

Aus dem
Departement für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik

**Sicherheitsbewertung von Lipid-DNA-Nanopartikeln für
die Verabreichung von okularen Arzneimitteln**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Deißenroth, Patricia

2024

Dekan: Prof. Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Spitzer

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. H. Gleiter

Tag der Disputation: 17.01.2024

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| I Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 6 |
| II Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| 1. Einleitung..... | 11 |
| 1.1 Das Auge..... | 11 |
| 1.1.1 Anatomischer Aufbau | 11 |
| 1.1.2 Anatomische und physiologische Barrieren | 12 |
| 1.2 Infektiöse Erkrankungen des vorderen Augensegments | 15 |
| 1.2.1 Konjunktivitis..... | 15 |
| 1.2.2 Keratitis | 16 |
| 1.3 Medikamentenapplikation am anterioren Segment | 16 |
| 1.3.1 Limitierende Faktoren: die Bioverfügbarkeit..... | 18 |
| 1.3.2 Toxizität..... | 20 |
| 1.4 Nanopartikuläre Trägersysteme zur Arzneimittelabgabe | 22 |
| 1.4.1 Definition Nanopartikel..... | 23 |
| 1.4.2 Vorteile gegenüber konventionellen Augentropfen..... | 24 |
| 1.5 Nanopartikel auf DNA-Basis | 25 |
| 1.5.1 Eigenschaften von DNA-Nanopartikeln..... | 25 |
| 1.5.2 Aufbau von DNA-Nanopartikeln | 26 |
| 1.5.3 Funktionalisierung von DNA-Nanopartikeln | 27 |
| 1.6 Ziel dieser Arbeit..... | 30 |
| 2. Material und Methoden | 31 |
| 2.1 Material | 31 |
| 2.1.1 Zelllinien | 31 |
| 2.1.2 Tiere | 32 |
| 2.1.3 Verbrauchsmaterialien | 32 |
| 2.1.4 Geräte und Programme | 34 |
| 2.2 Methoden | 35 |
| 2.2.1 Herstellung funktionalisierter NP..... | 35 |
| 2.2.2 Kultivierung der Zellen | 37 |
| 2.2.3 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTS-Assay..... | 39 |
| 2.2.4 Bestimmung der Zellmenge mittels Kristallviolett-Färbung..... | 39 |
| 2.2.5 Bestimmung der Apoptose-Induktion mittels Caspase 3/7-Assay | 40 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.2.6 | Statistische Auswertung der Zellkultur-Assays..... | 40 |
| 2.2.7 | Quantitative realtime-PCR | 41 |
| 2.2.8 | <i>In vivo</i> -Studien zur Sicherheitsbewertung der NP | 44 |
| 3. | Ergebnisse | 46 |
| 3.1 | U4T-NP | 46 |
| 3.1.1 | Vernachlässigbare Reduktion der Zellviabilität der Zelllinien RGC-5 und ARPE19..... | 46 |
| 3.1.2 | Keine toxische Veränderung der Zellmenge der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien..... | 48 |
| 3.1.3 | Ausschluss einer erhöhten Apoptose-Induktion der RGC-5- und ARPE19-Zellen..... | 49 |
| 3.1.4 | Keine signifikante Genexpression der inflammatorischen Marker .. | 50 |
| 3.1.5 | Zellviabilität von humanen Primärzellen im Toleranzbereich..... | 52 |
| 3.1.6 | Ausschluss einer toxischen Abnahme der Zellmenge bei Primärzellen..... | 54 |
| 3.1.7 | Geringe Apoptose-Induktion von Primärzellen | 55 |
| 3.1.8 | Exzellente Biokompatibilität in <i>in vivo</i> -Studien | 56 |
| 3.2 | U4T-Kanamycin-NP | 58 |
| 3.2.1 | Keine relevant verringerte Zellviabilität an RGC-5- und ARPE19-Zelllinien | 59 |
| 3.2.2 | Kein toxischer Einfluss auf die Zellmenge der Zelllinien RGC-5 und ARPE19..... | 60 |
| 3.2.3 | Keine toxische Erhöhung der Apoptose-Induktion der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien..... | 61 |
| 3.2.4 | Ausschluss einer signifikanten Veränderung der Genexpression inflammatorischer Marker | 63 |
| 3.2.5 | Keine signifikante Abnahme der Zellviabilität von Primärzellen..... | 65 |
| 3.2.6 | Konstante Anzahl an Primärzellen nach Inkubation mit Kanamycin-beladenen NP | 66 |
| 3.2.7 | Keine signifikant erhöhte Apoptose-Induktion bei humanen Primärzellen..... | 67 |
| 3.2.8 | Ausschluss einer Toxizität <i>in vivo</i> | 68 |
| 4. | Diskussion | 72 |
| 4.1 | Zytotoxische Wirkung von Nanopartikeln | 72 |
| 4.1.1 | Eigenschaften von Nanopartikeln, die die Toxizität beeinflussen .. | 72 |
| 4.1.2 | Biochemische und molekulare Mechanismen der Zytotoxizität | 74 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.1.3 | Unbedenklichkeit der getesteten U4T-NP | 77 |
| 4.2 | Verwendung von Zelllinien und Primärzellen | 78 |
| 4.3 | Studiendesign..... | 80 |
| 4.4 | Ausblick..... | 82 |
| 5. | Zusammenfassung | 84 |
| III | Literaturverzeichnis | 85 |
| | Erklärung zum Eigenanteil | 91 |

I Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 Horizontalschnitt durch den Bulbus oculi | 11 |
| Abbildung 2 Die fünf Schichten der Hornhaut einschließlich Aufbau des Tränenfilms | 13 |
| Abbildung 3 Pharmakokinetik des Auges bei topisch applizierten Arzneimitteln | 17 |
| Abbildung 4 Bildung der DNA-Nanopartikel | 26 |
| Abbildung 5 Verschiedene Beladungsmöglichkeiten der DNA-Nanopartikel .. | 28 |
| Abbildung 6 Schematische Darstellung der Zugabe der Kontroll- (grün), Puffer- (gelb) und U4T-NP-Lösungen (blau, verschiedene Konzentrationen) auf die jeweilige Zelllinie (RGC-5, ARPE19) bzw. Primärzellen (HCE) | 38 |
| Abbildung 7 Schematische Darstellung der Zugabe der Kontroll- (grün), Puffer- (gelb) und Kan-NP-Lösungen (blau, verschiedene Konzentrationen) auf die jeweilige Zelllinie (RGC-5, ARPE19) bzw. Primärzellen (HCE) | 38 |
| Abbildung 8 Kryoschnitte zur TUNEL-Färbung | 45 |
| Abbildung 9 MTS Viability Assay der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien | 47 |
| Abbildung 10 Kristall-Violett-Färbung der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien | 48 |
| Abbildung 11 Caspase 3/7 Assay der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien | 50 |
| Abbildung 12 qRT-PCR der 661W-Zellen | 52 |
| Abbildung 13 MTS Viability Assay der humanen primären Korneaepithelzellen | 53 |
| Abbildung 14 Kristall-Violett-Färbung der humanen primären Korneaepithelzellen | 54 |
| Abbildung 15 Caspase 3/7 Assay der humanen primären Korneaepithelzellen | 55 |
| Abbildung 16 TUNEL-Färbung der U4T-behandelten Kornea | 57 |
| Abbildung 17 <i>In vivo</i> Toxizität der mit U4T-12-NP behandelten Zellen nach 24 Stunden | 58 |
| Abbildung 18 MTS Viability Assay der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien | 59 |
| Abbildung 19 Kristall-Violett-Färbung der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien | 61 |
| Abbildung 20 Caspase 3/7 Assay der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien | 62 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 21 qRT-PCR der 661W-Zellen | 64 |
| Abbildung 22 MTS Viability Assay der humanen primären Korneaepithelzellen | 65 |
| Abbildung 23 Kristall-Violett-Färbung der humanen primären Korneaepithelzellen | 67 |
| Abbildung 24 Caspase 3/7 Assay der humanen primären Korneaepithelzellen | 68 |
| Abbildung 25 TUNEL-Färbung der U4T-12-Kanamycin-behandelten Kornea | 70 |
| Abbildung 26 <i>In vivo</i> Toxizität der mit U4T-12-NP behandelten Zellen nach 24 Stunden | 71 |

| | |
|--|----|
| Tabelle 1 Name, Details sowie Oligonukleotid-Sequenz der in dieser Studie verwendeten NP ssU4T, dsU4T und U4T-Kan | 36 |
| Tabelle 2 Sequenzdetails der verwendeten Oligonukleotide U4T, cU4T und cU4T-Kan zur Herstellung von NP, wobei der Name wie folgt dargestellt ist U4T mit U \triangleq alkylmodifiziertes Nukleotid, 4 \triangleq Anzahl der alkylmodifizierten Basen, T \triangleq Ort der Modifikation (5'-Ende der Oligonukleotid-Kette)..... | 36 |
| Tabelle 3 Primer für die qRT-PCR und ihre Sequenzen | 43 |

II Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| µl | Mikroliter |
| 661W | murine Photorezeptor-Zelllinie |
| ARPE-19 | Adulte retinale Pigmentepithel-19-Zellen |
| BAK | Benzalkoniumchlorid |
| Da | Dalton |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium (Standard-Nährmedium) |
| DNA | desoxy ribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| ds DNA | double stranded DNA (doppelsträngige DNA) |
| ss DNA | single stranded DNA (einzelsträngige DNA) |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dUTP | Desoxyuridintriphosphat |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay (Enzym-gekoppelter Immunadsorbtionstest) |
| HLA | Human Leukocyte Antigen (Humanes Leukozyten Antigen) |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| Kan | Kanamycin |
| LPS | Lipopolysacharid |
| M | Molar |
| MIC-Test | minimum inhibitory concentration test (Test für minimale Hemmkonzentration) |
| ml | Milliliter |
| MTS | Methyltetrazoliumsulfat 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium |
| MUC | Muzin |

| | |
|--------------|--|
| NP | Nanopartikel |
| nm | Nanometer |
| PBS | phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Saline) |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PFA | Paraformaldehyd |
| qRT-PCR | quantitative real-time polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) |
| RGC-5 | okuläre Zelllinie, ursprünglich charakterisiert als retinale Ganglienzelle aus der Ratte (in Diskussion) |
| RNA | ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| RT | Raumtemperatur |
| SD | Standardabweichung |
| SELEX | selection of ligands by exponential enrichment (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) |
| SDS | sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| TAE-Puffer | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBS | tris buffered saline (Tris-Pufferlösung) |
| TdT | Terminale Desoxyribosyl-Transferase |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNF α | Tumornekrosefaktor alpha |
| TUNEL | TdT-mediated dUTP Nick End Labeling |
| U | mittels Alkylketten/Lipidketten modifiziertes Deoxyuracil |

1. Einleitung

1.1 Das Auge

1.1.1 Anatomischer Aufbau

Der menschliche *Bulbus oculi* (Abbildung 1) setzt sich aus mehreren anatomischen Schichten zusammen. Die äußere Schicht (*Tunica fibrosa*), die sich aus Sklera (Lederhaut) und Kornea (Hornhaut) zusammensetzt, dient neben den Lidern und Wimpern dem Schutz des Auges vor mechanischen Einflüssen sowie Infektionen. Zur mittleren Schicht, der *Tunica vasculosa* (*Uvea*), zählen Iris (Regenbogenhaut), *Corpus ciliare* (Ziliarkörper) und Choroidea (Aderhaut). Die innere *Tunica nervosa* bildet die Retina (Netzhaut), deren Funktion in der Sinneswahrnehmung besteht [1, 2].

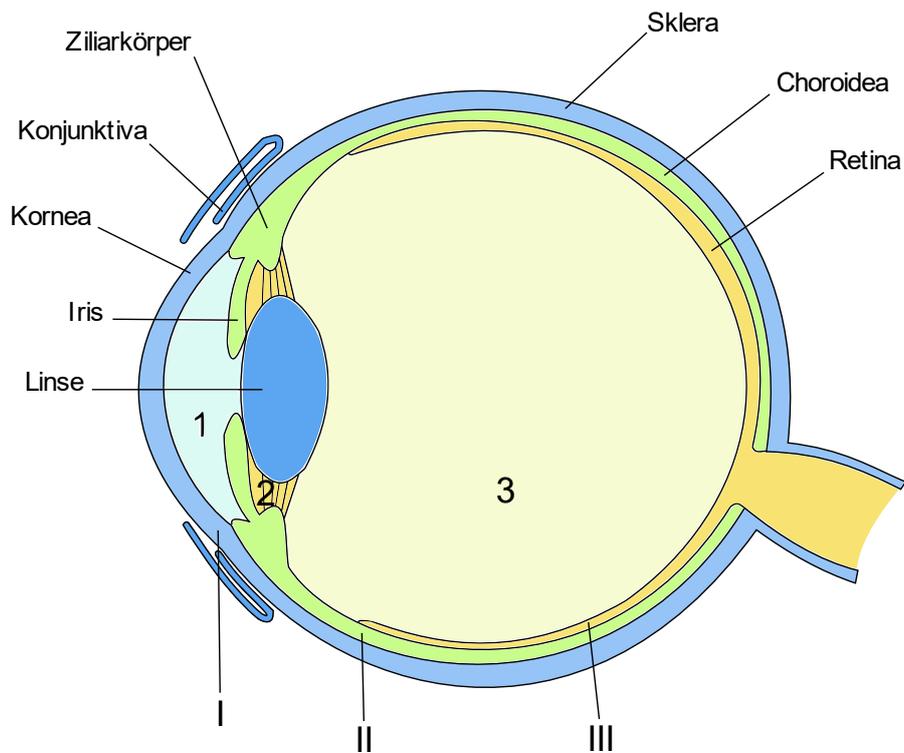


Abbildung 1 Horizontalschnitt durch den *Bulbus oculi*: Dargestellt sind die Schichten und Räume des Auges I *Tunica fibrosa* (blau) bestehend aus Sklera und Kornea, II *Tunica vasculosa* (grün) bestehend aus Iris, *Corpus ciliare* und Choroidea, III *Tunica nervosa* (gelb) bestehend aus Retina, 1 vordere Augenkammer, 2 hintere Augenkammer, 3 Glaskörper

Die innere Struktur des Bulbus (Abbildung 1) lässt sich in vordere und hintere Augenkammer (*Camera anterior & Camera posterior*) und den Glaskörperraum (*Camera vitrea/postrema*) unterteilen [1, 3].

Darüber hinaus differenziert man zwischen einem anterioren und einem posterioren Segment. Der vordere Augenabschnitt setzt sich aus Kornea, Iris, Ziliarkörper und Linse zusammen, während das hintere Segment aus Glaskörper, Retina, Choroidea und Sehnerv besteht [3]. Diese Gliederung spielt eine bedeutende Rolle bei der Arzneimittelverabreichung.

1.1.2 Anatomische und physiologische Barrieren

Aufbau der Kornea

Die Kornea nimmt eine wichtige Rolle bezüglich der Schutzmechanismen des Auges ein. Gemeinsam mit den Lidern und dem Tränenfilm verhindert sie das Eindringen von Mikroorganismen und Fremdkörpern in das Auge. Neben dem mechanischen Schutz verfügt die Kornea aufgrund ihrer sensiblen Innervation über bestimmte Reflexe, die den reflektorischen Lidschluss wie auch gesteigerten Tränenfluss induzieren [1, 3].

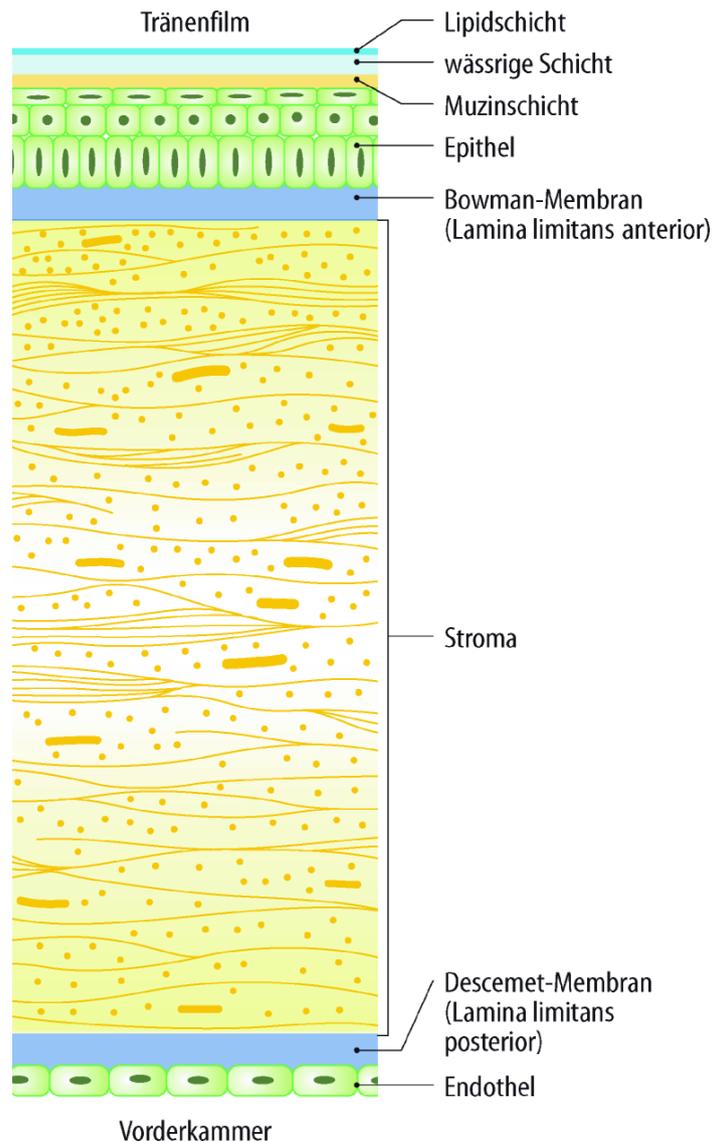


Abbildung 2 Die fünf Schichten der Hornhaut einschließlich Aufbau des Tränenfilms: Endothel, Descemet-Membran, Stroma, Bowman-Membran, Epithel [3]

Die Kornea besteht aus fünf Schichten (Abbildung 2). Hierbei bildet ein mehrschichtiges Plattenepithel die äußere Grenzschicht, dessen basale Zellen mit der darunter liegenden Bowman-Membran (*Lamina limitans anterior*) fest verbunden sind. Intaktes Hornhautepithel dient dem Schutz des Auges, indem es das Eindringen von Fremdstoffen sowie Mikroorganismen verhindert [1, 3]. Diese Barrierefunktion lässt sich auf *Tight junctions* im apikalen Drittel der epithelialen Zellen zurückführen. Hierbei handelt es sich um Verschlusskontakte, die über

Transmembranproteine (Claudine und Occludine) benachbarte Zellen dicht miteinander verknüpfen, sodass der interzelluläre Raum undurchlässig für Ionen und Moleküle ist. Ein Eindringen ins Gewebe bzw. der Stoffaustausch ist daher nur transzellulär möglich [2]. Nach Innen schließt sich das Stroma an, welches mit ca. 90% den Hauptanteil der Kornea einnimmt. Zwischen Hornhautstroma und der innersten Schicht, dem Endothel, liegt die Descemet-Membran (*Lamina limitans posterior*). Dem Endothel wird ebenfalls eine Barrierefunktion zuteil, die auf dem Vorhandensein von *Tight junctions* basiert [1, 3].

Aufbau des Tränenfilms

Der Tränenfilm bedeckt die Oberfläche des Bulbus. Gemeinsam mit der Hornhaut schützt er das Auge vor Infektionen [1].

Der Tränenfilm setzt sich aus drei unterschiedlichen Teilen zusammen. Von innen nach außen differenziert man eine Muzin-, eine wässrige sowie eine Lipidschicht (Abbildung 2) [5].

Der Augenoberfläche (Horn- und Bindehaut) liegt die Muzinschicht auf. Sie wird von den in der Bindehaut lokalisierten Becherzellen produziert. Die Aufgabe des gelartigen Sekrets besteht in der Stabilisierung bzw. Adhäsion des Tränenfilms auf dem Epithel, sowie dessen gleichmäßiger Benetzung [1, 6]. Die in der Tränenflüssigkeit vorkommenden Muzine lassen sich in zwei Gruppen klassifizieren: membranständige und sekretorische Muzine. Als membranständige Muzine sind MUC1, MUC4 und MUC16 bekannt, welche gemeinsam mit den sekretorischen Muzinen, darunter MUC5AC, dem Schutz der Augenoberfläche dienen. MUC5AC wird von Becherzellen der Konjunktiva sezerniert, die membranassoziierten Muzine stammen jeweils aus den Epithelzellen der Horn- oder Bindehaut [7]. Neben der Reinigungsfunktion dienen Muzine der Stabilisierung des Tränenfilms [2].

Die Tränendrüse (*Glandula lacrimalis*) sezerniert die mittlere wässrige Flüssigkeitsschicht, welche Unebenheiten der Oberfläche ausgleicht, die Gleitfähigkeit der Lider während des Blinzelns garantiert sowie als reinigende und

antimikrobiell wirkende Spülflüssigkeit fungiert. Dieser Effekt ist bedingt durch spezifische Proteine wie Lysozym, β -Lysin, Lactoferrin und γ -Globulin (IgA). Die oberflächige Lipidschicht stammt aus den Meibom-Drüsen und schützt die darunterliegende wässrige Phase vor Verdunstung. Sie dient somit der Tränenfilmstabilität [5].

Die Tränenproduktion beträgt etwa 0,5-2,2 μ l/min, kann jedoch durch Reizung gesteigert werden [1, 8]. Aufgrund von periodischem, unwillkürlich ausgeführtem Lidschlag wird das Tränensekret gleichmäßig auf der Bulbusoberfläche verteilt [1]. Das Zuschlagen der Lider spült den Flüssigkeitsfilm nach medial in den inneren Lidwinkel. Von hier gelangt sie über die Tränenpünktchen (*Puncta lacrimalia*) in die Tränenkanälchen (*Canaliculi lacrimales*) und weiter in den Tränensack (*Saccus lacrimalis*). Die Flüssigkeit wird abschließend über den Tränen-Nasen-Gang (*Ductus nasolacrimalis*) in die untere Nasenmuschel (*Concha nasalis inferior*) abtransportiert [3, 5].

1.2 Infektiöse Erkrankungen des vorderen Augensegments

1.2.1 Konjunktivitis

Einer Konjunktivitis können verschiedenste Ursachen zugrunde liegen. Grundsätzlich wird zwischen infektiösen und nicht infektiösen Konjunktividen differenziert. Auslöser einer konjunktivalen Infektion sind hauptsächlich Bakterien und Viren. Weltweit zählt die Konjunktivitis zu den häufigsten Augenerkrankungen [5]. In Europa ist sie die meistverbreitete ophthalmologische Infektionskrankheit. Viele Formen der Konjunktivitis verlaufen ohne bleibende Schäden zu verursachen. Die Therapie der infektiösen Konjunktivitis erfolgt erregerspezifisch. Bakteriell bedingte Infektionen werden mit Breitspektrumantibiotika wie beispielsweise Kanamycin oder Neomycin behandelt [1, 5].

1.2.2 Keratitis

Die Keratitis zählt zu den häufigsten monookularen Erblindungsursachen weltweit [9]. In Deutschland liegt die Inzidenz bei rund 50.000 Patienten pro Jahr [10], in Entwicklungsländern insgesamt bei etwa 1,5-2 Millionen Patienten [11]. In den Industrieländern stellen bakterielle Erreger mit über 90% den Hauptauslöser dar [12, 1]. Die infektiöse Keratitis wird grundsätzlich kausal therapiert. Je nach Erreger kommen Breitspektrumantibiotika, Virostatika oder Antimykotika zum Einsatz [13]. Zur antibiotischen Therapie wird unter anderem das in der Augenheilkunde oft eingesetzte Kanamycin appliziert [6, 1]. Die Behandlung erfolgt lokal, lediglich bei intraokularer Beteiligung ist eine systemische Behandlung indiziert [6].

1.3 Medikamentenapplikation am anterioren Segment

Die Therapie anteriorer Infektionen besteht in der Gabe entsprechender topischer Antiinfektiva, welche in der Regel in Form von Augentropfen verabreicht werden.

Das Medikament wird hierbei in den Bindehautsack getropft. Ein großer Teil (über 95%) des Pharmakons wird direkt aus dem Auge ausgeschwemmt oder gelangt über die lakrimale Drainage über die Nasenschleimhaut in den systemischen Kreislauf. Nur ein geringer Teil von ca. 3-5% wird vom Auge resorbiert. Die Arzneimittel erreichen zum einen über die korneale Route intraokulare Gewebe, zum anderen ist eine Aufnahme über die Konjunktiva und Sklera möglich (Abbildung 3) [8].

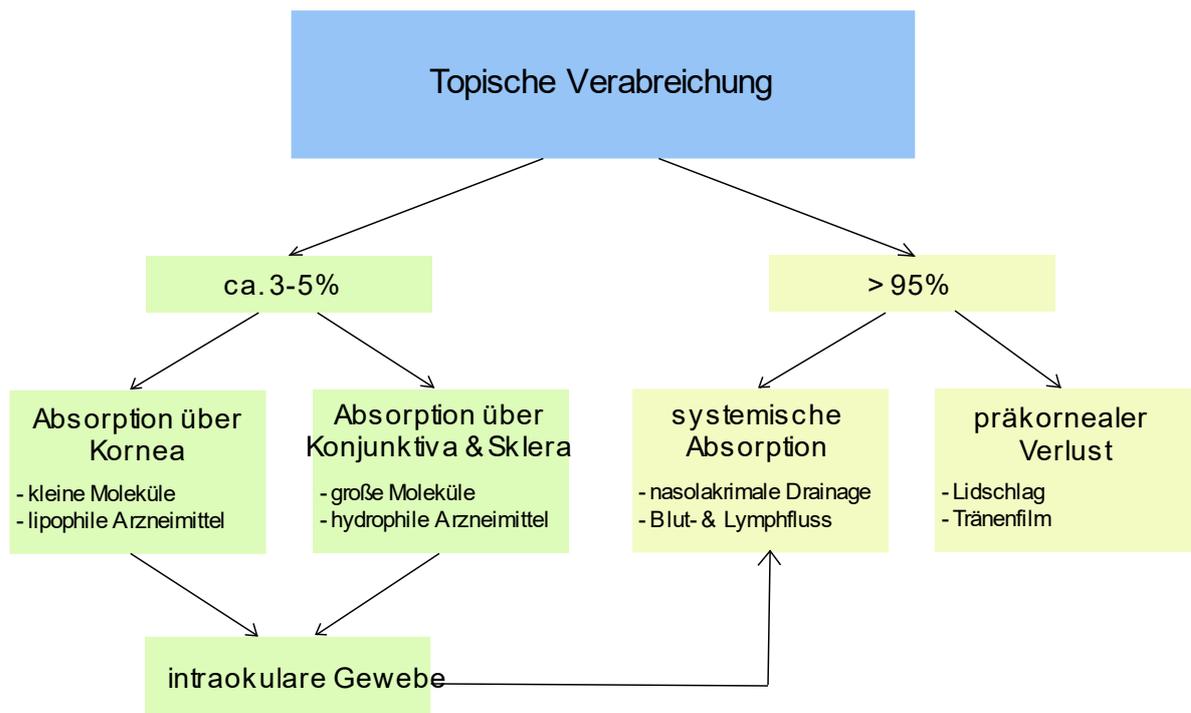


Abbildung 3 Pharmakokinetik des Auges bei topisch applizierten Arzneimitteln (modifiziert nach [8])

Augentropfen sind die meist verwendete Darreichungsform [8, 14, 15], da es sich zum einen um eine kostengünstige nicht-invasive Methode handelt, die relativ leicht in der Handhabung ist und somit eine gute Akzeptanz durch den Patienten mit sich bringt [8, 15]. Des Weiteren wird im Vergleich zu vielen anderen Applikationsformen bei der Verwendung von Augentropfen eine geringere Wirkstoffmenge (ca. 74%) systemisch absorbiert. Zudem wird der First-Pass-Metabolismus (Verstoffwechslung im Darm und in der Leber) umgangen, wodurch nur ein relativ geringer Dosierungsbedarf besteht [8]. Nachteilig sind hingegen neben einer oftmals schlechten Patientencompliance aufgrund der häufigen Tropffrequenz mögliche topisch wie auch systemisch auftretende unerwünschte Nebenwirkungen. Das größte Defizit dieser Applikationsform liegt in der eingeschränkten Bioverfügbarkeit des Arzneimittels [16]. Während bei intravitrealen Applikationen die systemische Absorption noch geringer ist, steigt jedoch das Risiko lokaler Nebenwirkungen und Infektionen. Zudem gestaltet sich

diese Art der Arzneimittelverabreichung wesentlich unangenehmer für Patienten und eignet sich eher für die Anwendung im posterioren Bereich [8, 14, 16].

1.3.1 Limitierende Faktoren: die Bioverfügbarkeit

Aufgrund der anatomischen und physiologischen Schutzmechanismen des Auges erreichen weniger als 5% topisch applizierter Arzneimittel intraokulare Strukturen [8, 14, 15]. Diese geringe Bioverfügbarkeit resultiert zu mehr als 75%, aus der kurzen Verweildauer des Arzneimittels auf der Augenoberfläche [8], welche durch den präkornealen Verlust (Lidschlag, Tränenfilm) zustande kommt. Des Weiteren reduzieren statische Hindernisse (Kornea, Konjunktiva) wie auch dynamische Faktoren (konjunktivaler Blut- und Lymph- sowie Tränenfluss) die Permeation der verbleibenden Wirkstoffmenge in tiefere Gewebe [8, 17].

Um eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration zu erzielen, ist die häufige Gabe hochkonzentrierter Pharmaka erforderlich. Dies mindert einerseits die Compliance des Patienten, wodurch der Therapieerfolg gefährdet wird. Zusätzlich wird das Auftreten möglicher Nebenwirkungen begünstigt [17].

Präkornealer Verlust

Bedingt durch den Lidschlag sowie der permanenten Tränenproduktion von etwa 0,5-2,2 $\mu\text{l}/\text{min}$ wird ein Großteil des Medikaments mithilfe der Tränenflüssigkeit binnen weniger Minuten aus dem präkornealen Bereich ausgeschwemmt [15, 8, 17]. Die Applikation von Augentropfen kann unter Umständen eine Irritation des Auges auslösen, wodurch eine verstärkte Tränensekretion provoziert wird. In der Folge nimmt die Reduktion des Arzneimittels über den Tränenabflussweg zu [15]. Die applizierte Menge von ca. 50 μl ist im Vergleich zum normalen Tränenvolumen von ca. 7 μl hoch, wodurch es ebenfalls zu einer verstärkten nasolacrimalen Drainage kommt.

Auch die Zusammensetzung des Tränenfilms wirkt sich negativ auf die Bioverfügbarkeit aus. Die in der Tränenflüssigkeit enthaltenen Proteine und Muzine können die Wirkstoffmoleküle binden und somit deren Konzentration reduzieren [15].

Kornealer Verlust

Die transkorneale Permeation stellt den Hauptabsorptionsweg [8] der meisten ophthalmologischen Medikamente dar. Gleichzeitig spielt sie aufgrund ihrer Barrierefunktion jedoch eine wichtige Rolle bei der Limitierung der Arzneimittelpenetration in intraokulare Gewebe [8]. Die geringe Permeabilität der Kornea resultiert aus ihrem Aufbau. Epitheliale *Tight junctions* bilden eine Diffusionsbarriere, indem sie den parazellulären Fluss einschränken. Das Epithel sowie das Endothel verfügen über einen hohen Lipidgehalt und setzen somit die Permeabilität hydrophiler Moleküle herab. Im Gegensatz hierzu weist das Stroma einen hydrophilen Charakter auf und begrenzt aufgrund dessen den Durchtritt lipophiler [8, 15]. Weiterhin beschränken Epithel und Stroma die Permeation von Makromolekülen, sodass lediglich Moleküle mit einer Größe von weniger als 50 kDa diffundieren können [15].

Konjunktivaler Verlust

Der histologische Aufbau der Konjunktiva hemmt die intraokularen Aufnahme topisch applizierter Arzneistoffe. Die apikalen Epithelzellen bilden mithilfe ihrer *Tight junctions* dichte Verbindungsstellen, wodurch parazellulär die Permeation in tiefer liegende Strukturen reduziert wird [15, 8]. Das Stroma ist reich an Blut- und Lymphgefäßen und sorgt für einen raschen Abtransport der Arzneimittel [8].

1.3.2 Toxizität

Die Verwendung konventioneller Augentropfen kann sowohl lokale [18, 19, 16] wie auch systemische [16, 15] Nebenwirkungen induzieren. Häufiger resultieren aus einer topischen Applikation lokale toxische Schädigungen. Dosis, Häufigkeit und Dauer [18] der Behandlung beeinflussen hierbei eine potenzielle Toxizität. Insbesondere Patienten mit bereits bestehenden okularen Erkrankungen sind prädispositioniert [18, 20]. Die okulare Toxizität ist nicht nur auf die in den Augentropfen enthaltenen Konservierungsstoffe zurückzuführen. Ebenso kann der Wirkstoff selbst, wie z.B. das verwendete Antibiotikum, eine schädigende Wirkung haben [18, 19, 21]. Die durch Augentropfenbehandlungen ausgelösten toxischen Reaktionen werden primär durch drei spezifische pathogenetische Mechanismen vermittelt: allergische Reaktionen, trockenes Auge und direkte epitheliale Schäden [18].

Pathohistologische Veränderungen treten im Epithel der Kornea wie auch der Konjunktiva auf [18, 19, 21]. Weiterhin führt eine möglich auftretende Toxizität oft zu einer signifikanten Zunahme entzündungsvermittelnder Zellen. Bedingt durch inflammatorische Prozesse kommt es zur Infiltration in Epithel und Stroma der Bindehaut [19–21]. Zudem ist ein deutlicher Anstieg an Entzündungsmarkern nachweisbar [18, 19, 21]. Die induzierten Horn- und Bindehautschäden wirken sich negativ auf die Schutzbarriere des Auges aus, woraus weitere Infektionen und größere Schäden an okularen Geweben resultieren können. [16, 19, 21]

Allergische Reaktionen

Am häufigsten löst die Verwendung konventioneller Augentropfen eine allergische Reaktion aus, die durch Überempfindlichkeiten gegen enthaltene Konservierungsmittel, Additiva und/oder Wirkstoff hervorgerufen wird [18, 19]. Diese übersteigerte Abwehrreaktion des Immunsystems wird durch eine IgE-vermittelte (Typ I) oder häufiger durch eine verzögerte (Typ IV) Hypersensibilität verursacht und resultiert in einer lokalen Entzündungsreaktion [18, 19, 21]. Im Zuge der ablaufenden immunologischen Kaskade kommt es zur Freisetzung

inflammatorischer Mediatoren, insbesondere Histamin. Dies führt u.a. zu einer Vasodilatation sowie erhöhten Permeabilität der Gefäße, welche eine erhebliche Infiltration von Entzündungszellen ins umliegende Gewebe induziert [19, 22]. Symptomatisch äußert sich eine allergische Reaktion der Augen durch starken Juckreiz, Brennen, Stechen, Tränen, Rötung, Lichtempfindlichkeit, Ekzeme der periorbitalen Haut, wobei pathognomonisch beide Augen betroffen sind [18, 19, 22]. Indirekt kann dies in der Folge zu Epithelschäden führen und somit zum teilweisen Verlust der Barrierefunktion [18, 22].

Trockenes Auge

Arzneimittelbedingt kann eine Veränderung des Tränenfilms auftreten. Hauptsächlich wird solch eine Nebenwirkung durch das enthaltene Konservierungsmittel, speziell Benzalkoniumchlorid (BAK), verursacht. BAK kann eine Instabilität des Tränenfilms bedingen, die eine übermäßige Verdunstung der wässrigen Phase und damit einhergehend eine unzureichende Menge an Tränenflüssigkeit induziert. Weiterhin kommt es zu einer veränderten bzw. fehlerhaften Zusammensetzung und somit einer Qualitätsminderung des Tränenfilms basierend auf einer nicht regelhaften Anzahl sowie Eigenschaften präkornealer Muzine [16, 18, 21]. Konjunktival wird eine deutliche Abnahme epithelialer Becherzellen beobachtet [18, 21, 7]. Folglich ist die Produktion des Muzins MUC-5AC beeinträchtigt. Weiterhin liegt eine reduzierte Dichte Muzin-exprimierender Zellen in Kornea und Konjunktiva vor, wodurch weniger membrangebundene Muzine MUC-1, MUC-4 und MUC-16 nachweisbar sind. Die präkornealen Muzine MUC-1, MUC-4, MUC-5AC und MUC-16 können sowohl in ihrer Expression, Verteilung wie auch Glykosylierung verändert sein [16, 18, 19, 7]. Infolge der qualitativen wie auch quantitativen Beeinträchtigung der Tränenflüssigkeit entsteht das Beschwerdebild des trockenen Auges (*Konjunktivitis sicca*) [18, 21, 7]. Die *Konjunktivitis sicca* ist gekennzeichnet durch ein Trockenheits- und Fremdkörpergefühl sowie Sehstörungen. Ebenso charakteristisch sind brennende, gerötete Augen mit Neigung zu verstärktem Tränenfluss [16, 19, 21, 7]. Die konservierungsmittelinduzierten Änderungen

wirken sich negativ auf die schützenden Eigenschaften des Tränenfilms aus, wodurch das Auge anfälliger gegenüber Infektionen ist [16, 18, 21].

Direkte epitheliale Schäden

Neben indirekten Veränderungen der Augenoberfläche infolge einer allergischen Reaktion oder eines trockenen Auges können direkte epitheliale Schäden provoziert werden [16]. Ein prädisponierender Faktor stellt die chronische und/oder kumulative Verwendung topisch applizierter Ophthalmika dar. Die apoptotische Wirkung lässt sich auf erhöhte Konzentrationen des Konservierungsstoffes bzw. des Wirkstoffes zurückführen. Der Verlust an vitalen kornealen sowie konjunktivalen Epithelzellen bedingt eine Verletzung der Schutzbarriere des Auges [16, 18].

Teilweise wird diese Störung bewusst gesucht, um die Permeabilität für Arzneimittel zu erhöhen. Das Konservierungsmittel BAK beispielsweise wird einerseits eingesetzt, um das Medikament zu stabilisieren, andererseits soll es zudem die Penetration ins Augeninnere verbessern und somit die Wirkung verstärken. Durch Aufbrechen der hydrophoben Barriere des Hornhautepithels können intraokular höhere Konzentrationen des Wirkstoffes erreicht werden [18, 21].

1.4 Nanopartikeläre Trägersysteme zur Arzneimittelabgabe

Seit geraumer Zeit werden neue Trägersysteme auf dem Gebiet der Arzneimittelverabreichung (Drug Delivery Systems) mit dem Ziel einer effizienteren Bioverfügbarkeit entwickelt. Die Problematik okulärer Schutzmechanismen des Auges, die sich bei konventioneller Applikationsform ergibt, soll überwunden werden [23, 24]. Weiterhin soll aufgrund der Eigenschaften neuartiger Transportsysteme die Wirkung der verabreichten Arzneimittel verstärkt werden, wobei gleichzeitig toxische Effekte minimiert

werden sollen. Einen vielversprechenden Ansatz bietet die Nanotechnologie, welche bereits in verschiedenen Anwendungsbereichen der Medizin (Bildgebung, Gen-Therapie, Arzneimittelabgabe) [25] eingesetzt wird. Neben unterschiedlichster verfügbarer nanomaterialbasierter Abgabesysteme, wie Liposome, Niosome, Dendrimere und Cyclodextrine, liegt im Bereich der okularen Arzneimittelabgabe ein besonderes Augenmerk auf nanopartikulären Vehikeln [25, 23, 17].

1.4.1 Definition Nanopartikel

Der Begriff Nanopartikel leitet sich von dem griechischen Wort *nanos*, das Zwerg bedeutet, [25] ab und beschreibt Teilchen mit einer Größe unter 100nm [24, 25]. Es handelt sich um kolloidale Trägersysteme [17, 26], welche aus einer Vielfalt an Materialien bestehen können. Eine Klassifizierung in anorganisch und organische Nanopartikel kann vorgenommen werden. Anorganische Stoffe umfassen beispielsweise Metalle wie Gold und Silber [17, 25]. Weiterhin können synthetische (z.B. Polyactide (PLA), Polylactid-co-Glycolid (PLGA), Polycaprolactone (PCL)) und natürliche (z.B. Albumin, Chitosan, Natriumalginat) Polymere sowie Lipide, Phospholipide oder Proteine verwendet werden, die meist biologisch abbaubar sind [25, 26]. In der Art, wie der therapeutische Wirkstoff in das nanopartikuläre System eingebaut ist, unterscheidet man zwischen Nanosphären/Nanokugeln und Nanokapseln. Das Arzneimittel kann in der Matrix integriert (Nanosphäre/Nanokugel) oder eingekapselt (Nanokapsel) vorliegen [15, 25].

1.4.2 Vorteile gegenüber konventionellen Augentropfen

Mithilfe nanopartikulärer Vehikel ist eine effizientere, zielgerichtete Arzneimittelabgabe [24, 25] mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung über einen verlängerten Zeitraum möglich [23, 17]. Hierdurch soll sowohl eine verbesserte Pharmakokinetik wie auch -dynamik erzielt werden, was wiederum mit einer minimierten Toxizität korreliert [25, 17].

Mukoadhäsive Eigenschaften vieler Nanopartikel bedingen neben ihrem großen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis eine signifikant bessere und deutlich längere Retention an der Augenoberfläche [23, 26]. Des Weiteren lässt sich die erhöhte okulare Verweilzeit auf eine ionische Wechselwirkung mit den negativ geladenen Zellen der Epithelien zurückführen, dies trifft insbesondere auf kationische Nanopartikel zu [15, 24, 27, 26].

Aufgrund ihrer geringen Größe besitzen Nanopartikel eine hohe Diffusivität gegenüber Membranen wie dem Hornhautepithel. Dies begünstigt neben der verlängerten Kontaktzeit im präkornealen Bereich eine verbesserte Permeation in die Hornhaut [24, 25, 23, 27]. Eine verlängerte Verfügbarkeit maximiert die Aufnahme des Wirkstoffs [17, 24, 8, 23]. Es werden höhere bzw. nachhaltigere Wirkstoffspiegel im gewünschten Gebiet erreicht, woraus eine effizientere therapeutische Wirksamkeit resultiert [17, 8, 23, 26].

Verschiedene Modifikationen der Nanopartikel sind möglich [15], beispielsweise ein sog. *Targeting*, wodurch ein selektiver Transport zum Zielgewebe ermöglicht wird [23, 26, 17]. Ebenso kann eine gezielte kontrollierte Abgabe des Arzneimittels über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden [15, 27, 25, 23]. Der aktive Wirkstoff kann langsam durch Diffusion, Auflösung oder mechanische Desintegration der Polymatrix freigesetzt werden [24].

Nanopartikel bieten, insbesondere bei Verkapselung des Pharmakons, einen Schutz vor Inaktivierung durch enzymatischen Abbau [15, 25, 8, 17]. Die Stabilität des Wirkstoffes wird erhöht und folglich auch dessen Wirksamkeit [24].

Die gesteuerte, verzögerte Freisetzung des Wirkstoffes erhöht dessen therapeutische Aktivität [24, 15, 25, 23, 8, 17], was insgesamt die Notwendigkeit

einer häufigen Verabreichung des Arzneimittels mindert. Infolge können sowohl die verabreichte Dosis wie auch die Tropffrequenz verringert werden [24, 17, 23, 26]. Dies führt zu einer erhöhten Compliance des Patienten [23, 8], es können bessere Therapieergebnisse erzielt werden [26].

1.5 Nanopartikel auf DNA-Basis

1.5.1 Eigenschaften von DNA-Nanopartikeln

Einen vielversprechenden Ansatz bietet die Verwendung von DNA als Trägermaterial für eine effizientere Arzneimittelabgabe sowie -wirksamkeit bei gleichzeitig optimiertem Sicherheitsprofil. DNA bietet viele Vorteile gegenüber anderen in der Nanomedizin verwendeten Materialien. Einerseits handelt es sich um ein körpereigenes Molekül, somit zeichnet sich dieses Vehikel durch eine hervorragende Biokompatibilität aus. Des Weiteren ist sie biologisch abbaubar. Mithilfe von Desoxyribonukleasen (DNAsen), die ubiquitär im Körper, auch im Tränenfilm, vorkommen, werden Nanopartikel auf DNA-Basis enzymatisch durch Hydrolyse abgebaut. Die so entstandenen natürlichen Einzelbausteine können vom Körper recycelt werden [28, 29]. Somit wird eine der Hauptursachen toxischer Wirkungen vieler nanoskaliger Materialien, die Akkumulation in Geweben, umgangen. Weiterhin besitzt DNA auch außerhalb des Körpers bei Raumtemperatur eine ausgezeichnete Stabilität. Darüber hinaus ist die Herstellung von DNA-Nanopartikeln relativ leicht. Ebenso ist eine Modifikation vergleichsweise einfach und Anpassungen an therapeutischen Wirkstoff möglich, was ein umfassenderes Anwendungsspektrum ermöglicht [30].

1.5.2 Aufbau von DNA-Nanopartikeln

Die auf DNA-basierenden Nanopartikel setzen sich aus einem Grundgerüst mehrerer Oligonukleotide zusammen. Die DNA-Sequenzen bestehen aus den Nucleinbasen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C). Die Anzahl der Nucleotide, und somit auch die Gesamtlänge, kann variiert werden. Mithilfe alkylmodifizierter 2'-Desoxyuridin-Nucleotide, die am terminalen Ende der wachsenden Oligonucleotidkette gebunden werden, kann die DNA-Sequenz optimiert werden (Abbildung 4-I). Die Anzahl lipidmodifizierter Basen ist ebenfalls variabel. Das Anhängen solcher Lipidanteile verleiht dem Oligonucleotid einen amphiphilen Charakter. In wässrigem Milieu organisieren sich diese DNA-Amphiphile durch Mikrophasentrennung selbst zu mizellaren Strukturen. Dabei umhüllt eine Korona aus einzelsträngiger DNA, den aus hydrophoben alkylmodifizierten Anteilen bestehenden Lipidkern der Mizelle (Abbildung 4-II) [30, 31].

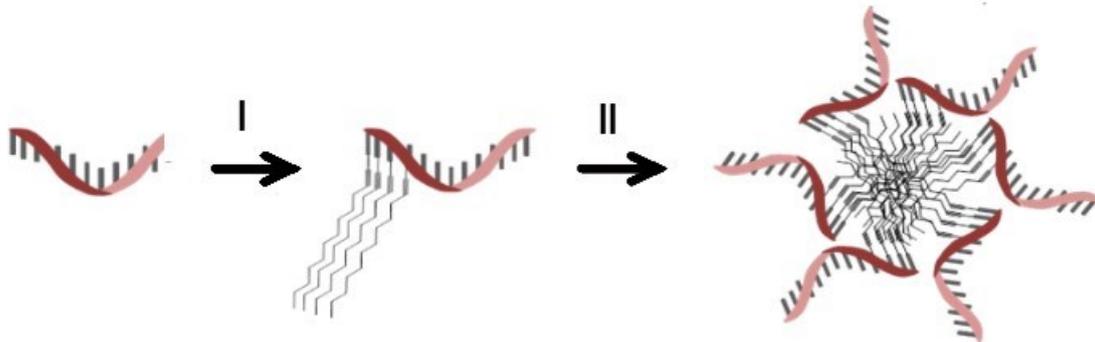


Abbildung 4 Bildung der DNA-Nanopartikel: I Modifizierung des Oligonucleotids mittels Einbau eines alkylmodifizierten 2'-Desoxyuridin-Nucleotids, II Selbstorganisation der lipidmodifizierten DNA in wässrigem Milieu zu mizellarer Struktur [30].

Vorherige Untersuchungen zeigten die größte Adhäsionsfähigkeit für DNA-Nanopartikel bestehend aus zwölf Nucleotiden, von denen vier Basen modifiziert vorliegen (U4T-12-NP), mit einer Verweilzeit an der Kornea von mindestens vier Stunden [30, 32, 33].

1.5.3 Funktionalisierung von DNA-Nanopartikeln

Zum Beladen bzw. zur Funktionalisierung der DNA-NP stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Die einfachste Variante basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen, um den therapeutischen Wirkstoff in den Kern des Nanopartikels zu laden (Abbildung 5-I). Auf diese Weise lassen sich jedoch nur hydrophobe Arzneimittel an den Träger binden. Dies beschränkt die Nutzung auf wenige Medikamente, da eine große Anzahl, darunter auch die Mehrheit an Antibiotika, hydrophil sind [30].

Ebenso ist es möglich, das Therapeutikum mittels kovalenter Bindung an ein Nukleotid zu binden, welches sich durch Hybridisierung komplementär an die DNA-Sequenz in der Korona des nanopartikulären Systems bindet (Abbildung 5-II). Dieses Verfahren erfordert jedoch eine chemische Modifikation des Arzneimittels, was dessen pharmazeutische Wirksamkeit beeinträchtigen oder gar eine toxische Wirkung hervorrufen kann. Zusätzlich ist eine Abspaltung vom Träger notwendig [30].

Eine weitere Methode bietet die Verwendung von Aptameren, die mit einer komplementären Sequenz verlängert und an die einzelsträngige Korona der DNA-Nanopartikel hybridisiert werden (Abbildung 5-III). Ein Aptamer ist ein einzelsträngiges DNA- oder RNA-Oligonukleotid, welches ein Molekül spezifisch adaptiv binden kann, indem es sich um dieses faltet und mittels schwacher Wechselwirkungen, wie beispielsweise Wasserstoffbrücken, stabilisiert. Daher muss keine chemische Veränderung in der Struktur des therapeutischen Wirkstoffes vorgenommen werden. Außerdem ermöglicht diese Art der Beladung eine Anwendbarkeit auf nahezu jedes gewünschte Molekül bzw. Medikament, da ein passendes Aptamer synthetisiert werden kann. Hierdurch eröffnet sich ein weitreichendes Anwendungsfeld [30].

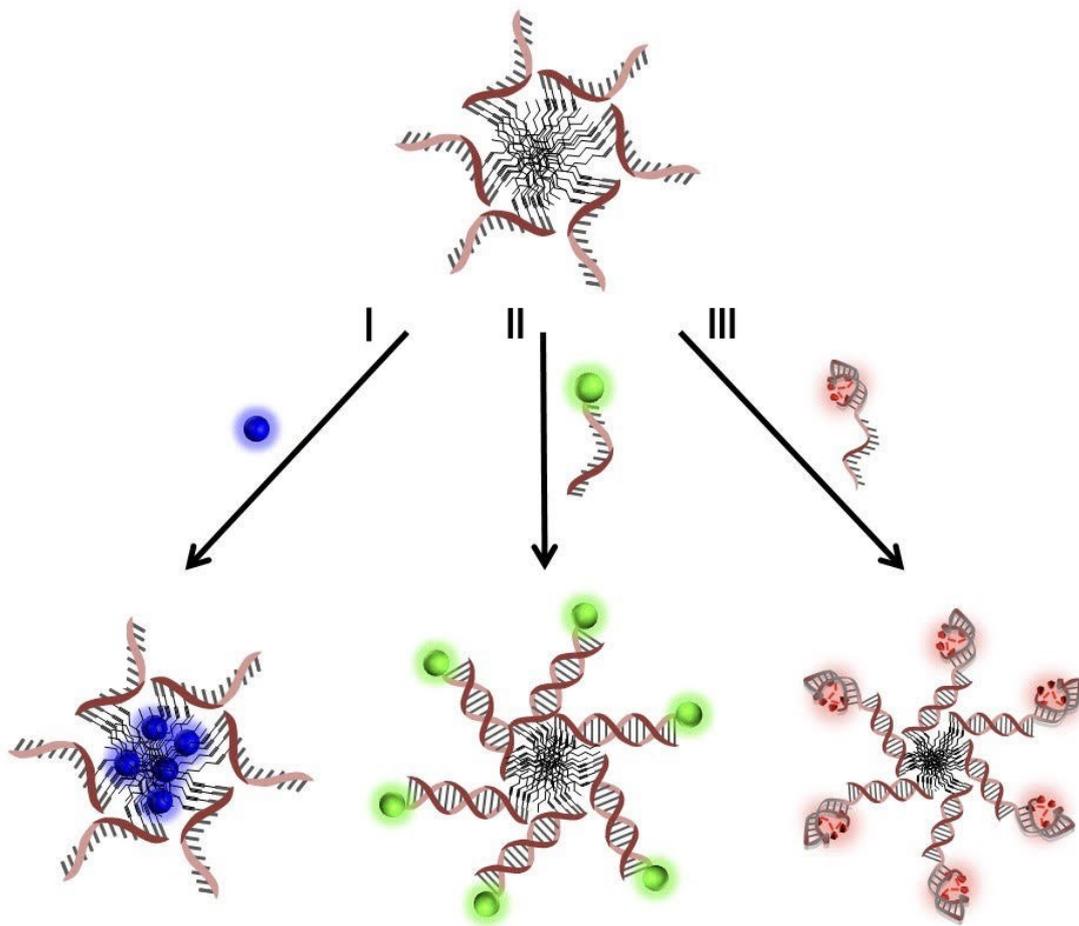


Abbildung 5 Verschiedene Beladungsmöglichkeiten der DNA-Nanopartikel: I Beladung des hydrophoben Mizellenkerns mittels hydrophober Wechselwirkungen innerhalb des Lipid-Kerns, II kovalente Bindung an den komplementären Strang: Hybridisierung mit komplementärem Oligonukleotid, das mit dem zu beladenen Molekül kovalent funktionalisiert ist, III aptamere Wechselwirkung: Verlängerung des komplementären Strangs mittels Aptamer [30].

Erfolgreiche Proof-of-Concept-Versuche bestätigten eine schnelle sowie langanhaltende Haftung der U4T-Nanopartikel von mindestens vier Stunden auf der Kornea (Ratte). Ebenso ergaben weitere Studien eine Verweilzeit auf der Hornhaut von mindestens 30 Minuten bei der Verwendung von mit dem Antibiotikum Kanamycin-beladenen Nanopartikel (aptamergebundene U4T-Kan-NPs). Konventionelle Augentropfen weisen eine erheblich kürzere Adhärenz auf. Weiterhin wurde ihre pharmazeutische Aktivität mittels MIC-Tests (minimum inhibitory concentration test) nachgewiesen, eine signifikante Abnahme des Bakterienwachstums (*E.coli*) wurde beobachtet. Letztlich wurden

Untersuchungen bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf menschlichem Hornhautgewebe durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Bindung [30, 32, 34].

Im Nachfolgenden sollen diese DNA-basierten Nanopartikel (U4T-NP und U4T-Kan-NP) auf ihr Sicherheitsprofil hin untersucht und bewertet werden, um künftig erfolgreich als Trägersysteme in der Arzneimittelabgabe eingesetzt werden zu können.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Derzeit werden Infektionen des anterioren Segments mit topisch applizierten Augentropfen behandelt. Ihre Bioverfügbarkeit (unter 5%) ist aufgrund verschiedener Faktoren stark limitiert, wie beispielsweise dem Lidschlag, dem Tränenfilm sowie der Permeabilität von Kornea und Konjunktiva. Dies führt zu einer hohen Dosierung und häufigen Tropffrequenz, um eine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Auge zu erzielen, was oftmals unerwünschte Nebenwirkungen induziert.

Aus diesem Grund wurde ein System zur Medikamentenabgabe für die Therapie von Vorderabschnittserkrankungen des Auges entwickelt. Dieses basiert auf der Grundlage der Nanotechnologie. Die neu entwickelten NP bestehen aus körpereigenen Materialien, Lipiden und DNA.

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Zytotoxizität dieser neu entwickelten Medikamententrägersysteme auf DNA-Basis auszuschließen.

Zunächst wurde der Einfluss der reinen NP (ssU4T-NP, dsU4T-NP) in verschiedenen *in vitro*-Testreihen auf die Parameter Zellviabilität, Zellzahl und Apoptose-Induktion sowie Veränderungen der Expression inflammatorischer Gene hin bewertet. Im Anschluss erfolgte eine Überprüfung der NP im Tiermodell mit dem Ziel, eine akute lokale Toxizität auszuschließen.

Weiterhin wurden die NP mithilfe einer adaptiven Bindung mit einem in der Ophthalmologie häufig verwendeten Antibiotikum (Kanamycin) beladen. In einem zweiten Versuchsdurchlauf erfolgte eine Bewertung der Biokompatibilität anhand der zuvor durchgeführten Studien unter Verwendung der mit Kanamycin beladenen NP (U4T-Kan-NP), da die Aptamerverbindung zu Veränderungen der NP führt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Für die Zellkulturstudien wurden die okularen Zelllinien RGC-5, ARPE19 und 661W verwendet. Die RGC-5-Zelllinie wurde von Prof. Neeraj Agarwal (UNT Health Science Center Fort Worth, TX, USA) zur Verfügung gestellt. Die ARPE19-Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) erworben. Die 661W-Zelllinie wurde von Prof. Dr. Muayyad Al-Ubaidi (Department of Cell Biology, University of Oklahoma, OK, USA) bezogen [30].

Die RGC-5-Zelllinie wurde ursprünglich als retinale Ganglienzellen, die von der Ratte abgeleitet wurde, eingeführt. Neeraj Agarwal (University of North Texas Health Science Centre) entwickelte diese immortalisierte RGC5-Zelllinie im Jahre 2001. [35] Nach neueren Erkenntnissen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die RGC-5-Zelllinie nicht von der Ratte abstammt, sondern möglicherweise von der Maus [36, 37]. Des Weiteren wird vermutet, dass es sich um neuronale Vorläuferzellen [36] bzw. Photorezeptorzellen [37] handelt. Trotz der unklaren Herkunft konnte diese okuläre Zelllinie zum Zeitpunkt der Versuche noch eingeschränkt für Toxizitätsprüfungen verwendet werden [38].

Die ARPE19-Zelllinie ist eine humane Zelllinie. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um retinales Pigmentepithel. Im Jahre 1986 wurden die Zellen von Amy Aotaki-Keen aus den Augen eines männlichen 19-jährigen Unfallopfers isoliert. Durch selektive Trypsinierung der humanen Primärzellen wurde die ARPE19-Zelllinie entwickelt. Aufgrund der strukturellen sowie funktionellen Eigenschaften der ARPE19-Zellen, die humanen retinalem Pigmentepithel *in vivo* gleichen, eignet sich diese Zelllinie für *in vitro*-Studien bezüglich der Physiologie [39].

Die 661W-Zelllinie ist eine Photorezeptorzelllinien. Sie wurde aus retinalem Tumorgewebe einer transgenen Mauslinie isoliert. Zur Immortalisierung wurde das Simianvirus T-Antigen verwendet [40].

Die primären Epithelzellen stammten aus Kornearesten von Organspendern, die nach Hornhauttransplantationen übriggeblieben waren und wurden von der Hornhautbank der Universitätsaugenklinik Tübingen bereitgestellt.

2.1.2 Tiere

Die Tierversuchsstudien wurden an adulten Lister-Hooded Ratten durchgeführt. Die Versuchstiere wurden von Charles River (Deutschland) bezogen und unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes (Tierversuchsgenehmigungen AK3/11 und AK1/15 des RP Tübingen an Dr. Sven Schnichels) gehalten und behandelt.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- 4',6-diadimidino-2-phenylindol (DAPI, 0,2µg/ml), Invitrogen, #D1306, USA
- Atto488, Atto-Tec GmbH, #AD488-101, Siegen, Deutschland
- Caspase-Glo® 3/7 Assay-Kit, Promega, #G8091, USA
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, #G3580, USA
- Crystal Violet Solution, Sigma Aldrich, #HT901-8FOZ, USA
- Deckgläser 24x50mm, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
- DNase, Sigma Aldrich, USA
- DNase-Puffer, Sigma Aldrich, USA
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma Aldrich, #31885-023, Deutschland

- Dulbecco's PBS (phosphatgepufferte Saline/Salzlösung), Gibco® by life technologies, #100110031, USA
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), Carl Roth, #205-358-3, Deutschland
- Eppendorf Save-Lock Tubes (verschiedene Größen), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Essigsäure (Acetat), VWR prolabo® chemicals international S.A.S., #20103.364, Darmstadt, Deutschland
- Fettstift Dako Pen Dako S 2002, Sigma Aldrich, #S200230-2, USA
- FBS (fötale bovines Serum), GIBCO, #31885-023, USA
- FluorSave™, Calbiochem, #345789, Deutschland
- Glasobjektträger (SuperFrost plus), R. Lagenbrick Labor- und Medizintechnik, #030060, Emmendingen, Deutschland
- In Situ Cell Death Detection Kit, Roche, Deutschland
- Master Mix for PCR SsoAdvanced Universal SYBER Green Supermix, Biorad, #166-5009EDU, Deutschland
- Multi-8 Filter and Frame, Miltenyi Biotec, #130-092-548, Deutschland
- MultiMACS cDNA Synthesis Kit, Miltenyi Biotec, #130-094-410, Deutschland
- Milli-Q®-Wasser, Merck, Deutschland
- Natriumchlorid, Merck, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin, PAA, Sigma Aldrich, #P11-010, USA
- PFA (4% Paraformaldehyd in PBS), Merck, #104005, Deutschland
- Pipettenspitzen (1µl, 20µl, 100µl, 500µl, 1000µl), Greiner Bio-One, Deutschland
- Primerstock (100µM) (Housekeeping-Gen L32, TLR3, IL1β, IL6 und TNFα)
- SDS ultra pure (Sodium dodecyl sulphate) (1% in Wasser), Roth, #2326.2, Deutschland
- Stickstoff Standardlösung CRM, Merck, #125043, Darmstadt, Deutschland

- Streptomycin Sulfat, Sigma Aldrich, USA
- TBS, gibco® by life technologies, USA
- Tissue Tek O.C.T., Sakura Finetek, #4583, Niederlande
- TritonX-100, Sigma Aldrich, #9002-93-1, USA
- Trypsin, GIBCO, #25200, USA
- Zellkulturflaschen Cellstar (250ml), Greiner Bio-One, #658170, Deutschland
- Zellkulturplatten (6-Well), Corning Inc., USA
- Zellkulturplatten (96-Well, weiß & transparent), Corning Inc., USA

2.1.4 Geräte und Programme

- Cryostat CM 1900, Leica, Deutschland
- CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Biorad, USA
- ELISA-Reader Synergy HT, BioTek, USA
- Färbekammer
- Fluoreszenzmikroskop (Axioplan2 imaging®), Zeiss, Jena, Deutschland
- Fluorophotometer (Fluorotron Master™), Ocumetrics, Langley, USA
- Inkubationsschrank (Heraeus bad 6220), Thermo Scientific, USA
- JMP (Version 11.2.0), SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
- Laminar-Flow-Werkbank, Thermo Scientific, Deutschland
- Magnetrührer IKA COMBIMAG RCT, Deutschland
- Microsoft® Excel für Mac, Version 16.20, USA
- Mikroplattenleser ELISA Reader Synergy HT, BioTek, Deutschland
- MultiMACS M96thermo Separator, Miltenyi Biotec, Deutschland
- Multipipette, accu-jet, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Neubauer-Zählkammer, VWR, Deutschland
- Openlab software, Improvision CV47HS, Deutschland
- Pipetten, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

- Prog Res C10 Mikroskopkamera, Jetoptik, Deutschland
- Schüttler, Vortex-Genie 2™, Scientific Industries, USA
- Stereomikroskop Stemi 2000-C, Zeiss, Jena, Deutschland
- Waage, Sartorius LA 120 S, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung funktionalisierter NP

Die in dieser Studie verwendeten NP werden als U4T-12 bezeichnet. Es handelt sich um DNA-Stränge der Sequenz UUUUGCGGATTC (5'→3'). Diese Abkürzung setzt sich aus der Anzahl modifizierter (4) sowie der Gesamtanzahl (12) an Nukleotiden zusammen. U steht für das alkylmodifizierte Nukleotid (dodecin-2'-Desoxyuridin). T beschreibt den Ort, das terminale 5'-Ende der Oligonukleotidkette, der Modifikation. Vorherige Studien wiesen die längste Adhärenz für diese Variante nach. Hierbei ist für die Haftung auf kornealem Epithelgewebe die gesamte Sequenzlänge wie auch das Verhältnis zwischen modifizierten und nicht modifizierten Nukleotiden (etwa 33% modifizierte Basen) verantwortlich. Die Modifizierung verleiht den DNA-Strängen eine Amphiphilie, wodurch sie sich in wässrigem Milieu aufgrund der Mikrophasentrennung selbstorganisiert zu Mizellen agglomerieren [30]. Im Folgenden werden diese mizellaren Konstrukte als Nanopartikel (NP) bezeichnet.

In Kooperation mit der Universität Groningen erfolgte die Synthese der lipidmodifizierten DNA-Einzelstränge. Die NP/Mizellen wurden in Eppendorf-Röhrchen in 1x TAE-Puffer (40mM Trisacetat, 1mM EDTA, 20mM NaCl, 12mM MgCl₂, pH 8,0) hergestellt und in den gewünschten Endkonzentrationen 20µM, 100 µM und 500 µM verdünnt. Anschließend wurde den lipidmodifizierten Oligonukleotiden (U4T) der gewünschten Konzentration ein Äquivalent der komplementären DNA (cU4T) hinzugegeben. Die Sequenz der jeweilig verwendeten Oligonukleotiden sind in Tabelle 2 aufgeführt. Unter Verwendung

eines thermischen Gradienten erfolgte dessen Hybridisierung. Die DNA-Stränge wurden für 30 Minuten auf 90 °C erhitzt und anschließend wurde die Temperatur alle zwei Minuten um 1 °C abgesenkt, bis Raumtemperatur (RT) erreicht wurde. Im gleichen Schritt erfolgte die Mizellenbildung. Zur Verwendung von reinen NP wurde zur Visualisierung eine 5'-Atto488-funktionalisierte komplementäre DNA verwendet. Für die Beladung mit Kanamycin B wurde ein DNA-Aptamer (cU4T-Kan) verwendet. Dieser wurde mittels der SELEX-Methode [41] entwickelt und anschließend mit der komplementären Sequenz (cU4T) am 5'-Ende des Trägers verlängert. Die Sequenzdetails sind in Tabelle 2 aufgeführt. Weiterhin enthielt diese Komplementär-DNA zu Bildgebungszwecken eine 5'-Cy3-Modifikation. Nach Zugabe von einem Äquivalent Kanamycin wurden die Lösungen für mindestens 30 Minuten bei RT inkubiert und ohne weitere Verdünnung verwendet. In Tabelle 1 sind Zusammensetzungen sowie Beschreibungen der in dieser Arbeit verwendeten NP aufgeführt.

Tabelle 1 Name, Details sowie Oligonukleotid-Sequenz der in dieser Studie verwendeten NP ssU4T, dsU4T und U4T-Kan

| Name | Details | Verwendete DNA-Einheiten |
|---------|------------------------|--------------------------|
| ssU4T | einzelsträngiger NP | U4T |
| dsU4T | doppelsträngiger NP | U4T + cU4T |
| U4T-Kan | Kanamycin-beladener NP | U4T + cU4T-Kan |

Tabelle 2 Sequenzdetails der verwendeten Oligonukleotide U4T, cU4T und cU4T-Kan zur Herstellung von NP, wobei der Name wie folgt dargestellt ist U4T mit U \triangleq alkylmodifiziertes Nukleotid, 4 \triangleq Anzahl der alkylmodifizierten Basen, T \triangleq Ort der Modifikation (5'-Ende der Oligonukleotid-Kette)

| Name | Sequenz (5'→3') |
|----------|-------------------------------------|
| U4T | UUUUGCGGATTC |
| cU4T | GAATCCGCAAAA |
| cU4T-Kan | TGGGGGTTGAGGCTAAGCCGATTGAATCCGCAAAA |

2.2.2 Kultivierung der Zellen

Die verwendeten Zelllinien (RGC-5, ARPE19) bzw. die verwendeten Primärzellen (humane korneale Epithelzellen, HCE) wurden jeweils in Zellkulturflaschen mit Medium (DMEM + 5% FBS + 1% P/S) im Zellkulturschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Um die Zellen zu passagieren, wurde zunächst das Medium abgesaugt. Anschließend wurde einmal mit 20ml PBS gewaschen und dieses abgesaugt. Die adhären Zellen wurden mittels Trypsins (1ml) und vorsichtigem Klopfen vom Flaschenboden abgelöst. Nach erfolgreicher Überprüfung dieses Schrittes unter dem Mikroskop, wurden die Zellen mit 19ml frischem Medium (DMEM + 5% FBS + 1% P/S) resuspendiert. Zur Bestimmung der Anzahl der Zellen wurden 20µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und vier Großquadrate ausgezählt, sodass je nach Zelldichte entsprechend mit Medium auf die gewünschte Zellzahl verdünnt wurde (1*10⁵ Zellen/ml, 1*10⁴ Zellen/Well, 100µl/Well). Die Aussaat der Zellen erfolgte in 96-Well-Platten mit einer Dichte von 10.000 Zellen/Well (RGC-5, ARPE19) bzw. 40.000 Zellen/Well (Primärzellen). Nach 24-stündiger Inkubation im Zellkulturschrank wurden die NP (U4T-NP, Kan-NP) in den zu testenden Konzentrationen sowie die Kontroll- bzw. Pufferlösung appliziert (Abbildung 6 und Abbildung 7) und für weitere 24h inkubiert. Nachfolgend wurden verschiedene Toxizitätstests durchgeführt, um die NP auf die drei Parameter Zellviabilität, Zellzahl und Apoptose-Induktion zu testen.

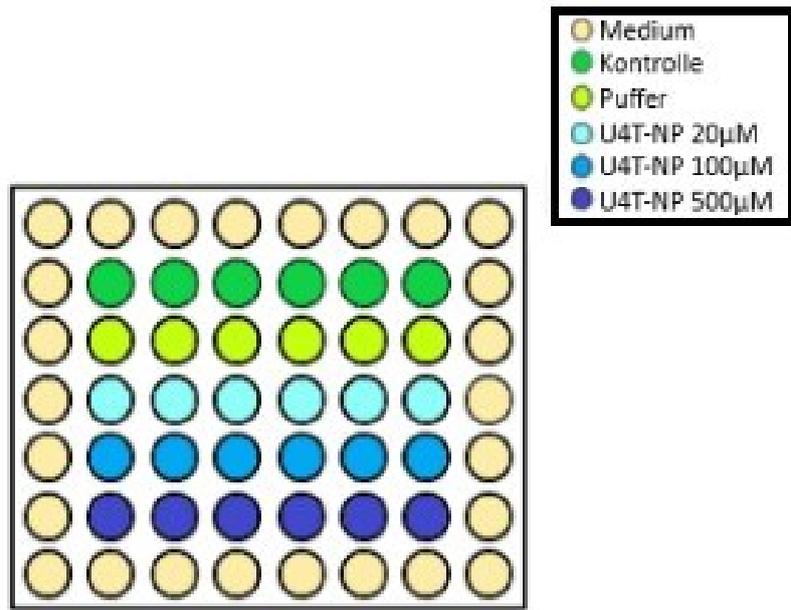


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Zugabe der Kontroll- (grün), Puffer- (gelb) und U4T-NP-Lösungen (blau, verschiedene Konzentrationen) auf die jeweilige Zelllinie (RGC-5, ARPE19) bzw. Primärzellen (HCE)

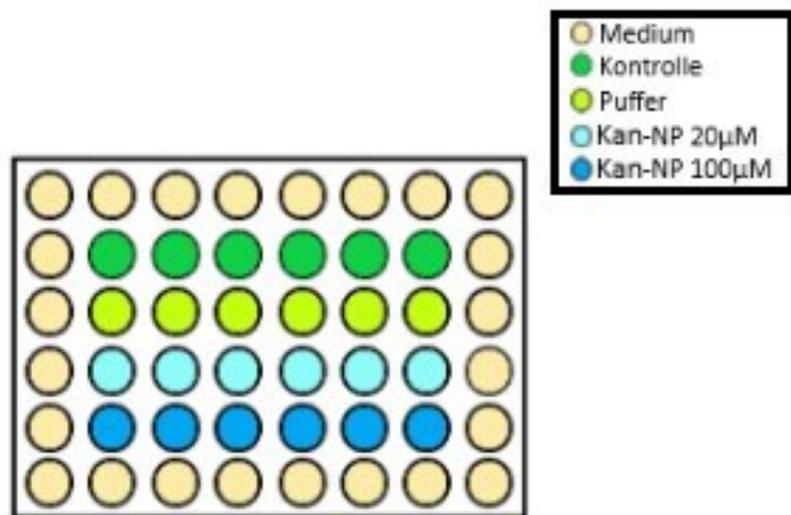


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Zugabe der Kontroll- (grün), Puffer- (gelb) und Kan-NP-Lösungen (blau, verschiedene Konzentrationen) auf die jeweilige Zelllinie (RGC-5, ARPE19) bzw. Primärzellen (HCE)

2.2.3 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTS-Assay

Die Zellviabilität, d.h. der Lebendzellanteil, wurde mittels eines MTS-Tests ermittelt. Hierzu wurde das CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay von Promega verwendet. Das Prinzip dieses Tests basiert auf der kolorimetrischen Messung metabolisch aktiver Zellen. Diese können das MTS mithilfe von Dehydrogenase-Enzymen zu Formazan umsetzen. Die Absorption des Formazans kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 490nm gemessen werden und ist direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen in der Kultur [42]. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesät und mit je 100µl Medium/Well aufgefüllt. Im Anschluss wurde jedem Well 20µl des MTS-Reagenz zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Danach erfolgte die Messung der Absorption an einem ELISA-Reader Synergy HT von BioTek.

2.2.4 Bestimmung der Zellmenge mittels Kristallviolett-Färbung

Um die Zellmenge bestimmen zu können, wurde eine Kristallviolett-Färbung mit der Crystal Violet Solution von Sigma durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen quantitativen Absorptions-Test. Der Farbstoff Kristallviolett lagert sich insbesondere an Nukleoproteine an. Durch photometrische Messungen bei einer Wellenlänge von 595nm kann somit die Zahl der vorhandenen vitalen Zellen bestimmt werden. Die Absorption ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Zunächst wurde das MTS-Reagenz abgesaugt und die Zellen mit 4% PFA (100µl/Well) bei 4°C über Nacht fixiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Wells zwei Mal mit je 200µl MilliQ Wasser pro Well gewaschen. Es folgte die Zugabe von 100µl/Well der Crystal violet solution. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde erneut jedes Well mit je 200µl MilliQ Wasser gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde mit der Pumpe abgesaugt. Anschließend

wurden 100µl/Well von 1% SDS zugegeben und für weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung wurde am ELISA-Reader Synergy HAT von BioTek bei 595nm durchgeführt.

2.2.5 Bestimmung der Apoptose-Induktion mittels Caspase 3/7-Assay

Die Apoptoseinduktion wurde mit dem Caspase-Glo 3/7 Assay von Promega getestet, mithilfe dessen die Aktivität der Caspasen 3 sowie 7 gemessen wird [43]. Caspasen sind Cystein-Asparaginsäure-spezifische Proteasen, die eine entscheidende Rolle bei der Apoptose (programmierter Zelltod) spielen. Sie induzieren eine Enzymkaskade, die letztlich zur Selbstzerstörung der Zelle führt [44–46, 45]. Der verwendete Lumineszenz-Test basiert auf der Spaltung eines DEVD-Aminoluziferin-Komplexes durch die Caspasen, wodurch neben DEVD auch Aminoluziferin freigesetzt wird. Dieses wird in einem weiteren Reaktionsschritt durch die enthaltene Luziferase umgesetzt. Durch diesen Prozess entsteht eine Lumineszenz, welche messbar ist. Die entstandene Lumineszenz korreliert mit der Menge an aktiven Caspasen und stellt somit das Ausmaß der Apoptose dar [43, 46].

Die Zellen wurden in weißen 96-Well-Platten ausgesät. Das Caspase-Reagenz wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Es folgte das Überführen des kompletten Puffers zum Pulver. In jedes Well wurden 100 µl des Caspase-Reagenz appliziert und vorsichtig vermennt. Nach einer Inkubation von 60 Minuten bei 37°C erfolgte die Messung der Lumineszenz an einem ELISA-Reader Synergy HT von BioTek.

2.2.6 Statistische Auswertung der Zellkultur-Assays

Jeder Assay wurde mit je 5-6 Versuchen (n = 5-6) pro Zelllinie und Puffer bzw. NP durchgeführt. Alle Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung

(SD) dargestellt. Die Mittelwerte der Kontrolle, also der reinen Pufferlösung, wurde mit 100% definiert. Eine Änderung von +/- 20% im Vergleich zum Puffer wurde als Toleranzbereich festgelegt. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung des Programms JMP Version 11.2.0. Die Daten wurden mittels ANOVA-Tests und anschließend Dunnett's post-hoc Test (zum Vergleich zwischen Puffer und den verschiedenen NP) ausgewertet. Abweichungen wurden als signifikant gewertet bei * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

2.2.7 Quantitative realtime-PCR

Als weiteres *in vitro*-Verfahren wurde eine quantitative realtime-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Diese beruht auf dem Prinzip der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Hierbei handelt es sich um eine Methode zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Die Reaktion verläuft in einem Zyklus bestehend aus drei Reaktionsschritten, der mehrfach wiederholt wird. Als erstes wird die DNA denaturiert, wodurch sich die DNA-Doppelstränge voneinander lösen. Im zweiten Schritt findet das sog. Annealing statt. Hierbei werden Primer (Einzelstrang-Oligomere) komplementär an die spezifische Einzelstrang-Sequenz gebunden, die den Anfang der Amplifikation markieren. Im letzten Schritt, der Elongation, erfolgt die Verlängerung entlang des DNA-Strangs. Es wird ein neuer DNA-Strang erzeugt, wodurch sich die Menge an DNA in der Reaktion verdoppelt. Durch mehrfache Wiederholungen des PCR-Zyklus erfolgt eine exponentielle Amplifikation der ausgewählten DNA-Sequenz [47, 48]. Die Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffs (SYBR Green), welcher an doppelsträngige DNA bindet, ermöglicht eine quantitative Analyse der gewonnenen PCR-Produkte. Folglich steigt mit der Menge der PCR-Produkte die Fluoreszenz, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit gemessen wird. [49].

Zunächst wurden die 661W-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und wie in 2.2.2.1 inkubiert. Anschließend erfolgte das Lysieren der Zellen sowie die cDNA-Synthese mittels MultiMACS cDNA Synthesis Kit von Miltenyi Biotec. Hierzu

wurden, um die Zellen zu lösen, 1ml Lyse-Puffer pro Well hinzugegeben und anschließend für drei Minuten im Vortexmischer durchgemischt. Das Lysat wurde mehrfach in einer G25-Nadel aufgezogen, bis die DNA komplett gesichert war. Nach dreiminütigem Zentrifugieren der Proben bei 6000g und 4°C wurde der Überstand in neue Eppendorf-Gefäße überführt und mit 30µl Oligo(dT) MicroBeads vermischt. Eine Multi 8 Säule, eine Waschplatte sowie ein Multi 8 Filter (Miltenyi Biotec), welcher mit 100µl Lyse/Bindungs-Puffer befeuchtet wurde, wurden in das Gerät eingesetzt und das gesamte Lysat, bestehend aus Beads und Überstand, auf den Filter gegeben. Es folgte zunächst zweimaliges Waschen mit je 200µl Lyse/Bindungs-Puffer. Nachfolgend wurde der Filter entfernt und viermal mit je 100µl Waschpuffer sowie zweimal mit je 100µl Äquilibrierungs-/Wasch-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde der Synthesemix angesetzt, indem der Enzymmix im Resuspensions-Puffer aufgelöst wurde. Je 20µl dieses Mix wurden in die Säulen pipettiert. Die cDNA wurde bei 42°C für eine Stunde synthetisiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit je 100µl Äquilibrierungs-/Wasch-Puffer. Nach Zugabe von 20µl cDNA Release Solution auf die Säule wurde das Programm für weitere 10 Minuten bei 42°C gestartet. Nach 10 Minuten wurden 10µl cDNA Elution Buffer zugegeben und im letzten Schritt eine 96-Well-Platte eingesetzt, um die gewonnene cDNA in die neue Platte zu überführen.

Nach erfolgreicher cDNA-Synthese konnte die qRT-PCR durchgeführt werden. Zum Zweck der zytotoxischen Überprüfung wurden die inflammatorischen Marker Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3), Interleukin 1 β (IL1 β), Interleukin 6 (IL6) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) ausgewählt. Hat eine Substanz eine zytotoxische Wirkung, werden die Zellen geschädigt, die in Folge mit einer Hochregulierung dieser inflammatorischen Gene reagieren [50, 51]. Mittels der qRT-PCR wurde das Genexpressionsmuster dieser vier Entzündungsmarker detektiert und gemessen. Zur Kontrolle wurde im gleichen Reaktionsschritt ein sog. Haushaltsgen (L32) amplifiziert. Im Gegensatz zu regulierbaren Genen werden Haushaltsgene unbeeinflusst von jeder Zelle exprimiert, da mittels dieser Gene Enzyme und Proteine transkribiert werden, die dem Grundstoffwechsel der Zelle dienen [52]. Die Aktivität des Housekeeping Gens L32 wurde auf 1 gesetzt und

diente zum Vergleich. Zudem wurde eine Positivkontrolle angefertigt. Hierzu wurden Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) infiziert, ein bakterielles Endotoxin, das zytotoxisch auf menschliche Zellen wirkt [53].

Die spezifischen Primer (Tabelle 3) wurden mit MilliQ Wasser auf 1µM (Primer-Stocklösung 100µM) und die cDNA auf 1ng/µl verdünnt. Um den Reaktionsmix pro Primerpaar anzusetzen (insgesamt 15µl/Well), wurden in eine 96-Well-Platte pro Well je 1µl MilliQ mit 2µl Primer for, 2µl Primer rev sowie 10µl Mastermix (SYBR Green Supermix, Biorad) versetzt. Zu jedem 15µl/Well Reaktionsmix wurde je Well 5µl cDNA hinzugefügt und mit selbstklebender Abdeckfolie versiegelt. Abschließend wurde für eine Minute bei 5000rpm zentrifugiert. Die qRT-PCR wurde gestartet und lief nach folgendem Programm über 42 Zyklen ab:

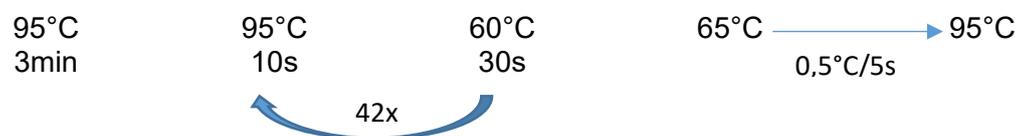


Tabelle 3 Primer für die qRT-PCR und ihre Sequenzen

| Primer | Sequenz |
|----------|-----------------------|
| L32 For | CTCTTCCAAGAACCGCAAAG |
| L32 Rev | CATGGCATCACCATGGATAC |
| TLR3 For | GGTACTGTTGCCCTTTTGGGA |
| TLR3 Rev | AATTCTGGCTCCAGCTTTGA |
| IL1β For | CAGCCATGGCCATAGTACCT |
| IL1β Rev | CCACGATGACAGACACCATC |
| IL6 For | CACCAGGAACGAAAGAGAGC |
| IL6 Rev | GTTTTGTCCGGAGAGGTGAA |
| TNFα For | CCACCAACGTTTTCTCACT |
| TNFα Rev | CCAAAATAGACCTGCCCAGA |

2.2.8 *In vivo*-Studien zur Sicherheitsbewertung der NP

In *in vivo*-Studien wurden lebenden Ratten unter kurzer Fixierung jeweils ein Tropfen bzw. vier Tropfen der NP verschiedener Konzentrationen (U4T-NP in den Konzentrationen 20µM, 100µM, 500µM, U4T-Kan-NP in den Konzentrationen 20µM, 100µM) im Abstand von je einer Stunde appliziert. Das Blinzeln der Tiere wurde weder während noch nach der Applikation verhindert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Versuchstiere mittels CO₂(Kohlenstoffdioxid)-Inhalation getötet. Die Augen wurden umgehend enukleiert und anschließend in TissueTek (Sakura Finetek) unter Verwendung von flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden diese bei -28°C aufbewahrt.

Zunächst wurden Kryoschnitte angefertigt. Hierzu wurden die Augen an einem Kryostaten Cryostat CM 1900, Leica längs des Bulbus mit einer Dicke von 12µm geschnitten und anschließend auf Glasobjektträger SuperFrost plus, R. Lagenbrick Labor- und Medizintechnik aufgebracht.

Mithilfe der TUNEL-Färbung werden DNA-Strangbrüche detektiert. Diese entstehen charakteristisch während der Apoptose, indem der DNA-Strang durch Endonukleasen gespalten wird. Mittels des Enzyms TdT werden an die freigewordenen Hydroxylgruppen der Fragmentenden Fluorescein-markierte Nukleotide (dUTP) angehängt. [54, 55] Die Fluoreszenz kann gemessen werden und dient somit der Visualisierung toxisch geschädigter Zellen. Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurde das InSitu Cell Death Detection Kit, Fluorescein von Roche verwendet.

Die Kryoschnitte wurden für 20 Minuten bei RT mit 4% PFA (4% Paraformaldehyd in PBS) fixiert und anschließend für weitere 30 Minuten mit PBS gewaschen. Danach folgte eine Inkubation mit Permeabilisationslösung (0,1% Triton X-100 in 0,1% Natriumcitrat) auf Eis für zwei Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte mit PBS gewaschen (2x je fünf Minuten). Um eine Positivkontrolle zu erhalten, wurde ein Schnitt auf dem Objektträger mit DNase I für zehn Minuten bei RT inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit PBS für je fünf Minuten wurde diese

wieder entfernt. Den anderen Proben wurde 100µl TUNEL reaction mixture (450µl Label solution + 50µl Enzym solution, gut vermischt) bzw. der Negativkontrolle 100µl reine Label solution ohne terminal transferase zugegeben. Nach einer Inkubation von 60 Minuten bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit wurde mit PBS (3x für je fünf Minuten) gewaschen. Es folgte die Färbung der Zellkerne mittels DAPI (1µg/ml in PBS) für fünf Minuten bei RT. Nach erneutem fünfminütigem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit Fluorsafe, Calbiochem eingedeckelt (Abbildung 8). Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie mit dem Axioplan2 imaging®, Zeiss durch visuelle Detektion der Zellkerne sowie apoptotischer Zellen auf dem Korneaepithel. Mithilfe des DAPI-Filters könnten bei einer Wellenlänge von 400nm die DAPI-markierten Zellkerne vitaler Zellen sichtbar gemacht werden. Der grün fluoreszierende Farbstoff Fluorescein wurde unter Verwendung des FITC-Filters (520nm) visualisiert. Die Ergebnisse wurden mit der Openlab Imposition Software fotodokumentiert. Eine Auswahl ist in Abbildung 16 und Abbildung 25 dargestellt.

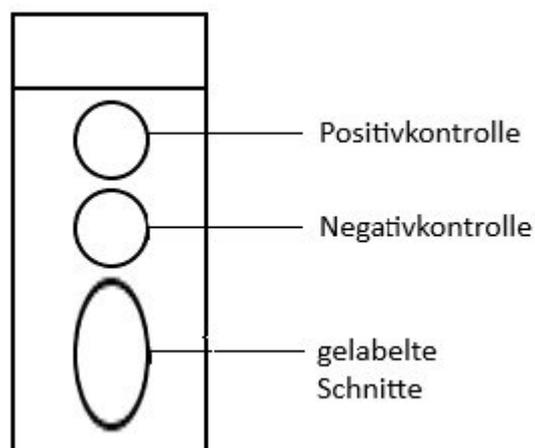


Abbildung 8 Kryoschnitte zur TUNEL-Färbung: Dargestellt ist die Anordnung der Schnitte, jeweils eine Probe als Positivkontrolle, eine Probe als Negativkontrolle und zwei Proben TUNEL-gefärbt.

3. Ergebnisse

Um eine toxikologische Wirkung auszuschließen, wurde das neuentwickelte Trägersystems in den folgenden präklinischen Studien auf verschiedene Parameter hin untersucht. In Zellkulturstudien wurden sowohl an permanenten Zelllinien wie auch an humanen Primärzellen folgende Testungen durchgeführt: MTS-Viabilitätstest, Kristall-Violett-Färbung und Caspase 3/7 Aktivitätstest. Somit konnten Rückschlüsse auf die Zellviabilität, Zellmenge sowie Apoptoseinduktion geschlossen werden. Weiterhin konnten die NP mittels einer qRT-PCR auf eine potenziell inflammatorische Wirkung hin geprüft werden. In Bezug auf die Biokompatibilität ergaben sich keinerlei Sicherheitsbedenken, wodurch mit der *in vivo*-Versuchsreihe begonnen werden konnte.

3.1 U4T-NP

In einer ersten Versuchsreihe wurden die reinen NP auf eine mögliche zytotoxische Wirkung hin getestet. Die Untersuchungen wurden sowohl an Einzelstrang-DNA-NP (ssU4T) wie auch an doppelsträngigen DNA-basierten NP (dsU4T) durchgeführt, da beide Konfigurationen als Trägersysteme für Medikamente genutzt werden können.

3.1.1 Vernachlässigbare Reduktion der Zellviabilität der Zelllinien RGC-5 und ARPE19

Die Tests zur Sicherheitsbewertung der U4T-NP wurden mit einem MTS Viability Assay begonnen, um die Zellviabilität, wie in 2.2.3 beschrieben, zu bestimmen. Bei den mit ssU4T behandelten Proben der RGC-5-Zelllinie stieg im Vergleich zu den mit reinem Puffer behandelten Zellen (100%) der Lebendzellanteil bei einer Konzentration von 20µM zunächst geringfügig. Mit zunehmender NP-

Konzentration zeigte sich eine stetige Abnahme der zellulären Vitalität. So war bei Zugabe von 500µM NP schließlich eine relevante Reduktion der Zellviabilität zu beobachten, alle weiteren Werte waren nicht signifikant.

Die Vitalität der ARPE19-Zelllinie hingegen lag bei der Anfangskonzentration der zugegebenen NP zunächst leicht unterhalb des Kontrollwerts. Unter Verwendung höherer ssU4T-Konzentrationen (100µM, 500µM) reagierten die Zellen mit gesteigerter Vitalität. Die gemessenen Werte wiesen, verglichen mit der Pufferlösung, einen erhöhten Lebendzellanteil auf. Bei einer Konzentration von 500µM war eine signifikante Zunahme der Zellviabilität festzustellen, die übrigen Konzentrationen zeigten keine Signifikanz. Sämtliche gemessenen Veränderungen lagen im vorgegebenen Toleranzbereich.

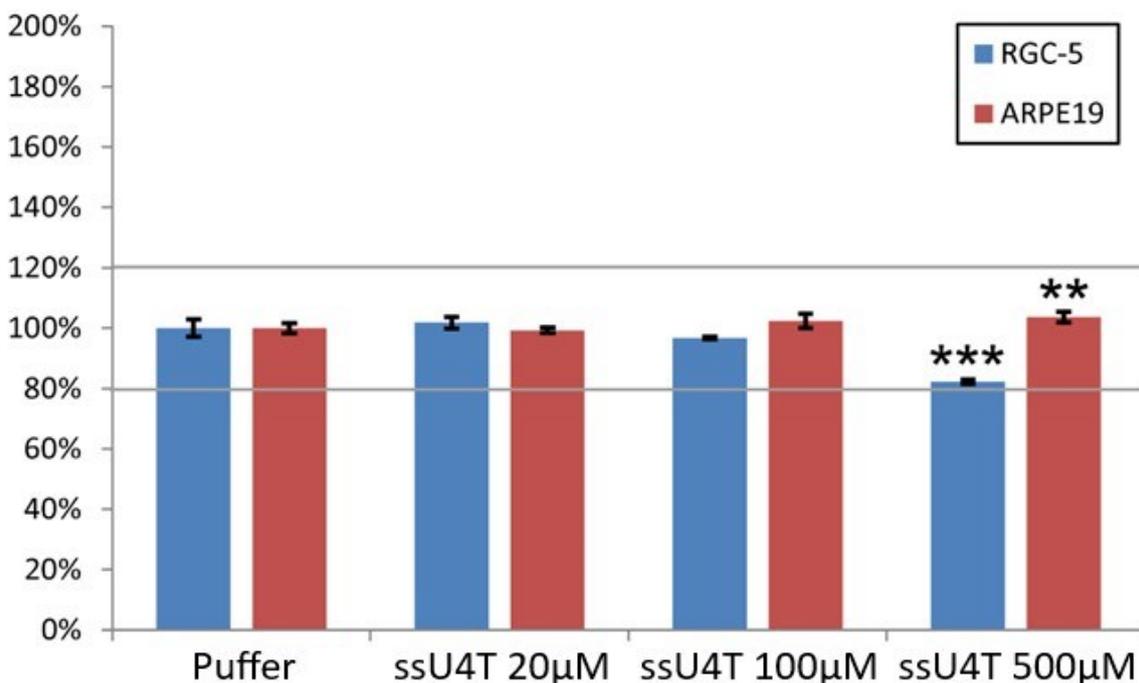


Abbildung 9 MTS Viability Assay der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien: Dargestellt ist die relative Zellviabilität (in %) der beiden okularen Zelllinien RGC-5 und ARPE19 unter Zugabe verschiedener Konzentrationen der ssU4T-NP (20µM, 100µM, 500µM) im Vergleich zu mit reinem Puffer behandelten Zellen. Der Mittelwert der Pufferlösung wurde auf 100% gesetzt. Signifikante Unterschiede der Standardabweichung gegenüber dem Pufferwert sind mit * $p < 0,05$, bei ** $p < 0,01$ und bei *** $p < 0,001$ beschrieben. Ein Toleranzbereich wurde bei +/- 20% Abweichung des Pufferwertes definiert und ist durch die grauen Linien bei 80 bzw. 120% markiert.

3.1.2 Keine toxische Veränderung der Zellmenge der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien

Um eine potenzielle Zellschädigung durch die Verwendung der NP ausschließen zu können, wurde mithilfe einer Kristall-Violett-Färbung (vgl. 2.2.4) die Zellmenge bestimmt. Diese verminderte sich in der RGC-5-Zelllinien mit zunehmender NP-Konzentration stetig. Lag der gemessene Wert bei einer Konzentration von 20µM noch bei 90,19%, so fiel er bei der verwendeten Höchstkonzentration bis auf 82,52%. Bei allen verwendeten Konzentrationen der ssU4T-NP zeigte sich eine signifikante Abnahme der Anzahl vitaler Zellen verglichen mit der reinen Pufferlösung, dennoch unterschritt keiner der Werte die Toleranzgrenzen.

Unter Zugabe der NP auf die humanen Zellen (ARPE19) konnte eine toxische Wirkung ausgeschlossen werden. Bei allen verwendeten Konzentrationen konnte eine signifikant erhöhte Zellmenge nachgewiesen werden (106,3%, 112,77%, 108,03%).

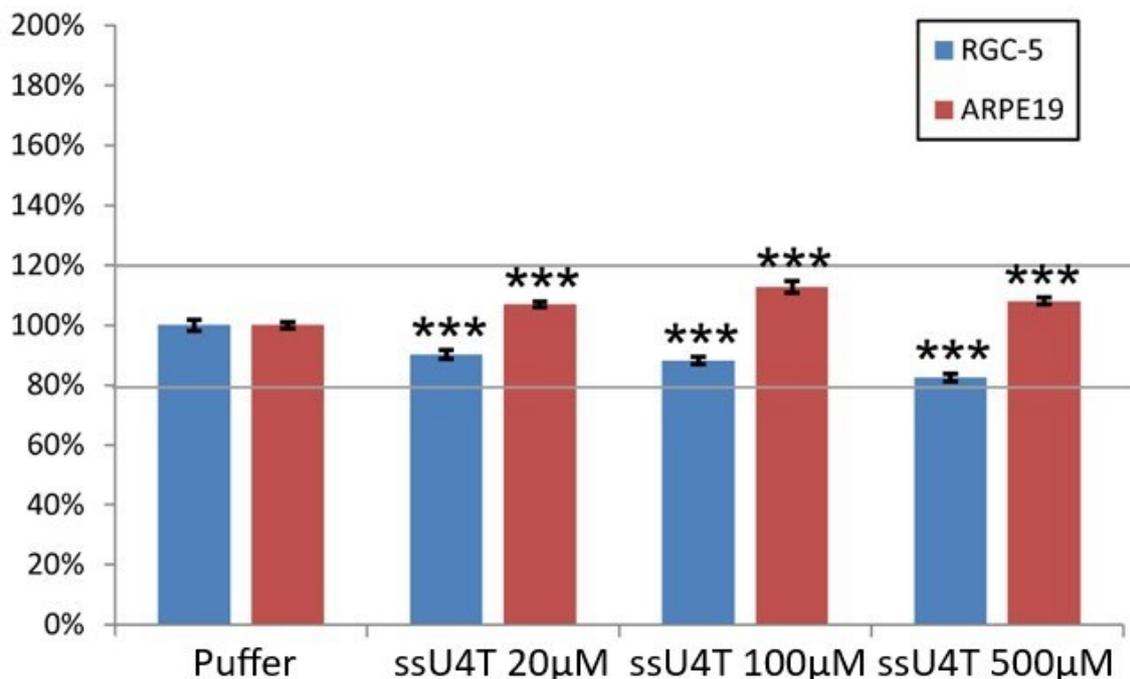


Abbildung 10 Kristall-Violett-Färbung der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien: Dargestellt ist die Zellmenge (in %) der okularen Zelllinien RGC-5 und ARPE19 nach Behandlung mit ssU4T-NP in folgenden Konzentrationen 20µM, 100µM, 500µM. Zum Vergleich wurde beiden Zelllinien der reine Puffer zugefügt.

Der Pufferwert wurde als 100% definiert. Unterschiede der Standardabweichung gegenüber der reinen Pufferlösung wurden bei * $p < 0,05$, bei ** $p < 0,01$ und bei *** $p < 0,001$ als signifikant gewertet. Die grauen Linien bei 80% und 120% begrenzen den zuvor festgelegten Bereich, indem Veränderungen gegenüber dem Puffer toleriert werden.

3.1.3 Ausschluss einer erhöhten Apoptose-Induktion der RGC-5- und ARPE19-Zellen

Während bei den vorherigen Versuchsmodellen vitale Zellen detektiert wurden, wurde nun bewiesen, dass die NP keinen bedenklichen Einfluss auf die Apoptoserate nahm. Zur Bestimmung der Apoptose-Induktion wurde ein Caspase 3/7 Aktivitätstest angewandt, dessen Durchführung Kapitel 2.2.5 zu entnehmen ist.

Das Ausmaß der apoptoseaktiven RGC-5-Zellen stieg mit zunehmender Konzentration bis auf 106,28% bei Zugabe von 500 μM NP-Lösung an und lag somit nur geringfügig über dem Kontrollwert. Unter Verwendung niedrigerer Konzentrationen war eine signifikant geringere Caspase-Aktivität nachweisbar.

Die mit NP behandelten Zellen der ARPE19-Zelllinie zeigten bei Zugabe einer Konzentration von 20 μM wie auch von 100 μM eine ähnliche Apoptoserate nahe der 100% wie unter Verwendung der Kontrolllösung. Bei der getesteten Höchstkonzentration war eine signifikante Abnahme der Apoptoseinduktion mit 80,50% zu verzeichnen. Die übrigen Ergebnisse wiesen keine Signifikanz auf. Alle Werte bewegten sich im tolerierten Bereich.

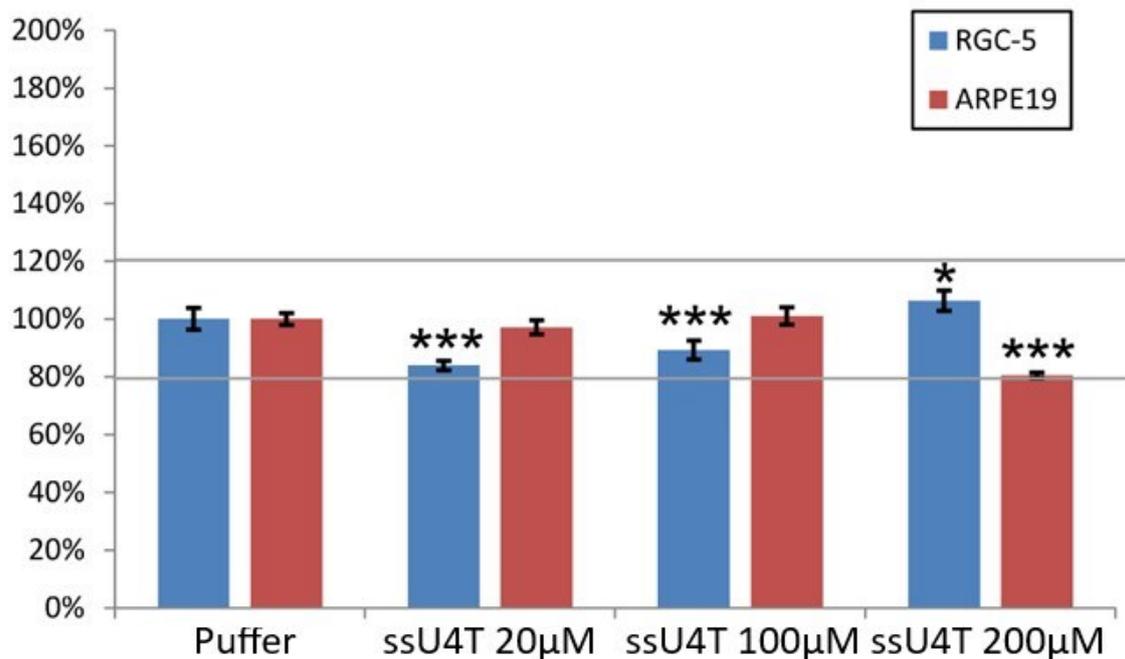


Abbildung 11 Caspase 3/7 Assay der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien: Dargestellt ist die Apoptose-Induktion (in %) der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien unter Verwendung reiner Pufferlösung verglichen mit ssU4T-NP-behandelten Zellen in den Konzentrationen 20µM, 100µM und 500µM. Die Apoptoseinduktion der mit Pufferlösungen durchgeführten Tests (Mittelwerte) wurden jeweils gleich 100 % gesetzt. Eine Signifikanz der Standardabweichung gegenüber des Pufferwertes wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet. Veränderungen von +/-20% gegenüber der 100% wurden als tolerierbar definiert. Diese Toleranzgrenzen sind in Form der grauen Linien dargestellt.

3.1.4 Keine signifikante Genexpression der inflammatorischen Marker

Als weiteres *in vitro*-Verfahren zum Ausschluss einer möglichen Toxizität wurde die quantitative realtime-PCR (qRT-PCR) angewandt. Die Durchführung ist in 2.2.7 beschrieben. Die Genexpression der inflammatorischen Marker TLR3, IL1 β , IL6 und TNF α wurde unter Verwendung verschiedener Konzentrationen (20µM, 100µM) der NP sowie bei der Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS), welches als Positivkontrolle fungiert, untersucht (Abbildung 12 **Abbildung**). Die Behandlung mit LPS führte zu erheblich höheren mRNA-Expressionen der Entzündungsmarker TLR3, IL1 β und IL6 als bei NP sowie im Vergleich zur

Kontrolle (Haushaltsgen). Die gemessenen Werte dieser Entzündungsmarker sind signifikant (TLR3: 4,5, IL1 β : 9,5, IL6: 10,0). Die 661W-Kulturen exprimierten ebenso vermehrt TNF α , jedoch zeigte sich hierbei kein relevanter Unterschied in Bezug auf das Kontrollgen. Verglichen mit dem Haushaltsgen konnte durch die Behandlung der Zellen mit U4T-NP keine signifikante Veränderung der Expressionsaktivität nachgewiesen werden.

Die TLR3-Expression lag bei allen verwendeten Konzentrationen der NP (20 μ M, 100 μ M) über der des Haushaltsgens. Bei den Expressionserhöhungen beider Konzentrationsmengen wurde keine Signifikanz festgestellt.

Das Expressionsprofil des inflammatorischen Markers IL1 β unterschied sich bei beiden verwendeten NP-Konzentrationen (20 μ M, 100 μ M) nicht wesentlich vom Kontrollwert wie auch nicht voneinander. Die leichte Zunahme der Aktivität des Gens war nicht signifikant.

Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten weiterhin, dass der Entzündungsmarker IL6 bei der Behandlung mit U4T bei einer Konzentration von 20 μ M dem Wert dem des Haushaltsgen (1) ähnelte und nur leicht zunahm. Die Genexpression bei der Durchführung mit einer Konzentration von 100 μ M hingegen wies einen nicht signifikanten aber dennoch stärkeren Abfall unterhalb des Kontrollwerts auf.

Die TNF α -Expression unterschied sich von den vorherigen Markern. Im Vergleich zum Kontrollwert 1 (Haushaltsgen) verminderte sich die Expression dieses Markers bei der Zugabe von 20 μ M der NP-Lösung deutlich. Im Gegensatz hierzu exprimierten die Zellen bei einer Konzentration von 100 μ M erheblich mehr Gene als das Haushaltsgen, wenngleich keine Signifikanz festzustellen war.

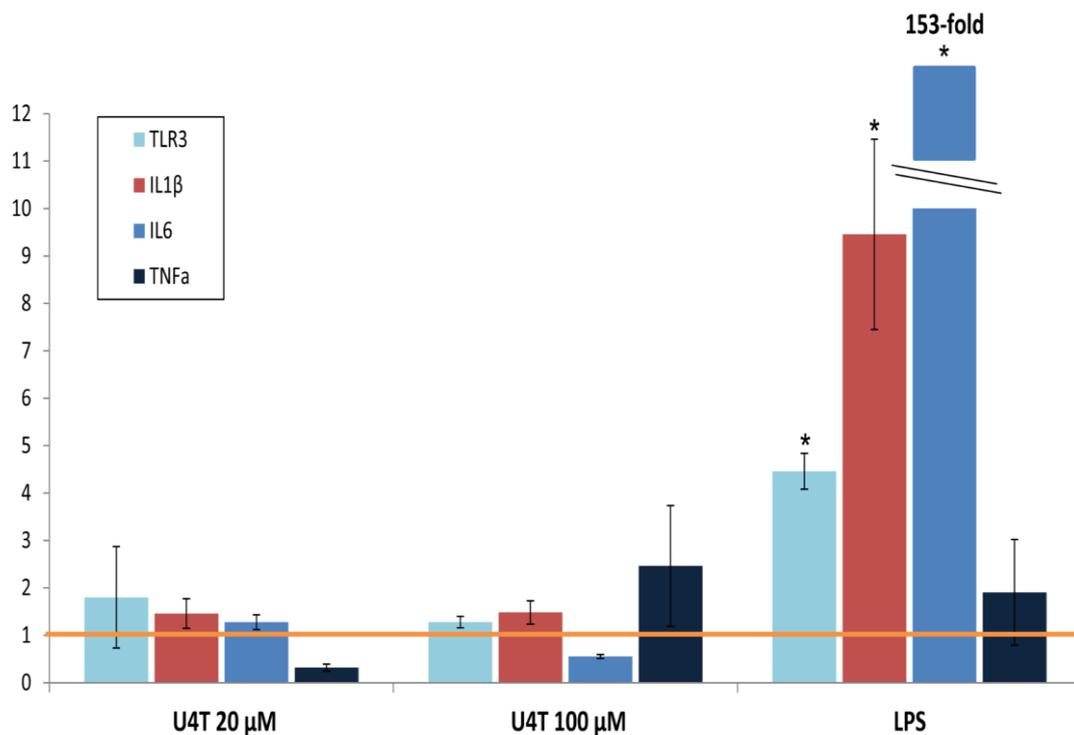


Abbildung 12 qRT-PCR der 661W-Zellen: Dargestellt ist die Genexpression der inflammatorischen Marker TLR3, IL1 β , IL6 und TNF α nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der U4T-NP (20 μ M, 100 μ M) sowie bei Zugabe von LPS (Positivkontrolle). Der Mittelwert des Haushaltsgen L32 wurde bei dem Wert 1 festgelegt. Signifikante Unterschiede der Standardabweichung sind mit * $p < 0,05$ definiert.

3.1.5 Zellviabilität von humanen Primärzellen im Toleranzbereich

Nachdem die gewonnenen Ergebnisse der an Zelllinien durchgeführten Toxizitätstests eine hervorragende Biokompatibilität bestätigten, wurden zur weiteren Sicherheitsbewertung der U4T-NP diese ebenfalls an humanen primären Korneaepithelzellen durchgeführt. Da Primärzellen in ihrer Gewinnung, Verarbeitung und Handhabung äußerst komplex sind und eine begrenzte Verfügbarkeit vorliegt, wurde eine Toxizität zunächst an Zelllinien ausgeschlossen. Die Sicherheitsbewertung der U4T-NP wurde mithilfe eines MTS Viability Assay vgl. 2.2.3 fortgeführt, welcher Rückschlüsse auf die Zellviabilität zulässt.

Die gemessene Vitalität der Kulturen lag unter Verwendung der ssU4T bei geringer Konzentration (20µM) nahe dem Kontrollwert (100%). Während die Viabilität der Primärzellen bei einer Konzentrationserhöhung auf 100µM zunächst einen unwesentlichen Anstieg zeigte, so resultierte bei Zugabe der höchsten Konzentration (500 µM) eine deutliche Minderung der zellulären Lebensfähigkeit. Die gemessenen Zellmengen (20µM: 104,41%, 100µM: 105,45%, 500µM: 94,67%) sind als signifikant zu beurteilen, lagen jedoch im definierten Toleranzbereich.

Die getesteten dsU4T-NP lösten bei Konzentrationen von sowohl 20µM wie auch 100µM zunächst kaum Veränderung bezüglich der Zellvitalität aus. Es wurde bei beiden Konzentrationen eine Viabilität nahe 100% gemessen. Die Steigerung der Konzentration auf 500µM führte zu einem signifikanten Abfall der vitalen Primärzellen auf 96,05%, welcher dennoch als nicht toxisch einzustufen gilt.

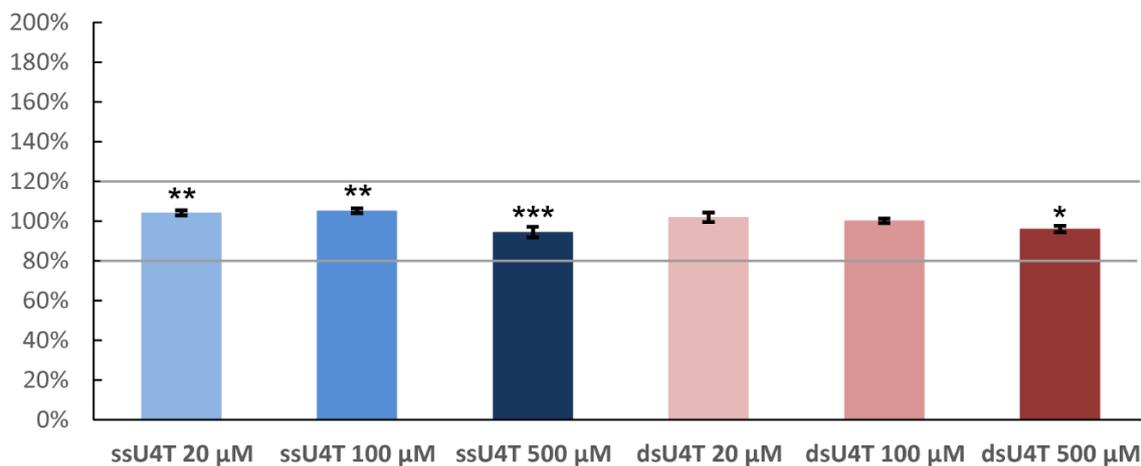


Abbildung 13 MTS Viability Assay der humanen primären Korneaepithelzellen: Dargestellt ist die Zellviabilität (in %) der kornealen Primärzellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen (20µM, 100µM, 500µM) der ssU4T-NP sowie dsU4T-NP. Eine Pufferkontrolle wurde bei 100% festgelegt. Unterschiede der Standardabweichung gegenüber der reinen Pufferlösung wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ beurteilt. Die grauen Linien bei jeweils 80% und 120% begrenzen den zuvor definierten Toleranzbereich.

3.1.6 Ausschluss einer toxischen Abnahme der Zellmenge bei Primärzellen

Um einen toxischen Einfluss der NP (ssU4T und dsU4T) auszuschließen, wurde zur Ermittlung der Zellmenge eine Kristall-Violett-Färbung verwendet. Der Ablauf ist in 2.2.4 ausgeführt.

Sowohl bei den getesteten ssU4T wie auch den dsU4T konnte mit zunehmender Konzentration (100µM, 500µM) eine stetige Abnahme bezüglich der Anzahl vorhandener Zellen nachgewiesen werden. Hierbei war bei der Behandlung der Primärzellen mit der Höchstkonzentration von 500µM beider NP-Varianten die Abnahme der Zellmenge als signifikant zu bewerten (ssU4T: 81,57%, dsU4T: 77,61%). Die übrigen Messwerte wiesen keine Signifikanz auf. Die Zellmenge der mit 500µM dsU4T versetzten Zellen unterschritt knapp den tolerierten Bereich, alle übrigen Ergebnisse befanden sich innerhalb der +/-20% -Grenze.

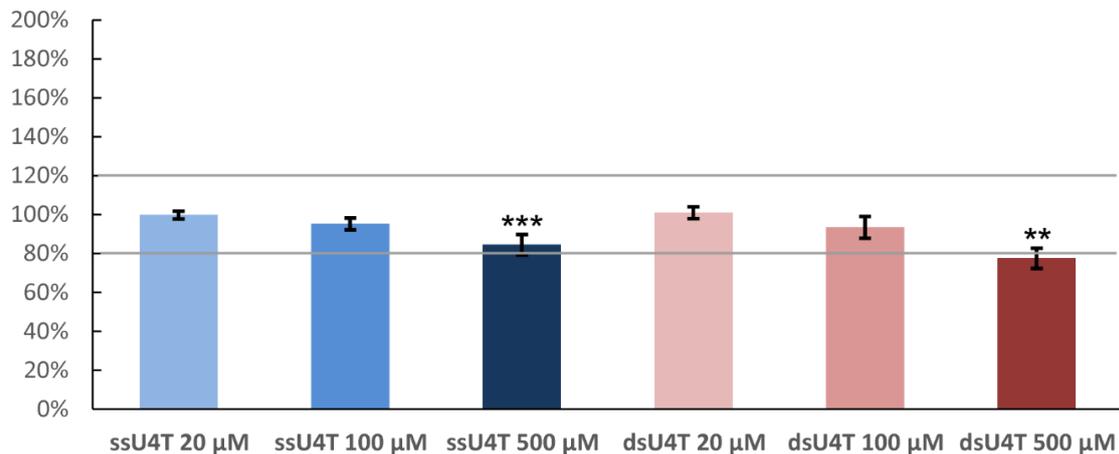


Abbildung 14 Kristall-Violett-Färbung der humanen primären Korneaepithelzellen: Dargestellt ist die Zellmenge (in %) der mit ssU4T-NP und dsU4T-NP behandelten Primärzellen in unterschiedlichen Konzentrationen (20µM, 100µM, 500µM). Der Mittelwert der Pufferlösung wurde auf 100% gesetzt. Signifikante Veränderungen der Standardabweichung gegenüber dem Pufferwert wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ als signifikant bewertet. Zuvor wurde eine Abweichung von +/- 20% Abweichung gegenüber des Pufferwertes als tolerierbar definiert (graue Linien).

3.1.7 Geringe Apoptose-Induktion von Primärzellen

Zur Bewertung der Apoptose-Induktion wurde der in 2.2.5 erläuterte Caspase 3/7 Aktivitätstest herangezogen. Die Apoptoserate der mit ssU4T behandelten humanen Korneazellen war bei allen verwendeten Konzentrationen im Vergleich zum Kontrollwert (100%) signifikant erhöht. Die meisten apoptoseaktiven Zellen wurden mit 120,63% bei einer NP-Konzentration von 100µM detektiert. Somit waren alle Werte trotz ihrer Signifikanz (20µM: 115,57%, 100µM: 120,63%, 500µM: 114,65%) unbedenklich, da sie unterhalb der 120%-Toleranzmarke lagen.

Unter Verwendung der dsU4T-NP wurde mit steigender Konzentration der programmierte Zelltod zunehmend verstärkt induziert. Bei verwendeter NP-Konzentration von 20µM lag die Anzahl apoptotischer Zellen bei 101,77% und steigerte sich mit zunehmender Konzentration. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 500µM war die Steigerung der Apoptoseaktivität mit 115,39% als signifikant zu bewerten, die übrigen Ergebnisse unterschieden sich nicht relevant von der Kontrolle.

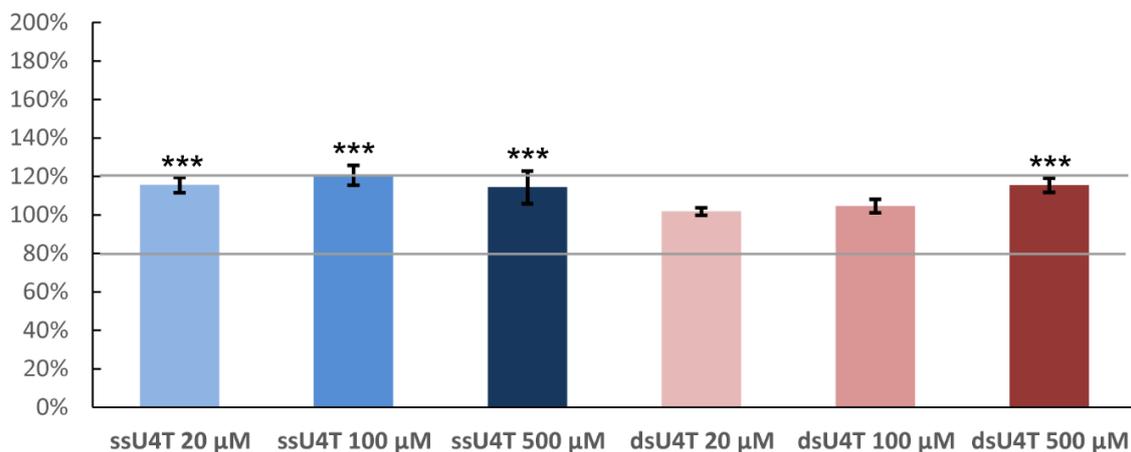


Abbildung 15 Caspase 3/7 Assay der humanen primären Korneaepithelzellen: Dargestellt ist die Apoptose-Induktion (in %) der Primärzellen nach Zugabe von ssU4T-NP und dsU4T-NP in den Konzentrationen 20µM, 100µM und 500µM. Zum Vergleich wurde der Mittelwert der Pufferkontrolle bei 100% definiert. Unterschiede der Standardabweichung gegenüber der reinen Pufferlösung wurden bei * $p < 0,05$, bei ** $p < 0,01$ und bei *** $p < 0,001$ als signifikant gewertet. Die grauen Linien bei 80% und 120% begrenzen den zuvor festgelegten Bereich, indem Veränderungen gegenüber dem Puffer toleriert werden.

3.1.8 Exzellente Biokompatibilität in *in vivo*-Studien

Nach Abschluss der *in vitro*-Versuche konnte eine Toxizität der U4T-NP ausgeschlossen werden. Daher wurde anschließend *in vivo* ebenfalls die Apoptoseinduktion überprüft. Die Durchführung erfolgte wie in 2.2.8 beschrieben. Die Augen wurden, wie in 2.2.5 erläutert, verarbeitet. Im Anschluss wurde zum Nachweis apoptotischer Zellen eine TUNEL-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde das *In Situ Cell Death Detection Kit*, Fluorescein von Roche (2.2.8) verwendet. Die DAPI-gefärbten Zellkerne der Hornhaut erscheinen blau, TUNEL-gefärbte apoptotische Zellkerne sind grün fluoreszierend. Es zeigte sich, dass bei keiner verabreichten Konzentration (20µM, 100µM, 500µM) bzw. Menge (ein Tropfen, vier Tropfen) apoptotische Zellen nachweisbar waren. Zum Vergleich wurde eine Positivkontrolle angefertigt, indem DNase auf die Schnitte gegeben wurde, um eine Apoptose auszulösen. Diese Apoptose-Induktion ist rechtsseitig in Form der grün gefärbten Zellkerne veranschaulicht. Das Säulendiagramm (Abbildung 17) fasst die Ergebnisse der *in vivo*-Studien der getesteten U4T-NP auf Rattenaugen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zusammen. Es konnte sowohl bei einer NP-Konzentration von 20µM wie auch bei 100µM bei allen verabreichenden Tropfmengen (ein Tropfen, vier Tropfen) eine Toxizität ausgeschlossen werden. Es wurden keine (0%) apoptotische Zellen gefunden. Demgegenüber steht die Positivkontrolle mit einer Apoptoserate von 100%.

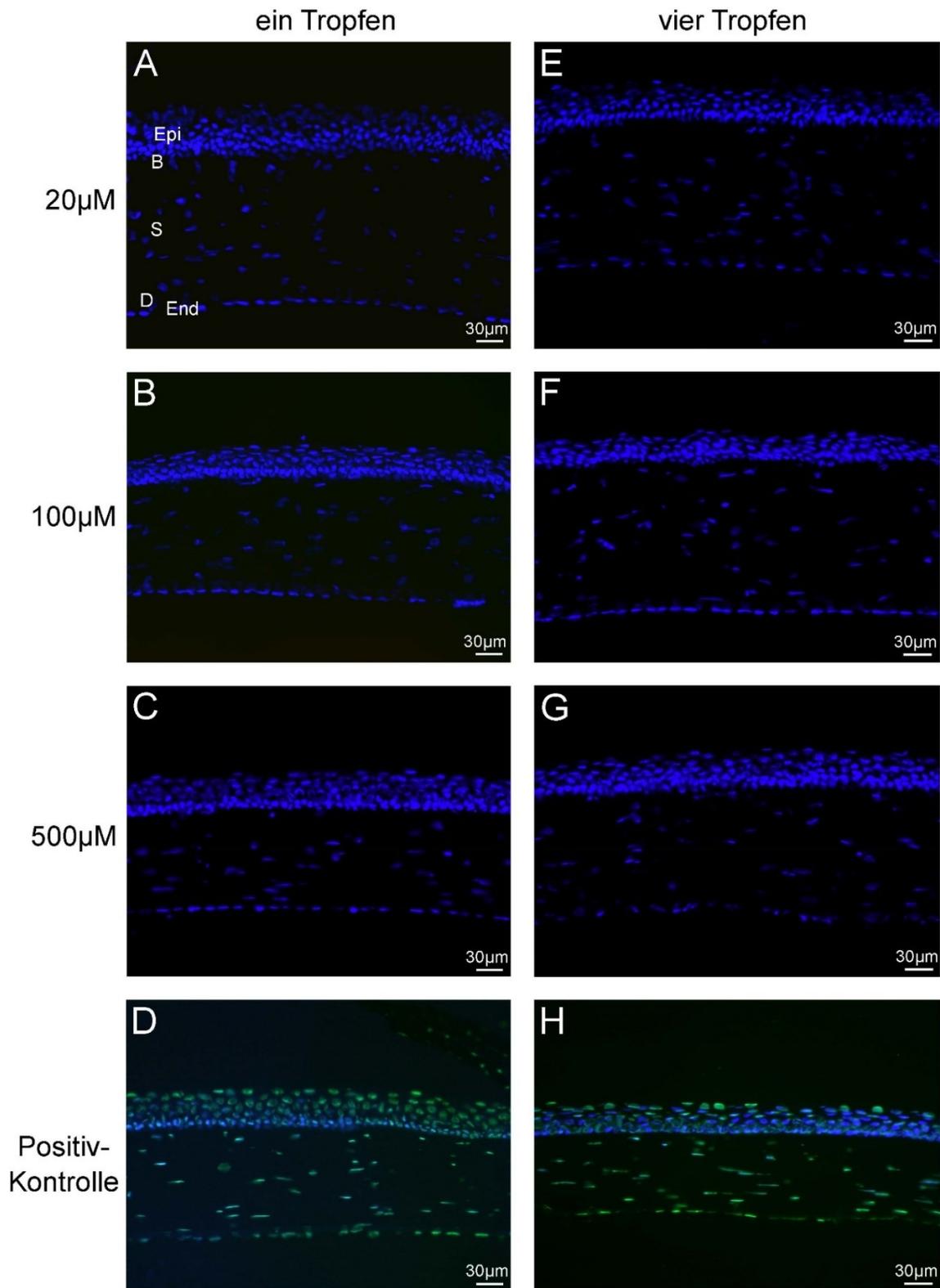


Abbildung 16 TUNEL-Färbung der U4T-behandelten Kornea: Repräsentative Bilder der Rattenaugen, welche mit verschiedenen Konzentrationen (20µM, 100µM, 500µM) sowie unterschiedlichen Mengen (ein Tropfen, vier Tropfen) der U4T-NP behandelt wurden. Die vitalen Kornea-Zellkerne sind mithilfe einer DAPI-

Färbung visualisiert (blau). Zum Vergleich sind die Positivkontrollen aufgeführt. Neben den DAPI-gefärbten Zellkernen (blau), dominieren die apoptotischen Kerne, die mithilfe der TUNEL-Färbung detektiert wurden (grün). A ein Tropfen, 20µM. B ein Tropfen, 100µM. C ein Tropfen, 500µM. D ein Tropfen, Positivkontrolle. E vier Tropfen, 20µM. F vier Tropfen, 100µM. G vier Tropfen, 500µM. H vier Tropfen, Positivkontrolle. Epi: Epithel, B: Bowman-Membran, S: Stroma, D: Descemet-Membran, End: Endothel.

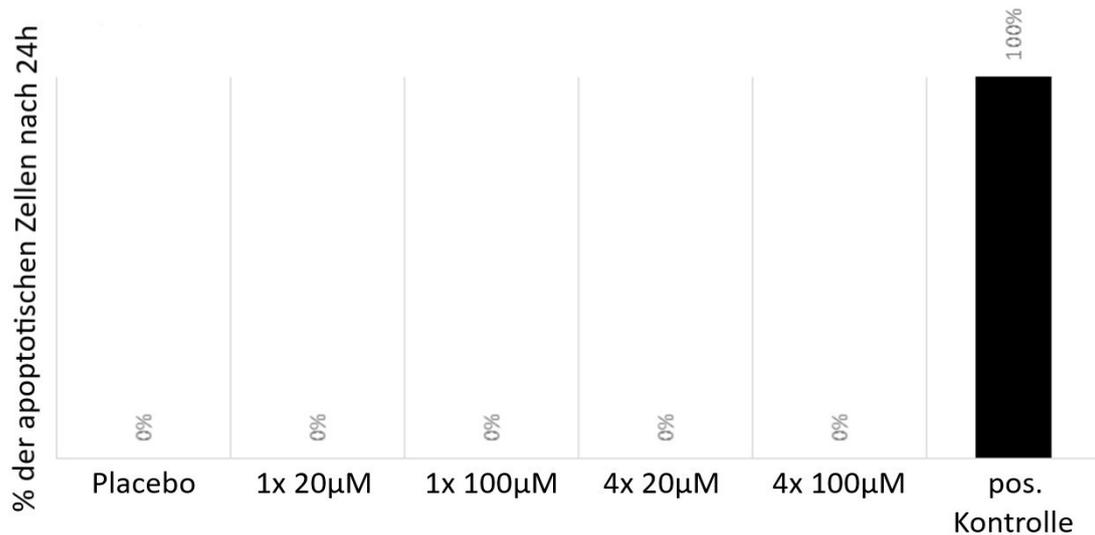


Abbildung 17 *In vivo* Toxizität der mit U4T-12-NP behandelten Zellen nach 24 Stunden: Keine apoptotischen Zellen detektierbar bei der Verwendung von U4T-NP sowie der Puffer-Kontrolle, zum Vergleich 100% Apoptose bei der Positivkontrolle.

3.2 U4T-Kanamycin-NP

Nachdem die exzellente Biokompatibilität der reinen NP bestätigt wurde, wurden die Toxizitätsprüfungen an U4T-Kan-NP durchgeführt. Somit wurde sichergestellt, dass aufgrund der Beladung auftretende Änderungen der Eigenschaften ebenfalls keine schädlichen Wirkungen zur Folge haben.

3.2.1 Keine relevant verringerte Zellviabilität an RGC-5- und ARPE19-Zelllinien

Die Sicherheitsbewertung wurde mit beladenen NP (U4T-Kan-NP) fortgeführt. Die Zellviabilität wurde, wie in 2.2.3 beschrieben, mittels MTS Viability Assay bestimmt. Die Viabilität der RGC-5-Kulturen blieb bei Zugabe mit Kanamycin-beladenen NP mit einer Konzentration von 20µM der der Kontrolle (100%). Die Verwendung höher konzentrierter NP (100µM) bewirkte eine signifikante Abnahme der zellulären Lebensfähigkeit auf 87,60%, die sich dennoch innerhalb der Toleranz bewegte.

Die Anzahl vitaler ARPE19-Zellen verringerte sich gegenüber der mit reinem Puffer behandelten Kulturen unter Verwendung der NP unabhängig von der getesteten Konzentration (20µM, 100µM). Beide Werte sind mit einem Lebendzellanteil von 95,41% bei einer Konzentration von 20µM bzw. 94,81% bei einer NP-Konzentration von 100µM als signifikant, aber dennoch als unbedenklich zu werten.

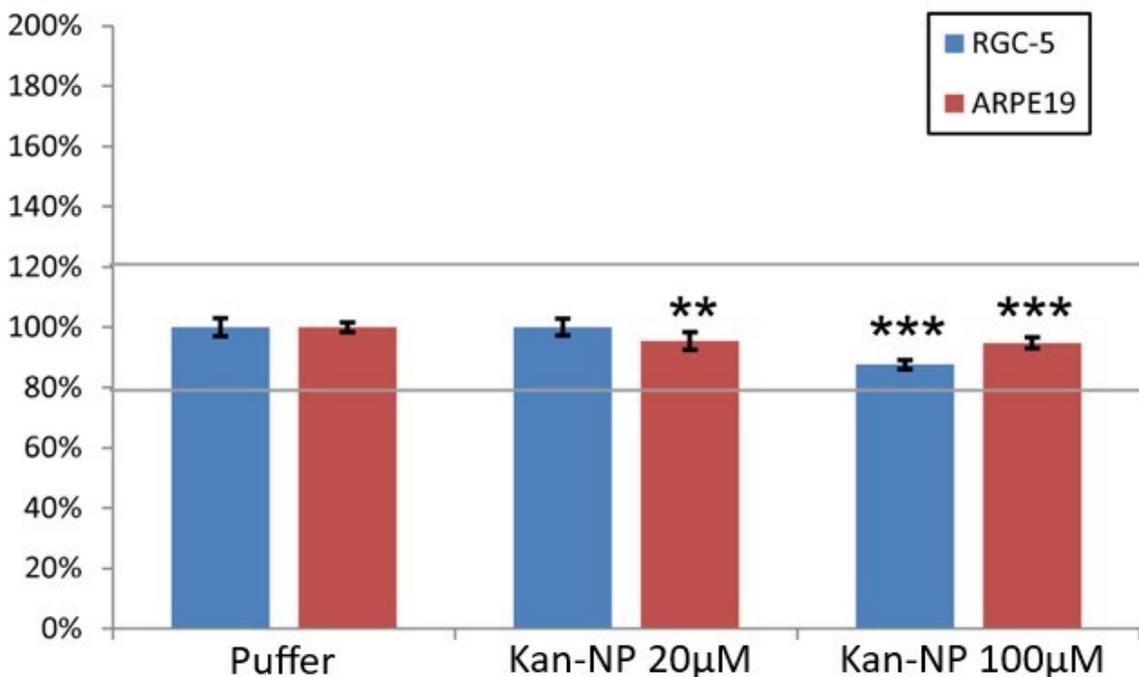


Abbildung 18 MTS Viability Assay der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien: Dargestellt ist die relative Zellviabilität (in %) der beiden okularen Zelllinien RGC-5 und ARPE19 unter Zugabe verschiedener

Konzentrationen der Kan-NP (20µM, 100µM) im Vergleich zu mit reinem Puffer behandelten Zellen. Der Mittelwert der Pufferlösung wurde auf 100% gesetzt. Signifikante Unterschiede der Standardabweichung gegenüber dem Pufferwert sind mit * $p < 0,05$, bei ** $p < 0,01$ und bei *** $p < 0,001$ beschrieben. Ein Toleranzbereich wurde bei +/- 20% Abweichung des Pufferwertes definiert und ist durch die grauen Linien bei 80 bzw. 120% markiert.

3.2.2 Kein toxischer Einfluss auf die Zellmenge der Zelllinien RGC-5 und ARPE19

Mithilfe der in Kapitel 2.2.4 erläuterten Kristall-Violett-Färbung wurde die Zellmenge der beiden Zelllinien RGC-5 und ARPE19 nach Behandlung mit U4T-Kan-NP bestimmt. Die gemessene Zellmenge der RGC-5-Zelllinie verringerte sich kontinuierlich mit zunehmender Konzentrationsmenge. Unter Verwendung einer Konzentration von 20µM fiel die Zahl vitaler Zellen auf 88,26%. Wurde die Konzentration auf 100µM erhöht, sank die Zellmenge weiter auf 84,03%. Bei allen verwendeten Konzentrationen (20µM, 100µM) wurde eine signifikante Abnahme nachgewiesen, jedoch lagen alle gemessenen Werte innerhalb des definierten Toleranzbereiches.

Im Gegensatz hierzu wurde eine stetige Zunahme der Zellzahl der ARPE19-Kulturen unter NP-Zugabe steigender Konzentrationen (20µM, 100µM) beobachtet. Eine toxische Wirkung konnte aufgrund der gemessenen Werte (105,68% bei 20µM, 113,59% bei 100µM) ausgeschlossen werden.

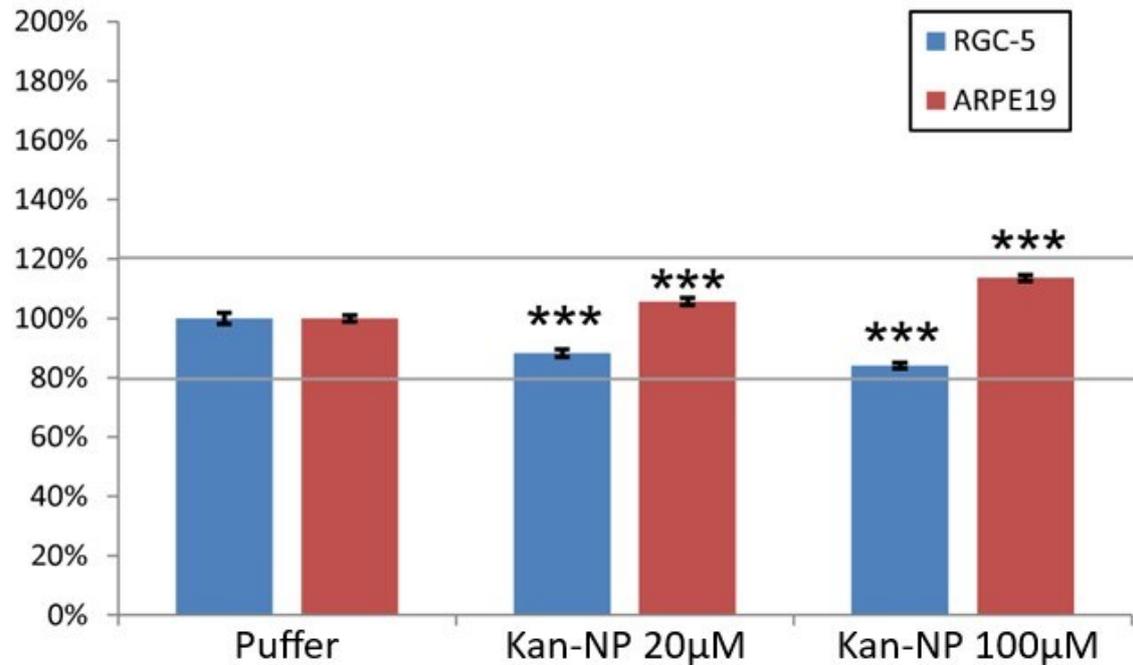


Abbildung 19 Kristall-Violett-Färbung der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien: Dargestellt ist die Zellmenge (in %) der okularen Zelllinien RGC-5 und ARPE19 nach Behandlung mit Kanamycin-beladenen NP in folgenden Konzentrationen 20µM und 100µM. Zum Vergleich wurde beiden Zelllinien der reine Puffer zugefügt. Der Pufferwert wurde als 100% definiert. Unterschiede der Standardabweichung gegenüber der reinen Pufferlösung wurden bei * $p < 0,05$, bei ** $p < 0,01$ und bei *** $p < 0,001$ als signifikant gewertet. Die grauen Linien bei 80% und 120% begrenzen den zuvor festgelegten Bereich, indem Veränderungen gegenüber dem Puffer toleriert werden.

3.2.3 Keine toxische Erhöhung der Apoptose-Induktion der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien

Zur Bestimmung der Apoptose-Induktion wurde ein Caspase 3/7 Aktivitätstest, wie in 2.2.5 beschrieben, durchgeführt. Die Apoptoserate der RGC-5-Zelllinie fiel bei einer NP-Konzentration von 20µM zunächst im Vergleich zur mit Puffer behandelten Probe ab (88,39%). Bei einer Konzentration von 100µM stieg die Zahl der ausgelösten Apoptosen gegenüber der Kontrolllösung auf 112,75% an. Verglichen mit der Kontrolle bestand bei Verwendung beider getesteter Konzentrationen ein signifikanter Unterschied, diese bewegten sich jedoch nicht außerhalb der Toleranzgrenzen.

Bei Testung der ARPE19-Kulturen mit den mit Kanamycin beladenen NP verhielt es sich gegenteilig. Die Zugabe von 20µM NP induzierte, gegenüber mit reinem Puffer behandelten Zellen, mit 102,25% eine nicht relevante Erhöhung der gemessenen Apoptosemenge. Unter Verwendung von 100µM wurden deutlich weniger apoptoseaktive Zellen nachgewiesen. Der Messwert sank auf 92,51%. Diese Abnahme der Apoptosemenge war als signifikant (im tolerierten Bereich) zu werten.

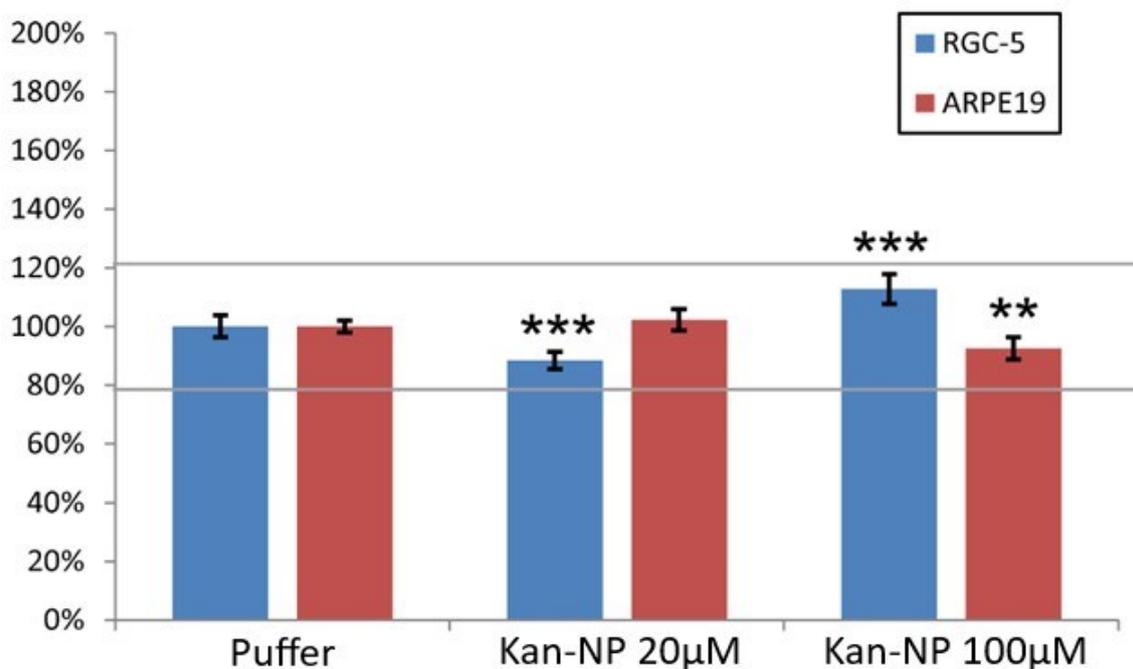


Abbildung 20 Caspase 3/7 Assay der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien: Dargestellt ist die Apoptose-Induktion (in %) der RGC-5- und ARPE19-Zelllinien unter Verwendung reiner Pufferlösung verglichen mit Kan-NP-behandelten Zellen in den beiden Konzentrationen 20µM und 100µM. Die Apoptoseinduktion der mit Pufferlösungen durchgeführten Tests (Mittelwerte) wurden jeweils gleich 100 % gesetzt. Eine Signifikanz der Standardabweichung gegenüber des Pufferwertes wurde mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet. Veränderungen von +/-20% gegenüber der 100% wurden als tolerierbar definiert. Diese Toleranzgrenzen sind in Form der grauen Linien dargestellt.

3.2.4 Ausschluss einer signifikanten Veränderung der Genexpression inflammatorischer Marker

Die qRT-PCR wurde zum Ausschluss einer signifikanten Veränderung des Genexpressionsmusters verschiedener Entzündungsmarker nach Behandlung der okularen 661W-Zelllinie der mit Kanamycin-beladenen NP, wie in 2.2.7 beschrieben, durchgeführt. Wie zuvor zeigte sich bei den mit LPS behandelten Zellen eine deutliche Expressionserhöhung aller Entzündungsmarker (TLR3, IL1 β , IL6, TNF α) im Vergleich zum Haushaltsgen, für dessen Mittelwert der Wert 1 definiert wurde. Die Zunahme der exprimierten Gene der Marker TLR3, IL1 β und IL6 waren signifikant (TLR3: 4,5, IL1 β : 9,5, IL6: 10,0).

Die Zellen exprimierten sowohl bei einer Behandlung mit reinem Kanamycin wie auch mit U4T-Kan bei einer Konzentration von je 20 μ M ähnlich viel TLR3. Die gemessenen Werte lagen bei 20 μ M und bei 100 μ M unterhalb dem des Haushaltsgens. Mit zunehmender Konzentration (100 μ M) war eine weitere Abnahme der Kan-behandelten Kulturen nachweisbar. Im Gegensatz hierzu steigerte sich die Expression des Markers bei Zugabe 100 μ M der beladenen NP und lag mit einem Messwert von 1,6 oberhalb des Kontrollwertes. Keines der Ergebnisse wies eine Signifikanz auf.

Unter Verwendung des reinen Antibiotikums mit einer Konzentration von 20 μ M veränderte sich die Genaktivität des inflammatorischen Markers IL1 β verglichen zur Kontrolle nicht. Bei erhöhter Konzentrationsmenge (100 μ M) des Antibiotikums zeigte sich ein Abfall der IL1 β -Expression auf einen Wert von 0,5. Das Expressionsprofil sank bei Zugabe der mit Kan-gekoppelten NP geringfügig unter den Wert der Kontrolle auf 0,9, stieg allerdings mit zunehmender Konzentration deutlich an. Hier wurde eine Expressionssteigerung auf 2,0 beobachtet. In Bezug auf das Haushaltsgen konnte bei allen verwendeten Konzentrationen des reinen Kanamycins sowie der U4T-Kann-NP keine signifikanten Änderungen festgestellt werden.

Die IL6-Expression steigerte sich durch eine Durchführung des Versuches mit reinem Antibiotikum mit einer Konzentration von 20 μ M gegenüber der Kontrolle. Der Messwert lag bei 1,2. Auf eine Konzentrationserhöhung auf 100 μ M

reagierten die Zellen mit einer geringfügigen Abnahme ihrer Aktivität des Gens. Im Vergleich zum Haushaltsgen resultierte aus der Behandlung mit NP (20µM wie auch 100µM) keine Veränderung ihres Expressionsprofils bezüglich des inflammatorischen Markers IL6.

Durch die Behandlung der 661W-Kulturen mit Kan zeigten sich geringere Messwerte der mRNA-Expression des Entzündungsmarkers TNFα verglichen mit dem Kontrollgen, die bei der höheren verwendeten Konzentration von 100µM einen unwesentlichen Anstieg induzierte. Weiterhin ergab die qRT-PCR eine geringfügige Abnahme der TNFα-Expression unter Verwendung von 20µM U4T-Kan. Bei einer Konzentration von 100µM hingegen exprimierten die Zellen vermehrt TNFα. Die Genaktivität erhöhte sich auf 1,4. Der gemessene Wert lag höher gegenüber der Kontrolle. Es bestand bei keinem der Ergebnisse, sowohl bei mit reinem Antibiotikum wie auch mit NP behandelten Zellen, ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Genexpression des Haushaltsgens.

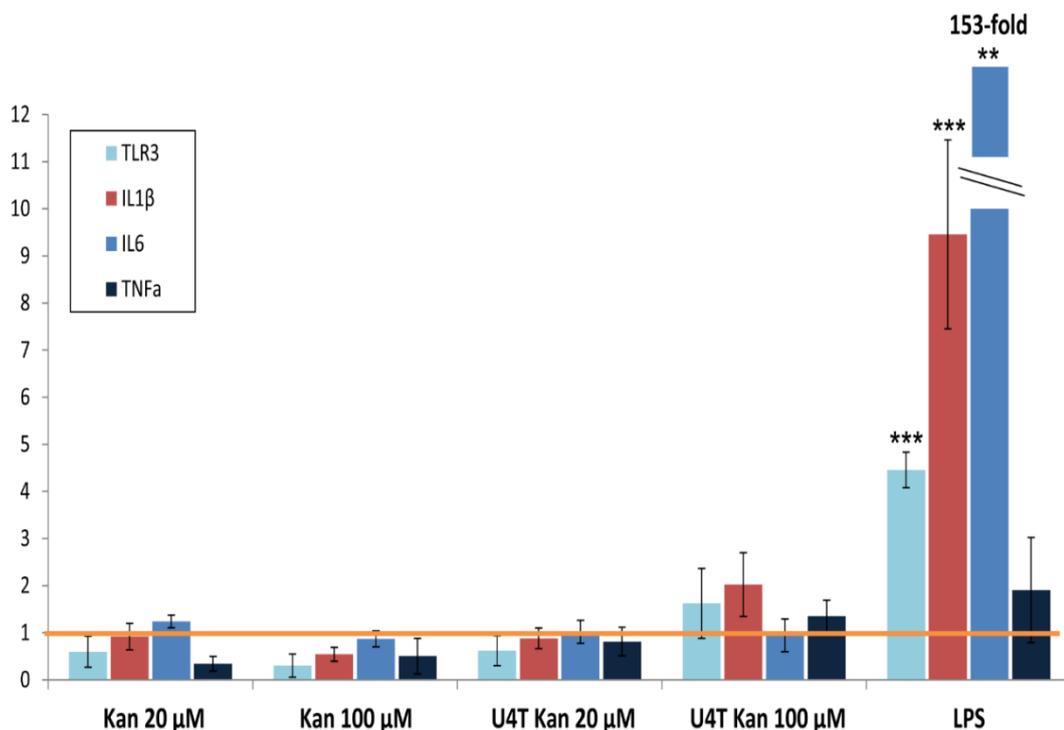


Abbildung 21 qRT-PCR der 661W-Zellen: Dargestellt ist die Genexpression der vier untersuchten Entzündungsmarker TLR3, IL1β, IL6 und TNFα nach Supplementierung der Zelllinie mit verschiedenen

Konzentrationen des reinen Antibiotikums Kanamycin (20µM, 100µM) und der U4T-Kan-NP (20µM, 100µM). Zum Vergleich wurden als Positivkontrolle die Zellen mit LPS behandelt. Für das Housekeeping- Gen L32 wurde der Wert 1 definiert. Eine Signifikanz der Standardabweichung wurde mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

3.2.5 Keine signifikante Abnahme der Zellviabilität von Primärzellen

Wie im ersten Versuchsdurchlauf wurden ebenfalls Studien mit Primärkulturen durchgeführt. Hierzu fand wieder der MTS Viability Assay (vgl. 2.2.3) Anwendung, um die Zellviabilität an humanen primären Korneaepithelzellen zu untersuchen.

Sowohl bei mit reinen Kanamycin wie auch mit Kanamycin-beladenen NP konnte mit steigender Konzentration eine nicht relevante Abnahme der Vitalität der Primärzellen beobachtet werden.

Das getestete Antibiotikum zeigte bei einer Konzentration von 20µM eine leicht erhöhte Zellviabilität gegenüber der 100%-Kontrolle. Dieses Ergebnis wies keine Signifikanz auf und überschritt somit nicht den Toleranzbereich. Unter Verwendung von 100µM entsprach die Anzahl vitaler Zellen der der Pufferlösung.

Es bestand kein Unterschied der Zellviabilität zwischen einer NP-Zugabe von 20µM und der mit reinem Puffer behandelten Zellen. Bei höher konzentrierter Menge an NP (100µM) war ein geringer Abfall der zellulären Viabilität auf 97,08% zu beobachten, der jedoch nicht als signifikant zu bewerten war.

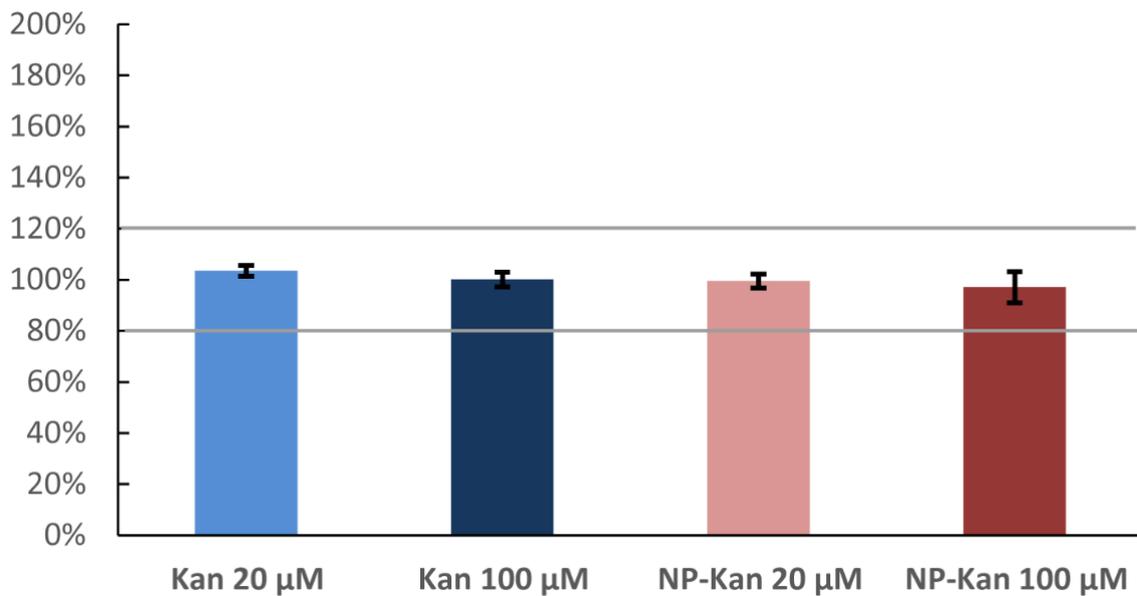


Abbildung 22 MTS Viability Assay der humanen primären Korneaepithelzellen: Dargestellt ist die Zellviabilität (in %) der kornealen Primärzellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen (20µM, 100 µM) des reinen Antibiotikums Kanamycin sowie den mit Kanamycin beladenen NP. Eine Pufferkontrolle wurde bei 100% festgelegt. Die grauen Linien bei jeweils 80% und 120% begrenzen den zuvor definierten Toleranzbereich.

3.2.6 Konstante Anzahl an Primärzellen nach Inkubation mit Kanamycin-beladenen NP

Zum Ausschluss der Biokompatibilitätsuntersuchungen mit Kanamycin beladenen NP wurde die Zellmenge wie zuvor mittels Kristall-Violett-Färbung bestimmt. Die Durchführung wurde in 2.2.4 beschrieben.

Es konnte sowohl bei den mit reinem Kanamycin wie auch mit den Kan-beladenen NP behandelten Primärzellen eine konstante Zellmenge beobachtet werden. Die Anzahl vitaler Zellen lag unter Zugabe von 20µM beider Versuchsreihen minimal unter dem Kontrollwert von 100%. Zwar sank der Lebendzellanteil bei erhöhter Konzentration (100µM), die gemessenen Werte waren im Vergleich zur Pufferkontrolle jedoch nicht signifikant verändert.

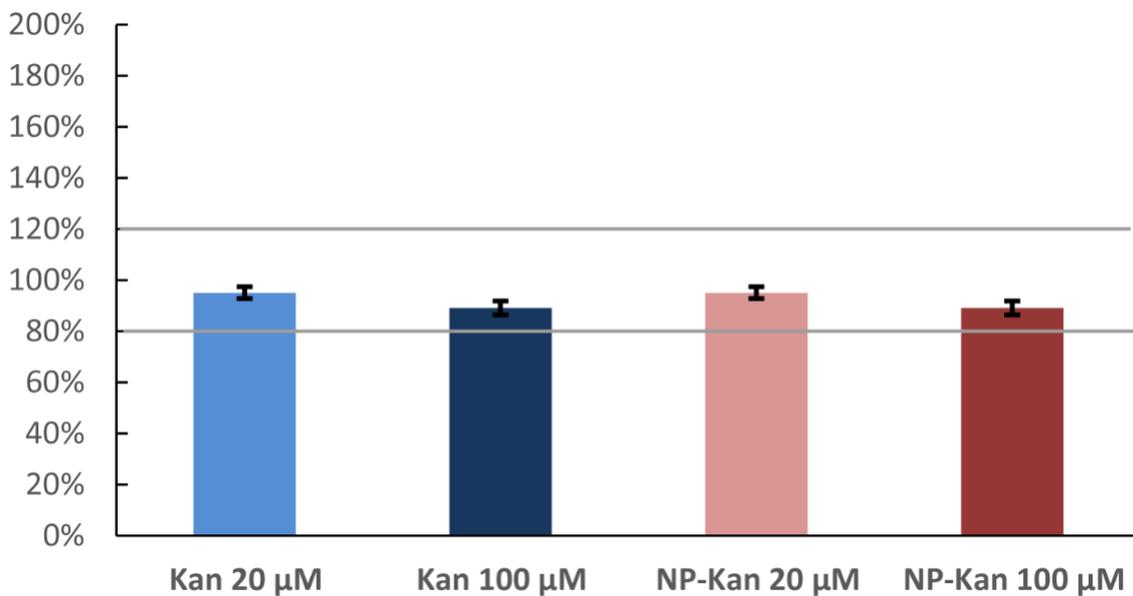


Abbildung 23 Kristall-Violett-Färbung der humanen primären Korneaepithelzellen: Dargestellt ist die Zellmenge (in %) der mit Antibiotikum (Kan) und Kan-NP behandelten Primärzellen in zwei Konzentrationen (20µM, 100µM). Der Mittelwert der Pufferlösung wurde auf 100% gesetzt. Zuvor wurde eine Abweichung von +/- 20% gegenüber des Pufferwertes als tolerierbar definiert (graue Linien).

3.2.7 Keine signifikant erhöhte Apoptose-Induktion bei humanen Primärzellen

Mithilfe eines Caspase 3/7-Aktivitätstests (vgl. 2.2.5) wurde die Apoptose-Induktion an humanen Primärzellen nach Behandlung mit dem reinen Kanamycin sowie mit den beladenen NP ermittelt.

Die Menge apoptoseaktiver Primärzellen erhöhte sich bei Zugabe des reinen Antibiotikums mit steigender Konzentration auf 100µM. Gegenüber den Zellen, die mit reinem Puffer behandelt wurden, zeigte sich bei allen Tests eine Zunahme der Apoptoseinduktion. Lediglich das reine Kan führte zu einer erhöhten Apoptoseaktivität, die mit 112,52% eine Signifikanz aufwies. Somit konnte keine signifikante Zunahme der Apoptose induziert durch die beladenen U4T-NP beobachtet werden.

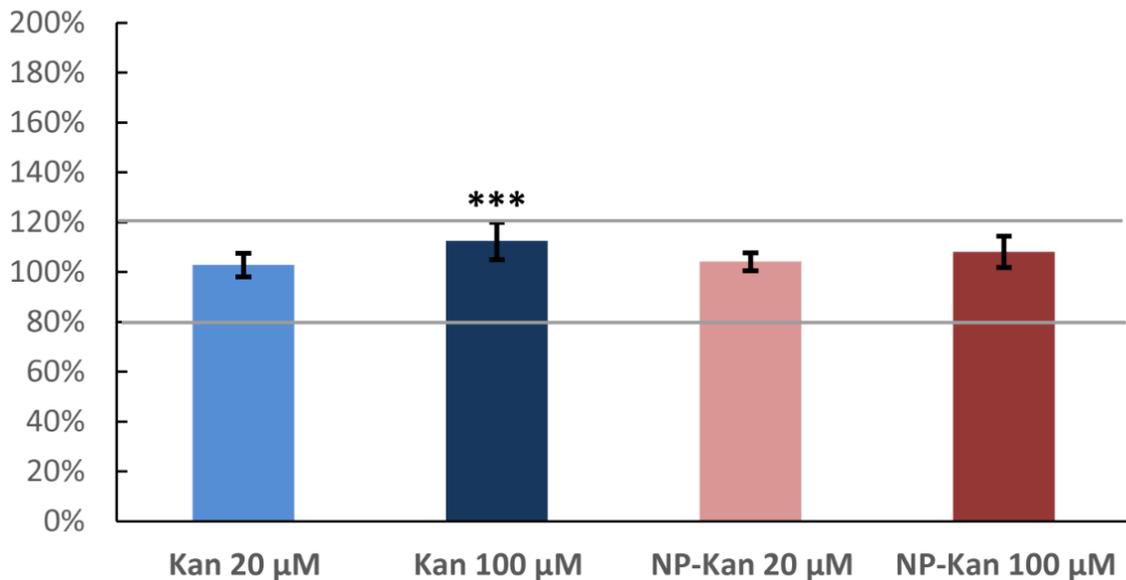


Abbildung 24 Caspase 3/7 Assay der humanen primären Korneaepithelzellen: Dargestellt ist die Apoptose-Induktion (in %) der Primärzellen nach Zugabe von reinem Kanamycin sowie mit Kanamycin-beladenen NP in den Konzentrationen 20µM und 100µM. Zum Vergleich wurde der Mittelwert der Pufferkontrolle bei 100% definiert. Unterschiede der Standardabweichung gegenüber der reinen Pufferlösung wurden bei *** $p < 0,001$ als signifikant gewertet. Die grauen Linien bei 80% und 120% begrenzen den zuvor festgelegten Bereich, indem Veränderungen gegenüber dem Puffer toleriert werden.

3.2.8 Ausschluss einer Toxizität *in vivo*

Nachdem für die mit Kanamycin-beladenen NP ebenfalls eine toxische Wirkung in allen durchgeführten *in vitro*-Versuchen ausgeschlossen wurde, folgte abschließend die Überprüfung *in vivo*, wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben. Die Verarbeitung der Augen ist in 2.2.5 erläutert. Mithilfe des *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* von Roche (2.2.8) wurde zur Bestimmung der Apoptose-Induktion eine TUNEL-Färbung durchgeführt. Korneale Zellkerne wurden aufgrund der DAPI-Färbung blau dargestellt, apoptotische Kerne fluoreszieren aufgrund der TUNEL-Methode grün. Es konnten sowohl bei einer Konzentration von 20µM als auch bei einer erhöhten Konzentration von 100µM keine apoptotischen Zellen beobachtet werden. Dies gilt für die Tropfmenge von einem und vier Tropfen. Für die Positivkontrollen wurden die Zellen mit DNase

behandelt, um eine Apoptose zu induzieren. Die Ergebnisse der *in vivo*-Studien der getesteten U4T-Kan-NP auf Rattenaugen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden sind im Säulendiagramm (Abbildung 26) veranschaulicht. Es wurden bei keiner Konzentration (20µM, 100µM) bzw. Tropfmenge (ein Tropfen, vier Tropfen) apoptotische Zellen detektiert. Die Positivkontrolle wies eine Apoptoserate von 100% auf.

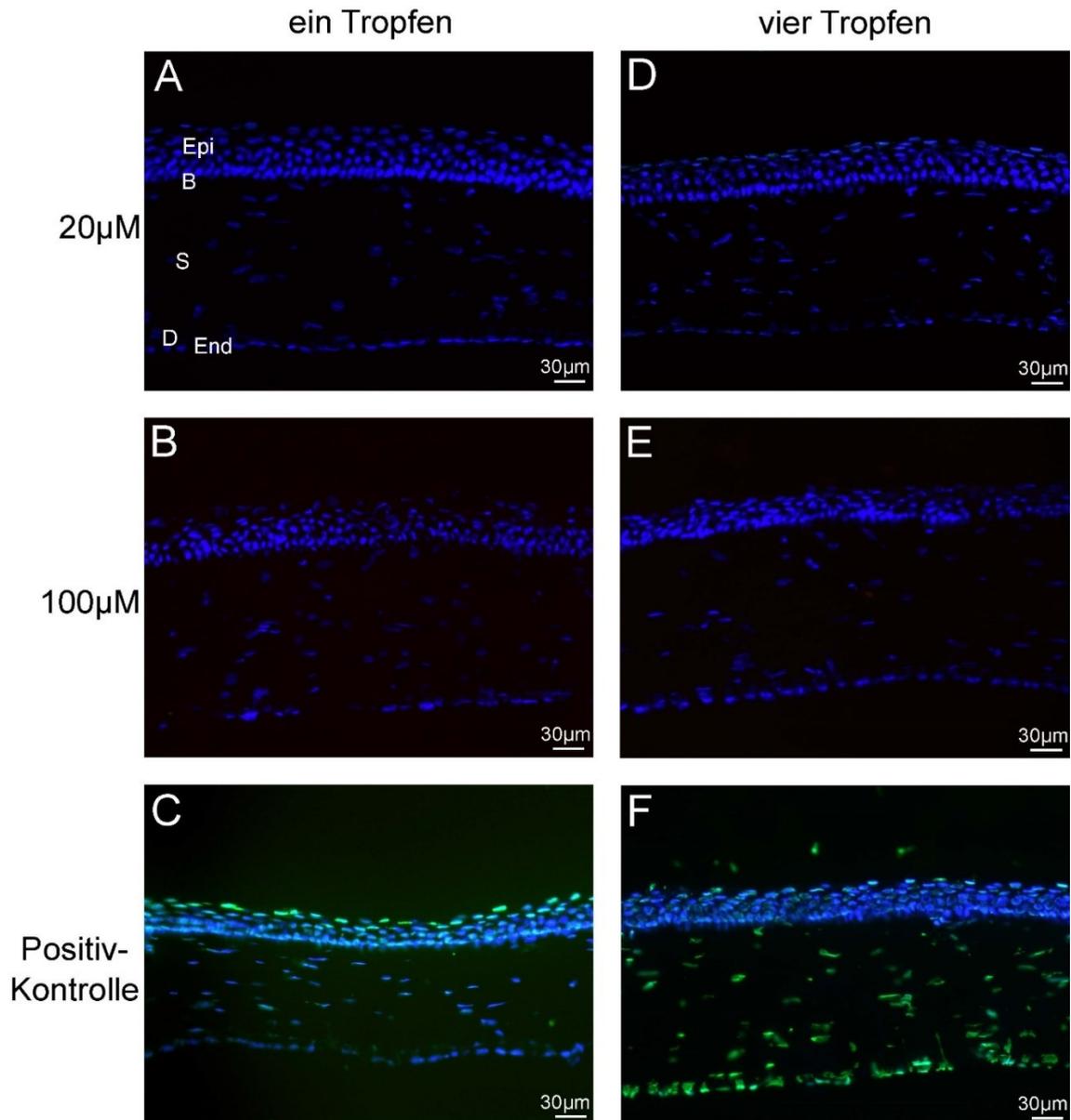


Abbildung 25 TUNEL-Färbung der U4T-12-Kanamycin-behandelten Kornea: Repräsentative Bilder der Rattenaugen, welche mit verschiedenen Konzentrationen von U4T-12-Kan-NP in den beiden Konzentrationen von 20µM und 100µM sowie mit jeweils einem bzw. vier Tropfen behandelt wurden. Auf den Bildern ist die Kornea dargestellt. Links sind die vitalen Kornea-Zellkerne mithilfe der DAPI-Methode blau eingefärbt. Es sind keine apoptotischen Zellen sichtbar. Zum Vergleich sind die Positivkontrollen aufgeführt. Neben den DAPI-gefärbten Zellkernen, dominieren die apoptotischen Kerne, die mithilfe der TUNEL-Färbung grün fluoreszieren. A ein Tropfen, 20µM. B ein Tropfen, 100µM. C ein Tropfen, Positivkontrolle. D vier Tropfen, 20µM. E vier Tropfen, 100µM. F vier Tropfen, Positivkontrolle. Epi: Epithel, B: Bowman-Membran, S: Stroma, D: Descemet-Membran, End: Endothel.

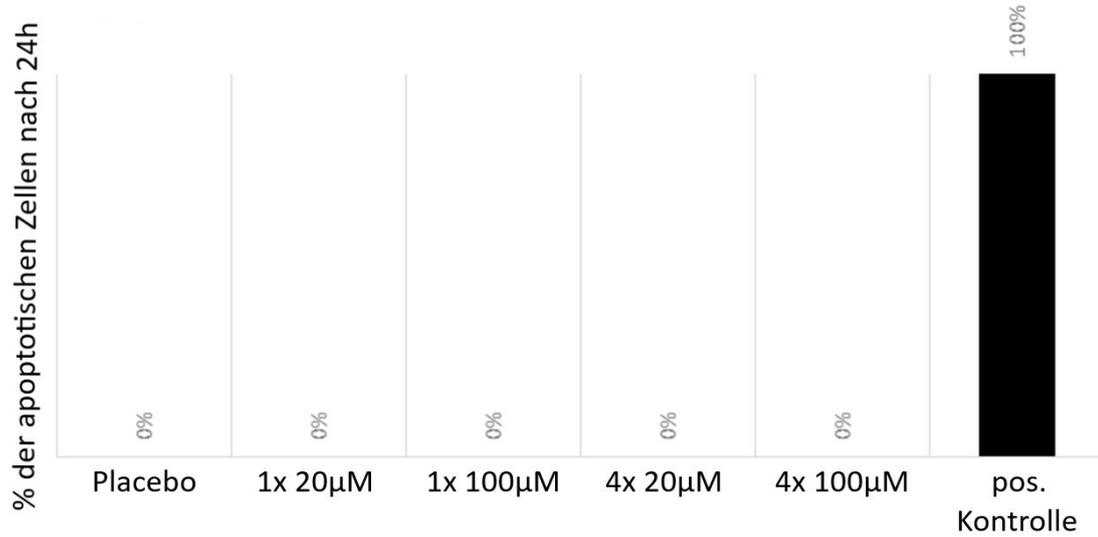


Abbildung 26 *In vivo* Toxizität der mit U4T-12-NP behandelten Zellen nach 24 Stunden: Keine apoptotischen Zellen bei der Verwendung von Kan-U4T-NP sowie der Placebo-Kontrolle, zum Vergleich 100% Apoptose bei der Positivkontrolle.

4. Diskussion

4.1 Zytotoxische Wirkung von Nanopartikeln

Nanopartikel können, wie jedes andere Material, toxisch auf ganze Organe, einzelne Gewebe und Zellen sowie ihre Organellen wirken. Ursächlich hierfür sind ihre spezifischen Eigenschaften, beispielsweise ihre Größe und Form. Diese ermöglichen zum einen ihren Einsatz als nanopartikuläre Wirkstoffträger, bergen andererseits jedoch auch Risiken bzgl. einer möglichen zytotoxischen Wirkung. Weiterhin begünstigen sie verschiedene Mechanismen, sowohl auf biochemischer wie auch molekularer Ebene, welche Zellen massiv schädigen können. Es können intrazellulär oxidativer Stress, inflammatorische Prozesse und weitere Schädigungen (siehe 1.1.2) an Zellorganellen induziert werden. Im schlimmsten Fall führen diese zu einer Apoptose oder Nekrose einzelner Zellen bzw. ganzer Gewebe. Grundsätzlich lassen sich Aussagen bezüglich der Biokompatibilität bzw. Toxizität von NP nicht pauschalisieren, da es viele sehr unterschiedliche Arten von NP gibt. Unter anderem unterscheiden sie sich in ihrem Material, organische und anorganische NP, sowie in Form und Größe.

4.1.1 Eigenschaften von Nanopartikeln, die die Toxizität beeinflussen

Ihre diversen physikochemischen Eigenschaften verleihen den verschiedenen Nanopartikeln eine enorme Effizienzsteigerung der Arzneimittelabgabe, gleichzeitig bergen diese jedoch auch Risiken bezüglich ihrer potentiellen Toxizität [56–58]. Die Wechselwirkung zwischen dem nanoskaligen Wirkstoffträger und Zellen beruht auf Faktoren wie Größe, Form, Oberflächengröße und -gestaltung der verschiedenen Nanopartikel wie auch ihrer Aktivität [56, 28, 59]. Nanopartikel können sich über Blutgefäße und das Lymphsystem im Körper verteilen. Die Translokation erfolgt in verschiedenen Organen wie Nieren, Leber, Milz, Herz und Gehirn. Dort können sie sich absetzen, agglomerieren und in Zellen aufgenommen werden (Internalisierung),

was zu Gewebeschäden bzw. -dysfunktionen führen kann. [58, 59]. Insbesondere biologisch nicht abbaubare Materialien neigen zur Akkumulation, darunter die meisten anorganischen und metallischen Nanopartikel [59]. Nanopartikel Trägersysteme neigen in biologischer Umgebung zur Aggregation [57]. Sammeln sich hohe Konzentrationen im Gewebe an, kann dies schwerwiegende zytotoxische Auswirkungen nach sich ziehen [58].

Aufgrund ihrer geringen Größe und somit großen Oberfläche im Verhältnis zum Volumen sind Nanopartikel äußerst reaktionsfähig und in der Lage mit zellulären Bestandteilen wie Nukleinsäuren, Proteinen, Fettsäuren und Kohlenhydraten zu interagieren. Verallgemeinernd lässt sich sagen, je kleiner, desto reaktiver und folglich auch toxischer sind Nanopartikel, da sie biologische Gewebearrieren überwinden und in Zellen eindringen können. Hierdurch können zelluläre Funktionen gestört oder unterbrochen werden. Größere Partikel werden eher opsoniert und über die natürlichen Clearance-Systeme beseitigt [56, 58, 28, 59]. Darüber hinaus ist ihre Gewebeverteilung sowie Akkumulation größenabhängig [28, 59]. Größe wie auch Oberflächenbeschichtung nanoskaliger Partikel beeinflussen des Weiteren die Endozytose und ihre dortige intrazelluläre Lokalisation [60].

Die Oberflächenchemie, d.h. verschiedene Arten von Beschichtungen oder Funktionalisierungen auf der Partikeloberfläche, tragen neben der Oberflächengröße zur schädigenden Wirkung von Nanoträgersystemen bei [56]. Insbesondere die Oberflächenladung bestimmt die elektrostatische Interaktion mit Organellen und Molekülen, sowie die endozytische Aufnahme. Kationische Nanopartikel weisen eine signifikant höhere Zytotoxizität auf als negativ geladene. Dies lässt sich zurückführen auf eine höhere und damit verbunden zytotoxischeren Wechselwirkung positiv geladener Nanopartikel mit Zellen, was sich durch die Zusammensetzung der Zelloberflächen erklären lässt. Diese sind aufgrund von vorhandenen Glykosaminoglykanen anionisch [56, 58, 28]. Gleiches gilt für positiv geladene Partikeloberflächen, die mit DNA interagieren und diese infolgedessen schädigen [56, 59]. Darüber hinaus ist ebenfalls ihre Löslichkeit entscheidend in Bezug auf schädigende Auswirkungen.

Beispielsweise sind hydrophile, d.h. lösliche, Titanoxid-Nanopartikel weitaus toxischer als unlösliche Titanoxid-Nanopartikel [58].

Die Morphologie spielt ebenfalls eine Rolle. Nanomaterialbasierte Träger können in unterschiedlichsten Formen vorkommen. Bei gleicher chemischer Zusammensetzung und Größe wirken beispielsweise röhren- oder stäbchenförmige Vehikel toxischer als kugelförmige oder kubische. Dies beruht auf der Tatsache, dass sie weniger effektiv durch die biologischen Reinigungsprozesse entfernt werden [56, 28, 59].

4.1.2 Biochemische und molekulare Mechanismen der Zytotoxizität

Hauptursachen der zytotoxischen Wirkung nanoskaliger Medikamententräger sind Nanopartikel-induzierter oxidativer Stress und Entzündungen sowie die Zerstörung der Zellmembran [57]. Intrazellulär aufgenommen interagieren die nanopartikulären Vehikel mit zellulären Komponenten und essentiellen Biomolekülen wie Lipiden, Proteinen oder Nukleinsäuren und können auf diese somit toxisch wirken [56, 61]. Die Schäden umfassen u.a. Beeinträchtigungen der Homöostase, vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials, verminderte Integrität der Zellmembranen, Lysosomen- und Mitochondriendysfunktionen sowie DNA-Läsionen einschließlich Strangbrüchen und Deregulierungen der Genexpression [56, 28, 59, 61]. Folglich kommt es zu Störungen verschiedener Zellfunktionen, wie beispielsweise der DNA-Synthese, der mitochondrialen Aktivität und dem Fortschreiten des Zellzyklus. Inwieweit internalisierte Nanopartikel die Zellfunktionen beeinflussen, hängt von ihrer zellulären Lokalisation ab. [60] Die durch metallische bzw. Metalloxid-NP induzierten Zell- oder DNA-Schäden können zu Autophagozytose, Apoptose wie auch Nekrose führen [56, 60, 61]. Darüber hinaus ist ein weniger drastischer Stillstand des Zellzyklus möglich. Aufgrund einer Deregulierung der Genexpression bezüglich des Zellzyklus bedingt durch DNA-Schäden oder einer Abnahme der ATP-Produktion kommt es

zur Unterdrückung der Proliferation. Dieser Wachstumsstopp bzw. Ruhezustand der Zellen ist reversibel, sofern die Schädigungen repariert werden können. Andernfalls werden sie apoptotisch [56, 60]. Eine signifikant verringerte Lebensfähigkeit der Zellen zeigt sich insbesondere, wenn die nanoskaligen Träger im Zytoplasma oder im Zellkern lokalisiert sind [60].

Nanopartikel können das zelluläre oxidative Stresslevel in Zellen massiv durch eine übermäßige Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie O_2 , OH und H_2O_2 , erhöhen. Das Gleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien ist gestört [56, 28]. Folglich werden u.a. Lipidperoxidationen, Oxidationen der DNA sowie Läsionen der Zellmembran und Proteinen hervorgerufen, woraus Schäden der Zelle wie auch der DNA resultieren [28, 59]. Die entstandenen zellulären Schädigungen bewirken wiederum eine weitere Erhöhung des oxidativen Stresses durch Bildung weiterer ROS, die abermals neue Schäden verursachen, es setzt ein Teufelskreis ein. Schlussendlich führt dies zum Zelltod, falls die Zelle den Stress nicht überwinden kann [59–61].

Interaktionen der Nanopartikel mit Rezeptoren der Zelloberfläche aktivieren intrazelluläre Signalkaskaden, aus diesen die Produktion Sauerstoffradikaler resultiert [61].

Nach erfolgreicher Internalisierung können die nanoskaligen Vehikel in den Mitochondrien agglomerieren. In der Folge sind Schädigungen der Mitochondrienmembran sowie ein Funktionsverlust der Atmungskette möglich, die in einer ROS-Bildung enden. Infolge einer mitochondrialen Depolarisation können apoptotische Signalwege aktiviert werden [60, 61].

Weiterhin kann es zu Wechselwirkungen mit zytoplasmatischen Enzymen kommen, die das zelluläre Redoxpotential aufrechterhalten. Aufgrund von Veränderungen bzw. Beeinträchtigungen dieser Enzyme, wie beispielsweise antioxidativen Enzymen und NADPH, entstehen vermehrt OS und somit auch reaktive Sauerstoffspezies [61].

In Lysosomen aufgenommene nanopartikuläre Träger können deren Membranen zerstören. Infolge einer erhöhten Permeabilität der Lysosomenmembran (LMP),

gelangen Verdauungsenzyme ins Zytosol und können hier massive zelluläre Schäden verursachen. Hieraus resultiert wiederum eine vermehrte ROS-Produktion [61]. Darüber hinaus kann die Anwesenheit von Nanopartikeln hohe intrazelluläre Calcium-Konzentrationen verursachen, woraufhin eine LMP folgen kann. Weiterhin sind mit einer Störung der Homöostase bezüglich des Calciumhaushalts ein metabolisches und energetisches Ungleichgewicht sowie zelluläre Dysfunktionen verbunden [56, 28, 61].

Der Abbau der Nanopartikel bzw. ihrer Beschichtung in Lysosomen kann direkt wie auch indirekt eine erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies auslösen, aber auch weitere zytotoxische Wirkungen nach sich ziehen. Während der Zerlegung eisenhaltiger Nanopartikel wird beispielsweise Eisen freigesetzt, der zytoplasmatische Eisenspiegel und folglich die Bildung freier Radikale werden erhöht. Daneben können die durch den Abbau freiwerdenden Ionen verschiedene Zellkomponenten erreichen und Beeinträchtigungen bis hin zu Zellkernschäden verursachen [28, 59, 61].

Metallbasierte bzw. Metalloxid-Nanopartikel können intrazellulär redoxaktive Metallionen (z.B. Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) freisetzen, die daraufhin über Fenton-ähnliche Reaktionen freie Radikale erzeugen. Zusätzlich können solche Nanopartikel aufgrund ihrer chemischen Reaktivität zelluläre Makromoleküle wie Proteine, Lipide und DNA oxidativ spalten [56, 59, 61].

Neben der Erzeugung von oxidativem Stress kann eine Agglomeration von Nanopartikeln die Freisetzung inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie z.B. $\text{TNF-}\alpha$ und Interleukinen, aktivieren und folglich eine Entzündungsreaktion auslösen. Dieser Umstand begründet die detaillierte Betrachtung und Bewertung der Entzündungsmarker $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ und IL6 während der Sicherheitsbewertung der NP. Nanopartikel zeigen somit eine immunmodulatorische Wirkung, da der Körper versucht, die Fremdpartikel zu entfernen. Infolgedessen entstehen große Infiltrate bestehend aus einer Vielzahl an Entzündungszellen [57, 28, 59]. Am Auge lässt sich dies zumeist im Glaskörper wie auch in der Netzhaut beobachten. Schwere Entzündungen können möglicherweise Netzhautdegenerationen nach sich ziehen [57]. Verbleiben nanopartikuläre Vehikel in Zellen, führt dies nicht

selten zu chronischen Entzündungen, die mit Gewebe- bzw. interstitiellen Fibrosen einhergehen [28, 59].

4.1.3 Unbedenklichkeit der getesteten U4T-NP

Die Sicherheitsbewertung der in dieser Arbeit getesteten NP (U4T-NP, U4T-Kan-NP) ergab eine Unbedenklichkeit in Bezug auf ihre Bioverträglichkeit. In keiner der durchgeführten Studien konnte eine zytotoxische Wirkung festgestellt werden. Es zeigten sich keine Veränderungen bzgl. der Zellviabilität bzw. der vorhandenen Zellzahl. Weiterhin konnte keine erhöhte Apoptoseinduktion beobachtet werden. Die Veränderungen im Vergleich zu der Kontrolllösung sind zu vernachlässigen. Die Messwerte beliefen sich allesamt in einem vorher eng gelegten Toleranzbereich von +/-20%. Laut der Verordnung für das Inverkehrbringen von Medizinprodukten (DIN ISO 10993-5) wird eine Abnahme der Lebensfähigkeit sowie der vorhandenen Zellmenge erst über 30% als zytotoxisch angesehen. Ebenso verhält es sich mit einer Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen, die erst ab einem Wert ab 30% als toxisch zu werten ist. Somit zeigt sich, dass die in 4.1.2 beschriebenen zytotoxischen Prozesse anderer NP nicht auf die in dieser Arbeit getesteten DNA-NP zutreffen. Ebenso ergab die Auswertung der Genexpression bestimmter inflammatorischer Marker keinen Anhalt auf eine mögliche toxische Wirkung der getesteten NP. Es konnte keine als kritisch zu beurteilende Hochregulierung inflammatorischer Gene festgestellt werden. Eine Induktion entzündlicher Prozesse, welche bei einer Agglomeration anderer NP zu verzeichnen ist, konnte für die in dieser Arbeit verwendeten NP ausgeschlossen werden. Des Weiteren führten diese im lebenden Organismus (Ratte) ebenfalls zu keiner apoptoseinduzierten Veränderung der Zellen. Die Biokompatibilität der U4T-NP lässt sich zurückführen auf den Grundbaustein der NP, der DNA. Da es sich um ein körpereigenes Molekül handelt, besteht keine Zytotoxizität und die Möglichkeit

des biologischen Abbaus, wodurch eine Agglomeration, die zu inflammatorischen Prozessen führen könnte, verhindert wird.

Freie oder sogenannte extrazelluläre DNA (exDNA) kann zellschädigende Auswirkungen haben, welche eine Vielzahl von pathologischen Prozessen zur Folge haben können [62]. Studien, welche an Mäusen durchgeführt wurden, zeigen, dass freie DNA mitunter in das Genom der Wirtszellen eingebaut wurde. Diese genomische Integration der DNA führte zu DNA-Strangbrüchen und induzierte schlussendlich den programmierten Zelltod [62, 63]. Des Weiteren können Veränderungen an Chromosomen und Mutationen des Karyotypen entstehen, indem exDNA in gesunde Körperzellen integrieren [63]. Im Extremfall führen diese zum Zelltod oder wirken kanzerogen [62, 63]. Extrazelluläre DNA kann zudem als körperfremd erkannt werden. Die Immunerkennung von Nukleinsäuren basiert unter anderem auf den Aspekten Struktur und Lokalisation [64, 65]. Neben bestimmten strukturellen Komponenten, wie beispielsweise das in Bakterienwänden vorkommende LPS [64], welches daher in der Versuchsreihe als Positivkontrolle diente, wird die Lokalisation im extrazellulären Raum als untypisch charakterisiert. Spezifische Rezeptoren des angeborenen Immunsystems können so exDNA als sogenannte DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) identifizieren. DAMPs sind verschiedene Moleküle, die von beschädigten Zellen sezerniert werden [65]. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung einer nicht-infektiösen Entzündungsreaktion. [64, 65]

4.2 Verwendung von Zelllinien und Primärzellen

Für die Zellkulturstudien wurden die okularen Zelllinien RGC-5, ARPE19 und 661W verwendet. Hierbei handelt es sich um etablierte immortalisierte Zelllinien [35, 39], somit ist eine unbegrenzte Teilbarkeit der Zellen möglich [44]. *In vitro*-Zytotoxizitätstests mit solchen Zelllinien bieten sowohl schnell und effektiv wie auch kostengünstig Ergebnisse [66, 67]. Weitere Vorteile permanenter Zelllinien bestehen in dem grenzenlosen und gleichwertigen Vorrat dieser Zellen, die über

Zellbanken bezogen werden können [68]. Dies führt zu einer guten Reproduzierbarkeit sowie Vergleichbarkeit der Experimente [66, 67]. Die Zelllinien sind etabliert, gut charakterisiert und vielfach zu Forschungszwecken verwendet worden. Daher existieren bereits weit über 100 Publikationen mit diesen Zelllinien [69, 70]. Die Handhabung permanenter Zelllinien gestaltet sich zudem einfacher und preiswerter gegenüber primären Zellkulturen [66]. Durch die Verwendung humaner Zelllinien, wie der ARPE19-Zelllinie, lässt sich das Problem der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen lösen [71, 67, 71].

Im Jahr 2001 wurde die RGC-5-Zelllinie durch Krishnamoorthy et al. etabliert. Hierzu wurden retinale Ganglienzellen postnataler Ratten isoliert und mit dem Ψ 2E1A-Virus transformiert [35]. Entgegen der ursprünglichen Charakterisierung konnten jüngsten Erkenntnissen zufolge keine ganglienspezifischen Merkmale nachgewiesen, sondern lediglich das Vorhandensein neuronaler Marker eindeutig belegt werden. Somit wird vermutet, dass es sich um neuronale Vorläufer- bzw. Photorezeptorzellen handelt. Zudem sollen die Zellen von Mäuseretina abstammen. Eine Kreuzkontamination mit der 661W-Zelllinie wird angenommen [36, 37]. Trotz der unklaren Herkunft kann diese okuläre Zelllinie noch eingeschränkt für Toxizitätsprüfungen verwendet werden [38].

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um retinale Zellen. Grund hierfür ist, dass momentan keine ausreichend entwickelten permanenten Zelllinien der Kornea zur Verfügung stehen. Zwar wurden in der Vergangenheit einige Versuche unternommen, korneale Zelllinien zu etablieren, wie beispielsweise im Jahre 1993 von Kahn et al. oder von Araki-Sasaki et al. 1995 [72, 73]. Dennoch scheiterten diese Versuche. Derzeit sind keine etablierten kornealen Zelllinien über Zellbanken erhältlich.

Die gewonnenen Ergebnisse der *in vitro*-Studien an Zelllinien wurden an humanen primären Korneaepithelzellen bestätigt. Trotz der Annehmlichkeiten, die das Arbeiten mit permanenten Zelllinien bietet, ist der Einsatz primärer Epithelzellen sinnvoll, da die Zellen weniger verändert sind und sie folglich vergleichbarere Eigenschaften wie *in vivo* besitzen. Somit ist dieses Verfahren

als biologisch relevanter zu bewerten [69]. Weiterhin war es so möglich die Studien am gewünschten Gewebe, der Kornea, durchzuführen.

4.3 Studiendesign

Begonnen wurde die Toxizitätsprüfung mit *in vitro*-Untersuchungen. Neben ethischen Gründen bieten *in vitro*-Verfahren noch weitere Vorteile gegenüber Tierversuchen. Ergebnisse können schneller und günstiger erzielt werden, da beispielsweise wesentlich kleinere Volumina der Testsubstanz benötigt werden. Ebenso ist es möglich, neben tierischen auch humane Zellen zu kultivieren bzw. Gewebe zu nutzen, wodurch das Problem der Übertragbarkeit gänzlich vermieden werden kann. Des Weiteren birgt die Reproduzierbarkeit der Experimente ein Benefit [71, 66, 71].

Als zellbasierte Testsysteme wurden drei verschiedene Nachweisverfahren angewandt: der MTS-Viabilitätstest, die Kristall-Violett-Färbung und der Caspase 3/7 Aktivitätstest. Somit wurden sowohl permanente okuläre Zelllinien wie auch okuläre Primärzellen auf die drei Parameter Zellviabilität, Zellmenge und Apoptoseinduktion hin untersucht. Es ist sinnvoll, verschiedene Methoden anzuwenden, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten [74]. Die ausgewählten Verfahren unterscheiden sich zum einen in ihrer Komplexität, zum anderen ergänzen sie sich hinsichtlich der zu untersuchenden Komponenten. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die NP einen direkten schädigenden Einfluss auf okuläre Zellen haben, indem der Anteil vitaler Zellen bzw. die Menge apoptotischer Zellen gemessen wurde.

Weiterhin wurde eine quantitative realtime-PCR durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht die Detektion inflammatorischer Marker. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass durch die verabreichten NP keine Schäden an den untersuchten Zellen verursacht wurden. Zellschäden bewirken eine Änderung des Genexpressionsmusters. Verschiedene Gene wie der Toll-like-Rezeptor 3

(TLR3), Interleukin 1 β (IL1 β), Interleukin 6 (IL6) sowie der Tumornekrosefaktor α (TNF α) werden in den Zellen hochreguliert und stellen folglich einen Marker für entzündliche Prozesse bzw. geschädigte Zellen dar [75], welche mittels einer quantitativen realtime-PCR detektiert werden können. Typischerweise werden die gewählten Entzündungsmarker durch Aktivierung des Immunsystems ausgeschüttet. Dies geschieht beispielsweise durch LPS, welches in Bakterien vorkommt [64], und sich somit exzellent als Positivkontrolle der Versuchsreihe eignet. Ebenso kann eine Agglomeration von NP in Geweben eine erhöhte Genexpression induzieren [57, 59].

Die untersuchten Marker sind Bestandteil der unspezifischen bzw. angeborenen Immunabwehr. Pathogene werden bereits beim erstmaligen Kontakt erkannt und lösen unmittelbar eine Immunreaktion aus. IL1 β , IL-6 und TNF α zählen zu den humoralen Elementen und wirken proinflammatorisch [64, 65]. Der intrazellulär lokalisierte TLR3 dient der Immunerkennung von Nukleinsäuren [76].

Durch *in vitro*-Untersuchungen kann die Anzahl an Tierversuchen deutlich verringert werden, dennoch kann nicht vollständig auf diese verzichtet werden, da die Komplexität des Körpers und darin ablaufenden Prozesse nicht gänzlich in alternativen Testverfahren dargestellt werden können und folglich nicht alle Wirkungen der zu untersuchenden Substanz geprüft werden können. Isolierte Zellen in Kultur reagieren anders als Zellen, die sich in einem Gewebeverband innerhalb des Organismus befinden. Die gewonnenen Daten aus Tierversuchen hinsichtlich potentiell toxischer Effekte lassen sich mit einer relativ hohen Übereinstimmung von 70% auf den Menschen übertragen [77]. Nachdem eine Toxizität der NP *in vitro* ausgeschlossen werden konnte, wurden diesbezüglich *in vivo*-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden Ratten die NP in Form von Augentropfen verabreicht und anschließend das Gewebe mithilfe einer TUNEL-Färbung untersucht. Mittels dieser Testform wurde ausgeschlossen, dass die NP eine zytotoxische Wirkung auf das Auge haben, indem keine apoptotischen, d.h. durch die NP geschädigte Zellen, detektiert wurden.

4.4 Ausblick

Eine gute Biokompatibilität der DNA-NP konnte in ersten *in-vitro* und *in-vivo*-Studien bestätigt werden, welche zu der exploratorischen Phase der Arzneimittelentwicklung zählen. Weitere Tests diesbezüglich sind dennoch notwendig, um eine potenziell zytotoxische Wirkung gänzlich auszuschließen. Denkbar ist die Überprüfung lokaler Unverträglichkeiten an höheren Spezies, die dem Menschen ähnlicher sind. Weiterhin muss eine Sicherheitsbewertung bzgl. systemischer Bioverträglichkeit durchgeführt werden. Somit kann mittels *in vivo*-Versuchen untersucht werden, wie sich die NP im gesamten Organismus verhalten. Die Wirkung auf den komplexen Körper und darin ablaufenden Prozessen muss entschlüsselt werden (Pharmakodynamik). Es gilt herauszufinden, inwieweit die NP sich im Körper verteilen und evtl. in Organen oder Geweben agglomerieren. Hierzu können einzelne Organe und Gewebe entnommen und histologisch sowie auf ihre regelrechte Funktion hin untersucht werden. Des Weiteren kann eine Überprüfung der Körperflüssigkeiten, z.B. des Blutes, erfolgen.

Wird auch in nachfolgenden Studien eine Unbedenklichkeit der DNA-NP bestätigt, ist es erforderlich, diese in ausführlichen gesetzlich vorgeschriebenen präklinischen Studien zu testen, bevor die klinische Phase am Menschen erfolgen kann. Hierzu sind unter anderem Studien in Bezug auf Reproduktionstoxizität, Gentoxizität und Karzigenität (DIN EN ISO 10993) unabdingbar [78–80].

Zukünftig ist es denkbar, die Anwendung der neu entwickelten U4T-NP auf weitere Einsatzgebiete der ophthalmologischen Arzneimittelverabreichung auszudehnen. Die Option einer adaptiven Bindung der NP mit einem Wirkstoff ermöglicht die Anwendbarkeit für nahezu jedes gewünschte Medikament, da ein passendes Aptamer synthetisiert werden kann. Interessant sind diese nanopartikulären Wirkstoffträgersysteme insbesondere für Erkrankungen des posterioren Segments. Die Arzneimittelverabreichung an den hinteren Augenabschnitt gestaltet sich erheblich schwieriger als an den Vorderabschnitt.

Der Bedarf eines effizienten Trägersystems ist enorm, betrachtet man die Zahl der therapiebedürftigen Erkrankungen, wie etwa das Glaukom, die altersbedingte Makuladegeneration oder die diabetische Retinopathie. So konnten die Lipid-DNA-NP (U4T) bereits erfolgreich mit den in der Glaukom-Therapie häufig eingesetzten Medikamenten Travopost und Brimonidin beladen und getestet werden. Erste Studien hierzu zeigten neben einer lang andauernden Haftung, eine verbesserte Wirksamkeit. Eine hervorragende Biokompatibilität konnte ebenfalls bestätigt werden [81, 82].

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Sicherheitsbewertung von Lipid-DNA-Nanopartikeln für die Verabreichung von okularen Arzneimitteln durchgeführt. Diese NP wurden neu entwickelt, um als Medikamententrägersystem zur Behandlung von Erkrankungen des vorderen Augensegments zu fungieren. Es sollte gezeigt werden, dass von ihnen keine Risiken bzgl. einer zytotoxischen Wirkung ausgehen. Anhand verschiedener *in vitro*-Studien wurden die NP auf die Parameter Zellviabilität, Zellmenge und Apoptose-Induktion hin untersucht. Weiterhin wurde ihr Einfluss auf das Genexpressionsmuster verschiedener inflammatorischer Marker (TLR3, IL1 β , IL6, TNF α) bewertet. Abschließend wurde *in vivo* ihre Wirkung auf das Apoptoseverhalten kornealer Zellen getestet.

Des Weiteren wurde das in der Augenheilkunde zur Therapie bakterieller Infektionen eingesetzte Antibiotikum Kanamycin über ein Aptamer an die NP gebunden. Durch diese adaptive Bindung kommt es zu Veränderung der Struktur der NP. Aufgrund dessen war es notwendig, die beladenen NP ebenfalls auf eine mögliche von ihnen ausgehende toxische Wirkung hin zu überprüfen.

Es konnte sowohl für die reinen NP wie auch für die mit Kanamycin beladenen NP eine sehr gute Bioverträglichkeit bestätigt werden. Zellviabilität und Zellmenge waren unter Verwendung der NP unverändert. Eine Steigerung der Apoptoserate aufgrund der NP konnte nicht festgestellt werden. Eine NP-induzierte Hochregulierung inflammatorischer Gene wurde nicht nachgewiesen. Im lebenden Organismus wirkten sich die NP nicht negativ auf die Zellen aus, es konnten keine apoptotischen Zellen detektiert werden.

Folglich sind die neu entwickelten Lipid-DNA-NP in reiner wie auch mit Kanamycin beladener Form als hoch biokompatibel zu bewerten. Der Ausschluss einer potenziellen Toxizität ermöglicht es, weiterführende Studien auf diesem Gebiet durchzuführen.

III Literaturverzeichnis

1. Sachsenweger M, Klauß V. Augenheilkunde. 2., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2003. (Duale Reihe).
2. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009.
3. Grehn F. Augenheilkunde. 30., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2008. (Springer-Lehrbuch).
4. Aumüller G. Anatomie: 208 Tabellen; [mit CD-ROM zum Präp-Kurs]. Stuttgart: Thieme; 2007. (Duale Reihe).
5. Lang GK, Gareis O, Lang GE. Augenheilkunde. 4., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2008.
6. Lang GK, Esser J. Augenheilkunde. 5., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2014.
7. Mantelli F, Argüeso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2008; 8(5):477–83.
8. Sanchez-Lopez E, Espina M, Doktorovova S, Souto EB, Garcia ML. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): Overcoming the anatomical and physiological barriers of the eye - Part I - Barriers and determining factors in ocular delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 2017; 110:70–5.
9. Rachwalik D, Pleyer U. Bakterielle Keratitis. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2015; 232(06):738–44.
10. Pleyer U. Entzündliche Augenerkrankungen. s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
11. Shah A, Sachdev A, Coggon D, Hossain P. Geographic variations in microbial keratitis: an analysis of the peer-reviewed literature. *The British journal of ophthalmology* 2011; 95(6):762–7.
12. Passos RM, Cariello AJ, Yu MCZ, Höfling-Lima AL. Microbial keratitis in the elderly: a 32-year review. *Arquivos brasileiros de oftalmologia* 2010; 73(4):315–9.
13. Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft. Leitlinie Nr. 13: Keratitis [cited 2016 Okt 29]. Available from: URL: <http://www.dog.org/wp-content/uploads/2009/09/Leitlinie-Nr.-13-Keratitis.pdf>.
14. Short BG. Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. *Toxicologic pathology* 2008; 36(1):49–62.
15. Yellepeddi VK, Palakurthi S. Recent Advances in Topical Ocular Drug Delivery. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics: the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2016; 32(2):67–82.

16. Del Amo EM, Urtti A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. *Drug discovery today* 2008; 13(3-4):135–43.
17. Gaudana R, Jwala J, Boddu SHS, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharmaceutical research* 2009; 26(5):1197–216.
18. Mantelli F, Tranchina L, Lambiase A, Bonini S. Ocular surface damage by ophthalmic compounds. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2011; 11(5):464–70.
19. Baudouin C. Allergic reaction to topical eyedrops. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2005; 5(5):459–63.
20. Becquet F, Goldschild M, Moldovan MS, Ettaiche M, Gastaud P, Baudouin C. Histopathological effects of topical ophthalmic preservatives on rat corneoconjunctival surface. *Current eye research* 1998; 17(4):419–25.
21. Baudouin C, Labbe A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Progress in retinal and eye research* 2010; 29(4):312–34.
22. Ono SJ, Abelson MB. Allergic conjunctivitis: Update on pathophysiology and prospects for future treatment. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2005; 115(1):118–22.
23. Liu S, Jones L, Gu FX. Nanomaterials for ocular drug delivery. *Macromolecular bioscience* 2012; 12(5):608–20.
24. Cholkar K, Patel SP, Vadlapudi AD, Mitra AK. Novel strategies for anterior segment ocular drug delivery. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics: the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2013; 29(2):106–23.
25. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug discovery today* 2008; 13(3-4):144–51.
26. Patel A, Cholkar K, Agrahari V, Mitra AK. Ocular drug delivery systems: An overview. *World journal of pharmacology* 2013; 2(2):47–64.
27. Rawas-Qalaji M, Williams C-A. Advances in ocular drug delivery. *Current eye research* 2012; 37(5):345–56.
28. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological reports: PR* 2012; 64(5):1020–37.
29. Yusifov TN, Abduragimov AR, Narsinh K, Gasymov OK, Glasgow BJ. Tear lipocalin is the major endonuclease in tears. *Molecular vision* 2008; 14:180–8.
30. Herrmann, Andreas, DeVries, Jan Willem, Spitzer MS, Schnichels SO, inventors. Means and methods for ocular drug delivery.
31. Anaya M, Kwak M, Musser AJ, Müllen K, Herrmann A. Tunable hydrophobicity in DNA micelles: Design, synthesis, and characterization of a new family of DNA amphiphiles. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 2010; 16(43):12852–9.

32. deVries JW, Schnichels S, Hurst J, Strudel L, Gruszka A, Kwak M et al. DNA nanoparticles for ophthalmic drug delivery. *Biomaterials* 2018; 157:98–106.
33. Schnichels S, Vries JW de, Strudel L, Kwak M, Hofmann J, Bartz-Schmidt K-U et al. DNA-based nanoparticles as potential drug carriers for the treatment of anterior segment diseases. *Investigative ophthalmology & visual science* [cited 2019 Nov 24]; April 2014(Vol.55). Available from: URL: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2270215&resultClick=1>.
34. Spitzer MS, Schnichels S, Strudel L, Hofmann J, Bartz-Schmidt K-U, Hermann A et al. Enhanced antibiotic delivery through DNA-based nanoparticles. *Investigative ophthalmology & visual science* [cited 2019 Nov 24]; April 2014(Vol.55). Available from: URL: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2267477>.
35. Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, Vopat K, Lambert W, Sheedlo HJ et al. Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Brain research. Molecular brain research* 2001; 86(1-2):1–12.
36. van Bergen NJ, Wood JPM, Chidlow G, Trounce IA, Casson RJ, Ju W-K et al. Recharacterization of the RGC-5 retinal ganglion cell line. *Investigative ophthalmology & visual science* 2009; 50(9):4267–72.
37. Krishnamoorthy RR, Clark AF, Daudt D, Vishwanatha JK, Yorio T. A forensic path to RGC-5 cell line identification: lessons learned. *Investigative ophthalmology & visual science* 2013; 54(8):5712–9.
38. Yeung CK, Chan KP, Chiang SWY, Pang CP, Lam DSC. The toxic and stress responses of cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) and human glial cells (SVG) in the presence of triamcinolone. *Investigative ophthalmology & visual science* 2003; 44(12):5293–300.
39. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental eye research* 1996; 62(2):155–69.
40. al-Ubaidi MR, Font RL, Quiambao AB, Keener MJ, Liou GI, Overbeek PA et al. Bilateral retinal and brain tumors in transgenic mice expressing simian virus 40 large T antigen under control of the human interphotoreceptor retinoid-binding protein promoter. *The Journal of cell biology* 1992; 119(6):1681–7.
41. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* 1990; 249(4968):505–10.
42. Promega. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay [cited 2019 Mai 8]. Available from: URL: <https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20one%20solution%20cell%20proliferation%20assay%20system%20protocol.pdf>.
43. Promega. Caspase-Glo 3/7 Assay [cited 2019 Mai 8]. Available from: URL: <http://www.promega.de/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/caspase-glo%203%207%20assay%20protocol.pdf>.

44. Schmitz S. Der Experimentator: Zellkultur. Heidelberg: Elsevier Spektrum Akad. Verl.; 2007. (Der Experimentator).
45. Hug H. Apoptose: Die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biologie in unserer Zeit* 2000; 30(3):128–35.
46. Gurtu V, Kain SR, Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Analytical biochemistry* 1997; 251(1):98–102.
47. BIO RAD. PCR (Polymerase Chain Reaction) [cited 2019 Jun 13]. Available from: URL: <http://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/pcr-polymerase-chain-reaction#1>.
48. Mülhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. 6. Auflage. Heidelberg, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; Springer; 2009. (Experimentator).
49. BIO RAD. Real-Time PCR: Applications Guide [cited 2019 Jun 13]. Available from: URL: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf.
50. Adam D, Doerr HW, Link H, Lode H. Die Infektiologie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2004. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-18577-9>.
51. Alberts B, Schäfer U, Häcker B, editors. Molekularbiologie der Zelle. 5. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH; 2011.
52. Koolman J, Röhm K-H. Taschenatlas Biochemie des Menschen. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009.
53. Miernikiewicz P, Klopot A, Soluch R, Szkuta P, Keska W, Hodyra-Stefaniak K et al. T4 Phage Tail Adhesin Gp12 Counteracts LPS-Induced Inflammation In Vivo. *Frontiers in microbiology* 2016; 7:1112.
54. Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2011; 682:3–13.
55. Roche. In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein [cited 2019 Mai 21]. Available from: URL: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11684795910bul.pdf>.
56. Huang Y-W, Cambre M, Lee H-J. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *International journal of molecular sciences* 2017; 18(12).
57. Prow TW. Toxicity of nanomaterials to the eye. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 2010; 2(4):317–33.
58. Amini SM, Gilaki M, Karchani M. Safety of nanotechnology in food industries. *Electronic physician* 2014; 6(4):962–8.
59. Zoroddu MA, Medici S, Ledda A, Nurchi VM, Lachowicz JI, Peana M. Toxicity of nanoparticles. *Current medicinal chemistry* 2014; 21(33):3837–53.
60. Austin LA, Ahmad S, Kang B, Rommel KR, Mahmoud M, Peek ME et al. Cytotoxic effects of cytoplasmic-targeted and nuclear-targeted gold and silver

nanoparticles in HSC-3 cells--a mechanistic study. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 2015; 29(4):694–705.

61. Feng X, Chen A, Zhang Y, Wang J, Shao L, Wei L. Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles. *International journal of nanomedicine* 2015; 10:4321–40.

62. Mitra I, Khare NK, Raghuram GV, Chaubal R, Khambatti F, Gupta D et al. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *Journal of biosciences* 2015; 40(1):91–111.

63. Basak R, Nair NK, Mitra I. Evidence for cell-free nucleic acids as continuously arising endogenous DNA mutagens. *Mutation research* 2016; 793-794:15–21.

64. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Critical reviews in immunology* 2011; 31(5):379–446.

65. Fernández-Domínguez IJ, Manzo-Merino J, Taja-Chayeb L, Dueñas-González A, Pérez-Cárdenas E, Trejo-Becerril C. The role of extracellular DNA (exDNA) in cellular processes. *Cancer biology & therapy* 2021; 22(4):267–78.

66. Freshney RI. *Tierische zellkulturen: Ein methoden-handbuch*. Berlin, Germany: Walter de Gruyter & Co; 1990.

67. Hahne M, Zorn-Kruppa M, Guzman G, Brandner JM, Haltner-Ukomado E, Watzig H et al. Prevalidation of a human cornea construct as an alternative to animal corneas for in vitro drug absorption studies. *Journal of pharmaceutical sciences* 2012; 101(8):2976–88.

68. Alge CS, Hauck SM, Priglinger SG, Kampik A, Ueffing M. Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *Journal of proteome research* 2006; 5(4):862–78.

69. Clark A, Tamm ER, Al-Ubaidi MR, Hollyfield JG. On the use of immortalized ocular cell lines in vision research: the unfortunate story of RGC-5. *Experimental eye research* 2013; 116:433.

70. Wood JPM, Chidlow G, Tran T, Crowston JG, Casson RJ. A comparison of differentiation protocols for RGC-5 cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 2010; 51(7):3774–83.

71. Marquardt H, Schäfer SG, editors. *Lehrbuch der Toxikologie*. Mannheim: BI-Wiss.-Verl.; 1994.

72. Kahn CR, Young E, Lee IH, Rhim JS. Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: In vitro model for ocular studies. *Investigative ophthalmology & visual science* 1993; 34(12):3429–41.

73. Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y et al. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Investigative ophthalmology & visual science* 1995; 36(3):614–21.

74. Schultz S, Niles A, Greene J, Banks P. Gleichzeitige Bestimmung von Zellvitalität, Zytotoxizität und Apoptose. *BIOspektrum* 2009; (06/2009):668–9.

75. Janeway CA. Immunobiology: The immune system in health and disease ; [animated CD-ROM inside]. 5. ed. New York, NY: Garland Publ; 2001.
76. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *International immunopharmacology* 2018; 59:391–412.
77. Greaves P, Williams A, Eve M. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nature reviews. Drug discovery* 2004; 3(3):226–36.
78. AMG - nichtamtliches Inhaltsverzeichnis; 2016 [cited 2020 Mrz 21]. Available from: URL: http://www.gesetze-im-internet.de/amg_1976/index.html.
79. Graefe K-H, Lutz W, Bönisch H. *Pharmakologie und Toxikologie: 201 Tabellen*. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2011. (Duale Reihe).
80. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S. *Pharmakologie und Toxikologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
81. Schnichels S, Hurst J, Vries JW de, Ullah S, Gruszka A, Kwak M et al. Self-assembled DNA nanoparticles loaded with travoprost for glaucoma-treatment. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* 2020; 29:102260.
82. Schnichels S, Hurst J, Vries JW de, Ullah S, Frößl K, Gruszka A et al. Improved Treatment Options for Glaucoma with Brimonidine-Loaded Lipid DNA Nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces* 2021; 13(8):9445–56.

Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Department für Augenheilkunde der Universitäts-Augenklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Martin S. Spitzer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Martin Spitzer, Dr. Sven Schnichels und Dr. Jan-Willem de Vries.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Sven Schnichels, Dr. José Hurst, Dr. Jan-Willem de Vries und Dipl. Ing. Johanna Wude von mir eigenständig durchgeführt. Die Tierversuche erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Sven Schnichels. Die Zellkulturversuche wurden mit Unterstützung von Dipl. Ing. Johanna Wude durchgeführt. Die quantitativen realtime-PCRs wurden von Dr. José Hurst ausgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. Sven Schnichels durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Dr. Sven Schnichels und Dr. Jan-Willem de Vries verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Frankfurt am Main, den 01.06.2023

Patricia Deißeroth