

Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen

Universitäts-Augenklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. U. Bartz-Schmidt

Muzin-DNA-Nanopartikel und lipid-modifizierte Aptamer-Nanopartikel zum zielgerichteten okulären drug delivery

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Ulrich Hagel

aus

Laupheim

2020

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Spitzer
2. Berichterstatter:	Professor Dr. C. Gleiter

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	Die Kornea .....	9
1.1.1	Histologie der Kornea.....	9
1.1.2	Der Tränenfilm als Barriere .....	10
1.2	Okulärer <i>drug delivery</i> .....	12
1.2.1	Applikationsformen.....	12
1.2.2	Limitationen der Tropftherapie .....	14
1.3	Nanopartikel .....	14
1.4	Aptamere.....	16
1.4.1	Aptamere als Therapeutika .....	17
1.5	Modifizierte DNA-Nanopartikel.....	18
1.5.1	Muzin-Nanopartikel .....	18
1.5.2	Lipid-Nanopartikel .....	19
1.6	Ziel dieser Arbeit / Fragestellung.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Verbrauchsmaterialien und Reagenzien .....	21
2.2	Geräte und verwendete Software.....	22
2.3	Lösungen.....	23
2.3.1	TAE-Puffer .....	23
2.3.2	TBS-Puffer .....	23
2.3.3	LB-Medium.....	23
2.3.4	Agarplatten.....	23
2.4	Zellen.....	24
2.4.1	<i>RGC-5 Zelllinie</i> .....	24
2.4.2	Korneale Epithelzellen .....	24
2.5	Methoden .....	24
2.5.1	Herstellung der funktionalisierten Nanopartikel.....	24
2.5.2	Evaluation des MUC1-Aptamers.....	27
2.5.3	In-vitro-Studien.....	30

2.5.4	Ex-vivo-Studien .....	32
2.5.5	In-vivo-Studien .....	32
2.5.6	Anfertigung von Dünnschnitten am Kryostat.....	33
2.5.7	Histologische Färbungen .....	33
2.5.8	Untersuchung der Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop.....	35
2.5.9	Wirksamkeitsstudie Kanamycin-NP .....	35
2.5.10	Toxizitätsstudien .....	37
2.5.11	Adhäsionsversuche.....	39
2.5.12	Statistische Auswertung der Wirksamkeits- und Toxizitätsstudien 41	
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Evaluation des MUC1-Aptamers .....	42
3.2	Adhäsion .....	43
3.2.1	MUC-NP auf RGC-5-Zellen.....	43
3.2.2	MUC-NP auf Epithelzellen .....	45
3.2.3	MUC-Apt auf Schweinekornea.....	48
3.2.4	MUC-NP auf Ratten .....	50
3.2.5	IApt auf Schweinekornea .....	52
3.2.6	IApt auf Ratten .....	53
3.3	Wirksamkeit/Effizienz .....	55
3.3.1	MIC-Test .....	56
3.3.2	Infektionsexperiment.....	57
3.4	Toxizität.....	58
3.4.1	Zellviabilität .....	58
3.4.2	Zellzahl.....	59
3.4.3	Apoptoseinduktion.....	59
4	Diskussion .....	61
4.1	DNA-Nanopartikel im Vergleich zu anderen Trägersystemen in der Augenheilkunde .....	61
4.1.1	Polymere (PLGA).....	61
4.1.2	Nanogelee.....	62

4.1.3	Liposomen.....	63
4.1.4	Niosomen.....	63
4.1.5	Dendrimere.....	64
4.1.6	Cyclodextrine.....	65
4.1.7	Übersicht verschiedener Nanomaterialien.....	66
4.2	Der weiterentwickelte / modifizierte DNA-Nanopartikel.....	68
4.2.1	MUC-NP.....	68
4.2.2	IApt.....	69
4.3	Weiterführende Untersuchungen und Ausblicke.....	71
5	Zusammenfassung.....	73
6	Literaturverzeichnis.....	74
6.1	Erklärung zum Eigenanteil.....	80
7	Anhang.....	82
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	82
7.2	Tabellenverzeichnis.....	86
7.3	Danksagung.....	88
7.4	Lebenslauf.....	89

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Englisch	Deutsch
<b>AB</b>	antibiotic	Antibiotikum
<b>AK</b>	antibody	Antikörper
<b>AMD</b>	age related macular degeneration	altersbedingte Makula-Degeneration
<b>Anova</b>	Analysis of variance	Varianzanalyse
<b>Aqua dest.</b>	distilled water	destilliertes Wasser
<b>BSA</b>	bovine serum albumin	Rinderserumalbumin
<b>CD</b>	cyclodextrins	Cyclodextrine
<b>Cy3</b>	cyanine3	Cyanin3
<b>DAPI</b>	4'6-diamidino-2-phenylindole	4'6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNase</b>	deoxyribonuclease	Desoxyribonuklease
<b>DNEM</b>	dulbecco's modified eagle's medium	Dulbeccos Nährmedium modifiziert nach Eagle
<b>EDTA</b>	ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	enzyme-linked Immunosorbent Assay	Enzym gekoppelter Immunsorbtionstest
<b>FDA</b>	food and Drug Administration	Behörde für Lebens- und Arzneimittel
<b>FITC</b>	fluorescein isothiocyanate	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FKS/FBS</b>	fetal bovine serum	fötales Kälberserum
<b>GKV</b>		gesetzliche Krankenversicherung
<b>HRP</b>	horse radish Peroxidase	Meerrettichperoxidase
<b>HWZ</b>	Half-life	Halbwertszeit
<b>Ivom</b>	intravitreal Injection	Intravitreale operative Medikamentengabe

<b>KV</b>	crystal violet	Kristallviolett
<b>IApt</b>	lipid aptamere	lipidmodifiziertes Aptamer
<b>LB</b>	lysogeny broth	Lysogenese Medium
<b>m</b>	milli	milli
<b>M</b>	molar	Molar
<b>MIC/MHK</b>	minimal Inhibitory Concentration	Minimale Hemm-Konzentration
<b>min</b>	minute	Minute
<b>MUC</b>	mucine	Muzin/Mucin
<b>NP</b>	nanoparticle	Nanopartikel
<b>OCT</b>	optical coherence tomography	Optische Kohärenztomografie
<b>P/S</b>	penicillin/streptomycin	Penicillin/Streptomycin
<b>PAMAM</b>	polyamidoamine	Polyamidoamin
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PEG</b>	poly ethylene glycol	Polyethylenglykol
<b>PLA</b>	polylactic acid	Polylactid/Polymilchsäure
<b>PLGA</b>	poly(lactic-co-glycolic) acid	Poly(lactid-co-glycolid)
<b>RGC</b>	retinal ganglion cell line	Retinale Ganglienzelle
<b>RNA</b>	ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	revolutions per minute	Umdrehungen pro Minute
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate	Natriumlaurylsulfat
<b>SELEX</b>	selection of ligands by exponential enrichment	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung

<b>TAE</b>	tris base acetic acid EDTA buffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
<b>TBS</b>	tris-buffered saline	trisphosphatgepufferte Saline
<b>TRIS</b>	tris(hydroxymethyl)amino-methane	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>UNT</b>	university of North Texas	Universität Nord-Texas
<b>URW/UPW</b>	ultra pure water	Ultrareinwasser
<b>VEGF<sub>165</sub></b>	vascular endothelial growth factor 165	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor 165
<b>VEP</b>	visually evoked cortical potentials	Visuell evozierte Potentiale
<b>vgl.</b>	compare to	vergleiche
<b>Vgl.</b>	comparison	Vergleich
<b>μ</b>	micro	mikro

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Kornea

Die Kornea oder Hornhaut (lat. *Cornea*) ist die am weitesten anterior gelegene Struktur des Augapfels, die kuppelförmig wie ein Uhrglas in die Lederhaut (lat. *Sklera*) eingepasst ist. Sie ist somit Grenzfläche zur Außenwelt und spielt eine, als optisches Fenster, entscheidende Rolle beim Sehen, aber auch bei vielen therapeutischen Ansätzen in der Augenheilkunde. Letzteres ist unter anderem durch den histologischen Aufbau und die physiologischen Eigenschaften zu begründen, die im Folgenden näher betrachtet werden.

### 1.1.1 Histologie der Kornea

Die Hornhaut hat einen Durchmesser von zehn bis zwölf mm. In der Peripherie ist sie mit ca. 650  $\mu\text{M}$  etwas dicker als im Zentrum (450 bis 600  $\mu\text{M}$ ) [1]. Histologisch ist die Kornea in fünf charakteristische Schichten unterteilt (Abbildung 1) Besonders die oberflächlichen Anteile tragen dazu bei, Medikamente zu binden und aufzunehmen und sind daher von bedeutendem Interesse.

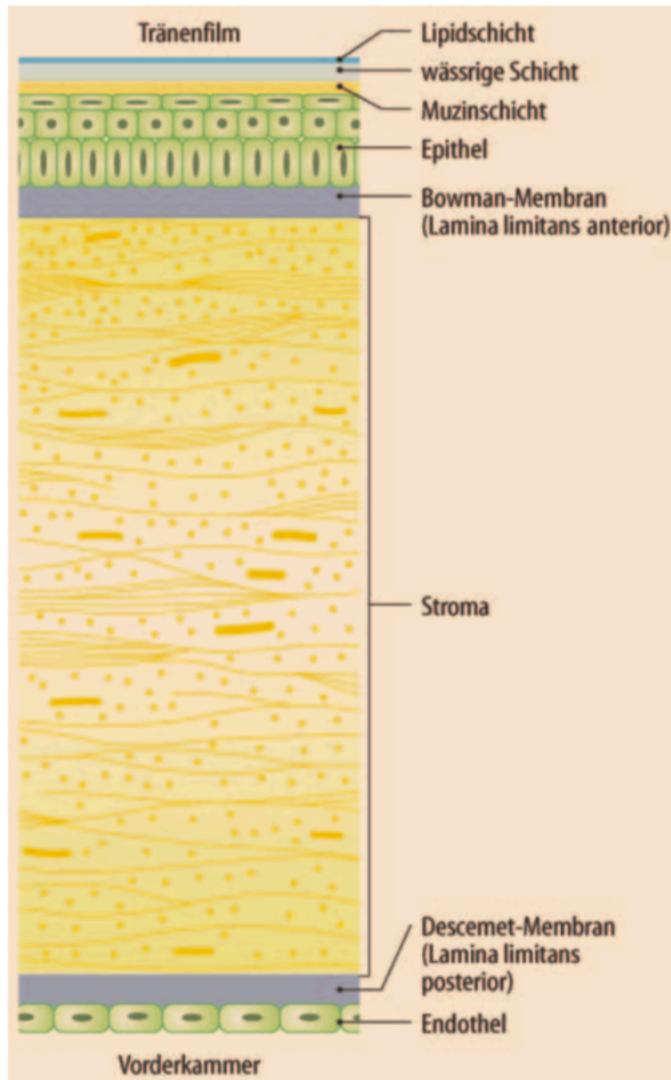
Im histologischen Schnitt der Kornea findet sich basal, als abschließende Struktur der Kornea zur Augenvorderkammer, das aus einer einzigen Zellschicht bestehende Endothel. Die Zellen des Endothels sind hexagonal angeordnet und können sich nicht regenerieren. Benachbarte Zellen können sich aber bei Bedarf vergrößern, um Lücken im Endothel zu schließen [2].

Die Descemetmembran (lat. *Lamina limitans posterior*) kann dagegen bei Verlust aus den Endothelzellen nachgebildet und somit regeneriert werden. Sie ist als derbe Kollagenmembran verantwortlich, die Augenvorderkammer bei Einschmelzung des Hornhautstromas aufrecht zu erhalten [3].

Der Descemetmembran schließt sich das Hornhautstroma an. Ca. 90% der Hornhaut besteht aus dieser kollagenen Struktur, die Keratozyten enthält. Man kann sich das Stroma als schwach vaskularisierte, strukturierte Schicht vorstellen, in der sich die kollagenen Fasern in Lamellen organisieren [1]. Die geringe Anzahl an Blutkapillaren und der schwache Stoffwechsel im Stroma haben einerseits den Nachteil der geringen Regenerationsfähigkeit, beeinflussen die Erfolgsrate einer Hornhauttransplantation aber positiv, da die Kornea dadurch immunologisch privilegiert ist und im Gegensatz zu anderen Präparaten keine Typisierung erfolgen muss [3].

Die oberflächlichste Schicht der Kornea besteht aus einem fünf bis siebenschichtigen, nicht verhornten Plattenepithel, welches basal auf der Bowman-Lamelle (lat. *Lamina limitans anterior*) verankert ist. Die von Natur aus säulenförmigen Zellen sind besonders basal abgeflacht und eng durch *tight-junctions* (lat.

*Zonulae occludentes*) verbunden, was für Diffusionsvorgänge eine entscheidende Rolle spielt und im nächsten Kapitel (1.2.1 weiter aufgegriffen werden soll. Die Epithelzellen selbst stammen aus dem Kornearand (lat. *Limbus Corneae*), einer Übergangszone der Kornea zur Sklera. Die dortigen Limbusstammzellen können sich vermehren und zu Korneaepithelzellen proliferieren.

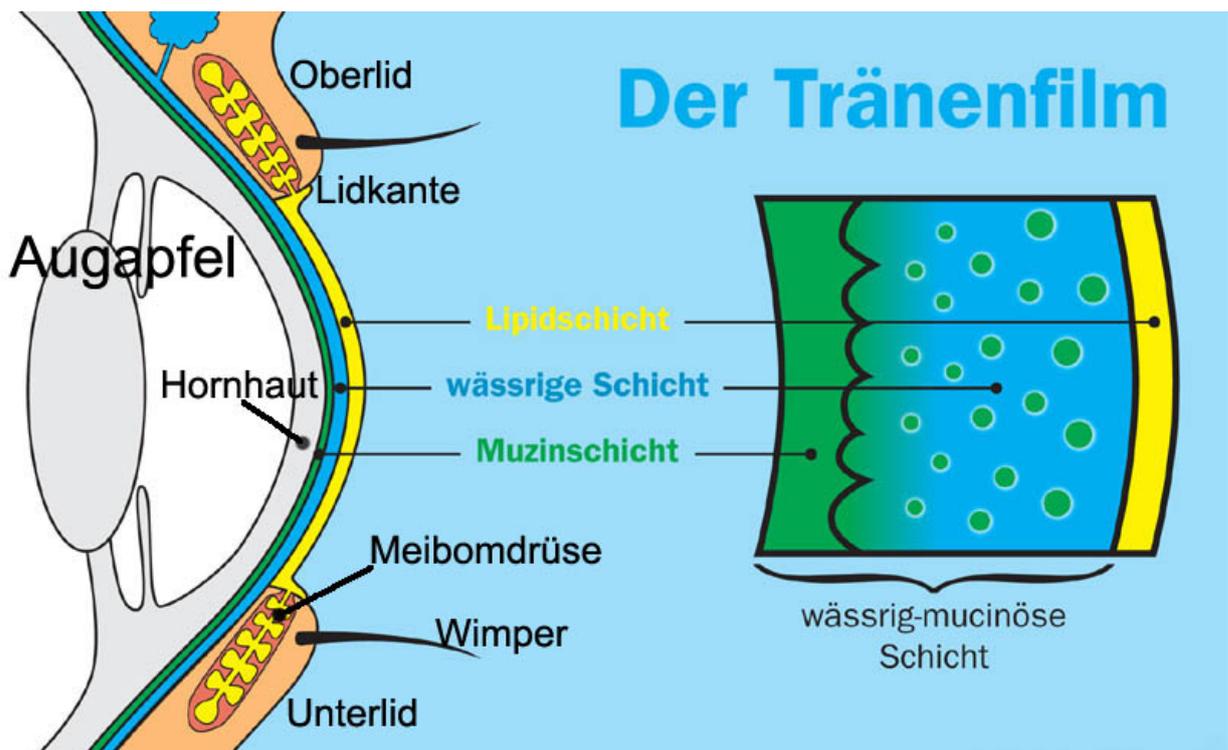


**Abbildung 1: Histologischer Aufbau der Kornea und des Tränenfilms. Schematische Darstellung der in Kapitel 1.1.1 beschriebenen Schichten und des Tränenfilms [4] (vgl. 1.1.2)**

### 1.1.2 Der Tränenfilm als Barriere

Der Tränenfilm liegt dem vorderen Teil des Auges auf (vgl. Abbildung 1) und hat mehrere Funktionen. Während der zwischen Lidspalte und Kornea gelegene

präokulare Tränenfilm ein Gleiten des oberen Augenlids zulässt, ist der präkorneale Tränenfilm im Wesentlichen für den Infektionsschutz der freiliegenden Kornea und deren Ernährung verantwortlich. E. Wolff beschrieb den Tränenfilm bereits 1954 als eine, mit einer dünnen äußeren Lipid-, einer dicken mittleren wässrigen und einer inneren am Korneaepithel haftenden Muzinschicht, dreischichtige Struktur [5] (vgl. Abbildung 2). In der direkt an das Korneaepithel angrenzenden Muzinschicht konnten die membranständigen Muzine MUC1, MUC4 und MUC16 sowie die gelformenden, nicht membranständigen Muzine MUC2 und MUC5AC nachgewiesen werden [6]. Die erstgenannten Muzine, insbesondere MUC1, verhindern unter anderem ein Binden von pathogenen Bakterien oder Viren an die Epithelzellen. Sie dienen also zum Schutz des äußeren Auges [7]. Kardon et al. zeigten 1999, dass *MUC1-Knock-Out*-Mäuse gegenüber einer Kontrollgruppe signifikant anfälliger für Infektionen im Auge waren [8]. Wie die Anwesenheit dieses Proteins auf dem oberflächlichen Korneaepithel therapeutisch genutzt werden kann, soll im Kapitel 1.5.1 (MUC-NP) erläutert werden.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des vorderen Augenabschnitts und des dreischichtigen Tränenfilms [9]**

## **1.2 Okulärer drug delivery**

Laut Pascolini und Mariotti leiden weltweit 285 Mio. Menschen an einer Augenerkrankung, wovon 39 Mio. erblindet sind [10]. Dies erfordert eine intensive Erforschung an Therapiemöglichkeiten im operativen und im konservativen Bereich. Die Effektivität eines Medikaments ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben Dosierung und Applikationsart spielen die Verteilung und der Metabolismus eine wichtige Rolle. In der Pharmakokinetik wird dies durch das **LADME-Prinzip** veranschaulicht [11].

**Liberation** beschreibt die Freisetzung des Wirkstoffs aus der Darreichungsform.

**Absorption** ist die Aufnahme vom Ort der Applikation in die Blutbahn.

**Distribution** ist die gleichmäßige Verteilung im Organismus.

**Metabolism** beschreibt die Verstoffwechslung eines Wirkstoffes, um diesen am Ende ausscheidbar zu machen.

**Exkretion** beschreibt den Ausscheidungsvorgang. Meist werden Medikamente renal, weniger häufig biliär oder pulmonal ausgeschieden.

Werden diese pharmakokinetischen Prozesse in der Literatur beschrieben, dann meist in Zusammenhang mit systemischen, über den Blutkreislauf wirkenden Medikamenten. In der okularen Pharmakokinetik werden diese Prinzipien auf das Auge angewandt, was aufgrund der in Kapitel 1.1. beschriebenen Anatomie und der komplexen Physiologie des Auges oftmals schwierig zu beschreiben und nicht immer eindeutig vorherzusagen ist. Hinzu kommt, dass die meisten Studien hierzu an Versuchstieren, meist Kaninchen, durchgeführt wurden, die sich vom Menschen in der okularen Pharmakokinetik oft signifikant unterscheiden [12].

### **1.2.1 Applikationsformen**

Neben der systemischen Medikation und der intravitrealen Gabe von Medikamenten ist die Tropftherapie eine der wichtigsten Säulen der medikamentösen Therapie in der Augenheilkunde [13].

#### ***Systemische Gabe***

Die oral oder parenteral verabreichten Medikamente werden in der Ophthalmologie verwendet, wenn sich Grunderkrankungen wie Diabetes, Sarkoidose oder Autoimmunerkrankungen im Auge manifestieren. Ebenfalls werden entzündliche Erkrankungen viralen Ursprungs, wie beispielsweise die Herpes-Simplex-Keratitis oder Pilzkrankungen wie die mykotische Konjunktivitis, gerne systemisch

mit entsprechenden Pharmazeutika mitbehandelt [4]. Meist wird die notwendige Wirkstoffkonzentration im Auge bei systemischer Applikation jedoch nicht erreicht, da nahezu undurchlässige Barrieren wie die Blut-Retina-Schranke oder die Blut-Kammerwasserschranke Proteine aus dem Gefäßsystem vom Kammerwasser bzw. von der hinteren Augenkammer abschirmen [1]. Nebenwirkungen der Medikamente bei unzureichendem therapeutischem Effekt sind als Gefahr zu werten.

### ***Intravitreale operative Medikamenteneingabe***

Bei der intravitrealen operativen Medikamenteneingabe (IVOM) wird das Präparat vom Augenarzt unter örtlicher Betäubung mit einer dünnen Nadel direkt in den Glaskörper gespritzt. Der Wirkstoff kommt somit bei Ausbleiben von systemischen Nebenwirkungen ausreichend nahe an das Zielgewebe. Indikationen hierfür sind hauptsächlich die altersabhängige Makuladegeneration und die diabetische Retinopathie. Auch Makulaödeme können durch intravitreale Gabe von Dexamethason behandelt werden [14]. Risiken der IVOM sind neben der etwaigen iatrogenen Verletzung der Retina oder der Linse durch die Nadel eine Keimverschleppung ins Augeninnere, aus der eine Endophthalmitis resultieren kann, die zum Verlust der Sehkraft oder in besonders schweren Fällen bis zur Amaurose führen kann [15].

### ***Topische Medikamentengabe***

Bei topischer Medikamentengabe im Auge werden zwei Absorptionsmechanismen unterschieden. Der nonkorneale Pfad über die Konjunktiva ist für Medikamente mit schlechter Hornhautdurchlässigkeit, wie Gentamicin, ein Weg zum Kammerwasser und somit ins Auge [16]. Dennoch ist der zweite, korneale Pfad der eigentliche Weg, den die Mehrheit der in der Ophthalmologie angewendeten Therapeutika passieren. Der Wirkstoff trifft zunächst auf das in Kapitel 1.1.1. beschriebene Epithel. Grundsätzlich können Epithelien transzellulär, sprich durch die Zellen selbst, oder parazellulär, sprich durch die Zellzwischenräume, durchquert werden. Da die Zellen durch *tight junctions*, im Speziellen durch die Proteine ZO-1, ZO-2, Cingulin und Occludin eng zusammengehalten werden [17], ist der parazelluläre Transport nur für sehr kleine hydrophile Moleküle möglich. Weiterhin ist die laterale Diffusion der meisten Wirkstoffe in der Kornea aus diesem Grund auf kurze Strecken limitiert.

### **1.2.2 Limitationen der Tropftherapie**

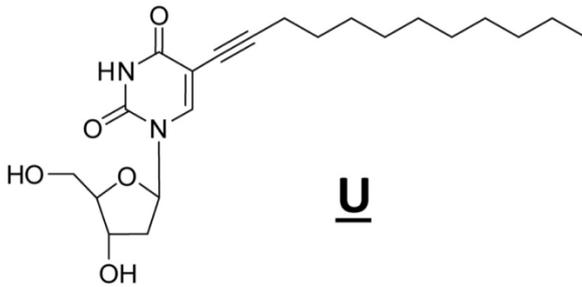
Viele Infektionskrankheiten der Kornea oder der Konjunktiva, wie beispielsweise die bakterielle Keratitis, müssen in schweren Fällen stündlich mit antibiotischen Augentropfen therapiert werden [18]. Physiologische Barrieren wie der Lidschlag, die Tränenflüssigkeit, aber auch falsches Anwenden der Tropfen, führen insbesondere bei älteren Patienten dazu, dass in der Regel weniger als fünf Prozent des topisch applizierten Wirkstoffs lange genug auf der Augenoberfläche verbleibt, um therapeutisch wirksam zu sein [19, 20]. Für eine akzeptable Verfügbarkeit am Zielort muss eine ausreichende Kontaktzeit des Medikaments mit der Kornea eingehalten werden. In der Literatur findet man Durchschnittswerte eines Tropfens von etwa 50 µl [21], welche aber von den meisten Herstellern mit rund 35 µl etwas geringer angegeben werden [22]. Der Großteil der verabreichten Menge wird unmittelbar mit der Tränenflüssigkeit abdrainiert und dann meist über die Nasenschleimhaut oder gastrointestinal absorbiert [23].

Die physiologischen Barrieren der Augenoberfläche wirken einerseits stark protektiv und schützen das Auge vor bakteriellen und viralen Erregern, stellen andererseits aber ein massives Hindernis für die meisten topischen Therapieansätze in der Ophthalmologie dar. Die Behandler sind oftmals gezwungen, sehr hohe Dosen zu applizieren, um eine Krankheit des Auges effektiv zu bekämpfen. Dies führt nicht selten zu Sehstörungen und anderen unerwünschten Nebenwirkungen und ist mit Risiken verbunden, welche dann wiederum die Patientencompliance herabsetzen. Oftmals geben Patienten an, die ihnen verordneten Medikamente nicht zum richtigen Zeitpunkt oder überhaupt nicht einzunehmen, insbesondere wenn mehrmals am Tag getropft werden soll [24].

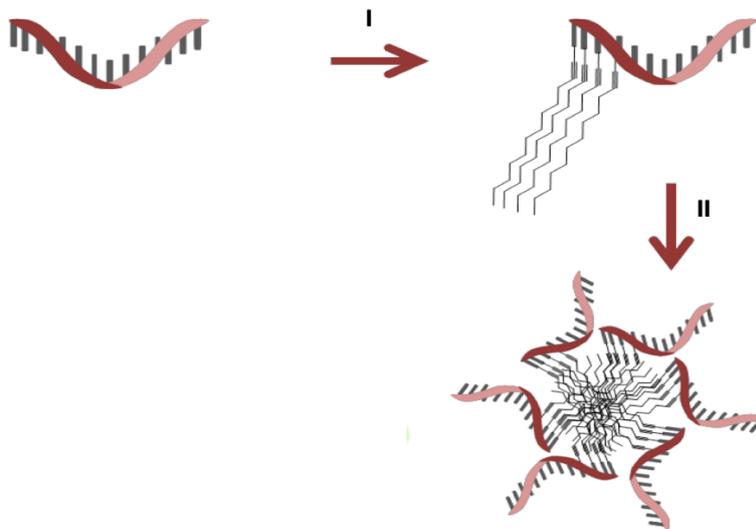
### **1.3 Nanopartikel**

Mitwirkende der Arbeitsgruppe von Prof. Spitzer aus Tübingen entwickelten in Zusammenarbeit mit Wissenschaftlern der AG Prof. Herrmann aus Groningen ein Trägersystem für Augentropfen. Mittels DNA-Nanopartikeln bleiben therapeutische Wirkstoffe aufgrund der hohen Affinität der Nanopartikel (NP) zum Auge signifikant länger am Zielort. Grundsätzlich sind NP kleine (1-100 nm) [25] Partikel, die aus den verschiedensten organischen (Kollagen, Polylactiden etc.) oder auch anorganischen Materialien, wie Keramik oder Metall, hergestellt werden können [26]. Die Besonderheit der DNA-NP aus Tübingen/Groningen ist, dass diese aus biokompatiblen, dem Körper bekannten Fragmenten zusammengesetzt sind, und gefahrlos metabolisiert und ausgeschieden werden können. Genauer bestehen die DNA-NP, die in dieser Arbeit verwendet wurden, aus synthetisch hergestellten, amphiphilen DNA-Strängen, die aus alkylmodifizierten Nucleotiden (Dodecen-modifizierten Desoxyuridingruppen) generiert werden (vgl.

Abbildung 3, Abbildung 4I). Die DNA-Stränge lagern sich durch Mikrophasenseparation zu Mizellen zusammen und formen NP mit einem inneren, wasserunlöslichen Lipidkern. Dieser besteht aus den Alkylresten der oben beschriebenen Desoxyuridingruppen. Er ist von DNA-Einzelsträngen, die die wasserlösliche Hülle des NP bilden, ummantelt (vgl. Abbildung 4 II).



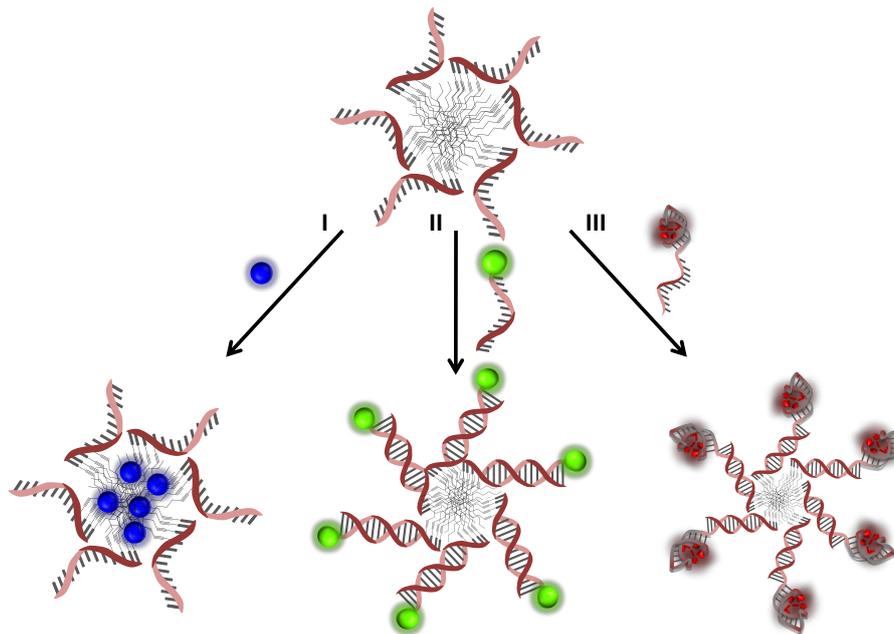
**Abbildung 3: Alkylmodifiziertes Desoxyuridin**



**Abbildung 4: Synthetisch produzierte DNA-Stränge werden mit Dodecylmodifizierten Desoxyuridingruppen gekoppelt und die eigentlich hydrophilen DNA-Stränge werden amphiphil (I). Diese bilden aufgrund der Mikrophasenseparation in wässriger Lösung dann Mizellen mit hydrophobem Lipidkern und hydrophiler Hülle aus Einzelstrang-DNA (II) [27].**

Um die NP mit dem gewünschten Wirkstoff zu beladen, stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Ein lipophiler Wirkstoff kann durch hydrophobe Wechselwirkungen in den Kern eingelagert werden (vgl. Abbildung 5 I). Eine

weitere Möglichkeit besteht darin, den Wirkstoff kovalent an eine DNA-Sequenz zu binden, die komplementär zum DNA-Strang des Nanopartikels synthetisiert wird (vgl. Abbildung 5 II). Als dritte und effektivste Methode können Wirkstoffe über Aptamere (siehe Kapitel 1.3) an die Hülle der NP gebunden werden (vgl. Abbildung 5 III). Hierbei müssen keine chemischen Modifikationen des Wirkstoffs vorgenommen werden. Diese Art der Bindung ist äußerst effizient, da Aptamere leicht für verschiedene Wirkstoffe hergestellt und angepasst werden können [28]. Die damit verbundene, therapeutisch breite Anwendbarkeit dieses Trägermodells ist ein entscheidender Vorteil im Vergleich zu anderen *drug delivery* Systemen in der Ophthalmologie.

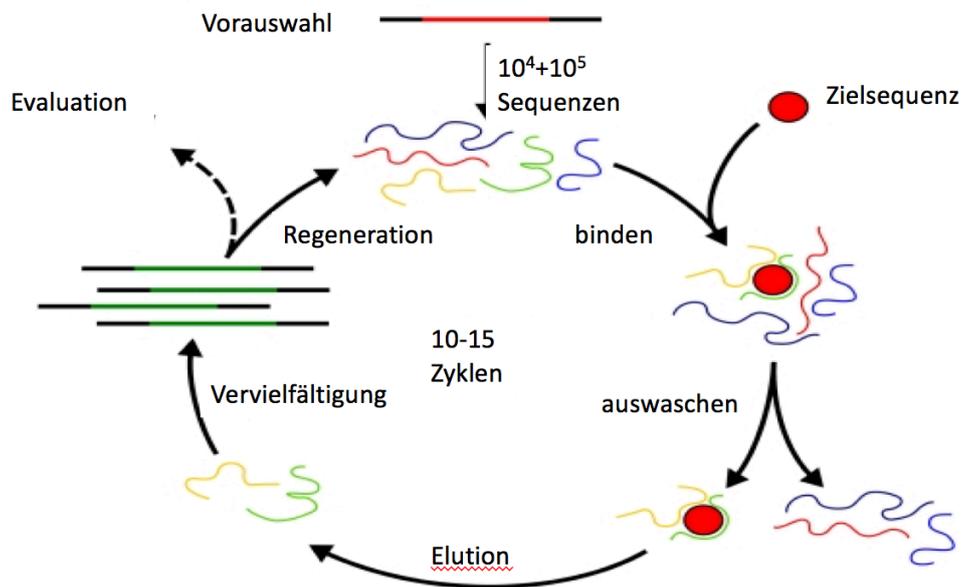


**Abbildung 5: Wirkstoffe können an die NP unter Zuhilfenahme hydrophober Wechselwirkungen (I), kovalent gebunden an komplementäre DNA-Stränge (II) oder mittels Aptameren (III) verknüpft werden.**

#### 1.4 Aptamere

Aptamere sind kurze Einzelstrang-Oligonukleotidstränge, welche aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur hohe Bindungsaffinitäten zu Zielstrukturen wie z.B. Proteinen besitzen. Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen sind hauptsächlich für deren Bindung ausschlaggebend. Aptamere werden *in vitro* generiert. 1990 isolierten A.Ellington und J.Szostak RNAs, die an ein bestimmtes Zielmolekül binden, aus einem zufälligen Sequenzpool und nannten diese dann „Aptamere“ (lat. *aptus*, passen, gr. *meros*, Gebiet) [28]. Zwei Jahre später beschrieben sie den gleichen Vorgang mit DNA Einzelstrangmolekülen [29]. C. Tuerk und L. Gold hingegen betitelten den experimentellen Prozess als „SELEX-Verfahren“ (vgl. Abbildung 6) [30]. Hierbei wird vorerst eine Vielzahl

an Oligonukleotiden mit randomisierten Sequenzen ( $10^{14}+10^{15}$ ) hergestellt. Das Molekül, zu dem ein Aptamer generiert werden soll, wird den Oligonukleotiden zugemischt. Die nicht gebundenen Oligonukleotiden werden ausgespült, sodass nur diejenigen Kandidaten zurückbleiben, die mit hoher Affinität an das Zielmolekül binden. Diese werden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [31] vervielfacht und erneut, wie oben beschrieben, in Bindung mit dem Zielmolekül gebracht. Sind einige Zyklen durchlaufen, erhält man das gewünschte Oligonukleotid (Aptamer). Zur Evaluation des Aptamers stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Um die spezifische Bindung in vitro zu testen, werden dann z.B. quantitative kompetitive ELISA-Tests durchgeführt.



**Abbildung 6: Im SELEX-Verfahren werden spezifische Oligonukleotide aus einer Zufallsbibliothek an Zielproteine gebunden und mittels PCR vermehrt [32].**

#### 1.4.1 Aptamere als Therapeutika

Aptamere haben in ihrer Anwendung als Therapeutika entscheidende Vorteile gegenüber anderen, etablierten Arzneimitteln wie beispielsweise monoklonalen Antikörpern [33]. Ende 2004 bewilligte die amerikanische Behörde für Lebensmittel und Arzneimittel (FDA) Pegaptanib Natrium, ein VEGF<sub>165</sub>-Aptamer welches als erstes zugelassenes Aptamer-Medikament zur Therapie der altersbedingten Makula-Degeneration (AMD) eingesetzt wurde. Es war unter dem Markennamen Macugen® erhältlich [34]. In der klinischen Anwendung wurde es zwischenzeitlich durch wirksamere Anti-VEGF-Medikamente ersetzt, die allerdings nicht auf

Aptamerbasis wirken. Dennoch bleiben Aptamere ein vielversprechender Ansatz für Medikamente. Die Rolle des VEGF-Moleküls bei der Entstehung verschiedener Krankheiten wurde in den letzten Jahrzehnten erforscht und besser verstanden [35]. So spielen VEGF-Aptamere, aber auch andere, wie zum Beispiel das MUC1-Aptamer etwa in der Krebsforschung [36] oder der Therapieforschung zur diabetischen Retinopathie [37] eine Rolle.

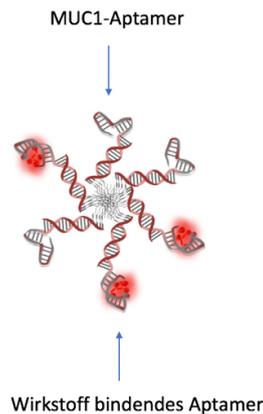
## **1.5 Modifizierte DNA-Nanopartikel**

In bisherigen Versuchen der AG konnte gezeigt werden, dass Medikamente, die über die DNA-NP Plattform appliziert wurden, signifikant länger am Auge verbleiben und in Bezug auf Toxizität unbedenklich sind [38, 39]. Hohe Dosierungen von Medikamenten können auf ein deutlich geringeres Level reduziert werden, was die Verträglichkeit erhöht. Weiterhin soll die Anwendungsfrequenz von NP-Medikamenten verringert werden, was zu einer höheren Compliance führen soll, da das Therapieregime bei Präparaten mit niedriger Anwendungsfrequenz nachweislich besser eingehalten wird und somit zu größerem Erfolg führt.

Nun wurde dieses Trägersystem so modifiziert, dass Proteine, die sich auf der Oberfläche der Kornea befinden, als Zielstrukturen genutzt werden können, um die Bindung noch weiter zu verbessern und zu spezifizieren. Hierzu wurden die DNA-NP funktionalisiert, was in den folgenden Kapiteln näher beschrieben wird.

### **1.5.1 Muzin-Nanopartikel**

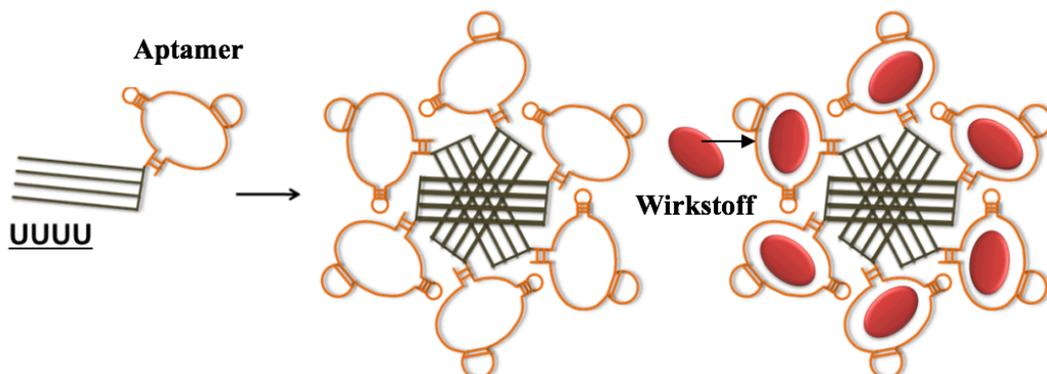
Für die Herstellung von Muzin-NP wurde an Stelle der bisherigen wirkstofftragenden Aptamere ein publiziertes Aptamer verwendet, welches spezifisch an ein Mucin der Korneaoberfläche bindet [40]. So kann gewährleistet werden, dass der NP zielgerichtet am gewünschten Gewebe haften bleibt. Diese Vorgehensweise wird als *drug-targeting* bezeichnet und soll gewährleisten, dass der NP sich zielgerichtet am gewünschten Ort (Kornea) anreichert und somit, bei gleichzeitiger Abnahme etwaiger Nebenwirkungen in anderen Geweben, effektiver wirken kann. Diese neuen, modifizierten Nanopartikel (vgl. Abbildung 7) bieten, zusätzlich zu den schon genannten Vorteilen, die Eigenschaft der selektiven Gewebespezifität. Die Charakterisierung dieser Partikel war ein Teil dieser Doktorarbeit.



**Abbildung 7: MUC1-NP mit einem Aptamer zur Beladung des Wirkstoffs und einem zweiten Aptamer, welches an das auf dem Korneaepithel befindliche MUC1 bindet.**

### 1.5.2 Lipid-Nanopartikel

Ein weiterer Weg die Nanopartikel potentiell effizienter zu gestalten, ist die Aptamere selbst zu konfigurieren. Lipidmodifizierte Aptamere, die in dieser Arbeit verwendet wurden (lApts), besitzen eine Domäne aus vier alkylmodifizierten 2'-Desoxyuridin-Nukleotiden (vgl. Abbildung 8) am 5' Ende. Sie haben somit die Eigenschaft, homolog zu den in Kapitel 1.2.3 vorgestellten DNA-Einzelsträngen, in wässriger Lösung Mizellen zu formen, ohne dass die Aptamere an den bisherigen Nanopartikel hybridisiert werden müssen. Ein entscheidender Vorteil dieser modifizierten Nanopartikel ist, dass deren Molekülgröße aufgrund der kürzeren DNA-Fragmente geringer ist, was sich in Bezug auf Adhäsion in bereits durchgeführten Studien als Vorteil erwiesen hat [38].



**Abbildung 8: Lipidmodifizierte Aptamere (lApts) formen in wässriger Lösung einen Nanopartikel mit Mizellenstruktur. Dieser kann mit einem Wirkstoff beladen werden.**

## 1.6 Ziel dieser Arbeit / Fragestellung

Bei der topischen Medikamentengabe in der Ophthalmologie gibt es vielerlei Hürden anatomischer und physiologischer Natur, die es zu überwinden gilt. Gleichwohl besteht ein aufgrund der hohen Prävalenz an lokal behandelbaren Augenerkrankungen [41] großer Bedarf an effektiveren Medikamenten. Das in Tübingen/Groningen entwickelte *drug-delivery*-System der AG Spitzer/Schnichels soll die Aufnahme vieler Wirkstoffe ins Auge erleichtern und effektiver gestalten.

Ziel dieser Arbeit war es, die neuen lipid- und muzinmodifizierten Nanopartikel auf Adhärenz, Wirkung und Toxizität an der Kornea zu evaluieren. In ersten Versuchen sollten die zum Teil mit Medikamenten beladenen modifizierten NP in vitro auf Adhäsion an kornealen Epithelzellen und der RGC-5-Zelllinie getestet werden. Insbesondere der spezifische Bindungscharakter der Muzin-Nanopartikel zum MUC1-Molekül auf dem Korneaepithel sollte überprüft werden, um die Evaluationsergebnisse von zuvor durchgeführten ELISA-Tests zu verifizieren. Anschließend sollten diese Nanopartikel weiter an enukleierten Schweineaugen und an Rattenaugen in in-vivo Studien getestet werden um die Adhäsion ans korneale Epithel zu bestätigen.

Es sollte gezeigt werden, welcher NP-Medikamentkomplex sich für die folgenden Funktionstests ausweist. Um Aussagen über die Effektivität und Wirksamkeit der neu entwickelten Medikamententräger machen zu können, wurde die funktionelle Anwendbarkeit der IApts in einem mikrobiologischen Titerverfahren zur Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MIC-Test) an Escherichia Coli-Bakterien und weiter in einem Infektionsversuch mit kornealem Gewebe aus enukleierten Schweineaugen getestet. Die IApts wurden hierzu mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum Kanamycin beladen und mit deren Vorgänger (U4T<sup>Kan</sup>) und freiem Kanamycin verglichen. Im Hinblick auf die unbedenkliche klinische Anwendung wurden die MUC-NP und die beladenen IApts in drei verschiedenen Versuchen auf toxische Eigenschaften (Apoptoseinduktion, Einfluss auf Zellzahl und Zellviabilität) getestet.

Unter den neu entwickelten Nanopartikeln sollte der in Bezug auf Adhäsion, Toxizität und Funktion bestmögliche mit Wirkstoffen beladene Nanopartikel ausgewählt werden. Auch im Vergleich mit den nicht modifizierten DNA-Nanopartikeln soll derjenige mit den besten Eigenschaften bestimmt werden. Dieser kommt dann für weitere Studien, wie beispielsweise einem in-vivo Infektionsversuch, und später für klinische Studien in Frage.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

- 10-Well Fotoplatte Sample Pack CELLview™ Slide, Greiner bio-one REF: 543999
- 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Invitrogen, #D1306
- 6-, 24-, 96-Well-Platten, Costar
- Antikörper donkey anti-rabbit IgG (H+L) Highly Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555, Thermo Fisher scientific
- *Aqua dest.*
- Atto488, Atto-Tec GmbH #AD488-101
- BSA (Rinderserumalbumin, Fraction V, 1 % (w/v)), Serva #11930
- Carbocyanin3 (Cy3), VWR prolabo® chemicals international S.A.S, #25-8010-86
- Caspase-Glo 3/7 Assay Promega, G8091
- CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent, Promega,
- CnT-Prime Epithelial Culture Medium, CellnTec
- Corning® BioCoat™ Collagen IV, 24 Wellplatte, fisher scientific, #354430
- Deckgläser 24x50mm, Greiner Bio-One
- Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM), Sigma Aldrich, REF 31885-023
- Dünnwandkanülen, 20g, 30g, Sterican®, Dünnwandkanülen, B.Braun Melsungen AG, ISO 7864 DIN 13097
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), Carl Roth, #205-358-3
- Eppendorf Save-Lock Tubes
- Fettstift, Dako Pen, Dako S 2002 #S200230-2
- Fluorsave™ Reagent, Calbiochem, #345789
- Fötales Kälberserum (FKS), GIBCO #10270
- Ham's F12 Nutrient Mix, Gibco #11765054
- Kristallviolettlösung, Sigma Aldrich,
- Lyse-Röhrchen, CK28 Lysing Kit, Herd Tissue Homogenizing, VWR
- Methanol, VWR # 20847.307
- Mucin-1, Rat/Pork/Human-MUC1, ELISA Kit, MyBioSource Inc, #MBS7220640, #MBS7246255, #MBS7201306
- Natriumdodecylsulfat (SDS), Sigma Aldrich
- Neubauer-Zählkammer, VWR
- Objektträger, Super Frost Plus. R. Langenbrinck, #030060
- Paraformaldehyd, Merck
- PBS (phosphatgepufferte Saline), gibco® by life technologies, #10010031
- Penicillin/Streptomycin, PAA, #P11-010

- Petrischalen, Greiner Bio-one
- Pipettenspitzen (1 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl), Greiner Bio-One
- Pipettierhilfe, accu-jet (Eppendorf)
- Polyklonaler CD227/Muzin-1 Antikörper, Acris, #AP10158PU-N
- Precellys® Keramik-Kit 5,0/2,8 mm, 'reinforced', 50× 2 ml Tubes (verstärkt), befüllt mit Keramik-Gemisch (VWR)
- *E*, ATCC® 10145GFP™
- Skalpell, Aesculap Division
- Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek, #4583
- Trispuffer, Sigma, #C4H11NO3
- TritonX-100, Sigma #9002-93-1
- Trypsin-EDTA 25 %, GIBCO, # 25200
- Tween 20 Polyocyethylen (20) Sorbitanmonolaurat, Molekularbiologie, Serva #3979601
- Zellkulturflaschen, Cellstar (250 ml), Greiner bio-one, #658 170

## 2.2 Geräte und verwendete Software

- Brutschrank Heraeus bad 6220, Thermo Scientific
- Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 imaging®), Zeiss
- GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc. San Diego, USA
- Kryostat CM1900, Leica
- Laminar flow Werkbank, Thermo Scientific
- Magnetrührer IKA COMBIMAG RCT
- Microplate Reader, BioTek, Synergy HT,
- Microsoft® Excel für Mac, Version 16.20
- Microsoft® Word für Mac, Version 16.16.5
- MultiMACS™ M96 Separator
- Openlab™ Software, Improvision C47HS
- Pipetten (2 µl, 5 µl, 10 µl, 25 µl 100 µl 2000 µl),
- Spectrophotometer Ultrospec 100, Fischer Scientific #80-2109-13

## 2.3 Lösungen

### 2.3.1 TAE-Puffer

Zur Herstellung des TAE-Puffer wurden 242 g Tris und 14,6g EDTA in 800 ml *Aqua dest.* vermengt und unter Verwendung eines Magnetrührers gelöst. Der Ziel-pH (8,0) wurde mittels Zugabe von Essigsäure eingestellt. Zuletzt wurde weiteres *Aqua dest.* hinzugegeben, bis ein Volumen von 1000 ml erreicht war.

### 2.3.2 TBS-Puffer

Zur Herstellung von 1000 ml TBS-Puffer (TBS 10x) wurden in einer Glasflasche 60,6 g Trispuffer, 87,7 g NaCl mit 900 ml *Aqua dest.* vermengt und unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers für etwa fünfzehn Minuten durchmischt. Der pH-Wert der Lösung wurde gemessen und mittels Titration von 25 % Salzsäure auf den Ziel-pH von 7,6 % eingestellt. Danach wurde die Menge mit *Aqua dest.* auf genau 1000 ml aufgefüllt. Der TBS-Puffer, der in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde dann 1:10 mit *Aqua dest.* verdünnt (TBS 1x). Um TBS-T Puffer herzustellen wurde 1ml Tween 20 (0,1 %) in den einfachen TBS Puffer pipettiert.

### 2.3.3 LB-Medium

Das LB-Medium wird zur Aufzucht und Kultivierung von Bakterien wie beispielsweise der *P. aeruginosa*, beschrieben in Kap. 2.5.8, verwendet. Die Zusammensetzung wurde bereits 1951 von Bertani et. al beschrieben [42]. Zur Herstellung eines Liters wurden 10 g Tryptone, 10 g NaCl, 5 g Hefe-Extrakt und 25mg Irgasan mit 900 ml *Aqua dest.* vermengt, gut durchmischt und auf 1000 ml aufgefüllt. Die Flaschen wurden vor weiterer Verwendung des Nährmediums autoklaviert.

### 2.3.4 Agarplatten

Um Bakterien auf einem festen Nährmedium kultivieren zu können, wurden Agarplatten hergestellt. Hierzu wurden 22,5 g Pseudomonas Isolation Agar und 10 ml Glycerol mit 500 ml *Aqua dest.* in einer Glasflasche vermischt und autoklaviert. Das Gemisch wurde unter einem Abzug in Petrischalen gefüllt. Durch Abkühlung auf Raumtemperatur entstand der gelförmige Nährboden in den Schalen, die bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert wurden.

## 2.4 Zellen

### 2.4.1 RGC-5 Zelllinie

Die RGC-5 Zelllinie ist von Herrn Prof. Neeraj Agarwal (UNT Health Science Center, Fort Worth, Texas, USA) zur Verfügung gestellt worden. Es handelt sich hierbei um retinaleneuronale Zellen. Ursprünglich wurde angenommen, dass diese Zellen aus der Ratte kommen was aber in üngerer Literatur widerlegt wurde. [43, 44].

### 2.4.2 Korneale Epithelzellen

Frische Epithelzellen wurden im Labor der Augenklinik in Tübingen, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, aus Schweinekornea isoliert.

## 2.5 Methoden

### 2.5.1 Herstellung der funktionalisierten Nanopartikel

Die lipidmodifizierten DNA-Einzelstränge, die zur Herstellung der Mizellen verwendet wurden, wurden von Wissenschaftlern des Instituts für Polymerchemie, (Zernike Institute for Advanced Materials) aus Groningen (Prof. Dr. Andreas Herrmann, Dr. Jan-Willem de Vries) zur Verfügung gestellt. Die Sequenz für die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (U4T-12) ist 5'UUUUGCGGATTC3'. Für die MUC-NP wurde in dieser Arbeit das MUC1-Aptamer mit der Sequenz 5'-GCAGTTGATCCTTTGGATACCCTGGTAG**GAATCCGCAAAA**-3' verwendet, welches das in Kapitel 1.1.2 beschriebene Protein als Zielstruktur bindet [45, 46]. Die fettgedruckten Basen sind für die Bindung des Aptamers an den NP verantwortlich. Die Beladung erfolgte dann in Tübingen. In ein Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf-Tube) wurden TAE-Puffer, NaCl (5M), MgCl<sub>2</sub> (1M) in Wasser (*Aqua dest.*) pipettiert. Die DNA-Einzelstränge und die komplementären Oligonukleotide, die zum Teil mit einem Fluoreszenzmolekül (Atto488) oder mit dem MUC1-Aptamer verknüpft waren, wurden hinzugegeben. Das genaue Herstellungsprotokoll der einzelnen Proben ist Tabelle 1 zu entnehmen. Die NP wurden unter Zuhilfenahme eines Temperaturgradienten hybridisiert. Nach einer Erhitzungsphase (30 Minuten bei 90 °C) folgte eine langsame Abkühlung auf -1 °C für 120 Sekunden, bis schlussendlich wieder Raumtemperatur erreicht wurde.

**Tabelle 1: Pipettierschema zur Herstellung der Proben für den Versuch 2.5.2. (Es wurden DNA-Nanopartikel (U4T), NP mit Muzin1-Aptameren (U4T-apt) und Muzin1-Aptamere, die nicht in einem Nanopartikel gebunden, jedoch direkt mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff (Atto488) verknüpft sind (MUCapt), in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Als Negativkontrolle wurden Ky2-NP verwendet (cU4T-Ky2 FAM), welche analog zum Muzin1-Nanopartikel (U4T-apt) hergestellt wurden.**

<i>Probe</i>		TAE (50x)	NaCl (5M)	MgCl <sub>2</sub> (1M)	U4T (2mM)	cU4T- Atto488 (1 mM)	cU4T- MUC1apt (1 mM)	aqua dest.	to tal
<b><i>U4T-apt 10 µM</i></b>	µl	1,6	3,2	1,6	2	2	2	27,6	40
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	100 µM	50 µM	50 µM	-	-
<b><i>U4T-apt 25 µM</i></b>	µl	1,6	3,2	1,6	5	5	5	18,6	40
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	250 µM	125 µM	125 µM	-	-
<b><i>U4T-apt 50 µM</i></b>	µl	1,6	3,2	1,6	10	10	10	3,6	40
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	500 µM	250 µM	250 µM	-	-
<b><i>U4T 10 µM</i></b>	µl	1,6	3,2	1,6	2	2	-	29,6	40
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	100 µM	50 µM	-	-	-
<b><i>U4T 25 µM</i></b>	µl	1,6	3,2	1,6	5	5	-	23,6	40
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	250 µM	125 µM	-	-	-
<b><i>U4T 50 µM</i></b>	µl	1,6	3,2	1,6	10	10	-	13,6	40
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	500 µM	250 µM	-	-	-
<b><i>MUCapt Atto 10 µM</i></b>	µl	1,6	3,2	1,6	-	2	-	31,6	40
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	-	50 µM	-	-	-
<b><i>MUCapt Atto 25 µM</i></b>	µl	1,6	3,2	1,6	-	5	-	28,6	40
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	-	125 µM	-	-	-
<b><i>MUCapt Atto 50 µM</i></b>	µl	1,6	3,2	1,6	-	10	-	23,6	40
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	-	250 µM	-	-	-

**Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung der Proben für den Versuch 2.5.3 und 2.5.4. Zur Vergleichskontrolle wurde in Versuch 2.5.4 ein Nanopartikel ohne MUC1-Aptamer hergestellt (U4T).**

<i>Probe</i>		TAE (50x)	NaCl (5M)	MgCl <sub>2</sub> (1M)	U4T (2mM)	cU4T- Atto488 (1 mM)	cU4T- MUC1apt (1 mM)	Was- ser	to- tal
<b>U4T-apt 10 20µM</b>	µl	0,8	1,6	0,8	2	2	2	190,8	200
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	20 µM	10 µM	10 µM	-	-
<b>MUCapt Atto 20 µM</b>	µl	1,6	3,2	1,6	-	-	4	192,8	200
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	-	-	40 µM	-	-
<b>U4T Atto 20 µM</b>	µl	1,6	3,2	1,6	2	2		192,8	200
	Endkonzentration	0,2 X	40 mM	4 mM	20 µM	10 µM		-	-

### Lipid-Nanopartikel

Die lipidmodifizierten Aptamere für diese Arbeit wurden ebenfalls von Kooperationspartnern aus Groningen (Prof. Dr. Andreas Herrmann, Dr. Jan-Willem de Vries, Qing Liu) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die alkylmodifizierten 2'-Desoxyuridin-Nukleotide (U), welche zur lipidmodifikation der Aptamere verwendet wurden (vgl. Kapitel 1.4.2 Abbildung 6), wurden nach einem veröffentlichten Procedere hergestellt [47]. Diese wurden mit den jeweiligen Aptameren verknüpft. Die Mizellen wurden dann wieder in Tübingen beladen.

**Tabelle 3: Pipettierschema zur Herstellung der Lipid-NP für die Versuche 2.5.3 und 2.5.4. Es wurden Aptamere für das Antibiotikum Kanamycin, Brimonidin und Travoprost verwendet. Letztere sind Wirkstoffe, die in der Glaukomtherapie verwendet werden.**

<i>Probe</i>		TAE (50x)	NaCl (5M)	MgCl <sub>2</sub> (1M)	U4T (2mM)	cU4T- Atto488 (1 mM)	cU4T- MUC1apt (1 mM)	Was- ser	total
<i>Lipid-NP Ka- namycin 20 µM</i>	µl	0,6	1,2	0,6	125	-	-	22,6	150
	Endkon- zentration	0,2 X	40 mM	4 mM	20 µM	-	-	-	-
<i>Lipid-NP Brimoni- din 20 µM</i>	µl	1,6	3,2	1,6	-	37,04	-	110,56	150
	Endkon- zentration	0,2 X	40 mM	4 mM	-	20 µM	-	-	-
<i>Lipid-NP Tra- voprost 20 µM</i>	µl	1,6	3,2	1,6	-	-	68,18	79,42	150
	Endkon- zentration	0,2 X	40 mM	4 mM	-	-	20 µM	-	-

**IApt<sup>Kan</sup> 5'-UUUUTTTGGGGGTTGAGGCTAAGCCGA-3'**

**IApt<sup>Bri</sup> 5'-UUUUTAGTGGCACTACTGGTACTAGTGTCGCGATGCCA-3'**

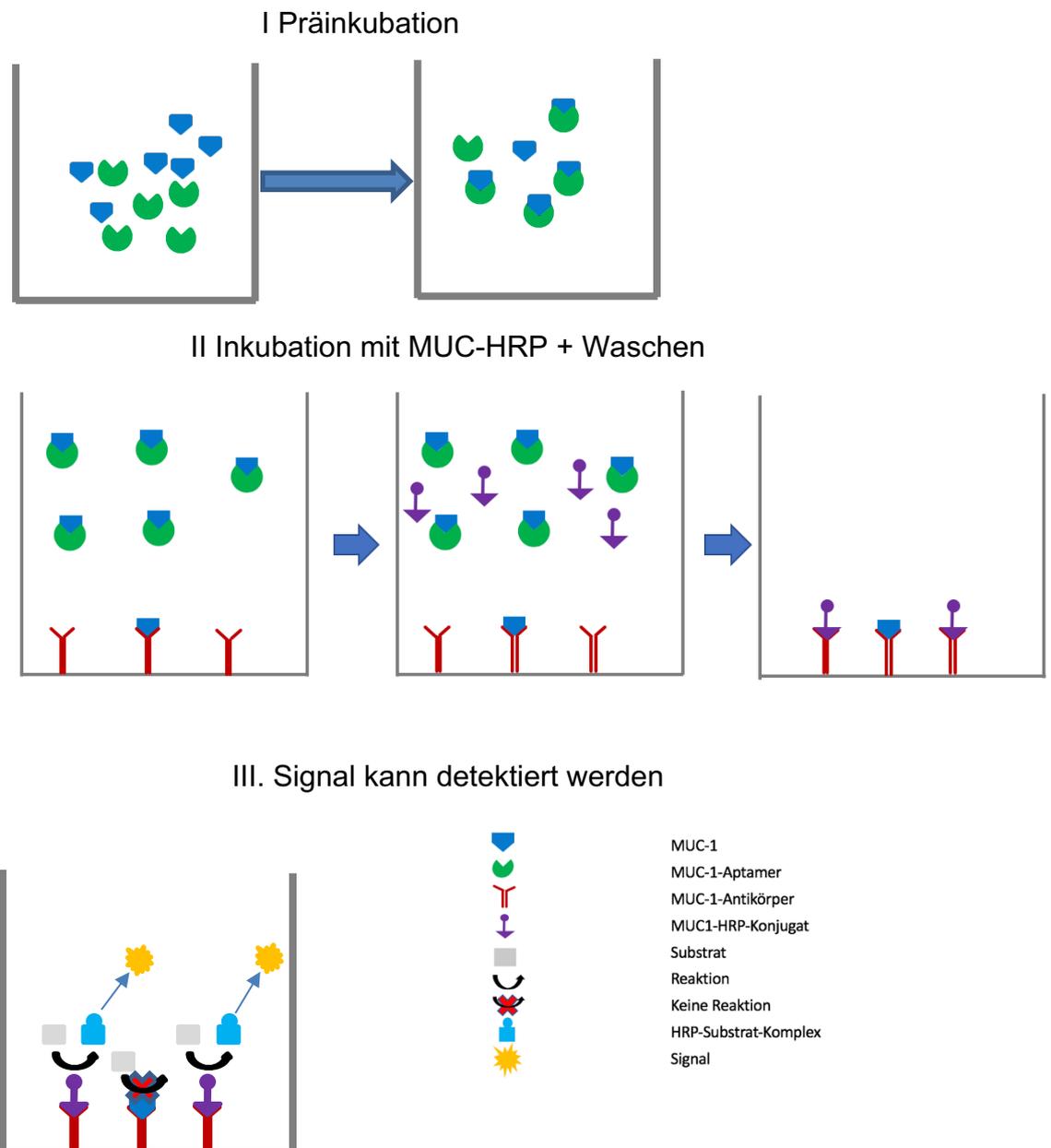
**IApt<sup>Tra</sup> 5'-UUUUGATGGTGAACAGGGATATAGTGAATATAAATAAAGTAATTGG-3'**

**Abbildung 9: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Aptamere für Kanamycin, Brimonidin und Travoprost**

### 2.5.2 Evaluation des MUC1-Aptamers

Nach der Herstellung der MUC1-Aptamere wurde ein ELISA-Test durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay, bei dem mehrere Moleküle um einen Bindungsplatz konkurrieren (Kompetition). Vorbereitend wurden die Aptamere und die Reagenzien aus den Kits auf Raumtemperatur gebracht, verdünnt und dem Schema entsprechend pipettiert (vgl. Tabelle 2). Das zu untersuchende MUC1-Aptamer wurde dann in verschiedenen Konzentrationen (vgl. Tabelle 4) für 60 Minuten und bei 37 °C mit dem MUC1-Protein vorinkubiert (vgl. Abbildung 10 I). Danach wurden die vorinkubierten Proben in die Kammern einer mit MUC1-Antikörpern beschichteten 96-Well-Platte gegeben und wieder für 60 Minuten und bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde MUC1-

HRP, ein mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltes Antikörperkonjugat, welches ebenfalls an den MUC1-AK auf dem Plattenboden bindet, hinzugefügt. Genauer wurden 50 µl pro Well pipettiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Weiter wurde jedes Well fünffach mit der im Kit enthaltenen Waschlösung gewaschen (vgl. Abbildung 10 II). Der nächste Schritt bestand in der Zugabe eines Substrates, welches in Anwesenheit des an den vom MUC-1 Antikörper gebundenen MUC-HRP-Komplex auf dem Plattenboden, zu einem blauen Komplex reagiert. Genauer wurden hiervon 100 µl pro Well zugegeben und für fünfzehn Minuten inkubiert. Schlussendlich wurden 50 µl Stop-Lösung pro Well zugefügt, die die Reaktion beendet und den blauen Komplex in einen gelben Komplex umgeformt hat (vgl. Abbildung 10 III). Die Intensität der Fluoreszenz dieses gelben Farbstoffes konnte mit dem Microplate Reader gemessen werden.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des kompetitiven ELISA-Tests. Wird im ersten Schritt viel MUC-1 vom Aptamer gebunden und somit ausgewaschen, kann das MUC1-HRP-Konjugat im zweiten Schritt an den MUC-1 Antikörper auf dem Plattenboden binden. Im dritten Schritt setzt dieses ein Substrat um, welches flourophotometrisch detektiert werden kann.**

Somit konnten wie folgt Rückschlüsse auf die Bindungsaffinität des Aptamers zum MUC1-Molekül gezogen werden. Die Stärke der gemessenen Fluoreszenz ist proportional zur Anwesenheit von MUC1-HRP. Im ersten Schritt (der Vorinkubation von MUC1 und dem MUC1-Aptamer) bindet das Aptamer an das Muzin, welches sich bei ausbleibender oder unzureichender Bindung an das Aptamer auf den Antikörper setzen würde, der sich auf dem Plattenboden befindet. Wird das Muzin aber im ersten Schritt vom Aptamer gebunden und in den Waschschrritten ausgewaschen, bleiben viele Bindungsstellen auf dem Plattenboden frei, auf die sich im zweiten Schritt das MUC1-HRP-Konjugat setzen kann. Die bei der Fluoreszenzmessung gewonnene Information über die Anwesenheit von MUC1-HRP ist folglich proportional zur Bindungsaffinität des Aptamers, was in diesem Versuch in mehreren Konzentrationen getestet wurde. Es wurden ELISA-Kits der Firma My Biosource verwendet und Tests mit MUC1-Aptameren vom Schwein, von der Ratte und humaner Herkunft durchgeführt (siehe Kapitel 2.1). Aus den in der Messung gewonnenen Werten wurde mithilfe Microsoft Excel eine Grafik erstellt, die anschaulich Bindungsaffinitäten der jeweiligen Aptamere zum Muzin darstellt (vgl. Abbildung 12).

**Tabelle 4: Die Aptamere wurden auf ihre Bindungsaffinität zu Ratten- und Schweine-MUC1 getestet. Zur Kontrolle wurde humanes MUC1 verwendet. Dieses wurde in aufsteigender Konzentration in die Wells pipettiert. Standard C (Stand.C) entspricht MUC1 in der Konzentration 1 ng/ml.**

**Pipettierschema kompetitiver Immunoassay MUC1-Aptamer**

<b>Mensch</b>	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 0,1ng/ml	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 0,1ng/ml	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 10ng/ml	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 10ng/ml
<b>Ratte</b>	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 0,1ng/ml	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 0,1ng/ml	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 10ng/ml	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 10ng/ml
<b>Schwein</b>	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 0,1ng/ml	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 0,1ng/ml	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 10ng/ml	-50 µl Stand. C -50 µl Apt. 10ng/ml

### 2.5.3 In-vitro-Studien

#### Isolieren der Epithelzellen

Limbusstammzellen wurden aus dem Kornearand von enukleierten Schweineaugen isoliert und in Zellkulturflaschen mit DMEM/F12 + *CnT-Prime Epithelial Culture Medium* zu kornealen Epithelzellen gezüchtet. Dazu wurden die Augen für ca. zwei bis drei Minuten in Jodlösung desinfiziert und anschließend in PBS gewaschen. Die Kornea wurde mit einem Skalpell und einer Präparationsschere herausgelöst und von Pigmentresten befreit. Der Kornearand wurde präpariert und in ca. 1 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten. Diese wurden auf Kollagen-beschichtete Platten verteilt und mit 300-500 µl Medium versetzt. Nach drei Tagen wurde ein Teil des Mediums mit den sich darin entwickelten Zellen in Zellkulturflaschen umgefüllt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und 300 µl Trypsin/EDTA (T/E) pro Well zugegeben und anschließend abgesaugt. Nach erneuter Zugabe von 50 µl Trypsin/EDTA und vorsichtigem Klopfen wurden die Zellkulturflaschen für fünf

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 300 µl Nährlösung zum Neutralisieren zugegeben, sodass die Zellen in die oben beschriebenen Flaschen umgefüllt werden konnten.

### Kultivieren und Aussäen der Zellen

Die RGC-5-Zellen wurden in Cellstar 250 ml Zellkulturflaschen mit dem entsprechenden Medium (DMEM + 1 % P/S, + 5 % FKS) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Die kornealen Epithelzellen wurden analog hierzu mit oben genanntem Medium aufgezüchtet. Um die gleiche Anzahl von Zellen im Versuch zu erhalten, wurde das Medium vorsichtig und unter einer sterilen Werkbank mit einer Glaspipette entnommen. Nach einem Waschgang mit 20 ml PBS, der über den Zellrasen pipettiert und anschließend abgesaugt wurde, wurden die am Flaschenboden festsitzenden Zellen durch Zugabe von 2000 µl 0,25 % Trypsin-EDTA und leichtes Klopfen gelöst. Dies wurde optisch unter einem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Zellkonzentration wurde mittels der Neubauerzählkammer ermittelt, sodass die erforderliche Menge an Medium für die gewünschten 10.000 Zellen pro Well (100 µl) zur Aussaat in der CELLview™ Fotoplatte per Dreisatz ausgerechnet werden konnte. Die restlichen Zellen wurden in einer neuen Zellkulturflasche und 18 ml neuem Medium im Brutschrank inkubiert.

## MUC-NP auf Zellen

Die, wie in Tabelle 1 aufgeführt, hergestellten Proben wurden im Verhältnis 1:5 (32 µl Probe + 128 µl Medium) verdünnt. Überschüssiges Medium in den Wells der CELLview™ Fotoplatte wurde abgesaugt. Hiernach sind jeweils 75 µl der verdünnten Proben auf die Zellen pipettiert worden. Nach einer dreißigminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und dreimaligem Waschen der Wells mit je 200 µl PBS wurden die Zellen auf dem Glasboden der Fotoplatte für zehn Minuten mit -20 °C kaltem Methanol fixiert. Der Deckel der Platte wurde nach der Fixierung abgenommen. Die auf dem Reagenzglas fixierten Zellen wurden gefärbt und unter dem Mikroskop untersucht.

### **2.5.4 Ex-vivo-Studien**

#### NP-Augentropfen auf Schweineaugen

Die enukleierten Schweineaugen wurden durch Frau Dr. Nathalie Quindt vom Schlachthof eG Landkreis Böblingen in Gärtringen zur Verfügung gestellt und in Tübingen bis zur Verwendung bei 4 °C in TBS gelagert. Nach einem Waschgang in TBS wurden die Augen in Petrischalen so positioniert, dass die Kornea nach oben ausgerichtet war. Um das Abfließen der Reagenzien auf der gewölbten Oberfläche zu verhindern, wurden Gummiringe verwendet, die in der Mitte und um die Kornea platziert wurden. Jeweils 15 µl der jeweiligen 20 µm Probe (vgl. Tabelle 2) wurde auf die Kornea pipettiert. Nach einminütiger Inkubationszeit wurden die Augen 5-60 Minuten in TBS-Puffer gewaschen, in Tissue-Tek eingebettet, mit Flüssigstickstoff schockgefroren und dann bei -20 °C gelagert.

### **2.5.5 In-vivo-Studien**

#### NP-Augentropfen auf lebenden Ratten

Die Studien an lebenden Ratten (*Rattus norvegicus forma domestica*, Lister Hooded) wurden im Tier-OP der Augenklinik Tübingen durchgeführt. Alle Tierversuche wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Entsprechende Tierversuchsgenehmigungen wurden zuvor vom Regierungspräsidium Tübingen (AK 3/11 und AK1/15) eingeholt.

Die vorbereiteten Proben (vgl. Tabellen 2, 3) wurden auf die Augen der kurz fixierten Ratten getropft. Der Lidschlag der Versuchstiere wurde weder beim Tropfen noch während der Inkubationszeit verhindert. Nach der Inkubationszeit (5-120 Minuten in der die Ratten wieder zurück in ihren Käfig gesetzt wurden, wurden sie mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet. Die Augen wurden entnommen, in Tissue-Tek eingebettet und mittels Flüssigstickstoff schockgefrostet und bei -20 °C aufbewahrt.

### **2.5.6 Anfertigung von Dünnschnitten am Kryostat**

Die Gewebsblöcke aus in Tissue-Tek eingebetteten Augen (Kapitel 2.5.3, 2.5.4) wurden in den Kryostaten eingespannt. Es wurden 12 µm dünne Schnitte der Hornhaut angefertigt und auf Objektträger aufgenommen. Pro Auge wurden zehn Objektträger verwendet, auf denen die Schnitte so platziert wurden, dass auf jedem Objektträger Schnitte aus unterschiedlichen Schichten untersucht werden konnten. Bei Schweineaugen wurden je zwei bei Rattenaugen je vier Schnitte auf einen Objektträger aufgenommen.

### **2.5.7 Histologische Färbungen**

#### Muzinfärbung

Mittels immunhistochemischen Färbungen können Proteine und andere Moleküle sichtbar gemacht werden. Antikörper, die spezifisch an eine im Interesse stehende Struktur binden, können direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sein (direkte Immunfluoreszenz) oder, wie in dieser Studie, an einen Zweitantikörper binden, der dann mit dem Fluoreszenzmolekül markiert ist (indirekte Immunfluoreszenz) [48]. Die Zielstruktur des primären Antikörpers war das MUC1 Protein der kornealen Epithelzellen und der histologischen Schnitte. Alle Proben wurden während der Inkubationszeiten mit einem schwarzen Tuch überdeckt, um einen Fluoreszenzverlust der Farbstoffe zu verhindern. Die Objektträger mit den Proben wurden zunächst für zehn Minuten in eiskaltem Methanol fixiert und für einen kurzen Moment an der Luft getrocknet. Hiernach folgte ein zehnminütiger Waschgang mit TBS. Die Proben wurden danach für 60 Minuten mit 5 % BSA geblockt und über Nacht mit dem verdünnten Primärantikörper (vgl. Tabelle 1) bei 4 °C inkubiert.

**Tabelle 5: Verdünnung der verwendeten Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Art/Herkunft</b>	<b>Verdünnung in 5 % BSA in PBS</b>
<b>1.AK MUC1</b>	Kaninchen	1:100
<b>2.AK Alexa 555</b>	Donky anti rabbit IgG	1:2.000

Am folgenden Tag wurde der überschüssige Erstantikörper abgesaugt. Nach drei fünfminütigen Waschgängen mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem verdünnten Zweitantikörper für 120 Minuten bei Raumtemperatur. Hiernach folgte die DAPI-Färbung welche im folgenden Abschnitt beschrieben ist.

#### 4'6-Diamidin-2-phenylindol Färbung

4'6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich in Adenin- und Thymin-reichen Regionen der DNA anlagert. Er wird in der Fluoreszenz- und konfokalen Mikroskopie verwendet, um Zellkerne darzustellen [49]. Bei der DAPI-Färbung werden die Schnitte ebenfalls zehnminütig in eiskaltem Methanol fixiert, luftgetrocknet und für weitere zehn Minuten mit TBS gewaschen. Bei vorheriger, wie oben beschriebener Muzinfärbung, entfiel die erneute Fixierung 0,2 µg/ml DAPI in TBS (DAPI Stock) wurde zuvor in der Konzentration 1:100 mit TBS verdünnt und dann vorsichtig auf die Objektträger pipettiert. Nach einer kurzen Inkubationszeit von etwa ein bis zwei Minuten, wurden die Proben achtsam gekippt, um das DAPI zu entfernen, zweimal mit TBS und ein drittes Mal mit destilliertem Wasser (*Aqua dest.*) gewaschen. Zuletzt wurden alle gefärbten Proben mit Fluorsave Reagent benetzt und einem Deckglas versehen. Sie konnten somit am nächsten Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

### 2.5.8 Untersuchung der Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop

Der Begriff Fluoreszenz beschreibt die Absorption kurzwelligigen Lichts (ca. 380-720 nm) mit nachfolgender Aussendung (Emission) von langwelligerem Licht. Die in den Versuchen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich durch auswechseln von Filtern, die die durchquerende Strahlung abhängig von der Wellenlänge abschwächen (Extinktion), getrennt nachweisen [50]. An dem Axioplan 2 Mikroskop wurden die Schnitte bei unterschiedlichen Vergrößerungen (50x-400x) vorerst durch einen DAPI-Filter bei einer Wellenlänge von 400 nm määndert, um eine übersichtliche Darstellung der Zellkerne zu erhalten. Der Farbstoff DAPI wird eingesetzt um DNA zu markieren, die sich in den Zellkernen befindet [51]. Um die mit dem grün fluoreszierenden Atto488 gekoppelten Nanopartikel zu detektieren, wurde ein FITC-Filter (520 nm) verwendet, der den grünen Farbstoff Fluoriscin sichtbar machen kann. Für die rot fluoreszierenden Sekundärantikörper der Muzinfärbung wurde ein Cy3-Filter (560 nm) verwendet, der den roten Fluoreszenzfarbstoff Carbocyanin-3 (Cy3) sichtbar macht. Mit der Openlab Imposition Software konnten Aufnahmen der Proben gemacht und bearbeitet werden. So konnten Ratings erstellt werden, in denen die Adhäsion der verschiedenen Proben verglichen wurden (vgl. Tabellen 7-9).

### 2.5.9 Wirksamkeitsstudie Kanamycin-NP

Die bis zu dieser Stelle beschriebenen Versuche sollten die Adhäsion der Nanopartikel am Auge untersuchen. Um auch deren Wirksamkeit zu überprüfen, wurden die folgenden Experimente durchgeführt

#### Lipid-Kanamycin-NP auf Bakterien

*Escherichia Coli* Bakterien (*E. coli*) wurden in LB-Medium im Brutschrank (37 °C) kultiviert. Vor Versuchsstart wurde die optische Dichte der Bakterienkultur spektrophotometrisch gemessen und durch Verdünnen mit weiterem LB-Medium auf den Zielwert von  $OD_{600}=0.1$  gebracht. Die Probe wurde in eine 96-Wellplatte verteilt (200µl/Well). Hiernach wurde der mit Kanamycin beladene Lipidnanopartikel so zugegeben, dass in den Wells Endkonzentrationen von null bis zwölf µM vorlagen. Zur Vergleichskontrolle wurde freies Kanamycin in den gleichen Konzentrationen in zwölf weiteren Wells pipettiert. Die optische Dichte aller Proben in der 96-Wellplatte wurde alle fünf Minuten über einen Zeitraum von fünf Stunden gemessen. Um den Zustand der Studie in Anwesenheit von Tränenflüssigkeit zu imitieren, wurde das Procedere zusätzlich unter Zugabe von zwei µl DNase Lösung (10 mg/ml) durchgeführt [52].

## Wirksamkeitsstudie Kanamycin-NP auf Schweinekornea

Hornhäute wurden aus enukleierten Schweineaugen mit Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1) infiziert und darauffolgend mit verschiedenen Kanamycin-NP und freiem Kanamycin behandelt. Der Versuch mit den infektiösen Bakterien fand unter einer sterilen Werkbank statt, die während der Versuchszeit ausschließlich hierfür verwendet wurde.

### Kultivieren der Bakterien und Infektion

Die *P. aeruginosa*-Keime wurden über Nacht und bei 37 °C im Brutschrank in LB-Medium kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde die optische Dichte mit dem Spektrophotometer gemessen und mittels Zuführens von weiterem Medium auf den Zielwert ( $OD_{600nm}=0,3-0,6$ ) gebracht. Die Schweineaugen wurden zuerst in PBS gewaschen. Hiernach wurde die Hornhaut mit einem scharfen Skalpell und einer chirurgischen Schere abpräpariert. Mittels einer runden Stanze konnten fünfzehn definierte, gleichgroße Stücke aus der Kornea angefertigt werden. Zwölf Stücke wurden auf den Boden einer 24-Well Platte mit jeweils 300 µl Medium (DMEM) gelegt und mit 30 µl der *P. aeruginosa*-Lösung infiziert. Weitere drei Stücke wurden zur Negativkontrolle uninfiziert in den Wells belassen. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank von 24-48 Stunden bei 37 °C.

### Behandlung mit Kanamycin und IApt<sup>Kan</sup>

Jeweils drei der ausgestanzten Hornhäute wurden mit derselben Probe (Kanamycin-Lipid-NP, Kanamycin-NP, Kanamycin, Kontrollpuffer) behandelt. Hierzu wurde das Medium im jeweiligen Well abgesaugt und 50 µl der Probe auf die Hornhautoberfläche pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten folgten drei Waschgänge mit jeweils einem ml PBS pro Well. Dieses Procedere wurde dreimal im Abstand von drei Stunden an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Nach der letzten Behandlung wurden die Gewebeproben aus der 24-Wellplatte entnommen und mit jeweils 400 µl PBS-Puffer in ein Precellys® Keramik Tube überführt. Die Bakterien wurden bei Raumtemperatur und 1400 rpm für 20 Minuten aus dem Gewebe ausgewaschen. Aus dem Überstand wurde darauffolgend eine Verdünnungsreihe in PBS hergestellt (1:10-10<sup>7</sup>). Daraus wurden dann jeweils zwei mal zehn µl aus jeder Verdünnung auf eine Agarplatte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit der Platten von 24-48 Stunden folgte das

Auszählen der Bakterienkolonien auf den Platten. Hierbei wurde in der Verdünnung gezählt, in der es am besten möglich war, die Kolonien zu bestimmen.

### **2.5.10 Toxizitätsstudien**

Die neuen Lipid-NP wurden in zwei Experimenten auf ihre Zytotoxizität auf korneale Epithelzellen untersucht. Die DNA-NP sind aufgrund von bereits zuvor veröffentlichten Arbeiten als unbedenklich einzustufen [38].

#### MTS Viabilitätstest

MTS ist ein Molekül, welches in Anwesenheit vitaler Zellen enzymatisch zu Formazan reduziert wird, welches bei 490 nm photometrisch detektiert wird [53]. Mit dem MTS-Test können vitale Zellkulturen folglich quantitativ erfasst bzw. der zytotoxische Effekt einer Probe messbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde der MTS-Viabilitätstest mithilfe CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit durchgeführt. Die wie in Kapitel 2.4.2 kultivierten Epithelzellen wurden dazu für 120 min Minuten bei 37 °C mit den Nanopartikeln in einer 96-Wellplatte ( $1 \times 10^5$  Zellen/ml) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Kontrolle wurden weitere Zellen mit TBS behandelt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden wurden je 20 µl CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Reagenz in ein Well gegeben. Nach 90 Minuten erfolgte dann die photometrische Absorptionmessung mit dem *Mutli-Mode and Absorbance Reader* der Firma Biotek. Zur Korrektur unspezifischer Hintergrundphänomene wurde eine weitere Messung bei 690 nm durchgeführt. Die Menge an nachgewiesenem Formazan in den Proben mit den NP-versetzten Zellen wurde mit der, der lediglich mit TBS-Puffer behandelten Zellen, verglichen. Da die Menge an nachgewiesenem Formazan verhältnisgleich zur Zellaktivität der Epithelzellen ist, kann auf deren Vitalität geschlossen werden. Verminderte Formazanbildung infolge einer Zellschädigung würde auf Zytotoxizität der getesteten NP hinweisen.

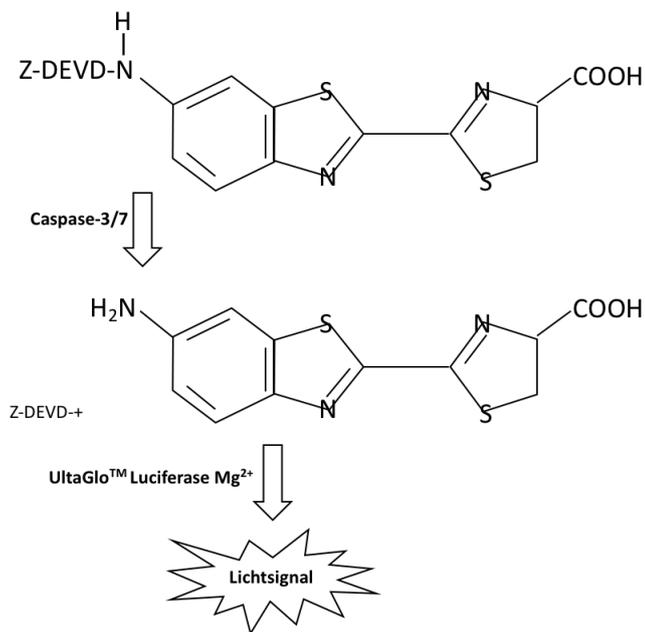
#### Kristallviolett färbung

Kristallviolett ist ein violetter Triphenylmethanfarbstoff, der die Eigenschaft hat, an Proteine und DNA vitaler Zellen zu binden. Bei adhärent wachsenden Zellen kann die Zellzahl mittels der Kristallviolett färbung bestimmt werden. Untergegangene Zellen verlieren ihre Adhärenz zum Plattenboden, werden nicht angefärbt

und in Waschgängen entfernt. Das Ausmaß der Färbung wird photometrisch gemessen. Somit können Rückschlüsse auf die Anzahl vitaler sowie zugrunde gegangener Zellen gezogen werden [54-56]. Unmittelbar nach dem oben beschriebenen MTS Viabilitätstest wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit Paraformaldehyd (4 % in PBS, 100 µl pro Well) fixiert und über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen dreimalig gewaschen (200 µl *Aqua dest.* pro Well), mit 100 µl Kristallviolettlösung angefärbt und nach weiteren drei Waschgängen mit je 200 µl *Aqua dest.* für eine Stunde mit 100 µl SDS pro Well inkubiert. Die Messung der Absorption wurde bei 595 nm Wellenlänge mit dem Microplate Reader gemessen.

### Caspase 3/7-Assay

Caspasen (cysteiny-aspartate specific protease) spielen eine ausschlaggebende Rolle bei apoptotischen Vorgängen in Zellen [57]. In einer Aktivierungskaskade werden die Effektorcaspasen 3 und 7 von Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10 wirksam gemacht und können im Caspase-Assay nachgewiesen werden [58]. In dieser Arbeit wurde das Caspase-Glo 3/7 Assay Kit von Promega verwendet. Hierbei wird initial eine Zelllyse ausgelöst, sodass die Caspasen freigesetzt werden. Anschließend wird Z-DEVD-Aminoluziferin hinzugefügt, welches einen Angriffspunkt für die Caspasen 3 und 7 darstellt. Das Aminoluziferin wird von der Tetrapeptidsequenz DEVD abgespalten und erzeugt in einer weiteren Reaktion mit „UltraGlo™ Luciferase“ und  $Mg^{2+}$  ein nachweisbares Lichtsignal.



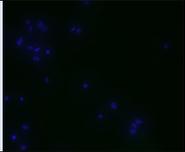
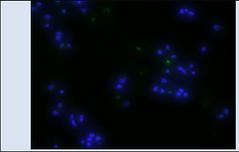
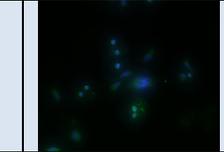
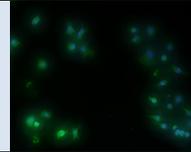
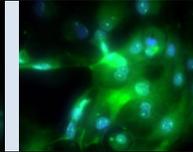
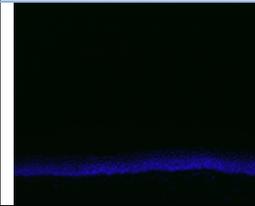
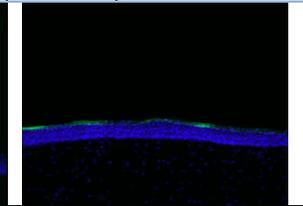
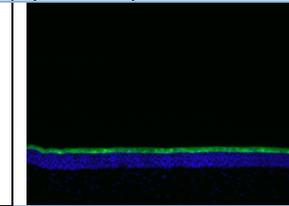
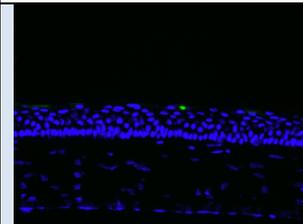
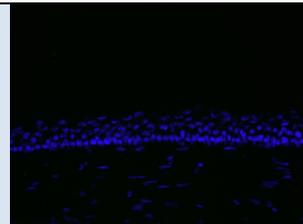
**Abbildung 11: Schematische Darstellung des Caspase 3/7 Assay [59]**

RGC-5-Zellen wurden wie in Kapitel 2.5.2 in 96-Wellplatten ausgesät ( $10^4$  Zellen pro Well) und mit der jeweiligen NP, Staurosporin oder Pufferlösung behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde nach Herstellerprotokoll je 100  $\mu$ l CaspaseGlo 3/7 Reagenz zugegeben. Die Proben wurden leicht geschüttelt. Nach drei Stunden Inkubationszeit wurde die Lumineszenz gemessen, welche proportional zur Caspaseaktivität ist. Zur Nullkontrolle diente eine weitere Probe, die lediglich aus Zellkulturmedium bestand.

### 2.5.11 Adhäsionsversuche

Die gefärbten Schnitte der Versuche aus Kapitel 2.5.2 bis 2.5.4 wurden, wie in 2.5.7 beschrieben, unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Nach sorgfältiger optischer Kontrolle aller angefertigter Proben, wurden die Schnitte in Bewertungsschemata eingeordnet (vgl. Tabelle 6).

**Tabelle 6: Die Objektträger aus den Adhäsionsversuchen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und in Bewertungsschemata eingeordnet. Proben, bei denen kein Messwert erhoben wurde, wurden mit einem – gekennzeichnet.**

Auswertung der Adhäsionsversuche					
<b>In vitro</b>			Die Zellproben wurden nach Menge der NP (grüne Fluoreszenz auf den Schnitten) in 5 Kategorien zugeordnet.		
Kategorie	0 Keine NP detektierbar	+ Zellrasen schwach (1-10%) bedeckt	+	++	+++
			Zellrasen mäßig (11-33%) bedeckt	Zellrasen stark (34-66%) bedeckt	Zellrasen sehr stark (66-90%) bedeckt
Beispiel					
<b>Ex vivo</b>			Die histologischen Schnitte wurden nach Menge der NP (grüne Fluoreszenz auf den Schnitten) auf dem Korneaepithel in 3 Kategorien zugeordnet.		
Kategorie	0 keine NP (0%) detektierbar	-+	+		
		Epithel teilweise ( $\leq$ 100 %) bedeckt	Epithel lückenlos (100 %) bedeckt		
Beispiel					
<b>In vivo</b>			Die histologischen Schnitte wurden bei Vorhandensein von NP als positiv und bei Ausbleiben von NP als negativ gewertet. Die Darstellung erfolgte im Bruch (A/B) mit A = positives und B = getestetes Auge.		
Kategorie	Vorhanden		Nicht vorhanden		
Beispiel					

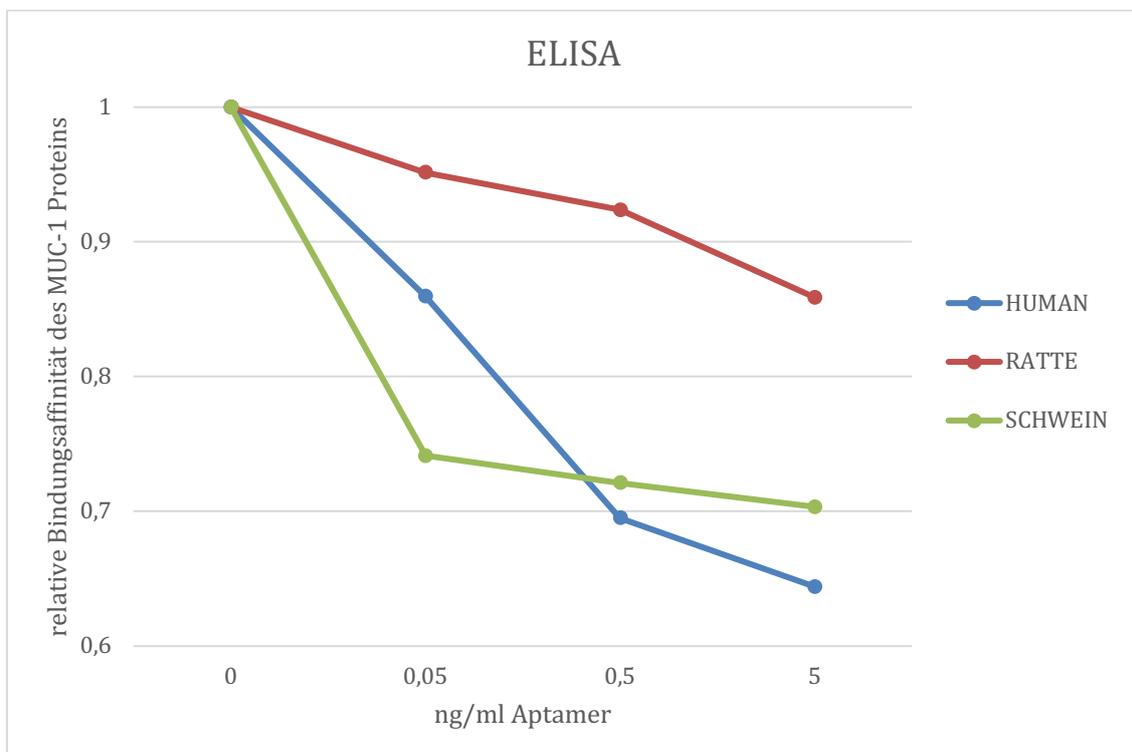
### **2.5.12 Statistische Auswertung der Wirksamkeits- und Toxizitätsstudien**

Zur statistischen Auswertung der in den Versuchen 2.5.8 und 2.5.9 gewonnenen Daten wurde Microsoft® Excel für Mac OS X (Version 15.36), Microsoft Word für Mac OS X (Version 16.23) und Graphpad Prism7 for Mac OS X Version 7.0c 2017 verwendet. Mittels ANOVA und anschließendem Tukey- bzw. Dunnet-Test konnten statistisch signifikante Unterschiede der gemessenen Proben zur Kontrolle bzw. der gemessenen Proben untereinander ermittelt werden. Als statistisch signifikant wurden ein p-Wert von  $\leq 0,05$  angenommen. Mithilfe der Software wurden Mittelwerte berechnet und Graphen erstellt, in denen die Daten als Mittelwerte mit Fehlerindikatoren (Standardabweichung) dargestellt sind. Für die Versuche in 2.5.9 wurden pro Lipid-NP und Kontrolle fünf oder sechs (n=5-6) Ansätze durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Evaluation des MUC1-Aptamers

Zunächst wurde die Bindungsaffinität des MUC1-Aptamers zum MUC1-Protein aus Ratte und Schwein mithilfe eines kompetitiven Immunoassay (ELISA-Test) evaluiert. Zur Kontrolle diente ein weiterer ELISA-Test mit humanem MUC1. Die Bindungskurven zeigen die relative Bindungsaffinität des MUC1-Proteins in Abhängigkeit zur Aptamerkonzentration. In allen drei Versuchsansätzen fällt eine konzentrationsabhängige Bindungsaffinität des Proteins auf. Die Schweine- und Humanproteine interagieren stärker mit MUC1-Aptamer als das Protein aus der Ratte. Mithilfe der aus diesem Experiment gewonnenen Daten konnte die Affinität des Aptamers zu Muzin bestätigt werden. Die Aptamere konnten weiter in Zell- und Tierversuchen getestet werden.



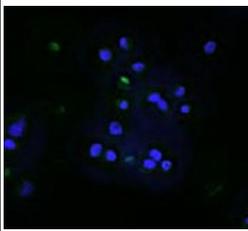
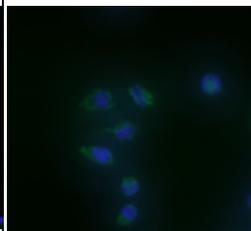
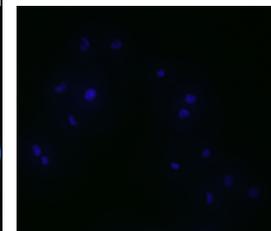
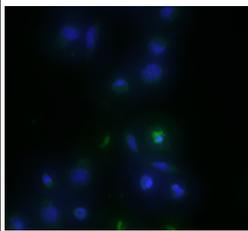
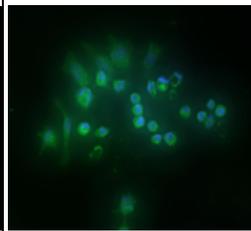
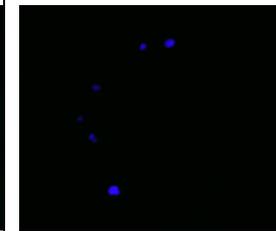
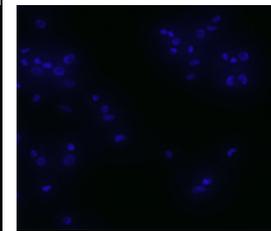
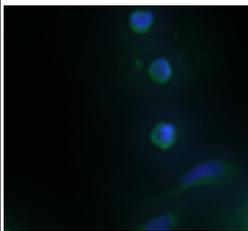
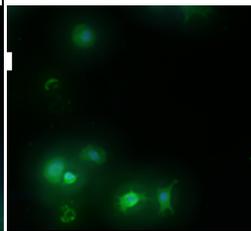
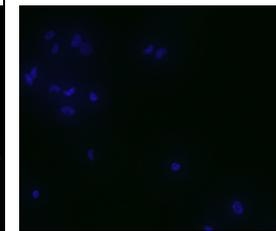
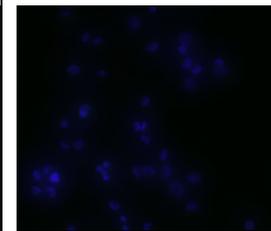
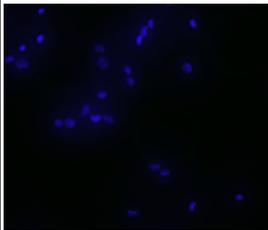
**Abbildung 12:** Mithilfe des kompetitiven ELISA-Tests konnte die Bindungsaffinität der MUC1-Aptamere zu MUC1 aus Ratte und Schwein evaluiert werden. Zur Kontrolle wurde ein weiterer ELISA-Test mit humanem MUC1 durchgeführt. Auf der X-Achse ist die relative Bindungsaffinität des Proteins, auf der Y-Achse die Konzentration des Aptamers aufgetragen.

## **3.2 Adhäsion**

Sowohl der mit dem Muzinaptamer beladene NP als auch das MUC1-Aptamer selbst wurden getestet. Zur Autofluoreszenzkontrolle wurden Zellen lediglich mit DAPI gefärbt. Um Aussagen über die Bindungsaffinität des mit dem Muzinaptamer verknüpften NP machen zu können, wurde dieses in verschiedenen Konzentrationen und im Vergleich zum unmodifizierten DNA-NP (U4T) getestet. Das MUC1-Aptamer selbst wurde ebenfalls auf die Zellen gegeben, um auszuschließen, dass der Bindungscharakter allein vom NP ausgeht. Zur Kontrolle wurde ein mit einem anderen Aptamer verknüpfter Nanopartikel (cU4T-Ky2) auf die Zellen gegeben. U4T-apt zeigte die im Vergleich zu den anderen Proben besten Adhäsionseigenschaften, wobei der NP selbst (U4T) ebenfalls gut an den Zellen haften blieb (vgl. Abbildung 13).

### **3.2.1 MUC-NP auf RGC-5-Zellen**

Die Auswertung des Versuchs erfolgte, wie in 2.5.8 beschrieben, am Fluoreszenzmikroskop. Mithilfe verschiedener Filter (DAPI, FITC, Cy3), die auf die Wellenlängen der verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe abgestimmt sind, konnten die zuvor gefärbten Zellkerne sowie die markierten Nanopartikel sichtbar gemacht werden. Ziel dieses Versuchs war herauszufinden, welche der NP am stärksten an den Zellen haften bleiben. Um Autofluoreszenz auszuschließen, wurden weitere Zellen mit Puffer behandelt (Kontrolle). Das MUC-NP zeigte die im Vergleich zum nicht modifizierten NP (U4T) bessere Adhäsion an den Zellen. Das Aptamer und das Kontroll-NP zeigten keine Adhäsion (vgl. Abbildung 13). Die unter dem Mikroskop kontrollierten Proben wurden zur übersichtlichen und vergleichenden Darstellung, wie in 2.5.11 beschrieben, in ein Bewertungsschema eingliedert, welches die Adhäsionseigenschaften in Abhängigkeit der Konzentration und der verwendeten Proben zeigt (vgl. Tabelle 7).

Konz.	U4T	U4T-apt	MUCapt-Atto	cU4T-Ky2
10 μM				
25 μM				
50 μM				
Ktr.				

**Abbildung 13: Representative Aufnahmen von mit verschiedenen NP und Muzin-Aptamern behandelten RGC5 Zellen. Um die Adhäsionseigenschaften des MUC1-Aptamers vergleichen zu können, wurde ein mit einem Kanamycin-Aptamer gekoppelter NP verwendet (Ky2). Zur Negativkontrolle wurden RGC-5-Zellen mit Puffer behandelt. Alle Bilder wurden in 200-facher Vergrößerung aufgenommen.**

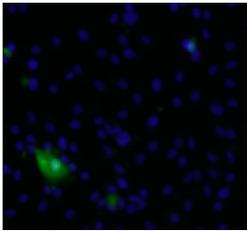
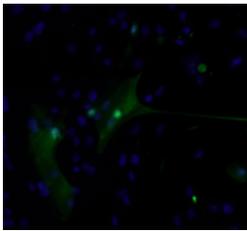
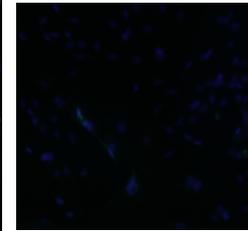
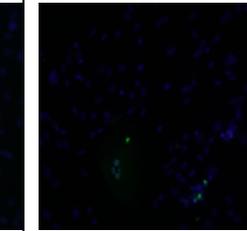
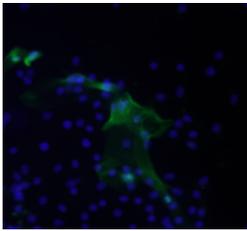
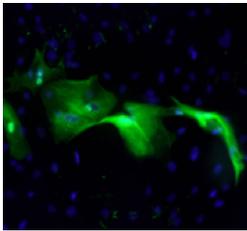
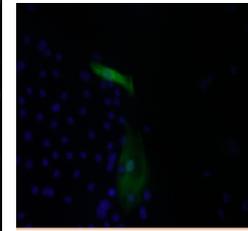
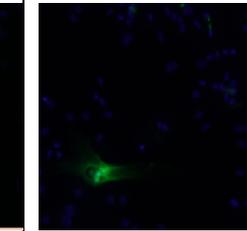
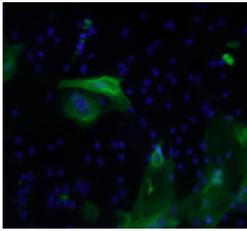
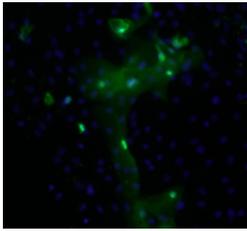
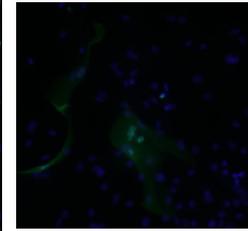
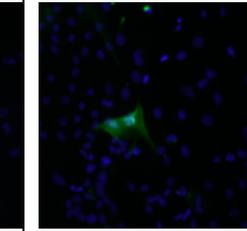
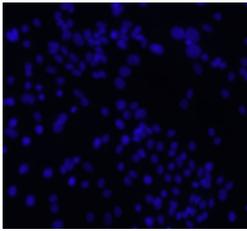
**Tabelle 7: Optische Kontrolle der Zelladhäsion aller getesteter NP und der MUC-Aptamere (- = keine NP auf den Zellen, +- = Zellrasen schwach bedeckt, + = Zellrasen mäßig bedeckt, ++ = Zellrasen stark bedeckt, +++ = Zellrasen sehr stark bedeckt)**

<b>Konz.</b>	<b>U4T</b>	<b>U4T-apt</b>	<b>MUCapt-Atto</b>	<b>cU4T-Ky2</b>
10 $\mu$ M	+-	+	-	-
25 $\mu$ M	+-	++	-	-
50 $\mu$ M	+	++	-	-

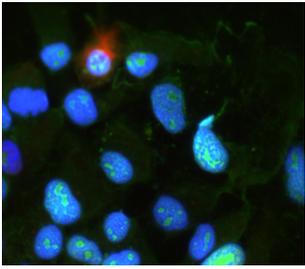
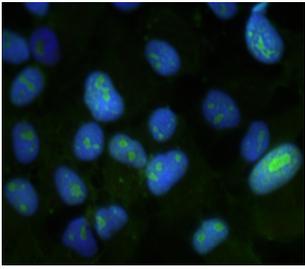
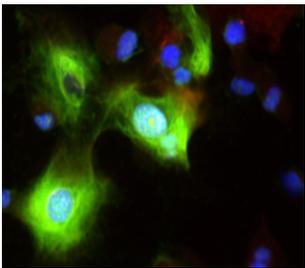
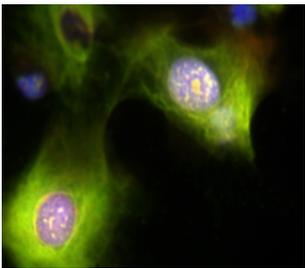
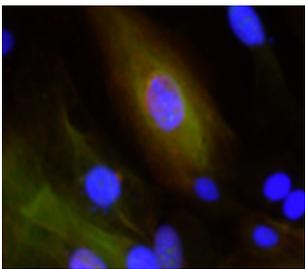
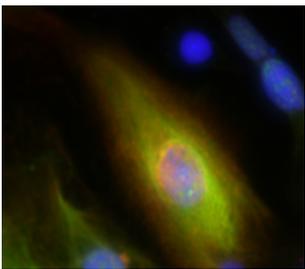
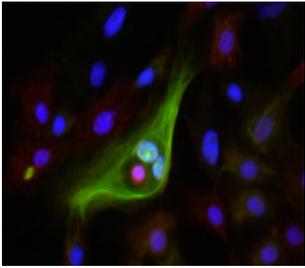
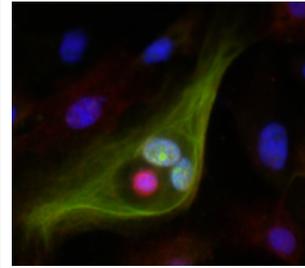
### 3.2.2 MUC-NP auf Epithelzellen

Nach der Auswertung der ersten Zellversuche folgten weitere Studien mit kornealen Epithelzellen, die zwar aufwändiger isoliert und kultiviert werden mussten (vgl. 2.5.3), aber ein spezifischeres Modell für die Kornea darstellten. Vorerst wurden die Epithelzellen wie in der vorhergehenden Studie (vgl. Kapitel 3.2.1) gefärbt und unter dem Mikroskop betrachtet. Zur Vergleichskontrolle wurde ein mit einem Kanamycin2-Aptamer beladenes NP verwendet. Zur Negativkontrolle wurden die Zellen mit Puffer behandelt. Anschließend wurden, zusätzlich zum wie in 3.2.1 durchgeführten Versuch, immunhistochemische Färbungen angefertigt, die das Zielmolekül MUZIN-1 sichtbar machten (vgl. Abbildung 14 II), um Aussagen zur Spezifität der Aptamerbindung machen zu können. Nach visueller Auswertung wurden repräsentative Bilder am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (vgl. Abbildung 14). U4T-apt wies im Vergleich zu den anderen getesteten Proben die besten Adhäsionseigenschaften auf. Die ausgewerteten Daten wurden zur übersichtlichen und vergleichenden Darstellung wie in 2.5.11 beschrieben, in einer Tabelle zusammengefasst (vgl. Tabelle 8).

I

Konz	U4T	U4T-apt	MUCapt-Atto	cU4T-Ky2
.				
10 μM				
25 μM				
50 μM				
Ktr.				

II

Vergrößerung	200x	400x
U4T		
U4T-apt		
MUCapt-Atto		
cU4T-Ky2		

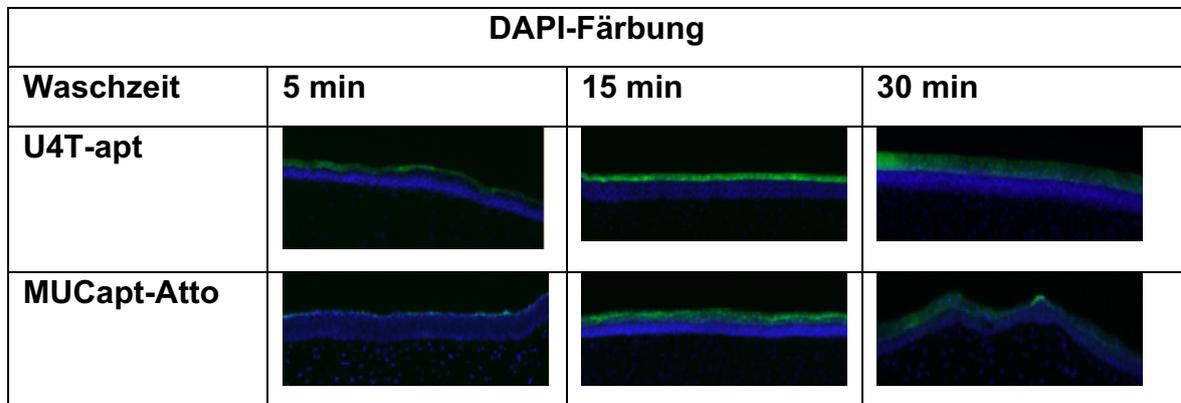
**Abbildung 14:** Repräsentative Aufnahmen von mit verschiedenen NP behandelten Zellen. I. Korneale Epithelzellen wurden mit Nanopartikeln, Muzin-NP und Muzinaptameren (vgl. Tabelle 1) behandelt. Die Zellkerne erscheinen aufgrund der DAPI-Färbung blau, die Atto488 modifizierte NP fluoreszieren grün. Alle Bilder wurden in 200-Facher Vergrößerung aufgenommen. II. Immunhistochemische Färbung der Zellen. Das markierte MUC-1 imponiert als rote Struktur. Auf allen Proben konnte NP detektiert werden, wobei die U4T-apt-Proben am stärksten fluoreszierten (vgl. Tabelle 5). Die Bilder wurden in 200- bzw. 400-facher Vergrößerung aufgenommen.

**Tabelle 8: Optische Kontrolle der Zelladhäsion aller getesteter NP und der MUC-Aptamere (- = keine NP auf den Zellen, +- = Zellrasen schwach bedeckt, + = Zellrasen mäßig bedeckt, ++ = Zellrasen stark bedeckt, +++ = Zellrasen sehr stark bedeckt)**

<b>Konz.</b>	<b>U4T</b>	<b>U4T-apt</b>	<b>MUCapt-Atto</b>	<b>cU4T-Ky2</b>
10 $\mu$ M	+-	+	+-	+-
25 $\mu$ M	+	+++	+-	+
50 $\mu$ M	++	+++	+	+

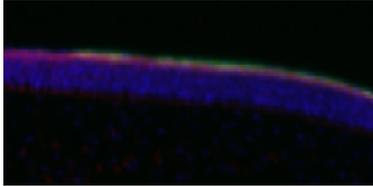
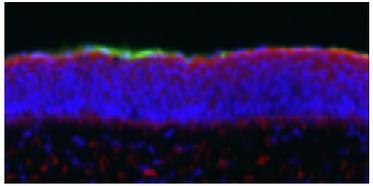
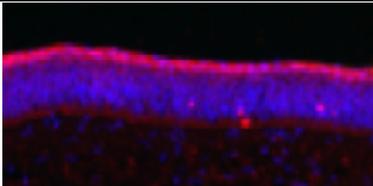
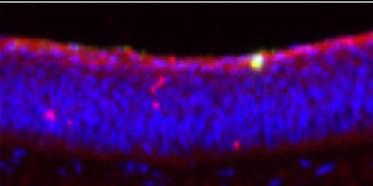
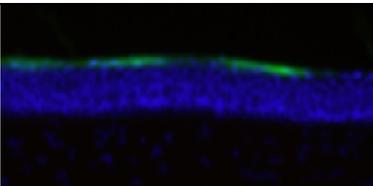
### 3.2.3 MUC-Apt auf Schweinekornea

Nach der Durchführung und Auswertung der Zellversuche in Kapitel 3.2, die gute Adhäsionseigenschaften der MUC-NP vermuten lassen, wurden diese im ex-vivo Versuch an enukleierten Schweineaugen getestet. Diese Studie stellt aufgrund der Verwendung von kornealem Gewebe ein dem menschlichen Auge realitätsnäheres Modell dar. Die Epithelschicht war bei beiden untersuchten Proben (MUC-NP und Muzin-Aptamer) selbst nach 30 Minuten Waschzeit lückenlos bedeckt (vgl. Abbildung 15).



**Abbildung 15: Repräsentative Aufnahmen der wie in 2.5.1 beschrieben hergestellten MUC-NP mit Inkubationszeiten von 5-30 Minuten. Alle Bilder wurden in 50-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Zellkerne stellen sich durch die DAPI-Färbung als blaue Punkte dar. Die mit Atto488 gekoppelten NP sind in den Bildern grün dargestellt. Alle getesteten NP zeigen gute Adhäsionseigenschaften am Epithel der Kornea.**

Das in der Antikörperfärbung dargestellte MUC1 präsentiert sich als rotes Band auf dem oberflächlichen Epithel (vgl. Abbildung 16). Um Autofluoreszenz auszuschließen, wurden Kontrollbilder von Schweineaugen angefertigt, die anstatt dem Erstantikörper nur mit TBS-Puffer behandelt wurden. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte im optischen Vergleich aller Bilder. Die Menge an adhärenter Substanz, die in den Bildern grün dargestellt wird, wurde auf ihre Kontinuität überprüft. Alle Proben zeigten eine ähnlich gute Adhäsion am Epithel. Selbst nach einer Waschzeit von 30 Minuten waren die Lipid-NP auf den Epithelien präsent (vgl. Tabelle 9). Der generelle Charakter der neu entwickelten Muzin-NP konnte über die Zellversuche hinaus auch im ex-vivo Versuch veranschaulicht werden. Das MUC1-Aptamer wies in Reinform und in Verknüpfung mit U4T gute Adhäsionseigenschaften auf, was einem ersten Beweis für die Funktionalität der neuen NP entspricht. Die gut adhärenenten Proben wurden weiter in in-vivo Versuchen getestet (vgl. Kapitel 3.4).

Immunhistochemische Färbung		
Vergrößerung	50x	100x
U4T-apt		
MUCapt-Atto		
Kontrolle		

**Abbildung 16:** Repräsentative Aufnahmen der wie in 2.5.1 beschrieben hergestellten MUC-NP in immunhistochemischer Färbung. Das angefärbte MUC1 Protein imponiert in dieser Färbung als rotes Band auf dem Epithel. Zur Kontrolle wurden weitere mit MUC-NP behandelte Schweineaugen lediglich mit TBS-Puffer behandelt. Alle Bilder wurden in einer 50-fachen und 100-fachen Vergrößerung aufgenommen.

### **3.2.4 MUC-NP auf Ratten**

Im Vergleich zu den in 3.3.1 durchgeführten Studien, stellt das in-vivo Modell eine aufgrund Vorhandenseins von Lidschlag und Sekretion von Tränenflüssigkeit genauere Simulation des menschlichen Auges dar. Die Durchführung und Auswertung der Studien erfolgte wie in den Kapiteln 2.5.4 bis 2.5.7 aufgeführt. Die MUC-NP sowie das Atto488-modifizierte MUC1 Aptamer wurde im in-vivo Versuch mit einem unbeladenen DNA-NP verglichen. Zur Kontrolle wurden weitere Augen lediglich mit TBS getropft. Zur Kontrolle der Antikörperfärbung wurden Schnitte anstatt mit dem Primärantikörper lediglich mit Pufferlösung behandelt. Zur exemplarischen Darstellung wurden nach visueller Kontrolle Bilder unter dem Axioplan-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (vgl. Abbildung 17). Wie in den vorhergegangenen Studien wurden die aus dem Versuch gewonnenen Daten, wie in 2.5.11 beschrieben, in ein Vergleichsschema eingeordnet (vgl. Tabelle 10).

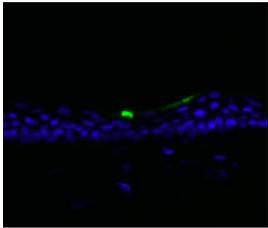
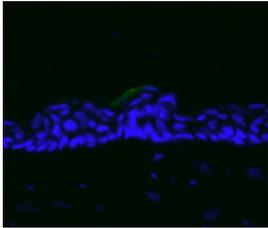
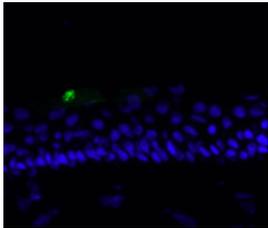
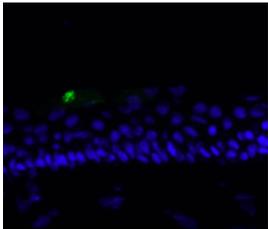
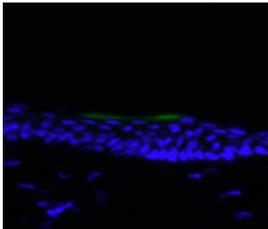
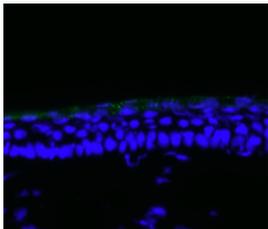
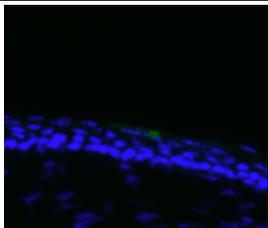
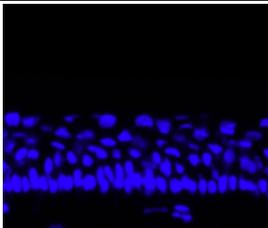
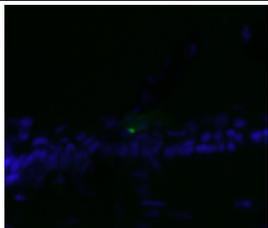
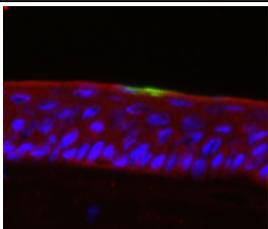
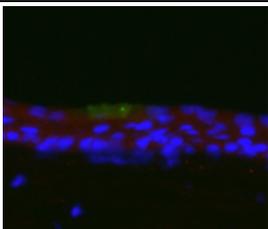
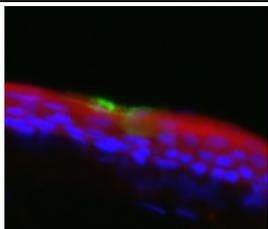
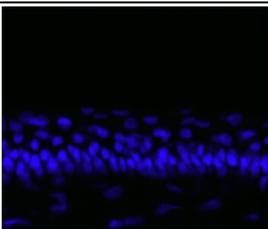
Zeit	U4T-apt	MUCapt-Atto	U4T
30 min			
60 min			
120 min			
MUC1 Färbung			
Kontrolle			

Abbildung 17: Die Muzin-NP und das mit Atto488 gekoppelte MUC1-Aptamer wurden im in-vivo Versuch mit Ratten getestet. Beispielaufnahmen mit Inkubationszeiten von 30-120 Minuten. Die Zellkerne erscheinen aufgrund der DAPI-Färbung als blaue Punkte. Die mit Atto488 gekoppelten Proben erscheinen grün. Um Hintergrundfluoreszenz auszuschließen, wurde eine weitere Ratte lediglich mit Puffer behandelt (Kontrolle). In der immunhistochemischen MUC1-Färbung erscheint das MUC1 als rotes Band auf dem oberflächlichen Epithel. Alle Bilder wurden in 200-facher Vergrößerung aufgenommen.

Beide Nanopartikel waren selbst nach 120 Minuten noch auf den Augen präsent, wobei die Muzin-1 modifizierten NP in 75 % zu finden waren, während die DNA-NP nur in einem Viertel der Proben detektiert werden konnten. Das MUCapt selbst war nach 120 Minuten nicht mehr detektierbar (vgl. Tabelle 10). Der mit MUC1 modifizierte Nanopartikel zeigt eine im Vergleich zum nicht modifizierten NP (U4T) bessere Bindungsaffinität zum kornealen Epithel. Insbesondere im Langzeitversuch (120 Minuten) weist der modifizierte NP bessere Adhäsionseigenschaften auf.

### 3.2.5 IApt auf Schweinekornea

Analog zum in 3.2.3 beschriebenen Versuch, wurden die Adhäsionseigenschaften der unbeladenen, lipid-modifizierten Nanopartikel IApt<sup>Kan</sup>, IApt<sup>Bri</sup> und IApt<sup>Tra</sup> an kornealem Gewebe von zuvor enukleierten Schweineaugen überprüft. Die hierzu verwendeten Nanopartikel wurden, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, hergestellt und modifiziert. In diesem Versuch wurden Waschzeiten von 15-60 Minuten gewählt. Alle untersuchten Proben zeigten selbst nach 60-minütigem Waschen noch lückenlos bedecktes Epithel (vgl. Tabelle 9).

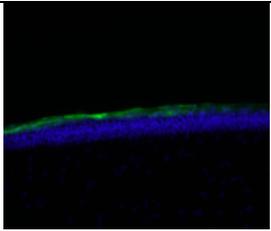
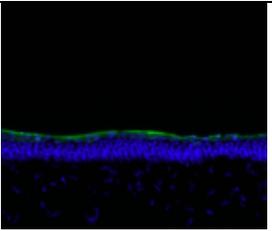
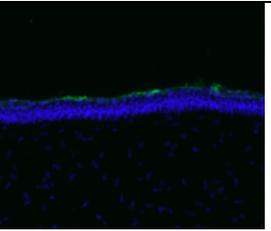
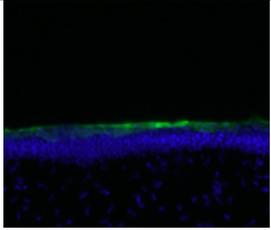
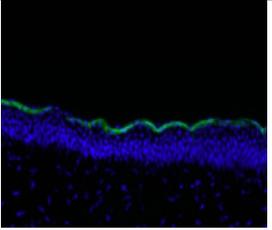
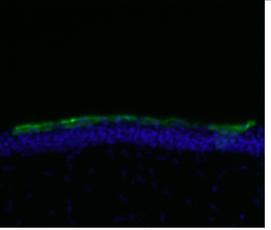
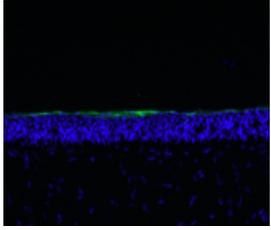
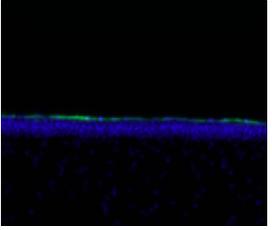
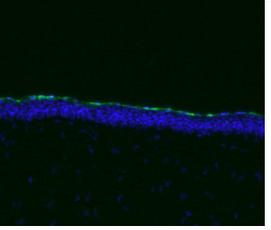
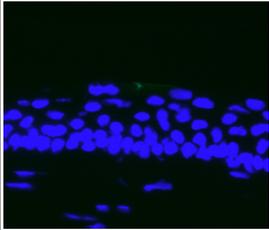
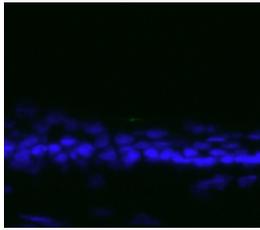
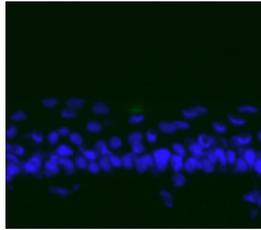
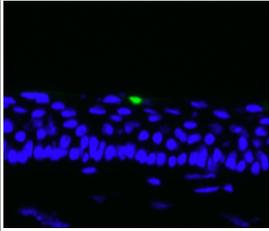
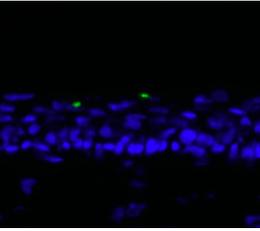
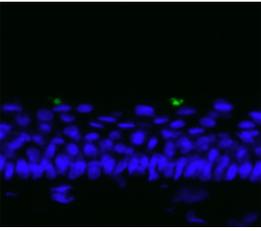
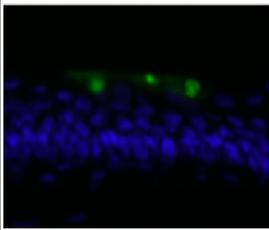
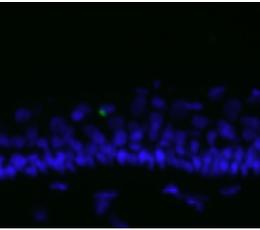
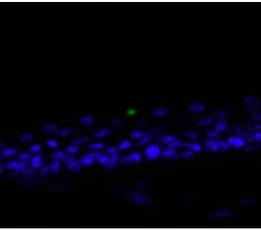
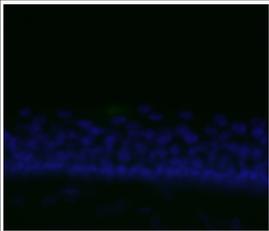
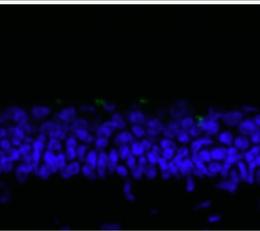
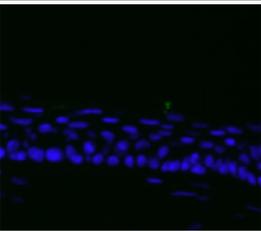
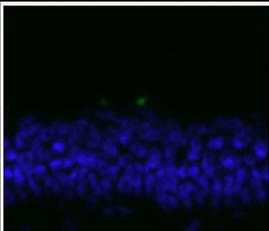
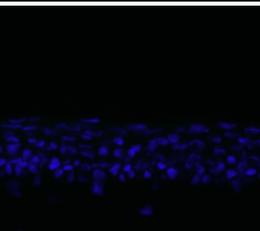
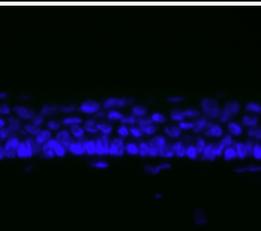
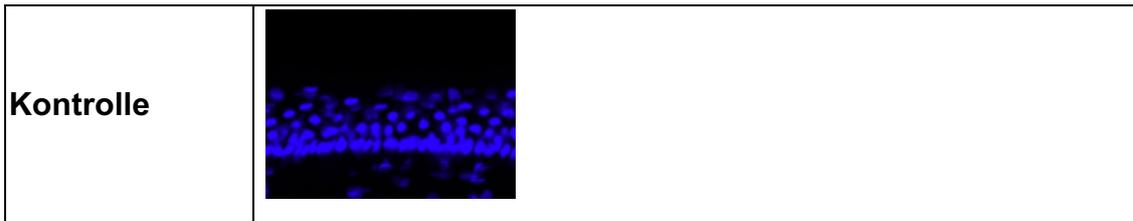
Waschzeit	IApt <sup>Kan</sup>	IApt <sup>Bri</sup>	IApt <sup>Tra</sup>
15 min			
30 min			
60 min			

Abbildung 18: Repräsentative Aufnahmen der IApt mit Inkubationszeiten von 15-60 Minuten. Alle Bilder wurden in einer 50-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Zellkerne stellen sich durch die DAPI-Färbung als blaue Punkte dar. Die mit Atto488 gekoppelten NP sind in den Bildern grün dargestellt. Alle getesteten NP zeigen gute Adhäsionseigenschaften am Epithel der Kornea.

### 3.2.6 IApt auf Ratten

Zeit	IApt <sup>Kan</sup>	IApt <sup>Bri</sup>	IApt <sup>Tra</sup>
5 min			
15 min			
30 min			
60 min			
120 min			



**Abbildung 19: Beispielbilder von in-vivo Rattenaugen die mit Kanamycin-, Brimonidin-, und Travoprostbeladenen Lipid-Nanopartikeln (IApt<sup>x</sup>) inkubiert wurden. Zur Kontrolle wurden Ratten lediglich mit Puffer behandelt. Alle Bilder wurden in 200-facher Vergrößerung aufgenommen.**

Alle mit Wirkstoffen beladenen IApts zeigten nach 30 Minuten Adhäsion am Epithel. IApt<sup>Kan</sup> war nach 30 Minuten in allen untersuchten Proben detektierbar, wohingegen IApt<sup>Bri</sup> und IApt<sup>Tra</sup> nur noch zu 50 bzw. 75 % nachgewiesen werden konnte. Nach 60 Minuten konnten die Brimonidin- und Travoprost-NP nur noch in einem Viertel der Proben beobachtet werden, während der Kanamycin-NP immer noch zu 75 % auf der Kornea zu sehen war. Selbst nach 120 Minuten konnte bei IApt<sup>Kan</sup> noch in 25 % eine umschriebene geringe Adhäsion festgestellt werden. Bei den beiden anderen Proben waren nach dieser Zeit keine Spuren der NP mehr erkennbar. Grundsätzlich konnte die Funktionalität der Lipid-NP in 3.2.5 und in diesem Versuch bewiesen werden. IApt<sup>Kan</sup> zeigte die gegenüber den beiden anderen Kandidaten besten Adhäsionseigenschaften und qualifizierte sich somit für weitere Studien (vgl. 3.3). Der mit dem Brimonidin-Aptamer verknüpfte NP zeigte die im Vergleich schlechteste Adhäsion am Epithel. Des Weiteren wies dieser NP gegensätzlich der im Allgemeinen erkennbaren Tendenz im Versuch mit fünf Minuten Inkubationszeit eine Adhäsionsrate von 25 % auf (vgl. 4.2.2).

**Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Daten aus 3.2.3 (- = keine NP auf den Zellen, +- = Zellrasen schwach bedeckt, + = Zellrasen mäßig bedeckt, ++ = Zellrasen stark bedeckt, +++ = Zellrasen sehr stark bedeckt). Die Ergebnisse der Versuche wurden analysiert und entsprechend einem Schema zugeordnet, welches sich an der Menge der detektierten NP orientiert (vgl. Kapitel 2.5.11).**

## Schweinekornea (ex vivo)

Probe	U4t-apt	MUCapt-Atto	IApt <sup>kan</sup>	IApt <sup>Bri</sup>	IApt <sup>Tra</sup>
5 min	++	++	-	-	-
15 min	++	++	++	++	++
30 min	++	++	++	++	++
60 min	-	-	++	++	++

**Tabelle 10: Übersichtliche tabellarische Darstellung der Daten aus 3.2.4 bis 3.2.6. Die Ergebnisse der Versuche wurden analysiert und entsprechend einem Schema zugeordnet, welches sich an der Menge der detektierten NP orientiert (vgl. Kapitel 2.5.11).**

### Ratten (in-vivo)

Probe	U4T	U4T-apt	MUCapt-Atto	IApt <sup>kan</sup>	IApt <sup>Bri</sup>	IApt <sup>Tra</sup>
<b>Zeit</b>						
5 min	-	-	-	4/4 (100 %)	1/4 (25 %)	3/4 (75 %)
15 min	-	-	-	4/4 (100 %)	3/4 (75 %)	4/4 (100 %)
30 min	4/4 (100 %)	4/4 (100 %)	4/4 (100 %)	4/4 (100 %)	2/4 (50 %)	3/4 (75 %)
60 min	3/4 (75 %)	3/4 (75 %)	3/4 (75 %)	3/4 (75 %)	1/4 (25 %)	1/4 (25 %)
120 min	1/4 (25 %)	3/4 (75 %)	0/4 (0 %)	1/4 (25 %)	0/4 (0 %)	0/4 (0 %)

### 3.3 Wirksamkeit/Effizienz

Da der mit Kanamycin beladene Lipid-NP (IApt<sup>Kan</sup>) in den Adhäsionsstudien sehr gute Ergebnisse aufwies, schien dieser als Kandidat zur ausführlicheren funktionellen Erforschung besonders geeignet. Des Weiteren ist der Effekt eines antibiotischen Medikaments in vitro effektiv und konsistent nachzuweisen (vgl. 3.4.1, 3.4.2), wohingegen drucksenkende Medikamente, im sehr variablen Tierversuch nachgewiesen werden müssen. Es würde bei den mit Travoprost beladenen Nanopartikeln einen Organismus erfordern, in dem die drucksenkende Wirkung gemessen werden kann. Dies ist in vitro nicht möglich. In früheren Studien der AG Spitzer/Schnichels wurde die Wirksamkeit der mit Kanamycin beladenen NP in

vivo nachgewiesen [38]. In dieser Arbeit wurden die IApt<sup>Kan</sup> erst in vitro getestet und anschließend vergleichend in vivo zu U4T-Kan untersucht.

### 3.3.1 MIC-Test

Anhand eines MIC-Tests wurde untersucht, inwiefern ein Pharmakon vom Substrat-IApt-Komplex am Zielort freigesetzt wird, um dort wirksam sein zu können. Im in-vitro Versuch zeigen das freie Medikament (Kanamycin B) und das an das Trägersystem gebundene Medikament (IApt<sup>Kan</sup>) keinen signifikanten Unterschied in ihrer Wirkung (vgl. Abbildung 20). Auch in Anwesenheit von zugegebener DNAse, die auch in humaner Tränenflüssigkeit vorhanden ist, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (vgl. Abbildung 20).

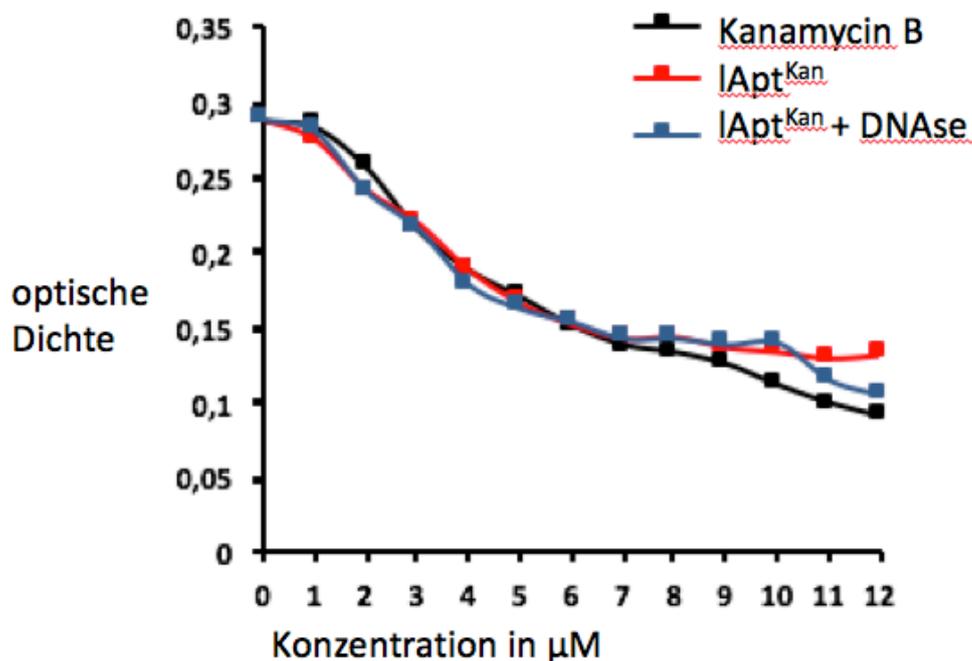
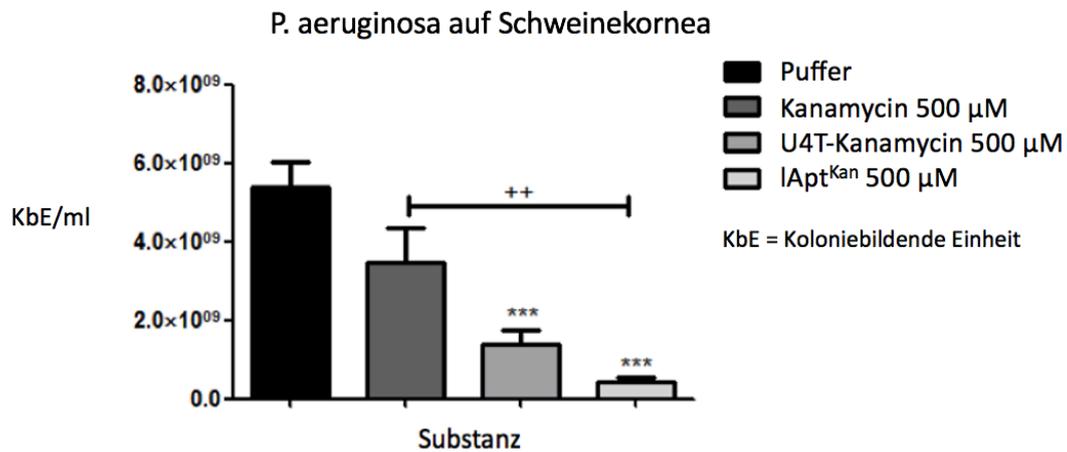


Abbildung 20: In-vitro Effizienz von IApt<sup>Kan</sup>. Das Wachstum der *E. coli*-Bakterien wird durch IApt<sup>Kan</sup> (rote Kurve) und IApt<sup>Kan</sup> in Anwesenheit von DNAse (blaue Kurve) ähnlich wie durch freies Kanamycin B (schwarze Kurve) gehemmt. Dies beweist die Freisetzung und erhaltene Funktionalität des Wirkstoffs des NP.

### 3.3.2 Infektionsexperiment

Die getesteten Substanzen (Kanamycin, U4T-Kanamycin und IApt<sup>Kan</sup>) zeigten unterschiedlich starke antibiotische Wirkung. Auf den Placebo-Augen, die lediglich mit Puffer behandelt wurden, konnten nach neunmaliger Behandlung ca.  $5 \times 10^9$  koloniebildende Einheiten (KbE) *P. aeruginosa* pro ml nachgewiesen werden. Vergleicht man die mit freiem Kanamycin behandelten mit den mit den Kanamycin beladenen NP und IApt behandelten Augen, fällt ein signifikanter Unterschied auf. Während auf den Kanamycin-behandelten Augen noch ca.  $3.2 \times 10^9$  KbE/ml berechnet werden konnten, waren es bei den U4T-Kanamycin in etwa die Hälfte. Die mit IApt<sup>Kan</sup> behandelten Augen wiesen mit ca.  $4.2 \times 10^8$  KbE/ml am wenigsten *P. aeruginosa* auf (vgl. Abbildung 21).

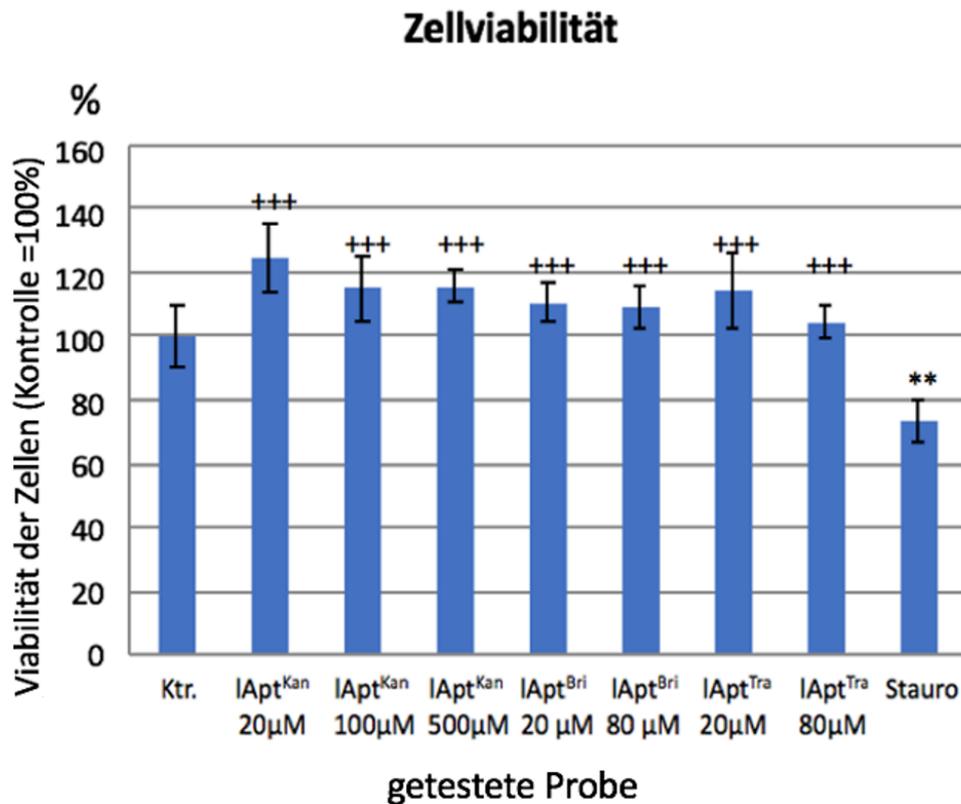


**Abbildung 21: Wirksamkeitsstudie Kanamycin NP auf Schweinekornea.** Die Ergebnisse des in 3.4.2 beschriebenen Experiments zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen IApt<sup>Kan</sup>, der Kontrolle (Puffer) und dem freien Kanamycin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert an. Statistische Unterschiede wurden mit \*\*\* ( $p < 0.001$ ) im Vergleich zur Kontrolle und mit ++ ( $p < 0.01$ ) im Vergleich zu freiem Kanamycin angegeben.

### 3.4 Toxizität

#### 3.4.1 Zellviabilität

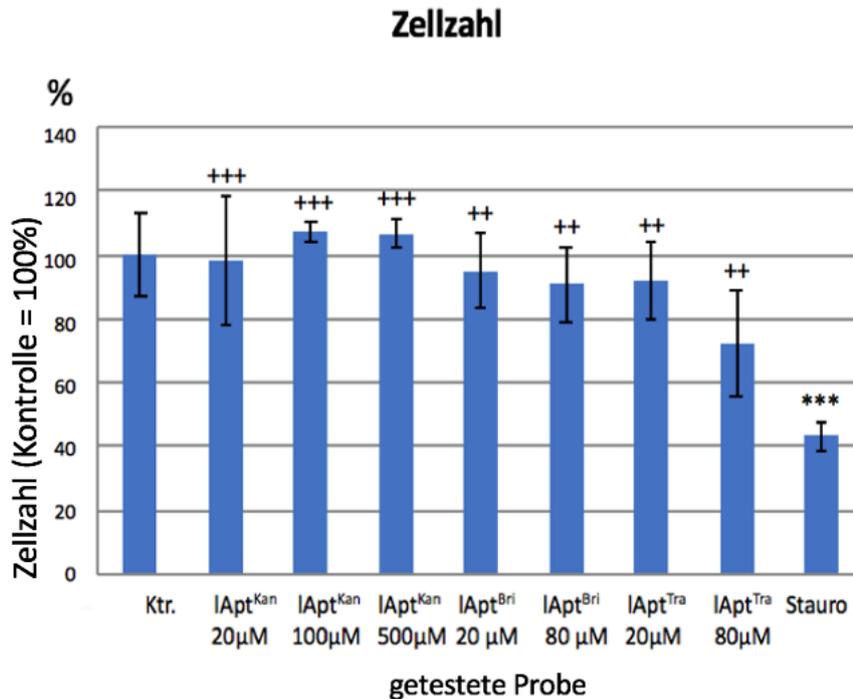
Mit dem in Kapitel 2.5.10 beschriebenen MTS-Viabilitätstest wurde die Vitalität von primären kornealen Epithelzellen bei Zugabe von IApt in verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Zur Positivkontrolle wurden weitere Zellen lediglich mit TBS-Puffer behandelt. Zur Negativkontrolle wurden die Zellen mit Staurosporin, einem Indolalkaloid, welches die Zellviabilität nachweislich hemmt [60], behandelt.



**Abbildung 22: Zellviabilität der mit IApt behandelten Zellen im Vergleich zu mit TBS und Staurosporin (Stauro) behandelten Zellen. Die Puffer-Kontrollzellen wurden hierbei gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Proben wurden mit diesen und der Positivkontrolle (Stauro) verglichen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert an. Signifikante Unterschiede sind mit +++  $p < 0.0001$  verglichen mit Stauro und \*\*  $p < 0.01$  verglichen mit der Kontrolle (Ktr.) gekennzeichnet. Zwischen den Lipid-NP und der Kontrolle konnte in diesem Versuch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.**

### 3.4.2 Zellzahl

Mittels der in Kapitel 2.5.10 beschriebenen Kristallviolett-Färbung konnte auf die Zellzahl bei Zugabe von IApt geschlossen werden. Außer der Positivkontrolle wiesen alle getesteten Proben keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollprobe auf. Folglich kann angenommen werden, dass keine der getesteten Proben toxische Eigenschaften ausweist, die zu einer relevanten Verringerung der Zellzahl führt.

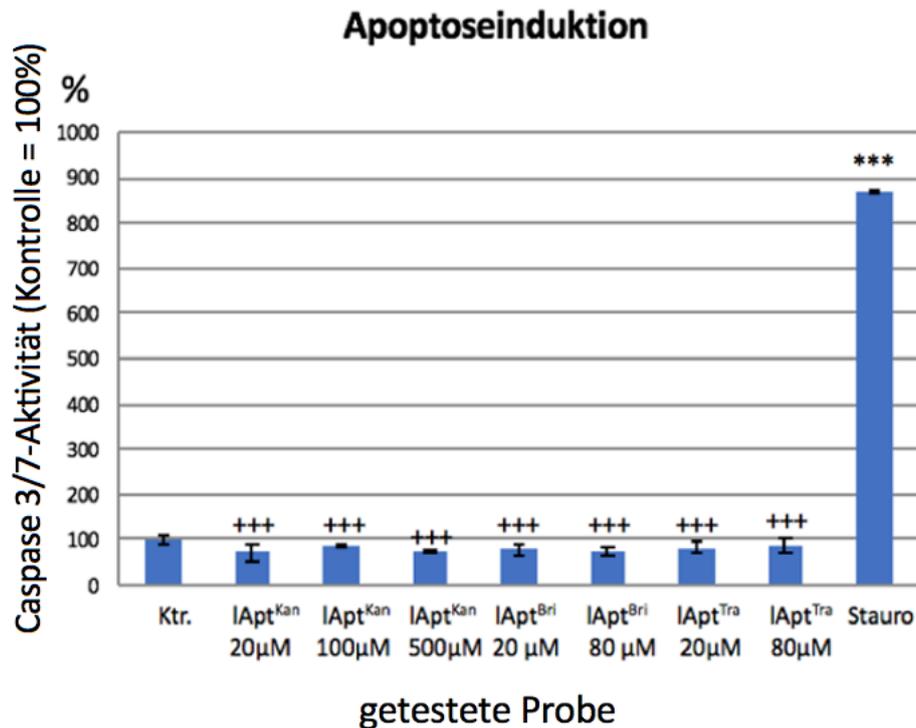


**Abbildung 23:** Die Zellzahl der mit IApt behandelten Zellen im Vergleich zu mit TBS und Staurosporin (Stauro) behandelten Zellen. Die Puffer-Kontrollzellen wurden hierbei gleich 100% gesetzt. Alle anderen Proben wurden mit diesen und der Positivkontrolle (Stauro) verglichen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert an. Signifikante Unterschiede sind mit +++  $p < 0.0001$  verglichen mit Stauro und \*\*\*  $p < 0.001$  verglichen mit der Kontrolle (Ktr.) gekennzeichnet. Zwischen den Lipid-NP und der Kontrolle konnte in diesem Versuch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

### 3.4.3 Apoptoseinduktion

Die Apoptoseinduktion wurde mit dem in Kapitel 2.5.10 beschriebenen Caspase 3/7-Assay ermittelt. Zur Bestimmung der basalen Apoptoseaktivität wurde eine Kontrollprobe lediglich mit TBS behandelt. Diese wurde gleich 100 % gesetzt und mit den anderen Proben verglichen. Zur Negativkontrolle wurden weitere Zellen

mit Staurosporin behandelt. Lediglich diese Gruppe zeigte eine 8,7-fach höhere Apoptoseinduktion und hat somit einen relevanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Die mit IApt behandelten Proben wiesen Werte zwischen 72,7 % und 87,4 % auf (vgl. Abbildung 23). Folglich ist davon auszugehen, dass außer der Positivkontrolle keine der getesteten Proben zum programmierten Zelltod führt. Daraus lässt sich schließen, dass potentielle Toxizität der Proben ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 24: Apoptoseinduktion der mit IApt behandelten Zellen im Vergleich zu mit TBS-Pufferlösung und Staurosporin (Stauro) behandelten Zellen. Die Puffer-Kontrollzellen wurden hierbei gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Proben wurden mit diesen und der Positivkontrolle (Stauro) verglichen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert an. Signifikante Unterschiede sind mit +++  $p < 0.0001$  verglichen mit (Stauro) und \*\*\*  $p < 0.001$  verglichen mit der Kontrolle (Ktr.) gekennzeichnet. Zwischen den Lipid-NP und der Kontrolle konnte in diesem Versuch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.**

## 4 Diskussion

### 4.1 DNA-Nanopartikel im Vergleich zu anderen Trägersystemen in der Augenheilkunde

#### 4.1.1 Polymere (PLGA)

Die Erforschung und Entwicklung polymerer Nanopartikel war in den vergangenen Jahren eine neue Aufgabe für Materialwissenschaftler und ophthalmologische Forscher. Sowohl für den vorderen als auch für den hinteren Augenabschnitt konnten Forscher Nanopartikel entwickeln, die Medikamente an den jeweils gewünschten Ort transportieren. Hierzu wurden unter anderem Polymere wie Albumin, Alginsäure, Chitosan, PLGA und PLA verwendet, die teils in der Natur vorkommen und teils synthetisch gewonnen werden können. Gupta et al. zeigten 2011 in ex-vivo und in-vivo Tierversuchen an Albinokaninchen, dass Levofloxacin, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Fluorchinolone, signifikant bessere Adhäsionseigenschaften aufweist, wenn es gekoppelt mit einem PLGA-NP verabreicht wird [61]. Die Polymer-Nanopartikel bestehen aus vielen, meist amphiphilen Polymeren, die sich in Mizellenstrukturen zusammen lagern können. Im Zentrum der Mizellen können Wirkstoffe eingelagert werden, die dann via Diffusion am gewünschten Ort in die Peripherie gelangen. Die Hülle selbst kann ebenfalls mit Wirkstoffen beladen werden. Polymere Nanopartikel haben neben den guten Adhäsionseigenschaften den Vorteil, dass sie relativ simpel und kostengünstig herzustellen sind, und dass eine große Anzahl infrage kommender Moleküle zur Verfügung steht. Ein weiterer Anspruch an dieses Trägersystem ist die Biokompatibilität und das Ausbleiben etwaiger Nebenwirkungen bei der Einnahme. Für viele Medikamente, die in Kombination mit Polymer-Nanopartikeln verabreicht werden, gibt es hierzu unzureichende Daten, sodass diese in Bezug auf Toxizität weiter untersucht werden müssen. Salamanca et al. konnten 2006 im in-vitro Versuch mit humanen okularen Proben ein geringeres Zellüberleben bei Behandlung mit Chitosan-NP feststellen [62]. Die im Vergleich hierzu in dieser Arbeit verwendeten DNA-NP werden durch körpereigene DNAsen gespalten und abgebaut, da sie aus dem Körper bekannten Bausteinen bestehen. Wie die Toxizitätsuntersuchungen (vgl. Kapitel 3.5) schon vermuten lassen, sind toxische Nebenwirkungen auch in Langzeitstudien höchst unwahrscheinlich. Eine weitere Herausforderung in der Anwendung von PLGA-NP ist ihre vergleichbar geringe Stabilität in Wasser, weswegen beständigere PEG-Nanopartikel entwickelt wurden. Diese können, wie die meisten Polymere, jedoch nur mit Medikamenten einer endlich hohen Molekülgröße verknüpft werden. Im Gegensatz dazu sollen die hier verwendeten NP ein Trägersystem für Medikamente aller Art darstellen (Plattformtechnologie) und diese unabhängig von Molekülgröße oder hydrophilen Eigenschaften mittels Aptamerbindung binden können.

#### 4.1.2 Nanogelee

Nanogelee sind 10-100 nm groÙe Nanopartikel, die aus Hydrogelen, sprich kleinen, durch kovalente oder ionische Bindungen vernetzten Polymeren, bestehen und aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften (wasserunlÙslich aber wasserenthaltend) in unterschiedlichen Bereichen der Medizin genutzt werden [63]. Zur Herstellung der Nanogelee kÙnnen beispielsweise Biopolymere wie Chitosan herangezogen werden. Dies hat den Vorteil, dass die Partikel als TrÙgerplattformen fÙr Medikamente biokompatibel und biologisch abbaubar sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass Chitosan ein sehr hÙufig in der Natur vorkommendes Polysacharid ist, und verhÙltnismÙÙig einfach und kostengÙnstig gewonnen werden kann. Alternativ hierzu kÙnnen synthetische Hydrogelee verwendet werden, die stabiler und weniger immunogenisierend sind. Nanogelee kÙnnen durch verschiedene Mechanismen wie beispielsweise Wasseraufnahme oder Ånderung des peripheren pH-Werts zum Quellen gebracht und somit von einer Tropfen- in eine Gelform ùberfÙhrt, sprich „geliert“, werden. Verschiedene Produkte wie „Timoptic-XE“ von der Firma Merck & Co. Inc, zur Senkung des Augeninnendrucks oder „Zirgan“ (Wirkstoff Ganciclovir; deutscher Handelsname Virgan) von Bausch & Lomb zur Therapie der herpetischen Keratitis machen sich dieses System zunutze. Ein Nachteil dieses TrÙgersystems ist jedoch in der Beschaffenheit der Polymere zu begrÙnden. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikeln kÙnnen Nanogelee nur bei Medikamenten mit kleiner MolekÙlgrÙÙe verwendet werden. FÙr hydrophobe oder makromolekulare Medikamente, wie beispielsweise Proteine, sind Nanogelee eher ungeeignet [64]. Nanogelee werden, neben der Herstellung von Tropfen, hauptsÙchlich verwendet, um weichbleibende Kontaktlinsen herzustellen, die dann wiederum mit Wirkstoffen beladen werden kÙnnen. Diese Methode fÙhrt zu der gewÙnschten verlÙngerten AdhÙsionszeit der Medikamente am Auge. Die Applikationsform eines Gels stellt am sensitiven Auge, im Vergleich zu Tropfen aber einen entscheidenden Nachteil dar, weil sie sich negativ auf die Compliance auswirkt. Viele Patienten klagen ùber ein FremdkÙrpergefÙhl im Auge, ùber verschwommene Sicht oder kommen mit der Handhabung nicht zurecht, wohingegen die Toleranzschwelle bei Tropfen hÙher ist. Weiterhin ist die Handhabung der Linsen fÙr viele Patienten eher umstÙndlich und unkomfortabel, was zu einer negativen BeeintrÙchtigung der Compliance fÙhrt [65]. Zudem ist die Sterilisation der Nanogelee derzeit eine klinische Herausforderung, da Polymere weniger hitzebestÙndig sind als andere Carriersysteme.

### 4.1.3 Liposomen

Liposomen (gr. *lipos*, Fett, *soma*, Körper) bestehen im Gegensatz zu Mizellen aus einer Lipiddoppelmembran, die sich in einer Bläschenstruktur anordnet (vgl. Abbildung 25). Die Membran des Liposoms besteht meist aus Phospholipiden oder Fettsäuren, die sich zu unterschiedlich großen Strukturen anordnen können. Namhafte Wissenschaftler erkannten das Potential der Liposomen, die schon Mitte der 60er Jahre entdeckt und erforscht wurden, als Carriersystem und entwickelten die ersten Medikamente, welche zunächst in der Onkologie eingesetzt [66] und dann im Verlauf der Zeit weiter modifiziert und entwickelt wurden. Da diese aufgrund ihrer Struktur sowohl hydrophile Moleküle im Kern als auch hydrophobe Moleküle in die Membran einlagern können, scheinen sie besonders geeignet, um die verschiedensten Medikamente durch die Barrieren des vorderen Augenabschnitts bis hin zur Zielstruktur zu befördern. Weiter können Hersteller Membranbausteine so auswählen, dass die Oberflächenladung an das jeweilige Medikament adaptiert werden kann. Im Vergleich zu der in dieser Arbeit verwendeten NP, die immer aus den gleichen DNA-Bausteinen bestehen, ist das jedoch ein belastender Mehraufwand, der Zeit und Kosten in Anspruch nimmt. Forschungsprojekte an Liposomen als Transportsysteme für topische Medikamentengabe in der Ophthalmologie, welche teilweise dieselben Wirkstoffe untersuchen wie diese Arbeit [67], bleiben oft nur präklinische Projekte, da große Hürden wie die Instabilität auf der Muzinschicht, die Aggregationstendenz oder der vorzeitige Verlust des zu transportierenden Medikaments oder die Phagozytoseanfälligkeit überwunden werden müssen [68]. Die deutlich unanfälligeren DNA-NP und Lipid-NP müssen nicht an einzelne Medikamente angepasst werden, da diese immer via Aptamerbindung an den Träger geknüpft werden können und bieten demnach größere Stabilität bei einfacherer Herstellung und Entwicklung.

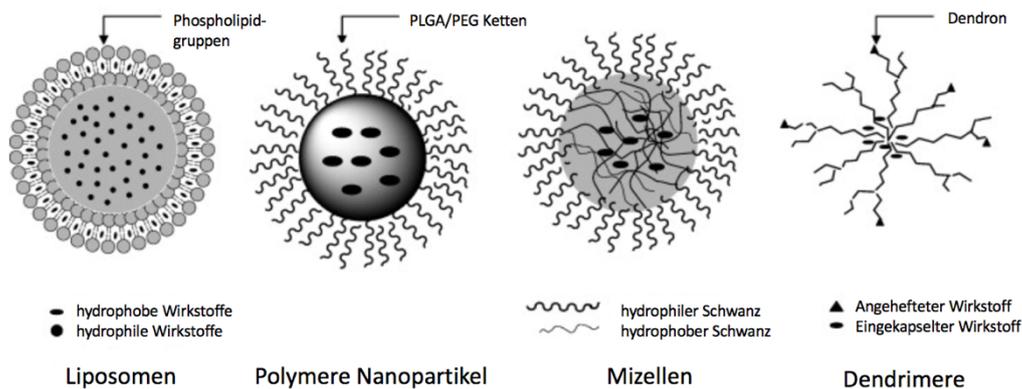
### 4.1.4 Niosomen

Niosomen wurden in den 1970er Jahren von Mitarbeitern der Firma L'Oréal entwickelt und für kosmetische Zwecke verwendet [69]. Ähnlich wie die Liposomen bestehen sie aus einer doppelschichtigen Membran, die einen Innenraum umschließen, in den Wirkstoffe eingelagert werden können. Anders als bei den Liposomen bestehen die Membranbausteine aber nicht aus Phospholipiden, sondern, wie aus der Nomenklatur abgeleitet werden kann, aus **nichtionischen** Tensiden. Dies sind Stoffe, die an Grenzflächen für Eigenschaften wie pH-Neutralität, Ionenladung und Wasserlöslichkeit verantwortlich sind und sich oft aus Zuckern und Aminosäuren ableiten. Abdelbary et al. verwendeten Niosomen 2008 als Carriersystem für Gentamycin, ein Aminoglycosidantibiotikum, welches bei bakteriellen Infektionen des vorderen Augenabschnitts wie beispielsweise bakteriellen Konjunktividen oder bakteriellen Keratiden verwendet wird [70]. Aufgrund

der nicht ionischen Natur der oberflächlichen Strukturen sind Niosomen weniger toxisch und stabiler als andere Mizellenbildende Systeme. Des Weiteren sind sie biokompatibel, nicht immunogen und können ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden, weshalb sie anderen vesikulären Trägersystemen vorgezogen werden sollten [71]. Allerdings haben Niosomen eine im Vergleich zu den DNA-NP oder IApt, höhere Partikelgröße, was sich wiederum nachteilig bei der Überwindung der Barrieren im vorderen Augenabschnitt, etwa durch Diffusion, auswirkt.

#### 4.1.5 Dendrimere

Dendrimere (gr. *dendron*, Baum) sind verästelte Moleküle, die aus einem Verzweigungskern und repetitiven Einheiten bestehen und mit Wirkstoffen beladen werden können. Donald Tomalia, ein US-amerikanischer Chemiker, leistete anfangs der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts Pionierarbeit in der Entwicklung von Dendrimeren, die verschiedenen Aufgaben, wie beispielsweise dem Einsatz als Nachweismittel als pharmazeutisch aktive Verbindung oder eben als Trägersystem für Medikamente, gerecht werden sollten [72]. Das anfangs zur Dendrimer-synthese verwendete Makromolekül Arborol wurde mit der Zeit weiterentwickelt und durch Polyamidoamin (PAMAM) ersetzt, welches heute vornehmlich verwendet wird. Tomalia und viele andere Forscher sahen großes Potential in der Verwendung von Dendrimeren, die zunächst in der Onkologie und im Transport von antiretroviral wirkenden Medikamenten verwendet wurden. Weiter gibt es aber auch mehrere präklinische Studien, die die Verwendung von Dendrimeren als Trägersystem für Medikamente in der Ophthalmologie untersuchen [73]. Antibiotika wie Nadifloxacin oder Prulifloxacin wurden mit dem Ziel, infektiöse Keratiden zu behandeln, mit einem PAMAM-Dendrimer verknüpft und in-vitro getestet. Sie wiesen eine im Vergleich zum freien Medikament verlängerte Retentionszeit auf, was durch die verbesserte Adhäsion des Dendrimers an der Kornea zu erklären ist [74]. PAMAM und andere Dendrimere stehen als weiterer Ansatz eines Medikamententrägersystems zur Verfügung um die Hürden der okularen Pharmakokinetik zu überwinden. Allerdings sind derzeit keinerlei Präparate auf dem Markt, die im klinischen Alltag Anwendung finden. Gründe hierfür sind unter anderem nur sporadisch wenige Untersuchungen der Toxizität, Verschwommensehen bei Verwendung der Tropfen und die Tatsache, dass Wirkstoffe angepasst werden müssen, bevor sie mit Dendrimeren verknüpft werden. Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-NP und die IApt können Wirkstoffe ohne jegliche vorherige Modifikation binden und führen mutmaßlich nicht zu verschwommener Sicht.



**Abbildung 25: Beispielhafte Schemazeichnung einiger *drug delivery* Systeme. Wirkstoffe können auf unterschiedliche Arten an Nanopartikel gekoppelt werden [75].**

#### 4.1.6 Cyclodextrine

Cyclodextrine (CD) sind Abbauprodukte der Stärke und bestehen aus wulstartig angeordneten Oligosacchariden mit einem zentralen Hohlraum (vgl. Abbildung 26). Das hierbei in der Ophthalmologie prominenteste Molekül ist 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin. Aufgrund ihrer lipophilen Kavität können Cyclodextrine Einschlussverbindungen, meist Wasserstoffbrückenbindungen oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, mit anderen lipophilen Molekülen eingehen und kommen somit als Kandidaten für den Transport vieler Medikamente infrage [76]. Seit einigen Jahren werden CD in der Pharmazie beansprucht und versprechen viele Vorteile bei der Verwendung in wässrigen Augentropfen. Die Behandlung des diabetischen Makulaödems ist beispielsweise Forschungsgegenstand von Ohira et. al. Er konnte in seinen klinischen Studien zeigen, dass die Anwendung von Cyclodextrin-Nanopartikeln im Vergleich zur Triamcinolonacetonid-Injektion, zur besseren Sehschärfe und verringerter Makuladicke führt. Die Ergebnisse seiner Arbeit zeigten aber auch einen erhöhten Augeninnendruck bei den Cyclodextrin-NP [77]. Medikamente sollen eine bei der Modifikation durch dieses Trägersystem höhere Bioverfügbarkeit und Stabilität nachweisen, das Auge weniger reizen und eine längere Haltbarkeit aufweisen [78]. Dass sich dennoch nur wenige CD-haltige Augentropfen auf dem Markt befinden und in Deutschland nur ein einziges Präparat zugelassen ist, ist vermutlich in deren Nebenwirkungen zu begründen. Es ist nicht auszuschließen, dass Cholesterol und Phospholipide von sich zuvor eingelagerten CD aus der Kornea herauslösen lassen, was einer Schädigung der Hornhaut entspricht. Weiter konnten Reaktionen mit Benzalkoniumchlorid und Parabenen, die als Konservierungsstoffe in Mehrdosenflaschen zugefügt sind, nachgewiesen werden. In Studien zeigten Patienten verkrustete Augenlider,

nachdem sie mit CD-Medikamenten behandelt wurden [79]. Diese Effekte können bei den in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikeln ausgeschlossen werden, was sich im Vergleich mit CD als entscheidender Vorteil herauskristallisiert.

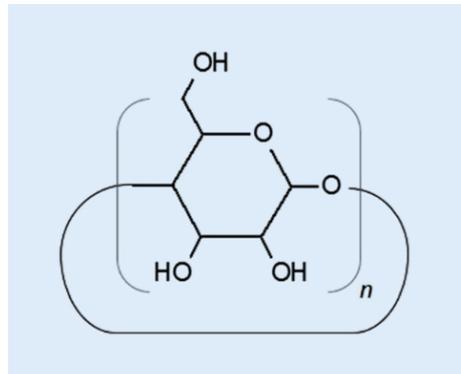


Abbildung 26: Allgemeine Strukturformel der Cyclodextrine [80]

#### 4.1.7 Übersicht verschiedener Nanomaterialien

Tabelle 11: Die Vergleichstabelle zeigt eine zusammenfassende Übersicht verschiedener Carriersysteme auf Basis von Nanomaterialien

	Beladung	Adhäsion an Cornea	Vorteil	Nachteil/ Nebenwirkung	Toxizität
<i>Poly-mere</i>	muss vor Beladung modifiziert werden, begrenzte Molekülgröße	verbessert [61]	erhöhte HZW im Vgl. zum alleinigen Wirkstoff	geringe Stabilität in Wasser	nicht ausreichend untersucht, teilweise positive Ergebnisse [62]
<i>Nano-gele</i>	keine hydrophoben Moleküle, keine makromolekularen Moleküle [64]	verbessert	verwendbar für Weichbleibe der Kontaktlinsen	Fremdkörpergefühl, Verschwommensehen, Sterilisation	mögliche erhöhte Immunogenität
<i>Liposo-men</i>	Membranbausteine müssen vor Beladung an Medikament angepasst werden	begrenzt	Verwendung für hydrophile und hydrophobe Wirkstoffe	instabil auf Muzinschicht, Aggregations-tendenz, phagozytoseanfällig [68]	wahrscheinlich nicht toxisch, da Bausteine körpereigen, keine Langzeitstudien

<i>Niosomen</i>	vgl. Liposomen	im Vgl. zu Liposomen verbessert	Wasserlöslichkeit, pH-Neutralität, Biokompatibilität [71]	hohe Partikelgröße → Barrieren im vorderen Augenabschnitt schwierig zu überwinden	vermutlich unbedenklich, weil nicht ionische Oberflächenstruktur
<i>Dendri- mere</i>	muss vor Beladung an den Wirkstoff angepasst werden	verbessert [74]	verlängerte Retentionszeit bei Beladung mit AB	Verschwommensehen, aufwändige Beladung	nicht ausreichend untersucht
<i>Cyclo- dextrine</i>	bilden Einschlussverbindungen, Dipol-Dipol oder Wasserstoffbrückenbindung	verbessert	höhere Bioverfügbarkeit, → Kornea soll weniger gereizt werden [78]	kann Irritationen der Kornea verursachen, Verkrustung der Augenlider [79]	kann Irritation der Kornea durch Herauslösen von Cholesterin und Phospholipiden hervorrufen
<i>DNA-NP</i>	Aptamerbindung, hydrophile und hydrophobe Wirkstoffe können gebunden werden, keine Modifikation nötig	verbessert	universelles Trägersystem, einfache Herstellung, Verwendung von biokompatiblen Material (DNA)	klinische Studien noch ausstehend	an verschiedenen retinalen Zelllinien negativ getestet, Langzeituntersuchungen ausstehend
<i>Modifizierte NP</i>	Aptamerbindung, hydrophile und hydrophobe Wirkstoffe können gebunden werden, keine Modifikation nötig	verbessert im Vgl. zu DNA-NP	vgl. DNA-NP <b>drug targeting</b> (MUC-NP) möglich, im Vgl. zu DNA-NP effizientere Herstellung	noch keine klinischen Erfahrungswerte, in-vivo Untersuchungen ausstehend	an cornealen Epithelzellen negativ getestet (IApt), MUC-NP werden derzeit getestet, Langzeituntersuchungen ausstehend

Im Vergleich zu anderen Nanomaterialien fällt auf, dass modifizierte NP-Systeme die meisten Vorteile aufweisen. Alle Systeme weisen zwar eine verlängerte Adhäsionszeit gegenüber dem allein applizierten Medikament auf, können aber oft nicht als universelle Trägersysteme eingesetzt werden oder verursachen Nebenwirkungen wie verschwommene Sicht oder Verkrustung der Augenlider, was dann zu schlechter Patientencompliance führt. Ein Merkmal, welches diese Arbeit von anderen Studien abhebt, ist, dass Versuche am erkrankten Modell durchgeführt wurden. Veröffentlichungen über Nanomaterialien als Trägersysteme berichten größtenteils über verbesserte Adhäsionszeiten an der gesunden Kornea, während im Infektionsexperiment dieser Arbeit (vgl. Kapitel 3.3.2) Effizienz und Wirkung der beladenen DNA-NP und der IApt nachgewiesen wurden.

## **4.2 Der weiterentwickelte / modifizierte DNA-Nanopartikel**

### **4.2.1 MUC-NP**

Die aus den DNA-NP weiterentwickelten Mucin-NP haben, wie schon in Kapitel 1.4.1 beschrieben, den Vorteil der Gewebsspezifität. Sie reichern sich an der Kornea an, da das MUC1-Aptamer des NP an das vorwiegend an der Hornhautoberfläche vorkommende MUC1-Molekül bindet. Diese Vektorisierung des Medikaments ist eine verhältnismäßig neue und innovative Methode in der Ophthalmologie, die ihren Ursprung in anderen Disziplinen wie der Onkologie hat. Ein Beispiel hierfür ist das Medikament Gemtuzumab-Ozogamicin, bei dem der monoklonale Antikörper Gemtuzumab mit dem Zytostatikum Ozogamicin gebunden wird. Der Antikörper bindet zielgerichtet an das Oberflächenprotein CD33 und ermöglicht dem Zytostatikum eine Aufnahme in die Zielzelle, was wiederum Voraussetzung für dessen Wirksamkeit ist [81]. 1995 zeigten Kreuter et al. im Tierversuch, dass Medikamente unter Verwendung von Aptameren Barrieren des Körpers passieren können [82]. Dalargin, ein Leu-Enkephalin-Analagon, welches die Schmerzempfindung beeinflusst indem es mit Opioid-Rezeptoren im Hirn wechselwirkt, kann die Blut-Hirnschranke unter Verwendung von mit Polysorbat-80 beschichteten Polybutylcyanoacrylat-NP überwinden. Zum einen sind Aptamere wenig anfällig aufgrund thermischer oder chemischer Reize zu denaturieren, wobei sich Antikörper in vivo als stabiler erwiesen haben. Zum anderen können sie relativ einfach, kostengünstig und effizient mittels SELEX gegen alle nur erdenklichen Zielstrukturen hergestellt werden. Ihre im Vergleich zu Antikörpern geringe Molekülgröße kann sich bei der Überwindung der Barrieren des vorderen Augenabschnitts zusätzlich vorteilhaft auswirken. Das Problem, welches bei der Verwendung von Aptameren als Targeting-Moleküle noch überwunden werden sollte, ist die Tatsache, dass diese durch Nukleasen, die im Körper vorkommen,

angegriffen und gespalten werden können. Hierzu gibt es vielerlei Lösungsansätze wie beispielsweise die terminale PEGylierung der Aptamere [83]. Hierbei wird dem Aptamer eine den Nucleasen resistente Einheit hinzugefügt. Die in dieser Arbeit verwendeten MUCIN-Nanoartikel stellen also eine aussichtsreiche Option eines weiterentwickelten Trägersystems für Medikamente für die Ophthalmologie dar. In den durchgeführten Untersuchungen zeigten die ungeladenen MUC-NP gute Adhäsionseigenschaften in Zellversuchen sowie ex- und in-vitro. Die Toxizität wird derzeit in einer weiteren Arbeit der AG Spitzer/Schnichels untersucht, ist aber als unbedenklich einzustufen, da bei der Herstellung nahezu dieselben Bausteine verwendet wurden. Ein wichtiger nächster Schritt ist jetzt, die MUC-NP mit Wirkstoffen zu beladen und dann weitere Studien durchzuführen, die Aussagen über Adhäsion und Funktion preisgeben. Parallel können weitere Aptamere entwickelt werden, die an andere Zielstrukturen in der vorderen und hinteren Augenkammer adressiert sind.

#### 4.2.2 IApt

Mit den lipid-modifizierten Aptameren (IApt) wurde das DNA-NP-System, wie schon in Kapitel 1.4.2 beschrieben, dergestalt modifiziert, dass die Aptamere nicht nur für die Bindung des Wirkstoffs an den NP verantwortlich sind, sondern selbst das Herzstück des NP bilden. Vier alkylmodifizierte 2'-Desoxyuridin-Nukleotide wurden dem 5'-Ende der Aptamere angehängt, um in wässriger Lösung eine Mizellenbildung derselben zu erzeugen. Das Trägersystem besteht folglich nur aus dem IApt-Wirkstoffkomplex, der sich als Assoziationskolloid selbstassembliert. Im Vergleich zu den unmodifizierten NP werden bei den IApt in einem ersten Arbeitsschritt lipidmodifizierte Aptamere hergestellt, die sich in wässriger Lösung zu NP zusammenlagern. Dieser Schritt entfällt bei den DNA-NP, bei denen das unmodifizierte Aptamer an den Basispartikel hybridisiert wird. Die Vorteile, die sich hieraus ergeben, liegen in der Produktion der NP und in deren Anwendung. Da die Aptamere selbst Gerüst des NP sind, entfällt der Hybridisierungsschritt, wie er in Abbildung 4 beschrieben ist. Weiterhin ist die Molekülgröße der IApt aufgrund der einzelsträngigen DNA-Struktur geringer als die der DNA-NP oder der meisten in Kapitel 4.1 beschriebenen Systeme, was sich bei der Überwindung der Barrieren des vorderen Augenabschnitts als nützlich und vorteilhaft auswirkt.

#### Adhäsion

In dieser Arbeit wurden IApt für die in der Ophthalmologie häufig verwendeten Medikamente Kanamycin, Brimonidin und Travoprost in vitro und in-vivo auf Adhäsion getestet. Hierbei konnten die IApt<sup>Bri</sup>- und IApt<sup>Tra</sup>-Proben 60 Minuten nach

Applikation nachgewiesen werden. Der IApt<sup>Kan</sup>-Partikel war selbst 120 Minuten nach dem Tropfen in situ nachzuweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Molekülgröße der Wirkstoffe. Das Kanamycin-Molekül besteht aus lediglich 23 Atomen, während Brimonidin mit 34 und Travoprost mit 42 eine weitaus größere Molekülgröße besitzen. Es ist also anzunehmen, dass kurze IApt mit geringer Größe bessere Adhäsionseigenschaften haben [84]. Viele Parameter, wie etwaiges Blinzeln eines Versuchstiers beim Tropfen oder die Entstehung von Artefakten beim Anfertigen oder Färben der Schnitte, beeinflussen den Verlauf und die Ergebnisse, weshalb auf eine adäquate Durchführung und eine ausreichend große Auswahl an Proben geachtet wurde. Im Speziellen auffällig beim Adhäsionsversuch in Kapitel 3.2.6 war, dass der mit dem Brimonidin-Aptamer verknüpfte NP IApt<sup>Bri</sup> nach fünf Minuten eine Adhäsionsrate von ,lediglich 25% aufwies. Dies mag beispielsweise daran liegen, dass Versuchstiere wie in diesem Absatz beschrieben, beim Applizieren der Augentropfen geblinzelt haben und der Wirkstoff die Kornea nicht adäquat erreichen konnte. Die weiteren Werte bei 15, 30, 60 und 120 Minuten lassen eine klare Tendenz erkennen und sprechen für diese Vermutung. Dieser Wert ist also als Ausreißer zu interpretieren und nicht aussagekräftig.

### Funktion

Da das mit Kanamycin beladene IApt (IApt<sup>Kan</sup>) in den Adhäsionsversuchen die besten Ergebnisse auswies, wurde dieses weiter auf Funktion und Wirksamkeit geprüft. Um nachzuweisen, dass das Kanamycin aus dem Trägersystem freigesetzt werden kann, wurde ein MIC-Test durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5.1), in dem das Wachstum von *E. coli* Bakterien unter Anwesenheit von freiem Kanamycin und IApt<sup>Kan</sup> beobachtet wurde. Das in Abbildung 19 dargestellte Ergebnis zeigt, dass IApt<sup>Kan</sup> in-vitro eine vergleichbar ähnliche Wachstumshemmung hervorrufen konnte wie freies Kanamycin. Die Zugabe von DNase, die zum Abbau des NP führte, bestätigte die erhaltene Funktionalität. Hieraus lässt sich schließen, dass die Freisetzung des Wirkstoffes funktioniert. Um nun aber Aussagen über das Wirksamkeitsprofil am Zielgewebe formulieren zu können, wurden mit *P. aeruginosa* infizierte Schweinehornhäute mit IApt<sup>Kan</sup> behandelt. Zum Vergleich wurden in weitere Proben U4T<sup>Kan</sup> und freies Kanamycin verwendet. Die mit IApt<sup>Kan</sup> und die mit U4T<sup>Kan</sup> behandelten Gruppen schnitten im Vergleich zu den mit freiem Kanamycin behandelten Präparaten signifikant besser ab. Die aus dem Versuch gewonnenen Daten zeigen, dass sowohl der DNA- als auch der lipid-NP ein vielversprechendes und effizientes Medium ist, um Kanamycin als Medikament bei bakteriellen Keratiden an die Kornea zu transportieren. Weiter lässt sich hieraus folgern, dass weitere Erkrankungen ebenso erfolgreich unter Verwendung des neuen Trägersystems therapiert werden können, was in weiteren Studien verifiziert werden sollte.

## Toxizität

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die mit Brimonidin, Travoprost und Kanamycin beladenen IApt in mehreren Konzentrationen auf Toxizität untersucht. Hierzu wurde ein MTS-Test, eine KV-Färbung und ein Caspase 3/7-Assay durchgeführt. Da die Lipid-Nanopartikel zukünftig vorerst topisch auf der Kornea angewendet werden sollen, stellten korneale Epithelzellen, die aus Limbus-Stammzellen von Schweinehornhäuten gewonnen wurden, ein besonders adäquates Modell dafür dar und wurden gegenüber immortalisierten Zelllinien wie ARPE-19, 661W und RGC-5 bevorzugt. Alle getesteten Proben zeigten in Bezug auf Zellviabilität, Zellzahl und Apoptoseinduktion keinerlei toxischen Eigenschaften auf die Epithelzellen und sind somit als unbedenklich und nicht toxisch einzustufen.

### **4.3 Weiterführende Untersuchungen und Ausblicke**

Die Behandlung von Krankheiten des vorderen und hinteren Augenabschnitts mit topisch applizierten Medikamenten ist durch die vielen anatomischen und physiologischen Barrieren und Hürden sehr komplex und mühsam (vgl. Kapitel 1.2.2). Aus diesem Grund war die Erforschung und Entwicklung neuer effizienterer Tropfpräparate ein wichtiges Bestreben der letzten Jahre und ist auch gegenwärtig Gegenstand und Ziel vieler Forscher in der Ophthalmologie [85]. Wird die Expositionszeit der Wirkstoffe am Zielort durch Carriersysteme verlängert, muss zum einen weniger oft getropft werden und kann zum anderen mit niedrigeren Dosierungen therapiert werden, was Nebenwirkungen verringert und zur Steigerung der Compliance führt. Weiter können potentiell toxische Medikamente mit Trägersystemen in niedrigeren, ungefährlicheren Konzentrationen verabreicht werden [86]. Die neuen modifizierten Nanomaterialien sind also sehr vielversprechend und sollten zukünftig weiter erforscht und entwickelt werden.

## MUZIN-NP

Besonders die Muzin-Nanopartikel sollten in weiteren Studien mit unterschiedlichen (?) Wirkstoffen beladen werden, um dann wiederum Adhäsion und Funktion zu testen. Hierbei könnten Versuchsaufbauten wie in Kapitel 3.5. helfen, um erste Aussagen machen zu können. Weiterhin kann das *drug targeting*-Prinzip auch auf andere Zielstrukturen ausgeweitet werden. Ist eine Zielstruktur und deren Sequenz bekannt, lassen sich Aptamere relativ unaufwändig herstellen. Beispielsweise könnten Erreger bakterieller Infektionen, insbesondere bei Vorhandensein von Multiresistenzen, auf eine mögliche Target-Struktur untersucht werden. So

könnte ein Medikament mittels modifizierter NP zielgerichtet eingesetzt werden um Krankheiten zu therapieren. Weiter könnten adressierte NP gegen bestimmte Zielzellen bei intravitrealer Injektion eingesetzt werden. Die Idee des adressierten Nanopartikels ist folglich eine universell einsetzbare Methode, die über viererlei Grenzen hinweg herangezogen werden kann.

## IApt

Die Lipid-Nanopartikel wurden in dieser Arbeit auf Adhäsion und Toxizität getestet und wiesen positive Ergebnisse auf. IApt<sup>Kan</sup> war im in-vivo-Experiment noch 120 Minuten nach dem Tropfen auf der Kornea detektierbar (vgl. Tabelle 10). Vergleichbar hierzu konnte freies Kanamycin in anderen Studien nur fünf Minuten lang detektiert werden [87]. Was diese Arbeit wesentlich von anderen Veröffentlichungen abhebt, ist, dass nicht nur Unbedenklichkeit und verbesserte Expositionszeit bewiesen wurden, sondern auch Studien zur Wirksamkeit durchgeführt wurden. Im MIC-Test wurde bewiesen, dass sich der Wirkstoff vom IApt freisetzt. Im Infektionsexperiment konnte die verbesserte antibiotische Wirkung des Medikaments beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.3.2). Die Waschgänge, die in Kapitel 3.3.2 zur Simulation der Tränenflüssigkeit durchgeführt wurden, zeigen, dass das freie Medikament ausgewaschen und somit nicht mehr effektiv sein kann. Das neue Trägersystem sollte in einer weiteren Studie, welche die Behandlung bakterielle Infektionen noch besser simuliert, untersucht werden. Denkbar wäre ein in-vivo Modell, in dem zuvor infizierte Ratten mit freiem Kanamycin, U4T<sup>Kan</sup> und IApt<sup>Kan</sup> behandelt werden. Neben den Antibiotikaversuchen sollte auch weiter mit den Aptameren für die Glaukom-Medikamente Brimonidin und Travoprost gearbeitet werden. Zum einen sollten zur Sicherung Toxizitätstests wie in 3.4 durchgeführt werden, zum anderen sollte aber auch die Wirksamkeit der Glaukomaptamere untersucht werden. Hierzu könnten beispielsweise Nanopartikel mit drucksenkenden Wirkstoffen beladen und im Tierversuch getestet werden. Vorstellbar wäre ein Versuchsaufbau, bei dem Ratten oder gar glaukomatöse Tiere mit den Proben getropft und im Anschluss in Diagnoseverfahren wie OCT, VEP oder einfacher durch Messen des Augeninnendrucks untersucht werden um Aussagen über die funktionale Regeneration der Ganglienzellen machen zu können. Mehr noch sollte die Flexibilität des IApt-Systems ausgenutzt werden. Neue IApt für Wirkstoffe, die via Augentropfen oder gar intravitreal appliziert werden, sollten entwickelt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Wirkstoffaufnahme in das Auge ist mit einigen Hürden und Barrieren verbunden. Augentropfen, welche die häufigste Applikationsform für Medikamente in der Augenheilkunde darstellen, weisen erschreckend niedrige Absorptionsraten von weniger als fünf Prozent auf. Aus der daraus entstehend, erhöhten Tropffrequenz vieler Medikamente, resultiert eine niedrige Compliance. Es besteht ein essenzieller medizinischer Bedarf eines Medikamententrägersystems, um Wirkstoffe adäquat, zielgerichtet und in ausreichender Menge an den Ort des Geschehens zu transportieren.

In dieser Arbeit wurden neue Konformationen untersucht, die aus den vielversprechenden DNA-Nanopartikeln der AG Spitzer/Schnichels in Tübingen weiterentwickelt wurden und als Träger für topisch applizierte Medikamente infrage kommen sollten. Muzin-Nanopartikel, die zielgerichtet an Oberflächenstrukturen der Kornea kleben bleiben und Lipid-Nanopartikel (IApt), die aus lipid-modifizierten Aptameren bestehen, bilden die Gruppe der neuen modifizierten Nanopartikel. Beide zeigten in in-vitro, ex-vivo und in in-vivo deutlich verbesserte Retentionszeiten, welche die von freien, auf dem Markt befindlichen Medikamenten, um ein Vielfaches überschreiten. Insbesondere der mit einem Kanamycin-Aptamer verknüpfte NP wies im Vergleich zu den anderen getesteten Proben gute Ergebnisse auf. In mehreren Toxizitätsstudien mit kornealen Epithelzellen konnte die Unbedenklichkeit der IApt bewiesen werden. Das mit Kanamycin beladene IApt führte in *E. coli*-Versuchen zu einer Reduktion des Bakterienwachstums, was die adäquate Freisetzung des Medikaments aus dem Wirkstoff-Aptamerkomplex beweist. Von großem Interesse sind die durchgeführten Wirksamkeitsstudien, deren Ergebnisse die Überlegenheit von IApt<sup>Kan</sup> und U4T<sup>Kan</sup> gegenüber der nicht modifizierten NP sowie gegenüber freiem Kanamycin in der klinischen Anwendung vermuten lassen. Im Vergleich zu anderen Trägersystemen, die ebenfalls längere Retentionszeiten aufweisen, haben die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nanopartikel wegweisende und folgenreiche Vorteile. Als universell einsetzbares Trägersystem bietet dieses Nanopartikelsystem Medikamenten ein Vehikel, um zum Zielort zu gelangen. Weiter bleiben viele unangenehme Nebenwirkungen aus. Diese Arbeit zeigt, dass die neuen Nanopartikel am Zielort ankommen und dort wirken. Vorderabschnittserkrankungen wie bakterielle Infektionen der Kornea könnten also langfristig mithilfe dieses Systems therapiert werden. Zudem ist eine Ausweitung auf topisch zu applizierende Augentropfen in der Glaukomtherapie oder gar intravitreal zu applizierende Medikamente in der Therapie der altersabhängigen Makuladegeneration denkbar und erstrebenswert.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Bob A: Duale Reihe Ophthalmologie, vol. 2: Thieme; 2002.
2. Kanski JJ: Klinische Ophthalmologie, vol. 5: Urban & Fischer; 2004.
3. Lang GK: Augenheilkunde, vol. 4: Thieme; 2009.
4. Grehn F: Augenheilkunde, vol. 30: Springer; 2008.
5. Wolff E: The Anatomy of the Eye and Orbit, fourth edition. London: H.K. Lewis & Co.; 1954.
6. Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gipson I: Assay of Mucins in Human Tear Fluid. *Experimental eye research* 2007, 84(5): 939-950.
7. Hodges RR, Dartt DA: Tear Film Mucins: Front Line Defenders of the Ocular Surface; Comparison with Airway and Gastrointestinal Tract Mucins. *Experimental eye research* 2013, 117: 62-78.
8. Kardon R, Price RE, Julian J, Lagow E, Tseng SC, Gendler SJ, Carson DD.
9. auge-online.de [http://www.auge-online.de/Erkrankungen/Trockenes\_Auge/Traenenfilm/traenenfilm.html]
10. Pascolini D, Mariotti SP: Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol* 2012, 96(5): 614-618.
11. Wehling M: klinische Pharmakologie, vol. 2. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005.
12. Worakul N, Robinson JR: Ocular pharmacokinetics/pharmacodynamics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1997, 44(1): 71-83.
13. Kearns VR, Williams RL: Drug delivery systems for the eye. *Expert Review of Medical Devices* 2009, 6(3): 277-290.
14. o.V.: Informationen für Sie: Intravitreale Medikamenteneingabe (Operative Medikamenteneingabe in das Auge. In: Edited by (BVA) BdADeV. Düsseldorf; 2011.
15. Avery RL, Bakri SJ, Blumenkranz MS, Brucker AJ, Cunningham ET, Jr., D'Amico DJ, Dugel PU, Flynn HW, Jr., Freund KB, Haller JA *et al*: Intravitreal injection technique and monitoring: updated guidelines of an expert panel. *Retina (Philadelphia, Pa)* 2014, 34 Suppl 12: S.1-18
16. Bloomfield SE, Miyata T, Dunn MW, Bueser N, Stenzel KH, Rubin AL: Soluble gentamicin ophthalmic inserts as a drug delivery system. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill: 1960)* 1978, 96(5): 885-887.
17. Yi X, Wang Y, Yu FS: Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Investigative ophthalmology & visual science* 2000, 41(13): 4093-4100.
18. Allan BD, Dart JK: Strategies for the management of microbial keratitis. *The British journal of ophthalmology* 1995, 79(8): 777-786.
19. Zhang W, Prausnitz MR, Edwards A: Model of transient drug diffusion across cornea. *Journal of Controlled Release* 2004, 99(2): 241-258.
20. Amrite AC, Edelhauser HF, Kompella UB: Modeling of corneal and retinal pharmacokinetics after periocular drug administration. *Investigative ophthalmology & visual science* 2008, 49(1): 320-332.

21. Bauer KH, Frömmig K.-H., Führer C.: Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2002.
22. Pharmaceuticals A: Fachinformation Alphagan® Augentropfen. In: Allergan Pharmaceuticals 1998.
23. Wang RF, Lee PY, Taniguchi T, Becker B, Podos SM, Serle JB, Mittag TW: Effect of oxymetazoline on aqueous humor dynamics and ocular blood flow in monkeys and rabbits. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 1993, 111(4): 535-538.
24. Hermann MM, Bron AM, Creuzot-Garcher CP, Diestelhorst M: Measurement of adherence to brimonidine therapy for glaucoma using electronic monitoring. *J Glaucoma* 2011, 20(8): 502-508.
25. Schnichels S: Nanopartikel machen Augentropfen wirksamer. *Bio Regio STERN* 2015: 5.
26. Diebold Y, Calonge M: Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research* 2010, 29(6): 596-609.
27. Herrmann A, De Vries JW, Spitzer MS, Schinchels SO: Means and methods for ocular drug delivery. In: Google Patents; 2016.
28. Ellington AD, Szostak JW: In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990, 346(6287): 818-822.
29. Ellington AD, Szostak JW: Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* 1992, 355(6363): 850-852.
30. Tuerk C, Gold L: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, NY)* 1990, 249(4968): 505-510.
31. Mullis KB, Erlich HA, Arnheim N, Horn GT, Saiki RK, Scharf SJ: Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences. In: Google Patents; 1987.
32. Schütze T, Wilhelm B, Greiner N, Braun H, Peter F, Mörl M, Erdmann VA, Lehrach H, Konthur Z, Menger M *et al*: Probing the SELEX Process with Next-Generation Sequencing. *PLoS ONE* 2011, 6(12): e29604.
33. Tarun Kumar Sharma RS: Nucleic Acid Aptamers as an Emerging Diagnostic Tool for Animal Pathogens. *Adv Anim Eet Sci* 2014, 2: 50-55.
34. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., Feinsod M, Guyer DR: Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* 2004, 351(27): 2805-2816.
35. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* 2003, 9(6): 669-676.
36. Zhou G, Wilson G, Hebbard L, Duan W, Liddle C, George J, Qiao L: Aptamers: A promising chemical antibody for cancer therapy. *Oncotarget* 2016, 7(12): 13446-13463.
37. Simunovic MP, Maberley DA: ANTI-VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR THERAPY FOR PROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Retina (Philadelphia, Pa)* 2015, 35(10): 1931-1942.
38. Strudel LV: DNA-Nanopartikel als potentielle Medikamententräger zur Behandlung von Vorderabschnittserkrankungen am Auge. Tübingen 2017.

39. Willem de Vries J, Schnichels S, Hurst J, Strudel L, Gruszka A, Kwak M, Bartz-Schmidt KU, Spitzer MS, Herrmann A: DNA nanoparticles for ophthalmic drug delivery. *Biomaterials* 2018, 157: 98-106.
40. Argüeso P, Tisdale A, Spurr-Michaud S, Sumiyoshi M, Gipson IK: Mucin Characteristics of Human Corneal-Limbal Epithelial Cells that Exclude the Rose Bengal Anionic Dye. *Investigative ophthalmology & visual science* 2006, 47(1): 113-119.
41. Christian Wolfram NP: Weißbuch zur Situation der ophthalmologischen Versorgung in Deutschland. München: Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG); 2012.
42. Bertani G: Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 1951, 62(3): 293-300.
43. Krishnamoorthy RR, Clark AF, Daudt D, Vishwanatha JK, Yorio T: A Forensic Path to RGC-5 Cell Line Identification: Lessons Learned Misidentification of RGC-5 Cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 2013, 54(8): 5712-5719.
44. Clark A: On the use of immortalized ocular cell lines in vision research: the unfortunate story of RGC-5. *Experimental eye research* 2013, 116.
45. Ferreira CS, Papamichael K, Guilbault G, Schwarzacher T, Gariepy J, Missailidis S: DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2008, 390(4): 1039-1050.
46. Tan L, Gee Neoh K, Kang ET, Choe WS, Su X: Designer tridentate mucin 1 aptamer for targeted drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences* 2012, 101(5): 1672-1677.
47. Kwak M, Minten IJ, Anaya DM, Musser AJ, Brasch M, Nolte RJ, Mullen K, Cornelissen JJ, Herrmann A: Virus-like particles templated by DNA micelles: a general method for loading virus nanocarriers. *Journal of the American Chemical Society* 2010, 132(23): 7834-7835.
48. B. Neumeister HKG, R. Braun: Mikrobiologische Diagnostik, vol. 2. Stuttgart: Thieme; 2009.
49. Kapuscinski J: DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry* 1995, 70(5): 220-233.
50. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD: Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor protocols* 2014, 2014(10): pdb.top071795.
51. Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RL, Fox K, Wydra RL, Streckowski L: DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 1990, 29(36): 8452-8461.
52. Yusifov TN, Abduragimov AR, Narsinh K, Gasymov OK, Glasgow BJ: Tear lipocalin is the major endonuclease in tears. *Molecular vision* 2008, 14: 180-188.
53. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG: Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications* 1991, 3(7): 207-212.
54. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M: Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor protocols* 2016, 2016(4): pdb.prot087379.

55. Chiba K, Kawakami K, Tohyama K: Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in vitro: An international journal published in association with BIBRA* 1998, 12(3): 251-258.
56. Gillies RJ, Didier N, Denton M: Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical biochemistry* 1986, 159(1): 109-113.
57. Chang HY, Yang X: Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 2000, 64(4): 821-846.
58. Kuribayashi K, Mayes PA, El-Deiry WS: What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer Biology & Therapy* 2006, 5(7): 763-765.
59. Technical Bulletin Caspase-Glo® 3/7 Assay Instructions for Use of Products G8090, G8091, G8092 and G8093 [<https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/Caspase-Glo%203%207%20Assay%20Protocol.pdf>]
60. Schultheiss M, Schnichels S, Miteva K, Warstat K, Szurman P, Spitzer MS, Van Linthout S: Staurosporine-induced differentiation of the RGC-5 cell line leads to apoptosis and cell death at the lowest differentiating concentration. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2012, 250(8): 1221-1229.
61. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G: Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Journal of drug targeting* 2011, 19(6): 409-417.
62. Enriquez de Salamanca A, Diebold Y, Calonge M, Garcia-Vazquez C, Callejo S, Vila A, Alonso MJ: Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. *Investigative ophthalmology & visual science* 2006, 47(4): 1416-1425.
63. Ye Yanqi YJ, Gu Then: Versatile Protein Nanogels Prepared by In Situ Polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics* 2016, 217(3): 10.
64. Hoare TR, Kohane DS: Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 2008, 49(8): 1993-2007.
65. Martin R, Sanchez I, de la Rosa C, de Juan V, Rodriguez G, de Paz I, Zalama M: Differences in the daily symptoms associated with the silicone hydrogel contact lens wear. *Eye & contact lens* 2010, 36(1): 49-53.
66. Gregoriadis G, Wills EJ, Swain CP, Tavill AS: Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. *Lancet (London, England)* 1974, 1(7870): 1313-1316.
67. Prabhu P, Nitish KR, Koland M, Harish N, Vijayanarayan K, Dhondge G, Charyulu R: Preparation and Evaluation of Nano-vesicles of Brimonidine Tartrate as an Ocular Drug Delivery System. *Journal of young pharmacists: JYP* 2010, 2(4): 356-361.
68. Agarwal R, Iezhitsu I, Agarwal P, Abdul Nasir NA, Razali N, Alyautdin R, Ismail NM: Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. *Drug delivery* 2016, 23(4): 1075-1091.

69. Handjani-Vila RM, Ribier A, Rondot B, Vanlerberghie G: Dispersions of lamellar phases of non-ionic lipids in cosmetic products. *International journal of cosmetic science* 1979, 1(5): 303-314.
70. Abdelbary G, El-Gendy N: Niosome-encapsulated gentamicin for ophthalmic controlled delivery. *AAPS PharmSciTech* 2008, 9(3): 740-747.
71. Liu S, Jones L, Gu FX: Nanomaterials for ocular drug delivery. *Macromol Biosci* 2012, 12(5): 608-620.
72. Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J, Smith P: A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polymer Journal* 1985, 17: 117.
73. Kambhampati SP, Kannan RM: Dendrimer nanoparticles for ocular drug delivery. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics: the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2013, 29(2): 151-165.
74. Cheng Y, Qu H, Ma M, Xu Z, Xu P, Fang Y, Xu T: Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as biocompatible carriers of quinolone antimicrobials: An in vitro study. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2007, 42(7): 1032-1038.
75. Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, Amiji M: A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release* 2008, 126(3): 187-204.
76. Franz G, Alban S: Cyclodextrine. *Pharmakognosie-Phytopharmazie Springer, Berlin* 1999: 337-339.
77. Ohira A, Hara K, Johannesson G, Tanito M, Asgrimsdottir GM, Lund SH, Loftsson T, Stefansson E: Topical dexamethasone gamma-cyclodextrin nanoparticle eye drops increase visual acuity and decrease macular thickness in diabetic macular oedema. *Acta ophthalmologica* 2015, 93(7): 610-615.
78. Klein SZT: Cyclodextrine Wundertüten in Pharmazie und Alltag. *Pharmazeutische Zeitung* 2008, 28.
79. Loftsson T, Jarvinen T: Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 1999, 36(1): 59-79.
80. Löscher M, Hurst J, Strudel L, Spitzer MS, Schnichels S: Nanopartikel als Drug-Delivery-Systeme für die Ophthalmologie. *Der Ophthalmologe* 2017.
81. van Der Velden VH, te Marvelde JG, Hoogeveen PG, Bernstein ID, Houtsmuller AB, Berger MS, van Dongen JJ: Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood* 2001, 97(10): 3197-3204.
82. Kreuter J, Alyautdin RN, Kharkevich DA, Ivanov AA: Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Research* 1995, 674(1): 171-174.
83. Da Pieve C, Blackshaw E, Missailidis S, Perkins AC: PEGylation and bio-distribution of an anti-MUC1 aptamer in MCF-7 tumor-bearing mice. *Bioconjugate chemistry* 2012, 23(7): 1377-1381.

84. Strudel L, Hurst J, Gruszka A, Hagel U, De Vries JW, Bartz-Schmidt KU, Herrmann A, Spitzer MS, Schnichels S: lipid modified aptamers as vehicles for ophthalmic drug delivery. *ARVO Annual Meeting Abstract* 2017, 58(8).
85. Souza JG, Dias K, Pereira TA, Bernardi DS, Lopez RF: Topical delivery of ocular therapeutics: carrier systems and physical methods. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2014, 66(4): 507-530.
86. Lallemand F, Felt-Baeyens O, Besseghir K, Behar-Cohen F, Gurny R: Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2003, 56(3): 307-318.
87. Spitzer MS, Schnichels S, Strudel L, Hofmann J, Bartz-Schmidt KU, Herrmann A, de Vries JW: Enhanced antibiotic delivery through DNA-based nanoparticles. *Investigative ophthalmology & visual science* 2014/04/30, 55(13).

## 6.1 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde im Department für Augenheilkunde an der Universitäts-Augenlinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Martin Spitzer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. M. Spitzer und Dr. rer. nat. Sven Schnichels (Laborleiter), die mir das Thema überließen und diese Arbeit betreuten.

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Dr. Schnichels, Dr. de Vries, Dr. Hurst) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Sven Schnichels, Dr. J.W. de Vries und durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Ravensburg, den 04.02.2020



---

Ulrich Hagel



## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologischer Aufbau der Kornea und des Tränenfilms. Schematische Darstellung der in Kapitel 1.1.1 beschriebenen Schichten und des Tränenfilms [4] (vgl. 1.1.2).....	10
Abbildung 2: Schematische Darstellung des vorderen Augenabschnitts und des dreischichtigen Tränenfilms [9].....	11
Abbildung 3: Alkylmodifiziertes Desoxyuridin .....	15
Abbildung 4: Synthetisch produzierte DNA-Stränge werden mit Dodecenmodifizierten Desoxyuridingruppen gekoppelt und die eigentlich hydrophilen DNA-Stränge werden amphiphil (I). Diese bilden aufgrund der Mikrophasenseparation in wässriger Lösung dann Mizellen mit hydrophobem Lipidkern und hydrophiler Hülle aus Einzelstrang-DNA (II) [27].....	15
Abbildung 5: Wirkstoffe können an die NP unter Zuhilfenahme hydrophober Wechselwirkungen (I), kovalent gebunden an komplementäre DNA-Stränge (II) oder mittels Aptameren (III) verknüpft werden. ....	16
Abbildung 6: Im SELEX-Verfahren werden spezifische Oligonukleotide aus einer Zufallsbibliothek an Zielproteine gebunden und mittels PCR vermehrt [32]. ....	17
Abbildung 7: MUC1-NP mit einem Aptamer zur Beladung des Wirkstoffs und einem zweiten Aptamer, welches an das auf dem Korneaepithel befindliche MUC1 bindet.....	19
Abbildung 8: Lipidmodifizierte Aptamere (IApts) formen in wässriger Lösung einen Nanopartikel mit Mizellenstruktur. Dieser kann mit einem Wirkstoff beladen werden.....	19
Abbildung 9: Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Aptamere für Kanamycin, Brimonidin und Travoprost.....	27
Abbildung 10: Schematische Darstellung des kompetitiven ELISA-Tests. Wird im ersten Schritt viel MUC-1 vom Aptamer gebunden und somit ausgewaschen, kann das MUC1-HRP-Konjugat im zweiten Schritt an den MUC-1 Antikörper auf dem Plattenboden binden. Im dritten Schritt setzt dieses ein Substrat um, welches flourophotometrisch detektiert werden kann.....	29
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Caspase 3/7 Assay [59] .....	39
Abbildung 12: Mithilfe des kompetitiven ELISA-Tests konnte die Bindungsaffinität der MUC1-Aptamere zu MUC1 aus Ratte und Schwein evaluiert werden. Zur Kontrolle wurde ein weiterer ELISA-Test mit humanem MUC1 durchgeführt.	

Auf der X-Achse ist die relative Bindungsaffinität des Proteins, auf der Y-Achse die Konzentration des Aptamers aufgetragen. ....	42
Abbildung 13: Representative Aufnahmen von mit verschiedenen NP und Muzin-Aptameren behandelten RGC5 Zellen. Um die Adhäsionseigenschaften des MUC1-Aptamers vergleichen zu können, wurde ein mit einem Kanamycin-Aptamer gekoppelter NP verwendet (Ky2). Zur Negativkontrolle wurden RGC-5-Zellen mit Puffer behandelt. Alle Bilder wurden in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. ....	44
Abbildung 14: Repräsentative Aufnahmen von mit verschiedenen NP behandelten Zellen. I. Korneale Epithelzellen wurden mit Nanopartikeln, Muzin-NP und Muzinaptameren (vgl. Tabelle 1) behandelt. Die Zellkerne erscheinen aufgrund der DAPI-Färbung blau, die Atto488 modifizierten NP fluoreszieren grün. Alle Bilder wurden in 200-Facher Vergrößerung aufgenommen. II. Immunhistochemische Färbung der Zellen. Das markierte MUC-1 imponiert als rote Struktur. Auf allen Proben konnte NP detektiert werden, wobei die U4T-apt-Proben am stärksten fluoreszierten (vgl. Tabelle 5). Die Bilder wurden in 200- bzw. 400-facher Vergrößerung aufgenommen. ....	47
Abbildung 15: Repräsentative Aufnahmen der wie in 2.5.1 beschrieben hergestellten MUC-NP mit Inkubationszeiten von 5-30 Minuten. Alle Bilder wurden in 50-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Zellkerne stellen sich durch die DAPI-Färbung als blaue Punkte dar. Die mit Atto488 gekoppelten NP sind in den Bildern grün dargestellt. Alle getesteten NP zeigen gute Adhäsionseigenschaften am Epithel der Kornea.....	48
Abbildung 16: Repräsentative Aufnahmen der wie in 2.5.1 beschrieben hergestellten MUC-NP in immunhistochemischer Färbung. Das angefärbte MUC1 Protein imponiert in dieser Färbung als rotes Band auf dem Epithel. Zur Kontrolle wurden weitere mit MUC-NP behandelte Schweineaugen lediglich mit TBS-Puffer behandelt. Alle Bilder wurden in einer 50-fachen und 100-fachen Vergrößerung aufgenommen. ....	49
Abbildung 17: Die Muzin-NP und das mit Atto488 gekoppelte MUC1-Aptamer wurden im in-vivo Versuch mit Ratten getestet. Beispielaufnahmen mit Inkubationszeiten von 30-120 Minuten. Die Zellkerne erscheinen aufgrund der DAPI-Färbung als blaue Punkte. Die mit Atto488 gekoppelten Proben erscheinen grün. Um Hintergrundfluoreszenz auszuschließen, wurde eine weitere Ratte lediglich mit Puffer behandelt (Kontrolle). In der immunhistochemischen MUC1-Färbung erscheint das MUC1 als rotes Band auf dem oberflächlichen Epithel. Alle Bilder wurden in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. ....	51

Abbildung 18: Repräsentative Aufnahmen der IApt mit Inkubationszeiten von 15-60 Minuten. Alle Bilder wurden in einer 50-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Zellkerne stellen sich durch die DAPI-Färbung als blaue Punkte dar. Die mit Atto488 gekoppelten NP sind in den Bildern grün dargestellt. Alle getesteten NP zeigen gute Adhäsionseigenschaften am Epithel der Kornea.....	53
Abbildung 19: Beispielbilder von in-vivo Rattenaugen die mit Kanamycin-, Brimonidin-, und Travoprostbeladenen Lipid-Nanopartikeln (IApt <sup>x</sup> ) inkubiert wurden. Zur Kontrolle wurden Ratten lediglich mit Puffer behandelt. Alle Bilder wurden in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. ....	54
Abbildung 20: In-vitro Effizienz von IApt <sup>Kan</sup> . Das Wachstum der <i>E. coli</i> -Bakterien wird durch IApt <sup>Kan</sup> (rote Kurve) und IApt <sup>Kan</sup> in Anwesenheit von DNase (blaue Kurve) ähnlich wie durch freies Kanamycin B (schwarze Kurve) gehemmt. Dies beweist die Freisetzung und erhaltene Funktionalität des Wirkstoffs des NP.....	56
Abbildung 21: Wirksamkeitsstudie Kanamycin NP auf Schweinecornea. Die Ergebnisse des in 3.4.2 beschriebenen Experiments zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen IApt <sup>Kan</sup> , der Kontrolle (Puffer) und dem freien Kanamycin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert an. Statistische Unterschiede wurden mit *** (p<0.001) im Vergleich zur Kontrolle und mit ++ (p<0.01) im Vergleich zu freiem Kanamycin angegeben.....	57
Abbildung 22: Zellviabilität der mit IApt behandelten Zellen im Vergleich zu mit TBS und Staurosporin (Stauro) behandelten Zellen. Die Puffer-Kontrollzellen wurden hierbei gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Proben wurden mit diesen und der Positivkontrolle (Stauro) verglichen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert an. Signifikante Unterschiede sind mit +++ p<0.0001 verglichen mit Stauro und ** p<0.01 verglichen mit der Kontrolle (Ktr.) gekennzeichnet. Zwischen den Lipid-NP und der Kontrolle konnte in diesem Versuch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. ....	58
Abbildung 23: Die Zellzahl der mit IApt behandelten Zellen im Vergleich zu mit TBS und Staurosporin (Stauro) behandelten Zellen. Die Puffer-Kontrollzellen wurden hierbei gleich 100% gesetzt. Alle anderen Proben wurden mit diesen und der Positivkontrolle (Stauro) verglichen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert an. Signifikante Unterschiede sind mit +++ p<0.0001 verglichen mit Stauro und *** p<0.001 verglichen mit der Kontrolle (Ktr.) gekennzeichnet. Zwischen den Lipid-NP und der Kontrolle konnte in diesem Versuch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. ....	59

Abbildung 24: Apoptoseinduktion der mit lApt behandelten Zellen im Vergleich zu mit TBS-Pufferlösung und Staurosporin (Stauro) behandelten Zellen. Die Puffer-Kontrollzellen wurden hierbei gleich 100 % gesetzt. Alle anderen Proben wurden mit diesen und der Positivkontrolle (Stauro) verglichen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert an. Signifikante Unterschiede sind mit +++  $p < 0.0001$  verglichen mit (Stauro) und \*\*\*  $p < 0.001$  verglichen mit der Kontrolle (Ktr.) gekennzeichnet. Zwischen den Lipid-NP und der Kontrolle konnte in diesem Versuch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. ....60

Abbildung 25: Beispielhafte Schemazeichnung einiger *drug delivery* Systeme. Wirkstoffe können auf unterschiedliche Arten an Nanopartikel gekoppelt werden [75]. ....65

Abbildung 26: Allgemeine Strukturformel der Cyclodextrine [80] .....66

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema zur Herstellung der Proben für den Versuch 2.5.2. (Es wurden DNA-Nanopartikel (U4T), NP mit Muzin1-Aptameren (U4T-apt) und Muzin1-Aptamere, die nicht in einem Nanopartikel gebunden, jedoch direkt mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff (Atto488) verknüpft sind (MUCapt), in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Als Negativkontrolle wurden Ky2-NP verwendet (cU4T-Ky2 FAM), welche analog zum Muzin1-Nanopartikel (U4T-apt) hergestellt wurden. ....	25
Tabelle 2: Pipettierschema zur Herstellung der Proben für den Versuch 2.5.3 und 2.5.4. Zur Vergleichskontrolle wurde in Versuch 2.5.4 ein Nanopartikel ohne MUC1-Aptamer hergestellt (U4T).....	26
Tabelle 3: Pipettierschema zur Herstellung der Lipid-NP für die Versuche 2.5.3 und 2.5.4. Es wurden Aptamere für das Antibiotikum Kanamycin, Brimonidin und Travoprost verwendet. Letztere sind Wirkstoffe, die in der Glaukomtherapie verwendet werden.....	27
Tabelle 4: Die Aptamere wurden auf ihre Bindungsaffinität zu Ratten- und Schweine-MUC1 getestet. Zur Kontrolle wurde humanes MUC1 verwendet. Dieses wurde in aufsteigender Konzentration in die Wells pipettiert. Standard C (Stand.C) entspricht MUC1 in der Konzentration 1 ng/ml.....	30
Tabelle 5: Verdünnung der verwendeten Antikörper .....	34
Tabelle 6: Die Objektträger aus den Adhäsionsversuchen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und in Bewertungsschemata eingeordnet. Proben, bei denen kein Messwert erhoben wurde, wurden mit einem – gekennzeichnet. ....	40
Tabelle 7: Optische Kontrolle der Zelladhäsion aller getesteter NP und der MUC-Aptamere (- = keine NP auf den Zellen, +- = Zellrasen schwach bedeckt, + = Zellrasen mäßig bedeckt, ++ = Zellrasen stark bedeckt, +++ = Zellrasen sehr stark bedeckt).....	45
Tabelle 8: Optische Kontrolle der Zelladhäsion aller getesteter NP und der MUC-Aptamere (- = keine NP auf den Zellen, +- = Zellrasen schwach bedeckt, + = Zellrasen mäßig bedeckt, ++ = Zellrasen stark bedeckt, +++ = Zellrasen sehr stark bedeckt).....	48
Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Daten aus 3.2.3 (- = keine NP auf den Zellen, +- = Zellrasen schwach bedeckt, + = Zellrasen mäßig bedeckt, ++ = Zellrasen stark bedeckt, +++ = Zellrasen sehr stark bedeckt). Die Ergebnisse der Versuche wurden analysiert und entsprechend einem Schema zugeordnet, welches sich an der Menge der detektierten NP orientiert (vgl. Kapitel 2.5.11). ....	54

Tabelle 10: Übersichtliche tabellarische Darstellung der Daten aus 3.2.4 bis 3.2.6. Die Ergebnisse der Versuche wurden analysiert und entsprechend einem Schema zugeordnet, welches sich an der Menge der detektierten NP orientiert (vgl. Kapitel 2.5.11).....	55
Tabelle 11: Die Vergleichstabelle zeigt eine zusammenfassende Übersicht verschiedener Carriersysteme auf Basis von Nanomaterialien.....	66

### **7.3 Danksagung**

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Martin Spitzer bedanken, der mir dieses interessante Dissertationsthema überlassen hat und mich während der Promotion fortlaufend unterstützt hat. Ein großer Dank gebührt hierbei insbesondere seiner umfassenden und zuverlässigen Betreuung.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. Sven Schnichels für seine erstklassige Betreuung, seine engagierte Art und Weise mich an wissenschaftliche Arbeit heranzuführen und sein offenes Ohr bei Hürden, die es während meiner Zeit in seinem Labor zu überwinden galt, bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Jan Willem de Vries, der mit mir die chemischen Grundlagen erarbeitete und Dr. José Hurst, die mich insbesondere bei der praktischen Umsetzung meiner Arbeit unterstützt hat.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitarbeitern der AG Spitzer/Schnichels, die mir zuerst im Breunigerbau und später im Labor der neuen Augenklinik Materialien und Geräte zur Verfügung gestellt und mich verlässlich und hilfsbereit unterstützt haben.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Freunden, die mich inspirierten und motivierten, und bei meiner Familie für ihre Geduld und Liebe.

## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Vorname/Name: Ulrich Hagel  
Geburtsdatum: 01.09.1989  
Geburtsort: Laupheim  
Anschrift: Kuppelnaustraße 78 88212 Ravensburg

### Ausbildung

2009: Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife  
2009-2010: Zivildienst in einer karitativen Einrichtung  
2010/2011: Studium Zahnmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)  
2011-2017: Studium Zahnmedizin an der Eberhard Karls Universität in Tübingen  
Abschluss: Staatsexamen (28.09.2017)  
2018-2020: Vorbereitungsassistent in Ravensburg