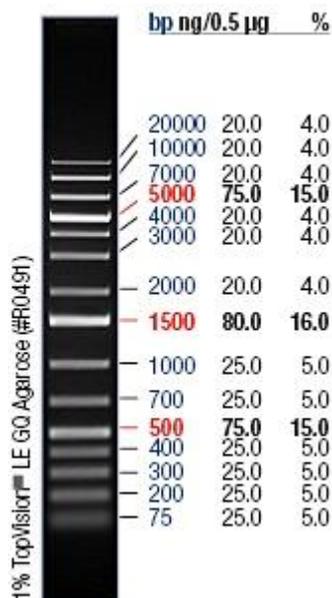


Abb. 6b: DNA Größenstandard Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St.Leon-Rot)

## Protein-Größenstandard:

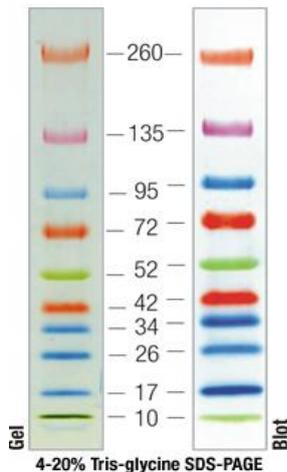


Abb. 7: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas, St.Leon-Rot)

## 2.7 Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen

**DMEM (Dubelcco's modified Eagle medium)**, PAA the Cell Culture Company (Cölbe, Deutschland). Dieses Medium wurde für die Kultivierung von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293), von humanen Zervixadenokarzinom-Zellen (HeLa) und von humanen Pigmentepithelzelllinien der Retina (arpe19) verwendet. DMEM wurde mit 1% Pen/Strep (v/v), 10% FKS (v/v), 200 mg/l Calciumchlorid und mit 4 mM L-Glutamin angesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

**Medium 200**, Invitrogen (Karlsruhe). Dieses Medium wurde zusammen mit dem LSGS (Low Serum Growth Supplement) Kit für die Kultivierung von HUVEC-Zellen verwendet.

### **LB-Medium:**

25 g/l Luria Broth Base (siehe 2.1) autoklavieren

### **Migration Assay Medium:**

Medium 200 mit LSGS (Low Serum Growth Sublement, Invitrogen)

### **PBS (phosphate buffered saline):**

8,0 g/l Natriumchlorid

0,2 g/l Kaliumchlorid

1,44 g/l Dinatriumhydrogenphosphat

0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat

(pH-Wert 7,4; autoklaviert; bei RT gelagert)

**Ampicilin-Stammlösung:**

349,4 mg/ml Ampicilin (1M)

**Calciumchlorid – Lösung:**

18,375 g Calciumchlorid

(auf 50 ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, aliquotiert à 5 ml und bei -20°C gelagert)

**Einfrierlösung:**

(steril gefiltert, bei -20°C gelagert)

10% DMSO

90% FKS

**Ethidiumbromidlösung:**

0,1 g/ml Ethidiumbromid

**HEPES-Lösung:**

1 mM HEPES

**Stopplösung:**

1 M Schwefelsäure

**LB-Agar:**

LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar

(autoklavieren, Zugabe des Selektionsantibiotikums unter 50°C, Gießen der Platten mit jeweils ca. 15 ml LB-Agar, bei 4°C sind die Platten etwa 6 Monate verwendbar)

**HeBS 2x (100 ml):**

1,636 g Natriumchlorid

0,0213 g Dinatriumhydrogenphosphat

1,19 g Hepes

(pH-Wert 7,05; auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, steril filtriert, aliquotiert à 10 ml und bei -20°C gelagert)

**Blocking-Puffer:**

5% (w/v) Milchpulver in 1 x TBS

**Blocking-Solution:**

5% (w/v) Milchpulver in 1x PDS

**10x SDS-Laufpuffer:**

30 g/L Tris  
144 g/L Glycin  
100 ml SDS (10%)  
pH 8,3

**10 x TBS:**

12,11 g/L Tris  
87,75 g/L NaCl  
pH 7,5 mit HCl

**TE-Puffer:**

1,21 g/l Tris  
1,86 g/l EDTA  
pH 8,0

**TBS-Tween-Puffer (Waschpuffer):**

1 x TBS  
0,05% Tween 20

**TBS-TT-Puffer:**

0,05% Tween 20  
0,2% Triton X100

**Western-Blot Transferpuffer:**

11,6 g Tris  
5,8 g Glycin  
400 ml Methanol  
qsq 2 Liter H<sub>2</sub>O  
pH 8,2–8,4 wird nicht eingestellt

## 2.8 Röntgenfilme und Membranen

Röntgenfilme wurden von GE Healthcare (München) verwendet.

Membranen und Filterpapier für Western-Blots (Whatman Protran Nitrocellulose Membran) wurden von Biometra (Göttingen) bezogen.

## 2.9 Geräte

6-, 24-Well-Platten	Greiner (Frickenhausen)
96-Well-Platten NUNC-Maxisorb	Thermo Scientific (Karlsruhe)
Autoklav DX-65	Systec (Wettenberg)
BioPhotometer	Eppendorf (Köln)
Cryo-Röhrchen (16 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Drucker für Photometer	Seiko Instruments GmbH (Neu-Isenburg)
Einweg-Pipettenspitzen	Corning (Wiesbaden), BioZym (Oldendorf)
Eismaschine	Scotsman (Herborn)
Elektrophorese - Kammer (DNA)	Biometra (Göttingen)
Elektroporationsküvette	Eppendorf (Köln), Bio Rad (München)
Entwicklungsgerät Curix 60	Agfa (Düsseldorf)
Falcons (15ml)	Greiner (Frickenhausen)
Fastblot Whatman	Biometra (Göttingen)
Filter (Bottle Top, steril, 150 ml)	Corning (Wiesbaden)
Fluoreszenzmikroskop BZ8000	Keyence (Neu-Isenburg)
Gefrierschränke	Liebherr (Ochsenhausen)
Gefrierschränke	VWR International (Darmstadt)
Gefrierschränke	Thermo Electron (Oberhausen)
Geldokumentation BioDocAnalyse	Biometra (Göttingen)
Gelkamm	Biometra (Göttingen)
Geltrockner Whatman Miditry	Biometra (Göttingen)
Glaspipetten (5 ml/10ml/20ml)	VWR (Darmstadt)/ Hirschmann (Eberstadt)
Handschuhe	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. CoKG (Wetter)
Inkubationshaube	Sartorius AG (Göttingen)
Inkubator	Binder (Tuttlingen)
Laminar Flow	Fisher Scientific (Schwerte)
Lichtmikroskop	VWR International (Darmstadt)
Membranpumpen System I Whatmann	Biometra (Göttingen)
Mikrokühlzentrifuge 1-15PK	SIGMA (Osterode am Harz)
Mikrowelle	Siemens (Deutschland, gibt's überall)
Minizentrifuge	LMS (Ilmenau)
Multiporator®	Eppendorf (Köln)
Netzgerät (Elektrophorese) Power Pack P25T	Biometra (Göttingen)
Neubauer Zählkammer improved	LO Laboroptik (Friedrichsdorf)
pH-Elektrode	Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)

Pipetten  
 Pipetten  
 Quarz-Küvette (10mm Dicke)  
 Thermoblock TB2  
 Thermocycler TPersonal  
 Thermocycler TProfessional Basic Gradient  
 Tisch-Schüttler  
 UV-Transilluminator  
 Vortexer  
 Waagen  
 Wasserbad  
 Zellkultur Schalen (58 cm<sup>2</sup>)  
 Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>)  
 Zentrifuge 4K15  
 Zentrifugenröhrchen (0,5 ml/1,5 ml/2 ml)

Eppendorf (Köln)  
 Brand (Wertheim)  
 Hellma (Essen)  
 Biometra (Göttingen)  
 Biometra (Göttingen)  
 Biometra (Göttingen)  
 Sartorius AG (Göttingen)  
 Allied Vision Technologies GmbH (Ahrensburg)  
 VWR International (Darmstadt)  
 Sartorius AG (Göttingen)  
 Julabo (Seelbach)  
 Greiner (Frickenhausen)  
 TPP (Trasadingen, Schweiz)  
 SIGMA (Osterode am Harz)  
 Sarstedt (Nümbrecht)

## 2.10 Biologische Materialien

### 2.10.1 Vektoren und Plasmide

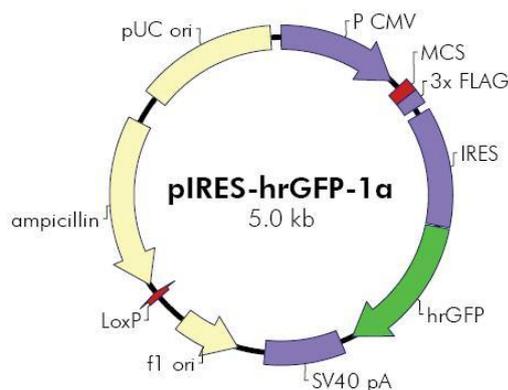


Abb. 8: pIRES-hr GFP 1a von Stratagene

Abkürzung	Name	Nukleotid Position
<b>CMV</b>	CMV Promoter	1-602
<b>MCS</b>	Multiple cloning site	651-715
<b>3x FLAG</b>	stop codon (in frame with 3x FLAG tag)	677-679
<b>IRES</b>	internal ribosome entry site (IRES)	823-1397
<b>hr GFP</b>	hrGFP ORF	1407-2123
<b>SV40 pA</b>	SV40 polyA signal	2188-2571
<b>f1 ori</b>	f1 origin of ss-DNA replication	2709-3015
<b>LoxP</b>	LoxP sequence	3178-3211
<b>ampicillin</b>	ampicillin resistance ( <i>bla</i> ) ORF	3256-4113
<b>pUC ori</b>	pUC origin of replication	4260-4927

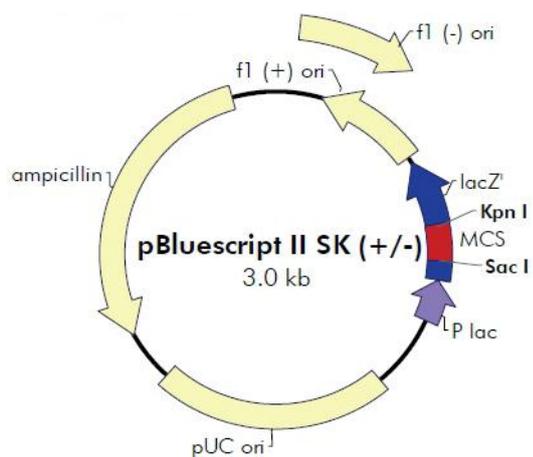


Abb. 9: pBluescript II SK + von Stratagene

Abkürzung	Name	Nukleotid Position
<b>f1 (+) ori</b>	f1 (+) origin of ss-DNA replication	135–441
<b>lac Z'</b>	$\beta$ -galactosidase $\alpha$ -fragment coding sequence	460–816
<b>MCS</b>	multiple cloning site	653–760
<b>P lac</b>	<i>lac</i> promoter	817–938
<b>pUC ori</b>	pUC origin of replication	1158–1825
<b>Ampicillin</b>	ampicillin resistance ( <i>bla</i> ) ORF	1976–2833

### 2.10.2 Antikörper

Folgende 2 Antikörper wurden im Rahmen dieser Dissertation zur Detektion der Peptidketten eingesetzt.

1. anti-human IgG (rabbit anti human IgG H+L, Rockland)
2. anti-mouse IgG (rabbit anti mouse IgG H+L, Rockland)

### 2.10.3 Zelllinien

#### HEK 293 – Zelllinie (CLS)

Hierbei handelt es sich um eine humane embryonale Nierenzelllinie (Abk. HEK für engl. **H**uman **E**mbyonic **K**idney cells), deren Wildtyp durch Transfektion mit dem Adenovirus 5 zu einer dauerhaft kultivierbaren Form (293) umgewandelt wurde. 1977 wurde die Zelllinie erstmals von Dr. Fl. Graham etabliert. Die Zelllinie gilt als gut kultivierbar und ist eine gute Basis für Untersuchungen an durch Transfektion exprimierten Proteinen. Die Zellen weisen eine epitheliale Morphologie auf und wachsen adhärent in einer Zellschicht. Die Zellen wurden von Cell Lines Service (CLS, Eppelheim, Deutschland) bezogen und wurden kultiviert in DMEM mit Zusatz von 1% Pen/Strep, 4 mM L-Glutamin, 200 mg/l Calciumchlorid und mit 10% FKS (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum).

### HeLa –Zelllinie (CLS)

Hela-Zellen sind adhären wachsende humane Karzinomzellen, die im Jahre 1951 aus dem Cervixepithel der amerikanischen Patientin Henrietta Lacks isoliert wurden. Diese Zelllinie war die erste epitheliale Zelllinie die kontinuierlich kultiviert wurde und ist mittlerweile als Standardzelllinie bekannt. Die Zellen wurden bezogen von Cell Lines Service (CLS, Eppelheim, Deutschland) und wurden kultiviert in DMEM mit Zusatz von 1% Pen/Strep, 4 mM L-Glutamin und 10% FKS (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum).

### RPE arpe19-Zelllinie (ATCC,CRL-2302)

Hierbei handelt es sich um eine humane Pigmentepithelzelllinie der Retina. Die Zelllinie wurde erstmals von Dunn et al. isoliert. Sie zeichnet sich aus durch ihre rasche Proliferation und besitzt strukturelle und funktionelle Eigenschaften, die für RPE-Zellen in vivo charakteristisch sind. Die Zellen wurden bezogen von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) und wurden kultiviert in DMEM mit Zusatz von 1% Pen/Strep, 4 mM L-Glutamin und 10% FKS (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum).

### Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

Für den Planar Migration Assay (siehe Kapitel 3.8) wurden primäre HUVECs aus der Nabelschnurvene verwendet. Die Zellen wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und in Medium 200 (Invitrogen) komplettiert mit dem LSGS Kit (Invitrogen) kultiviert.

#### 2.10.4 *E.coli*-Stämme

Der *E.coli* XL-1 Blue Stamm ist aus dem *E. coli*-K12-Sicherheitsstamm abgeleitet. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C als Suspensionsschüttelkultur (180-200 rpm) in Luria-Bertani-Medium. Die Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide erfolgte durch Zusatz des entsprechenden Antibiotikums (Ampicillin oder Tetracyclin).

Stamm	Phenotyp
<b><i>E. coli</i> XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla CA)</b>	NaIS, StrS, RifS, Thi-,Lac-, Ara+, Gal+, Mtl-, F-RecA+, Uvr+, Lon+

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellbiologische Methoden**

#### **3.1.1 Zellkultur**

Alle Arbeiten wurden an einer zuvor desinfizierten Sterilbank (Laminar Flow, Fisher Scientific) durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit 5-6 ml DMEM-Medium (1% Pen/Strep (v/v), 10% FKS (v/v), 200 mg/l Calciumchlorid und 4 mM L-Glutamin). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank (37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit) gehalten. Zum Passagieren der adhären wachsenden Zellen wurde das Medium mit sterilen Glaspipetten abgesaugt, einmal mit 5-6 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 2,5 ml Trypsin-EDTA für 2-5 min. inkubiert. Dadurch wurden die Zellen vom Boden abgelöst. Der Zellsuspension wurden 10 ml Medium zugefügt und die Zellen gezählt. Ca.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit 5-6 ml Medium im Brutschrank (37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

#### **3.1.2 Kryokonservierung von Zellen**

Für die Lagerung wurden die Zelllinien eingefroren. Dafür wurde das Medium mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt, die Zellen mit 5-6 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank für 2-5 min. inkubiert und 10 ml Medium auf die abgelösten Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt, die Zellen gezählt und für 10 min. bei 125 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit einer Konzentration von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen im Einfriermedium resuspendiert. Diese Suspension wurde in Kryotubes aliquotiert (je 1 ml). Die Kryotubes wurden für 24 h in kaltes Isopropanol und danach bei -196°C in flüssigen Stickstoff gelagert.

#### **3.1.3 Auftauen von Zellen**

Die entsprechenden Kryotubes wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 5-6 ml DMEM-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Kulturflasche überführt. Durch leichtes hin- und her schwenken der Flasche wurden die Zellen auf der Oberfläche verteilt.

### 3.1.4 Auszählen von Zellen

Mit der Neubauer Zählkammer-improved wurde die Zellzahl bestimmt. Mit der Zählkammer wird die Teilchenzahl pro Volumeneinheit einer Flüssigkeit bestimmt. Die Zählkammer besteht aus einer Grundplatte mit 0,1 mm Kammertiefe. In den Kammerboden ist ein Zählnetz eingraviert. Das Zählnetz besteht aus 4 (L-) Quadraten, die wiederum aus 4x4 kleinen Quadraten bestehen. Jedes der 4 L-Quadrate hat eine Größe von 1x1 mm. Dies entspricht einem Volumen von 0,1 µl. Nach Auflegen des plangeschliffene Deckglases wurde die verdünnte Zellsuspension zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert (Verdünnung 1:2 mit Medium). Danach wurden alle 4 L-Quadrate ausgezählt und die Zellzahl berechnet mit folgender Formel:

$$[(L1+L2+L3+L4) :4] = x V \times 10^4 = \text{Zellzahl / ml}$$

L = L-Quadrat

V = Verdünnungsfaktor (hier: 2)

## 3.2 Klonierung

### 3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Säule (Mini, Medi)

Die Plasmid-DNA wurde aus *E.coli*-Übernachtskulturen gewonnen. Die zu überprüfenden Klone wurden mit sterilen Pipettenspitzen gepickt. In 5 ml-LB-Medium und 5 µl Ampicillin wurden die Kulturen bei 37°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Mit den unter Kapitel 2.4 aufgelisteten Plasmid-Isolations-Kits (peQLab HP Plasmid Mini Kit I) wurde die Plasmid-DNA nach Herstellerprotokoll im Mini- oder Midimaßstab isoliert. Es wurden ausschließlich die in den genannten Kits vorhandenen Puffer verwendet. Die gewonnene DNA wurde in 0,5 ml TE-Puffer eluiert.

### 3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation

2 ml der *E.coli*-Übernachtskultur wurden gewonnen und bei 5000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule mit 100 µl S1-Puffer (Kapitel 2.3) resuspendiert. Direkt im Anschluss erfolgte das Lysieren mit 100 µl S2-Puffer (Kapitel 2.3). Nach einmaligem Invertieren wurden 100 µl des S3-Puffers (Kapitel 2.3) zu Neutralisation hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 10.000 rpm für 10 min. zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet mit 700 µl -20°C kalten 100%igen Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte ein erneutes Zentrifugieren mit 17.000 g für 30 min. bei 4°C. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und das Pellet mit 200 µl 70%igen Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt

bei 17.000 g über 5 min. wurde das Pellet luftgetrocknet und anschließend in 20 µl TE-Puffer (Kapitel 2.7) gelöst.

### 3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde verwendet, um DNA-Fragmente aus den Restriktionsansätzen der Größe nach aufzutrennen. Für das 1%-ige Agarosegel wurde die Agarose zusammen mit 1x TBE-Puffer (121,14 g/L Tris; 51,33 g/L Borsäure; 2,92 g/L EDTA\*2 Na\*2H<sub>2</sub>O) in der Mikrowelle aufgeköcht und das dabei verdampfte Wasser wieder mit dest. H<sub>2</sub>O ausgeglichen. Nach Abkühlen auf ca. 42°C wurden 2-5 µl der 1%-ige Ethidiumbromidlösung zugegeben und gemischt. Danach wurde diese Lösung in eine Elektrophoresekammer gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Nach ca. 15 min. wurde das erstarrte Agarosegel mit 1x TBE-Puffer überschichtet und der Kamm wieder entfernt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 1-5 µl Ladepuffer versetzt und zusammen mit dem DNA-Größenstandard (siehe Kapitel 2.6) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V über eine Stunde durchgeführt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde die DNA auf einem UV-Leuchttisch mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm sichtbar gemacht.

### 3.2.4 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Die gewünschte Bande des DNA-Fragmentes wurde auf einem UV-Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits (Nucleo Spin® Plasmid Kit), nach Angaben des Herstellers, aus der Agarose isoliert. Die Elution erfolgte in NE-Puffer. Anschließend wurde die Konzentration des Eluats photometrisch bestimmt.

### 3.2.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die photometrischen Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Laut dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Absorption bzw. die Extinktion direkt proportional zu der Konzentration einer Lösung. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption (OD<sub>260</sub>) der Proben in Quarzglasküvetten bei 260 nm mit dem Photometer gemessen. Die Absorption wurde durch geeignete Verdünnungen auf einen Wert zwischen 0,1 und 1,0 eingestellt. Ober- und unterhalb dieser beiden Werte verläuft die Standardkurve nicht linear und es können dadurch zu hohe Abweichungen in den Messungen auftreten. Um die Reinheit

der DNA zu überprüfen, wurde die Ratio des Ansatzes mit dem Photometer bestimmt. Dazu wurden die Absorptionen bei 280 nm und 260 nm gemessen und der Quotient (E260/E280) daraus berechnet. Für reine DNA lag dieser Wert bei 1,8.

**Lambert-Beer'sches Gesetz:**  $E = \log I\Delta/I = \epsilon \cdot c \cdot d$

E	gemessene Extinktion (Absorption)
$I\Delta$	Intensität des eintretenden Lichtstrahls
I	Intensität des nach Durchgang durch die Probe austretenden Lichtes
c	Konzentration der absorbierenden Substanz
d	Schichtdicke der Küvette
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient

### 3.2.6 Enzymatische Hydrolyse (Restriktion)

Die benutzten Restriktionsenzyme (siehe Kapitel 2.2) wurden in den dafür vorgesehenen Puffern, nach Angaben des Herstellers, verwendet. Auf vollständige Aktivität beider Enzyme wurde bei einem Doppelverdau geachtet. Bei Weiterverwendung der Restriktionsansätze (z.B. Ligation, Dephosphorylierung) wurden die Enzyme zuvor hitzeinaktiviert.

Plasmid	100-300 ng
Enzym 1	20 U
Enzym 2	20 U
10x Puffer	1x
H <sub>2</sub> O dest.	ad 10 $\mu$ l

### 3.2.7 Dephosphorylieren von DNA

Bei der Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors wurde die 5'-Phosphat-Gruppe der DNA vor der Ligation entfernt. Somit konnte eine Selbstligation des geschnittenen Vektors mit dem geschnittenen Insert verringert werden. Dafür wurde die Antarktische Phosphatase verwendet, die nach einer Inkubationszeit von 15 min. bei 37°C wieder bei 65°C hitzeinaktiviert wurde.

DNA (hydrolysiert)	1 $\mu$ g
Antartic Phosphatase	1 $\mu$ l
10x Puffer	1x
H <sub>2</sub> O dest.	ad 20 $\mu$ l

### 3.2.8 Ligation mit der T4-DNA Ligase

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden der Vektor und das Insert zuvor verdaut (siehe Kapitel 3.2.6) und gereinigt. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.2.5). In einem 20 µl-Ansatz mit 4 µl T4-Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (400 U) wurde Insert zu Vektor in, nach unten stehender Formel, berechnetem Verhältnis eingesetzt. Nach der Inkubation wurde die Ligase bei 70°C für 20 min. inaktiviert.

$$\text{Insert [ng]} = 3 \cdot \text{Vektor[ng]} \cdot \frac{\text{Länge Insert [bp]}}{\text{Länge Vektor [bp]}}$$

### 3.2.9 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen von DNA wurden als externe Auftragsarbeiten durch die Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

Plasmid	700 ng
Primer	20 ng
H <sub>2</sub> O dest.	x µl
Gesamt	7 µl

### 3.2.10 Herstellung von Glycerin-Stocks

Um die E.coli-Klone über mehrere Jahre lagern zu können, wurden je 1 ml der jeweiligen LB-Flüssigkultur mit 1 ml Glycerin versetzt, gemischt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 3.2.11 Herstellung elektrokompetenter *E.coli*-Zellen

Zur Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden 5 µl Zellen eines Glycerinstocks über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Ampicilin als Selektivantibiotikum (Endkonzentration: 1 mM) bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Übernacht-Kultur in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium plus 250 µl Antibiotikum (Endkonzentration: 1 mM) überimpft. Diese Hauptkultur wurde bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler für ca. 2 h bis zu einer OD600 = 0,5–0,7 inkubiert. Nach Erreichen der optischen Dichte wurde die Bakterienkultur sofort für 30 min. auf Eis gelagert und anschließend für 5 min. bei 5.100 g und 4°C zentrifugiert.

Das Bakteriensediment wurde vorsichtig in 50 ml kalter 1 mM HEPES-Lösung (0,23 g/L) resuspendiert und für 5 min. bei 5.100 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Dieser Schritt wurde mit 25 ml kalter 1 mM HEPES-Lösung wiederholt. Anschließend wurde das Sediment zuerst in 10 ml und dann in 5 ml 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert und jeweils für 5 min. bei 5.100 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde jedes Mal abdekantiert und verworfen. Das Sediment wurde vorsichtig in 1 ml 10%-iger Glycerinlösung resuspendiert und frisch für die Transformation eingesetzt. Die restlichen Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.2.12 Transformation elektrokompenter *E.coli*-Zellen

Vor der Elektroporation wurden 0,5-1 µl des Ligationsansatzes aus Kapitel 3.2.8 mit 50 µl frischen, kompetenten *E. coli*-Zellen aus dem vorangegangenen Kapitel für 30 min. auf Eis gelagert. Der gesamte Ansatz wurde luftblasenfrei in die gekühlten Elektroporationsküvetten pipettiert. Mit dem Multiporator wurde bei 2000 V mit 5 ms transformiert. Sofort nach dem Puls wurde der Ansatz mit 1 ml vorgewärmten LB-Medium aus der Küvette gespült und 60 min. bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler regeneriert. 100 µl des regenerierten Transformationsansatzes wurden dann auf leicht angetrocknete LB-Amp-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 3.3 Transfektion

Bei der Transfektion wurde die Plasmid-DNA in die HEK 293- bzw. HeLa Zellen eingebracht. Essentielle Parameter sind hierbei die Temperatur der Reagenzien (RT), der pH-Wert, die Zelldichte und die DNA Konzentration.

### 3.3.1 Lipofektion

Bei der Lipofektion bilden sich Liposomen-DNA Komplexe. Die Komplexe fusionieren mit der Zellmembran und die DNA wird ins Zytoplasma transportiert. Am Tag vor der eigentlichen Transfektion wurden die Zellen (HEK 293/ HeLa/ arpe19) aus den Kulturflaschen mit einer Zellzahl von  $1 \cdot 10^6$  auf die 6-Well Platten überführt. Jedes Well wurde mit DMEM-Medium auf 2 ml aufgefüllt und 24 h inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde das Medium abgesaugt. Für jedes Well wurden 4 µg DNA mit 500 µl DMEM-Medium (ohne FKS), 7,5 µl PLUS-Reagent und 22,5 µl Lipofectamine LTX™ Reagent verdünnt. Die Lösung wurde für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

30 min. wurde der DNA-Lipid-Komplex tropfenweise auf die Zellen gegeben und die 6-Well-Platten für 5-10 min. bei 50-80 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden für weitere 24-48 h inkubiert.

### **3.3.2 Calcium-Phosphat-Präzipitation**

Bei der Calciumphosphat – Präzipitation bildet die zu transfizierende DNA mit dem Calciumphosphat einen feinkörnigen Niederschlag, die Zellen nehmen die so entstandenen Kristalle durch Phagozytose auf. Die DNA wird bis zum Kern transportiert. Nach erfolgter Transkription und Translation wird das „Fremd“ Protein exprimiert.

Am Tag vor der eigentlichen Transfektion wurden die Zellen (HEK 293/ HeLa) aus den Kulturflaschen mit einer Zellzahl von  $1 \cdot 10^6$  auf die 6-Well Platten überführt. Jedes Well wurde mit DMEM-Medium auf 2 ml aufgefüllt und für 24 h inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde 30 min. vor Transfektion das Medium gewechselt (mit 10% FKS). Pro Well wurden 2 µg DNA mit H<sub>2</sub>O auf 90 µl aufgefüllt. Zu der Lösung wurden 10 µl Calciumchlorid pipettiert. Unmittelbar danach wurde das Gemisch tröpfchenweise in eine Tube mit 100 µl HeBS 2x, unter vorsichtigem Vortexen, pipettiert. Danach wurde 10 sec. weiter gevortext und 50 sec. inkubiert. Anschließenden wurden 200 µl des Gemisches, unter hin- und her bewegen der Platte, in jedes Well pipettiert. Die Zellen wurden für weitere 24 h inkubiert.

### **3.4 Proteinextraktion aus HEK 293-, HeLa- und arpe19-Zellen**

Zunächst wurde das DMEM-Medium vorsichtig entfernt, danach die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Pro Well wurden 200-400 µl des Lysepuffers (M-PER = Mammalian Protein Extraction Reagent) zugegeben und 5 min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lysat wurde anschließend 5 min. bei 14.000 g zentrifugiert und der Überstand zur Weiterverarbeitung abgenommen.

### **3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der indirekten Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld. Da die meisten Proteine an SDS in einem konstanten Masse-Ladungs-Verhältnis binden, wandert dieser negativ geladene SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Die SDS-PAGE wurde unter

reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in 1 mm starken Vertikalgelen durchgeführt. Zur Herstellung der Gele wurde zunächst das 15%ige Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit Ethanol abs. überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol entfernt, die Gelkammer mit H<sub>2</sub>O dest. gewaschen und getrocknet. Über das Trenngel wurde dann das 4%ige Sammelgel gegossen und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Vor dem Probenauftrag wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer (Rotiload) versetzt, 10 min. bei 94°C erhitzt und zusammen mit einem Proteinstandard (Kapitel 2.6) aufgetragen und im SDS-Laufpuffer elektrophoretisch bei 150 V für 75 min. aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder mit Coomassie-Blau bzw. Silber gefärbt (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.5.2) oder zum Blotten weiterverwendet.

### Mischtabelle Protein-Polyacrylamid-Gele

	<b>Trenngel (25 ml)</b>	<b>Sammelgel (10 ml)</b>
<b>Polyacrylamid</b>	<b>15%</b>	<b>4%</b>
1,5 M Tris/HCl; pH 8,8	6,25 ml	-
0,5 M Tris/HCl; pH 6,8	-	5,0 ml
20% SDS-Stock	125 µl	50 µl
30% Acrylamidlösung (Rothiphorese Gel 30)	11,25 ml	2,2 ml
10% APS-Stock	20 µl	15 µl
TEMED	200 µl	100 µl
H <sub>2</sub> O dest.	7,50 ml	2,8 ml

APS und TEMED wurden erst kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben.

#### 3.5.1 Coomassie-Färbung

Die Proteine wurden nach der SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.5) mit Page Blue angefärbt und somit auf den Gelen sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele ca. 2 h oder über Nacht in dem Farbstoff geschwenkt. Farbrückstände wurden nach der Färbung mit destilliertem Wasser bis zum gewünschten Kontrast wieder entfärbt. Danach konnten die Gele auf dem Geltrockner für 90 min. bei 80°C getrocknet werden.

### 3.5.2 Silberfärbung

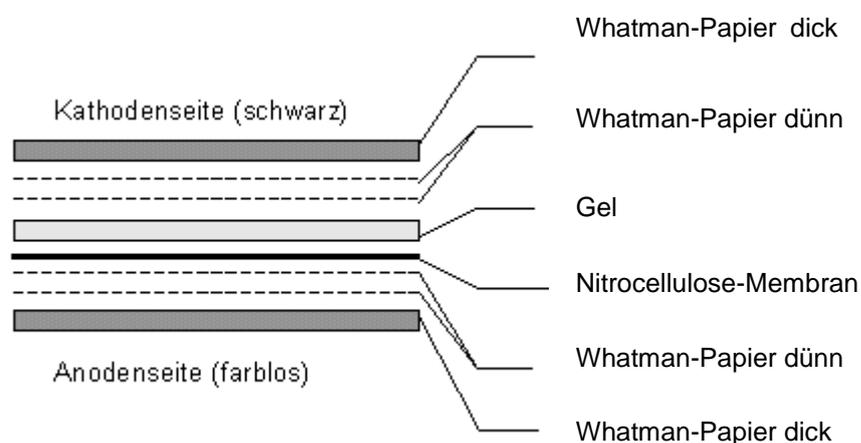
Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen durch Silberfärbung ist eine empfindlichere Färbemethode als die Coomassie-Färbung. Ihr Vorteil liegt in der hohen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze: 5 ng Protein/Bande).

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurden die Polyacrylamid-Gele mit Silber angefärbt. Zunächst wurden die Gele mit 45 ml Methanol, 5 ml Essigsäure und 50 ml Wasser fixiert. Die Entfernung von eventuell störenden Substanzen erfolgte durch dreimaliges Waschen in H<sub>2</sub>O dest. für jeweils 20 min. Danach erfolgte die 1-2 minütige Sensibilisierung durch eine 0,02%ige Natriumthiosulfatlösung. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Gele in 0,1% bei 4°C gekühlter Silbernitratlösung 30 min. lang gefärbt. Entwickelt wurden nach einem weiteren Waschschrift mit 0,04% Formaldehyd und 2% Natriumcarbonat bis zur gewünschten Intensität der Banden. Gestoppt wurde der Entwicklungsvorgang durch 1% Essigsäure. Die Geltrocknung erfolgte für 2 h bei 80°C auf dem Geltrockner.

### 3.6 Western-Blot

Die, durch die SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.5), elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch das Semi-Dry-Blotting-Verfahren mit dem Fastblot auf eine Protran-Nitrozellulose-Membranen übertragen. Der Aufbau des Blots erfolgte nach unten stehendem Material und Methoden Schema mit in Transferpuffer getränktem Filterpapier. Nach dem Aufbau des Western-Blots wurden die Proteine mit 150 mA/cm<sup>2</sup> für 40 min. auf die Protran-Nitrozellulose-Membran übertragen.

#### Semi-Dry-Blot Aufbau:

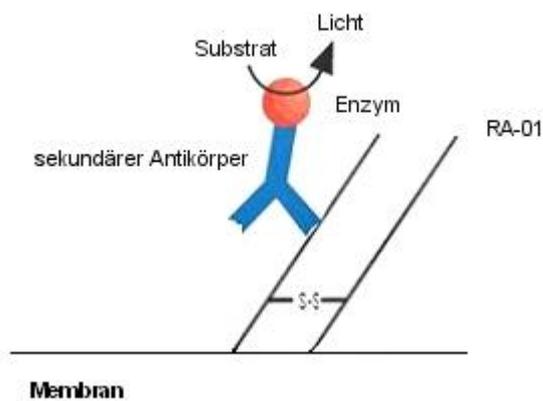


### 3.6.1 Ponceau Rot-Färbung

Die Protran-Nitrozellulose-Membran wurde nach dem Western-Blot für 5 min. in Ponceau Rot geschwenkt. Somit wurden die Proteine auf der Membran sichtbar gemacht und die Bloteffizienz überprüft. Entfärbt wurde mit destilliertem Wasser.

### 3.6.2 Detektion mit Antikörpern

Die Detektion mit Antikörpern dient dazu bestimmte Proteine auf Western-Blots sichtbar zu machen. Dazu wurde dieser mit den Antikörpern inkubiert. Man macht sich dabei, wie in Abbildung 10 gezeigt, die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze. Der primäre Antikörper bindet an das Antigen. In diesem Fall ist RA-01 der primäre Antikörper (also das zu detektierende Protein). Ein zweiter, sekundärer Antikörper, der zuvor mit einem Enzym, meist der Alkalische Phosphatase oder der Meerrettichperoxidase markiert wurde, bindet an den primären Antikörper. Durch das an diesen Antikörper gebundene Enzym wird dann eine Reaktion katalysiert, die als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens dient.



**Abb. 10: Prinzip der Detektion mit dem spezifischen Antikörper** (verändert Qiagen Qiaexpress-Protokoll)

Nach der Ponceau-Rot Färbung wurde die Membran für 1 h oder über Nacht bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min. in TBS-Tween erfolgte die Inkubation über 2 h bei Raumtemperatur mit den Antikörpern (Rabbit anti-human IgG H+L, Rockland und Rabbit anti-mouse IgG H+L, Rockland). Der Rabbit anti-human IgG (H+L)-Antikörper wurde 1: 1000 und der Rabbit anti-mouse IgG (H+L) wurde 1: 1500 mit H<sub>2</sub>O dest. verdünnt und in 10 ml Blocking-Puffer gelöst. Nach einem Waschschrütte für 10 min. in TBS-TT, einem Schritt für 10 min. in TBS-Tween und einem Schritt für 10

min. in TBS, erfolgte die Detektion mit dem Western Blotting Detection-Kit (3 ml Solution A + 3 ml Solution B) für 1 min. bei Raumtemperatur. Nachdem das Substrat wieder entfernt wurde, wurde die Membran in Frischhaltefolie eingespannt und in die Röntgenkassette geklebt. Der Röntgenfilm wurde wahlweise für 3-30 min. bzw. über Nacht aufgelegt und anschließend entwickelt.

### **3.7 ELISA (Quantifizierung von Ranibizumab und RA-01)**

Für die Quantifizierung des exprimierten RA-01 wurde ein ELISA durchgeführt. Die einzelnen Vertiefungen einer NUNCMaxisorb-ELISA-Platte wurden mit je 100µl rhVEGF-165 (2µg/ml) (siehe Kapitel 2.1) und in 1x Coating Puffer (pH 7,4) bei 4°C, 300 rpm, über Nacht beschichtet. Am nächsten Tag wurde das rhVEGF-165 wieder entfernt, die beschichteten Vertiefungen 4x mit je 400 µl Waschpuffer gewaschen und die noch freien Bindungsstellen anschließend mit 200 µl Blockierungslösung (1% Gelatine in 1x TBS) eine Stunde lang bei 37 °C mit 300 rpm abgesättigt. Nach dreimaligen waschen wurde, jeweils in Triplets, in alle benötigten Vertiefungen 100 µl der zu messenden Proben bzw. des Standards (Lucentis® 0,1 µg/ml bis 0,5 µg/ml) gegeben. Es folgte eine 60 minütige Inkubation bei 37°C und 300 rpm, sowie ein dreimaliger Waschschrift. Anschließend wurde das an das rhVEGF-165 gebundene Lucentis® bzw. RA-01 mit je 100µl Detektionslösung (anti-human-IgG-HRP-Antikörper in einer Verdünnung von 1:60000 mit PBS) für 1h, 300rpm bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift, sowie nach Zugabe der Substratlösung (TMB-Substrat) (37°C, 300rpm, bis zu 15 min.) und der Stopplösung (siehe Kapitel 2.7) erfolgte ein Farbumschlag und die Proben färbten sich gelb. Es folgte die photometrische Absorptionsbestimmung bei 450 nm im Spektralphotometer. Die unbekannt Konzentrationen wurden mit Hilfe der erstellten Standardgeraden und linearer Regression berechnet.

### **3.8 HUVEC- Planar Migration Assay**

Zur Bestimmung der Aktivität des exprimierten RA-01 wurden HUVEC-Zellen (siehe Kapitel 2.10.3) in einer 24-Well-Platten ausgesät und bis zur 100%igen Konfluenz im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wachsen gelassen. Anschließend wurde mit einer sterilen 2,5ml Einweg-Pipettenspitze ein zellfreier Bereich definierter Breite in der konfluenten Zellschicht erzeugt. Hierbei war darauf zu achten, dass eine möglichst gerade und gleichmäßige Furche durch den dichten Zellrasen gezogen wurde. Dies wurde lichtmikroskopisch überprüft. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS

gewaschen. Die Kontrollen und Proben wurden mit 20 ng/ml rhVEGF<sup>165</sup> in Migration Assay Medium pipettiert. Als Kontrollen dienten Ansätze mit und ohne rhVEGF<sup>165</sup>, das kommerziell vertriebene Lucentis<sup>®</sup> sowie der Kulturüberstand einer HEK293 Kultur. Das Ergebnis wurde mit einem Lichtmikroskop (siehe Kapitel 2.9) photographiert und die Spaltenbreite wurde mittels Photoshop CS4 Software gemessen.

## 4 Ergebnisse

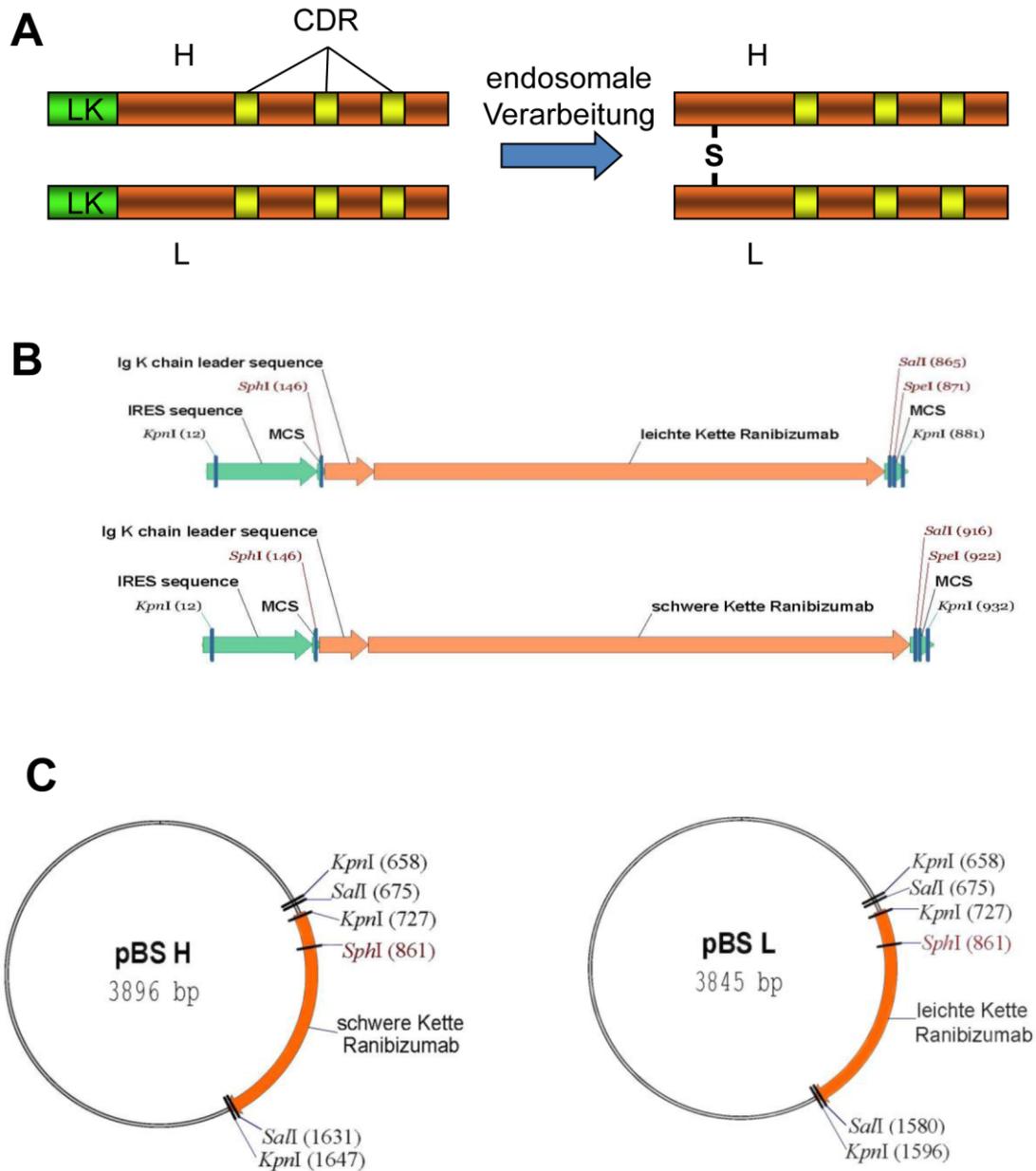
### 4.1 Design von RA-01

Das F(ab) Fragment eines Antikörpers besteht aus zwei Ketten, einer leichten Kette „L“ und einem Teil der schweren Kette „H“ (Abb. 11A). Diese beiden Ketten sind über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden und bilden die dreidimensionale Struktur durch ihre kanonische Interaktion.

Die DNA Sequenzen wurden von der publizierten Peptidsequenz (Chen *et al.*, 1999) abgeleitet und für eine Expression in eukaryonten Zellen optimiert, das heißt, es wurden bestimmte Basen ausgetauscht, ohne die Aminosäuresequenz zu verändern. Für eine effiziente Sekretion der exprimierten Peptidketten aus den eukaryonten Zellen müssen sekretorische Signalketten an die Gene angehängt werden. Dafür werden die leichte- (L) und die schwere (H) Aminosäurekette mit einer N-terminalen Leader Sequenz (Lk) der IgG-Kappa Untereinheit zusammen exprimiert. Bei Eintritt der Ketten in das sekretorische Vesikel wird die Leadersequenz abgespalten und es bildet sich ein heterodimeres Molekül durch eine Disulfidbrückenbindung. Die CDRs (complementarity determining region) sind für die Interaktion des Antikörperfragments mit dem komplementären Antigen verantwortlich (Abb. 11A).

Die Synthese der DNA Ketten wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt und in den Subklonierungsvektor pbluescript II SK (+) kloniert (Abb. 11B,C). Die DNA wurde an beiden Enden mit zusätzlichen Restriktionschnittstellen versehen (Abb. 11B).

Es wurden die Schnittstellen Sall (G`TCGA`C), SphI (G`CATG`C) und KpnI (G`GTAC`C) gewählt. Diese Schnittstellen dienten dazu, die DNA bei späteren Klonierungsschritten in den Expressionsvektor pIRES-hrGFP 1a klonieren zu können.



**Abb. 11: Design der Ketten von RA-01.**

(A) Das F(ab) Fragment bestehend aus einer leichten (L) und einer schweren (H) Aminosäurekette. Lk: Leadersequenz, CDR: complementarity determining region, S: Disulfidbrücke.

(B) Leichte- und schwere Kette mit Schnittstellen; IRES: internal ribosomal entry site, MCS: multiple cloning site.

(C) pbluescript Vektor mit schwerer Kette (links) und leichter Kette (rechts) und Schnittstellen.

## 4.2 Klonierung

Da im ersten Teil dieser Dissertation mehrere Klonierungen vorgenommen werden, soll kurz vorgestellt werden, wie und in welcher Reihenfolge die einzelnen dafür notwendigen Schritte durchgeführt werden. Unter Klonierung versteht man die Integration eines Gens oder DNA-Fragments in einen Klonierungs- bzw. Expressionsvektor, sowie die anschließende Vervielfältigung und Expression dieser rekombinanten DNA in einem geeigneten Wirtssystem. Der Ablauf einer Klonierung im Rahmen dieser Dissertation ist folgendermaßen (siehe Abbildung 12):

Zunächst wurden das Plasmid und die Fremd-DNA mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten (Restriktionsverdau), so dass der geöffnete Plasmidvektor und das Insert komplementäre Enden zueinander aufweisen. Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe mittels Gelelektrophorese (Gelaufreinigung). Mit Hilfe einer DNA-Ligase wurde bei der nachfolgenden Ligation das Insert in den geöffneten Vektor eingefügt. Um nachfolgend die rekombinante Plasmid-DNA vermehren zu können, mussten die Plasmide in Bakterienzellen transformiert werden (Transformation). Dazu wurden elektrokompetente *E.coli* Zellen in großer Menge hergestellt, aliquotiert und für alle weiteren Versuche verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation in die kompetenten *E.coli* Zellen eingebracht. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht inkubiert (Übernachtkultur). Durch das schnelle Wachstum der Bakterien fand eine enorme Vermehrung der DNA statt. Am nächsten Tag wurde die DNA aus den *E.coli* Übernachtskulturen mit einem speziellen Protokoll für Minipreps aufgereinigt (DNA Isolierung). Es erfolgten ein weiterer Restriktionsverdau und Gelelektrophorese um die Klone screenen zu können (Restriktion für Screening). Die ausgewählten Klone wurden für die Sequenzierung zu einer externen Firma geschickt (Sequenzierung). Für weitere Klonierungsschritte oder eine anschließende Transfektion in HEK 293-, HeLa- oder arpe19-Zellen wurde die DNA ein weiteres Mal isoliert (DNA Isolierung für weitere Klonierungsschritte oder Transfektion).

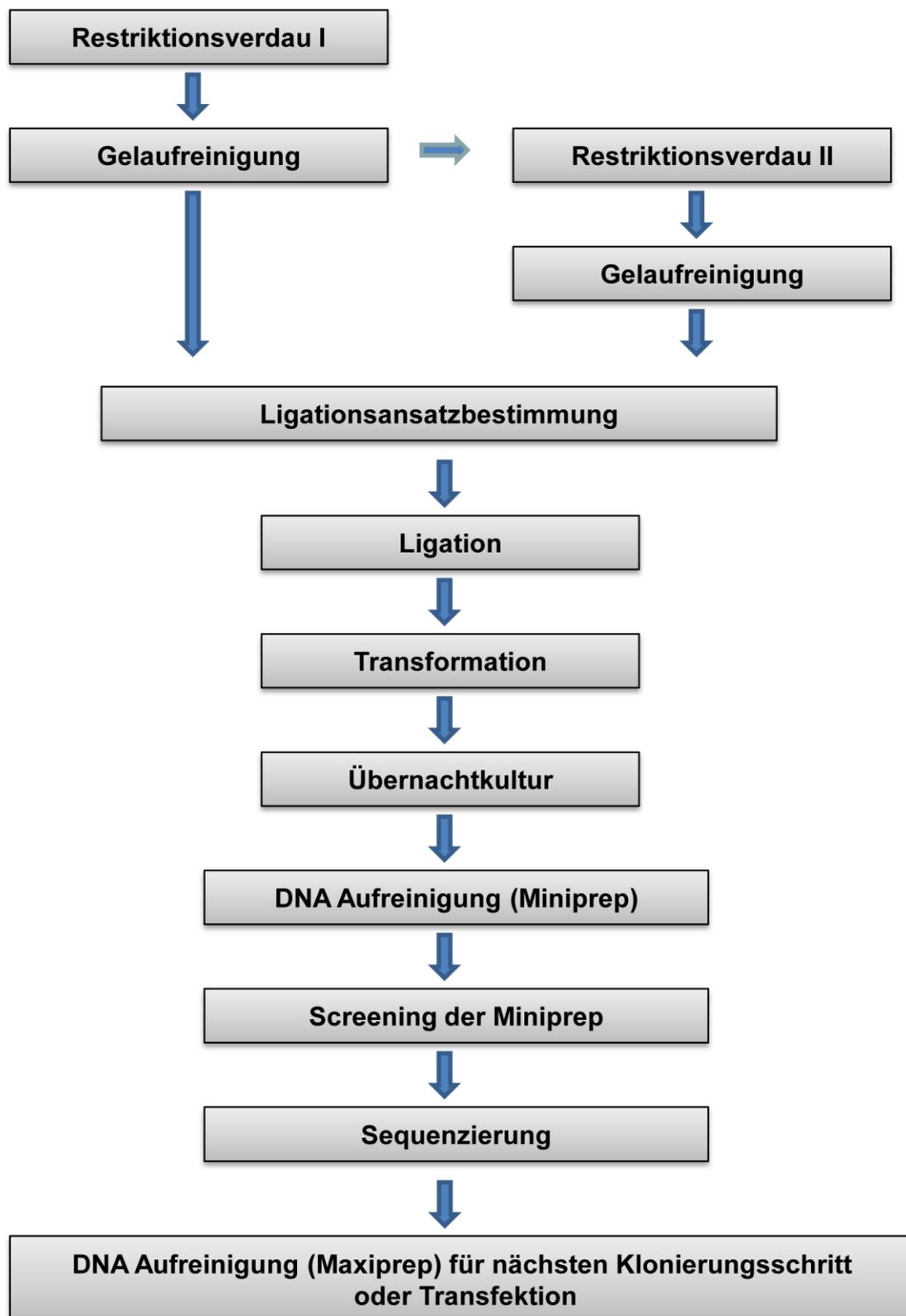


Abb. 12: Ablauf einer Klonierung.

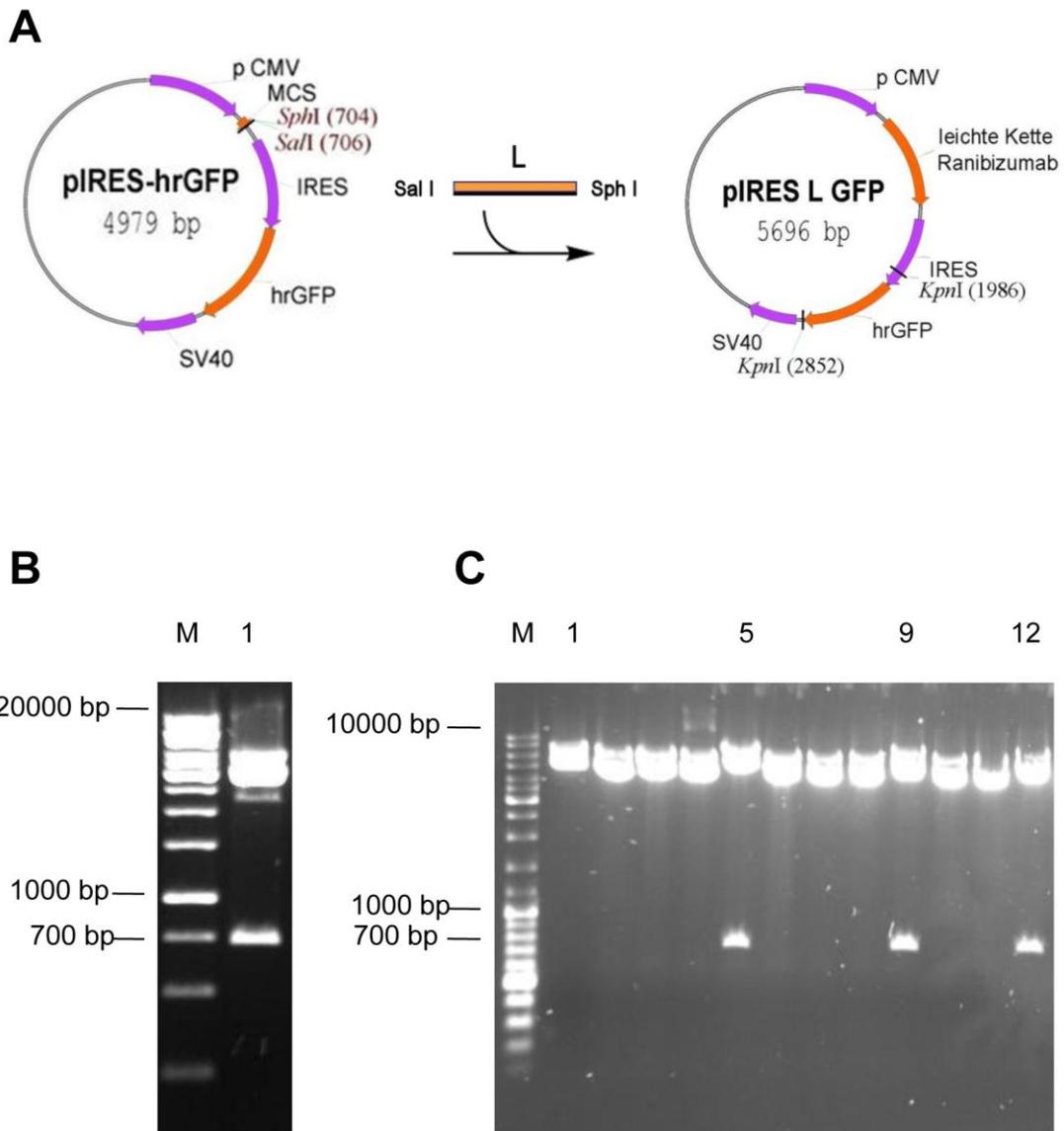
## 4.3 Klonierung in pIRES-hrGFP1a

### 4.3.1 Klonierung der leichten Kette

Die Klonierung in pIRES-hrGFP erfolgte in 2 Schritten.

Zunächst wurde die leichte Kette (L) mit den Schnittstellen SphI (G`CATG`C) und Sall (G`TCGA\_C) aus dem pbluescript Vektor herausgeschnitten und in den pIRES Vektor zwischen CMV Promoter und die internal ribosomal entry site (IRES) kloniert (Abb. 13A). Die IRES erlaubte nach erfolgter Translation des ersten Gens das erneute Anlagern der mRNA an die Ribosomen und somit auch die Translation des zweiten Gens. Die Richtigkeit der Klonierung wurde mittels Restriktionsenzymverdau überprüft. Die Größe des Insert nach Kontrollverdau mit Sall und SphI beträgt 719 bp, was der Größe der leichten Kette entspricht (Abb. 13B).

Anschließend wurden 24 Klone gepickt und die Plasmid-DNA im Minimaßstab isoliert und gescreent. Es wurden sich für Klone mit der Nummer 5, 9 und 12 entschieden (Abb. 13C) und die DNA Sequenz des Plasmids im Bereich der Klonierung durch Sequenzierung überprüft (Seqlab, Göttingen).



**Abb. 13: Klonierung der leichten Kette.**

(A) In das Ausgangsplasmid pIRES-hrGFP1a wurde zuerst die leichte Kette des F(ab) Fragmentes kloniert. L: leichte Kette, CMV: Cytomegalievirus Promoter; IRES: internal ribosomal entry site; hrGFP: humanized recombinant green fluorescent protein; SV40pA: Polyadenylierungssignal SV40; MCS: multiple cloning site, Schnittstellen: SphI und SalI.

(B) Gelelektrophorese Restriktion pIRES-L mit SphI und SalI geschnitten; M: Marker Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas).

(C) Screening von pIRES-L geschnitten mit SalI und SphI; M: Marker Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

### 4.3.2 Klonierung der schweren Kette

Dieselbe Klonierung wurde auch mit der schweren Kette durchgeführt. Hierbei wurde die schwere Kette (H) mit der Schnittstelle SphI (G\_CATG`C) und Sall (G`TCGA\_C) aus dem pbluescript Vektor herausgeschnitten und zwischen CMV Promoter und IRES in den pIRES Vektor kloniert (Abb. 14A). Die Klonierung wurde ebenfalls mit demselben Restriktionsenzymverdau überprüft, wobei die Größe des Insert 719 bp beträgt und somit der schweren Kette entspricht (Abb. 14B)

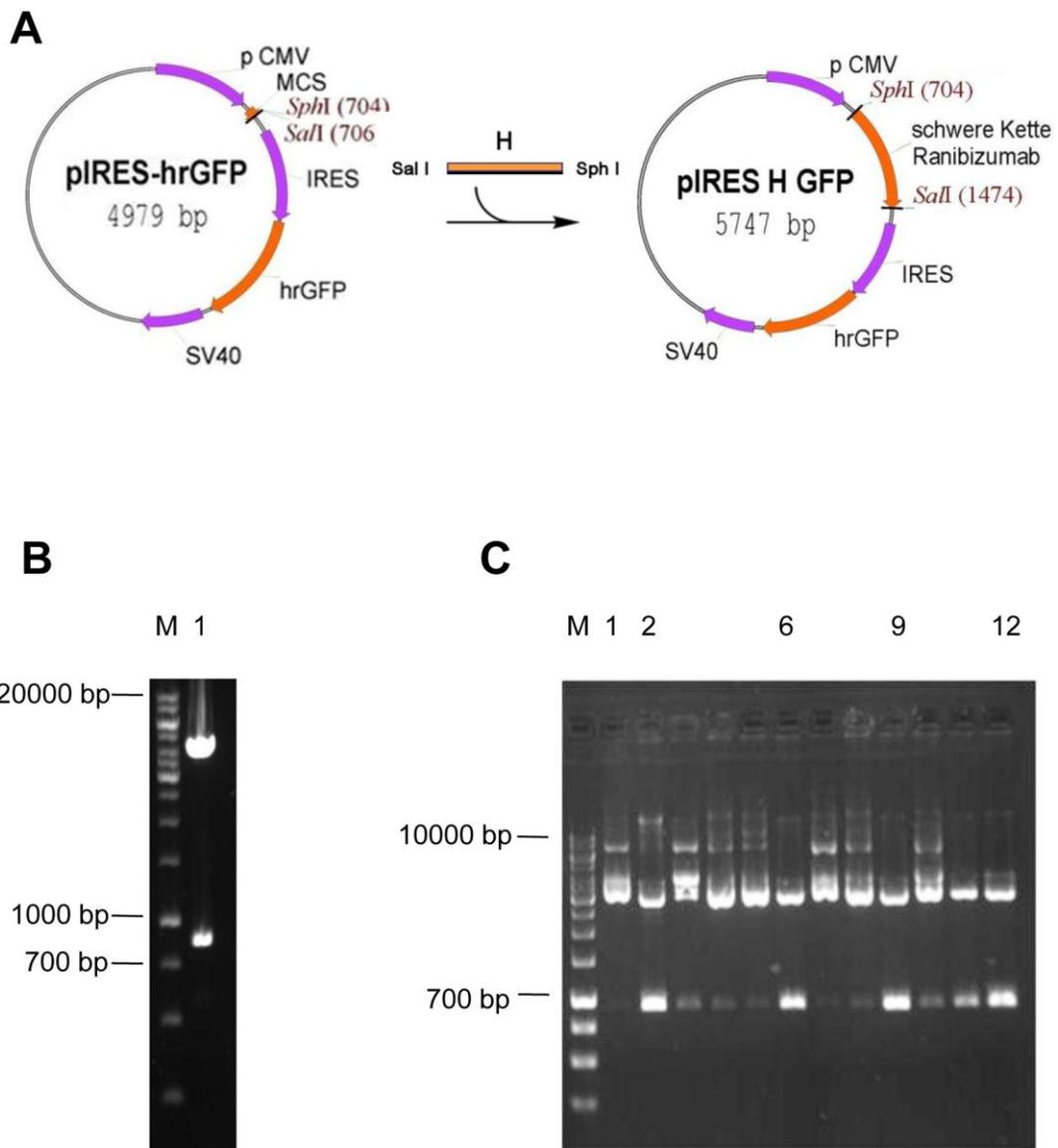
Anschließend wurden 12 Klone gepickt und die Plasmid-DNA im Minimaßstab isoliert und gescreent (Abb. 14C). Es wurde sich für die Klone 2,6,9 und 12 entschieden und anschließend durch Sequenzierung überprüft.

Mit beiden Plasmiden kann die Expression und Sekretion der jeweiligen Kette einzeln und als Kotransfektion überprüft werden.

### 4.3.3 Klonierung der schweren Kette in den pIRES-L Vektor

Im zweiten Schritt wurde aus dem pIRES-L Vektor das GFP-Gen mit zwei KpnI (G\_GTAC`C) Schnittstellen entfernt und die schwere Kette (H) an dessen Stelle mit KpnI eingefügt. Die leichte und die schwere Kette wurden jeweils vor und hinter der IRES platziert, wodurch eine zeitgleiche Expression beider Peptide gewährleistet wurde. Kontrolliert wurde die Expression der Gene durch den eukaryontisch aktiven CMV Promoter und durch das SV40 Polyadenylierungssignal (Abb. 15A). Die Klonierung wurde mit einem Restriktionsverdau überprüft. Hierbei betrug die Größe der beiden Fragmente zusammen 920 bp (Abb. 15B).

Es wurden 23 Klone gepickt und die Plasmid-DNA nach Herstellerprotokoll im Minimaßstab isoliert und gescreent (Abb. 15C). Hierbei wurde sich für die Klone 2 und 12 entschieden. Die Klone wurden ebenfalls durch Sequenzierung überprüft.

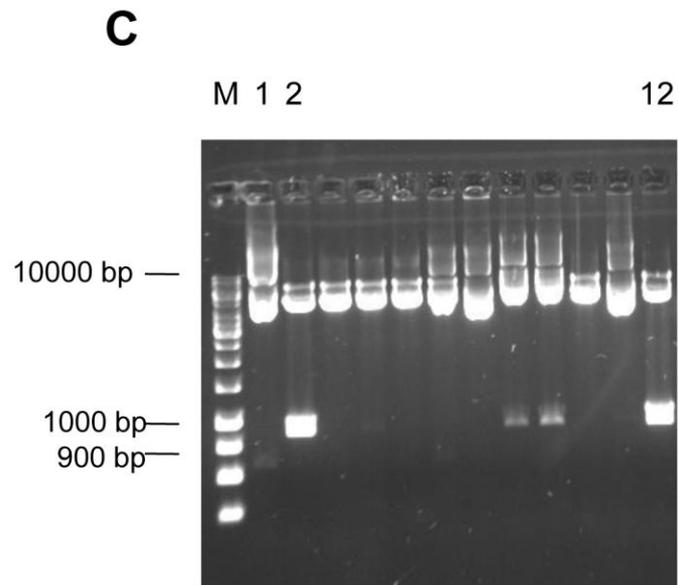
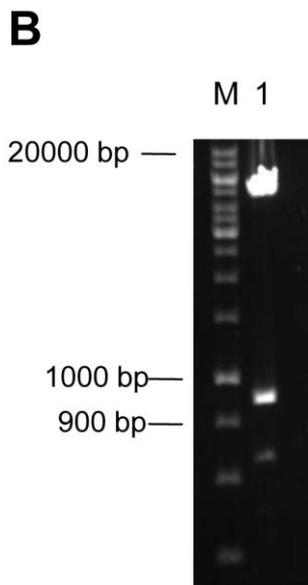
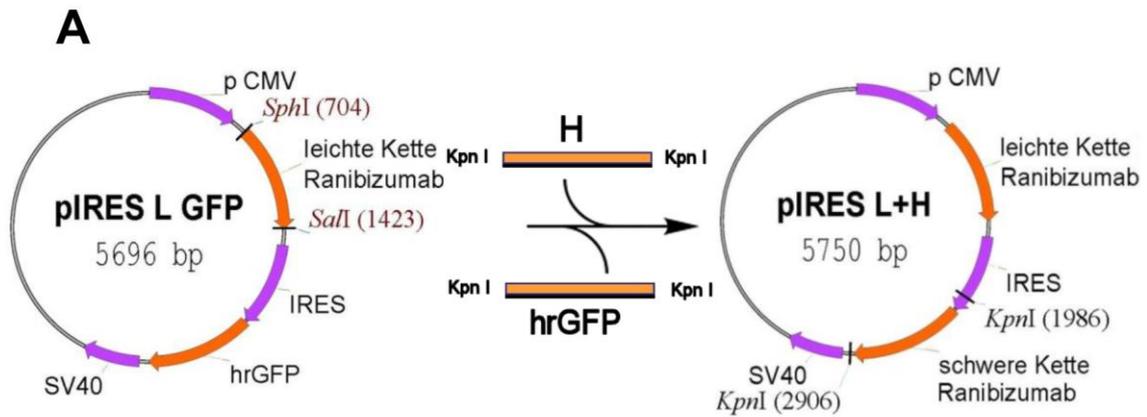


**Abb. 14: Klonierung der schweren Kette.**

(A) In das Ausgangsplasmid pIRES-hrGFP1a wurde die schwere Kette des F(ab) Fragmentes kloniert. H: schwere Kette, CMV: Cytomegalievirus Promoter; IRES: internal ribosomal entry site; hrGFP: humanized recombinant green fluorescent protein; SV40pA: Polyadenylierungssignal SV40, MCS: multiple cloning site, Schnittstellen: SphI und SalI.

(B) Gelelektrophorese, Restriktion pbluescript-H mit SphI und Sali geschnitten; M: Marker Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas)

(C) Screening von pIRES-H geschnitten mit SalI und SphI; M: Marker Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).



**Abb. 15: Klonierung zweiter Schritt.**

(A) Der hrGFP-Teil wird herausgeschnitten und die schwere Kette des F(ab)-Fragments an der Stelle eingefügt. H: schwere Kette, CMV: Cytomegalievirus Promoter; IRES: internal ribosomal entry site; hrGFP: humanized recombinant green fluorescent protein; SV40pA: Polyadenylierungssignal SV40, Schnittstelle: KpnI.

(B) Gelelektrophorese pIRES-L mit KpnI geschnitten; M: Marker Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

(C) Screening des pIRES-L+H mit KpnI geschnitten; M: Marker Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

#### 4.4 Validierung der Positivkontrolle (Lucentis®) sowie des anti-IgG Antikörpers zur Detektion des rekombinanten Moleküls

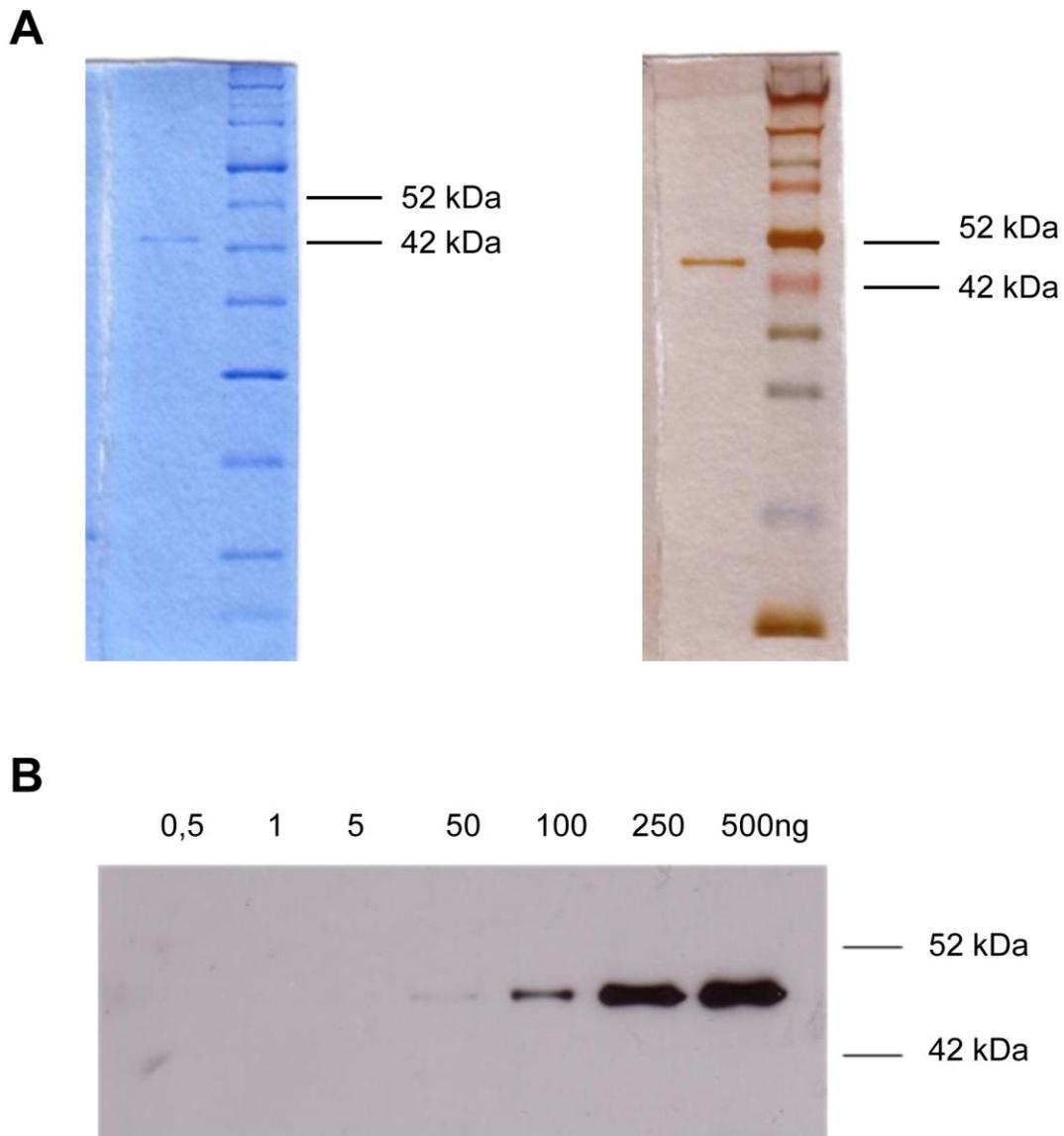
Um die Expression des rekombinanten Moleküls *in vitro* zu charakterisieren zu können, wurde das kommerziell erhältliche Ranibizumab (Lucentis®) als Positivkontrolle etabliert. Mittels größenabhängiger Migration auf einem SDS-PAGE wurde überprüft, ob Ranibizumab als Bande sichtbar wird. Dazu wurden 100 ng Protein auf zwei SDS-PAGE Gelen unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, wodurch das komplette F(ab)-Fragment als Heterodimer nachgewiesen werden kann.

Die Färbung der beiden Gele erfolgte entweder mittels Silber-Nitrat oder Coomassie-Blau. Hierbei wurde eine Bande bei ca. 45 kDa sichtbar, was der Größe von Ranibizumab als Heterodimer entspricht (Abb. 16A).

Um in den nachfolgenden Expressionsstudien die produzierten und ausgeschleusten Peptidketten im Kulturmedium detektieren zu können, wurde ein Antikörper gegen humane Immunglobuline (H+L) getestet (siehe 2.10.2.). Mit diesem Experiment sollte auch die Nachweisgrenze für die Detektion von Ranibizumab bestimmt werden. Hierfür wurde Ranibizumab in aufsteigender Konzentration zwischen 0,5 bis 500 ng Protein auf einem SDS-PAGE Gel und nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend mit dem Antikörper inkubiert.

Ab einer Konzentration von 50 ng aufgetragenem Protein konnte man im Western Blot eine Bande bei etwa 45 kDa erkennen, die mit steigender Proteinkonzentration an Intensität zunahm. Diese Bande wurde aufgrund der korrekten Größe und dem Konzentrationsgefälle als Ranibizumab identifiziert (Abb. 16B). Somit liegt die Nachweisgrenze bei etwa 50 ng Protein.

In allen weiteren Experimenten wurde Ranibizumab als Kontrolle mit einer Konzentration von 100 ng verwendet.



**Abb. 16: Überprüfung der Darstellbarkeit des Ranibizumabs.**

(A) SDS-PAGE Gel Nachweis: links SDS-Gel in Coomassie-Blau Färbung nicht reduziert, rechts SDS-Gel in Silber-Nitrat Färbung nicht reduziert, Marker: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas).

(B) Western Blot: Detektion durch den humanen anti IgG (H+L) Antikörper unter nicht reduzierten Bedingungen.

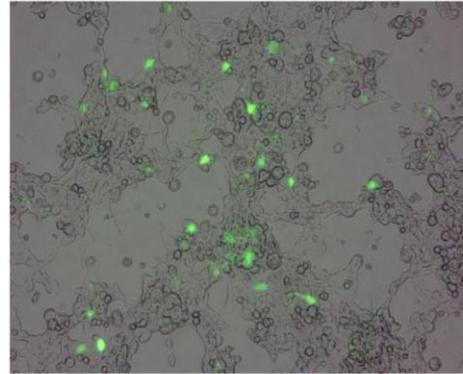
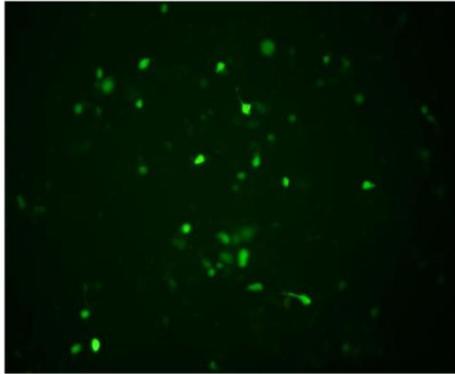
## 4.5 Transfektionseffizienz in eukaryonten Zellen

Die korrekte Expression der einzelnen Ketten von RA-01 und deren effiziente Sekretion aus der Zelle sollte *in vitro* in drei verschiedenen Zelllinien getestet werden. Zum einen wurde die HEK 293-Zelllinie genutzt, bei der es sich um eine humane embryonale Nierenzelllinie handelt, die standardmäßig in vielen Laboren verwendet wird, da sie gut kultivierbar ist. Als zweites wurde die HeLa-Zelllinie verwendet, bei der es sich um humane Cervix-Karzinomzellen handelt, die 1951 zum ersten Mal aus der amerikanischen Patientin Henrietta Lacks isoliert wurden. HEK 293-Zellen und HeLa-Zellen eignen sich aufgrund ihrer guten Transfizierbarkeit hervorragend für *in vitro* Studien. Zusätzlich zu diesen Standardzelllinien wurde die arpe19-Zelllinie verwendet. Arpe19-Zellen sind spontan transformierte humane Pigmentepithelzellen der Retina. Sie haben besondere physiologische Eigenschaften und wurden eingesetzt um die Expression von RA-01 auch in retinalen Zellen zu überprüfen.

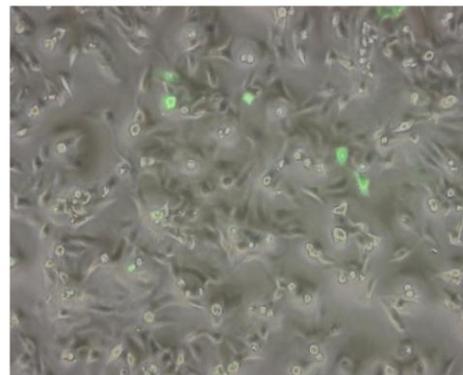
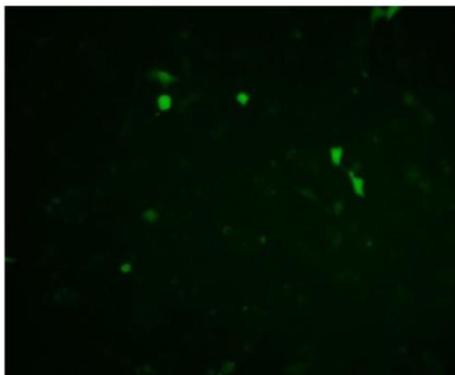
Da das pIRES Plasmid zusätzlich zu den jeweiligen Ketten auch die cDNA für das grün fluoreszierende Protein (GFP) enthält, leuchten erfolgreich transfizierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün und man kann somit die Effizienz der Transfektion überprüfen.

Es wurde standardmäßig 4 µg DNA eingesetzt und in 50-70% konfluenten Zellen in 6-Well Platten transfiziert. Nach 24-48 Stunden wurde die Transfektionseffizienz mithilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskopes (Keyence BL8100) dargestellt (Abb. 17A-C). Hierbei zeigte sich, dass die Effizienz in HEK 293- und arpe19-Zellen etwa gleich gut bei 10-20% transfizierten Zellen lag, während HeLa-Zellen weniger gut zu transfizieren sind. Die Effizienz wurde jedoch für alle drei Zelllinien als ausreichend betrachtet, um die Expression der einzelnen Ketten beziehungsweise beider Ketten gleichzeitig nachzuweisen.

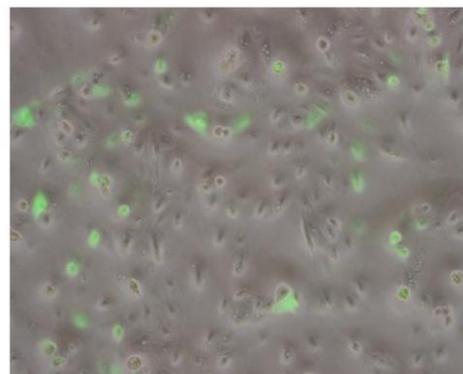
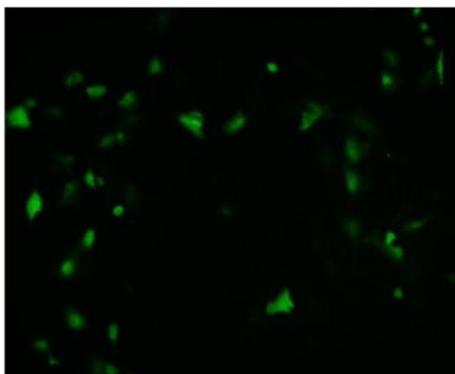
**A**



**B**



**C**



**Abb. 17: In vitro Expression von RA-01 in HEK 293-Zellen (A), in HeLa-Zellen (B) und in arpe19-Zellen (C).**

Transfizierte Zellen sind links als Fluoreszenzmikroskopaufnahme mit 488n Filter, rechts in Phasenkontrast Darstellung zu sehen (Vergrößerung 20fach).

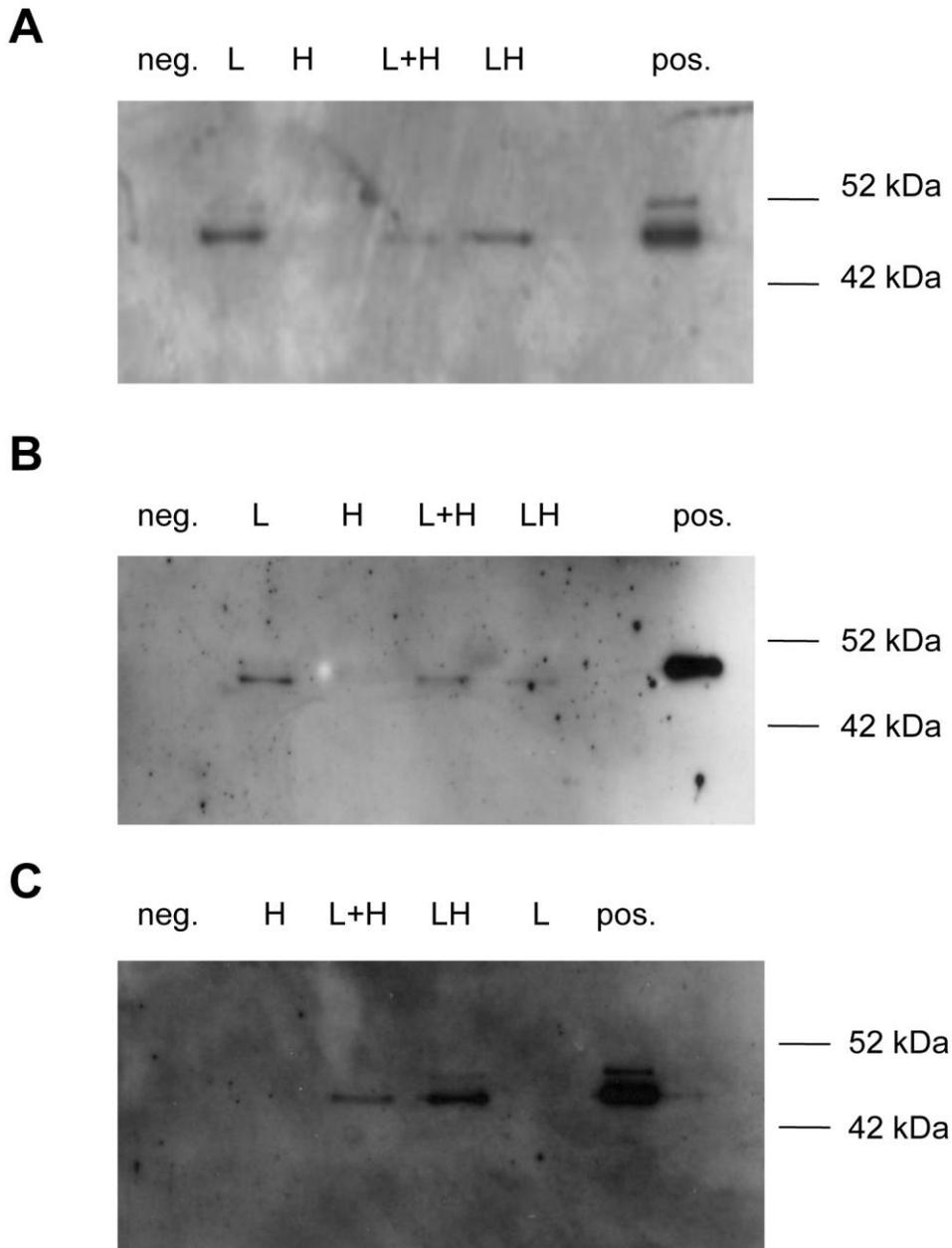
## 4.6 In vitro Expression von RA-01

Für die Expressionsstudien wurden jeweils HEK 293-, HeLa- und arpe19-Zellen mit 4 µg DNA transfiziert und nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgenommen und 20 µl wurden auf einem SDS-PAGE Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Durch Testen des Kulturmediums kann nicht nur die Expression sondern auch die korrekte Ausschleusung des RA-01 überprüft werden.

Die Proteine wurden geblottet und anschließend mit dem anti-human IgG (H+L) Antikörper inkubiert.

Zur Darstellung kamen Banden bei ca. 45 kDa (Abb. 18). Sie haben somit die gleiche Größe wie die Positivkontrolle. Das heterodimere F(ab) Fragment (LH) wurde deutlich in HEK 293- (Abb. 18A) und arpe19-Zellen (Abb. 18C) nachgewiesen, bei den HeLa-Zellen (Abb. 18B) war die Intensität der Bande weniger stark. Diese Diskrepanz hängt sehr wahrscheinlich mit der Transfektionseffizienz in den entsprechenden Zelllinien zusammen.

Des Weiteren wurde eine Bande bei etwa 45 kDa im Kulturüberstand der Zellen sichtbar, die nur mit der leichten Kette transfiziert wurden, während bei den Zellen, die mit der schweren Kette transfiziert wurden, keine Bande sichtbar war. Diese unerwartete Beobachtung wirft die Frage auf, ob die leichten Ketten allein ein Monodimer bilden können, welches bei dieser Größe zu sehen ist. Des Weiteren ist unklar, ob die schwere Kette nicht detektiert werden kann, da auch sie Monomere bilden könnte, die bei dieser Größe zu sehen sein müssten.



**Abb. 18: In vitro Expression von RA-01 in HEK 293-Zellen (A), in HeLa-Zellen (B) und in arpe19-Zellen (C).**

pos: positiv Kontrolle Ranibizumab (100ng); LH: pIRES-anti-VEGF mit leichter und schwerer Kette; L+H: Kotransfektion pIRES-anti-VEGF mit leichter Kette + pIRES-anti-VEGF mit schwerer Kette; H: pIRES-anti-VEGF mit schwerer Kette; L: pIRES-anti-VEGF mit leichter Kette, neg.: negativ Kontrolle.

#### 4.7 Darstellung von Ranibizumab unter reduzierten Bedingungen

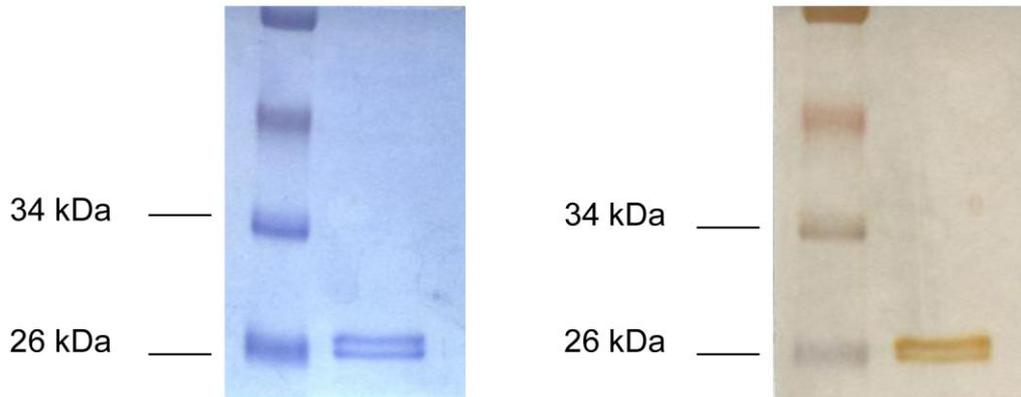
Da unter nicht-reduzierenden Bedingungen nur die Bande des theoretischen Heterodimers oder eines Homodimers aus leichten Ketten sichtbar ist und nicht unterschieden werden kann, und da die schwere Kette unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar war, ist die korrekte Expression beider Ketten und die Formation eines Heterodimers nicht hundertprozentig dargestellt. Daher wurden die Western Blot Analysen unter reduzierenden Bedingungen wiederholt, da unter diesen Bedingungen beide Ketten einzeln vorliegen.

Zunächst wurde die Detektierbarkeit beider Ketten für das Kontrollprotein (Ranibizumab) überprüft. Dies geschah unter reduzierenden Bedingungen durch Zugabe von beta-Mercaptoethanol. Dieser Stoff führt zur Spaltung von Disulfidbrücken, wodurch die schwere und die leichte Kette einzeln vorliegen.

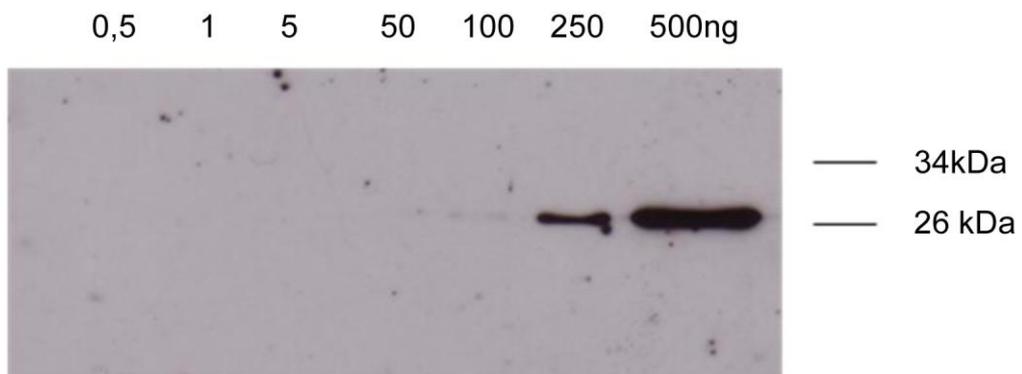
In der Proteinfärbung mittels Silber-Nitrat bzw. Coomassie-Blau lagen jetzt die Ketten als Monomer vor, da zwei Banden zwischen 20- und 30 kDa sichtbar wurden (Abb. 19A).

Bei der Detektion der beiden Peptidketten mit dem Antikörper gegen humanes IgG (H+L) zeigte sich jedoch weiterhin nur eine Bande. Diese spezifische Bande wurde bei ca. 28 kDa ab einer Konzentration von 100 ng sichtbar (Abb. 19B). Da Ranibizumab aber als Heterodimer garantiert aus zwei verschiedenen Polypeptidketten besteht, nämlich der schweren und der leichten Kette, wurde durch diesen Test nachgewiesen, dass der Antikörper gegen humanes Immunglobulin die schwere Kette nicht detektiert.

**A**



**B**



**Abb. 19: Darstellung von Ranibizumab unter reduzierten Bedingungen.**

(A) mittels SDS-PAGE Gel, links SDS-Gel in Coomassie-Blau Färbung reduziert, rechts SDS-Gel in Silber-Nitrat Färbung reduziert.

(B) mittels Western Blot, Detektion durch den humanen anti IgG (H+L) Antikörper unter reduzierten Bedingungen.

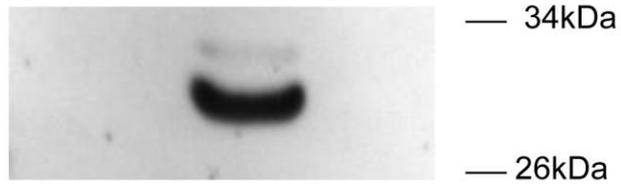
#### 4.8 Mischung der beiden Antikörper anti humanes/murines IgG

Ursprünglich wurde Ranibizumab aus einem murinen Antikörper heraus humanisiert und optimiert. Darunter versteht man den Austausch bestimmter muriner gegen humane Sequenzen, wodurch Antikörper weniger immunogen sind und das Risiko einer Immunreaktion des humanen Antikörpers abnimmt. Diese Veränderungen betreffen vor allem die leichte Kette. Die schwere Kette bleibt hauptsächlich unverändert. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass ein Antikörper gegen murines Immunglobulin die schwere Kette detektiert.

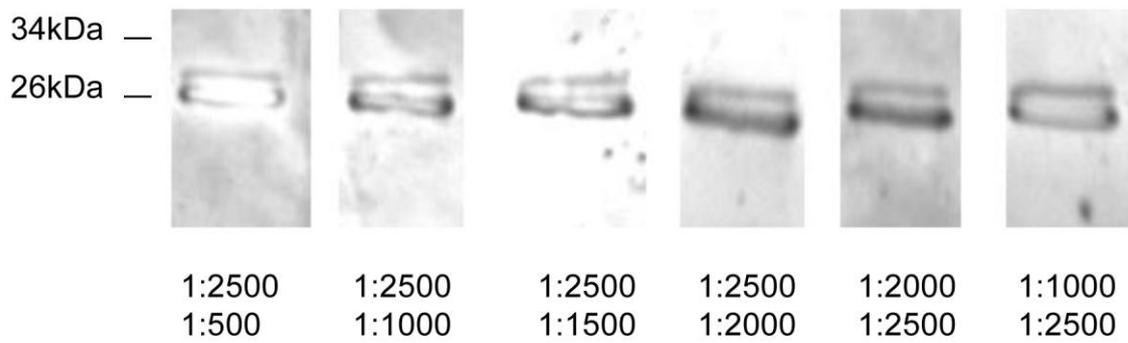
Um diese Hypothese zu überprüfen wurde Ranibizumab unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit einem anti murinen IgG Antikörper inkubiert (Abb. 20A). Eine Bande bei etwa 30 kDa konnte detektiert werden. Es war jedoch nicht ersichtlich, ob es sich um die schwere oder die leichte Kette handelt, da beide etwa die gleiche Größe haben.

Sollte es sich um die schwere Kette handeln, die in diesem Experiment nachgewiesen wurde, dann müssten durch eine Mischung beider Antikörper die beiden Ketten detektierbar sein. Hierfür wurden verschiedene Mischungsverhältnisse ausprobiert, um beiden Ketten gleich stark nachzuweisen (Abb. 20B). Das Mischungsverhältnis anti human IgG-Antikörper 1:2000 mit dem anti mouse IgG-Antikörper 1:2500 zeigte bei 26 kDa eindeutig 2 Banden. Somit konnte gezeigt werden, dass bei einer Kombination von einem humanen mit einem murinen Antikörper beide Ketten detektiert werden können.

**A**



**B**



**Abb. 20: Mischung der beiden Antikörper.**

(A) Westernblot von Ranibizumab unter reduzierten Bedingungen, Inkubation erfolgte mit dem Anti mouse IgG Antikörper.

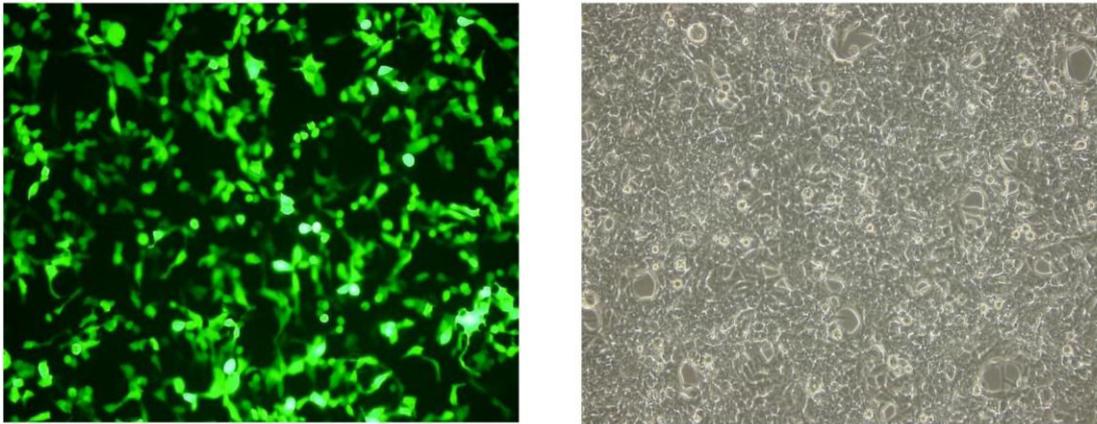
(B) Mischung des anti human IgG Antikörpers mit dem anti mouse IgG Antikörper in verschiedenen Mischungsverhältnissen unter reduzierten Bedingungen. (obere Zahl: anti human IgG AK, untere Zahl: anti mouse IgG AK).

#### **4.9 Expression von RA-01 in HEK 293-Zellen und Nachweis beider Ketten unter reduzierenden Bedingungen**

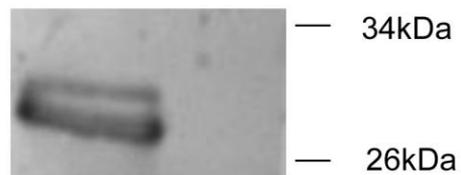
Um möglichst viel exprimiertes Protein im Kulturmedium nachweisen zu können, wurden die Transfektionsbedingungen optimiert. Da eine Effizienzsteigerung bei den HEK 293-Zellen am wahrscheinlichsten ist, wurde sich auf diese Zelllinie beschränkt. Durch eine Optimierung des Transfektionsprotokolls wurde eine Steigerung der Effizienz auf über 80% der Zellen erreicht (Abb. 21A).

Das in diesen Transfektionen gewonnene Kulturmedium wurde unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit der zuvor optimierten Antikörpermischung inkubiert. Dabei wurden beide Banden bei etwa 28 und 30 kDa im Western Blot detektiert und somit die Expression und korrekte Ausschleusung beider Ketten nachgewiesen (Abb. 21B).

**A**



**B**



**Abb. 21: Expression von RA-01 in HEK 293-Zellen unter optimierten Bedingungen.**

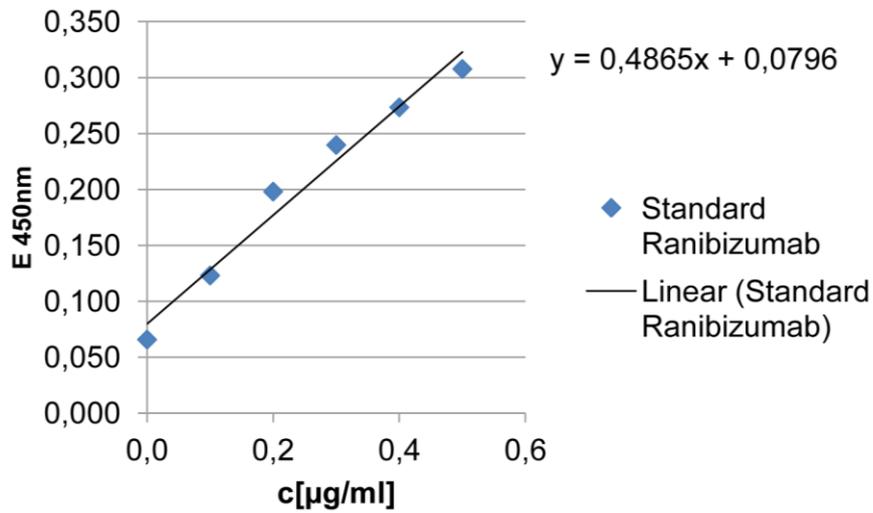
(A) HEK 293-Zellen unter optimierten Transfektionsbedingungen, links Fluoreszenzmikroskopaufnahme, rechts als Phasen Kontrast Darstellung.

(B) Westernblot des Kulturmediums unter reduzierten Bedingungen.

#### 4.10 Quantifizierung von Ranibizumab und RA-01 mittels ELISA

Um die eingesetzte Konzentration von RA-01 zu bestimmen wurde ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Hierbei wurde zunächst VEGF an eine feste Phase (96-Well-Platte) gebunden. Die zu untersuchenden Probe RA-01, sowie eine negativ Kontrolle und Ranibizumab in verschiedenen Konzentrationen als Standard wurden hinzugegeben und banden an VEGF. Anschließend wurde ein zweiter spezifischer Antikörper (anti human IgG Antikörper) hinzugegeben, um sich wiederum an Ranibizumab bzw. RA-01 zu binden. Die spezifischen Antikörper wurden zuvor mit einer horse raddish peroxidase (HRP) enzymmarkiert. Durch eine Spaltung des Produkts und anschließender Beendigung der Reaktion erfolgte ein Farbumschlag nach Gelb. Die Intensität der Gelbfärbung wurde mit Hilfe eines ELISA-Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Extinktion). Das Ranibizumab (Lucentis®) wurde mit den Konzentrationen von 0,0 - 0,5 µg/ml eingesetzt. Aus den parallel gemessenen Standardreihen (Abb. 22B) wurde eine Standardkurve mit Excel angefertigt (Abb. 22A). Anhand der Geradengleichung ( $y=ax+b$ ), mit einer Steigung von 0,4865 und ein Y-Achsenabschnitt von 0,0796, konnte durch einsetzen der ermittelten Extinktionswerte die Konzentration für RA-01 berechnet werden (Abb. 22C). Die Konzentration von RA-01 betrug 0,387 µg/ml.

**A**



**B**

Standard	Messungen E[450nm]			
c(Ranibizumab) in µg/ml	1	2	3	Ø
0,0	0,066	0,066	0,065	0,066
0,1	0,125	0,120	0,124	0,123
0,2	0,204	0,189	0,201	0,198
0,3	0,244	0,236	0,239	0,240
0,4	0,284	0,262	0,274	0,273
0,5	0,319	0,303	0,301	0,308

**C**

Probe	Messungen			Ø	Ø-0,066	STAB	c(RA-01) µg/ml	Abweichung µg/ml
	1	2	3					
RA-01	0,343	0,340	0,304	0,329	0,263	0,022	0,378	0,024

**Abb. 22: Quantifizierung von RA-01 mittels ELISA.**

(A) Standardgeradengleichung für die Konzentration von Ranibizumab. (c:Konzentration; E:Extinktion)

(B) Messergebnisse der Extinktion bei 450 nm für die Lucentis® Konzentration von 0,0 bis 0,5 µg/ml.

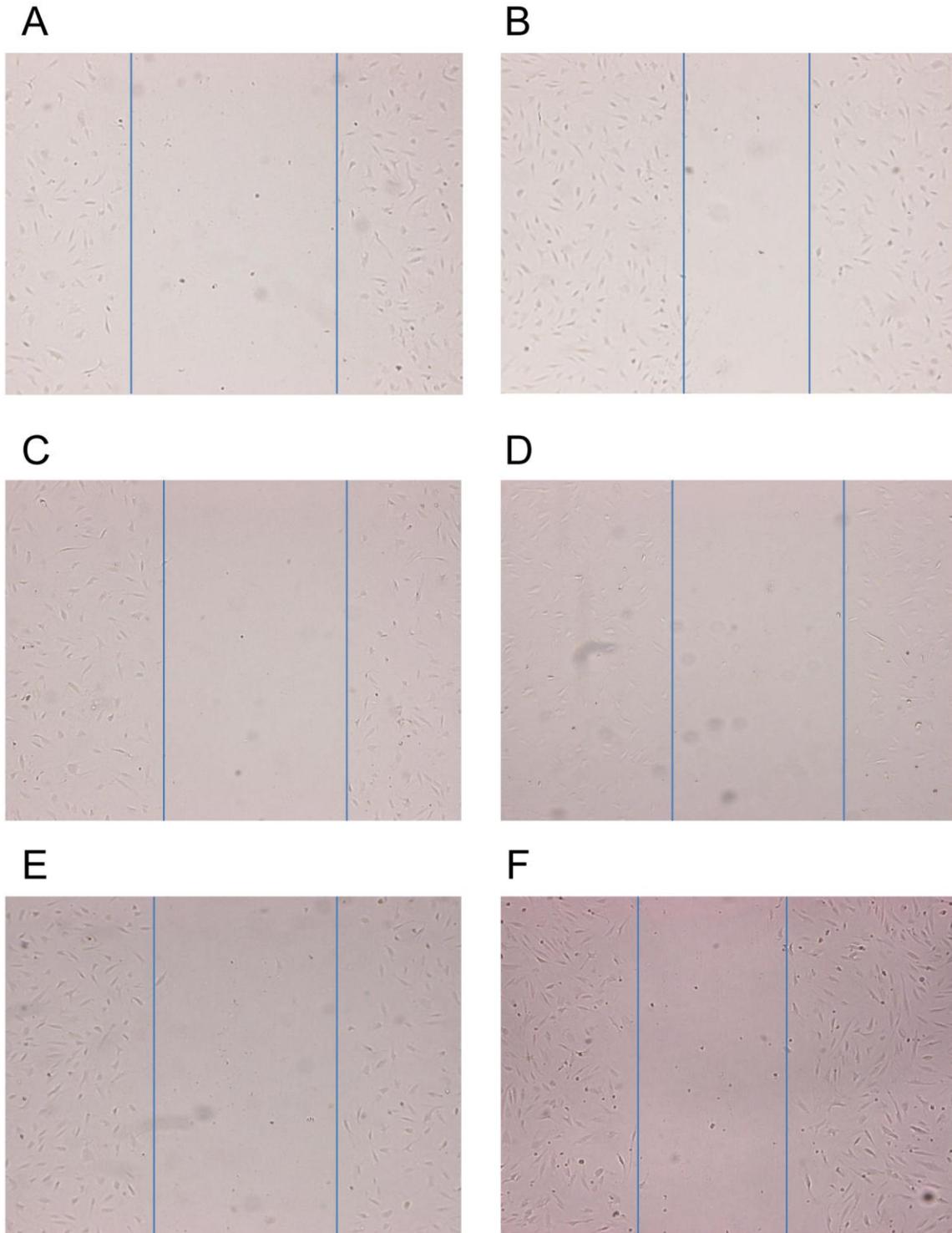
(C) Messergebnisse der Extinktion für RA-01 und daraus errechnete Konzentration für RA-01 in µg/ml. (STAB: Standardabweichung)

## 4.11 Biologische Aktivitätsmessung

Die biologische Aktivität von RA-01 wurde mittels HUVEC-Planar Migrations Assay überprüft. In diesem Assay wird der Einfluss von VEGF auf Migration von HUVEC Zellen gemessen. In einem 96-Well werden HUVEC Zellen bis zur 100%igen Konfluenz wachsen gelassen. Anschließend wird mit einem Spatel ein Spalt „Scratch“ mit definierter Größe angelegt, in dem sich keine Zellen befinden. Unter VEGF Einfluss wachsen die randständigen Zellen erneut in diesen Spalt ein und verkürzen die Distanz zur gegenüberliegenden Seite (Abb. 23). Durch Zugabe verschiedener anti-VEGF Moleküle kann die Abnahme dieser Distanzverkürzung als Maß für die Hemmung der VEGF Aktivität angesehen werden (Methodenbeschreibung Kapitel 3.8). Die Frage in diesem Experiment war nicht nur, ob RA-01 biologisch aktiv ist, sondern auch, in welchem Maße es die VEGF Aktivität gegenüber Ranibizumab (Lucentis®) hemmt.

Die Auswertung des Assays erfolgte 24-48 h nach der Inhibierung durch Ranibizumab bzw. RA-01. Ranibizumab wurde mit 100, 250 und 500ng eingesetzt, während RA-01 mit einer Menge von 37,8 ng eingesetzt wurde (100µl mit einer Konzentration von 378ng/µl). Es konnten dosisabhängig deutliche Unterschiede in der Hemmung der VEGF Aktivität durch Ranibizumab beobachtet werden (Abb. 23). Je mehr Lucentis® eingesetzt wurde, desto weniger Zellmigration fand statt. Die Zugabe von RA-01 zeigte ebenfalls eine deutliche Hemmung der VEGF Aktivität (Abb. 23). Diese lag bei 50% und somit ungefähr bei der Hemmungsaktivität von 100ng Ranibizumab. Eventuelle zusätzliche hemmende Einflüsse im Überstand der RA-01 Expressionskultur konnten dadurch ausgeschlossen werden, dass identischer Überstand als Verdünnung auch für Ranibizumab und die Negativkontrolle eingesetzt wurde. RA-01 wurde jedoch nur mit einer Konzentration von 37,8ng (378ng/ml) eingesetzt. Da Ranibizumab und RA-01 die gleichen molekularen Strukturen aufweisen, kann von einem gleichen Molaren Verhältnis ausgegangen werden, wodurch eine 3 x stärkere Hemmung durch RA-01 errechnet werden kann.

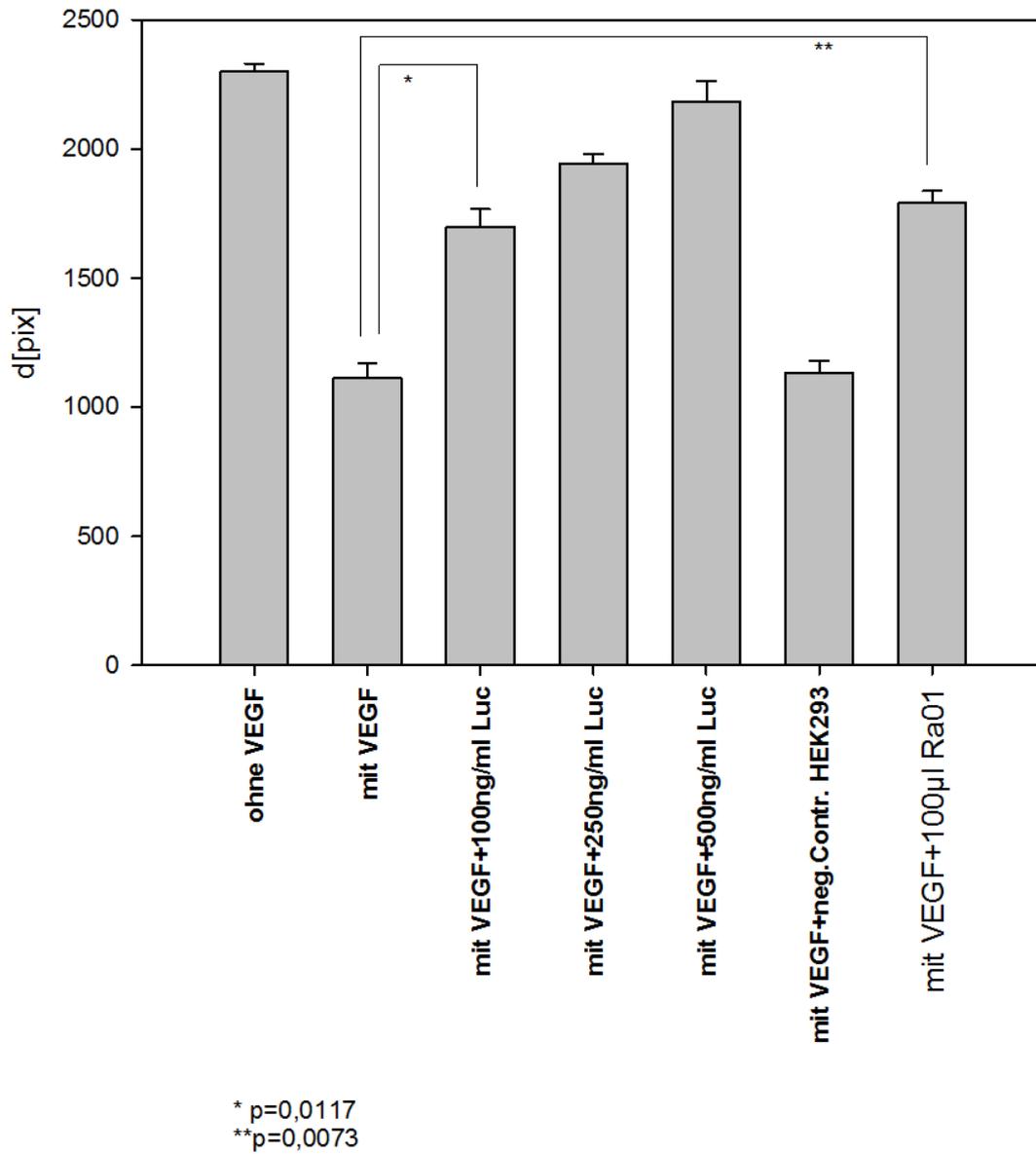
Durch diese Experimente konnte nachgewiesen werden, dass das rekombinant exprimierte RA-01 in HEK293 Zellen hergestellt und in das Kulturmedium abgegeben wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass RA-01 biologisch aktiv ist und die VEGF abhängige Migration von HUVEC Zellen effizient hemmt.



**Abb. 23: Biologische Aktivität von RA-01 dargestellt in einem HUVEC Planar Migration Assay.** In HUVEC Zellen wurde bei hundertprozentiger Konfluenz mit einem Spatel ein „Scratch“ erzeugt, der anschließend von den HUVEC Zellen VEGF abhängig durch Migration wieder geschlossen wird. Schwarze Linien zeigen die Grenzen des „Scratches“.

(A) Assay ohne VEGF (Negativkontrolle). (B) Assay mit VEGF (Positivkontrolle). (C) Assay mit VEGF und 100ng Ranibizumab. (D) Assay mit VEGF und 250ng Ranibizumab. (E) Assay mit VEGF und 500ng Ranibizumab. (F) Assay mit VEGF und 37,8 ng RA-01.

## HUVEC Planar Migration Assay



**Abb. 24: HUVEC Planar Migration Assay.** Quantitative Darstellung der "Scratch"-Breite (d) aus Abb. 23 in Pixeln. Experimente wurden in Triplets durchgeführt.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein rekombinantes anti-VEGF F(ab) Fragment hergestellt, das auf dem handelsüblichen Ranibizumab (Lucentis®) basiert. Dieses Molekül wurde im Zellkulturüberstand detektiert, wodurch die effiziente Ausschleusung aus eukaryonten Zellen nachgewiesen wurde. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass das Molekül biologisch aktiv ist und die VEGF abhängige Migration von HUVEC Zellen in vitro hemmen. Dieses anti-VEGF Molekül soll nun in weiteren Studien reguliert exprimiert werden und in vivo in einem Mausmodell für neovaskulären Erkrankungen der Retina exprimiert werden. Fernziel dieses Projektes ist der Einsatz des Moleküls in neovaskulären Erkrankungen der Netzhaut beim Menschen wie altersabhängige Makuladegeneration oder diabetische Retinopathie.

Die altersabhängige Makuladegeneration ist inzwischen die häufigste Ursache für einen Verlust der zentralen Sehschärfe in den westlichen Industrienationen (Holz *et al.*, 2004a). Über 30 Millionen Menschen sind weltweit betroffen, alleine in Deutschland leiden nach Schätzungen der *AMD Alliance International* ca. 4,5 Millionen Menschen an einer AMD. Auch andere altersabhängige neovaskuläre Erkrankungen wie die diabetische Retinopathie nehmen rapide zu (Frank, 2004). Gemeinsam haben diese Augenerkrankungen, dass sie durch ein massiv stimuliertes Wachstum von neuen Blutgefäßen in der Retina ausgelöst werden. Da die Blutgefäße oft nicht korrekt ausgebildet sind und ohne Rücksicht auf retinale Strukturen wachsen, kommt es gerade im Bereich der Makula zu Einschränkungen der Sehkraft bis hin zur Erblindung. Auf molekularer Ebene ist die treibende Kraft der Neovaskularisationen das VEGF. Durch die Hemmung dieses Faktors durch das in dieser Dissertation generierte anti-VEGF Molekül könnten diese Volkskrankheiten dauerhaft behandelt werden.

### 5.1 Rationale für eine kontinuierliche Expression im Auge

Momentan werden die aktuell angewandten anti-VEGF Moleküle aufgrund der kurzen Halbwertszeit von wenigen Tagen regelmäßig monatlich appliziert. Dies beinhaltet einige entscheidende Nachteile. Ein wichtiger Nachteil ist der invasive Charakter der intravitrealen Injektion, der mit einer Reihe von Nebenwirkungen (z.B. Uveitis, Endophthalmitis, Ablatio retinae) einhergehen kann (Jager *et al.*, 2004). Zusätzlich gehen die Kosten für die intraokuläre Behandlung über die Leistung der gesetzlichen Krankenkassen hinaus und müssen somit vom Patienten teilweise selber getragen werden. Dies stellt somit eine finanzielle Belastung nicht nur für den Patienten, sondern auch für das Gesundheitssystem dar. Bei monatlichen Injektionen und einem ständig

steigenden mittleren Lebensalter werden zukünftig enorme Belastungen auf Patienten und Gesundheitssystem zukommen.

Um eine kontinuierliche Expression des anti-VEGF Moleküls zu erreichen, würde eine einmalige Injektion des Transfervektors ins Auge genügen (siehe weiter unten). Die Risiken mehrmaliger Injektionen fielen weg. Zusätzlich würden die Kosten für das Gesundheitssystem sinken.

Ein Gentransfer in retinale Zellen kann das Risiko beinhalten, dass die transduzierten Zellen nicht mehr hundertprozentig am Sehvorgang teilnehmen. Da das Molekül in der Retina frei diffundiert, reicht eine Expression der Proteine in einem relativ kleinen Teil der retinalen Peripherie aus, um die therapeutische Konzentration zu erhalten. Dadurch wäre das Risiko eines zentralen Sehverlustes aufgrund der Behandlung minimiert.

## 5.2 Eigenschaften von RA-01

In dieser Arbeit wurde Ranibizumab als anti-VEGF Faktor für die Entwicklung der alternativen Expressionsmethode im Auge aus verschiedenen Gründen herangezogen. Ranibizumab als F(ab) Fragment besteht nur aus zwei relativ kurzen Ketten und kann somit relativ einfach produziert werden. Ebenso ist es für die Ketten relativ einfach, sich zu einem Heterodimer zusammenzufinden. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit, ein solches heterodimeres Protein in neuronalen Zellen der Netzhaut zu produzieren größer, als einen kompletten Antikörper, wie zum Beispiel Bevacizumab in diesen dafür nicht spezialisierten Zellen zu generieren. Zusätzlich kann durch das Fehlen des konstanten Fc-Teils des kompletten Antikörpers keine Komplementbindung eingegangen werden und somit ist das Risiko einer Immunreaktion sehr gering.

Da beide Ketten einzeln in den Zellen hergestellt werden, besteht auch die Möglichkeit, dass beide Ketten jeweils als Homodimere vorliegen können. Die Expression des Peptids vor dem IRES ist zudem häufig höher als die Expression des dahinter liegenden Peptids. Das Verhältnis liegt bei etwa 3:1 (Jackson *et al.*, 1990; Van, V *et al.*, 1995). Da die beiden Peptidketten nicht mit demselben Antikörper nachgewiesen werden konnten, sondern nur mit einem Mix aus einem humanen und einem murinen Antikörper, können solche quantitativen Aussagen in dieser Arbeit nicht erhoben werden (siehe 4.8.). Allerdings wurden Homodimere aus leichten Ketten beobachtet, nicht jedoch solche aus schweren Ketten (siehe 4.6.). Da diese Homodimere keine funktionellen CDR bilden können, ist eine biologische Aktivität unwahrscheinlich. Eine

Hemmung der biologischen Aktivität der gleichzeitig vorliegenden Heterodimere scheint aber ebenfalls nicht vorzuliegen (siehe 4.11).

Die anti-VEGF Moleküle, die momentan in der Vorbereitung für klinische Studien sind (siehe Punkte 1.8), basieren beide auf dem natürlich vorkommenden löslichen VEGFR-1 Rezeptor (Pechan *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2009). Da nicht eindeutig geklärt ist, warum dieser Faktor bei bestimmten pathologischen Vorgängen, wie der Eklampsie, erhöht in der Zirkulation vorhanden ist, und da es mehrere Isoformen zu geben scheint, ist der Einsatz dieses anti-VEGF Moleküls als suboptimal zu sehen (Rajakumar *et al.*, 2005; Rajakumar *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurde sich für Ranibizumab entschieden, da dieses Molekül für eine Hemmung von humanem VEGF entwickelt wurde und ein sehr gut untersuchtes Sicherheitsprofil aufweist (Ferrara *et al.*, 2006). Eine Produktion dieses Moleküls in retinalen Zellen dürfte daher keine Nebenwirkungen haben, die über die für das rekombinante Protein bekannten hinausgehen würden.

### 5.3 Vergleich zwischen Ranibizumab und RA-01

In Experiment 4.11. konnte beobachtet werden, dass RA-01 einen hemmenden Effekt von etwa 50% auf die Migration von HUVEC Zellen in vitro ausübt, der vergleichbar ist mit dem Effekt von 100ng Ranibizumab. Diese stärkere hemmende Aktivität von RA-01 gegenüber dem Ranibizumab in diesem Experiment kann durch verschiedene Dinge hervorgerufen werden.

Die Ampulle Lucentis, aus der das für diese Experimente genutzte Ranibizumab stammt, wurde aus dem Operationstrakt der Augenklinik bezogen. In den jeweiligen Fläschchen waren nur noch geringe Mengen Flüssigkeit vorhanden, die gepoolt wurden. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass Flüssigkeitsmengen mit unterschiedlichen Restkonzentrationen Ranibizumab vermischt wurden. Da bei der Konzentrationsbestimmung für Ranibizumab auf die angegebenen Konzentrationen vertraut wurde, kann hier unter Umständen weniger Ranibizumab als eigentlich gedacht, eingesetzt worden sein. Da das Experiment aber mehrmals wiederholt wurde, um die Richtigkeit der Ergebnisse zu überprüfen, erscheint diese Verunreinigungstheorie jedoch als eher unwahrscheinlich.

Eine weitere Möglichkeit für eine gesteigerte biologische Aktivität von RA-01 gegenüber Ranibizumab ist die Tatsache, dass RA-01 in eukaryontischen Zellen exprimiert wird, wohingegen Ranibizumab in Bakterien (E.coli) hergestellt wird. Dadurch kann es bei Ranibizumab nicht zu posttranslationalen Modifikationen

kommen, die bei der Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen durchaus weitverbreitet sind. Nach einer Überprüfung der Aminosäuresequenz von RA-01 konnte festgestellt werden, dass es verschiedene Glykosylierungsstellen im F(ab) Fragment gibt. Diese Modifikationen können die Aktivität eines Proteins erhöhen (Jackson *et al.*, 1990; Jefferis, 2005; Jefferis, 2009). Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um den Einfluss dieser Modifikationen genau identifizieren zu können.

## 5.4 Ausblick

Für die Entwicklung eines Behandlungsansatzes basierend auf der Expression von anti-VEGF Molekülen in der Retina sind neben dem biologisch aktiven Molekül auch ein effizientes Transfersystem nötig sowie aus Sicherheitsgründen die Möglichkeit, die Expression des Moleküls in vivo regulieren zu können. Beides steht mittlerweile für die Anwendung in der Retina zur Verfügung, sodass die Weiterentwicklung des hier vorgestellten Ansatzes in eine zukünftige Behandlungsmethode gegeben ist.

### 5.4.1 Transfer in die Retina

Für den Transfer von Genen in die Retina wurden in den letzten Jahren verschiedene Systeme entwickelt. Dabei handelt es sich um virale Vektoren oder gekapselte Zelltransfersysteme (Bioreaktoren).

Zu den viralen Vektoren gehören die Adenoviren (Bennett *et al.*, 1996), Lentiviren (Bemelmans *et al.*, 2006) und die rekombinanten Adeno-assoziierten Virus Vektoren (rAAV) (Ali *et al.*, 1996). In letzter Zeit haben sich die AAV Vektoren als Goldstandard für den retinalen Gentransfer durchgesetzt, da sie zellspezifisch eingesetzt werden können und eine lang andauernde Expression des Transgenes ermöglichen (Acland *et al.*, 2005; Le Meur *et al.*, 2005). Basierend auf diesen Vektoren wurden klinische Studien zur Gentherapie bei schweren frühkindlichen Netzhautdegenerationen aufgrund von Mutationen im RPE65 Gen erfolgreich durchgeführt, die eindeutig belegen, dass dieses System eine realistische Methode für den Transfer der Expressionskassette darstellt.

Gekapselte Zelltransfersysteme stellen eine sichere Alternative zum viralen Gentransfer dar, da einmal implantierte Bioreaktoren bei Bedarf wieder rückstandslos entfernt werden können (Tao *et al.*, 2002). Stabil mit der Expressionskassette transfizierte Zellen, z.B. HEK293 Zellen, werden in eine Matrix eingekapselt, die entweder aus

biologisch inerten Materialien oder nichtabbaubaren Kollagenverbindungen bestehen. Die Kapsel wird in den Glaskörper implantiert und an einer Seite des Ziliarkörpers befestigt (Sieving *et al.*, 2006). Diese Kapseln haben wenige Nanometer große Löcher, über die die Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen im Auge versorgt werden, sowie das anti-VEGF Molekül sezernieren, durch die jedoch vollständige Antikörper nicht hindurch passen (Tao *et al.*, 2002). Mithilfe solcher Kapseln oder Hologel-Fasern wurden in den USA schon klinische Studien mit dem Wachstumsfaktor ciliary neurotrophic factor (CNTF) bei Patienten mit Retinitis pigmentosa durchgeführt (Sieving *et al.*, 2006). Obwohl klinisch keine Verbesserung bei den Patienten erzielt werden konnte, zeigte sich die Nutzung dieser Kapseln als sicherer Weg zur Produktion von CNTF im Auge.

#### 5.4.2 TetOn-System

Durch die kontinuierliche Expression von anti-VEGF Molekülen wie Ranibizumab würde die Aktivität von VEGF im Auge dauerhaft unterdrückt werden. Es ist allerdings fraglich, ob eine solche langanhaltende und fast komplette Blockade der VEGF Aktivität in der Retina wünschenswert ist. VEGF stellt auch einen neuroprotektiven Faktor dar und ist für die normale Angiogenese in der Retina mitverantwortlich (Baffert *et al.*, 2006). Zudem ergeben sich seit kurzem Hinweise darauf, dass eine langfristige Behandlung der feuchten AMD das Risiko für die Entwicklung von geographischen Atrophien auf der Ebene der RPE Zellen erhöht, da auch diese von VEGF als Wachstumsfaktor abhängig sind (Ford and D'Amore, 2012; Kehler *et al.*, 2012). Zudem führte die systemische und langfristige Anwendung von Bevacizumab (Avastin®) als antiangiogene Therapie von verschiedenen Tumoren bei einem Teil der Patienten zu Komplikationen, die entweder durch eine Induktion der Immunantwort gegen den monoklonalen Antikörper oder durch die direkte Hemmung der VEGF Aktivität in bestimmten Organen ausgelöst wurde (Eremina *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2007).

Um solche potenziellen Nebenwirkungen zu vermeiden, müsste die Expression der transferten Gene in der Retina regulierbar sein. Ebenso würde ein Regulationssystem die Expression von anti-VEGF Molekülen nur kurzzeitig erlauben, um ähnliche Konzentrationskurven zu erzeugen wie sie beim synthetisch hergestellten Ranibizumab bei monatlich wiederholter Injektion auftreten. Ein solches Regulationssystem wäre das Tetrazyklin-abhängige System (TetOn) (Gossen and Bujard, 1992). Es ist das am weitesten verbreitete Regulationssystem für *in vivo* Anwendungen (Stieger *et al.*, 2009) und wurde in der Retina schon bei Nagetieren und Primaten erfolgreich getestet, ohne immunologische Reaktionen gegen die exprimierten Proteine hervorzurufen (Smith *et al.*, 2005; Stieger *et al.*, 2006).

Unter Berücksichtigung der vorhandenen Transfer- und Regulationssysteme kann das in dieser Arbeit vorgestellte Molekül aller Voraussicht nach effizient in vivo in der Retina hergestellt werden und seine biologische Aktivität bei verschiedenen retinalen Erkrankungen entfalten. Dieser Behandlungsansatz würde eine kostengünstige und effektive Alternative zur regelmäßigen Injektion von rekombinant hergestellten Proteinen darstellen.

## 6 Zusammenfassung

Neovaskuläre Erkrankungen der Netzhaut, wie die altersabhängige Makuladegeneration oder die diabetische Retinopathie, nehmen in der zunehmend älter werdenden Bevölkerung rapide zu. Grundlage der neovaskulären Erkrankungen ist ein überschießendes Blutgefäßwachstum in die Retina ausgelöst durch eine gesteigerte Aktivität des *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Die aktuelle Therapiemethode besteht in der monatlich zu wiederholenden intravitrealen Injektion von anti-VEGF Molekülen wie Bevacizumab oder Ranibizumab. Der Nachteil dieser Behandlung ist jedoch der invasive Charakter der intravitrealen Injektion sowie die hohe finanzielle Belastung für die Patienten und das Gesundheitssystem. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Expressionssystems, mit dem das anti-VEGF F(ab)-Molekül Ranibizumab (RA-01) in eukaryotischen Zellen produziert werden kann.

Die DNA Sequenz beider Peptide des F(ab) Fragmentes wurden für eine Expression in eukaryotischen Zellen durch Basenmodifizierung, Anhängen einer sekretorischen Leadersequenz und der Generierung bestimmter Enzymschnittstellen optimiert. Zwischen die DNA Sequenzen wurde eine *internal ribosomal entry site* (IRES) kloniert, um eine gleichzeitig Expression beider Peptide zu gewährleisten. Die Plasmide wurden in HEK293, HELA und arpe19 Zellkulturen transfiziert und das exprimierte Protein im Überstand per Western blot detektiert. Ein Ranibizumab spezifischer ELISA wurde entwickelt, um die Konzentration von RA-01 im Überstand messen zu können. Die biologische Aktivität von RA-01 wurde in einem *human umbilical vein endothelial cell* (HUVEC) planar migration assay nachgewiesen.

RA-01 konnte im Überstand von allen getesteten Zellkulturen nach Transfizierung detektiert werden. Aufgrund der höchsten Transfektionsrate wurden für die Produktion des Proteins für weitere biologische Messungen HEK293 Zellen transfiziert. Die Konzentration des Proteins konnte per ELISA gemessen werden (0,378µg/ml). Eine Konzentration von 37,8ng RA-01 konnte im HUVEC Migrationsassay die VEGF induzierte Migration um 50% hemmen, ähnlich der Hemmungsaktivität von 100ng kommerziell erhältlichem Ranibizumab (Lucentis®).

In dieser Arbeit wurde somit erfolgreich ein biologisch aktives anti-VEGF F(ab) Fragment in eukaryotischen Zellen in vitro hergestellt. Die Aktivität von RA-01 ist mindestens so hoch wie rekombinant in Bakterien hergestelltes, kommerziell erhältliches Ranibizumab. Somit kann zukünftig unter Nutzung vorhandener Transfer- und Regulationssysteme RA-01 in vivo in der Retina hergestellt werden. Diese neue Behandlungsmethode könnte zukünftig die regelmäßige intraokuläre Injektion von anti-VEGF Molekülen ersetzen und einen kostengünstigeren und weniger invasiven Therapie der neovaskulären Erkrankungen der Netzhaut darstellen.

## 7 Summary

Neovascular diseases of the retina, like the age-related macular degeneration or diabetic retinopathy, play an increasingly important role in the aging population. The pathogenetic mechanism of such neovascular diseases is an excessive and uncontrolled growth of blood vessels in the retina caused by the increased activity of vascular endothelial growth factor (VEGF). The current therapy of choice consists of monthly intraocular injections of anti-VEGF molecules, such as Bevacizumab or Ranibizumab. The disadvantage of this treatment is the invasive character of the intravitreal injection and the high financial burden for the patient and the healthcare system. The purpose of this study is to develop an expression system in order to produce the anti-VEGF F(ab) molecule Ranibizumab (RA-01) in eukaryotic cells.

The DNA sequence of both peptides of the F(ab) fragment were optimized for expression in eukaryotic cells by modifying the base composition, adding a secretory leader sequence, and generating certain enzyme cleavage sites. An internal ribosomal entry site (IRES) was cloned between the DNA sequences in order to ensure a simultaneous expression of both peptides. The plasmids were transfected into HEK 293, HeLa and arpe 19 cell cultures and the target protein was detected in the supernatant by Western blot. A Ranibizumab specific ELISA was developed to measure the concentration of RA-01. The biological activity of RA-01 was detected in a human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) planar migration assay.

After transfection, RA-01 was detected in the supernatant of all tested cell cultures. Due to the highest transfection rate, HEK 293 cells were used for further biological measurements. The protein concentration could successfully be measured by ELISA (0.378 µg/ml). A concentration of 37.8 ng RA-01 was sufficient to inhibit the VEGF-induced migration by 50% in the HUVEC migration assay, similar to the inhibitory activity of 100 ng of commercially available Ranibizumab (Lucentis®).

This work demonstrates the successful expression of a biologically active anti-VEGF F(ab) fragment in eukaryotic cells in vitro. The activity of RA-01 is at least as high as commercially available Ranibizumab recombinantly produced in bacterial cells. In the future, RA-01 may be manufactured in vivo in the retina using existing transfer and regulatory systems. This new treatment could replace the regular intraocular injection of anti-VEGF molecules and would be a cheaper and less invasive treatment of neovascular diseases of the retina.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ-	mikro
Abb	Abbildung
Abk	Abkürzung
abs.	absolut
ad	auffüllen auf
AK	Antikörper
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
Amp	Ampicilin
ANCHOR	Anti-VEGF-Antibody for the Treatment of Predominantly Classic Choroidal Neovascularisation in AMD
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BVA	Berufsverband der Augenärzte
CDR	complementarity determining regions
CLS	Cell Lines Service
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMV	Cytomegalievirus Promoter
CNV	choroidale Neovaskularisation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid

dest.	destilliert
DMEM	Dubelcco´s modiflicated Eagle medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOG	Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft
DR	diabetische Retinopathie
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EPO	Erythropoetin
et al.	und andere
F(ab)	fragment antigen binding
FCS	fötale Kälberserum
Fc	fragment crystallizabel
Flk-1	fetal liver kinase receptor
Flt-1	fms-related tyrosine kinase 1
Flt-4	fms-related tyrosin kinase 4
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde

H	schwere Kette
HCl	Salzsäure
HEK 293	Human Embryonic Kidney cells
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks-Zellen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N`-(2-Ethansulfonsäure)
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible Factor</i>
hrGFP	humanized recombinand green fluorescent protein
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
Ig	Immunglobulin
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IgG1	Immunglobulin G1
IRES	internal ribosomal entry site
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KDR	kinase insert domain receptor
L	leichte Kette
L+H	pIRES-anti-VEGF mit leichter Kette + pIRES-anti-VEGF mit schwerer Kette
LB	Luria Broth
LDL	Low-Density Lipoprotein
LH	pIRES-anti-VEGF mit leichter und schwerer Kette
Lk	Leader Sequenz

m	Meter
M	Molar
m-	milli
mA	Milliamper
MARINA	Minimally Classic/Occult trial of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular AMD
MCS	Multiple cloning site
min.	Minute
mmHg	Millimeter Hydrargyrum
M-PER	Mammalian Protein Extraction Reagent
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Ms	Millisekunde
n-	nano
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NRP-1	Neuropilin-1
NRP-2	Neuropilin-2
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
ODx	optische Dichte bei Wellenlänge x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffer sulfate, Phosphatsalzpuffer

PDGF-B	<i>Platelet Derived Growth Factor B</i>
PDT	photodynamische Therapie
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PIGF	plazenta growth factor
qsq	auffüllen
RG	Retinologische Gesellschaft
RNV	retinale Neovaskularisation
ROP	retinopathy of prematurity
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Disulfidbrücke
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SH2	Src-homology 2
SSW	Schwangerschaftswoche
SV40pA	Polyadenylierungssignal SV40
TBS	Tris-Salz-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math>1</i>
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett

V	Volt
V.I.S.I.O.N.-Studie	VEGF-Inhibition Study in Ocular Neovascularization
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGF-R	VEGF-Rezeptor
VPF	vascular permeability factor
VRP	VEGF-related protein
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der VEGF-Formen und ihrer Rezeptoren. (Quelle: (Olsson <i>et al.</i> , 2006)).....	10
Abb. 2: Anti-VEGF-Moleküle und ihre Bindungsstellen am VEGF. (Quelle: (Kowanetz and Ferrara, 2006)) .....	11
Abb. 3: Pegaptanib Struktur (Quelle: (Ng and Adamis, 2006)).....	12
Abb. 4: Der molekulare Aufbau des monoklonalen IgG1 Antikörpers Bevacizumab. ..	14
Abb. 5: F(ab) Fragment Ranibizumab mit schwerer und leichter Kette. ....	15
Abb. 6a, 6b: DNA-Größenstandard GeneRuler DNA-Ladder Mix/1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot).....	23
Abb. 7: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot). 24	
Abb. 8: pIRES-hr GFP 1a von Stratagene .....	28
Abb. 9: pBluescript II SK + von Stratagene.....	29
Abb. 10: Prinzip der Detektion mit dem spezifischen Antikörper (verändert Qiagen Qiaexpress-Protokoll).....	41
Abb. 11: Design der Ketten von RA-01.....	44
Abb. 12: Ablauf einer Klonierung. ....	46
Abb. 13: Klonierung der leichten Kette. ....	48
Abb. 14: Klonierung der schweren Kette. ....	50
Abb. 15: Klonierung zweiter Schritt.....	51
Abb. 16: Überprüfung der Darstellbarkeit des Ranibizumabs.....	53
Abb. 17: In vitro Expression von RA-01 in HEK 293-Zellen (A), in HeLa-Zellen (B) und in arpe19-Zellen (C). ....	55
Abb. 18: In vitro Expression von RA-01 in HEK 293-Zellen (A), in HeLa-Zellen (B) und in arpe19-Zellen (C). ....	57
Abb. 19: Darstellung von Ranibizumab unter reduzierten Bedingungen. ....	59
Abb. 20: Mischung der beiden Antikörper.....	61
Abb. 21: Expression von RA-01 in HEK 293-Zellen unter optimierten Bedingungen... 63	
Abb. 22: Quantifizierung von RA-01 mittels ELISA. ....	65
Abb. 23: Biologische Aktivität von RA-01 dargestellt in einem HUVEC Planar Migration Assay. ....	67
Abb. 24: HUVEC Planar Migration Assay. ....	68

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vergleich der vier anti-VEGF-Medikamente..... 18

## 9 Literaturteil

- Acland, G. M., Aguirre, G. D., Bennett, J., Aleman, T. S., Cideciyan, A. V., Benniselli, J., Dejneka, N. S., Pearce-Kelling, S. E., Maguire, A. M., Palczewski, K., Hauswirth, W. W., and Jacobson, S. G. (2005) Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* **12**, 1072-82.
- Adamis, A. P., Miller, J. W., Bernal, M. T., D'Amico, D. J., Folkman, J., Yeo, T. K., and Yeo, K. T. (1994) Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* **118**, 445-450.
- Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., Park, J. E., and . (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1480-1487.
- Ali, R. R., Reichel, M. B., Thrasher, A. J., Levinsky, R. J., Kinnon, C., Kanuga, N., Hunt, D. M., and Bhattacharya, S. S. (1996) Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet* **5**, 591-4.
- Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., and Keshet, E. (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* **1**, 1024-8.
- Ambati, B. K., Nozaki, M., Singh, N., Takeda, A., Jani, P. D., Suthar, T., Albuquerque, R. J., Richter, E., Sakurai, E., Newcomb, M. T., Kleinman, M. E., Caldwell, R. B., Lin, Q., Ogura, Y., Orecchia, A., Samuelson, D. A., Agnew, D. W., St Leger, J., Green, W. R., Mahasreshti, P. J., Curiel, D. T., Kwan, D., Marsh, H., Ikeda, S., Leiper, L. J., Collinson, J. M., Bogdanovich, S., Khurana, T. S., Shibuya, M., Baldwin, M. E., Ferrara, N., Gerber, H. P., De Falco, S., Witta, J., Baffi, J. Z., Raisler, B. J., and Ambati, J. (2006) Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* **443**, 993-7.
- Avery, R. L., Pearlman, J., Pieramici, D. J., Rabena, M. D., Castellarin, A. A., Nasir, M. A., Giust, M. J., Wendel, R., and Patel, A. (2006a) Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology.* **113**, 1695-15.
- Avery, R. L., Pieramici, D. J., Rabena, M. D., Castellarin, A. A., Nasir, M. A., and Giust, M. J. (2006b) Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* **113**, 363-372.
- Baffert, F., Le, T., Sennino, B., Thurston, G., Kuo, C. J., Hu-Lowe, D., and McDonald, D. M. (2006) Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, 547-59.
- Bagley, R. G., Kurtzberg, L., Weber, W., Nguyen, T. H., Roth, S., Krumbholz, R., Yao, M., Richards, B., Zhang, M., Pechan, P., Schmid, S., Scaria, A., Kaplan, J., and Teicher, B. A. (2011) sFLT01: a novel fusion protein with antiangiogenic activity. *Mol. Cancer Ther* **10**, 404-415.

- Bashshur, Z. F., Bazarbachi, A., Schakal, A., Haddad, Z. A., El Haibi, C. P., and Nouredin, B. N. (2006) Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* **142**, 1-9.
- Bemelmans, A. P., Kostic, C., Crippa, S. V., Hauswirth, W. W., Lem, J., Munier, F. L., Seeliger, M. W., Wenzel, A., and Arsenijevic, Y. (2006) Lentiviral gene transfer of RPE65 rescues survival and function of cones in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS Med* **3**, e347.
- Bennett, J., Tanabe, T., Sun, D., Zeng, Y., Kjeldbye, H., Gouras, P., and Maguire, A. M. (1996) Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by in vivo gene therapy. *Nat. Med.* **2**, 649-654.
- Bird, A. C., Bressler, N. M., Bressler, S. B., Chisholm, I. H., Coscas, G., Davis, M. D., de Jong, P. T., Klaver, C. C., Klein, B. E., Klein, R., and et al. (1995) An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* **39**, 367-74.
- Bose, B., Khanna, N., Acharya, S. K., and Sinha, S. (2006) Generation and characterization of a single-gene mouse-human chimeric antibody against hepatitis B surface antigen. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 1439-1447.
- Boyer, D. S., Antoszyk, A. N., Awh, C. C., Bhisitkul, R. B., Shapiro, H., and Acharya, N. R. (2007) Subgroup analysis of the MARINA study of ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* **114**, 246-252.
- Brown, D. M., Kaiser, P. K., Michels, M., Soubrane, G., Heier, J. S., Kim, R. Y., Sy, J. P., and Schneider, S. (2006) Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **355**, 1432-44.
- Burri, P. H. and Tarek, M. R. (1990) A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat. Rec.* **228**, 35-45.
- Campochiaro, P. A. (2000) Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* **184**, 301-10.
- Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* **9**, 653-660.
- Carmeliet, P. and Collen, D. (2000) Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **902**, 249-262.
- Chappelow, A. V. and Kaiser, P. K. (2008) Neovascular age-related macular degeneration: potential therapies. *Drugs.* **68**, 1029-1036.
- Chen, Y., Wiesmann, C., Fuh, G., Li, B., Christinger, H. W., McKay, P., de Vos, A. M., and Lowman, H. B. (1999) Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J. Mol. Biol.* **293**, 865-881.
- Cheung, C. M., Peh, K. K., and Yang, Y. (2007) Estimating the potential impact of using intravitreal angiostatic agents for wet macular degeneration on service capacity in a large retinal referral centre. *Eye (Lond).* **21**, 1121-1122.

- Eremina, V., Jefferson, J. A., Kowalewska, J., Hochster, H., Haas, M., Weisstuch, J., Richardson, C., Kopp, J. B., Kabir, M. G., Backx, P. H., Gerber, H. P., Ferrara, N., Barisoni, L., Alpers, C. E., and Quaggin, S. E. (2008) VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1129-1136.
- Ferrara, N. (1995) Vascular endothelial growth factor. The trigger for neovascularization in the eye. *Lab Invest.* **72**, 615-618.
- Ferrara, N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* **25**, 581-611.
- Ferrara, N., Damico, L., Shams, N., Lowman, H., and Kim, R. (2006) Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina.* **26**, 859-870.
- Fine, S. L., Berger, J. W., Maguire, M. G., and Ho, A. C. (2000) Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **342**, 483-492.
- Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1182-1186.
- Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**, 27-31.
- Ford, K. M. and D'Amore, P. A. (2012) Molecular regulation of vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium. *Mol. Vis* **18**, 519-527.
- Frank, R. N. (2004) Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* **350**, 48-58.
- Friedman, D. S., O'Colmain, B. J., Munoz, B., Tomany, S. C., McCarty, C., de Jong, P. T., Nemesure, B., Mitchell, P., and Kempen, J. (2004) Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol.* **122**, 564-572.
- Fruttiger, M. (2002) Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **43**, 522-527.
- Fruttiger, M. (2007) Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis.* **10**, 77-88.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., and Betsholtz, C. (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* **161**, 1163-1177.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-51.
- Gragoudas, E. S., Adamis, A. P., Cunningham, E. T., Jr., Feinsod, M., and Guyer, D. R. (2004) Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **351**, 2805-16.
- Grunwald, J. E., Hariprasad, S. M., DuPont, J., Maguire, M. G., Fine, S. L., Brucker, A. J., Maguire, A. M., and Ho, A. C. (1998) Foveolar choroidal blood flow in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 385-90.

- Hirschi, K. K., Rohovsky, S. A., and D'Amore, P. A. (1998) PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J. Cell Biol.* **141**, 805-814.
- Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S. D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J. P., Daly, T., Wiegand, S. J., Yancopoulos, G. D., and Rudge, J. S. (2002) VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **99**, 11393-11398.
- Holz, F. G., Pauleikhoff, D., Klein, R., and Bird, A. C. (2004a) Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am. J. Ophthalmol.* **137**, 504-510.
- Holz, F. G., Pauleikhoff, D., Klein, R., and Bird, A. C. (2004b) Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am J Ophthalmol* **137**, 504-10.
- Hughes, S., Yang, H., and Chan-Ling, T. (2000) Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **41**, 1217-1228.
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., and Semenza, G. L. (1998) Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* **12**, 149-162.
- Jackson, R. J., Howell, M. T., and Kaminski, A. (1990) The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem. Sci* **15**, 477-483.
- Jager, R. D., Aiello, L. P., Patel, S. C., and Cunningham, E. T., Jr. (2004) Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina* **24**, 676-98.
- Jandek, C., Kellner, U., Lorenz, B., and Seiberth, V. (2008) [Guidelines for ophthalmological screening of premature infants in Germany]. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* **225**, 123-130.
- Jefferis, R. (2005) Glycosylation of natural and recombinant antibody molecules. *Adv. Exp Med. Biol.* **564**, 143-148.
- Jefferis, R. (2009) Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends Pharmacol. Sci* **30**, 356-362.
- Jewell, U. R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R. H., and Gassmann, M. (2001) Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* **15**, 1312-1314.
- Kehler, A. K., Andersen, C., Andreasen, J. R., Vohra, R., Junker, N., Poulsen, K. A., and Kolko, M. (2012) Interaction between VEGF and Calcium-Independent Phospholipase A(2) in Proliferation and Migration of Retinal Pigment Epithelium. *Curr. Eye Res.* **37**, 500-507.
- Kendall, R. L. and Thomas, K. A. (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10705-9.

- Klein, R., Klein, B. E., and Moss, S. E. (1992) Epidemiology of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* **15**, 1875-91.
- Kook, D., Wolf, A., Neubauer, A. S., Haritoglou, C., Priglinger, S. G., Kampik, A., and Ulbig, M. W. (2008) [Retinal pigment epithelial tears after intravitreal injection of bevacizumab for AMD. Frequency and progress]. *Ophthalmologe* **105**, 158-164.
- Kowanzetz, M. and Ferrara, N. (2006) Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* **12**, 5018-5022.
- Ladewig, M. S., Ziemssen, F., Jaissle, G., Helb, H. M., Scholl, H. P., Eter, N., Bartz-Schmidt, K. U., and Holz, F. G. (2006) [Intravitreal bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration]. *Ophthalmologe.* **103**, 463-470.
- Lai, C. M., Estcourt, M. J., Himbeck, R. P., Lee, S. Y., Yew-San, Y., I, Luu, C., Loh, B. K., Lee, M. W., Barathi, A., Villano, J., Ang, C. L., van der Most, R. G., Constable, I. J., Dismuke, D., Samulski, R. J., gli-Esposti, M. A., and Rakoczy, E. P. (2011) Preclinical safety evaluation of subretinal AAV2.sFlt-1 in non-human primates. *Gene Ther.*
- Lai, C. M., Estcourt, M. J., Wikstrom, M., Himbeck, R. P., Barnett, N. L., Brankov, M., Tee, L. B., Dunlop, S. A., gli-Esposti, M. A., and Rakoczy, E. P. (2009) rAAV.sFlt-1 gene therapy achieves lasting reversal of retinal neovascularization in the absence of a strong immune response to the viral vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 4279-4287.
- Lai, J. C., Lapolice, D. J., Stinnett, S. S., Meyer, C. H., Arieu, L. M., Keller, M. A., and Toth, C. A. (2002) Visual outcomes following macular translocation with 360-degree peripheral retinectomy. *Arch Ophthalmol.* **120**, 1317-1324.
- Le Meur, G., Weber, M., Pereon, Y., Mendes-Madeira, A., Nivard, D., Deschamps, J. Y., Moullier, P., and Rolling, F. (2005) Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates. *Arch Ophthalmol* **123**, 500-6.
- Lei, J., Jiang, A., and Pei, D. (1998) Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183. *Biochim. Biophys. Acta.* **1443**, 400-406.
- Levy, A. P., Levy, N. S., and Goldberg, M. A. (1996) Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **271**, 2746-2753.
- li Rahman, I. S., Li, C. R., Lai, C. M., and Rakoczy, E. P. (2011) In vivo monitoring of VEGF-induced retinal damage in the Kimba mouse model of retinal neovascularization. *Curr. Eye Res.* **36**, 654-662.
- Lukason, M., DuFresne, E., Rubin, H., Pechan, P., Li, Q., Kim, I., Kiss, S., Flaxel, C., Collins, M., Miller, J., Hauswirth, W., Maclachlan, T., Wadsworth, S., and Scaria, A. (2011) Inhibition of choroidal neovascularization in a nonhuman primate model by intravitreal administration of an AAV2 vector expressing a novel anti-VEGF molecule. *Mol. Ther* **19**, 260-265.
- Luo, W., Chen, Y., Li, L., Xu, C., Miao, J., Shih, J. W., Zhang, J., and Xia, N. (2007) Construction and characterization of the chimeric antibody 8C11 to the hepatitis E virus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**, 18-25.

- Machemer, R. and Laqua, H. (1978) A logical approach to the treatment of massive periretinal proliferation. *Ophthalmology*. **85**, 584-593.
- Meyer, C. H., Helb, H. M., and Eter, N. (2008a) [Monitoring of AMD patients on anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) treatment. Practical notes on functional and anatomical examination parameters from drug approval studies, specialist information and case series]. *Ophthalmologe*. **105**, 125-2.
- Meyer, C. H., Lapolice, D. J., and Fekrat, S. (2005) Functional changes after photodynamic therapy with verteporfin. *Am. J. Ophthalmol.* **139**, 214-215.
- Meyer, C. H., Ziemssen, F., and Heimann, H. (2008b) [Intravitreal injection. Monitoring to avoid postoperative complications]. *Ophthalmologe* **105**, 143-55, 157.
- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H. J., and Dehio, C. (1999) A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* **18**, 363-374.
- Michaelson I.C. (1948) The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders. *Trans Ophthalmol Soc UK* **68**, 137-180.
- Michels, S., Rosenfeld, P. J., Puliafito, C. A., Marcus, E. N., and Venkatraman, A. S. (2005) Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology*. **112**, 1035-1047.
- Mintz-Hittner, H. A., Kennedy, K. A., and Chuang, A. Z. (2011) Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N. Engl. J. Med.* **364**, 603-615.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* **13**, 9-22.
- Ng, E. W. and Adamis, A. P. (2006) Anti-VEGF aptamer (pegaptanib) therapy for ocular vascular diseases. *Ann N Y Acad Sci* **1082**, 151-71.
- Ng, E. W., Shima, D. T., Calias, P., Cunningham, E. T., Jr., Guyer, D. R., and Adamis, A. P. (2006) Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 123-132.
- Nguyen, Q. D., Shah, S. M., Hafiz, G., Quinlan, E., Sung, J., Chu, K., Cedarbaum, J. M., and Campochiaro, P. A. (2006) A phase I trial of an IV-administered vascular endothelial growth factor trap for treatment in patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. **113**, 1522.
- Ohr, M. and Kaiser, P. K. (2012) Intravitreal aflibercept injection for neovascular (wet) age-related macular degeneration. *Expert. Opin. Pharmacother.* **13**, 585-591.
- Olofsson, B., Korpelainen, E., Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Aase, K., Kumar, V., Gunji, Y., Jeltsch, M. M., Shibuya, M., Alitalo, K., and Eriksson, U. (1998) Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and

- regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **95**, 11709-11714.
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 359-371.
- Park, J. E., Keller, G. A., and Ferrara, N. (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell.* **4**, 1317-1326.
- Patz, A. (1980) Studies on retinal neovascularization. Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **19**, 1133-1138.
- Pe'er, J., Shweiki, D., Itin, A., Hemo, I., Gnessin, H., and Keshet, E. (1995) Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab Invest.* **72**, 638-645.
- Pechan, P., Rubin, H., Lukason, M., Ardinger, J., DuFresne, E., Hauswirth, W. W., Wadsworth, S. C., and Scaria, A. (2009) Novel anti-VEGF chimeric molecules delivered by AAV vectors for inhibition of retinal neovascularization. *Gene Ther.* **16**, 10-16.
- Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodaysky, I., Keshet, E., and Neufeld, G. (1997) VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **272**, 7151-7158.
- Rajakumar, A., Michael, H. M., Rajakumar, P. A., Shibata, E., Hubel, C. A., Karumanchi, S. A., Thadhani, R., Wolf, M., Harger, G., and Markovic, N. (2005) Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta* **26**, 563-573.
- Rajakumar, A., Powers, R. W., Hubel, C. A., Shibata, E., von Versen-Hoyneck, F., Plymire, D., and Jeyabalan, A. (2009) Novel soluble Flt-1 isoforms in plasma and cultured placental explants from normotensive pregnant and preeclamptic women. *Placenta* **30**, 25-34.
- Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, A. M., and Vacca, A. (2007) The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia.* **21**, 44-52.
- Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* **386**, 671-674.
- Risau, W. and Flamme, I. (1995) Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 73-91.
- Rosenfeld, P. J., Brown, D. M., Heier, J. S., Boyer, D. S., Kaiser, P. K., Chung, C. Y., and Kim, R. Y. (2006b) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* **355**, 1419-31.
- Rosenfeld, P. J., Brown, D. M., Heier, J. S., Boyer, D. S., Kaiser, P. K., Chung, C. Y., and Kim, R. Y. (2006a) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1419-1431.
- Ruckman, J., Green, L. S., Beeson, J., Waugh, S., Gillette, W. L., Henninger, D. D., Claesson-Welsh, L., and Janjic, N. (1998) 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular

- permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* **273**, 20556-67.
- Schaal, K. B., Engler, C., Schutt, F., Scheuerle, A., and Dithmar, S. (2008) [Intravitreal anti-VEGF therapy with bevacizumab for neovascular AMD]. *Ophthalmologie*. **105**, 538-543.
- Semenza, G. L. (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* **88**, 1474-1480.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., and Dvorak, H. F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. **219**, 983-985.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., and Sato, M. (1990) Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. **5**, 519-524.
- Shweiki, D., Itin, A., Neufeld, G., Gitay-Goren, H., and Keshet, E. (1993) Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J. Clin Invest.* **91**, 2235-2243.
- Sieving, P. A., Caruso, R. C., Tao, W., Coleman, H. R., Thompson, D. J., Fullmer, K. R., and Bush, R. A. (2006) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3896-901.
- Smith, J. R., Verwaerde, C., Rolling, F., Naud, M. C., Delanoye, A., Thillaye-Goldenberg, B., Apparailly, F., and De Kozak, Y. (2005) Tetracycline-inducible viral interleukin-10 intraocular gene transfer, using adeno-associated virus in experimental autoimmune uveoretinitis. *Hum Gene Ther* **16**, 1037-46.
- Smith, L. E. (2008) Through the eyes of a child: understanding retinopathy through ROP the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **49**, 5177-5182.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. **92**, 735-745.
- Spaide, R. F. and Fisher, Y. L. (2006) Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of proliferative diabetic retinopathy complicated by vitreous hemorrhage. *Retina*. **26**, 275-278.
- Stacker, S. A., Achen, M. G., Jussila, L., Baldwin, M. E., and Alitalo, K. (2002) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat. Rev. Cancer*. **2**, 573-583.
- Staubach, F. and Lagrèze, W. A. (2002) Frühgeborenenretinopathie. *Monatsschr. Kinderheilkd.* **150**, 302-308.
- Stewart, M. W., Rosenfeld, P. J., Penha, F. M., Wang, F., Yehoshua, Z., Bueno-Lopez, E., and Lopez, P. F. (2012) Pharmacokinetic rationale for dosing every 2 weeks versus 4 weeks with intravitreal ranibizumab, bevacizumab, and aflibercept (vascular endothelial growth factor Trap-eye). *Retina* **32**, 434-457.

- Stieger, K., Belbellaa, B., Le, G. C., Moullier, P., and Rolling, F. (2009) In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 527-541.
- Stieger, K., Le, M. G., Lasne, F., Weber, M., Deschamps, J. Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Martin, L., Moullier, P., and Rolling, F. (2006) Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol. Ther.* **13**, 967-975.
- Tao, W., Wen, R., Goddard, M. B., Sherman, S. D., O'Rourke, P. J., Stabila, P. F., Bell, W. J., Dean, B. J., Kauper, K. A., Budz, V. A., Tsiaras, W. G., Acland, G. M., Pearce-Kelling, S., Laties, A. M., and Aguirre, G. D. (2002) Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3292-8.
- Terman, B. I., Carrion, M. E., Kovacs, E., Rasmussen, B. A., Eddy, R. L., and Shows, T. B. (1991) Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. **6**, 1677-1683.
- Terry, T. L. (1942) Fibroblastic Overgrowth of Persistent Tunica Vasculosa Lentis in Infants Born Prematurely: II. Report of Cases-Clinical Aspects. *Trans. Am. Ophthalmol Soc.* **40:262-84.**, 262-284.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., and Abraham, J. A. (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* **266**, 11947-11954.
- Van, D., V, Kaminski, A., Jackson, R. J., and Belsham, G. J. (1995) Defective point mutants of the encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site can be complemented in trans. *Virology* **214**, 82-90.
- Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., and Persico, G. (1996) Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation.* **93**, 1493-1495.
- Watanabe, M., Boyer, J. L., and Crystal, R. G. (2009) Genetic Delivery of Bevacizumab to Suppress VEGF-induced High-permeability Pulmonary Edema. *Hum Gene Ther.*
- Watanabe, M., Boyer, J. L., Hackett, N. R., Qiu, J., and Crystal, R. G. (2008) Genetic delivery of the murine equivalent of bevacizumab (avastin), an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody, to suppress growth of human tumors in immunodeficient mice. *Hum Gene Ther.* **19**, 300-310.
- Whittle, C., Gillespie, K., Harrison, R., Mathieson, P. W., and Harper, S. J. (1999) Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. *Clin Sci (Lond).* **97**, 303-312.
- Zhu, X., Wu, S., Dahut, W. L., and Parikh, C. R. (2007) Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis.* **49**, 186-193.

## 10 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

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die durch ihre wissenschaftlichen Ratschläge und moralischer Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. med. Birgit Lorenz danke ich für ihre wissenschaftliche Unterstützung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn PD Dr. Dr. med. vet. Knut Stieger danke ich für die Übernahme meiner Betreuung als mein Doktorvater und seine wissenschaftliche Unterstützung, für die Überlassung des interessanten Themas, die große und stetige Hilfsbereitschaft und besonders freundliche Supervision des Projektes, sowie für die Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Tobias Wimmer möchte ich für die Einweisung in die Laborarbeit, die vielen Tipps und Tricks, die ständige Offenheit für Fragen und die Hilfe bei der Durchführung zahlreicher Versuche danken. Ich hatte stets Freude bei der Arbeit im Labor, woran er maßgeblichen Anteil hatte.

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich für ihre große Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion danken.