

Vascular Endothelial Growth Factor Detektion aufgrund von
Protein-Protein-Interaktion basiertem
Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer

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

vorgelegt von Schroeter, Eva Sabrina Julia
aus Hanau

Gießen 2019

Aus der experimentellen Ophthalmologie (Prof. Dr. Dr. Knut Stieger, kommissarische
Leitung Forschung und Lehre) der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Fach-
bereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Knut Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Tag der Disputation: 02.11.2020

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 dass ich diese nachstehend spezifiziert habe. 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.“

Gießen, den

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	V
INHALTSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Anatomischer Aufbau des Auges	1
1.1.1 Blutversorgung der Retina	2
1.2 Retinale und choroidale Gefäßpathologien	4
1.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	7
1.3.1 VEGF-Rezeptoren	10
1.3.2 VEGF Co-Rezeptoren	11
1.4 Anti-VEGF	13
1.4.1 Pegaptanib	13
1.4.2 Bevacizumab	14
1.4.3 Ranibizumab	15
1.4.4 Aflibercept (Eylea®)	16
1.5 Nachteile der aktuellen Anti-VEGF Behandlungsmethoden	17
1.6 Die Ranibizumab „single chain variable fragment“ Variante Ra02	19
1.7 VEGF Nachweis durch Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer	20
1.8 Ziel der Arbeit	27
2 MATERIAL	28
2.1 Geräte und Labormaterial	28
2.2 Verbrauchsmaterialien	29
2.3 Chemikalien	30
2.4 Puffer und Medien	33
2.4.1 Allgemeine Pufferlösungen	33
2.4.2 Puffer für die Zellkulturen	33
2.4.3 Puffer die SDS-Page	35

2.4.4	Puffer für den Western-Blot	36
2.4.5	BRET-Assay-Puffer:	37
2.5	Antikörper	37
2.6	Biologische Materialien	37
2.6.1	Zelllinien	37
2.6.2	Enzyme:	38
2.7	Plasmide	39
2.8	Primer	39
2.9	Reagenzien und Kits	40
2.10	Größenstandards	41
2.10.1	DNA Größenstandard	41
2.10.2	Protein-Größenstandard	41
3	METHODEN	42
3.1	Herstellung der Konstrukte	42
3.1.1	Mutagenese PCR	43
3.1.2	Agarosegelelektrophorese	45
3.1.3	DNA-Extraktion aus Agarosegel	46
3.1.4	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	46
3.1.5	Ligation mit der T4-DNA Ligase	46
3.1.6	Transformation in E. coli	47
3.1.7	Ausplattieren und Kultivierung der XL-1 Zellen	47
3.1.8	Plasmidisolierung mittels Säule (Mini-Präparation)	48
3.1.9	Sequenzierung	48
3.1.10	Herstellung von Glycerin-Stocks	48
3.1.11	Maxi-Prep	48
3.1.12	Kultivierung der HEK-Zellen	49
3.2	Transfektion in HEK- Zellen	49
3.2.1	Lipofektion	49
3.2.2	Proteinextraktion aus HEK-Zellen	50
3.3	Luziferase Aktivität	50
3.3.1	Quantifizierung von RLuc8, Rluc8-4Gly-Ra02/ Rluc8-Ra02	50
3.4	Reduzierte SDS-Polyarylamidgelelektrophorese	51

3.4.1	Western Blot	52
3.4.1.1	Ponceau Rot-Färbung	53
3.4.1.2	Detektion mit Antikörpern	53
3.5	Kopplung von Neuropilin (NRP) mit Lightning Link Per.CP-Cy 5.5®	54
3.6	Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET)	54
3.7	Versuchsaufbau zur VEGF- Detektion	56
3.7.1	Fixierte Messung	56
3.7.1.1	Methode 1: NRP-fixierte Messung (Akzeptor-Fixierte Messung)	56
3.7.1.2	Methode 2: Rluc8-(4Gly) -Ra02-fixierte Messung (Donor-Fixierte Messung)	57
3.7.2	Vorinkubierte Messung	57
3.7.2.1	Methode 3: NRP-Vorinkubierte Messung (Akzeptor-inkubierte Messung)	57
3.7.2.2	Methode 4: Rluc8-(4Gly)-Ra02 Vorinkubierte Messung (Donor-inkubierte Messung)	57
3.7.3	Direkte Messung	58
3.7.3.1	Methode 5: Rluc8-(4Gly)-Ra02 Direkte Messung	58
3.8	Statistik	58
4	ERGEBNISSE	59
4.1	DNA-Ebene	59
4.1.1	Konstrukt-Design	59
4.2	Biodoc PCR-Kontrolle	61
4.2.1	Klonierung	63
4.2.2	Transfektionskontrolle durch GFP	63
4.2.3	In vitro Expressionskontrolle	64
4.2.4	Luziferaseexpressionsmessung	65
4.3	BRET-Messungen	66
4.3.1	Fixierte Messung	69
4.3.1.1	Methode 1: NRP-fixierte Messung (Akzeptor-Fixierte Messung)	69
4.3.1.2	Methode 2: Rluc8-(4Gly)-Ra02-fixierte Messung (Donor -Fixierte Messung)	70
4.3.2	Vorinkubierte Messung	71
4.3.2.1	Methode 3: Akzeptor-Inkubierte Messung (NRP-Vorinkubiert)	71
4.3.2.2	Methode 4: Donor-Inkubierte Messung (Rluc8-(4Gly)-Ra02-Vorinkubiert)	71
4.3.2.3	Direkte Messung	73
4.3.2.4	Messung 1:	74
4.3.2.5	Messung 2:	75

5	DISKUSSION	76
5.1	Vergleich der Versuchsmethoden	76
5.2	Ausblick	85
6	ZUSAMMENFASSUNG	86
6.1	Detection of the vascular endothelial growth factor with a novel bioluminescence resonance energy transfer pair using a two component system	86
6.2	Vascular Endothelial Growth Factor Detektion mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer basierter Protein-Protei-Interaktion	87
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	88
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	91
	TABELLENVERZEICHNIS	91
	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	92
	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	98
	DANKSAGUNG	99

1 Einleitung

Der Mensch nimmt einen Großteil seiner Sinneseindrücke über das Auge wahr. Lichtstrahlen werden von ihm aufgenommen, verarbeitet und an das Gehirn weitergeleitet. Der anatomische Aufbau des visuellen Systems ist für eine regelrechte Funktion von entscheidender Bedeutung.

1.1 Anatomischer Aufbau des Auges

Der fast kugelförmige Bulbus oculi liegt gut geschützt in der Orbitahöhle. Anatomisch kann man den Innenraum des Bulbus in eine vordere und eine hintere Augenkammer gliedern, die sowohl den Glaskörper als auch die Linse enthalten. Funktionell ist er in einen dioptrischen und einen lichtwahrnehmenden Apparat einzuteilen. Der lichtbrechende Apparat soll das einfallende Licht bündeln, um es punktförmig auf der Retina abzubilden. Hierzu dienen Cornea, Linse, Glaskörper und Kammerwasser. Den lichtwahrnehmenden Teil des Auges macht die Retina aus, die den einfallenden Lichtreiz über Photorezeptoren in elektrische Impulse umwandelt. Diese werden wiederum über den Nervus opticus zum Gehirn weitergeleitet.

Die Hülle des Bulbus oculi besteht aus drei konzentrisch angeordneten Schichten. Die schützende Tunica fibrosa bulbi umschließt sowohl in der Mitte liegende Choroidea (Tunica vasculosa) als auch die innere Retina (Tunica interna bulbi).

Der hintere Teil Retina allein dient der visuellen Wahrnehmung. Dieser als Pars optica bezeichnete Teil setzt sich aus dem retinalen Pigmentepithel (RPE/ Stratum pigmentosum) und dem Stratum nervosum zusammen (Chader and Taylor, 2013).

Die Zellen des Stratum pigmentosum sind polarisierte Zellen, die basal der Choroidea aufliegen und apikal an das Stratum nervosum der Retina grenzen. Innerhalb dieser drei Schichten besteht ein komplexes Abhängigkeitssystem. Die RPE-Zellen produzieren ihrerseits Wachstumsfaktoren, die die Choriokapillaren beeinflussen. Stratum pigmentosum und nervosum sind gleichzeitig aber auch abhängig von der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch die Choroidea. Die Bruchmembran, als Trennung zwischen Choriokapillaren und RPE-Zellen spielt eine entscheidende Rolle zur regelrechten Funktion von RPE, Photorezeptoren sowie Choriokapillaren (Campochiaro, 2015).

Das Stratum nervosum der Retina besteht aus vielen verschiedenen Schichten, die sowohl die ersten drei Neurone der Sehbahn enthalten als auch deren Axone, Synapsen und Gliazellen. Als erstes Neuron der Sehbahn gilt der Photorezeptor, gefolgt von Bipolarzellen

und Ganglienzellen. Die Photorezeptoren stellen die äußerste Schicht dar. Folglich muss das Licht zunächst alle anderen Schichten durchdringen, bevor es auf die Photorezeptoren trifft.

Die Axone der Ganglienzellen des Stratum nervosum vereinen sich schließlich und verlassen den Bulbus am Discus nervi optici als Sehnerv. Dieser tritt durch den Canalis Opticus in den Schädel ein und trifft im Chiasma opticum auf den Nervus opticus des anderen Auges. Im Chiasma opticum kreuzen jeweils die nasalen Anteile der Nervi optici und der Sehnerv zieht weiter zum Cornu geniculatum laterale im Thalamus und anschließend als Sehstrahlung zum virtuellen Cortex (Chader and Taylor, 2013).

1.1.1 Blutversorgung der Retina

Da die Retina besonders im Bereich der Photorezeptoren einen hohen metabolischen Umsatz besitzt, ist hier eine regelrechte Blutversorgung von enormer Wichtigkeit.

Die retinale Zentralarterie erreicht das Auge mit dem Sehnerv und teilt sich auf dessen Oberfläche, um sich in Arteriolen, die Blut und Nährstoffe zu den oberflächlichen anterioren Anteilen der Netzhaut leiten, auszudifferenzieren. Diese versorgen über das oberflächliche und tiefe Kapillarbett die inneren zwei Drittel der Retina. Der oberflächliche Plexus liegt direkt unter der inneren Grenzschicht, während der tiefe Plexus die innere Körnerschicht versorgt (Abbildung 1). Die Endothelzellen der retinalen Kapillaren sind über tight junctions verbunden und bilden so die innere Blut-Retina-Schranke (Penn et al., 2008). Retinale Kapillaren anastomosieren schließlich mit retinalen Venolen, die, zu den Arterien analog, durch progressiv größer werdende Venen den Augapfel mit dem Sehnerv verlassen.

Auffällig ist, dass die Schichten des äußeren Drittels der Retina und die darin enthaltenen Photorezeptorzellkörper, sowie deren innere und äußere Segmente völlig avaskulär sind. Dies dient der visuellen Aktivität, da lichtbrechendes Hämoglobin in dieser Region zu Einschränkungen der Lichtdurchlässigkeit führen würde. Die Nährstoffversorgung der Photorezeptoren erfolgt hier rein über das choroidale Gefäßnetzwerk (Campochiaro, 2015). Die Choroidea (Aderhaut) stellt die mittlere Tunica vasculosa bulbi (Uvea) des Augapfels zwischen Sclera und Retina dar. Durch sie fließt ein Großteil des Blutes, welches das Auge erreicht.

Ihr Gefäßbett speist sich aus den Arterien posteriores breves, die ebenfalls wie die Zentralarterie aus der Arteria ophtalmica hervorgehen (Chader and Taylor, 2013).

Die Choroidea besteht aus einem dünnen Plexus fenestrierter Kapillaren, die einen Plasmafluss hin zum RPE herstellen. Dieses Epithel ist über apikale tight junctions verbunden, die einen gerichteten Vesikelfluss hin zu den Photorezeptoren ermöglichen.

Zusammen mit der Bruch-Membran wird so eine Barriere geschaffen, die als äußere Blut-Retina-Schranke gilt. Die Distanz, die Sauerstoff und Nährstoffe zurücklegen müssen, um das avaskuläre Drittel der Retina zu versorgen, ist erheblich größer als in anderen Geweben. Das RPE und Endothelzellen besitzen daher spezielle Charakteristika. So übernimmt beispielsweise das eigentlich epithelial aufgebaute RPE durch die Nähr- und Sauerstoffversorgung der Photorezeptoren auch endotheliale Funktionen. Dieses komplexe Abhängigkeitsverhältnis und der relativ hohe Umsatz des RPEs sowie der retinalen vaskulären Zellen führt zu einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit des Systems.

Entsprechend der unterschiedlichen Blutversorgung werden Pathologien der retinalen Endothelzellen in retinale vaskuläre Erkrankungen und die des RPEs in choroidale vaskuläre Erkrankungen eingeteilt (Campochiaro, 2015).

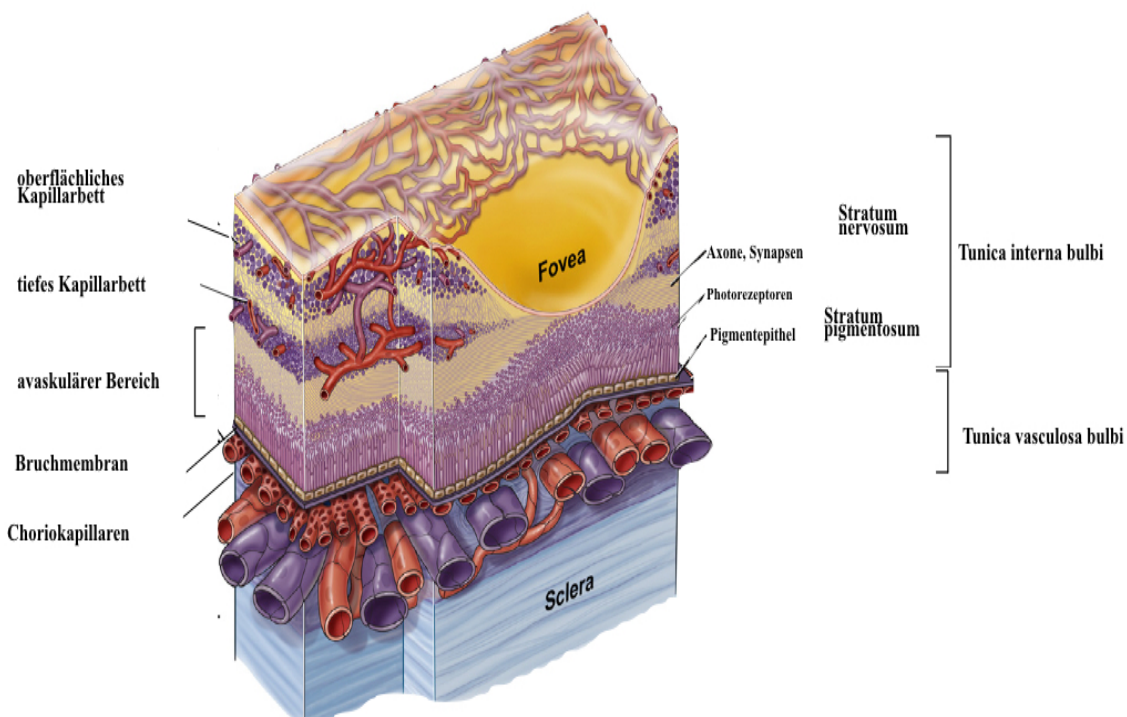


Abbildung 1: Anatomischer Aufbau und Blutversorgung des Auges

Gefäßversorgung von Retina und Choroidea am Punkt des schärfsten Sehens (Fovea) Tunika interna bulbi mit Stratum nervosum und Stratum pigmentosum, sowie die Tunika vasculosa bulbi und enthaltenen Strukturen. Verändert nach (Kur et al.).

1.2 Retinale und choroidale Gefäßpathologien

Im menschlichen Körper sind unterschiedliche Typen des Gefäßwachstums bekannt. Bei der pränatalen Entwicklung der Blutgefäße im Embryo spricht man im Allgemeinen von der Vaskulogenese. Hier differenzieren sich Angioblasten zu Endothelzellen, die sich weiter zu einem vaskulären Labyrinth entwickeln. Ein Aussprossen von neuen Gefäßen aus schon existierenden Gefäßen wird als Angiogenese bezeichnet.

In gesunden, adulten Endothelzellen sorgen Faktoren, wie der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), der NOTCH-Faktor, Angiopoetin (ANG) und der Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) für eine regulierte Angiogenese, die die physiologische Weiterentwicklung und Anpassung des vaskulären Systems sichert.

Unter Neovaskularisierung (NV) wird eine entkoppelte Angiogenese verstanden, die bei fehlender Regulierung pathologisch exzessive Formen annimmt. Durch NV entstandene Gefäße sind oft unausgereift, undicht und neigen folglich häufig zu Blutungen. Das Resultat sind Gewebeveränderungen und Fibrosen, die die Struktur und Funktion des betroffenen Gewebes letztendlich völlig zerstören können (Grisanti and Tatar, 2008, Tatar et al., 2008).

Besonders im Auge können solch pathologisch veränderte Gefäße großen Schaden anrichten, weswegen NV assoziierte retinale und choroidale Gefäßerkrankungen zu den häufigsten Ursachen von Visusverlust und Erblindung gehören.

Pathologien, die retinale Neovaskularisierung auslösen, sind primär proliferativ (Miller et al., 2013). Sie beginnen meist mit einem Gefäßverschluss, der eine ausgeprägte retinale Ischämie auslöst. Die anschließende überschießende angiogene Reaktion führt letztendlich zur NV. Als Beispiele für proliferative NV sind Erkrankungen wie die Frühgeborenen-Retinopathie (ROP), Diabetische Retinopathie (DR) und retinale Venenverschlüsse (RVO) zu nennen (Campochiaro, 2015).

Bei Frühgeborenen ist die retinale Gefäßentwicklung noch nicht abgeschlossen. Die unterentwickelten Gefäße können den Anforderungen der sich entwickelnden Retina nicht bestehen. Es entsteht eine relative retinale Hypoxie bis hin zur vollständigen Ischämie (Miller et al., 2013). Das verzögerte retinale Gefäßwachstum wird in der initialen Phase durch die Behandlung im Brutkasten verstärkt. Die Versorgung der Säuglinge mit Sauerstoff löst zunächst eine Hyperoxie aus, die die Sauerstoffversorgung der Retina sicherstellt.

Im weiteren Verlauf kommt es jedoch aufgrund der mangelnden Gefäßversorgung bei steigenden metabolischen Anforderungen der Retina zu einer relativen retinalen Hypoxie. Die zweite Phase der ROP ist durch vermehrte Bildung von VEGF und anderen proangiogenen Faktoren gekennzeichnet, die ein proliferatives Wachstum von abnormen, geschwächten Blutgefäßen hervorrufen.

Durch Einblutungen in das Gewebe steht als terminale Konsequenz ein Glaskörpererguss und das Ablösen der Retina bevor.

Die Vermutung, dass die zweite Phase der Erkrankung durch die Entwöhnung der Kinder von der Sauerstofftherapie ausgelöst werden könne, wurde widerlegt, da diese auch schon im Brutkasten auftreten kann (Penn et al., 2008, Smith, 2008).

Im Gegensatz zur ROP wird die DR primär durch Durchlässigkeitsprobleme hervorgerufen. Hier führt die chronische Hyperglykämie der an Diabetes erkrankten Patienten zu erhöhtem oxidativem Stress und subklinischen Entzündungssignalen. Diese lösen über eine verstärkte Produktion von angiogenen Faktoren vaskuläre Veränderungen aus, die sich unter anderem über den Verlust der Endothelzellverbindungen manifestieren. Kleine Endothelverletzungen und das Versagen der Blut-Retina-Schranke sind die Folge (Penn et al., 2008, Miller et al., 2013). Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung von Ergüssen und Microaneurismen, die im retinalen Gewebe zu exsudativen Ablagerungen führen. Erreicht das Ödem die Makula, wird es als Diabetisches Makulaödem (DME) bezeichnet und kann zu starkem Verlust der visuellen Aktivität führen. Dieser Zustand wird als nicht-proliferative diabetische Retinopathie (NRPD) beschrieben, die von einer abnormen vaskulären Durchlässigkeit ausgeht.

NRPD kann in eine proliferative Form (PDR) übergehen. Für PDR ist das Wachstum von neuen Blutgefäßen (NV) an der Oberfläche der Retina charakteristisch. Diese sind vergleichbar mit solchen, welche bei später ROP auftreten.

Die neuen Blutgefäße sind instabil und können leicht in die Retina und den Glaskörper einbluten. Eine hierdurch ausgelöste Trübung des Glaskörpers kann zur drastischen Verminderung der Sehleistung führen. Weiter kann eine fortschreitende PDR die Entstehung von fibrovaskulärem Narbengewebe auslösen, die von der Retina bis in den Glaskörperraum reichen kann. Unbehandelt kommt es zur Retinaablösung und Erblindung (Penn et al., 2008).

Choroidale Pathologien, wie die Altersbedingte Makuladegeneration (AMD), welche mit NV einhergehen kann, gilt als eine Kombination aus Proliferations- und Durchlässigkeitsstörungen (Miller et al., 2013).

Die AMD stellt eine komplexe Krankheit dar, die in den Industrieländern der Hauptgrund für Erblindung bei Personen über 50 Jahren darstellt (Bourne et al., 2014).

Die Erkrankung verläuft in mehreren Stadien: von frühen subklinischen Veränderungen des choroidal-retinalen Pigmentepithels bis hin zu fortgeschrittenen atrophischen oder fibrovaskulären Veränderungen. Je nach Schweregrad der Pathologie ist eine degenerative, funktionell inaktive Retina gekoppelt mit dem Verlust der zentralen Sehschärfe.

Diese kann bis zu 80% betragen, falls die NV in den makulären Bereich der Retina vorschreitet. Die initialen Stimuli dieser Erkrankung sind altersbedingte Veränderungen des RPEs und der Bruchmembran. Das RPE besitzt viele metabolische und suppurative Funktionen, die für die Versorgung und somit den Erhalt der Photorezeptoren unabdingbar sind. Hierzu gehören unter anderem der Erhalt der äußeren Blut-Retina-Schranke, Produktion von Vitamin A für die Sehkaskade sowie Phagozytose der konstant abgeschliffenen äußeren apikalen Segmente der Photorezeptoren.

Gealterte RPE-Zellen verlieren häufig ihre hexagonale Morphologie, wodurch sowohl ihre Dichtigkeit als auch ihr Melanosomengehalt abnimmt. Melanin agiert in gesunden RPE-Zellen als Schutz vor oxidativen Schäden. Ohne diesen Schutzschild kann Lipofuscin akkumulieren, die RPE-Zelle übersättigen und den biochemischen Kreislauf limitieren. Apoptose und Zelltod sind die Konsequenz.

Weiter können sich amorphe Ablagerungen (Drusen) und metabolische Abfälle zwischen RPE und der inneren, kollagenen Schicht der Bruchmembran anhäufen, was eine verminderte Diffusion zwischen Choroidea und RPE bedingt. Die Folge ist auch hier Apoptose der RPE-Zellen sowie der angrenzenden Photorezeptoren durch die fehlende Sauerstoffversorgung.

Resultierend tritt eine geografische Atrophie (GA) als „trockene“ Verlaufsform der AMD auf. Diese zeichnet sich durch den RPE-Zelltod mit gleichzeitiger Atrophie der aufliegenden Photorezeptorzellen und der unterhalb liegenden choroidalen Blutgefäße aus. Die Krankheit schreitet mit einer Abnahme der Drusen fort, die atrophisierte Areale hinterlassen.

Über noch nicht genau geklärte Vorgänge kann die trockene AMD auch in eine choroidale NV übergehen, indem Gefäße die Bruchmembran überschreiten.

Dieser Krankheitsverlauf wird als „feuchte“ AMD bezeichnet und verschlechtert die Prognose drastisch. Die durch den Verlust von choroidalen Gefäßen ausgelöste Hypoxie induziert die Entstehung eines neovaskulären Komplexes. Dieser kann sich bis in subretinale Bereiche ausbreiten. Die neu entstandenen Gefäße sind meist für seröse Flüssigkeiten undicht, neigen zu Blutungen und können sich zu fibrovaskulärem Gewebe entwickeln (Grisanti and Tatar, 2008).

Die zentrale Rolle in der Entwicklung von NV spielt bei den genannten Erkrankungen der proangiogene Faktor VEGF. Es konnte beobachtet werden, dass über die alleinige Reduktion des VEGF-Spiegels die Entwicklung eines vaskulären Systems unterdrückt werden kann (Campochiaro, 2015).

1.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Das homodimere Glykoprotein „vascular endothelial growthfactor“ wurde bereits 1983 von Senger als „vascular permeabilityfactor“ (VPF) beschrieben. Als Heparin-bindender endothelialer Wachstumsfaktor mit einer Molekülmasse von 45 kDa gilt es als potenter, mitogener Faktor für Endothelzellen und wirkt aufgrund der sekretorischen Signalsequenz vor dem NH₂-Terminus als sekretorisches Protein (Leung et al., 1989).

VEGFs gehören zur „platelet derived growth factor“-Familie (PDGF) und bestehen aus zwei Monomeren, die antiparallel angeordnet ein Dimer bilden. Das Dimer besitzt somit an jedem Pol ein Rezeptorbindeelement.

Die meisten VEGF-Proteine liegen als Homodimere vor. Es sind jedoch auch Heterodimere aus VEGF-A und dem „placental growth factor“ (PLGF) bekannt (Olsson et al., 2006).

VEGF ist essenziell für verschiedene biologische Signalwege. So gilt es aufgrund seiner Förderung von Proliferation, Differenzierung, Migration und Invasion der Basalmembran als angiogenes, vaskulogenes und lymphatisches Überlebenspeptid. Als Teil einer Signalkaskade soll es die Sauerstoffversorgung wiederherstellen, falls der Blutfluss reduziert ist. VEGF trägt somit zur Bildung neuer Blutgefäße bei, um einen durch hypoxische Bedingungen ausgelösten Gefäß- und Gewebetod zu verhindern. Zusätzlich erhöht es die Permeabilität bestehender Gefäße (darum der ursprüngliche Name „vascular permeability factor“).

Endothelzellen selbst produzieren kein VEGF, sondern werden über VEGF-produzierenden Perizyten und vaskulären Stromazellen durch deren parakrine Sekretion von VEGF stimuliert (Crafts et al., 2015).

Die Regulation der VEGF-Genexpression wird bedeutend über den Sauerstoffpartialdruck beeinflusst. Dazu sind Endothelzellen mit Sauerstoffrezeptoren und hypoxieinduzierten Faktoren, wie der Hydroxylasedomäne (PHD) und dem hypoxieinduzierten Faktor (HIF) ausgestattet. Diese dienen indirekt einer Änderung der Morphologie der Endothelzellen und somit einer Änderung des Blutflusses, um die Sauerstoffversorgung des Gewebes zu regulieren (Carmeliet and Jain, 2011, Grisanti and Tatar, 2008). Die autokrine und parakrine Sekretion weiterer Faktoren kann ebenfalls auf eine lokale Hypoxie hinweisen und die VEGF-Expression positiv beeinflussen. Neben den HIF-Wachstumsfaktoren spielen der epidermale Wachstumsfaktor, der TGF-alpha, der TGF-beta, der Keratinozyten Wachstumsfaktor, der Insulin-like Wachstumsfaktor1 sowie FGF und PDGF eine Rolle. Ebenfalls können entzündungsvermittelte Zytokine wie IL-1alpha und IL-6 sowie die onkogene Mutation von Ras in die VEGF-Expression eingreifen (Ferrara et al., 2003).

Ist nun die VEGF-Konzentration erhöht, kommt es zu einer pathologischen Transformation der Gefäßversorgung. Diese reicht von Veränderung der Permeabilität der Gefäße bis hin zu Umgestaltungen des vaskulären Netzwerks im Sinne von NV (Miller et al., 2013).

Die humane VEGF-Familie besteht aus VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PLGF (Placental Growth Factor, gleicht VEGF zu 50% und kommt in der Plazenta vor). VEGF-E wurde in Parapoxviren gefunden, während VEGF-F in Schlangengift vorkommt. Beide zählen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur VEGF-Familie.

Die Untergruppe VEGF-A wird in der Literatur und auch in dieser Arbeit allgemein mit VEGF bezeichnet und lässt sich weiter in verschiedene Untergruppen einteilen.

Das VEGF-Gen ist 14kb groß und auf Chromosom 6p 21.3 lokalisiert. Es beinhaltet acht Exone und sieben Introne, die durch alternatives Spleißen fünf verschieden aufgebaute VEGF-Isoformen ergeben (Patil et al., 2012). Die codierenden Aminosäuren der Exone 1-5 und 8 sind in jeder VEGF-Isoform identisch. Alternatives Spleißen tritt lediglich in Exon 6 und 7 auf, welche jeweils für zwei bestimmte Heparinbindedomänen codieren (Hoeben et al., 2004).

Je nach Kettenlänge unterscheidet man zwischen VEGF-A-121, VEGF-A-145, VEGF-A-165, VEGF-A-189 und VEGF-A-206, wobei die hintere Zahl die Anzahl an Aminosäuren angibt (Abbildung 2). Die VEGF Isoformen unterscheiden sich je nach An- oder Abwesenheit von Exon 6 und 7 in ihrer Kettenlänge, der proteolytischen Spaltung und der Affinität zu Neuropilin (NRP) und zu den VEGF-Rezeptoren. Ein besonders wichtiger Unterschied zwischen den verschiedenen proteinogenen Isoformen ist jedoch die unterschiedliche Affinität zu Heparin und Heparinsulfat. Diese bestimmt die Bindeeigenschaft des VEGFs zum Rezeptor und ob das VEGF-Molekül löslich oder gebunden vorliegt (Patil et al., 2012).

Beispielsweise liegt aufgrund der fehlenden Heparin-Bindeeigenschaft von VEGF-121 dieses löslich vor. VEGF-189 hingegen ist durch Bindung von Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) weniger löslich und daher auf der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix (ECM) gebunden.

Da VEGF-189 jedoch auch löslich vorliegen kann, zeigt, dass sowohl alternatives Spleißen als auch proteolytische Spaltung zu nicht-Heparin-bindenden VEGF-Isoformen führt (Ferrara, 2009).

Alle ursprünglichen Isoformen wurden in Linse, Sklera, Retina, Iris und Glaskörper nachgewiesen. Besonders die Isoformen VEGF-121, VEGF-145 und VEGF-165 sind in einen direkten Zusammenhang mit der Angiogenese zu bringen, wobei VEGF-165 als potenteste und wichtigste Isoform gilt.

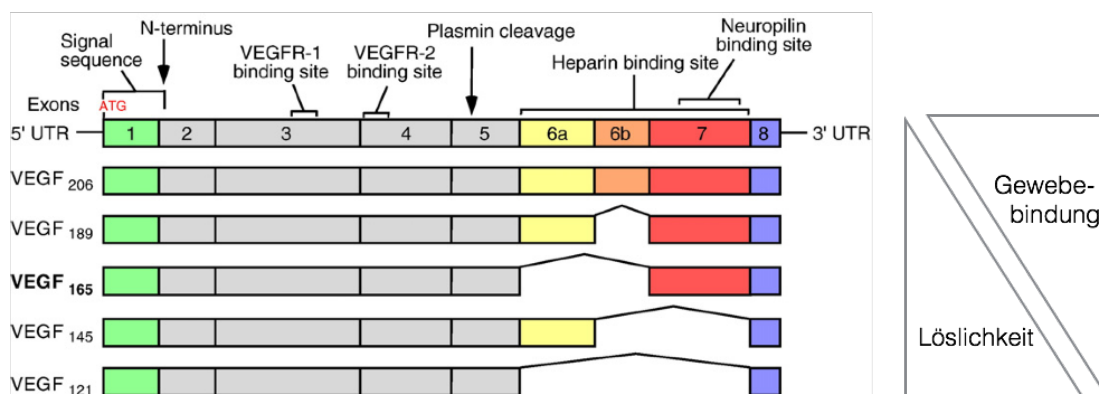


Abbildung 2: Struktur des VEGF-Gens

Grafische Darstellung der vier Hauptisoformen des VEGF-A. Alternatives Spleißen der Exone 6, 7 und 8 ergeben unterschiedliche Isoformen. Die Isoformen unterscheiden sich in Größe, Molekulargewicht und Bindungsdomänen. Die resultierend unterschiedliche Affinität zur extrazellulären Matrix beeinflusst die Löslichkeit. Verändert nach (Holmes et al., 2007)

1.3.1 VEGF-Rezeptoren

VEGF wirkt wie beschrieben sowohl als Schlüsselregulator der physiologischen Angiogenese während der embryonalen Entwicklung als auch bei der pathologischen Angiogenese, während des Tumorwachstums und der intraokularen Neovaskularisation. Seine biologischen Effekte werden dabei über Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) vermittelt.

Hierbei bindet VEGF-A an zwei verschiedene RTKs, VEGF- Rezeptor-1 (VEGFR-1) und VEGF- Rezeptor-2 (VEGFR-2). Der VEGFR setzt sich extrazellulär aus sieben immunoglobulinähnlichen Domänen zusammen. Eine einzelne Transmembrandomäne verbindet diese mit einer intrazellulären Tyrosinkinasesequenz, welche durch eine Kinaseinsert-Domäne unterbrochen ist und mit einem C-terminalen Schwanz endet (Ferrara et al., 2003).

Die VEGF-Bindung des Rezeptors löst dessen Dimerisierung aus, welche wiederum eine ligandenabhängige Tyrosinautophosphorylierung induziert. In der Folge kommt es zu einer Aktivierung von spezifischen intrazellulären Proteinen wie der Phospholipase C (PLC), den Phosphoinositid-3-Kinasen (PI-3 Kinase), des Ras GTPase aktivierenden Proteins und des „Growth factor receptor bound protein“-2 (Grb2). Schließlich wird der Raf/Mek/Erk-Signalweg aktiviert und die Proliferation ausgelöst (Abbildung. 3).

Je nach Liganden und Interaktionspartnern können diese intrazellulären Veränderungen schlussendlich zu angiogenen Reaktionen der Zelle führen (Crafts et al., 2015).

Die Regulation der VEGFR-Expression wird vor allem durch das Vorhandensein von VEGF beeinflusst und ist nur sekundär abhängig von hypoxiestabilisierten HIFs, die an spezifische Promotorregionen von VEGF aber auch von VEGFR binden.

VEGFR1, murin auch FLt1 genannt, kommt vor allem auf Endothelzellen und Monozyten vor und bindet sowohl VEGF-A als auch VEGF-B und PLGF. Die VEGF- Bindestelle liegt, genau wie bei VEGFR-2, in der zweiten immunoglobulinähnlichen Domäne. Durch alternatives Spleißen kann eine lösliche Form des Rezeptors entstehen.

VEGFR-1 besitzt bei VEGF-Bindung eine nur schwache Tyrosinkinase- und Autophosphorylierungsaktivität und gilt somit als VEGF-Inhibitor. Auch Mutationen an der Tyrosinkinase ändern seine Bindeeigenschaften zu VEGF nicht wesentlich, weswegen VEGFR-1 als Lockvogelrezeptor gilt. Durch dieses Prinzip wird VEGF abgefangen und steht dem VEGFR-2 nicht mehr zur Verfügung.

Der VEGFR-2 ist Hauptmediator der VEGF-Wirkung und somit auch primärer Aktivator der VEGF-induzierten Angiogenese. Er gehört zu den Rezeptoren mit enthaltener Kinasedomäne (KDR) und kommt sowohl auf Endothelzellen, als auch hämatopoetischen Stammzellen, Megakaryozyten und retinalen Progenitorzellen vor. VEGFR-2 bindet alle VEGF-Formen A bis -E.

VEGFR-3 kommt ausschließlich in lymphatischen Gefäßen vor, wo er mittels VEGF-C und -D die Lymphangiogenese fördert (Ferrara et al., 2003, Crafts et al., 2015).

1.3.2 VEGF Co-Rezeptoren

VEGF kann über die Interaktion mit Co-Rezeptoren seine Wirkung durch VEGFRs modifizieren. Dabei spielt Neuropilin (NRP) eine entscheidende Rolle.

NRP ist ein 130kDa großes Zelloberflächen-Glykoprotein, welches erstmals als semaphoriner Rezeptor in der neuronalen Steuerung entdeckt wurde.

Das Transmembranmolekül ist in erster Linie wichtig für die neuronale Signalweiterleitung über die Bindung von Klasse 3 Semaphorine der Axonmoleküle. Jedoch kann NRP auch die Blutgefäßausbildung und Tumorangio-genese über die Bindung von bestimmten VEGF-Formen beeinflussen. Die NRP-1 Isoform dient als spezifischer Rezeptor für VEGF, wobei es die VEGF-145, -165, VEGF-B und PLGF-1 binden kann. Die VEGF-induzierte Proliferation und Migration von Zellen vermittelt durch den VEGFR-2 wird durch die Anwesenheit von NRP1 erhöht, wodurch es indirekt die Angiogenese in vivo fördert. Dabei bildet NRP einen Komplex mit VEGFR2 und nimmt so entscheidenden Einfluss auf die Ausformung des vaskulären Netzwerks.

Die proangiogene Funktion des NRP konnte unter anderem durch den additiven Effekt einer Anti-NRP-Therapie auf den Erfolg einer Anti-VEGF-Therapie bestätigt werden.

Das verwandte NRP-2 ist zu 44% homolog zu NRP-1 und bindet vor allem VEGF-145, VEGF-165, VEGF-C und PLGF-2. Seine Funktion übt NRP-2 sowohl in den sympathischen Neuronen als auch den lymphatischen Geweben aus (Takahashi and Shibuya, 2005, Geretti et al., 2007).

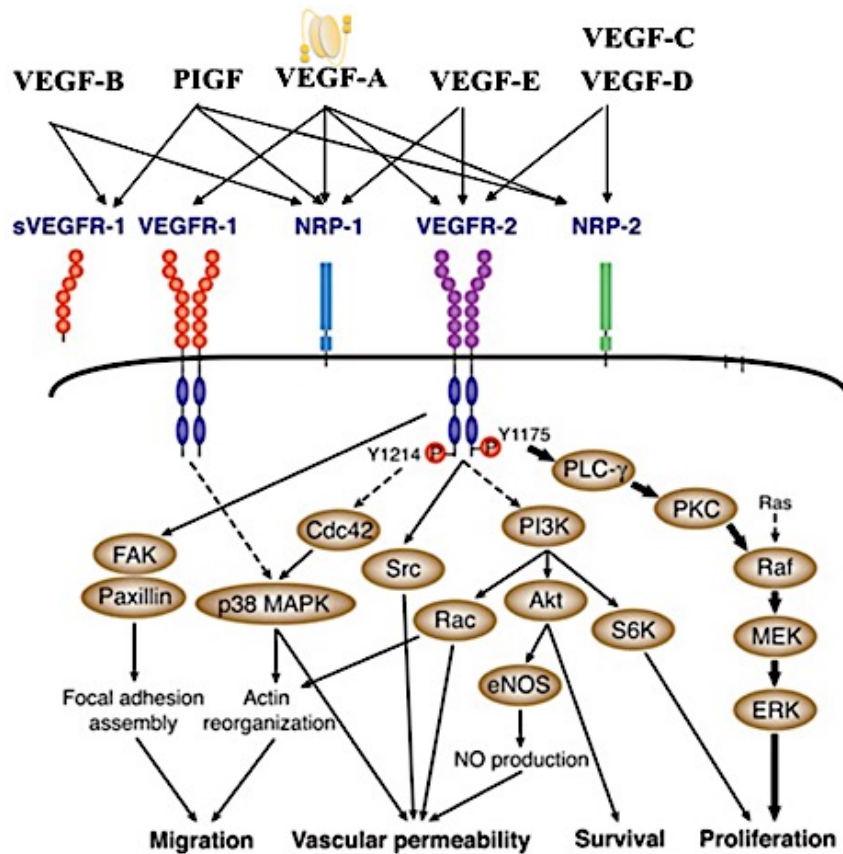


Abbildung. 3: Schematische Darstellung der Rezeptorbindungsspezifität der VEGF-Familie und des VEGFR-2 Signalwegs

Tyr1175 und Tyr 1214 sind die Hauptautophosphorylierungsdomänen in VEGFR2. Die Aktivierung der Signaltransduktion führt zu einer unterschiedlichen endothelialen Zellfunktion, wie Migration, vaskuläre Durchlässigkeit und Proliferation. Verändert aus (Takahashi and Shibuya, 2005).

1.4 Anti-VEGF-Therapie

Anti-VEGF ist der etablierte Name für alle Medikamente, die gegen eine pathologische, VEGF-induzierte NV entwickelt wurden. Sie binden und neutralisieren VEGF und verhindern somit die angiogene Wirkung in Verbindung mit dem VEGFR-2.

Die intravitreale Injektion von anti-VEGF-Molekülen ist vor der konservativen Laserkoagulation die Therapie der ersten Wahl bei intraokulärer NV. Derzeit sind vier anti-VEGF-Medikamente auf dem Markt, die sich in Gewicht, Struktur, Bindeeigenschaften zu VEGF und auch im Preis unterscheiden.

1.4.1 Pegaptanib

Pegaptanib (Macugen®) wurde als erstes der vier Medikamente im Herbst 2006 zugelassen. Laut FDA (U. S. Food and Drug Administration) soll eine Medikation von 0,3 mg Pegaptanib über intravitreale Injektionen alle sechs Wochen zur erfolgreichen Behandlung von AMD führen. Zu den Nebenwirkungen gehören Endophthalmitis, erhöhter Augeninnendruck und Anaphylaxis („Prescribing Information“ der FDA zu Macugen®, 2011).

Pegaptanib ist ein in vitro chemisch hergestellter Ribonukleinsäureaptamer, der an die Heparinbindestelle VEGF bindet und sich somit vor allem gegen die Isoform VEGF-165 richtet (Ng et al., 2006). Durch die Bindung wird eine Interaktion des VEGF-165 mit VEGFR2 und die einhergehende NV verhindert. Im Zuge der Wirkung von Pegaptanib werden jedoch auch Proteasen aktiviert, die VEGF-165 spalten und non-heparinbindende Fragmente produzieren. Diese Fragmente können der Pegaptanibblockade ausweichen und die Angiogenese weiter vorantreiben (Keane and Sadda, 2012).

Die VISION-Studie (VEGF-Inhibition Study in Ocular Neovaskularisation) untersuchte, inwiefern Pegaptanib eine effiziente Behandlungsmethode für AMD-Patienten darstellt. 70% der mit Pegaptanib behandelten Patienten hatten keinen weiteren moderaten Visusverlust (= weniger als 15 Zeilen der Sehschärfe) im Vergleich zu 55% der Kontrollgruppe. Höhere Dosen wie 1,0g und 3,0g schienen die klinische Wirksamkeit nicht zu verbessern. Insgesamt kam es trotz Behandlung zu einem Verlust von 1,5 Zeilen der Sehschärfe innerhalb eines Jahres (Keane and Sadda, 2012).

1.4.2 Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin®) ist ein monoklonaler Antikörper, der alle Isoformen des VEGFs binden kann. Das Medikament wurde ursprünglich zur intravenösen Gabe bei metastasierendem Kolorektalkarzinom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, metastasierendem Brustkrebs und Glioblastomen entwickelt. Bei diesen Erkrankungen soll eine Dosierung zwischen 5 und 10mg/kg erfolgen („Prescribing Information“ der FDA zu Avastin®, 2015).

Bevacizumab ist bislang für die intraokuläre Behandlung von AMD nicht zugelassen. Bei der *offlabel* Verwendung zur Therapie von intraokulärer NV werden geringere Dosen intravitreal injiziert, um die Wahrscheinlichkeit für Nebenwirkungen wie Bluthochdruck, Neigung zu Blutungen und Thrombose so gering wie möglich zu halten.

Bevacizumab ist ein 149 kDa langer Antikörper, der sich aus jeweils zwei schweren und leichten Ketten zusammensetzt. Er besteht zu 93% aus einer humanen Aminosäuresequenz und wurde über Humanisierung eines murinen VEGF-Antikörpers entwickelt (Meyer and Holz, 2011, Keane and Sadda, 2012). Ein entscheidender Nachteil bei der Behandlung mit den vollständigen Antikörpern besteht darin, dass das enthaltene „Fragment Crystallizable“ (Fc- Fragment) die Komplementkaskade aktiviert und zu Zelltod und steigenden Entzündungswerten führen kann (Tatar et al., 2008).

Die Vermutung, dass Bevacizumab als monoklonaler Antikörper sich nicht über alle retinalen Zelllagen verteilen könne, wurde mittlerweile widerlegt. Jedoch ist die genaue intraokuläre Pharmakokinetik des Mittels und das Ausmaß etwaiger systemischer Nebenwirkungen durch erhöhte Serumkonzentrationen bisher noch nicht bekannt (Meyer et al., 2011).

Sowohl die ABC-Studie 2010 (Avastin (Bevacizumab) for treatment of Choroidal Neovaskularisation) als auch die CATT Studien 2011 (Comparison of Age-related macular degeneration Treatment Trials) konnten eine Wirksamkeit von Bevacizumab bei AMD-Patienten nachweisen. Hier gewannen 32% / 31,3% der Patienten, die mit Bevacizumab behandelt wurden, 15 oder mehr Zeilen der Sehschärfe zurück. 91%/ 94% der behandelten Patienten verloren weniger als 15 Zeilen. Insgesamt konnte ein Gewinn von 7/8 Zeilen der Sehschärfe verzeichnet werden (Keane and Sadda, 2012).

1.4.3 Ranibizumab

Ranibizumab (Lucentis®) ist ein monoklonales Antikörperfragment, welches die Fähigkeit besitzt, alle VEGF-Formen zu binden. Laut Hersteller wird eine monatliche intravitreale Injektion von 0,5mg empfohlen, wobei auf Nebenwirkungen wie Endophthalmitis, Retinaablösung, steigender Augeninnendruck und arterielle Thrombose hingewiesen wird („Prescribing Information“ der FDA zu Lucentis®, 2010).

Ranibizumab ist aufgrund der Verwendung einer alternativen Fab-Variante, welche die Bindeeigenschaft zu VEGF signifikant verbessert, 5-20-fach potenter als Bevacizumab. Zudem ist Ranibizumab mit 48kDa deutlich kleiner als Bevacizumab (148kDa) (Meyer et al., 2008a, Keane and Sadda, 2012). Bei dem monoklonalen Antikörperfragment handelt es sich um ein chirales Molekül, das sowohl eine murine antigenbindende als auch humane nichtbindende Komponente, jedoch keinen Fc-Rezeptor enthält. Ranibizumab verlässt den Glaskörper und dringt sowohl in die Retina als auch in die choroidalen Gefäße ein. Die maximalen Serumkonzentrationen sind dosisabhängig gering und liegen bei 0,3 ng/ml- 2,36 ng/ml, was einer 100-fachen Verringerung der Konzentration im Glaskörper entspricht. Für die Zulassung von Ranibizumab bei AMD waren MARINA und ANCHOR-Studien entscheidend. Die MARINA-Studie (Minimally Classic/ Occult Trail of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular AMD) untersuchte Patienten mit minimal klassischen oder okkulten angiografischen Erkrankungen, die mit einer 0,3mg oder 0,5mg intravitreale Gabe von Ranibizumab behandelt wurden. Nach 12 Monaten hatte sich die Sehschärfe von 33,8% der Fälle in der 0,5mg Gruppe um 15 oder mehr Zeilen verbessert im Gegensatz zu nur 5% der Fälle der Kontrollgruppe. Insgesamt kam es zu einer Verbesserung von 7,2 Zeilen der Sehschärfe von Patienten, die mit Ranibizumab behandelt wurden, während Patienten ohne Therapie 10,4 Zeilen verloren. Bei 94% der Patienten konnte weiterer Visusverlust verhindert werden, im Gegensatz zu nur 62,2% der Patienten ohne Therapie (Keane and Sadda, 2012).

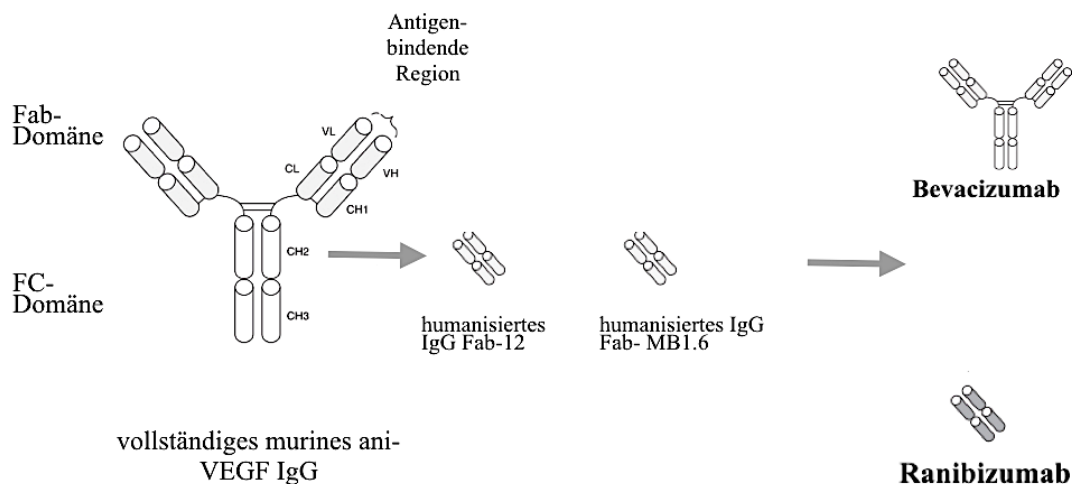


Abbildung 4: Ranibizumab und Bevacizumab schematisch

(CH) constant heavy domain; (CL) constant light domain; (VH) variable heavy domain; (VL) variable light domain; (Fab) fragment antigen binding; (Fc) fragment crystallizable. Verändert aus (Meyer and Holz, 2011)

1.4.4 Aflibercept (Eylea®)

Aflibercept (Eylea®) ist ein pharmakologisch generiertes Fusionsprotein, welches die aktuellste Weiterentwicklung von Anti-VEGF-Molekülen auf dem Markt darstellt.

Laut Hersteller werden 2mg intravitreale Injektionen alle 4-8 Wochen zur Behandlung von AMD empfohlen. Das Nebenwirkungsprofil ist ähnlich dem des Ranibizumab: Endophthalmitis und Retinaablösung sowie erhöhter Augeninnendruck und Thrombose.

Eylea wirkt als löslicher Lockvogelrezeptor („VEGF-Trap“) und bindet sowohl alle VEGF-Formen als auch PLGF („Prescribing Information“ der FDA zu Eylea®, 2011)(FDA, Revised:11/2011).

Das Medikament besteht aus den ligandenbindenden Elementen des VEGFR-1 und -2, die über ein Fc-Fragment des humanen Immunoglobulin G1 (IgG1) gebunden sind. Das 115 kDa große Protein bindet VEGF mit weitaus höherer Affinität als monoklonale Antikörper und kann so nicht nur in geringeren Dosen seine Funktion ausüben, sondern muss auch weitaus weniger frequentiert angewendet werden. Dies senkt sowohl die Gefahr der systemischen als auch der injektionsbedingten Nebenwirkungen. Verstoffwechselt wird Eylea durch Bildung von inaktiven Komplexen mit VEGF und Proteolyse, die durch den Fc-Rezeptor ausgelöst wird.

Die VIEW1 und VIEW 2-Studien (VEGF Trap-Eye: Investigation of Efficiency and Safety in Wet AMD) untersuchten Patienten mit monatlicher intravitrealer Injektion von 2

mg Eylea. Nach einem Jahr Behandlung zeigte sich eine Verbesserung von 10,9 Zeilen der Eylea-Gruppe im Gegensatz zur Verbesserung von 8,1 Zeilen bei Patienten die mit Ranibizumab behandelt wurden. Andere getestete Dosen ergaben keinen statistischen Unterschied zur Behandlung mit Ranibizumab (Keane and Sadda, 2012, Holash et al., 2002).

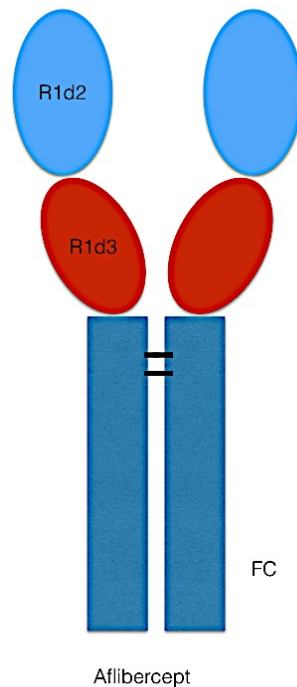


Abbildung 5: Aflibercept

(Fc) Fragment crystallizable region, (R1d2) Ig-Domäne2 des VEGFR-1, (R2d3) Ig-Domäne des VEGFR-2, (schwarze Balken) Disulfidbrücken. Verändert nach Platania, 2015

1.5 Nachteile der aktuellen Anti-VEGF Behandlungsmethoden

Durch die intravitreale Injektion des Anti-VEGF-Wirkstoffes kann eine maximale Konzentration direkt am Wirkungsort erzielt werden. Der Glaskörper dient hier als Reservoir, das stetig geringe Mengen des Medikaments abgeben kann und so hohe Serumkonzentrationen verhindert. Die Gefahr von systemischen Nebenwirkungen je nach Behandlungsmittel erscheinen also mehr oder weniger gering.

Ein wesentlicher Nachteil der invasiven Injektion sind jedoch Risiken, die unabhängig vom Wirkstoff auftreten. Dazu gehören seltenere schwere Nebenwirkungen, wie Endophthalmitis, Ablatio retinae oder Uveitis, aber auch häufigere mildere Nebenwirkungen wie

leichte Schmerzen, Fremdkörpergefühl, Glaskörperverflüssigung, temporärer Augeninnendruckanstieg und kleine subkutane Blutungen. Auch die leichte Vernarbung der Bindehaut ist nach multiplen Injektionen möglich.

Abgesehen davon ist das Volumen des Glaskörpers und somit auch die injizierbare Menge des Anti-VEGF-Moleküls begrenzt. Resultierend wird der Wirkstoff vergleichsweise zügig aus dem Glaskörperraum eliminiert. Um die Effekte der Behandlung aufrecht zu erhalten, ist also eine hochfrequente Wiederholung der mit Risiken behafteten intravitrealen Injektion nötig (Meyer et al., 2008b).

Jedoch kommt eine in standardisierten Abständen frequentierte Injektion den individuellen Bedürfnissen der Patienten nicht nach, da ein pathologischer VEGF-Spiegel von Patient zu Patient und im Verlauf der Erkrankung individuell variiert. Des Weiteren wird das Anti-VEGF-Molekül patientenabhängig unterschiedlich schnell metabolisiert.

Eine bedürfnisorientierte Anti-VEGF-Behandlung ist allerdings aktuell nicht möglich, da Schlüsselsymptome zur Diagnose, wie verminderte visuelle Sehschärfe (VA) und das Monitoring über spektrale optische Kohärenztomographie (OCT), einen Anstieg des VEGF-Levels erst mit Verspätung anzeigen.

Eine Verbesserung des Monitorings des VEGF-Spiegels könnte also zur signifikanten Optimierung der Diagnostik und somit auch der individuellen Behandlung von VEGF-induzierten Pathologien dienen (Muether et al., 2012).

1.6 Die Ranibizumab „single chain variable fragment“ Variante Ra02

Die Arbeitsgruppe für experimentelle Ophthalmologie in Gießen forscht derzeit unter anderem an Verbesserungsmöglichkeiten der Anti-VEGF-Therapie.

Dazu wurde bereits auf Grundlage von Ranibizumab ein codon- optimiertes Anti-VEGF-Molekül entwickelt, mit dem weiter experimentiert wird. Im Zuge der Forschungen wurde das offene Leseraster (ORF, open reading frame) der schweren und leichten Kette von Ranibizumab in einen Vektor unter Kontrolle eines CMV-Promotors kloniert, in dem sie durch eine IRES (internal ribosomal entry site) getrennt vorliegen (Stieger et al., 2009, Wimmer et al., 2016). Zunächst wurde das Stoppcodon der leichten Kette sowie die IRES und die kappa leader Sequenz der schweren Kette deletiert. Über die Insertion eines Linkers aus sechs Glycinen zwischen den Ketten konnte nun ein F(ab)-Fragment generiert werden, das aus nur einem Molekül besteht. Durch Expression können so variable Einzelketten-Fragmente (single chain variable fragments [scFv]) des Ranibizumab generiert werden, die VEGF binden und als Ra02 bezeichnet werden.

Die VEGF-Bindeeigenschaften dieses Ra02-Konstruktes sind zwar geringer als die des Lucentis®, jedoch wird auch die maximale Hemmung von VEGF schon bei geringeren Dosen erreicht. Auch die Inhibition der Zellmigration ist unter beiden Anti-VEGF-Mitteln vergleichbar. Weitere Forschungen werden von der Arbeitsgruppe in Gießen auf Grundlage dieser schon bestehenden Ergebnisse angestellt: Beispielsweise wird untersucht, ob durch einen Gentransfer von Ra02 und anderen anti-VEGF-Molekülen in die Retina eine langfristige Synthese von anti-VEGF-Molekülen am Zielort ermöglicht werden kann. Aber auch die Verbesserung des VEGF-Monitoring in Hinblick auf eine non-invasive VEGF-Quantifizierung wird auf Grundlage von Ra02 erforscht (Wimmer et al., 2015).



Abbildung 6: Ra02

(CMV) Cytomegalievirus Promotor, (kl) sekretorische kappa leader Sequenz, (Ra02-L) leichte Kette des codon-optimierten Ranibizumabs, (L) 6x Glycin-Linker, (Ra02-H) schwere Kette des codon-optimierten Ranibizumabs, (pA) Poly-A. Aus (Wimmer et al., 2015)

1.7 VEGF Nachweis durch Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer

Um die anti-VEGF-Therapie zu verbessern und zu individualisieren, ist der Nachweis der aktuellen VEGF-Konzentration im Auge der Patienten unumgänglich. VEGF lässt sich heutzutage nur nach invasiver Gewinnung einer Kammerwasserprobe in vitro unter anderem über ein „Enzyme linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) nachweisen. Jedoch birgt dieser Eingriff gewisse unter 1.5 genannte Risiken (Noma et al., 2008, Campochiaro et al., 2009).

Eine Möglichkeit der non-invasiven in-vivo Bestimmung der aktuellen VEGF-Konzentration im Auge könnte über den Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET) erreicht werden. Biosensoren bieten bereits eine schnelle und sensitive Quantifizierung eines großen Spektrums von Analytika.

Der Resonanz-Energie-Transfer (RET) wurde erstmalig 1948 durch den Physiker Theodor Förster charakterisiert. Es handelt sich um einen physikalischen Prozess, der das Phänomen beschreibt, wie die Energie eines angeregten Farbstoffes (Donor) strahlungsfrei auf einen zweiten Farbstoff (Akzeptor) übertragen wird. Dabei geht die Energie des Donorfärbstoffs nicht in Form eines Photons, sondern durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf den Akzeptor über, der diese beispielsweise in Form von Strahlung wieder abgeben kann. Während die Strahlungsintensität des Donors durch den Energieübertrag also abnimmt, kann eine Zunahme der Strahlung des Akzeptors beobachtet werden. Voraussetzung für einen Energieübertrag ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (Förster, 1948).

Das System des strahlungsfreien Energieübertrags wird zunehmend für die Darstellung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) in vitro aber auch in lebenden Zellen und Geweben genutzt. Auf Grundlage des RET wurden BRET und der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) entwickelt.

BRET und FRET können bei 37°C in lebenden Zellen, Zelllysaten und aufgereinigten Proteinen in Echtzeit gemessen werden. Der Hauptunterschied zwischen beiden Techniken besteht darin, dass FRET einen Energieübertrag zwischen zwei Fluorophoren beschreibt, wobei der Donor durch extrinsische Strahlung angeregt werden muss und anschließend Energie auf den fluoreszierenden Akzeptor überträgt (Heyduk and Heyduk, 2002).

Beim Energieübertrag des BRET-Systems hingegen produziert der biolumineszente Donor durch katalytische Substratumwandlung selbst Energie, durch die wiederum ein spezifisches Akzeptorfluorophor angeregt wird (Xu et al., 1999). Die Vorteile von BRET gegenüber FRET liegen darin, dass eine Anregung des Donors über Strahlung nicht nötig ist. Folglich werden Photobleaching, Autofluoreszenz und gleichzeitige Anregung von Donor und Akzeptor vermieden und eine Untersuchung von lichtsensitiven Geweben ermöglicht (Pfleger and Eidne, 2006).

Die Effizienz des Resonanz-Energietransfers hängt von den durch Förster beschriebenen verschiedenen Faktoren ab: (1) dem Abstand zwischen Energiedonor und Energieakzeptor, (2) der Qualität der Überlappung der Emission des Energiedonors und der Anregung des Energieakzeptors und (3) der Parallelität bzw. dem Winkeln zwischen dem Dipolmomenten des Energiedonors und Energieakzeptors zueinander (Förster, 1948).

Der optimale Donor-Akzeptor-Abstand liegt zwischen 0,5 und 10 nm. Dies ergibt sich aus Berechnungen wonach die Effizienz des Energietransfers umgekehrt proportional zur sechsten Potenz der Distanz zwischen Donor und Akzeptordipol sei. Ein Energieübertrag ist also nur dann möglich, wenn das Akzeptorfluorophor in ausreichende Nähe, sprich weniger als 10nm, zum Donor gebracht wurde (Dragulescu-Andrasi et al., 2011). Diese Distanz ist vergleichbar mit der Dimension, in der sich biologische Makromolekülkomplexe bewegen und folglich lässt sich BRET auf Protein-Protein-Interaktionen (PPI) anwenden.

Der zweite Faktor der entscheidend die BRET-Signalstärke beeinflusst, ist der Grad der Überlappung des Donoremissionsspektrums und des Akzeptorextinktionsspektrums. Die Anregungswellenlänge des Akzeptors sollte also möglichst dem Emissionsmaximum des Donors entsprechen.

Als dritten Faktor wird die räumliche Orientierung von Energiedonor zu Energieakzeptor genannt. Für einen optimalen Energieübertrag liegt der Emissionsdipol des Donors in einer Ebene mit dem Anregungsdipol des Akzeptors (siehe Abbildung 7). Zusätzlich wichtig für die Funktion des jeweiligen BRET-Systems ist die Substratabhängige Quantenausbeute und dessen Zerfall (Pfleger and Eidne, 2006).

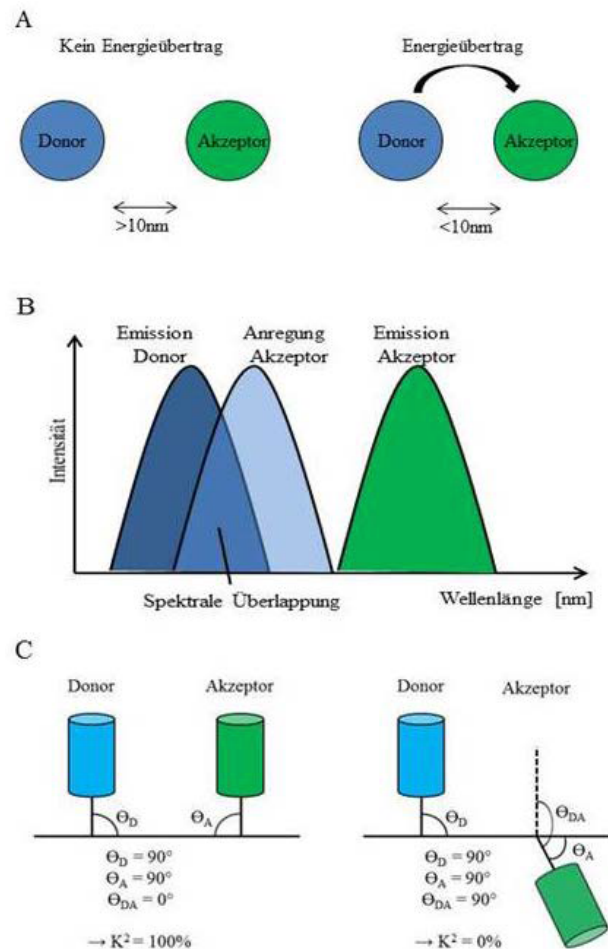


Abbildung 7: Abhängigkeiten des Resonanz-Energietransfers

(A) Distanz zwischen Energiedonor und Energieakzeptor. (B) Spektrale Überlappung Energiedonor Emission und Anregung Energieakzeptor. (C) Parallelität bzw. Winkel zwischen den Dipolmomenten von Energiedonor und Energieakzeptor (K^2 : Übertragungskoeffizient). Aus (Wimmer, 2019)

Xu et al. etablierten 1999 den ersten BRET-Assay, welcher kontinuierlich im Sinne von nummerierten BRET-Versionen weiterentwickelt wurde.

Heutige BRET-Verfahren nutzen meist die *Renilla reniformis* Luziferase (RLuc) oder verwandte Formen als Energiedonor. Varianten mit brauchbaren spektralen Überlappungseigenschaften des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP) dienen meist als Energieakzeptor.

Coelenterazine (CLZ), ein kleines hydrophobes Molekül, kann als Substrat von RLuc Zellmembranen überqueren und erlaubt so die Analyse auch in intakten Zellen (Yamakawa et al., 2002). RLucs emittieren Strahlung in Abhängigkeit von deren Substrat Coelenterazine oder dessen Derivaten mit Emissionsmaxima von beispielsweise $\lambda_{em1/4} = 480\text{nm}$ für natives CLZ (nCLZ) und $\lambda_{em} = 400\text{nm}$ für CLZ400a. Durch die Überlappung der Anregungsmaxima von beispielsweise GFP wird anschließend Strahlung im höheren Wellenlängenbereich erzeugt (siehe Abbildung 8) (De et al., 2007).

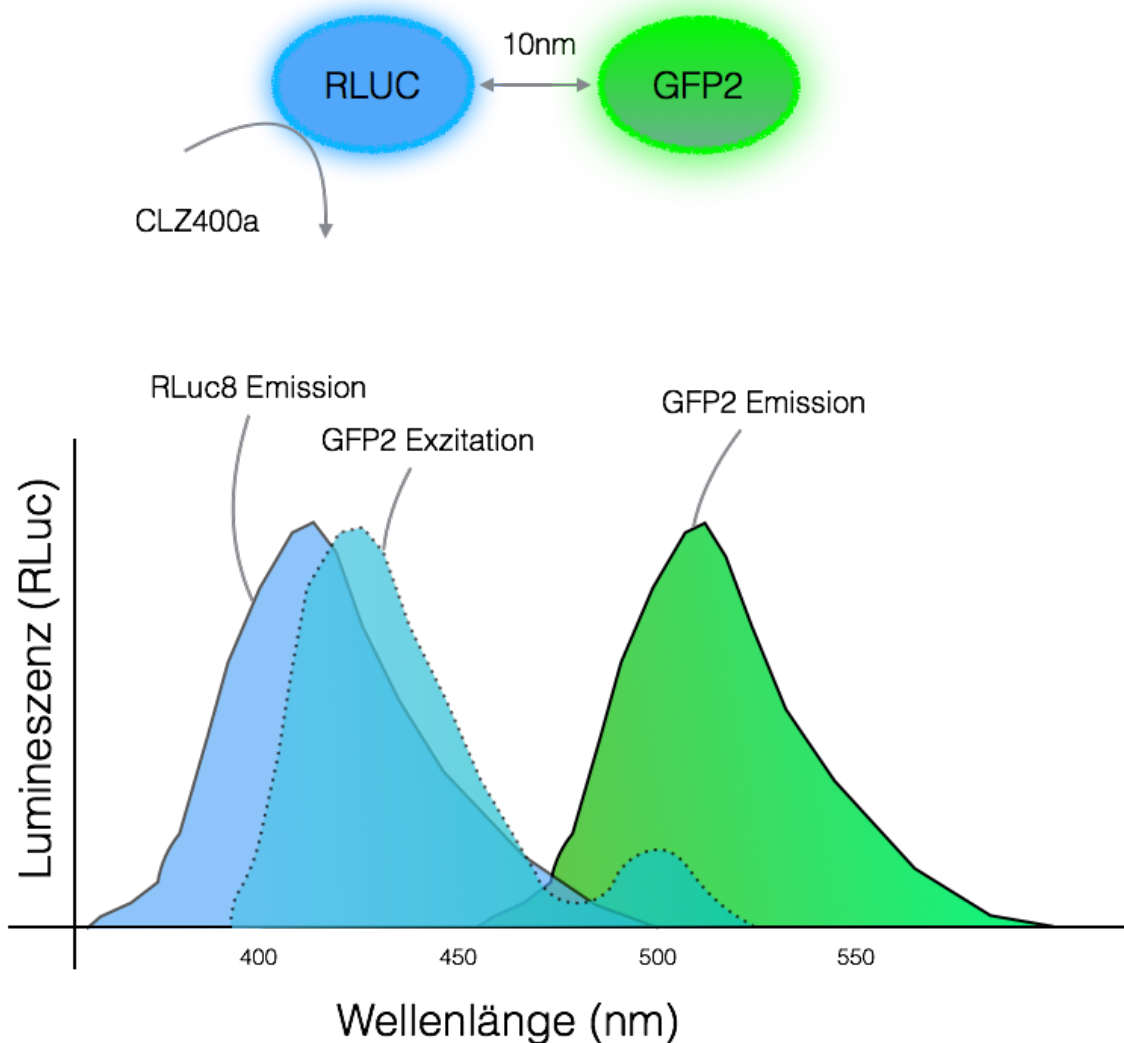


Abbildung 8: eBRET Prinzip

RLuc8 (RLuc) emittiert durch die Umwandlung von Coelenterazine 400a (CLZ400a) Strahlung einer Wellenlänge von ca. 400nm. Durch Überlappung des Exzitationsfeldes von GFP2 wird Energie auf das FP übertragen und nun Strahlung im Wellenlängenbereich von ca. 510 nm emittiert.

Im Rahmen der wissenschaftlichen Optimierung der BRET-Systeme wurde eine RLuc8 mit acht Mutationen im originalen RLuc-Gen hergestellt. Es wurde nachgewiesen, dass durch Austausch der nativen Luziferase mit dem RLuc8-Mutant im BRET2 die Strahlungsausbeute um den Faktor 10 erhöht werden kann (Dacres et al., 2012a). Zudem wurden kürzere Erfassungszeiten benötigt, was eine Verminderung der Substratkonzentration ermöglichte und somit zur Minimalisierung von Kalkulationsfehlern führte. RLuc8 wird seit ihrer Einführung im eBRET² (enhanced BRET) von Kocan et. al in den meisten BRET-Systemen der nativen RLuc-Luziferase vorgezogen (Kocan et al., 2010).

Weiter stellt CLZ human (CLZ h) eine verbesserte Form des nativen CLZs dar, das bei höherer Quantenemission die spektralen Eigenschaften der Luziferase nicht beeinflusst. CLZ400a und CLZv, welche den Emissionpeak der Luziferase zu 400nm bzw. 515nm verschieben, sowie EnduRen und ViviRen, die längere bzw. kürzere Emissionszeiten auslösen, sind weitere Alternativen, die je nach Anregungswellenlänge des FPs genutzt werden (Sun et al., 2016).

Für die unterschiedlichen BRET-Varianten mit den spezifischen Emissionsmaxima, abhängig von Donorform und Substrat, ergeben sich zahlreiche Akzeptoren, die wiederum je nach Extinktions- und Emissionswellenlänge passend oder weniger passend für eine BRET-Variante sind.

Der Akzeptor, meist ein fluoreszierendes Protein (FP) stellt den ausgereiftesten Teil des BRET-Systems dar. Es besteht eine Auswahl zwischen tausenden FPs, deren Emissionsspektren von ultravioletten bis hin zu infraroten reichen. Für eine möglichst gute Signalqualität mit hoher spektraler Auflösung sollte eine große Emissionsseparation der Emissionsspektren von Donor und Akzeptor vorliegen. Sprich die Emissionsmaxima möglichst in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen liegen.

Die Quantenausbeute, die essentiell zur Eignung in BRET-Systemen gilt, sind für FPs, die im blauen, grünen oder gelben Wellenlängenbereich emittieren bereits gut untersucht und liegt zwischen 60% und 85%. FPs, die im roten Wellenlängenbereich emittieren, erscheinen meist weniger hell (Sun et al., 2016).

Im Laufe der Zeit wurden bereits mehrere verschiedene BRET-Systeme beschrieben, die variierende Luziferaseformen und Substrate als Energiedonoren nutzen, um Strahlung verschiedener Wellenlängen auf passende Akzeptoren, wie Proteinfluorophore oder chemische Fluorophore, zu übertragen (De et al., 2007).

Name	Energiedonor	Energieakzeptor	Substrat	Spektrale Auflösung $\Delta\lambda_{em}$ (nm)
BERT 1	RLuc	eYFP	n- CLZ	50
BRET 2	RLuc	GFP2	CLZ400a	115
eBRET 2	RLuc8	GFP2	CLZ400a	115
BRET 3	Rluc8	mOrange	n- CLZ	85
BRET 3.1	RLuc8	mOrange	CLZ-v	50
BRET 4.1	RLuc8	TagRFP	CLZ-v	70
BRET 5	RLuc8.6	TagRFP	n-CLZ	50
BRET 6	RLuc8.6	TurboFP	n-CLZ	100
BRET 6.1	RLuc8.6	TurboFP	CLZ-v	65
BRET 7	RLuc8	PerCP-Cy 5.5	n-CLZ	300

Abbildung 9: BRET-Varianten

Die Tabelle zeigt die verschiedenen BRET-Varianten mit entsprechenden Energie-Donoren und –Akzeptoren. Die BRET-Varianten sind nach ihrer Entdeckung durchnummeriert und bestehen jeweils aus verschiedenen Luziferasen (Energy Donor), die mit unterschiedlichen fluoreszierenden Proteinen (Energy Acceptor) kombiniert wurden. Die spektrale Auflösung ist zu dem jeweiligen BRET-Paar und passenden Luziferase-Substrat angegeben. Aus (Wimmer et al., 2017).

Um Proteine über ein BRET-System zu detektieren, werden diese genetisch an einen biolumineszenten Donor und/oder fluoreszierenden Akzeptor gekoppelt. Die Fusion der Donor- und Akzeptormoleküle an Proteine muss ohne Beeinträchtigung von deren Proteinfunktion möglich sein.

Zur Messung von PPI müssen die Expressionsmengen niedrig genug sein, um physiologisch Relevanz zu haben, aber hoch genug angesetzt werden, um einen Energieübertrag überhaupt auszulösen (Pfleger and Eidne, 2006 2006). Außerdem sollten Donor- und Akzeptorprotein zunächst in einem Abstand zueinanderstehen, der keinen Energieübertrag auslöst (>10nm). Ein Energietransfer kann resultierend nur dann gemessen werden, wenn durch eine direkte Konformationsänderung oder Bildung eines Komplexes Donor und Akzeptor in ausreichende Nähe gebracht werden.

Über ein Luminometer (Microplate oder Singletube) oder ein „scanning Spektrometer“ kann das BRET-Signal detektiert werden. Dieses sollte die Eigenschaft besitzen sequenzierte oder simultane Strahlung mit zwei verschiedenen Wellenlängenfiltern für die separaten Donor- und Akzeptoremissionen zu detektieren (Pfleger and Eidne, 2006).

Nach Messung der BRET-Daten lassen sich BRET-Ratios in mili BRET-Units (mBU) errechnen, die über die tatsächlich übertragene Energie auf das Akzeptorfluorophor und damit der Protein-Protein-Interaktionen, die eingegangen wurden, schließen lässt.

Da die Anwendung des BRET-Systems in lebenden Zellen und darüber hinaus in lebenden Tieren bereits möglich ist (Dragulescu-Andrasi et al., 2011), liegt eine in vivo VEGF-Messmethode im menschlichen Auge nahe.

BRET könnte demnach zur Quantifizierung von VEGF in verschiedenen Medien im Sinne eines Biosensors herangezogen werden. Dies würde einen großen Fortschritt in der personalisierten anti-VEGF- Therapie bedeuten, da VEGF-Konzentrationen in Echtzeit gemessen werden könnten.

Die Arbeitsgruppe für experimentelle Ophthalmologie in Gießen konnte bereits erste Erfolge hinsichtlich eines BRET-Verfahrens zur VEGF-Quantifizierung verzeichnen. Hierzu wurde der N-Terminus der leichten Kette des unter 1.6 beschriebenen Ra02 mit RLuc8 gekoppelt, während der C-Terminus der schweren Kette an verschiedene GFPs gebunden wurde. Resultat war ein einziges Molekül, das über VEGF-Bindung und folgende Konformationsänderung zwei BRET-Komponenten in ausreichende räumliche Nähe zueinander bringen kann, sodass ein BRET-Signal entsteht. Aufgrund der BRET-ratio dieses Ein-Komponenten BRET-Systems lassen sich Rückschlüsse auf die VEGF-Konzentration in Medien ziehen (Wimmer et al., 2016).

Ein Zwei-Komponenten BRET-System, bei dem Donor und Akzeptor jeweils an unterschiedliche VEGF-bindende Moleküle gekoppelt sind, könnte eine Alternative zum Ein-Komponenten BRET-System darstellen.

1.8 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit besteht darin, ein neues Zwei-Komponenten-BRET-System zu etablieren, das sich zur VEGF-Quantifizierung eignet.

Dieses soll aus einer Form der *Renilla reniformis* Luziferase (Rluc8) ($\lambda_{em} = \sim 480$ nm) bestehen, die mit dem entsprechenden Substrat Coelenterazine (native or n-CLZ) als Energiedonor dient. Der chemisch hergestellte fluoreszierende Farbstoff, PerCP-Cy5.5[®] ($\lambda_{ex} = \sim 488$ nm, $\lambda_{em} = \sim 700$ nm), wird als der Energieakzeptor verwendet. Beide Komponenten sollen an VEGF binden können, um dessen Quantifizierung im Sinne eines Zwei-Komponenten-Systems zu ermöglichen.

2 Material

2.1 Geräte und Labormaterial

Gerät	Hersteller
Autoklav DX-65	Systec (Wettenberg)
Analysewaage	Sartorius AG (Göttingen)
Begasungsbrutschrank	Binder (Tuttlingen)
BioPhotometer	Eppendorf (Köln)
Bunsenbrenner	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Drucker für Photometer	Seiko Instruments GmbH (Neuhausen)
Erlenmeyer-Kolben	Schott (Mainz)
Einweg- Pipettenspitzen	Corning (Wiesbaden)
Eismaschine	Scotsman (Herborn)
Elektrophorese- Kammer (DNA)	Biometra (Göttingen)
Elektroporationsküvette	Eppendorf (Köln), Bio Rad ++ (München)
Entwicklungsgerät Curix (60)	Agfa (Düsseldorf)
Falcons (15 ml)	Greiner (Frickhausen)
Fastblot Whatman	Biometra (Göttingen)
Filter (Bottle Top, steril, 150 ml)	Corning (Wiesbaden)
Fluoreszenzmikroskop BZ8000	Keyence (Neu Isenburg)
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr (Ochsenhausen)
Gefrierschränke (-80°C)	Thermo Electron (Oberhausen)
Geldokumentation BioDocAnalyse	Biometra (Göttingen)
Gelkamm	Biometra (Göttingen)
Heizblock	Biometra (Göttingen)
Infinite M1000Pro (Microplate Reader)	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Inkubationshaube	Sartorius AG (Göttingen)
Inkubator	Binder (Tuttlingen)
Kühlschrank (4°C)	Bosch (Gerlingen)
Laminar Flow	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Lichtmikroskop	VWR International (Darmstadt)
Magnetrührer	IKA® (Staufen)

Material	Verbrauchsmaterialien
Mehrfachdispenser	Brand (Wertheim)
Messzylinder	Hirschmann (Eberstadt)
Mikrokühlzentrifuge 1-15 PK	SIGMA (Osterode am Harz)
Mikrowelle	Siemens (Deutschland)
Minizentrifuge	LMS (Hemmenau)
Multiporator	Eppendorf (Köln)
Orbitalschüttler	Sartorius AG (Göttingen)
pH- Elektrode	Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Pipetten	Eppendorf (Köln)
Pipettierhilfe	Hirschmann (Eberstadt)
Quarz-Küvette (10mm Dicke)	Helma (Essen)
Reinstwasser-Filteranlage	Sartorius (Göttingen)
MagellanData Analysis Software	Tecan (Männedorf, Schweiz)
SigmaPlot 12.0	Systat Software Inc. (Erkrath)
Spannungsgeber (Power Supply)	Biometra (Göttingen)
Spülmaschine	Miele (Gütersloh)
Thermocycler TPersonal	Biometra (Göttingen)
Thermoblock TB2	Biometra (Göttingen)
Thermocycler TPersonal	Biometra (Göttingen)
Tisch-Schüttler	Sartorius AG (Göttingen)
UV-Transilluminator	Allied Vision Technologies GmbH (Ahrensburg)
Vortexer	VWR International (Darmstadt)
Wasserbad	Julabo (Seelbach)
Waagen	Sartorius AG (Göttingen)
Wasserbad	Julabo (Seelbach)
Zellkultur Schalen (58 cm ²)	Greiner (Frickenhäusen)
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifuge 1-15	SIGMA (Osterode am Harz)
Zentrifuge 4K15	SIGMA (Osterode am Harz)
Zentrifuge Mikro 200	Hettich (Tuttlingen)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
----------	------------

Material	Chemikalien
6well Zellkulturschale, adhären	Greiner (Frickenhausen)
Aluminiumfolie	Prime Source (Irving, USA)
COSTAR Lumiplates Flat White	Prime Source (Irving, USA)
Glasflaschen (1l, 500 ml, 100 ml)	Kavalier (Sazava, Tschechien)
Glaspipetten (5 ml/10 ml/15 ml)	VWR (Darmstadt)/ Hirschmann (Eberstadt)
Handschuhe	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. CoKG (Wetter)
Immuno 8well Strips	Nunc (Wiesbaden)
Kryoröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Parafilm M®	Bemis (Neenah, USA)
Pipettenspitzen	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Präzisions Dispenser Tips 5 ml	Brand (Wertheim)
Präzisions Dispenser Tips 0,5 ml	Eppendorf (Köln)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Röntgenfilme	GE Healthcare (München)
Skalpell	Feather (Osaka, Japan)
Vakuumfilter (Sterilfilter)	TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturplatten, adhären	Greiner (Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Zellschaber	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Accutase	PAN Biotech (Aidenbach)
Acrylamid (Rothiphorese Gel 30)	Carl Roth (Karlsruhe)
Agar	Thermo Fisher (Darmstadt)
Agarose	Genaxxon (Ulm)
Ampicillin	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Antarktische Phosphatase Puffer	New England BioLabs (Schwallbach)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)

Material	Chemikalien
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Coating Puffer	Candor Bioscience (Wengen)
ddH ₂ O	Reinstwasser-Filteranlage im Labor
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
DMEM	Pan Biotech (Aidenbach)
dNTP 10mM	New England Biolabs (Frankfurt)
ECL Westernblotting Detection Reagent	GE Healthcare (München)
EDTA-Na ₂	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Fötale Kälberserum (FKS)	PAN Biotech (Aidenbach)
Gelatine	Naumann (Memmingen)
GelRed	Biotium Inc. (Fremont)
Glucose	Carl Roth (Karlsruhe)
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase	R&D Systems (Wiesbaden)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
HF- Puffer	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin)
Lightning Link Per.CP-Cy5.5 [®]	R&D Systems (Minneapolis)
Lipofectamine LTX	Invitrogen (Darmstadt)
Loading Dye 6x	Fermentas (St. Leon-Rot)
Luziferase Assay Reagent	NanoLight Inc. (Pinetop, USA)
Lucia Broth Base	Invitrogen (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchloridheptahydrat	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Nanofuel solvent	NanoLight Inc. (Pinetop, USA)

Native coelenterazine	NanoLight Inc. (Pinetop, USA)
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Neuropilin	R&D Systems (Wiesbaden)
Penicillin/ Streptomycin	PAN Biotech (Aidenbach)
PBS	Roth (Karlsruhe)
Ponceau S Solution	Sigma (Seelzen)
Salzsäure 5M	Merck (Darmstadt)
SDS ultra pure	Carl Roth (Karlsruhe)
Stickstoff (flüssig)	Linde (Pullbach)
T4- DNA Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
TEMED	Carl Roth (Karlsruhe)
TRIS (hydroxymethyl)aminomethan	Merck (Darmstadt)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe)
VEGF-A 165	Cell Signaling (Frankfurt a.M.)
Western Blot Detection Reagent	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Zelllysis Puffer	Promega (Mannheim)

2.4 Puffer und Medien

2.4.1 Allgemeine Pufferlösungen

10xPBS (phosphate buffered saline):

8,0 g/l Natriumchlorid

0,2 g/l Kaliumchlorid

1,44 g/l Dinatriumhydrogenphosphat

0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat

(auf 1L mit ddH₂O aufgefüllt, pH-Wert 7,4; autoklaviert, bei RT gelagert)

10xTBS Puffer (TRIS-buffered saline)

121,1 g/l TRIS

87,7 g/l Natriumchlorid

(auf 1L mit ddH₂O aufgefüllt, pH-Wert 7,4; autoklaviert, bei RT gelagert)

TBE Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)

10,8 g TRIS

5,5 g Borsäure

0,7 g EDTA-Na₂

(auf 1 L mit ddH₂O aufgefüllt, pH-Wert 7,4; autoklaviert, bei Raumtemperatur gelagert)

2.4.2 Puffer für die Zellkulturen

LB- Medium:

25,0 g Luria-Broth-Base

mit 100 ml dd H₂O aufgefüllt

LB Agar:

12,5 g Luria-Broth-Base

7,5 g Luria-Broth Agar

mit 500 ml ddH₂O aufgefüllt, autoklaviert, Zugabe von Selektionsantibiotikum (Ampicillin), in Petrischalen gegossen (ca. 15 ml pro Schale), bei 4 °C ca. 6 Monate verwendbar

SOC- Medium (Salt-Optimized+Carbon):

2 % Trypton

0,5% Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glucose

DMEM (Dulbecco's modifizier Eagle Medium):

PAA (Paschingen Österreich)

1% Penicillin/Streptomycin (v/v)

10% FKS (v/v)

200 mM L-Glutamin

zur Kultivierung von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293), Lagerung bei 4 °C.

2.4.3 Puffer die SDS-Page**10x SDS-Laufpuffer:**

30 g/L TRIS

144 g/L Glycin

100 ml SDS (10%)

pH 8,3

1M TRIS Puffer, pH 6,8

12,1 g TRIS

mit 100 ml ddH₂O aufgefüllt, pH mit HCl eingestellt

0,5M TRIS Puffer, pH 6,8

30,3 g TRIS

mit 500 ml ddH₂O aufgefüllt, pH mit HCl eingestellt

1,5M TRIS Puffer, pH 8,8

90,8 g TRIS

mit 500 ml ddH₂O aufgefüllt, pH mit HCl eingestellt

5x Laemmli Probenpuffer (nicht reduzierend)

1,0 g SDS

5,0 ml Glycerol

3,0 ml 1M Tris Puffer, pH 6,8

0,05 g Bromphenolblau

2,0 ml ddH₂O

5x Laemmli Probenpuffer (reduzierend)

500 µl 5x Laemmli Probenpuffer

25 µl β-Mercaptoethanol

2.4.4 Western-Blot**10xTransferpuffer**

30,3 g TRIS

144 g Glyzin

20 ml 20% SDS

mit 1000 ml ddH₂O aufgefüllt

1x Transferpuffer

100 ml 10x Transferpuffer

200 ml Methanol

mit 1000 ml ddH₂O aufgefüllt

1x TBS-T (Waschpuffer):

10x TBS 1:10 mit ddH₂O verdünnt

0,5 ml Tween20

mit 1000 ml 1xTBS aufgefüllt

Coating-Puffer:

3,70 g Natriumbikarbonat

0,64 g Natriumkarbonat

1 L ddH₂O

feste Bestandteile abgewogen, in 800 ml ddH₂O gelöst, pH 9,6 mit 2,5 M NaOH eingestellt, mit ddH₂O auf 1 L aufgefüllt

Blocking - Puffer:

3,0 g Magermilchpulver

mit 1000 ml 1xTBS aufgefüllt

1 % Gelatine (Blockierlösung):

0,5 g Gelatine (lyophilisiert)

50 ml 1x TBS

Gelatine durch Erhitzen gelöst, vor Gebrauch auf Eis abgekühlt.

Ethidiumbromidlösung:

0,1 g/ml Ethidiumbromid

2.4.5 BRET-Assay-Puffer:

PBS ergänzt mit 1.0 g/l D-Glucose-Monohydrate

0.1 g/l Calciumchlorid-Dihydrat

0.1 g/l Magnesiumchloridheptahydrat

Substrat:

Natives CLZ (1.0 mg/ml in 100% Ethanol)

100 µl Nano Fuel Solvent

15 µl des Substrates wurden anschließend mit 15 ml BRET Assaypuffer verdünnt (1:1000 Verdünnung)

2.5 Antikörper

goat anti-rabbit-IgG-HRP (Sigma Aldrich, Taufkirchen Germany)

rabbit anti-RLuc (Biomol, Hamburg Germany)

rabbit anti-GAPDH (R&D Systems, Wiesbaden Germany)

2.6 Biologische Materialien**2.6.1 Zelllinien****HEK 293-Zelllinie (CLS) (ATCC: CRL-1573)**

Verwendet wurde eine humane embryonale Zelllinie (Abk. HEK für engl. Human Embryonic Kidney cells) deren Wildtyp durch eine Transfektion mit dem Adenovirus 5 zu einer dauerhaft kultivierbaren Form umgewandelt wurde. Sie eignet sich für Untersuchungen an durch Transfektion exprimierten Proteinen. Die Zellen sind hypotriploide Epithelzellen, die adhärent wachsen. Kultiviert wurden die von Cell Lines Service (CLS, Eppenheim, Deutschland) bezogenen Zellen in DEMEM.

Zur Transfektionskontrolle wurde ein eGFP-Vektor (peGFP-N) in die HEK-Zellen transfiziert. (s. 4.2.2)

E. coli-Stämme

Zelltyp	Genotyp
E. coli XL-1 Blue, (Stratagene, La Jolla, USA)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]
One Shot TOP10, (Invitrogen, Karlsruhe)	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZΔM15ΔlacX74recA1a-raD139Δ(araleu)7697 galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>

Kultiviert wurden die Zellen in Luria-Broth-Medium bei 37 °C als Suspensionsschüttelkultur (180-200 rpm) und auf Agar- Platten gezüchtet.

Zur Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide wurde Ampicillin zugegeben.

2.6.2 Enzyme:

T4- DNA Ligase	Invitrogen (Karlsruhe)
Phusion® Highfidelity Polymerase	Life Technologies/Thermo Fisher (Darmstadt)
Antarctic Phosphatase	NEB (Frankfurt a. M.)

2.7 Plasmide

Als Plasmid wurde das bereits vorliegende pcDNA 3.1 (+) RLuc8-Ra02 verwendet.

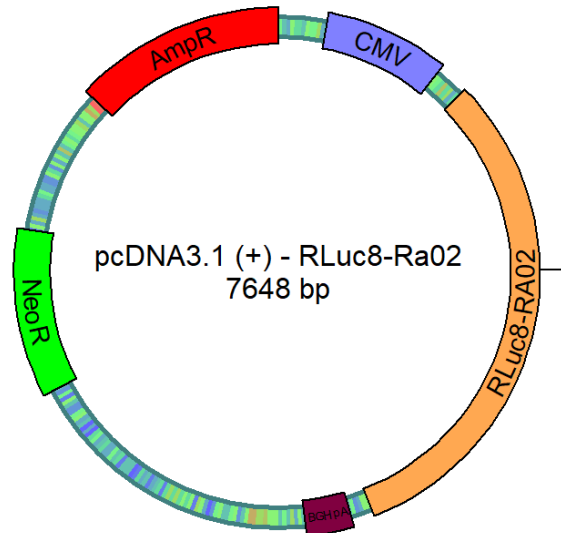


Abbildung 10: schematische Darstellung des RLuc8-Ra02 Plasmids

(AmpR) Promotor für die Ampizilinresistenz, (CMV) Cytomegalievirus Promotor, (BGHpA) Bovine Growth Hormone Polyadenylierungssignal, (NeoR) Gen für die Aminoglycosid Phosphotransferase

2.8 Primer

Folgende Primer wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

RLuc8Glyf: P-GGA GGA GAC ATA CAG CTG ACT CAG TCT

RLuc8Glyr: P-TCC TCC CTG CTC GTT CTT CAG CAC GGG

„P“ = Phosphat

Beide Primer sind am 5' Ende phosphoryliert um das entstehende PCR Produkt direkt ligieren zu können.

Sequenzierprimer:

SeqRRG3: TGG CTA TGA CTT CAC ACA CTA TGG

2.9 Reagenzien und Kits

Tabelle 1: Reagenzien und Kits

Reagenzien und Kits	Hersteller
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up - DNA extraction from agarose gels	Macherey & Nagel (Düren)
Lipofectamine 3000 Reagent	Thermon Fisher Scientific (Schwerte)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (Hilden)
NucleoSpin® Plasmid Quick Pure Proto- col- isolation of high copy plasmid DNA from E. coli	Macherey & Nagel (Düren)
Westernblot Detection Reagent	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

2.11 Größenstandards

2.11.1 DNA Größenstandard

Als DNA Größenstandard wurde die 1 kbp DNA Ladder von Fermentas (St.Leon-Roth, Deutschland) benutzt.

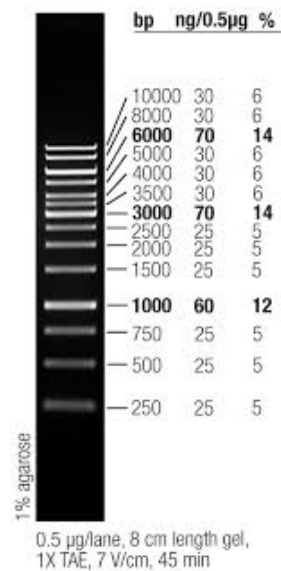


Abbildung 11: DNA-Größenstandard

2.11.2 Protein-Größenstandard

Als Protein Größenstandard wurde die Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

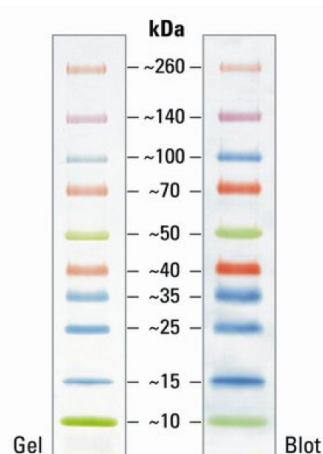


Abbildung 12: Spectra-multicolor-Broade-Range-Protein-Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)

3 Methoden

3.1 Herstellung der Konstrukte

Ziel der Arbeit ist die Detektion von VEGF-Molekülen über ein Zwei-Komponenten-BRET-System. Dazu wird ein neues BRET-Paar etabliert.

Dieses soll aus einer Form der *Renilla reniformis* Luziferase (RLuc8) ($\lambda_{em} = \sim 480$ nm) als Energiedonor und dem fluoreszierenden Farbstoff PerCP-Cy5.5[®] ($\lambda_{ex} = \sim 488$ nm, $\lambda_{em} = \sim 700$ nm) als Energieakzeptor bestehen.

Um die Verbindung zu VEGF zu schaffen, wurde RLuc8 mit Ra02, einem auf Basis von Ranibizumab hergestellten, fusionierten, variablen Einzelkettenfragment (single chain variable fragments [scFv]) verlinkt. Ra02 bindet an die VEGF-Rezeptorbindungsstelle des VEGF am N-Terminus. Die Versuche wurden mit einer direkt fusionierten- und eine 4x Glycin-Linkervariante von RLuc8 und Ra02 durchgeführt.

Um einen brauchbaren Energiedonor zu schaffen wurde der Farbstoff PerCP-Cy5.5[®] an Neuropilin gekoppelt. Neuropilin bindet an die C-terminale Neuropilinrezeptorbindestelle des VEGF und stellt so die Verbindung des Energieakzeptors zu VEGF her.

Ein Energieübertrag vom Donormolekül (RLuc8-Ra02/ RLuc8-4Gly-Ra02) auf das Akzeptormolekül NRP-PerCP-Cy5.5[®] kann nur dann stattfinden, wenn beide Moleküle an dasselbe VEGF-Molekül binden.

3.1.1 Ra02 als Ausgangskonstrukt

Als Verbindung zwischen dem Energiedonor RLuc8 und VEGF soll das Anti-VEGF Molekül Ra02 dienen, das an die VEGF-Rezeptorbindestelle bindet.

Ra02 wurde in vorangegangenen Experimenten (der Forschungsgruppe Gießen) auf Grundlage von Ranibizumab entwickelt. Es liegt als codon- optimiertes Anti-VEGF-Molekül, bestehend aus variablen Einzelketten-Fragmenten (scFv) vor. Unter der Kontrolle eines CMV-Promotors wurden die open reading frames (ORFs) der schweren und leichten Kette des Ranibizumabs in einen Vektor kloniert. Zunächst wurde die IRES und die kappa leader Sequenz der schweren Kette, sowie das Stoppcodon der leichten Kette deletiert. Nach Insertion eines Linkers aus vier Glycinen zwischen den Ketten liegt nach dessen Expression nun ein scFab-Fragment vor, das aus nur einem Molekül besteht (siehe 1.6).

In der weiteren Entwicklung des Forschungsprojekts wurde Ra02 über eine Mutagenese PCR an RLuc8 gekoppelt. Dieses Konstrukt mit den direkt fusionierten Bestandteilen diente einerseits als Variante für die BRET-Versuche dieser Arbeit und weiter als Ausgangskonstrukt für die Herstellung einer zweiten Variante, die durch einen Linker von 4 Glycinen verbunden ist.

3.1.2 Mutagenese PCR

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) dient als Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA in vitro. Sie ist angelehnt an in-vivo ablaufende Prozesse der Replikation.

In der Mutagenese PCR wird die DNA über Deletion und/oder Insertion von Nucleotiden verändert. Das Prinzip der PCR besteht aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Die Denaturierung findet bei 90-98°C statt. Dabei trennen sich zunächst die Doppelstränge der DNA in zwei Einzelstränge auf. Anschließend binden zwei komplementäre Oligonucleotide, die als Primer dienen, an die Einzelstränge. Für das Annealing ist die benötigte Temperatur abhängig von der Länge und der Sequenz der eingesetzten Primer. Eine hitzestabile DNA-Polymerase bindet im Zuge der Elongation nun an die Primer und verlängert diese komplementär zum vorhandenen Einzelstrang durch den Einbau von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs). Eine exponentielle Vervielfältigung wird durch eine Wiederholung der einzelnen Zyklen erreicht.

In diesem Fall wurde durch die Phusion®-Polymerase PCR das gewünschte DNA-Material aus dem scFv RLuc8- Ra02 hergestellt. Über Deletion der sekretorischen IgG der kappa leader Sequenz des anti-VEGF open reading frame (ORF) und anschließender Insertion des Peptidlinker (4x Glycin) sollte RLuc 8-4Gly-Ra02 erzeugt werden.

Bei der PCR wurde streng nach Phusion® Highfidelity DNA Polymerase (M0530) Protokoll vorgegangen.

Tabelle 2: Reaktionsansatz der Mutagenese - PCR

Als Thermocycling-Programm wurde für die RLuc8-4Gly-Ra02-Variante ein 2-Step-Verfahren angewendet

RLuc8-4Gly-Ra02	
dd H ₂ O	13,1 µl
5x Phusion® HF Puffer	4 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
Primer I (10 pmol/µl)	1 µl
Primer II (10 pmol/µl)	1 µl
Template DNA (~ 5 ng)	1 µl
Phusion DNA Polymerase	0,2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,3 µl
Gesamtvolumen: 20 µl	

Tabelle 3: PCR-Programm

Zunächst wird die Probe auf die richtige Temperatur gebracht, dann erfolgen die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation 34x hintereinander. Zum Schluss kühlt der Thermocycler die Probe langsam auf 10°C herunter.

2-Step-Verfahren: RLuc8-4Gly-Ra02		
<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Zyklenanzahl</i>
98° C	30 s	1
98° C	7 s	34
-	-	34
72° C	210 s	34
72° C	600 s	1
10° C	600 s	1

3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde verwendet, um sicher zu gehen, dass das gewünschte Produkt in der Probe enthalten ist. Dazu wird die DNA aus der Phusion® PCR im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. Für das 1%ige Agarosegel wurde 1 g Agarose mit 100 ml 1x TBE-Puffer (s.2.4.1) vermischt und in der Mikrowelle bei 600W aufgeköcht. Das dabei verdampfte Wasser wurde mit ddH₂O aufgefüllt.

Nach Abkühlen wurden 5 µl GelRed zugegeben, gemischt und die Lösung in eine Elektrophoresekammer gegossen. Der Gel-Kamm wurde zur Bildung von Taschen eingesetzt und nach ca. 15 min wieder entfernt. Das nun erstarrte Gel wurde mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die 20 µl der PCR- Probe wurde mit 5µl Ladepuffer versetzt und davon 20 µl auf das Gel aufgetragen. 7 µl des DNA-Größenstandards (GeneRuler DNA- Ladder Mix (siehe 2.11.1) wurde ebenfalls aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 45 Minuten bei 150 V durchgeführt. Durch die angelegte Spannung wanderte die negativ geladene DNA in Richtung Anode. Dies geschah unterschiedlich schnell je nach Größe der DNA.

Durch das zwischen GC-Basen interkalierte GelRed® leuchtete die DNA unter dem UV-Transilluminator und konnte mit dem ebenfalls aufgetragenen DNA-Größenstandard zur Größenbestimmung abgeglichen werden.

3.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Die Bande der richtigen Größe wurde unter dem UV-Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits (Nucleo Spin® Plasmid Kit) aus der Agarose isoliert und in 30 µl ddH₂O eluiert. Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration folgte.

3.1.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption der Proben in Quarzglasküvetten mit dem Spektralphotometer gemessen. Das Prinzip des Messverfahrens beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz, welches besagt, dass die Absorption bzw. Extinktion direkt proportional zur DNA-Konzentration einer Lösung sei. Zunächst wurde durch Messung von ddH₂O der Nullpunkt bestimmt. Anschließend wurden 7 µl der Probe abgemessen. Um Abweichungen in den Messungen zu vermeiden, wurde die Absorption durch Verdünnung auf einen Wert zwischen 0,1 und 1,0 eingestellt. Hier verläuft die Standardkurve linear. Die Verdünnung wurde durch das Gerät berücksichtigt. Die Reinheit einer Probe wird durch die Ratio zweier Absorptionen bestimmt. Der Quotient, der bei 280 nm und 260 nm gemessenen Absorptionen liegt für reine DNA bei 1,8.

3.1.6 Ligation mit der T4-DNA Ligase

DNA-Ligasen verknüpfen die freie 5'-Phosphat-Gruppe eines DNA-Doppelstrangs mit der freien 3'-OH-Gruppe eines anderen oder auch des gleichen DNA-Moleküls. Die T4-Ligase (siehe 2.3) verbindet die Enden der linearen Plasmid-DNA, sodass ein ringförmiges Plasmid entsteht. In einem 20 µl T4-DNA Ligaseansatz sollte immer ca. 100ng der DNA enthalten sein. Für die das Konstrukte RLuc8-4Gly-Ra02 ergab sich folgender Ansatz:

Rluc8-4Gly-Ra02

12 µl	DNA (9ng/µl)
2 µl	10x T4-Ligasepuffer
1 µl	T4-Ligasepuffer
5 µl	ddH ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.1.7 Transformation in E. coli

Zur Vervielfältigung der Plasmide sollten diese über Elektroporation in E. coli XL-1 (siehe:2.6.1) eingebracht werden. Dazu wurden 2 µl des Plasmid-Ansatzes zu ca. 60 µl gekühlten XL-1 Zellen pipettiert und gevortext. Der gesamte Ansatz wurde frei von Luftblasen in gekühlte Elektroporationsküvetten pipettiert und mit dem Multiporator bei 2000V 5ms transformiert. Durch den elektrischen Impuls werden die Poren der Bakterienzellwände geöffnet und das Plasmid kann eindringen. Direkt nach dem Impuls wurde der Ansatz mit 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium (s. 2.4.2) aus der Küvette gespült und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Eppendorfgefäße wurden bei 37 °C für 60 min bei 180 rpm auf dem Orbitalschüttler inkubiert. In dieser Zeit konnte der Resistenzmarker exprimiert werden.

3.1.8 Ausplattieren und Kultivierung der XL-1 Zellen

Die transformierten XL-1 Zellen sollen auf Agarplatten mit Ampicillin (Konz. 100 µg/ml) kultiviert werden. Das Antibiotikum Ampicillin dient dazu, dass ausschließlich Zellen wachsen können, die die Plasmid-DNA mit dem Resistenzmarker aufgenommen haben. Der 1 ml Ansatz wurde zunächst konzentriert, indem er zwei Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und 800 µl abpipettiert wurden. 100 µl der verbliebenen XL-1 Zellen wurden mit einem sterilen Glasspatel gleichmäßig auf den Agarplatten verteilt. Die ausplattierten Agarplatten wurden über Nacht im Inkubator bei 37 °C kultiviert.

3.1.9 Plasmidisolation mittels Säule (Mini-Präparation)

Die Plasmid-DNA wurde aus den kultivierten E. coli Zellen gewonnen. Zehn Klone jeder Probe wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und jeweils in einem Ansatz von 5 ml LB-Medium (siehe: 2.22.2) (+ 5 µl Ampicillin, Endkonzentration 100 µg/ml) beimpft. Die Kulturen wurden anschließend bei 37 °C und 180 rpm über Nacht auf dem Orbitalschüttler inkubiert.

Mit einem Plasmid-Isolations-Kit „Nucleo Spin Plasmid Quick Pure Protocoll- isolation of high-copy plasmid DNA from E. coli“ (siehe Tabelle 1) wurde die Plasmid-DNA nach Herstellerprotokoll im Minimaßstab isoliert. Es wurden ausschließlich die im Kit vorhandenen Puffer verwendet. Durch die zugegebenen Puffer wurde die Bakterienmembran lysiert und die austretende Plasmid-DNA an eine, in der Säule vorhandene Silicatmembran gebunden. Die gewonnene DNA wurde in 200 µl ddH₂O eluiert und als isolierte DNA bei -20 °C gelagert.

3.1.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Basensequenz der isolierten DNA wurde als externe Auftragsarbeit durch die Firma SeqLab (Eisenach) durchgeführt. Die verschickten Ansätze beinhalteten insgesamt 15 µl bestehend aus 4 µl Plasmid und 3 µl Primer aufgefüllt mit 8 µl H₂O dest.

3.1.11 Herstellung von Glycerin-Stocks

Um die positiv sequenzierten E. coli Klone über mehrere Jahre lagern zu können, wurden 500 µl des jeweiligen Ansatzes zu 500 µl Glycerin gegeben und vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.1.12 Maxi-Prep

Zur Vervielfältigung der positiv sequenzierten DNA wurden über Glycerolstocks erneut größere Übernachtskulturen angeimpft. Zu 100 ml warmem LB-Medium und 100 µl Ampicillin wurden 100 µl des Glycerin-Stocks gegeben. Die Kultur wurde anschließend bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Isoliert wurden die Plasmide mit dem „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ (s. Tabelle 1: Reagenzien und Kits) nach Herstellerprotokoll im Ma-

ximaßstab. Es wurden ausschließlich die im Kit vorhandenen Puffer verwendet. Die gewonnene DNA wurde in 500 µl ddH₂O eluiert und bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde für jede Probe nach Kapitel 3.1.5 die DNA-Konzentration bestimmt.

3.1.13 Kultivierung der HEK-Zellen

Die Kultivierung der adhärenenten Zellen erfolgte in 10 ml DMEM⁺⁺⁺-Medium (DMEM⁻⁻⁻ und 1% Penicillin/Streptomycin, 4 mM L-Glutamin und 10% FKS [Fötales Kälberserum]). Die Zellen wurden in Zellkulturplatten im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) inkubiert. Zum Splitten der adhärenenten Zellen wurde das Medium mit sterilen Glaspipetten abgesaugt, 1,5 ml Accutase zu den Zellen gegeben und inkubiert. Durch leichtes Klopfen und Schütteln lösten sich die Zellen bedingt durch die Accutase-Reaktion. Auf- und abpipettieren mit 9 ml DMEM Medium löste die Zellen im Medium. Je 0,7 5ml wurden in ein Well einer 6-well Platte überführt. Pro Well wurden nun wieder 1,5 ml Medium hinzugegeben und damit durch Verdünnung die Accutasereaktion gehemmt. Anschließend wurden die Zellen wieder im Brutschrank inkubiert.

3.2 Transfektion in HEK- Zellen

Bei der Transfektion wurde die Plasmid DNA in die HEK-Zellen (siehe 2.6.1) eingebracht. Für die Effizienz waren DNA-Konzentration, Zelldichte, die Temperatur und der pH-Wert wichtige Parameter.

3.2.1 Lipofektion

Die Transfektion der HEK-Zellen mit den Plasmiden erfolgte mittels des Lipofectamine[®]3000 Kits (siehe: Tabelle 1: Reagenzien und Kits). Im Zuge der Lipofektion wurde die DNA durch Bindung an Liposomen in das Zytoplasma von HEK Zellen eingeschleust. Die zelleigene Proteinbiosynthese stellte anschließend die gewünschten Proteine her. Ein Tag zuvor wurden HEK-Zellen aus dem Bestand gesplittet, indem zunächst das Medium abgenommen und 1,5 ml Accutase hinzugefügt wurden. Leichtes auf- und abpipettieren mit 9ml DMEM Medium löste die Zellen im Medium. 0,75 ml wurden in je ein Well einer 6-Well-Platte überführt und 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bis sie eine Kohärenz von etwa 70-90% besaßen. Am Tag der Transfektion wurde das alte Medium durch 1,5 ml frisches DMEM (++) ersetzt, um die Zellteilung anzuregen. Zur Transfektion wurden je 250 µl DMEM (- - -) und 7,5 µl Lipofektamin mit 250 µl DMEM, 10 µl

P3000 und 5 µg DNA vereint, gevortext und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Lipid-Komplex tröpfchenweise mit einer 200 µl Pipette zu den 6-well-weise ausplattierten HEK-Zellen pipettiert. Als Transfektionskontrolle diente ein eGFP-Vektor (peGFP-N1) (siehe: 2.6.1). Der eGFP-Vektor kodiert für das Green Fluoreszenz Protein (GFP) und dient als Positivkontrolle für die Transfektion. Nach 5 h wurde das Transfektionsmedium erneut je Well mit 2,0 ml frischem DMEM (+++) gewechselt. Die Expression der transferierten HEK-Zellen betrug 24 h. Danach wurde die Transfektionseffizienz des eGFP-Vektors mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beurteilt. Somit konnten Rückschlüsse über die gesamte Transfektionseffizienz gezogen werden.

3.2.2 Proteinextraktion aus HEK-Zellen

Das nun von den HEK-Zellen durch Proteinbiosynthese hergestellte, nicht sekretorische Donorprotein RLuc8-Ra02/ RLuc8-4Gly-Ra02 musste für die weiteren Versuche aus der Zelle freigesetzt werden. Dies geschah über die Proteinextraktion. Zunächst wurde das DMEM-Medium abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 250 µl 1xLysispuffer hinzugegeben. Die adhärenen Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt. Hierbei sollte die Zellmembran der HEK-Zellen zerstört werden, um die Proteine austreten zu lassen. Durch die Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min sanken Zellmembranbestandteile und Zelltrümmer zu Boden. Das Lysat mit den zelleigenen Proteinen und dem darin vermutetem BRET-Donor-Protein RLuc8-Ra02/ RLuc8-4Gly-Ra02 wurde abgenommen. Der Überstand wurde in einem frischen Eppendorfgefäß bei -20 °C eingefroren.

3.3 Luziferase Aktivität

3.3.1 Quantifizierung von RLuc8, Rluc8-4Gly-Ra02/ Rluc8-Ra02

Zur Überprüfung der regelrechten Expression der Luziferasedomäne des RLuc8-Ra02 und RLuc8-4xGly-Ra02 erfolgten BRET-Messungen, die über die enzymatische Aktivität der Luziferase Auskunft geben sollten.

Die Emission der exprimierten Donorproteine wurden durch einen Microplate-Reader filterlos gemessen. Diese Messung wurde nach 24 h und nach 48 h Expressionszeit durchgeführt. Die Emission der RLuc8-Luziferase ist nach Zugabe ihres Substrats proportional zu ihrer im Gemisch enthaltenen Menge. Die Emissionsaktivität der reinen RLuc8-Luziferase diente als Positivkontrolle, eine nicht transfizierte Probe als Negativkontrolle. Hierzu wurden COSTAR Lumiplates (siehe 2.2) mit je 10 µl der Lysate beschichtet und anschließend je 100 µl des Substrates (siehe: 2.4.5) hinzugegeben.

Die Luziferaseemission wurde direkt nach Substratzugabe, filterlos im Microplate-Reader, Tecan Infinite M 1000Pro (Tecan, Groeding Austria), mit einer Integrationszeit von 1 s gemessen.

Bei unterschiedlicher Transfektionseffizienz und somit auch Emissionsaktivität der unterschiedlichen Donorproteine wurde die stärker emittierende Probe auf das Niveau der schwächer emittierenden verdünnt.

Zur Substratherstellung wurde eine halbe Stunde vor Nutzung natives Coelenterazine (n-CLZ) (1,0 mg/ml in 100% Ethanol) in 100 µl Nanofuel Solvent gelöst und bei Raumtemperatur alle 5 min. gevortext. 15 µl des Substrates wurden anschließend mit 15 ml BRET Assaypuffer verdünnt (1:100 Verdünnung).

3.4 Reduzierte SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) werden Proteine gemäß ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei wirkt SDS (Natriumdodecylsulfat) als anionisches Tensid, das die Eigenladung der Proteinketten überlagert. Je nach Länge der Peptidkette nimmt die negative Ladung derselben also zu. Die Eigenladung bleibt vernachlässigbar.

Die angelegte elektrische Spannung bedingt ein Wandern der negativ geladenen Moleküle zur Anode. Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb, wobei größere Proteine früher hängen bleiben als kleinere. In diesem Fall diente die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der proteinogenen Überprüfung der durch die HEK-Zellen exprimierten Donorproteine (RLuc8-4Gly-Ra02, RLuc8-Ra02).

Die SDS-Page wurde unter reduzierten Bedingungen in einem Vertikalgel (siehe Tabelle 4) durchgeführt. Dabei wurde zunächst das 10% Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit Ethanol absolut für einen gleichmäßigen Übergang überschichtet.

Nach Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Ethanol entfernt, die Kammer mit H₂O dest. gereinigt und anschließend das 4% ige Sammelgel hineingegossen. Der Probekamm wurde frei von Luftblasen eingesetzt. Durch Vermischung von 15 µl Mercaptoethanol mit 500 µl Ladepuffer (siehe.2.4.4) wurde ein reduzierender Ladepuffer hergestellt. Das Mercapthoethanol im Ladepuffer spaltete die Disulfidbrücken durch Reduktion und die Peptidkette liegt nach der Denaturierung (Erhitzen bei 94° für 10 min) linear vor. Vor dem Probeauftrag wurden 50 µl der Proben mit 10 µl des reduzierenden Ladepuffers zusammengegeben und 10 min bei 94 °C auf dem Heizblock denaturiert. Die Proteine lagen nun entfaltet und linear vor.

Zusammen mit dem Proteinstandard (siehe 2.11.2) wurden die Proben aufgetragen und im SDS-Laufpuffer elektrophoretisch für 50 min bei 150 Volt aufgetrennt.

Tabelle 4: Mischtablette Protein-Polyacrylamid-Gele

	Trenngel (25 ml)	Sammelgel (2,5 ml)
30% Polyacrylamid	9,0 ml	2,2 ml
1,5 M TRIS/HCL	6,25 ml	----
0,5 M TRIS/HCL	-----	5,0 ml
ddH ₂ O	9,75 ml	2,8 ml
20% SDS-Stock	125 µl	50 µl
10% APS-Stock	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	15 µl

3.4.1 Western Blot

Die durch die SDS-Page aufgetrennten Proteine im Gel wurden durch ein Blotting-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

Dazu wurde ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Die mit SDS beladenen, negativ geladenen Proteine wanderten in Richtung Anode auf eine Nitrocellulose Membran, wo sie durch ionische und polare Wechselwirkungen haften blieben. Beim Transfer blieben die Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Für die entsprechende Stromstärke wurde zunächst das Gel vermessen und entsprechend große Filterpapiere in verschiedenen Stärken in Transferpuffer getränkt.

Die zum Blotten verwendeten Stromstärke ergab sich aus der Größe des Gels in cm² multipliziert mit dem Faktor 1,2. Es wurde mit 80 mA 50 min. lang geblottet. Der Aufbau des Blots entsprach dem unten aufgeführten Schema:

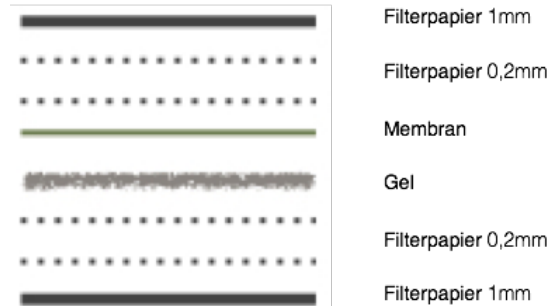


Abbildung 13: Aufbau des Western-Blots

3.4.1.1 Ponceau Rot-Färbung

Zum Überprüfen der Bloteffizienz wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Westernblot 5 min in Ponceau S geschwenkt. Die Banden der Proteine auf der Membran ließen sich über Bindung des Ponceau-Farbstoffs an der positiv geladenen Aminogruppe der Proteine sichtbar machen. Anschließend wurde mit H₂O dest. entfärbt.

3.4.1.2 Detektion mit Antikörpern

Um spezifisch Proteine auf der Nitrozellulose-Membran des Westernblots sichtbar zu machen, wurden die RLuc8-(4Gly)-Ra02 Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert und gebunden.

Die Konstrukte RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 bildeten die Antigene, an die der primäre Antikörper anti-RLuc band. Ein sekundärer Antikörper, der zuvor mit einer Peroxidase markiert wurde, band an den primären Antikörper. In diesem Fall band anti-Rabbit an das zuvor gebundene anti-RLuc (siehe: 2.5). Nach Zugabe eines Substrats wurde dann durch die Peroxidase eine Reaktion katalysiert, die das Vorhandensein des Antigens über die Belichtung eines Röntgenfilms nachweist.

Nach der Ponceau Rot-Färbung wurden freie Bindungsstellen der Membran zunächst über Nacht mit 3% igem Milchmedium (3 g Milchpulver und 100 ml 1x TBS-Puffer; s. 2.4.4) geblockt. Anschließend wurde 10 min mit TBS Tween 20 0,05% gewaschen und zweimalig mit 1xTBS ebenfalls 10 min. Der primäre Antikörper rabbit anti-RLuc wurde in 3% igem Milchmedium 1:2000 verdünnt und zwei Stunden inkubiert.

Nach weiteren drei Waschschritten wurde der sekundäre Antikörper goat anti-Rabbit-IgG-HRP in 3%igem Milchmedium 1:5000 verdünnt und zwei Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion mit dem Western-Blotting-Detektion-Reagenz (siehe: 2.9) (500 µl Reagenz 1 und 500 µl Reagenz 2) für 2-3 Minuten im Dunkeln. Die Nitrozellulosemembran wurde in eine Röntgenkassette gelegt und ein Röntgenfilm 30 s, 15 min. bzw. 30 min. aufgelegt und anschließend entwickelt.

Rabbit anti-GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase) in Kombination mit goat anti-rabbit-IgG-HRP wurde als Ladekontrolle genutzt.

3.5 Kopplung von Neuropilin (NRP) mit Lightning Link Per.CP-Cy 5.5®

Um einen VEGF-bindenden Akzeptor zu kreieren, wurde der fluoreszierende Farbstoff Lightning Link Per.CP-Cy5.5® an Neuropilin gekoppelt. Der Farbstoff wurde von R&D Systems bezogen.

Um Neuropilin mit Lightning Link zu markieren, wurde ein Kit verwendet und streng nach Anleitung vorgegangen. Laut dieser Anleitung sei eine Konzentration von 1 µg/µl optimal. So wurden 25 µg Neuropilin in 25 µl PBS gelöst. Anschließend wurden zwei Ansätze mit je 10 µl NRP mit 1 µl LL-Modifier vermischt und gevortext. Die sich ergebenden 11 µl Ansätze wurden zum Kit gegeben, auf- und abpipettiert und 2-3h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Als Letztes wurde 1 µl LL-Quencher FD hinzugegeben und 30 min inkubiert. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt. 12 µl enthielten nun 0.83 µg/µl NRP.

3.6 Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET)

Das Prinzip des Biolumineszenz- Resonanz-Energietransfer (BRET) wurde zur Energieübertragung der Donormoleküle RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 auf das Akzeptor-Fluorophor NRP-PerCP-Cy5.5® genutzt. Über das Ausmaß des Energieübertrags lassen sich direkte Rückschlüsse auf die VEGF-Konzentration einer Probe ziehen.

In verschiedenen unter 3.7 beschriebenen Versuchsaufbauten wurden die Donor-Proteinkonstrukte sowohl mit VEGF als auch mit dem markierten Neuropilin-Akzeptor inkubiert.

100 µl des Luziferase-Substrats (1:100 Verdünnung mit BRET Assay-Puffer) wurden unmittelbar vor der Messung hinzugegeben. Die Messung erfolgte mit einem Microplate-Reader über ein Zwei-Farbenlumineszenz-System mit zwei unterschiedlichen Transmissionsfiltern. Der Transmissionsfilter (Lumi Green1) für den Wellenlängenbereich von 520-570 nm wurde zur Messung der RLuc8-Emission mit einem Peak bei 480 nm genutzt. Der Magenta-Filter (Lumi Magenta) mit seinem Wellenlängenbereich von 370-450nm und 610-700 nm wurde zur Detektion des Per.CP-Cy5.5-Signals mit einem Peak bei ca. 700 nm herangezogen.

Zudem wurde immer eine Negativprobe ohne Luziferasekonstrukt und eine Nullprobe ohne VEGF-Zugabe gemessen. Die Messung verzeichnete die Emission der Luziferase und zeitgleich des PerCP-Cy5.5®. Durch Division beider Werte erhält man den Energieübertrag in Milli-BRET-Units (mBU). Die Kontrollen, die ohne VEGF gemessen wurden, dienten zur Normalisation der BRET-Ratios.

$$BRET (mBU) = \frac{Emission\ NRP-Per.CP-5.5}{Emission\ RLuc8-(4Gly)-Ra02} \quad - \text{ no VEGF control}$$

Zur VEGF-Quantifizierung wurden verschiedene Versuchsmethoden verwendet:

Fixierte Messung, Vorinkubierte Messung und Direkte Messung.

3.7 Versuchsaufbau zur VEGF- Detektion

Zur optimalen BRET von Donorprotein Ra02-(4Gly)-RLuc8 auf das Akzeptorprotein NRP- PerCP-Cy5.5[®] wurden die Proteine innerhalb fünf Versuche in unterschiedlichen Verfahren mit VEGF inkubiert.

3.7.1 Fixierte Messung

Bei der fixierten Messung musste das Akzeptor-/Donor- Molekül zunächst an eine feste Oberfläche gebunden werden, um nach einem Blockungsvorgang mit VEGF inkubiert zu werden. Danach folgte die VEGF-Detektion über den BRET Donor/Akzeptor entsprechend einer Emissionsmessung durch einen Microplate-Reader.

Als Negativprobe diente eine Probe, die nicht mit VEGF inkubiert wurde.

3.7.1.1 Methode 1: NRP-fixierte Messung (Akzeptor-Fixierte Messung)

Um Neuropilin-PerCP-Cy5.5[®] zu fixieren, wurde die Costar flat white Platte zunächst mit dem markierten Neuropilin beschichtet. Dazu wurden 4,8 µl Neuropilin-PerCP-Cy5.5[®] mit 2000 µl PBS verdünnt, um eine Konzentration von 2 µg/ml Neuropilin-PerCP-Cy5.5[®] zu erreichen. 100 µl der Neuropilin-PerCP-Cy5.5[®]- Lösung wurden in die Vertiefungen A1-3 bis F1-3 einer Costar flat white Platte pipettiert und über Nacht bei 4 °C bei 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen (1x PBS 0,05% Tween). Die freien Bindungsstellen der Platte wurden durch 200 µl Blockierungslösung (1% Gelatine in 1xTBS) 2 h bei 20 °C und 300 rpm blockiert. Anschließend sollte VEGF an die entsprechende Bindungsstelle des Neuropilin-PerCP-Cy5.5[®] binden.

Um eine Konzentration von 1 µg/ml VEGF zu erreichen, wurden 10 µl VEGF (100 µg/ml) mit 990 µl H₂O dest. verdünnt.

Nach erneutem Durchführen der Waschschrte wurde 100 µl VEGF (entsprechend 1 µg/ml oder 22,4 nM VEGF) in die Vertiefungen gegeben. Als Negativkontrolle diente 1xTBS (0,0 µg/ml oder 0 nM VEGF). Inkubiert wurde 1h bei 20°C und 300 rpm. An die nun entstandene proteinogene Verbindung von Neuropilin-PerCP-Cy5.5[®] und VEGF sollten ebenfalls die Proteinkonstrukte RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 über die freien VEGF-Rezeptorbindungsstellen binden. Nach erneutem Waschen wurden 30 µl der Konstruktproben bzw. PBS nach unten aufgeführtem Schema hinzugegeben und ebenfalls 1 h bei 20 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde, wie unter 3.6 beschrieben, die Messung durchgeführt.

3.7.1.2 Methode 2: RLuc8-(4Gly) -Ra02-fixierte Messung (Donor-Fixierte Messung)

Nach gleichem Vorgehen wie in Methode 1 wurde hier RLuc8-(4Gly)-Ra02 auf einer Costar-flat-white Platte fixiert. Diese wurde zunächst mit den RLuc8-(4Gly)-Ra02- Donorproteinen beschichtet. Dazu wurden je 100 µl Donorprotein und Negativprobe nach dem unten aufgeführten Schema in die Vertiefungen pipettiert und anschließend über Nacht bei 300 rpm und 4 °C, 20 °C inkubiert. Nach anschließenden Waschschritten und einem Blockierungsvorgang (s. Methode 1) wurden 100 µl VEGF (1 µg/ml oder 22,4 nM VEGF) hinzu pipettiert und 1 h bei 300 rpm inkubiert. Zuletzt wurden 100 µl NRP-PerCP-Cy5.5® (2 µg/ml) hinzugegeben, bei 20 °C und 300 rpm inkubiert und entsprechend dem in Kapitel 3.6 beschriebenen Messvorgang gemessen.

3.7.2 Vorinkubierte Messung

Hierbei sollten Donor- oder Akzeptormolekül ohne Fixierung zunächst mit VEGF inkubiert werden, bevor die zweite Komponente hinzugegeben und entsprechend eines ELISA eine VEGF-Detektion vorgenommen wurde.

3.7.2.1 Methode 3: NRP-Vorinkubierte Messung (Akzeptor-inkubierte Messung)

Neuropilin-PerCP-Cy5.5® wurde mit VEGF vorinkubiert. Dazu wurden 200 µl VEGF (1 µg/ml entsprechen 22,4 nM) bzw. 200 µl PBS zur Negativkontrolle mit 200 µl NRP-PerCP-Cy5.5® (1 µg/ml) über Nacht bei 4 °C auf dem Rüttler inkubiert.

Anschließend wurden je 20 µl der Konstrukte RLuc8-Ra02 bzw. RLuc8-4Gly-Ra02 hinzugegeben und unter denselben Bedingungen inkubiert.

Die Messung erfolgte wie unter Kapitel 3.6 beschrieben.

3.7.2.2 Methode 4: RLuc8-(4Gly)-Ra02 Vorinkubierte Messung (Donor-inkubierte Messung)

RLuc8-(4Gly)-Ra02 wurde mit VEGF vorinkubiert. Hierzu wurden je 200 µl VEGF (1 µg/ml), bzw. 200 µl PBS, mit 10 µl Donorprotein (RLuc8-(4Gly)-Ra02) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurden 200 µl NRP-PerCP-Cy5.5® (1 µg/ml) hinzugegeben und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Messung erfolgte wie unter Kapitel 3.6 beschrieben.

3.7.3 Direkte Messung

Zur direkten Messung wurden alle drei Komponenten annähernd gleichzeitig inkubiert und anschließend gemessen.

3.7.3.1 Methode 5: *Rluc8-(4Gly)-Ra02 Direkte Messung*

Dazu wurden 5 µl Neuropilin-PerCP Cy5.5® (1 µg/ml) mit 50 µl VEGF (1 µg/ml) bzw. 50 µl PBS und 25 µl Rluc-Ra02 bzw. Rluc-4Gly-Ra02 über Nacht bei 4 °C unter Rütteln inkubiert. Die Messung erfolgte wie unter 3.6 beschrieben.

Weitere Messungen folgten mit den VEGF-Konzentrationen von 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 100 ng/ml und 50 ng/ml VEGF unter gleichem Versuchsaufbau.

3.8 Statistik

Alle Daten wurden als Durchschnitt $\pm$ Standardabweichung (SD) festgehalten. Student's T-Test wurde in allen Gegenüberstellungen mit Sigma Plot (Systat Software, Erkrath), angewandt. Die zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) wurde bei Vergleichen von mehreren Proben herangezogen. P-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

Ziel der Arbeit ist die Detektion von VEGF-Molekülen über ein Zwei-Komponenten-BRET-System. Dazu wurde ein neues BRET-Paar etabliert, dessen zwei Komponenten VEGF binden können.

Der Energiedonor besteht hier aus einer Luziferase RLuc8, die mit Ra02 in verschiedenen Varianten (direkt/ 4 Glycinlinker) gekoppelt wurde. Ra02 bindet an die VEGF-Rezeptorbindungsstelle des VEGF am N-Terminus. Als Energieakzeptor dient der Farbstoff PerCP-Cy5.5[®] welcher mit Neuropilin gekoppelt wurde. Neuropilin bindet an die C-terminale Neuropilinrezeptorbindungsstelle des VEGF.

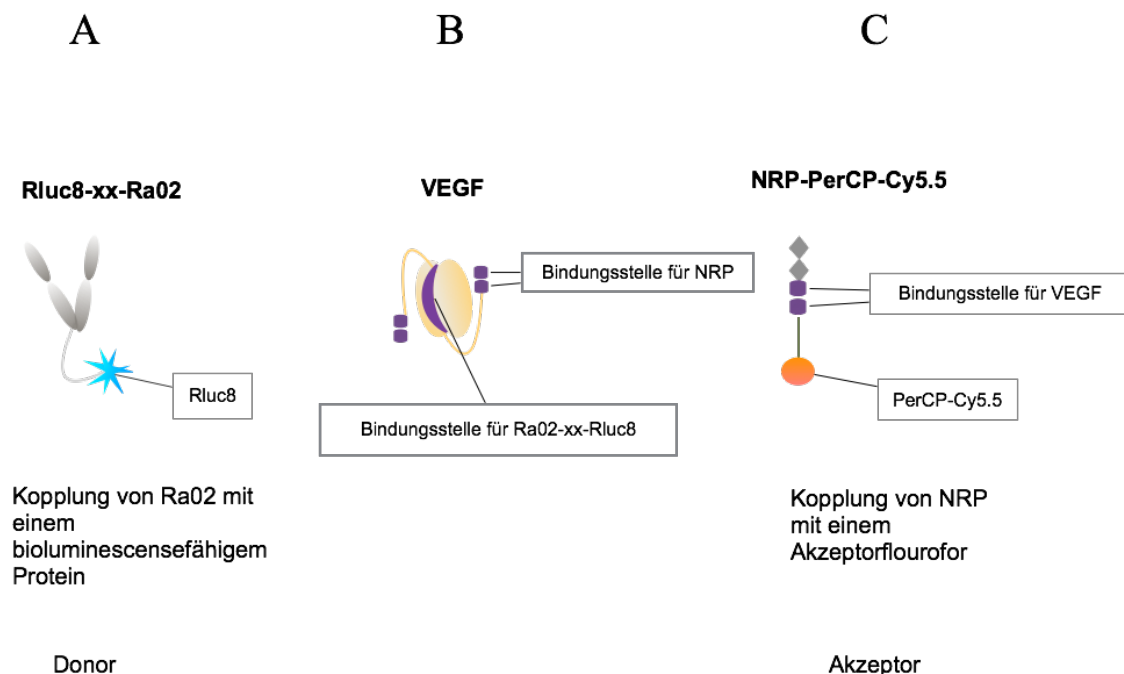


Abbildung 14: Schematische Darstellung der BRET-Komponenten

(A) Donormolekül RLuc8-(4Gly)-Ra02 und (C) Akzeptormolekül NRP-PerCP-Cy5.5[®] binden beide an (B) VEGF und bilden so ein BRET System.

4.1 DNA-Ebene

4.1.1 Konstrukt-Design

Das Ra02 wurde als Ausgangskonstrukt zur Herstellung eines lumineszenten VEGF-Bindungsmoleküls verwendet (siehe 1.6).

Die sekretorische *IgG kappa leader Sequenz (LS)* der Ra02-VEGF-Bindungsdomäne wurde durch PCR-Mutagenese deletiert. RLuc8 wurde am 5'-Ende des Ra02 ORF inseriert, nachdem das intrinsische Stopp-Codon deletiert wurde. Dadurch konnte die direkt fusionierte Variante des Donor-Expressions-Konstruktes entstehen (RLuc8-Ra02).

Die Herstellung der 4-fach Glycin verlinkten Variante des Donor-Expressions-Konstruktes wurde über das Insertieren einer DNA-Sequenz, die für 4-fach Glycin codiert (GGC GGA GGC GGA), erreicht (siehe Abbildung 15).

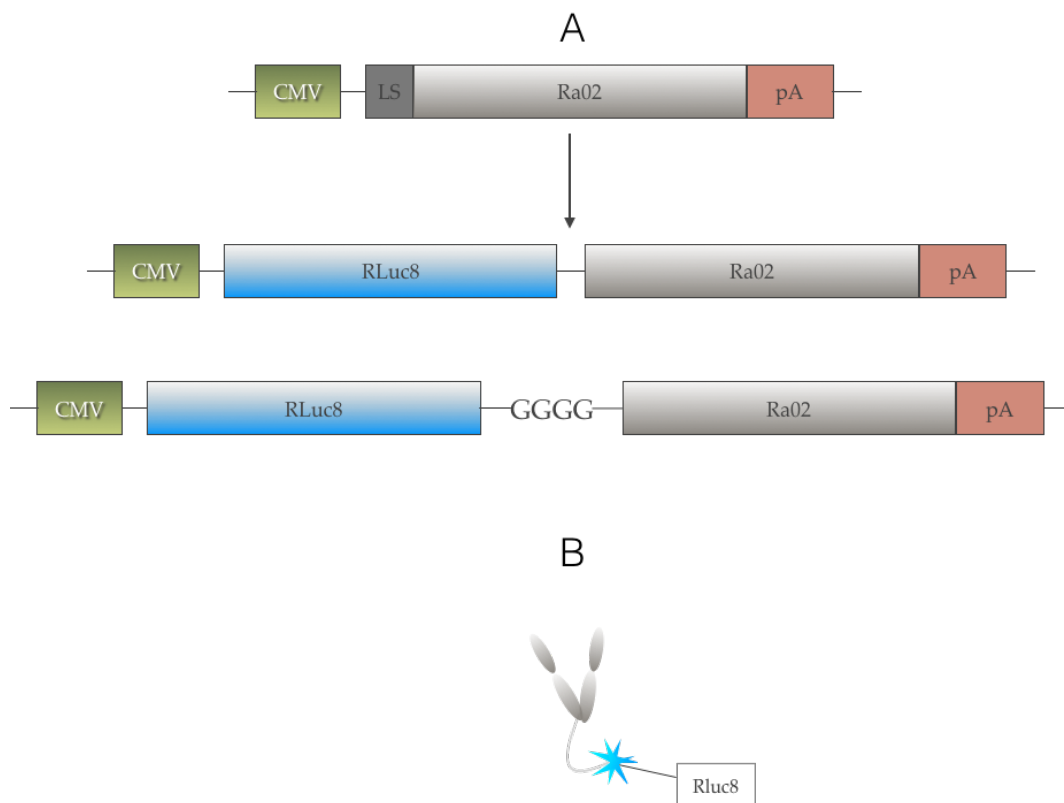


Abbildung 15: BRET-Donor Expressionskonstrukt

A: Das neue Konstrukt enthält die Luziferase RLuc8 und das VEGF-Bindungsmolekül Ra02 entweder direkt oder über einen 4x Glycinlinker (GGGG) fusioniert. Die LS (Leadersequenz) ist deletiert und alles wird über einen Cytomegalievirus-Promotor (CMV) kontrolliert. Das Konstrukt besitzt ein Polyadenylierungssignal (pA) am 3'Ende. B: RLuc8 graphisch dargestellt.

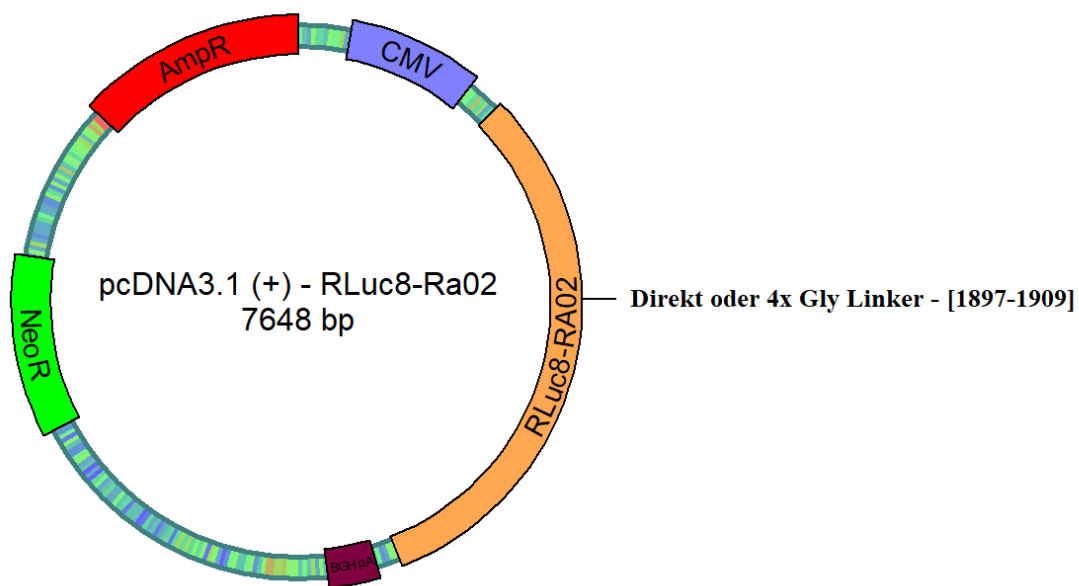


Abbildung 16: schematische Darstellung des RLuc8-(4Gly)-Ra02 Plasmids
(AmpR) Promotor für die Ampizillinresistenz, (CMV) Cytomegalievirus Promotor, (BGHpA) Bovine Growth Hormone Polyadenylierungssignal, (NeoR) Neomycin Resistenz.

4.2 Biodoc PCR-Kontrolle

Zur Überprüfung der PCR diente die Gelelektrophorese. Dabei wurde die DNA der Proben der Größe nach aufgetrennt. Eine Bande für RLuc8-4Gly-Ra02 liegt bei ca. 7800 bp.

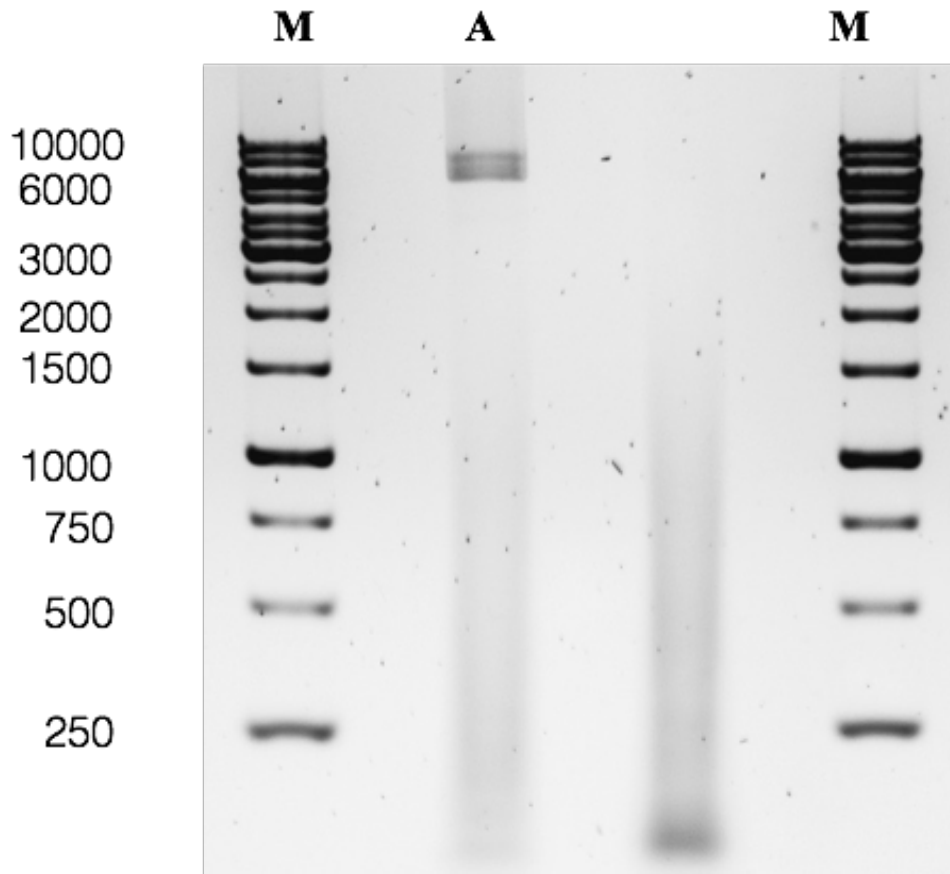


Abbildung 17: Biodoc PCR-Kontrolle

(M) Marker, GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot), (A) RLuc8-4xGly-Ra02

4.2.1 Klonierung

Vor der Ligation der DNA-Sequenzen wurde deren Konzentration mit dem Biophotometer gemessen.

Zur Vervielfältigung der DNA-Sequenz wurde die jeweilige DNA der RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 Konstrukte in E.coli Zellen transformiert und nach ihrer Klonierung isoliert. Die DNA-Sequenz von fünf Einzelklonen wurde im Eisenacher SeqLab sequenziert. Die Sequenzierung war sowohl für die RLuc-Ra02-Klone 5 und 9 als auch für die RLuc-4Gly-Ra02-Klone 2,3 und 4 positiv. Damit wurde der Erfolg der Mutagenese-PCR bestätigt.

4.2.2 Transfektionskontrolle durch eGFP

Zur Expression der Proteine RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 wurde die HEK 293-Zelllinie genutzt. Zuvor wurde das Plasmid von RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 einzeln in HEK-Zellen transfiziert. Zur Erfolgskontrolle der Transfektion wurde zusätzlich die DNA von peGFP-N1 des fluoreszierenden Proteins GFP nach selbigem Vorgehen in gleichartige HEK-Zellen transfiziert.

Bei erfolgreicher Transfektion und Expression des GFP leuchteten die Kontroll-HEK-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün.

Durch die simultane Transfektion der unterschiedlichen DNA konnte bei hoher GFP-Transfektionseffizienz gleichzeitig auch von einer hohen Transfektionseffizienz der RLuc8-Ra02 DNA bzw. RLuc8-4Gly-Ra02 DNA ausgegangen werden.

Es wurde standardmäßig 4 µg DNA in 6-well Platten 24-48 h transfiziert.

Wie in Abbildung 18 gezeigt, haben die HEK293 das peGFP-N1 aufgenommen und exprimierten GFP.

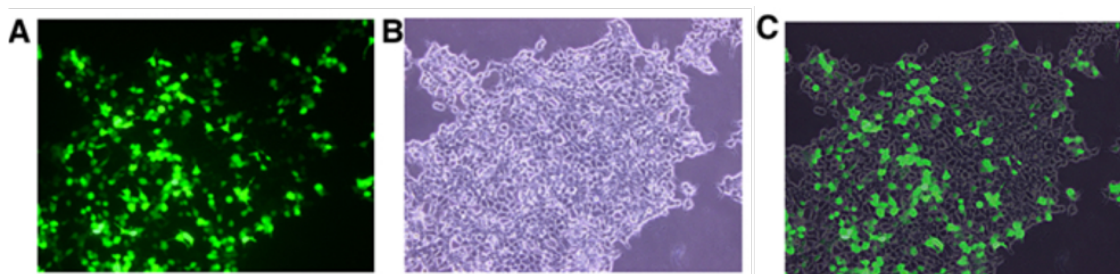


Abbildung 18: peGFP-N1-transfizierte HEK293 exprimieren eGFP

(A) transfizierte HEK293 im Phasenkontrast, (B) nach Anregung mit blauem Licht fluoreszieren GFP exprimierende Zellen grün. (C) Overlay aus A und B in 20x Vergrößerung.

4.2.3 Nachweis der Volllängenexpression der klonierten Konstrukte

Um eine regelrechte Expression zu kontrollieren, wurden die extrahierten Proteine der transfizierten HEK-Zellen unter reduzierten Bedingungen auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend geblottet und mit dem anti-Luziferase-Antikörper inkubiert.

Wie Abbildung 19 zeigt, wurden die Donor-Moleküle RLuc8-Ra02/ RLuc8-4Gly-Ra02 mit einem Proteingewicht von ca. 84 kDa korrekt exprimiert. Die errechnete Größe betrug 87,9 kDa.

Diese Ergebnisse bestätigten die korrekte Expression der Donor-Moleküle.

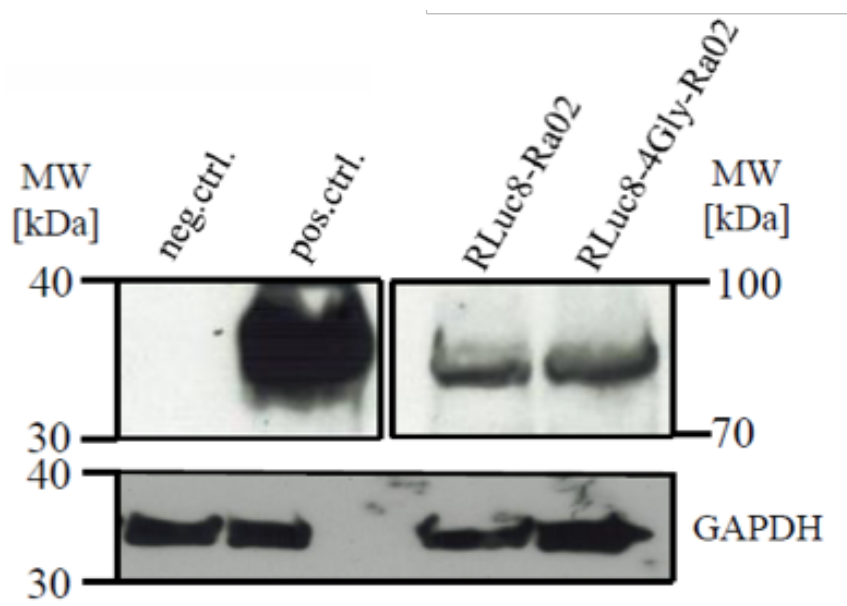


Abbildung 19: In vitro Expressionskontrolle

Vollständige Expression des RLuc8 Moleküls und der RLuc-(4Gly)-Ra02 Donormoleküle. Sowie die Ladekontrolle durch GAPDH.

4.2.4 Luziferaseexpressionsmessung

Da beide Proteine RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 die Luziferase enthielten konnte durch die Luziferaseemissionsmessung eine Aussage sowohl über die Expressionseffizienz beider Konstrukte, als auch über die intakte Funktion des Luziferaseanteils getroffen werden. Beide Donormoleküle und die RLuc8-Probe als Positivkontrolle zeigten RLuc8-Aktivität. Die gemessene Emission der Luziferase betrug $1,495 \cdot 10^6 \pm 0,074 \cdot 10^6$ RLU für die direkt fusionierte RLuc8-Ra02-Variante und $98,700 \cdot 10^4 \pm 8,614 \cdot 10^4$ RLU für die RLuc8-4Gly-Ra02-Variante. Die Negativkontrolle verzeichnete 185 ± 15 RLU. Bei den nachfolgenden Versuchen wurde über Verdünnung eine vergleichbare RLuc8-Aktivität der unterschiedlichen Donormoleküle eingestellt.

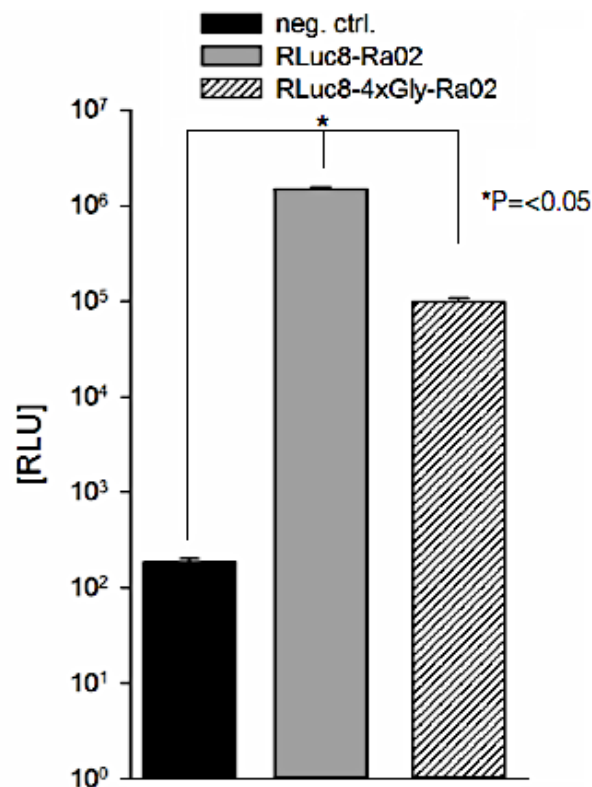


Abbildung 20: RLuc-Aktivität der Donormolekül-Konstrukte

Die Abbildung zeigt die RLuc-Aktivität der in HEK293-Zellen exprimierten Donormolekül-Konstrukte, verglichen mit einer Negativprobe, die ohne DNA-Zugabe transfiziert wurde. Die Ergebnisse wurden logarithmisch auf der Y-Achse aufgetragen und sind mit $P < 0,05$ signifikant (zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)).

Durch den Vergleich der 24h- und 48h-Expressionsmessung konnte kein signifikanter Anstieg der Luziferaseaktivität verzeichnet werden. RLuc8-Ra02 zeigte nach 24h eine Expression von $2,243 \cdot 10^7 \pm 0,173 \cdot 10^7$ und nach 48h $1,493 \cdot 10^7 \pm 0,136 \cdot 10^7$. RLuc8-4Gly-Ra02 zeigte nach 24h eine Expression von $1,120 \cdot 10^7 \pm 0,029 \cdot 10^7$ und nach 48h $1,536 \cdot 10^7 \pm 0,239 \cdot 10^7$. Aufgrund des geringen Anstiegs der Luziferaseaktivität nach 48h wurden alle weiteren Versuche mit 24h exprimierten Rluc-Ra02 bzw. Rluc-4Gly-Ra02 Proben durchgeführt.

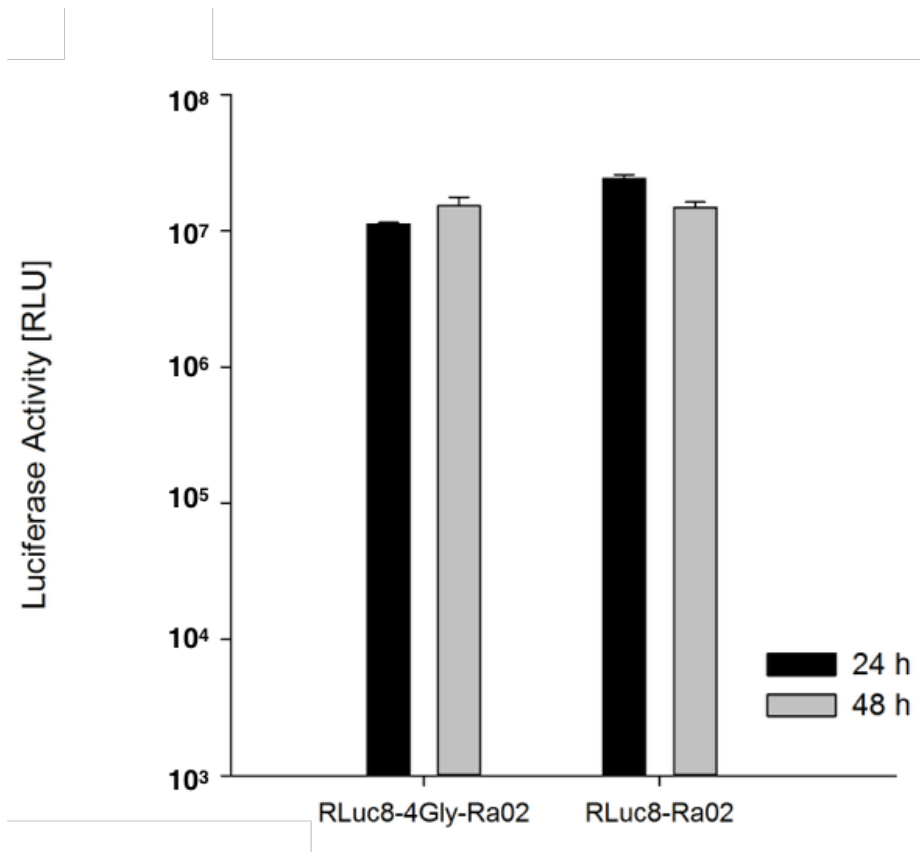


Abbildung 21: Vergleich der Luziferase Aktivität der Donormolekülkonstrukte nach 24h und 48h Inkubation

Kein signifikanter Anstieg der Luziferase Aktivität in Abhängigkeit zu einer verdoppelten Inkubationszeit beim Vergleich der beiden Donormolekülvarianten RLuc8-4Gly-Ra02 und RLuc8-Ra02 (zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)).

4.3 BRET-Messungen

In dieser Arbeit sollte ein neues BRET-System bestehend aus der RLuc8-Luziferase als Energiedonor und dem Farbstoff PerCP-Cy5.5[®] als Energieakzeptor etabliert werden. Zur VEGF-Quantifizierung wurden, wie bereits beschrieben, beide Komponenten an VEGF-bindende Moleküle gekoppelt.

Ein Energieübertrag vom Donormolekül RLuc8-Ra02/ RLuc8-4Gly-Ra02 auf das Akzeptormolekül NRP-PerCP-Cy5.5[®] nach Substratzugabe findet nur dann statt, wenn beide Moleküle an dasselbe VEGF-Molekül binden.

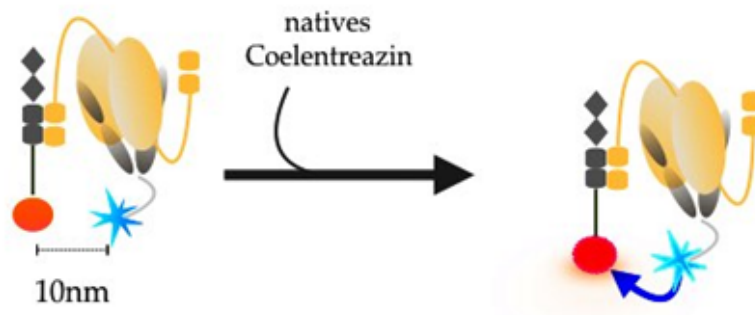


Abbildung 22: VEGF-abhängiges BRET7

Nach VEGF-Bindung stehen Donormolekül RLuc8-(4Gly)-Ra02 und Akzeptormoleküle NRP-PerCP-Cy5.5[®] in ausreichender räumlicher Nähe zueinander um ein BRET-Signal zu erzeugen.

Die Donormoleküle RLuc8-(4Gly)-Ra02 besitzen mit dem verwendeten Substrat n-Coelenterazine einen Emissionswellenlängenpeak von ca. 480nm. Dieser überlappt mit der Anregungswellenlänge des Akzeptormoleküls NRP-PerCP-Cy5.5[®]. Ein Energieübertrag ist also grundsätzlich möglich. NRP-PerCP-Cy5.5[®] emittiert nach Energieübertragung eine Strahlung mit einem Peak bei ca. 700nm. Daraus ergibt sich eine Emissionspeakseparation (spektrale Auflösung) von $\Delta\lambda = 220 \text{ nm}$ (Abbildung 23).

Wie in 3.7 beschrieben, wurden unterschiedliche Möglichkeiten zur Zusammenführung der BRET-Komponenten und deren Effizienz zur VEGF-Quantifizierung untersucht.

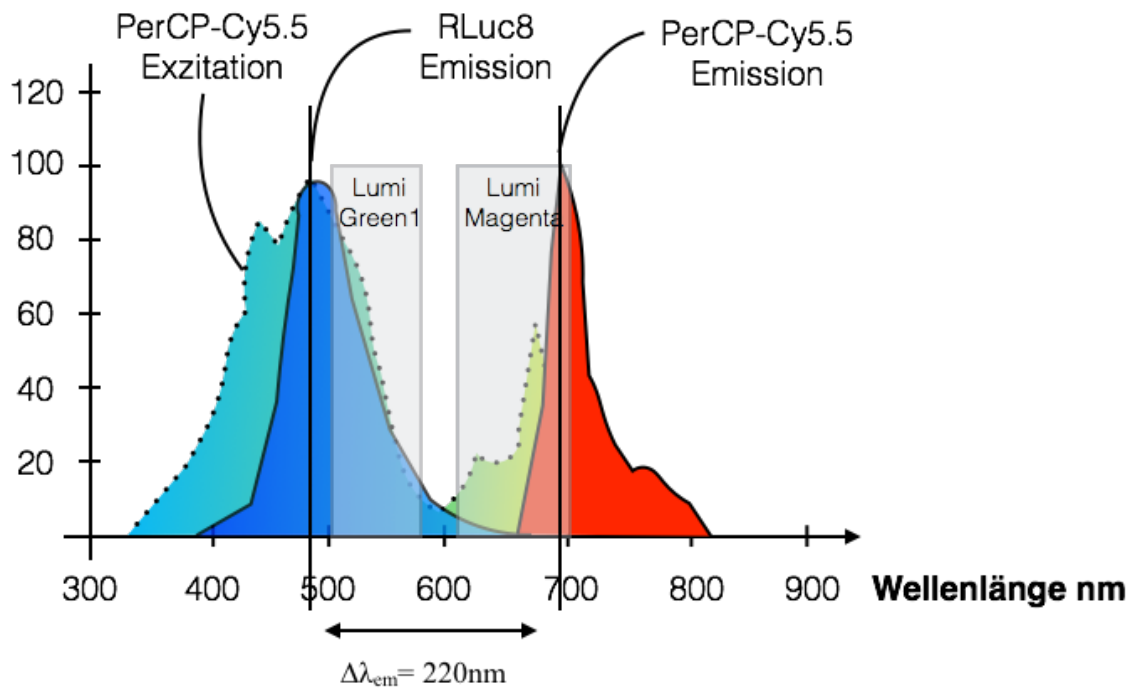


Abbildung 23: Emissionsspektren von Donor und Akzeptormolekül

Die bei um 480 nm emittierende RLuc8 überträgt, durch Überlappung der Exzitationswellenlänge, Energie an PerCP-Cy5.5®. Dieses emittiert anschließend Strahlung mit einem Peak bei 700 nm. Es ergibt sich eine spektrale Auflösung von 220 nm; Lumi Green1, Lumi Magenta = Tecan Lumineszenz Filter.

4.3.1 Fixierte Messung

4.3.1.1 Methode 1: NRP-fixierte Messung (Akzeptor-Fixierte Messung)

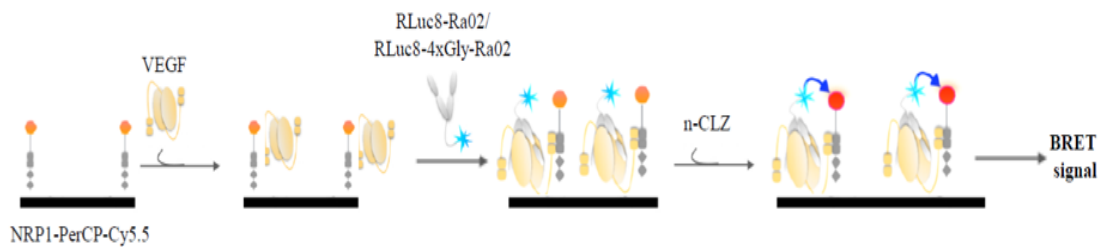


Abbildung 24: Akzeptorfixierte Messung

NRP-PerCP-Cy5.5[®]-Fixierung an eine feste Oberfläche und VEGF-Inkubation. Nach Zugabe des korrespondierenden Donormoleküls RLuc8-(4Gly)-Ra02 und dessen Substrats (nativen Coelenterazine) ist die Generierung eines BRET-Signals möglich.

Durch Fixierung des Akzeptormoleküls NRP1-PerCP-Cy5.5[®] ergaben sich für das RLuc8-Ra02-Donormolekül Werte von $124,1 \pm 2,0$ mBU für die Kontrolle ohne VEGF und $124,2 \pm 5,2$ mBU nach Zugabe von VEGF.

Für das RLuc8-4Gly-Ra02-Donormolekül ergaben sich BRET-Ratios von $128,7 \pm 2,2$ mBU ohne VEGF und $125,4 \pm 4,1$ mit VEGF.

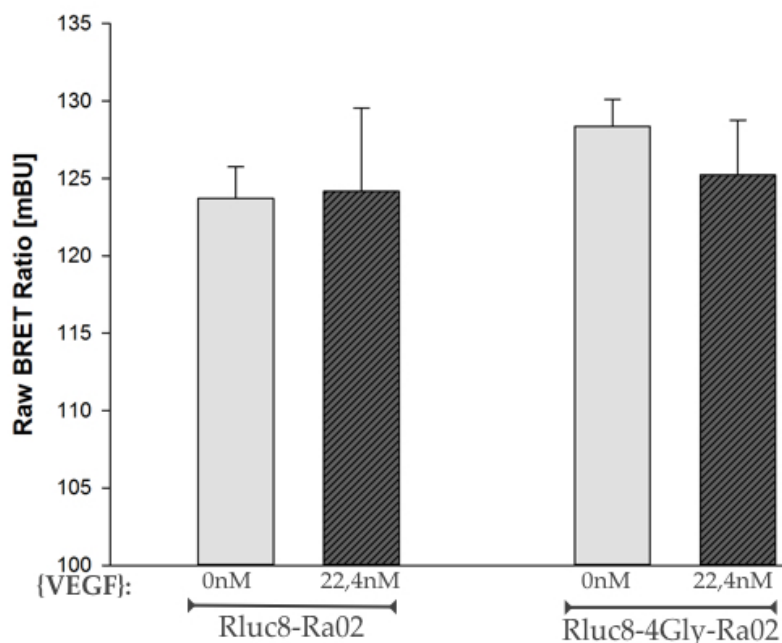


Abbildung 25: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Akzeptor-Fixierten-Messung

Auftrag der BRET-Ratio für die Donormoleküle RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 nach VEGF-Inkubation mit 22,4nM VEGF und 0nM VEGF als Negativkontrolle.

4.3.1.2 Methode 2: RLuc8-(4Gly)-Ra02-fixierte Messung (Donor -Fixierte Messung)

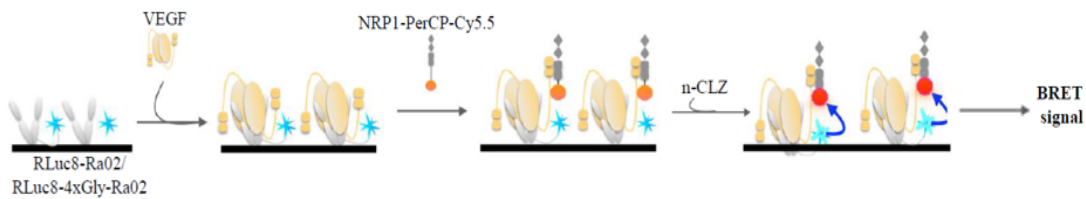


Abbildung 26: Donorfixierte Messung

RLuc8-(4Gly)-Ra02-Fixierung an eine feste Oberfläche und VEGF-Inkubation. Nach Zugabe des korrespondierenden Akzeptormoleküls NRP-PerCP-Cy5.5[®] und des Substrats (natives Coelenterazine) ist die Generierung eines BRET-Signals möglich.

Durch die Fixierung des Donormoleküls RLuc8-Ra02/ RLuc8-4Gly-Ra02 ergaben sich Messungen mit einem Wert von $1135 \pm 189,5$ mBU für die Negativkontrolle. Nach der Zugabe von VEGF wurden $1341 \pm 280,9$ mBU für die RLuc8-Ra02- Kombination gemessen. Für die RLuc8-4xGly-Ra02/NRP1-PerCP-Cy5.5[®]-Variante ergaben sich $1023 \pm 191,6$ mBU für die Kontrolle und 1004 ± 192 mBU nach VEGF Zugabe.

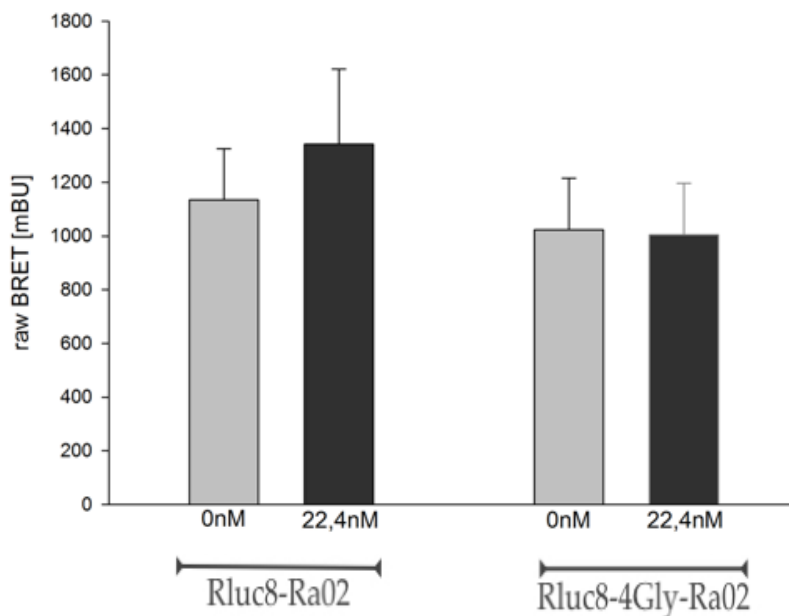


Abbildung 27: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Donor-Fixierten-Messung

Auftrag der BRET-Ratio für die Donormoleküle RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 nach VEGF-Inkubation mit 22,4nM VEGF und 0nM VEGF als Negativkontrolle.

4.3.2 Vorinkubierte Messung

4.3.2.1 Methode 3: Akzeptor-Inkubierte Messung (NRP-Vorinkubiert)

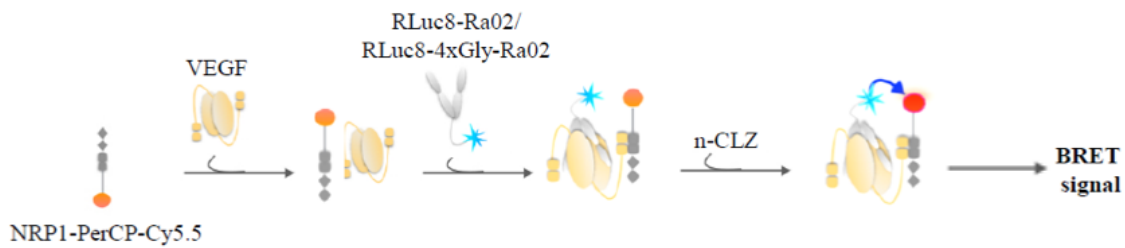


Abbildung 28: Akzeptor-Inkubierte Messung

Vorinkubation von NRP-PerCP-Cy5.5[®] mit VEGF. Nach Zugabe von RLuc8-(4Gly)-Ra02 und des Substrats Coelenterazine ist ein BRET-Signal möglich

Die BRET-Ratios für die Akzeptor-inkubierte Variante betrugen $143,4 \pm 1,9$ mBU mit VEGF und $146,4 \pm 1,5$ mBU ohne VEGF mit der RLuc8-Ra02- Kombination. Für die RLuc8-4Gly-Ra02- Variante wurden $158,1 \pm 0,1$ mBU mit VEGF und $158,1 \pm 1,5$ mBU ohne VEGF gemessen.

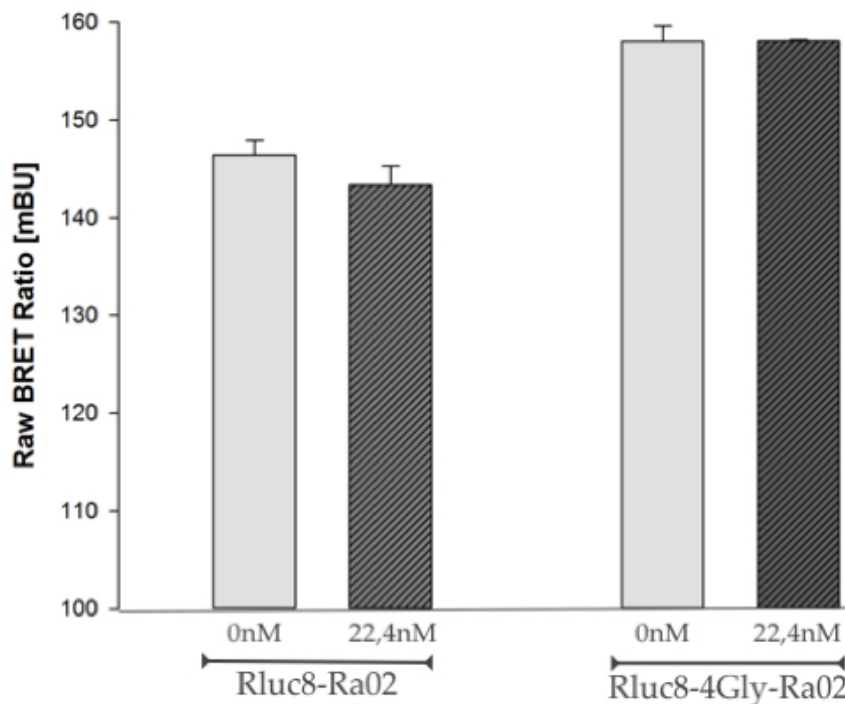


Abbildung 29: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Akzeptor-Inkubierten Messung

Auftrag der BRET-Ratio für die Donormoleküle RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 nach VEGF-Inkubation mit 22,4nM VEGF und 0nM VEGF als Negativkontrolle.

4.3.2.2 Methode 4: Donor-Inkubierte Messung (Rluc8-(4Gly)-Ra02-Vorinkubiert)

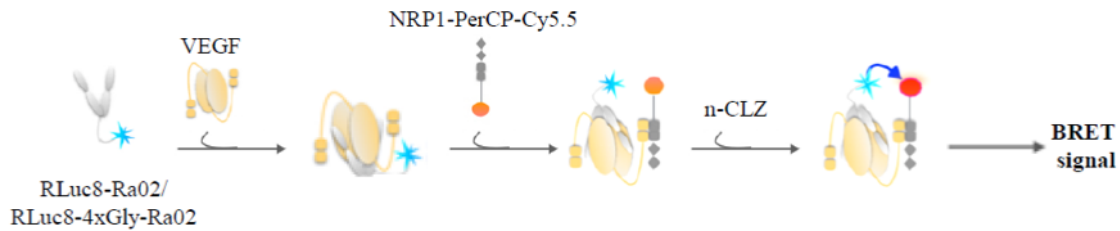


Abbildung 30: Donor-Inkubierte Messung

Vorinkubation von RLuc8-(4Gly)-Ra02 mit VEGF. Nach Zugabe von NRP-PerCP-Cy5.5[®] und des Substrats Coelenterazine ist ein BRET-Signal möglich

Die gemessenen BRET- Ratios lagen bei $115,5 \pm 3,9$ mBU für die Donor-vorinkubierte RLuc8-Ra02/NRP1-PerCP-Cy5.5[®] Variante und $129,4 \pm 9,7$ mBU für die Kontrolle ohne VEGF. Die Donor-vorinkubierte Kombination von RLuc8-4xGly-Ra02/NRP1-PerCP-Cy5.5[®] wurde mit $117,7 \pm 1,6$ mBU gemessen. Die Kontrolle ohne VEGF lag bei $115,0 \pm 1,1$ mBU.

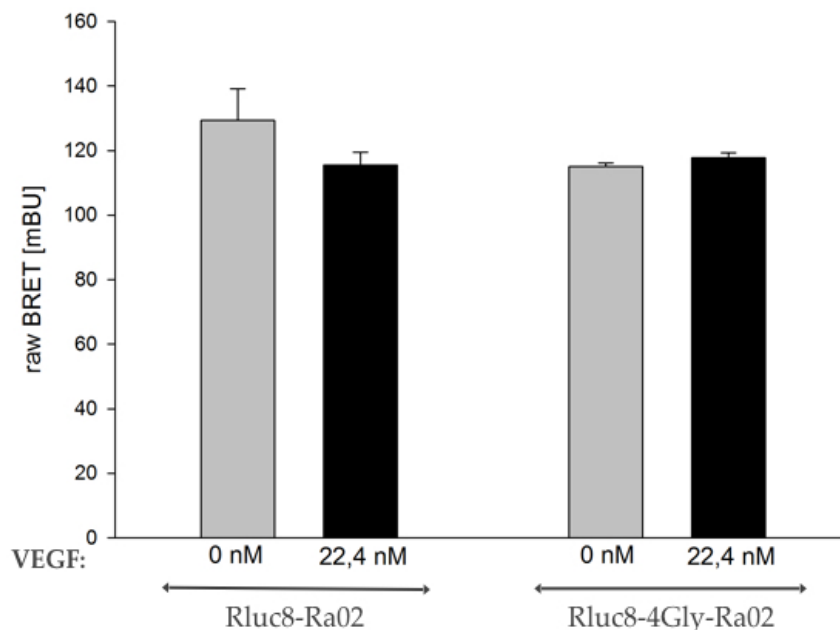


Abbildung 31: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Donorinkubierten Messung

Auftrag der BRET-Ratio für die Donormoleküle RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 nach VEGF-Inkubation mit 22,4nM VEGF und 0nM VEGF als Negativkontrolle.

4.3.2.3 Direkte Messung

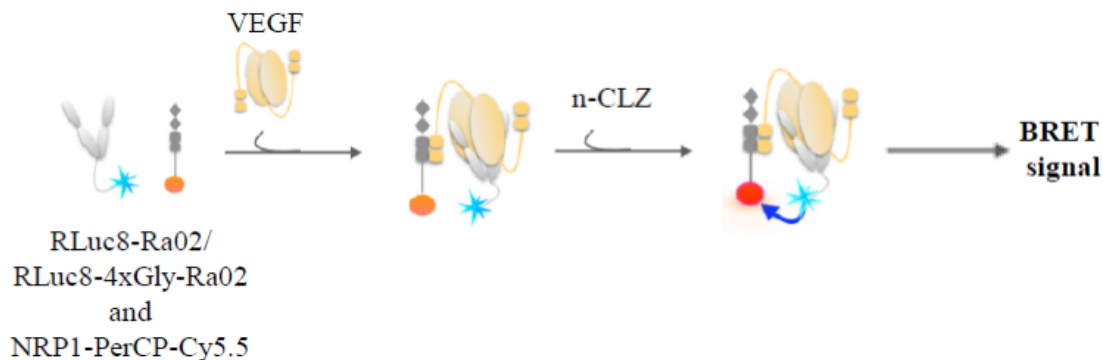


Abbildung 32: Direkte Messung

Simultane Inkubation der Donorkonstrukte (RLuc8-(4xGly)-Ra02 und des Akzeptorkonstrukts (NRP1-PerCP-Cy5.5) mit VEGF. Nach Zugabe des Substrats n-CLZ (natives Coelenterazine) entsteht ein BRET- Signal

Zur direkten Messung wurden alle drei Komponenten: NRP-PerCP Cy5.5[®], VEGF und RLuc8-(4Gly)-Ra02 simultan inkubiert. Hier ging gleichzeitig das markierte Neuropilin eine Verbindung mit der NRP-Bindungsstelle an VEGF ein, als auch Ra02 an der Rezeptor-Bindungsstelle.

Das BRET System wurde mit verschiedenen VEGF Konzentrationen untersucht.

4.3.2.4 Messung 1

Für die Probe RLuc8-Ra02 (22,4 nM VEGF) war im Vergleich zur Negativprobe (0nM VEGF) ein mit $P < 0,001$ signifikanter Unterschied der BRET-Ratio zu erkennen. Während bei der Probe ohne VEGF eine BRET-ratio von 98.7 ± 1.2 mBU zu verzeichnen war, zeigte sich bei der Probe mit 22,4 nM VEGF eine BRET-ratio von ca. 115.3 ± 5.0 mBU. Auch bei der RLuc8-4Gly-Ra02 Probe mit 22,4 nM VEGF zeigte sich mit einer BRET-ratio von ca. 119.4 ± 4.0 mBU ein signifikanter ($P < 0,001$) Anstieg im Gegensatz zur Probe ohne VEGF mit einer BRET-ratio von 101.4 ± 2.2 mBU.

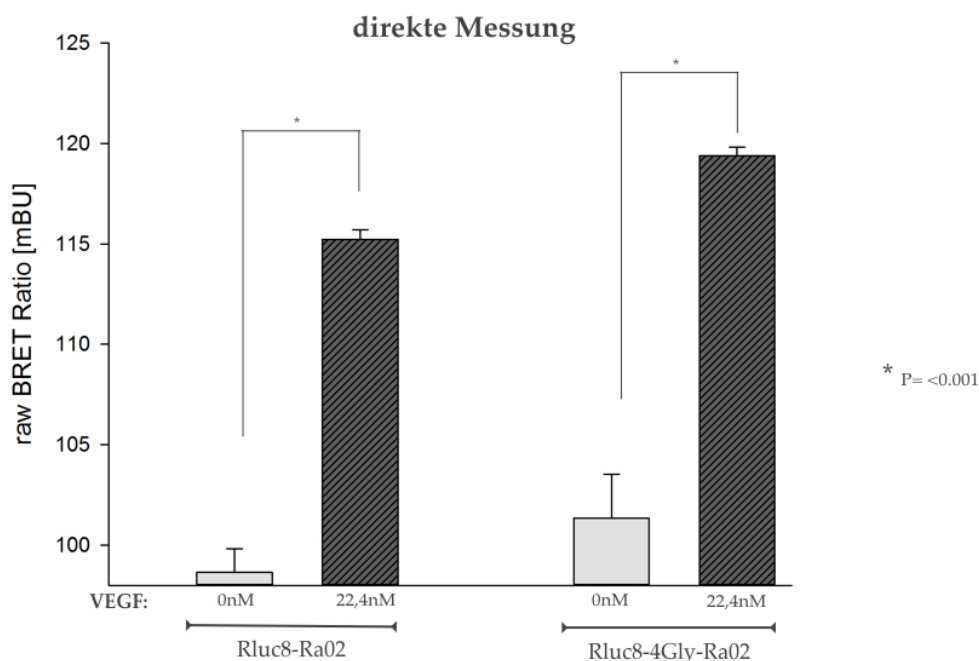


Abbildung 33: Grafische Darstellung der Ergebnisse der direkten Messung

Auftrag der BRET-Ratio für die Donormoleküle RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 nach VEGF-Inkubation mit 22,4nM VEGF und 0nM VEGF als Negativkontrolle. Signifikanzen von $P = < 0,001$ (t-Test) beim Vergleich der Positiv- und Negativprobe je eines Donormoleküls.

4.3.2.5 Messung 2

Zur Untersuchung, ob diese Messmethode auch Konzentrationsunterschiede von VEGF aufzeichnen kann, wurde ein Versuch mit $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ VEGF (22,4 nM) und $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (11,2 nM) VEGF durchgeführt. Bei diesen Konzentrationsunterschieden ist eine Änderung der BRET-ratio zu verzeichnen. Für die RLuc8-Ra02-Probe lag der Wert der $0\mu\text{g}/\mu\text{l}$ VEGF-Probe noch bei $98,7 \pm 1,2$ mBU, der von $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ VEGF bei $110,5 \pm 2,0$ mBU und der von $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ VEGF bei $115,3 \pm 5,0$ mBU. Hier ergibt sich ein signifikanter Anstieg ($P < 0,05$) von 0 nM VEGF zu 22,4 nM VEGF. Auch für die RLuc8-4Gly-Ra02-Probe sah man einen Anstieg der BRET-ratio mit steigender VEGF-Konzentration: $119,4 \pm 4,0$ mBU für 22,4 nM VEGF, $114,2 \pm 5,0$ mBU für 11,2 nM VEGF und $101,4 \pm 2,2$ mBU ohne VEGF. Dies ergibt auch hier einen signifikanten Anstieg ($P < 0,05$) von 0 nM VEGF zu 22,4 nM VEGF.

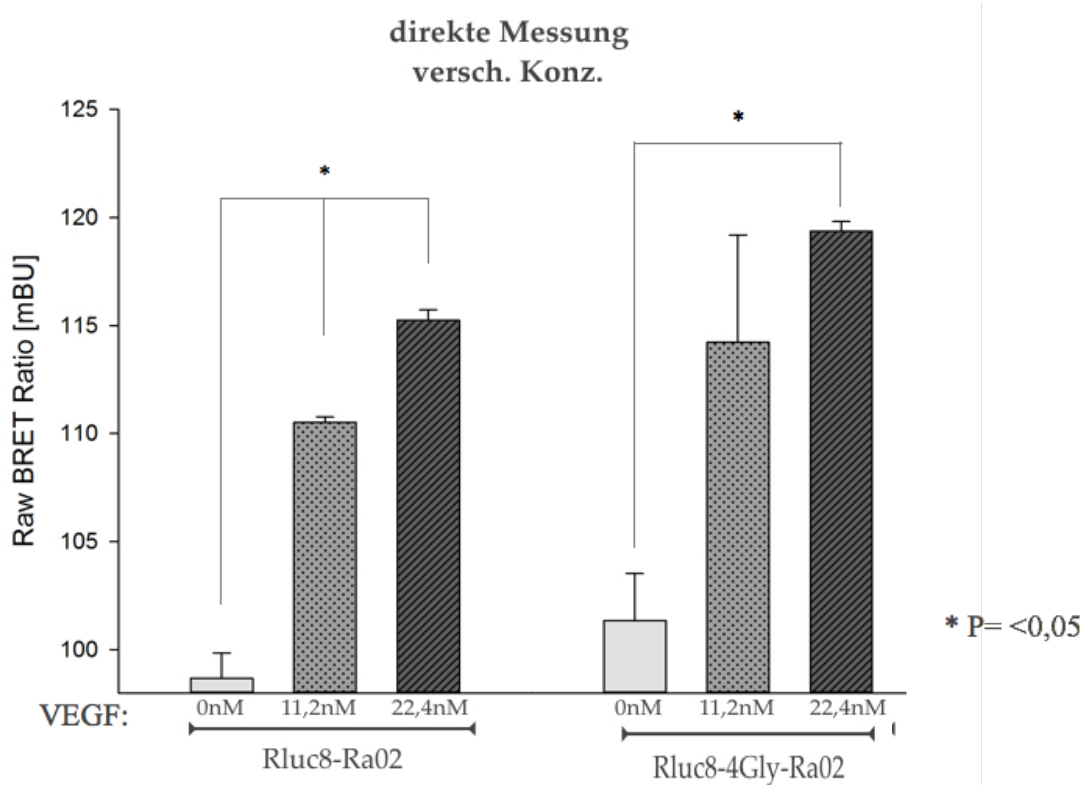


Abbildung 34: Grafische Darstellung der Ergebnisse der direkten Messung mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen

Zusätzliche Messung mit 11,2 nM VEGF aufgetragen neben den Ergebnissen von 0 nM VEGF und 22,4 nM VEGF (s. Abbildung 33). Signifikanzen von $P = < 0,05$ (zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA))

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein neues BRET-Paar etabliert, welches aus der Renilla reniformis Luziferase (RLuc8) als Energiedonor und dem fluoreszierenden Farbstoff PerCP-Cy5.5[®] als Energieakzeptor besteht.

Es wurden bereits mehrere verschiedene BRET-Systeme beschrieben, die sich in der Auswahl der Luziferase als Energiedonor, des Substrates oder des fluoreszierenden Proteins (FP) unterscheiden (Sun et al., 2016).

BRET Systeme können dementsprechend durch variable Kombinationen verschiedener Luziferasen und FPs mit jeweils eigenen Eigenschaften und optischen Charakteristika angepasst werden. Jede Kombination birgt ihre eigenen Vor- und Nachteile.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurde erstmals beschrieben, dass ein Energieübertrag zwischen RLuc8 und PerCP-Cy5.5[®] möglich ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass dieser zur VEGF-Detektion genutzt werden kann, indem VEGF-bindende Moleküle an Donor- und Akzeptormoleküle gekoppelt werden.

Ein Energieübertrag vom Donormolekül RLuc8-Ra02/ RLuc8-4Gly-Ra02 auf das Akzeptormolekül NRP-PerCP-Cy5.5[®] nach Substratzugabe fand nur dann statt, wenn beide Moleküle an dasselbe VEGF-Molekül banden. Die BRET-Ratio sollte also in der Negativkontrolle immer geringer sein, da nur wenige Moleküle in ausreichender Nähe zueinander vorliegen können, um ein BRET Signal zu erzeugen. Der Anstieg der BRET-Ratio nach VEGF Zugabe zeigt dann die Bindung beider Komponenten an VEGF an. Somit könnte dieses System in der Theorie zur VEGF-Quantifizierung genutzt werden.

5.1 Vergleich der Versuchsmethoden

Die Daten, die durch diese Arbeit erhoben wurden, demonstrieren, dass eine VEGF-Detektion über ein Zwei-Komponenten-BRET-System in vitro möglich ist.

Die verschieden beschriebenen Versuchsmethoden resultierten in unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der VEGF-Detektion durch BRET basierte Protein-Protein-Interaktionsmessungen. Die getesteten Versuchsmethoden sind also in ihrer Sensitivität zu einer VEGF-Bindung und somit auch in ihrer Eignung als Biosensor zur VEGF-Quantifizierung verschieden.

Die fixierten Messungen (Abbildung 24, Abbildung 26) ergaben keine Änderung der BRET-Ratio in Abhängigkeit von VEGF.

Anhand der Messwerte sowie Abbildung 25 ist zu erkennen, dass bei der Akzeptor-Fixierten Methode mit der Rluc8-Ra02-Probe nur eine sehr geringfügige, nicht signifikante Erhöhung der BRET-Ratio im Gegensatz zur Negativ-Probe zu verzeichnen ist.

Die Rluc8-4Gly-Ra02-Probe zeigt sogar einen Abfall der BRET-Ratio im Vergleich zur Negativ-Probe.

Die beeinflussende Komponente hin zu diesen Ergebnissen könnte das Verfahren selbst darstellen.

Bei der Fixierung der Moleküle auf einer festen Oberfläche (Mikrowellplatte) kann, bei der Wiederholung des Versuchs, nicht mit einer konstanten Zahl an gebundenen Molekülen gerechnet werden. Die Anzahl der initial bindenden Moleküle ist unbekannt und wird trotz gleichbleibendem Versuchsaufbau bei jeder Wiederholung variieren. Durch den Blockierungsvorgang mit einhergehenden Wachschritten, bei denen sich wieder eine nicht voraussehbare Anzahl an Molekülen löst, wird die letztendlich gebundene Anzahl noch weiter verändert. Das System erscheint also als nicht reproduzierbar und ist somit für eine zuverlässige VEGF-Detektion ungeeignet. Dies gilt besonders im Hinblick der Bestimmung von Proben mit unbekannter VEGF-Konzentration.

Die fehlende Reproduzierbarkeit des Verfahrens könnte auch die Ursache für die stark abweichenden Zahlen der Donorfixierten Methode im Vergleich zu den anderen Versuchen darstellen (vgl.

Abbildung 27). Durch diverse Fixierungs-, Blockierungs- und Waschschriffe kann die Zahl gebundener sowohl Donor- als auch Akzeptormoleküle nicht konstant gehalten werden, folglich ergeben sich abweichende BRET-Ratios.

Eine weitere Erklärung für die Ergebnisse der Donor-/Akzeptorfixierten Methode könnte die Tatsache sein, dass sich VEGF-Moleküle als antiparallele Homodimere darstellen, welche jeweils zwei Bindungsstellen für Ra02 als auch für NRP1 besitzen (Muller et al., 1998).

Es besteht demnach die Möglichkeit, dass je nach Donor- oder Akzeptor-Fixiertem Verfahren entweder die Ra02 oder die NRP1 Bindungsdomänen des VEGF ausschließlich mit Donor- oder dem Akzeptormolekülen besetzt sind.

Durch diese einseitige Sättigung mit jeweils nur einer BRET-Komponente, dem Donor- ODER Akzeptormolekül, ist es für den korrespondierenden BRET-Partner aufgrund des Prinzips der räumlichen Verdrängung unmöglich, ebenfalls an VEGF zu binden.

Auch das Donor-/Akzeptor-Inkubierte-Verfahren führte zu ähnlich unbefriedigenden Ergebnissen.

Hier ist ebenfalls anhand der Daten (vgl. Abbildung 28 und Abbildung 30) kein signifikanter Anstieg der BRET-Ratio bei VEGF-Zugabe für beide getesteten Donormoleküle zu verzeichnen.

Vermutlich war der Effekt der doppelten Bindungen nur einer Komponente und die räumliche Verdrängung noch präsenter als in der fixierten Messung.

Durch die Inkubation von zunächst nur einer der BRET-Komponenten mit VEGF könnte diese initial doppelt an VEGF gebunden werden. Die später hinzugefügte korrespondierende BRET-Komponente wird räumlich von der schon bestehenden Bindung verdrängt und kann folglich durch die sterische Inhibition keine Proteininteraktion mit VEGF mehr eingehen.

Im Allgemeinen wird die Bindung von Molekülen in Lösung oft als ein Vorgang, der von Assoziation und Dissoziation bestimmt wird, beschrieben. Jedoch besteht nur eine geringe Chance, dass ein schon gebundenes Molekül durch ein anderes ersetzt wird. Folglich ist es unwahrscheinlich, dass ein BRET-Signal durch ein mit doppeltem Donor oder Akzeptor besetztem VEGF ausgelöst wird.

Das Donor/Akzeptor-Inkubierte-Verfahren stellt sich somit auch als unbrauchbar zur VEGF-Quantifizierung heraus.

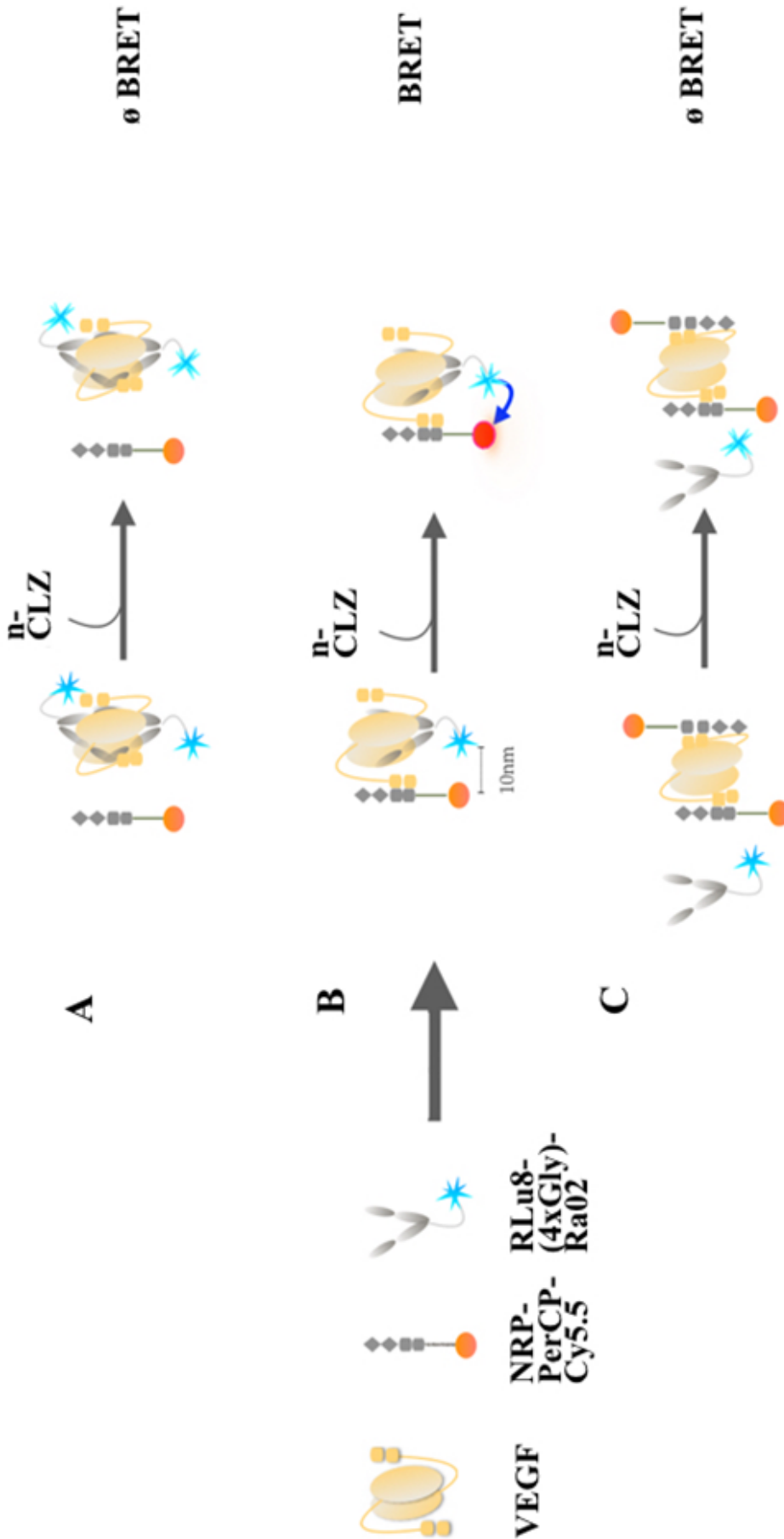


Abbildung 35: Schematische Darstellung der möglichen Bindungen der BRET-Komponenten

(A/C) Sowohl zwei der Donormoleküle RLU8-(4Gly)-Ra02 (C) als auch der Akzeptormoleküle (A) können eine Bindung mit VEGF eingehen. Ein BRET-Signal kann nicht entstehen; (B) Ein BRET-Signal entsteht nur, wenn sowohl Donor als auch Akzeptormolekül an dasselbe VEGF-Molekül binden.

Die unbefriedigenden Ergebnisse der fixierten und vorinkubierten Versuche könnten Zweifel erwecken, ob eine adäquate VEGF-Bindung beider BRET-Moleküle überhaupt möglich ist. Dies gilt primär, wenn man sich auf die Versuche konzentriert in denen die Negativprobe eine höhere BRET-Ratio aufweist als die der BRET-Konstrukte.

Ein BRET-Signal kann nur dann entstehen, wenn beide BRET-Komponenten in der Lage sind VEGF zu binden und somit eine gewisse räumliche Nähe zwischen den beiden BRET Partnern entsteht.

Wimmer et. al zeigten jedoch den Versuchen bezüglich des Ein-Komponenten-BRET-Systems zur Quantifizierung von VEGF, dass eine Kopplung von RLuc8 an Ra02 dessen Proteinfunktion und VEGF-Bindeaffinität nicht beeinflusst (Wimmer et al., 2016). RLuc8-(4Gly)-Ra02 sollte also ungehindert an die Rezeptorbindestelle des VEGF binden.

Das Akzeptorfluorophor PerCP-Cy5.5[®] wurde an eine freie Aminogruppe des NRP1 gekoppelt. NRP ist wiederum fähig VEGF an seiner C-terminalen Sequenz zu binden. Möglich ist, dass durch die Kopplung des Farbstoffes an NRP1 dessen Proteinfunktion und VEGF-Bindeaffinität beeinflusst wird. Hinweise für eine solche Beeinträchtigung konnten in den weiteren Versuchen dieser Arbeit jedoch nicht gefunden werden.

Im Falle der direkten Methode, also der gleichzeitigen Inkubation des VEGFs mit den VEGF-bindenden Donor- und Akzeptormolekülen, ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass beide BRET Partner an dasselbe VEGF binden. Damit erhöht sich auch die Chance eines detektierbaren BRET-Signals.

Anhand der Daten und Grafiken (vgl. Abbildung 32 und Abbildung 33) ist für die beiden Donorvarianten (RLuc8-(4Gly)-Ra02) nach Zugabe von 22,4 nM VEGF im Vergleich zur Negativprobe (0nM VEGF) ein mit $P < 0,05$ signifikanter Anstieg der BRET-ratio zu messen.

Zwar besteht die Möglichkeit der sterischen Inhibition des VEGFs mit nur einer BRET-Komponente auch hier, jedoch provoziert das simultane Inkubieren eine Rivalität um die VEGF-Bindestelle für Donor und Akzeptor.

Voraussetzung hierfür und dementsprechend für eine konstante VEGF-Detektion ist eine vergleichbare Affinität von Donor- und Akzeptormolekül zu VEGF. Die theoretische Affinitätskonstante für NRP1 zu VEGF wurde mit einem Wert von 0,3 pM ermittelt. Ra02 wurde mit einer Konstante von 1,3 nM in einer vorhergehenden Studie bezüglich des Ra02 charakterisiert (Fuh et al., 2006, Geretti et al., 2007, Wimmer et al., 2015).

Ein signifikanter Unterschied der BRET-Ratio-Änderungen nach VEGF-Zugabe zwischen den Donorkonstrukten RLuc8-Ra02 und RLuc8-4Gly-Ra02 lässt sich in den durchgeführten Versuchen nicht darstellen.

Zwar ist die BRET-Ratio des RLuc8-4Gly-Ra02 nach VEGF- Zugabe meist höher als die des RLuc8-Ra02, jedoch verzeichnen hier auch die Negativproben (ohne VEGF) erhöhte BRET-Ratios verglichen mit den Negativproben des RLuc8-Ra02.

Ein Unterschied in den BRET-Ratios je nach Linkervariante wäre allerdings auch zu vermuten gewesen. Denn der Verzicht oder das Einsetzen eines Linkers hat Einfluss auf die dreidimensionale Struktur des Proteins, welche wiederum Einfluss auf die Orientierung zwischen Luziferase und Fluorophor nach der VEGF-Bindung besitzt.

Einerseits kann durch das Einfügen von Linkern, je nach deren Aminosäuresequenz die räumliche Distanz des Energiedonors zum –Akzeptor vergrößert und so den Energieübertrag abschwächt werden. Die BRET-Ratio könnte also bei der 4xGlycinvarianteder als geringer vermutet werden. Andererseits kann die räumliche Orientierung des Energiedonors zum –Akzeptor also die Winkel zwischen den Dipolmomenten durch Linker positiv aber auch negativ beeinflusst werden (siehe Abbildung 7). Bei optimalem Energieübertrag liegt der Emissionsdipol des Donors in einer Ebene mit dem Anregungsdipol des Akzeptors ($\Theta_D = \Theta_A = 90^\circ$). Verschiebt sich der Winkel des Dipols ($\Theta_D = \Theta_A = \Theta_{DA} = 90^\circ$) einer Komponente nimmt die übertragene Energie ab und wird bei einem Winkel von 90° Null.

Dacres et. al haben bereits 2012 beschrieben, dass oben genannte Komponenten den Energietransfer beeinflussen können (Dacres et al., 2012b). Auch Le et al. verdeutlichten den Einfluss der Peptidlinkervarianten auf ein BRET-Signal (Le et al., 2014).

Auch Wimmer et al. haben in den Studien zur Quantifizierung von VEGF über ein Einkomponentensystem gezeigt, dass die VEGF-Konzentration, die über verschiedene Biosensorvarianten zu erfassen ist, abhängig von den Linkern zwischen den Biosensordomänen zu sein scheint. In diesen Studien zeigt die 4x Glycin verlinkte Biosensorvariante keinen Energietransfer und ist somit unbrauchbar für eine Quantifizierung. Nach Wimmer et. al könnte die Insertion von längeren Ketten einen Einfluss auf die Distanz zwischen Donor und Akzeptor haben, von der das BRET-Signal abhängt (Wimmer et al., 2016). Auch das Einfügen von AS, die die räumliche Struktur eines Proteins verändern, können nach Wimmer et. al Einfluss auf die BRET-Ratio haben.

Wimmer beschreibt jedoch ein Singlemolekül BRET2-System, das Donor- und Akzeptor in einem Molekül vereint. Die Konformationsänderung des Moleküls durch die VEGF-Bindung reduziert die Distanz zwischen Donor und Akzeptor, was zu einer erhöhten eBRET2-Ratio führt. Bestimmte Linker zwischen Donor und Akzeptormolekül haben somit natürlich einen viel größeren Einfluss auf die terminale Konformation des Moleküls vor und nach VEGF-Bindung, als bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Zwei-Komponenten BRET-System.

Generell ist also eine VEGF-Detektion über den Energieübertrag durch das etablierte BRET-Verfahren bei simultaner Inkubation von VEGF, RLuc8-(4Gly)-Ra02 und NRP1-PerCP-Cy5.5[®] möglich. Jedoch ist fraglich, wie sensitiv dieses System auf die eigentliche VEGF-Bindung reagiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind indirekt vergleichbar mit den Ergebnissen der durch Wimmer et. al. beschriebenen Methode des Ein-Komponenten-Systems zur VEGF-Detektion mittels eBRET2.

Jedoch besitzt diese Arbeit eine geringere Sensitivität bezüglich der VEGF-Abhängigkeit, verglichen mit dem Ein-Komponenten-System.

Abweichend von Wimmer et. al., die die geringe Brutto-BRET-Ratio der 4Gly-Variante als Resultat des unvorteilhaften 4Gly Linkers deuten, liegt das Problem der Zwei-Komponenten-Variante in den relativ hohen BRET-Ratios der no-VEGF-Kontrolle (Wimmer et al., 2016). Diese wurde unabhängig von der Versuchsmethodik gemessen und können daher nicht nur durch die Effekte der Brown'schen Molekülbewegung erklärt werden. Diese besagt, dass Donor- und Akzeptor zufällig in ausreichende Nähe gebracht werden und ohne entsprechende VEGF-Bindung ein BRET-Signal zu erzeugen. Möglich wäre, dass zu hohe Korrekturfaktoren durch das Messverfahren selbst zustande kommen.

Durch den Magenta Filter des Tecan Microplate-Readers könnte eine verzerrte BRET-Ratio aufgrund des zweiteiligen Wellenlängenfilters von 370-450nm und 610-700nm erwartet werden. Ein Teil des Filters (bei 370-450nm) grenzt knapp an den Bereich der Emission der Donormoleküle RLuc8-(4xGly)-Ra02 ($\lambda_{em} = ca. 480\text{ nm}$). So könnte zusätzlich zur Emission des PerCP-Cy5.5[®] ein Teil der Emission der RLuc8-Luziferase gemessen werden. Resultieren würde eine vermeintlich höhere Emission des Akzeptors PerCP-Cy5.5[®]. Es ergibt sich also eine Summe bestehend aus der RLuc8-Emission, die durch den Filter bei 370-450nm gemessen wird und der tatsächlichen PerCP-Cy5.5[®].

Emission, die durch den Filter bei 610-700nm gemessen wird. Resultat wäre eine höhere BRET-Ratio als tatsächlich vorhanden. Dies gilt auch für die no-VEGF-Kontrolle.

Der Anteil der RLuc8-Emission, der durch den Lumi Magenta Filter gemessen werden würde, ist jedoch als verhältnismäßig gering zu erachten. Ein Großteil der Energie, welche durch die RLuc8-Luziferase generiert wird, geht nach dem BRET-Verfahren direkt strahlungsfrei an PerCP-Cy5.5[®] über. Nur ein kleiner Teil der Emission wird in Strahlung umgewandelt und kann durch den Tecanfilter Lumi Green erfasst werden. Ein noch geringerer Teil wird durch den Tecan-Filter Lumi Magenta erfasst, da dieser das Spektrum der RLuc8-Luziferase, mit einem Peak von 480 nm, mit seinen 370-450nm kaum misst.

Ein weiteres Problem bei der Auswahl geeigneter Filter stellt die Emissionsbreite des Donormoleküls RLuc8-(4Gly)-Ra02 dar. Diese reicht von ca. 375 nm bis 650 nm mit einem Peak bei 480 nm (siehe Abbildung 36). Der Tecan-Filter Lumi Green1 erfasst Strahlung mit einem Wellenlängenbereich von 520-570 nm und somit nicht die gesamte Emissionsbreite des Donormoleküls. Die Nutzung eines anderen Filters, wie beispielsweise des Lumi Blue oder Blue1 ($\lambda = 400-515 / 370-480$) würde einerseits ebenfalls die Gesamtbreite des Emissionsspektrums der RLuc8-Luziferase nicht erfassen und sich andererseits zusätzlich mit dem Filter Lumi Magenta (370-450, 610-700nm) überschneiden, was zu einer noch größeren Verzerrung der BRET-Ratios führen würde.

Die Emission der RLuc8-Luziferase könnte also höher sein als durch den Microplate-Reader dargestellt. Die etwaige BRET-Ratio, die sich durch den Quotienten aus Emission des Akzeptormoleküls und die des Donormoleküls berechnet, könnte sich signifikant verringert darstellen.

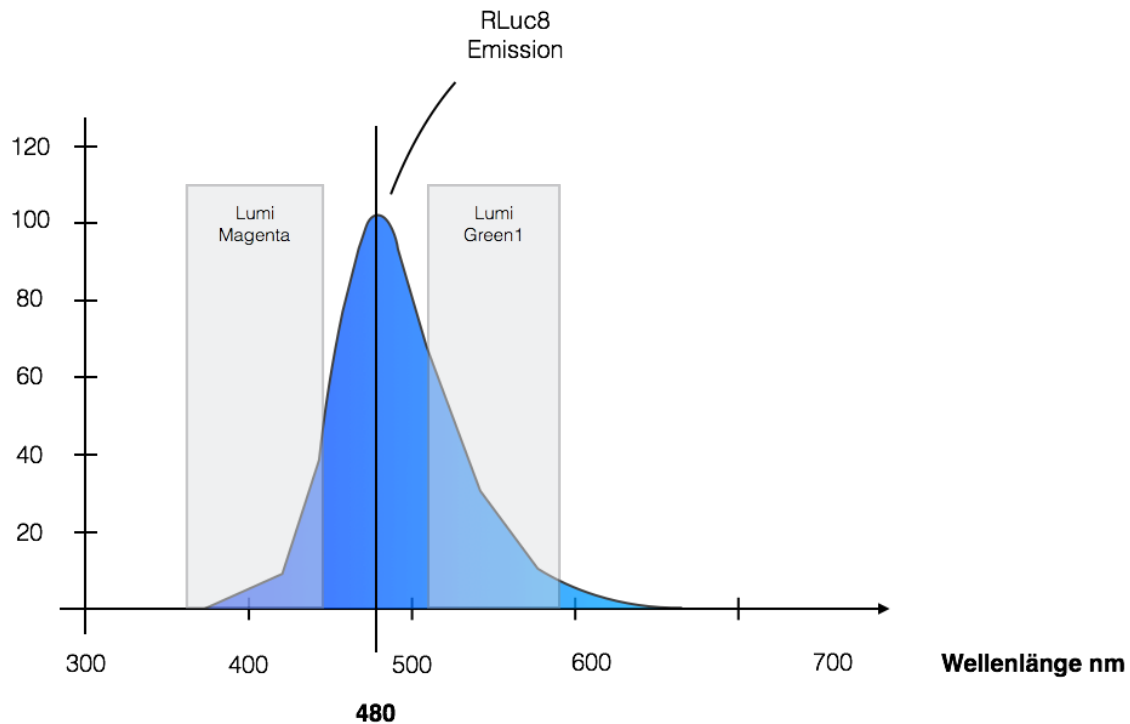


Abbildung 36: RLuc8 Emission

Messung der RLuc8 Emission durch den Filter Green1 (520-570); Teile der RLuc8-Emission werden auch durch den Filter Lumi Magenta (370-450nm//610-700nm) eingefangen.

Um die Sensitivität des Systems im Zusammenhang mit unterschiedlichen VEGF-Konzentrationen weiter zu testen, wurde ein Versuch mit variablen Konzentrationen, von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ VEGF und 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ VEGF durchgeführt.

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass in diesem Bereich der Konzentrationsunterschiede eine Änderung der BRET-Ratio mit einer statistischen Relevanz von $P = <0,05$ zu verzeichnen ist (Abbildung 34). Jedoch sind die untersuchten VEGF-Konzentrationen im μg -Bereich noch weit von der physiologischen VEGF-Konzentration im Auge, die im pg-Bereich liegt, entfernt.

5.2 Ausblick

Die Entwicklung eines BRET-Systems zur Detektion und Quantifizierung von VEGF hat vor allem eine Bedeutung für die Therapie von Augenerkrankungen, wie die diabetische Retinopathie, die altersabhängige Makuladegeneration und die Frühgeborenenretinopathie, die laut „Global estimates of visual impairment: 2010“ der World Health Organisation (WHO) zu den Hauptursachen von Sehschwäche und Erblindung gehören (Pascolini and Mariotti, 2012).

Therapie der Wahl dieser Erkrankungen, die, wie bereits in der Einleitung beschrieben, mit einem Anstieg der lokalen VEGF-Konzentration korreliert sind, stellt heutzutage die Behandlung mit anti-VEGF Molekülen dar. Diese besitzen jedoch teils geringe intraokuläre Halbwertszeiten, von 7,19 Tagen für Ranibizumab bis zu 9,82 Tagen für Bavacizumab (Krohne et al., 2012). Eine monatliche Wiederholung einer intraokulären Injektion ist in jedem Fall nötig. Diese birgt jedoch sowohl körperliche Risiken für die Patienten, wie Blutungen oder Infektionen als auch, dass sie eine rein uniforme Therapieform darstellt. Der Abbau und die Halbwertszeit und der ideale Zeitpunkt der Injektion der verschiedenen Anti-VEGF-Moleküle sind je nach Individuum, Krankheitsstadium und -verlauf unterschiedlich. Etwaige diagnostische Symptome, die auf den Anstieg der VEGF-Konzentration hindeuten, manifestieren sich erst, wenn ein solches Event schon längst aufgetreten ist und weiter voranschreitet (Muether et al., 2012).

Das in dieser Arbeit etablierte BRET-System, stellt einen kleinen aber entscheidenden Schritt in der Entwicklung eines implantierbaren Biosensors dar, der in der Lage ist, intraokuläres VEGF non-invasiv zu detektieren und quantifizieren. Ein Monitoring VEGF-induzierter Erkrankungen würde eine individuelle Behandlung mit anti-VEGF-Medikamenten ermöglichen, welche an die Bedürfnisse der Patienten angepasst ist.

In dieser „Proof-Of-Concept“-Studie wurden sowohl Donor- als auch Akzeptormoleküle im Überschuss genutzt. Zudem konnte ein VEGF-abhängiges BRET-Signal nur in einem Konzentrationsbereich gemessen werden, der weit über der physiologischen VEGF-Konzentration liegt. Für präzisere Ergebnisse in der Zukunft, besonders im Hinblick auf eine Verwendung als intraokkular implantierbares Systems, ist es notwendig, Anpassungen bezüglich der Donor- und Akzeptorkonzentration sowie der VEGF-Sensitivität des Systems vorzunehmen.

6 Zusammenfassung

6.1 Detection of the vascular endothelial growth factor due to protein-protein interaction based on bioluminescence resonance energy transfer

Neovascular diseases of the eye, such as age-related macular degeneration (AMD), retinopathy of prematurity (ROP) and diabetic retinopathy (DR) are caused by a hypoxia-induced upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. The resulting excessive supply of VEGF leads to the formation of an unusual and unnatural number of new and immature blood vessels in the eye which may impair visual function.

To avoid the increasing development of immature vessels in the eye, the current state-of-the-art-treatment is a monthly injection of anti-VEGF molecules like Avastin[®], Lucentis[®] and EYLEA[®], which prevent VEGF binding to the VEGF-receptors and thus leading to a decreasing activation of VEGF-induced intracellular signaling. However, the crucial disadvantage of the anti-VEGF-therapy lies in the delayed indication of a decreasing VEGF inhibition by diagnostic parameters, such as visual acuity (VA) and ocular spectral optical coherence tomography (spectral OCT), which are indispensable for monitoring the need and success of the therapy. Furthermore, the invasive sampling poses distinct risks to the patients.

The aim of this study is to turn the Bioluminescence Resonance Energy Transfer System into standard for non-invasive VEGF detection. Therefore, a luminescent VEGF binding molecule (donor), which binds to the receptor-binding motif of VEGF, was created. This donor transfers energy via BRET to a fluorophore-coupled VEGF binding molecule (acceptor) that binds to the respective neuropilin binding motif of VEGF. The emission of the acceptor appears at a longer wavelength than the donor, thus leading to an increased BRET signal only when VEGF is bound to both, the donor and acceptor molecules. In detail, Renilla reniformis mutant (RLuc8, $\lambda_{em} \approx 480\text{nm}$) was fused to a single chain variable fragment (scFv) based on Ranibizumab (Lucentis[®]) named as Ra02, which binds to the receptor binding motif of VEGF. The fluorophore PerCP-Cy5.5[®] was coupled to neuropilin which binds to the neuropilin motif of VEGF. The implantation of capsules consisting of the two BRET components in solution, permeable for VEGF for its in vivo detection, would provide a new and improved method for monitoring VEGF-induced pathologies and thereby an adjustment of therapy to patient needs.

6.2 Vascular Endothelial Growth Factor Detektion aufgrund von Protein-Protein-Interaktion basiertem Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Neovaskuläre Erkrankungen des Auges wie altersbedingte Makuladegeneration (AMD), Frühgeborenenretinopathie (ROP) und diabetische Retinopathie (DR) werden hauptsächlich durch eine hypoxieinduzierte Verstärkung der „vascular endothelial growthfactor“ (VEGF)- Expression hervorgerufen.

Die erhöhte VEGF-Konzentration führt zur Bildung von unnatürlich vielen und unreifen Blutgefäßen, die im Auge die visuelle Funktion erheblich beeinträchtigen können.

Aktuelle Therapiemaßnahmen zur Regulierung der VEGF induzierten Neovaskularisierung im Auge bedienen sich der monatlichen Injektion von anti-VEGF-Molekülen. Der entscheidende Nachteil dieser anti-VEGF-Therapie besteht jedoch darin, dass ein VEGF-Anstieg durch die gängigen Parameter wie Sehschärfe (VA) und die spektrale optische Kohärenz Tomografie (spectral OCT) erst mit einer gewissen Verzögerung erkannt werden kann. Des Weiteren ist eine invasive Probengewinnung notwendig.

Das Ziel dieser Studie ist es, ein neues Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer-System zu etablieren, das sich zur nicht invasiven VEGF Detektion eignet.

Genutzt wird die lumineszenten Renilla reniformisform (RLuc8) ($\lambda_{em} \approx 480\text{nm}$), die in Kombination mit dem Substrat Coelenterazine (CLZ) als Donor dient. Der chemisch generierte Fluorophor, PerCP-Cy5.5[®] wird als Akzeptor genutzt. Um die Verbindung zu VEGF zu schaffen wird RLuc8 an Ra02, ein Einzelketten variables Fab-Fragment (scFab) eines etablierten anti-VEGF Medikaments, fusioniert, welches an die Rezeptorbindestelle des VEGF bindet. PerCP-Cy5.5[®] wird an Neuropilin gekoppelt, welches seinerseits an die Neuropilinbindestelle von VEGF bindet.

Durch die VEGF-Bindung werden Donor und Akzeptor nun in ausreichende Nähe zueinander gebracht, sodass ein Energieübertrag zwischen ihnen möglich ist, der VEGF nachweist. Anhand der Menge des vom angeregten Fluorophor ausgesendeten Lichts (in BRET-Unit) könnten zusätzlich Rückschlüsse auf die VEGF-Konzentration einer Lösung gezogen werden.

Ein Ziel wäre, dass das neue BRET-Paar über ein vivo applizierbares Verfahren immobilisiert in implantierbaren Kapseln die aktuelle VEGF-Konzentration im Auge misst. So wäre es möglich eine, den Patientenbedürfnissen angepasste anti-VEGF-Dosis zu bestimmen. Die Therapie von neovaskulären Erkrankungen könnte folglich deutlich verbessert werden.

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Studie	Avastin (Bevacizumab) for treatment of Choroidal Neovaskularisation
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
ANG.	Angiopoetin
BRET.	Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer
CATT.	Comparison of Age-related macular degeneration Treatment Trials
CLZ.	Coelenterazine
CLZ h.	CLZ human
DME.	Diabetisches Makulaödem
DMEM.	Dulbecco's modifizier Eagle Medium
dNTPs.	Desoxyribonukleosidtriphosphaten
DR.	Diabetische Retinopathie
eBRET ² .	enhanced BRET
ELISA.	Enzyme linked Immunosorbent Assay
Fc- Fragment.	Fragment Crystallizable
FGF.	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FKS.	Fötales Kälberserum
FP.	fluoreszierendes Proteins
GA.	geografische Atrophie
GAPDH.	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
GFP.	Green Fluoreszenz Protein,
Grb2.	Growth factor receptor bound protein
HEK.	Human Embryonic Kidney cells
HIF.	hypoxieinduzierten Faktor
HSGP.	Heparansulfatproteoglykanen
IgG1.	Immunoglobulin G1
IRES.	internal ribosomal entry site
KDR.	Kinasedomäne
LB.	Lucia Broth Base
MARINA-Studie.	Minimally Classic/ Occult Trail of the Anti-VEGF Antibody Ranibizumab in the Treatment of Neovascular AMD

mBU.	mili BRET-Units
nCLZ.	natives CLZ
NRP.	Neuropilin
NRPD.	nicht-proliferative diabetische Retinopathie
NV.	Neovaskularisierung
OCT.	optische Kohärenztomographie
ORF.	open reading frame, offene Leseraster, open reading frame
PBS.	phosphate buffered saline
PCR.	Polymerase Chain Reaction
PDGF.	platelet derived growth factor
PDR.	proliferative diabetische Retinopathie
PHD.	Hydroxylasedomäne
PI-3 Kinase.	Phosphoinositid-3-Kinasen
PLC.	Phospholipase C
PLGF.	placental growth factor
PPI.	Protein-Protein-Interaktionen
RET.	Resonanz-Energie-Transfer
RLuc.	Renilla reniformis luciferase
ROP.	Frühgeborenen-Retinopathie
RTKs.	Rezeptortyrosinkinasen
RVO.	retinale Venenverschlüsse
scF.	single chain variable fragments
scFv.	variables Einzelkettenfragment
SDS.	Natriumdodecysulfat
SOC.	Salt-Optimized+Carbon
TBE.	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS.	Tris-buffered saline
VA.	visuelle Sehschärfe
VEGF.	vascular endothelial growth factor
VEGFR-1.	VEGF- Rezeptor-1
VEGFR-2.	VEGF- Rezeptor-2
VIEW.	VEGF Trap-Eye: Investigation of Efficiency and Safety in Wet AMD
VISION.	VEGF-Inhibition Study in Ocular Neovaskularisation

VPF.	vascular permeabilityfactor
WHO.	World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomischer Aufbau und Blutversorgung des Auges	3
Abbildung 2: Struktur des VEGF-Gens	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Rezeptorbindungsspezifität der VEGF-Familie und des VEGFR-2 Signalwegs	12
Abbildung 4: Ranibizumab und Bevacizumab schematisch	16
Abbildung 5: Aflibercept.....	17
Abbildung 6: Ra02.....	19
Abbildung 7: Abhängigkeiten des Resonanz-Energietransfers	22
Abbildung 8: eBRET Prinzip	23
Abbildung 9: BRET-Varianten.....	25
Abbildung 10: DNA-Größenstandard.....	41
Abbildung 11: Spectra-multicolor-Broad-Range-Protein-Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)	41
Abbildung 12: Aufbau des Western-Blots	53
Abbildung 13: Schematische Darstellung der BRET-Komponenten	59
Abbildung 14: BRET-Donor Expressionskonstrukt	60
Abbildung 15: schematische Darstellung des RLuc8-(4Gly)-Ra02 Gens	61
Abbildung 16: Biodoc PCR-Kontrolle.....	62
Abbildung 17: peGFP-N1-transfizierte HEK293 exprimieren eGFP	63
Abbildung 18: In vitro Expressionskontrolle	64
Abbildung 19: RLuc-Aktivität der Donormolekül-Konstrukte.....	65
Abbildung 20: Vergleich der 48h zur 24h Inkubation der Donormolekülkonstrukte.....	66
Abbildung 21: VEGF-abhängiges BRET7.....	67
Abbildung 22: Emissionsspektren von Donor und Akzeptormolekül	68
Abbildung 23: Akzeptorfixierte Messung.....	69
Abbildung 24: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Akzeptor-Fixierten-Messung.....	69
Abbildung 25: Donorfixierte Messung	70
Abbildung 26: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Donor-Fixierten-Messung....	70
Abbildung 27: Akzeptor-Inkubierte Messung.....	71
Abbildung 28: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Akzeptor-Inkubierten Messung	71
Abbildung 29: Donor-Inkubierte Messung	72
Abbildung 30: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Akzeptorfixierten Messung..	72
Abbildung 31: Direkte Messung.....	73
Abbildung 32: Grafische Darstellung der Ergebnisse der direkten Messung	74
Abbildung 33: Grafische Darstellung der Ergebnisse der direkten Messung mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen	75
Abbildung 34: Schematische Darstellung der möglichen Bindungen der BRET-Komponenten	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 35: RLuc8 Emission	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien und Kits.....	40
Tabelle 2: Reaktionsansatz der Mutagenese - PCR	44
Tabelle 3: PCR-Programm	45
Tabelle 4: Mischtablette Protein-Polyacrylamid-Gele.....	52

Literatur- und Quellenverzeichnis

- BOURNE, R. R., JONAS, J. B., FLAXMAN, S. R., KEEFFE, J., LEASHER, J., NAIDOO, K., PARODI, M. B., PESUDOV, K., PRICE, H., WHITE, R. A., WONG, T. Y., RESNIKOFF, S., TAYLOR, H. R. & VISION LOSS EXPERT GROUP OF THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE, S. 2014. Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe: 1990-2010. *Br J Ophthalmol*, 98, 629-38.
- CAMPOCHIARO, P. A. 2015. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res*, 49, 67-81.
- CAMPOCHIARO, P. A., CHOY, D. F., DO, D. V., HAFIZ, G., SHAH, S. M., NGUYEN, Q. D., RUBIO, R. & ARRON, J. R. 2009. Monitoring ocular drug therapy by analysis of aqueous samples. *Ophthalmology*, 116, 2158-64.
- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473, 298-307.
- CHADER, G. J. & TAYLOR, A. 2013. Preface: The aging eye: normal changes, age-related diseases, and sight-saving approaches. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54, ORSF1-4.
- CRAFTS, T. D., JENSEN, A. R., BLOCHER-SMITH, E. C. & MARKEL, T. A. 2015. Vascular endothelial growth factor: therapeutic possibilities and challenges for the treatment of ischemia. *Cytokine*, 71, 385-93.
- DACRES, H., MICHIE, M. & TROWELL, S. C. 2012a. Comparison of enhanced bioluminescence energy transfer donors for protease biosensors. *Anal Biochem*, 424, 206-10.
- DACRES, H., MICHIE, M., WANG, J., PFLEGER, K. D. & TROWELL, S. C. 2012b. Effect of enhanced Renilla luciferase and fluorescent protein variants on the Forster distance of Bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Biochem Biophys Res Commun*, 425, 625-9.
- DE, A., LOENING, A. M. & GAMBHIR, S. S. 2007. An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer Res*, 67, 7175-83.
- DRAGULESCU-ANDRASI, A., CHAN, C. T., DE, A., MASSOUD, T. F. & GAMBHIR, S. S. 2011. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging

of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 12060-5.

FDA Revised 6/2010. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION- Lucentis®.
http://www.genentechaccess.com/sites/default/files/LUCENTIS_prescribing.pdf.

FDA Revised 07/2011. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION- Macugen®.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021756s018lbl.pdf.

FDA Revised:11/2011. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION- EYLEA.
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/125387lbl.pdf

FDA Revised:12/2015. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION- Avastin®.
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/125085s301lbl.pdf.

FERRARA, N. 2009. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 789-91.

FERRARA, N., GERBER, H. P. & LECOUTER, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9, 669-76.

FÖRSTER 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 1948, 437, 55–75. .

FUH, G., WU, P., LIANG, W. C., ULTSCH, M., LEE, C. V., MOFFAT, B. & WIESMANN, C. 2006. Structure-function studies of two synthetic anti-vascular endothelial growth factor Fabs and comparison with the Avastin Fab. *J Biol Chem*, 281, 6625-31.

GERETTI, E., SHIMIZU, A., KURSCHAT, P. & KLAGSBRUN, M. 2007. Site-directed mutagenesis in the B-neuropilin-2 domain selectively enhances its affinity to VEGF165, but not to semaphorin 3F. *J Biol Chem*, 282, 25698-707.

GRISANTI, S. & TATAR, O. 2008. The role of vascular endothelial growth factor and other endogenous interplayers in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*, 27, 372-90.

HEYDUK, T. & HEYDUK, E. 2002. Molecular beacons for detecting DNA binding proteins. *Nat Biotechnol*, 20, 171-6.

- HOEBEN, A., LANDUYT, B., HIGHLEY, M. S., WILDIERS, H., VAN OOSTEROM, A. T. & DE BRUIJN, E. A. 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*, 56, 549-80.
- 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. & RUDGE, J. S. 2002. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11393-8.
- HOLMES, K., ROBERTS, O. L., THOMAS, A. M. & CROSS, M. J. 2007. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, 19, 2003-12.
- KEANE, P. A. & SADDA, S. R. 2012. Development of Anti-VEGF Therapies for Intraocular Use: A Guide for Clinicians. *J Ophthalmol*, 2012, 483034.
- KOCAN, M., DALRYMPLE, M. B., SEEGER, R. M., FELDMAN, B. J. & PFLEGER, K. D. 2010. Enhanced BRET Technology for the Monitoring of Agonist-Induced and Agonist-Independent Interactions between GPCRs and beta-Arrestins. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 1, 12.
- KROHNE, T. U., LIU, Z., HOLZ, F. G. & MEYER, C. H. 2012. Intraocular pharmacokinetics of ranibizumab following a single intravitreal injection in humans. *Am J Ophthalmol*, 154, 682-686 e2.
- KUR, J., NEWMAN, E. A. & CHAN-LING, T. 2012. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res*, 31, 377-406.
- LE, N. C., GEL, M., ZHU, Y., DACRES, H., ANDERSON, A. & TROWELL, S. C. 2014. Real-time, continuous detection of maltose using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) on a microfluidic system. *Biosens Bioelectron*, 62, 177-81.
- LEUNG, D. W., CACHIANES, G., KUANG, W. J., GOEDDEL, D. V. & FERRARA, N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246, 1306-9.
- MEYER, C. H., HELB, H. M. & 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, 125-38, 140-2.

- MEYER, C. H. & HOLZ, F. G. 2011. Preclinical aspects of anti-VEGF agents for the treatment of wet AMD: ranibizumab and bevacizumab. *Eye (Lond)*, 25, 661-72.
- MEYER, C. H., KROHNE, T. U. & HOLZ, F. G. 2011. Intraocular pharmacokinetics after a single intravitreal injection of 1.5 mg versus 3.0 mg of bevacizumab in humans. *Retina*, 31, 1877-84.
- MEYER, C. H., ZIEMSEN, F. & HEIMANN, H. 2008b. [Intravitreal injection. Monitoring to avoid postoperative complications]. *Ophthalmologe*, 105, 143-55, 157.
- MILLER, J. W., LE COUTER, J., STRAUSS, E. C. & FERRARA, N. 2013. Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease. *Ophthalmology*, 120, 106-14.
- MUETHER, P. S., HERMANN, M. M., VIEBAHN, U., KIRCHHOF, B. & FAUSER, S. 2012. Vascular endothelial growth factor in patients with exudative age-related macular degeneration treated with ranibizumab. *Ophthalmology*, 119, 2082-6.
- MULLER, Y. A., CHEN, Y., CHRISTINGER, H. W., LI, B., CUNNINGHAM, B. C., LOWMAN, H. B. & DE VOS, A. M. 1998. VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure*, 6, 1153-67.
- NG, E. W., SHIMA, D. T., CALIAS, P., CUNNINGHAM, E. T., JR., GUYER, D. R. & ADAMIS, A. P. 2006. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 123-32.
- NOMA, H., FUNATSU, H., MIMURA, T. & HORI, S. 2008. Changes of vascular endothelial growth factor after vitrectomy for macular edema secondary to retinal vein occlusion. *Eur J Ophthalmol*, 18, 1017-9.
- OLSSON, A. K., DIMBERG, A., KREUGER, J. & CLAESSEON-WELSH, L. 2006. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 359-71.
- PASCOLINI, D. & MARIOTTI, S. P. 2012. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol*, 96, 614-8.
- PATIL, A. S., SABLE, R. B. & KOTHARI, R. M. 2012. Occurrence, biochemical profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms and their functions in endochondral ossification. *J Cell Physiol*, 227, 1298-308.

- PENN, J. S., MADAN, A., CALDWELL, R. B., BARTOLI, M., CALDWELL, R. W. & HARTNETT, M. E. 2008. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res*, 27, 331-71.
- PFLEGER, K. D. & EIDNE, K. A. 2006. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods*, 3, 165-74.
- SMITH, L. E. 2008. Through the eyes of a child: understanding retinopathy through ROP the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 5177-82.
- STIEGER, K., LHERITEAU, E., MOULLIER, P. & ROLLING, F. 2009. AAV-mediated gene therapy for retinal disorders in large animal models. *ILAR J*, 50, 206-24.
- SUN, S., YANG, X., WANG, Y. & SHEN, X. 2016. In Vivo Analysis of Protein-Protein Interactions with Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET): Progress and Prospects. *Int J Mol Sci*, 17.
- TAKAHASHI, H. & SHIBUYA, M. 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 109, 227-41.
- TATAR, O., YOERUEK, E., SZURMAN, P., BARTZ-SCHMIDT, K. U., TUBINGEN BEVACIZUMAB STUDY, G., ADAM, A., SHINODA, K., ECKARDT, C., BOEYDEN, V., CLAES, C., PERTILE, G., SCHARIOTH, G. B. & GRISANTI, S. 2008. Effect of bevacizumab on inflammation and proliferation in human choroidal neovascularization. *Arch Ophthalmol*, 126, 782-90.
- WIMMER, T. 2019.
- WIMMER, T., LORENZ, B. & STIEGER, K. 2015. Functional Characterization of AAV-Expressed Recombinant Anti-VEGF Single-Chain Variable Fragments In Vitro. *J Ocul Pharmacol Ther*, 31, 269-76.
- WIMMER, T., LORENZ, B. & STIEGER, K. 2016. Quantification of the vascular endothelial growth factor with a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) based single molecule biosensor. *Biosens Bioelectron*, 86, 609-15.
- WIMMER, T., SCHROETER, E., LORENZ, B. & STIEGER, K. 2017. Detection of the Vascular Endothelial Growth Factor with a Novel Bioluminescence Resonance Energy Transfer Pair Using a Two-Component System. *Sensors (Basel)*, 17.

- XU, Y., PISTON, D. W. & JOHNSON, C. H. 1999. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc Natl Acad Sci US A*, 96, 151-6.
- YAMAKAWA, Y., UEDA, H., KITAYAMA, A. & NAGAMUNE, T. 2002. Rapid homogeneous immunoassay of peptides based on bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase. *J Biosci Bioeng*, 93, 537-42.

Publikationsverzeichnis

- WIMMER, T., SCHROETER, E., LORENZ, B. & STIEGER, K. 2017. Detection of the Vascular Endothelial Growth Factor with a Novel Bioluminescence Resonance Energy Transfer Pair Using a Two-Component System. *Sensors (Basel)*, 2017.
- WIMMER, T., STUMPF, C., SCHROETER, E., LORENZ, B. & STIEGER, K. 2016. Development of a BRET-based technique for VEGF quantification. Poster published at ARVO 2016, Ft. Lauderdale.

Danksagung

Ein ganz herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Knut Stieger für die sehr gute Betreuung als Doktorvater und der Bereitstellung des interessanten Themas. Danke für das große Interesse am Gelingen dieser Arbeit und die schnelle Korrektur.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Dr. Tobias Wimmer, der sich bereit erklärte meine Betreuung zu übernehmen. Danke für die stetig vorhandene Hilfestellung bei jeglicher Frage.

Durch ihn und die immer fröhliche Art von Annabella Janise-Libawski hat mir die Arbeit im Labor große Freude bereitet.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an Diethild Münstermann-Lohn für den grammatikalischen Feinschliff und an meine Schwester Lea Schroeter für die Unterstützung bei der Formatierung.

Für die Rückendeckung und die bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums möchte ich mich bei dieser Gelegenheit auch bei meinen Eltern herzlich bedanken.

Und last but not least ein riesiges Dankeschön an Britta Maria Lohn für die unvergessliche Studienzeit.