

Entwicklung einer lichtinduzierten Proteinsynthese in optogenetisch aktivierbaren Säugerzellen für therapeutische Applikationen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Nina Louisa Wichert, M. Sc.

2023

Referentin: Prof. Dr. med. Cornelia Blume

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Heisterkamp

Tag der Promotion: 05.05.2023

Kurzzusammenfassung

In der Optogenetik, einer Kombination aus Optik und Genetik, werden Zellen durch genetische Manipulation lichtempfindlich, sodass Zellfunktionen gezielt durch Licht gesteuert, Krankheiten analysiert und neue Ansätze für Heilmethoden entwickelt werden können. Ein optogenetisches System besteht meist aus zwei Transkriptionsfaktoren, die unter Lichtaktivierung eines Chromophors eine Einheit bilden, der den Promotor der Zielsequenz aktiviert und die Proteinsynthese startet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer lichtinduzierten Proteinsynthese in optogenetisch aktivierbaren humanen Zellen für therapeutische Applikationen. Es könnten z. B. patienteneigene mesenchymale Stammzellen (hMSCs) während der Implantation auf dem CI (Cochleaimplantat) platziert werden, die auf Lichtinduktion hin BDNF (*brain-derived neurotropic factor*) synthetisieren. BDNF hat einen positiven Effekt auf Spiralganglionzellen, die wiederum die auditorische Vermittlung von CIs verbessern. Durch die gute zeitliche und räumliche Auflösung optogenetischer Systeme wird umliegendes Gewebe geschont und ungewollte Nebeneffekte minimiert. Als Modellzellen wurden Säugertierzellen verwendet. Eine Etablierung des optogenetischen PhyB (phytochrome B)-Systems in CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*) Zellen mit EGFP (*green fluorescent protein*) Marker führte nach Optimierung zu einer 5-mal höheren Proteinexpression im Vergleich zur *Leakage*, während beim CRY2 (Cryptochrome 2)-System in HEK293 (*human embryonic kidney*) Zellen mit Luciferase (Luc) Marker eine um den Faktor 26 gesteigerte Proteinexpression erzielt wurde. Eine Analyse der Genexpression mittels qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) bestätigte diese Ergebnisse. Beide Systeme konnten sowohl mittels LED-Induktion (*light emitting diode*) wie auch durch Laser-Induktion aktiviert werden und das Protein BDNF optogenetisch synthetisiert werden, wobei nur das CRY2-System eine therapeutisch relevante Konzentration erzeugte.

Für eine Übertragung dieser Systeme auf hMSCs, hier aus Fettgewebe isoliert, wurden diverse Transfektionsmethoden getestet. Eine chemische Transfektion (mit DreamFect™ Gold) lieferte mit einer Einzel-Transfektionseffizienz von ca. 35 % zwar die besten Ergebnisse, lag aber mit einer Ko-Transfektionseffizienz lediglich bei 6 %. Somit ist sie in dieser Form noch nicht für therapeutische Anwendungen nutzbar.

Schlagwörter: Optogenetik, PhyB, CRY2, BDNF, Cochleaimplantat

Abstract

In optogenetics, a combination of optics and genetics, cells become light-sensitive through genetic manipulation, so cell functions can be specifically controlled by light, diseases can be analyzed and new approaches for cures can be developed. An optogenetic system consists usually of two transcription factors that assemble into a unit under light activation of a chromophore, which activates the promoter of the target sequence and starts protein synthesis.

The aim of the present work was the development of a light-induced protein synthesis in optogenetically activatable human cells for therapeutic applications. For example patient-derived mesenchymal stem cells (hMSCs) could be placed on the CI (cochlear implant) during implantation and synthesize BDNF (brain-derived neurotropic factor) upon light induction. BDNF has a positive effect on spiral ganglion cells which in turn enhance auditory mediation of CIs. The good temporal and spatial resolution of optogenetic systems spares surrounding tissue and minimizes unwanted side effects. Mammalian cells were used as model cells. Establishment of the optogenetic PhyB (phytochrome B) system in CHO-K1 (Chinese hamster ovary) cells with EGFP (green fluorescent protein) marker resulted in 5-fold higher protein expression after optimization compared to leakage while a 26-fold increase in protein expression, was obtained for the CRY2 (cryptochrome 2)-system in HEK293 (human embryonic kidney) cells with luciferase marker. Analysis of gene expression by qPCR (quantitative polymerase chain reaction) confirmed these results. Both systems could be activated by LED (light emitting diode) induction as well as by laser induction and synthesized the protein BDNF optogenetically whereas only the CRY2-system produced a therapeutically relevant concentration.

Various transfection methods were tested to transfer these systems into hMSCs here isolated from adipose tissue. Chemical transfection (using DreamFect™ Gold) provided the best results with a single transfection efficiency of about 35%, but co-transfection resulted in a transfection efficiency of only 6%. Thus it is not yet applicable for therapeutic applications in this form.

Keywords: optogenetics, PhyB, CRY2, BDNF, cochlear implant

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Cornelia Blume bedanken. Sie hat mir diese Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover ermöglicht. Sie begleitete meine Anliegen während des gesamten Arbeitsprozesses mit großer Aufmerksamkeit, Fachkunde und Empathie. Die vielseitige, herausfordernde Aufgabenstellung, die Nutzung modernster technischer Verfahren sowie das ausgesprochen positive Arbeitsumfeld haben mich mit Freude arbeiten lassen.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper für die Aufnahme am Institut bedanken. Er sowie Prof. Dr. Alexander Heisterkamp übernehmen freundlicherweise das Korreferat.

Allen Mitgliedern der AG Blume gebührt ebenso mein großer Dank. Sie haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich mich stets wohl gefühlt habe, und sie standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Mit Martin Witt (Etablierung der qPCR Analyse und Veröffentlichung meines Reviews), Sina Christoffers und Yvonne Mergel (Mitarbeit im Projekt und Hilfe bei den Klonierungen des CRY2-Systems) sowie Andy Martinez (Laborpraktikant) und Sebastian Heene (Büropartner) habe ich besonders eng zusammengearbeitet. Hierfür möchte ich mich herzlich bedanken.

Martina Weiß, Martin Pähler und Dr. Frank Stahl haben sich meiner Fragen und Problemstellungen freundlich und fachkundig angenommen.

Liebe TCI-ler, es war mir wirklich eine Freude, mit euch allen zu arbeiten.

Ein besonderer Dank gebührt der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Exzellenzcluster Hearing4All (EXC 2177/1 – Project ID: 390895286) für die Finanzierung dieses Projekts.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Freund Thomas und meiner Familie bedanken. Sie haben mich liebevoll unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	II
Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
2. Theorie	7
2.1 Optogenetik	7
2.2 Optogenetische Systeme für die Gen- und Proteinexpression	8
2.2.1 Phytochrome B (PhyB)	9
2.2.2 Light-oxygen-voltage (LOV)	11
2.2.3 Cryptochrome 2 (CRY2)	13
2.2.4 Vor- und Nachteile der Systeme	14
2.3 Indikatorproteine	17
2.3.1 Green fluoreszent protein (GFP)	17
2.3.2 <i>Secreted alkaline phosphatase</i> (SEAP)	20
2.3.3 <i>Firefly</i> Luciferase	21
2.4 Zielprotein BDNF (brain-derived neurotropic factor)	24
2.5 Verwendete Zellarten	25
2.5.1 Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO-K1)	25
2.5.2 Human Embryonal Kidney Zellen (HEK-293)	27
2.5.3 Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs)	27
2.6 Transfektion von MSCs	30
2.6.1 Physikalische Transfektionsmethoden	30
2.6.2 Transfektion mit Hilfe von Nanomaterialien	34

Inhaltsverzeichnis

2.6.3	Chemische Transfektionsmethoden _____	35
2.6.4	Virale Transfektionsmethoden _____	36
2.7	CIs (Cochleaimplantate) _____	37
2.8	Therapeutische Anwendungen _____	38
2.8.1	Übertragung von <i>in vitro</i> durchgeführten optogenetischen Experimenten auf klinische Anwendungen _____	39
2.8.2	Erste Erfolge der Optogenetik in <i>vivo</i> Experimenten _____	43
3.	Ergebnisse _____	48
3.1	Optimierungen des optogenetischen PhyB Systems _____	51
3.1.1	Überprüfung der <i>Leakage</i> der verwendeten Plasmide nach chemischer Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) _____	51
3.1.2	Durchflusszytometermessungen _____	54
3.1.3	qPCR Analyse _____	55
3.1.4	Variation der Beleuchtungsstärke _____	56
3.1.5	Variation des Arbeitsabstandes _____	59
3.1.6	Variation der zugegebenen PCB-Menge _____	61
3.1.7	Variation des Plasmidverhältnisses _____	63
3.1.8	Laser-Illumination _____	64
3.1.9	PhyB-System mit anderem Bindungsmechanismus _____	66
3.1.10	PhyB-System in HEK293 Zellen _____	66
3.1.11	Klonierung des Zielplasmids mit BDNF Marker _____	67
3.1.12	SEAP-Expression _____	69
3.1.13	BDNF-Expression _____	69
3.2	Transfektion von humanen mesenchymalen Stammzellen _____	70
3.2.1	Viromer® Red _____	71
3.2.2	Viromer® Plasmid _____	73
3.2.3	Lipofektamine Stem _____	73

3.2.4	X-tremeGENE™ 9	74
3.2.5	DreamFect™ Gold	75
3.2.6	Elektroporation	80
3.3	Optimierungen des optogenetischen CRY2-Systems	86
3.3.1	Klonierung der Gal4UAS Zielplasmide mit BDNF und eGFP Marker	86
3.3.2	Luciferase Kalibrierreihe	88
3.3.3	Variation des Plasmidverhältnisses	90
3.3.4	Variation der Plasmidmenge	93
3.3.5	Variation der Menge an Transfektionsreagenz	94
3.3.6	Variation der Illuminationsdauer	95
3.3.7	Laser-Illumination	96
3.3.8	qPCR Analyse	98
3.3.9	BDNF Expression	103
4.	Diskussion und Ausblick	106
4.1	PhyB-System	106
4.1.1	Leakage des PhyB-Systems	106
4.1.2	Einfluss der Zellkonfluenz auf die Proteinexpression	106
4.1.3	Bildauswertung mittels Image J	107
4.1.4	Co-Transfektionseffizienz und das Markerprotein eGFP	108
4.1.5	Optimierung des PhyB-Systems	108
4.1.6	Optimierung des PhyB-Systems: Plasmidverhältnis	109
4.1.7	Optimierung des PhyB-Systems: Illuminationsintensität	109
4.1.8	Optimierung des PhyB-Systems: PCB-Menge	110
4.1.9	Zusammenfassung der Optimierungen des PhyB-Systems	110
4.1.10	Laser-Illumination	111
4.1.11	Optogenetische Aktivierung der Proteinmarker BDNF und SEAP	112
4.1.12	Bindungsmechanismus und Zellart	113

4.2	Transfektion von ADhMSCs _____	114
4.2.1	Chemische Transfektion _____	115
4.2.2	Physikalische Transfektion _____	116
4.3	CRY2-System _____	118
4.3.1	Etablierung des CRY2-Systems _____	118
4.3.2	Optimierung des CRY2-Systems: Transfektionsbedingungen ____	118
4.3.3	Optimierung des CRY2-Systems: Illuminationsdauer _____	119
4.3.4	Zusammenfassung der Optimierung des CRY2-Systems _____	120
4.3.5	Laser-Illumination _____	121
4.3.6	Überprüfung des CRY2-Systems: qPCR Analysen und mRNA Kinetik 121	
4.3.7	Optogenetische Proteinexpression von BDNF _____	123
4.3.8	Vergleich der verwendeten optogenetischen Systeme CRY2 und PhyB hinsichtlich ihrer Eignung für therapeutische Anwendungen _____	124
5.	Zusammenfassung _____	126
6.	Quellenverzeichnis _____	129
7.	Anhang _____	150
7.1	Materialien _____	150
7.1.1	Chemikalien _____	150
7.1.2	Enzyme _____	152
7.1.3	Laborgeräte _____	152
7.1.4	Nährmedien und Puffer _____	154
7.1.5	Organismen _____	155
7.1.6	Plasmide _____	155
7.1.7	Primer _____	159
7.1.8	Verbrauchsmaterialien _____	161
7.2	Methoden _____	162

Inhaltsverzeichnis

7.2.1	Kultivierung von Zellen _____	163
7.2.2	Kryokonservierung _____	163
7.2.3	Transfektion _____	164
7.2.4	Illumination _____	166
7.2.5	Proteinnachweise _____	175
7.2.6	Klonierung _____	181
7.2.7	Qualitative Polymerasekettenreaktion _____	190
7.2.8	Isolation von ADhMSCs aus Fettgewebe _____	197
7.3	Plasmidsequenzen _____	198
7.3.1	pKM-022 _____	198
7.3.2	pKM-078 _____	199
7.3.3	pKM-006 _____	200
7.3.4	pSAM200 _____	202
7.3.5	pKM-BDNF _____	202
7.3.6	pKM-EGFP _____	204
7.3.7	EGFP _____	205
7.3.8	BDNF _____	206
7.3.9	CRY2 _____	207
7.3.10	CIB _____	209
7.3.11	Gal4UAS-Luc _____	211
7.3.12	Gal4UAS-EGFP _____	213
7.3.13	Gal4UAS-BDNF _____	214
	Abbildungsverzeichnis _____	216
	Tabellenverzeichnis _____	224
	Lebenslauf _____	225
	Publikationsliste _____	227

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Verzeichnis aller verwendeten Abkürzungen.

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
3D	3-dimensional
ABC	<i>Avidin-Biotin Peroxidase Complex</i>
ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol Copolymer
AD	<i>Activation domain</i>
ADHMSC	<i>Adipose tissue derived human mesenchymal stem cells</i>
AG	Arbeitsgruppe
AMP	Ampecilin
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP	Alkalische Phosphatase
ASLOV2	<i>avena sativa</i> phototropin1
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	Beta-2-Microglobulin
BD	<i>Binding domain</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BPHP1	<i>Bacterial bathyphytochrome</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Lichtgeschwindigkeit
CI	Cochleaimplantat
CAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDNA	<i>Complementary DNA</i>
CGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
CHO-K1	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIB	<i>Cryptochrome interaction helix-loop-helix</i>
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i>
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
COS-7	<i>CV-1 in Origin, carrying SV40</i>
CPF	CRISPR aus <i>prevotella</i> und <i>francinella</i>
CRE	Cyclic recombinase
CRISPR/CAS	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein</i>
CRY2	<i>Cryptochrome 2</i>
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DDH ₂ O	<i>Double-distilled water</i>

Abkürzungsverzeichnis

DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagles´s Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRE	DNA Rekombinase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EL222	<i>erythrobacter litoralis</i> LOV
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EP	Energiequantum
EQF	Quantenfluss
F	Frequenz
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FKF1	<i>A. thaliana flavin-binding</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FLP	Flippase
FMN	Flavin Mononukleotid
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	<i>Forward scatter</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GI	<i>gigantea</i>
GOI	<i>Gene of Interest</i>
H	Planksche Konstante
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HCL	Salzsäure
HEK293	<i>Human embryonic kidney</i>
HELA	Henriette Lacks, menschliche Epithelzellen von Gebärmutterhalskrebs
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMSC	<i>Human Mesenchymal Stem Cells</i>
HS	Humanserum
I	Bestrahlungsstärke
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
LB	Luria-Bertani Medium
LED	<i>Light emitting diode</i>
LFR	<i>Lipofection reagent</i>

Abkürzungsverzeichnis

LOV	<i>Light-oxygen-voltage</i>
LUC	Luciferase
MEM	<i>Modified Eagles´s Medium</i>
MRNA	<i>Messenger RNA</i>
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MUG	4-methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside
NA	Avogadrozahl
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIH/3T3	<i>swiss albino mouse fibroblasts</i>
NIR	Nahes Infrarotlicht
NP	Anzahl der Photonen pro Sekunde und Oberflächeneinheit
PAS	<i>period circadian protein-acryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein-single-minded protein</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCB	Phycocyanobilin
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEI	Polyethylenimin
PEN/STREP	Penicillin/ Streptomycin
PHCMVMIN	<i>Minimal human cytomegalovirus imediate early promoter</i>
PHYB	Phytochome B
PHYBR	PhyB inaktivierter Zustand
PHYBFR	PhyB aktivierter Zustand
PIF	Phytochrome-interacting factor
P75NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>
PNPP	p-Nitrophenylphosphat
PPIA	Peptidylpropyl isomerase A
PSV40	Simian virus 40 early promoter
QPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RLU	Relative Lichteinheit
RPL4	<i>Ribosomal Protein L4</i>
SEAP	<i>Secreted embryonic alkaline phosphatase</i>
SGZ	Spiralganglionzellen
SOC	<i>Super optimal growth with catabolite repression</i>
SSC	Side scatter
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TETO	Tetrazycline operator
TETR	Tetrazycline repressor proteine

Abkürzungsverzeichnis

TF	Transkriptionsfaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRKB	Track B
UAS	<i>Upstream activating sequence</i>
UV	Ultra-violett
VP16	<i>Herpes simplex virus-derived transactivation domain</i>
VVD	<i>neurosporea crassa</i> Vivid
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 2: Verzeichnis aller verwendeten Einheiten.

<i>Einheit</i>	<i>Bedeutung</i>
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
µmol	Mikromolar
µs	Mikrosekunde
µW	Mikrowatt
b	Byte
bp	Basenpaare
Bar	Bar
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
J	Joule
kb	Kilobyte
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
m	Meter
M	Molar
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
Min	Minute
Mio.	Millionen
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
ms	Millisekunde
mW	Milliwatt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
pg	Pikogramm
pM	Pikomol
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
U	Unit
V	Volt
W	Watt
xg	x-fache Gewichtskraft

1. Einleitung

Schon seit mehr als 100 Jahren erforschen Photobiologen den Einfluss von Licht auf Pflanzen, Tiere und Bakterien. Als Resultat werden dem Licht unterschiedliche Funktionen zugeordnet. Sie erstrecken sich z. B. von der Energiegewinnung über die Orientierung sowie den Tag- und Nachtrhythmus bis hin zur Differenzierung der Zellen. Einige dieser Funktionen sind für das Überleben der Spezies unabdingbar, sodass der Einfluss von Licht auf Zellen ein sehr interessantes und vielversprechendes Forschungsgebiet darstellt [1].

In dem noch relativ jungen Forschungsgebiet der Optogenetik werden die Fachgebiete Optik und Genetik miteinander kombiniert. Es handelt sich hierbei um einen experimentellen Ansatz, bei dem Zellen genetisch so manipuliert werden, dass sie lichtempfindlich werden. Ziel der Optogenetik ist es, ausgewählte Zellen oder Zellfunktionen mit Hilfe von Licht gezielt zu steuern. Dies geschieht mittels genetischer Methoden, bei denen die Sequenzen für lichtempfindliche Pflanzenproteine in die Zellen eingefügt werden. Die Aktivierung erfolgt dann durch Licht bestimmter Wellenlängen, während die Deaktivierung in der Dunkelheit selbstständig erfolgt. Einige dieser optogenetischen Systeme fungieren auch als Schalter, wodurch die Aktivierungslänge bestimmt werden kann. Hierbei kann die Deaktivierung durch Illumination mit einer Deaktivierungswellenlänge eingeleitet werden. Dadurch können nicht nur zelluläre Abläufe gesteuert werden, sondern auch Informationen über biologische und neuronale Prozesse gewonnen werden. Diese entscheidenden Entdeckungen haben dazu beigetragen, dass dieses Forschungsgebiet im Jahr 2010 vom *Nature* Magazin zur Methode des Jahres gewählt wurde [1–3].

Die Optogenetik hat ihren Ursprung in der Entdeckung und Erforschung von Channelrhodopsinen, die zur Familie der Membranproteine gehören. Diese aus Algen isolierten, lichtaktivierbaren Ionenkanäle werden in der Regel zur Depolarisierung von Membranen und zur Auslösung von Aktionspotenzialen in neuronalen Zellen verwendet [4], wodurch die Nervenübertragung und die neuronale Aktivität manipuliert werden. Später wurden die optogenetischen Werkzeuge dann um Schalter für die Regulation der Protein- und Genexpression sowie zur Steuerung der Enzymaktivität oder Protein-Protein-Wechselwirkungen erweitert. Je nach Anwendung kann mittlerweile aus einer großen Vielfalt an optogenetischen Werkzeugen ausgewählt werden [5].

Für die Anwendung bietet die Nutzung von Licht zur Aktivierung bzw. Deaktivierung von Zellfunktionen mehrere Vorteile wie z. B. Nicht-Invasivität und eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung. Mehrere optogenetische Systeme verschiedener Wellenlängen können kombiniert werden, um eine mehrkanalige Steuerung zu ermöglichen und somit die Spezifität noch weiter zu erhöhen. Zusätzlich ist die Gefahr einer nicht gewollten Beeinflussung oder Schädigung umliegender Zellen und von Gewebe sowie einer Funktionsbeeinträchtigung im Vergleich zu einer elektrischen Beeinflussung sehr gering [6].

Ziel der optogenetischen Forschung ist es, Krankheiten mit Hilfe von Licht zu analysieren, um deren Mechanismen besser zu verstehen. Hierdurch sollen neue Ansätze für Heilmethoden oder Linderungsmaßnahmen diverser Krankheiten gefunden werden. Einige dieser Ansätze befassen sich mit der Erforschung Licht-basierter oder optogenetischer Heilmethoden. Diese Forschungen beschäftigen sich vorrangig mit den Themengebieten der Wiederherstellung des Sehvermögens, der Behandlung von neuronalen Störungen, wie z. B. Epilepsie oder Parkinson, sowie von kardiovaskulären Krankheiten, dem Genome *Editing* und der Implantatforschung [2].

Aktuelle Therapien von neurosensorischen und neurologischen Störungen aktivieren Neurone meist elektrisch. Hierbei wird jedoch lediglich ein physiologischer Prozess ausgelöst, während bei einer natürlichen Aktivierung des Neurons durch die Ausschüttung von Neurotransmittern zusätzlich zahlreiche weitere molekulare Prozesse ausgelöst werden. Darüber hinaus kann der Einsatz von Strom bei benachbarten Zellen ungewollte Nebeneffekte auslösen [7]. Daher besteht die Überlegung, die molekularen Prozesse der Neuronenaktivierung durch den Einsatz von optogenetischen Methoden zu beeinflussen. Hierdurch würden nicht nur die ungewollten Nebeneffekte wegfallen, sondern auch eine bessere zeitliche und räumliche Auflösung erreicht werden. Diese Technik soll in stimulierenden Implantaten, wie z. B. optogenetischen Herzschrittmachern oder Cochlea, später die elektrische Aktivierung ergänzen oder komplett ersetzen (siehe Abbildung 1). Darüber hinaus können optogenetische Systeme, die in der Regel aus zwei Transkriptionsfaktoren bestehen, die sich unter Lichtaktivierung eines intrinsisch gebildeten Chromophors zu einer funktionellen Einheit zusammensetzen, einen Promotor einer bestimmten Zielsequenz aktivieren. Dieser startet dann die Zielgen-Transkription und -Proteinbiosynthese von z. B.

Wachstumsfaktoren oder neuroprotektive Faktoren wie BDNF. Diese optogenetisch aktivierbaren Zellen können bei der Implantation neben dem Implantat platziert werden, um die Erfolgchancen der elektrischen Resonanz auf das CI durch eine Stabilisierung der dafür notwendigen Spiralganglienzellen (SGZ) zu steigern. Bei CIs besteht zusätzlich die Möglichkeit, das Wachstum der SGZ zum Implantat hin zu fördern, wodurch die elektrische Kopplung bedeutend erhöht werden kann.

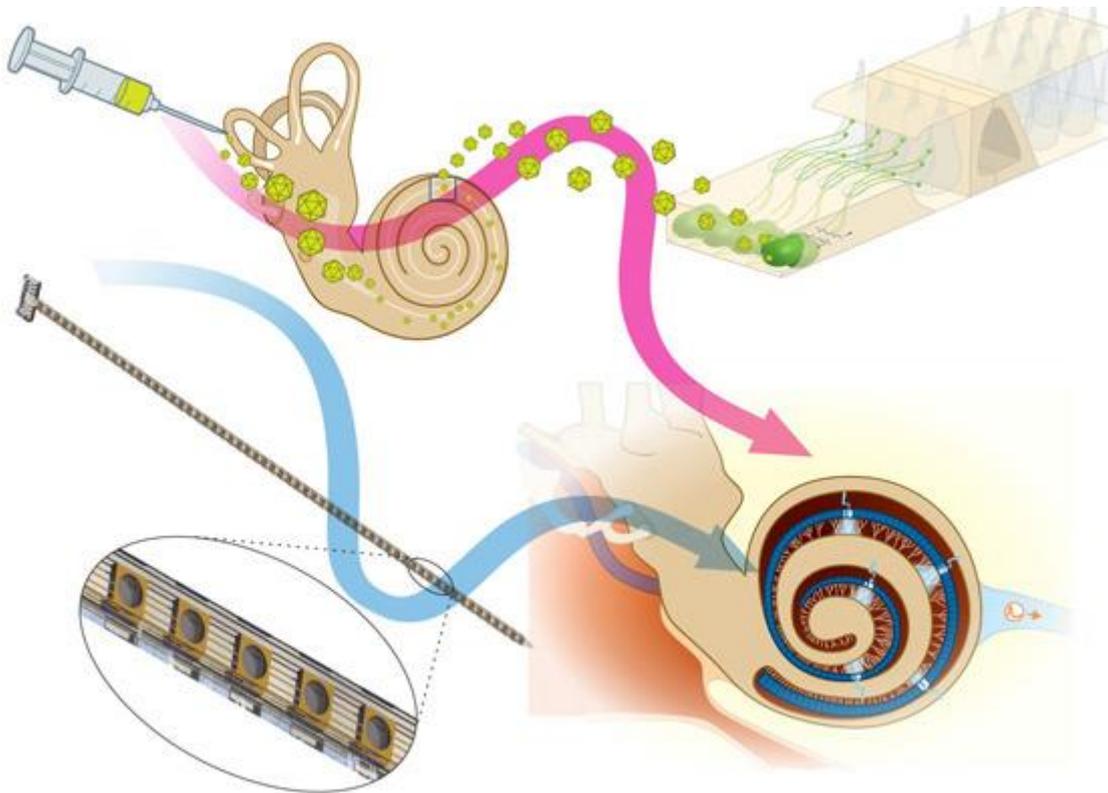


Abbildung 1: Schematische Darstellung des optogenetischen CIs. Der pinkfarbene Pfeil stellt die Transfektion der hMSCs mit dem optogenetischen System dar, die bei der Implantation neben dem Implantat platziert wird. Der blaue Pfeil stellt den Lichtleiter dar, mit dem das CI versehen wird und durch den das optogenetische System aktiviert werden kann [8].

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass SGZ eine entscheidende Rolle bei der auditorischen Vermittlung von CIs spielen [9]. Andere Studien haben positive Effekte des neuroprotektiven Faktors BDNF auf Spiralganglionzellen nachgewiesen [10]. In Konsequenz stellt somit eine Therapie der Cochlea mit BDNF einen guten Ansatz zur Verbesserung der auditorischen Vermittlung von CIs dar [11]. Hierbei könnte eine optogenetisch-induzierte BDNF Expression direkt am CI eine entscheidende Rolle spielen, da durch die gute zeitliche und räumliche Auflösung umliegendes Gewebe geschont und ungewollte Nebeneffekte minimiert werden. Das

CI wird hierfür mit einem Laser-basierten Lichtleiter [13], der bei einer sehr geringen Größe eine gute Strahlenqualität mit hohen Intensitäten ermöglicht, sowie mit optogenetisch aktivierbaren patienteneigenen Zellen versehen. Mesenchymale Stammzellen z. B. lassen sich leicht aus dem Fettgewebe des Patienten isolieren und weisen als allogene übertragene Zellen eine niedrige Immunogenität auf [12]. Durch die Verwendung patienteneigener Stammzellen könnte die Immunogenität komplett vermieden werden.

Durch die optogenetische Aktivierung kann BDNF mit einer guten zeitlichen und räumlichen Auflösung direkt am CI synthetisiert werden. Die Menge und die Häufigkeit der BDNF-Synthese können direkt durch die Häufigkeit und Dauer der Lichtinduktion gesteuert werden. Hierbei wird nur ein minimaler Bereich um das Implantat herum im Innenohr betroffen, während die anderen Bereiche des Kopfes nicht beeinflusst werden. Dies ist ein entscheidender Vorteil im Vergleich zu einer oralen, systemischen oder subkutanen BDNF-Applikation oder einer simplen Beschichtung des Implantats mit BDNF. Zusätzlich birgt eine Lichtaktivierung nicht die Gefahr, ungewollt Einfluss auf die empfindliche Elektronik des CIs zu nehmen.

Bei der vorliegenden Dissertation handelt es sich um ein Kooperationsprojekt zwischen dem Institut für Technische Chemie, dem Institut für Quantenoptik und dem Institut für Mikroelektronische Systeme der Leibniz Universität Hannover. Dieses Projekt ist Teil des Exzellenz Clusters *Hearing 4 All*, der die Expertisen der Universitäten Hannover, Oldenburg und der Medizinischen Hochschule Hannover in der Hörforschung vereint und Kooperationen untereinander fördert.

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war die Entwicklung einer lichtinduzierten Proteinsynthese in optogenetisch aktivierbaren Säugerzellen als Modellzellen für therapeutische Applikationen in humanen Stammzellen. Hierbei sollten Säugerzellen mit einem optogenetischen System transfiziert werden, das anschließend mit Hilfe eines Lichtimpulses dazu angeregt wird, ausgewählte Proteine wie das therapeutisch relevante BDNF zu synthetisieren.

Als Modellzellen für die humanen Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst Säugerzellen einer Zelllinie verwendet. Eine Etablierung des optogenetischen PhyB-Systems erfolgte in CHO-K1 Zellen mit EGFP Marker, während das CRY2-

System, in einem anderen Modellzellsystem, den HEK293 Zellen mit dem Reporter Luciferase als Marker etabliert wurde.

Bei dem PhyB System handelt es sich um ein Rotlicht-aktivierbares und Fernrotlicht-deaktivierbares optogenetisches Schaltersystem, dass aus zwei Plasmiden besteht. Für eine optogenetische Schaltung des PhyB Systems ist die Zugabe eines externen Chromophors notwendig. Das CRY2-System hingegen ist Blaulicht-aktivierbar und besteht aus drei Plasmiden. Es deaktiviert sich nach wenigen Minuten in der Dunkelheit von selbst, wodurch eine wiederholte Illumination notwendig ist. Im Gegensatz zum PhyB System benötigt es jedoch keine externen Faktoren.

Da optogenetische Systeme in der Regel aus zwei Transkriptionsfaktoren bestehen, die sich unter Lichtaktivierung eines Chromophors zu einer funktionellen Einheit zusammensetzen, die dann einen Promotor einer bestimmten Zielsequenz aktiviert, bestehen sie meist aus mehreren Plasmiden. Dies hat mehrere Gründe. Zum einen sollen die beiden Transkriptionsfaktoren getrennt voneinander exprimiert werden, damit der Promoter nicht bereits ohne Lichtinduktion aktiviert wird. Deswegen sind die beiden Transkriptionsfaktoren in der Regel auf zwei verschiedenen Plasmiden lokalisiert. Zum anderen ist die Länge eines zu transfizierenden Plasmids begrenzt. Je länger das Plasmid ist, desto schwerer ist es zu transfizieren, deswegen ist es meist nicht möglich, alle notwendigen Gensequenzen auf einem Plasmid unterzubringen. Zusätzlich ist bei manchen optogenetischen Systemen ein bestimmtes stöchiometrisches Verhältnis zwischen den verschiedenen Komponenten notwendig, um eine hohe Expression zu erreichen. Dieses kann durch eine Transfektion mit verschiedenen Mengen der Plasmide erzielt werden. Für die Etablierung der beiden optogenetischen Systeme war deswegen eine Ko-Transfektion mit zwei bis drei Plasmiden notwendig. Auf dem einen Plasmid befindet sich die Sequenz für den Photosensor und auf dem anderen bzw. den anderen Plasmiden die Sequenz für den Interaktionspartner sowie für das zu synthetisierende Protein.

In dieser Arbeit wurde die Ko-Transfektion eines optogenetischen Systems in Säugetierzellen (PhyB in CHO-K1 Zellen und CRY2 in HEK293 Zellen) etabliert und hinsichtlich einer hohen Proteinexpression für therapeutische Applikationen optimiert. Für das PhyB-System wurden die Parameter Illuminationsintensität, Arbeitsabstand, Menge der Chromophore sowie das Plasmidverhältnis optimiert. Bei dem CRY2-

System wurden die Einflussfaktoren Plasmidverhältnis, Plasmidmenge, Menge an Transfektionsreagenz sowie die Illuminationsdauer optimiert.

Anschließend sollte die Proteinbiosynthese des therapeutisch relevanten BDNFs mittels optimierten Versuchsprotokolls optogenetisch induziert werden und die Konzentration des BDNFs quantifiziert werden. Zusätzlich sollte die Funktion der optogenetisch aktivierbaren Genexpression auf Genebene mittels qPCR nachgewiesen und mit der Proteinexpression verglichen werden. Weiterhin sollte nachgewiesen werden, dass auch die therapeutisch relevante Laser-Induktion geeignet ist, die optogenetische Proteinbiosynthese zu aktivieren. Anschließend soll die resultierende Proteinexpression mit der Proteinexpression der experimentell verwendeten LED-Illumination verglichen werden. Abschließend sollte die Methode, die in der höchsten BDNF Expression resultiert, auf die therapeutisch relevanten hMSCs, die aus Fettgewebe isoliert wurden, übertragen werden. Hierfür sollte zunächst eine geeignete Ko-Transfektionsmethode ermittelt, optimiert und etabliert werden.

2. Theorie

2.1 Optogenetik

Einer der ersten Schritte in der Entwicklung der Optogenetik war im Jahr 1971 die Entdeckung eines Opsins aus der Purpurmembran von *Halobacterium halobium*, dass sowohl Ionenkanal, wie auch Lichtrezeptor ist. Wird diese Gensequenz in eine Zelle eingebracht, so produziert diese den Ionenkanal und baut ihn in die Zellmembran ein. Diese Ionenkanäle können durch Licht geöffnet werden, wodurch positive Natrium- und Calciumionen aus dem extrazellulären Raum in die Zelle einströmen können, wodurch sich das Zellpotential ins Positive verschiebt. Hierdurch werden Aktionspotenziale in der Zelle erzeugt. Später entdeckte Opsine sind Ionenkanäle unter anderem für negative Chloridionen, wodurch das Aktionspotential der Zelle ins Negative verschoben werden kann. Kombiniert man beide Opsine so lassen sich die Zellen nach Belieben polarisieren oder depolarisieren. Dies ermöglicht eine schnelle Kontrolle bestimmter zellulärer Prozesse [13], [14].

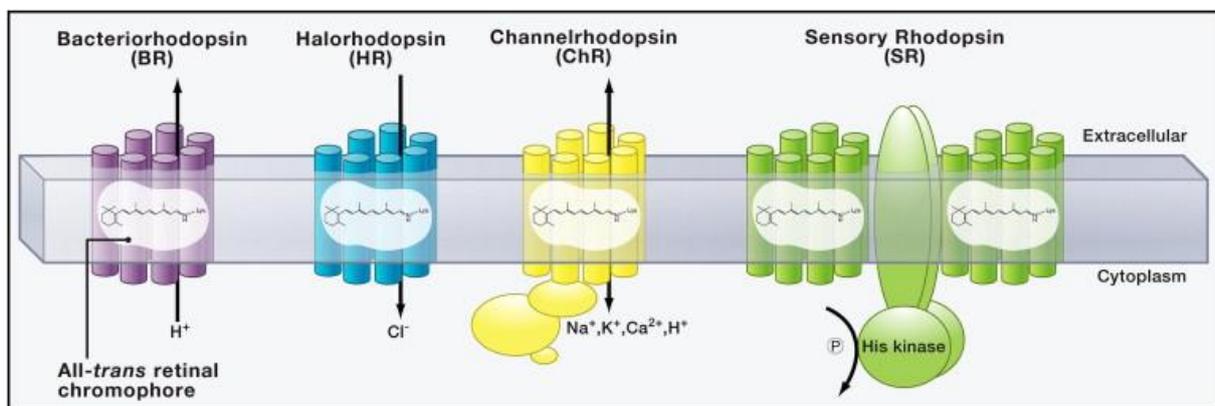


Abbildung 2: Übersicht verschiedener optogenetischer Opsine, ihres Aufbaus und ihrer Funktionsweisen. Von links nach rechts: Bacteriorhodopsin, Halorhodopsin, Channelrhodopsin und Sensory Rhodopsin. [14].

Im Laufe der Jahre wurden weitere Mitglieder der Licht-induzierbaren Opsin-Familie identifiziert. Das Halorhodopsin in 1984 [15] und das Channelrhodopsin [16] im Jahr 2002 (siehe Abbildung 2). Die Entdeckung, dass Neuronen nach Transfektion mit einem mikrobiellen Opsin-Gen ohne weitere Faktoren auf Licht reagierten stellte einen wesentlichen Durchbruch dar [17].

Zu den in der Optogenetik am häufigsten verwendeten Opsinen gehören Channelrhodopsine und lichtgesteuerte Pumpen, wie Halorhodopsin und Archs. Channelrhodopsine sind durch blaues Licht aktivierte, unspezifische Kationenkanäle. Das erste beschriebene Channelrhodopsin (Channelrhodopsin-1) stammt aus *Chlamydomonas reinhardtii* und lässt sich mit Hilfe von blauem Licht aktivieren [16]. Ein weiteres Channelrhodopsin (Channelrhodopsin-2) wurde später aus demselben Organismus isoliert [18]. Halorhodopsine sind lichtgesteuerte Einwärts-Chloridpumpen. Wenn sie in der Zielzelle exprimiert und mit gelbem Licht beleuchtet werden, pumpen sie Chloridionen aus dem extrazellulären Medium in die Zelle und vermitteln eine Hyperpolarisierung mit anschließender Abschaltung der Zielzelle. Das Halorhodopsin aus dem Archaea *Natronomonas pharaonis* ist das erste in Neuronen eingesetzte [19]. Archs sind Licht-gesteuerte, nach außen gerichtete Protonenpumpen aus *Halorubrum sodomense*. Wenn sie in Neuronen exprimiert und mit gelbem oder grünem Licht beleuchtet werden, pumpen Archs positive Ladung aus den Zellen und hyperpolarisieren diese [20].

Der Begriff Optogenetik wurde erstmals 2006 von Deisseroth *et al.* [21] eingeführt und steht für eine Kombination von Gentechnik und optischer Technologie. Sie hat das Ziel, biologische Funktionen von Zellen, Geweben, Organen oder Organismen mit Hilfe von Licht zu steuern und zu überwachen.

Durch den großen Erfolg der Opsine gewann die Optogenetik schnell an Popularität, und das Interesse an optogenetischer Forschung wuchs insbesondere, weil sich damit die Vision verband, über Lichtimpulse neuronale Aktivität zu steuern. Durch die große Vielfalt an Forschungsgebieten wurde das optogenetische Repertoire bald um Schalter für die Regulation der Protein- und Genexpression sowie zur Steuerung der Enzymaktivität oder Protein-Protein-Wechselwirkungen erweitert. Je nach Anwendung kann mittlerweile zwischen einer großen Vielfalt an optogenetischen Werkzeugen ausgewählt werden [5].

2.2 Optogenetische Systeme für die Gen- und Proteinexpression

Im Allgemeinen besteht ein optogenetisches System zur Gen- und Proteinexpression aus zwei Komponenten, einem Photosensor und einem Interaktionspartner. Bei Lichtinduktion absorbiert das im Photorezeptor befindliche Chromophor Photonen,

wodurch sich die Konformation des Photorezeptors ändert. Dies ermöglicht die Interaktion beider Komponenten miteinander. Die Interaktions- und Bindungseigenschaften der beiden Komponenten können in vier verschiedene Kategorien eingeteilt werden: (i) gespaltene Proteine, (ii) Dimerisierung und DNA-Bindung, (iii) Kompartimentalisierung/ Lokalisierung und (iv) sterische/allosterische Effekte [22]. Typischerweise ist einer der Partner mit einer DNA-Bindedomäne (DBD) mit einem ausgeprägten Bindungsmotiv fusioniert, während der andere Partner einen Transkriptionsfaktor (TF), auch Aktivierungsdomäne genannt, beherbergt. In Kombination kann dadurch die Genexpression des optogenetischen Systems beeinflusst werden. Nach Lichtinduktion bindet der Partner mit der DBD an das Bindungsmotiv der DNA, während der andere Partner mit dem TF den Startpunkt für die RNA-Polymerase bildet, wodurch das *gene of interest* (Goi) exprimiert wird [23]. Alle optogenetischen Systeme zur Genexpression erfordern ein Chromophor, das an eine intramolekulare Bindungsstelle des Photosensors gebunden ist. In der Regel sind diese Chromophore kovalent an einen Cysteinrest des Photosensors gebunden [24]. Bei Absorption eines Photons ändert sich die Elektronendichte innerhalb des Chromophors, was zu einer Konformationsänderung des Chromophors und des entsprechenden Photosensors führt [25]. Phycocyanobilin (PCB), Flavin-Mononukleotid (FMN), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Biliverdin sind die gängigsten Chromophore für die molekulare Lichtsensorik. Zwei eher seltene Chromophore sind 5'-Desoxyadenosylcobalamin und p-Cumarsäure. Die wichtigsten optogenetischen Werkzeuge für die Genexpression in Säugetierzellen sind das CRY2-System [26], das PhyB-System [27] und das LOV (*light-oxygen-voltage*)-System [28]. Ihr allgemeines Funktionsprinzip wird im Folgenden erläutert.

2.2.1 Phytochrome B (PhyB)

Die beiden Hauptkomponenten des PhyB-Systems sind der Photorezeptor Phytochrom B und sein Interaktionspartner, der Phytochrom-Interaktionsfaktor (PIF) [27, 29–32], die beide ursprünglich aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana* stammen [33]. In Abbildung 3 ist das Funktionsprinzip des PhyB-Systems dargestellt.

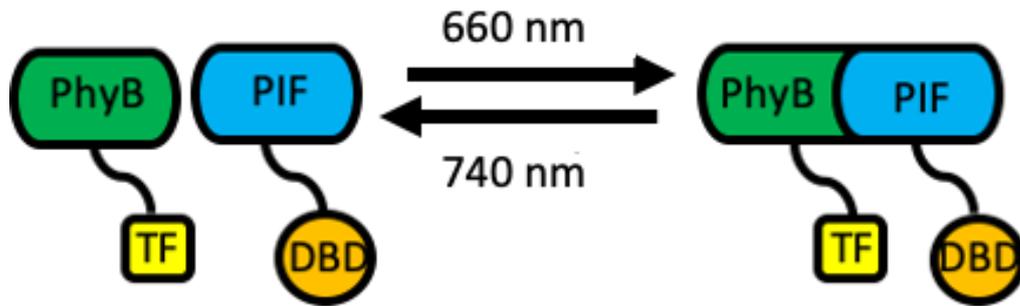


Abbildung 3: Funktionsprinzip des PhyB-Systems: Das optogenetische System besteht aus zwei Komponenten – einem Photosensor (grün: PhyB) und seinem Interaktionspartner (blau: PIF) –, die nach Lichtinduktion in Gegenwart eines Chromophors (PCB - nicht gezeigt) miteinander interagieren.

Der Photorezeptor PhyB besteht aus zwei Hauptdomänen, wobei nur die N-terminale Domäne für die Optogenetik relevant ist. Sie bildet die photosensorische Domäne und bindet den exogenen Co-Faktor, das Chromophor PCB. Bis zur Absorption des Chromophors bleibt PhyB in seinem inaktiven Zustand (PhyBR genannt). Nach der Bindung des Chromophors ist PhyB in der Lage, ein rotes Photon (660 nm) zu absorbieren, wodurch es isomerisiert, und zu einer Konformationsänderung von PhyBR zu seinem aktiven Zustand (PhyBFR) führt. PhyBFR kann an PIF, das mit Hilfe der DNA-bindenden Domäne an die DNA gebunden ist, binden. Der mit PhyB fusionierte Transkriptionsfaktor leitet dann die Gentranskription ein. Durch Absorption eines dunkelroten Photons (740 nm) ändert sich die Konformation von PhyBFR zurück zu PhyBR. Infolgedessen dissoziiert der PhyB-PIF-Komplex und die Gentranskription von PIF wird beendet [27].

Das PhyB-System ist also ein optogenetischer Schalter, der mit Licht zweier unterschiedlicher Wellenlängen aktiviert und deaktiviert werden kann. Wird das System nicht durch dunkelrotes Licht deaktiviert, kehrt es langsam (nach etwa 24 Stunden) in den thermisch stabileren inaktivierten Zustand zurück. Dieser Vorgang wird auch als thermische Revision bezeichnet [34].

Neben der Genexpression wird das PhyB-System auch zur Translokation einer Vielzahl von Proteinen verwendet und so die Zellmorphologie in Säugetierzellen verändert und gesteuert. Levskaya *et al.* [35] und Leung *et al.* [36] fokussierten sich in ihren Arbeiten auf eine optogenetische Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts und die Lenkung der Aktin-Polymerisation, während sich Toettcher *et al.* [37, 38] mit der Phosphoinositid-3-Kinase-Aktivität und dem Signalprotein RAS beschäftigten. Auch andere Zellfunktionen wie der intrazelluläre Transport [39] und die Proteinlokalisierung

[40] können gesteuert werden. In neueren Studien entwickelten Uda *et al.* [41, 42] eine stabile HeLa (Henriette Lacks, menschliche Epithelzellen von Gebärmutterhalskrebs) Zelllinie die PCB synthetisiert, um die Notwendigkeit der Zugabe eines exogenen Chromophors zu umgehen. Kramer *et al.* [43] verwendeten das PhyB-System in Kombination mit CRY2 für eine multichromatische Kontrolle von Signalwegen in HEK293 Zellen. Fonin *et al.* [44] beobachteten die Bildung von membranlosen Organellen in Säugetierzellen mit Hilfe von PhyB.

2.2.2 Light-oxygen-voltage (LOV)

Der Licht-Sauerstoff-Spannungs-Photorezeptor LOV ist einer der vielseitigsten optogenetischen Photorezeptoren, da es viele verschiedene Möglichkeiten der gentechnischen Veränderung und verschiedenste Mutanten gibt, was zu einer großen Vielfalt an Anwendungen führt. LOV-Domänen finden sich in zahlreichen pflanzlichen, fungiziden und bakteriellen Proteinen [28, 45–50]. Der typische LOV-Photorezeptor hat keinen Interaktionspartner, da seine Funktion durch Konformationsänderung einer Helix hervorgerufen wird. Der Hauptaktionsmechanismus ist die Regulierung der Aktivität über sterische Hinderung, die durch eine Konformationsänderung einer Helix moduliert wird. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 4 dargestellt. Es gibt jedoch einige LOV-Varianten mit anderen Interaktionspartnern die später erwähnt werden.

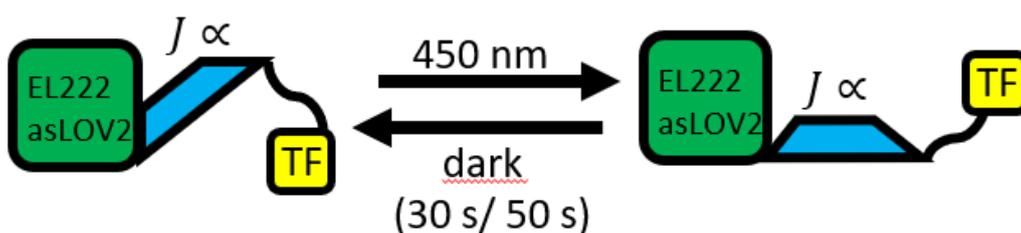


Abbildung 4: Funktionsprinzip des EL222-Systems (grün): Nach Bindung des Chromophors (FAD/FMN - nicht gezeigt) und Lichtinduktion entfaltet sich die J-Helix (blau) und der Transkriptionsfaktor (TF: gelb) wird nicht mehr sterisch gehindert, wodurch die Genexpression des Zielgens aktiviert wird.

LOV gehört zur Per-ARNT-Sim Domäne (PAS: *period circadian protein-acryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein-single-minded protein*) und nimmt blaues Licht (450 nm - 500 nm) mit Hilfe des Chromophors Flavin-Mononukleotid oder

Flavin-Adenin-Dinukleotid wahr. Beide Chromophore sind in Säugetierzellen endogen und interagieren in der Dunkelheit nicht-kovalent mit LOV [51]. Bei Absorption eines Photons wird eine kovalente Bindung zwischen dem Chromophor und dem PAS-Kern gebildet, die zu einer Konformationsänderung und einer Neuordnung der nicht-kovalenten Wasserstoffbrückenbindungen führt [52]. Diese Konformationsänderung führt zu einer Dislokation der α - und J-Helices von der C- und N-terminalen Domäne [53] und legt die sterisch gehinderte DBD frei [54]. Für die Regulierung der Genexpression wurde ein Transkriptionsfaktor an die J-Helix fusioniert.

Im Dunkeln löst ein spontaner Mechanismus die Bindung zwischen LOV und dem Chromophor auf, wodurch das System innerhalb von 50 Sekunden deaktiviert wird. Anwendungen, die auf dieser lichtinduzierten Konformationsänderung beruhen, sind zum Beispiel Protein-Protein-Wechselwirkungen (Hetero-, Homodimerisierung und Dissoziation) [26, 28, 55], lichtabhängige Allosterie (Maskierung/Demaskierung von Effektorstellen, photocaged Peptide und lichtinduzierte Störungen) [56–58], Genom-Editing mit CRISPR/Cas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein*) [46] und Genexpression. Neue Ansätze beschäftigen sich mit einer dualen optogenetischen Aktivierung zur Protein-Regulation mit einer Kombination aus Senkung der Genexpression sowie der Proteinstabilität in HEK293T, HeLa-, CHO-K1-, NIH/3T3 (*swiss albino mouse fibroblasts*)- und Cos-7 (*CV-1 in Origin, carrying SV40*)-Zellen [45, 59].

Es sind verschiedene Varianten von LOV bekannt, die je nach Anwendung die optogenetische Leistung des Systems verbessern können. Gängige LOV-Systeme mit einem anderen optogenetischen Hauptmechanismus sind: FKF1 (*A. thaliana* flavin-binding), asLOV2 (*avena sativa* phototropin1), EL222 (*erythrobacter litoralis* LOV) und VVD (*neurosporea crassa* Vivid).

Der Photorezeptor FKF1 unterliegt einer Heterodimerisierung mit dem Interaktionspartner GI (*gigantea*) nach einer nicht kovalenten Chromophorbindung (FAD/FMN) und Blaulichtbeleuchtung. Ein mit FKF1 fusionierter Transkriptionsfaktor aktiviert nach der Heterodimerisierung die Gentranskription [60–62]. GI hingegen ist mit der DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Bindungsdomäne (Zinkfingerprotein) fusioniert, die den Initiationskomplex am Zielgen lokalisiert.

Das Funktionsprinzip von Photorezeptoren wie asLOV2 und EL222 ähnelt dem der typischen LOV-Domäne (siehe Abbildung 4). Der Photorezeptor ist im dunklen Zustand an eine Helix-Turn-Helix-Domäne gebunden, die die für die DNA-Bindung wichtige Helix blockiert. Nach Bindung eines Chromophors und Beleuchtung mit blauem Licht ändert der Photorezeptor seine Konformation. Dadurch wird die Helix der Helix-Turn-Helix-Domäne nicht mehr blockiert, und das DBD-Element kann an das DNA-Bindungsmotiv binden. Ein Transkriptionsfaktor, der mit dem Photorezeptor fusioniert ist, startet die Genexpression. Zurück im Dunkeln erfolgt die thermische Revision schnell [63].

Der VVD-Photorezeptor zeichnet sich dadurch aus, dass er bei Bindung eines Chromophors und bei Beleuchtung an den Interaktionspartner Gal4 (Transkriptionsfaktor) dimerisiert. Gal4 hat ein ausgeprägtes DNA-Bindungsmotiv, weshalb der mit VVD fusionierte Transkriptionsfaktor die Genexpression initiieren kann. In der Dunkelheit dissoziiert das Heterodimer wieder in seine ursprüngliche Form und die Gentranskription wird beendet [64].

2.2.3 Cryptochrome 2 (CRY2)

Das CRY2-System besteht aus dem Photorezeptor Cryptochrom Circadian Regulator 2, seinem Interaktionspartner, dem Protein CIB (*cryptochrome-interacting basic-loop-helix*) und den Chromophoren Flavin-Adenin-Dinukleotid oder Flavin-Mononukleotid [26, 45, 61, 65–70]. An der N-terminalen Domäne von CRY2 befindet sich eine Photolyase-homologe Region, die an das Chromophor bindet. CRY2, aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, ist ein ungewöhnliches photosensorisches Protein, da es nach der Beleuchtung mit blauem Licht (450 nm) auf zwei verschiedene Arten interagieren kann. Der erste Interaktionsweg ist eine Homo-Oligomerisierung ohne Beteiligung eines anderen Interaktionspartners, die zur Bildung von Clustern verschiedener CRY2-Moleküle bei Blaulichtstimulation führt. In den letzten Jahren ist die Anwendung der CRY2-Homo-Oligomerisierung immer populärer geworden, um Zellfunktionen und Protein-Protein-Interaktionen zu regulieren [71]. Für die vorliegenden Experimente ist dies jedoch ein unerwünschter Nebeneffekt.

Nach der Lichtinduktion kann CRY2 aber auch mit CIB interagieren (Abbildung 5).

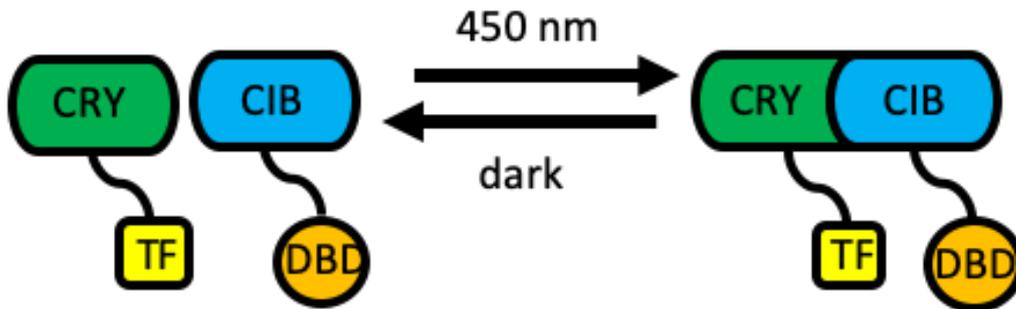


Abbildung 5: Funktionsprinzip des CRY2-Systems: Das optogenetische System besteht aus zwei Komponenten – einem Photosensor (grün: CRY2) und seinem Interaktionspartner (blau: CIB) –, die nach Lichtinduktion in Gegenwart eines Chromophors (FAD/FMN - nicht gezeigt) miteinander interagieren.

Der genaue Bindungsmechanismus von CRY2 und CIB ist noch nicht vollständig geklärt. Kennedy *et al.* [26] nutzten jedoch das CRY2-System zur Kontrolle von Protein-Protein-Interaktionen. Genauer gesagt induzierten sie Proteintranslokation, Transkription und Cre-Rekombinase-vermittelte DNA-Rekombination. Idevall-Hagren *et al.* [72] kontrollierten den Phosphoinositid-Stoffwechsel in Säugetierzellen mit CRY2/CIB. Phosphoinositide sind Lipidkomponenten von Zellmembranen, die eine Vielzahl von Zellfunktionen regulieren. Duan *et al.* [55] nutzten CRY2, um den Transport und die Verteilung von Organellen durch Licht zu steuern. Sie erreichten dies durch die optische Rekrutierung molekularer Motoren auf Organellen durch die Heterodimerisierung von CRY2 und CIB. Nihongaki *et al.* [67] und Polstein & Gersbach *et al.* [69] kombinierten das CRY2-System mit dem Genom-*Editing*-Werkzeug CRISPR/Cas zur Regulierung der Genexpression in Säugetierzellen (HEK293, HEK293T, Cos-7). Im Jahr 2016 kam auch ein optogenetisch induzierbares Cre-Rekombinasesystem (*Cyclization Recombination* oder *Causes Recombination*) für das Genom-*Editing in vitro* in HEK293- und HEK293T-Zellen zum Einsatz [73, 74].

2.2.4 Vor- und Nachteile der Systeme

Die optogenetischen Systeme unterscheiden sich in der Aktivierungswellenlänge, dem Chromophor, der Reversibilität und der Deaktivierungszeit der Genexpression. Da jedes System seine eigenen Vor- und Nachteile hat, gibt es nicht das perfekte optogenetische System für alle Arten von klinischen Anwendungen. Daher muss es in Abhängigkeit von der gewünschten Anwendung sorgfältig ausgewählt werden. Die

Vor- und Nachteile der wichtigsten optogenetischen Systeme, laut Literatur, sind in Tabelle 3 zusammengefasst und werden anschließend ausführlicher erörtert.

Tabelle 3: Vor- und Nachteile der verwendeten optogenetischen Systeme.

Optogenetisches System	Vorteile	Neutral	Nachteile
PhyB (660 nm)	<ul style="list-style-type: none"> • Illumination zellschonend mit hoher Eindringtiefe • Optogenetischer Schalter • Stabile Aktivierung für 12-24 Stunden 		<ul style="list-style-type: none"> • Externer Co-Faktor notwendig • Halbwertszeit der Chromophore beträgt nur 1 Stunde
CRY2 (450 nm)	<ul style="list-style-type: none"> • Chromophor kommt in Säugetierzellen natürlich vor • Gute Zeitauflösung (Deaktivierung nach ca. 5 Minuten) 	<ul style="list-style-type: none"> • Niedrige Eindringtiefe (Problem lösbar) • Hohe Intensität kann zellschädigend wirken (gepulste Illumination) 	<ul style="list-style-type: none"> • Nebenreaktion: Homodimerisation von CRY2
LOV (450 nm)	<ul style="list-style-type: none"> • Chromophor kommt in Säugetierzellen natürlich vor • Sehr vielseitig (Varianten, Anwendungsmöglichkeiten) 	<ul style="list-style-type: none"> • Niedrige Eindringtiefe (Problem lösbar) • Hohe Intensität kann zellschädigend wirken (gepulste Illumination) • Zeitauflösung abhängig von der Variante (17 Sekunden bis 62 Stunden möglich) 	

PhyB: Das PhyB System ist auf das Chromophor PCB angewiesen, das in Säugetierzellen nicht endogen ist. Abgesehen von Sicherheitsbedenken ist dies ein schwerwiegender Nachteil, da PCB dem optogenetischen System zugeführt werden muss, welche Injektionen oder Infusionen in das Zielgewebe erfordert [75]. Die wiederholte Zugabe von PCB ist obligatorisch, da die Halbwertszeit von PCB nur etwa

1 Stunde beträgt. Eine Möglichkeit, diesen Nachteil zu überwinden, ist die Co-Transfektion der Zellen mit den Genen für die PCB-Synthese aus Häme [27]. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Einführung der PCB-Synthese allein nicht ausreicht, sondern dass andere Wege des Häme-Stoffwechsels unterdrückt werden müssen, um ausreichende PCB-Konzentrationen zu erreichen [41]. Darüber hinaus ist Häme auch für andere lebenswichtige Körperfunktionen wie den Sauerstofftransport von entscheidender Bedeutung, weshalb bei der Störung des Häme-Stoffwechsels größte Vorsicht geboten ist.

Das PhyB System wird mit (dunkel-) rotem Licht aktiviert und deaktiviert, was für den *in vivo* Einsatz von Vorteil ist, da es das Gewebe tiefer durchdringt als Licht mit einer kürzeren Wellenlänge. Darüber hinaus enthält rotes Licht im Vergleich zu Licht kürzerer Wellenlänge eine geringere Energie, so dass mögliche gewebeschädigende Wirkungen verringert werden, was für *in vivo* Applikationen ein großer Vorteil ist [27].

CRY2: Das CRY2-System ist von der Aktivierung durch blaues Licht abhängig und hat eine Aktivierungshalbwertszeit von 5,5 Minuten. Daher muss, auch wenn die hohe zeitliche Auflösung attraktiv erscheint, eine aufwändigere konstante oder wiederholte Blaulichtbeleuchtung verwendet werden, um das System im aktivierten Zustand zu halten, was einen Nachteil darstellen könnte. Um Zellschäden zu vermeiden wird eine kontinuierliche Blaulicht-Beleuchtung nicht empfohlen. Außerdem kann die Homodimerisierung von CRY2 zu unerwünschten Nebenwirkungen führen und die Gesamtleistung der Genexpression verringern. Es ist noch nicht erwiesen, ob eine unerwünschte CRY2 Homodimerisierung weitere Nebenwirkungen in den Zellen verursacht und somit ein Risiko für die biologische Sicherheit darstellt. Allerdings konnten Duan *et al.* [76] zeigen, dass die Homodimerisierung an der C-terminalen Domäne stattfindet, während die CRY2/CIB-Heterodimerisierung an der N-terminalen Domäne stattfindet. Indem sie die Ladungen an der C- und N-terminalen Domäne veränderten, konnten sie eine der Reaktionen verstärken oder unterdrücken. Andererseits sind die Chromophoren FMN und FAD in Säugetierzellen endogen, was von Vorteil ist. Außerdem führt die kurze Halbwertszeit des aktivierten Zustands zu einer guten zeitlichen Auflösung des Systems [61].

LOV: LOV-Systeme weisen je nach verwendeter Variante unterschiedliche Eigenschaften auf. Die Deaktivierungszeit der LOV-Systeme hängt stark von der verwendeten Variante ab und reicht von 17 Sekunden bis 62 Stunden. Ähnlich wie beim CRY2-System ist auch eine kontinuierliche oder gepulste Blaulichtbeleuchtung erforderlich um LOV-Systeme zu aktivieren. Wie bereits erwähnt, hat blaues Licht unerwünschte optische Eigenschaften und kann dem bestrahlten Gewebe unerwünschte Schäden zufügen [45]. Ein großer Vorteil des LOV-Systems ist, dass LOV-Elemente klein sind und das Chromophor FMN in Säugetieren endogen ist. Durch ihre große Vielseitigkeit in der Anwendung sind LOV-Systeme ein wichtiges optogenetisches Werkzeug [26].

2.3 Indikatorproteine

Die nachfolgenden Proteine wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit als *proof-of-principle* und Indikator für die Höhe der Transkription und Genexpression während der Optimierung der Reaktionsbedingungen verwendet.

2.3.1 Green fluoreszent protein (GFP)

Das aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende grüne fluoreszierende Protein wurde bereits in den 60er Jahren entdeckt [77]. 2008 bekamen seine Entdecker und Erforscher – O. Shimomura, M. Chalfie, R. Tsien – sogar den Nobelpreis verliehen. GFP besteht aus 238 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 29,6 kDa [78]. In der *A. victoria* Qualle erhält GFP seine Anregungsenergie durch das Photoprotein Aequorin, das nach Bindung von Calciumionen blaues Licht der Wellenlänge $\lambda = 470$ nm emittiert [79]. Das aus der Qualle isolierte GFP hat sein Hauptabsorptionsmaximum bei 395 nm und ein weiteres Absorptionsmaximum bei 470 nm. Nach Lichtabsorption emittiert es grünes Licht der Wellenlänge 509 nm. Hierbei hat es einen Schulterpeak bei 540 nm [79]. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten eGFP hingegen (siehe Abbildung 6) liegt das Absorptionsmaximum bei 488 nm, während das Emissionsspektrum bei 507 nm liegt.

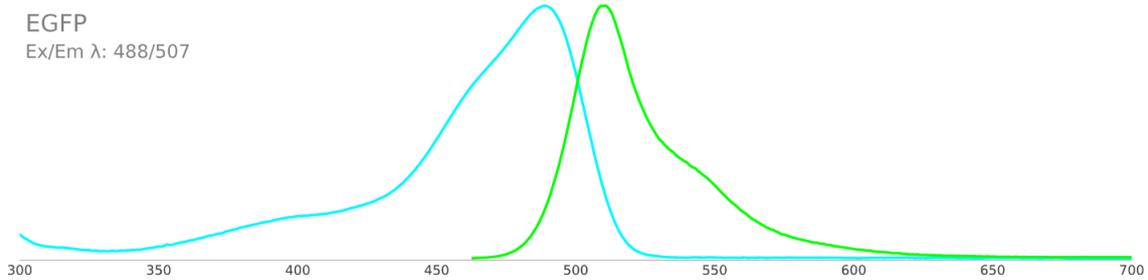


Abbildung 6: Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (grün) von eGFP [80]. Auf der x-Achse wurde die Wellenlänge in nm aufgetragen, während die y-Achse die relative Intensität darstellt.

Die zylindrische Struktur von GFP (siehe Abbildung 7) besteht aus einer α -Helix und elf β -Faltblättern, die die α -Helix umgeben. In der Mitte der α -Helix und damit im Zentrum des Zylinders befindet sich das Chromophor [81].

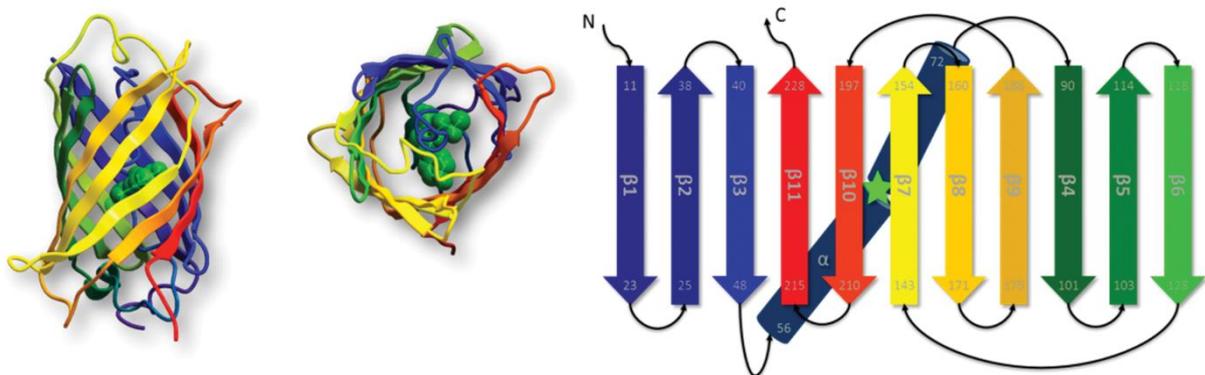


Abbildung 7: Durch Röntgenkristallographie bestimmte Tertiärstruktur von GFP (links) und Sekundärstruktur von GFP (rechts) [82].

Hierbei wird das Chromophor, ein 4-(p-Hydroxybenzyliden)-Imidazolidin-5-on, von den Aminosäuren Ser⁶⁵, Tyr⁶⁶ und Gly⁶⁷ in einem autokatalytischen Prozess, wie in Abbildung 8 dargestellt, gebildet [83].

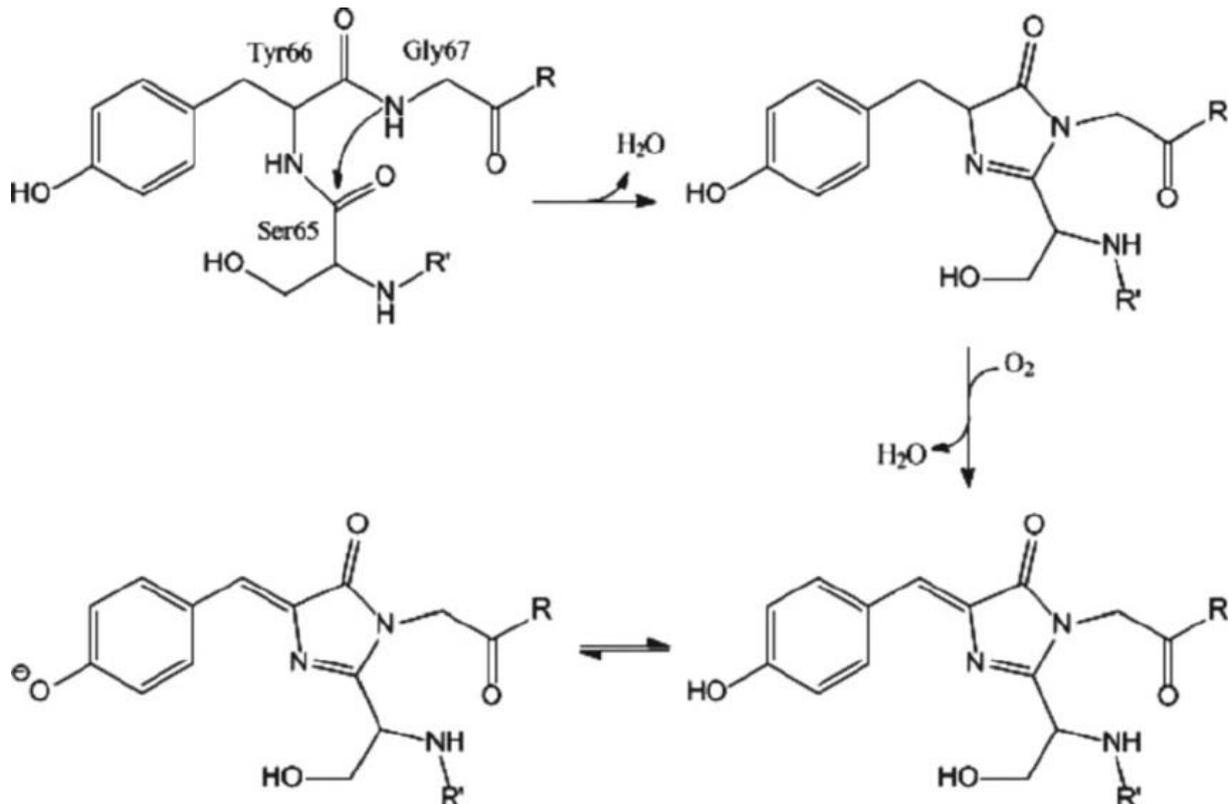


Abbildung 8: Reaktionsmechanismus der autokatalytischen Bildung der GFP Chromophore [84].

Für die Fluoreszenz von GFP sind somit weder exogene Substrate noch Kofaktoren erforderlich. Aufgrund seiner kompakten Struktur ist GFP sehr stabil. Weder Temperaturen bis 65 °C, noch pH-Werte von 5-12, Proteasen oder die meisten herkömmlichen Laborreagenzien können es verändern. Auch eine C- oder N-terminale Fusion mit anderen Proteinen mindert seine Fluoreszenz nicht [85]. Durch diese Vorteile ist die GFP-Expression sowohl ein geeignetes Maß für die Genexpression als auch für die Lokalisierung von Proteinen in lebenden Organismen [86].

Trotz dieser Vorteile hat GFP auch einige Nachteile, wie z. B. die relativ langsame Chromophorenbildung (ca. 2 h), die Bildung inaktiver Aggregate bei über 20 °C und die geringe Fluoreszenzintensität. Mittlerweile wurden viele verschiedene GFP Varianten (wie z. B. das eGFP) erstellt, die sich hauptsächlich in den zur Chromophorenbildung verwendeten Aminosäuren sowie deren Nachbaraminosäuren unterscheiden. Diese Varianten unterscheiden sich dann nicht nur in ihrer Leuchtkraft, sondern auch in ihren Anregungs- und Absorptionsspektren. Auch eine Anpassung an die *codon-usage* des Zielorganismus ist möglich [87].

Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, kann das Chromophor nur mit Hilfe von Sauerstoff gebildet werden. GFP fluoresziert also nur unter aeroben Versuchsbedingungen [87].

In saurem Medium wird GFP protoniert, wodurch es kein Licht mehr absorbieren kann und folglich auch nicht mehr fluoresziert [88]. Darüber hinaus ist GFP mit seiner Größe von 29,6 kDa ein relativ großes Protein, das aufgrund seiner Struktur kaum gekürzt werden kann. Es gibt Hinweise darauf, dass GFP zytotoxisch wirken kann, wodurch GFP-markierte Zellen im Laufe der Zeit eher zum Absterben neigen als unmarkierte Zellen [89]. Auch die Zelldifferenzierung von Stammzellen kann durch die Anwesenheit von GFP beeinflusst werden [90].

2.3.2 *Secreted alkaline phosphatase (SEAP)*

Alkalische Phosphatasen (AP) sind eine große Familie von Dimeren, die zu den Glykoproteinen gehören. Da sie membrangebunden sind, findet man sie größtenteils an den Zelloberflächen. Wie der Name sagt, dephosphorylieren diese Enzyme bei einem alkalischen pH-Wert diverse Moleküle, wie z. B. Proteine und Nukleotide. Genau genommen katalysieren sie diese Dephosphorylierung, das heißt sie hydrolysieren Phosphorsäureester zu Phosphat und Alkohole ($R-OPO_3^{2-} + H_2O \rightarrow R-OH + H^+ PO_4^{3-}$). In der Natur kommen sie sowohl in Prokaryoten, als auch in Eukaryoten und vielen Pflanzen vor [91].

Durch das Einfügen eines Stopcodons in die Sequenz für die Membranverankerung wurde das 513 Aminosäuren große Enzym auf 489 Aminosäuren verkürzt, wodurch seine Funktion jedoch nicht beeinträchtigt wird. Lediglich die Membranbindung wird unterbunden, wodurch das Enzym nun sekretiert werden kann. Diese veränderte Form ist unter dem Namen SEAP bekannt [92]. Heutzutage gehört SEAP zu den meist verwendeten sekretierten Reportern für *in vivo* Prozesse. Es kann nicht nur über einen langen Zeitraum (bis zu 4 Monate [93]) konstitutiv exprimiert, sondern auch effizient aus den Zellen freigesetzt werden. Experimente haben gezeigt, dass die im Zellkulturmedium gemessenen Änderungen der SEAP-Konzentration proportional zu den intrazellulären SEAP mRNA (*messenger* Ribonukleinsäure) Leveln sind [94]. Die Sekretion in das Zellkulturmedium ermöglicht eine einfache Detektion ohne nachteilige Auswirkungen auf die Zellen.

In Nagetieren, den häufigsten Versuchstieren, ist das menschliche SEAP immunogen, wodurch es schnell wieder abgebaut wird. Dieser Nachteil konnte behoben werden, indem die Immunogenität durch weitere Modifikationen herabgesetzt wurde [95, 96].

Einen weiteren limitierenden Faktor für *in vivo* Experimente stellt das hohe Molekulargewicht (64 kDa) von SEAP dar. Dadurch wird SEAP hauptsächlich in den Urin der Versuchstiere sekretiert und weniger in das Blut. Somit werden für einen SEAP Nachweis relativ große Mengen Blut benötigt [97]. Ein weiterer Nachteil ist das natürliche Vorkommen von APs in Tieren, wodurch es zu verfälschten Messergebnissen kommen kann. Im Vergleich zu natürlichen APs weist SEAP eine deutlich höhere Temperaturstabilität (bis zu 65 °C) auf und ist widerstandsfähiger gegen Phosphataseinhibitoren. Mit geeigneter Probenvorbereitung kann auch dieser Nachteil umgangen werden. Zusätzlich ist eine Reduzierung des Messhintergrunds möglich, was zu sensitiveren Messungen führt [94].

Der Nachweis von SEAP wird mit Hilfe eines kolorimetrischen Assays durchgeführt. Hierbei wird das farblose p-Nitrophenylphosphat (pNPP) durch die Alkaline Phosphatase aufgespalten. In einer alkalischen Lösung wird das Spaltprodukt dann zu dem gelben p-Nitrophenolat umgesetzt. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 9 dargestellt.

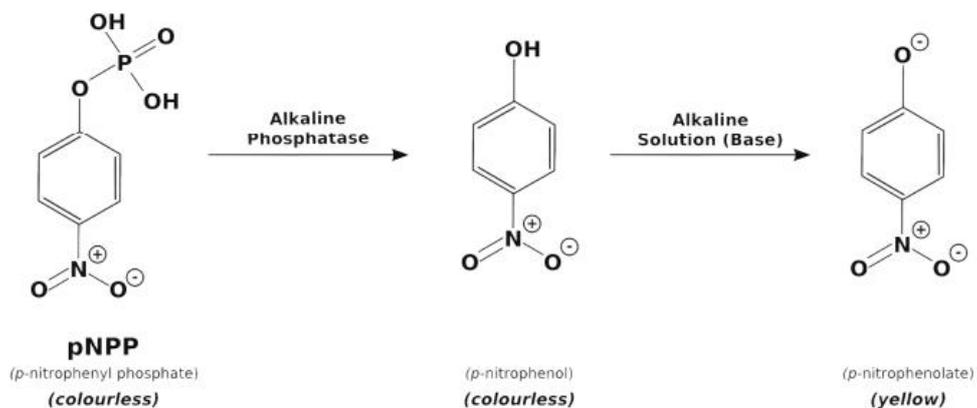


Abbildung 9: Nachweisreaktion von SEAP mit Hilfe von pNPP [98].

Durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 405 nm kann die Menge des gelben p-Nitrophenolats quantifiziert werden. Diese ist proportional zur SEAP Menge.

2.3.3 Firefly Luciferase

Die als *firefly* Luciferase bezeichnete Luciferase des Glühwürmchens *Photinus pyralis* ist ein Protein im Leuchtorgan des Insekts, das im Hinterleib lokalisiert ist. In der Natur

sendet ein Glühwürmchen damit Lichtblitze aus, die potentielle Partner anlocken sollen. Das 62 kDa große Enzym gehört zu den Oxygenasen [99]. Die Biolumineszenz des Enzyms entsteht in einer zweistufigen Reaktion, die sowohl ATP (Adenosintriphosphat) wie auch Sauerstoff benötigt. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 10 dargestellt.

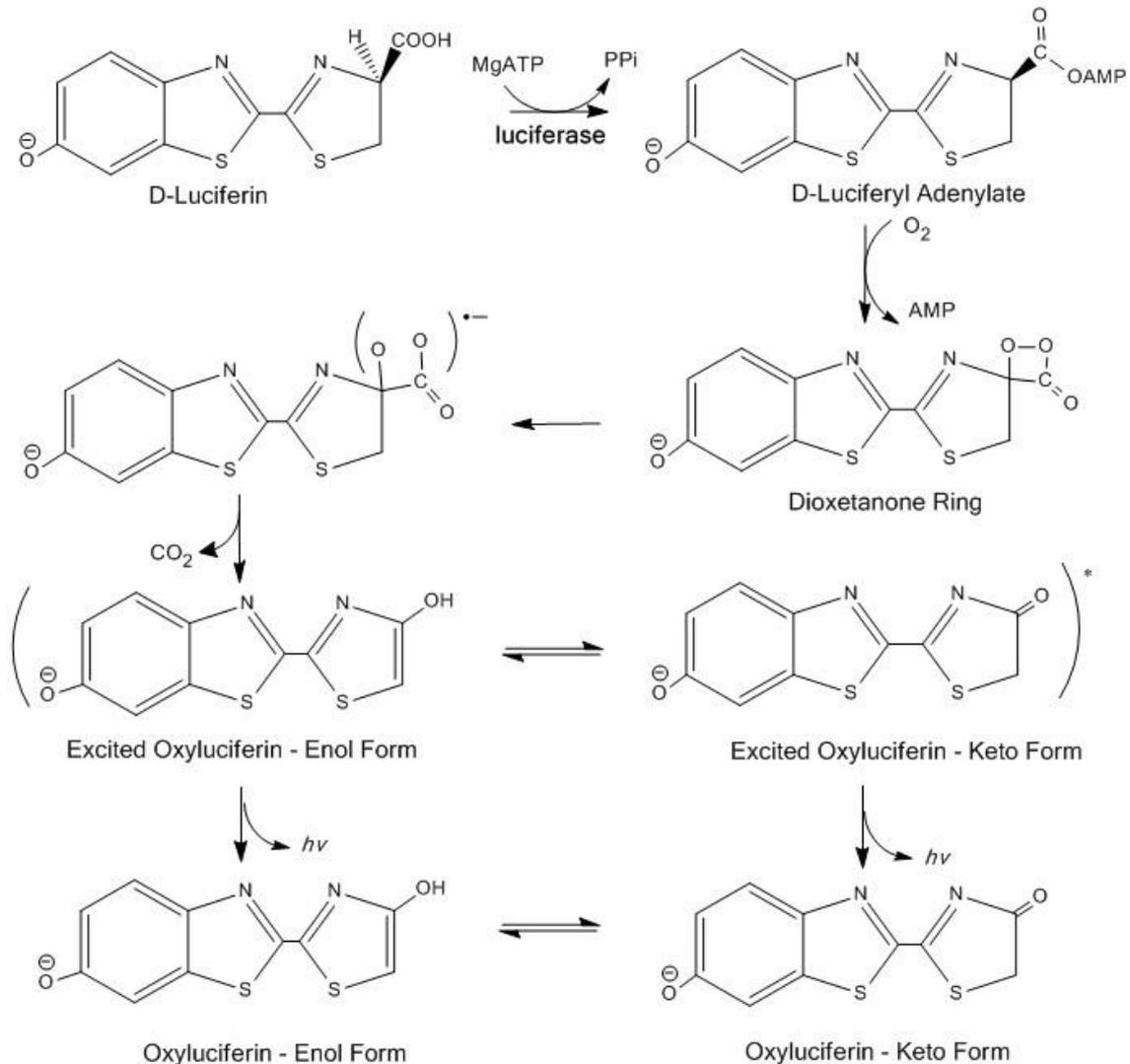


Abbildung 10: Reaktionsmechanismus der Biolumineszenz von *firefly* Luciferase [100].

Die entstehende Biolumineszenz hat ihr Maximum bei einer Wellenlänge von 562-570 nm [100]. Eine Besonderheit dieser Biolumineszenz ist die Tatsache, dass die Lumineszenz nach einem anfänglichen Lichtblitz relativ schnell wieder auf ein niedriges Niveau absinkt. *Firefly* Luciferase hat die höchste bekannte Quantenausbeute für eine Lumineszenzreaktion [101].

Die Sekundärstruktur von *firefly* Luciferase und die Lokalisierung ihrer Subdomänen in der Sequenz sind in Abbildung 11 dargestellt.

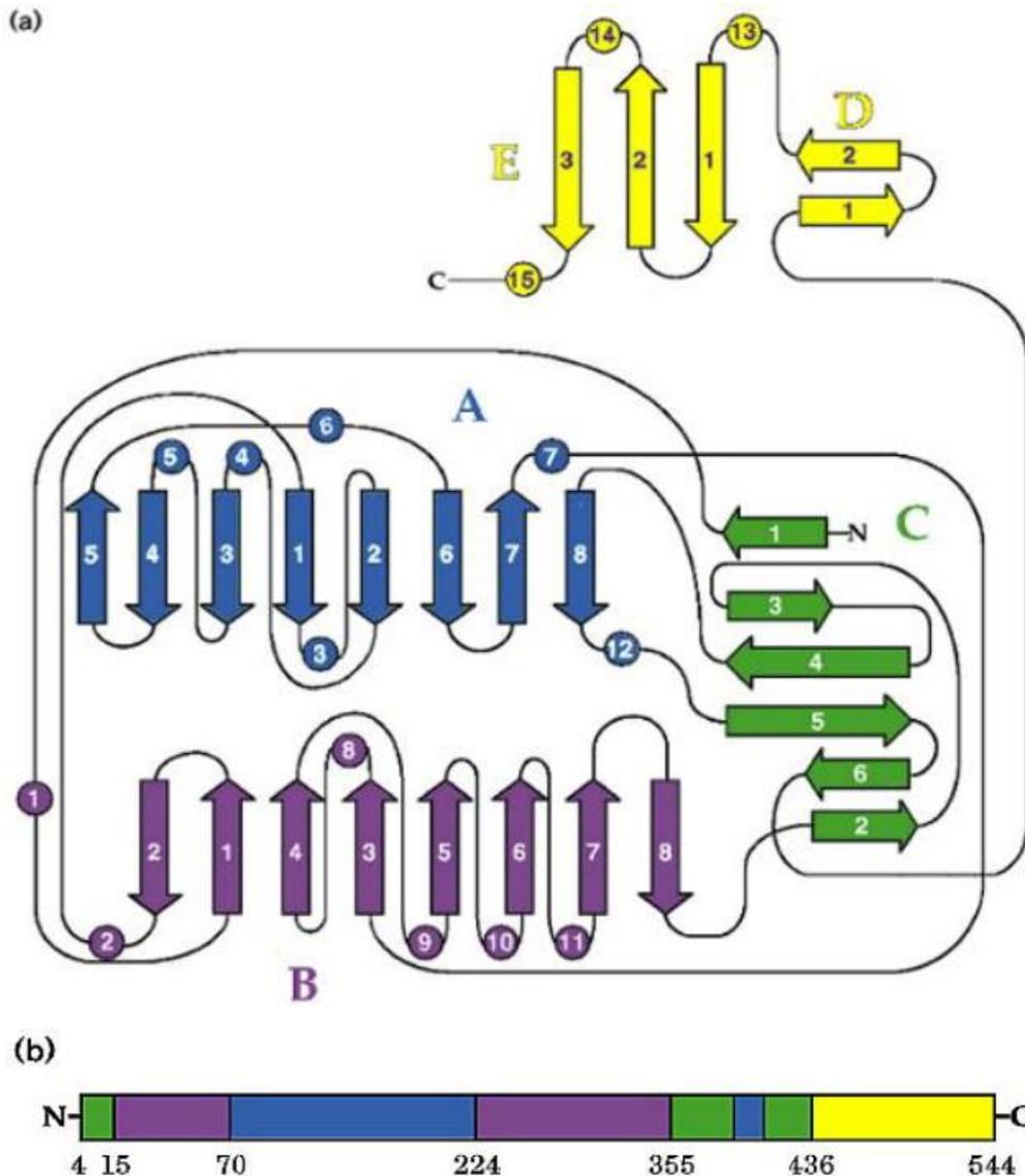


Abbildung 11: (a) Sekundärstruktur von *firefly* Luciferase mit eingefärbten Subdomänen. Die Kreise stellen die fortlaufend nummerierten α -Helices dar, während die Pfeile die β -Faltblätter darstellen, die für jede Subdomäne fortlaufend nummeriert wurden, (b) Schematische Zeichnung der Lage der Subdomänen in der Sequenz [102].

Das Enzym besteht aus zwei Haupt-Domänen, der N-terminalen Domäne (A-C: Aminosäuren 4-436) und der C-terminalen Domäne (D-E: Aminosäuren 440-544). Die N-terminale Domäne besteht aus einem β -Fass und zwei β -Faltblättern, die von α -Helices flankiert werden und so fünfschichtige $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ -Strukturen bilden. Die beiden β -Faltblätter liegen übereinander, wobei das β -Fass die Enden der Blätter bedeckt. Die

C-terminale Domäne hingegen besteht aus fünf β -Faltblättern und drei α -Helices, die zu einer kompakten Struktur gefaltet sind. Die C-terminale Domäne ist mit der N-terminalen Domäne durch eine ungeordnete Schleife (Aminosäuren 435 und 441) verbunden. In der Struktur sind noch drei weitere ungeordnete Schleifen vorhanden, eine in der C-terminalen Domäne (Aminosäuren 523 und 529) und zwei in der N-terminalen Domäne (Aminosäuren 198-204 und 355-359) [102]. Während einer Reaktion kommt es zu einer Konformationsänderung in der *firefly* Luciferase, bei der die beiden Domänen zusammenkommen und so das Substrat einschließen. Dadurch wird Wasser von der Reaktion ausgeschlossen, damit weder das ATP noch das Produkt, das sich im elektronisch angeregten Zustand befindet, hydrolysiert wird [102]. Die hohe Lumineszenzintensität sowie der schnelle (5 Minuten) und einfache Nachweis macht diese *firefly* Luciferase zu einem besonders guten Reporterprotein mit einer sehr niedrigen Nachweisgrenze. Der schnelle Abbau der *firefly* Luciferase hat sowohl Vor- als auch Nachteile. Einerseits ist der schnelle Abbau für genetische Reporter vorteilhaft, da man sowohl die Reaktionsdynamik, als auch die Reaktionskinetik gut beobachten kann. Andererseits muss die Auswertung des Assays zeitnah erfolgen und Langzeitmessungen sind problematisch. Neben der Analyse der Biolumineszenz besteht ebenfalls die Möglichkeit *firefly* Luciferase für einen ATP Nachweis zu verwenden. Auch hier ist die Enzymstabilität problematisch, wenn die *firefly* Luciferase als Reagenz in einem Nachweisassay verwendet wird. Mittlerweile gibt es modifizierte *firefly* Luciferasen, die eine deutlich höhere Stabilität aufweisen [103].

2.4 Zielprotein BDNF (brain-derived neurotropic factor)

Das seit den 1980er Jahren bekannte neurotrophe Protein BDNF gehört zur Familie der Nervenwachstumsfaktoren und besteht aus 119 Aminosäuren (13 kDa). Der Begriff neurotroph steht für seine überlebens- und wachstumsfördernden Wirkungen auf Neurone von Wirbeltieren [104]. Die Wirkung von BDNF resultiert aus einer Bindung an die Rezeptoren p75^{NGFR} (*nerve growth factor receptor*) und TrkB (*Track B*). Neben einer Förderung des Zellwachstums und -überlebens werden unter anderem auch die synaptische Übertragung sowie die Zellmigration und -differenzierung dadurch positiv beeinflusst [105]. Auch im Erwachsenenalter

beeinflusst BDNF diverse Gehirnfunktionen, wie z. B. das Gedächtnis, vor allem das Langzeitgedächtnis, und Lernprozesse [106, 107] oder Drogenabhängigkeit [108]. Zusätzlich wurden auch bei der Erforschung von verschiedenen Krankheiten Veränderungen in der BDNF-Expression nachgewiesen, was darauf schließen lässt, dass BDNF ein für die Forschung sehr interessantes Protein mit hoher therapeutischer Relevanz ist. Die wichtigsten dieser Krankheiten sind unter anderem Depressionen, Alzheimer, Bipolarität, Parkinson, Epilepsie oder die Huntington-Krankheit [109–112]. Je nach Krankheitsbild wurden sowohl zu hohe wie auch zu niedrige BDNF Level detektiert, was impliziert, dass eine genaue Dosierung wichtig ist. BDNF kommt jedoch nicht nur im Gehirn und bei Neuronen vor, sondern auch bei anderen Zelltypen. Es findet sich z. B. in verschiedenen Geweben, in Speichel und den Netzhäuten sowie der Niere und Prostata [113].

Das BDNF Protein wird von dem beim Menschen auf Chromosom 11 gelegenen Gen kodiert, das ebenfalls BDNF heißt [114]. Die Transkription von BDNF wird von acht verschiedenen Promotoren gesteuert und resultiert in unterschiedlichen Transkripten [115]. Das Vorläuferprotein von BDNF wird im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und wandert anschließend durch den Golgi-Apparat, bis es von den Vesikeln sekretiert wird. Danach wird es enzymatisch aufgespalten, wodurch BDNF entsteht [116]. Die Wirkung von BDNF resultiert aus einer Bindung an die Rezeptoren p75^{NGFR} und TrkB [105].

2.5 Verwendete Zellarten

Dieses Kapitel beschreibt die in dieser Arbeit verwendeten Zellarten.

2.5.1 Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO-K1)

Chinese Hamster Ovary Zellen sind eine immortalisierte Epithelzelllinie aus den Eierstöcken des chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*). Die K1 Variante ist ein Klon der CHO-Zelllinie die 1957 aus einem weiblichen chinesischen Hamster gewonnen wurde. Sie sind sowohl als adhärenente Zellen wie auch als Suspensionszellen erhältlich. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit adhärenenten CHO-K1 Zellen gearbeitet (siehe Abbildung 12).

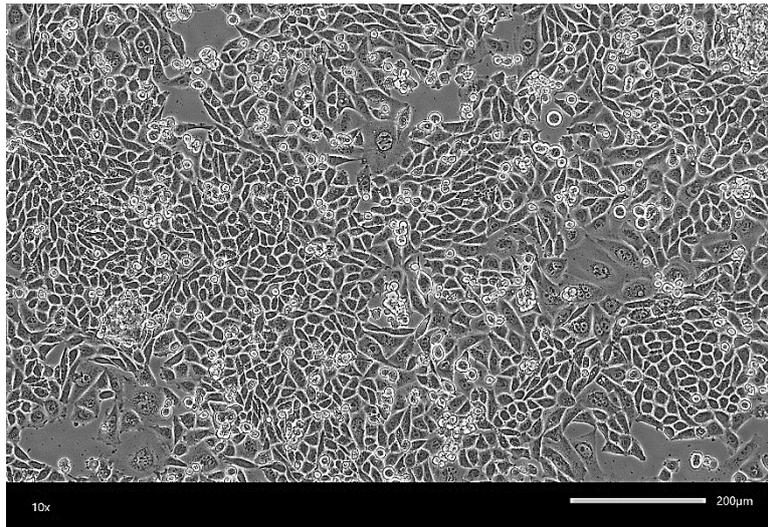


Abbildung 12: Durchlichtmikroskopische Aufnahme von CHO-K1 Zellen in 10-facher Vergrößerung.

Heutzutage werden ca. 65 % der rekombinanten Proteine, die als Arzneimittel verwendet werden, in Säugetierzellen hergestellt. Hierbei sind vor allem CHO-K1 Zellen, aber auch menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-293), die bevorzugten Zelllinien. Die Mehrheit der industriellen Kultivierungen verwendet Suspensionszellen, jedoch gibt es auch Konzepte, bei denen adhärenente Zellen Verwendung finden [117, 118]. CHO-K1 Zellen weisen im Vergleich zu anderen Zelllinien viele Vorteile für die Herstellung auf. Zum einen gibt es sie sowohl als Suspensionszellen wie auch als adhärenente Zellen. Darüber hinaus sind sowohl die Zellen, als auch die Transfektionsmethoden und die Genamplifikation, gut charakterisiert. Zum anderen sind sie schon lange behördlich für die rekombinante Proteinexpression zugelassen. Zusätzlich ist es besonders wichtig, dass diese Zellen humanverträgliche posttranslationale Modifikationen (z. B. Glykosylierung) durchführen, wodurch sowohl die therapeutische Wirksamkeit als auch die Langlebigkeit der Proteine verbessert und Sicherheitsbedenken verringert werden [119]. Heutige Produktionsverfahren sind technisch so ausgereift, dass Ausbeuten von mehreren Gramm Protein pro Liter erreicht werden können [118].

2.5.2 Human Embryonal Kidney Zellen (HEK-293)

Bei HEK Zellen handelt es sich um eine immortalisierte adhärenente Epithelzelllinie aus der menschlichen embryonalen Niere, die das erste Mal in den 1970er erwähnt wurde. Die Zahl 293 steht für die Experimentnummer des Autors dieser ersten Publikation. Hierbei wurden die HEK Zellen mit Bruchstücken vom menschlichen Adenovirus 5 transfiziert [120]. Abbildung 13 zeigt die verwendeten HEK-293 Zellen.

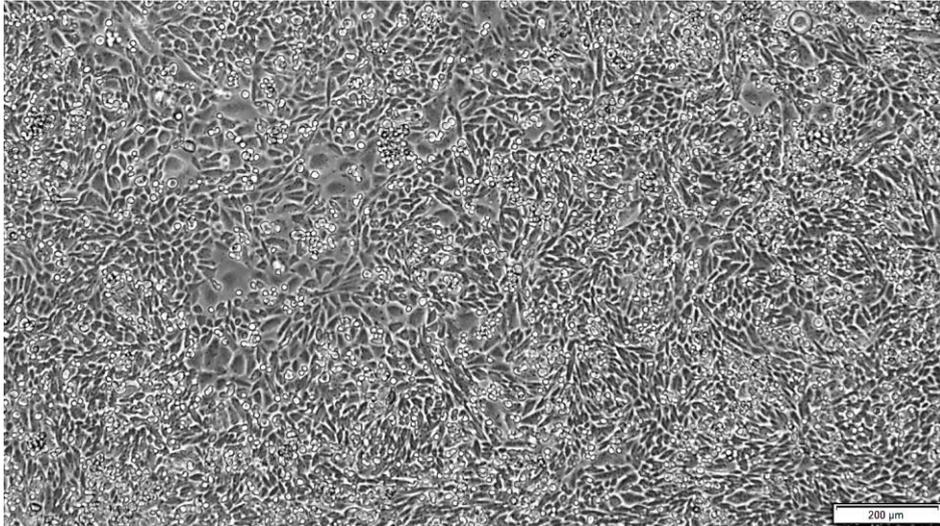


Abbildung 13: Durchlichtmikroskopische Aufnahme von HEK-293 Zellen in 4-facher Vergrößerung.

In der Zellbiologie finden HEK-293 Zellen aufgrund ihrer relativ simplen Handhabung, ihres guten Wachstums und ihrer einfachen Transfizierbarkeit häufig Verwendung. Einerseits werden HEK-293 Zellen für die Expression von rekombinanten Proteinen verwendet, andererseits finden sie auch bei der transienten Expression von Antikörpern [121] sowie der Virus- und Impfstoffproduktion Anwendung [122].

2.5.3 Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs)

Im *Tissue Engineering* sowie bei zellbasierten medizinischen Therapien werden häufig bevorzugt Stammzellen eingesetzt, da sie die Fähigkeit besitzen, sich in diverse Zelllinien zu differenzieren. Die aus Gewebe gewonnenen mesenchymalen Stammzellen (MSCs) haben im Vergleich zu Stammzellen anderer Herkunft einige Vorteile. Zum einen werden Sicherheitsbedenken verringert, da die Gefahr der Tumorbildung bei Patienten durch embryonale oder induzierte pluripotente

Stammzellen nicht gegeben ist. Zum anderen fallen auch ethische Bedenken weg, die z. B. bei der Entnahme von menschlichen Embryonen entstehen [123, 124]. Ein weiterer Vorteil besteht in der Tatsache, dass patienteneigene Zellen keine Immunreaktion auslösen, die für eine Abstoßung von Implantaten und Organen verantwortlich sind [125].

Die häufigsten Quellen für hMSCs sind das Fettgewebe sowie das Knochenmark. In Fettgewebe, das z. B. durch Fettabsaugungen gewonnen werden kann, befinden sich ca. 2 % hMSCs, während Knochenmark nur ca. 0,001-0,004 % hMSCs aufweist. Pro Patiententnahme wird darüber hinaus in der Regel mehr Fettgewebe gewonnen als Knochenmark. Dies macht Fettgewebe zu einer guten Quelle für hMSCs [126]. Ein Nachteil der Verwendung von hMSCs aus Fettgewebe ist die Tatsache, dass sie eine höhere Wahrscheinlichkeit als Knochenmark hMSCs haben sich wieder in Fettgewebe zu differenzieren. Für therapeutische Applikationen, vor allem im Innenohr, erweist sich dies als nachteilig [127]. In hMSCs, die aus Knochenmark isoliert wurden, werden deutlich mehr Zytokine exprimiert, die eine wichtige Rolle im Stammzell-*homing* spielen, als in hMSCs aus Fettgewebe [128]. Das Stammzell-*homing* ist ein wichtiger Prozess für therapeutischen Anwendungen, da es die Anlagerung der Stammzellen an eine bestimmte Stelle des Gewebes bezeichnet. Für therapeutische Anwendungen ist es essentiell, dass die Stammzellen auch dort anwachsen, wohin sie platziert wurden [129].

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit hMSCs, die aus Fettgewebe isoliert wurden, gearbeitet (siehe Abbildung 14). Aus Gründen der Einfachheit werden sie im weiteren Verlauf nur als ADhMSCs (*adipose tissue derived mesenchymal stem cells*) betitelt.

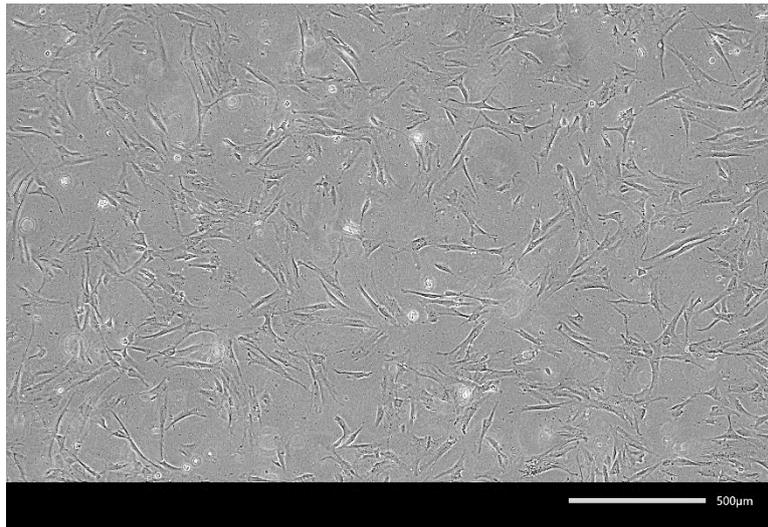


Abbildung 14: Durchlichtmikroskopische Aufnahme von ADhMSCs Zellen in 4-facher Vergrößerung.

Für eine Identifizierung von mesenchymalen Stammzellen wurden drei Kriterien definiert, die mindestens erfüllt sein müssen, damit man offiziell von Stammzellen sprechen kann.

Als erstes müssen sie unter standardmäßigen Zellkulturbedingungen adhärent wachsen. Die zweite Bedingung ist die Expression der Oberflächenmarker CD105 (*cluster of differentiation*), CD73 und CD90, während die Oberflächenmarker CD45, CD34, CD14 sowie CD11b, CD79a, CD19 und HLA-DR nicht exprimiert werden dürfen. Zusätzlich müssen sie in Osteoblasten (Knochenzellen), Adipozyten (Fettzellen) und Chondrozyten (Knorpelzellen) differenzieren können [130]. Meistens exprimieren hMSCs darüber hinaus auch die Oberflächenmarker CD13, CD29, CD44 und CD10 [131]. Unter besonderen Kultivierungsbedingungen ist es möglich hMSCs, die aus Fettgewebe isoliert wurden, auch in Myozyten (Muskelzellen), neuronale Zellen, Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen), Hepatozyten (Leberzellen) sowie Pankreaszellen (Bauchspeicheldrüsenzellen) und Endothelzellen (Blutgefäße) zu differenzieren [132]. Damit eine Stammzelldifferenzierung induziert und aufrechterhalten werden kann sind spezifische Kulturbedingungen und Signalmoleküle erforderlich [133]. Diese Vielseitigkeit zeigt sich in vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von hMSCs aus Fettgewebe.

Gewebeläsionen sind oft von Entzündungen begleitet, die chemotaktische Botenstoffe aussenden. Diese mobilisieren MSCs und leiten sie gezielt zu den geschädigten Stellen. Dort angekommen bereiten sie eine Mikroumgebung durch die Freisetzung

von Wachstumsfaktoren vor, die die Entzündung beeinflussen [134]. Diese Erkenntnisse führten in den letzten Jahren zu diversen Therapieansätzen. So wurde Meerschweinchen hMSCs aus Fettgewebe in die Cochlea transplantiert, um durch die Expression von Wachstumsfaktoren akustische Trauma zu behandeln [135]. Zur Wiederherstellung des Gehörs bei Mäusen nutzte man die parakrine Aktivität von hMSCs. hMSCs bewirken eine Verringerung der Proliferation antigenspezifischer T-Zellen, indem sie die Produktion eines entzündungshemmenden Zytokins induzieren [136]. In einer Studie an Meerschweinchen wurde festgestellt, dass die Fähigkeit von autologen hMSCs aus Fettgewebe zur Differenzierung in neuronenähnliche Zellen eine gute zellbasierte regenerative Methode darstellt [137].

2.6 Transfektion von MSCs

Die Transfektion von MSCs für therapeutische Anwendungen ist sehr komplex, da die Transfektionseffizienz bei Primärzellen, insbesondere bei Stammzellen, in der Regel nicht so hoch ist wie bei Zelllinien [138–140]. Die wichtigsten Kriterien für eine Transfektion von Stammzellen für therapeutische Anwendungen sind eine hohe Effizienz bei einem möglichst geringen Risiko für den Patienten. Einige Transfektionsmethoden für MSCs stehen im Verdacht, die Zellbiologie (z. B. Proliferation oder Differenzierung) nachhaltig zu beeinträchtigen, was einen gewaltigen Nachteil in Hinblick auf therapeutische Applikationen darstellt [141]. Zusätzlich gibt es auch Transfektionsmethoden (vor allem virale Methoden) die ein Sicherheitsrisiko für den Patienten darstellen, da sie toxisch oder kanzerogen wirken sowie Immunogenität hervorrufen können [142–144].

In dem nachfolgenden Kapitel werden einige der relevantesten physikalischen, chemischen und viralen Methoden für die Transfektion von MSCs erläutert.

2.6.1 Physikalische Transfektionsmethoden

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Nukleinsäuren mit Hilfe diverser physikalischer Transfektionsmethoden erfolgreich in MSCs eingebracht werden konnten. Sie nutzen physikalische Kräfte (wie z. B. elektrische und magnetische Felder, Ultraschall oder Laser) um die Zellmembran zu durchdringen und so die

Nukleinsäuren in die Zellen einzubringen. Zu diesen physikalischen Transfektionsmethoden gehören unter anderem die Elektroporation, die Sonoporation und die Magnetoporation sowie die Nukleofektion. Vorteile dieser Methoden sind, dass die meistens nicht toxisch sind und nicht-invasiv angewendet werden können. In den letzten Jahren stieg die Relevanz der Transfektionen mit Hilfe von Nanomaterialien enorm und ergänzt nun das Portfolio physikalischer Transfektionsmethoden.

2.6.1.1 Elektroporation

Die Elektroporation wurde 1982 von Neumann [145] entwickelt und verändert die Permeabilität der Zellmembran durch ein elektrisches Feld (siehe Abbildung 15).

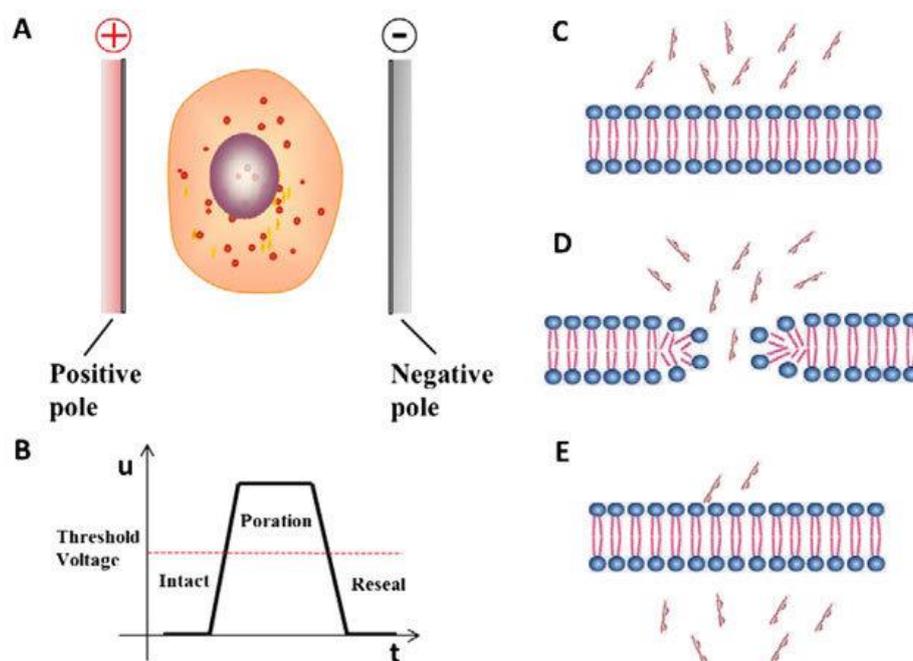


Abbildung 15: Prinzip der Elektroporation [146].

Die Permeabilität der Zellmembran ist abhängig von der Stärke und Dauer des elektrischen Felds. Für die Transfektion von Nukleinsäuren werden reversible Poren erzeugt, die sich nach dem Gentransfer wieder schließen [147]. Bei der Elektroporation wird eine lebende Zelle einem elektrischen Feld ausgesetzt (Abbildung 15A), wodurch sich transiente Poren in der Zellmembran bilden. Durch diese werden die Nukleinsäuren in die Zelle eingeschleust (Abbildung 15D). Nach Beendigung des elektrischen Pulses wird die Zellmembran innerhalb weniger Minuten wieder versiegelt (Abbildung 15E) [146].

Die Elektroporation wird bereits seit einigen Jahren erfolgreich für die *in vitro* Transfektion von MSCs eingesetzt [90, 148–150]. Trotzdem ist diese Methode auch mit Nachteilen behaftet, denn während der Elektroporation werden die Zellen stark in Mitleidenschaft gezogen, was in einer geringen Zellviabilität der MSCs resultiert. Zusätzlich variiert die Transfektionseffizienz abhängig vom Zelltyp, der Dauer und Stärke des elektrischen Pulses [146].

2.6.1.2 Magnetoporation

Bei der Magnetoporation wird die Permeabilität der Zellmembran mit Hilfe eines magnetischen Felds verändert (siehe Abbildung 16).

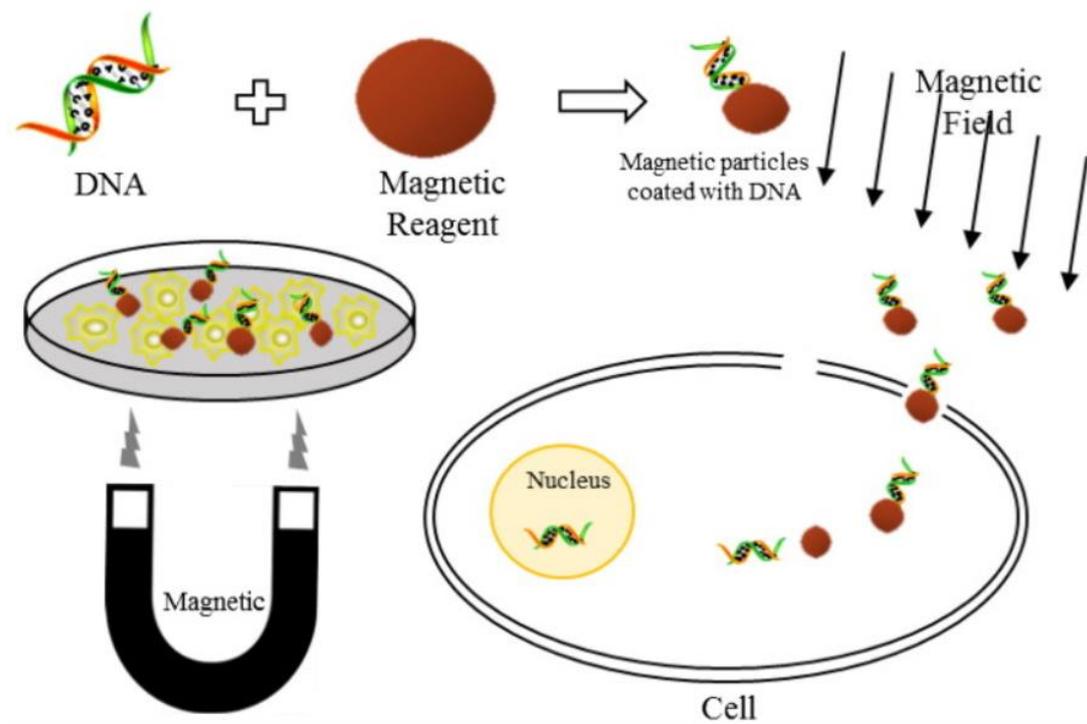


Abbildung 16: Prinzip der Magnetoporation [146].

Hierbei werden die Nukleinsäuren mit einem Magnetofektionsreagenz vermischt, wodurch ein Biomolekül/Magnetreagenz-Komplex entsteht. Durch ein Magnetfeld wird dieser Komplex dann in die Zellen eingebracht. Nicht einig sind sich die Wissenschaftler darüber, ob das Prinzip der Magnetoporation auf dem Prinzip der Elektroporation beruht. Sie gehen davon aus, dass das Magnetfeld ein elektrisches Feld induziert [151]. Die Magnetofektionsreagenzien CoFe_2O_4 , NiFe_2O_4 und MnFe_2O_4 führen zu höheren Transfektionseffizienzen als andere Magnetofektionsreagenzien [152, 153]. Jedoch sind diese Reagenzien hoch toxisch, was ihre Anwendung für

therapeutische Applikationen erheblich einschränkt. Geeigneter sind Eisenoxide (Fe_3O_4 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), da sie eine geringe Toxizität aufweisen und biokompatibel sind [154]. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer Kombination aus Magnetoporation und Nanomaterialien, die bereits in MSCs verwendet wurde [155, 156].

2.6.1.3 Sonoporation

Die Sonoporation verwendet Ultraschall (500 MHz) um die Zellmembran zu perforieren (siehe Abbildung 17).

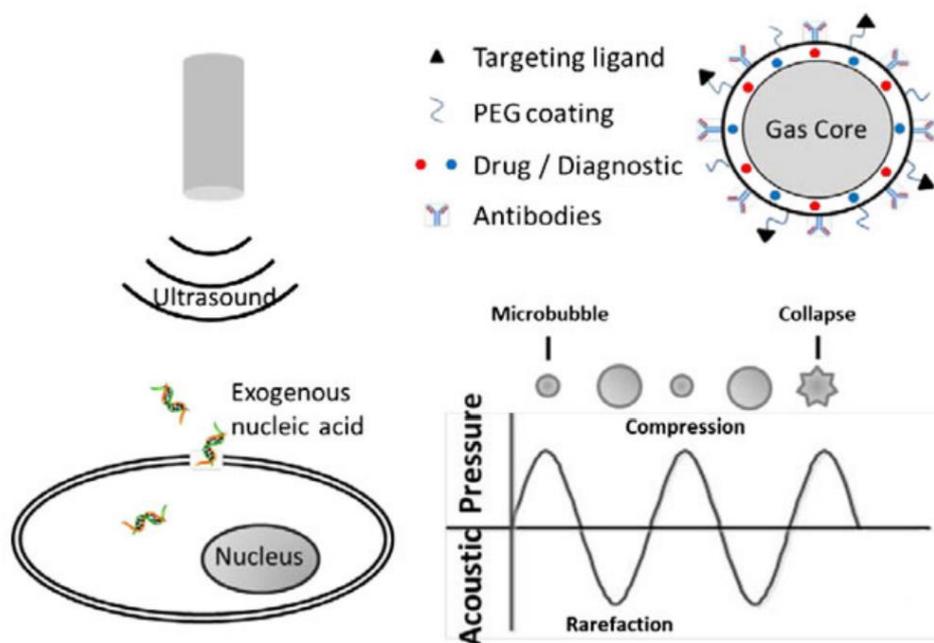


Abbildung 17: Prinzip der Sonoporation [146].

Die Sonoporation hat eine geringere Transfektionseffizienz als die Elektroporation [157]. Deswegen wird die Sonoporation vermehrt in Kombination mit Nanomaterialien verwendet, um so die Transfektionseffizienz zu erhöhen [158]. Die Transfektionseffizienz der Sonoporation hängt von mehreren Faktoren ab, darunter die Frequenz und Intensität der Ultraschallwelle sowie der Ultraschalldruck und die Expositionsdauer [159, 160].

Auch diese Transfektionsmethode wurde bereits für die Transfektion von MSCs erfolgreich *in vitro* etabliert [161, 162].

2.6.1.4 Nukleofektion

Die Transfektionsmethode der Nukleofektion basiert auf der Elektroporation. Hierbei wird die zu transfizierende DNA mit Hilfe eines Nukleofektors direkt in den Zellkern eingebracht. Der Nukleofektor erzeugt eine elektrische Spannung, die wie bei der Elektroporation Poren in der Zellmembran erzeugt. Anders als bei der Elektroporation werden zusätzlich noch zelltyp-spezifische Reagenzien verwendet, die die DNA direkt in den Zellkern einbringen. Dadurch können auch nicht teilende Zellen transfiziert werden [163].

Es konnte gezeigt werden, dass durch Nukleofektion sowohl eine transiente als auch eine stabile Genexpression in Stammzellen aus Fettgewebe möglich ist, ohne ihr Differenzierungspotenzial zu beeinträchtigen [163, 164]. Gleichzeitig können mit Hilfe von Nukleofektion Transfektionseffizienzen von ca. 74% erreicht werden [142], was die meisten anderen non-viralen Transfektionsmethoden übertrifft.

2.6.2 Transfektion mit Hilfe von Nanomaterialien

Für eine Transfektion mit Hilfe von porösen Nanomaterialien werden die Nanopartikel zuerst mit der zu transfizierenden DNA beladen. An der Zellmembran werden die Nanopartikel in Vesikel eingeschlossen und ins Zellinnere transportiert (Endozytose). Aufgrund des erhöhten osmotischen Drucks reißt der Vesikel auf und setzt die Nanopartikel samt DNA im Zellinneren frei [165].

Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Nanomaterialien, die für die Transfektion eingesetzt werden können. Auch mesenchymale Stammzellen wurden bereits erfolgreich unter anderem mit Hilfe von Calcium-Phosphat Nanopartikeln [165, 166], Silica Nanopartikeln [167, 168], Nanohydroxyapatit Nanopartikeln [169] und Eisenoxid Nanopartikeln [170] transfiziert.

Obwohl die meisten Nanomaterialien nur eine geringere Toxizität aufweisen, gibt es Nachteile. Einige Nanomaterialien haben nur eine schlechte Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit, was den Nutzen von Nanomaterialien für klinische Anwendungen einschränkt [171].

2.6.3 Chemische Transfektionsmethoden

Chemische Transfektionsmethoden sind relativ einfach in der Handhabung, erfordern keine besondere Ausrüstung und sind meist kostengünstig. Allerdings erzielen diese Methoden oft relativ niedrige Transfektionseffizienzen bei Primärzellen, wie z. B. MSCs. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass diese Reagenzien zytotoxisch auf die Zellen wirken können, wodurch ihre Anwendung für klinische Anwendungen eingeschränkt sein kann [172]. Bei chemisch basierten Transfektionstechniken werden hauptsächlich kationische Lipide und Polymere verwendet [173].

2.6.3.1 Kationische Lipide

Die Grundstruktur von kationischen Lipiden besteht aus einer positiv geladenen Gruppe und ein bis zwei Kohlenwasserstoffketten. Die positiv geladene Gruppe bindet an das Phosphatgerüst der Nukleinsäure. Häufig befindet sich in einem Transfektionsreagenz neben dem kationischen Lipid auch noch ein zweites neutrales Lipid, wodurch eine außen positiv geladene liposomale Struktur entsteht. Diese erlaubt die Fusion der liposomalen Struktur mit der negativ geladenen Zellmembran. Durch Endozytose gelangt sie anschließend in die Zelle, wo die DNA im Zellinneren freigesetzt wird [174] (siehe Abbildung 18).

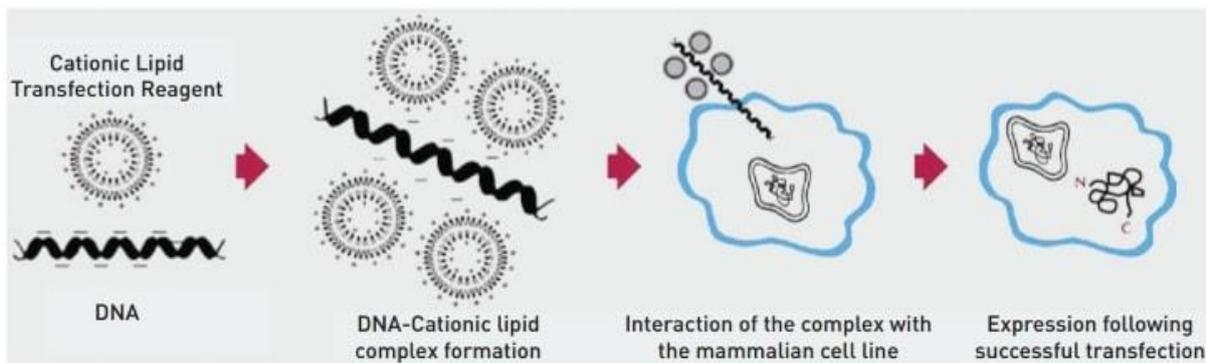


Abbildung 18: Mechanismus der Transfektion mit kationischen Lipiden [174].

Es gibt eine große Anzahl an Transfektionsreagenzien, die auf kationischen Lipiden beruhen. In MSCs können hiermit Transfektionseffizienzen von ungefähr 20-40 % erreicht werden [175–177].

Zur Verbesserung der Transfektionseffizienz wurden mit DNA beladene Nanopartikel mit kationischen Lipiden, wie PEI, beschichtet. Die Beschichtung soll die Bindung an

die Zellmembran verbessern, wodurch auch die Aufnahme der DNA in die Zelle verbessert wird [178].

2.6.3.2 Kationische Polymere

Analog zu kationischen Lipiden bilden auch kationische Polymere einen Komplex mit der DNA, der anschließend endozytiert und die DNA im Zytoplasma freisetzt [179]. Eines der bekanntesten und meist verwendeten kationischen Polymere ist PEI [180].

2.6.4 Virale Transfektionsmethoden

Virale Transfektionsmethoden nutzen die natürlichen und sehr effizienten Mechanismen von Viren, um Nukleinsäuren zu kondensieren und ihren Transport sowie ihre Expression in den Zielzellen zu vermitteln. Die Viren dienen somit als Vehikel für die Nukleinsäuren. Im Allgemeinen können diese Vehikel durch Hinzufügen exogener Gene und Entfernen schädlicher viraler Gene so verändert werden, dass sie eine geringe Pathogenität aufweisen [181]. Virale Transfektionen sind in der Regel hocheffizient, sind aber durch Sicherheitsprobleme, einschließlich der Insertionsmutagenität, für therapeutische Applikationen nur eingeschränkt nutzbar. So führte ein klinischer Versuch, bei dem Stammzellen vor der Transplantation mit einem Retrovirus genetisch verändert wurden aufgrund einer mutagenen Insertionstransformation bei vier Patienten zur Entwicklung von Leukämie [182]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass virale Transfektionsmethoden die Risiken für die Tumorentstehung erhöhen. Selbst bei Viren, die sich nicht in das Genom integrieren bestehen weiterhin Sicherheitsrisiken, denn *in vivo* kann eine virale Transfektion Immunreaktionen auslösen [183, 184]. Darüber hinaus sind virale Systeme durch die relativ geringe Kapazität an Nukleinsäuren und die Schwierigkeiten bei der Produktion, vor allem in großem Maßstab, nur eingeschränkt für therapeutische Applikationen nutzbar [185]. Sicherheitsrisiken und Probleme bei der Herstellung sind der Grund für die Entwicklung von Methoden zur effizienten nichtviralen Genübertragung auf hMSCs. Nichtvirale Transfektionsmethoden sind sicherer als virale Methoden, skalierbarer und flexibler, aber auch weniger effizient und können ebenfalls toxisch sein, insbesondere bei hMSCs.

Bislang gibt es mehrere präklinische Studien gentechnisch veränderter Viren als Vehikel für den Gentransfer von mesenchymalen Stammzellen. Hierbei wurden Adenoviren [186–188], Lentiviren [189–191] sowie Adeno-assoziierte Viren [192–194] verwendet.

2.7 CIs (Cochleaimplantate)

Ein CI ist ein implantiertes elektronisches Hörgerät, das durch eine elektrische Stimulation der Nerven im Innenohr von Patienten Höreindrücke erzeugt. Abbildung 19 zeigt wie ein implantiertes CI im Innenohr platziert ist.

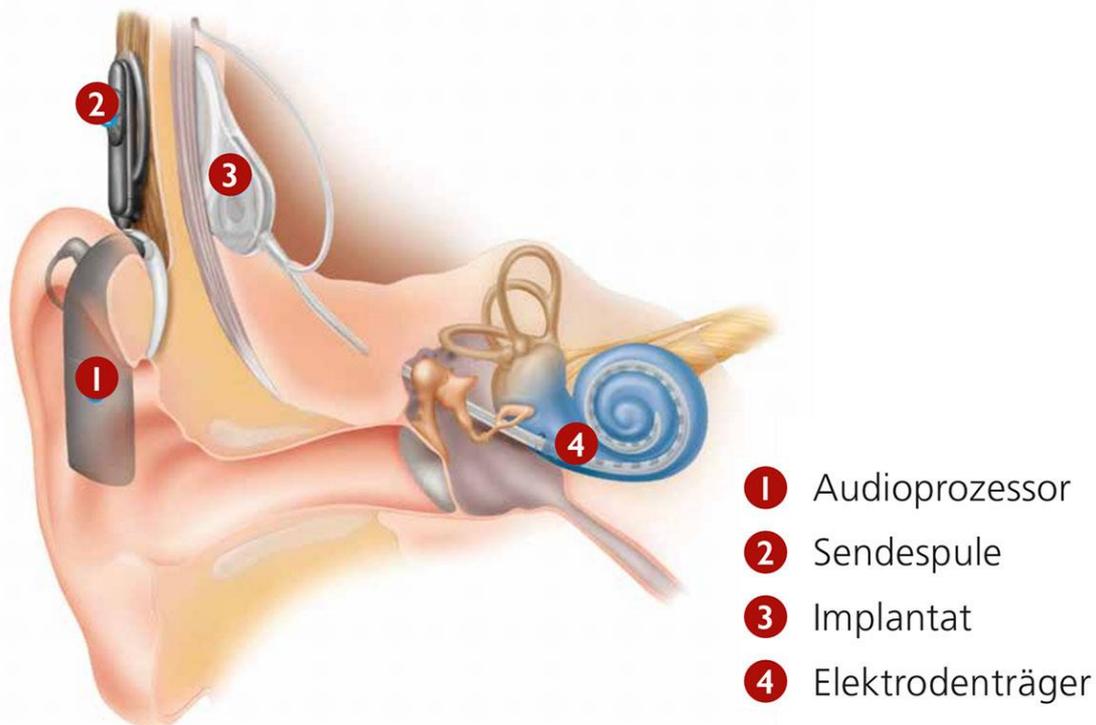


Abbildung 19: Abbildung eines CI im Innenohr [195].

In der Regel bestehen CIs aus vier Hauptkomponenten, einem Audioprozessor, einer Sendespule, dem Implantat und dem Elektrodenträger. Der Audioprozessor, der wie ein Hörgerät hinter dem Ohr getragen wird, nimmt die akustischen Signale auf und wandelt sie in ein Muster aus elektrischen Signalen um. Diese werden von der Sendespule (magnetisch außen am Kopf befestigt) an die Empfängerspule des Implantats (unter der Haut) gesendet. Diese elektrischen Signale werden weiter an den Elektrodenträger (in der Cochlea) geleitet, wo die Elektroden die Hörnerven elektrisch stimulieren. Diese Stimulation ist anders, als bei dem herkömmlichen

Hörvorgang, sodass das Gehirn die Verarbeitung dieser Höreindrücke neu lernen muss [196–198].

Bereits 1957 gab es die erste Publikation in der die Auswirkungen einer direkten Stimulation des Hörnervs eines tauben Patienten beschrieben wurden [199]. In den 1960er Jahren entwickelten mehrere unabhängige Forschergruppen bereits erste Prototypen von CIs [200, 201]. Erst 1977 wurde die Skepsis der Wissenschaftler gegenüber dieser neuartigen Technologie zerstreut. Nachdem die WHO (Weltgesundheitsorganisation) einen Bericht veröffentlichte, indem die positiven Effekte von Einkanalelektroden Implantaten auf taube Patienten verifiziert und gleichzeitig deren Risiko als gering bewertet wurde, folgten rasche Entwicklungsschritte. [202]. 1978 wurde das erste mehrkanalige Implantat entwickelt [203]. 1984 erfolgte die erste Zulassung eines einkanaligen CIs für Erwachsene [200]. Die einkanaligen Implantate wurden wenig später durch mehrkanalige Varianten ersetzt, da diese zu einer deutlich besseren räumlichen Wahrnehmung sowie zu einem verbesserten Sprachverständnis führten.

Laut der *U.S. Food and Drug Administration* wurden bis 2020 bereits mehr als 700.000 CIs weltweit erfolgreich implantiert. Eine Cochleaimplantation ist mittlerweile die Standardbehandlung bei schwerem bis vollständigem Hörverlust [204].

2.8 Therapeutische Anwendungen

Um Krankheiten zu heilen und optogenetische Implantate für Patienten zu entwickeln, sind die Anforderungen an die optogenetischen Werkzeuge deutlich höher, als bei *in vitro* Experimenten. *In vitro* Zellkulturen sind meist zweidimensional und basieren in der Regel auf einem einzigen Zelltyp der einfach zu handhaben ist, immortalisiert ist und eine stark veränderte und unphysiologische, krebszellähnliche Funktion hat. Lebende Organismen hingegen sind sehr komplex und bestehen aus verschiedenen Zelltypen und Regulationswegen. Daher sind *in vitro* Experimente nicht direkt auf *in vivo* Experimente oder klinische Situationen übertragbar, und selbst Tiermodelle können eine andere Biokinetik aufweisen als der Mensch [205].

2.8.1 Übertragung von *in vitro* durchgeführten optogenetischen Experimenten auf klinische Anwendungen

Im Hinblick auf klinische Anwendungen für optogenetische Genexpressionssysteme sind mehrere Faktoren zu berücksichtigen. Nachfolgend werden die wichtigsten Hindernisse erörtert.

(i) Größe der Plasmide: Optogenetische Systeme für die Genexpression setzen sich in der Regel aus verschiedenen Genen für die optogenetischen Proteine zusammen. Die Expression der lichtempfindlichen Elemente muss von einem Promotor gesteuert werden und die entsprechende RNA sollte eine Terminator-Sequenz enthalten. Das betreffende Gen sollte vorne ein Bindungsmotiv aufweisen, um die Genexpression zu initiieren und hinten eine Terminator-Sequenz, um die Erzeugung der RNA zu beenden. In der Regel umfassen die optogenetischen Systeme etwa 5 bis 6 kb an genomischer Information.

(ii) Regulatorische Elemente: Ein sehr wichtiger Bestandteil der optogenetischen Systeme ist der gewählte Promotor. Nicht alle Promotoren weisen in jedem Zelltyp eine hohe Genexpressionsrate auf [206]. Außerdem können Promotoren durch Methylierung der transfizierten DNA im Laufe der Zeit deaktiviert werden, wenn sie im falschen Zelltyp verwendet werden [207]. Dadurch wird die Proteinproduktivität eingeschränkt. In klinischen Anwendungen kann das sogenannte langsam fortschreitende *Silencing* selektiv genutzt werden, um ein optogenetisches System mit der Zeit zu deaktivieren. Dies könnte für Zelltherapien von Vorteil sein, bei denen eine vorübergehend regulierte Gen- und Proteinexpression entscheidend ist, wobei die Zellen über einen begrenzten Zeitraum optogenetisch aktiviert werden (z. B. bei klinischen Anwendungen mit Zellen, die Implantate umgeben, um die Heilungsphase zu optimieren). Andererseits ermöglicht die Wahl des Promotors auch eine Fokussierung auf bestimmte Zelltypen, während andere ausgelassen werden. Daher sollte der Promotor an den verwendeten Zelltyp und die Anwendung angepasst werden. Die gleiche Sorgfalt sollte bei der Auswahl des Transkriptionsfaktors angewendet werden. Es ist gut dokumentiert, dass übermäßige Genexpressionsraten vermieden werden sollten, da eine hohe Proteinexpression die Zellgesundheit beeinträchtigen und sogar zum Zelltod führen kann [208].

(iii) Transfektionsmethode: Eine der wichtigsten Überlegungen für die *in vivo* Anwendung ist die Art und Weise, wie das optogenetische System in die Wirtszellen eingebracht wird. Fast alle optogenetischen Systeme zur Genexpression bestanden ursprünglich aus mehreren Plasmiden. Einerseits ist dies auf die Schwierigkeiten zurückzuführen, die sich aus größeren Plasmiden ergeben, andererseits erleichtert dieses Design einen schnellen Wechsel der genetischen Kassetten und eine enge Kontrolle über die Stöchiometrie dieser Kassetten. Zu bedenken ist, dass die Ko-Transfektion mehrerer Plasmide jedoch anspruchsvoller als die Transfektion eines einzelnen Plasmids ist. Bei der Auswahl einer geeigneten Transfektionsmethode müssen der Zelltyp und das klinische Ziel berücksichtigt werden. Eine ideale Transfektionsmethode hat eine hohe Transfektionseffizienz, geringe Zelltoxizität, minimale Auswirkungen auf die Zellphysiologie und ist einfach und reproduzierbar [209]. Wenn man an klinische Anwendungen denkt, sind nicht alle Transfektionsmethoden geeignet. Eine der häufigsten Transfektionsmethoden *in vivo* ist die virale Transfektion, die sich durch eine hohe Transfektionseffizienz auszeichnet. Je nach verwendetem Virustyp kann die Transfektion transient oder stabil sein und gezielt auf einen bestimmten Zelltyp ausgerichtet werden. Andererseits sind Mutagenese und Immunreaktionen bekannte Nebenwirkungen der viralen Transfektion [210]. Eine detaillierte Erörterung dieses Themas würde den Rahmen dieser Arbeit übersteigen, dazu gibt es bereits diverse Literatur [209, 211].

(iv) Leakage: Alle optogenetischen Systeme befinden sich in einem Gleichgewicht zwischen ihrem aktivierten und deaktivierten Zustand. Durch Aktivierung oder Deaktivierung des Systems mit Licht wird das Gleichgewicht auf eine der beiden Seiten verschoben. Folglich ist die Hintergrundaktivierung, auch *Leakage* genannt, niemals null. Andererseits gibt es aber auch keine vollständige Aktivierung [51]. *Leakage* und Aktivierungsstärke sollten bei der Auswahl eines optogenetischen Systems für eine Anwendung beachtet werden. Je nach Anwendung kann eine hohe Leckage vernachlässigbar oder sogar schädlich sein.

(v) Eindringtiefe von Licht: Bei der Auswahl eines optogenetischen Systems spielt die Gewebedurchdringung des Lichts eine wichtige Rolle und hängt stark von der Wellenlänge ab. Im sichtbaren Spektrum hat rotes Licht mit bis zu 5 mm die höchste Gewebedurchdringung, während blaues Licht das Gewebe nur bis zu 2 mm durchdringt [212]. Insgesamt ist die Gewebedurchdringung des Lichts zu gering, um

tiefes Gewebe zu erreichen, außerdem kann die Lichtstreuung problematisch werden, falls eine hohe räumliche Genauigkeit erforderlich ist.

Es gibt fünf Möglichkeiten die schlechte Gewebedurchdringung von blauem und grünem Licht zu überwinden. Die erste Möglichkeit besteht in der Verwendung von 2-Photonen-Techniken als Aktivierungsquelle, die eine präzise dreidimensionale (3D) Zellansteuerung im Gewebe ermöglichen. 2-Photonen-Techniken nutzen die Absorption von zwei Photonen niedriger Energie zur Anregung. Bei diesen Photonen handelt es sich in der Regel um Nahinfrarotlicht (NIR) das tiefer in das Gewebe eindringen kann. Außerdem ist die Anregung räumlich im Zielvolumen lokalisiert und erzeugt im Vergleich zu 1-Photonen-Methoden nur relativ wenig Wärme [213]. Daher reduziert die Verwendung von NIR-Licht die Gewebestreuung und Phototoxizität, während die Interferenz mit dem Körper minimal ist, was für *in vivo* Anwendungen von Vorteil ist. Außerdem sind die so erzeugten Photonen robust genug, um verschiedene optogenetische Konstrukte zu aktivieren, z. B. LOV, CRY2 und Channelrhodopsin2 [214]. Eine zweite Option zur Überwindung der schlechten Gewebepenetration sind implantierbare μ LED-Geräte, die über Funkfrequenzen gesteuert werden und in unmittelbarer Nähe des Zielortes eingesetzt werden können. Sie bringen das Licht effektiv an einen bestimmten Ort, was die Nutzung von Anwendungen, die mehr als einen bestimmten Bereich des Körpers betreffen, einschränkt [215]. Der dritte (experimentelle) Weg ist die Anwendung von hochkonvertierenden Lanthanid-Nanopartikeln, die NIR-Licht in tieferen Geweben absorbieren und hochkonvertiertes blaues Licht emittieren. Die Verwendung von NIR-Licht bringt die oben erwähnten Vorteile mit sich. Darüber hinaus ist es möglich, durch Oberflächenmodifikationen der Nanopartikel, z. B. mit Antikörpern oder Liganden, ein zellspezifisches Targeting in Verbindung mit einer räumlichen Kontrolle zu erreichen. Die Sicherheit dieser Nanopartikel muss jedoch noch bewertet werden. Eine vierte Methode zur Erzeugung von Photonen auch in tiefem Gewebe ist die Biolumineszenz. Hier führt eine enzymatische Reaktion zwischen Gauß-Luciferase und Coelenterazin zur Bildung von Photonen. Dies ist die einfachste und nicht-invasivste der vier Strategien, aber die Erzeugung einer ausreichenden Lichtintensität ist eine Herausforderung. Außerdem fehlt es an räumlicher Kontrolle und schneller Reversibilität [216]. Als wissenschaftlicher Fortschritt zeigte eine aktuelle Studie von Parag-Sharma *et al.* [217], dass selbstleuchtende, biolumineszierende, fluoreszierende Proteine genügend

Licht erzeugen, um mehrere optogenetische Systeme (FKF1, CRY/CIB mit Cre-Rekombinase, CRY/CIB mit CRISPR/Cas, VVD und das Magnetsystem) über Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer in Säugetierzellen zu aktivieren. Die fünfte Methode ist die Implantation eines Laser-basierten Lichtleiters [218], der bei einer sehr geringen Größe eine gute Strahlenqualität mit hohen Intensitäten ermöglicht und gleichzeitig zu minimalen Gewebeschädigungen führt [219, 220].

(vi) Illumination: Die angewandte Illuminationstechnik hat Nebenwirkungen, die von der Wellenlänge des Lichts abhängen. Während rotes Licht am tiefsten in das Gewebe eindringt, ist die Gewebeerwärmung nur mäßig. Bei kürzeren Wellenlängen hingegen ist die Gewebedurchdringung geringer, während das Licht mehr Energie enthält, was je nach Bestrahlungsstärke zu einer erheblichen Gewebeerwärmung führt. Darüber hinaus führt energiereiches Licht zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Mutationen im genetischen Material verursachen, indem sie Nukleotide oxidieren und so Fehlanpassungen fördern [221]. Blaues Licht und ultraviolettes (UV)-Licht haben die stärkste mutagene und unspezifische schädigende Wirkung. UV-B-Bestrahlung löst eine Kaskade neuroaktiver und vasoaktiver Mediatoren und Zytokine aus, die zu einer Entzündungsreaktion führen [222]. Bei höheren Dosen werden apoptotische Signalwege in Keratinozyten aktiviert, was zum Zelltod führt [223]. Außerdem kann UV-Strahlung von Pyrimidinen im genetischen Material absorbiert werden, was zu einer Spaltung von Doppelbindungen und zur Bildung anormaler Bindungen führt, die stark mutagen sind [222].

(vii) Biokompatibilität: Auch die Sicherheit der optogenetischen Genexpression im Hinblick auf die Biokompatibilität muss vor der klinischen Umsetzung geprüft werden. Neben der Transfektionsmethode sind auch die verwendete DNA sowie die synthetisierten Proteine körperfremd. Fremde Moleküle bergen immer das Risiko einer zellulären Toxizität und von Immunreaktionen, wodurch die Expression eingeschränkt oder sogar der Körper geschädigt werden kann. Im Sinne behördlicher Richtlinien bedürfen klinische Versuche deshalb einer vorherigen ausreichenden präklinischen Prüfung.

2.8.2 Erste Erfolge der Optogenetik in *vivo* Experimenten

Historisch gesehen hat die Optogenetik ihren Ursprung in lichtaktivierten Ionenkanälen, die auf Neuronen angewendet wurden und den Wissenschaftlern bedeutende Fortschritte ermöglichten. Seitdem hat sich das optogenetische Repertoire erheblich erweitert. Die Tabellen 4 und 5 geben einen kurzen Überblick über die Errungenschaften der klassischen Optogenetik mit Ionenkanälen (siehe Tabelle 4) und der modernen Optogenetik mit den oben beschriebenen optogenetischen Werkzeugen (siehe Tabelle 5) in präklinischen und klinischen Studien.

Die wachsende Vielfalt an klassischen optogenetischen Werkzeugen hat die Möglichkeit geschaffen, die Beziehungen zwischen Verhalten und Gehirnaktivität herzustellen. Sie sind nicht nur ein hervorragendes Instrument um diese Beziehungen zu ermitteln und weiter zu untersuchen, sondern können auch zur Kontrolle des Verhaltens von Tieren und möglicherweise zur Behandlung neurologischer Erkrankungen eingesetzt werden. Die Rolle von Dopamin bei der Belohnungsvorhersage wurde von Cohen *et al.* [224] und bei der Verhaltenskonditionierung von Tsai *et al.* [225] nachgewiesen. Es wird angenommen, dass eine Dysregulation des dopaminergen Systems, und damit der Belohnungsschaltkreise des Gehirns, an depressionsbedingtem Verhalten [226–230] sowie an Stress [228, 231, 232] und Drogenmissbrauch [227, 228, 233] beteiligt ist. Tierisches Sozialverhalten wird u.a. ebenfalls durch die Dopaminregulation gesteuert [234, 235]. Eine auf Dopamin basierende Behandlung für die Krankheiten Alzheimer [236, 237] und Parkinson [238–240] wurde ebenfalls etabliert.

Zur Untersuchung von Furcht und Angst [241, 242] wurde die zentrale Amygdala mittels Optogenetik untersucht. Die Gedächtnisforschung befasst sich hauptsächlich mit der Amygdala, dem Hippocampus und dem Kortex [243, 244]. Studien zum Hypothalamus wurden zur Erforschung des Fressverhaltens und der Fettleibigkeit eingesetzt [245, 246] und zeigten, dass sie mit Drogenabhängigkeit und Depressionen in Verbindung stehen [247, 248]. Auch der Schlaf kann mit Hilfe optogenetischer Werkzeuge untersucht werden [249] u.a. auf seine Auswirkungen auf die Gedächtnisfunktion [250].

Die optogenetische Neuromodulation verbessert nachweislich die Regeneration geschädigter neuronaler Schaltkreise, z. B. nach einer Myelin-Degeneration, wie sie bei der Krankheit Multiple Sklerose auftritt [251]. Weitere Versuche zur Entwicklung neuartiger Therapien, z. B. zur Behandlung von Schlaganfällen [252, 253], Epilepsie [254] oder Rückenmarksverletzungen, wurden durchgeführt. Sie zielten auf die Verbesserung oder Wiederherstellung von Atemfunktionen [255], Muskelfunktionen [256] oder Funktionen der unteren Körperhälfte [257] ab. Optogenetische Herzschrittmacher zur Resynchronisierung des Herzschlags [258, 259] und Strategien zur Behandlung chronischer Schmerzen wurden entwickelt [260–262]. Es gibt inzwischen direktere Ansätze zur Wiederherstellung des Sehvermögens durch optogenetische Gentherapie der Netzhaut [263, 264] oder zur Wiederherstellung des Hörvermögens durch ein optogenetisches CI [265, 266]. Der optogenetisch induzierte Fluss von Kalziumionen, der zur Sekretion von Insulin aus transgenen Mauszellen genutzt wurde [267], könnte in Kombination mit einem Implantat, das die Insulinsekretion in Abhängigkeit vom Blutzuckerspiegel reguliert, eine Option für die Behandlung von Diabetes sein. Eine weitere Anwendung konzentriert sich auf lichtaktivierte Chemokinrezeptoren zur lokalen Immunmodulation, z. B. in Tumoren zur Krebsbehandlung [268]. Optisch aktivierte Adenylatzyklen und Guanylatzyklen [269] ermöglichen die Kontrolle über die intrazellulären Level der Botenstoffe cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*) und cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*), während lichtgesteuerte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren direkt G-Protein-vermittelte Signalkaskaden ansprechen [270, 271]. Um die aktivitätsabhängige Neurogenese zu untersuchen und die Differenzierung von transplantierten neuronalen Stammzellen zu regulieren, verwendeten Teh *et al.* [272] transformierte neuronale Stammzellen, die stabil Channelrhodopsine exprimieren.

Bislang gibt es jedoch kaum klinische Studien für optogenetische Systeme, da die Übertragung von Kleintieren, wie Nagetieren oder kleinen nichtmenschlichen Primaten, auf den Menschen noch ein großer Schritt ist. Wie in Kapitel 2.8.1 erwähnt, müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt und Hindernisse überwunden werden, um diese wissenschaftlichen Errungenschaften in klinische Anwendungen zu übertragen. Im letzten Jahr hat sich der Bereich der Wiederherstellung des Sehvermögens als besonders vielversprechend erwiesen, dort laufen bereits zwei

klinische Studien (NCT02556736 und NCT03326336). Sie nutzen die Optogenetik zur Behandlung von Netzhautdegenerationen, die die Hauptursache für Blindheit sind.

Tabelle 4: Liste der *in vivo* Experimente mit optogenetischen Systemen, die auf Ionenkanälen basieren.

Forschungsgebiet	Quelle
Belohnungsvorhersage	[224]
Verhaltens-Konditionierung	[225]
Depressionen	[226–230]
Stress	[228, 231, 232]
Drogenmissbrauch	[227, 228, 233]
Sozialverhalten	[234, 235]
Alzheimer	[236, 237]
Parkinson	[238–240]
Angst	[241, 242]
Gedächtnis	[243, 244]
Schlaf und Gedächtnisfunktionen	[250]
Schlaf	[249]
Essverhalten und Übergewicht	[245, 246]
Essverhalten und Depressionen	[247, 248]
Multiple Sklerose	[251]
Schlaganfall	[252, 253]
Epilepsie	[254]
Rückenmarksverletzungen: Atemfunktion	[255]
Rückenmarksverletzungen: Muskelfunktionen	[256]
Rückenmarksverletzungen: Funktionen der unteren Körperhälfte	[257]
Optogenetischer Herzschrittmacher	[258, 259]
Chronische Schmerzen	[260–262]
Wiederherstellung der Sicht: retinale Gentherapie	[263, 264]
Optogenetisches CI	[265, 266]
Insulin Produktion	[267]
Immunmodulation: Krebs-Therapie	[268]
Aktivierung von Adenylat- und Guanylatzyklasen	[269]
Aktivierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren	[270, 271]
Regulation der Stammzellendifferenzierung	[272]

Einer der Hauptbereiche, in denen die modernen optogenetischen Werkzeuge eingesetzt werden, ist das Genom *Editing*. Daher ist es naheliegend, dass verschiedene optogenetische Werkzeuge mit diversen Genom *Editing* Techniken kombiniert wurden. Li *et al.* [273] nutzten das CRY2-System zur Aktivierung von CRISPR/Cas für das Genom *Editing* in regionaler Haut, während Schindler *et al.* [274] und Meador *et al.* [73] die Genexpression mit der Kombination von CRY2 und Cre-Rekombinase regulierten. Im Genom *Editing* und der Genaktivierung findet auch das

Blaulichtsystem mit Magneten Anwendung. Dabei werden verschiedene Werkzeuge wie CRISPR/Cpf (CRISPR aus *Prevotella* und *Francisella*) [275] oder cre, dre (DNA-Rekombinase), flp (Flippase) Rekombinasen [276–278] eingesetzt. Da Blaulichtsysteme aufgrund ihrer geringen Gewebedurchdringung *in vivo* Experimenten immer noch schwierig zu implementieren sind, entwickelten Kinjo *et al.* [279] eine FRET-gestützte (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) Photoaktivierung von Flavoproteinen für die *in vivo* Zweiphotonen-Optogenetik. Zur Steuerung der Differenzierung von Stammzellen *in vivo* mit Rotlichtaktivierung [280] und zum Genom *Editing* von inneren Organen und Tumoren [281] wurde CRISPR/Cas unter Verwendung von BphP1 (bacterial bathyphytochrome RpBphP1) eingesetzt. Das BphP1 System aktivierte auch Cre-Rekombinasen [282] und Adenylatzyklen [283] für das *in vivo* Genom *Editing*.

Neben dem Genom *Editing* gibt es eine Reihe weiterer Anwendungen optogenetischer Systeme, die bereits in Tiermodellen getestet werden. Schneider *et al.* [284] entwickelten eine Flüssig-Flüssig Phasentrennung von Licht-induzierbaren (CRY2) Transkriptionsfaktoren für eine verstärkte Transkriptionsaktivierung in Säugetierzellen und Mäusen. Die optogenetische Kontrolle endogener Transkription und epigenetischer Zustände mit Hilfe von CRY2 wurde von Konermann *et al.* [65] als einem der ersten erreicht. Reade *et al.* [49] etablierten das EL222-System in Zebrafischen zur Genexpression und Genom *Editing* mit CRISPR/Cas, während Yen *et al.* [285] Genome von Zebrafischen mit Cre-Rekombinase und dem PhyB/PIF-System editierten. Obwohl Zebrafische keine Säugetiere sind, stellen sie ein interessantes Forschungsobjekt für die Optogenetik dar, da sie durchsichtig sind und daher nichtinvasiv von außen beleuchtet werden können. Im Jahr 2017 ermöglichten Smartphone-gesteuerte optogenetische Zellen eine halbautomatische Glukose-Homöostase bei diabetischen Mäusen, die durch dunkelrotes Licht (BphP1 = *bacterial bathyphytochrome*) aktiviert wurden [286]. Hörner *et al.* [287] und Weicai Wang *et al.* [288] zeigten ein optogenetisches Modell zur Optimierung der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen für eine präzise Knochenregeneration *in vivo* auf der Grundlage des FKF1/GI-Systems (LOV-Variante). Das CRY2-System wird auch in der Alzheimer-Forschung eingesetzt [289].

Theoretisch sollten sich diese vielfältigen Möglichkeiten zur Modulation oder Verbesserung zellulärer Funktionen in einer ausreichenden Zahl von Anwendungen

niederschlagen. Außer bei Neuronen hat die Optogenetik in Tiermodellen jedoch gerade erst begonnen über das *proof-of-concept* Stadium hinauszukommen. Darüber hinaus wurden erste Versuche in menschlichen Stammzellen durchgeführt. Klapper *et al.* [290] entwickelten eine Methode zur Erzeugung einer konditionalen und stabilen optogenetischen menschlichen Stammzelllinie, die sich leicht in funktionelle Neuronen differenzieren lässt. Obwohl es sich bei diesem fortschrittlichen und benutzerfreundlichen System noch um eine *in vitro* Entwicklung handelt, ermöglicht es eine breitere Anwendung der Optogenetik bei aus Stammzellen abgeleiteten Neuronen und ist ein wichtiger Schritt in Richtung *in vivo* Anwendungen. Andererseits fehlt bei den meisten Krankheiten noch detailliertes mechanistisches Wissen, und viele Fragen im Zusammenhang mit der Gentherapie von optogenetischen Systemen müssen noch geklärt werden (wie im vorigen Kapitel erläutert). Dennoch ist die Optogenetik eine vielversprechende Technik für Anwendungen, die präzise an spezifischen Zellen wirken oder die eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung erfordern.

Tabelle 5: Liste der *in vivo* Experimente mit optogenetischen Systemen für die Genexpression.

System	Forschungsgebiet	Quelle
CRY2	Genom <i>Editing</i> : CRISPR/Cas	[273]
CRY2	Genom <i>Editing</i> : cre Rekombinase	[73, 274]
pMag/nMag	Genom <i>Editing</i> : CRISPR/cfp	[67]
pMag/nMag	Genom <i>Editing</i> : cre, dre, flp Rekombinasen	[276–278]
BphP1	Genom <i>Editing</i> : CRISPR/Cas	[280, 281]
BphP1	Genom <i>Editing</i> : cre Rekombinase	[282]
EL222 (LOV)	Genom <i>Editing</i> : CRISPR/Cas in Zebrafischen	[49]
PhyB/PIF	Genom <i>Editing</i> : cre Rekombinase in Zebrafischen	[285]
CRY2 LOV	FRET Photoaktivierung	[279]
BphP1	Adenylatcyclase	[283]
BphP1	Smartphone basierte halbautomatische Glucose Homöostase in diabetischen Mäusen	[286]
FKF1/GI (LOV)	Regulierung der mesenchymalen Stammzellendifferenzierung für präzise Knochenregeneration	[287, 288]
CRY2	Endogene Transkription / epigenetische Zustände	[65]
CRY2	Flüssig-Flüssig Phasentrennung für eine erhöhte Transkriptionsaktivierung	[284]
CRY2	Alzheimer	[289]

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer lichtinduzierten Proteinsynthese in Säugetierzellen für therapeutische Anwendungen. Die Versuchsreihe wurde mit dem optogenetischen rotlichtinduzierten System PhyB [27] begonnen. Die Etablierung dieses Systems in CHO-K1 Zellen sowie eine erste Optimierung der Versuchsbedingungen erfolgte bereits im Rahmen der Masterarbeit. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sind in Kapitel 3.1 weiterführende Optimierungsexperimente in CHO-K1 Zellen dargestellt.

Beim optogenetischen PhyB System hängt die Höhe der Proteinexpression von der Intensität der „optogenetischen Reaktion“ ab. Diese wird durch diverse Faktoren beeinflusst. Einer der wichtigsten Einflussfaktoren ist die Illuminationsintensität, (angegeben in W/m^2) die sowohl vom Arbeitsabstand zwischen Zellen und LEDs als auch von der verwendeten Beleuchtungsstärke abhängt. Auch die Illuminationsdauer spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Weitere Einflussfaktoren des PhyB Systems sind die Transfektionsbedingungen wie z. B. Menge und Verhältnis der Plasmide oder des Transfektionsreagenzes, ebenso die Menge des Cofaktors PCB sowie der Zeitpunkt seiner Zugabe. Hierbei ist vor allem die relative kurze Halbwertszeit (ca. 1 Stunde) des Chromophors PCB zu beachten.

Bereits in der Masterarbeit wurde eine im Vergleich zur lichtinduzierten Expression relativ hohe spontane *Leakage* des Systems auch unter unbelichteten Bedingungen festgestellt. Zuerst wurde die Herkunft dieser *Leakage* ermittelt. Anschließend wurden weitere Optimierungen zur Erreichung einer möglichst hohen Proteinexpression durchgeführt, bei der die relevanten Einflussfaktoren variierend getestet wurden. Im Anschluss wurde eine für therapeutische Anwendungen vielversprechende Laser-Illumination vergleichend zu der in den Experimenten verwendeten LED-Illumination getestet.

Für eine Überprüfung, ob die Plasmide des PhyB Systems in Co-Transfektion in die gewünschten Zellen übertragen wurden, stand ein Testplasmid (pSAM200) zur Verfügung, das bereits ohne Lichtinduktion an das Zielplasmid bindet und somit die Proteinexpression initiiert. Eine qualitative und quantitative Auswertung der Funktion des optogenetischen PhyB Systems sowie der erreichten Proteinexpression wurde zunächst mit dem fluoreszierenden Protein eGFP als Marker durchgeführt. Die

Quantifizierung erfolgte mittels Bildanalysen und Durchflusszytometermessungen. Zusätzlich wurde vergleichend auch die Expression von und dem für das Innenohr therapeutisch relevanten BDNF im Überstand der optogenetisch aktivierten Zellen vermessen.

Da auch mit optimierten Reaktionsbedingungen mittels LED-Illumination kein signifikanter Unterschied zu der gemessenen *Leakage* erzielt werden konnte, wurden zwei weitere in der Literatur als erfolgversprechend beschriebene blaulichtinduzierte optogenetische Systeme das CRY2-System [26] und das auf dem LOV-System basierende optogenetische System-EL222 [63] vergleichend getestet. Das CRY2-System überzeugte hierbei durch seine signifikant höhere Proteinexpression im Gegensatz zum EL222-System bei gleichen Versuchsbedingungen gemessen anhand des Proteins Luciferase, das hierbei als Marker eingesetzt wurde. Daher wurden die nachfolgenden Experimente mit dem erfolgsversprechender erscheinenden CRY2-System durchgeführt.

Die Einflussfaktoren für die Höhe der Proteinexpression des CRY2-Systems sind ebenfalls die Illuminationsintensität und -dauer. Im Unterschied zum PhyB-System wird das CRY2-System jedoch nicht dauerhaft illuminiert, sondern repetitiv. Grund hierfür ist zum einen die rasche Deaktivierung des Systems (ca. 5 Minuten) nach Illumination und zum anderen die Verwendung von energiereicherem blauem Licht, das bei dauerhafter Illumination zu einer Zellschädigung führen kann. Bei der repetitiven Illumination sind sowohl die Gesamtilluminationsdauer wie auch die Pulslänge sowie die Pausenzeit variabel. Wie auch beim PhyB-System sind die Transfektionsbedingungen ebenfalls beim CRY2-System ein wichtiger Einflussfaktor. Das optogenetische CRY2-System benötigt keinen externen Co-Faktor.

Die Optimierung des aus drei Plasmiden bestehenden CRY2-Systems mittels Luciferase Expression in HEK293 Zellen wurde in Kapitel 3.3 beschrieben. Während der Optimierung dieses neuen Systems wurden die oben genannten Einflussfaktoren variiert. Auch hier erfolgte anschließend ein Vergleich von Laser- und LED-Illumination. Eine Quantifizierung der Proteinexpression des optogenetischen CRY2-Systems wurde zunächst mit dem einfachen und schnell nachweisbaren Protein Luciferase als Marker durchgeführt. Dieser Luciferase-Nachweis zeichnet sich vor allem durch seine hohe Sensitivität aus und war somit zur Testung der optimalen Lichtinduktion hilfreich. Weiterhin wurde dann ausgehend von diesen Vorergebnissen die Expression des für

das Innenohr therapeutisch relevanten BDNF im Überstand der optogenetisch aktivierten Zellen vermessen.

Um die Kinetik der lichtinduzierten Transkription besser zu verstehen, wurden die Genmarker eGFP, BDNF sowie der zur Optimierung des CRY2-Systems verwendete Genmarker Luciferase mittels qPCR Analysen untersucht, neben dem CRY2-System wurde dies auch im PhyB System durchgeführt (Kapitel 3.4).

Um der klinischen Anwendung durch den Einsatz von immunogen neutralen menschlichen Stammzellen näher zu kommen, sollte das optogenetische CRY2-System dann von Säugerzellen wie HEK293-Zellen auf hMSCs, die aus Fettgewebe isoliert wurden, übertragen werden. Hierfür wurden in Kapitel 3.2 verschiedene Transfektionsmethoden für eine Dreifachtransfektion in ADhMSCs getestet und optimiert.

3.1 Optimierungen des optogenetischen PhyB Systems

Eine Etablierung des PhyB Systems in CHO-K1 Zellen und eine erste Optimierung der Versuchsbedingungen wurden bereits im Rahmen der Masterarbeit erzielt. Dieses Kapitel führt weiterführende optimierende Experimente in CHO-K1 Zellen auf, damit eine möglichst hohe Proteinexpression mit signifikantem Unterschied zur *Leakage* erzielt werden kann. Hierbei wurde eGFP als Marker für die Höhe der Proteinexpression der Zellen verwendet.

3.1.1 Überprüfung der *Leakage* der verwendeten Plasmide nach chemischer Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Auch ohne Illumination zeigt das PhyB System in CHO-K1 Zellen eine relativ hohe, spontane *Leakage*, die für die Etablierung eines lichtinduzierten Systems problematisch ist. Zur Erforschung der Ursache dieser spontanen *Leakage* wurden die optogenetisch aktivierbaren Plasmide pKM-022 und pKM-EGFP (mit eGFP als Marker) mittels chemischer Transfektion unter Verwendung von PEI einzeln und gemeinsam in CHO-K1 Zellen transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen über drei Tage im Dunklen ohne Zugabe des Cofaktors PCB inkubiert. Abbildung 20 zeigt die Bildaufnahmen (drei Tage nach Transfektion) nach Bearbeitung mit dem Image J Makro. Die weißen Bereiche entsprechen hierbei den als Fluoreszenz berechneten Stellen, während die schwarzen Bereiche als nicht fluoreszierend bewertet wurden.

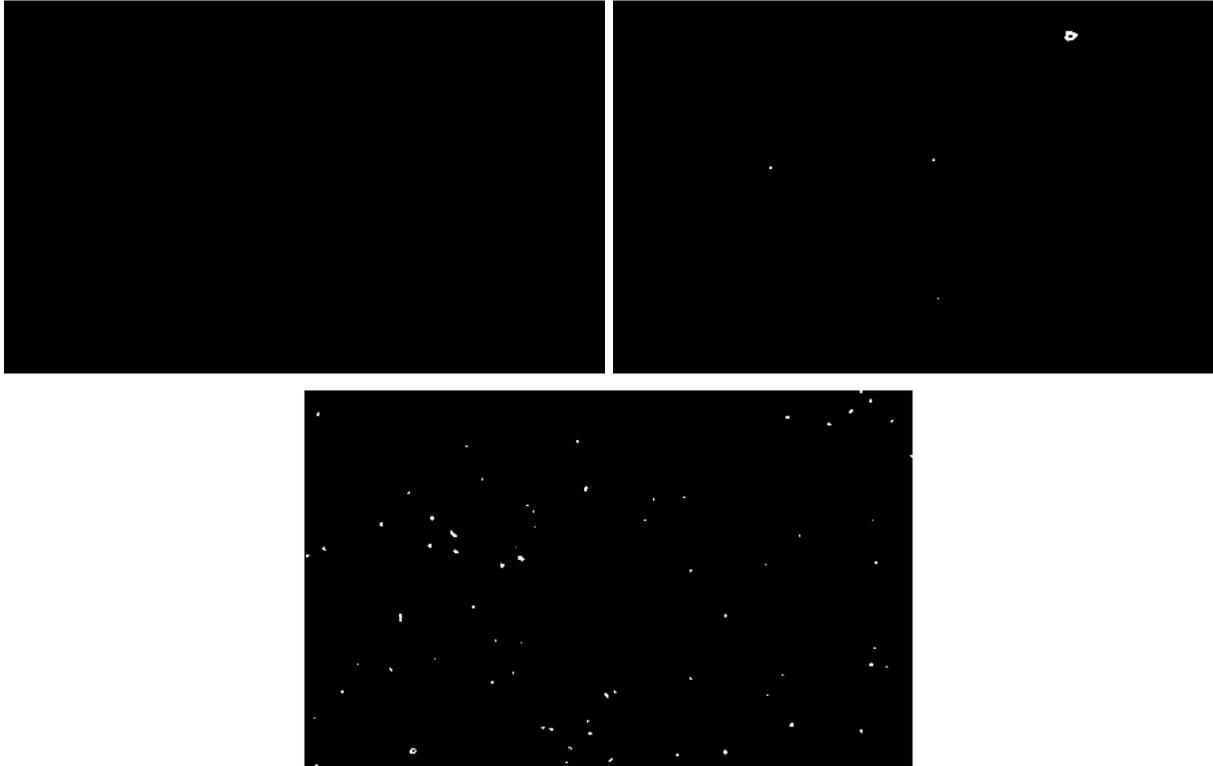


Abbildung 20: Mittels Image J ausgewertete fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 4-fach Vergrößerung drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) von CHO-K1 Zellen mit 5,53 μ g pKM-022 (oben links), 2,77 μ g pKM-EGFP (oben rechts) und 5,53 μ g pKM-022 in Kombination mit 2,77 μ g pKM-EGFP (unten in der Mitte) in einer 6-Well-Platte ohne PCB Zugabe und Illumination.

Im Ansatz mit pKM-022 waren keine fluoreszierenden Zellen erkennbar, während im Ansatz mit pKM-EGFP lediglich einzelne fluoreszierende Zellen zu erkennen waren. In dem Ansatz mit pKM-022 in Kombination mit pKM-EGFP waren jedoch diverse fluoreszierende Zellen erkennbar.

Hierfür wurden bei pKM-022 drei und sowohl bei pKM-EGFP als auch bei der Kombination aus beiden Plasmiden jeweils vier repräsentative Bilder ausgewertet, deren berechnete Mittelwerte in Tabelle 6 dargestellt wurden.

Tabelle 6: Mittels Image J berechnete Fläche an fluoreszierenden Zellen in %; N=4.

Plasmid	Berechnete Fläche	Standardabweichung
pKM-022	0 %	$\pm 0,0\%$
pKM-EGFP	0,11 %	$\pm 0,1\%$
pKM-022 + pKM-EGFP	0,22 %	$\pm 0,02\%$

Für pKM-022 wurden keine fluoreszierenden Bereiche detektiert. Bei pKM-EGFP wurde eine fluoreszierende Fläche von 0,11 % und bei einer Kombination aus beiden Plasmiden eine Fläche von 0,22 % ermittelt. Vergleicht man die berechneten Flächen an fluoreszierende Zellen von pKM-EGFP (0,11 %) und der Kombination aus pKM-022 mit pKM-EGFP (0,22 %), so hat eine Verdopplung der fluoreszierenden Fläche stattgefunden.

Anschließend wurde die *Leakage* des optogenetischen Systems mit eGFP als Marker (pKM-022 mit pKM-EGFP) bei unterschiedlichen Illuminationen (ohne Illumination, mit der Deaktivierungswellenlänge 740 nm LED-Licht und mit der Aktivierungswellenlänge 660 nm LED-Licht) mit und ohne PCB-Zugabe untersucht. Es wurden jeweils fünf repräsentative Fluoreszenzaufnahmen (aufgenommen drei Tage nach der Transfektion) mit der Software Image J ausgewertet. Die entstandenen Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

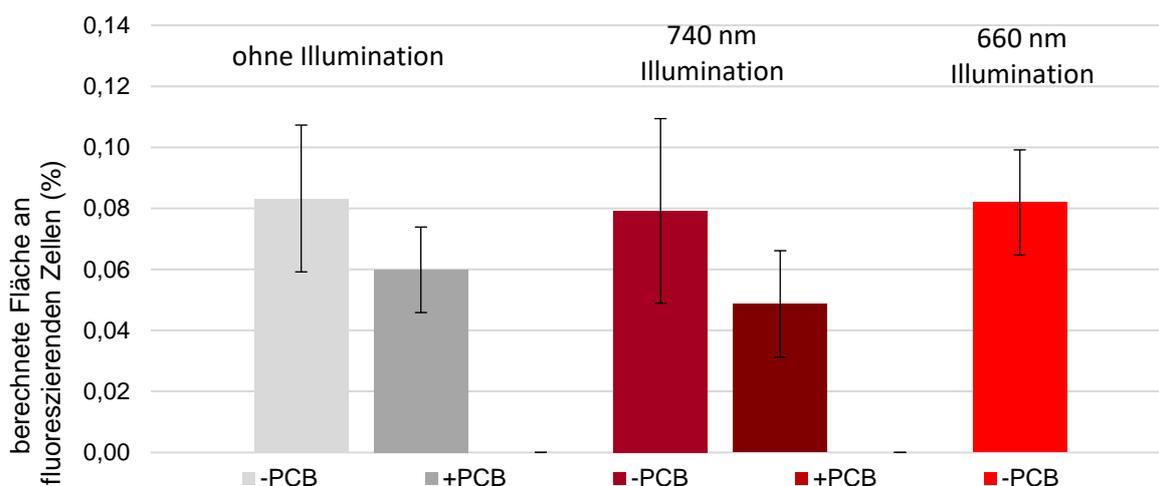


Abbildung 21: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) mit 5,53 μ g pKM-022 und 2,77 μ g pKM-EGFP nach einstündiger Illumination mit verschiedenen Wellenlängen (660 nm (1,45 W/m²), 740 nm (14,5 W/m²) oder ohne Illumination) in einer 6-Well-Platte mit (15 μ M) und ohne PCB Zugabe; N=5.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass die berechnete *Leakage* bei allen Proben keine Unterschiede aufweist. Sie befindet sich bei allen getesteten Bedingungen in einem Bereich von 0,05 % bis 0,08 %. Zu bemerken ist jedoch, dass alle Proben ohne PCB-Zugabe unabhängig von der Art der Illumination eine Leakage von 0,08 % aufwiesen, während die Proben mit PCB-Zugabe nur eine Leakage von 0,05 % bis 0,06 % hatten.

Aufgrund der geringen Werte und den relativ hohen Standardabweichungen sind diese Unterschiede jedoch nicht aussagekräftig.

3.1.2 Durchflusszytometermessungen

Für eine Verifizierung der mittels Image J berechneten Flächen an fluoreszierenden Zellen wurden zusätzlich Durchflusszytometermessungen durchgeführt. Diese geben genaueren Aufschluss über die Transfektionseffizienz, da jede Zelle einzeln vermessen und deren Fluoreszenzintensität quantifiziert wird. Der eGFP Marker der transfizierten CHO-K1 Zellen wurde drei Tage nach PEI Transfektion vermessen. Hierbei wurden jeweils drei gleichen Proben quantifiziert und deren Mittelwerte in Abbildung 22 dargestellt.

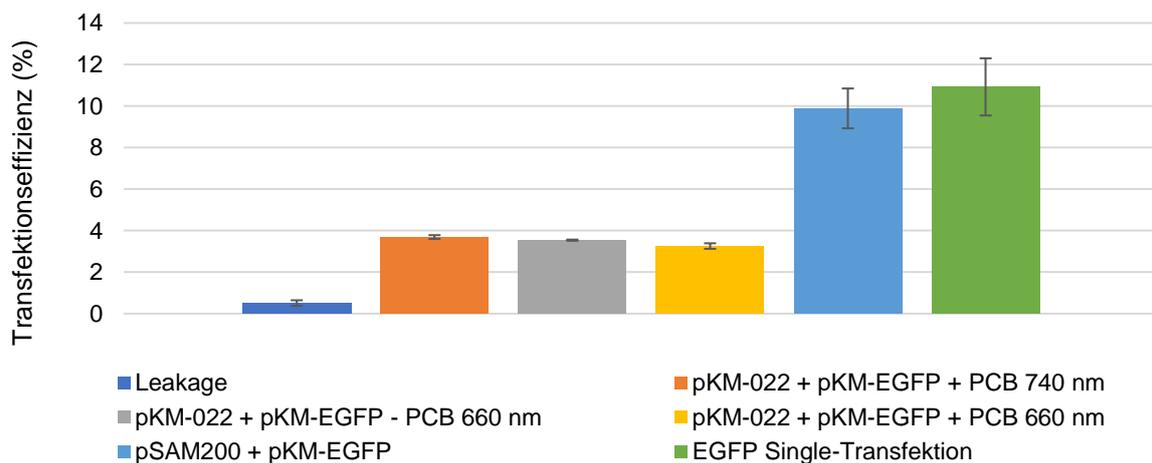


Abbildung 22: Durchflusszytometermessungen des Markers eGFP von CHO-K1 Zellen nach PEI Transfektion zur Bestimmung der Transfektionseffizienzen verschiedener Proben des PhyB-Systems drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) mit verschiedenen Plasmidkombinationen (5,53 μ g pKM-022/pSAM200, EGFP und 2,77 μ g pKM-EGFP) nach einstündiger Illumination mit verschiedenen Wellenlängen (660 nm (1,45 W/m²), 740 nm (14,5 W/m²) oder ohne Illumination) in einer 6-well-Platte mit (15 μ M) und ohne PCB Zugabe; N=3.

Die Transfektionseffizienzen des optogenetisch aktivierbaren PhyB Systems bestehend aus den Plasmiden pKM-022 und pKM-EGFP zeigten keine Unterschiede (Mittelwert bei 3,5 % unabhängig von einer PCB-Zugabe oder der Wellenlänge der Illumination (740 nm mit PCB: 3,7 %, 660 nm mit PCB: 3,2 % und 660 nm ohne PCB: 3,5 %)).

Zwischen den Transfektionseffizienzen des Testplasmids mit eGFP Marker (pSAM200 und pKM-EGFP: 9,9 %) und einer Einzeltransfektion mit eGFP (10,9 %) war ebenfalls kein Unterschied (Mittelwert bei 10,4 %) nachweisbar. Es konnte jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen dem optogenetischen aktivierbarem PhyB System (3,5 %) und dem Testplasmidsystem (10,4 %) ermittelt werden.

3.1.3 qPCR Analyse

Für eine Verifizierung der Funktion des PhyB Systems wurden qPCR Analysen durchgeführt. Diese gaben nicht nur über die Funktion der Plasmide Aufschluss, sondern zeigten zusätzlich detailliert den Verlauf der Genexpression von Transfektion bis zur Versuchsauswertung. Eine detaillierte Beschreibung der Funktion, Vorbereitung sowie Durchführung der durchgeführten qPCR Analyse kann in Kapitel 3.3.8 eingesehen werden.

Es wurden immer jeweils drei homologe Proben zu sieben verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 4 h, 24 h, 30 h, 48 h, 54 h, 72 h nach der Transfektion) genommen. Zusätzlich gab es immer eine Negativkontrollprobe ohne DNA und eine nach 72 h genommene Probe, die nicht illuminiert wurde, beides ebenfalls in Dreifachbestimmung. Die Zellen wurden zur Entnahme lysiert und anschließend wurde ihre RNA isoliert. Für die cDNA Synthese wurde die verwendete RNA auf 15 ng/ μ L normiert. Die verwendeten Referenzprimer für die Normierung der Messwerte waren B2M (Beta-2-Microglobulin), RPL4 (*Ribosomal Protein L4*) und PPIA (Peptidylpropyl isomerase A).

Die Bezeichnung der Proben haben die folgenden Bedeutungen: L (gesamte *Leakage*: transfizierte Zellen ohne Illumination, Probennahme zum Zeitpunkt 7), N1 (Negativkontrolle (keine DNA) ohne Illumination, Probennahme zum Zeitpunkt 7), N2 (Negativkontrolle (keine DNA) nach Illumination mit 660 nm, Probennahme zum Zeitpunkt 7), die Zahlen stehen für illuminierte Proben (660 nm) und den jeweiligen Zeitpunkt der Probennahme (1: 1 h, 2: 4 h, 3: 24 h, 4: 30 h, 5: 48 h, 6: 54 h, 7: 72 h nach Transfektion). Die Illumination der Proben erfolgte ab dem Zeitpunkt 4, der in den nachfolgenden Grafiken mit einem roten Pfeil markiert wurde. Die drei homologen Proben wurden jeweils viermal vermessen, das heißt, dass jeder Messbalken in der resultierenden Grafik den Mittelwert von 12 Messungen darstellt.

Für das optogenetische PhyB-System mit eGFP Marker wurde eine qPCR Analyse, durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 23 dargestellt sind.

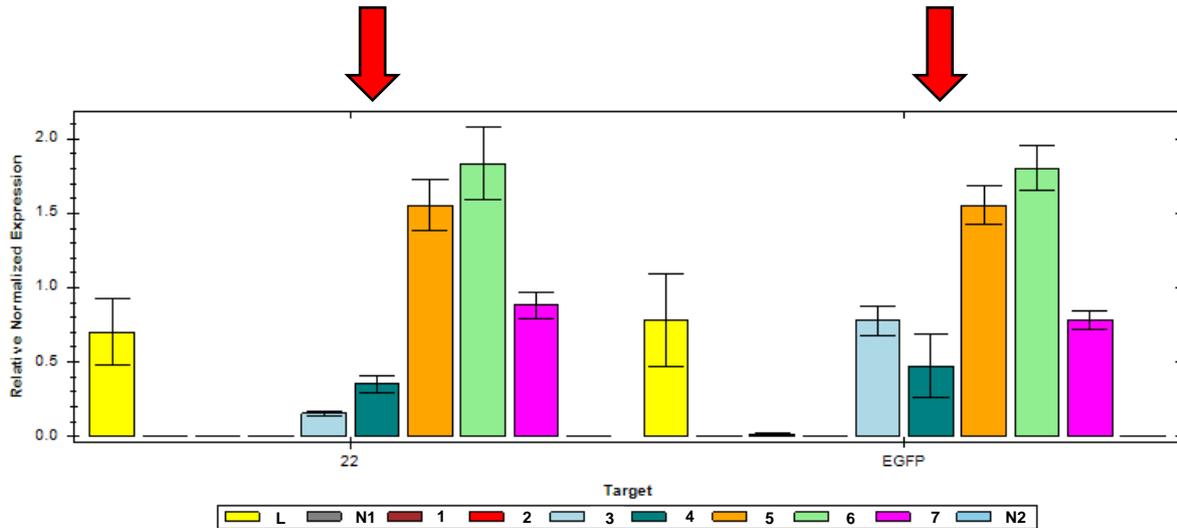


Abbildung 23: qPCR Daten des PhyB-Systems (0,375 µg pKM-022 und 0,75 µg pKM-EGFP) in HEK293 Zellen nach Dreamfect™ Gold Transfektion (3 µL) nach einstündiger Illumination mit 660 nm (1,45 W/m²) oder ohne Illumination in einer 24-well-Platte mit (15 µM) PCB Zugabe, N=12.

Die Daten zeigten für die beiden Plasmide pKM-022 und pKM-EGFP des PhyB-Systems eine steigende RNA (Ribonukleinsäure) Expression ab Zeitpunkt 4 (Start der Illumination) mit einem Maximum bei Zeitpunkt 6 (einen Tag nach der Illumination). Anschließend sank die RNA Expression wieder. Für beide Plasmide war eine gleich hohe Genexpression mit einem ähnlichen zeitlichen Verlauf erkennbar. Die *Leakage* des Systems (Expression vor dem Zeitpunkt 4) begann erst ab Zeitpunkt 3, also direkt vor der Illumination. Auffällig war, dass die *Leakage* bei dem Plasmid pKM-EGFP deutlich höher war als bei dem optogenetischen Plasmid pKM-022. Die maximale eGFP Expression war nur ungefähr doppelt so hoch wie die ermittelte *Leakage*. Daher konnte zwar die optogenetisch aktivierte Genexpression nachgewiesen werden, jedoch mit nur gering erhöhter Genexpression im Vergleich zur *Leakage* des PhyB-Systems.

3.1.4 Variation der Beleuchtungsstärke

Für eine weitere Optimierung der eGFP Expression in CHO-K1 Zellen wurde die Beleuchtungsstärke ausgehend von der Start-Intensität 1,5 W/m², wie sie von Weber *et. al.* [27] verwendet wurde, variiert. Hierbei wurden jeweils identische Proben mit

0,7 W/m², 1,5 W/m² und 2,2 W/m² LED Licht mit einer Wellenlänge von 660 nm für eine Stunde illuminiert. Von jeder Probe wurden zwei Tage nach Illumination fünf repräsentative Fluoreszenzaufnahmen angefertigt, die erneut mit dem Programm Image J ausgewertet wurden.

Abbildung 24 zeigt die berechneten Flächen an fluoreszierenden Zellen nach einer PEI Transfektion mit dem Testplasmid pSAM200 in Kombination mit pKM-EGFP ohne Zugabe des Ko-Faktors PCB.

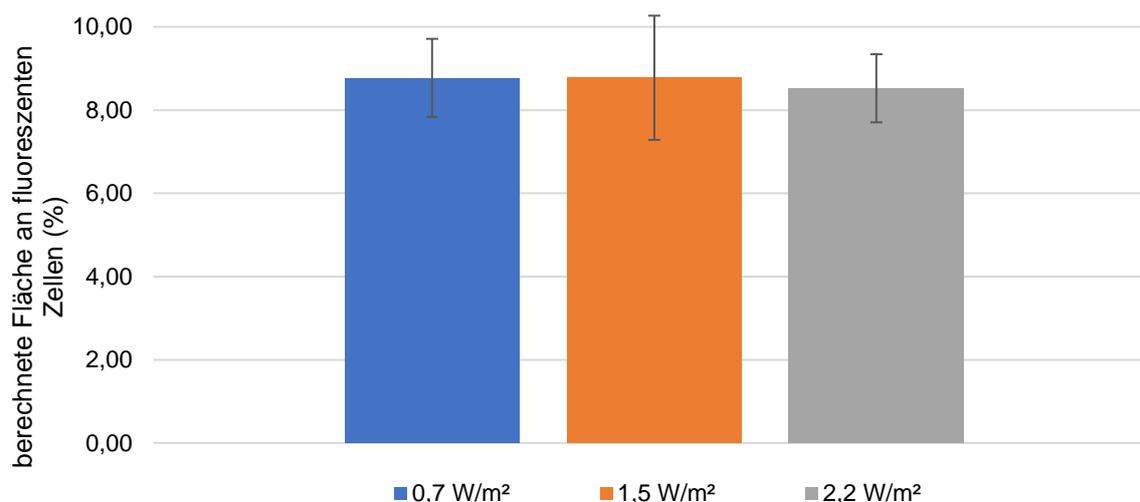


Abbildung 24: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 µL, 1 mg/mL) mit dem Testplasmid pSAM200 (5,53 µg) und pKM-EGFP (2,77 µg) nach einstündiger Illumination bei 660 nm mit unterschiedlichen Illuminationsintensitäten (0,7 W/m², 1,5 W/m² und 2,2 W/m²) in einer 6-well-Platte ohne PCB Zugabe; N=5.

Die Transfektion des Testplasmids mit eGFP Marker resultierte unabhängig von der Illuminationsintensität in einer fluoreszierenden Fläche von ca. 8,8 % (0,7 W/m²: 8,8 %; 1,5 W/m²: 8,8 %; 2,2 W/m²: 8,5 %). Zwischen den Proben konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden.

In Abbildung 25 sind die berechneten Flächen an fluoreszierenden Zellen nach einer Transfektion mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 in Kombination mit pKM-EGFP nach Zugabe von 15 µM PCB dargestellt.

Ergebnisse

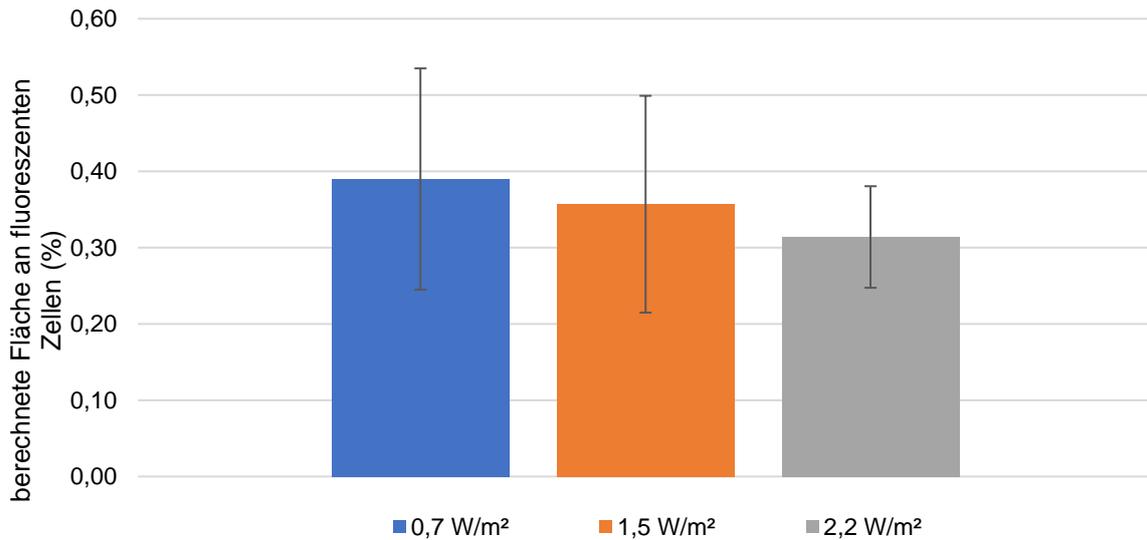


Abbildung 25: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (5,53 μ g) und pKM-EGFP (2,77 μ g) nach einstündiger Illumination bei 660 nm mit unterschiedlichen Illuminationsintensitäten (0,7 W/m², 1,5 W/m² und 2,2 W/m²) in einer 6-well-Platte nach 15 μ M PCB-Zugabe; N=5.

Bei Betrachtung der Abbildung ist ein leichter negativer Trend erkennbar, denn bei steigender Illuminationsintensität scheint die berechnete Fläche an fluoreszierenden Zellen abzunehmen (0,39 % bei 0,7 W/m², 0,36 % bei 1,5 W/m² und 0,31 % bei 2,2 W/m²). Zieht man jedoch die Standardabweichungen der Werte in die Betrachtung mit ein, so konnte kein aussagekräftiger Unterschied zwischen den Proben (Mittelwert bei 0,35 %) ermittelt werden.

Abbildung 26 zeigt die berechneten Flächen an fluoreszierenden Zellen nach einer Transfektion mit den pKM-022 und pKM-EGFP ohne Zugabe des Cofaktors PCB.

Ergebnisse

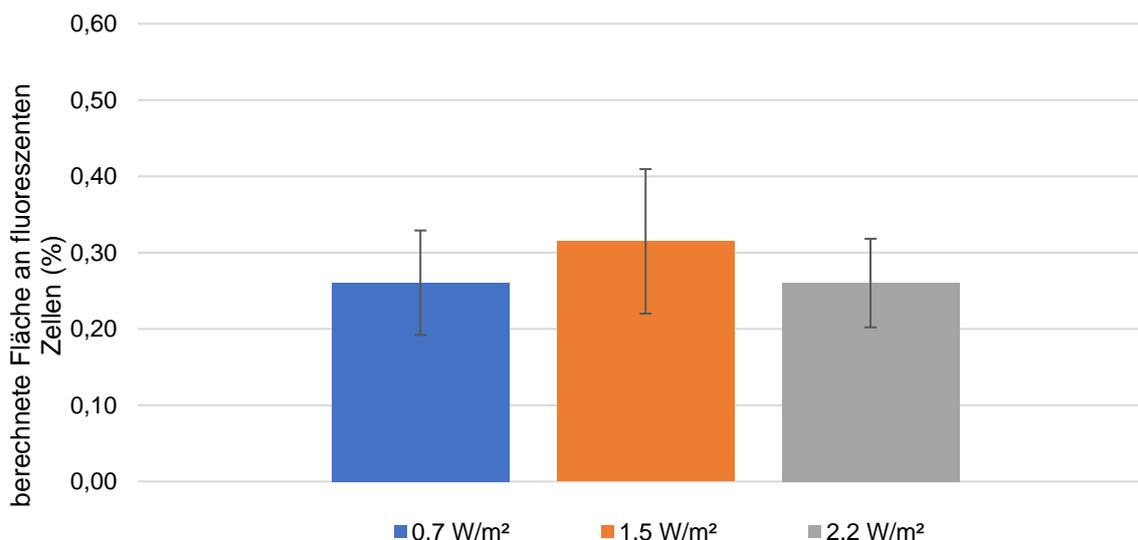


Abbildung 26: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (5,53 μ g) und pKM-EGFP (2,77 μ g) nach einstündiger Illumination bei 660 nm mit unterschiedlichen Illuminationsintensitäten (0,7 W/m², 1,5 W/m² und 2,2 W/m²) in einer 6-well-Platte ohne PCB-Zugabe; N=5.

Es konnte kein Unterschied zwischen den Proben festgestellt werden (0,26 % bei 0,7 W/m², 0,31 % bei 1,5 W/m² und 0,26 % bei 2,2 W/m²). Der Durchschnittswert der *Leakage* in diesem Experiment betrug 0,28 %.

Die Unterschiede in den Messwerten der *Leakage* (0,28 %) und des optogenetisch aktivierten PhyB-Systems (0,35 %) lagen im Bereich ihrer Standardabweichungen. Daher war keine eindeutige optogenetische Aktivierung des Systems nachweisbar.

3.1.5 Variation des Arbeitsabstandes

Eine weitere Möglichkeit der Optimierung war die Vergrößerung des Arbeitsabstandes zwischen den Zellen und den LEDs, ausgehend von dem Ausgangswert von 15 cm [27]. Eine Verringerung des Arbeitsabstandes schien im vorliegenden Versuchsaufbau nicht sinnvoll, da dadurch keine vollständige Illumination der gesamten Well-Platte mit gleicher Illuminationsintensität nicht gewährleistet werden konnte. Somit wären die gewonnenen Erkenntnisse nicht mit den anderen Versuchen vergleichbar.

In Abbildung 27 sind die mit Image J berechneten Flächen an fluoreszierenden Zellen nach einer PEI Transfektion mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 mit eGFP

Marker und PCB-Zugabe dargestellt. Für die Auswertung wurden jeweils vier oder fünf repräsentative Fluoreszenzaufnahmen verwendet.

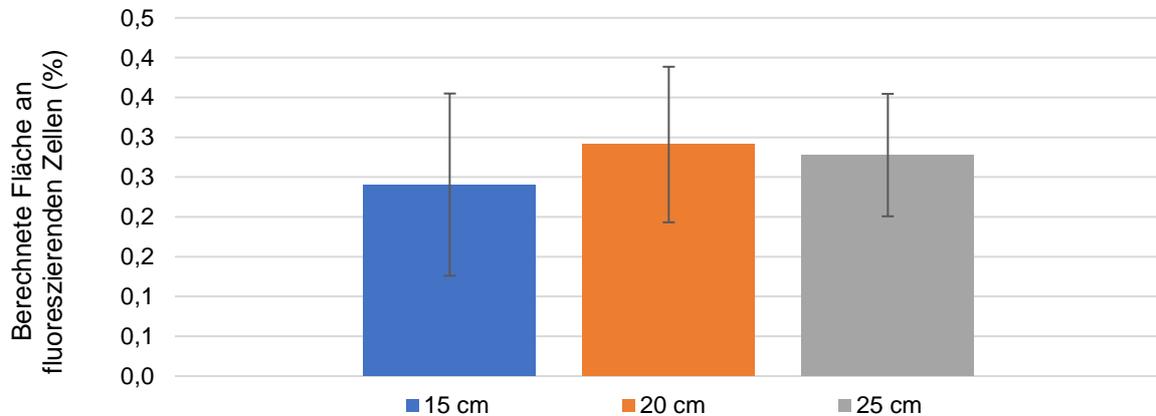


Abbildung 27: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (5,53 μ g) und pKM-EGFP (2,77 μ g) nach einstündiger Illumination bei 660 nm (1,45 W/m²) bei unterschiedlichen Arbeitsabständen zwischen Zellen und LEDs in einer 6-well-Platte nach PCB Zugabe (15 μ M); N=5.

Es ist zu erkennen, dass alle verwendeten Arbeitsabstände zu einer gleich großen fluoreszierenden Fläche von ungefähr 0,27 % führen. Zwischen den Proben (0,24 % bei 15 cm, 0,29 % bei 20 cm und 0,28 % bei 25 cm) konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden.

Die Vergleichsproben des optogenetischen Plasmids mit eGFP Marker (pKM-022 mit pKM-EGFP) ohne PCB Zugabe (siehe Abbildung 28) zeigten ebenfalls keine aussagekräftigen Unterschiede, der Mittelwert lag bei 0,34 %.

Ergebnisse

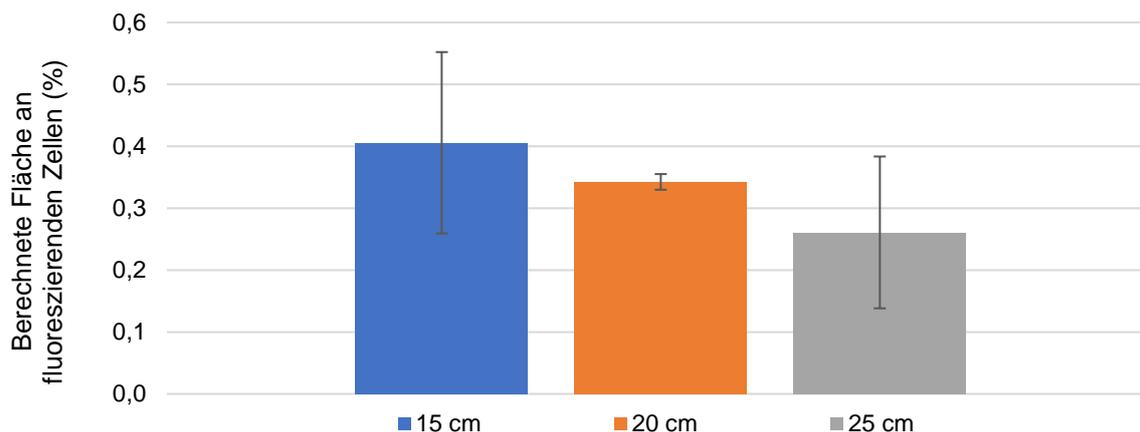


Abbildung 28: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (5,53 μ g) und pKM-EGFP (2,77 μ g) nach einstündiger Illumination bei 660 nm (1,45 W/m²) bei unterschiedlichen Arbeitsabständen zwischen Zellen und LEDs in einer 6-well-Platte ohne PCB Zugabe; N=5.

Es konnte jedoch ein negativer Trend beobachtet werden, derart dass mit steigendem Arbeitsabstand die Fläche an fluoreszierenden Zellen sank (0,41 % bei 15 cm, 0,34 % bei 20 cm und 0,26 % bei 20 cm).

Die Unterschiede in den Messwerten der *Leakage* (0,34 %) und des optogenetisch aktivierten PhyB-Systems (0,27 %) lagen auch bei diesem Experiment im Bereich ihrer Standardabweichungen. Daher war keine eindeutige optogenetische Aktivierung des Systems nachweisbar.

3.1.6 Variation der zugegebenen PCB-Menge

Als nächstes wurde die dem Medium zugegebene PCB-Menge, ausgehend von der Standard Menge [27] von 15 μ M, variiert. In den folgenden Experimenten wurden die Auswirkungen von PCB-Zugaben zwischen 7,5 μ M und 22,5 μ M eine Stunde vor der einstündigen Illumination mit 660 nm auf die eGFP Expression von CHO-K1 Zellen dokumentiert. Auf die Verwendung größerer PCB-Mengen wurde verzichtet, da PCB in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst wurde, was in größeren Mengen zelltoxisch wirkt. Die Auswertung erfolgte abermals mit der Software Image J und dem dafür erstellten Makro. Es wurden für jeden Versuch fünf repräsentative Fluoreszenzaufnahmen erstellt und ihre berechneten Ergebnisse für eine PEI Transfektion mit dem

Ergebnisse

optogenetischen Plasmid pKM-022 mit eGFP Marker gemittelt. Die Ergebnisse sind Abbildung 29 zu entnehmen.

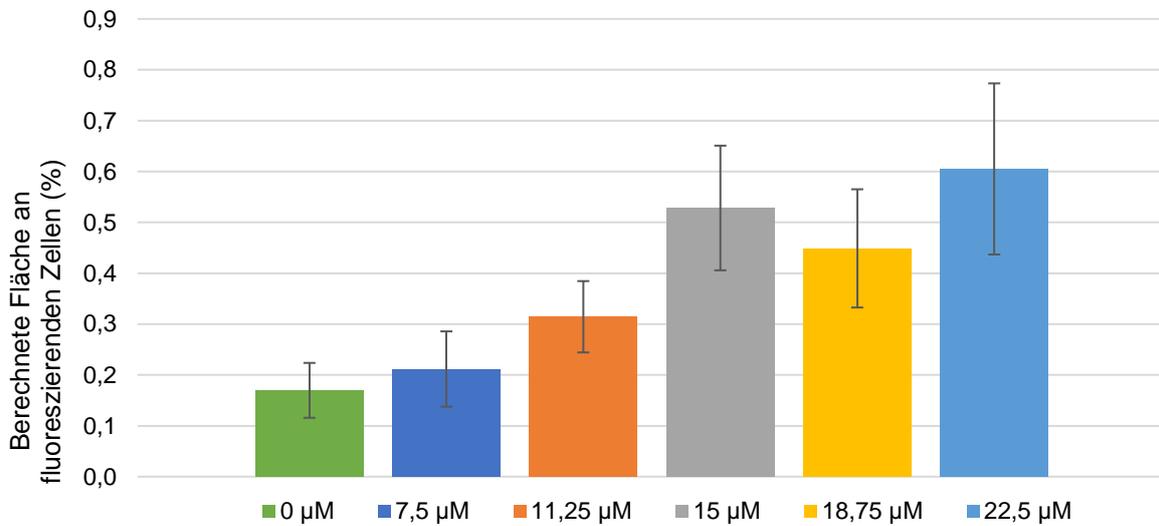


Abbildung 29 Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μL , 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (5,53 μg) und pKM-EGFP (2,77 μg) nach einstündiger Illumination bei 660 nm (1,45 W/m^2) nach Zugabe von verschiedenen PCB-Mengen (0 μL , 7,5 μL , 11,25 μL , 15 μL , 18,75 μL und 22,5 μL); N=5.

In der Abbildung kann man erkennen, dass eine Verringerung der PCB-Konzentration ausgehend von 15 μM (0,53 %) zu einer Reduzierung der fluoreszierenden Flächen (0,31 % bei 11,25 μM PCB und 0,21 % bei 7,5 μM) führte. Eine Erhöhung der PCB-Konzentration ausgehend von 15 μM führte hingegen zu keiner Steigerung der fluoreszierenden Flächen (0,45 % bei 18,75 μM und 0,61 % bei 22,5 μM). Trug man die gemessenen Werte in eine Kurve auf, so war von der Negativkontrolle bis zu einer Konzentration von 15 μM eine lineare Steigung erkennbar. Ab einer Konzentration von 15 μM flachte die Kurve jedoch deutlich ab, was auf eine Sättigung hindeutete. Die Fläche an fluoreszierenden Zellen konnte durch eine Steigerung der PCB Menge von 7,5 μM auf 22,5 μM verdreifacht werden.

Die *Leakage* dieses Experiments betrug 0,17 %. In Anbetracht der Standardabweichungen konnte man ab einer PCB Konzentration von 11,25 μM eine Lichtaktivierung des optogenetischen PhyB-Systems nachweisen.

Da die Kurve ab einer Konzentration von 15 μM PCB abflacht und große PCB Mengen wegen des enthaltenen DMSOs toxisch wirken, wurde in den nachfolgenden Experimenten eine PCB Konzentration von 15 μM verwendet.

3.1.7 Variation des Plasmidverhältnisses

Als nächster Optimierungsschritt wurde das Plasmidverhältnis zwischen dem optogenetischen Plasmid pKM-022 und pKM-EGFP, ausgehend von einem 1:1 Verhältnis, variiert. Hierbei blieb die Gesamtplasmidmenge der PEI Transfektion in CHO-K1 Zellen konstant. Diese Menge wurde dabei auf die verschiedenen getesteten Plasmidverhältnisse (1:1, 1:2, 2:1 und 3:1) aufgeteilt. Drei Tage nach der Transfektion wurden mittels Fluoreszenzmikroskop repräsentative Bilder aufgenommen, deren Flächen an fluoreszierenden Zellen ebenfalls mittels der Software Image J berechnet wurden. Für die Verhältnisse 1:1 und 1:2 sowie die Probe ohne PCB wurde jeweils der Mittelwert aus fünf Bildern, für das Verhältnis 2:1 aus zwei Bildern und für das Verhältnis 3:1 aus einem Bild ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

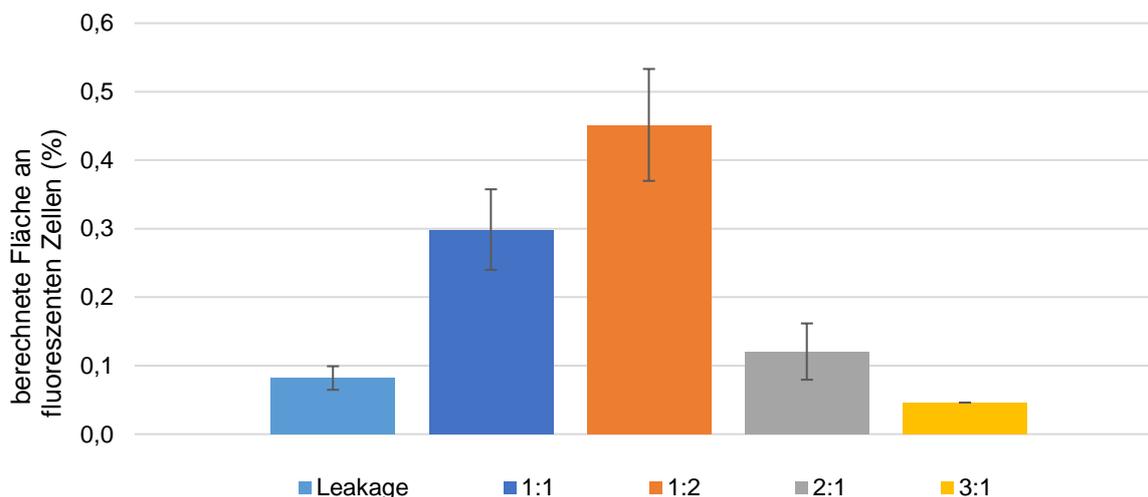


Abbildung 30: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 und pKM-EGFP nach einstündiger Illumination bei 660 nm (1,45 W/m²) mit 15 μ M PCB-Zugabe bei verschiedenen Plasmidverhältnissen (1:1 mit jeweils 4,15 μ g, 2:1 mit 5,53 μ g pKM-022 und 2,77 μ g pKM-EGFP, 1:2 mit 2,77 μ g pKM-022 und 5,53 μ g pKM-EGFP, 3:1 mit 8,31 μ g pKM-022 und 2,77 μ g pKM-EGFP); N=5.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass ein Plasmidverhältnis von 1:2 (0,45 %) im Vergleich zu einem Verhältnis von 1:1 (0,3 %) zu einer Erhöhung der Proteinexpression führte, während Plasmidverhältnisse von 2:1 (0,12 %) und 3:1 (0,05 %) zu einer Verminderung der Proteinexpression führten.

Die ermittelte *Leakage* in diesem Experiment lag bei 0,08 %. Bei den Plasmidverhältnissen 1:1 und 1:2 konnte die optogenetische Aktivierung der Proteinexpression nachgewiesen werden, während bei den Verhältnissen von 2:1 und 3:1 kein Unterschied zur *Leakage* bestand.

In den nachfolgenden Experimenten wurde daher mit einem Plasmidverhältnis von 1:2 zwischen pKM-022 und pKM-EGFP weitergearbeitet.

3.1.8 Laser-Illumination

Vergleichend zur verwendeten LED-Illumination mit 660 nm wurde bei identischen Versuchsbedingungen auch eine Illumination mittels eines 660 nm Lasers ausgetestet, da dieser für spätere therapeutische Anwendungen eine größere Relevanz haben würde. Der einzige Unterschied bestand in der Illumination, denn während die LEDs alle Zellen gleichzeitig für eine Stunde illuminierten, fuhr der Laser lediglich mehrfach einen quadratischen Bereich im Well in Bahnen ab. Die LED-Illumination erfolgte konstant 60 Minuten lang bei einer Beleuchtungsstärke von 1,45 W/m², was eine Gesamtillumination von 0,52 W*s/cm² ergibt. Die Laser-Illumination erfolgte aufgrund der kleinen Laserfläche bei 5474930 W/m². Zog man den beim Abrastern des Wells zurückgelegten Weg (bzw. die hierbei illuminierte Fläche) sowie die Lasergeschwindigkeit von 10 mm/s und die Gesamtilluminationszeit von 30 Minuten in Betracht, so kam man auf eine Gesamtillumination von 67,4 W*s/cm². Die Laser-Illuminationsintensität war somit deutlich stärker als bei der LED-Illumination (Faktor 130).

Für die mittels Image J berechneten Flächen stand lediglich eine repräsentative Aufnahme pro Probe zur Verfügung (siehe Abbildung 31).

Ergebnisse

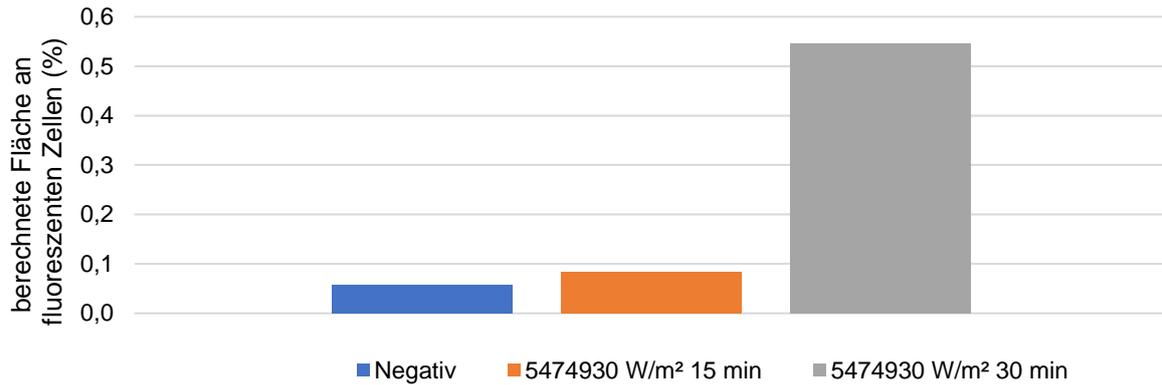


Abbildung 31: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (6 μL , 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (1,1 μg) und pKM-EGFP (0,55 μg) nach 15- und 30-minütiger Laser-Illumination bei 660 nm (5474930 W/m²) mit einer Lasergeschwindigkeit von 10 mm/s nach 15 μM PCB-Zugabe in einer 24-well-Platte.

Es ist zu erkennen, dass eine 15-minütige Illumination mit einer Beleuchtungsstärke von 5474930 W/m² und einer Abrastergeschwindigkeit von 10 mm/s zu keinem Anstieg der eGFP Expression führte (0,08 % im Vergleich zur *Leakage* von 0,06 %). Wurde die Illuminationsdauer jedoch auf 30 Minuten erhöht, so war ein Anstieg der eGFP Expression (0,55 %) um den Faktor 10 erkennbar (siehe Abbildung 32).

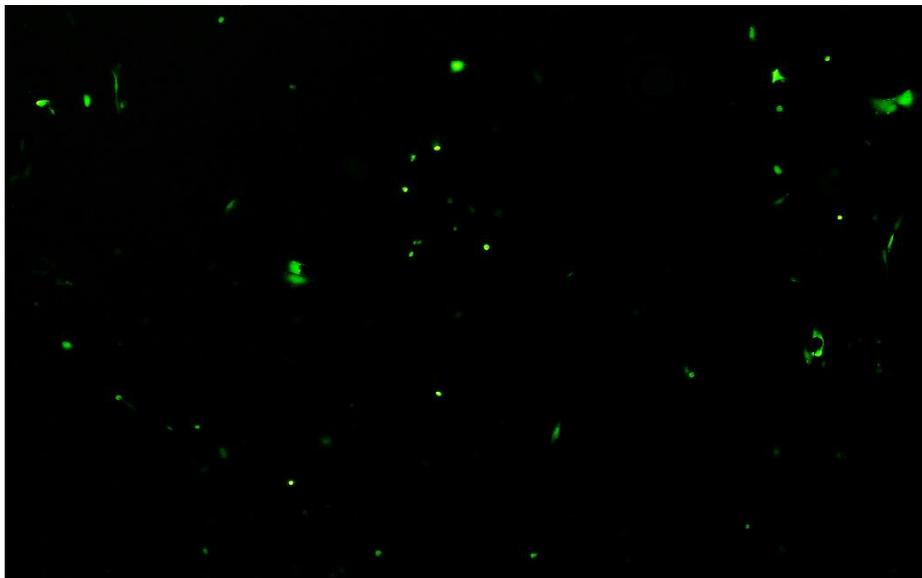


Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in 4-facher Vergrößerung von CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (6 μL , 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (1,1 μg) und pKM-EGFP (0,55 μg) nach 30-minütiger Laser-Illumination bei 660 nm (5474930 W/m²) mit einer Lasergeschwindigkeit von 10 mm/s nach 15 μM PCB-Zugabe in einer 24-well-Platte.

Auch hier konnte die optogenetische Aktivierung der Genexpression nach 30-minütiger Laser-Illumination mit 54734930 W/m^2 und einer Lasergeschwindigkeit von 10 mm/s nachgewiesen werden. Die ermittelte Proteinmenge war hierbei mit der Proteinexpression nach 60-minütiger LED-Illumination vergleichbar, bei nur halber Illuminationsdauer.

3.1.9 PhyB-System mit anderem Bindungsmechanismus

Ein weiterer Einflussfaktor der die Genexpression des PhyB-Systems inhibieren kann ist der Tetrazyklin-Rezeptor, denn die Bindung des optogenetischen Plasmids pKM-022 an das Zielplasmid des PhyB-Systems beruht auf der Bindung des Tetrazyklin Rezeptors an den Tetrazyklin Operator. Dieser bindet jedoch nur in Abwesenheit von Tetrazyklin. Da der Hersteller des in den Experimenten verwendeten fötalen Kälberserums ein Vorhandensein von Tetrazyklin nicht ausschließen konnte, wurden zu Testzwecken zwei andere Plasmide des PhyB-Systems, die uns von [27] zur Verfügung gestellt wurden, getestet. Die Funktion dieser neuen Plasmide pLK-001 und pKT-393 ist analog zu den Plasmiden pKM-022 und pKM-EGFP, lediglich der Bindungsmechanismus basiert nicht auf dem Tetrazyklin Rezeptor. Diese Plasmide wurden in Doppelbestimmung in den Verhältnissen 1:1 und 1:2 transfiziert und die Proben wurden später mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops betrachtet. Es konnten jedoch keine fluoreszierenden Zellen nachgewiesen werden.

3.1.10 PhyB-System in HEK293 Zellen

Im Anschluss an die Optimierungen wurde das optogenetische PhyB-System auf eine andere Zellart überführt. Hiermit sollte überprüft werden, ob die Zellart eventuell einen inhibierenden Einfluss, z. B. durch Promoter-*silencing*, auf die Genexpression des PhyB-Systems haben würde. Hierfür wurde die menschliche HEK293 Zelllinie ausgewählt, da sie einfach zu transfizieren ist. Transfiziert wurden die Zellen mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 in Kombination mit pKM-EGFP mittels chemischer Transfektion mit dem Reagenz DreamFect™ Gold. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometermessung des Markers eGFP. Die Ergebnisse des in

Einfachbestimmung durchgeführten Experiments können Abbildung 33 entnommen werden.

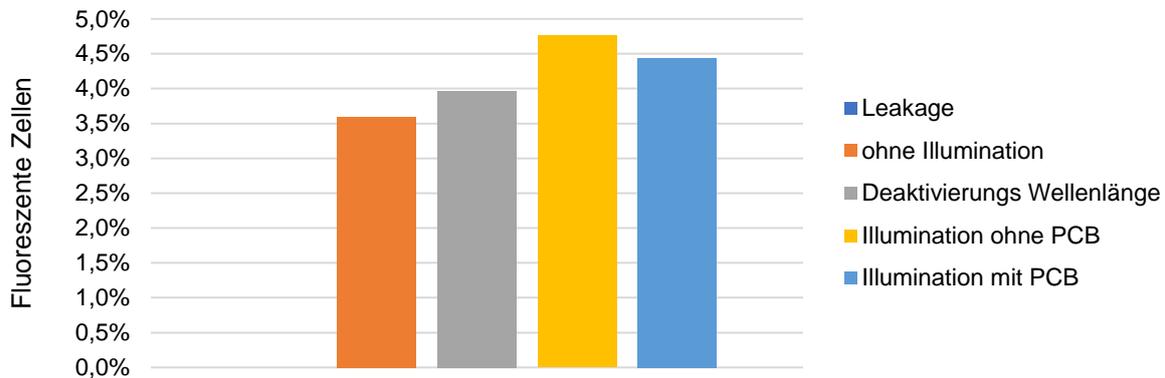


Abbildung 33: Mittels Durchflusszytometer gemessene Anteile an fluoreszierenden HEK293 Zellen nach DreamFect™ Gold Transfektion (15 μ L) mit dem optogenetisch aktivierbaren PhyB-System pKM-022 (3,75 μ g) und pKM-EGFP (7,5 μ g) nach einstündiger Illumination mit 660 nm (1,45 W/m²) mit 15 μ M PCB-Zugabe.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass sich die *Leakage* des PhyB-Systems im Bereich von 3,6 % bis 4,8 % befindet. Hierfür wurden drei verschiedene Negativkontrollen vermessen. Bei Zellen die nicht transfiziert wurden konnten keine fluoreszierenden Zellen nachgewiesen werden. Zellen, die nicht illuminiert wurden, hatten eine *Leakage* von 3,6 % während Zellen, die mit der Deaktivierungswellenlänge von 740 nm eine Stunde illuminiert wurden einen fluoreszierenden Anteil von 4,0 % aufwiesen. Zellen, die mit der Aktivierungswellenlänge von 660 nm illuminiert wurden ohne das dem Zellkulturmedium das Chromophor (PCB) beigemischt wurde hatten 4,8 % fluoreszierende Zellen. Da die Experimente in Einfachbestimmung erstellt wurden und die Differenzen der Ergebnisse relativ gering waren, kann nicht eindeutig von Unterschieden gesprochen werden.

Betrachtet man das Ergebnis der illuminierten Probe, dessen Medium mit PCB versetzt wurde, so fällt auf, dass das Ergebnis von 4,4 % im Bereich der *Leakage* lag. Die optogenetische Aktivierung der Proteinexpression konnte somit nicht nachgewiesen werden.

3.1.11 Klonierung des Zielpasmids mit BDNF Marker

Da sich der für die Optimierung verwendete Proteinmarker eGFP als nicht optimal herausgestellt hatte, sollten für die lichtinduzierte Genexpression des PhyB-Systems

weitere Proteinmarker getestet werden. Hierfür wurde das für spätere therapeutische Anwendungen relevante Protein BDNF ausgewählt. Um eine optogenetisch-induzierte BDNF Synthese zu realisieren, musste zuerst das Zielplasmid für eine BDNF Expression kloniert werden. Die verwendete Klonierungsstrategie zur Erstellung der Zielplasmids pKM-BDNF ist in Abbildung 34 dargestellt.

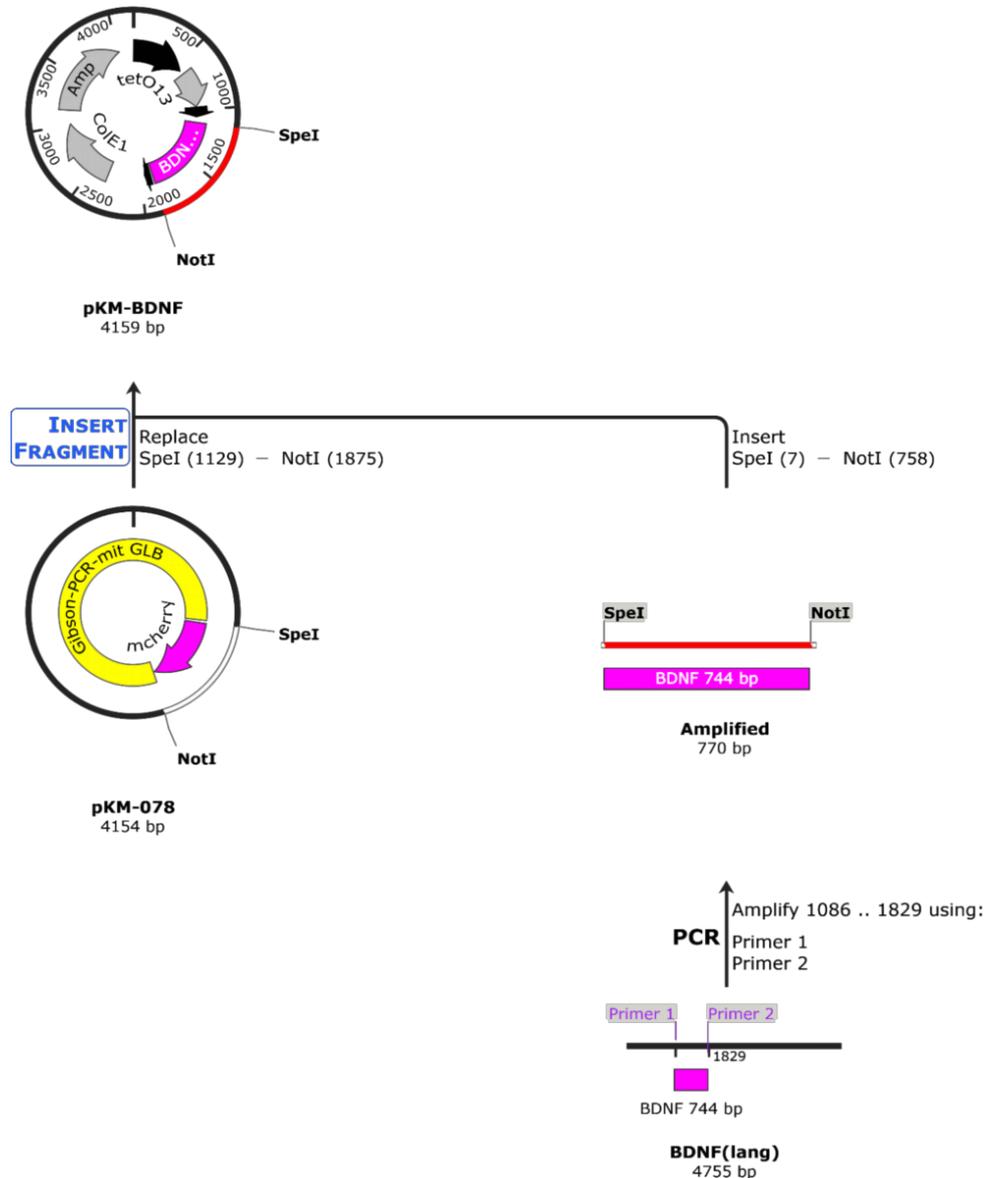


Abbildung 34: Verwendete Klonierungsstrategie zur Erstellung des Zielplasmids pKM-BDNF ausgehend vom Plasmidvektor pKM-078 und dem Insert BDNF.

Hierfür bestand der Plasmidvektor aus pKM-078 (mit Expression einer roten mCherry Fluoreszenz) das bereits für die Klonierung des in der Masterarbeit erstellten Zielplasmids pKM-EGFP mit eGFP Marker verwendet wurde. Der Plasmidvektor wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *NotI* linearisiert, indem die Sequenz für mCherry herausgeschnitten wurde. Die Sequenz für BDNF wurde aus dem Plasmid

BDNF mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) amplifiziert. Die verwendeten Primer (Primer 1: pKM-BDNF *forward* und Primer 2: pKM-BDNF *reversed*) erhielten Überhänge, sodass die BDNF Sequenz während der PCR um die Schnittstellen für NotI und SpeI verlängert wurde. Das PCR Amplifikat wurde anschließend ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten. Beide Plasmide wiesen somit komplementäre Schnittstellen an ihren Enden auf die es ermöglichten, sie mit Hilfe von Ligase zusammenzufügen. Da beide verwendeten Restriktionsenzyme *sticky ends* produzierten, konnte das Insert nur in der gewünschten Richtung eingefügt werden, wodurch unerwünschte Nebenprodukte vermieden wurden. Das klonierte Plasmid wurde anschließend in Bakterien transformiert die es vervielfältigten. Mittels eines Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Aufreinigungs Kits erfolgte die Aufreinigung. Eine nachfolgende Gelelektrophorese wurde verwendet, um die Größe des entstandenen Plasmids zu bestimmen, was bei Übereinstimmung mit der gewünschten Größe eine erste Überprüfung des Klonierungserfolgs darstellte. Zur genauen Verifizierung des Endproduktes wurde das erstellte Plasmid zusätzlich noch sequenziert. Das Sequenzierungsergebnis bestätigte die erfolgreiche Klonierung von pKM-BDNF.

3.1.12 SEAP-Expression

Zusätzlich wurde die Expression eines weiteren Proteins vergleichend getestet. Hierfür wurden das optogenetisch aktivierbare Plasmid pKM-022 und das Testplasmid pSAM200 mit dem Plasmid pKM-006 mit SEAP Marker kombiniert, dass uns [27] zur Verfügung stellte. Die Auswertung jeweils vier identischer Proben erfolgte drei Tage nach der Transfektion mittels SEAP-Assay. Dabei konnte in keiner Probe SEAP nachgewiesen werden. Eine erneute Versuchsdurchführung bestätigte das Ergebnis.

3.1.13 BDNF-Expression

Das PhyB-System wurde ebenfalls mit dem klonierten Zielplasmid pKM-BDNF getestet, da der BDNF Marker für die klinische Anwendung der Optogenetik im Innenohr relevant ist. Für die Evaluation von mittels der chemischen Transfektionsmethode mit PEI transfizierten CHO-K1 Zellen wurden zwei gleiche

Proben mit einem BDNF ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) jeweils doppelt vermessen. Die resultierenden Mittelwerte der anhand der Kalibriergeraden berechneten BDNF Konzentrationen sind in Abbildung 35 dargestellt.

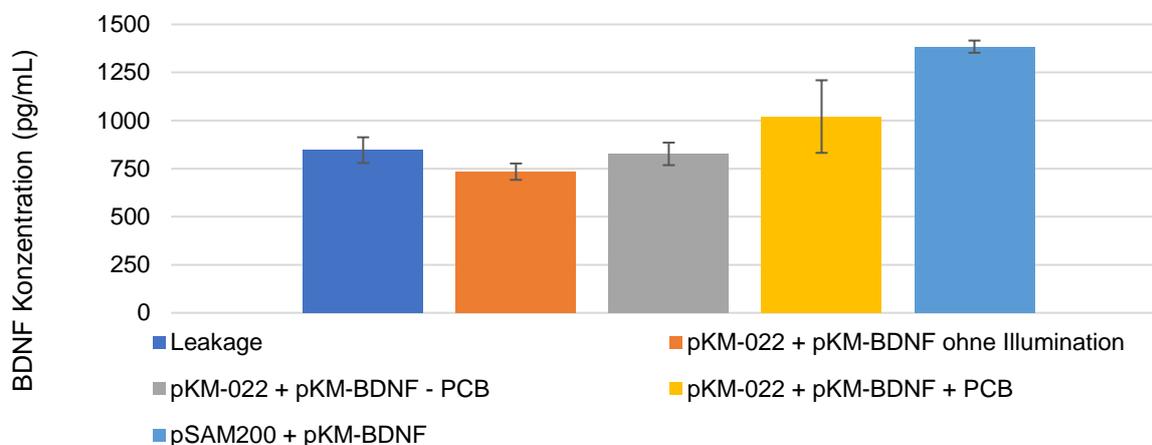


Abbildung 35: Mittels BDNF ELISA ermittelte BDNF Konzentrationen von CHO-K1 Zellen PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) von unterschiedlichen Plasmidkombinationen des PhyB-Systems (3,46 μ g pKM-022/pSAM200 und 1,73 μ g pKM-BDNF) nach einstündiger Illumination mit 660 nm (1,45 W/m²) mit und ohne 15 μ M PCB-Zugabe; N=4.

Als erstes fällt auf, dass die Negativkontrolle (nur Zellen ohne DNA) eine BDNF Konzentration von ungefähr 850 pg/ μ L aufweist. Vergleicht man diesen Wert mit den Konzentrationen der *Leakage* des optogenetischen Systems (ohne Illumination und PCB-Zugabe), so ist zu erkennen, dass es keinen Unterschied zur Negativkontrolle gibt.

Das Testplasmid (pSAM200 mit pKM-BDNF) zeigt mit einer Konzentration von 1385 pg/mL eine deutlich höhere BDNF Expression als die Negativkontrolle/*Leakage*. Betrachtete man allerdings die optogenetisch aktivierbare BDNF Expression mit 1020 pg/mL, so konnte aufgrund der hohen Standardabweichung nicht von einer erhöhten BDNF Expression gesprochen werden, obwohl der Mittelwert oberhalb der *Leakage* lag.

3.2 Transfektion von humanen mesenchymalen Stammzellen

Durch die Optimierungen der Proteinexpression des PhyB-Systems konnte zwar eine optogenetisch-induzierte Proteinexpression nachgewiesen werden, die aber durch die relativ hohe *Leakage* des Systems relativiert wurde. Zusätzlich waren sowohl die Höhe

der *Leakage* wie auch der Genexpression stark von der Konfluenz der Zellen abhängig, was in hohen Standardabweichungen und in Schwankungen der Expressionswerte resultierte. Daher wurden andere optogenetische Systeme gesucht, die eine stabilere Genexpression mit geringerer *Leakage* in Säugetierzellen aufwiesen und somit besser für therapeutische Anwendungen geeignet sein würden.

Ebenso wurde an einer geeigneten Co-Transfektionsmethode für aus Fettgewebe isolierten humanen mesenchymalen Stammzellen gearbeitet. hMSCs sind für spätere therapeutische Anwendungen besonders geeignet, da sie relativ einfach aus Patientengewebe isoliert werden können, wodurch ungewollte Immunreaktionen vermieden werden. Immortalisierte Modell-Zelllinien wie CHO-K1 oder HEK293 Zellen hingegen sind für spätere therapeutische Anwendungen an Patienten nicht geeignet. Somit bestand die Aufgabe darin, eine Transfektionsmethode für ADhMSCs mit eGFP Marker zu etablieren, die zu einer möglichst hohen Proteinexpression führten sollte, um im Anschluss auf eine Co-Transfektion ausgeweitet zu werden.

In diesem Kapitel sind die Optimierungen der physikalischen Transfektion durch Elektroporation, der chemischen Transfektion durch Lipofektion mit drei verschiedenen Reagenzien dargestellt sowie einer chemischen Transfektion mit zwei verschiedenen Reagenzien, die die Plasmide ähnlich dem Mechanismus einer viralen Transfektion in die Zelle bringen. Mit LFR (*lipofection reagent*) ist das im jeweiligen Kapitel verwendete Transfektionsreagenz gemeint.

3.2.1 Viromer® Red

Das erste getestete Transfektionsreagenz für ADhMSCs war Viromer® Red, dessen Wirkmechanismus einer viralen Transfektion gleicht. Hierbei wurde mit einer Einfachtransfektion von eGFP begonnen wobei die Transfektionsreagenzmenge nach Herstellerangaben [291] variiert wurde. „Faktor 1“ bezieht sich hierbei auf die standardmäßig verwendete Menge Transfektionsreagenz. „Faktor 0,5“ bedeutet halb so viel Reagenz wie bei „Faktor 1“ während „Faktor 1,5“ für 50 % mehr Transfektionsreagenz steht. Drei Tage nach der Transfektion wurden jeweils zwei repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transfizierten ADhMSCs angefertigt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Image J. Die

berechneten Flächen an fluoreszierenden Zellen für die verschiedenen Mengen sind in Abbildung 36 dargestellt.

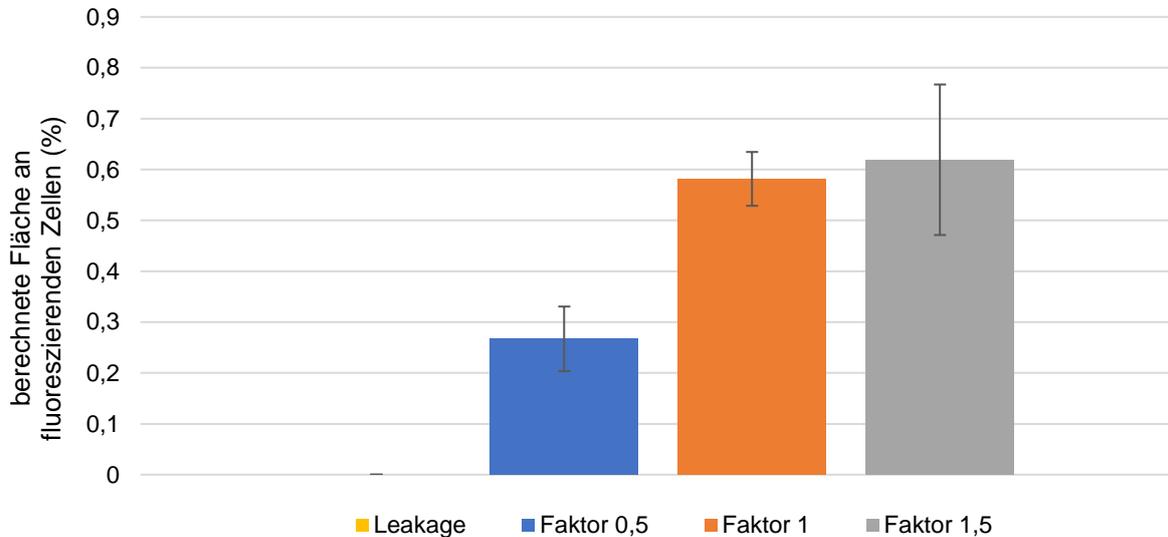


Abbildung 36: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden ADhMSCs (AD33J Passage 3) drei Tage nach eGFP (11 ng/ μ L) Single-Transfektion mit verschiedenen Mengen (25 μ L, 50 μ L und 75 μ L) des Transfektionsreagenzes Viromer® Red in einer 24-well-Platte; N=2.

Auf den Bildern der Negativkontrolle konnten keine fluoreszierenden Zellen nachgewiesen werden. Die Probe „Faktor 0,5“ wies 0,27 % fluoreszierende Zellen auf. Im Vergleich dazu konnte in den Proben „Faktor 1“ mit 0,58 % und „Faktor 1,5“ mit 0,62 % eine Steigerung der fluoreszierenden Fläche, genau genommen eine Verdoppelung, festgestellt werden. Zwischen den Proben „Faktor 1“ und „Faktor 1,5“ bestand jedoch kein Unterschied. Daher wurde die im Herstellerprotokoll standardmäßig verwendete Menge an Transfektionsreagenz für die nachfolgenden Experimente verwendet.

Nach der Negativkontrolle wurde überprüft, wie sich eine Verdopplung der Plasmidmenge auf die Menge fluoreszierender Zellen auswirkte. Mit einer berechneten Fläche von 0,42 % wurden weniger fluoreszierende Zellen nachgewiesen als bei der im Protokoll angegebenen Plasmidmenge.

Da es sich bei den durchgeführten Experimenten um Einzeltransfektionen mit nur einem Plasmid handelte sind die resultierenden Ergebnisse und die durch Veränderungen der Transfektionsbedingungen erzielten Resultate zu gering, um das verwendete Transfektionsreagenz auf Multi-Transfektionen zu übertragen.

3.2.2 Viomer® Plasmid

Bei dem als zweites getesteten Transfektionsreagenz Viomer® Plasmid handelte es sich um eine neuere Version des Transfektionsreagenz Viomer® Red, das speziell für schwierig zu transfizierenden Zellen, wie z. B. Stammzellen, entwickelt wurde. Nach einer Einzeltransfektion mit eGFP konnten nur vereinzelte, schwach fluoreszierende Zellen detektiert werden. Es waren deutlich weniger fluoreszierende Zellen als nach einer Transfektion mit Viomer® Red. Daher wurden die Experimente mit diesem Transfektionsreagenz nicht fortgesetzt.

3.2.3 Lipofektamine Stem

Das dritte getestete Reagenz war Lipofektamine Stem, das für die chemische Transfektion von Stammzellen entwickelt wurde. Zu Testzwecken wurden Einfach-Transfektionen von ADhMSCs mit eGFP nach Hersteller-Protokoll durchgeführt. Drei Tage nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz mit Hilfe eines Durchflusszytometers bestimmt. Die Ergebnisse für die in Doppelbestimmung getesteten verschiedenen Verhältnisse von Transfektionsreagenz und DNA-Menge sind in Abbildung 37 für lineare und circulare DNA dargestellt.

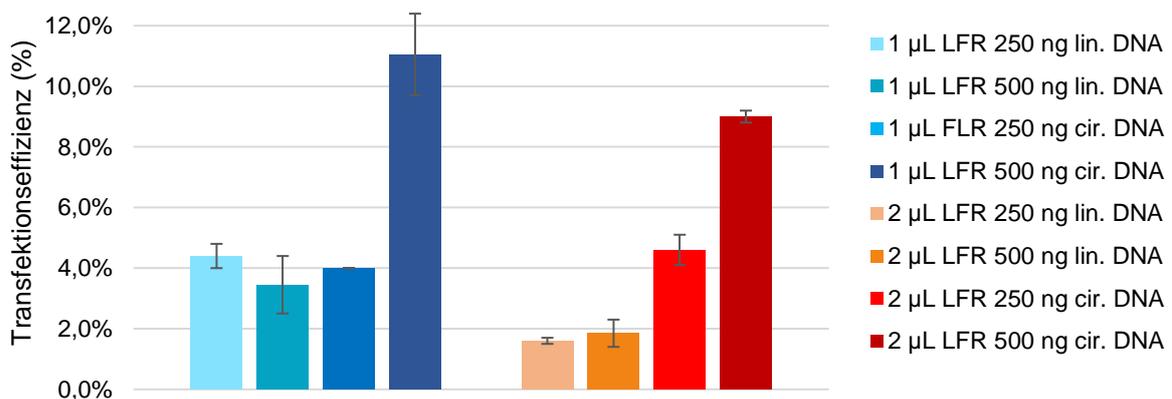


Abbildung 37: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienz von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 250 ng und 500 ng EGFP (lineare und circulare DNA) mit Lipofektamine Stem (1 µL und 2 µL) transfiziert wurden. mit verschiedenen Mengen von Transfektionsreagenz und DNA (linear und circular) in einer 24-well-Platte; N=2.

Betrachtet man die linke Seite der Abbildung, bei der die Proben mit 1 µL Lipofektamine Stem transfiziert wurden, so fiel auf, dass mit linearer DNA (türkis-

farbener Balken) nur eine Transfektionseffizienz von ca. 4 % erreicht wurde, unabhängig von der verwendeten DNA-Menge. Auch bei der Verwendung von 250 ng circulärer DNA wurden lediglich 4 % der Zellen transfiziert. Wurde die verwendete Menge circulärer DNA aber auf 500 ng erhöht, so erhöhte sich auch die Transfektionseffizienz auf ca. 11 %.

Die rechte Seite der Abbildung zeigt die Transfektionseffizienzen der Proben, die mit 2 µL Lipofektamine Stem transfiziert wurden. Die Proben, bei denen lineare DNA verwendet wurden (orangefarbener Balken), zeigten eine maximale Transfektionseffizienz von 2 %. Proben mit 250 ng circulärer DNA zeigten erneut nur eine Transfektionseffizienz von 4 %. Wurden 500 ng DNA verwendet, so konnte eine Transfektionseffizienz von 9 % gemessen werden.

Es konnte demnach festgestellt werden, dass eine Linearisierung der DNA nur zu sehr geringen Transfektionseffizienzen führte, geringer als bei der Verwendung von circulärer DNA. Die Verdopplung der eingesetzten circulären DNA-Menge von 250 ng auf 500 ng führte zu einer deutlichen Steigerung der Transfektionseffizienz. Verglich man die Ergebnisse für 1 µL und 2 µL Lipofektamine Stem mit 500 ng circulärer DNA, so fiel auf, dass mit 1 µL Transfektionsreagenz eine etwas höhere Transfektionseffizienz als mit 2 µL erzielt wurde.

3.2.4 X-tremeGENE™ 9

X-tremeGENE™ 9 war das vierte chemische Transfektionsreagenz, das für ein Transfektion von ADhMSCs getestet wurde. Auch bei diesem Reagenz wurde die Transfektionseffizienz mit einem Durchflusszytometer drei Tage nach der Transfektion gemessen. Von jeder getesteten Kombination aus Transfektionsreagenzmenge und DNA-Menge wurden jeweils zwei homologe Proben erstellt. Die resultierenden Transfektionseffizienzen können der Abbildung 38 entnommen werden.

Ergebnisse

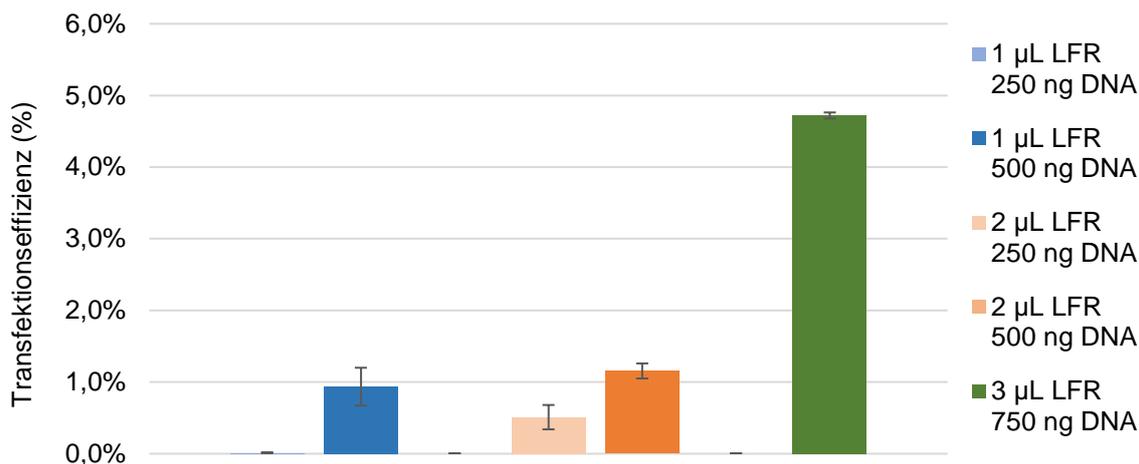


Abbildung 38: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienz von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 250 ng, 500 ng oder 750 ng EGFP mit X-tremeGENE™ 9 (1 μL, 2 μL und 3 μL) transfiziert wurden in einer 24-well-Platte; N=2.

Der Abbildung kann entnommen werden, dass sowohl bei Verwendung von 1 μL wie auch bei 2 μL Transfektionsreagenz in Kombination mit 250 ng und 500 ng DNA nur eine maximale Transfektionseffizienz von 1 % erreicht wurde. Wurden hingegen 750 ng DNA mit 3 μL X-tremeGENE™ 9 transfiziert, so konnte die Transfektionseffizienz auf 4,8 % gesteigert werden.

3.2.5 DreamFect™ Gold

Das fünfte für die ADhMSC Transfektion getestete chemische Transfektionsreagenz war DreamFect™ Gold. Analog zu den vorherigen zwei Kapiteln wurden auch hier die Mengen an Transfektionsreagenz und DNA variiert. Per Durchflusszytometer erfolgte die Auswertung der in Doppelbestimmung erstellten Proben. In Abbildung 39 können die Ergebnisse eingesehen werden.

Ergebnisse

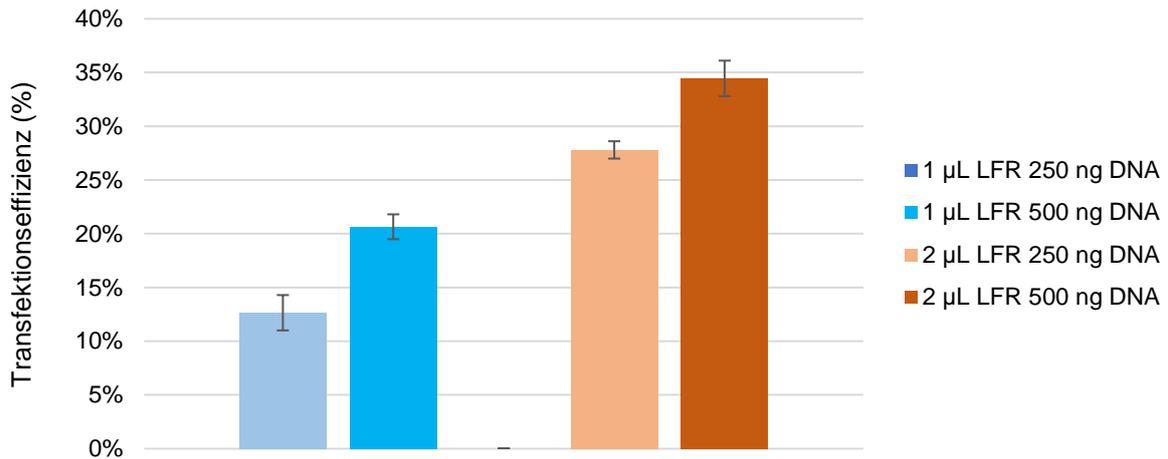


Abbildung 39: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienzen von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 250 ng und 500 ng EGFP mit DreamFect™ Gold (1 µL oder 2 µL) in einer 24-well-Platte transfiziert wurden, N=2.

Bei Verwendung von 1 µL DreamFect™ Gold und 250 ng DNA wurden 13 % der Zellen transfiziert. Eine Verdopplung der DNA-Menge erhöhte die Transfektionseffizienz auf 21 %. Erhöhte man die Transfektionsreagenzmenge auf 2 µL, so wurde mit 250 ng DNA 28 % der Zellen transfiziert. Eine Verdopplung der DNA Menge führte zu einer erneuten Steigerung der Transfektionseffizienz auf bis zu 35 %.

Ein Vergleich mit den in den vorherigen Kapiteln getesteten Transfektionsreagenzien zeigte, dass DreamFect™ Gold zu der mit Abstand besten Transfektionseffizienz in ADhMSCs führte. Daher wurde im Folgenden mit diesem Reagenz weitergearbeitet. Zur weiteren Optimierung der Transfektions-Experimente wurden die Auswirkungen einer erneuten Steigerung der Transfektionsreagenz- und DNA-Mengen beobachtet. Abbildung 40 zeigt die in Dreifachbestimmung erhaltenen Experimentergebnisse.

Ergebnisse

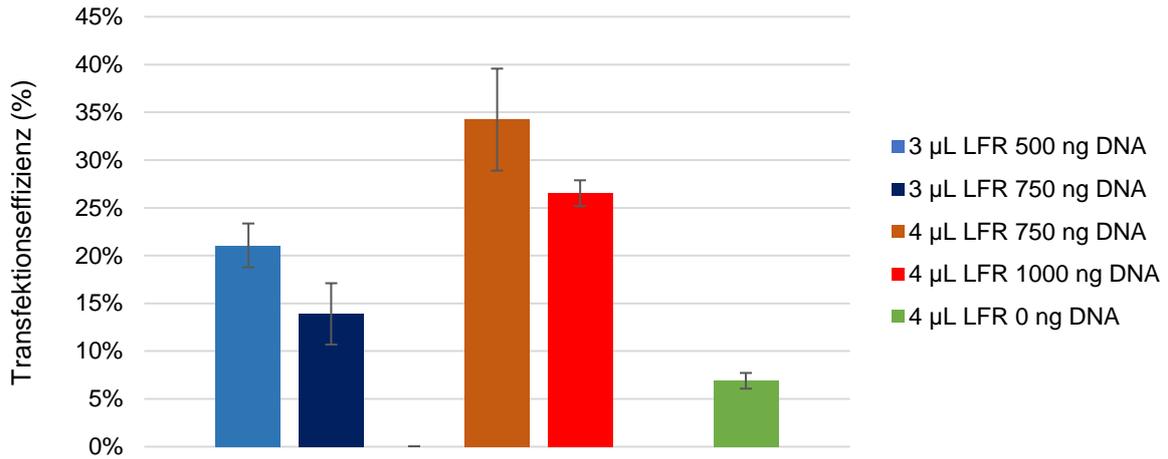


Abbildung 40: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienzen von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 500 ng, 750 ng oder 1000 ng EGFP mit DreamFect™ Gold (3 µL oder 4 µL) in einer 24-well-Platte transfiziert wurden, N=3.

Es war zu erkennen, dass mit einer Verwendung von 3 µL DreamFect™ Gold nur eine maximale Transfektionseffizienz von ungefähr 15-20 % erreicht wurde. Diese Werte waren deutlich geringer als die gemessenen Werte mit 2 µL Transfektionsreagenz. Bei einer Verwendung von 4 µL Transfektionsreagenz und 750 ng DNA war die erzielte Transfektionseffizienz (34 %) ähnlich wie bei dem vorherigen Maximum von ca. 35 % (DreamFect™ Gold). Allerdings fiel bei der Betrachtung der Negativkontrolle mit Transfektionsreagenz ohne DNA auf, dass größere Mengen DreamFect™ Gold (mehr als 3 µL) zu einer Autofluoreszenz von bis zu 7 % (mit 4 µL) führten, dargestellt in Abbildung 41 als kleine fluoreszierende Punkte zwischen den Zellen.

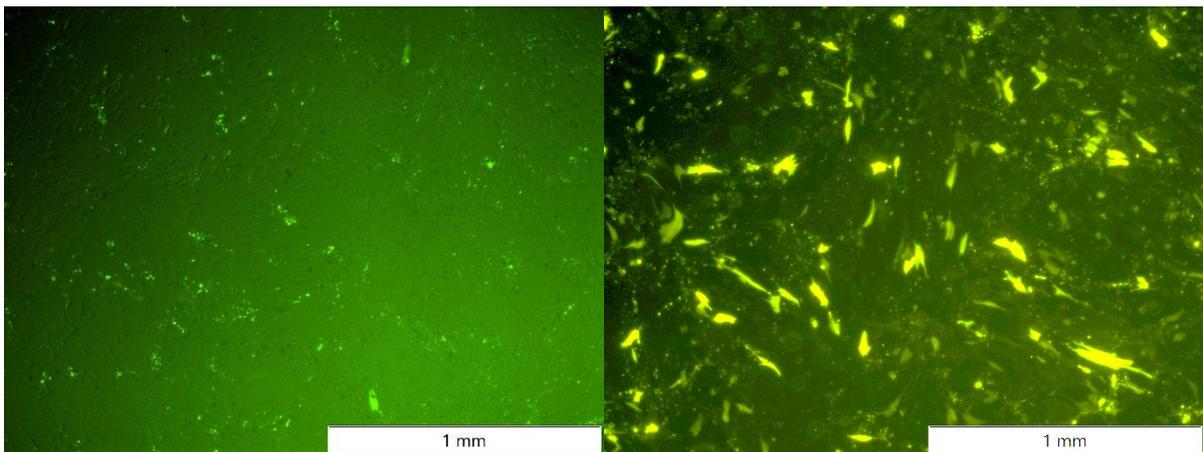


Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen: Links von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 4 µL DreamFect™ Gold transfiziert wurden, links: ohne DNA, rechts: mit 750 µg DANN (EGFP).

Um eine vergleichbare Transfektionseffizienz zu erhalten, musste diese Autofluoreszenz von der gemessenen Transfektionseffizienz subtrahiert werden. Die Transfektionseffizienzen mit 4 μL DreamFect™ Gold waren abzüglich der Autofluoreszenz deutlich geringer als mit 2 μL Transfektionsreagenz.

Des Weiteren wurde der Einfluss von ADhMSCs, die von verschiedenen Spendern isoliert wurden, auf die Transfektionseffizienz bei gleichen Transfektionsbedingungen untersucht. Die Proben wurden in Doppelbestimmung erstellt und mittels Durchflusszytometer vermessen. Die Resultate sind in Abbildung 42 dargestellt.

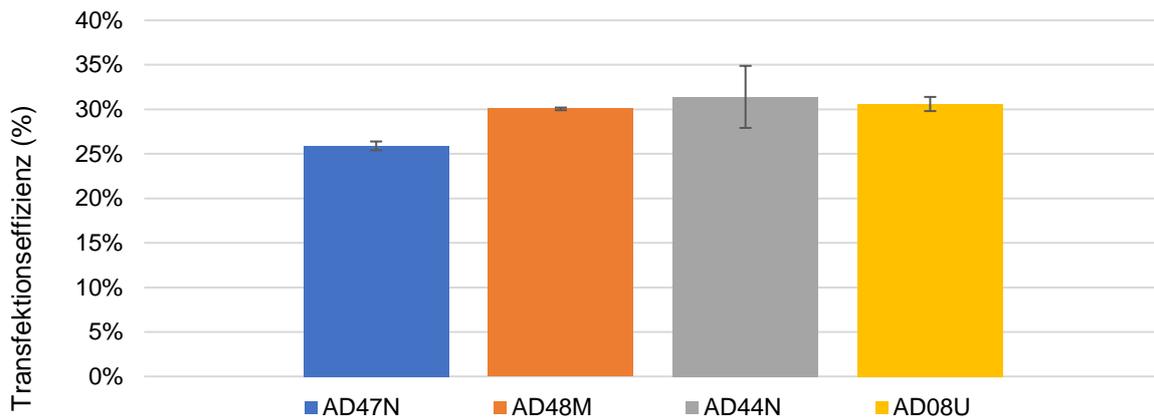


Abbildung 42: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienz von ADhMSCs (AD47N Passage 5, AD48M Passage 5, AD44N Passage 4, AD08U Passage 3), die mit 750 ng EGFP mit DreamFect™ Gold (3 μL) in einer 24-well-Platte transfiziert wurden; N=2.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, zeigte sich, dass die Transfektionseffizienz von aus unterschiedlichen Spendern isolierten ADhMSCs bei gleichen Transfektionsbedingungen ungefähr gleich war. Zwischen dem Ergebnis der Spender AD48M, AD44N und AD08U konnte keine Unterschiede (ca. 30 % Transfektionseffizienz) festgestellt werden. Das Ergebnis des Spenders AD47N war lediglich um 4 % geringer.

Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse der Einfach-Transfektionen von DreamFect™ Gold wurden als nächstes die Transfektionseffizienzen von Co-Transfektionen des Testplasmids pSAM200 in Kombination mit pKM-EGFP gemessen. Die beiden verwendeten Plasmide wurden in unterschiedlichen Verhältnissen und Mengen mit 2 μL DreamFect™ Gold transfiziert und die

Transfektionseffizienz nach drei Tagen mit dem Durchflusszytometer gemessen. Die Resultate dieser Versuche sind in Abbildung 43 dargestellt.

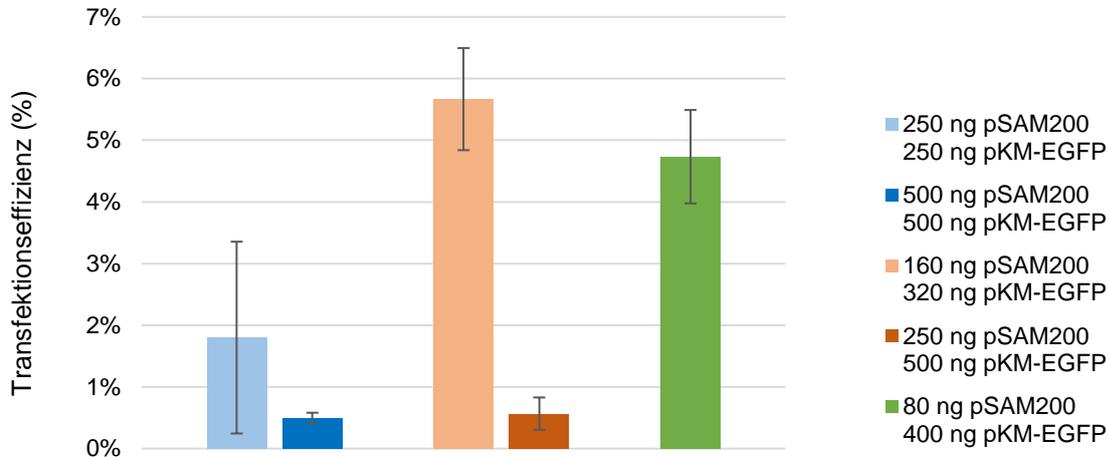


Abbildung 43: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienz von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 2 μ L DreamFect™ mit dem Testplasmid (pSAM200 und pKM-EGFP) mit verschiedenen Plasmidmengen (480 ng, 500 ng, 750 ng und 1000 ng) in verschiedenen Plasmidverhältnissen (1:1, 1:2 und 1:5) in einer 24-well-Platte transfiziert wurden; N=3.

Die in blau dargestellten Proben wurden mit einem Plasmidverhältnis von 1:1 transfiziert. Bei der in hellblau dargestellten Probe betrug die Gesamtplasmidmenge 500 ng, bei der in dunkelblau dargestellten waren es 1000 ng. Die ermittelten Transfektionseffizienzen beider Proben lagen unter 2 %. Die orangefarbenen Proben wurden mit einem Plasmidverhältnis von 1:2 transfiziert. Die hellorangefarbene Probe wies eine Gesamtplasmidmenge von 480 ng auf, während die dunkelorangefarbene Probe mit 750 ng transfiziert wurde. Bei einem Plasmidverhältnis von 1:2 und einer Gesamtplasmidmenge von 480 ng lag die ermittelte Transfektionseffizienz bei 5,7 % während sie bei einer Gesamtmenge von 750 ng nur bei weniger als 1 % lag. Bei der in grün dargestellten Probe wurde eine Gesamtplasmidmenge von 480 ng in einem Verhältnis von 1:5 transfiziert. Die resultierende Transfektionseffizienz betrug 4,7 %. Die beiden besten Ergebnisse lagen im Bereich ihrer Standardabweichungen und unterschieden sich somit nicht. Bei beiden wurde eine Gesamtplasmidmenge von 480 ng verwendet.

3.2.6 Elektroporation

Da die untersuchten chemischen Transfektionsmethoden für eine Multitransfektion von ADhMSCs nicht ausreichend erschienen, wurde zusätzlich die physikalische Transfektion mittels Elektroporation getestet. Die Versuchsbedingungen der Elektroporation wurden basierend auf dem Protokoll von K. von der Haar *et. al.* [90] optimiert.

Bei ersten Tests wurden 10^6 ADhMSCs mit einem Rechteckpuls von 600 V und einer Pulslänge von 100 μ s mit 3 μ g linearer DNA in Elektroporationspuffer in einer Küvette mit einer Spaltbreite von 0,4 cm elektroporiert. Es konnten jedoch auch drei Tage nach der Transfektion keine fluoreszierenden Zellen detektiert werden, unabhängig davon, mit welchen Plasmiden (EGFP, pSAM200 mit pKM-EGFP, pKM-022 mit pKM-EGFP) sie transfiziert wurden. Trotz mehrfacher Wiederholungen konnten unter den gegebenen Bedingungen keine fluoreszierenden Zellen detektiert werden. Auffällig war, dass nach der Elektroporation wenige bis gar keine toten Zellen erkennbar waren. Dementsprechend wurde bei den nachfolgenden Experimenten sowohl die Pulslänge, wie auch die verwendete Spannung variiert. Eine Variation der Pulslänge bei einer Spannung von 600 V zeigte, dass erst ab einer Pulslänge von 500 μ s fluoreszierende Zellen nachgewiesen werden konnten. Bei den folgenden Versuchen wurden daher bei einer Spannung von 600 V verschiedene Pulslängen (500 μ s, 750 μ s, 1 ms, 1,25 ms) und bei einer Pulslänge von 10 ms verschiedenen Spannungen (200 V, 250 V, 300 V, 350 V) ausgetestet. Hierbei wurden jeweils 20 μ g linearer GFP DNA in einer Küvette mit einer Spaltbreite von 0,4 cm elektroporiert.

Eine Spannung von 600 V in Kombination mit einer Pulslänge von 500 μ s führte insgesamt zu der größten Menge an fluoreszierenden Zellen. Bei größeren Pulslängen (750 μ s und 1 ms) war eine erhöhte Sterblichkeit der Zellen zu beobachten und ab einer Pulslänge von 1,25 ms waren dann alle Zellen abgestorben (siehe Abbildung 44).

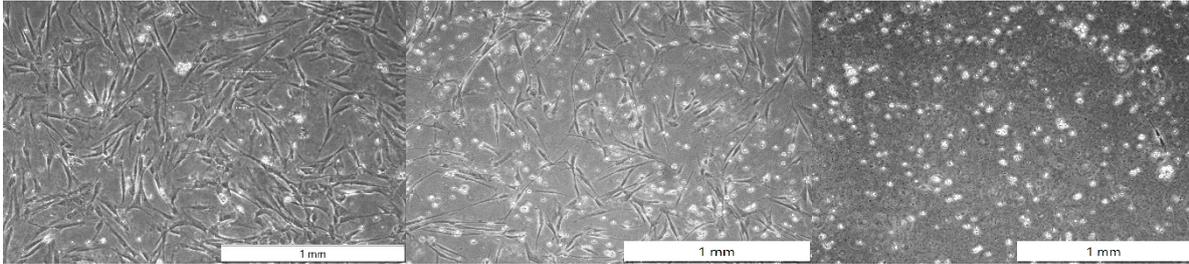


Abbildung 44: Durchlichtmikroskopische Bildaufnahmen von ADhMSCs (AD47N Passage 5) unbehandelten (links), mit 600 V 750 μ s elektroporierten (mitte) und mit 600 V und 1,25 ms elektroporierten (rechts).

Eine Pulslänge von 10 ms mit einer Spannung von 350 V führte ebenfalls zu einer zu hohen Sterblichkeitsrate der Zellen. Das beste Ergebnis bei einer Pulslänge von 10 ms konnte mit einer Spannung von 300 V erreicht werden. Alle niedrigeren Spannungen führten zu einer geringeren Anzahl an fluoreszierenden Zellen. Sämtliche mittels Durchflusszytometer gemessenen Transfektionseffizienzen lagen lediglich in einem Bereich von 1-3 % unabhängig davon, ob es sich um eine Einzel- oder Kotransfektion handelte. Die Unterschiede der gemessenen Werte waren zu gering, um aussagekräftig zu sein.

Für weitere Optimierungen wurden im Anschluss die folgenden beiden Kombinationen mit verschiedenen Puffern und unterschiedlichen DNA-Mengen getestet. In Abbildung 45 sind die Einflüsse verschiedener Elektroporationspuffer auf die Transfektionseffizienz von ADhMSCs mit einem 600 V Rechteckpuls der Länge 0,5 ms dargestellt. Die Transfektionseffizienzen wurden mittels Durchflusszytometer aus jeweils zwei homologen Proben (Negativkontrolle nur aus einer Probe) ermittelt.

Ergebnisse

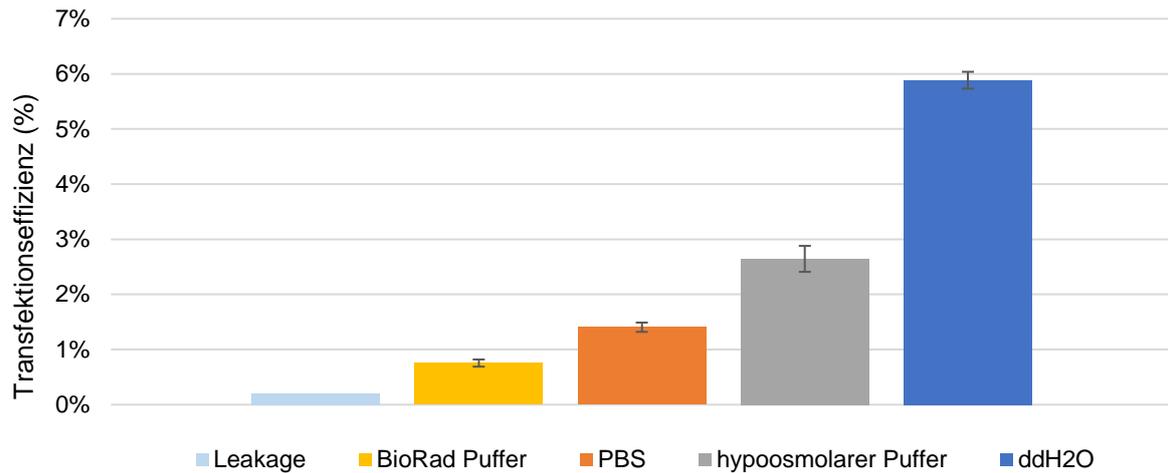


Abbildung 45: Mittels Durchflusszytometer gemessene Transfektionseffizienzen von ADhMSCs (AD44N Passage 4) nach Elektroporation mit einem 600 V Rechteckpuls mit einer Pulslänge von 0,5 ms und einer Spaltbreite von 0,4 cm mit verschiedenen Elektroporationspuffern (PBS, ddH₂O, hypoosmolarer Puffer und Puffer von BioRad) ; N=2.

Variierte man den Puffer, wurde zwar mit ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser) die höchste Transfektionseffizienz erreicht, jedoch waren die Zellen nach Elektroporation deutlich weniger konfluent, als bei den anderen Puffern (siehe Abbildung 46).

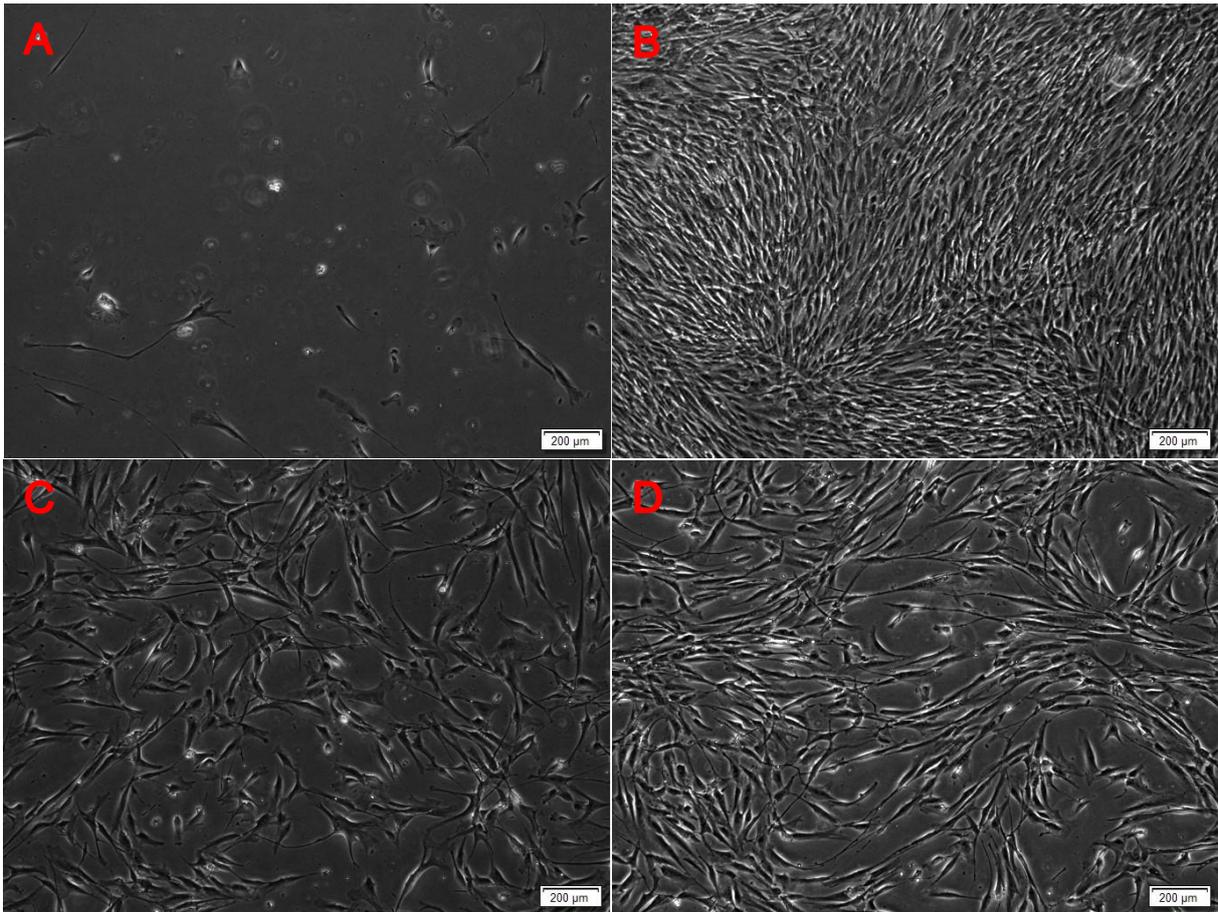


Abbildung 46: Phasenkontrastaufnahmen der ADhMSCs (AD44N Passage 4), die mit einem Rechteckpuls von 600 V und einer Pulslänge von 0,5 ms mit verschiedenen Elektroporationspuffern elektroporiert wurden, vor der Durchflusszytometermessung. A: ddH₂O, B: PBS, C: hypoosmolarer Elektroporationspuffer, D: Elektroporationspuffer von BioRad.

Die beste Kombination aus niedriger Sterblichkeit und möglichst hoher Transfektionseffizienz konnte mit dem hypoosmolaren Elektroporationspuffer erreicht werden. Mit Abstand die beste Konfluenz der Zellen wurde mit PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung), erzielt, allerdings war die Transfektionseffizienz nur halb so hoch wie mit dem hypoosmolaren Elektroporationspuffer.

Auch bei einer Elektroporation mit 300 V und einer Pulslänge von 10 ms stellte sich der hypoosmolare Elektroporationspuffer am geeignetsten heraus. Daher wurde von einem Wechsel des Elektroporationspuffers abgesehen und der hypoosmolare Elektroporationspuffer auch weiterhin für die nachfolgenden Experimente verwendet.

Abbildung 47 zeigt die Einflüsse verschiedener Plasmidmengen auf die Transfektionseffizienz von ADhMSCs mit einem 600 V Rechteckpuls der Länge

0,5 ms. Die Transfektionseffizienzen wurden mittels Durchflusszytometer aus jeweils zwei homologen Proben (Negativkontrolle nur aus einer Probe) ermittelt.

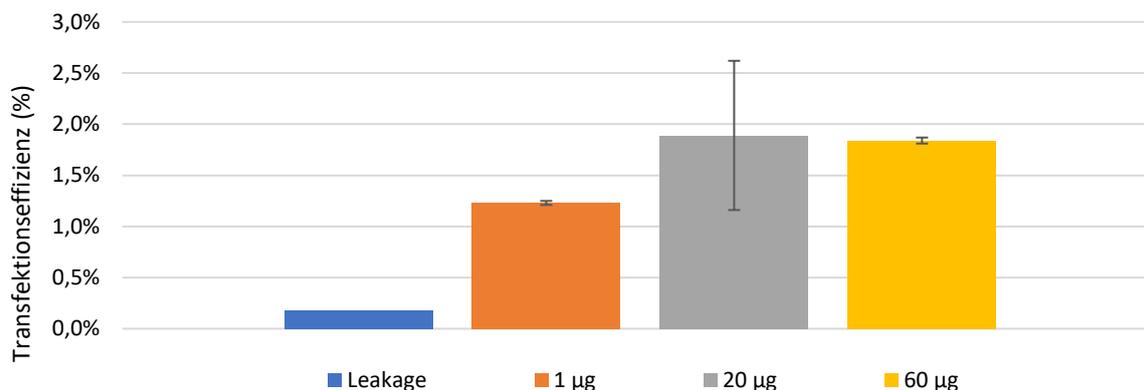


Abbildung 47: Mittels Durchflusszytometer gemessene Transfektionseffizienzen von ADhMSCs (AD47N Passage 5) nach Elektroporation mit einem 600 V Rechteckpuls mit einer Pulslänge von 0,5 ms und einer Spaltbreite von 0,4 cm mit verschiedenen Plasmidmengen; N=2.

Eine Verringerung der Plasmidmenge von 20 µg auf 1 µg führte aufgrund der hohen Standardabweichung zu keiner deutlichen Änderung der Transfektionseffizienz, auch wenn der Absolutwert geringer war. Eine Erhöhung auf 60 µg führte ebenfalls zu keiner Änderung der Transfektionseffizienz. Dies lag vor allem an der hohen Standardabweichung der 20 µg Proben. Ein Unterschied in der Konfluenz der Proben konnte als Ursache hierfür ausgeschlossen werden. Verglich man die Ergebnisse von 1 µg und 60 µg Plasmid, so war ein deutlicher Unterschied vorhanden. Mit 60 µg war die Transfektionseffizienz höher als bei 1 µg. Somit konnte geschlussfolgert werden, dass mit 1 µg Plasmid die Transfektionseffizienz niedriger war, als bei Verwendung von 20 µg und 60 µg.

Diese Ergebnisse deckten sich mit den Ergebnissen nach einer Elektroporation mit 300 V bei einer Pulslänge von 10 ms. An dieser Stelle wurde das Maximum der Transfektionseffizienz bei einer Verwendung von 60 µg Plasmid nachgewiesen, die zweitbesten Ergebnisse konnten mit 20 µg und 1 µg Plasmid erzielt werden.

Die Verwendung beider Spannungs- und Pulslängenkombinationen führte zu vergleichbaren Ergebnissen, die sich auch in der Höhe der resultierenden Transfektionseffizienz nicht unterschieden.

Des Weiteren wurde mit einer Spannung von 600 V und einer Pulslänge von 0,5 ms noch der Einfluss der ADhMSCs Spender auf die Transfektionseffizienz der

Elektroporation überprüft. Hierfür wurden die Transfektionseffizienzen mittels Durchflusszytometer aus jeweils zwei homologen Proben (Negativkontrolle nur aus einer Probe) ermittelt. Die gemessenen Transfektionseffizienzen sind in Abbildung 48 dargestellt.

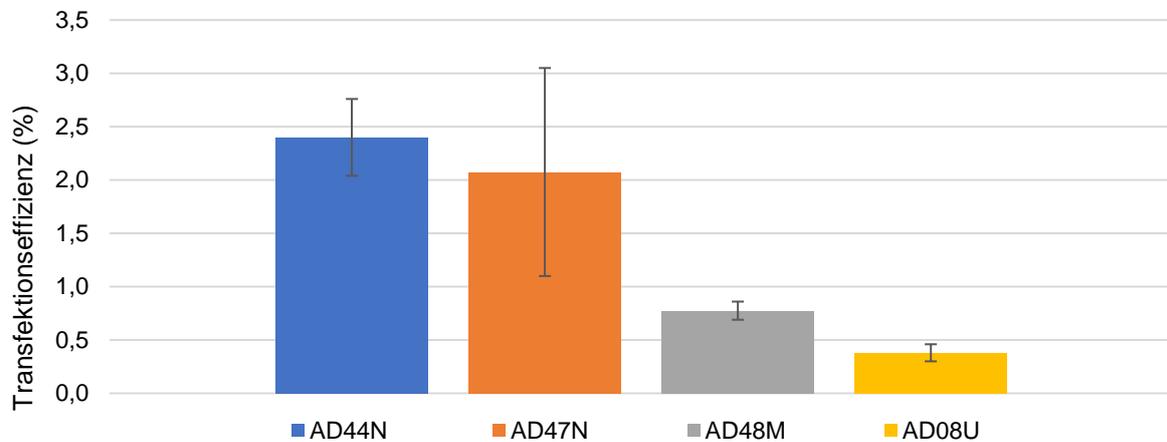


Abbildung 48: Mittels Durchflusszytometer gemessene Transfektionseffizienzen von ADhMSCs (AD47N Passage 5, AD48M Passage 5, AD44N Passage 4, AD08U Passage 3) nach Elektroporation mit einem 600 V Rechteckpuls mit einer Pulslänge von 0,5 ms und einer Spaltbreite von 0,4 cm mit ADhMSCs von verschiedenen Spendern; N=2.

ADhMSCs der Spender AD08U und AD48M zeigten deutlich niedrigere Transfektionseffizienzen als die Spender AD44N und AD47N. Zwischen Transfektionseffizienzen der Spender AD44N und AD47N war hingegen kein Unterschied erkennbar. Daher eigneten sich beide für weiterführende Experimente. Abschließend konnte ermittelt werden, dass eine Steigerung der Transfektionseffizienz der Einzel- und Ko-Transfektion von ADhMSCs durch Elektroporation über ca. 3 %, auch nach Veränderung diverser Parameter, nicht erzielt werden konnte. Diese Ergebnisse lagen unter denen der chemischen Transfektion mit DreamFect™ Gold. Somit wurde herausgefunden, dass die erfolversprechendste der getesteten Transfektionsmethoden für ADhMSCs die chemische Transfektion mittels DreamFect™ Gold war.

3.3 Optimierungen des optogenetischen CRY2-Systems

Durch die Optimierungen der Proteinexpression des PhyB-Systems konnte zwar eine optogenetisch-induzierte Proteinexpression nachgewiesen werden, die andererseits durch die relativ hohe *Leakage* des Systems relativiert wurde. Zusätzlich waren sowohl die Höhe der *Leakage* wie auch der Genexpression stark von der Konfluenz der Zellen abhängig, welches in hohen Standardabweichungen und in Schwankungen der Expressionswerte resultierte. Daher wurden andere optogenetische Systeme gesucht, die eine stabilere Genexpression mit geringerer *Leakage* in Säugetierzellen aufwiesen und somit besser für therapeutische Anwendungen geeignet waren.

Dazu wurden zwei erfolgversprechende blaulichtinduzierte optogenetische Systeme, CRY2 und EL222, vergleichend getestet. Bei ersten Vorversuchen mit den in den Veröffentlichungen [26, 63] verwendeten Plasmiden überzeugte nach DreamFect™ Gold Transfektion in HEK293 Zellen das CRY2-System durch seine signifikant höhere Luciferase Expression im Gegensatz zu dem EL222-System. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde von weiteren Versuchen mit dem EL222-System abgesehen und das CRY2-System für weiterführende Versuche ausgewählt. Die anschließende Optimierung mit DreamFect™ Gold Transfektion des CRY2-Systems mit Luciferase Marker wurde in HEK293 Zellen durchgeführt.

3.3.1 Klonierung der Gal4UAS Zielplasmide mit BDNF und eGFP Marker

Damit neben dem Luciferase Marker noch weitere Proteinmarker zur Verfügung standen, wurden zusätzlich noch die Gal4UAS (*upstream activating sequence*) Zielplasmide des CRY2-Systems mit dem fluoreszierenden Marker eGFP und dem therapeutisch relevanten Marker BDNF kloniert.

Die Klonierung des Zielplasmids Gal4UAS mit BDNF (Gal4UAS-BDNF) wurde ausgehend vom dem Plasmid pGL2_Gal4UAS_Luc_6054bp durchgeführt, das als Zielvektor diente. In Abbildung 49 ist die verwendete Klonierungsstrategie detailliert abgebildet.

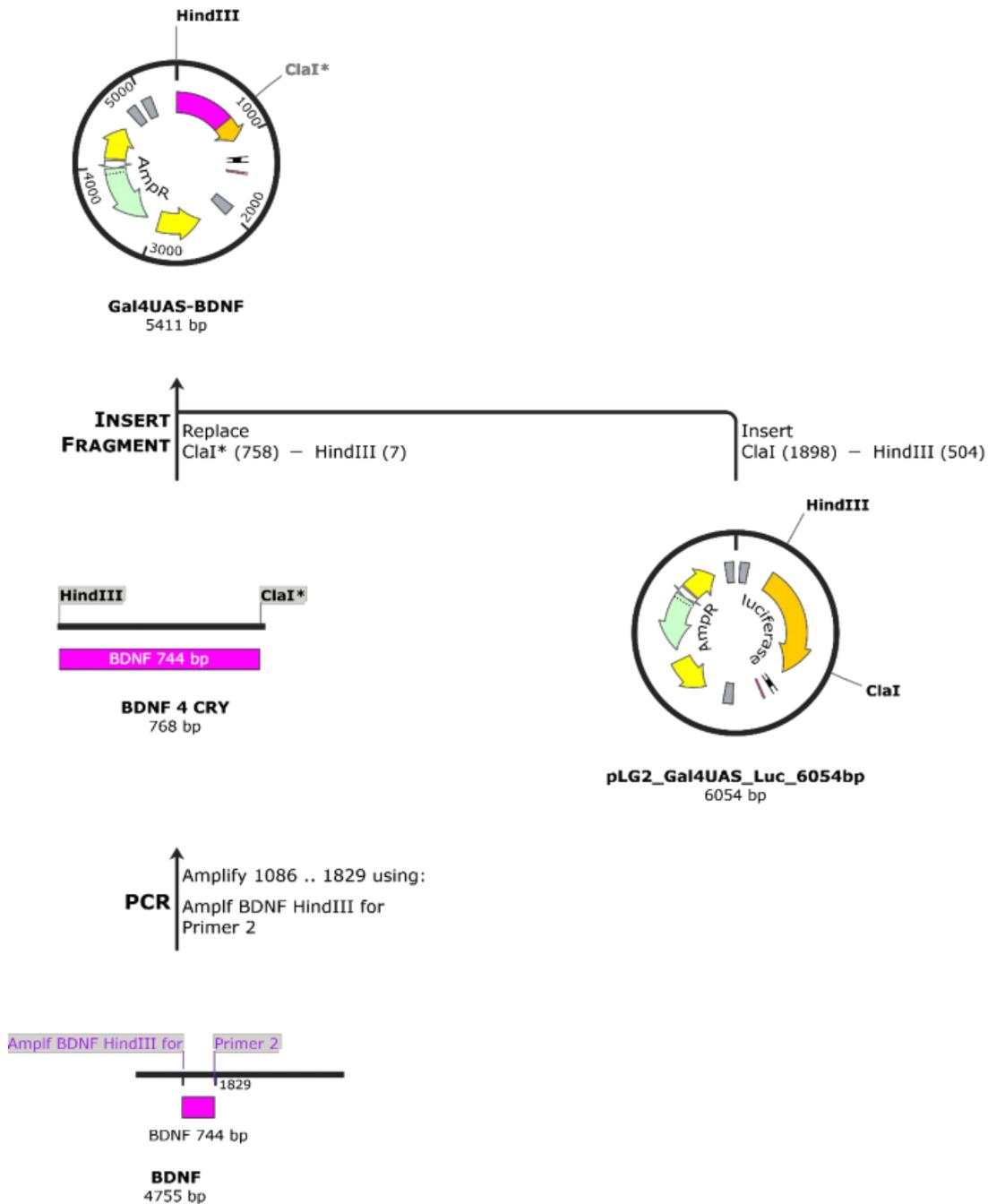


Abbildung 49: Klonierungsstrategie von dem Gal4UAS-BDNF Plasmid ausgehend vom pLG2_Gal4UAS_Luc_6054bp Plasmid und dem BDNF Plasmid.

Hierfür wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen HindIII und ClaI linearisiert, indem ein Großteil der Sequenz für Luciferase herausgeschnitten wurde. Die Sequenz für BDNF wurde aus dem Plasmid BDNF mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer (Amplf BDNF HindIII for & Amplf BDNF ClaI rev (in der Abbildung als Primer 2 dargestellt)) erhielten Überhänge, die der BDNF Sequenz Schnittstellen für ClaI und

HindIII an den Enden hinzugefügt haben. Das PCR Amplifikat wurde anschließend ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten, damit die weiteren Basenpaarüberhänge des Primers entfernt wurden. Beide Plasmide wiesen nun komplementäre Schnittstellen an ihren Enden auf, die es ermöglichten, sie mit Hilfe von Ligase zusammenzufügen. Da beide verwendeten Restriktionsenzyme *sticky ends* produzierten, konnte das Insert nur in der gewünschten Richtung eingefügt werden, wodurch unerwünschte Nebenprodukte vermieden wurden. Das klonierte Plasmid wurde anschließend in Bakterien transformiert, die es vervielfältigten und dann mittels eines DNA-Aufreinigungskits aufgereinigt. Eine Gelelektrophorese wurde verwendet, um die Größe des entstandenen Plasmids zu bestimmen. Dies ist ein erster Anhaltspunkt dafür, dass die Klonierung erfolgreich war. Zur genauen Verifizierung des Endproduktes wurde das erstellte Plasmid zusätzlich sequenziert. Das Sequenzierungsergebnis bestätigte die erfolgreiche Klonierung von Gal4UAS-BDNF.

Analog zu der vorherigen Klonierung wurde ausgehend von dem Plasmidvektor pGL2_Gal4UAS_Luc_6054bp auch das Plasmid Gal4UAS-EGFP mit einem Insert des pKM-EGFPs kloniert. Auch hier wurden mit Hilfe einer PCR, mit den Primern (Ampl for EGFP für Gal4UAS und Ampl rev EGFP für Gal4UAS), Überhänge mit den Restriktionsschnittstellen für ClaI und HindIII erzeugt. Auch hier bestätigte eine Sequenzierung den Klonierungserfolg.

3.3.2 Luciferase Kalibrierreihe

Der für die Optimierung des CRY2-Systems verwendete Luciferase Marker wurde mit Hilfe eines fluorometrischen Assays analysiert. Das für die Quantifizierung der Luciferase Enzymaktivität verwendete fluorometrische Assay enthielt Luciferine. Die in den Proben enthaltene Luciferase katalysierte die Oxidation dieser Luciferine zu Oxiluciferinen, wobei Photonen emittiert wurden. Die Menge der emittierten Photonen war dabei proportional zur Menge der vorhandenen Luciferase [292]. Durch die gemessene Absorption der Proben konnte daher mit Hilfe einer Kalibration direkt auf die vorhandene Luciferasekonzentration geschlossen werden.

Hierfür wurde der lyophilisierte Luciferase Standard (11 U/mg) im Dunklen in einem Milliliter 1M Tris-HCl (TRIS(hydroxymethyl)aminomethan, Salzsäure) Lösung mit

einem pH-Wert von 7-8 gelöst. Ausgehend von diesem Standard mit einer Konzentration von 10^{11} U wurde durch eine 1:20 Verdünnung mit 1M Tris-HCl Lösung (pH 7-8) der 10^9 U Standard erstellt. Wichtig war hierbei die Standards nicht zu vortexen und alle Arbeiten im Dunkeln zu verrichten, da die Luciferase Moleküle sehr empfindlich waren. Die weiteren Standards wurden durch 1:1 Verdünnungen des 10^9 U Standards mit 1M Tris-HCl Lösung (pH 7-8) erstellt. Der kleinste Standard hatte hierbei eine Konzentration von $9,765625 \cdot 10^5$ U. Für den Standard der Konzentration 0 U wurde nur 1M Tris-HCl Lösung (pH 7-8) verwendet. Die Standards wurden mit einem Abstand von jeweils 2 Wells zueinander auf einer schwarzen Well-Platte aufgetragen. So konnten fehlerhafte Messungen der niedrigen Konzentrationen durch eine zu starke Lumineszenz der hohen Konzentrationen ausgeschlossen werden. Die so entstandenen Messwerte sind in Abbildung 50 aufgetragen. Jeder Standard wurde doppelt vermessen und der jeweilige Mittelwert aufgetragen.

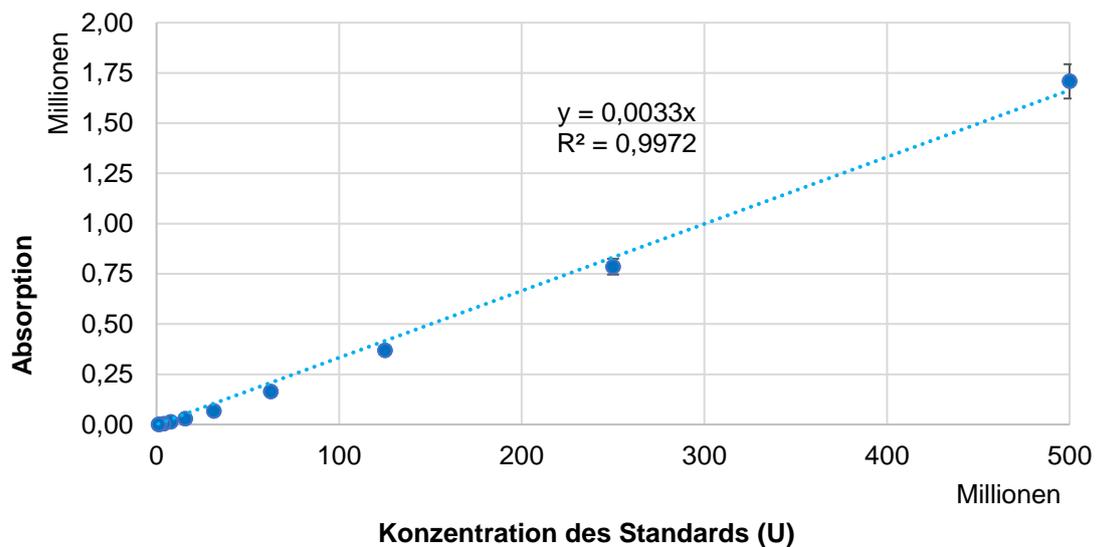


Abbildung 50: Kalibrationsreihe mit Ausgleichsgerade der Luciferase Standardreihe; N=2.

Die entstandene Kalibriergerade hatte einen Schnittpunkt mit der y-Achse bei 0 und das Bestimmtheitsmaß lag bei 99,6 %.

Die in den folgenden Kapiteln gemessenen Absorptionswerte wurden alle mit dieser Kalibriergeraden in die Enzymeinheit U umgerechnet. Laut Hersteller produziert eine Luciferase Enzymeinheit eine relative Lichteinheit (RLU) bei 20-25 °C über einen Zeitraum von 10 Sekunden, gemessen mit einem GloMax 20/20 Luminometer in 100 μ L Lösung (mit 40 pM ATP und 15 nM Luciferin in Tris-glycine Puffer bei pH 7,6) [293].

3.3.3 Variation des Plasmidverhältnisses

Die Optimierung des Plasmidverhältnisses der drei Plasmide CRY, CIB und Gal4UAS-Luc, aus denen das CRY2-System besteht, wurde mit einer Variation ihrer Verhältnisse zueinander begonnen. Für diesen Zweck wurden jeweils 0,5 µg Plasmid mit 0,5 µL DreamFect™ Gold Transfektionsreagenz in HEK293 Zellen transfiziert. Ausgewertet wurden vier homologe Proben, deren Mittelwerte in Abbildung 51 aufgetragen wurden.

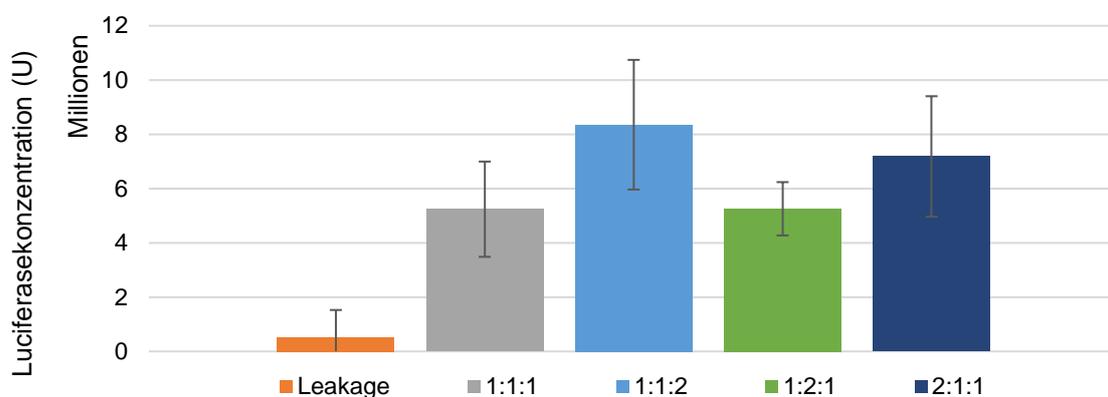


Abbildung 51: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit 0,5 µL DreamFect™ Gold mit verschiedenen Plasmidverhältnissen (Gesamtplasmidmenge: 500 µg) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetitiv (20 sek on, 60 sek off) für 12 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4.

Aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen der Proben konnte zwischen den Plasmidverhältnissen 1:1:1 (5,2 Mio. U), 1:1:2 (8,4 Mio. U), 1:2:1 (5,3 Mio. U) und 2:1:1 (7,1 Mio. U) kein signifikanter Unterschied (ANOVA (*analysis of variance*) mit $p=0,05$) festgestellt werden. Grund für die hohen Standardabweichungen waren die teilweise sehr unterschiedlichen Konfluenzen der Proben, die in unterschiedlichen Luciferasekonzentrationen resultierten. Betrachtete man jedoch die absoluten Luciferasekonzentrationen, so wurde die höchste Luciferasekonzentration bei einem Plasmidverhältnis von 1:1:2 gemessen.

Für eine Verifizierung dieser Ergebnisse wurde ein Folgeexperiment angesetzt, in dem die getesteten Plasmidverhältnisse unter identischen Bedingungen ausgeweitet und teilweise wiederholt wurden. Die Ergebnisse des zweiten Experiments können aus der Abbildung 52 ersehen werden.

Ergebnisse

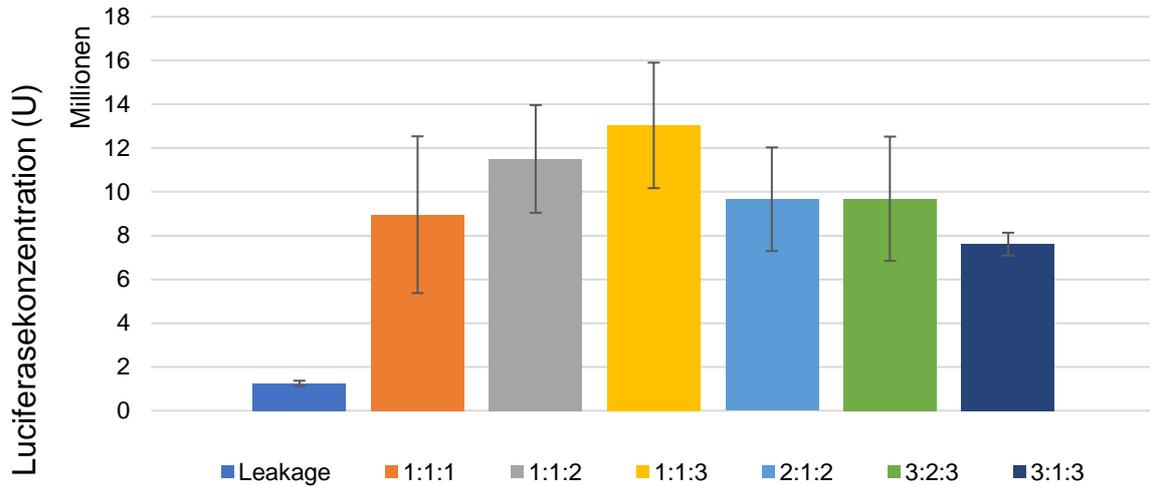


Abbildung 52: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit 0,5 µL DreamFect™ Gold mit verschiedenen Plasmidverhältnissen (Gesamtplasmidmenge: 500 µg) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetativ (20 sek on, 60 sek off) für 12 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4.

Auch hier konnte aufgrund der hohen Standardabweichungen keine signifikante Unterscheidung (ANOVA mit $p=0,05$) der Proben mit den Plasmidverhältnissen 1:1:1 (9,0 Mio. U), 1:1:2 (11,5 Mio. U), 1:1:3 (12,0 Mio. U), 2:1:2 (9,7 Mio. U) und 3:2:3 (9,7 Mio. U) vorgenommen werden. Den höchsten absoluten Mittelwert hatte jedoch die Probe, die mit einem Plasmidverhältnis von 1:1:3 transfiziert wurde. Diese weist eine signifikant höhere Luciferasekonzentration auf, als die Probe mit dem Plasmidverhältnis von 3:1:3 (7,6 Mio. U). Die ermittelten Werte decken sich mit den Ergebnissen des vorherigen Versuchs. Auch hier liegt die erhöhte Standardabweichung der homologen Proben an den unterschiedlichen Zellkonfluenzen.

Ein erneutes Folgeexperiment wurde angesetzt, um weitere Plasmidverhältnisse zu testen. Hier wurden jeweils vier homologe Proben unter den gleichen Bedingungen vermessen. Die Ergebnisse können in Abbildung 53 eingesehen werden.

Ergebnisse

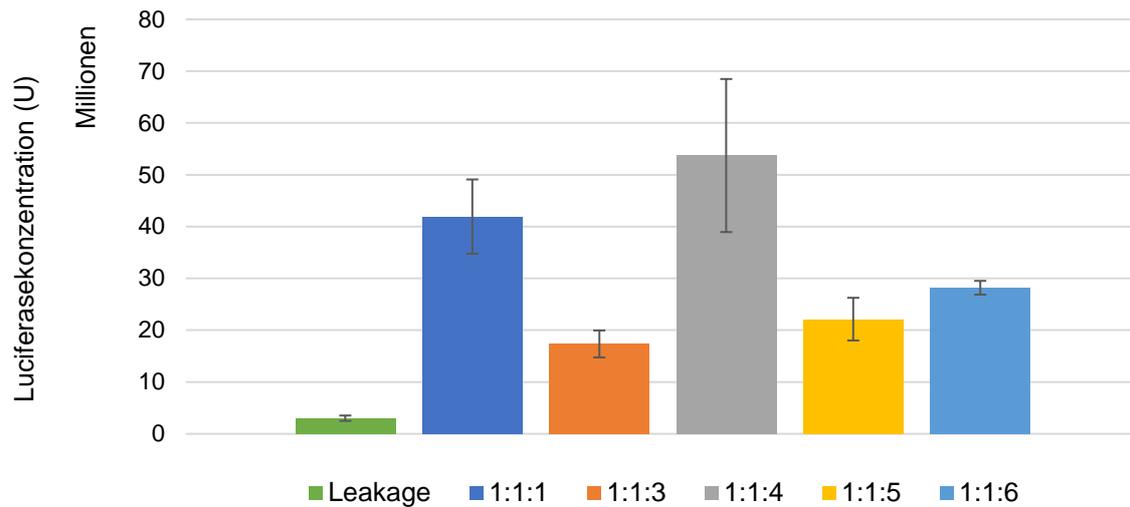


Abbildung 53: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit 0,5 μL DreamFect™ Gold mit verschiedenen Plasmidverhältnissen (Gesamtplasmidmenge: 500 μg) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetitiv (20 sek on, 60 sek off) für 12 h mit 8 W/m^2 illuminiert wurden; N=4.

Erkennbar war, dass die beiden mit Abstand höchsten Luciferasekonzentrationen mit den Plasmidverhältnissen 1:1:1 (41,9 Mio. U) und 1:1:4 (53,7 Mio. U) erreicht wurden. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant (ANOVA mit $p=0,05$). Der höchste Absolutwert wurde jedoch bei einem Verhältnis von 1:1:4 gemessen. Da die Konfluenz der Probe mit dem Plasmidverhältnis 1:1:3 (17,4 Mio. U) deutlich geringer als bei den restlichen Proben war, ist dieses Ergebnis nicht repräsentativ. Eine weitere Erhöhung des Plasmidverhältnisses auf 1:1:5 (22,1 Mio. U) und 1:1:6 (28,2 Mio. U) von Gal4UAS-Luc führte zu signifikant (ANOVA mit $p=0,05$) geringeren Luciferase-Konzentrationen, während sich die Ergebnisse dieser beiden Verhältnisse nicht signifikant unterschieden (ANOVA mit $p=0,05$).

Die Plasmidverhältnisse mit den höchsten absoluten Luciferasekonzentrationen (1:1:3 und 1:1:4) wurden bei den nachfolgenden Experimenten verwendet und weitergehend untersucht.

Es konnte festgestellt werden, dass sie lichtinduzierte Genexpression des CRY2-Systems funktionierte und diese die *Leakage* um den Faktor 18 überstieg.

3.3.4 Variation der Plasmidmenge

Für die Optimierung der eingesetzten Gesamtplasmidmenge, aufgeteilt auf das verwendete Plasmidverhältnis, wurden die im vorherigen Kapitel optimierten Plasmidverhältnisse 1:1:3 und 1:1:4 verwendet. Auch hier wurden jeweils vier homologe HEK293 Proben mittels Luciferase Assay ausgewertet, nachdem sie mit 0,5 µL DreamFect™ Gold transfiziert wurden. Die resultierenden Daten sind in Abbildung 54 dargestellt.

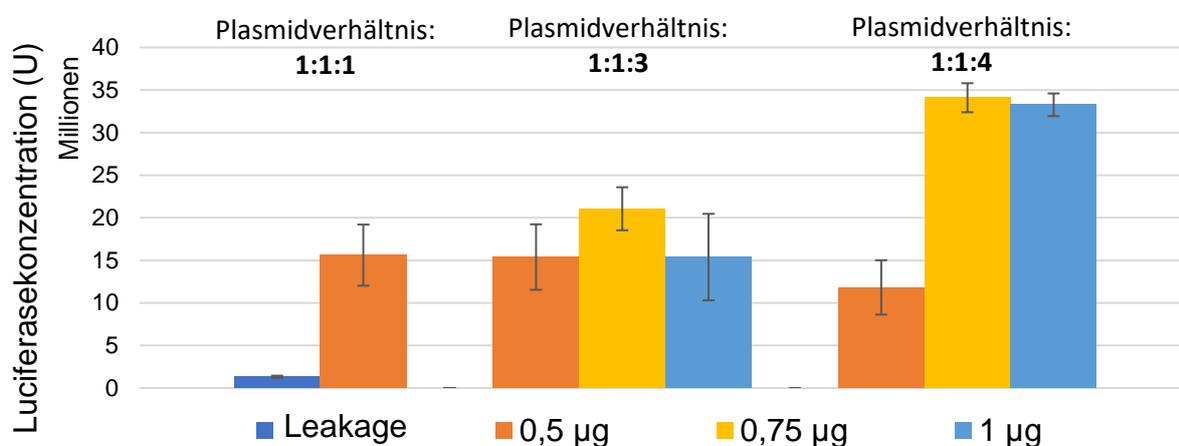


Abbildung 54: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit 0,5 µL DreamFect™ Gold mit verschiedenen Plasmidverhältnissen (Gesamtplasmidmenge: 500 µg, 750 µg oder 1000 µg) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetitiv (20 sek on, 60 sek off) für 12 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4.

Für ein Plasmidverhältnis von 1:1:3 wurde die höchste Luciferasekonzentration bei einem Einsatz von 0,75 µg DNA (21,1 Mio. U) gemessen. Eine Variation der DNA Menge auf 1 µg (15,4 Mio. U) oder 0,5 µg (15,4 Mio. U) führte zu keinen signifikanten (ANOVA mit p=0,05) Unterschieden in den Luciferasekonzentrationen.

Bei einem Plasmidverhältnis von 1:1:4 wurde die höchste Luciferasekonzentration bei ebenfalls einem Einsatz von 0,75 µg DNA (34,1 Mio. U) erzielt, wobei kein signifikanter Unterschied (ANOVA mit p=0,05) zu einem Einsatz von 1 µg (33,3 Mio. U) festgestellt werden konnte. Eine Plasmidmenge von 0,5 µg DNA (11,8 Mio. U) hingegen wies eine signifikant (ANOVA mit p=0,05) geringere Luciferasekonzentration auf.

Vergleich man nun die gemessenen Luciferasekonzentrationen bei 0,75 µg Gesamtplasmidmenge so fiel auf, dass bei einem Plasmidverhältnis von 1:1:4 die

Luciferasekonzentration fast doppelt so hoch war wie bei einem Plasmidverhältnis von 1:1:3. Die lichtinduzierte Genexpression des CRY2-Systems überstieg die *Leakage* in diesem Experiment um den Faktor 26.

Die nachfolgenden Optimierungen wurden daher mit dem Plasmidverhältnis 1:1:4 und einer Gesamtplasmidmenge von 0,75 µg bis 1 µg DNA durchgeführt.

3.3.5 Variation der Menge an Transfektionsreagenz

Zur Ermittlung der optimalen Menge an Transfektionsreagenz wurde das bereits optimierte Plasmidverhältnis von 1:1:4 mit der optimierten Gesamtplasmidmenge von 0,75 µg bis 1 µg verwendet. Erneut wurden dafür vier homologe HEK293 Proben mittels Luciferase Assay vermessen. Abbildung 55 zeigt die berechneten Luciferasekonzentrationen.

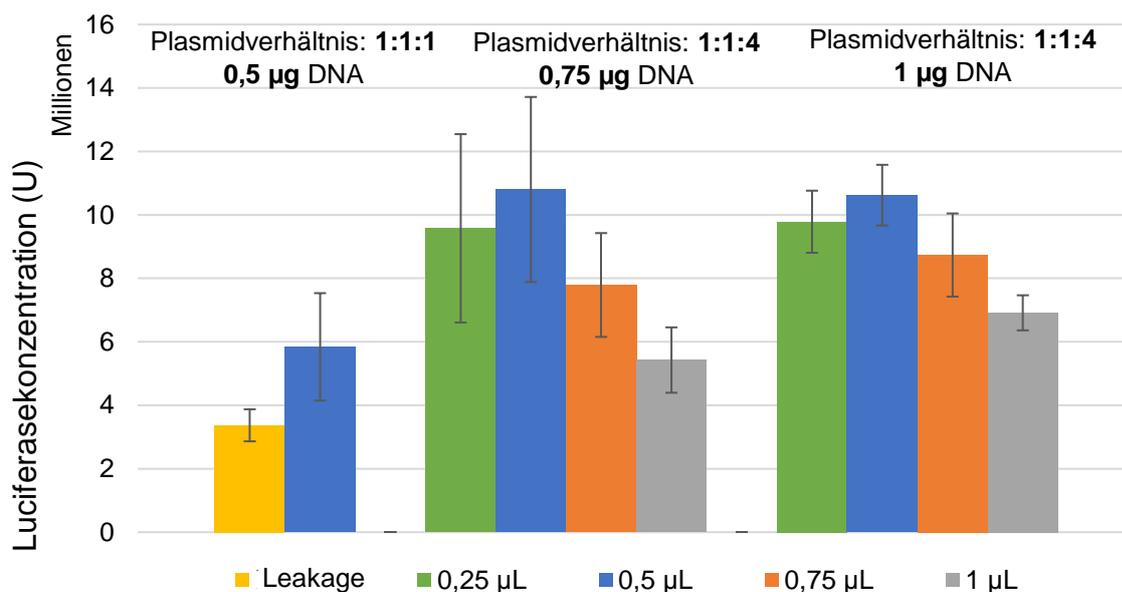


Abbildung 55: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit DreamFect™ Gold (0,25 µL, 0,5 µL, 0,75 µL und 1 µL) mit verschiedenen Plasmidverhältnissen (Gesamtplasmidmenge: 500 µg, 750 µg oder 1000 µg) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetitiv (20 sek on, 60 sek off) für 12 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4.

Für beide getesteten Plasmidmengen 0,75 µg (0,25 µL: 9,6 Mio. U; 0,5 µL: 10,8 Mio. U; 0,75 µL: 7,8 Mio. U; 1 µL: 5,4 Mio. U) und 1 µg (0,25 µL: 9,8 Mio. U; 0,5 µL: 10,6 Mio. U; 0,75 µL: 8,7 Mio. U; 1 µL: 6,9 Mio. U), bei einem Plasmidverhältnis von 1:1:4, sind

Glockenkurven mit einem Maximum bei Verwendung von 0,5 μL Transfektionsreagenz entstanden.

Wie auch beim vorherigen Versuch konnte kein signifikanter Unterschied (ANOVA mit $p=0,05$) zwischen den gemessenen Luciferasekonzentrationen mit 0,75 μg und 1 μg Plasmid festgestellt werden. Aus wirtschaftlichen Gründen wurde die kleinere Plasmidmenge bevorzugt.

Die ermittelten optimalen Transfektionsbedingungen setzten sich daher aus einem Plasmidverhältnis von 1:1:4 mit einer Gesamtplasmidmenge von 0,75 μg und 0,5 μL Transfektionsreagenz zusammen und wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, für alle nachfolgenden Experimente verwendet.

3.3.6 Variation der Illuminationsdauer

Der nächste neben der Transfektion optimierte Einflussfaktor war die Illuminationsdauer. Die in der Literatur [63] verwendete repetitive 12-stündige Illumination bestand aus einer 20-sekündigen Illumination von 8 W/m^2 mit einer Wellenlänge von 450 nm gefolgt von 60-sekündigen Pause ohne Illumination. Grund hierfür war, dass das CRY2-System nach Blaulichtaktivierung lediglich ein paar Minuten aktiv blieb, bevor es wieder deaktiviert wurde. Die repetitive Illumination sorgte somit für eine konstante Aktivierung über die gesamte Illuminationsdauer, während die Pause vor einer Überhitzung der LEDs und damit einer Zellschädigung schützte. Von einer weiteren Variation wurde abgesehen, weil das verwendete Illuminationsmuster bereits optimiert war. In dem folgenden Experiment wurde jedoch die Gesamtilluminationsdauer variiert. Zum einen wurde überprüft, ob eine Verlängerung der Illuminationsdauer auch zu einer höheren Proteinkonzentration führte. Zum anderen wurde getestet, ob kürzere Illuminationszeiten die Proteinkonzentration verringern und ob bei einer Illuminationszeit von 6 Stunden schon quantifizierbare Proteinmengen entstanden waren. Dies ist vor allem für die nachfolgenden Laser-Illuminationsversuche von großer Relevanz, da der Laser nur unter Aufsicht betrieben werden durfte, wodurch 12-stündige Illuminationen über Nacht, wie bei den LED-Illuminationen nicht möglich waren. Die maximale Laser-Illuminationsdauer betrug 6 Stunden.

Abbildung 56 stellt die gemessenen Luciferasekonzentrationen nach verschiedenen Illuminationszeiten dar.

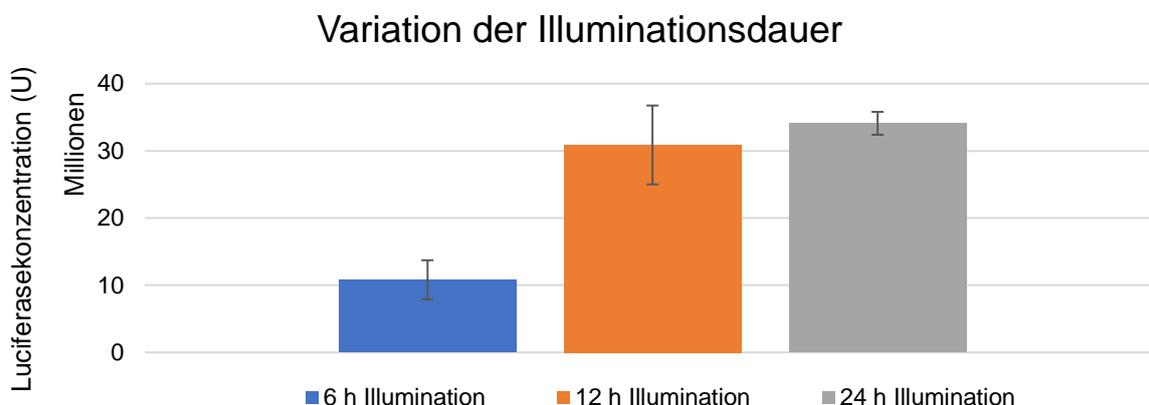


Abbildung 56: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit DreamFect™ Gold (0,5 µL) im Plasmidverhältnis 1:1:4 (Gesamtplasmidmenge: 750 µg) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetitiv (20 sek on, 60 sek off) für 6 h, 12 h oder 24 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4.

Eine Verdopplung der Illuminationszeit von 12 Stunden (30,9 Mio. U) auf 24 Stunden (34,1 Mio. U) resultierte in keiner signifikanten (ANOVA mit $p=0,05$) Veränderung der gemessenen Luciferasekonzentration.

Eine Halbierung der Illuminationszeit von 12 Stunden auf 6 Stunden (10,8 Mio. U) führte zu einer Reduzierung der Luciferasekonzentration um ca. 2/3. Dies zeigte, dass eine 6-stündige Illumination nicht ausreichend war, um in einer möglichst hohen Proteinmenge zu resultieren. Die gemessene Luciferasekonzentration reichte jedoch vollkommen aus, um die Luciferasekonzentration zu quantifizieren. Auch durch veränderte Reaktionsbedingungen resultierende Konzentrationsänderungen sollten zu signifikant quantifizierbaren Unterschieden führen. Eine Illumination von 6 Stunden ist demnach ausreichend, um vergleichende Laser- und LED-Illuminationsexperimente durchzuführen.

3.3.7 Laser-Illumination

Die Laser-Illumination sollte mit einer der LED-Illumination vergleichbaren Intensität von 8 W/m² durchgeführt werden. Aufgrund der sehr kleinen Fläche des Laserstrahls entsprach dies einer Laserpower von 0,06 µW auf der Well Platte. Aus technischen Gründen war es jedoch nicht möglich eine so kleine Laserintensität einzustellen. Die

kleinste mögliche einstellbare Intensität war 0,6 mW auf der Well Platte, was 5 mW am Laserausgang entsprach. Daher wurde diese als Ausgangsintensität für die nachfolgenden Experimente ausgewählt.

Die LED-Illumination erfolgte repetitiv (20 Sekunden Illumination, 60 Sekunden Dunkelheit) 6 Stunden lang, was einer Gesamtilluminationsdauer von 1,5 Stunden entsprach, bei einer Beleuchtungsstärke von 8 W/cm². Somit belief sich die Gesamtillumination auf 4,3 W*s/cm².

Die Laser-Illumination hingegen erfolgte aufgrund der kleinen Laserfläche bei 76349,4 W/m² (bei 3,5 mW auf der Wellplatte). Zog man den beim Abrastern des Wells zurückgelegten Weg (bzw. die hierbei illuminierte Fläche) sowie die Lasergeschwindigkeit von 35 mm/s und die Gesamtilluminationszeit von 6 Stunden in Betracht, so kam man auf eine Gesamtillumination von 6,6 W*s/cm². Die Laser-Illumination war somit trotz deutlich stärkerer Illuminationsintensität lediglich um den Faktor 1,5 höher als die LED-Illumination, da die kürzere Illuminationszeit pro cm² diesen Unterschied relativierte.

Auch hier wurden wiederum vier identische behandelte Wells mittels Luciferase Assay vermessen und die resultierenden Mittelwerte in Abbildung 57 aufgetragen. Die Well-Platte befand sich während der gesamten Laser-Illuminationsdauer von 6 Stunden in der portablen Inkubationskammer, wie es auch bei den LED-Illuminationen der Fall gewesen war.

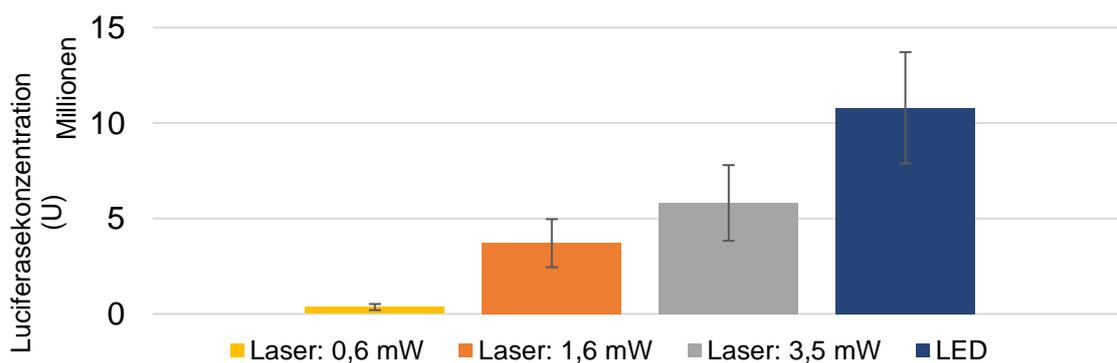


Abbildung 57: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit DreamFect™ Gold (0,5 µL) im Plasmidverhältnis 1:1:4 (Gesamtplasmidmenge: 750 µg) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm mittels eines Lasers für 6 h mit verschiedenen Laserintensitäten illuminiert wurden; N=4.

In der Abbildung war zu erkennen, dass mit steigender Laserintensität auch die gemessene Luciferasekonzentration stieg (0,6 mW: 0,4 Mio. U; 1,6 mW: 3,7 Mio. U; 3,5 mW: 5,8 Mio. U). Eine Beeinträchtigung der Zellviabilität durch die hohen Laserintensitäten konnte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops nicht festgestellt werden.

Es konnte somit geschlussfolgert werden, dass auch eine 6-stündige Laser-Illumination mit den gewählten Intensitäten für eine Aktivierung des optogenetischen CRY2-Systems geeignet war. Gleichzeitig konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass die gemessenen Luciferasekonzentrationen nach Laser-Illumination mit den ausgewählten Intensitäten signifikant geringer waren, als nach LED-Illumination.

3.3.8 qPCR Analyse

Zur Verifizierung der Funktion der klonierten Plasmide für die Expression der Marker eGFP und BDNF sowie des zur Optimierung verwendeten CRY2-Systems mit Luciferase Expression und des PhyB Systems wurden qPCR Analysen durchgeführt. Diese gaben nicht nur über die Funktion der Plasmide Aufschluss, sondern zeigten detailliert, was auf der Genebene im zeitlichen Verlauf passiert.

Die qPCR funktioniert wie eine herkömmliche PCR, jedoch werden bei der qPCR die PCR-Produkte während des Laufs mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Das nach jedem Zyklus in Echtzeit gemessene Fluoreszenzsignal der exponentiellen Phase ermöglicht dann eine präzise Quantifizierung dieser PCR-Produkte, denn das Fluoreszenzsignal ist proportional zu Menge an PCR-Produkt.

Vor der qPCR Analyse der Proben wurden zuerst die optimalen Annealingtemperaturen für jedes Primerpaar mit einer Gradienten PCR ermittelt. Anschließend wurde die qPCR Effizienz bestimmt. Hierfür wurde für jedes Primerpaar eine Verdünnungsreihe aus DNA (bzw. HEK cDNA (komplementäre DNA) für die Referenzprimerpaare) erstellt. Bei allen verwendeten Primern lagen die Steigungen der resultierenden Kalibriergeraden in dem Akzeptanzbereich von 80-120 %. Deshalb sind alle Primerpaare für die Analyse der Proben geeignet.

Es wurden immer jeweils drei homologe Proben zu sieben verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 4 h, 24 h, 30 h, 48 h, 54 h und 72 h nach der Transfektion) genommen. Zusätzlich gab es immer eine Negativkontrollprobe ohne DNA und eine nach 72 h genommene

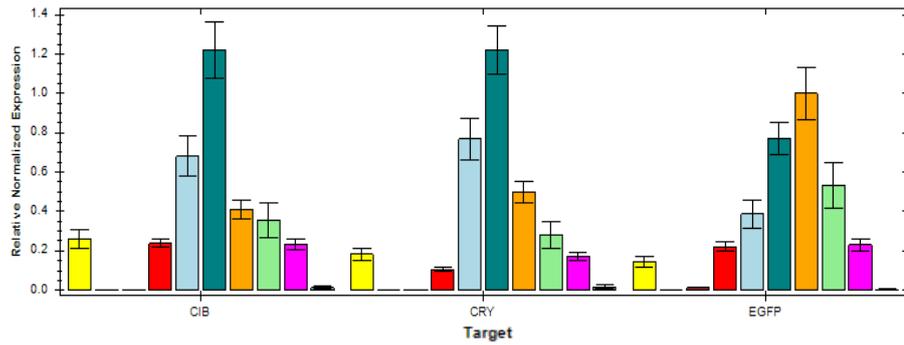
Probe, die nicht illuminiert wurde, beides ebenfalls in Dreifachbestimmung. Die Zellen wurden zur Entnahme lysiert und anschließend die RNA isoliert. Für die cDNA Synthese ist die verwendete RNA auf 15 ng/ μ L normiert worden. Die verwendeten Referenzprimer für die Normierung der Messwerte waren B2M (Beta-2-Microglobulin), RPL4 (*Ribosomal Protein L4*) und PPIA (Peptidylpropyl isomerase A).

Die Bezeichnung der Proben haben die folgenden Bedeutungen: L (gesamte *Leakage*: transfizierte Zellen ohne Illumination, Probennahme zum Zeitpunkt 7), N1 (Negativkontrolle (keine DNA) ohne Illumination, Probennahme zum Zeitpunkt 7), N2 (Negativkontrolle (keine DNA) nach Illumination mit 660 nm, Probennahme zum Zeitpunkt 7), die Zahlen stehen für illuminierte Proben (660 nm) und den jeweiligen Zeitpunkt der Probennahme (1: 1 h, 2: 4 h, 3: 24 h, 4: 30 h, 5: 48 h, 6: 54 h, 7: 72 h nach Transfektion). Die Illumination der Proben erfolgte ab dem Zeitpunkt 4, der in den nachfolgenden Grafiken (Abbildung 59ff) mit einem blauen Pfeil markiert wurde. Die drei homologen Proben wurden jeweils viermal vermessen, das heißt, dass jeder Messbalken in der resultierenden Grafik den Mittelwert von 12 Messungen darstellt.

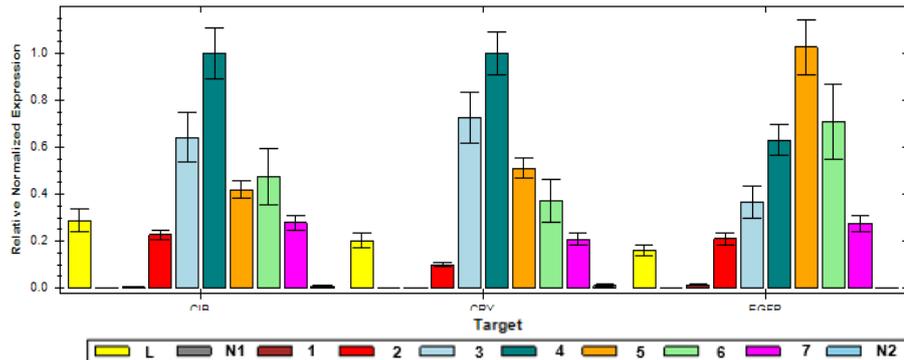
Als erstes wurde überprüft, ob die drei verwendeten Referenzprimer geeignet waren und ob sie die gleichen Ergebnisse lieferten. Abbildung 58 zeigt beispielhaft die Messwerte der drei Referenzprimer B2M, PPIA und RPL4 für die Gene CRY, CIB und Gal4UAS-EGFP dargestellt. Die Ergebnisse dieser drei Referenzprimer waren bei allen verwendeten Plasmiden beider optogenetischer Systeme und aller Protein Expressionen gleich.

Ergebnisse

B2M



PPIA



RPL4

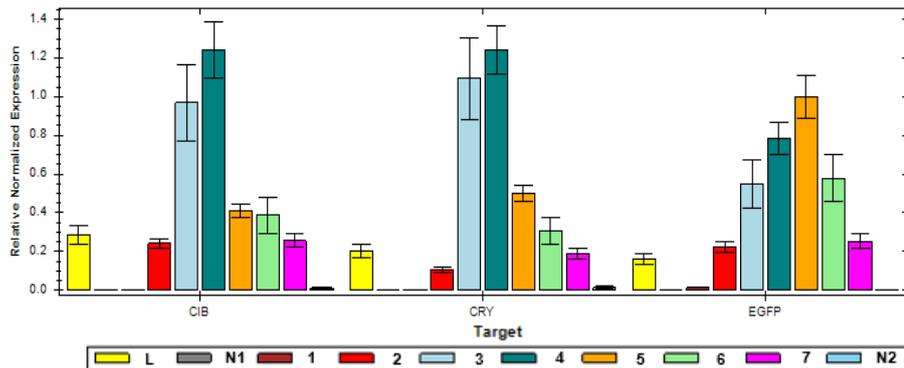


Abbildung 58: qPCR Daten der drei verwendeten Referenzprimer B2M, PPIA und RPL4 für die Gene CRY, CIB, EGFP; N=12.

Wie in der Abbildung zu erkennen ist, sind die Ergebnisse der drei verwendeten Referenzprimer bei allen untersuchten Genen gleich. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Primern nachgewiesen werden.

Daher waren alle drei Referenzgene für eine Normierung der Messdaten geeignet. Die Normierung der nachfolgenden Probenmessungen wurde mit allen drei Referenzgenen durchgeführt.

Zuerst wurde das optogenetische CRY2-System mit den Proteinmarkern eGFP, BDNF und Luciferase analysiert. Abbildung 59 zeigt die gemessenen qPCR Daten des CRY2-Systems mit Luciferase Expression.

Ergebnisse

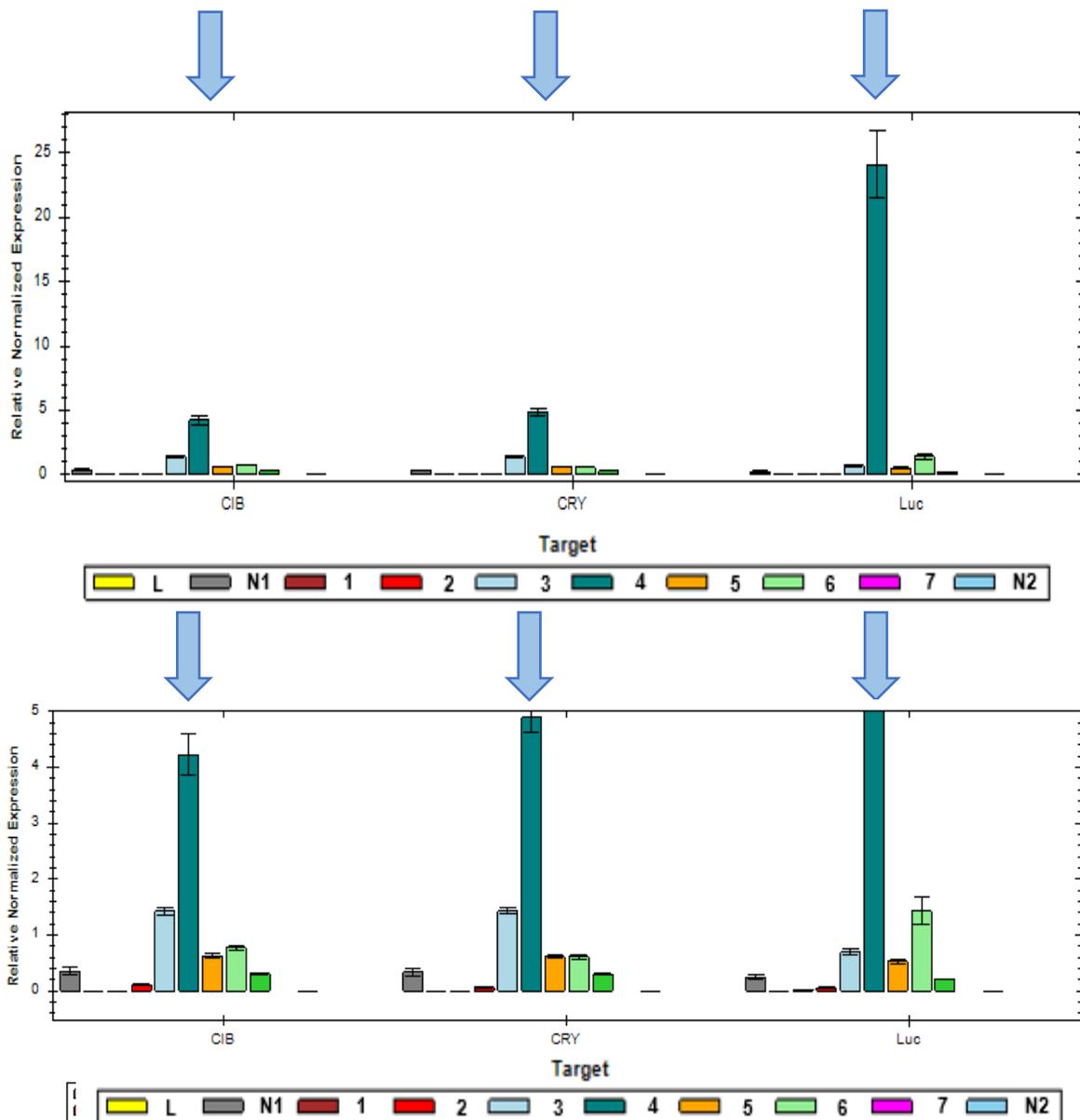


Abbildung 59: qPCR Daten des CRY Systems mit Luciferase Expression. Oben: in voller Größe, unten: Ausschnitt der Expression von 0-5; N=12.

Betrachtet man die Expression von CRY und CIB so fiel auf, dass sich beide Kurven der zeitlichen Verläufe sehr ähnelten und die Expressionswerte ebenfalls keine deutlichen Unterschiede aufweisen. Die Kurve des zeitlichen Verlaufs der Genexpression stieg bis zu einem Maximum bei Zeitpunkt 4 während der Illumination an. Nach Beendigung der Illumination nahm die RNA Menge kontinuierlich ab. Alle vor dem Zeitpunkt 4 gemessenen Expressionen waren die *Leakage* des Systems.

Betrachtete man nun die Luciferase Expression, so war auch hier eine ähnliche Kurvenform mit einem Maximum bei Zeitpunkt 4 erkennbar. Darüber hinaus ist auch hier eine *Leakage* bei Zeitpunkt 3 gemessen worden. Da die gemessene Luciferase Expression jedoch 25-mal so hoch war, konnte sie vernachlässigt werden. Im Vergleich mit der CRY und CIB Expression war die Luciferase Expression 5-mal höher. Feststellbar war, dass Luciferase eine sehr hohe Expression mit geringer RNA Halbwertszeit hatte.

In Abbildung 60 sind die qPCR Messwerte für das CRY2-System mit eGFP Expression dargestellt.

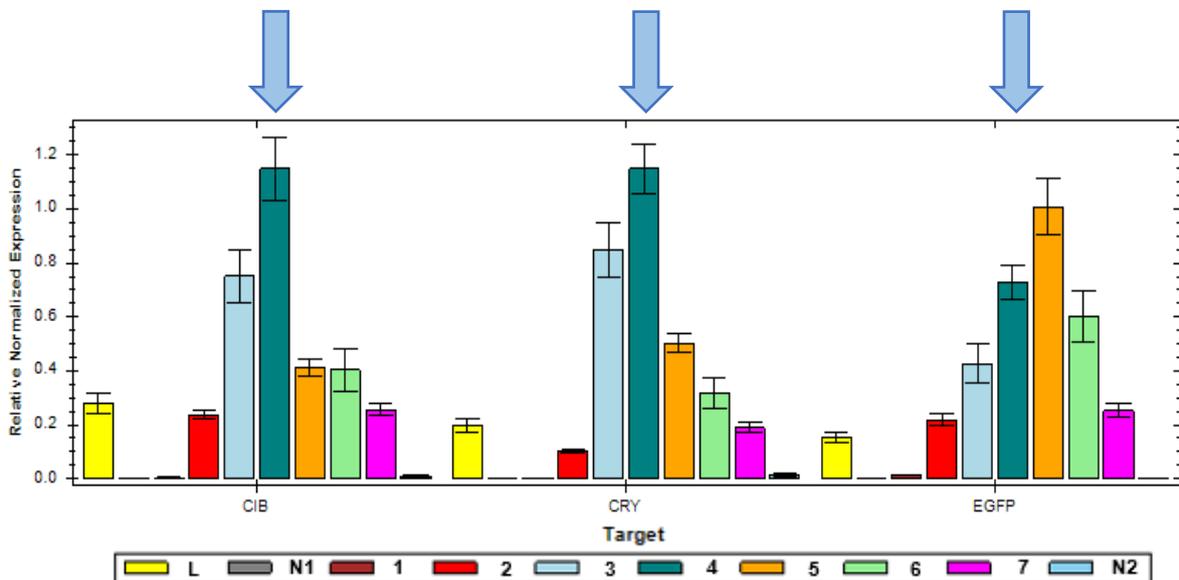


Abbildung 60: qPCR Daten des CRY2-Systems mit EGFP Expression; N=12.

In der oben gezeigten Grafik stimmen die Kurven der zeitlichen Verläufe von CRY und CIB überein. Sie verfügen ebenfalls über eine Glockenkurvenform mit einem Maximum bei Zeitpunkt 4. Die eGFP Daten bilden ebenso eine Glockenkurve, jedoch diesmal mit einem Maximum der RNA Menge bei Zeitpunkt 5, also erst nach der Illumination. Im Vergleich zur Luciferase Expression ist die eGFP Expression deutlich geringer ausgeprägt und zeichnete sich durch eine längere RNA Halbwertszeit aus. Die geringere Expression des Systems war im Unterschied zu der gemessenen *Leakage* geringer, aber es bestand dennoch ein messbarer Unterschied.

Abbildung 61 zeigt die erhaltenen qPCR Daten für das CRY2-System mit BDNF Expression. Die CIB und CRY Daten waren analog zu denen des vorherigen CRY2-Systems mit EGFP Expression.

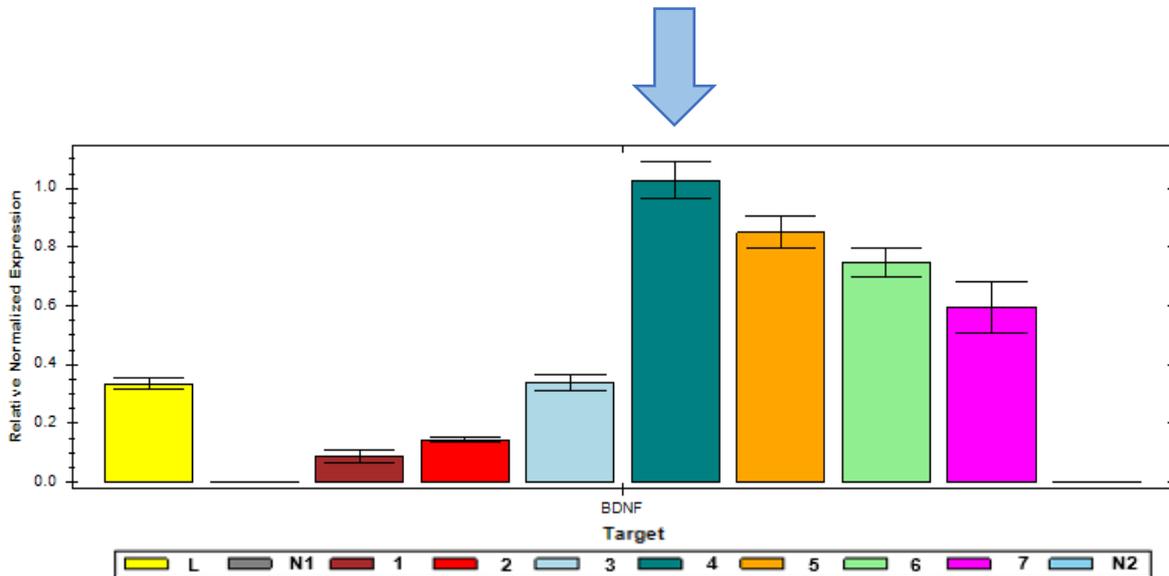


Abbildung 61: qPCR Daten des CRY2-Systems mit BDNF Expression; N=12.

Zu erkennen war, dass auch der zeitliche Verlauf der BDNF Expression eine Glockenkurve mit einem Maximum bei Zeitpunkt 4 bildete. Im Vergleich zu den CRY2-Systemen mit eGFP und Luciferase Expression hatte die BDNF RNA die längste Halbwertszeit. Die Expression von BDNF war analog zur eGFP Expression und damit deutlich geringer als bei der Luciferase Expression. Betrachtete man die *Leakage*, so war diese ebenfalls analog zum CRY2-System mit eGFP Expression. Auch hier bestand ein messbarer Unterschied zur Expression.

3.3.9 BDNF Expression

Nach Optimierung der Proteinexpression des CRY2-Systems, unter Verwendung des Luciferase Markers, wurde die Expression des therapeutisch relevanten BDNFs mit Hilfe des klonierten Plasmids Gal4UAS-BDNF überprüft. Erneut wurden vier identische Proben mit 750 µg CRY Plasmiden in einem Verhältnis von 1:1:4 mit 0,5 µL DreamFect™ Gold Transfektionsreagenz transfiziert. Diese wurden anschließend 12 Stunden repetitiv illuminiert und nach 48 Stunden mittels BDNF ELISA quantifiziert. Der ELISA und seine dazugehörige Kalibrationskurve wurden nach Herstellerangaben

durchgeführt und dessen Absorption bei 450 nm gemessen. Die daraus resultierende Kalibrationskurve kann in Abbildung 62 eingesehen werden.

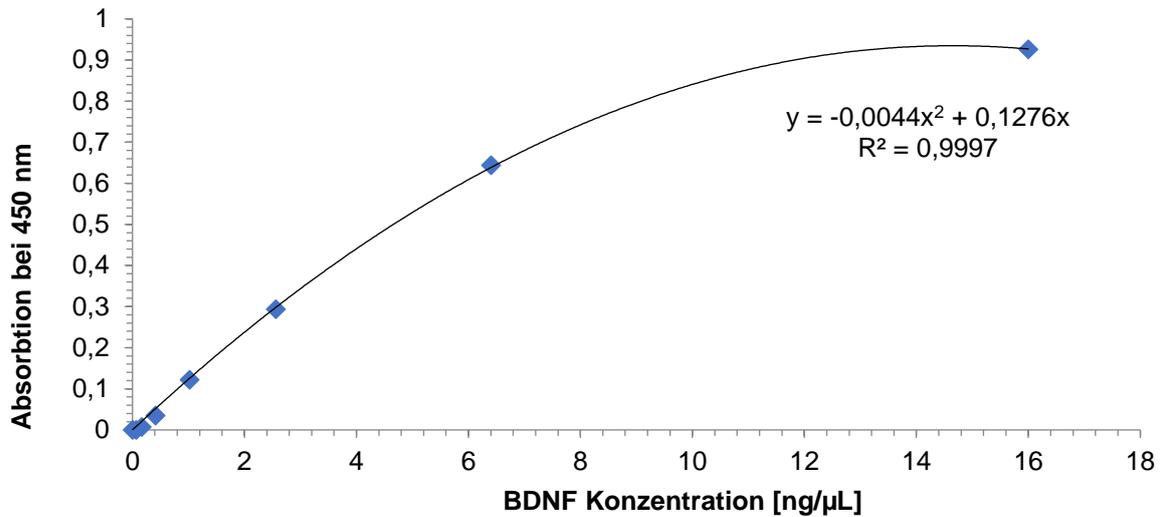


Abbildung 62: Mittels BDNF ELISA gemessene Absorptionswerte bei 450 nm des optogenetischen CRY2-System nach Transfektion und Illumination mit den optimierten Bedingungen.

Die Kalibrierkurve mit nichtlinearer Regression zweiter Ordnung hatte ein Bestimmtheitsmaß von 99,9 % und schnitt die y-Achse im Nullpunkt. Bis zu einer Konzentration von 6,4 ng/µL war eine lineare Steigung zu erkennen, danach flachte die Steigung deutlich ab. Das Detektionslimit dieses ELISAs lag bei 16 ng/µL.

Abbildung 63 zeigt die mittels BDNF ELISA gemessenen Absorptionswerte der Proben.

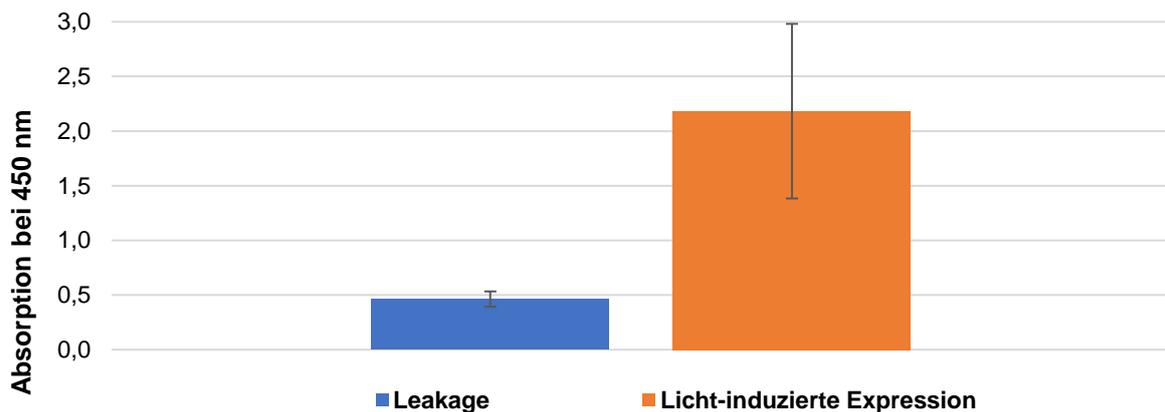


Abbildung 63: Mittels BDNF ELISA gemessene BDNF Konzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit DreamFect™ Gold (0,5 µL) im Plasmidverhältnis 1:1:4 (Gesamtplasmidmenge: 750 µg) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetitiv (20 sek on, 60 sek off) 12 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4.

Die *Leakage* hatte in diesem Experiment einen Absorptionswert von 0,46, der nach obiger Kalibration einer BDNF Konzentration von 4,5 ng/ μ L entsprach. Die Absorption der lichtinduzierten Probe lag bei 2,18. Dieser Absorptionswert überschritt das Maximum der Kalibration um mehr als das Doppelte. Daher war die BDNF Konzentration größer als 16 ng/ μ L, vermutlich jedoch sogar noch deutlich größer. Die Absorption der lichtinduzierten BDNF Expression war um den Faktor 5 größer als die der *Leakage*.

4. Diskussion und Ausblick

Das Ziel dieser Dissertation war die Etablierung einer lichtinduzierten Proteinsynthese in Säugetierzellen für therapeutische Anwendungen. Hierfür wurden die Experimente zunächst mit dem optogenetischen, rotlichtinduzierten PhyB-System [27] begonnen. Die Etablierung dieses Systems in CHO-K1 Zellen sowie eine erste Optimierung der Versuchsbedingungen erfolgte bereits im Rahmen der Masterarbeit. Dort wurde eine im Vergleich zur lichtinduzierten Expression relativ hohe spontane *Leakage* auch ohne Illumination festgestellt, die für die Etablierung eines lichtinduzierten Systems problematisch war.

4.1 PhyB-System

4.1.1 Leakage des PhyB-Systems

Eine spontane *Leakage* eines optogenetischen Systems wird dadurch verursacht, dass ein optogenetisches System nie vollständig aktiviert oder deaktiviert werden kann, da es sich in einem Gleichgewichtszustand zwischen Aktivierung und Deaktivierung befindet. Die Illumination des Systems führt also lediglich zu einer Verschiebung des Gleichgewichts auf Seiten der Aktivierung. Somit weist jedes optogenetische System eine gewisse *Leakage* auf, dessen Höhe unter anderem vom verwendeten System abhängt [51].

Bei einer genaueren Untersuchung der *Leakage* wurde das PhyB-System mit unterschiedlichen Wellenlängen (ohne Illumination, 660 nm sowie 740 nm) mit und ohne PCB Zugabe illuminiert. Alle Proben lagen im Bereich ihrer Standardabweichungen, wodurch keine Unterschiede erkennbar waren. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass weder die Illumination noch eine PCB-Zugabe Einfluss auf die *Leakage* hatte.

4.1.2 Einfluss der Zellkonfluenz auf die Proteinexpression

Bei homologen Proben konnten trotz gleicher Kultivierungsbedingungen teils unterschiedliche Proteinexpressionen gemessen werden, die zu den hohen

Standardabweichungen führten. Diese Unterschiede entstanden durch unterschiedliche Zellkonfluenzen der Proben. Es fiel in diversen Experimenten auf, dass auch bei gleicher Probenkonfluenz am Tag der Transfektion sehr unterschiedliche Konfluenzen am Tag der Experimentauswertung festgestellt wurden. Diese führten nicht nur zu Ungenauigkeiten in der Bildauswertung, sondern auch zu Differenzen in der Proteinexpression. Hierdurch entstanden Unterschiede sowohl zwischen homologen wie auch unterschiedlichen Proben eines Experiments und zwischen verschiedenen Experimenten.

4.1.3 Bildauswertung mittels Image J

Im Laufe der Experimente konnte festgestellt werden, dass die mittels Image J berechneten Flächen nicht immer mit den visuellen Eindrücken der Bildaufnahmen übereinstimmten. Ein Grund für die Unterschiede war, dass die Software bei der Bildauswertung automatisiert zwischen Fluoreszenzsignal der Zellen oder Hintergrundsignal differenziert, wodurch schwach fluoreszierende Zellen möglicherweise falsch zugeordnet wurden. Zusätzlich waren die fluoreszierenden Zellen teilweise unterschiedlich groß, wodurch zusätzliche Abweichungen entstanden. Zum anderen legte die Bildauswertung die Annahme einer konfluenten, einschichtigen Zellschicht zu Grunde. Dies war am Tag der Auswertung jedoch nicht immer der Fall, daher wurden die Ergebnisse verfälscht. Künftig muss daher die Zellzahl als Normierungsfaktor für die Auswertung mitberücksichtigt werden.

Alternativ zur Bildauswertung wurde daher die Proteinexpression des PhyB-Systems mittels Durchflusszytometrie bewertet. Hierbei konnte nicht nur die Menge an fluoreszierenden Zellen, sondern auch die Stärke der Fluoreszenz jeder Zelle gemessen werden unabhängig von der Zellkonfluenz. Diese Messungen bestätigten generell die Ergebnisse der Image J Bildauswertungen und die Verhältnisse der Proben zueinander, jedoch waren die Anteile an fluoreszierenden Zellen bei den Durchflusszytometermessungen um den Faktor 10 höher als bei der Bildauswertung. Die weiteren Auswertungen erfolgten aufgrund der größeren Genauigkeit mit Hilfe des Durchflusszytometers.

4.1.4 Co-Transfektionseffizienz und das Markerprotein eGFP

Ein Vergleich der Transfektionseffizienzen des Testplasmids (pSAM200 mit pKM-EGFP) mit dem optogenetisch aktivierbaren Plasmid (pKM-022 mit pKM-EGFP) in CHO-K1 Zellen resultierte in einer um den Faktor 3 gesteigerten Proteinexpression des Testplasmids. Damit konnte die Genexpression des Testplasmids deutlich von der *Leakage* unterschieden werden, wodurch die Funktion dieser Plasmidkombination verifiziert wurde. Gleichzeitig konnte geschlossen werden, dass die Co-Transfektionseffizienz von zwei Plasmiden, die mit PEI in CHO-K1 Zellen transfiziert wurden, mit dem verwendeten Protokoll bei ungefähr 10 % lag. Wahrscheinlich lag daher auch die Transfektionseffizienz des optogenetischen Plasmids (pKM-022 mit pKM-EGFP) bei ca. 10 %. Durch den jedoch deutlich komplizierteren Aktivierungsmechanismus (Bindung der Chromophore an den Photorezeptor, Konformationsänderung durch Lichtinduktion und anschließender Bindung der Plasmide aneinander) dieser Plasmidkombination exprimieren nur ca. 1/3 dieser co-transfizierten Zellen zwei Tage nach Illumination den Marker eGFP. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zeitspanne von zwei Tagen nicht ausreichend war, um die maximale Proteinexpression zu erreichen. Darüber hinaus ist eGFP ein relativ großes Protein, dessen Synthese für die Zellen problematisch ist [90]. Daher stellt eGFP keinen optimalen Proteinmarker für die vorliegenden Experimente dar. Eine Verwendung eines anderen Proteinmarkers wie dem therapeutisch relevanten BDNF oder SEAP könnte möglicherweise zu verbesserten Expressionswerten führen. Diese These wurde an einer späteren Stelle noch weitergehend überprüft (siehe Kapitel 3.1.12 und 3.1.13).

4.1.5 Optimierung des PhyB-Systems

Bereits in der Masterarbeit wurden die Einflussfaktoren Zeitspanne zwischen Transfektion und Versuchsauswertung, Anzahl verwendeter Zellen, Kultivierungsmedien und die Verwendung zellulärer DNA sowie die verwendete PEI Transfektionsreagenz-Menge in CHO-K1 Zellen optimiert.

Für eine weitere Optimierung der Proteinexpression wurden daher Einflussfaktoren des PhyB-Systems, wie die Illuminationsintensität (abhängig vom Arbeitsabstand

zwischen Zellen und LEDs und der Beleuchtungsstärke), die Illuminationsdauer, die Transfektionsbedingungen (abhängig vom Verhältnis und Menge der Plasmide oder des Transfektionsreagenzes) sowie der Co-Faktors PCB (abhängig von der Menge und dem Zeitpunkt der Zugabe), in CHO-K1 Zellen nach PEI Transfektion variiert.

4.1.6 Optimierung des PhyB-Systems: Plasmidverhältnis

Ein variiertes Einflussfaktor waren die Transfektionsbedingungen, bei denen das Plasmidverhältnis zwischen dem optogenetischen Plasmid pKM-022 und pKM-EGFP in CHO-K1 Zellen verändert wurde, wobei die Gesamtplasmidmenge konstant blieb. Wie in Abbildung 30 zu erkennen ist, führten Plasmidverhältnisse mit einem Überschuss des optogenetischen Plasmids (pKM-022) zu keiner Verbesserung, während ein Überschuss des Zielplasmids (pKM-EGFP) zu einer deutlichen Steigerung der Proteinexpression führte. Bei einem Plasmidverhältnis von 1:2 konnte eine um den Faktor 5 gesteigerte Proteinexpression im Vergleich zur *Leakage* festgestellt werden, wodurch auch die Funktion dieser Plasmidkombination bestätigt wurde. Somit hatte dieser Einflussfaktor eine große Wirkung auf die Höhe der Proteinexpression des optogenetischen PhyB-Systems.

4.1.7 Optimierung des PhyB-Systems: Illuminationsintensität

Die Illuminationsintensität war ein weiterer untersuchter Einflussfaktor, bei dem sowohl die Beleuchtungsintensität wie auch der Arbeitsabstand in CHO-K1 Zellen variiert wurde. Die Beleuchtungsintensität wurde ausgehend von der Originalpublikation von Weber *et. al.* [27] sowohl erhöht wie auch erniedrigt, während der Arbeitsabstand aufgrund der vorliegenden Experimentbedingungen lediglich vergrößert werden konnte, um eine homogene Illumination der Proben gewährleisten zu können.

Bei keinem dieser Experimente konnte ein Unterschied zwischen der lichtinduzierbaren Plasmidkombination pKM-022 und pKM-EGFP und der *Leakage* gemessen werden. Dies lag unter anderem an den hohen Standardabweichungen der homologen Proben, die wahrscheinlich in unterschiedlichen Konfluenzen begründet waren. Es konnte daher festgestellt werden, dass durch die durchgeführten

Variationen der Illuminationsintensität keine Optimierung der eGFP Proteinexpression möglich war.

4.1.8 Optimierung des PhyB-Systems: PCB-Menge

Als nächster Einflussfaktor wurde die dem Medium zugegebene PCB-Menge in CHO-K1 Zellen untersucht. Hierbei war zu beachten, dass PCB lediglich eine Halbwertszeit von einer Stunde hatte, wodurch bereits kleine Abweichungen in unterschiedlichen Proteinexpressionen resultieren konnten. Auf eine Zugabe großer Mengen PCB sollte verzichtet werden, da PCB in zelltoxischem DMSO gelöst werden muss. Auf die Verwendung eines weiteren Plasmids, das PCB innerhalb der Zellen synthetisiert, wurde aufgrund der dadurch sinkenden Transfektionseffizienz sowie der geringen entstehenden PCB Mengen verzichtet [41, 294].

Die in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse zeigen eine lineare Steigung der Proteinexpression bei steigenden PCB Konzentrationen bis zu einer Konzentration von 15 μM . Weitere Erhöhungen der PCB Menge führen nur noch zu geringen Steigerungen der Proteinkonzentrationen, was auf eine Sättigung des Fotorezeptors hindeutet, denn jeder Fotorezeptor ist nur in der Lage, ein PCB-Molekül zu binden.

Die Proteinexpression konnte durch eine Erhöhung der PCB Menge von 7,5 μM auf 22,5 μM um den Faktor 3 gesteigert werden. Dies zeigte, dass PCB ein besonders wichtiger Einflussfaktor des optogenetischen PhyB-Systems ist. Des Weiteren konnte auch eine Verdreifachung der Proteinexpression im Vergleich zur *Leakage* festgestellt werden. Eine optogenetische Aktivierung der Genexpression des PhyB-Systems war bereits ab einer PCB Konzentration von 11,25 μM nachweisbar.

4.1.9 Zusammenfassung der Optimierungen des PhyB-Systems

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Optimierung der Einflussfaktoren des optogenetischen PhyB-Systems in CHO-K1 Zellen erfolgreich war, wobei vor allem die PCB-Menge sowie das Plasmidverhältnis während der Transfektion entscheidende Rollen gespielt haben. Durch diese Optimierungen konnte die optogenetische Aktivierung der Genexpression des PhyB-Systems mit einer um den Faktor 5 gesteigerten Proteinexpression im Vergleich zur *Leakage* nachgewiesen werden.

Trotzdem standen diese Ergebnisse in Divergenz zu der Veröffentlichung von Weber *et. al.* [27], bei der ein deutlich größerer Unterschied zwischen *Leakage* und lichtinduzierter Proteinexpression erzielt wurde. Auch nach mehrfachem regem Austausch mit den Kollegen dieser Arbeitsgruppe konnte die Ursache hierfür nicht zweifelsfrei ermittelt werden.

Es besteht jedoch die Möglichkeit in zukünftigen Experimenten weitere Plasmidverhältnisse (z. B. 1:3 oder 1:4), Illuminationsintensitäten sowie höhere PCB Mengen (z. B. durch wiederholte Zugabe nach einer Stunde) auszutesten und somit die Proteinexpression noch weiter zu steigern.

Diese oben dargestellten Ergebnisse wurden durch die erfolgten qPCR Messungen des PhyB-Systems mit eGFP Marker verifiziert. Die Ergebnisse der qPCR belegten ebenfalls die erfolgreiche Aktivierung der Proteinexpression durch Lichtinduktion, jedoch nur mit dem Faktor 2. Hierbei wurde auch eine im Vergleich zur Proteinexpression relativ hohe *Leakage* gemessen. Zusätzlich fiel auf, dass die Expression zeitverzögert ablief, also dass das Maximum der mRNA erst deutlich nach der Illumination erreicht wurde. Dies deckte sich mit der aufgestellten These, dass es sich bei eGFP um keinen geeigneten Proteinmarker für die durchgeführten Experimente handelte. Ebenfalls muss beachtet werden, dass schon kleine Konfluenzunterschiede zu deutlichen Schwankungen in der Höhe der *Leakage* sowie in der lichtinduzierten Proteinexpression führten. Für einen erfolgreichen Einsatz bei therapeutischen Anwendungen müssten diese Schwankungen minimiert sowie die Proteinexpression erhöht werden.

4.1.10 Laser-Illumination

Vergleichend zu der verwendeten LED-Illumination (660 nm) wurde bei identischen Versuchsbedingungen auch eine Laser-Illumination (660 nm) in CHO-K1 Zellen ausgetestet, da diese für spätere therapeutische Anwendungen eine größere Relevanz hat. Der Vorteil einer Laser-Illumination liegt darin, dass anders als bei einer LED-Illumination gezielt ausgewählte Bereiche illuminiert werden können, während umliegendes Gewebe geschont wird. Hierdurch wird die räumliche Auflösung des verwendeten optogenetischen Systems erheblich erhöht, während Risiken für den Patienten gleichzeitig minimiert werden.

Der einzige Unterschied der beiden Experimente bestand in der Illuminationsstärke, denn während die LEDs alle Zellen gleichzeitig eine Stunde mit 52 W*s/cm^2 illuminiert wurden, fuhr der Laser mit $67,4 \text{ W*s/cm}^2$ lediglich mehrfach einen quadratischen Bereich im Well in Bahnen ab. Die Laser-Illuminationsintensität war somit deutlich stärker (Faktor 130) als bei der LED-Illumination.

Mit einer 30-minütigen Laser-Illumination konnte ein Anstieg der Proteinexpression im Vergleich zur *Leakage* um den Faktor 10 erzielt werden (siehe Abbildung 31). Folglich konnte die optogenetische Aktivierung der Genexpression des PhyB-Systems in CHO-K1 Zellen durch Laser-Illumination nachgewiesen werden. Die ermittelte Proteinmenge war hierbei mit der Proteinexpression nach 60-minütiger LED-Illumination vergleichbar, bei nur halber Illuminationszeit. Somit konnte geschlussfolgert werden, dass eine Erhöhung der LED-Illuminationsstärke zu keiner weiteren Steigerung der Proteinexpression führen wird. Die *Leakage* der LED-Illumination war geringer als bei der LED-Illumination. Grund hierfür könnten Konfluenzunterschiede oder die Verwendung von schwarzen Well-Platten sowie eines schwarzen Pappdeckels sein. Für eine genauere Aussage müssten weitere Laser-Illuminationen durchgeführt werden.

Für zukünftige Experimente könnten darüber hinaus andere Muster zur Abrasterung der Wells verwendet werden, um einen größeren Bereich der Wells abzudecken. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, Einflussfaktoren der Laser-Illumination weiter zu optimieren wie z. B. die Beleuchtungsstärke, -dauer sowie die Lasergeschwindigkeit.

4.1.11 Optogenetische Aktivierung der Proteinmarker BDNF und SEAP

Der für die Optimierung verwendete Proteinmarker eGFP hat sich als nicht optimal herausgestellt, deshalb wurde die lichtinduzierte Genexpression der Proteine BDNF und SEAP nun direkt untersucht.

Bei der lichtinduzierten SEAP-Expression konnte auch nach einer Wiederholung des Experiments in keiner der Proben SEAP nachgewiesen werden. Die synthetisierte SEAP Menge lag entweder unterhalb des Detektionslimits (mU/mL) des verwendeten Assays oder die Plasmidkombination aus optogenetischem Plasmid pKM-022 und dem Zielplasmid mit SEAP Marker (pKM-006, durch Sequenzierung auf die richtige Sequenz überprüft) hat nicht zu einer Transkription der SEAP-Sequenz geführt.

Die lichtinduzierte BDNF Expression des klonierten Zielplasmids pKM-BDNF in Kombination mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 wurde mittels BDNF-ELISA quantifiziert. Bei einer der beiden Negativkontrollen (untransfizierte Zellen) wurde bereits eine BDNF Konzentration von ungefähr 850 pg/ μ L ermittelt. Zwischen der gemessenen *Leakage* des optogenetischen Systems und der Grundkonzentration war kein eindeutiger Unterschied nachweisbar. Es war somit davon auszugehen, dass die BDNF Grundkonzentration in CHO-K1 Zellen im Bereich von 850 pg/mL \pm 100 pg/mL lag. Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnte in diesem Experiment weder ein Wert für die *Leakage* bestimmt noch eine optogenetisch-induzierte BDNF Expression eindeutig nachgewiesen werden, auch wenn der absolute Expressionswert oberhalb der *Leakage* lag. Grund hierfür waren erneut Konfluenzunterschiede zwischen den Proben. Bei dem Testplasmid (pSAM200 mit pKM-BDNF) konnte jedoch mit einer Konzentration von 1385 pg/mL eine nachweisbar höhere BDNF Expression als bei der *Leakage* ermittelt werden. Abzüglich des Grundwerts war die Expression des Testplasmids ungefähr dreimal so hoch wie die des optogenetischen Plasmids. Dies bestätigte die bereits erhaltenen Ergebnisse der lichtinduzierten eGFP Expression. Dementsprechend lagen die im Vergleich zur *Leakage* relativ niedrigen Proteinexpressionen des PhyB-Systems nicht an der Verwendung des unphysiologischen Proteinmarkers eGFP.

4.1.12 Bindungsmechanismus und Zellart

Ein weiterer Einflussfaktor, der die Genexpression des PhyB-Systems möglicherweise inhibiert haben könnte, war der Tetrazyklin-Rezeptor, denn die Bindung des optogenetischen Plasmids pKM-022 an das Zielplasmid des PhyB-Systems beruhte auf der Bindung des Tetrazyklin Rezeptors an den Tetrazyklin Operator. Diese Bindungsstellen waren nur in Abwesenheit von Tetrazyklin in der Lage, aneinander zu binden, da sie ansonsten durch die Bindung des Tetrazyklins blockiert waren. Der Hersteller des in den Experimenten verwendeten fötalen Kälberserums konnte ein Vorhandensein von Tetrazyklin nicht ausschließen, deswegen wurden für eine Überprüfung dieser These zwei weitere experimentelle Plasmide (pLK-001 und pKT-393) des PhyB-Systems, die von Weber *et. al.* [27] zur Verfügung gestellt wurden, getestet. Die Funktion dieser neuen Plasmide war analog dem optogenetischen

Plasmid pKM-022 mit pKM-EGFP. Lediglich der Bindungsmechanismus basierte auf anderen Bindungsstellen, die nicht von Tetrazyklin beeinflusst werden konnten. Bei diversen Proben, die zum Teil mit verschiedenen Transfektionsbedingungen transfiziert wurden, konnten mittels Fluoreszenzmikroskop keine fluoreszierenden Zellen nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen könnten sein, dass es sich um experimentelle Plasmide handelte, deren vollständige Sequenz nicht publiziert waren und die deswegen nicht durch eine Sequenzierung überprüft werden konnten. Eine Verringerung der Proteinexpression durch Tetrazyklin konnte somit weiterhin nicht ausgeschlossen werden. Eine komplette Inhibierung der Bindestellen durch Tetrazyklin lag jedoch nicht vor, da sowohl beim Testplasmid wie auch beim optogenetisch aktivierbaren Plasmid erhöhte Proteinexpressionen nachgewiesen wurden, obwohl beide Plasmidsysteme auf den Tetrazyklin Bindestellen basierten.

Die letzten überprüften Einflussfaktoren waren die verwendete Zellart, die z. B. durch Promoter *silencing* einen inhibierenden Einfluss auf die Genexpression ausüben könnte und das verwendete Transfektionsreagenz. Hierfür wurde die menschliche HEK293 Zelllinie, die robust und gleichzeitig relativ einfach zu transfizieren war, mit dem Transfektionsreagenz DreamFect™ Gold, das selbst in schwer zu transfizierenden ADhMSCs gute Transfektionseffizienzen lieferte, transfiziert.

Auch in diesem Experiment waren die Unterschiede zwischen *Leakage* und optogenetisch aktivierter Genexpression so gering, dass man nicht von eindeutigen Unterschieden sprechen konnte. Eine Wiederholung des Experiments mit größerer Probenzahl würde Aufschluss über die Eindeutigkeit oder Gleichheit der Ergebnisse geben. Die Ursache der im Vergleich zur *Leakage* relativ niedrigen Proteinexpressionen des PhyB-Systems lag demnach weder an der verwendeten Zellart noch an der Transfektionsmethode.

4.2 Transfektion von ADhMSCs

Durch die Optimierungen der Proteinexpression des PhyB-Systems wurde zwar eine optogenetisch-induzierte Proteinexpression nachgewiesen, die durch die relativ hohe *Leakage* des Systems relativiert wurde. Zusätzlich waren sowohl die Höhe der *Leakage* wie auch der Genexpression stark von der Konfluenz der Zellen abhängig. Daher wurden andere optogenetische Systeme gesucht, die eine stabilere

Genexpression mit geringerer *Leakage* in Säugetierzellen aufwiesen und folglich besser für therapeutische Anwendungen geeignet waren.

Währenddessen wurde an einer geeigneten Co-Transfektionsmethode für humane mesenchymale Stammzellen, die aus Fettgewebe isoliert wurden, gearbeitet. ADhMSCs sind für spätere therapeutische Anwendungen besonders geeignet, weil sie relativ einfach vom Patienten isoliert werden können. Außerdem gelten sie als unreife Zellen als relativ wenig immunogen, darüber hinaus ist eine autologe Gewinnung möglich. Immortalisierte Modell-Zelllinien wie CHO-K1 oder HEK293 Zellen hingegen sind für spätere therapeutische Anwendung an Patienten nicht geeignet. Deshalb bestand die Aufgabe darin, eine Transfektionsmethode für ADhMSCs mit eGFP Marker zu etablieren, die zu einer möglichst hohen Proteinexpression führen sollte. Diese sollte dann im Anschluss auf eine Co-Transfektion ausgeweitet werden.

4.2.1 Chemische Transfektion

Es wurden hierfür fünf verschiedene chemische Transfektionsreagenzien vergleichend in Einzel-Transfektionen getestet. Dort überzeugte nach einer Variation der Transfektionsbedingungen nach Herstellerprotokoll (Menge an Transfektionsreagenz und DNA sowie ein Vergleich circularer und linearer DNA) das Transfektionsreagenz DreamFect™ Gold mit einer Transfektionseffizienz von 35 % im Vergleich zu Lipofectamine Stem (11 %), X-tremeGENE™ 9 (5 %) sowie Viromer® Red und Viromer® Plasmid (> 1 %). Weitere Optimierungen mit dem Reagenz DreamFect™ Gold zeigten eine Autofluoreszenz (von bis zu 7 %) bei Verwendung von größeren Mengen (> 3 µL). Es zeigte sich jedoch, dass die besten Ergebnisse mit 2 µL Reagenz erzielt wurden, wodurch die Autofluoreszenz vernachlässigt werden konnte.

Des Weiteren wurde der Einfluss von ADhMSCs, die von verschiedenen Spendern isoliert wurden, auf die Transfektionseffizienz bei gleichen Transfektionsbedingungen untersucht. Hierbei zeigten alle Spender vergleichbare Transfektionseffizienzen. Ergebnisse von verschiedenen ADhMSCs waren demnach miteinander vergleichbar. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der Einfach-Transfektionen mit DreamFect™ Gold wurden als nächstes die Transfektionseffizienzen von Co-Transfektionen des Testplasmids pSAM200 in Kombination mit pKM-EGFP gemessen. Hierbei zeigte sich, dass ein Überschuss des Zielplasmids (pKM-EGFP)

mit einer Gesamtmenge von 480 ng DNA zu den besten Co-Transfektionseffizienzen (ca. 6 %) führte. Zieht man nun in Betracht, dass die optogenetisch aktivierte Proteinexpression lediglich ein Drittel der Proteinexpression des Testplasmids ausmachte, so ist festzustellen, dass die chemische Co-Transfektion von ADhMSCs mit den getesteten Reagenzien nicht für therapeutische Anwendungen ausreichend war. Zusätzlich musste beachtet werden, dass die Transfektionseffizienz bereits bei der Übertragung von einer Einfach- auf eine Co-Transfektion deutlich gesunken war. Bei einer Übertragung dieser Methode auf eine Dreifachtransfektion, wie sie beim neuen optogenetischen CRY2-System benötigt würde, führt dies vermutlich zu einer erneuten Senkung der Effizienz.

Für weitere Optimierungen der Co-Transfektionseffizienz könnten in zukünftigen Experimenten noch weitere Gesamtplasmidmengen und Plasmidverhältnisse ausgetestet werden in der Hoffnung, die resultierende Co-Transfektionseffizienz noch weiter zu steigern. Verwendet man anstelle des eGFP Markers einen anderen Proteinmarker, so könnten zusätzlich auch noch größere Mengen an Transfektionsreagenz ausgetestet werden, da dort die Autofluoreszenz vernachlässigbar ist. Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Transfektionseffizienz wäre die Veränderung des optogenetischen CRY2-Plasmidsystems. Eine Umklonierung des Systems von drei auf zwei Plasmide könnte zu einer erheblichen Verbesserung der Transfektionseffizienz und damit verbunden zu einer gesteigerten Proteinexpression führen. Alternativ könnten selbstverständlich auch weitere Transfektionsmethoden ausgetestet werden, wie z. B. physikalische Transfektionsmethoden (Elektroporation, Nukleofektion) oder eine virale Transfektion.

4.2.2 Physikalische Transfektion

Da die getesteten chemischen Transfektionsmethoden für eine Multitransfektion von ADhMSCs nicht ausreichend erschienen, wurde zusätzlich die physikalische Transfektion mittels Elektroporation untersucht. Die Versuchsbedingungen der Elektroporation wurden ausgehend von dem Protokoll von K. von der Haar *et. al.* [90] optimiert. Hierbei wurde bei den nachfolgenden Experimenten sowohl die Pulslänge, wie auch die verwendete Spannung variiert. Die besten Resultate wurden mit einem 10 ms Puls von 300 V sowie mit einem 0,5 ms Puls von 600 V erzielt. Unter

Verwendung beider Pulse erfolgte eine Variation des Elektroporationspuffers. Hierbei wurde herausgefunden, dass mit ddH₂O zwar die höchste Transfektionseffizienz erreicht wurde auffallend war, dass die Zellen nach der Elektroporation deutlich weniger konfluent waren als bei den anderen Puffern. Die beste Kombination aus niedriger Zellsterblichkeit und möglichst hoher Transfektionseffizienz konnte mit dem hypoosmolaren Elektroporationspuffer erreicht werden. Mit Abstand die beste Konfluenz der Zellen wurde mit PBS erzielt, allerdings war dort die Transfektionseffizienz nur halb so hoch wie mit dem hypoosmolaren Elektroporationspuffer. Eine anschließende Variation der eingesetzten Plasmidmenge zeigte die besten Ergebnisse unter Verwendung von 20 µg und 60 µg DNA. Zusätzlich wurde auch hier der Einfluss der ADhMSCs-Spender auf die Transfektionseffizienz der Elektroporation überprüft. Im Gegensatz zur chemischen Transfektion wurden spenderseitige Qualitätsunterschiede ermittelt, indem bei den Spendern AD44N und AD47N höhere Transfektionseffizienzen als bei den Spendern AD08U und AD48M resultierten.

Abschließend wurde festgestellt, dass eine Steigerung der Transfektionseffizienz der Einzel- und Co-Transfektion von ADhMSCs durch Elektroporation über ca. 3 % auch nach Veränderung diverser Parameter nicht erzielt werden konnte. Diese Ergebnisse lagen unter denen der chemischen Transfektion mit DreamFect™ Gold. Somit war die erfolgversprechendste der getesteten Transfektionsmethoden für ADhMSCs die chemische Transfektion mittels DreamFect™ Gold. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere Transfektionsmethoden, wie Nukleofektion oder eine virale Transfektion zu noch besseren Resultaten führen könnten. Darüber hinaus wurde deutlich, dass mit steigender Anzahl der zu transfizierenden Plasmide die Transfektionseffizienz sank. Infolgedessen erscheint die wahrscheinlich erfolgversprechendste Lösung eine Reduzierung der zu transfizierenden Plasmide. Für das CRY2-System wäre dies eine Klonierung von drei auf zwei Plasmide.

4.3 CRY2-System

4.3.1 Etablierung des CRY2-Systems

Da sich das PhyB-System als nicht geeignet für therapeutische Anwendungen herausgestellt hat, wurden andere optogenetische Systeme gesucht, die eine stabilere Genexpression mit geringerer *Leakage* in Säugetierzellen aufwiesen.

Hierfür wurden zwei erfolgversprechende blaulichtinduzierte optogenetische Systeme, CRY2 und EL222, vergleichend getestet. Bei ersten Vorversuchen mit den in den Veröffentlichungen [26, 63] verwendeten Plasmiden überzeugte nach DreamFect™ Gold Transfektion in HEK293 Zellen das CRY2-System durch seine signifikant höhere Luciferase Expression im Gegensatz zu dem EL222-System und wurde daher für weiterführende Versuche ausgewählt. Die anschließende Optimierung mit DreamFect™ Gold Transfektion des CRY2-Systems mit Luciferase Marker wurde in HEK293 Zellen durchgeführt. Der für die Optimierung des CRY2-Systems verwendete Luciferase Marker wurde mit Hilfe eines fluorometrischen Assays quantifiziert.

4.3.2 Optimierung des CRY2-Systems: Transfektionsbedingungen

4.3.2.1 Plasmidverhältnis

Der erste optimierte Einflussfaktor des CRY2-Systems war das Plasmidverhältnis, in dem die drei Plasmide des CRY2-Systems CRY, CIB und Gal4UAS-Luc transfiziert wurden. Hierbei zeigte es sich, dass die höchsten Genexpressionen bei einem Überschuss des Zielplasmids Gal4UAS-Luc gemessen wurden und zwar bei den Plasmidverhältnissen 1:1:3 und 1:1:4 (siehe Abbildung 33 und 34). Hierbei konnte eine um den Faktor 18 höhere Proteinexpression im Vergleich zur *Leakage* festgestellt und somit die Funktion des Plasmidsystems nachgewiesen werden. Noch größere Überschüsse des Zielplasmids Gal4UAS führten zu keinen weiteren Verbesserungen der Proteinexpressionen. Dieser Einflussfaktor hatte eine große Wirkung auf die Höhe der Proteinexpression des optogenetischen CRY2-Systems. Auch hier konnten aufgrund von hohen Standardabweichungen resultierend aus Konfluenzunterschieden nicht zwischen allen Proben signifikante Unterschiede festgestellt werden.

4.3.2.2 Gesamtplasmidmenge

Ein nächster Einflussfaktor, dessen Effekte auf das CRY2-System untersucht wurden, war die bei der Transfektion eingesetzte Gesamtplasmidmenge. Sowohl bei einem Plasmidverhältnis von 1:1:3 wie auch bei einem Plasmidverhältnis von 1:1:4 war die höchste absolute Proteinkonzentration bei Verwendung von 0,75 µg DNA messbar (siehe Abbildung 35). Ein Vergleich zwischen den Proteinkonzentrationen zeigte, dass das optimale Plasmidverhältnis 1:1:4 war mit dem Einsatz einer Gesamtplasmidmenge von 0,75 µg bis 1 µg. Durch diese Optimierung war die Genexpression des CRY2-Systems im Vergleich zur *Leakage* um Faktor 26 höher. Die Gesamtplasmidmenge gehört deshalb ebenfalls zu den wichtigen Einflussfaktoren.

4.3.2.3 Transfektionsreagenz

Der dritte optimierte Einflussfaktor des CRY2-Systems war die für die Transfektion verwendete Menge an Transfektionsreagenz DreamFect™ Gold. Bei einem Plasmidverhältnis von 1:1:4 war sowohl bei einer Plasmidmenge von 0,75 µg als auch bei 1 µg eine Verwendung von 0,5 µL DreamFect™ Gold optimal (siehe Abbildung 36). Die gemessenen Luciferasekonzentrationen beider Plasmidmengen unterschieden sich erneut nicht signifikant. Daher waren beide Mengen geeignet um eine hohe Proteinkonzentration zu erzielen. Aus wirtschaftlichen Gründen wurde jedoch die kleine Plasmidmenge bevorzugt. Die ermittelten optimalen Transfektionsbedingungen setzten sich daher aus einem Plasmidverhältnis von 1:1:4 mit einer Gesamtplasmidmenge von 0,75 µg und 0,5 µL Transfektionsreagenz zusammen.

4.3.3 Optimierung des CRY2-Systems: Illuminationsdauer

Der letzte optimierte Einflussfaktor war die Illumination. Da das verwendete Illuminationsmuster bereits optimiert wurde, ist von einer weiteren Variation abgesehen worden. In dem folgenden Experiment wurde daher nur die Gesamtilluminationsdauer variiert.

Die in der Literatur [63] verwendete repetitive 12-stündige Illumination bestand aus einer 20-sekündigen Illumination mit 8 W/m² mit einer Wellenlänge von 450 nm gefolgt von 60-sekündigen Pause ohne Illumination. Grund hierfür war, dass das CRY2-

System nach Blaulichtaktivierung lediglich ein paar Minuten aktiv blieb, bevor es wieder deaktiviert wurde. Die repetitive Illumination sorgte somit für eine konstante Aktivierung über die gesamte Illuminationsdauer, während die Pause vor einer Überhitzung der LEDs und damit einer Zellschädigung schützte.

Eine Verdopplung der Illuminationszeit von 12 Stunden auf 24 Stunden resultierte in keiner signifikanten Veränderung der gemessenen Luciferasekonzentration. Es kann davon ausgegangen werden, dass nach spätestens 12 Stunden Illumination eine Art Sättigung erreicht wurde, die vermutlich daher resultierte, dass ein oder mehrere Ausgangsmaterialien für die Luciferasesynthese aufgebraucht wurden. Ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen wäre daher eine erneute Illumination nach einer gewissen Ruhephase.

Eine Halbierung der Illuminationszeit von 12 Stunden auf 6 Stunden führte zu einer Reduzierung der Luciferasekonzentration um ca. $\frac{2}{3}$. Hierbei handelte es sich um eine noch quantifizierbare Menge, die ausreichend war, veränderte Reaktionsbedingungen in signifikant unterscheidbaren Luciferasekonzentrationen abzubilden. Eine 6-stündige Illumination war demnach ausreichend, um vergleichende Laser- und LED-Illuminationsexperimente durchzuführen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Luciferasesynthese nach 6 Stunden die Sättigung noch nicht erreicht hat.

4.3.4 Zusammenfassung der Optimierung des CRY2-Systems

Abschließend konnte festgestellt werden, dass die Optimierung der Einflussfaktoren des optogenetischen CRY2-Systems erfolgreich war, wobei vor allem das Plasmidverhältnis und die -menge während der Transfektion entscheidende Rollen gespielt haben. Eine optogenetische Aktivierung der Genexpression des CRY2-Systems konnte zweifelfrei in jedem Experiment nachgewiesen werden. Durch die Optimierungen konnte eine im Vergleich zu *Leakage* um den Faktor 26 gesteigerte Enzymaktivität der Luciferase nachgewiesen werden. Das deutet auf eine deutlich erhöhte Luciferase Proteinexpression unter diesen Bedingungen hin. Zusätzlich muss beachtet werden, dass das Wachstum und die Konfluenz der Zellen bei Versuchsauswertung eine entscheidende Rolle gespielt haben.

Im Vergleich zum vorherigen PhyB-System war die gemessene *Leakage* jedoch geringer und die erzielte Luciferase Expressionsteigerung höher. Dadurch fielen Konfluenzunterschiede nicht so sehr ins Gewicht und waren daher vernachlässigbar.

4.3.5 Laser-Illumination

Die Laser-Illumination sollte mit einer der LED-Illumination vergleichbaren Intensität von 8 W/m^2 durchgeführt werden. Aufgrund der sehr kleinen Fläche des Laserstrahls entsprach dies einer Laserpower von $0,06 \mu\text{W}$ auf der Well Platte. Aus technischen Gründen war es jedoch nicht möglich eine so kleine Laserintensität einzustellen, daher wurde die kleinste mögliche Intensität von $0,6 \text{ mW}$ verwendet.

Die LED-Illumination erfolgte repetitiv 6 Stunden lang, wodurch sich die Gesamtillumination auf $4,3 \text{ W*s/cm}^2$ belief. Die Laser-Illumination rasterte das Well ab und resultierte in einer Gesamtillumination von $6,6 \text{ W*s/cm}^2$. Die Laser-Illumination war somit trotz deutlich stärkerer Illuminationsintensität lediglich um den Faktor 1,5 größer als die LED-Illumination.

Eine Variation der Laserintensität ergab, dass mit steigender Laserintensität auch die gemessene Luciferaseaktivität stieg. Eine Beeinträchtigung der Zellviabilität durch die hohen Laserintensitäten konnte nicht festgestellt werden. Daraus resultiert die Schlussfolgerung, dass auch eine 6-stündige Laser-Illumination mit den gewählten Intensitäten für eine Aktivierung des optogenetischen CRY2-Systems geeignet ist.

Die gemessenen Luciferaseaktivität nach Laser-Illumination waren jedoch signifikant geringer als nach LED-Illumination.

Eine Variation der Lasergeschwindigkeit, eine erneute Erhöhung der Laserintensität sowie eine Veränderung des Illuminationsweges bieten weitere Optimierungsmöglichkeiten.

4.3.6 Überprüfung des CRY2-Systems: qPCR Analysen und mRNA Kinetik

Für eine Verifizierung der Funktion der klonierten Plasmide für die Expression der Marker eGFP und BDNF sowie des zur Optimierung verwendeten CRY2-Systems mit Luciferase Expression wurden qPCR Analysen durchgeführt. Diese gaben nicht nur

über die Funktion der Plasmide Aufschluss, sondern zeigten im zeitlichen Verlauf detailliert Veränderungen auf Genebene.

Betrachtete man die Expression von CRY und CIB bei allen drei CRY2-Systemen so fiel auf, dass sich beide Kurven der zeitlichen Verläufe sehr ähnelten und die Expressionswerte ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede aufwiesen. Dies entsprach den Erwartungen, da diese beiden Plasmide nach Lichtinduktion in einem Verhältnis von 1:1 miteinander agierten. Die Kurve des zeitlichen Verlaufs ähnelt einer Glockenkurve mit einem Maximum bei Zeitpunkt 4 (nach 6 h Illumination). Die RNA Produktion begann demnach bereits direkt mit der Illumination, somit wurde das RNA Maximum bereits während der Illumination erreicht. Nach Beendigung der Illumination nahm die RNA Menge kontinuierlich ab. Dies zeigte die gute zeitliche Auflösung des CRY2-Systems sowohl bei der schnellen Aktivierung nach Illumination als auch bei der rapiden Deaktivierung nach Beendigung der Illumination. Alle vor dem Zeitpunkt 4 gemessenen Expressionen entsprachen der *Leakage* des Systems. Auffällig war jedoch, dass ein Großteil der *Leakage* zum Zeitpunkt 3 (vor Illuminationsbeginn) gemessen wurde. Kurz vor der dritten Probennahme wurde das Medium der Zellen unter Rotlicht gewechselt. Die Wellenlänge des roten Lichts überschneidet sich zwar nicht mit der Anregungswellenlänge des CRY2-Systems, aber es bestand dennoch die Möglichkeit, dass geringe Mengen Streulicht beim Öffnen der Illuminationskammer an die Proben gelangt waren und somit zu einer frühzeitigen Aktivierung führten. Für zukünftige Experimente sollte daher auf eine noch bessere Abdunkelung des Labors geachtet werden und die Öffnungszeit der Illuminationskammer so weit wie möglich reduziert werden. Die hier gemessene *Leakage* war jedoch im Vergleich zu der gemessenen Expression relativ klein und war somit vernachlässigbar.

Betrachtete man die Genexpression von Luciferase, so war auch hier eine Glockenkurve mit einem Maximum bei Zeitpunkt 4 (nach 6 h Illumination) erkennbar, die um den Faktor 25 höher war als die *Leakage* bei Zeitpunkt 3 (vor Illuminationsbeginn). Zusätzlich konnte durch die sehr hohe lichtinduzierte Expression gezeigt werden, dass Luciferase hervorragend für eine Optimierung der Reaktionsbedingungen geeignet ist.

Auch bei der Expression der Marker BDNF und eGFP entstanden Kurven mit Glockenform. Bei BDNF war das Maximum bei Zeitpunkt 4 (nach 6 h Illumination) erreicht, während es bei eGFP erst bei Zeitpunkt 5 (12 h nach Illuminationsende)

erreicht war. Wie auch beim PhyB-System war die Expression von eGFP zeitverzögert, was erneut bestätigte, dass eGFP kein geeigneter Expressionsmarker für die vorliegenden Experimente darstellt. Die mRNA-Expression von eGFP und BDNF waren um den Faktor 5 geringer als die mRNA-Expression von Luciferase, hatten jedoch einen signifikanten Unterschied zur *Leakage*. Daher kann geschlossen werden, dass die klonierten CRY2-Systeme mit eGFP und BDNF Expression funktionierten, jedoch mit einer deutlich geringeren Expressionssteigerung gegenüber der unbeleuchteten Kontrolle als bei Luciferase.

4.3.7 Optogenetische Proteinexpression von BDNF

Nach Optimierung der Proteinexpression des CRY2-Systems mit Hilfe des Luciferase-Markers wurde die Expression des therapeutisch relevanten BDNFs nach chemischer Transfektion der HEK293 Zellen mit dem CRY2-System und dem klonierten Plasmid Gal4UAS-BDNF überprüft.

Bis zu einer BDNF Konzentration von 6,4 ng/μL war eine lineare Steigung der Kalibriergeraden zu erkennen, danach flachte die Steigung deutlich ab. Grund hierfür war wahrscheinlich eine Sättigung der Antikörper des verwendeten ELISAs, dessen Detektionslimit bei 16 ng/μL lag. Da auch die Kalibriergeraden auf der Herstellerwebseite bei der höchsten Konzentration abflachte, waren Pipettierfehler bei der Erstellung der Kalibrierstandards auszuschließen.

Bei der Negativkontrolle konnte, wie auch beim PhyB-System, bereits eine BDNF Konzentration von 4,5 ng/μL gemessen werden, die sich nicht signifikant von der *Leakage* unterschied. Die Absorption der lichtinduzierten Probe lag bei 2,18. Dieser Absorptionswert überschritt das Maximum der Kalibration um mehr als das Doppelte, daher konnte lediglich geschlossen werden, dass die BDNF Konzentration in jedem Fall größer als 16 ng/μL war. Auf jeden Fall war die Absorption der lichtinduzierten BDNF Expression aber um den Faktor 5 größer als die der *Leakage*. Dies stellte eine deutliche Steigerung der BDNF-Proteinexpression nach Lichtinduktion dar. Es konnte demnach festgestellt werden, dass das klonierte CRY2-System für die BDNF-Proteinexpression durch Licht funktionsfähig war. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die gemessene BDNF Konzentration ausreichend war, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen [295]. Somit wäre das verwendete CRY2-

System auch für therapeutische Anwendungen geeignet. Ein geeignetes Zellsystem hierfür wären hMSCs. Eine Übertragung des Systems in diesen Zelltyp war im Rahmen dieser Arbeit zeitlich jedoch nicht mehr möglich.

4.3.8 Vergleich der verwendeten optogenetischen Systeme CRY2 und PhyB hinsichtlich ihrer Eignung für therapeutische Anwendungen

In Tabelle 7 wurden die Eigenschaften beider verwendeten optogenetischen Systeme gegenübergestellt sowie die erzielten Genexpressionen im Vergleich zur *Leakage* mit den verschiedenen Proteinmarkern.

Tabelle 7: Vergleich der optogenetischen Systeme PhyB und CRY2.

	PhyB	CRY2
Anregungswellenlänge	660 nm	450 nm
Deaktivierung	740 nm 24 h im Dunkeln	- 5 min im Dunkeln
Eindringtiefe des Lichts	5 mm	2 mm
Verwendete Zellart	CHO-K1	HEK293
Exogener Co-Faktor notwendig?	Ja	Nein
Anzahl Plasmide	2	3
Abhängig von Zellkonfluenz	Ja	Ja
lichtinduzierte Proteinexpression nachweisbar?	LED: Ja Laser: Ja	LED: Ja Laser: Ja
LED	Ja	Ja
Laser	Ja	Ja
Genexpression im Vergleich zur <i>Leakage</i> eGFP	qPCR: Faktor 4 Protein: LED: Faktor 5 Protein: Laser: Faktor 10	qPCR: Faktor 2 Protein: -
Genexpression im Vergleich zur <i>Leakage</i> Luciferase	qPCR: - Protein: -	qPCR: Faktor 25 Protein: LED: Faktor 26 Protein: Laser: ≤ Faktor 16
Genexpression im Vergleich zur <i>Leakage</i> BDNF	qPCR: - Protein: ≤ Faktor 1	qPCR: Faktor 5 Protein: ≤ Faktor 5

Vergleicht man die beiden verwendeten optogenetischen Plasmide, so sind die Vorteile des PhyB-Systems zum einen die Gewebeeindringtiefe der

Aktivierungswellenlänge und zum anderen, dass es nur aus zwei Plasmiden besteht und nicht aus dreien wie das CRY2-System. Andererseits ist die Notwendigkeit der Zugabe eines externen Co-Faktors PCB wie beim PhyB-System nachteilig. Bei beiden optogenetischen Systemen konnte eine lichtinduzierte Genexpression in Säugetierzellen nachgewiesen werden (sowohl mit LED-, wie auch mit Laser-Induktion) sowie eine *Leakage*. Diese war im PhyB-System höher. Vergleicht man die Proteinexpressionen beider Systeme miteinander, so konnte mit dem PhyB-System eine um Faktor 10 erhöhte eGFP Expression erzielt werden, während beim CRY2-System eine um Faktor 26 erhöhte Luciferase Expression erreicht werden konnte. Die lichtinduzierte Expression des therapeutisch relevanten BDNFs konnte mit Hilfe beider Systeme nachgewiesen werden (Faktor 5 im CRY2-System). Die therapeutisch relevantere Laser-Induktion des PhyB-Systems erreichte die gleiche Proteinexpression wie eine LED-Induktion bei halber Illuminationszeit und ansonsten vergleichbaren Illuminationsbedingungen. Beim CRY2-System hingegen war die Proteinexpression nach Laser-Induktion nur halb so groß wie nach LED-Induktion. In Anbetracht der oben genannten Kriterien und Ergebnisse war das CRY2-System besser für spätere therapeutische Anwendungen geeignet, da es trotz der mehr zu transfizierenden Plasmide ohne Zugabe eines Co-Faktors eine höhere Proteinexpression bei niedrigerer *Leakage* aufwies. Zusätzlich konnte das System durch Laser-Induktion aktiviert und die Genexpression von BDNF in therapeutischer Menge bestätigt werden. Ein negativer Einfluss der verwendeten Lichtintensität auf die Zellen konnte ausgeschlossen werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte eine lichtinduzierte Proteinsynthese in Säugetierzellen für therapeutische Anwendungen etabliert werden. Die Arbeiten wurden mit dem optogenetischen rotlichtinduzierten PhyB-System begonnen, das bereits während der Masterarbeit in CHO-K1 Zellen etabliert wurde. Dort zeigte sich bei ersten Optimierungen eine im Vergleich zur lichtinduzierten Expression relativ hohe *Leakage*. Eine genauere Untersuchung zeigte, dass sie sowohl unabhängig von der Illumination wie auch vom Chromophor PCB war.

Optimierungen weiterer Einflussfaktoren waren erfolgreich, wobei vor allem die PCB-Menge sowie das Plasmidverhältnis während der Transfektion entscheidende Rollen gespielt haben. Hierdurch konnte die optogenetische Aktivierung der Genexpression des PhyB-Systems eindeutig (Faktor 5 im Vergleich zur *Leakage*) nachgewiesen werden. Trotzdem standen diese Ergebnisse in Divergenz zu der Veröffentlichung von Weber *et. al.* [27], bei der deutlich größere Unterschiede erzielt wurden. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Versuchsauswertung einen großen Einfluss auf die Höhe der Proteinexpression sowie die *Leakage* hatte. Für einen erfolgreichen Einsatz bei therapeutischen Anwendungen müssten sowohl Schwankungen wie auch *Leakage* minimiert werden.

Die Ergebnisse der Optimierungen wurden durch qPCR-Analysen verifiziert (Faktor 2 im Vergleich zur *Leakage*). Auch hier wurde eine relativ hohe *Leakage* gemessen. Zusätzlich fiel auf, dass die mRNA-Expression von eGFP zeitverzögert ablief, da das mRNA-Maximum erst 12 Stunden nach Ende der Illumination erreicht wurde. Dies deckte sich mit der aufgestellten These, dass es sich bei eGFP um keinen geeigneten Marker handelte.

In weiterführenden Experimenten konnten sowohl der verwendete Marker eGFP, die Zellart (CHO-K1), die Transfektionsmethode (chemisch mit PEI) sowie Tetrazyklin als Ursachen für die im Vergleich zur *Leakage* relativ niedrigen Proteinexpressionen des PhyB-Systems ausgeschlossen werden.

Eine Variation des Proteinmarkers zu SEAP führte zu keiner von der *Leakage* unterscheidbaren Proteinexpression, während der therapeutisch relevante Proteinmarker BDNF beim optogenetisch aktivierten Plasmid sowie beim Testplasmid

erhöhte Expressionswerte zeigte, die aufgrund der hohen Standardabweichungen jedoch nicht immer eindeutig von der *Leakage* unterscheiden werden konnten.

Die therapeutisch relevantere Laser-Induktion führte zu einer mit der LED-Illumination vergleichbaren Proteinexpression bei nur halber Illuminationsdauer und geringerer *Leakage*. Daher war ihre Proteinexpression 10-mal höher als ihr *Leakage*.

Durch die Optimierungen des PhyB-Systems konnte zwar eine optogenetisch-induzierte Proteinexpression nachgewiesen werden, die aber durch die relativ hohe *Leakage* des Systems relativiert wurde. Zusätzlich waren sowohl *Leakage* wie auch Lichtinduktion stark von der Konfluenz der Zellen abhängig. Diese Methode lässt sich nur unter enger Normierung der Zellzahlen erfolgreich anwenden, wobei das PhyB-System trotzdem unter den Erwartungen für eine klinische Anwendbarkeit bleibt. Daher wurden weitere optogenetische Systeme hinsichtlich ihrer Eignung für therapeutische Anwendungen überprüft. Zeitgleich wurden zusätzlich diverse Transfektionsmethoden hinsichtlich ihrer Ko-Transfektionseffizienz für humane mesenchymale Stammzellen (ADhMSCs) getestet und bewertet, die am Ende klinisch eingesetzt werden könnten.

Von den getesteten fünf chemischen und der einen physikalischen Transfektionsmethode erzielte das chemische Transfektionsreagenz DreamFect™ Gold die mit Abstand besten Transfektionseffizienzen in ADhMSCs. Bei einer Einzeltransfektion von eGFP wurden nach Optimierung der Einflussfaktoren Plasmid- und Transfektionsreagenzmenge bis zu 35 % der Zellen transfiziert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Herkunft der ADhMSCs keinen Einfluss auf die Transfektionseffizienz hatte. Eine Übertragung dieser Methode auf eine Co-Transfektion des Testplasmids (pSAM200 mit pKM-EGFP) führte jedoch nur zu einer Transfektionseffizienz von 6 %. Zieht man nun in Betracht, dass die optogenetisch aktivierte Proteinexpression lediglich ein Drittel der Proteinexpression des nicht lichtinduzierbaren Testplasmids ausmachte, so bleibt festzustellen, dass die chemische Co-Transfektionseffizienz von ADhMSCs mit den getesteten Reagenzien nicht für therapeutische Anwendungen ausreichend war. Eine Übertragung dieser Methode auf eine Dreifachtransfektion, wie es bei dem CRY2-System [26] erforderlich ist, führt vermutlich zu einer erneuten Senkung der Effizienz. Dieses System überzeugte bei der Überprüfung zusätzlicher optogenetischer Systeme hinsichtlich seiner Eignung für therapeutische Anwendungen nach DreamFect™ Gold

Transfektion in HEK293 Zellen mit Luciferase Marker durch die im Vergleich zur *Leakage* relativ hohe Enzymaktivität um den Faktor 10.

Die Optimierungen des CRY2-Systems waren erfolgreich, wobei vor allem das Plasmidverhältnis und die Plasmidmenge während der Transfektion entscheidende Rollen gespielt haben. Bei diesem System konnte die optogenetische Aktivierung der Genexpression des CRY2-Systems jederzeit eindeutig nachgewiesen werden. Im Vergleich zur *Leakage* konnte die Enzymaktivität der Luciferase als Markersystem um den Faktor 26 gesteigert werden, was einer deutlich gesteigerten Luciferase Proteinexpression entsprochen haben dürfte. Auch bei diesem optogenetischen System hatte die Konfluenz der Zellen bei Versuchsauswertung einen großen Einfluss. Im Vergleich zum vorherigen PhyB-System war die gemessene *Leakage* jedoch geringer und die erzielten Proteinexpressionen höher, wodurch die Schwankungen weniger ins Gewicht fielen. qPCR-Analysen bestätigten die Funktion des CRY2-Systems mit allen drei Targets (Luciferase, BDNF und eGFP), wobei Luciferase die höchste Expression aufwies.

Das CRY2-System konnte ebenfalls durch Laser-Illumination optogenetisch aktiviert werden, jedoch lag die Steigerung der Enzymaktivität der Luciferase unter der nach LED-Illumination. Zusätzlich konnte auch die Proteinexpression des therapeutisch relevanten BDNFs nach Lichtinduktion bewiesen werden und wäre der hierzu vorliegenden Literatur nach für therapeutische Applikationen im Innenohr zur Neuroprotektion ausreichend.

Bei dem Vergleich beider verwendeter optogenetischer Systeme hinsichtlich ihrer Eignung für therapeutische Applikationen stellte sich das CRY2-System als das geeignetere heraus, denn trotz einer höheren Anzahl der zu transfizierenden Plasmide wies dieses System auf eine höhere Proteinexpression bei niedrigerer *Leakage* hin, ohne die Notwendigkeit der Zugabe eines externen Kofaktors. Zusätzlich konnte das CRY2-System durch Laser-Induktion aktiviert und die Genexpression von BDNF in therapeutischer Menge bestätigt werden.

6. Quellenverzeichnis

- [1] Seipp, C. Was ist Optogenetik? *Humboldt-Spektrum*, **2012**, Januar, 10–17.
- [2] Optogenetik An- und Abschalten von Zellaktivität mit Licht (Accessed May 2, 2022).
- [3] Method of the Year 2010. *Nat Methods*, **2011**, 8, 1.
- [4] Lin, J.Y. A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Experimental physiology*, **2011**, 96, 19–25.
- [5] Deisseroth, K. Optogenetics. *Nature methods*, **2011**, 8, 26–29.
- [6] Häusser, M. Optogenetics: the age of light. *Nature methods*, **2014**, 11, 1012–1014.
- [7] Tanja Krämer. Mit dem Hirnschrittmacher gegen Morbus Parkinson.
<https://www.dasgehirn.info/krankheiten/parkinson/mit-dem-hirnschrittmacher-gegen-parkinson>.
- [8] Dieter, A.; Klein, E.; Keppeler, D.; Jablonski, L.; Harczos, T.; Hoch, G.; Rankovic, V.; Paul, O.; Jeschke, M.; Ruther, P.; Moser, T. μ LED-based optical cochlear implants for spectrally selective activation of the auditory nerve. *EMBO molecular medicine*, **2020**, 12, e12387.
- [9] Cheng, Y.-S.; Svirsky, M.A. Meta-Analysis-Correlation between Spiral Ganglion Cell Counts and Speech Perception with a Cochlear Implant. *Audiology Research*, **2021**, 11, 220–226.
- [10] Leake, P.A.; Hradek, G.T.; Hetherington, A.M.; Stakhovskaya, O. Brain-derived neurotrophic factor promotes cochlear spiral ganglion cell survival and function in deafened, developing cats. *The Journal of comparative neurology*, **2011**, 519, 1526–1545.
- [11] Rejali, D.; Lee, V.A.; Abrashkin, K.A.; Humayun, N.; Swiderski, D.L.; Raphael, Y. Cochlear implants and ex vivo BDNF gene therapy protect spiral ganglion neurons. *Hearing research*, **2007**, 228, 180–187.
- [12] Schu, S.; Nosov, M.; O'Flynn, L.; Shaw, G.; Treacy, O.; Barry, F.; Murphy, M.; O'Brien, T.; Ritter, T. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, **2012**, 16, 2094–2103.
- [13] Oesterhelt, D.; Stoeckenius, W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature: New biology*, **1971**, 233, 149–152.
- [14] Zhang, F.; Vierock, J.; Yizhar, O.; Fenno, L.E.; Tsunoda, S.; Kianianmomeni, A.; Prigge, M.; Berndt, A.; Cushman, J.; Polle, J.; Magnuson, J.; Hegemann, P.; Deisseroth, K. The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell*, **2011**, 147, 1446–1457.
- [15] Sugiyama, Y.; Mukohata, Y. Isolation and characterization of halorhodopsin from *Halobacterium halobium*. *Journal of biochemistry*, **1984**, 96, 413–420.
- [16] Nagel, G.; Ollig, D.; Fuhrmann, M.; Kateriya, S.; Musti, A.M.; Bamberg, E.; Hegemann, P. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science (New York, N.Y.)*, **2002**, 296, 2395–2398.
- [17] Boyden, E.S.; Zhang, F.; Bamberg, E.; Nagel, G.; Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, **2005**, 8, 1263–1268.
- [18] Nagel, G.; Szellas, T.; Huhn, W.; Kateriya, S.; Adeishvili, N.; Berthold, P.; Ollig, D.; Hegemann, P.; Bamberg, E. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2003**, *100*, 13940–13945.
- [19] Bernstein, J.G.; Boyden, E.S. Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior. *Trends in cognitive sciences*, **2011**, *15*, 592–600.
- [20] Han, X.; Chow, B.Y.; Zhou, H.; Klapoetke, N.C.; Chuong, A.; Rajimehr, R.; Yang, A.; Baratta, M.V.; Winkle, J.; Desimone, R.; Boyden, E.S. A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex. *Frontiers in systems neuroscience*, **2011**, *5*, 18.
- [21] Deisseroth, K.; Feng, G.; Majewska, A.K.; Miesenböck, G.; Ting, A.; Schnitzer, M.J. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J. Neurosci.*, **2006**, *26*, 10380–10386.
- [22] Liu, Q.; Tucker, C.L. Engineering genetically-encoded tools for optogenetic control of protein activity. *Current opinion in chemical biology*, **2017**, *40*, 17–23.
- [23] Piatkevich, K.D.; Subach, F.V.; Verkhusha, V.V. Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals. *Chemical Society reviews*, **2013**, *42*, 3441–3452.
- [24] Scheerer, P.; Michael, N.; Park, J.H.; Nagano, S.; Choe, H.-W.; Inomata, K.; Borucki, B.; Krauss, N.; Lamparter, T. Light-induced conformational changes of the chromophore and the protein in phytochromes: bacterial phytochromes as model systems. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, **2010**, *11*, 1090–1105.
- [25] Horsten, S. von; Straß, S.; Hellwig, N.; Gruth, V.; Klasen, R.; Mielcarek, A.; Linne, U.; Morgner, N.; Essen, L.-O. Mapping light-driven conformational changes within the photosensory module of plant phytochrome B. *Scientific reports*, **2016**, *6*, 34366.
- [26] Kennedy, M.J.; Hughes, R.M.; Peteya, L.A.; Schwartz, J.W.; Ehlers, M.D.; Tucker, C.L. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nature methods*, **2010**, *7*, 973–975.
- [27] Müller, K.; Engesser, R.; Metzger, S.; Schulz, S.; Kämpf, M.M.; Busacker, M.; Steinberg, T.; Tomakidi, P.; Ehrbar, M.; Nagy, F.; Timmer, J.; Zurbruggen, M.D.; Weber, W. A red/far-red light-responsive bi-stable toggle switch to control gene expression in mammalian cells. *Nucleic acids research*, **2013**, *41*, e77.
- [28] Crosson, S.; Rajagopal, S.; Moffat, K. The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry*, **2003**, *42*, 2–10.
- [29] Baaske, J.; Mühlhäuser, W.W.D.; Yousefi, O.S.; Zanner, S.; Radziwill, G.; Hörner, M.; Schamel, W.W.A.; Weber, W. Optogenetic control of integrin-matrix interaction. *Communications biology*, **2019**, *2*, 15.
- [30] Beyer, H.M.; Juillot, S.; Herbst, K.; Samodelov, S.L.; Müller, K.; Schamel, W.W.; Römer, W.; Schäfer, E.; Nagy, F.; Strähle, U.; Weber, W.; Zurbruggen, M.D. Red Light-Regulated Reversible Nuclear Localization of Proteins in Mammalian Cells and Zebrafish. *ACS synthetic biology*, **2015**, *4*, 951–958.

- [31] Gomez, E.J.; Gerhardt, K.; Judd, J.; Tabor, J.J.; Suh, J. Light-Activated Nuclear Translocation of Adeno-Associated Virus Nanoparticles Using Phytochrome B for Enhanced, Tunable, and Spatially Programmable Gene Delivery. *ACS nano*, **2016**, *10*, 225–237.
- [32] Noda, N.; Ozawa, T. Light-controllable Transcription System by Nucleocytoplasmic Shuttling of a Truncated Phytochrome B. *Photochemistry and photobiology*, **2018**, *94*, 1071–1076.
- [33] Khanna, R.; Huq, E.; Kikis, E.A.; Al-Sady, B.; Lanzatella, C.; Quail, P.H. A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *The Plant cell*, **2004**, *16*, 3033–3044.
- [34] Rockwell, N.C.; Lagarias, J.C. A brief history of phytochromes. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, **2010**, *11*, 1172–1180.
- [35] Levskaya, A.; Weiner, O.D.; Lim, W.A.; Voigt, C.A. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature*, **2009**, *461*, 997–1001.
- [36] Leung, D.W.; Otomo, C.; Chory, J.; Rosen, M.K. Genetically encoded photoswitching of actin assembly through the Cdc42-WASP-Arp2/3 complex pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, *105*, 12797–12802.
- [37] Toettcher, J.E.; Gong, D.; Lim, W.A.; Weiner, O.D. Light-based feedback for controlling intracellular signaling dynamics. *Nature methods*, **2011**, *8*, 837–839.
- [38] Toettcher, J.E.; Weiner, O.D.; Lim, W.A. Using optogenetics to interrogate the dynamic control of signal transmission by the Ras/Erk module. *Cell*, **2013**, *155*, 1422–1434.
- [39] Adrian, M.; Nijenhuis, W.; Hoogstraaten, R.I.; Willems, J.; Kapitein, L.C. A Phytochrome-Derived Photoswitch for Intracellular Transport. *ACS synthetic biology*, **2017**, *6*, 1248–1256.
- [40] Buckley, C.E.; Moore, R.E.; Reade, A.; Goldberg, A.R.; Weiner, O.D.; Clarke, J.D.W. Reversible Optogenetic Control of Subcellular Protein Localization in a Live Vertebrate Embryo. *Developmental cell*, **2016**, *36*, 117–126.
- [41] Uda, Y.; Goto, Y.; Oda, S.; Kohchi, T.; Matsuda, M.; Aoki, K. Efficient synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells for optogenetic control of cell signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2017**, *114*, 11962–11967.
- [42] Uda, Y.; Miura, H.; Goto, Y.; Yamamoto, K.; Mii, Y.; Kondo, Y.; Takada, S.; Aoki, K. Improvement of Phycocyanobilin Synthesis for Genetically Encoded Phytochrome-Based Optogenetics. *ACS chemical biology*, **2020**, *15*, 2896–2906.
- [43] Kramer, M.M.; Mühlhäuser, W.W.D.; Weber, W.; Radziwill, G. Multichromatic Control of Signaling Pathways in Mammalian Cells. *Advanced biology*, **2021**, *5*, e2000196.
- [44] Fonin, A.V.; Antifeeva, I.A.; Shpironok, O.G.; Stepanenko, O.V.; Silonov, S.A.; Stepanenko, O.V.; Antifeev, I.E.; Romanovich, A.E.; Kuznetsova, I.M.; Kim, J.-I.; Uversky, V.N.; Turoverov, K.K. Photo-dependent membrane-less organelles formed from plant phyB and PIF6 proteins in mammalian cells. *International journal of biological macromolecules*, **2021**, *176*, 325–331.
- [45] Baaske, J.; Gonschorek, P.; Engesser, R.; Dominguez-Monedero, A.; Raute, K.; Fischbach, P.; Müller, K.; Cachat, E.; Schamel, W.W.A.; Minguet, S.; Davies, J.A.; Timmer, J.; Weber, W.; Zurbriggen, M.D. Dual-controlled optogenetic system for the rapid down-regulation of protein levels in mammalian cells. *Scientific reports*, **2018**, *8*, 15024.

- [46] Bubeck, F.; Hoffmann, M.D.; Hartevelde, Z.; Aschenbrenner, S.; Bietz, A.; Waldhauer, M.C.; Börner, K.; Fakhiri, J.; Schmelas, C.; Dietz, L.; Grimm, D.; Correia, B.E.; Eils, R.; Niopek, D. Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR-Cas9. *Nature methods*, **2018**, *15*, 924–927.
- [47] Müller, K.; Engesser, R.; Timmer, J.; Zurbriggen, M.D.; Weber, W. Orthogonal optogenetic triple-gene control in Mammalian cells. *ACS synthetic biology*, **2014**, *3*, 796–801.
- [48] Niopek, D.; Wehler, P.; Roensch, J.; Eils, R.; Di Ventura, B. Optogenetic control of nuclear protein export. *Nature communications*, **2016**, *7*, 10624.
- [49] Reade, A.; Motta-Mena, L.B.; Gardner, K.H.; Stainier, D.Y.; Weiner, O.D.; Woo, S. TAEL: a zebrafish-optimized optogenetic gene expression system with fine spatial and temporal control. *Development (Cambridge, England)*, **2017**, *144*, 345–355.
- [50] Yumerefendi, H.; Lerner, A.M.; Zimmerman, S.P.; Hahn, K.; Bear, J.E.; Strahl, B.D.; Kuhlman, B. Light-induced nuclear export reveals rapid dynamics of epigenetic modifications. *Nature chemical biology*, **2016**, *12*, 399–401.
- [51] Möglich, A.; Yang, X.; Ayers, R.A.; Moffat, K. Structure and function of plant photoreceptors. *Annual review of plant biology*, **2010**, *61*, 21–47.
- [52] Crosson, S.; Moffat, K. Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *The Plant cell*, **2002**, *14*, 1067–1075.
- [53] Harper, S.M.; Christie, J.M.; Gardner, K.H. Disruption of the LOV-Jalpha helix interaction activates phototropin kinase activity. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 16184–16192.
- [54] Mena, L. de; Rizk, P.; Rincon-Limas, D.E. Bringing Light to Transcription: The Optogenetics Repertoire. *Frontiers in genetics*, **2018**, *9*, 518.
- [55] Duan, L.; Che, D.; Zhang, K.; Ong, Q.; Guo, S.; Cui, B. Optogenetic control of molecular motors and organelle distributions in cells. *Chemistry & biology*, **2015**, *22*, 671–682.
- [56] Baarlink, C.; Wang, H.; Grosse, R. Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. *Science (New York, N.Y.)*, **2013**, *340*, 864–867.
- [57] Strickland, D.; Moffat, K.; Sosnick, T.R. Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, *105*, 10709–10714.
- [58] Dagliyan, O. *Engineered control of protein activity in living cells*, **2016**.
- [59] Fischbach, P.; Gonschorek, P.; Baaske, J.; Davies, J.A.; Weber, W.; Zurbriggen, M.D. Optogenetic Downregulation of Protein Levels to Control Programmed Cell Death in Mammalian Cells with a Dual Blue-Light Switch. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **2020**, *2173*, 159–170.
- [60] Polstein, L.R.; Gersbach, C.A. Light-inducible spatiotemporal control of gene activation by customizable zinc finger transcription factors. *Journal of the American Chemical Society*, **2012**, *134*, 16480–16483.
- [61] Quejada, J.R.; Park, S.-H.E.; Awari, D.W.; Shi, F.; Yamamoto, H.E.; Kawano, F.; Jung, J.C.; Yazawa, M. Optimized light-inducible transcription in mammalian cells using Flavin Kelch-repeat F-box1/GIGANTEA and CRY2/CIB1. *Nucleic acids research*, **2017**, *45*, e172.

- [62] Yazawa, M.; Sadaghiani, A.M.; Hsueh, B.; Dolmetsch, R.E. Induction of protein-protein interactions in live cells using light. *Nature biotechnology*, **2009**, *27*, 941–945.
- [63] Motta-Mena, L.B.; Reade, A.; Mallory, M.J.; Glantz, S.; Weiner, O.D.; Lynch, K.W.; Gardner, K.H. An optogenetic gene expression system with rapid activation and deactivation kinetics. *Nature chemical biology*, **2014**, *10*, 196–202.
- [64] Wang, X.; Chen, X.; Yang, Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nature methods*, **2012**, *9*, 266–269.
- [65] Konermann, S.; Brigham, M.D.; Trevino, A.; Hsu, P.D.; Heidenreich, M.; Le Cong; Platt, R.J.; Scott, D.A.; Church, G.M.; Zhang, F. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, **2013**, *500*, 472–476.
- [66] Lee, D.; Creed, M.; Jung, K.; Stefanelli, T.; Wendler, D.J.; Oh, W.C.; Mignocchi, N.L.; Lüscher, C.; Kwon, H.-B. Temporally precise labeling and control of neuromodulatory circuits in the mammalian brain. *Nature methods*, **2017**, *14*, 495–503.
- [67] Nihongaki, Y.; Kawano, F.; Nakajima, T.; Sato, M. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nature biotechnology*, **2015**, *33*, 755–760.
- [68] Pathak, G.P.; Spiltoir, J.I.; Höglund, C.; Polstein, L.R.; Heine-Koskinen, S.; Gersbach, C.A.; Rossi, J.; Tucker, C.L. Bidirectional approaches for optogenetic regulation of gene expression in mammalian cells using Arabidopsis cryptochrome 2. *Nucleic acids research*, **2017**, *45*, e167.
- [69] Polstein, L.R.; Gersbach, C.A. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nature chemical biology*, **2015**, *11*, 198–200.
- [70] Yamada, M.; Suzuki, Y.; Nagasaki, S.C.; Okuno, H.; Imayoshi, I. Light Control of the Tet Gene Expression System in Mammalian Cells. *Cell reports*, **2018**, *25*, 487-500.e6.
- [71] Bugaj, L.J.; Choksi, A.T.; Mesuda, C.K.; Kane, R.S.; Schaffer, D.V. Optogenetic protein clustering and signaling activation in mammalian cells. *Nature methods*, **2013**, *10*, 249–252.
- [72] Idevall-Hagren, O.; Dickson, E.J.; Hille, B.; Toomre, D.K.; Camilli, P. de. Optogenetic control of phosphoinositide metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2012**, *109*, E2316-23.
- [73] Meador, K.; Wysoczynski, C.L.; Norris, A.J.; Aoto, J.; Bruchas, M.R.; Tucker, C.L. Achieving tight control of a photoactivatable Cre recombinase gene switch: new design strategies and functional characterization in mammalian cells and rodent. *Nucleic acids research*, **2019**, *47*, e97.
- [74] Taslimi, A.; Zoltowski, B.; Miranda, J.G.; Pathak, G.P.; Hughes, R.M.; Tucker, C.L. Optimized second-generation CRY2-CIB dimerizers and photoactivatable Cre recombinase. *Nature chemical biology*, **2016**, *12*, 425–430.
- [75] Müller, K.; Zurbriggen, M.D.; Weber, W. Control of gene expression using a red- and far-red light-responsive bi-stable toggle switch. *Nature protocols*, **2014**, *9*, 622–632.
- [76] Duan, L.; Hope, J.; Ong, Q.; Lou, H.-Y.; Kim, N.; McCarthy, C.; Acero, V.; Lin, M.Z.; Cui, B. Understanding CRY2 interactions for optical control of intracellular signaling. *Nature communications*, **2017**, *8*, 547.

- [77] SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F.H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology*, **1962**, *59*, 223–239.
- [78] Prasher, D.C.; Eckenrode, V.K.; Ward, W.W.; Prendergast, F.G.; Cormier, M.J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, **1992**, *111*, 229–233.
- [79] SHIMOMURA, O. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Letters*, **1979**, *104*, 220–222.
- [80] Absorptions- und Emissionsspektrum von eGFP. <https://www.fpbases.org/protein/egfp/> (Accessed March 21, 2022).
- [81] Ormö, M.; Cubitt, A.B.; Kallio, K.; Gross, L.A.; Tsien, R.Y.; Remington, S.J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science (New York, N.Y.)*, **1996**, *273*, 1392–1395.
- [82] E., D.; Huang, Y.-M.; J., D.; Schenkelberg, C.; Fraser, K.; Macari, S.; Bystroff, C. GFP-Based Biosensors. In: *State of the Art in Biosensors - General Aspects*. Rincken, T., Ed.; InTech, **2013**.
- [83] Reid, B.G.; Flynn, G.C. Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 6786–6791.
- [84] Cannon, M.B.; Remington, S.J. Redox-sensitive green fluorescent protein: probes for dynamic intracellular redox responses. A review. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **2008**, *476*, 51–65.
- [85] Chalfie, M. Green fluorescent protein. *Photochemistry and photobiology*, **1995**, *62*, 651–656.
- [86] Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W.W.; Prasher, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, **1994**, *263*, 802–805.
- [87] Tsien, R.Y. The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, **1998**, *67*, 509–544.
- [88] Cranfill, P.J.; Sell, B.R.; Baird, M.A.; Allen, J.R.; Lavagnino, Z.; Gruiter, H.M. de; Kremers, G.-J.; Davidson, M.W.; Ustione, A.; Piston, D.W. Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nature methods*, **2016**, *13*, 557–562.
- [89] Ansari, A.M.; Ahmed, A.K.; Matsangos, A.E.; Lay, F.; Born, L.J.; Marti, G.; Harmon, J.W.; Sun, Z. Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Rev and Rep*, **2016**, *12*, 553–559.
- [90] Haar, K. von der; Jonczyk, R.; Lavrentieva, A.; Weyand, B.; Vogt, P.; Jochums, A.; Stahl, F.; Scheper, T.; Blume, C.A. Electroporation: A Sustainable and Cell Biology Preserving Cell Labeling Method for Adipogenous Mesenchymal Stem Cells. *BioResearch open access*, **2019**, *8*, 32–44.
- [91] Herries, D.G. Alkaline phosphatase. *Biochemical Education*, **1981**, *9*, 76.
- [92] Berger, J.; Hauber, J.; Hauber, R.; Geiger, R.; Cullen, B.R. Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene*, **1988**, *66*, 1–10.
- [93] Hughes, T.S.; Langer, S.J.; Johnson, K.W.; Chavez, R.A.; Watkins, L.R.; Milligan, E.D.; Leinwand, L.A. Intrathecal injection of naked plasmid DNA provides long-term expression of

- secreted proteins. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **2009**, *17*, 88–94.
- [94] Bettan, M.; Darteil, R.; Scherman, D. Secreted human placental alkaline phosphatase as a reporter gene for in vivo gene transfer. *Analytical biochemistry*, **1999**, *271*, 187–189.
- [95] Wang, M.; Orsini, C.; Casanova, D.; Millán, J.L.; Mahfoudi, A.; Thuillier, V. MUSEAP , a novel reporter gene for the study of long-term gene expression in immunocompetent mice. *Gene*, **2001**, *279*, 99–108.
- [96] Maelandsmo, G.M.; Ross, P.J.; Pavliv, M.; Meulenbroek, R.A.; Eveleigh, C.; Muruve, D.A.; Graham, F.L.; Parks, R.J. Use of a murine secreted alkaline phosphatase as a non-immunogenic reporter gene in mice. *The journal of gene medicine*, **2005**, *7*, 307–315.
- [97] Hiramatsu, N.; Kasai, A.; Meng, Y.; Hayakawa, K.; Yao, J.; Kitamura, M. Alkaline phosphatase vs luciferase as secreted reporter molecules in vivo. *Analytical biochemistry*, **2005**, *339*, 249–256.
- [98] JAUBRY. SEAP Assay Kit OZ Biosciences Protocol.
- [99] Wet, J.R. de; Wood, K.V.; Helinski, D.R.; DeLuca, M. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1985**, *82*, 7870–7873.
- [100] Baldwin, T.O. Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Structure (London, England : 1993)*, **1996**, *4*, 223–228.
- [101] Seliger, H.H.; McElroy, W.D. Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1960**, *88*, 136–141.
- [102] Conti, E.; Franks, N.P.; Brick, P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure (London, England : 1993)*, **1996**, *4*, 287–298.
- [103] Pozzo, T.; Akter, F.; Nomura, Y.; Louie, A.Y.; Yokobayashi, Y. Firefly Luciferase Mutant with Enhanced Activity and Thermostability. *ACS omega*, **2018**, *3*, 2628–2633.
- [104] Johnson, J.E.; Barde, Y.A.; Schwab, M.; Thoenen, H. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J. Neurosci.*, **1986**, *6*, 3031–3038.
- [105] Dechant, G.; Barde, Y.-A. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature neuroscience*, **2002**, *5*, 1131–1136.
- [106] Tabuchi, A.; Yamada, T.; Sasagawa, S.; Naruse, Y.; Mori, N.; Tsuda, M. REST4-mediated modulation of REST/NRSF-silencing function during BDNF gene promoter activation. *Biochemical and biophysical research communications*, **2002**, *290*, 415–420.
- [107] Tyler, W.J.; Alonso, M.; Bramham, C.R.; Pozzo-Miller, L.D. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N. Y.)*, **2002**, *9*, 224–237.
- [108] Bolaños, C.A.; Nestler, E.J. Neurotrophic Mechanisms in Drug Addiction. *NMM*, **2004**, *5*, 69–84.
- [109] Bibel, M.; Barde, Y.A. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & development*, **2000**, *14*, 2919–2937.
- [110] Binder, D.K.; Scharfman, H.E. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, **2004**, *22*, 123–131.

- [111]Murer, M.; Yan, Q.; Raisman-Vozari, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, **2001**, *63*, 71–124.
- [112]Chen, M.J.; Ivy, A.S.; Russo-Neustadt, A.A. Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3' kinase expression. *Brain research bulletin*, **2006**, *68*, 257–268.
- [113]Mandel, A.L.; Ozdener, H.; Utermohlen, V. Identification of pro- and mature brain-derived neurotrophic factor in human saliva. *Archives of oral biology*, **2009**, *54*, 689–695.
- [114]Jones, K.R.; Reichardt, L.F. Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1990**, *87*, 8060–8064.
- [115]Zheng, F.; Wang, H. NMDA-mediated and self-induced bdnf exon IV transcriptions are differentially regulated in cultured cortical neurons. *Neurochemistry international*, **2009**, *54*, 385–392.
- [116]Bothwell, M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annual review of neuroscience*, **1995**, *18*, 223–253.
- [117]Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature biotechnology*, **2010**, *28*, 917–924.
- [118]Wurm, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, **2004**, *22*, 1393–1398.
- [119]Lim, Y.; Wong, N.S.C.; Lee, Y.Y.; Ku, S.C.Y.; Wong, D.C.F.; Yap, M.G.S. Engineering mammalian cells in bioprocessing - current achievements and future perspectives. *Biotechnology and applied biochemistry*, **2010**, *55*, 175–189.
- [120]Graham, F.L.; Smiley, J.; Russell, W.C.; Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, **1977**, *36*, 59–74.
- [121]Dübel, S.; Breitling, F.; Frenzel, A.; Jostock, T.; Marschall, A.L.J.; Schirrmann, T.; Hust, M. *Rekombinante Antikörper: Lehrbuch und Kompendium für Studium und Praxis*, 2nd ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2019**.
- [122]Petiot, E.; Cuperlovic-Culf, M.; Shen, C.F.; Kamen, A. Influence of HEK293 metabolism on the production of viral vectors and vaccine. *Vaccine*, **2015**, *33*, 5974–5981.
- [123]Blum, B.; Benvenisty, N. The Tumorigenicity of Human Embryonic Stem Cells; Elsevier, **2008**; Vol. 100; pp. 133–158.
- [124]Hanley, J.; Rastegarlar, G.; Nathwani, A.C. An introduction to induced pluripotent stem cells. *British journal of haematology*, **2010**, *151*, 16–24.
- [125]Griffin, M.D.; Ritter, T.; Mahon, B.P. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Human gene therapy*, **2010**, *21*, 1641–1655.
- [126]Strem, B.M.; Hicok, K.C.; Zhu, M.; Wulur, I.; Alfonso, Z.; Schreiber, R.E.; Fraser, J.K.; Hedrick, M.H. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio journal of medicine*, **2005**, *54*, 132–141.

- [127]Xu, L.; Liu, Y.; Sun, Y.; Wang, B.; Xiong, Y.; Lin, W.; Wei, Q.; Wang, H.; He, W.; Li, G. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Stem cell research & therapy*, **2017**, *8*, 275.
- [128]Zhu, X.; Shi, W.; Tai, W.; Liu, F. The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. *Cell and tissue research*, **2012**, *350*, 277–287.
- [129]Chute, J.P. Stem cell homing. *Current opinion in hematology*, **2006**, *13*, 399–406.
- [130]Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, **2006**, *8*, 315–317.
- [131]Bühring, H.-J.; Battula, V.L.; Treml, S.; Schewe, B.; Kanz, L.; Vogel, W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2007**, *1106*, 262–271.
- [132]Huang, S.-J.; Fu, R.-H.; Shyu, W.-C.; Liu, S.-P.; Jong, G.-P.; Chiu, Y.-W.; Wu, H.-S.; Tsou, Y.-A.; Cheng, C.-W.; Lin, S.-Z. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell transplantation*, **2013**, *22*, 701–709.
- [133]Freyria, A.-M.; Mallein-Gerin, F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury*, **2012**, *43*, 259–265.
- [134]Ma, S.; Xie, N.; Li, W.; Yuan, B.; Shi, Y.; Wang, Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell death and differentiation*, **2014**, *21*, 216–225.
- [135]Fetoni, A.R.; Lattanzi, W.; Eramo, S.L.M.; Barba, M.; Paciello, F.; Moriconi, C.; Rolesi, R.; Michetti, F.; Troiani, D.; Paludetti, G. Grafting and early expression of growth factors from adipose-derived stem cells transplanted into the cochlea, in a Guinea pig model of acoustic trauma. *Frontiers in cellular neuroscience*, **2014**, *8*, 334.
- [136]Zhou, Y.; Yuan, J.; Zhou, B.; Lee, A.J.; Lee, A.J.; Ghawji, M.; Yoo, T.J. The therapeutic efficacy of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on experimental autoimmune hearing loss in mice. *Immunology*, **2011**, *133*, 133–140.
- [137]Frölich, K.; Scherzed, A.; Mlynski, R.; Technau, A.; Hagen, R.; Kleinsasser, N.; Radeloff, A. Multipotent stromal cells for autologous cell therapy approaches in the guinea pig model. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties*, **2011**, *73*, 9–16.
- [138]Frangioni, J.V.; Hajjar, R.J. In vivo tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease. *Circulation*, **2004**, *110*, 3378–3383.
- [139]Yang, Y.; Wang, X.; Hu, X.; Kawazoe, N.; Yang, Y.; Chen, G. Influence of Cell Morphology on Mesenchymal Stem Cell Transfection. *ACS applied materials & interfaces*, **2019**, *11*, 1932–1941.
- [140]Hamm, A.; Krott, N.; Breibach, I.; Blindt, R.; Bosserhoff, A.K. Efficient transfection method for primary cells. *Tissue engineering*, **2002**, *8*, 235–245.

- [141]Flanagan, M.; Gimble, J.M.; Yu, G.; Xia, X.; Bunnell, B.A.; Li, S. Competitive DNA transfection formulation via electroporation for human adipose stem cells and mesenchymal stem cells. *Biological procedures online*, **2012**, *14*, 7.
- [142]Aluigi, M.; Fogli, M.; Curti, A.; Isidori, A.; Gruppioni, E.; Chiodoni, C.; Colombo, M.P.; Versura, P.; D'Errico-Grigioni, A.; Ferri, E.; Baccarani, M.; Lemoli, R.M. Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **2006**, *24*, 454–461.
- [143]Flotte, T.R. Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art. *Journal of cellular physiology*, **2007**, *213*, 301–305.
- [144]Zhang, X.; Godbey, W.T. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, **2006**, *58*, 515–534.
- [145]Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P.H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal*, **1982**, *1*, 841–845.
- [146]Du, X.; Wang, J.; Zhou, Q.; Zhang, L.; Wang, S.; Zhang, Z.; Yao, C. Advanced physical techniques for gene delivery based on membrane perforation. *Drug delivery*, **2018**, *25*, 1516–1525.
- [147]Miklavčič, D.; Mali, B.; Kos, B.; Heller, R.; Serša, G. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomedical engineering online*, **2014**, *13*, 29.
- [148]Kim, H.-J.; Im, G.-I. Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, **2011**, *20*, 2103–2114.
- [149]Jeun. CXCR4-transfected human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells exhibit enhanced migratory capacity toward gliomas. *Int J Oncol*, **2010**, *38*.
- [150]Ryser, M.F.; Ugarte, F.; Thieme, S.; Bornhäuser, M.; Roesen-Wolff, A.; Brenner, S. mRNA transfection of CXCR4-GFP fusion--simply generated by PCR-results in efficient migration of primary human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part C, Methods*, **2008**, *14*, 179–184.
- [151]Jakutavičiūtė, M.; Ruzgys, P.; Tamošiūnas, M.; Maciulevičius, M.; Šatkauskas, S. Physical Methods for Drug and Gene Delivery Through the Cell Plasma Membrane. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, **2017**, *227*, 73–92.
- [152]Sun, X.; Gutierrez, A.; Yacaman, M.; Dong, X.; Jin, S. Investigations on magnetic properties and structure for carbon encapsulated nanoparticles of Fe, Co, Ni. *Materials Science and Engineering: A*, **2000**, *286*, 157–160.
- [153]Tomitaka, A.; Kobayashi, H.; Yamada, T.; Jeun, M.; Bae, S.; Takemura, Y. Magnetization and self-heating temperature of NiFe₂O₄ nanoparticles measured by applying ac magnetic field. *J. Phys.: Conf. Ser.*, **2010**, *200*, 122010.
- [154]Arora, S.; Gupta, G.; Singh, S.; Singh, N. Advances in Magnetofection – Magnetically Guided Nucleic Acid Delivery: a Review. *JPTRM*, **2013**, *1*, 19–29.

- [155]Wu, H.-C.; Wang, T.-W.; Bohn, M.C.; Lin, F.-H.; Spector, M. Novel Magnetic Hydroxyapatite Nanoparticles as Non-Viral Vectors for the Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene. *Adv. Funct. Mater.*, **2010**, *20*, 67–77.
- [156]Adams, C.F.; Pickard, M.R.; Chari, D.M. Magnetic nanoparticle mediated transfection of neural stem cell suspension cultures is enhanced by applied oscillating magnetic fields. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, **2013**, *9*, 737–741.
- [157]Dasgupta, A.; Liu, M.; Ojha, T.; Storm, G.; Kiessling, F.; Lammers, T. Ultrasound-mediated drug delivery to the brain: principles, progress and prospects. *Drug discovery today. Technologies*, **2016**, *20*, 41–48.
- [158]Husseini, G.A.; Pitt, W.G. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*, **2008**, *60*, 1137–1152.
- [159]Mehier-Humbert, S.; Guy, R.H. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced drug delivery reviews*, **2005**, *57*, 733–753.
- [160]Al-Dosari, M.S.; Gao, X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*, **2009**, *11*, 671–681.
- [161]Nakashima, M.; Tachibana, K.; Iohara, K.; Ito, M.; Ishikawa, M.; Akamine, A. Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11. *Human gene therapy*, **2003**, *14*, 591–597.
- [162]Otani, K.; Yamahara, K.; Ohnishi, S.; Obata, H.; Kitamura, S.; Nagaya, N. Nonviral delivery of siRNA into mesenchymal stem cells by a combination of ultrasound and microbubbles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **2009**, *133*, 146–153.
- [163]Zaragosi, L.-E.; Billon, N.; Ailhaud, G.; Dani, C. Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **2007**, *25*, 790–797.
- [164]Sheyn, D.; Pelled, G.; Tawackoli, W.; Su, S.; Ben-David, S.; Gazit, D.; Gazit, Z. Transient overexpression of Ppar γ 2 and C/ebp α in mesenchymal stem cells induces brown adipose tissue formation. *Regenerative medicine*, **2013**, *8*, 295–308.
- [165]Neuhaus, B.; Tosun, B.; Rotan, O.; Frede, A.; Westendorf, A.M.; Epple, M. Nanoparticles as transfection agents: a comprehensive study with ten different cell lines. *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 18102–18112.
- [166]Tenkumo, T.; Vanegas Sáenz, J.R.; Takada, Y.; Takahashi, M.; Rotan, O.; Sokolova, V.; Epple, M.; Sasaki, K. Gene transfection of human mesenchymal stem cells with a nano-hydroxyapatite-collagen scaffold containing DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, **2016**, *21*, 682–695.
- [167]Zhu, K.; Wu, M.; Lai, H.; Guo, C.; Li, J.; Wang, Y.; Chen, Y.; Wang, C.; Shi, J. Nanoparticle-enhanced generation of gene-transfected mesenchymal stem cells for in vivo cardiac repair. *Biomaterials*, **2016**, *74*, 188–199.
- [168]Kim, T.-H.; Kim, M.; Eltohamy, M.; Yun, Y.-R.; Jang, J.-H.; Kim, H.-W. Efficacy of mesoporous silica nanoparticles in delivering BMP-2 plasmid DNA for in vitro osteogenic stimulation of

- mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical materials research. Part A*, **2013**, *101*, 1651–1660.
- [169]Gonzalez-Fernandez, T.; Sathy, B.N.; Hobbs, C.; Cuniffe, G.M.; McCarthy, H.O.; Dunne, N.J.; Nicolosi, V.; O'Brien, F.J.; Kelly, D.J. Mesenchymal stem cell fate following non-viral gene transfection strongly depends on the choice of delivery vector. *Acta biomaterialia*, **2017**, *55*, 226–238.
- [170]Wang, Y.-X.J.; Quercy-Jouvet, T.; Wang, H.-H.; Li, A.-W.; Chak, C.-P.; Xuan, S.; Shi, L.; Wang, D.-F.; Lee, S.-F.; Leung, P.-C.; Lau, C.B.S.; Fung, K.-P.; Leung, K.C.-F. Efficacy and Durability in Direct Labeling of Mesenchymal Stem Cells Using Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Organosilica, Dextran, and PEG Coatings. *Materials (Basel, Switzerland)*, **2011**, *4*, 703–715.
- [171]Wu, H.-H.; Zhou, Y.; Tabata, Y.; Gao, J.-Q. Mesenchymal stem cell-based drug delivery strategy: from cells to biomimetic. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **2019**, *294*, 102–113.
- [172]Yalvac, M.E.; Ramazanoglu, M.; Gumru, O.Z.; Sahin, F.; Palotás, A.; Rizvanov, A.A. Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electro-poration. *Neurochemical research*, **2009**, *34*, 1272–1277.
- [173]Cesnulevicius, K.; Timmer, M.; Wesemann, M.; Thomas, T.; Barkhausen, T.; Grothe, C. Nucleofection is the most efficient nonviral transfection method for neuronal stem cells derived from ventral mesencephali with no changes in cell composition or dopaminergic fate. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **2006**, *24*, 2776–2791.
- [174]Thermo Fisher Scientific. How Cationic Lipid Mediated Transfection Works.
- [175]Hoare, M.; Greiser, U.; Schu, S.; Mashayekhi, K.; Aydogan, E.; Murphy, M.; Barry, F.; Ritter, T.; O'Brien, T. Enhanced lipoplex-mediated gene expression in mesenchymal stem cells using reiterated nuclear localization sequence peptides. *The journal of gene medicine*, **2010**, *12*, 207–218.
- [176]Kelly, A.M.; Plautz, S.A.; Zemleni, J.; Pannier, A.K. Glucocorticoid Cell Priming Enhances Transfection Outcomes in Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **2016**, *24*, 331–341.
- [177]Carvalho, T.G. de; Pellenz, F.M.; Laureano, A.; Da Rocha Silla, L.M.; Giugliani, R.; Baldo, G.; Matte, U. A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells. *Biotechnology letters*, **2018**, *40*, 617–622.
- [178]Saraf, A.; Hacker, M.C.; Sitharaman, B.; Grande-Allen, K.J.; Barry, M.A.; Mikos, A.G. Synthesis and conformational evaluation of a novel gene delivery vector for human mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules*, **2008**, *9*, 818–827.
- [179]Sonawane, N.D.; Szoka, F.C.; Verkman, A.S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *The Journal of biological chemistry*, **2003**, *278*, 44826–44831.
- [180]Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M.A.; Mergny, M.D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo:

- polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1995**, *92*, 7297–7301.
- [181]Giacca, M.; Zacchigna, S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **2012**, *161*, 377–388.
- [182]Oggu, G.S.; Sasikumar, S.; Reddy, N.; Ella, K.K.R.; Rao, C.M.; Bokara, K.K. Gene Delivery Approaches for Mesenchymal Stem Cell Therapy: Strategies to Increase Efficiency and Specificity. *Stem cell reviews and reports*, **2017**, *13*, 725–740.
- [183]Chan, J.L.; Tang, K.C.; Patel, A.P.; Bonilla, L.M.; Pierobon, N.; Ponzio, N.M.; Rameshwar, P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*, **2006**, *107*, 4817–4824.
- [184]Dewey, R.A.; Morrissey, G.; Cowsill, C.M.; Stone, D.; Bolognani, F.; Dodd, N.J.; Southgate, T.D.; Klatzmann, D.; Lassmann, H.; Castro, M.G.; Löwenstein, P.R. Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nature medicine*, **1999**, *5*, 1256–1263.
- [185]Yin, H.; Kanasty, R.L.; Eltoukhy, A.A.; Vegas, A.J.; Dorkin, J.R.; Anderson, D.G. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature reviews. Genetics*, **2014**, *15*, 541–555.
- [186]Peterson, B.; Zhang, J.; Iglesias, R.; Kabo, M.; Hedrick, M.; Benhaim, P.; Lieberman, J.R. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue engineering*, **2005**, *11*, 120–129.
- [187]Zhao, C.; Wu, N.; Deng, F.; Zhang, H.; Wang, N.; Zhang, W.; Chen, X.; Wen, S.; Zhang, J.; Yin, L.; Liao, Z.; Zhang, Z.; Zhang, Q.; Yan, Z.; Liu, W.; Di Wu; Ye, J.; Deng, Y.; Zhou, G.; Luu, H.H.; Haydon, R.C.; Si, W.; He, T.-C. Adenovirus-mediated gene transfer in mesenchymal stem cells can be significantly enhanced by the cationic polymer polybrene. *PloS one*, **2014**, *9*, e92908.
- [188]Meinel, L.; Hofmann, S.; Betz, O.; Fajardo, R.; Merkle, H.P.; Langer, R.; Evans, C.H.; Vunjak-Novakovic, G.; Kaplan, D.L. Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 4993–5002.
- [189]Lee, C.I.; Kohn, D.B.; Ekert, J.E.; Tarantal, A.F. Morphological analysis and lentiviral transduction of fetal monkey bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **2004**, *9*, 112–123.
- [190]Totsugawa, T.; Kobayashi, N.; Okitsu, T.; Noguchi, H.; Watanabe, T.; Matsumura, T.; Maruyama, M.; Fujiwara, T.; Sakaguchi, M.; Tanaka, N. Lentiviral transfer of the LacZ gene into human endothelial cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, **2002**, *11*, 481–488.
- [191]Zhang, X.-Y.; La Russa, V.F.; Reiser, J. Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. *Journal of virology*, **2004**, *78*, 1219–1229.

- [192] Ju, X.; Lou, S.; Wang, W.; Peng, J.; Tian, H. Effect of hydroxyurea and etoposide on transduction of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cell by adeno-associated virus vectors. *Acta pharmacologica Sinica*, **2004**, *25*, 196–202.
- [193] Lu, L.; Zhao, C.; Liu, Y.; Sun, X.; Duan, C.; Ji, M.; Zhao, H.; Xu, Q.; Yang, H. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease. *Brain research. Brain research protocols*, **2005**, *15*, 46–51.
- [194] Stender, S.; Murphy, M.; O'Brien, T.; Stengaard, C.; Ulrich-Vinther, M.; Søballe, K.; Barry, F. Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *European cells & materials*, **2007**, *13*, 93-9; discussion 99.
- [195] HNO Praxis. HNO-Praxis Dr. Woltersdorf & Coll.: Experten für Cochlea-Implantat - HNO Praxis. <https://hno-in-chemnitz.de/hno-praxis-dr-woltersdorf-coll-experten-fuer-cochlea-implantat/> (Accessed April 23, 2022).
- [196] Cochlear Implants. *FDA*, **2022**.
- [197] Wie funktioniert ein CI. <https://hno.uk-koeln.de/klinik/cochlear-implant-zentrum-koeln-cik/wie-funktioniert-ein-ci/> (Accessed April 23, 2022).
- [198] Carlson, M.L.; Driscoll, C.L.W.; Gifford, R.H.; McMenomey, S.O. Cochlear implantation: current and future device options. *Otolaryngologic clinics of North America*, **2012**, *45*, 221–248.
- [199] DJOURNO, A.; EYRIES, C.; VALLANCIEN, P. Premiers essais d'excitation électrique du nerf auditif chez l'homme, par micro-appareils inclus à demeure. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*, **1957**, *141*, 481–483.
- [200] House, W.F.; Berliner, K.I. Safety and efficacy of the House/3M cochlear implant in profoundly deaf adults. *Otolaryngologic clinics of North America*, **1986**, *19*, 275–286.
- [201] SIMMONS, F.B.; EPLEY, J.M.; LUMMIS, R.C.; GUTTMAN, N.; FRISHKOPF, L.S.; HARMON, L.D.; ZWICKER, E. AUDITORY NERVE: ELECTRICAL STIMULATION IN MAN. *Science (New York, N.Y.)*, **1965**, *148*, 104–106.
- [202] Bilger, R.C.; Black, F.O. Auditory prostheses in perspective. *The Annals of otology, rhinology & laryngology. Supplement*, **1977**, *86*, 3–10.
- [203] Clark, G.M.; Tong, Y.C.; Martin, L.F. A multiple-channel cochlear implant: an evaluation using open-set CID sentences. *The Laryngoscope*, **1981**, *91*, 628–634.
- [204] NIDCD. Cochlear Implants. <https://www.nidcd.nih.gov/health/cochlear-implants> (Accessed April 23, 2022).
- [205] Saeidnia, S.; Manayi, A.; Abdollahi, M. From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Current drug discovery technologies*, **2015**, *12*, 218–224.
- [206] Xia, W.; Bringmann, P.; McClary, J.; Jones, P.P.; Manzana, W.; Zhu, Y.; Wang, S.; Liu, Y.; Harvey, S.; Madlansacay, M.R.; McLean, K.; Rosser, M.P.; MacRobbie, J.; Olsen, C.L.; Cobb, R.R. High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein expression and purification*, **2006**, *45*, 115–124.
- [207] Qin, J.Y.; Zhang, L.; Clift, K.L.; Hulus, I.; Xiang, A.P.; Ren, B.-Z.; Lahn, B.T. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PloS one*, **2010**, *5*, e10611.

- [208]Liu, H.S.; Jan, M.S.; Chou, C.K.; Chen, P.H.; Ke, N.J. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochemical and biophysical research communications*, **1999**, *260*, 712–717.
- [209]Kim, T.K.; Eberwine, J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **2010**, *397*, 3173–3178.
- [210]Pfeifer, A.; Verma, I.M. Gene therapy: promises and problems. *Annual review of genomics and human genetics*, **2001**, *2*, 177–211.
- [211]Anguela, X.M.; High, K.A. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annual review of medicine*, **2019**, *70*, 273–288.
- [212]Barolet, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, **2008**, *27*, 227–238.
- [213]Benninger, R.K.P.; Piston, D.W. Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues. *Current protocols in cell biology*, **2013**, *Chapter 4*, Unit 4.11.1-24.
- [214]Zhang, Y.; Huang, L.; Li, Z.; Ma, G.; Zhou, Y.; Han, G. Illuminating Cell Signaling with Near-Infrared Light-Responsive Nanomaterials. *ACS nano*, **2016**, *10*, 3881–3885.
- [215]Park, S.I.; Brenner, D.S.; Shin, G.; Morgan, C.D.; Copits, B.A.; Chung, H.U.; Pullen, M.Y.; Noh, K.N.; Davidson, S.; Oh, S.J.; Yoon, J.; Jang, K.-I.; Samineni, V.K.; Norman, M.; Grajales-Reyes, J.G.; Vogt, S.K.; Sundaram, S.S.; Wilson, K.M.; Ha, J.S.; Xu, R.; Pan, T.; Kim, T.-I.; Huang, Y.; Montana, M.C.; Golden, J.P.; Bruchas, M.R.; Gereau, R.W.; Rogers, J.A. Soft, stretchable, fully implantable miniaturized optoelectronic systems for wireless optogenetics. *Nature biotechnology*, **2015**, *33*, 1280–1286.
- [216]Berglund, K.; Clissold, K.; Li, H.E.; Wen, L.; Park, S.Y.; Gleixner, J.; Klein, M.E.; Lu, D.; Barter, J.W.; Rossi, M.A.; Augustine, G.J.; Yin, H.H.; Hochgeschwender, U. Luminopsins integrate opto- and chemogenetics by using physical and biological light sources for opsin activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2016**, *113*, E358-67.
- [217]Parag-Sharma, K.; O'Banion, C.P.; Henry, E.C.; Musicant, A.M.; Cleveland, J.L.; Lawrence, D.S.; Amelio, A.L. Engineered BRET-Based Biologic Light Sources Enable Spatiotemporal Control over Diverse Optogenetic Systems. *ACS synthetic biology*, **2020**, *9*, 1–9.
- [218]Tsakas, A.; Tselios, C.; Ampeliotis, D.; Politi, C.; Alexandropoulos, D. (INVITED)Review of Optical Fiber Technologies for Optogenetics. *Results in Optics*, **2021**, *5*, 100168.
- [219]Ung, K.; Arenkiel, B.R. Fiber-optic implantation for chronic optogenetic stimulation of brain tissue. *Journal of visualized experiments : JoVE*, **2012**, e50004.
- [220]Gather, M.C.; Yun, S.H. Single-cell biological lasers. *Nature Photon*, **2011**, *5*, 406–410.
- [221]Meyskens, F.L.; Farmer, P.; Fruehauf, J.P. Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment cell research*, **2001**, *14*, 148–154.
- [222]Sarasin, A. The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **1999**, *428*, 5–10.
- [223]Rizzini, L.; Favory, J.-J.; Cloix, C.; Faggionato, D.; O'Hara, A.; Kaiserli, E.; Baumeister, R.; Schäfer, E.; Nagy, F.; Jenkins, G.I.; Ulm, R. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science (New York, N.Y.)*, **2011**, *332*, 103–106.

- [224]Cohen, J.Y.; Haesler, S.; Vong, L.; Lowell, B.B.; Uchida, N. Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *Nature*, **2012**, *482*, 85–88.
- [225]Tsai, H.-C.; Zhang, F.; Adamantidis, A.; Stuber, G.D.; Bonci, A.; Lecea, L. de; Deisseroth, K. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science (New York, N.Y.)*, **2009**, *324*, 1080–1084.
- [226]Chaudhury, D.; Walsh, J.J.; Friedman, A.K.; Juarez, B.; Ku, S.M.; Koo, J.W.; Ferguson, D.; Tsai, H.-C.; Pomeranz, L.; Christoffel, D.J.; Nectow, A.R.; Ekstrand, M.; Domingos, A.; Mazei-Robison, M.S.; Mouzon, E.; Lobo, M.K.; Neve, R.L.; Friedman, J.M.; Russo, S.J.; Deisseroth, K.; Nestler, E.J.; Han, M.-H. Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature*, **2013**, *493*, 532–536.
- [227]Hare, B.D.; Shinohara, R.; Liu, R.J.; Pothula, S.; DiLeone, R.J.; Duman, R.S. Optogenetic stimulation of medial prefrontal cortex Drd1 neurons produces rapid and long-lasting antidepressant effects. *Nature communications*, **2019**, *10*, 223.
- [228]Lammel, S.; Lim, B.K.; Malenka, R.C. Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology*, **2014**, *76 Pt B*, 351–359.
- [229]Ohmura, Y.; Tsutsui-Kimura, I.; Sasamori, H.; Nebuka, M.; Nishitani, N.; Tanaka, K.F.; Yamanaka, A.; Yoshioka, M. Different roles of distinct serotonergic pathways in anxiety-like behavior, antidepressant-like, and anti-impulsive effects. *Neuropharmacology*, **2020**, *167*, 107703.
- [230]Tye, K.M.; Mirzabekov, J.J.; Warden, M.R.; Ferenczi, E.A.; Tsai, H.-C.; Finkelstein, J.; Kim, S.-Y.; Adhikari, A.; Thompson, K.R.; Andalman, A.S.; Gunaydin, L.A.; Witten, I.B.; Deisseroth, K. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature*, **2013**, *493*, 537–541.
- [231]Sparta, D.R.; Jennings, J.H.; Ung, R.L.; Stuber, G.D. Optogenetic strategies to investigate neural circuitry engaged by stress. *Behavioural brain research*, **2013**, *255*, 19–25.
- [232]Sparta, D.R.; Smithuis, J.; Stamatakis, A.M.; Jennings, J.H.; Kantak, P.A.; Ung, R.L.; Stuber, G.D. Inhibition of projections from the basolateral amygdala to the entorhinal cortex disrupts the acquisition of contextual fear. *Frontiers in behavioral neuroscience*, **2014**, *8*, 129.
- [233]Witten, I.B.; Lin, S.-C.; Brodsky, M.; Prakash, R.; Diester, I.; Anikeeva, P.; Gradinaru, V.; Ramakrishnan, C.; Deisseroth, K. Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science (New York, N.Y.)*, **2010**, *330*, 1677–1681.
- [234]Gunaydin, L.A.; Grosenick, L.; Finkelstein, J.C.; Kauvar, I.V.; Fenno, L.E.; Adhikari, A.; Lammel, S.; Mirzabekov, J.J.; Airan, R.D.; Zalocusky, K.A.; Tye, K.M.; Anikeeva, P.; Malenka, R.C.; Deisseroth, K. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*, **2014**, *157*, 1535–1551.
- [235]Nieh, E.H.; Vander Weele, C.M.; Matthews, G.A.; Presbrey, K.N.; Wichmann, R.; Leppla, C.A.; Izadmehr, E.M.; Tye, K.M. Inhibitory Input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation. *Neuron*, **2016**, *90*, 1286–1298.

- [236]Roy, D.S.; Arons, A.; Mitchell, T.I.; Pignatelli, M.; Ryan, T.J.; Tonegawa, S. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature*, **2016**, *531*, 508–512.
- [237]Wilson, C.A.; Fouda, S.; Sakata, S. Effects of optogenetic stimulation of basal forebrain parvalbumin neurons on Alzheimer's disease pathology. *Scientific reports*, **2020**, *10*, 15456.
- [238]Gradinaru, V.; Mogri, M.; Thompson, K.R.; Henderson, J.M.; Deisseroth, K. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science (New York, N.Y.)*, **2009**, *324*, 354–359.
- [239]Howe, M.W.; Dombeck, D.A. Rapid signalling in distinct dopaminergic axons during locomotion and reward. *Nature*, **2016**, *535*, 505–510.
- [240]Steinbeck, J.A.; Choi, S.J.; Mrejeru, A.; Ganat, Y.; Deisseroth, K.; Sulzer, D.; Mosharov, E.V.; Studer, L. Optogenetics enables functional analysis of human embryonic stem cell-derived grafts in a Parkinson's disease model. *Nature biotechnology*, **2015**, *33*, 204–209.
- [241]Ciocchi, S.; Herry, C.; Grenier, F.; Wolff, S.B.E.; Letzkus, J.J.; Vlachos, I.; Ehrlich, I.; Sprengel, R.; Deisseroth, K.; Stadler, M.B.; Müller, C.; Lüthi, A. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature*, **2010**, *468*, 277–282.
- [242]Tye, K.M.; Prakash, R.; Kim, S.-Y.; Fenno, L.E.; Grosenick, L.; Zarabi, H.; Thompson, K.R.; Gradinaru, V.; Ramakrishnan, C.; Deisseroth, K. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, **2011**, *471*, 358–362.
- [243]Goshen, I.; Brodsky, M.; Prakash, R.; Wallace, J.; Gradinaru, V.; Ramakrishnan, C.; Deisseroth, K. Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell*, **2011**, *147*, 678–689.
- [244]Tonegawa, S.; Liu, X.; Ramirez, S.; Redondo, R. Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*, **2015**, *87*, 918–931.
- [245]Aponte, Y.; Atasoy, D.; Sternson, S.M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience*, **2011**, *14*, 351–355.
- [246]Atasoy, D.; Betley, J.N.; Su, H.H.; Sternson, S.M. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, **2012**, *488*, 172–177.
- [247]Adamantidis, A.R.; Tsai, H.-C.; Boutrel, B.; Zhang, F.; Stuber, G.D.; Budygin, E.A.; Touriño, C.; Bonci, A.; Deisseroth, K.; Lecea, L. de. Optogenetic interrogation of dopaminergic modulation of the multiple phases of reward-seeking behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **2011**, *31*, 10829–10835.
- [248]Stamatakis, A.M.; van Swieten, M.; Basiri, M.L.; Blair, G.A.; Kantak, P.; Stuber, G.D. Lateral Hypothalamic Area Glutamatergic Neurons and Their Projections to the Lateral Habenula Regulate Feeding and Reward. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **2016**, *36*, 302–311.
- [249]Halassa, M.M.; Siegle, J.H.; Ritt, J.T.; Ting, J.T.; Feng, G.; Moore, C.I. Selective optical drive of thalamic reticular nucleus generates thalamic bursts and cortical spindles. *Nature neuroscience*, **2011**, *14*, 1118–1120.
- [250]Rolls, A.; Colas, D.; Adamantidis, A.; Carter, M.; Lanre-Amos, T.; Heller, H.C.; Lecea, L. de. Optogenetic disruption of sleep continuity impairs memory consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2011**, *108*, 13305–13310.

- [251]Ortiz, F.C.; Habermacher, C.; Graciarena, M.; Houry, P.-Y.; Nishiyama, A.; Nait Oumesmar, B.; Angulo, M.C. Neuronal activity in vivo enhances functional myelin repair. *JCI insight*, **2019**, *5*.
- [252]Pendharkar, A.V.; Levy, S.L.; Ho, A.L.; Sussman, E.S.; Cheng, M.Y.; Steinberg, G.K. Optogenetic modulation in stroke recovery. *Neurosurgical focus*, **2016**, *40*, E6.
- [253]Tennant, K.A.; Taylor, S.L.; White, E.R.; Brown, C.E. Optogenetic rewiring of thalamocortical circuits to restore function in the stroke injured brain. *Nature communications*, **2017**, *8*, 15879.
- [254]Paz, J.T.; Davidson, T.J.; Frechette, E.S.; Delord, B.; Parada, I.; Peng, K.; Deisseroth, K.; Huguenard, J.R. Closed-loop optogenetic control of thalamus as a tool for interrupting seizures after cortical injury. *Nature neuroscience*, **2013**, *16*, 64–70.
- [255]Alilain, W.J.; Li, X.; Horn, K.P.; Dhingra, R.; Dick, T.E.; Herlitze, S.; Silver, J. Light-induced rescue of breathing after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **2008**, *28*, 11862–11870.
- [256]Bryson, J.B.; Machado, C.B.; Crossley, M.; Stevenson, D.; Bros-Facer, V.; Burrone, J.; Greensmith, L.; Lieberam, I. Optical control of muscle function by transplantation of stem cell-derived motor neurons in mice. *Science (New York, N.Y.)*, **2014**, *344*, 94–97.
- [257]Awad, B.I.; Gutierrez, D.V.; Alilain, W.; Steinmetz, M.P. Optogenetic Photostimulation to Control Bladder Function After Experimental Spinal Cord Injury. *The Spine Journal*, **2013**, *13*, S12.
- [258]Bruegmann, T.; Boyle, P.M.; Vogt, C.C.; Karathanos, T.V.; Arevalo, H.J.; Fleischmann, B.K.; Trayanova, N.A.; Sasse, P. Optogenetic defibrillation terminates ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations. *The Journal of clinical investigation*, **2016**, *126*, 3894–3904.
- [259]Bruegmann, T.; Malan, D.; Hesse, M.; Beiert, T.; Fuegemann, C.J.; Fleischmann, B.K.; Sasse, P. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nature methods*, **2010**, *7*, 897–900.
- [260]Iyer, S.M.; Vesuna, S.; Ramakrishnan, C.; Huynh, K.; Young, S.; Berndt, A.; Lee, S.Y.; Gorini, C.J.; Deisseroth, K.; Delp, S.L. Optogenetic and chemogenetic strategies for sustained inhibition of pain. *Scientific reports*, **2016**, *6*, 30570.
- [261]Iyer, S.M.; Montgomery, K.L.; Towne, C.; Lee, S.Y.; Ramakrishnan, C.; Deisseroth, K.; Delp, S.L. Virally mediated optogenetic excitation and inhibition of pain in freely moving nontransgenic mice. *Nature biotechnology*, **2014**, *32*, 274–278.
- [262]Samineni, V.K.; Mickle, A.D.; Yoon, J.; Grajales-Reyes, J.G.; Pullen, M.Y.; Crawford, K.E.; Noh, K.N.; Gereau, G.B.; Vogt, S.K.; Lai, H.H.; Rogers, J.A.; Gereau, R.W. Optogenetic silencing of nociceptive primary afferents reduces evoked and ongoing bladder pain. *Scientific reports*, **2017**, *7*, 15865.
- [263]Ferrari, U.; Deny, S.; Sengupta, A.; Caplette, R.; Trapani, F.; Sahel, J.-A.; Dalkara, D.; Picaud, S.; Duebel, J.; Marre, O. Towards optogenetic vision restoration with high resolution. *PLoS computational biology*, **2020**, *16*, e1007857.
- [264]Gauvain, G.; Akolkar, H.; Chaffiol, A.; Arcizet, F.; Khoei, M.A.; Desrosiers, M.; Jaillard, C.; Caplette, R.; Marre, O.; Bertin, S.; Fovet, C.-M.; Demilly, J.; Forster, V.; Brazhnikova, E.; Hantraye, P.; Pouget, P.; Douar, A.; Pruneau, D.; Chavas, J.; Sahel, J.-A.; Dalkara, D.; Duebel, J.; Benosman, R.; Picaud, S. Optogenetic therapy: high spatiotemporal resolution and pattern

- discrimination compatible with vision restoration in non-human primates. *Communications biology*, **2021**, *4*, 125.
- [265]Hernandez, V.H.; Gehrt, A.; Reuter, K.; Jing, Z.; Jeschke, M.; Mendoza Schulz, A.; Hoch, G.; Bartels, M.; Vogt, G.; Garnham, C.W.; Yawo, H.; Fukazawa, Y.; Augustine, G.J.; Bamberg, E.; Kügler, S.; Salditt, T.; Hoz, L. de; Strenzke, N.; Moser, T. Optogenetic stimulation of the auditory pathway. *The Journal of clinical investigation*, **2014**, *124*, 1114–1129.
- [266]Mager, T.; La Lopez de Morena, D.; Senn, V.; Schlotte, J.; D Errico, A.; Feldbauer, K.; Wrobel, C.; Jung, S.; Bodensiek, K.; Rankovic, V.; Browne, L.; Huet, A.; Jüttner, J.; Wood, P.G.; Letzkus, J.J.; Moser, T.; Bamberg, E. High frequency neural spiking and auditory signaling by ultrafast red-shifted optogenetics. *Nature communications*, **2018**, *9*, 1750.
- [267]Kushibiki, T.; Okawa, S.; Hirasawa, T.; Ishihara, M. Optogenetic control of insulin secretion by pancreatic β -cells in vitro and in vivo. *Gene therapy*, **2015**, *22*, 553–559.
- [268]Xu, Y.; Hyun, Y.-M.; Lim, K.; Lee, H.; Cummings, R.J.; Gerber, S.A.; Bae, S.; Cho, T.Y.; Lord, E.M.; Kim, M. Optogenetic control of chemokine receptor signal and T-cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2014**, *111*, 6371–6376.
- [269]Kyung, T.; Lee, S.; Kim, J.E.; Cho, T.; Park, H.; Jeong, Y.-M.; Kim, D.; Shin, A.; Kim, S.; Baek, J.; Kim, J.; Kim, N.Y.; Woo, D.; Chae, S.; Kim, C.-H.; Shin, H.-S.; Han, Y.-M.; Kim, D.; Heo, W.D. Optogenetic control of endogenous Ca(2+) channels in vivo. *Nature biotechnology*, **2015**, *33*, 1092–1096.
- [270]Airan, R.D.; Thompson, K.R.; Fenno, L.E.; Bernstein, H.; Deisseroth, K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature*, **2009**, *458*, 1025–1029.
- [271]Siuda, E.R.; McCall, J.G.; Al-Hasani, R.; Shin, G.; Il Park, S.; Schmidt, M.J.; Anderson, S.L.; Planer, W.J.; Rogers, J.A.; Bruchas, M.R. Optodynamic simulation of β -adrenergic receptor signalling. *Nature communications*, **2015**, *6*, 8480.
- [272]Teh, D.B.L.; Prasad, A.; Jiang, W.; Zhang, N.; Wu, Y.; Yang, H.; Han, S.; Yi, Z.; Yeo, Y.; Ishizuka, T.; Wong, L.; Thakor, N.; Yawo, H.; Liu, X.; All, A. Driving Neurogenesis in Neural Stem Cells with High Sensitivity Optogenetics. *Neuromolecular medicine*, **2020**, *22*, 139–149.
- [273]Li, F.; Lu, Z.; Wu, W.; Qian, N.; Wang, F.; Chen, T. Optogenetic gene editing in regional skin. *Cell research*, **2019**, *29*, 862–865.
- [274]Schindler, S.E.; McCall, J.G.; Yan, P.; Hyrc, K.L.; Li, M.; Tucker, C.L.; Lee, J.-M.; Bruchas, M.R.; Diamond, M.I. Photo-activatable Cre recombinase regulates gene expression in vivo. *Scientific reports*, **2015**, *5*, 13627.
- [275]Nihongaki, Y.; Otabe, T.; Ueda, Y.; Sato, M. A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation. *Nature chemical biology*, **2019**, *15*, 882–888.
- [276]Jung, H.; Kim, S.-W.; Kim, M.; Hong, J.; Yu, D.; Kim, J.H.; Lee, Y.; Kim, S.; Woo, D.; Shin, H.-S.; Park, B.O.; Heo, W.D. Noninvasive optical activation of Flp recombinase for genetic manipulation in deep mouse brain regions. *Nature communications*, **2019**, *10*, 314.
- [277]Kawano, F.; Okazaki, R.; Yazawa, M.; Sato, M. A photoactivatable Cre-loxP recombination system for optogenetic genome engineering. *Nature chemical biology*, **2016**, *12*, 1059–1064.

- [278] Yao, S.; Yuan, P.; Ouellette, B.; Zhou, T.; Mortrud, M.; Balaram, P.; Chatterjee, S.; Wang, Y.; Daigle, T.L.; Tasic, B.; Kuang, X.; Gong, H.; Luo, Q.; Zeng, S.; Curtright, A.; Dhaka, A.; Kahan, A.; Gradinaru, V.; Chrapkiewicz, R.; Schnitzer, M.; Zeng, H.; Cetin, A. RecV recombinase system for in vivo targeted optogenomic modifications of single cells or cell populations. *Nature methods*, **2020**, *17*, 422–429.
- [279] Kinjo, T.; Terai, K.; Horita, S.; Nomura, N.; Sumiyama, K.; Togashi, K.; Iwata, S.; Matsuda, M. FRET-assisted photoactivation of flavoproteins for in vivo two-photon optogenetics. *Nature methods*, **2019**, *16*, 1029–1036.
- [280] Shao, J.; Wang, M.; Yu, G.; Zhu, S.; Yu, Y.; Heng, B.C.; Wu, J.; Ye, H. Synthetic far-red light-mediated CRISPR-dCas9 device for inducing functional neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2018**, *115*, E6722-E6730.
- [281] Yu, Y.; Wu, X.; Guan, N.; Shao, J.; Li, H.; Chen, Y.; Ping, Y.; Li, D.; Ye, H. Engineering a far-red light-activated split-Cas9 system for remote-controlled genome editing of internal organs and tumors. *Science advances*, **2020**, *6*, eabb1777.
- [282] Wu, J.; Wang, M.; Yang, X.; Yi, C.; Jiang, J.; Yu, Y.; Ye, H. A non-invasive far-red light-induced split-Cre recombinase system for controllable genome engineering in mice. *Nature communications*, **2020**, *11*, 3708.
- [283] Fomicheva, A.; Zhou, C.; Sun, Q.-Q.; Gomelsky, M. Engineering Adenylate Cyclase Activated by Near-Infrared Window Light for Mammalian Optogenetic Applications. *ACS synthetic biology*, **2019**, *8*, 1314–1324.
- [284] Schneider, N.; Wieland, F.-G.; Kong, D.; Fischer, A.A.M.; Hörner, M.; Timmer, J.; Ye, H.; Weber, W. Liquid-liquid phase separation of light-inducible transcription factors increases transcription activation in mammalian cells and mice. *Science advances*, **2021**, *7*.
- [285] Yen, S.-T.; Trimmer, K.A.; Aboul-Fetouh, N.; Mullen, R.D.; Culver, J.C.; Dickinson, M.E.; Behringer, R.R.; Eisenhoffer, G.T. CreLite: An optogenetically controlled Cre/loxP system using red light. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **2020**, *249*, 1394–1403.
- [286] Shao, J.; Xue, S.; Yu, G.; Yu, Y.; Yang, X.; Bai, Y.; Zhu, S.; Yang, L.; Yin, J.; Wang, Y.; Liao, S.; Guo, S.; Xie, M.; Fussenegger, M.; Ye, H. Smartphone-controlled optogenetically engineered cells enable semiautomatic glucose homeostasis in diabetic mice. *Science translational medicine*, **2017**, *9*.
- [287] Hörner, M.; Raute, K.; Hummel, B.; Madl, J.; Creusen, G.; Thomas, O.S.; Christen, E.H.; Hotz, N.; Gübeli, R.J.; Engesser, R.; Rebmann, B.; Lauer, J.; Rolaufts, B.; Timmer, J.; Schamel, W.W.A.; Pruszek, J.; Römer, W.; Zurbriggen, M.D.; Friedrich, C.; Walther, A.; Minguet, S.; Sawarkar, R.; Weber, W. Phytochrome-Based Extracellular Matrix with Reversibly Tunable Mechanical Properties. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, **2019**, *31*, e1806727.
- [288] Wang, W.; Huang, D.; Ren, J.; Li, R.; Feng, Z.; Guan, C.; Bao, B.; Cai, B.; Ling, J.; Zhou, C. Optogenetic control of mesenchymal cell fate towards precise bone regeneration. *Theranostics*, **2019**, *9*, 8196–8205.

- [289]Lim, C.H.; Kaur, P.; Teo, E.; Lam, V.Y.M.; Zhu, F.; Kibat, C.; Gruber, J.; Mathuru, A.S.; Tolwinski, N.S. Application of optogenetic Amyloid- β distinguishes between metabolic and physical damages in neurodegeneration. *eLife*, **2020**, *9*.
- [290]Klapper, S.D.; Sauter, E.J.; Swiersy, A.; Hyman, M.A.E.; Bamann, C.; Bamberg, E.; Buskamp, V. On-demand optogenetic activation of human stem-cell-derived neurons. *Scientific reports*, **2017**, *7*, 14450.
- [291]LabBook-Viromer-RED-YELLOW.
- [292]Thorne, N.; Inglese, J.; Auld, D.S. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chemistry & biology*, **2010**, *17*, 646–657.
- [293]Luciferase aus Glühwürmchen recombinant, expressed in E. coli, lyophilized powder, $\geq 10 \times 10^{10}$ units/mg protein | Sigma-Aldrich.
<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/sre0045> (Accessed January 20, 2022).
- [294]Müller, K.; Engesser, R.; Timmer, J.; Nagy, F.; Zurbriggen, M.D.; Weber, W. Synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells. *Chemical communications (Cambridge, England)*, **2013**, *49*, 8970–8972.
- [295]Djalali, S.; Hölte, M.; Grosse, G.; Rothe, T.; Stroh, T.; Grosse, J.; Deng, D.R.; Hellweg, R.; Grantyn, R.; Hörtnagl, H.; Ahnert-Hilger, G. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *Journal of neurochemistry*, **2005**, *92*, 616–627.
- [296]Kuhbier, J.W.; Weyand, B.; Radtke, C.; Vogt, P.M.; Kasper, C.; Reimers, K. Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, **2010**, *123*, 55–105.

7. Anhang

7.1 Materialien

Die verwendeten Materialien lassen sich in Chemikalien, Enzyme, Laborgeräte, Medien und Puffer, Organismen, Plasmide, Primer sowie Verbrauchsmaterialien kategorisieren.

7.1.1 Chemikalien

Eine vollständige Auflistung der eingesetzten Chemikalien ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller	Bemerkung
α -MEM	Thermo Fisher	Gibco, powder
Accutase	Sigma Aldrich	
Aceton	Roth	$\geq 99,8\%$, Rotipuran
Agar	Sigma Aldrich	Pulver
Agarose	Roth	Rotigarose, gentechnische Qualität
Ampicillin Natriumsalz	Fluka	
Bode Bacillol AF	Hartmann	aldehydfreie Flächen Desinfektion
BSA	Sigma Aldrich	Albumin aus Rinderserum
Calciumchlorid	Roth	
Calciumchlorid Dihydrat	Roth	
Collagenase	Sigma Aldrich	
DMEM	Sigma Aldrich	<i>D5648 High Glucose</i> (4500 mg/L), L-Glutamin, Natriumpyruvat, ohne Natriumbikarbonat, Pulver
DMEM/Nutrient F-12	Sigma Aldrich	mit 15 mM HEPES und Natriumbikarbonat mit Pyridoxin ohne L-Glutamin
DMSO	AppliChem	für die Zellkultur
DNA Leiter	Thermo Fisher	100 bp, 1.000 bp
dNTP Mix	Thermo Fisher	10 mM jeweils
DreamFect™ Gold	Oz Biosciences	
DreamFect™ Stem	Oz Biosciences	

Anhang

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth	≥ 99 %, ACS
Essigsäure	Roth	Rotipuran 100 %
Ethanol	Roth	> 99,8 %, Rotipuran
FKS	Biochrom	Herkunft EU-zertifizierte Länder (Südamerika)
Flüssiger Stickstoff	Linde Gas	
Gentamicin	Sigma Aldrich	10 mg/mL
Glycerin	Roth	≥ 98 %, wasserfrei
GoTaq DNA Polymerase	Promega	
GoTaq Reaction Buffer	Promega	5 x grüner Puffer
Hefe	Fluka	
Humanserum AB	c-c-pro	
HTS-Medium	Cell Culture Technologies	für Serum-freie Gen-Transfektion und Klon-Selektion
Hypoosmolarer Elektroporationspuffer	Biorad	Gene Pulser Electroporation Buffer
Isopropanol	Roth	70 %
Kaliumchlorid	Roth	CELLPURE, ≥ 99 %
Kaliumhydrogenphosphat	Roth	
Kanamycinsulfat	Roth	≥ 750 I.U./mg
Lipofectamine Stem	Thermo Fisher	
Luciferase	Sigma Aldrich	≥ 10•10 ¹⁰ units/mg
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth	CELLPURE, ≥ 99 %
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth	
Natriumchlorid	Roth	CELLPURE, ≥ 99,8 %
Natriumhydrogen-carbonat	Roth	CELLPURE, ≥ 99,5 %
Natriumhydrogen-phosphat Dihydrat	Roth	
Nukleasefreies Wasser Opti-MEM	Sigma Aldrich Thermo Fisher	0.1 µm filtriert, für die Zellkultur Gibco Medium mit reduziertem Serum, Modifikation des MEM-Mediums, gepuffert mit HEPES und Natriumbikarbonat, mit Hypoxanthin, Thymidin, Natriumpyruvat, L-Glutamin, Spurenelemente und Wachstumsfaktoren
PBS	Medicago	Tabletten

PCB	Frontier Scientific	mikrobielle Quelle
PEI	Polysciences Inc.	Linear, Molekulargewicht: 25000
Pen/Step	Biochrom	
pH Puffer	Hamilton	pH 4,01, pH 7,00, pH 9,21
Primer	Invitrogen	
Reinstwasser	eigene Herstellung	Milli-Q Wasser
Roti <i>Gel Stain</i>	Roth	
TRIS	Roth	≥ 99,9 %, Pufferan
Trypsin	Sigma Aldrich	10x Trypsin/EDTA (0,5 % / 0,2 %)
Trypton/ Pepton	Roth	aus Casein, pankreatisch verdaut
Viromer® Red	Lipocalyx GmbH	
Viromer® Plasmid	Lipocalyx GmbH	
X-tremeGENE™ 9	Sigma Aldrich	

7.1.2 Enzyme

Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller	Bemerkung	Spaltsequenz
Cla I	New England Biolabs	Restriktionsenzym	5´...AT CGAT...3´ 3´...TAGC TA...5´
HindIII	New England Biolabs	Restriktionsenzym	5´...A AGCTT...3´ 3´...TTCGA A...5´
NotI	New England Biolabs	Restriktionsenzym	5´...GC GGCCGC...3´ 3´...CGCCGG CG...5´
SpeI	New England Biolabs	Restriktionsenzym	5´...A CTAGT...3´ 3´...TGATC A...5´
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher	Ligase	

7.1.3 Laborgeräte

Tabelle 10 beinhaltet die eingesetzten Laborgeräte einschließlich des verwendeten Zubehörs.

Anhang

Tabelle 10: Verwendete Laborgeräte.

Gerät	Hersteller	Bemerkung
Autoklav	System	DX-65, DX-150, VX-150
Biologische Sicherheitswerkbank	ThermoFisher	Safe 2020, Klasse 2
Brutschrank	Memmert	32 L
Durchflusszytometer	Miltenyi Biotec	MACSQuant Analyzer 10
Elektroporator	Biorad	GenePulser Xcell und CE Module
Flüssigkeit-Absaugsystem	vacuubrand	BVC control
Gas Mixer	ibidi	für CO ₂ und O ₂ mit Befeuchtungssäule
Geldokumentations-system	Nippon genetics	FAS V mit blau/grüner LED Technologie
Gelelektrophorese System (horizontal)	Biozym	Mupid One
Illuminationskammer	Eigenbau	
Inkubationsschüttler	Infors HT	Multitron
Inkubator	ThermoFisher	Heracell 150i mit Vollkupfer-Innenraum
Laborwaage	Sartorius	ENTRIS, maximal 60 g
Magnetrührer	Heidolph	MR Hei-End EU
Mikroliterpipetten	Brand	Transferpette S, 2,5 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL
Mikroskop	Olympus	IX83 <i>Inverted microscope</i>
Mikroskop	Olympus	CKX 53 Inversmikroskop
Mikroplate Reader	Molecular Devices	SpectraMax i3x
Mikrowelle		
Milli-Q Wasseraufbereitungssystem	Merck	Advantage A10
Mr. Frosty	Thermo Fisher	Nalgene 1 °C Gefrierbehälter
pH-Meter	HANNA instruments	HI 221
Pipettierroboter	Eppendorf	epMotion 5073
Thermocycler	BIOer	LifeECO, 96-Well PCR Instrument
Thermocycler	Biorad	CFX384 Real-time System C1000 Touch
Thermoschüttler	VWR	Thermal shake lite
Tischzentrifuge	ThermoFisher	Heraeus Megafuge 8
tragbare Waage	Ohaus	Scout Pro
Vortex-Mischer	Velp Scientifica	ZX4 Advanced IR Vortex Mixer
Wasserbad	Memmert	WNB 29

Zählkammer	Brand	Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm ²
Zentrifuge	VWR	belüftet/gekühlt, Micro Star 17R
Zentrifuge	Thermo Fisher	Heraeus Multifuge X3 FR
Zentrifuge	Eppendorf	5804R

Wichtig ist die korrekte Differenzierung zwischen einem Brutschrank, Schüttelschrank und Inkubator. In einem Brutschrank herrscht eine konstante Temperatur, während ein Inkubator sowohl die Temperatur als auch die CO₂ Konzentration regelt. Im Schüttelschrank herrscht ebenfalls eine konstante Temperatur, doch schüttelt er die Proben zusätzlich mit einer definierten Geschwindigkeit.

7.1.4 Nährmedien und Puffer

Aus der Tabelle 11 können die verwendeten Puffer und Nährmedien sowie ihre Zusammensetzungen entnommen werden. Für die Erstellung der Medien und Puffer wurde destilliertes Wasser verwendet.

Tabelle 11: Puffer und Nährlösungen mit ihren Zusammensetzungen.

Puffer / Nährmedium	Zusammensetzung
α-MEM Medium	89,5 % α-MEM, 10 % HS, 0,5 % Gentamycin
DMEM-F12 Medium	89 % DMEM-F12, 10 % FKS, 1 % P/S
DMEM Medium	89 % DMEM, 10 % FKS, 1 % P/S
FACS Puffer	995 mL/L PBS, 2 mL/L EDTA, 5 g/L BSA
HBSS Puffer	8 g/L NaCl, 400 mg/L KCl, 140 mg/L CaCl ₂ , 100 mg/L MgCl ₂ •6H ₂ O, 100 mg/L MgSO ₄ •7H ₂ O, 60 mg/L Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O, 60 mg/L KH ₂ PO ₄ , 1g/L Glucose, 350 mg/L NaHCO ₃
HTS Medium	89 % HTS, 10 % FKS, 1 % P/S
HTS-PCB Medium	89 % HTS, 10 % FKS, 1 % P/S, 15 µM PCB
Kryokonservierungs α-MEM Medium	70 % α-MEM, 20 % HS, 10 % DMSO
Kryokonservierungs DMEM Medium	70 % DMEM, 20 % FKS, 10 % DMSO
LB-Miller Medium	10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefe
PBS	0,14 M NaCl, 0,0027M KCl, 0,01 M Phosphat Puffer pH 7,4

PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PBS mit 133 mg/L CaCl ₂ • 2 H ₂ O, 100 mg/L MgCl ₂ • 6 H ₂ O
TAE-Puffer x 50	242 g/L TRIS, 57,1 mL/L Essigsäure (100 %), 100 mL/L 0,5 M EDTA, pH 8
TE-Puffer	10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8

Für eine bessere Differenzierung wird Medium ohne Zusätze Basalmedium genannt, während eine Mischung aus Basalmedium und Zusätzen Medium genannt wird.

7.1.5 Organismen

Aus der Tabelle 12 sind die verwendeten Organismen zu entnehmen.

Tabelle 12: Verwendete Organismen.

Organismus	Hersteller	Bemerkung
ADhMSC	Eigene Isolation	Menschliche Stammzellen aus Fettgewebe isoliert nach [296], adhärenente Zellen, von verschiedenen Spendern
CHO-K1	Synexa	Chinese Hamster Ovary Cell Line, adhärenente Epithelzellen
E.coli TOP10	iba Lifesciences	Kompetenten Zellen, Genotyp: F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
HEK-293		Human Embryonic Kidney, immortalisierte adhärenente Zelllinie vom DSMZ in Braunschweig erworben

7.1.6 Plasmide

Die Plasmidkarten inklusive aller relevanten Genabschnitte sind in den nachfolgenden Grafiken dargestellt. Die zugehörigen Sequenzen sind dem Anhang (siehe Kapitel 7.3) zu entnehmen.

Das PhyB-System ist in Abbildung 64 bis Abbildung 69 dargestellt.



Abbildung 64: Plasmidkarte von pSAM200.

Bei dem Plasmid pSAM200 (siehe Abbildung 64) handelt es sich um das Testplasmid für das PhyB-System. In Kombination mit dem Zielgen erfolgt eine konstitutive Genexpression des GOIs. Eine vorherige Aktivierung des Systems durch Illumination ist daher nicht erforderlich. Es dient somit als Funktionskontrolle des Systems sowie als Indikator der Kofransfektionseffizienz.

Der pSV40 (*simian virus 40 early promoter*) Promoter aktiviert die konstitutive Expression von der Bindestelle tetR (*tetracycline repressor proteine*) und dem Transkriptionsfaktor vp16 (*Herpes simplex virus-derived transactivation domain*) bis zum SV40pA Terminator. In Abwesenheit von Tetrazyklin bindet tetR an tetO (*operator sequence binding tetR*) des Zielgens, wodurch der an tetR gebundene Transkriptionsfaktor vp16 die Genexpression des GOIs aktivieren kann.

Der für die Experimente nicht relevante Genabschnitt ist die Ampicillinresistenz (Amp).



Abbildung 65: Plasmidkarte von pKM-022.

Das in Abbildung 65 dargestellte Plasmid pKM-022 (optogenetisches Plasmid) bildet in Kombination mit dem Zielgen das optogenetisch aktivierbare PhyB-System.

Der pSV40 Promoter aktiviert hier konstitutiv die Expression zweier Genabschnitte, die durch das vorhandene IRES (*internal ribosome entry site*) Element voneinander getrennt werden, bis zum SV40pA Terminator. Der erste Genabschnitt besteht aus dem Photorezeptor PhyB mit dem Transkriptionsfaktor vp16. Auf dem zweiten Genabschnitt liegen die genetischen Informationen für tetR mit PIF. In Abwesenheit von Tetrazyklin bindet tetR (mit PIF) an tetO des Zielgens. Nach Bindung des Chromophors PCB an den Photorezeptor PhyB ändert dieser nach Lichtinduktion seine Konformation, wodurch er nun in der Lage ist an PIF6 zu binden. Der an PhyB gebundene Transkriptionsfaktor vp16 aktiviert anschließend die Genexpression des GOIs.

Die weiteren für die Experimente nicht relevanten Genabschnitte sind der Replikationsursprung *origin* und die Ampicillinresistenz Amp.

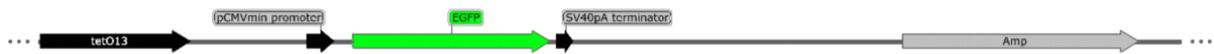


Abbildung 66: Plasmidkarte von pKM-EGFP.

Abbildung 66 zeigt die Plasmidkarte von pKM-EGFP, dem Zielgen mit der Sequenz für die Expression des GOI mit GFP.

TetR des Testplasmids oder des optogenetischen Plasmids kann an das auf diesem Plasmid vorhandene tetO binden. Ist der Transkriptionsfaktor vp16 an tetR oder die an ihn gebundenen Proteine gebunden, so wird der pCMVmin (*minimal human cytomegalovirus immediate early promoter*) Promoter aktiviert. Dieser initiiert die Expression von GFP bis zum SV40pA Terminator.

Der für die Experimente nicht relevante Genabschnitt ist die Ampicillinresistenz Amp.

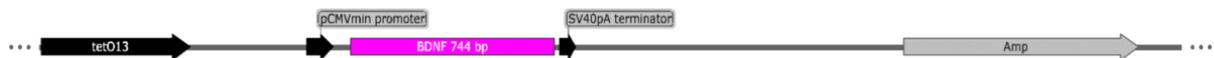


Abbildung 67: Plasmidkarte von pKM-BDNF.

Abbildung 67 zeigt die Plasmidkarte von pKM-BDNF, dem Zielgen mit der Sequenz für die Expression des GOI mit β -Galaktosidase. Der Aufbau und die Funktionsweise des Plasmids ist analog zu dem oben dargestellten pKM-EGFP.



Abbildung 68: Plasmidkarte von pKM-078.

Abbildung 68 zeigt die Plasmidkarte von pKM-078, dem Zielgen mit der Sequenz für die Expression des GOI mit mcherry. Die Funktionsweise ist analog zu dem oben aufgeführten pKM-EGFP. Er wurde als Ausgangsvektor für die Klonierung der Plasmide pKM-EGFP und pKM-BDNF verwendet (siehe Kapitel 3.1.11), wobei das mcherry durch die Sequenz für die anderen Proteine ersetzt wurde.



Abbildung 69: Plasmidkarte von pKM-006.

Abbildung 69 zeigt die Plasmidkarte von pKM-006, dem Zielgen mit der Sequenz für die Expression des GOI mit SEAP. Ebenso ist hier die Funktionsweise analog zu dem obigen pKM-EGFP.

Die Plasmide pKM-006, pKM-022, pKM-078 und pSAM200 wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Weber der Universität Freiburg [27] zur Verfügung gestellt. Das Plasmid mit der Sequenz für BDNF wurde netterweise von der AG Hoffmann der Medizinischen Hochschule Hannover zu Verfügung gestellt. Die Plasmide EGFP und GLB waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Die Sequenzen für die bei der Klonierung benötigten Plasmide für die Protein Inserts (EGFP und BDNF) können dem Anhang (siehe Kapitel 7.3) entnommen werden.

Die zum CRY System zugehörigen Plasmide können den Abbildungen 70 bis 74 entnommen werden.



Abbildung 70: Plasmidkarte von CRY2.



Abbildung 71: Plasmidkarte von CIB.



Abbildung 72: Plasmidkarten von Gal4UAS-Luc.

Die in Abbildung 70 dargestellte Plasmidkarte zeigt das CRY2 Plasmid. In Kombination mit dem CIB Plasmid (Abbildung 71) und dem Zielgen Gal4UAS für eine Luciferaseexpression (Abbildung 72) bilden sie das optogenetisch aktivierbare CRY2-System.

Der CMV (*cytomegalovirus*) Promoter aktiviert die Expression des Reporters *mcherry* sowie des Genabschnitts CRY2-Gal4BD. Der CMV *enhancer* verstärkt den CMV Promoter. Das CRY2 ist der Photorezeptor, der nach Bindung des Chromophors FAD durch Lichtinduktion seine Konformation ändert. Hierdurch ist er in der Lage mit CIBN (N-terminale Domäne von CIB) zu dimerisieren. Bei dem an das CRY2 gebundenen Gal4BD (BD: *binding domain*) handelt es sich um die Bindedomäne für das Zielgen Gal4UAS. Nachdem die Gal4BD an die Gal4UAS gebunden hat, aktiviert der an das CIBN gebundene Transkriptionsfaktor VP64 letztlich die Expression des GOIs.

Die für die Experimente nicht relevanten Genabschnitte sind der SV40 Promoter, AmpR Promoter sowie der Replikationsursprung. Die Plasmide CRY2 und CIB besitzen eine Kanamycinresistenz, während Gal4UAS resistent gegen Ampicillin ist.

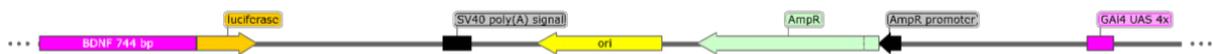


Abbildung 73: Plasmidkarte von Gal4UAS-BDNF.



Abbildung 74: Plasmidkarte von Gal4UAS-EGFP.

Abbildung 73 zeigt die Plasmidkarte von Gal4UAS-BDNF, dem Zielgen für eine BDNF Expression und Abbildung 74 analog die Plasmidkarte von Gal4UAS-EGFP für eine EGFP Expression.

Die Plasmide CRY2 (92035), CIB (92037) und Gal4UAS-Luc (33020) wurden bei der Firma Addgene erworben. Durch Klonierung wurde die Luciferase aus dem Gal4UAS-Luc Plasmid ausgeschnitten und durch die Proteine β -Galaktosidase, BDNF und GFP ersetzt. Die daraus resultierenden Plasmide sind Gal4-GLB und Gal4-BDNF.

7.1.7 Primer

Die verwendeten Primer (Invitrogen von Thermo Fisher) mit ihren Sequenzen, Annealingtemperaturen und den resultierenden Fragmentlängen können Tabelle 13 entnommen werden.

Anhang

Tabelle 13: Verwendete Klonierungs-Primer mit Sequenzen, Annealingtemperaturen und Fragmentlängen.

Name	Plasmide	Annealing-temp. (°C)	Sequenz
Amplf BDNF HindIII for	BDNF	59 °C	GCATGAAAGCTTATGACCATCCTT TTCCTTACTATG
Amplf BDNF Clal rev	BDNF	59 °C	GACCATTAAAAGGGGAAGATAGAT CGATGCATGA
	➔	Fragment:	BDNF (744 bp)
Ampl for EGFP für Gal4UAS	EGFP	61 °C	GCATGAAAGCTTATGGTGAGCAA GGGCGAGGA
Ampl rev EGFP für Gal4UAS	EGFP	61 °C	ACGCGTATGGTGAGCAAGGGCGA GGA
	➔	Fragment:	EGFP (744bp)
Fragment.FOR	EGFP	60 °C	TAAGAGCTCGATGGTGAGCAAGG GCGAG
Fragment.REV	EGFP	59 °C	AATGTATCTTATGTTACTTGTACAG CTCGTCCATGCC
	➔	Fragment:	EGFP (744 bp)
pKM-BDNF forward	BDNF	58 °C	AAAGGGACTAGTATGACCATCCTT TTTCCTTACTATG
pKM-BDNF reversed	BDNF	59 °C	GGGAAAGCGGCCGCCTATCTTCC CCTTTTAATGGTCAA
	➔	Fragment:	BDNF (744 bp)

Tabelle 14: Verwendete qPCR-Primer mit Sequenzen, Annealingtemperaturen und Fragmentlängen.

Name	Plasmide	Annealingtemperatur	Sequenz	Fragmentlänge
B2M forward reversed	Referenzgen	56,1 °C	GCAAGGACTGGTCTTTCTAT GATGCTTGATTACATGTCTCG	140 bp
BDNF forward reversed	BDNF	61,6 °C	CTCTTTCTGCTGGAGGAATACAA GCCGTTACCCACTCACTAATAC	131 bp
CIB2 forward reversed	CIB	63,4 °C	CAAGTACCTCAATCCCACCTTT GTCGAAAGATAGCTGTCCATCTC	96 bp
CRY1 forward reversed	CRY	61,6 °C	GAATCCGTTATGCTTCCTCCTC CTCCAGCCCTAGTTCTTCAATC	96 bp

GFP forward reversed	GFP	63,1 °C	GCACAAGCTGGAGTACA TACTA TGTTGTGGCGGATCTTGAA	98 bp
Luc1 forward reversed	Luciferase	61,6 °C	GTGTTGGGCGCGTTATTTATC TAGGCTGCGAAATGTTTCATACT	97 bp
OPT forward reversed	pKM-022	63,1 °C	CAGAACCGTGTCCGAATGATAG GTAGAACCAACCAAGCACATAGA	98 bp
PPIA forward reversed	Referenzgen	61,6 °C	CTCTGAGCACTGGAGAGAAAG CAGTGCCATTATGGCGTG	108 bp
RPL4 forward reversed	Referenzgen	60,6 °C	CAAAGGCAAATGAGAAACCG GAAGGCCTTGATGATACCATTATC	88 bp

7.1.8 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 15 zeigt die Auflistung der genutzten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Bemerkung
Aluminiumfolie	Roth	
β-Gal Assay	Anaspec	SensoLyte MUG Fluorimetric Assay Kit
BDNF ELISA	Sigma Aldrich	Human BDNF ELISA Kit
DNA Gelextraktions-Kit	Monarch	Gelextraktion
DNA Midiprep Kit	Quiagen	DNA-Isolierung
DNA Miniprep Spin Kit	Quiagen	DNA-Isolierung
Durchflusszytometer- röhrchen	Merck	5 mL, runder Boden, PP
Einwegskalpell	Aesculap	Mit Griff
Elektroporationsküvetten	Biorad	4 mm
Kryo-Röhrchen	neoLab	1,2 mL
Luciferase Assay	Promega	Steady-Glo Luciferase Assay System
Nucleo Bond Xtra Maxi kit	Macherey-Nagel	DNA-Isolierung
Parafilm M	Bemis	
Pasteurpipetten	Brand	Aus Glas 150 mm, 230 mm
PCR & DNA Clean-up Kit	Monarch	DNA-Aufreinigung
Petrischalen	VWR	100 mm
Petrischalenspatel	Roth	L-förmig, aus ABS

Pipetten	Corning	Costar Stripette, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL
Pipette ohne Watte	Corning	2 mL
Pipettenspitzen	Brand	Kristall, gelb, blau
Pipettenspitzen mit Filter	Sartorius	Kristall und gelb
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt	blau
Pipettenspitzen für den Pipettierroboter	Eppendorf	EpT.I.P.S mit Filter 10 µL, 50 µL
qPCR-Platte	Biorad	384-Well
qPCR-Platte	Biorad	96-Well spitz
Reaktionsgefäße	Eppendorf	0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL, 5 mL
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher	cDNA Synthese Kit
RNeasy Mini Kit	Quiagen	RNA Isolation
Sealing Tapes	Thermo Fisher	Für Wellplatten
Skalpell		
Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix	Biorad	qPCR Master-Mix
TC-Flasche	Sarstedt	Standard, T25, T75, T175
TC-Platte	Sarstaedt	Standard, F, 6/24/96-Well
TC-Platte	Eppendorf	Schwarz, 96-Well
Zellkulturschale	TPP	9,2 cm ²
Zellsieb	Merck	Coring 70 µm
Zentrifugenröhrchen	Merck	Coring PP, 15 mL, 50 mL, konischer Boden

7.2 Methoden

Die beschriebenen Experimente wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit sterilen Materialien in einer sterilen Umgebung durchgeführt. Zur Sterilisation wurden nicht steril verpackte Materialien vor Verwendung bei 121 °C und 1 bar Überdruck mindestens 20 Minuten lang autoklaviert und verwendete Medien und Puffer steril filtriert (0,2 µm Porengröße). Die Sterilwerkbank wurde vor und nach jeder Benutzung mit Bacillol und/oder 70%igem Isopropanol gereinigt und anschließend zusätzlich mindestens 30 Minuten mit UV-Licht sterilisiert. Alle in der Sterilbank verwendeten Geräte, Materialien und Medien wurden vor Aufnahme der Arbeit gründlich mit 70%igem Isopropanol sterilisiert.

7.2.1 Kultivierung von Zellen

Die verschiedenen Säugetier-Zellkulturen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und alle drei bis vier Tage passagiert. Für eine Teilung von Zellen in einer T75-Flasche wurde das Medium abgesaugt, mehrfach mit 10 mL PBS gewaschen, um alle Reste des im Medium enthaltenen Serums gründlich zu entfernen. Serum verringert die Wirkung von Trypsin bzw. Accutase und behindert somit die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Nach Zugabe von 3 mL Accutase bzw. Trypsin und erneutem Schwenken der Flasche wurde diese 5 Minuten lang im Inkubator inkubiert. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft. Nach Zugabe von 4 mL Zellkultur-Medium wurde die Zellsuspension in ein 50 mL Reaktionsgefäß übertragen und 5 Minuten lang bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in Zellkulturmedium-Medium resuspendiert. Die Menge variierte hierbei je nach Größe des Zellpellets zwischen 1 mL und 10 mL. 20 µL dieser Zellsuspension wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem sie nicht steril mit 20 µL Typanblau gemischt und anschließend in eine Neubauer-Zählkammer gegeben wurde. Auf dem Boden der Zählkammer befinden sich vier Großquadrate definierter Größe, die aus jeweils 16 kleinen Quadraten bestehen. Damit es ein für die komplette Zellsuspension repräsentatives Ergebnis gab, wurden in jedem der vier Großquadrate sämtliche Zellen gezählt. Aus dem resultierenden Mittelwert dieser vier Zählungen wurde mit Hilfe der Formel 1 die Gesamtzellzahl berechnet:

$$x_{gesamt} = \bar{x} \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot V(\text{Zellsuspension in mL})$$

Formel 1: Berechnung der Gesamtzellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer.

Damit die Zellen alle drei bis vier Tage zu 80 % konfluent waren, wurden 1•10⁶ Zellen in 13 mL Kulturmedium in einer neuen T75-Flasche ausgesät. Die übrig gebliebene Zellsuspension konnte nun in Well-Platten für Experimente ausgesät werden.

7.2.2 Kryokonservierung

Durch Kryokonservierung können Zellkulturen nahezu zeitlich unbegrenzt gelagert werden. Hierzu werden sie nach Ablösung (siehe Kapitel 7.2.1) in einem speziellen Kryokonservierungsmedium suspendiert. Dieses Medium enthält kein Antibiotikum,

aber u.a. 20 % Serum und 10 % DMSO. Die Zugabe von DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen beim Einfrierprozess zerstören würden. Da DMSO zelltoxisch ist, wurde die Dauer der Arbeiten möglichst minimiert. Anschließend wurden die durch Zentrifugation pelettierten Zellen in 4 °C kaltem Kryokonservierungsmedium resuspendiert und möglichst schnell in die Kryo-Röhrchen aliquotiert, meist 1 mL Zellsuspension mit $0,5 \cdot 10^6$ oder $1 \cdot 10^6$ Zellen. Die befüllten Kryo-Röhrchen wurden direkt in einen auf 4 °C vorgekühlten Mr. Frosty Gefrierbehälter überführt und bei -80 °C eingefroren. Dieser mit Isopropanol gefüllte Gefrierbehälter friert die Zellen kontrolliert mit -1 °C/Minute ein, wodurch die Zellen soweit wie möglich geschont werden. Nachdem die gewünschte Temperatur von -80 °C erreicht war, wurden die Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Wurden neue Zellen für Experimente benötigt, so wurde eine Kryokultur revitalisiert, indem sie aus dem flüssigen Stickstoff in einem 37 °C warmen Wasserbad unter Schwenken fast vollständig aufgetaut wurde. Unter Zugabe von 13 mL Kulturmedium, abgefüllt in eine neue T75-Flasche, lagerten die Zellen anschließend im Inkubator. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten, konnten sie für Experimente verwendet werden. Es stellte sich als vorteilhaft heraus das Zellkulturmedium einen Tag nach der Revitalisierung zu wechseln, damit die durch Kryokonservierung abgestorbenen Zellen und die Reste des DMSOs entfernt werden konnten.

7.2.3 Transfektion

Die Protokolle für die verschiedenen Transfektionsmethoden und -reagenzien sind nachfolgend aufgeführt.

7.2.3.1 Transfektion mit PEI

Die im Rahmen der Masterarbeit optimierte Ko-Transfektion von CHO-K1 Zellen mit PEI wurden anfänglich nach dem Protokoll [27] der Forschungsgruppe der Universität Freiburg durchgeführt. Nachfolgend ist die optimierte Version dieses Protokolls dargestellt.

Einen Tag nach dem Aussäen von 300.000 Zellen in 3 mL DMEM-Medium in eine 6-Well-Platte fand die Transfektion statt. Dieses Vorgehen gab den Zellen genügend Zeit

zu adhären und sich vom Teilungsprozess zu regenerieren. Für die Ko-Transfektion des PhyB-Systems wurde für jedes Well der folgende Plasmid-Mix erstellt:

- 5,53 µg Plasmid mit dem Photosensor
- 2,77 µg Plasmid mit dem GOI
- Auf 400 µL mit Opti-MEM Medium auffüllen

Für die Anzahl der Wells mit zu transfizierenden Zellen y wurde in einem geeigneten Reaktionsgefäß, je nach zu erstellender Menge, der PEI-Mix wie folgt erstellt:

- $y \cdot 75$ µL PEI (1 mg/mL)
- auf $y \cdot 500$ µL mit Opti-MEM Medium auffüllen

Der PEI-Mix wurde mehrfach invertiert und jeweils 400 µL in den Plasmid-Mix gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde erneut invertiert und dann 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Zellkultur-Medium in den Kavitäten-Platten mit 2,5 mL HTS-Medium gewechselt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß nochmals invertiert und 500 µL in jede Kavität gegeben. Nach vier bis fünf Stunden Inkubation im Inkubator wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und durch 3 mL DMEM-Medium ersetzt. Die Zellen verblieben bis zur Illumination am nächsten Tag im Inkubator.

7.2.3.2 Transfektion mit DreamFect™ Gold /Stem, Lipofektamine Stem und X-tremeGENE™ 9

Die Optimierung der Transfektion mit den Transfektionsreagenzien ist in Kapitel 3.2 beschrieben. Nachfolgend ist das optimierte Protokoll dargestellt. Einen Tag nach dem Aussäen von 12.000 HEK293 Zellen bzw. 8.000 ADhMSCs in 200 µL DMEM-Medium (für HEK293 Zellen) oder α -MEM (für ADhMSCs) in eine 96-Well-Platte fand die Transfektion statt. Die Experimente wurden stets in Vierfachbestimmung durchgeführt, daher setzt sich der Transfektions-Mix für vier Wells wie folgt zusammen:

- 750 µg DNA
- 2 µL Transfektionsreagenz
- 200 µL Opti-MEM

Die 750 µg DNA wurden hierbei auf die Anzahl der zu transfizierenden Plasmide aufgeteilt und ihr Verhältnis zueinander muss zusätzlich berücksichtigt werden.

Das Reaktionsgefäß wurde mehrfach invertiert und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Zellkultur-Medium

in den Kavitäten-Platten mit 150 μL Opti-MEM Medium gewechselt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß nochmals invertiert und 50 μL in jede Kavität gegeben. Die Zellen wurden bis zur Illumination am nächsten Tag im Inkubator gelagert. Vor der Illumination wurde das Medium abgenommen und 200 μL DMEM Medium hinzugegeben.

7.2.3.3 Elektroporation

Für die Elektroporation wurde linearisierte DNA verwendet, das heißt, die DNA wurde mit einem geeigneten Restriktionsenzym (schneidet die DNA nur einmal außerhalb der versuchsrelevanten Sequenz) geschnitten. Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll des Enzyms gearbeitet. Pro Versuchsansatz wurden $1 \cdot 10^6$ ADhMSCs benötigt, die nach Ablösung (siehe Kapitel 7.2.1) in 425 μL kaltem hypoosmolaren Elektroporationspuffer resuspendiert wurden. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 20 μg linearer DNA vermischt und 10 Minuten lang auf Eis inkubiert. Danach wurde die Mischung in eine Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 4 mm umgefüllt und mit einem einmaligen Rechteckpuls elektroporiert. Damit die optimalen Einstellungen gefunden werden, wird die Stromstärke und Dauer des Pulses variiert. Die optimalen Bedingungen lagen bei 5 ms bei 600 V. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und nochmals 10 Minuten lang auf Eis inkubiert, bevor sie auf einer mit 10 mL α -MEM befüllten (auf 37 °C vorgewärmten) 10 cm Petrischale ausgesät wurden. Bis zur Auswertung des Versuchs lagerte die Petrischale im Inkubator. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel sodass die Zellen Zeit hatten sich von der Prozedur zu erholen. Anschließend konnten die während der Elektroporation abgestorbenen Zellen entfernt werden.

7.2.4 Illumination

Dieses Kapitel beschreibt die Methoden der Illumination der verschiedenen optogenetischen Systeme sowie den Aufbau der verwendeten Illuminationskammer.

7.2.4.1 Aufbau der Illuminationskammer und Berechnung der Beleuchtungsstärke

Die Illuminationskammer wurde von der Werkstatt des Instituts für technische Chemie der Leibniz Universität Hannover gebaut. Der Einbau und die Steuerung der LEDs sowie der Kamera wurde von der AG Blume des Instituts für Mikroelektrische Systeme übernommen. Die Messung der tatsächlichen LED-Lichtstärke führte die AG Blume des Instituts für Mikroelektrische Systeme in Kooperation mit der AG Heisterkamp des Instituts für Quantenmechanik aus. Bei der Illuminationskammer handelt es sich um eine lichtundurchlässige Kammer, die an der Vorderseite mit einer herausnehmbaren Türe ausgestattet ist. In dieser Türe sind zwei Handschuhe für steriles Arbeiten im Kammerinneren befestigt. An der Decke der Kammer befindet sich ein LED-Array, das man mit Hilfe des Tablets auf der Oberseite der Kammer steuern kann. Es wurden LEDs von unterschiedlichen Wellenlängen verbaut (465 nm, 520 nm, 660 nm, 740 nm), die alle individuell angesteuert werden können. Mit Hilfe des Steuerungsprogramms können verschiedene Illuminationsszenarien programmiert werden, z. B. repetitive Sequenzen aus Aktivierung und Deaktivierung. An der Decke der Illuminationskammer wurde eine Kamera eingebaut, sodass selbst bei geschlossener Türe die mittels Handschuhen durchgeführten Arbeiten beobachtet werden können. Des Weiteren dient die Kamera der Überprüfung ob die gewählten Einstellungen auch ausgeführt werden. Auf dem Kammerboden befindet sich ein höhenverstellbares Stativ, wodurch sich der Arbeitsabstand zwischen Probe und LEDs individuell einstellen lässt. Damit auch bei längeren Illuminationsdauern die Zellen nicht geschädigt werden, wurde auf dem Stativ eine kleine Inkubatorkammer installiert. Diese kann die Temperatur, Luftfeuchtigkeit und den CO₂ Gehalt im Inneren regulieren. Somit ist auch eine längere Illuminationsdauer möglich, ohne eine Veränderung der Inkubationsbedingungen herbeizuführen. Die Kontrolleinheiten sowie der Gasmixer dieser Inkubationskammer befinden sich außerhalb. Auf der rechten Kammerseite befindet sich eine kleine Öffnung durch das Kabel und ein Belüftungsschlauch führen. Die Öffnung wurde großzügig mit Aluminiumfolie abgeklebt, um jegliches Eindringen von Licht zu verhindern. Abbildung 75 zeigt den schematischen Aufbau der Kammer, Abbildung 76 die bildliche Darstellung.

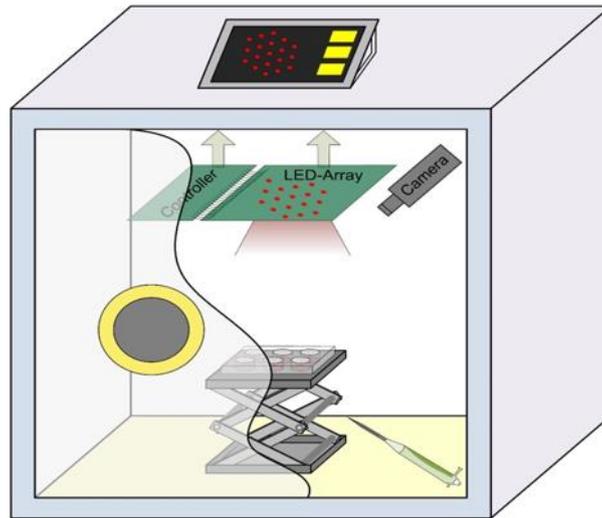


Abbildung 75: Schematischer Aufbau der Illuminationskammer.

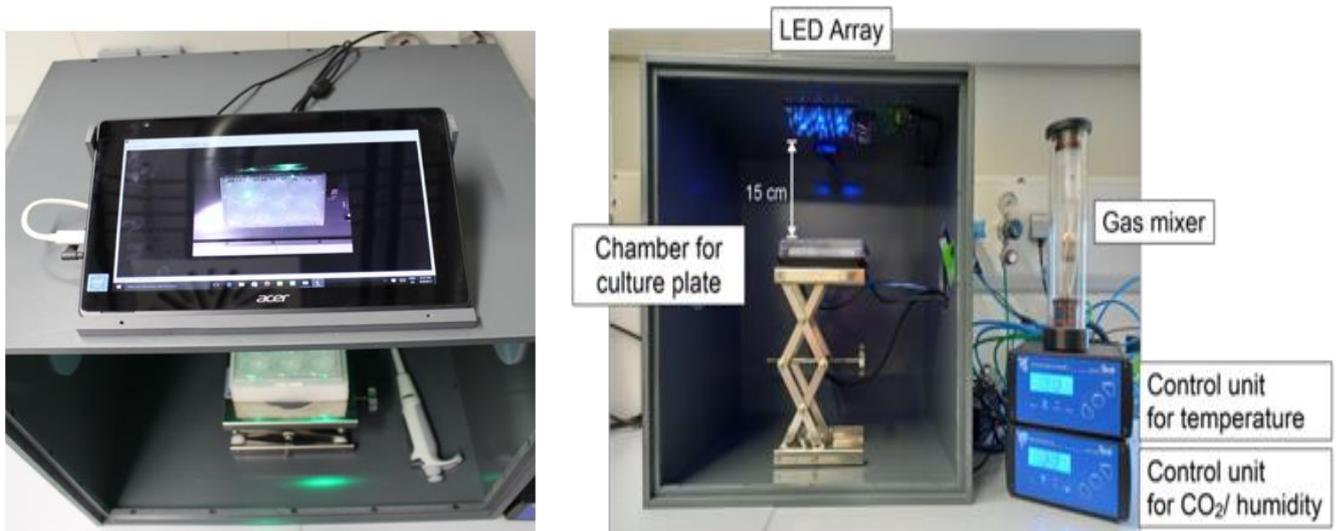


Abbildung 76: Bilder der Illuminationskammer.

Da das Arbeiten in dem kleinen Raum mit den dicken Handschuhen und der nur geringen Sicht der Kamera sehr aufwändig und schwierig in der Handhabung war, hat es zu Pipettierungenauigkeiten geführt. Daher wurde beschlossen den ganzen Raum mit Hilfe von Aluminiumfolie abzdunkeln und Arbeiten, die in Dunkelheit durchgeführt (bzw. unter einer Wellenlänge, die keine Aktivierung des Systems hervorruft) werden mussten, bei offener Türe durchzuführen. Vorher wurde die Illuminationskammer gründlich gereinigt und sterilisiert. Während der Illumination bzw. Inkubationszeit in der Dunkelheit wurde die Tür wieder sicher verschlossen.

Die Messung der tatsächlichen LED-Lichtstärke übernahm die AG Blume des Instituts für Mikroelektrische Systeme in Kooperation mit der AG Heisterkamp des Instituts für Quantenmechanik, ebenso die Umrechnung der gemessenen Werte in die Bestrahlungsstärke (W/m^2). Die Bestrahlungsstärke ist die gesamte Leistung der elektromagnetischen Energie, die auf eine Oberfläche trifft, bezogen auf die Größe dieser Fläche. Die Messung erfolgte mit einem Power Meter und dem Newport thermophilen Sensor (3 W, 10 mm, 0,19 - 11 μm , Modellnummer: 919P-003-10). Die Größe des verwendeten Sensors beträgt 0,71 cm^2 . Gemessen wurde die Anzahl an Photonen pro Wellenlänge mit einer Integrationszeit von 0,06 Sekunden. Die Auswertung der die gemessenen Daten erfolgte mit der Kalibrationskurve des Herstellers, im Datenblatt vermerkt. Jeder Wellenlänge ist dort ein individueller Umrechnungsfaktor zugeordnet. Zur Bestimmung der Leistung wurde von dem gesamten aufgenommenen Spektrum der Peak isoliert und alle Messwerte addiert. Anschließend wurde die Kalibration (abhängig vom Cp-Wert der Kalibrationslampe, Integrationszeit und Größe des Sensors) auf diese Werte angewendet. Die gemessene Genauigkeit betrug insgesamt +/- 10 %.

Hierbei wurde eine Aktivierung aller verfügbaren LEDs (660 nm: 16; 740 nm: 16 und 465 nm: 6) in der Mitte des Statives bei einem Arbeitsabstand von 15 cm gemessen. Mit Hilfe des Steuerungsprogramms können maximal 63 verschiedene Lichtintensitäten eingestellt werden. Die Lichtintensitäten wurden bei neun verschiedenen Einstellungen (1, 7, 15, 23, 31, 39, 47, 55, 63) gemessen. Die Lichtintensitäten der anderen Einstellungen konnten mit Hilfe der resultierenden Ausgleichsgeraden anschließend berechnet werden.

Abbildung 77 zeigt die Kalibriergerade für die LEDs mit einer Wellenlänge von 465 nm.

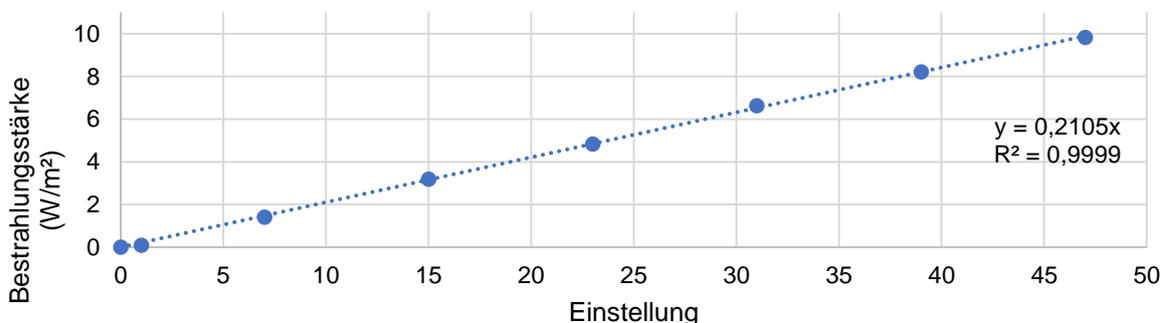


Abbildung 77: Kalibriergerade für 465 nm LEDs.

Die in der Literatur [63] verwendete Bestrahlungsstärke für die Aktivierung von optogenetischen Blaulichtsystemen beträgt 8 W/m². Dies entspricht einer Einstellung der Stufe 39. Einstellungen oberhalb der Stufe 40 wurden seitens der AG Blume (IMS) nicht empfohlen, da bei dauerhafter Aktivierung mit einer zu starken Hitzeentwicklung zu rechnen ist. Das ist auch der Grund dafür, dass blaulichtaktivierbare Systeme lediglich mit Blaulichtpulsen (20 Sekunden aktiviert, 60 Sekunden deaktiviert) illuminiert werden.

Die für das Rotlichtsystem verwendeten Lichtintensitäten wurden in der Literatur [27] in E_{QF} (Quantenfluss: μmol/(m²•s)) angegeben. Für biologische Prozesse kann der Quantenfluss von Licht einer bestimmten Wellenlänge eine wichtigere Rolle als die Bestrahlungsstärke spielen. Aus diesem Grund muss sie zunächst mit Hilfe der Formel 2 in die Bestrahlungsstärke (W/m²) umgerechnet werden.

Formel 2: Umrechnung von der Bestrahlungsstärke (W/m²) in E_{QF} (μmol/(m²•s)).

$$E_{QF} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{m}^2 \cdot \text{s}} \right) = \frac{N_p}{NA \cdot 10^6} = \frac{\frac{I}{E_p}}{NA \cdot 10^6} = \frac{\frac{I}{\frac{h \cdot c}{\lambda}}}{NA \cdot 10^6} = I \cdot \lambda \cdot 0,836 \cdot 10^{-2}$$

E_{QF} = Quantenfluss (μmol/(m²•s))

N_p = Anzahl der Photonen pro Sekunde und Flächeneinheit

NA = Avogadrozahl = 6,022 • 10²³ mol⁻¹

I = Bestrahlungsstärke (W/m²)

E_p = Energiequantum = h • f

h = Plancksche Konstante = 6,63 • 10⁻³⁴ J•s

f = Frequenz (1/s) = $\frac{c}{\lambda}$

c = Lichtgeschwindigkeit = 2,998 • 10⁸ m/s

λ = Wellenlänge (m)

Die Kalibriergrade für LEDs der Wellenlänge 660 nm kann in Abbildung 78 eingesehen werden.

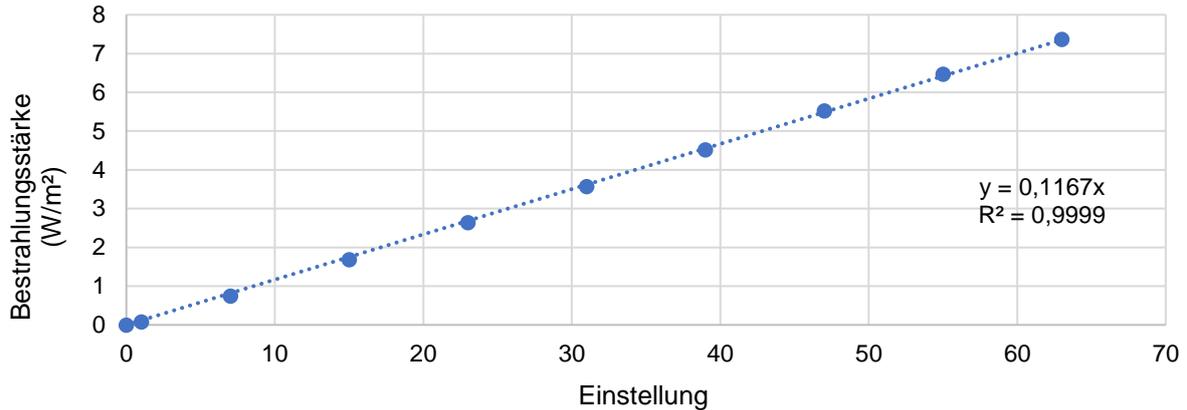


Abbildung 78: Kalibriergerade für 660 nm LEDs.

Der in der Literatur [27] verwendete Quantenfluss für die 660 nm LEDs beträgt $8 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. Umgerechnet entspricht das einer Bestrahlungsstärke von $1,45 \text{ W}/\text{m}^2$, dies entspricht einer Einstellung von 13.

Abbildung 79 zeigt die Kalibriergerade für die 740 nm LEDs.

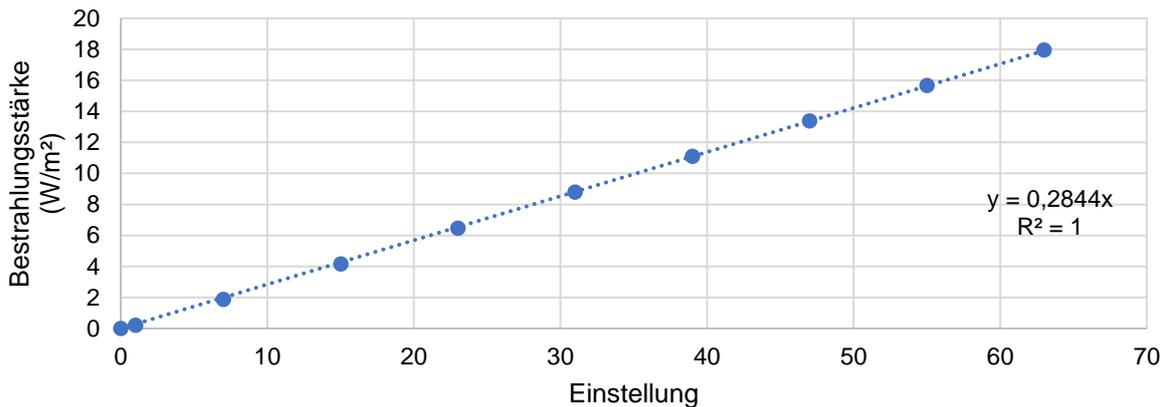


Abbildung 79: Kalibriergerade für 740 nm LEDs.

Der für die 740 nm LEDs in der Literatur [27] verwendete Quantenfluss beträgt $80 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$. In die Bestrahlungsstärke umgerechnet ergibt das einen Wert von $14,5 \text{ W}/\text{m}^2$. Dies entspricht einer Einstellung von 51 in der Illuminationskammer.

7.2.4.2 Aufbau des Lasersetups und Berechnung der Beleuchtungsstärke

Die automatisierten Lasersetups für die laserinduzierte Illumination der optogenetisch aktivierbaren Zellen wurden von der AG Heisterkamp des Instituts für Quantenmechanik entwickelt und gebaut.

Für das optogenetische PhyB-System wurde eine Laserdiode mit einer Wellenlänge von 660 nm verwendet. Die Steuerung der Laserleistung auf der Probenebene erfolgte

mit einer Kombination aus einer Halbwellenplatte und einem polarisierenden Strahlenteiler gesteuert. Durch eine Linse wird dabei der Strahl auf die Probe fokussiert. Die Position des Strahls auf der Probe kann mit Hilfe von Galvanometerspiegeln gesteuert werden. So kann jedes einzelne Well der Well-Platte individuell mit einer bestimmten Laserleistung und Scangeschwindigkeit illuminiert werden. Für die Automatisierung des Scanvorgangs werden sowohl der motorisierte Tisch (auf dem die Proben in der Inkubationskammer platziert sind), die motorisierte Halbwellenplatten-Halterung sowie die Galvanometerspiegel mit einer speziell entwickelten Software gesteuert. Darüber hinaus wird das Streulicht durch die Verwendung einer schwarz beschichteten Wellplatte sowie eines schwarzen Deckels minimiert, da die Illumination von unten erfolgte. Die Illumination von Zellen, die mit dem optogenetischen PhyB transfiziert wurden, erfolgte 30 Minuten lang bei 43 mW und einer Scangeschwindigkeit von 10 mm/s nach dem in Abbildung 80 gezeigtem Muster.

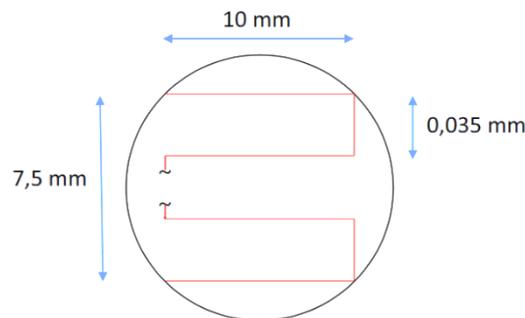


Abbildung 80: Weg des Lasers zum Scannen eines Wells einer 24-Well Platte.

Das verwendete Lasersetup für die Illumination des PhyB-Systems wird in der folgenden Abbildung (81) gezeigt.

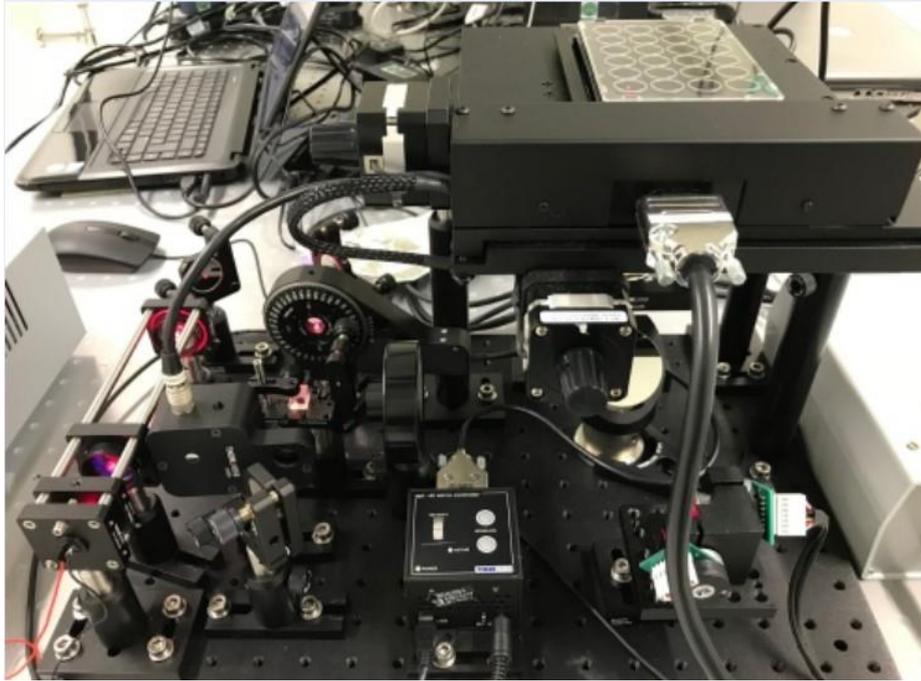


Abbildung 81: Lasersetup des PhyB Systems.

Für die Illumination des CRY Systems wurde ein Laseraufbau mit einem blauen Laser mit einer Wellenlänge von 473 nm entwickelt. Der Laserstrahl wurde über eine Reihe von Spiegeln und Optiken auf 2 Galvo-Spiegel reflektiert und geleitet. Anschließend reflektierte ein weiterer Spiegel das Licht durch eine Fokussierlinse (Brennpunkt auf dem Wellboden) von unten auf die Wellplatte. Die Galvo-Spiegel wurden von einer selbst entwickelten externen Software (AG Heisterkamp) gesteuert und scannten jedes Well von oben nach unten nach dem in Abbildung 82 gezeigten Muster.

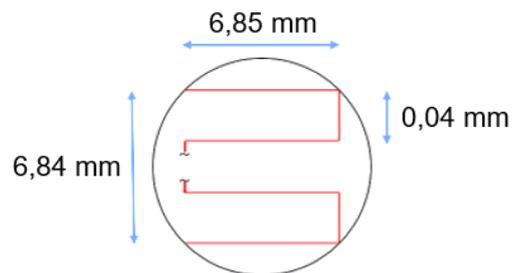


Abbildung 82: Weg des Lasers zum Scannen eines Wells einer 96-Well Platte.

Der Abstand zwischen den Wells sowie ihr Durchmesser konnten in die Software eingegeben werden, somit war die Verwendung verschiedener Well-Platten möglich. Die erforderliche Bewegung des Tisches wurde anschließend automatisch berechnet.

Die Inkubationskammer mit der darin befindlichen Wellplatte wurde auf dem beweglichen Tisch platziert, der ebenfalls mittels der selbst entwickelten Software gesteuert wurde. Nach Beendigung des Scannvorgangs (35 mm/s) eines Wells wurde der Tisch so bewegt, dass der Laser auf das nächste Well positioniert wurde. Insgesamt wurden immer vier Wells gleichzeitig für 6 aufeinander folgende Stunden beleuchtet. Die Gesamtzeit für den Scan von vier Wells sowie die Rückkehr in die Ausgangsposition betrug genau 1 Minute und 52 Sekunden (112 Sekunden), in Summe 192 Scans in 6 Stunden

Die Laserleistung wurde mit einem Energiemessgerät (PM100USB, Thorlabs, Newton, Vereinigte Staaten von Amerika) sowohl an der Laserquelle als auch an der Wellplatte dreifach gemessen, da auf dem Weg durch die Optik ein Teil der Leistung verloren geht. Zur Größenbestimmung des Laserpunktes wurden Aufnahmen mit einer IR-Kamera erstellt, die mit der Bildbearbeitungssoftware Image J analysiert wurden. Der Laserpunkt weist einen Durchmesser von 100 μm auf und hat eine Fläche von $7,85 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2$. Damit die verwendete Laserintensität mit der LED-Intensität vergleichbar war, wurden 8 W/m^2 benötigt. Bei der berechneten Laserpunktgröße würde dies einer Laserintensität von $0,06 \mu\text{W}$ entsprechen. Eine so kleine Intensität konnte jedoch nicht eingestellt werden, daher wurde mit der kleinsten möglichen Intensität von $0,6 \text{ mW}$ an der Well-Platte gearbeitet, was einer Laserintensität am Laser von 5 mW entspricht. Die verwendete Intensität war somit 10000-mal höher als bei der LED-Illumination.

7.2.4.3 Illuminationsexperiment PhyB-System

Einen Tag nach der Transfektion der Zellen wurde frisches DMEM-PCB ($15 \mu\text{M}$ PCB) Medium angesetzt, da PCB nur eine Halbwertszeit von ca. einer Stunde aufweist. Das Medium der Zellen auf DMEM-PCB Medium wurde unter grünem Licht (525 nm) gewechselt. Das Spektrum des grünen Lichts überschneidet sich nicht mit der Aktivierungswellenlänge des optogenetischen Systems, daher stellt es eine optimale Illuminationsquelle für Arbeiten mit dem PhyB-System dar. Die Zellen wurden anschließend eine Stunde lang im Dunkeln in der Illuminationskammer inkubiert, damit das Chromophor an das Phytochrom binden kann. Danach folgte eine Illumination von meist einer Stunde mit rotem (660 nm) Licht. Die Zellen wurden mit Aluminiumfolie umwickelt und weitere 48 Stunden bis zur Auswertung in dem Inkubator gelagert.

7.2.4.4 Illuminationsexperiment Cry System

Einen Tag nach der Transfektion der Zellen wurde ihr Medium durch frisches DMEM Medium unter rotem Licht (660 nm) gewechselt. Das Spektrum des roten Lichts überschneidet sich nicht mit der Aktivierungswellenlänge des optogenetischen Systems, daher stellt es eine optimale Illuminationsquelle für Arbeiten mit dem CRY System dar. Die Zellen wurden anschließend meist 12 Stunden lang mit blauem (450 nm) Licht illuminiert (20 Sekunden an und 60 Sekunden aus). Die Zellen wurden mit Aluminiumfolie umwickelt und weitere 48 Stunden bis zur Auswertung im Inkubator gelagert.

7.2.5 Proteinnachweise

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Proteinnachweise erläutert.

7.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopie von eGFP

48 Stunden nach der Illumination der Zellen erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung des synthetisierten eGFPs in CHO-K1 Zellen mittels des Inversmikroskops CKX53 von Olympus. Die verwendeten Filter richteten sich hierbei nach dem zu analysierenden Reporterprotein. Für die Detektion von eGFP wurde ein Emissionsfilter 510IF und ein Absorptionsfilter 460-495, entsprechend dem Modell U-FBW von Olympus, verwendet. Der genutzte dichromatische Spiegel 500 ist analog dem Modell U-MBW2. Für die Aufnahme der Bilder wurde das Programm *Gryphax* mit 4-facher Vergrößerung verwendet. Pro Well wurden fünf Bilder der fluoreszierenden Zellen aufgenommen. Von den gleichen Stellen wurde darüber hinaus noch jeweils ein Phasenkontrast-Bild angefertigt. Auf den Deckel jedes Wells ist hierfür eine horizontale und vertikale Linie durch die Wellmitte gezogen worden. Pro Viertel wurde ein Bild aufgenommen und zusätzlich wurde eins von der Mitte angefertigt. Für die Erstellung der Bilder von eGFP wurden als erstes die Einstellungen *Gain* und Schärfe auf jeweils 1 eingestellt. Anschließend wurde eine Belichtungszeit von ungefähr 300 ms bis 500 ms eingestellt und der Hintergrund als Schwarzpunkt ausgewählt. Danach wurde die Belichtungszeit auf 1.329 ms erhöht und der Hintergrund erneut als Schwarzpunkt definiert. Dadurch wurden die Hintergrundfluoreszenz und das Streulicht der

Beleuchtung negiert und somit ein schwarzer Hintergrund kreiert, auf dem sich auch die schwach grün fluoreszierenden Zellen gut abzeichnen.

Die Fluoreszenzaufnahmen von HEK293 und ADhMSCs wurden mit dem Inversmikroskop IX83 von Olympus angefertigt. Der verwendete Filtercube war Alexa 488, bestehend aus einem 470/40 ET Bandpass, einem Strahlenteiler T495 LPXR, einem 525/50 ET Bandpass und einem U-FF Filtermodul für BX3/IX3. Die zugehörige Software heißt *CellSens Dimension*. Diese Aufnahmen wurden ebenfalls in 4-facher Vergrößerung erstellt, dieses Mal jedoch mit automatischer Belichtung. Es wurden immer repräsentative Aufnahme der Wells angefertigt, die einen guten Überblick der durchschnittlichen Besiedelung geben. Ein Schwarzabgleich des Hintergrundes war bei dem verwendeten Mikroskop nicht möglich.

7.2.5.2 Bildauswertung der Fluoreszenzaufnahmen mit Image J

Die Auswertung der erstellten Fluoreszenzbilder erfolgte mit dem Programm ImageJ . Hierfür wurde ein Makro erstellt, das bei jedem Bild automatisch die folgenden Schritte ausgeführt hat:

- `dir="Y"`
- `run("8-bit");`
- `run("Median...", "radius=6");`
- `run("Subtract Background...", "rolling=20");`
- `run("Enhance Contrast...", "saturated=0.01 normalize");`
- `run("Options...", "iterations=1 count=1 black edm=Overwrite");`
- `run("Threshold...");`
- `setThreshold(9, 255);`
- `setOption("BlackBackground", true);`
- `run("Convert to Mask");`
- `saveAs("Jpeg", dir);`
- `setTool("rectangle");`
- `makeRectangle(0, 0, 1918, 1200);`
- `roiManager("Add");`
- `run("Measure");`

Y ist hierbei der Pfad zu dem Ordner, in dem die bearbeiteten Bilder gespeichert werden sollen. Mit Hilfe dieser Arbeitsanweisungen wurde der untere Rand der Bilder

abgeschnitten, der die Auflösung und den verwendeten Maßstab beinhaltet. Nach Entfernung des Rands, wurde gemessen, wie viel Prozent der Gesamtfläche mit fluoreszierenden Zellen bedeckt ist. Die obigen Einstellungen dienten dazu, einen Helligkeitsgrenzwert zu definieren, ab dem ein Signal als leuchtende Zelle bzw. als Hintergrund definiert wurde. Diese Methode war allerdings nur repräsentativ und vergleichbar, wenn die Bilder von einer konfluenten Zellpopulation stammten, da das Programm nicht zwischen besiedelten und unbesiedelten Bereichen unterscheiden kann. Somit würden unbesiedelte Bereiche als nicht fluoreszierende Bereiche gewertet und das Ergebnis verfälscht werden. Die berechneten Flächen wären geringer als der wirkliche Anteil an fluoreszierende Zellen.

Anschließend wurde für alle Bilder derselben Probe der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

7.2.5.3 Durchflusszytometermessung von eGFP

Das Durchflusszytometer musste ca. 30 Minuten vor jeder Messung eingeschaltet werden, damit die Laser ihre Betriebstemperatur von ca. 37 °C erreichen konnten. Wenn nötig musste darüber hinaus eine Gerätekalibrierung erfolgen. Hierfür wurde 1 Tropfen der kalten, gevortexten Kalibrierlösung in ein Durchflusszytometerröhrchen gegeben und die automatische Kalibrierung gestartet. Darüber hinaus musste sichergestellt werden, dass immer ausreichend Waschpuffer und Platz im Abfallgefäß vorhanden waren.

Zur Vorbereitung der durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellen zuerst wie in Kapitel Kultivierung von Zellen beschrieben abgelöst und anschließend in 300 µL kaltem FACS-Puffer resuspendiert und direkt auf Eis gelagert. So wurde einem erneuten Adhären der Zellen entgegengewirkt. Direkt vor jeder Messung wurden die Proben mit einem 70 µm Zellsieb gefiltert, damit keine Zellagglomerate das Durchflusszytometer verstopften, und in ein 5 mL Durchflusszytometerröhrchen gegeben.

Zuerst wurde eine Negativkontrollprobe gemessen. Hierbei wurde die Fließgeschwindigkeit auf langsam gestellt und 100 µL Probe vermessen. Im ersten Diagramm SSC (*side scatter*) vs. FSC (*forward scatter*) wurden während dieser ersten Messung die Geräteparameter so eingestellt, dass möglichst alle *Events* auf dem Bildschirm zu sehen waren. Die FSC-Intensität ist proportional zum Durchmesser der

Zelle und auf die Lichtbeugung an der Zelle zurückzuführen, daher wird es zur Unterscheidung der Zellen nach Größe verwendet. Das SSC-Signal hingegen entsteht durch das Licht, das an der Grenzfläche zwischen dem Laser und intrazellulären gebrochen oder reflektiert wird, daher liefert das SSC-Signal Informationen über die innere Komplexität (d. h. die Granularität) einer Zelle. Danach wird ein *Gate* um die Hauptpopulation der Zellen gezogen. Dieses *Gate* dient dazu alle restlichen Zellagglomerate, kleine Zellreste und Schmutz aus der Messung auszuschließen. In einem zweiten Diagramm wurden nur die Zellen aus dem *Gate* angezeigt und es war FITC gegen FSC aufgetragen. FITC ist hierbei das Signal des eGFPs nach Laseranregung. Für andere Analyten müssen gegebenenfalls andere Laser verwendet werden. Bei diesem Diagramm wurde ein Kreuz aus einer horizontalen und waagerechten Linie als *Gate* verwendet. Der waagerechte Strich wurde direkt über der Zellpopulation platziert, während der horizontale links an die Zellpopulation angelegt wurde. Für die Messung interessant ist die Anzahl an Zellen, die direkt über der Zellpopulation angezeigt werden. Diese Zellen haben eine höhere Fluoreszenz als die Negativkontrolle und sind somit eGFP-positive Zellen. Die eingestellten Werte können gespeichert und für weitere Messungen derselben Zellart beibehalten werden. Für die Messung einer anderen Zellsorte müssen die Einstellungen angepasst werden. Die Proben werden anschließend bei mittlerer Geschwindigkeit gemessen. Wurden 10.000 *Events* gemessen, so endete die Messung. Dies dient der Vergleichbarkeit der gemessenen Werte zwischen den unterschiedlichen Proben.

7.2.5.4 Luciferase Fluorometrischer Assay

Der Luciferase Assay wurde entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Vor der ersten Verwendung des Assays wurde das lyophilisierte Pulver in dem Assaypuffer gelöst und in 10 mL Portionen aliquotiert. Diese wurden bei -80 °C in Aluminiumfolie gelagert, da der Puffer lichtempfindlich ist.

Der Assaypuffer wurde schonend im Dunklen bei Raumtemperatur aufgetaut. Wichtig ist, dass er nicht über 30 °C erhitzt werden darf, um seine vollständige Funktion zu gewährleisten. Vor Verwendung des Assays wurde die Konfluenz der Proben mikroskopisch bestimmt. Anschließend wurde so viel Puffer zu den Proben (in einer 96-Well Platte) gegeben, wie sich Zellkulturmedium im Well befand. Bei 200 µL Medium waren es dann 200 µL Puffer. Nach 5 Minuten Inkubation im Dunkeln konnte

die Lumineszenz der Proben im Mikroplate Reader (Spectramax I3X von Molecular Devices) vermessen werden. Unter den bereits vorprogrammierten Protokollen des Mikroplate Readers befand sich ein Protokoll für genau dieses Assay, das auch verwendet wurde.

7.2.5.5 BDNF ELISA

Zum Nachweis des neurotrophen Faktors BDNF wurde ein Sandwich ELISA der Firma Sigma Aldrich entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Alle Standards und Proben wurden in Doppelbestimmung vermessen.

Hierbei wurde als erstes der Verdünnungspuffer B (Gegenstand E1) 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt, der für die Verdünnung von Zellkulturüberständen verwendet wurde. Anschließend wurde der lyophilisierte menschliche BDNF Standard (Gegenstand C) in 720 μL Verdünnungspuffer B gelöst und kurz gevortext. Seine Konzentration betrug dadurch 400 ng/mL. 40 μL dieses Standards wurden in ein Reaktionsgefäß mit 960 μL Verdünnungspuffer B überführt und gevortext, wodurch der 16 ng/ μL Standard entstand. Für jede weitere Verdünnung (6,4 ng/ μL , 6,4 ng/ μL , 2,56 ng/ μL , 1,02 ng/ μL , 0,41 ng/ μL , 0,16 ng/ μL , 0,066 ng/ μL) wurden 300 μL Verdünnungspuffer B vorgelegt, auf die 200 μL des nächst größeren Standards gegeben wurden. Hierbei wurde jeder Standard gevortext, bevor der nächste erstellt wurde. Zusätzlich wurde ein Negativstandard aus 300 μL Verdünnungspuffer B erstellt. Anschließend wurde der gevortexte Detektionsantikörper (Gegenstand F) in 100 μL Verdünnungspuffer B gelöst um das Detektionsantikörperkonzentrat zu erstellen. Diese Lösung wurde durch Auf- und Abpipettieren erneut gemischt. Vor der Nutzung musste es erneut 1:80 in Verdünnungspuffer B verdünnt werden. Das HRP-Streptavidin (Gegenstand G) wurde ebenfalls durch Auf- und Abpipettieren gemischt, bevor es 1:200 in Verdünnungspuffer B verdünnt wurden.

Bevor der ELISA begonnen werden konnte mussten alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden. Jeweils 100 μL der Proben und Standards wurden in die Wells der mit menschlichen BDNF Antikörpern beschichteten Wellplatte (Gegenstand A) gegeben. Die abgedeckte Wellplatte wurde 2,5 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen verworfen und die Wells viermal mit 300 μL 1x Waschpuffer (Gegenstand B 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt) gewaschen. Zu Trocknungszwecken wurde

die Wellplatte anschließend kurzzeitig kopfüber auf Papiertücher gelegt. Danach wurden 100 µL des verdünnten Detektionsantikörpers in jedes Well gegeben, die Wellplatte verschlossen und eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Lösung wurde wieder verworfen und die Wells erneut viermal, wie oben beschrieben, gewaschen. Nach Zugabe von 100 µL der verdünnten Streptavidin Lösung zu den Wells wurden sie erneut abgedeckt und 45 Minuten lang bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Erneut wurde die Lösung verworfen und die Wells, wie oben beschrieben, viermal gewaschen. Nun wurden 100 µL TMB Reagenz (Gegenstand H) zu jedem Well gegeben. Nach Abdeckung wurde erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln bei leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden sofort 50 µL Stopp Lösung (Gegenstand I) zu jedem Well gegeben und die Absorption bei 450 nm gemessen.

7.2.5.6 β -Galaktosidase Fluorometrischer Assay

Der fluorometrische β -Galaktosidase Assay (Sensolyte MUG β -Galactosidase Assay Kit) wurde ebenfalls entsprechend des Herstellerprotokolls der Firma Anaspec durchgeführt. Die β -Galaktosidaseaktivitätsdetektion beruht auf der Hydrolyse des farblosen 4-methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside (MUG) in Gegenwart von β -Galaktosidase in das blau fluoreszierende 4-methylumbelliferone. Dessen blaue Fluoreszenz kann bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 360 nm bei einer Wellenlänge von 460 nm detektiert werden. Als erstes wurde der *Assay buffer* erstellt. Dieser muss für jedes Experiment neu angesetzt werden. Pro Well wurden 95,5 µL Komponente D (*Assay buffer*) mit 4,5 µL Komponente E (1M DTT) zuzüglich eines Überschusses von 2 Wells vermischt. Als nächstes wurde das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen mit 0,2 µL PBS gewaschen. Auf jedes Well wurden 50 µL Lysepuffer gegeben. Dieser setzt sich aus dem zuvor erstellten *Assay buffer* mit 0,1 % Komponente F (Triton X-100) zusammen. Auch hier wurde wieder ein Überschuss von 2 Wells erstellt. Die Zelllyse dauerte 10 Minuten bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit wurde die *β -galactosidase substrate solution* erstellt. Hierfür wurde Komponente A (β -Galaktosidase Substrat) 1:200 in dem vorhin erstellten *Assay buffer* verdünnt. Pro Well wurden also 0,5 µL Komponente A in 99,5 µL *Assay buffer* verdünnt. Für die Erstellung der β -Galaktosidase Standards wurde Komponente C (β -Galaktosidase) auf 400 ng/mL (1:250) in dem erstellten Lysepuffer verdünnt. Mit 1:5 Verdünnungen

wurden die folgenden Standards erstellt: 80 ng/mL, 16 ng/mL, 3,2 ng/mL, 0,6 ng/mL, 0,12 ng/mL, 0,024 ng/mL, ebenso wie eine Negativkontrolle. In eine schwarze 96-Well Platte wurden je 10 µL Zellextrakt bzw. 10 µL Standardlösung sowie die beiden Negativkontrollen (nur Lysepuffer und Zellen ohne β -Galaktosidase) gefüllt. In jedes dieser Wells wurde anschließend noch 90 µL *substrate solution* gegeben und die Platte sanft für 30 Sekunden geschüttelt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C im Dunkeln wurden 50 µL Komponente G (Stopp Lösung) hinzugegeben und wieder kurz geschüttelt. Mit Hilfe des Microplate Readers konnte die Fluoreszenzintensität bei einer Anregung von 360 nm bei 460 nm gemessen werden.

7.2.6 Klonierung

Im folgenden Kapitel wurden alle Arbeitsschritte der Klonierungen erläutert.

7.2.6.1 Restriktionsverdau

Mittels des Restriktionsverdau wird DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen, auch Restriktionsendonukleasen genannt, gezielt geschnitten. Dabei bindet das Restriktionsenzym erst an die für das Enzym spezifische Basensequenz der DNA, danach spaltet die Endonuklease die DNA an der Bindungsstelle durch Hydrolyse auf. Je nach Art des Restriktionsenzym variieren die entstehenden Enden der DNA an der Schnittstelle. Bei den *blunt ends* endet der DNA-Strang mit einem Basenpaar, während bei *sticky ends* ein Überhang an ungepaarten Nukleotiden erzeugt wird, die meist komplementär zueinander sind. Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme erzeugen *sticky ends*. Die in den Experimenten verwendete Ligase ist für eine Ligation (siehe Kapitel Ligation) von *sticky ends* optimiert. Des Weiteren können nur komplementäre Überhänge miteinander ligiert werden, wodurch die Spezifität der Ligation deutlich erhöht wird. Die Verwendung von nur einem Restriktionsenzym führt zu einer Linearisierung des ringförmigen Plasmids, sofern die das Plasmid nur einmal schneidet. Eine Verwendung eines mehrfachscheidenden Restriktionsenzym oder von mehreren Restriktionsenzymen resultiert in mehreren DNA-Fragmenten.

Bei der Restriktionsanalyse wird die DNA durch gezieltes Schneiden in charakteristische Fragmente zerlegt. Diese sind leichter zu analysieren als die der Ursprungs-DNA. Dadurch kann unbekannte DNA charakterisiert werden. Darüber

hinaus wird der Restriktionsverdau auch bei einer Klonierung genutzt. Der Reaktionsansatz für eine Linearisierung von DNA lautet wie folgt:

- 0,5 µg Plasmid
- 1 µL Restriktionsenzym
- 2 µL 10 x Puffer
- auf 30 µL mit ddH₂O auffüllen

Damit ein Stück DNA mit Hilfe von zwei Restriktionsenzymen ausgeschnitten werden konnte, wurde folgender Reaktionsansatz erstellt:

- 0,5 µg Plasmid
- 1 µL Restriktionsenzym 1
- 1 µL Restriktionsenzym 2
- 4 µL 10 x Puffer
- auf 30 µL mit ddH₂O auffüllen

Beide Ansätze wurden zuerst mittels eines Vortexers vermischt, danach zentrifugiert und anschließend eine Stunde lang bei 37 °C ohne Schütteln im Thermoschüttler inkubiert. Während der Erstellung der Reaktionsansätze wurde darauf geachtet, dass die Enzyme auf Eis gelagert wurden, damit sie nicht denaturieren. Sollte anschließend eine Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 7.2.6.2) durchgeführt werden, wurde statt eines farblosen Puffers ein grüner Puffer verwendet, wodurch die DNA-Lösung im Gel sichtbar wurde. Durch Anreicherung des Reaktionsansatzes mit 1 µL CIP (*calv intestinal phosphatase*) und 2 µL *Cut smart* Puffer nach 30 der 60 Minuten Inkubationszeit wurde die Dephosphorylierung der Enden von linearer DNA katalysiert. Die freien Phosphate der Enden wurden durch Hydrolyse abgespalten und dadurch eine Re-Ligation linearer DNA verhindert. Nicht sinnvoll für die Erstellung größerer Mengen geschnittener DNA war eine Erhöhung der Plasmidmenge im Reaktionsansatz, da sonst ungeschnittene DNA im Reaktionsansatz verblieben wäre. Sinnvoller war die Erstellung mehrerer Reaktionsansätze, die nach Beendigung der jeweiligen Reaktion vereinigt wurden. Anschließend musste das Reaktionsgefäß erneut mittels eines Vortexers gemischt und zentrifugiert werden, damit ein homogenes Gemisch entsteht.

Zur Deaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Reaktionsansätze 10 Minuten lang bei 80 °C inkubiert oder mit Hilfe eines DNA Clean-up Kits aus der Lösung entfernt. In den meisten Fällen war dies jedoch nicht notwendig, denn direkt im

Anschluss wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und somit auch von dem Enzym getrennt.

7.2.6.2 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese wird ein Agarosegel als Matrix für die Trennung verwendet. Agarose ist ein lineares Polysaccharid, das aus Algen gewonnen wird. Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den verschiedenen Polymeren entsteht das Gel. Die Porengröße des Agarosegels kann mit Hilfe der Agarosekonzentration variiert werden. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto kleiner sind die Poren, und desto fester ist das entstehende Gel. In Abhängigkeit des Größenbereichs der zu trennenden DNA wird die Porengröße des Agarosegels ausgewählt. Diese Abhängigkeit ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Agarosekonzentration in Abhängigkeit der DNA Größe.

Agarosekonzentration (%)	Größe der DNA (kbp)
0,3	5 - 60
0,6	1 - 20
0,7	0,8 - 10
0,9	0,5 - 7
1,2	0,4 - 6
1,5	0,2 - 4
2,0	0,1 - 3

Die gewünschte Agarosemenge wurde in der Mikrowelle (2,5 Minuten lang bei 700 W) in 100 mL 1 x TAE-Puffer gelöst. Unter Rühren wurde der leicht abgekühlten Lösung 5 µL *Roti-GelStain* hinzugefügt. Durch Anfärben des Gels mit *Roti-GelStain* konnte die Lage der DNA anschließend unter blauem LED-Licht bestimmt werden, da es in der DNA interkaliert. Im Anschluss wurde das Gel in die Gelkammer (mit Kämmen zur Erstellung von Taschen) gegossen. Innerhalb von 10 bis fünfzehn Minuten war die Lösung erstarrt und ein Gel hatte sich gebildet. Nach Entfernung der Kämmen wurde die Elektrophoresekammer mit 1 x TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel komplett mit Puffer bedeckt war. Die Größe der erstellten Tasche ist abhängig von dem verwendeten Kamm. Bei dem im Experiment verwendeten Kamm konnten bis zu 20 µL (meist 15 µL) DNA-Lösung in jede Tasche gefüllt werden. Für die Bestimmung der Fragmentgröße konnte je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente entweder eine 100 bp

Leiter (100 bp bis 1 kbp) und/oder eine 1 kbp Leiter (1 kbp bis 10 kbp) verwendet werden. Dafür wurden 3,5 µL der DNA-Leiter mit 3,5 µL eines 5 x grünen Puffers vermischt. Die Trennung erfolgte im Gel für 60 Minuten bei 100 V.

Die Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung wurden mit dem Kamera-System durch live-Bilder des Probentisches dokumentiert. Zuerst wurde das Gel mit weißem Licht beleuchtet, sodass es in die richtige Position gebracht werden konnte. Nach Schließung der Kammer wurde die Kamera so fokussiert, dass sie nur den relevanten Bereich des Gels scharf abbildet. Durch die anschließende Beleuchtung des Gels mit blauem LED-Licht wurden nun die einzelnen Banden sichtbar. Es ist zu beachten, dass die DNA durch die Bestrahlung langsam denaturiert und die Leuchtkraft des Farbstoffs nachlässt. Dadurch werden die Banden mit zunehmender Bestrahlungsdauer schwächer und die DNA ist eventuell nicht mehr für anschließende Analysen nutzbar. Die Beleuchtungszeit sollte deswegen stets minimiert werden. Mit Hilfe der Software konnten die Beleuchtungsstärke und der Kontrast so optimiert werden, dass die Banden gut sichtbar waren. Das fertige Bild konnte daraufhin gespeichert werden.

7.2.6.3 Gelextraktion

Nach der Agarosegelelektrophorese wurde das Gel auf den Probentisch der Geldokumentation platziert. Durch Anschalten des blauen LED-Lichts wurden die getrennten DNA-Banden sichtbar. Mit Hilfe eines Skalpell wurden die relevanten Banden möglichst sorgfältig ausgeschnitten und in jeweils separate Reaktionsgefäße überführt. Die Gelextraktion erfolgte mit Hilfe eines DNA Gelextraktions-Kits der Firma Monarch und wurde entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Die Gelstücke wurden gewogen und die vierfache Menge an Auflösungspuffer zugegeben (für 100 mg Gel waren es 400 µL Auflösungspuffer). Nach 5-minütiger Inkubation bei 50 °C im Thermoschüttler hatte sich das Gel aufgelöst. Die entstandene Lösung wurde jeweils auf eine Säule aufgetragen und 1 Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zweimal mit 200 µL Wasch-Puffer gewaschen, erneut 1 Minute zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Nach Überführung der Säule auf ein Neues 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 20 µL des auf 50 °C vorgewärmten Elutionspuffers hinzugegeben. Nach 3 bis 5 Minuten Inkubationszeit wurde erneut 1 Minute zentrifugiert. Durch das Temperieren des Elutionspuffers auf 50 °C und die Inkubationszeit des Puffers auf der Säule sollte

die Ausbeute verbessert werden. Mittels Microplate Reader wurde im Anschluss die Konzentration der eluierten DNA vermessen (siehe Kapitel 7.2.6.4).

7.2.6.4 Konzentrationsmessung

Der Microplate Reader wurde verwendet, um die Konzentration und Reinheit von DNA in einer Lösung zu bestimmen. Es wurden jeweils 2 μL von jeder Probe sowie 2 μL nukleasefreies Wasser vermessen, die je nach DNA/RNA Konzentration unterschiedlich viel Licht absorbierten. Das Wasser stellte hierbei die Negativkontrolle dar, die von dem Probenmessergebnis subtrahiert wurde. Je höher die Konzentration in der Probe war, desto mehr Licht wurde absorbiert. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm. Der Microplate Reader hat für beide Messungen vorgefertigte Protokolle, die automatisch die gemessene Konzentration berechnen.

Für die Bestimmung der Reinheit der Probe wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm berechnet. Proteine stellen eine der Hauptkontaminationen von DNA dar und haben ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Das 260/280-Verhältnis gibt also an, wie stark die DNA-Probe mit Proteinen kontaminiert ist. Liegt reine DNA vor, so ist das 260/280-Verhältnis bei ungefähr 1,5 bis 2. Ist die DNA mit Proteinen kontaminiert, ist dieser Wert deutlich kleiner. Die Bestimmung der Kontamination durch Polysaccharide wurde mit dem 230/260-Verhältnis bestimmt. Idealerweise liegt dieser Wert mindestens bei 2,0.

7.2.6.5 Ligation

Die Ligation ist die Verknüpfung von zwei oder mehr DNA-Fragmenten, sie stellt die Umkehrreaktion zu einer Restriktionsverdau (siehe Kapitel Restriktionsverdau) dar. Mit Hilfe des im Ligasepuffer vorhandenen ATP's wird die Phosphatgruppe am 5'-Ende aktiviert. Nun kann das 3'-Hydroxy-Ende an dem 5'-Phosphat-Ende angreifen. Das Enzym Ligase verknüpft die beiden Enden durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. Die verwendete T4-DNA Ligase kann sowohl *sticky ends* als auch *blunt ends* ligieren, wobei die Effizienz bei *sticky ends* jedoch deutlich höher ist. Ein Reaktionsansatz enthält die folgenden Komponenten:

- 1 µL T4 DNA Ligase
- 5 µL T4 DNA Puffer
- 1 µg Vektor DNA
- X µg Insert DNA
- Auf 20 µL mit ddH₂O auffüllen

Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor sollte 3:1 betragen. Die benötigte Menge an Insert lässt sich mit Formel 3 berechnen:

$$\text{Menge (Insert)} = \frac{\text{Länge (Insert)} \cdot \text{Menge (Vektor)} \cdot \text{Verhältnis (Insert)}}{\text{Länge (Vektor)} \cdot \text{Verhältnis (Vektor)}}$$

Formel 3: Berechnung der Insert-Menge für eine Ligation.

Dabei wird die Länge des DNA-Fragments in Basenpaaren eingesetzt und die Menge in µg. Der Reaktionsansatz wurde 90 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.

7.2.6.6 Transformation

Unter einer Transformation wird die Aufnahme von DNA in Bakterienzellen verstanden. Dazu müssen die Bakterienzellen kompetent sein, d.h., sie müssen DNA aufnehmen können. Diese Kompetenz kann natürlich vorkommen oder durch Chemikaliengabe künstlich erzeugt werden. Dies war jedoch hier nicht notwendig, da die vorliegenden *E.coli* Top10 Bakterien bereits kompetent erworben wurden. Eine erste Inkubation auf Eis führt dazu, dass die äußere Membran der Bakterien hart und unbeweglich wird. Durch eine schnelle Temperaturerhöhung auf 37 °C erleiden die Bakterien einen Hitzeschock und schwellen an. Die Membran ist nicht in der Lage sich genauso schnell auszudehnen, wodurch sich Risse bilden und ein Unterdruck im Zellinneren entsteht. Damit sich der Druck wieder normalisieren kann wird die umliegende Flüssigkeit samt Plasmid in die Bakterienzelle gesogen.

Als Erstes wurden 100 µL der kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut, 10 µL des Ligationsansatzes hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeshock bei 30-sekündiger Inkubation bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen wiederum ca. 4 Minuten lang auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µL SOC-Medium wurden sie 45 Minuten lang unter Schütteln (800 rpm) bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert. Die transformierten Bakterien konnten kultiviert werden.

7.2.6.7 Stammhaltung von Bakterien

Langfristig wurden die transformierten Bakterien als Glycerinkulturen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Glycerinkulturen bestehen zu 50 % aus Glycerin und zu 50 % aus der Bakterien-Lösung in LB-Medium. Eine weitere Möglichkeit der Stammhaltung ist die Lagerung von Bakterien auf LB-Platten. Für die Herstellung dieser Platten wurde LB-Medium mit 1,5 % Agar versetzt und autoklaviert. Alle notwendigen Arbeiten hierzu wurden in steriler Umgebung durchgeführt. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurden, abhängig von der Resistenz auf dem eingeschleusten Plasmid, Antibiotika (100 μL Ampicillin oder 25 μL Kanamycin pro 25 mL Medium) hinzugefügt. Ungefähr 25 mL der Lösung wurden jeweils in eine 100 mm Petrischale gegossen. Nachdem die Platten erstarrt waren, konnten bis zu 100 μL Bakterienlösung mit einem Petrischalenspatel ausgestrichen werden. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm umwickelt, sie konnten nun den sterilen Bereich verlassen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubieren. Die fertigen Platten konnten über mehrere Wochen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden

7.2.6.8 Kultivierung von Bakterien

Für die Herstellung von Vorkulturen wurden 1 mL Bakterien-Lösung der Ligation, eine Bakterien-Kolonie von einer Agarplatte oder 200 μL Glycerinkultur in 20 mL LB-Medium bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht in einem Schüttelschrank inkubiert. Je nach Plasmid besitzen die Bakterien eine Plasmid-induzierte Resistenz gegen ein Antibiotikum. Dieses Antibiotikum wurde der Kultur am Anfang zugefügt, damit alle nicht transformierten Bakterien absterben und sich nur das gewünschte Bakterium vermehrte. Bei einer Kanamycin-Resistenz wurden 20 μL hinzugegeben, während bei einer Ampicillin-Resistenz 60 μL benötigt wurden.

Bei Kultivierung einer Hauptkultur wurde 1,5 mL Glycerin-Kultur oder 20 mL Vorkultur in 200 mL LB-Medium gelöst und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht in einem Schüttelschrank inkubiert. Für eine Kanamycin-Resistenz wurden 200 μL Kanamycin und für eine Ampicillin-Resistenz 600 μL Ampicillin hinzugefügt. Alle Kultivierungen fanden in Schüttelkolben statt, die einen ausreichenden Gasaustausch gewährleisten, wobei sie trotzdem keimfrei verschlossen waren. Der Gasaustausch ist notwendig, damit die Bakterien immer frischen Sauerstoff zur Verfügung haben.

7.2.6.9 DNA Isolation

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte je nach benötigter Menge mit verschiedenen großen DNA Isolations Kits. Diese wurden alle nach Herstellerprotokoll verwendet und funktionieren nach demselben Prinzip. Beispielhaft ist das Protokoll für die Isolation mittels Miniprep Spin Kit erläutert. Das Prinzip basiert auf der alkalischen Lyse und der Bindung an eine Silica-Matrix auf einer Säule. Mit dem Miniprep Kit können bis zu 20 µg DNA aufgereinigt werden. Für größere Mengen kann ein Midiprep (bis zu 200 µg DNA) oder Maxiprep Kit verwendet werden.

Zuerst wurde die Kultivierungslösung zur Isolierung von DNA in 50 mL Reaktionsgefäße abgefüllt und bei 10.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 500 µL Puffer P1 (mit Lyse blau als Indikator) resuspendiert und auf zwei 2 mL Reaktionsgefäße gleichmäßig aufgeteilt. Anschließend wurde 250 µL Puffer P2 zugegeben und die Reaktionsgefäße invertiert, wodurch sich die Lösung blau färbte. War die Lösung nicht vollständig blau, so war sie noch nicht homogen und musste abermals invertiert werden. Anschließend wurde 350 µL Puffer N3 zugegeben und das Reaktionsgefäß erneut invertiert. Die blaue Lösung sollte nun wieder entfärbt sein. War dies nicht der Fall, musste die Probe erneut so lange invertiert werden, bis sie homogen war. Die Reaktionsgefäße wurden für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand konnte jeweils auf eine Säule pipettiert werden; und diese wurde wiederum für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µL PB-Wasch Puffer auf die Säule gegeben. Nach erneuter einminütiger Zentrifugation wurde der Durchfluss erneut verworfen. Anschließend wurden 750 µL PE-Waschpuffer zugegeben und es wurde wiederum 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µL eines auf 50 °C vorgewärmten Elutionspuffers übergossen. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde nochmals 1 Minute mit 13.000 rpm zentrifugiert. Die DNA befand sich nun im Eluat und die Konzentration konnte mittels Microplate Reader bestimmt werden.

7.2.6.10 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion lassen sich kleinste DNA-Mengen exponentiell vervielfältigen. Ähnlich wie bei der Restriktionsanalyse wird jedoch nicht der gesamte DNA-Strang amplifiziert, sondern nur ein kleiner Bereich zwischen den verwendeten

Primern. Die PCR besteht aus drei wesentlichen Schritten. Sie beginnt mit der Denaturierung, wobei die Doppelstränge der DNA durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen getrennt werden. Im zweiten Schritt, dem *Annealing*, lagern sich die Primer an die zu ihrer Sequenz komplementären Bereiche der Template-DNA an. Letztlich wird der neue DNA-Strang, ausgehend von dem Primer, durch die Polymerase verlängert. Sie lagert freie Nukleotide komplementär zu denen im Template-Strang in 3'→5' Richtung an. Im finalen Elongationsschritt werden eventuell noch nicht vollständig komplettierte Stränge vervollständigt. In einem initialen Schritt wird die DNA fünf Minuten lang bei 95 °C denaturiert. Die folgenden drei Schritte werden 40-mal wiederholt, man spricht von Zyklen:

- Denaturierung: 30 Sekunden bei 95 °C
- Annealing: 30 Sekunden (Temperatur abhängig von verwendeten Primern)
- Elongation: 30 Sekunden bei 72 °C
- finale Elongation: 5 Minuten bei 72 °C

Ein Reaktionsansatz für die PRC bestand aus den folgenden Komponenten:

- 10 µL 5 x grüner Puffer
- 4 µL Nukleotid-Mix (2 µM)
- 0,25 µL Taq-Polymerase
- 2 µL Primer-Mix
- 32,75 µL ddH₂O (für eine Vorkultur nur 28,75 µL)
- 1 µL Plasmid / 1 Kolonie / 5 µL Vorkultur

Der Nukleotid-Mix wurde wie folgt erstellt:

- 8 µL CNTP
- 8 µL GNTP
- 8 µL ANTP
- 8 µL TNTP
- 368 µL ddH₂O

Der Primer-Mix bestand aus den folgenden Komponenten:

- 10 µL forward Primer
- 10 µL reversed Primer
- 180 µL ddH₂O

Die Größe der entstandenen Amplifikate wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel Agarosegelelektrophorese) bestimmt.

Bei schwierigeren Klonierungen, z. B. wenn die zu trennenden DNA-Fragmente eine ähnliche Größe oder die aus dem Gel extrahierte DNA eine sehr niedrige Konzentration aufweist, ist es ebenfalls möglich, diese DNA-Fragmente mittels PCR gezielt zu vervielfältigen. Eine Sonderform der Klonierung mit Hilfe der PCR ist die Gibson-Klonierung. Hierbei werden Primer mit nicht-bindenden Überhängen verwendet, um bei dem entstehenden DNA-Fragment an den Enden kleine Bereiche, wie z. B. Restriktionsschnittstellen, zu ergänzen.

7.2.6.11 Primerdesign

Ein geeigneter Primer für die PCR eines bestimmten Plasmids hat die folgenden Eigenschaften:

- Die optimale Länge beträgt 18-22 bp für eine spezifische Bindung
- Die Annealingtemperatur sollte zwischen 60 °C und 65 °C liegen
- Der Temperaturabstand zwischen den Primern sollte nicht größer als 5 °C sein
- Das GC-Verhältnis der Primer sollte zwischen 40 % und 60 % liegen
- Keine Ausbildung von Sekundärstrukturen
- Die Primer dürfen weder aneinanderbinden, noch mit sich selbst Dimere bilden
- Ein Basenpaar darf nicht mehr als viermal hintereinander vorkommen
- Das Amplifikat sollte eine Länge von 100 bp bis 700 bp aufweisen

Primer können mit Hilfe verschiedener Programme designet werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Programme Clone Manager und SnapGene genutzt. Diese Programme suchen nach vorgegeben Kriterien mögliche Primerpaare und zeigen potentielle Fehlerquellen, wie z. B. Sekundärstrukturen oder weitere Bindungsstellen, auf.

7.2.7 Qualitative Polymerasekettenreaktion

7.2.7.1 Primerdesign

Die Primer für die qPCR wurden mit Hilfe des *NCBI Primer Blast*'s designet. Folgende Einstellungen wurden programmiert:

- Suchbereich: gesamte DNA
- Produktlänge: 70 – 150 bp
- Maximaler Unterschied der Annealingtemperaturen: 2 °C
- genutzte Datenbank: Refseq RNA (refseq_rna)

Die zehn gefundenen Primerpaare wurden anschließend mit dem *NCBI Primer Blast* überprüft. Anstelle des DNA Templates wurden die bereits gefundenen Primer eingefügt. Die Suchdatenbank wurde auf *Genomes for selected organisms* geändert und die Spezies *Homo sapiens* (Mensch), *Mus musculus* (Maus) und *Cricetulus griseus* (Chinesischer Hamster) eingefügt. Hierbei wird überprüft, ob die Primer an die ausgewählten Genome binden. Je weniger Ergebnisse erschienen sind, desto besser waren die Primer.

Eine zweite Überprüfung der noch übrig gebliebenen Primer erfolgte mit dem *IDT Oligo Analyzer*. Hierbei wird *Parameter sets* auf qPCR gestellt und beide Primer eines Paares separat analysiert. Überprüft wird:

- Der Unterschied der Schmelztemperaturen: <2 °C, da nur eine Schmelztemperatur pro Primerpaar bei der qPCR verwendet werden kann und dort beide Primer funktionieren müssen
- GC-Gehalt: 45-65 %
- Sekundärstrukturen sollten nur bei Temperaturen unter 50 °C auftreten, da anderenfalls eine korrekte Primerbindung bei den verwendeten Annealingtemperaturen (55-62 °C) verhindert wird
- Ausbildung von möglichst wenigen Heterodimeren

Die besten zwei Primerpaare konnten anschließend erworben werden. Sollten keine zwei Primerpaare gefunden werden, die den obigen Kriterien entsprechen, so konnten mit der *IDT Primer Quest* erneut Primerpaare generiert werden. Diese mussten dann ebenfalls wie beschrieben überprüft werden.

7.2.7.2 Bestimmung der Annealingtemperatur

Für die Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur jedes Primerpaars wurde eine Gradienten PCR durchgeführt. Hierbei wurde eine qPCR durchgeführt, bei der jede Reihe des Thermocyclers eine andere Temperatur aufwies. Bei 16 Reihen waren das 16 verschiedenen Temperaturen in einem Temperaturbereich von ± 5 °C um die vom

Hersteller genannte Annealingtemperatur. Die Bestimmung wurde in 3-fach Bestimmung durchgeführt, daher wurden 48 Proben benötigt. Ein Reaktionsansatz wurde wie folgt erstellt:

- 5 μL PCR Master Mix
- 0,4 μL Primer-Mix (5 pmol/ μL Endkonzentration)
- 2,6 μL ddH₂O
- 2 μL DNA (ca. 1 μg)

Mit dem Überschuss wurde eine Master Mix für 60 Proben erstellt:

- 300 μL PCR Master Mix
- 24 μL Primer-Mix (5 pmol/ μL Endkonzentration)
- 156 μL ddH₂O
- 120 μL DNA

10 μL des Master Mixes wurden mittels eines Pipettierroboters in eine 384-Well qPCR Platte transferiert. In jeder Zeile wurden jeweils die ersten drei Spalten befüllt. Anschließend wurde die Platte mit Folie verschlossen und kurz zentrifugiert. Mit dem folgenden Temperaturprogramm wurde die optimale Annealingtemperatur ermittelt:

- 95 °C 2:00 min
 - 95 °C 0:20 min
 - Annealingtemperatur des Herstellers (± 5 °C) 0:30 min
 - 70 °C 0:10 min *Real Time Data*
 - 70 °C 2:00 min
 - 70 °C -> 95 °C (Schmelzkurve)
- 40 x

Die Auswertung erfolgte mit der Software CFX Maestro. Dort wurde zuerst die Plattenbelegung eingetragen. Nun konnte die Temperatur der höchsten Kurven ausgewählt werden. War der CQ-Wert (Schnittpunkt der Kurve mit der Grenzwertlinie) unter 8, so war die verwendete DNA zu stark konzentriert und das Experiment musste mit verdünnterer DNA wiederholt werden. Darüber hinaus wurden auch die Schmelzkurven und Schmelzpeaks der Proben betrachtet. Die Schmelzpeaks sind die erste Ableitung der Schmelzkurven. Dort sollte lediglich ein Peak zu erkennen sein. Weitere Peaks oder Hügel deuten auf das Vorhandensein von Nebenprodukten hin,

was nicht der Fall sein darf. Mit Hilfe eines Agarosegels (siehe Kapitel Agarosegelelektrophorese) des qPCR Mixes sollte diese Theorie überprüft werden.

7.2.7.3 Bestimmung der qPCR Effizienz

Damit die qPCR Effizienz der Primerpaare bestimmt werden konnte, wurden Kalibrierreihen erstellt. Für die Referenzprimer wurden aus cDNA von HEK293 Zellen die folgenden Verdünnungen in ddH₂O erstellt:

- 1:10
- 1:50
- 1:100
- 1:500
- 1:1.000
- 1:5.000
- 1:10.000
- 0

Eine Verdünnung von 1:10 entspricht in der Auswertungssoftware einer Konzentration von 0,1. Die jeweilige DNA (mit einer Ausgangskonzentration von 200 – 300 ng/μL) wurde für die restlichen Primer wie folgt verdünnt:

- 1:100
- 1:500
- 1:1.000
- 1:5.000
- 1:10.000
- 1:50.000
- 1:100.000
- 0

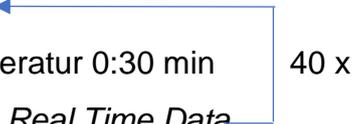
Zusätzlich wurde folgender Reaktionsansatz für 1 Probe erstellt:

- 5 μL qPCR Master Mix
- 0,4 μL Primer-Mix
- 2,6 μL ddH₂O

Für 8 Standards in 3-fach Bestimmung mit Überschuss ergibt sich daraus ein Master Mix für 35 Proben, der wie folgt erstellt wurde:

- 175 µL qPCR Master Mix
- 14 µL Primer-Mix
- 91 µL ddH₂O

8 µL dieses Master Mixes wurden mit Hilfe des Pippetierroboters in eine 384-Well Platte vorgelegt und anschließend wurden vom Roboter noch 2 µL der Standards zugegeben. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen und zentrifugiert. Das nachfolgende Temperaturprogramm wurde für die qPCR verwendet:

- 95 °C 2:00 min
 - 95 °C 0:20 min
 - Annealingtemperatur 0:30 min
 - 70 °C 0:10 min *Real Time Data*
 - 70 °C 2:00 min
 - 70 °C -> 95 °C (Schmelzkurve)
- 

Die Auswertung erfolgte mit der Software CFX Maestro. Dort wurden zuerst die Plattenbelegung und die Konzentrationen der Standards eingetragen. Die Software hat dann automatisch eine Grafik mit Kalibriergeraden generiert. Eventuelle Ausreißer wurden aus der Berechnung ausgeschlossen. Optimal wäre eine resultierende Steigung der Kalibriergeraden von 100 %. Abweichungen von bis zu 20 % sind tolerierbar und meist auf Ungenauigkeiten bei der Erstellung der Verdünnungen zurückzuführen. Liegt die Steigung unter 80 %, liegt es möglicherweise an einer Ausbildung von Sekundärstrukturen, einer falschen Annealingtemperatur oder schlechter DNA-Qualität, während Werte von über 120 % für die Bildung von Nebenprodukten spricht.

7.2.7.4 mRNA Isolation

Die mRNA Isolation der Proben wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Zuerst wurde der Überstand auf den Zellen abgenommen und 350 µL RLT Plus Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Lysat in ein 1,5 mL Probengefäß überführt und einminütiges vortexen homogenisiert.

Das Lysat wurde auf eine gNDA Eliminator Säule gegeben und 30 Sekunden lang bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule verworfen und 350 µL 70 %iger Ethanol auf den Überstand gegeben und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vermischt. Das Gemisch wurde dann auf eine RNeasy Säule gegeben, 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 700 µL RW1 Puffer auf die Säule wurde diese erneut zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Anschließend wurden zweimal 500 µL RPE Puffer auf die Säule gegeben, diese zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Danach wurde die Säule auf einem neuen 2 mL Reaktionsgefäß platziert und 2 Minuten lang zentrifugiert, um auch den letzten Waschpuffer zu entfernen. Nachdem die Säule auf ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß platziert wurde, erfolgte die Elution der mRNA durch Zugabe von 30 µL ddH₂O die nach einminütiger Inkubationszeit durch die Säule zentrifugiert wurde. Schließlich folgte die RNA Konzentrationsbestimmung (siehe Kapitel Konzentrationsmessung).

7.2.7.5 cDNA Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde die mRNA der Proben auf eine Konzentration von 15 ng/µL normiert. Es wurden insgesamt 11 µL mRNA mit einer Konzentration von 15 ng/µL benötigt. Höher konzentrierte Proben wurden mit ddH₂O verdünnt, während geringer konzentrierte Proben unverdünnt verwendet wurden. Anschließend wurde 1 µL *random hexamer primer* zugegeben, die Proben 5 Minuten lang bei 65 °C im Thermocycler inkubiert und danach auf Eis gelagert. Ein cDNA Master Mix wurde mit Überschuss angesetzt. Pro Probe bestand er aus:

- 4 µL 5x reaction buffer
- 1 µL RiboLock
- 2 µL 10M dNTP Mix
- 1 µL RevertAid H Minus Reverse Transcriptase

In jede Probe wurden 8 µL des Master Mixes gegeben und sie wurden nach folgendem Temperaturprogramm im Thermocycler inkubiert:

- 5 Minuten 25 °C
- 60 Minuten 42 °C
- 5 Minuten 70 °C

Im Anschluss wurde die cDNA 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

7.2.7.6 Probenmessung und -auswertung

Für eine Analyse der Proben mit 6 Primern (3 Referenzprimer (B2M, RPL4, PPIA) und 3 Primern (CRY, CIB, Target)) wurden 80 µL der cDNA in eine 96-Well Platte mit spitzem Boden pipettiert. In eine zweite 96-Well Platte mit spitzem Boden wurden 60 µL der HEK cDNA und 20 µL der Standards pipettiert. Pro Versuch wurden 36 Proben mit 8 Standards in 3-fach Bestimmung vermessen. Hierfür wurde der folgende Master Mix angesetzt:

- 650 µL qPCR Master Mix
- 52 µl Primer Mix
- 338 µL ddH₂O

Der Pipettierroboter hat in jedes Well einer 384-Well Platte 8 µL Master Mix vorgelegt und anschließend 2 µL Probe bzw. Standard hinzugegeben. Für jedes Primerpaar wurde eine eigene Platte pipettiert, also resultiert ein Versuch in 6 verschiedenen Platten. Diese wurden mit dem folgenden Temperaturprogramm gemessen:

- 95 °C 2:00 min
 - 95 °C 0:20 min
 - Annealingtemperatur 0:30 min
 - 70 °C 0:10 min *Real Time Data*
 - 70 °C 2:00 min
 - 70 °C -> 95 °C (Schmelzkurve)
- 40 x
- 

Die Auswertung erfolgte mit der Software CFX Maestro. Dort wurden zuerst die Plattenbelegung und die Konzentrationen der Standards eingetragen. Die Software hat dann automatisch eine Grafik mit Kalibriergeraden generiert. Eventuelle Ausreißer wurden aus der Berechnung ausgeschlossen.

Für die Gesamtauswertung eines Versuches wurde mit der Software eine neue *Gene Study* geöffnet und die Daten aller 6 Platten eingeladen. Wichtig ist hierbei, dass die Proben auf allen Platten gleich benannt sind. Die Referenzgene müssen als Referenz markiert werden. Nun normiert die Software die gemessenen Daten automatisch auf die Referenzgene und erstellt eine Grafik (*Study Analysis*).

7.2.8 Isolation von ADhMSCs aus Fettgewebe

Am ersten Tag der Isolation wurden ca. 20 g Fettgewebe von Adern, Haut und anderem Gewebe befreit und mittels einer Schere zerkleinert und homogenisiert. Die Masse wurde in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und 10 mL Collagenase Lösung hinzugefügt. Für diese wurden 20 mg Collagenase in 10 mL HBSS (*Hanks balanced salt solution*) gelöst und steril filtriert. Die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Durch eine einstündige Inkubation bei 37 °C kann dieser Vorgang beschleunigt werden.

Am zweiten Tag der Isolation wurde das Reaktionsgefäß 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert und anschließend gevortext, bis eine möglichst homogene Lösung entstanden war. Die Lösung wurde gleichmäßig auf zwei neue 50 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt, jeweils auf 40 mL Waschpuffer 1 (HBSS) aufgefüllt und gevortext. Die Reaktionsgefäße wurden 5 Minuten lang bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nun wurde der Fettüberstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, die Mittelschicht abgesaugt und verworfen, und der Fettüberstand wieder auf das Pellet gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden auf 40 mL mit Waschpuffer 2 (HBSS mit 10 % HS) aufgefüllt und gevortext. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 400 g bei Raumtemperatur wurde die Fettschicht und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 40 mL Waschpuffer 2 resuspendiert und erneut 10 Minuten lang bei 400 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 40 mL α -MEM Medium resuspendiert. Jeweils 20 mL wurden in T175-Flaschen gefüllt und über Nacht bei 37 °C im Inkubator gelagert.

An Tag 3 wurde das Medium in den Zellkulturflaschen durch jeweils 20 mL neues α -MEM Medium ersetzt. Nach Erreichen einer 90 %igen Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und als Passage 1 kryokonserviert. Die Charakterisierung der isolierten Zellen kann mittels Durchflusszytometer oder verschiedener Differenzierungsmedien erfolgen. MSCs sind typischerweise CD90, CD44, CD73, und CD105 positiv, während sie CD45, CD31, CD14 negativ sind.

7.3 Plasmidsequenzen

7.3.1 pKM-022

TCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAATAGCAAAGCATG
CATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT
GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTC
CGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCCTCTGA
GCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGAGGAAGTAA
AAACCAGAAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTATTTTCAGGTCCCGGATCGGAATTGCGGCCG
CCACCATGGTTTTCCGGAGTCGGGGGTAGTGGCGGTGGCCGTGGCGGTGGCCGTGGCGGAGAAGAAGAAC
CGTCGTCAAGTCACACTCCTAATAACCGAAGAGGAGGAGAACAAGCTCAATCGTCGGGAACGAAATCTCTCA
GACCAAGAAGCAACTGAATCAATGAGCAAAGCAATTCAACAGTACACCGTCGACGCAAGACTCCACGCCG
TTTTCGAACAATCCGGCAATCAGGGAAATCATTGACTACTACAATCACTCAAACGACGACGTACGGTTC
CTCTGTACCTGAGCAACAGATCACAGCTTATCTCTCTCGAATCCAGCGAGGTGGTTACATTACGCCTTCGGA
TGTATGATCGCCGTCGATGAATCCAGTTTTCCGGATCATCGGTTACAGTGAAAACGCCAGAGAAATGTTAGG
ATTATGCTCAATCTGTTCTACTCTTGAGAAACCTGAGACTGATAGCTATGGGAAGTGTGTGAGATCTTTGTT
CACTTCTTCGAGCTCGATTCTACTCGAGCGTCTTTGTTGCTCGAGAGATTACCTGTTAAATCCGGTTTTGG
ATCCATTCCAAGAATACTGGTAAACCGTTTTACGCCATTCTTCATAGGATTGATGTTGGTGTGTTATTGATTT
AGAGCCAGCTAGAAGTGAAGATCCTGCGCTTTCTATTGCTGGTGTCTGTTCAATCGCAGAAACTCGCGGTTG
TGCGATTTCTCAGTTACAGGCTCTTCTGGTGGAGATAATTAAGCTTTTGTGTGACACTGTCGTGGAAAGTGTG
AGGGACTTGACTGGTTATGATCGTGTATGGTTTATAAGTTTCATGAAGATGAGCATGGAGAAGTTGTAGCTG
AGAGTAAACGAGATGATTTAGAGCCTTATTTGAGACTGATTGCAATCCTGCTACTGATATTCCTCAAGCGTCAAG
GTTCTTGTAAAGCAGAACCCTGTCCGAATGATAGTAGATTGCAATGCCACACTGTTCTTGTGGTCCAGGAC
GATAGGCTAACTCAGTCTATGTGCTTGGTTGGTTCTACTCTTAGGGCTCCTCATGGTTGCTACTCTCAGTATA
TGGCTAACATGGGATCTATTGCGTCTTTAGCAATGGCGTTATAATCAATGGAATGAAGATGATGGGAGCAA
TGTAGCTAGTGGAGAAGCTCGATGAGGCTTTGGGGTTGGTTGTTGCCATCACACTTCTCTCGCTGCATA
CCGTTTCCGCTAAGGTATGCTTGTGAGTTTTGATGCAGGCTTTCGGTTTACAGTTAAACATGGAATTGCAGT
TAGCTTTGCAATGTCAGAGAAACCGTTTTGAGAACGCAGACACTGTTATGTGATATGCTTCTGCGTGACTC
GCCTGGTGAATTTTACACAGAGTCCCAGTATCATGGACTTAGTGAATGTGACGGTGCAGCATTCTTTTAC
CACGGGAAGTATTACCCGTTGGGTGTTGCTCCTAGTGAAGTTCAGATAAAAAGATGTTGTGGAGTGGTTGCTT
GCGAATCATGCGGATTAACCCGATTAAGCACTGATAGTTTAGGCGATGCGGGGTATCCCGGTGCAGCTGC
GTTAGGGGATGCTGTGTGCGGTATGGCAGTTGCATATATCACAAAAGAGACTTTTCTTTTTGGTTTCGATCT
CACACTGCGAAAAGAAATCAATGGGGAGGCGCTAAGCATCATCCGGAGGATAAAGATGATGGGCAACGAAT
GCATCCTCGTTTCGTCCTTTCAGGCTTTTCTGAAGTTGTTAAGAGCCGGAGTCAGCCATGGGAAACTGCGGA
AATGGATGCGATTCAGTCCAGCTTATTCTGAGAGACTCTTTTAAAGAATCTGAGGCGGCTATGAACTCT
AAAGTTGTGGATGGTGTGGTTTCAGCCATGTAGGGATATGGCGGGGGAACAGGGGATTGATGAGTTAGTGA
ATTCTGATGCTGTTAGTGTGTAGTGTGTTCCGCTAGTACGCCGCGCGCTACGAAAAACAATTACG
GGTCTACCATCGAGGCTGCTCGATCTCCCGGACGACGACGCCCGAAGAGGGCGGGCTGCGGCTCC
GCGCCTGCTCTTCTCCCGCGGGACACGCGCAGACTGTCGACGGCCCCCGACCGATGTCAGCCTG
GGGACGAGCTCCACTTAGACGGCGAGGACGTGGCGATGGCGCATGCCGACGCGCTAGACGATTTGATC
TGGACATGTTGGGGACGGGGATTCCCGGGTCCGGGATTTACCCCCACGACTCCGCCCTACGGCGC
TCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAAGCAGATGTTTACCGATGCCCTTGAATTGACGAGTACGGTGGGCC
CAAGAAAAGCGGAAGGTGTGATCTAGAGTCGACCTGCAGCCAAAGCTTAAACAGCTCTGGGGTTGTACC
CACCCAGAGGCCACGTTGGCGGCTAGTACTCCGTTATTGCGGTACCCTTGTACGCTGTTTTATACTCCCT
TCCCGTAACTTAGACGCACAAAACCAAGTTCAATAGAAGGGGTACAAAACAGTACCACCAAGCAAGCAC
TTCTGTTTCCCGGTGATGTCGTATAGACTGCTTGCCTGGTTGAAAGCGACGGATCCGTTATCCGCTTATGTA
CTTCGAGAAGCCCAGTACCACCTCGGAATCTTCGATGCGTTGCGCTCAGCACTCAACCCAGAGTGTAGCTT
AGGCTGATGAGTCTGGACATCCCTCACCGGTGACGGTGGTCCAGGCTGCGTTGGCGGCCTACCTATGGCTA
ACGCCATGGGACGCTAGTTGTGAACAAGGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTACATAAGAATCCTCCGCCCCCTG
AATGCGGCTAATCCCAACCTCGGAGCAGGTGGTCAAAAACAGTATTGGCCTGTCGTAACGCGCAAGTCC
GTGGCGAACCAGACTACTTTGGGTGTCCTGTTTCTTTTTATTTATTGTGGCTGCTTATGGTGACAATCACA
GATTGTTATCATAAAGCGAATTGGATTGCGGCGCCGCAATTCATATGTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAGTATTA
ACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATGAGGTCCGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAACCTCGCCCAGAAGCTAG
GTGTAGAGCAGCCTACATTGTATTGGCATGTAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCTTAGCCATTGAGA
TGTTAGATAGGCACCATACTCACTTTTGCCTTTAGAAGGGGAAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGC
TAAAAGTTTTAGATGTCTTTACTAAGTCATCGCGATGGAGCAAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAGAA
AAACAGTATGAAACTCTCGAAAATCAATTAGCCTTTTTATGCCAACAAAGGTTTTTCACTAGAGAATGCATTATA
TGCACCTCAGCGCTGTGGGCACTTTACTTTAGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCGTAACAGA
AGAAAGGAAACACCTACTACTGATAGTATGCCGCTATTATTACGACAAGCTATCGAATTTTGTACACCAA
GGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGGCCTTGAATTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTTAAATGTGAAA
GTGGGTCCGCGTACAGCCGCGCGCTCGATAGTGTGTTAGTGTGTTAGTGTGTTAGTGTGTTAGTGTGTTAGT

ACCGATTATTGTTGCAGGTTAAGCGATCAAGAGTATATGGAGCTTGTGTTTGAGAATGGCCAGATTCTTGCAA
AGGGCCAAAGATCCAACGTTTCTCTGCATAATCAACGTACCAAATCGATCATGGATTTGTATGAGGCAGAGTA
TAACGAGGATTTTCATGAAGAGTATCATCCATGGTGGTGGTGGTCCATCACAATCTCGGGACACGCAGGT
TGTTCCGCAAAAGTCATGTTGCTGCTGCCCATGAAACAACATGTTGGAAAGCAATAAACATGTTGACTACCGA
TACGATGTTCCAGATTACGCTTAAAAAGCTTCGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACC
ACAAC TAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATA
AGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGG
TTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGAT
GACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAG
CAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTACAGT
AGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGT
CGGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAG
TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCT
CTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGAAGCGTGGCGCTTTCTC
ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCC
CCGTTACAGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTAT
CGCCATGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTG
AAGTGGTGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC
TTCGGAATAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACCAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGC
AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT
CAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTT
TAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGAT
AACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGG
GCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTGCGCAACGTT
GTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAA
CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTT
GTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCACTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACC
GAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCAT
TGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCAGTCTTACCAGTCTTTCGAGTCCGATGTAACCCAC
TCGTGACCCGATCTTACGATCTTTCAGCATCTTTTACCTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGACCAA
AATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATATTATT
GAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAACAAATAGGG
GTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATA
AAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGCTTCAAGAATTGGTGCATCGACCAATTCTCATGTTTGACAGCTT
ATCATCGATAAGCTAGCT

7.3.2 pKM-078

CCCTCGATCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGT
GATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCAC
TCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTC
GAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAA
AAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCA
GTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACC
ACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAG
TCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCGGTACGCTATGGCATGCATGTG
TCGCGACCTGCAGGCCCTGAAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGA
CCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAG
TCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACGCCATCAGCGACAACGTCTATATCACCGCCGACAA
GCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAATTCAAGAGCTAGCCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTGAAACCGTCA
GATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCG
GCCCGGTACCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGATCCACTAGTCCACCATGGTGAGCAA
GGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGA
ACGGCCACGAGTTCCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCCGCAAGC
TGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCCTCAGTTATGTACGGCTCC
AAGGCCATCGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTG
GGAGCGCGTGTGAACCTTCGAGGACGGCGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGC
GAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGCACCAACTTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGAC

CATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAG
AGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCG
TGCAGCTGCCGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATC
GTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCACTCCACCGGCGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTC
ACCCATACAGTACATATGAGCGGCCGCAAAAGCTAGCTTCGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAA
GGACAAACCACAACACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGT
AACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTATTTATGTTTCAGTTTCAGGGGGAGG
TGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCTGCCTCGCGCGT
TTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGA
TGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGAC
CCAGTCAGTACGGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGATG
CACCATATGTCGGGCCGCTTGGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCG
ACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCC
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCCGGGAAGCGTG
GCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTG
CACGAACCCCCGTTACGCCGACCCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAG
ACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTTGTATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTT
TTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGG
GTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACC
TAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTAC
CAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCG
TCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCA
CGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACGACGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTCGC
AACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTCGGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGT
GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTC
CGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCC
TCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCACTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
ACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAAGTGA
TGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCTGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA
GTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCG
ATGTAACCCACTCTGCAACCACTGATCTTCCAGCATCTTTACTTTTACCAGCTTTTGGGTGAGCAAAAA
CAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTT
TTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATA
AACAATAGGGGTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCGTCGACGAT

7.3.3 pKM-006

GACGATATCCCTCGATCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCC
CTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAG
TTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAG
TGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTG
ATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACT
CCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCG
AGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAA
AGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCGGTACGCTATGGCA
TGCATGTGTGCGGACCTGCAGGCCCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCAC
CCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACT
TCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC
AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACT
TCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACGCCATCAGCGACAACGTCTATATCACC
GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGAGCTAGCCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTG
AACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAG
CCTCCGCGGCCCGGTACCGAATTCGAGCTCGCCGGGGATCCTCTAGAGTCAGCTTCTGCTGCTGCTG
CTGCTGCTGCTGCTGGGCTGAGGCTACAGCTCTCCCTGGGCATCATCCAGTTGAGGAGGAGAACCCGGA
CTTCTGGAACCGCGAGGCAGCCGAGGCCCTGGGTGCCGCAAGAAGCTGCAGCCTGCACAGACAGCCGCC
AAGAACCTCATCATCTTCTGGGCGATGGGATGGGGGTGTCTACGGTGACAGCTGCCAGGATCCTAAAAGG
GCAGAAGAAGGACAACTGGGCTGAGATACCCCTGGCCATGGACCGCTTCCATATGTGGCTGTGCTCA
AGACATAAATGTAGACAACATGTGCCAGACAGTGGAGCCACAGCCACGGCCTACCTGTGCGGGGTCAAG
GGCAACTTCCAGACCAATTGGCTTGAAGTGCAGCCGCCGCTTTAACCAAGTGCAACACGACACGCGGCAACGA
GGTCATCTCCGTGATGAATCGGGCAAGAAAGCAGGGAAAGTCAGTGGGAGTGGTAACCACCACACGAGTGC
AGCAGCCTCGCCAGCCGGCACCTACGCCACACGGTGAACCGCAACTGGTACTCGGACGCCGACGTGCC

TGCCTCGGCCCGCCAGGAGGGGTGCCAGGACATCGCTACGCAGCTCATCTCCAACATGGACATTGACGTGA
TCCTAGGTGGAGGCCGAAAGTACATGTTTCCCATGGGAACCCAGACCCTGAGTACCCAGATGACTACAGC
CAAGTGGGACCCAGGCTGGACGGGAAGAATCTGGTGCAGGAATGGCTGGCGAAGCCAGGGTGCCCGG
TATGTGTGGAACGCTGAGCTCATGCAGGCTTCCCTGCACCCGTCTGTGACCCATCTCATGGTCTCTTT
GAGCCTGGAGACATGAAATACGAGATCCACCCGAGACTCCACACTGGACCCCTCCCTGATGGAGATGACAGA
GGCTGCCCTGCGCCTGCTGAGCAGGAACCCCGCGGCTTCTTCTTCTCGTGAGGGGTGGTCGCATCGAC
CATGGTCATCATGAAAGCAGGGCTTACCGGGCACTGACTGAGACGATCATGTTGACGACGCCATTGAGAG
GGCGGGCCAGCTCACCAGCGAGGAGGACACGCTGAGCCTCGTCACTGCCGACCCTCCACGTCTTCTCC
TTCGGAGGCTACCCCTGCGAGGGAGCTCCATCTTCCGGGCTGGCCCTGGCAAGGCCCGGGACAGGAAGG
CCTACACGGTCTCCTATACGGAAACGGTCCAGGCTATGTGCTCAAGGACGGCGCCCGGGCCGGATGTTACC
GAGAGCGAGAGCGGGAGCCCGAGTATCGGCACGAGTACAGAGTCCCTGGACGAAGAGACCCACGCA
GGCGAGGACGTGGCGGTGTTCCGCGCGCCCGCAGGCGCACCTGGTTCACGGCGTGCAGGAGCAGACC
TTCATAGCGCACGTATGGCCTTCCGCGCCTGCCTGGAGCCCTACACCGCCTGCGACCTGGCGCCCCCG
CCGGCACCCGACGCGCGCACCCGGTTAACCCGTGGTCCCGCGGTTGCTTCTCTGCTGGCCGGGAC
CCTGCTGCTGCTGGAGACGGCCACTGCTCCCTGAGTGTCCCGTCCCTGGGGCTCCTGCTTCCCATCCCGG
AGTTCTCTGCTCCCCACCTCCTGTCTGCTCCTGCCTGGCCTCCAGCCGAGTCTCATCCCGGAGTCCCTAT
ACAGAGGTCTGCCATGGAACCTTCCCTCCCGTGCCTCTGGGGACTGAGCCCATGACACCAACCTGC
CCCTTGGCTGCTCGGACTCCCTACCCCAACCCAGGGACTGCAGGTTGTCCCTGTGGCTGCCTGCACC
CCAGGAAAGGAGGGGCTCAGGCCATCCAGCCACCTACAGCCAGTGGCCTGAGTGCAGAGGCTT
TAAACAGCTCTGGGGTTGTACCCACCCAGAGGCCACGTGGCGGCTAGTACTCCGGTATTGCGGTACC
CTTGACGCCTGTTTTATACTCCCTTCCCGTAACTTAGACGCACAAAACCAAGTTCAATAGAAGGGGTACAA
ACCAGTACCACCACGAACAAGCACTTCTGTTTCCCGGTGATGTCTGATAGACTGCTTGCCTGGTTGAAAGC
GACGGATCCGTTATCCGCTTATGTACTTCCGAGAAGCCAGTACCACCTCGGAATCTTCGATGCGTTGCGCTC
AGCACTCAACCCAGAGTGTAGCTTAGGCTGATGAGTCTGGACATCCCTCACCGGTGACGGTGGTCCAGGC
TGCCTTGGCGCCTACCTATGGCTAACGCCATGGGCACTAGTTGTGAACAAGGTGTGAAGAGCCTATTGA
GCTACATAAGAATCCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACCTCGGAGCAGGTGGTCACAAACCCAGT
ATTGGCCTGTCTAACGCGCAAGTCCGTGGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTTTTATTTTAT
TGTGGCTGCTTATGGTGACAATCACAGATTGTTATCATAAAGCGAATTGGATTGCGGCCGCGGCCGCCCCG
GGCGCGCCTGATCAATCGATGTTAAACTTAAAACAGCTCTGGGGTTGTACCCACCCAGAGGCCACGTG
GCGGCTAGTACTCCGGTATTGCGGTACCCTTGTACGCCTGTTTTATACTCCCTTCCCGTAACTTAGACGCACA
AAACCAAGTTCAATAGAAGGGGGTACAAACAGTACCACCACGAACAAGCACTTCTGTTTCCCGGTGATGT
CGTATAGTCTGCTTGCCTGGTTGAAAGCGACGGATCCGTTATCCGCTTATGTACTTCGAGAAGCCAGTACC
ACCTCGAATCTTCGATGCTGGCTGCGCTCAGCACTCAACCCAGAGTGTAGCTTAGGCTGATGACTCGGACA
TCCCTCACCGGTGACGGTGGTCCAGGCTGCGTTGGCGGCCTACCTATGGCTAACGCCATGGGACGCTAGTT
GTGAACAAGGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTACATAAGAATCCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCCCAACC
TCGGAGCAGGTGGTCACAAACAGTATTGGCCTGTCTAACGCGCAAGTCCGTGGCGGAACCGACTACTT
TGGGTGTCGCTGTTTCTTTTATTTTATTGTGGCTGCTTATGGTGACAATCACAGATTGTTATCATAAAGCGAA
TTGGATTCTCGAGACTAGTGCATCGCTTAATTAATTTAATACGCGTTTAAACAGATCCAGATCTTATTAAG
CAGAATTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCAATTT
TTTTACTGCTTATTGCTGTTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTAGTCTAGAATC
TTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGCTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA
AGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAA
AAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCA
CAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTG
GAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGG
GAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGG
GCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCCAAC
CCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGCGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGCGGATGATGATGAG
CGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGC
TCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAG
CGGTGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT
TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG
ATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGTAAAAATCAATCTAAAGTATATAGAGTAAACTTGGTCT
GACGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCCATAGTTGCCT
GACTCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCAAGTGTGCAATGATACCCG
CGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG
TGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCA
GTTAATAGTTTGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTT
CATTACGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCT
CCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGC
ATAATCTCTTACTGCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA
GAATAGTGTATCGGCGACCGAGTTGCTCTTCCCGGCTCAATAACGGGATAATAACCGGCACATACGAG
AACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGA
TCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGT
GAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAAAAGGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACT
TCTTCTTTTTCAATATTTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTT
AGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCGTC

7.3.4 pSAM200

AGCTAGCTTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT
GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA
TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCCCCCCTAACTC
CGCCAGTTCGGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCCT
CGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCTC
GAGGAACTGGAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAGGTCCCGGATCGAA
TTGCGGCCGCAATTCATATGTCTAGATTAGATAAAAAGTAAAGTGATTAACAGCGCATTAGAGCTGCTTAATG
AGGTCCGGAATCGAAGGTTTAAACAACCCGTAACCTCGCCAGAAAGCTAGGTGTAGAGCAGCCTACATTGTATT
GGCATGTAAAAAATAAGCGGGCTTTGCTCGACGCCTTAGCCATTGAGATGTTAGATAGGCACCATACTCACTT
TTGCCCTTTAGAAGGGGAAAGCTGGCAAGATTTTTTACGTAATAACGCTAAAAGTTTTAGATGTGCTTTACTAA
GTCATCGCGATGGAGCAAAAGTACATTTAGGTACACGGCCTACAGAAAAACAGTATGAAACTCTCGAAAATCA
ATTAGCCTTTTTATGCCAACAAGGTTTTTCACTAGAGAATGCATTATATGCACTCAGCGCTGTGGGGCATTTTA
CTTTAGGTTGCGTATTGGAAGATCAAGAGCATCAAGTCGCTAAAGAAGAAAGGGAAACACCTACTACTGATA
GTATGCCGCATTATTACGACAAGCTATCGAATTTTTGATCACCAGGTGCAGAGCCAGCCTTCTTATTCGG
CCTTGAATTTGATCATATGCGGATTAGAAAAACAACCTAAATGTAAGTGGGTCCGCTCAGCCGCGCGCG
TACGAAAAACAATTACGGGTCTACCATCGAGGGCCTGCTCGATCTCCCGGACGACGACGCCCCCGAAGAGG
CGGGGCTGGCGGCTCCGCGCCTGTCTTTCTCCCGCGGGACACACGCGCAGACTGTCGACGGCCCCCCC
GACCGATGTCAGCCTGGGGGACGAGCTCCACTTAGACGGCGAGGACGTGGCGATGGCGCATGCCGACGCG
CTAGACGATTTTCGATCTGGACATGTTGGGGGACGGGGATTCCCGGGTCCGGGATTTACCCCCACGACTC
CGCCCCCTACGGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAGCAGATGTTTACCGATGCCCTTGAATTGA
CGAGTACGGTGGGTAGGGGGCGGAGGATCTAGAGTCGACCTGCAGCCCAAGCTTCGATCCAGACAT
GATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTT
GTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAAACAAGTTAAACAACAACAATTGCATTCATTTA
TGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTG
ATTATGATCCTGCCTCGCGCTTTCCGGTATGACGGTAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGT
CACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGG
TGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGATACTGGCTTAACTATGCGGCATCA
GAGCAGATTGTAAGAGTGCACCATATGTCGGGCCGCTTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC
CTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAG
GCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGC
CTTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGT
TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATC
GTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGT
ATTTGGTACTGCGCTGCTGTAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACA
AACCACCGTGGTAGCGGTTTTTTTTGTTTCAAGCAGCAGATTACGCGCAAAAAAAGGATCTCAAGA
AGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATG
AGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAT
GAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGCTT
CATCCATAGTTGCCGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTG
CTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGG
GCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTTCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGA
GTAAGTAGTTCCGCAAGTAAAGTGCAGCAAGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGCAGCTCGCTGCT
TTTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGGTTCCCAAGATCAAGGCGAGTTACATGATGCCCCCATGTTGCAA
AAAAGCGGTTAGCTCCTTCCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGT
TATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCA
ACCAAGTCATTCTGAGAAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAACACGGGATAATACC
GCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATC
TTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTCA
CCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAA
TGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAC
ATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACG
TCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTGCTTTCAAGAA
TTGGTGCATCGACCAATTCTCATGTTTACAGCTTATCATCGATA

7.3.5 pKM-BDNF

CCCTCGATCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGT
GATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACT
TCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTC

GAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAA
AAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCA
GTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACC
ACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAG
TCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAAGTCGAGCTCGGTACGCTATGGCATGCATGTG
TCGCGACCTGCAGGCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGA
CCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCGCCCGTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCAAG
TCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCTCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACGCCATCAGCGACAACGTCTATATCACCGCCGACAA
GCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAATTCAAGAGCTAGCCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCA
GATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCG
GCCCGGTACCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACTAGTATGACCATCCTTTTTCT
TACTATGGTTATTTCTACTTTGGTTGCATGAAGGCTGCCCCCATGAAAGAAGCAAACATCCGAGGACAAGGT
GGCTTGGCCTACCCAGGTGTGCGGACCCATGGGACTCTGGAGAGCGTGAATGGGCCAAGGCAGGTTCAA
GAGGCTTGACATCATTGGCTGACACTTTTGAACACGTGATAGAAGAGCTGTTGGATGAGGACCAGAAAGTTC
GGCCAATGAAGAAAACAATAAGGACGCAGACTTGTACACGTCCAGGGTGTGCTCAGTAGTCAAGTGCCTT
TGGAGCCTCCTCTTCTTTCTGCTGGAGGAATACAAAATTACCTAGATGCTGCAAACATGTCCATGAGGGT
CCGGCGCCACTCTGACCCTGCCCGCCGAGGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGTGAGTGGGTAACG
CGCGCAGACAAAAGACTGCAGTGGACATGTCGGGCGGACGGTCACAGTCTTGAAGAGGTCCTGTATC
AAAAGGCCAATCAAGCAATACTTACGAGACCAAGTGAATCCCATGGTTACACAAAAGAAGGCTGCAG
GGCATAGACAAAAGGCATTGGAACCTCCAGTCCGGAACCTACCCAGTCTGACGTGCGGGCCCTTACCATGG
ATAGCAAAAAGAGAATTGGCTGGCGATTACATAAGGATAGACACTTCTTGTGTATGTACATTGACCATTA
GGGAAGATAGGCGGCCGCAAAGCTAGCTTCGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACC
ACAATAAGATGCAGTGAAGAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATA
AGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTATTTTATGTTTCAGGTTCCAGGGGAGGTGTGGGAGG
TTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCTGCCTCGCGCTTTCCGGTGT
GACGGTGAAGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAG
CAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGT
AGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGT
CGGGCCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAG
TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCT
CTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCCGGAAGCGTGGCGCTTTCTC
ATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
CCGTTCCAGCCGACCGCTGCCTTATCCGGTAACTACTCGTCTTGTGATCCAACCCGTAAGACACGACTTAT
CGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTT
AAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC
TTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGTATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC
AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT
CAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTGCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTT
TAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGAT
AACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGG
CTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAACTTTATCC
GCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTGCGCAACGTT
GTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAA
CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCCGGTCTCCGATCGTT
GTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACC
GAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA ACTTTAAAAGTGTCTATCAT
TGAAAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCAC
TCGTGCACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAA
AATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATATTATT
GAAGCATTTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAATAGGG
GTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCGTGACGATAT

7.3.6 pKM-EGFP

CCCTCGATCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCC
CTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGA
AAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATC
AGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTC
GAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGA
TAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTT
TACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGA
GAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACC
ACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGCTCGGTACGCTATGGCATGCATGTGTGCG
GACCTGCAGGCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTC
GTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAC
GACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACG
ACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCG
AGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACG
CCATCAGCGACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAA
GAGCTAGCCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCA
CGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCCGGTACCGAAT
TCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCCGACCATGGTGAGCAAGGGCGA
GGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAA
GTTACAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCAT
CTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGT
GCAGTGCTTCAAGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG
AGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCAT
GGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC
AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCTG
CCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATC
ACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAA
GTAAAGCGGCCGCAAAGCTAGCTTCGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAA
CCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGT
AACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTT
GGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGA
TCCTGCCTCGCGGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGG
TCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTG
TTGGCGGGTGTGCGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCT
TAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGTCGGGCCGCGTGTGCTGGC
GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGG
CGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTC
CTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCT
TTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTG
TGCACGAACCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAA
CCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG
TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCCTAACACTACGCTACACTAGAAGGACAGT
ATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCG
GCAAACAACACCAGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAATC
ACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA
TGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCA
GTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCGCTCGTG
TAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACC
CACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG
TGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTA
GTTTCGCCAGTTAATAGTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTC
GTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGT
TGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCCGAGTG

TTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTT
TCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTC
TTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACCTTTAAAAGTGCTCATCATTG
GAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCCTCGTGCACCCAACCTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAA
ACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACT
CTTCTTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA
TGTATTTAGAAAATAAAATAAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGT
CGTCGACGATAT

7.3.7 EGFP

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTAC
ATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATA
ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTA
CGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT
GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATG
GGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAG
TTTTTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCA
AATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAAG
ATCCGCTAGCGTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCAAGTTCGAGTTCGAGTCCGAGTACC
CGGGCCCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGG
TGGTGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCG
AGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC
TGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTTCAGCCGCTA
CCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAG
CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGC
GACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG
GGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGA
ACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGA
CCTACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCT
GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGA
GTTCTGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGCGA
CTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACAC
CTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGAGCTTATA
ATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTACTGCATTCTAG
TTGTGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTAAATTTTTGTTAAA
ATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCT
TATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTTGGAACAAGAGTCCACTA
TTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTAC
GTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCT
AAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGCGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGG
AAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAAGTGTAGCGGTACAGCTGCGCGTAACC
ACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAAT
GTGCGCGAAACCCCTATTTGTTTTTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT
AACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGT
GGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAG
CATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGT
ATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCC
CCTAACTCCGCCAGTTCGCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTATGCAGA
GGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTA
GGCTTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGAT
TGCACGCAGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGAC
AATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTG
AAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTG
GCCACGACGGGCGTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTACTGAAGCGGGAAGGGACTGG

CTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAG
TATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGA
CCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAG
GATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTCGCCAGGCTCAAGGCG
AGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGG
TGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCA
GGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTC
CTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGA
GTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAC
GAGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCC
GGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGG
CTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGAC
AGAATAAAACGCACGGTGTGGTCTTTGTTTTCATAAACCGCGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCA
CTCTGTGATACCCACCGAGACCCATTGGGGCCAATACGCCCGCTTTCTTCTTTTCCCCAC
CCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTTCGGGGCGGCAGGCCCT
GCCATAGCCTCAGGTTACTCATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGAT
CTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTG
AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTG
CTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGC CGGATCAAGAGCTACCAA
CTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGCTCTTAGTGTAG
CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCT
GTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAG
TTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTGGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAG
CGAACGACCTACCCGAACCTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCG
AAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGG
GAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGA
GCGTGCATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC
CTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGA
TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT

7.3.8 BDNF

ACTAGTCACACACACACACACACAGAGAGAACATCTCTAGTAAAAAGAAAAGTTGAGCTTTCTT
AGCTAGATGTGTGATTAGCCAGAAAAAGCCAAGGAGTGAAGGGTTTTAGAGAACTGGAGGAGAT
AAAGTGGAGTCTGCATATGGGAGGCATTTGAAATGGACTTAAATGTCTTTTTAATGCTGACTTTTT
CAGTTTTCTCCTTACCAGACACATTGTTTTCATGACATTAGCCCCAGGCATAGACACATCATTAAA
ATGAACATGTCAAAAAATGATTTCTGTTTAGAAATAAGCAAAACATTTTCAGTTGTGACCACCCAG
GTGTAGAATAAAGAACAGTGGAAATTGGGAGCCCTGAGTTCTAACATAAACTTTCTTCATGACATAA
GGCAAGTCTTCTATGGCCTTTGGTTTTCTTACCTGTAAAACAGGATGGCTCAATGAAATTATCTTT
CTTCTTTGCTATAATAGAGTATCTCTGTGGGAAGAGGAAAAAAAAGTCAATTTAAAGGCTCCTTA
TAGTTCCCAACTGCTGTTTTATTGTGCTATTCATGCCTAGACATCACATAGCTAGAAAGGCCCAT
CAGACCCCTCAGGCCACTGCTGTTCTGTACACATTCCTGCAAAGGACCATGTTGCTAACTTGA
AAAAAATTAATTAATTACACTTGCAGTTGTTGCTTAGTAACATTTATGATTTGTGTTTCTCGTGA
CAGCATGAGCAGAGATCATTAAAAATTAACCTTACAAAGCTGCTAAAGTGGGAAGAAGGAGA
TGAAGCCACAATTTTTGCACTTGTGTTAGAAAGCCATCTAATCTCAGGTTATATGCTAGATCTTGGG
GCAAACACTGCATGTCTCTGTTTTATATTAACCACATACAGCACACTACTGACACTGATTTGTGT
CTGGTGCAGCTGGAGTTTATCACCAGACATAAAAAACCTTGACCCTGCAGAATGGCCTGGAAT
TACAATCAGATGGGCCACATGGCATCCCGGTGAAAGAAAGCCCTAACCCAGTTTTCTGTCTTGTTT
CTGCTTTCTCCCTACAGTTCCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCATCCTTTTTCTTACTATGGTTA
TTTCATACTTTGGTTGCATGAAGGCTGCCCCCATGAAAGAAGCAAACATCCGAGGACAAGGTGGC
TTGGCCTACCCAGGTGTGCGGACCCATGGGACTCTGGAGAGCGTGAATGGGCCCAAGGCAGGT
TCAAGAGGCTTGACATCATTGGCTGACACTTTTGAACACGTGATAGAAGAGCTGTTGGATGAGGA
CCAGAAAGTTCGGCCCAATGAAGAAAACAATAAGGACGCAGACTTGTACACGTCCAGGGTGATG
CTCAGTAGTCAAGTGCCTTTGGAGCCTCCTTCTTCTTTCTGCTGGAGGAATACAAAAATTACCTA
GATGCTGCAAACATGTCCATGAGGGTCCGGCGCCACTCTGACCCTGCCCGCCGAGGGGAGCTG
AGCGTGTGTGACAGTATTAGTGAGTGGGTAACGGCGGCAGACAAAAAGACTGCAGTGGACATGT
CGGGCGGGACGGTACAGTCTTGAAGGTTCCCTGTATCAAAGGCCAACTGAAGCAATACTT

CTACGAGACCAAGTGCAATCCCATGGGTTACACAAAAGAAGGCTGCAGGGGCATAGACAAAAGG
CATTGGAACCTCCAGTGCCGAACCTACCCAGTCGTACGTGCGGGCCCTTACCATGGATAGCAAAA
AGAGAATTGGCTGGCGATTATAAGGATAGACACTTCTTGTGTATGTACATTGACCATTAAGGG
GAAGATAGTGGATTTATGTTGTATAGATTAGATTATATTGAGACAAAATTATCTATTTGTATATA
CATAACAGGGTAAATTATTCAGTTAAGAAAAAATAATTTTATGAACTGCATGTATAAATGAAGTTT
ATACAGTACAGTGGTTCTACAATCTATTTATTGGACATGTCCATGACCAGAAGGGAAACAGTCATT
TGCGCACAACTTAAAAAGTCTGCATTACATTCCTTGATAATGTTGTGGTTTGTGGCCGTTGCCAAG
AACTGAAAACATAAAAAGTTAAAAAATAATAAATTGCATGCTGCTTTAATTGTGAATTGATAATA
AACTGTCCTCTTTTCAGAAAACAGAAAAAACACACACACACACAAAAAATTTGAACCAAAACAT
TCCGTTTACATTTTAGACAGTAAGTATCTTCGTTCTTGTAGTACTATATCTGTTTTACTGCTTTTAA
CTTCTGATAGCGTTGGAATTAACAATGTCAAGGTGCTGTTGTCATTGCTTTACTGGCTTAGGGG
ATGGGGATGGGGGTATATTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTTTTTTTTCGTTTTGTTTTGTTTTTAG
TTCCACAGGGAGTAGAGATGGGAAAGAATTCCTACAATATATATTCTGGCTGATAAAAGATACA
TTTGTATGTTGTGAAGATGTTTGCAATATCGATCAGATGACTAGAAAGTGAATAAAAATTAAGGCA
ACTGAACAAAAAATGCTCACACTCCACATCCCGTGATGCACCTCCCAGGCCCGCTCATTCTTT
GGCGTGTGGTCAGAGTAAGCTGCTTTTGACGGAAGGACCTATGTTTGCTCAGAACACATTCTTTC
CCCCCTCCCCCTCTGGTCTCCTCTTTGTTTTGTTTTAAGGAAGAAAAATCAGTTGCGGTTCTGA
AATATTTTACCCTGCTGTGAACAAGTGAACACATTGTGTCACATCATGACTCGTATAAGCATG
GAGAACAGTGATTTTTTTTTAGAACAGAAAACAACAAAAATAACCCCAAATGAAGATTATTTTT
ATGAGGAGTGAACATTTGGGTAAATCATGGCTAAGCTTAAAAAAACTCATGGTGAGGCTTAACAA
TGTCTTGAAGCAAAAGGTAGAGCCCTGTATCAACCCAGAAACACCTAGATCAGAACAGGAATCC
ACATTGCCAGTGACATGAGACTGAACAGCCAAATGGAGGCTATGTGGAGTTGGCATTGCATTTAC
CGGCAGTGCGGGAGGAATTTCTGAGTGGCCATCCCAAGGTCTAGGTGGAGGTGGGGCATGGTA
TTTGAGACATTCCAAAACGAAGGCCTCTGAAGGACCCTTCAGAGGTGGCTCTGGAATGACATGTG
TCAAGCTGCTTGGACCTCGTGCTTTAAGTGCCTACATTATCTAACTGTGCTCAAGAGTTCTCGAC
TGGAGGACCACACTCAAGCCGACTTATGCCACCATCCACCTCTGGATAATTTTGCATAAAATT
GGATTAGCCTGGAGCAGGTTGGGAGCCAAATGTGGCATTGTGATCATGAGATTGATGCAATGA
GATAGAAGATGTTTGCTACCTGAACACTTATTGCTTTGAACTAGACTTGAGGAAACCAGGGTTTA
TCTTTTGAGAACTTTTGGTAAGGGAAAAGGGAACAGGAAAAGAAACCCCAAATCAGGCCGAATG
ATCAAGGGGACCCATAGGAAATCTTGTCCAGAGACAAGACTTCGGGAAGGTGTCTGGACATTCA
GAACACCAAGACTTGAAGGTGCCTTGCTCAATGGAAGAGGCCAGGACAGAGCTGACAAAATTT
GCTCCCCAGTGAAGGCCACAGCAACCTTCTGCCATCCTGTCTGTTTATGGAGAGGGTCCCTGC
CTCACCTCTGCCATTTTGGGTTAGGAGAAGTCAAGTTGGGAGCCTGAAATAGTGGTTCTTGAAA
AATGGATCCCCAGTGAAAACTAGAGCTCTAAGCCATTGAGCCATTTACACCTGAAAATGTTA
GTGATCACCACTGGACCAGCATCCTTAAGTATCAGAAAGCCCAAGCAATTGCTGCATCTTAGT
AGGGTGAGGGATAAGCAAAAGAGGATGTTTACCATAACCCAGGAATGAAGATACCATCAGCAA
GAATTTCAATTTGTTTCACTTTTATTTAGAGCTAGTCTTTCACAGTACCATCTGAATACCTTTTG
AAAGAAGGAAGACTTTACGTAGTGTAGATTTGTTTTGTGTTGTTTGAATAATTATCTTTGTAATTA
TTTTAATATGTAAGGAATGCTTGGAAATCTGCTATATGTCAACTTTATGCAGCTTCTTTTGAGG
GACAAATTTAAAACAACAACCCCCCATCACAACCTTAAAGGATTGCAAGGGCCAGATCTGTTAAG
TGGTTTCATAGGAGACACATCCAGCAATTGTGTGGTCAGTGGCTCTTTTACCCAATAAGATACATC
ACAGTCACATGCTTGATGGTTTATGTTGACCTAAGATTTATTTTGTAAAATCTCTCTCTGTTGTG
TCGTTCTTGTCTGTTTTGTTTTGTTTTTAAAGTCTTGCTGTGGTCTCTTTGTGGCAGAAGTGT
CATGCATGGCAGCAGGCCTGTTGCTTTTTTATGGCGATTCCCATTGAAAATGTAAGTAAATGTCTG
TGGCCTTGTCTCTCTATGGTAAAGATATTATCCCATGTAAAACAAAAACAATATTTATTGTATT
TTAGTATATTTATATAATTATGTTATTGAAAAAATTGGCATTAAACTTAACCGCATCAGAACCTAT
TGTAATACAAGTTCTATTTAAGTGTACTAATTAACATATAATATATGTTTTAAATATAGAATTTTAA
TGTTTTTAAATATATTTTCAAAGTACATAAAAGCGGCCGC

7.3.9 CRY2

AGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACA
TAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAA
TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTA
CGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTT
GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATG

GGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAG
TTTTTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCA
AATGGGCGGTAGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCA
ATCCGCTAGCGCTACCGGTGCGCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCAT
CAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATC
GAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAA
GGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCC
TACGTGAAGCACCCGCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGT
GGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGC
AGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCG
TAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCG
CCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGG
TCAAGACCCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAA
GTTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGC
CGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGTGGCGGCTAGTACTCCGGTATTGCG
GTACCCTGTACGCTGTTTTATACTCCCTTCCCGTAACTTAGACGCACAAAACCAAGTTCAATAG
AAGGGGTACAAACCAGTACCACCACGAACAAGCACTTCTGTTTCCCGGTGATGTGCTATAGAC
TGCTTGCGTGGTTGAAAGCGACGGATCCGTTATCCGCTTATGTACTTCGAGAAGCCCAGTACCAC
CTCGGAATCTTCGATGCGTTGCGCTCAGCACTCAACCCAGAGTGTAGCTTAGGCTGATGAGTCT
GGACATCCCTCACCGGTGACGGTGGTCCAGGCTGCGTTGGCGGCCTACCTATGGCTAACGCCAT
GGGACGCTAGTTGTGAACAAGGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTACATAAGAATCCTCCGGCCCCCT
GAATGCGGCTAATCCCAACCTCGGAGCAGGTGGTCACAAACCAGTGATTGGCCTGTCGTAACGC
GCAAGTCCGTGGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCTTTTATTTTATTGTGGCTGCTT
ATGGTGACAATCACAGATTGTTATCATAAAGCGAATTGGATAGGATCAAGCTTATCGATACCGTCCG
ACCTCGAGCTCGCCACCATGAAGATGGACAAAAGACTATAGTTTGGTTTAGAAGAGACCTAAGG
ATTGAGGATAATCCTGCATTAGCAGCAGCTGCTCACGAAGGATCTGTTTTTCTGTCTTCATTTGG
TGCTCCTGAAGAAGAAGGACAGTTTTATCCTGGAAGAGCTTCAAGATGGTGGATGAAACAATCACT
TGCTCACTTATCTCAATCCTTGAAGGCTCTTGGATCTGACCTCACTTAACTCAAAACCCACAACAC
GATTTACAGCGATCTTGGATTGTATCCGCGTTACCGGTGCTACAAAAGTCGTCTTTAACCACCTCTA
TGATCCTGTTTCGTTAGTTCGGGACCATAACCGTAAAGGAGAAGCTGGTGGAACGTGGGATCTCTG
TGCAAAGCTACAATGGAGATCTATTGTATGAACCGTGGGAGATATACTGCGAAAAGGGCAAACCT
TTTACGAGTTTTCAATTTACTGGAAGAAATGCTTAGATATGTCGATTGAATCCGTTATGCTTCTC
CTCCTTGGCGGTTGATGCCAATAACTGCAGCGGCTGAAGCGATTTGGGCGTGTTCGATTGAAGA
ACTAGGGCTGGAGAATGAGGCCGAGAAACCGAGCAATCGCGTTGTTAACTAGAGCTTGGTCTCCA
GGATGGCAATGCTGATAAGTTACTAAATGAGTTCATCGAGAAGCAGTTGATAGATTATGCAAA
GAACAGCAAGAAAGTTGTTGGGAATTTCTACTTTCTCCTTCTCCGATCTCCATTTCCGGGAAAT
AAGCGTCAGACACGTTTTCCAGTGTGCCCGGATGAAACAAATTATATGGGCAAGAGATAAGAACA
GTGAAGGAGAAGAAAGTGCAGATCTTTTTCTTAGGGGAATCGGTTTAAAGAGAGTATTCTCGGTAT
ATATGTTTCAACTTCCCGTTTACTCACGAGCAATCGTTGTTGAGTCATCTTCGGTTTTTCCCTTGG
GATGCTGATGTTGATAAGTTCAAGGCCTGGAGACAAGGCAGGACCGGTTATCCGTTGGTGGATG
CCGGAATGAGAGAGCTTTGGGCTACCGGATGGATGCATAACAGAATAAGAGTGATTGTTTCAAGC
TTTGCTGTGAAGTTTCTTCTCCTTCCATGGAATGGGGAATGAAGTATTTCTGGGATACACTTTTG
GATGCTGATTTGGAATGTGACATCCTTGGCTGGCAGTATATCTCTGGGAGTATCCCCGATGGCCA
CGAGCTTGATCGCTTGGACAATCCCGCGTTACAAGGCGCCAAATATGACCCAGAAGGTGAGTAC
ATAAGGCAATGGCTTCCCGAGCTTGCAGATTGCCAACTGAATGGATCCATCATCCATGGGACG
CTCCTTTAACCGTACTCAAAGCTTCTGGTGTGGAACCTCGGAACAACTATGCGAAACCCATTGTA
GACATCGACACAGCTCGTGAGCTACTAGCTAAAGCTATTTCAAGAACCCGTGAAGCACAGATCAT
GATCGGAGCAGCACCTGATGAGATTGTAGCAGATAGCTTCGAGGCCTTAGGGGCTAATACCATTA
AAGAACCTGGTCTTTGCCATCTGTGTCTTCTAATGACCAACAAGTACCTTCGGCTGTTTCGTTACA
ACGGGTCAAAGAGAGTGAAACCTGAGGAAGAAGAAGAGAGACATGAAGAAATCTAGGGGATT
CGATGAAAGGGAGTTGTTTTGACTGCTGAATCTTCTTCTTTCGAGTGTGTTTTTCGTTTCGCA
GTCTTGCTCGTTGGCATCAGAAGGGGAAGAATCTGGAAGGTATTCAAGATTCATCTGATCAGATTA
CTACAAGTTTGGGAAAAAATGGTTGCAAAGGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGGTCCGGAG
GAGGCGGCCGCATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAACAAGCATGCGATATTTGCCGACTTAAAAAG
CTCAAGTGCTCCAAGAAAAACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTGAAGAACAACCTGGGAGTGTGCGT
ACTCTCCAAAACCAAAGGTCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACAGAAGTGGAAATCAAGGCTA
GAAAGACTGGAATCTAGGGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATAACACAT
TGTAGAGGTTTTACTTGTCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAA
TGCAATTGTTGTTAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACA
AATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGCCAACTCATCAATGTAT

CTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAATTTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCT
CATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAATAGACCGAGATAG
GGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAA
GGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTT
GGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGA
CGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAG
GGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCC
GCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTT
TCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTG
AAAAAGGAAGAGTCTTGAGGCGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAA
AGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGGAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAG
GTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGGAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCA
GCAACCATAGTCCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCCGCCATT
CTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAG
CTATTCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGA
CAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTG
GGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTG
TTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGA
ATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAG
CTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGC
AGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGG
CGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGC
GAGCACGTA CTGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGG
GCTCGCGCCAGCCGAACGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGT
CGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCA
TCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATAT
TGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGCTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCC
GATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTC
GAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCT
ATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGG
ATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAAT
ACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTGCG
TTTGTTCATAAACGCGGGGTTCCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCCGAGACCCC
ATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTTCTTCTTTTCCCCACCCACCCCCCAAGTTCGGGTGAAG
CCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCCGGGCGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATA
CTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCT
CATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCA
AAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGC
TACCAGCGGTGGTTTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTC
AGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA
CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG
ATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGG
CTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCAGGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCG
GTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTAT
CTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGG
GGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGG
CCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATG
CATT

7.3.10 CIB

TTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAA
CTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGA
CGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGG
TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAAT
GACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCA

GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGC
GTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTG
TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAT
GGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC
CGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCGCCACCATGAATGGAGCTATAGGAGGTGACCT
TTTGCTCAATTTTCTGACATGTCGGTCTAGAGCGCCAAAGGGCTCACCTCAAGTACCTCAATC
CCACCTTTGATTCTCCTCTCGCCGGCTTCTTTGCCGATTCTTCAATGATTACCGGCGGCGAGATG
GACAGCTATCTTTGACTGCCGTTTTGAATCTTCCGATGATGTACGGTGAGACGACGGTGGAAAG
GTGATTCAAGACTCTCAATTTCCCGGAAACGACGCTTGGGACTGGAATTTCAAGAAACGGAAG
TTTGATACAGAGACTAAGGATTGTAATGAGAAGAAGAAGAAGATGACGATGAACAGAGATGACCT
AGTAGAAGAAGGAGAAGAAGAAGTCAAAAATAACAGAGCAAAAACAATGGGAGCACAAAAGC
ATCAAGAAGATGAAACACAAAGCCAAGAAAAGAAGACAACAATTTCTCTAATGATTCATCTAAAGTG
ACGAAGGAATTGGAGAAAACGGATTATATTGTTCTGTCACGACGAGGCCAAGCCACTGATAG
TCACAGCATAGCAGAACGAGTTAGAAGAGAAAAGATCAGTGAGAGAATGAAGTTTTCTACAAGATT
TGGTTCCTGGATGCGACAAGATCACAGGCAAAGCAGGGATGCTTGATGAAATCATTAACATATGTT
CAGTCTCTTCAGAGACAAATCGAGTTCTTATCGATGAAACTAGCAATTGTGAATCCAAGGCCGA
TTTTGATATGGATGACATTTTTGCCAAAGAGGTTGCCTCAACTCCAATGACTGTGGTGCCATCTCC
TGAAATGGTTCTTTCCGTTATTCTCATGAGATGGTTCACTCTGGTTATTCTAGTGAGATGGTTAA
CTCCGTTACCTTCATGTCAATCCAATGCAGCAAGTGAATACCAGTTCTGATCCATTGTCATGCTT
CAACAATGGCGAAGCTCCTTCGATGTGGGACTCTCATGTGCGAATCTCTATGGCAATTTAGGAG
TTGGTGGCGGTGGCTCTGGAGGTGGTGGGTCCGGACCGAAAAAGAAACGCAAAGTTGGGCGCG
CCGACGCGCTGGACGATTTGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCCTCGATGACTTTGACCT
GGATATGTTGGGAAGCGACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACATGCTCGGCTCCGATGCTCTG
GACGATTTGATCTCGATATGTTAATTAAGTATGTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCAT
AATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAA
CCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAA
TAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGT
CCAAACTCATCAATGTATCTTAAGGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAATTCGCGTTAA
ATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAAATCCCTTATAAATCAAA
AGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGACAAGAGTCCACTATTAAGAACG
TGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATC
ACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCC
CCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGA
AAGGACGGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGTACGCTGCGCGTAACACCACACCCG
CCGCGTTAATCGCCGCTACAGGGCGCGCTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAA
CCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATA
AATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTG
TCAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTC
AATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCA
TGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCG
CCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGC
CGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTTGCA
AAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAG
GTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTG
CTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGAC
CTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACG
GGCCTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGG
GCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCAT
GGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCG
AAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA CTGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGG
ACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCG
ACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGG
CCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCG
TTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTT
ACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA
GCGGGACTCTGGGTTTCAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCA
TTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCCGAATCGTTTTCCGGGACCGCGCTGGATG
ATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGAGGTTCTTCCGCCACCCTAGGGGAGGCTAACTGAA
CACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAC
GCACGGTGTGGGTGCTTTGTTTATAAACGCGGGGTTCCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGAT

ACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTTCTTCCTTTTCCCCACCCACCCCC
CAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCT
CAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAG
ATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGAC
CCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAA
ACAAAAAACCCACCGCTACCAGCGGTGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCC
GAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAG
GCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTG
GCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA
AGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCT
ACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAA
GGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG
GGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCCGATT
TTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGT
TCCTGGCCTTTTGTGTCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATA
ACCGTATTACCGCCATGCATTAG

7.3.11 Gal4UAS-Luc

CCCGGGAGGTACCGAGCTCTTACGCGTGCTAGCTCGAGATCTCCGAGCTCTTACGCGGGTTCGAA
GCGGAGTACTGTCTCCGAGTGGAGTACTGTCTCCGAGCGGAGTACTGTCTCCGAGTCGAGG
GTCGAAGCGGAGTACTGTCTCCGAGTGGAGTACTGTCTCCGAGCGGAGTACTGTCTCCGAG
TCGACTCTAGAGGTATATAATGGATCTCGAGATATCGGAGCTCGTTTGTGAAACCGTCAGATCG
CCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCG
CGGCCGGAACGGTGCATTGGAACGCGCATTCCCCGTGTTAATTAACAGGTAAGTGTCTTCCTC
CTGTTTCCCTCCCTGCTATTCTGCTCAACCTTCCATCAGAACTGCAGTATCTGATTTTTGCTA
GCAGTAATACTAACGGTTCTTTTTTCTCTTACAGGCCACAGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCG
GTACTGTTGGTAAAATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCGGCGCCATTCTATCCTCTA
GAGGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAA
CAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGAACATCACGTACGCGGAATACTTCAAATGTCC
GTTTCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAG
TGAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCC
CGCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGAACATTTTCGAGCCTACCGTAGT
GTTTTTTCCAAAAAGGGTTCGAAAAATTTTGAACGTGCAAAAAAATTACCAATAATCCAGAA
AATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTTCAAGTCGATGTACACGTTTCGTACATC
TCATCTACCTCCCGTTTTAATGAATACGATTTTGTACCAGAGTCCTTTGATCGTGACAAAACAATT
GCACTGATAATGAATCCTCTGGATCTACTGGGTTACCTAAGGGTGTGGCCCTTCCGCATAGAAC
TGCTGCGTCAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGACTGCG
GATTTTAAAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGT
GGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGATCCCTTCCAGGATTAC
AAAATTCAAAGTGCCTGCTAGTACCAACCCTATTTTCACTTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGAC
AAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGGGGCGCACCTCTTTCGAAAGAAGTCCGG
GAAGCGGTTGCAAAACGCTTCCATCTTCCAGGGATACGACAAGGATATGGGCTCACTGAGACTA
CATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCCGGTAAAGTTGTTCC
ATTTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCAGGAAACGCTGGGCGTTAATCAGAGAGGC
GAATTATGTGTCAGAGGACCTATGATTATGTCCGTTATGTAACAATCCGGAAGCGACCAACGC
CTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACT
TCTTCATAGTTGACCGCTTGAAGTCTTTAATTAATAACAAGGATATCAGGTGGCCCCCGCTGAAT
TGGAATCGATATTGTTACAACACCCCAACATCTTCGACGCGGGCGTGCCAGGTCTTCCCGACGAT
GACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCGTGTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAG
AGATCGTGGATTACGTGGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTT
TGTGGACGAAGTACCGAAAGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCA
TAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGTAATGTAAGTGTATTTCAGCGATGACGAAATT
CTTAGCTATTGTAATACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGG
TGCCCTTAAACGCCTGGTGTACGCTGAATAAGTGAATAAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCCG
CCGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAAACTACCTACAGAGAT
TTAAAGCTCTAAGGTAATAATAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTTAACTACTGATTCTAATTGTTT

GTGTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTGAATGGGAGCAGTGGTGAATGCCTTTAATGAG
GAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACAT
TCTACTCCTCCAAAAAGAAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAG
TTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGAA
AAAGCTGCACTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATATTCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACA
GTTATAATCATAACATACTGTTTTTCTTACTCCACACAGGCATAGAGTGCTGCTATTAATAACTA
TGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGCTTTTTAATTTGTAAAGGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTAT
AGTGCCTTGACTAGAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAA
CCTCCCACACCTCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATT
GCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCAC
TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGTCGACCGA
TGCCCTTGAGAGCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGC
CGCACTTATGACTGTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTTCCGCT
TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA
AGGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGG
CCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC
CCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
GATACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTAC
CGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGT
ATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCC
CGACCCTGCGCCTTATCCGTAAGTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGC
CACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTT
CTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
AGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCCACCGCTGGTAGC
GGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGA
GATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGT
ATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATC
TGCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
CTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT
CAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTC
CATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAA
CGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTAGCT
CCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCCGGTTAGCTCC
TTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGCGCAGC
ACTGCATAATTTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAAC
CAAGTCAATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGCTCAATACGGGAT
AATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCCGGGGCGAAA
ACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGAT
CTTACGATCTTTTACTTTACACGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCA
AAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGA
AGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA
TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAG
CGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCG
TCCTTTGCTTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCG
GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGCTTATTAGG
GTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCC
ACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCT
TTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT
TTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACT
GTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTTTCGCTATTACGCCAGCCCAAGCTACCATGATAAGT
AAGTAATATTAAGGTACGTGGAGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCTGAACC
TGAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATA
AAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC
AAACTCATCAATGTATCTTATGGTACTGTAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT

7.3.12 Gal4UAS-EGFP

AGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGG
ACGGCGACGTA AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACG
GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGT
GACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGAC
TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG
GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGC
TGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAA
CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCC
GCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCG
GCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAG
ACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATCACTCT
CGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAATCGATATTGTTACAACACCCCAACATCTTCGACGCGGGC
GTGGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCGTTGTTGTTTTGGAGCACG
GAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTGGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAA
GTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCA
AGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGTA AAAATGTAAC
TGTATTCAGCGATGACGAAATCTTAGCTATTGTAATACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTA
ATTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTGCTACGCCTGAATAAGTGATAATAAG
CGGATGAATGGCAGAAATTCGCCGGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGACATAAT
TGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGT
TAAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGATTTTTAGATTTCCAACCTATGGAACCTGATGAATGGGAGCA
GTGGTGAATGCCTTAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAATGCCATCTAGTGATGATG
AGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAG
GACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTTAGTAATAGA ACTCTTGCTTGCT
TTGCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATACAAGAAAATTATGAAAAAATATTCTG
TAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTTCTTACTCCACACAGGCA
TAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTTAGCTTTTTAATTTGTA AAGGG
GTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGATCATAATCAGCCATAACCACATTTGTA
GAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCA
ATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCACAAATT
TCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA
TCATGTCTGGATCCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGG
GCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACA
GGTGCCGGCAGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCCGGCTGC
GGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGC
AGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTG
GCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTC
TCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCG
CTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTG
TGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCC
AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGAC
AGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT
CCGGCAAACAACACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAG
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAA
ACTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA
AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTA
ATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGT
GTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAG
ACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAG
AAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAA
GTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACCGC
TCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC
CATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCCGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCG
CAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGAT

GCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGT
TGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCAT
CATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGA
TGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAG
CAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT
CATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATA
TTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT
GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCT
ACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCG
CGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGTCTTACGGC
ACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGTGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGAC
GGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAAC
AACACTCAACCCATCTCGGTCTATTTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTG
GTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTT
CCCATTGCGCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATT
ACGCCAGCCCAAGCTACCATGATAAGTAAGTAATATTAAGGTACGTGGAGGTTTTACTTGCTTTAA
AAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGT
TTATTGCAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTT
TTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATGGTACTGTAAGTACTGAGCTA
ACATAACCCGGGAGGTACCGAGCTCTTACGCGTGCTAGCTCGAGATCTCCGAGCTCTTACGCGG
GTCGAAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGTGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAG
TCGAGGGTCAAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGTGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCT
TCCGAGTCGACTCTAGAGGGTATATAATGGATCTCGAGATATCGGAGCTCGTTTAGTGAACCGTC
AGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAG
CCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGCATTCCCCGTGTTAATTAACAGGTAAGTGTCT
TTCTCCTGTTTCTTCCCTGCTATTCTGCTCAACCTTCTATCAGAACTGCAGTATCTGTATTT
TTGCTAGCAGTAATACTAACGGTTCTTTTTTCTTTCACAGGCCACAGATCTAAGTA

7.3.13 Gal4UAS-BDNF

AGCTTATGACCATCCTTTTCTTACTATGGTTATTTCACTTTGGTTGCATGAAGGCTGCCCCCA
TGAAAGAAGCAAACATCCGAGGACAAGGTGGCTTGGCCTACCCAGGTGTGCGGACCCATGGGA
CTCTGGAGAGCGTGAATGGGCCCAAGGCAGGTTCAAGAGGCTTGACATCATTGGCTGACACTTT
CGAACACGTGATAGAAGAGCTGTTGGATGAGGACCAGAAAGTTCGGCCCAATGAAGAAAACAAT
AAGGACGCAGACTTGTACACGTCCAGGGTGTGCTCAGTAGTCAAGTGCCTTTGGAGCCTCCTC
TTCTCTTTCTGCTGGAGGAATACAAAATTACCTAGATGCTGCAACATGTCCATGAGGGTCCGG
CGCCACTCTGACCCTGCCCGCCGAGGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGTGAAGTGGGTA
ACGGCGGCAGACAAAAGACTGCAGTGGACATGTCGGGCGGGACGGTCACAGTCTTGAAAAG
GTCCCTGTATCAAAGGCCAACTGAAGCAATACTTCTACGAGACCAAGTGAATCCCATGGGTTA
CACAAAAGAAGGCTGCAGGGGCATAGACAAAAGGCATTGGAACCTCCAGTGCCGAACCTACCCAG
TCGTACGTGCGGGCCCTTACCATGGATAGCAAAAAGAGAATTGGCTGGCGATTGTTACAACACCCCA
ACATCTTCGACGCGGGCGTGGCAGGTCTTCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCGG
TTGTTGTTTTGGAGCACGGAAGACGATGACGGAAGAGATCGTGGATTACGTGGCCAGTCAA
GTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAAGGTCTTA
CCGAAAAACTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTC
CAAATTGTAAAATGTAACCTGATTCAGCGATGACGAAATTCCTTAGCTATTGTAATACTGCGATGAG
TGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTAAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTGCTACGC
CTGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGCCGGATCTTTGTGAAGGAACCTTAC
TTCTGTGGTGTGACATAATTGGACAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAATATAAAA
TTTTAAGTGTATAATGTGTTAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGATTTTAGATTCCAACCTATGG
AACTGATGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAAGAAA
TGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCAAAAAAGAAGAGAA
AGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATGCTGTGTTTAGTA
ATAGAACTCTTGCTTTGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATAACAAGAAA
TTATGAAAAATATTCTGTAACCTTTATAAGTAGGCATAACAGTTATAATCATAACATACTGTTTTTT
CTTACTCCACACAGGCATAGAGTGTCTGCTATTAATAACTATGCTCAAAAATTGTGTACCTTAGC

TTTTTAATTTGTAAAGGGGTTAATAAGGAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGATCATAATC
AGCCATAACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGTCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTG
AAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGTTACAAATAAA
GCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAA
ACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAG
TCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATC
ATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGC
TCGGTCGTTCCGGCTGCGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG
AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAA
AAAGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGA
CGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAA
GCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCT
TCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTGCGGTGAGGTGCTTC
GCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA
CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACA
GGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGG
CTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG
TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAG
CAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
TCAGTGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTA
GATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGAC
AGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTT
GCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTG
CAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGG
AAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCC
GGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC
ATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCC
AGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCA
GAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCA
TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTA
TGCGGGCAGCCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAC
TTTTAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTT
GAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCCAG
CGTTTCTGGTGAGCAAAAACAGGAAGCAAAATGCCGAAAAAAGGGAATAAGGGGACGACCGG
AAATGTTGAATACTACTACTCTTCTTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCAT
GAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAAGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG
AAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCG
CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTTCTTCCCTTCTTTT
TCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTT
AGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGTATGGTTCACGTAGTGGGCCATC
GCCCTGATAGACGGTTTTTCCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTT
CCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAGGGATTTTGGCGAT
TTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTA
ACGTTTACAATTTCCATTCCGATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG
CCTCTTCGCTATTACGCCAGCCCAAGCTACCATGATAAGTAAGTAATATTAAGGTACGTGGAGGT
TTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTT
GTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAA
ATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATGGTAC
TGTAAGTGAAGTAAACATAACCCGGGAGGTACCGAGCTTACCGGTGCTAGCTCGAGATCTCCG
AGCTCTTACGCGGGTCAAGCGGAGTACTGTCTCCGAGTGGAGTACTGTCTCCGAGCGGAGT
ACTGTCTCCGAGTCGAGGGTCAAGCGGAGTACTGTCTCCGAGTGGAGTACTGTCTCCGAG
CGGAGTACTGTCTCCGAGTCGACTCTAGAGGGTATATAATGGATCTCGAGATATCGGAGCTCGT
TTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCG
GGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGCATTCCCCGTGTTAATTA
CAGGTAAGTGTCTTCTCCTGTTTCTTCCCTGCTATTCTGCTCAACCTTCTATCAGAAACTGC
AGTATCTGTATTTTTGCTAGCAGTAATACTAACGGTCTTTTTTTTTCTTTCACAGGCCACAGATCTA
AGTA

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des optogenetischen CIs. Der pinkfarbene Pfeil stellt die Transfektion der hMSCs mit dem optogenetischen System dar, die bei der Implantation neben dem Implantat platziert wird. Der blaue Pfeil stellt den Lichtleiter dar, mit dem das CI versehen wird und durch den das optogenetische System aktiviert werden kann [8]. 3

Abbildung 2: Übersicht verschiedener optogenetischer Opsine, ihres Aufbaus und ihrer Funktionsweisen. Von links nach rechts: Bacteriorhodopsin, Halorhodopsin, Channelrhodopsin und Sensory Rhodopsin. [14]. 7

Abbildung 3: Funktionsprinzip des PhyB-Systems: Das optogenetische System besteht aus zwei Komponenten – einem Photosensor (grün: PhyB) und seinem Interaktionspartner (blau: PIF) –, die nach Lichtinduktion in Gegenwart eines Chromophors (PCB - nicht gezeigt) miteinander interagieren. 10

Abbildung 4: Funktionsprinzip des EL222-Systems (grün): Nach Bindung des Chromophors (FAD/FMN - nicht gezeigt) und Lichtinduktion entfaltet sich die J-Helix (blau) und der Transkriptionsfaktor (TF: gelb) wird nicht mehr sterisch gehindert, wodurch die Genexpression des Zielgens aktiviert wird. 11

Abbildung 5: Funktionsprinzip des CRY2-Systems: Das optogenetische System besteht aus zwei Komponenten – einem Photosensor (grün: CRY2) und seinem Interaktionspartner (blau: CIB) –, die nach Lichtinduktion in Gegenwart eines Chromophors (FAD/FMN - nicht gezeigt) miteinander interagieren..... 14

Abbildung 6: Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (grün) von eGFP [80]. Auf der x-Achse wurde die Wellenlänge in nm aufgetragen, während die y-Achse die relative Intensität darstellt. 18

Abbildung 7: Durch Röntgenkristallographie bestimmte Tertiärstruktur von GFP (links) und Sekundärstruktur von GFP (rechts) [82]. 18

Abbildung 8: Reaktionsmechanismus der autokatalytischen Bildung der GFP Chromophore [84]...... 19

Abbildung 9: Nachweisreaktion von SEAP mit Hilfe von pNPP [98]. 21

Abbildung 10: Reaktionsmechanismus der Biolumineszenz von *firefly* Luciferase [100]. 22

Abbildung 11: (a) Sekundärstruktur von *firefly* Luciferase mit eingefärbten Subdomänen. Die Kreise stellen die fortlaufend nummerierten α -Helices dar, während

die Pfeile die β -Faltblätter darstellen, die für jede Subdomäne fortlaufend nummeriert wurden, (b) Schematische Zeichnung der Lage der Subdomänen in der Sequenz [102].
 23

Abbildung 12: Durchlichtmikroskopische Aufnahme von 26

Abbildung 13: Durchlichtmikroskopische Aufnahme 27

Abbildung 14: Durchlichtmikroskopische Aufnahme von ADhMSCs Zellen in 4-facher Vergrößerung. 29

Abbildung 15: Prinzip der Elektroporation [146]..... 31

Abbildung 16: Prinzip der Magnetoporation [146]. 32

Abbildung 17: Prinzip der Sonoporation [146]. 33

Abbildung 18: Mechanismus der Transfektion mit kationischen Lipiden [174]. 35

Abbildung 19: Abbildung eines CI im Innenohr [195]. 37

Abbildung 20: Mittels Image J ausgewertete fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 4-fach Vergrößerung drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) von CHO-K1 Zellen mit 5,53 μ g pKM-022 (oben links), 2,77 μ g pKM-EGFP (oben rechts) und 5,53 μ g pKM-022 in Kombination mit 2,77 μ g pKM-EGFP (unten in der Mitte) in einer 6-Well-Platte ohne PCB Zugabe und Illumination. 52

Abbildung 21: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) mit 5,53 μ g pKM-022 und 2,77 μ g pKM-EGFP nach einstündiger Illumination mit verschiedenen Wellenlängen (660 nm (1,45 W/m²), 740 nm (14,5 W/m²) oder ohne Illumination) in einer 6-Well-Platte mit (15 μ M) und ohne PCB Zugabe; N=5. 53

Abbildung 22: Durchflusszytometermessungen des Markers eGFP von CHO-K1 Zellen nach PEI Transfektion zur Bestimmung der Transfektionseffizienzen verschiedener Proben des PhyB-Systems drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μ L, 1 mg/mL) mit verschiedenen Plasmidkombinationen (5,53 μ g pKM-022/pSAM200, EGFP und 2,77 μ g pKM-EGFP) nach einstündiger Illumination mit verschiedenen Wellenlängen (660 nm (1,45 W/m²), 740 nm (14,5 W/m²) oder ohne Illumination) in einer 6-well-Platte mit (15 μ M) und ohne PCB Zugabe; N=3. 54

Abbildung 23: qPCR Daten des PhyB-Systems (0,375 μ g pKM-022 und 0,75 μ g pKM-EGFP) in HEK293 Zellen nach Dreamfect™ Gold Transfektion (3 μ L) nach einstündiger Illumination mit 660 nm (1,45 W/m²) oder ohne Illumination in einer 24-well-Platte mit (15 μ M) PCB Zugabe, N=12. 56

Abbildung 24: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μL , 1 mg/mL) mit dem Testplasmid pSAM200 (5,53 μg) und pKM-EGFP (2,77 μg) nach einstündiger Illumination bei 660 nm mit unterschiedlichen Illuminationsintensitäten (0,7 W/m², 1,5 W/m² und 2,2 W/m²) in einer 6-well-Platte ohne PCB Zugabe; N=5. 57

Abbildung 25: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μL , 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (5,53 μg) und pKM-EGFP (2,77 μg) nach einstündiger Illumination bei 660 nm mit unterschiedlichen Illuminationsintensitäten (0,7 W/m², 1,5 W/m² und 2,2 W/m²) in einer 6-well-Platte nach 15 μM PCB-Zugabe; N=5. 58

Abbildung 26: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μL , 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (5,53 μg) und pKM-EGFP (2,77 μg) nach einstündiger Illumination bei 660 nm mit unterschiedlichen Illuminationsintensitäten (0,7 W/m², 1,5 W/m² und 2,2 W/m²) in einer 6-well-Platte ohne PCB-Zugabe; N=5. 59

Abbildung 27: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μL , 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (5,53 μg) und pKM-EGFP (2,77 μg) nach einstündiger Illumination bei 660 nm (1,45 W/m²) bei unterschiedlichen Arbeitsabständen zwischen Zellen und LEDs in einer 6-well-Platte nach PCB Zugabe (15 μM); N=5. 60

Abbildung 28: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μL , 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (5,53 μg) und pKM-EGFP (2,77 μg) nach einstündiger Illumination bei 660 nm (1,45 W/m²) bei unterschiedlichen Arbeitsabständen zwischen Zellen und LEDs in einer 6-well-Platte ohne PCB Zugabe; N=5. 61

Abbildung 29 Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μL , 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (5,53 μg) und pKM-EGFP (2,77 μg) nach einstündiger Illumination bei 660 nm (1,45 W/m²) nach Zugabe von verschiedenen PCB-Mengen (0 μL , 7,5 μL , 11,25 μL , 15 μL , 18,75 μL und 22,5 μL); N=5. 62

Abbildung 30: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (30 μL , 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 und pKM-EGFP nach einstündiger Illumination bei 660 nm (1,45 W/m²) mit

15 μM PCB-Zugabe bei verschiedenen Plasmidverhältnissen (1:1 mit jeweils 4,15 μg , 2:1 mit 5,53 μg pKM-022 und 2,77 μg pKM-EGFP, 1:2 mit 2,77 μg pKM-022 und 5,53 μg pKM-EGFP, 3:1 mit 8,31 μg pKM-022 und 2,77 μg pKM-EGFP); N=5. 63

Abbildung 31: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (6 μL , 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (1,1 μg) und pKM-EGFP (0,55 μg) nach 15- und 30-minütiger Laser-Illumination bei 660 nm (5474930 W/m²) mit einer Lasergeschwindigkeit von 10 mm/s nach 15 μM PCB-Zugabe in einer 24-well-Platte..... 65

Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in 4-facher Vergrößerung von CHO-K1 Zellen drei Tage nach PEI-Transfektion (6 μL , 1 mg/mL) mit dem optogenetischen Plasmid pKM-022 (1,1 μg) und pKM-EGFP (0,55 μg) nach 30-minütiger Laser-Illumination bei 660 nm (5474930 W/m²) mit einer Lasergeschwindigkeit von 10 mm/s nach 15 μM PCB-Zugabe in einer 24-well-Platte. 65

Abbildung 33: Mittels Durchflusszytometer gemessene Anteile an fluoreszierenden HEK293 Zellen nach DreamFect™ Gold Transfektion (15 μL) mit dem optogenetisch aktivierbaren PhyB-System pKM-022 (3,75 μg) und pKM-EGFP (7,5 μg) nach einstündiger Illumination mit 660 nm (1,45 W/m²) mit 15 μM PCB-Zugabe. 67

Abbildung 34: Verwendete Klonierungsstrategie zur Erstellung des Zielplasmids pKM-BDNF ausgehend vom Plasmidvektor pKM-078 und dem Insert BDNF..... 68

Abbildung 35: Mittels BDNF ELISA ermittelte BDNF Konzentrationen von CHO-K1 Zellen PEI-Transfektion (30 μL , 1 mg/mL) von unterschiedlichen Plasmidkombinationen des PhyB-Systems (3,46 μg pKM-022/pSAM200 und 1,73 μg pKM-BDNF) nach einstündiger Illumination mit 660 nm (1,45 W/m²) mit und ohne 15 μM PCB-Zugabe; N=4. 70

Abbildung 36: Mittels Image J berechnete Flächen an fluoreszierenden ADhMSCs (AD33J Passage 3) drei Tage nach eGFP (11 ng/ μL) Single-Transfektion mit verschiedenen Mengen (25 μL , 50 μL und 75 μL) des Transfektionsreagenzes Viromer® Red in einer 24-well-Platte; N=2..... 72

Abbildung 37: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienz von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 250 ng und 500 ng EGFP (lineare und circulaire DNA) mit Lipofektamine Stem (1 μL und 2 μL) transfiziert wurden. mit verschiedenen

Mengen von Transfektionsreagenz und DNA (linear und circular) in einer 24-well-Platte; N=2.....	73
Abbildung 38: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienz von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 250 ng, 500 ng oder 750 ng EGFP mit XtremeGENE™ 9 (1 µL, 2 µL und 3 µL) transfiziert wurden in einer 24-well-Platte; N=2.	75
Abbildung 39: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienzen von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 250 ng und 500 ng EGFP mit DreamFect™ Gold (1 µL oder 2 µL) in einer 24-well-Platte transfiziert wurden, N=2.	76
Abbildung 40: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienzen von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 500 ng, 750 ng oder 1000 ng EGFP mit DreamFect™ Gold (3 µL oder 4 µL) in einer 24-well-Platte transfiziert wurden, N=3.	77
Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen: Links von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 4 µL DreamFect™ Gold transfiziert wurden, links: ohne DNA, rechts: mit 750 µg DANN (EGFP).....	77
Abbildung 42: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienz von ADhMSCs (AD47N Passage 5, AD48M Passage 5, AD44N Passage 4, AD08U Passage 3), die mit 750 ng EGFP mit DreamFect™ Gold (3 µL) in einer 24-well-Platte transfiziert wurden; N=2.....	78
Abbildung 43: Mittels Durchflusszytometer bestimmte Transfektionseffizienz von ADhMSCs (AD47N Passage 5), die mit 2 µL DreamFect™ mit dem Testplasmid (PSAM200 und pKM-EGFP) mit verschiedenen Plasmidmengen (480 ng, 500 ng, 750 ng und 1000 ng) in verschiedenen Plasmidverhältnissen (1:1, 1:2 und 1:5) in einer 24-well-Platte transfiziert wurden; N=3.	79
Abbildung 44: Durchlichtmikroskopische Bildaufnahmen von ADhMSCs (AD47N Passage 5) unbehandelten (links), mit 600 V 750 µs elektroporierten (mitte) und mit 600 V und 1,25 ms elektroporierten (rechts).....	81
Abbildung 45: Mittels Durchflusszytometer gemessene Transfektionseffizienzen von ADhMSCs (AD44N Passage 4) nach Elektroporation mit einem 600 V Rechteckpuls mit einer Pulslänge von 0,5 ms und einer Spaltbreite von 0,4 cm mit verschiedenen Elektroporationspuffern (PBS, ddH ₂ O, hypoosmolarer Puffer und Puffer von BioRad) ; N=2.....	82

Abbildung 46: Phasenkontrastaufnahmen der ADhMSCs (AD44N Passage 4), die mit einem Rechteckpuls von 600 V und einer Pulslänge von 0,5 ms mit verschiedenen Elektroporationspuffern elektroporiert wurden, vor der Durchflusszytometermessung. A: ddH₂O, B: PBS, C: hypoosmolarer Elektroporationspuffer, D: Elektroporationspuffer von BioRad..... 83

Abbildung 47: Mittels Durchflusszytometer gemessene Transfektionseffizienzen von ADhMSCs (AD47N Passage 5) nach Elektroporation mit einem 600 V Rechteckpuls mit einer Pulslänge von 0,5 ms und einer Spaltbreite von 0,4 cm mit verschiedenen Plasmidmengen; N=2. 84

Abbildung 48: Mittels Durchflusszytometer gemessene Transfektionseffizienzen von ADhMSCs (AD47N Passage 5, AD48M Passage 5, AD44N Passage 4, AD08U Passage 3) nach Elektroporation mit einem 600 V Rechteckpuls mit einer Pulslänge von 0,5 ms und einer Spaltbreite von 0,4 cm mit ADhMSCs von verschiedenen Spendern; N=2. 85

Abbildung 49: Klonierungsstrategie von dem Gal4UAS-BDNF Plasmid ausgehend vom pGL2_Gal4UAS_Luc_6054bp Plasmid und dem BDNF Plasmid. 87

Abbildung 50: Kalibrationsreihe mit Ausgleichsgerade der Luciferase Standardreihe; N=2..... 89

Abbildung 51: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit 0,5 µL DreamFect™ Gold mit verschiedenen Plasmidverhältnissen (Gesamtplasmidmenge: 500 µg) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetativ (20 sek on, 60 sek off) für 12 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4..... 90

Abbildung 52: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit 0,5 µL DreamFect™ Gold mit verschiedenen Plasmidverhältnissen (Gesamtplasmidmenge: 500 µg) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetativ (20 sek on, 60 sek off) für 12 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4..... 91

Abbildung 53: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit 0,5 µL DreamFect™ Gold mit verschiedenen Plasmidverhältnissen (Gesamtplasmidmenge: 500 µg) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetativ (20 sek on, 60 sek off) für 12 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4..... 92

Abbildung 54: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit 0,5 μ L DreamFect™ Gold mit verschiedenen Plasmidverhältnissen (Gesamtplasmidmenge: 500 μ g, 750 μ g oder 1000 μ g) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetativ (20 sek on, 60 sek off) für 12 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4. 93

Abbildung 55: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit DreamFect™ Gold (0,25 μ L, 0,5 μ L, 0,75 μ L und 1 μ L) mit verschiedenen Plasmidverhältnissen (Gesamtplasmidmenge: 500 μ g, 750 μ g oder 1000 μ g) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetativ (20 sek on, 60 sek off) für 12 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4. 94

Abbildung 56: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit DreamFect™ Gold (0,5 μ L) im Plasmidverhältnis 1:1:4 (Gesamtplasmidmenge: 750 μ g) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetativ (20 sek on, 60 sek off) für 6 h, 12 h oder 24 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4. 96

Abbildung 57: Mittels Luciferase Assay gemessene Luciferasekonzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit DreamFect™ Gold (0,5 μ L) im Plasmidverhältnis 1:1:4 (Gesamtplasmidmenge: 750 μ g) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm mittels eines Lasers für 6 h mit verschiedenen Laserintensitäten illuminiert wurden; N=4. 97

Abbildung 58: qPCR Daten der drei verwendeten Referenzprimer B2M, PPIA und RPL4 für die Gene CRY, CIB, EGFP; N=12. 100

Abbildung 59: qPCR Daten des CRY Systems mit Luciferase Expression. Oben: in voller Größe, unten: Ausschnitt der Expression von 0-5; N=12. 101

Abbildung 60: qPCR Daten des CRY2-Systems mit EGFP Expression; N=12. 102

Abbildung 61: qPCR Daten des CRY2-Systems mit BDNF Expression; N=12. 103

Abbildung 62: Mittels BDNF ELISA gemessene Absorptionswerte bei 450 nm des optogenetischen CRY2-System nach Transfektion und Illumination mit den optimierten Bedingungen. 104

Abbildung 63: Mittels BDNF ELISA gemessene BDNF Konzentrationen des CRY2-Systems in HEK293 Zellen, die mit DreamFect™ Gold (0,5 μ L) im Plasmidverhältnis 1:1:4 (Gesamtplasmidmenge: 750 μ g) transfiziert wurden (96-well-Platte) und mit 450 nm repetativ (20 sek on, 60 sek off) 12 h mit 8 W/m² illuminiert wurden; N=4. 104

Abbildung 64: Plasmidkarte von pSAM200.....	156
Abbildung 65: Plasmidkarte von pKM-022.....	156
Abbildung 66: Plasmidkarte von pKM-EGFP.....	157
Abbildung 67: Plasmidkarte von pKM-BDNF.....	157
Abbildung 68: Plasmidkarte von pKM-078.....	157
Abbildung 69: Plasmidkarte von pKM-006.....	158
Abbildung 70: Plasmidkarte von CRY2.....	158
Abbildung 71: Plasmidkarte von CIB.....	158
Abbildung 72: Plasmidkarten von Gal4UAS-Luc.....	158
Abbildung 73: Plasmidkarte von Gal4UAS-BDNF.....	159
Abbildung 74: Plasmidkarte von Gal4UAS-EGFP.....	159
Abbildung 75: Schematischer Aufbau der Illuminationskammer.....	168
Abbildung 76: Bilder der Illuminationskammer.....	168
Abbildung 77: Kalibriergerade für 465 nm LEDs.....	169
Abbildung 78: Kalibriergerade für 660 nm LEDs.....	171
Abbildung 79: Kalibriergerade für 740 nm LEDs.....	171
Abbildung 80: Weg des Lasers zum Scannen eines Wells einer 24-Well Platte.....	172
Abbildung 81: Lasersetup des PhyB Systems.....	173
Abbildung 82: Weg des Lasers zum Scannen eines Wells einer 96-Well Platte.....	173

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verzeichnis aller verwendeten Abkürzungen.	IX
Tabelle 2: Verzeichnis aller verwendeten Einheiten.	XIII
Tabelle 3: Vor- und Nachteile der verwendeten optogenetischen Systeme.....	15
Tabelle 4: Liste der <i>in vivo</i> Experimente mit optogenetischen Systemen, die auf Ionenkanälen basieren.	45
Tabelle 5: Liste der <i>in vivo</i> Experimente mit optogenetischen Systemen für die Genexpression.	47
Tabelle 6: Mittels Image J berechnete Fläche an fluoreszierenden Zellen in %; N=4.	52
Tabelle 7: Vergleich der optogenetischen Systeme PhyB und CRY2.....	124
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien.	150
Tabelle 9: Verwendete Enzyme.....	152
Tabelle 10: Verwendete Laborgeräte.	153
Tabelle 11: Puffer und Nährlösungen mit ihren Zusammensetzungen.	154
Tabelle 12: Verwendete Organismen.	155
Tabelle 13: Verwendete Klonierungs-Primer mit Sequenzen, Annealingtemperaturen und Fragmentlängen.	160
Tabelle 14: Verwendete qPCR-Primer mit Sequenzen, Annealingtemperaturen und Fragmentlängen.	160
Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	161
Tabelle 16: Agarosekonzentration in Abhängigkeit der DNA Größe.....	183

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Nina Louisa Wichert
Geburtsdatum 28.07.1991
Geburtsort Düsseldorf

Akademischer Werdegang

Seit 01/18 Promotionsvorhaben im Fach Chemie: Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
Thema: „Etablierung einer lichtinduzierten Proteinsynthese in Säugetierzellen für therapeutische Anwendungen“

10/15 - 12/17 Masterstudium, M.Sc. im Fach der Analytischen Chemie mit 1,8, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, Masterarbeit: „Optogenetische Signatur von Säugerzellen“ mit 1,4

10/12 -10/15 Bachelorstudium, B.Sc. im Fach der Naturwissenschaftlichen Forensik mit 2,4, Hochschule Bonn-Rhein-Sieg
Bachelorarbeit: „Methodenentwicklung zur Polymeranalytik von Wasch- und Reinigungsmitteln mittels Gelpermeationschromatographie bzw. Gelpermeationschromatographie mit Advanced Polymer Chromatography-Technik“ mit 1,7

10/10 -10/12 Diplomstudium im Fach der Wirtschaftsmathematik, Universität Leipzig, Studiengangwechsel

2010 Abitur mit 1,8, Humboldt–Gymnasium Düsseldorf

Berufliche Erfahrung

Seit 09/22 Stellvertretende Leitung der Qualitätssicherung, MukoCell GmbH, Bochum

Seit 04/22 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, MukoCell GmbH, Bochum

Lebenslauf

- 04/20 – 11/20 Wissenschaftliche Hilfskraft, Mobile Corona-Analytik, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
- 03/17 Wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
- 10/16 - 12/16 Wissenschaftliche Hilfskraft, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
- 05/15 - 08/15 Bachelorarbeit, Henkel, Düsseldorf

Absolvierte Praktika

- 03/17 - 05/17 Forschungspraktikum, Institut für Radioökologie und Strahlenschutz, Leibniz Universität Hannover
- 07/16 - 09/16 Forschungspraktikum, Zentrale Forschungs-einrichtung Metabolomics, Medizinische Hochschule Hannover

Fortbildungen

- 05/19 – 06/19 Englisch Communication Practice, Leibniz Universität Hannover
- 09/18 Workshop für die Software Fiji/Image J, GRANAT, Graduiertenschule für Naturwissenschaftler
- 07/17 Qualitätsmanagement-Seminar, Leibniz Universität Hannover, gehalten von Dr. F. Lammers (Firma Sanofi, Frankfurt)
- WS 2015/16
und SS 2016 Strahlenschutzkurs mit erworbener Fachkunde "S4.1", Institut für Radioökologie und Strahlen-schutz, Leibniz Universität Hannover

Publikationsliste

Akzeptierte wissenschaftliche Veröffentlichungen

Nina Wichert, Martin Witt, Cornelia Blume, Thomas Scheper

Titel: Clinical applicability of optogenetic gene regulation

Veröffentlicht am 29.07.2021 in Biotechnology and Bioengineering, Wiley

DOI: 10.1002/bit.27895

Posterbeiträge

LUCS – Leibniz University Chemistry Symposium, Hannover, 07/22

Nina Wichert, Sina Christoffers, Marc Wahalla, Lani Torres, Holger Blume, Alexander Heisterkamp, Cornelia Blume

Titel: Development of light-induced protein synthesis in optogenetically activatable mammalian cells for therapeutic applications

ARO – Association for Research in Otolaryngology MidWinter Meeting, San Jose, USA, 02/20

Nina Wichert, Martin Witt, Rebecca Jonczyk, Andy Martinez, Tim Strauß, Jennifer Schulze, Malte Sgodda, Lani Torres, Marc Wahalla, Hans Nothwang, Peter Behrens, Athanasia Warnecke, Tobias Cantz, Alexander Heisterkamp, Holger Blume, Cornelia Blume

Titel: Light-induced protein synthesis in human mesenchymal stem cells for cochlea implants

Optogenetic Technologies and Applications, Boston, USA, 12/19

Nina Wichert, Tim Strauß, Rebecca Jonczyk, Martin Witt, Andy Martinez, Malte Sgodda, Lani Torres, Marc Wahalla, Jennifer Schulze, Hans Nothwang, Athanasia Warnecke, Tobias Cantz, Alexander Heisterkamp, Peter Behrens, Holger Blume, Cornelia Blume

Titel: Light-induced protein synthesis in mammalian cells

Hearing 4 All Symposium, Hannover, 10/19

Nina Wichert, Martin Witt, Rebecca Jonczyk, Andy Martinez, Lani Torres, Marc Wahalla, Alexander Heisterkamp, Holger Blume, Cornelia Blume

Titel: Optimization of light-induced protein synthesis in CHO-K1 cells

Hearing 4 All Symposium, Hannover, 10/19

Nina Wichert, Andy Martinez, Malte Sgodda, Martin Witt, Tobias Cantz, Cornelia Blume

Titel: Towards stable integration of an optogenetic toggle switch in human mesenchymal stem cells via lentiviral transfection

Hearing 4 All Summer School, Visselhövede, 08/19

Nina Wichert, Rebecca Jonczyk, Martin Witt, Andy Martinez, Tim Strauß, Peter Behrens, Cornelia Blume

Titel: Optogenetics in human mesenchymal stem cells

DFG Begehung, NIFE, Hannover, 08/19

Nina Wichert, Tim Pinkvos, Rebecca Jonczyk, Martin Witt, Andy Martinez, Malte Sgodda, Lani Torres, Marc Wahalla, Jennifer Schulze, Athanasia Warnecke, Tobias Cantz, Alexander Heisterkamp, Peter Behrens, Holger Blume, Cornelia Blume

Titel: Optogenetics in human mesenchymal stem cells

Hearing 4 All Symposium, Oldenburg, 11/18

Nina Wichert, Stas Hans, Marc Wahalla, Thomas Reinard, Cornelia Blume, Holger Blume

Titel: Optogenetically induced protein expression in mammalian cells

Hearing 4 All Summer School, Soltau, 07/18

Nina Wichert, Lani Torres, Marc Wahalla, Alexander Heisterkamp, Holger Blume, Cornelia Blume

Titel: Laser-based light induction of GFP synthesis in CHO-K1 cells as a model for optogenetics in human cells