

Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik

**DNA-Nanopartikel als potentielle Medikamententräger
zur Behandlung von Vorderabschnittserkrankungen am
Auge**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Strudel, Lisa Vanessa

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. S. Spitzer

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Grundmann-Hauser

Tag der Disputation: 24.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	6
1.1 Erkrankungen des vorderen Augenabschnitts	6
1.2 Medikamentenapplikation am vorderen Augenabschnitt	8
1.2.1 Vorteile der Anwendung von Augentropfen	8
1.2.2 Nachteile der Anwendung heutzutage gängiger Augen tropfen	9
1.3 Nanopartikel	13
1.3.1 Nanopartikel - Definition	13
1.3.2 Weshalb Nanopartikel?	13
1.3.3 Nanomaterialien in der Augenheilkunde	14
1.4. DNA-Nanopartikel	17
1.4.1 Warum DNA als Trägermaterial?	18
1.4.2 Aufbau der DNA-Nanopartikel	18
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte und verwendete Software	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3 Chemikalien	23
2.1.4 Tiere/ Tiermaterial/ humanes Gewebe	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 DNA-Nanopartikel	25
2.2.3 In-vitro-Studien	26
2.2.4 In-vivo-Studien	29
2.2.5 Toxizitätsstudien	31
2.2.6 Statistische Auswertung der Zellkultur-Assays	34
2.2.7 In-vitro-Untersuchungen an humanem Gewebe	35
2.2.8 Fluorophotometerversuche zur Ex-vivo-Quantifizierung der Nanopartikel	36
2.2.9 In-vitro-Evaluation der antibiotischen Aktivität auf Schweinecornea	36
3. Ergebnisse	38
3.1 In-vitro-Studien der verschiedenen entwickelten Nanopartikel ..	38
3.2 In-vivo-Studien der verschiedenen entwickelten Nanopartikel ...	40
3.2.1 Adhäsion der NP am Corneaepithel	40

Inhaltsverzeichnis

3.2.2 Adhäsion in Abhängigkeit von der verwendeten Pufferlösung	43
3.3. Toxizitätsstudien	50
3.3.1 Zellviabilität	51
3.3.2 Zellzahl	52
3.3.3 Apoptoseinduktion	52
3.4 In-vivo-Adhäsion von an U4T-12 gekoppeltem Kanamycin	54
3.5 In-vitro-Adhäsion von an U4T-12 gekoppeltem Kanamycin an humanem Gewebe	55
3.6 Fluorophotometerversuche zur Ex-vivo-Quantifizierung der Kanamycin-Nanopartikel	55
3.7 In-vitro-Evaluation der antibiotischen Aktivität auf Schweinecornea	57
4. Diskussion der Ergebnisse	60
4.1 Kurze Adhäsionszeit gängiger Augentropfen auf der Corneaoberfläche	60
4.2 Deutlich verlängerte Adhäsion der getesteten DNA-Nanopartikel	60
4.3 Mögliche Modifikationen des Nanopartikels	61
4.4 Zeitabhängigkeit der Adhäsion	61
4.5 Verwendete Verdünnungslösung	62
4.6 Toxizitätsstudien	62
4.7 Fluorophotometerversuche	63
4.8 Vergleich zu anderen Nanopartikeln als potentielle Medikamententräger in der Augenheilkunde	63
4.8.1 Polymere Nanopartikel	63
4.8.2 Hydrogele	65
4.8.3 Liposomen	66
4.8.4 Niosomen	67
4.8.5 Dendrimere	68
4.8.6 Cyclodextrine	69
4.8.7 Zusammenfassende tabellarische Übersichtsdarstellung der verschiedenen sich in der Entwicklung befindenden Nanomaterialien	71
4.9 Mögliche weiterführende Untersuchungen	73
4.10 Weiterentwicklung als <i>drug delivery</i> Plattform	74
4.11 Beweis der erhaltenen Funktionalität von Kanamycin im Kanamycin-Nanopartikel-Medikamentenkomplex	75
4.12 Erkrankungen als Ziele	75
Zusammenfassung	77
Bibliographie	78
Erklärung zum Eigenanteil	81

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	82
Lebenslauf	83

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
661W	murine Photorezeptor-Zelllinie
Abb.	Abbildung
AT	Augentropfen
ARPE19	humane Zelllinie retinaler Pigmentepithelzellen
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CD	Cyclodextrin
CpG	Cytosin - Phosphat - Guanin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DNA	<i>deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)</i>
DNase	Desoxyribonuklease
ds DNA	<i>double stranded DNA (doppelsträngige DNA)</i>
ss DNA	<i>single stranded DNA (einzelsträngige DNA)</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDO	Einzeldosisopthiole
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde/-n
HeLa-Zellen	Zelllinie humaner epitheloider Zervixkarzinomzellen, benannt nach Henrietta Lacks
IL	Interleukin
Kan	Kanamycin
LB-Medium	<i>lysogeny broth-Medium</i>
LZ	Langzeit
M	Molar
min	Minute/-n
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MTS	Methyltetrazoliumsulfat (MTS)

Abkürzungsverzeichnis

NP/NPs	Nanopartikel/ Nanopartikel (<i>Plural</i>)
o.g.	oben genannt
PAMAM	Poly(amidoamin)
PBS(-Puffer)	Phosphatgepufferte Saline(-Puffer)
PEG	Polyethylenglykol
PLGA	Poly(lactid-co-Glycolid)
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RGC-5	okuläre Zelllinie, ursprünglich charakterisiert als retinale Ganglienzellen aus der Ratte (in Diskussion)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS(-Puffer)	Tris-gepufferte Saline(-Puffer)
TLR	Toll-like Rezeptor
U	mittels Alkylketten modifiziertes 2'-Deoxythymidin
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vs.	versus

1. Einleitung

1.1 Erkrankungen des vorderen Augenabschnitts

Erkrankungen des vorderen Augenabschnitts sind vielfältig, unterschiedlichster Genese und umfassen ein breites Patientenkollektiv. Im Folgenden wird eine Einteilung nach dem Ort vorgenommen, an dem sich die Erkrankung abspielt. Es werden beispielhaft häufige Erkrankungen genannt, jedoch kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben.

Konjunktiva

Häufig vorkommende Erkrankungen des vorderen Augenabschnitts sind Konjunktividen. Diese können von sehr unterschiedlicher Genese sein. So können sie beispielsweise bakteriell, viral, mykotisch, parasitär, allergisch oder auch mechanisch bedingt sein [1].

Episklera/Sklera

Seltener als die Konjunktividen sind Entzündungen der Episklera oder Sklera - die Episkleritis oder Skleritis. Während bei der Episkleritis seltener eine zugrunde liegende Ursache festgestellt werden kann (zu ca. 20%), kann bei einer Skleritis häufiger (zu ca. 50%) eine ursächliche Erkrankung, wie beispielsweise Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis oder auch infektiöse Erkrankungen, wie Varizella-Zoster-Virus-Infektionen, Tuberkulose oder Lues, ursächlich sein [2].

Cornea

Auch Entzündungen der Cornea sind kein seltenes Bild in der Augenheilkunde. Keratitiden können ebenfalls infektiös bedingt sein (z.B. bakteriell, mykotisch, viral). Es kann eine Assoziation mit bestimmten Risikofaktoren wie zum Beispiel Trauma, Kontaktlinsentragen, bullöse Keratopathie, Erosio, Schnittwunden oder Hornhautchirurgie vorliegen. Auch eine autoimmune Genese ist möglich [3]. Ebenfalls therapiebedürftige Vorderaugenabschnittserkrankungen sind bei-

spielsweise corneale Erosionen oder Ulcerationen, etwa nach Trauma oder Verätzung oder assoziiert mit einer Keratitis [1].

Iris/Ziliarkörper

Eine weitere Vorderabschnittserkrankung ist die anteriore Uveitis oder auch Iritis/Iridozyklitis. Auch diese kann autoimmunologisch, beispielsweise bei einem zugrunde liegenden Morbus Bechterew oder bei Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis (z.B. juvenile idiopathische Arthritis, etc.) bedingt sein. Auch eine infektiöse (z.B. Tuberkulose, Borreliose, Bartonnellose, Herpesviren, Lues) oder idiopathische Genese ist möglich [4].

Weitere Erkrankungen

Eine weitere Erkrankung, die u.a. den vorderen Augenabschnitt betrifft, jedoch noch über ihn hinaus geht, ist das Glaukom. Dieses ist im Grunde genommen eine Form der Optikusneuropathie mit charakteristischem Gesichtsfeldbefund, welche mit verschiedenen Risikofaktoren, wie unter anderem einem erhöhten Augeninnendruck, assoziiert ist. Es umfasst eine heterogene Gruppe von Erkrankungen - vom chronischen Offenwinkelglaukom bis hin zum uveitischen oder traumatischen Sekundärglaukom -, bei denen es zum Verlust von Sehnervenzellen und im Endstadium zur Erblindung kommt [4]. Die Therapie erfolgt meist über die topische Applikation von drucksenkenden Augentropfen, obwohl der Augeninnendruck mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht alleine ursächlich für die Entstehung der Erkrankung ist.

So unterschiedlich die Genese der verschiedenen Vorderabschnittserkrankungen am Auge ist, so breit ist auch das Patientenkollektiv, bei dem je nach vorliegender Erkrankung Patienten jeden Alters betroffen sein können. All diese Erkrankungen erfordern neben der Behandlung der möglicherweise zugrundeliegenden ursächlichen Grunderkrankung häufig eine Medikamentenapplikation am vorderen Augenabschnitt, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.2 Medikamentenapplikation am vorderen Augenabschnitt

Die meisten chronischen und akuten Erkrankungen des vorderen Augenabschnitts (s.1.2) werden heutzutage mittels topischer Medikamentenapplikation in Form von Augentropfen behandelt [5]. Eine meist zusätzlich angewendete ergänzende Möglichkeit der Medikamentengabe ist die subkonjunktivale Injektion. Eine weitere Form der Medikamentenapplikation sind *Cul-de-sac-Implantate* (z.B. Lacrisert® [6]). Weitere Applikationsformen, die bisher allerdings erst noch in klinischen Studien oder Tierversuchen untersucht werden, sind medikamentenfreisetzende *Punctum plugs* und Kontaktlinsen, verschiedene Formen von Implantaten (subkonjunktival/episkleral/Vorderkammer) sowie medikamentenfreisetzende Intraokularlinsen und *capsule drug rings* [5].

Mit Ausnahme der Augentropfen, der medikamentenfreisetzenden Kontaktlinsen und *Cul-de-sac-Implantate* handelt es sich bei den genannten Maßnahmen allerdings um invasive Applikationsmethoden. Bei den medikamentenfreisetzenden Kontaktlinsen und *Cul-de-sac-Implantaten* handelt es sich um Fremdkörper, welche migrieren können oder auch verloren gehen können.

Da die meisten dieser Applikationsarten sich noch in klinischen oder Tierstudien befinden und es sich größtenteils um invasive Methoden handelt, wird aktuell die große Mehrheit an Vorderabschnittserkrankungen mithilfe von Augentropfen behandelt. Daher soll im Folgenden genauer auf Vor- und Nachteile dieser Applikationsform eingegangen werden.

1.2.1 Vorteile der Anwendung von Augentropfen

Die Anwendung von Augentropfen zur Behandlung von Vorderabschnittserkrankungen bietet viele Vorteile. Die topische Applikationsform führt zu einer meist nur geringen systemischen Absorption im Vergleich zu systemisch (beispielsweise oral oder intravenös) verabreichten Medikamenten. Auch der *first-pass-Effekt* wird umgangen (der *first-pass-Effekt* bezeichnet eine präsystemische Elimination/Metabolisierung von oral und demzufolge über den Intestinaltrakt und das Pfortadersystem aufgenommenen Medikamenten in der Leber vor Erreichen des „großen Kreislaufs“ [7]). Dadurch sind verhältnismäßig geringe Medikamentendosen notwendig. Weiterhin handelt es sich um eine

nicht-invasive Applikationsmethode, welche vom Patienten relativ einfach (je nach Geschicklichkeit/Alter/Vorerkrankungen) zu applizieren ist [8].

1.2.2 Nachteile der Anwendung heutzutage gängiger Augentropfen

Trotz der o.g. Vorteile bietet die Anwendung heutzutage gängiger Augentropfen auch viele Nachteile. Vor allem ein Teilverlust des Medikaments vor Erreichen des Wirkortes sowie eine Abhängigkeit von der Patientencompliance spielen eine wichtige Rolle. Deshalb soll hierauf im Folgenden näher eingegangen werden.

Verlust an applizierter Medikamentendosis

Präcornealer Verlust

Eine große Rolle bei der Anwendung von Augentropfen spielen präcorneale Faktoren. Bereits Blinzeln führt zum Verlust an appliziertem Medikament. Ein weiteres Problem ist die hohe Erneuerungsrate des Tränenfilms (ca. $1 \mu\text{l}/\text{min}$ [8]). Die Tränenfilmerneuerungszeit beträgt ca. zwei bis drei Minuten. Dies führt dazu, dass ein Großteil der applizierten Menge innerhalb von 15-30 Sekunden wieder ausgewaschen wird und über die Tränenwege verloren geht [9].

Hinzu kommt, dass je nach Zusammensetzung des Medikaments (z.B. abhängig vom pH-Wert) eine Irritation des Auges provoziert wird, wodurch es zu einer Steigerung der Tränenproduktion kommt und die Auswaschrage noch erhöht wird. Weiterhin ist die applizierte Menge eines Augentropfens relativ groß im Vergleich zur Menge des cornealen Tränenfilms (ca. $50 \mu\text{l}$ vs. ca. $7 \mu\text{l}$). Auch dies führt dazu, dass ein Großteil direkt über die Tränenwege eliminiert wird [10]. Somit kommt es bereits präcorneal zu einem Verlust von ca. 90-99% der applizierten Medikamentenmenge [11].

Corneale Faktoren

Auch der Aufbau der Cornea mit niedriger Permeabilität trägt dazu bei, dass topisch applizierte Medikamente schlecht intraokular aufgenommen werden [11]. Die Cornea besteht aus fünf Schichten und ist an ihrer Oberfläche mit

Einleitung

einer Muzinschicht [12] bedeckt. Die oberste Schicht der Cornea bildet das lipophile Epithel, welches aus ca. fünf bis sechs Zellschichten besteht. Die Zellen sind untereinander durch *tight junctions* verbunden, welche die Permeabilität erniedrigen [5]. Anschließend folgen von außen nach innen die Bowman-Membran, das hydrophile Stroma, die Descemet-Membran und das lipophile Endothel (s. Abbildung 1) [8].

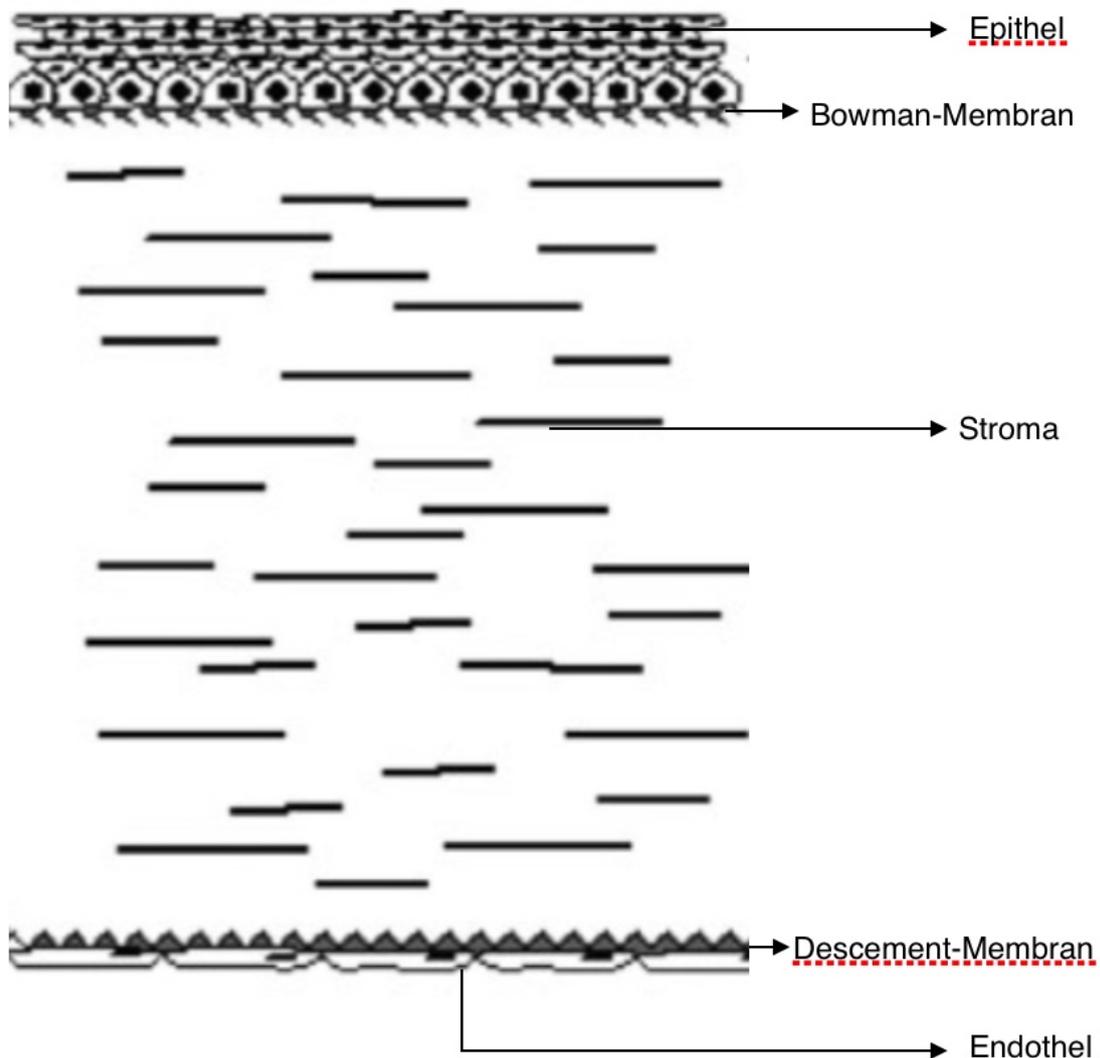


Abbildung 1: histologischer Aufbau der Cornea schematisch (modifiziert nach *Molokhia et al.* [5])

Einleitung

Das lipophile Epithel ist schlecht permeabel für hydrophile Medikamente. Das hydrophile Stroma wiederum ist schlecht durchlässig für hydrophobe Substanzen, so dass diese zwar das Epithel passieren könnten, dann aber nicht in die tieferen stromalen Schichten vordringen können [8]. Eine weitere Barriere sind transmembranöse Efflux-Pumpen (z.B. *Multidrug resistance-Related Proteine* (MRP), *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP)), welche an der Epitheloberfläche sitzen und das Eindringen des Medikaments in tiefere stromale Schichten verringern [8].

Konjunktivale Faktoren

Auch die Konjunctiva trägt zur Reduktion der applizierten Medikamentendosis bei. Histologisch kann man sie in das außen gelegene Epithel und das innen gelegene Stroma einteilen. Das Epithel ist durch *tight junctions* verbunden, welche den parazellulären Durchtritt des Medikaments erschweren. Das Stroma ist reich an Nerven, Blut- und Lymphgefäßen, wodurch Medikamente schnell wieder abtransportiert werden können [8].

Systemische Wechselwirkungen

Ein weiteres Problem bei der topischen Medikamentenapplikation stellen systemische Wechselwirkungen dar. Durch Tränendrainage in die Nase bzw. in den Magen, welche eine hohe Absorptionsrate aufweisen, kann es zu einer starken systemischen Aufnahme des Medikaments und weiterhin zu unerwünschten systemischen Nebenwirkungen bzw. in Extremfällen auch zu einer toxischen Wirkung des Medikaments bzw. zu einem anaphylaktischen Schock kommen [10, 13].

Einleitung

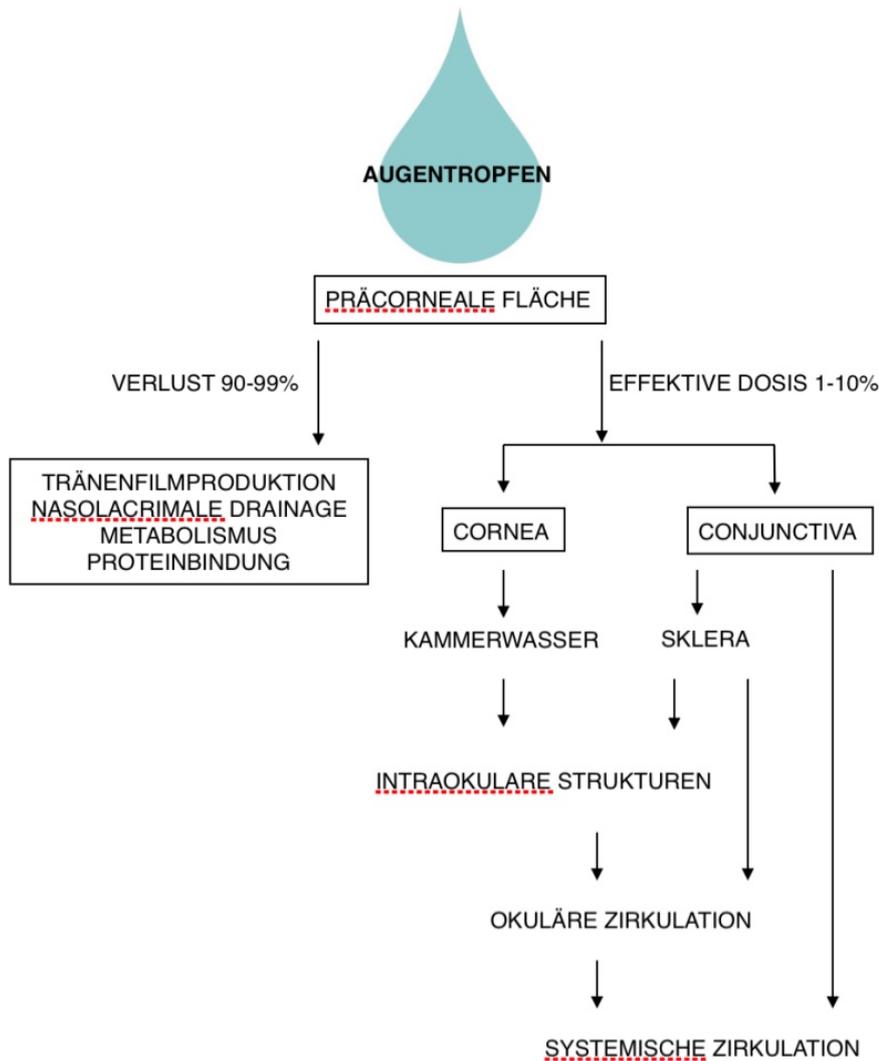


Abbildung 2: Darstellung des Weges eines Augentropfens durch das Auge. Nur ein Bruchteil der applizierten Menge gelangt an seinen Wirkort. (Diagramm modifiziert nach *Bucolo et al. [11]*)

Compliance

Eine weitere Problematik bei der Anwendung von Augentropfen ist die niedrige *Compliance*. *Compliance* bezeichnet das Verhalten eines Patienten entsprechend des vorgeschriebenen Therapieregimes in Bezug auf den Zeitpunkt der Einnahme, die Dosierung und die Einnahme- oder (bei Augentropfen) die Tropffrequenz. Sie ist somit ein Maß dafür, wie gut eine Therapie durch den Patienten eingehalten wird [14]. Diese wird durch eine hohe Anwendungsfrequenz reduziert.

Die Bedeutung der Anwendungsfrequenz zeigte sich beispielsweise bei der Anwendung von Brimonidin in der Glaukomtherapie. Hier war die tatsächliche Tropffrequenz bezogen auf die geplante Tropffrequenz (2x/Tag vs. 3x/Tag) bei den Patienten, die nur zwei Mal am Tag tropfen mussten, signifikant höher im Vergleich zu den Patienten, welche drei Mal pro Tag getropft haben ($1,44 \pm 0,4$ bei geplanter zweimaliger Anwendung entsprechend ungefähr 72% der geplanten Anwendungen vs. $1,86 \pm 0,5$ bei geplanter dreimaliger Anwendung entsprechend ungefähr 62% der geplanten Anwendungen) [15]. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass bei einer niedrigeren Anwendungsfrequenz das Therapieregime besser eingehalten wird.

Aufgrund dieser Nachteile, die mit der Anwendung heutzutage gängiger Augentropfen verbunden sind, ist man auf der Suche nach neuen Trägersystemen, welche die Halbwertszeit des Medikaments am Auge erhöhen und eine gezieltere Therapie ermöglichen. Hier sind Nanopartikel (NPs) bzw. Nanomaterialien als Trägersystem ein neuer Ansatz, weshalb im Folgenden näher darauf eingegangen werden soll.

1.3 Nanopartikel

1.3.1 Nanopartikel - Definition

Nanopartikel (von griech.: *nanos* = der Zwerg) sind Teilchen einer Partikelgröße von 1 bis 100 nm [16]. Ein Nanometer entspricht 1×10^{-9} m.

Nanopartikel können entweder spontan entstehen (beispielsweise kleinste Rußpartikel, Feinstaub) oder auch chemisch synthetisiert werden. Nanopartikel können aus verschiedenen Stoffen bestehen. Es gibt beispielsweise kohlenstoffhaltige Nanopartikel, oder auch Nanopartikel aus Metallen oder Polymeren [17] (z.B. Fullerene, Gold-Nanopartikel).

1.3.2 Weshalb Nanopartikel?

Aufgrund Ihrer geringen Größe können Nanopartikel im Vergleich zu größeren Partikeln gut über Membranen, wie beispielsweise das corneale Epithel,

diffundieren bzw. durch Endozytose aufgenommen werden. Für Gold-Nanopartikel lag die Größe des besten Uptakes bei ca. 50 nm [18] (untersucht an HeLa-Zellen, Zelllinie humaner epitheloider Zervixkarzinomzellen [19]). Ein Nachteil von Gold-Nanopartikeln ist allerdings eine mögliche Akkumulation im Körper.

Als Folge einer höheren Diffusionsrate kann im Verlauf ggf. die Konzentration des eingesetzten Medikaments verringert werden [20]. Hierdurch können ggf. konzentrationsabhängige Nebenwirkungen vermieden werden. Weiterhin ist die Oberfläche von NPs im Vergleich zum Volumen relativ groß und somit ggf. die Adhäsionszeit an die äußere Muzinschicht verlängert, was dadurch auch die Retentionszeit des applizierten Medikaments erhöht [21].

1.3.3 Nanomaterialien in der Augenheilkunde

Aktuell werden verschiedene Arten von Nanomaterialien als Medikamententräger in der Augenheilkunde entwickelt. Die meisten hiervon befinden sich noch in präklinischen Studien, einige wenige werden inzwischen in klinischen Studien getestet [21]. Im Folgenden soll genauer auf die verschiedenen Arten der Nanomaterialien eingegangen werden.

Polymere Mizellen

Hierbei handelt es sich um amphiphile Copolymere, welche einen hydrophoben Kern und eine hydrophile Hülle haben. Hydrophobe Medikamente können in den Kern eingeschlossen werden. Hierdurch ist das Medikament im hydrophilen Milieu abgeschirmt und seine Halbwertszeit z.B. in Gefäßen verlängert. Um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden, sollten biokompatible und im Körper abbaubare Polymere verwendet werden (beispielsweise Polyactid (PLA) oder Polyactid-co-Glycolid (PLGA)). Ein Problem in der Verwendung von PLGA-Copolymeren ist ihre Instabilität in wässrigem Medium, da ihre Hauptkette (Ester) einer hydrolytischen Spaltung unterliegt [21]. Daher wurden im Verlauf weitere Nanopartikel - z.B. Polyethylenglykol (PEG) - weiterverfolgt, da hier der hydrophobe Kern durch hydrophile Ketten vor Abbau geschützt wird [21].

Einleitung

Hier befinden sich mehrere entwickelte Stoffe in präklinischen Studien. Als Beispiel können hier Dexamethason enthaltende N-isopropylacrylamid (NI-PAAM)-Vinylpyrrolidon (VP)-Methacrylat (MAA) Mizellen genannt werden [22].

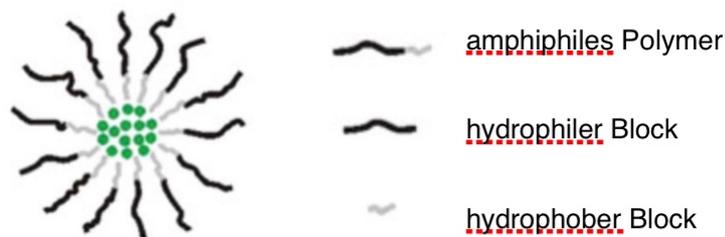


Abbildung 3: Beispielhafte vereinfachte schematische Darstellung einer polymeren Mizelle (modifiziert nach *Oerlemans et al. [23]*), mittig in grün die hydrophobe Beladung (z.B. Medikament)

Hydrogele

Hydrogele sind wasserlösliche polymere Netzwerke, welche über 20% ihres Eigengewichts an Wasser aufnehmen können, ohne dabei Ihre dreidimensionale Struktur zu verlieren [24]. Diese können mit Medikamenten beladen werden. Als Beispiel kann hier Timolol 0.1% Hydrogel genannt werden, welches im Vergleich zur wässrigen Timolol-Lösung geringere interindividuelle Schwankungen in der Kammerwasserkonzentration aufweist, während der drucksenkende Effekt einer einmaligen täglichen Gabe von Timolol 0.1% Hydrogel ähnlich einer 2-mal-täglichen Applikation der wässrigen Lösung ist [25].



Abbildung 4: Beispielhafte vereinfachte schematische Darstellung eines Hydrogels als 3D-Struktur wasserlöslicher Polymere, welche mit hydrophilen Medikamenten beladen werden können [12]

Liposomen

Hierbei handelt es sich um eine oder mehrere Lipiddoppelschichten, welche meist aus amphiphilen Phospholipiden zusammengesetzt sind. Liposomen unterscheiden sich u.a. in Ihrer Lipidzusammensetzung, Oberflächenladung und ihrer Größe. Anhand der Oberflächenladung kann die Permeabilität durch das Corneaepithel verändert werden. Positiv geladene Liposomen scheinen aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen eine bessere Interaktion mit dem negativ geladenen Corneaepithel zu zeigen [26]. Aufgrund der Amphiphilie können sie sowohl mit hydrophilen als auch lipophilen Medikamenten beladen werden [21]. Es sind beispielsweise Chitosan-behüllte Ciprofloxacin-Hydrochlorid-Liposomen entwickelt worden, welche eine höhere Aufnahme (in vivo als auch in vitro) zeigten, als wässrig gelöstes Ciprofloxacin-Hydrochlorid [27]. Probleme bereiten jedoch unter anderem eine begrenzte Langzeit-Stabilität [21], aggressive Herstellungsverfahren und Sterilisationsprobleme [26].

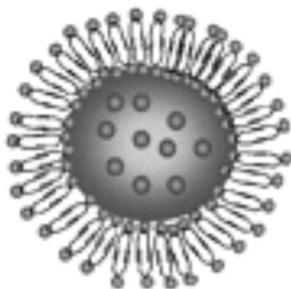


Abbildung 5: Beispielhafte vereinfachte schematische Darstellung eines Liposoms bestehend aus eine Phospholipiddoppelschicht und dem inneren hydrophilen Kern, welcher mit einem Medikament beladen werden kann, nach *Cho et al. [19]*

Niosomen

Niosomen sind eine spezielle Form der Liposomen, welche ebenfalls vesikelartige Strukturen bilden und sowohl hydrophile als auch lipophile Medikamente aufnehmen können. Sie haben gegenüber den Liposomen allerdings den Vorteil, dass ihre Struktur eine bessere Langzeit-Stabilität hat und dass ihre Toxizität aufgrund des ungeladenen Charakters geringer ausgeprägt ist [28].

Dendrimere

Dies sind stark verzweigte Makromoleküle (im Nanometerbereich), welche aufgrund Ihrer speziellen Struktur ebenfalls entweder durch Nutzung innen gelegener „Hohlräume“ oder Beladung ihrer Oberfläche funktionalisiert werden können [21]. Ein häufig als Medikamententräger verwendetes Dendrimer ist Poly(amidoamin) (PAMAM). Hier wurde beispielsweise eine Mischung aus PAMAM und Pilocarpin getestet, welche die okuläre Halbwertszeit verlängerte - wobei Pilocarpin hierbei nicht an das Dendrimer gebunden vorlag, sondern die Dendrimer-Lösung am ehesten nur die Retentionszeit verlängerte [29].



Abbildung 6: Beispielhafte vereinfachte schematische Darstellung eines Dendrimers, nach *Cho et al. [19]*

Cyclodextrine

Dies sind cyclisch aufgebaute Oligosaccharide (bestehend aus sechs bis acht Glucoseuntereinheiten), welche v.a. die Löslichkeit hydrophober Medikamente in wässrigen Lösungen verbessern kann, indem sie einen Inklusionskomplex bilden [30].

Die o.g. Nanopartikel bestehen allerdings nicht aus körpereigenen Stoffen und können somit ggf. akkumulieren.

1.4 DNA-Nanopartikel

Ein weiterer Ansatz, der von der Universität Tübingen (Department für Augenheilkunde) in Zusammenarbeit mit der Universität Groningen (Zernike institute for advanced materials) verfolgt wurde, ist die Verwendung von DNA-Nanopartikeln.

1.4.1 Warum DNA als Trägermaterial?

DNA ist ein körpereigenes Material und somit leicht abbaubar. Dies geschieht durch hydrolytische Spaltung mittels im Körper und beispielsweise auch im Tränenfilm natürlich vorkommender Desoxyribonukleasen (DNAsen) und Endonukleasen [31]. Außerdem besitzt DNA eine gute Stabilität bei Raumtemperatur. Das Schmelzen der DNA (auch Denaturierung genannt) geschieht bei um die 90°C (u.a. abhängig vom GC (Guanin-Cytosin)-Gehalt und dem pH-Wert des Lösungsmittels) [32], dadurch bleiben die Nanopartikel bei Raumtemperatur in der Augentropfenlösung stabil. Weiterhin ist DNA relativ leicht modifizierbar und somit sind Anpassungen an das jeweilige Medikament vergleichsweise leicht möglich. Hinzu kommt, dass DNA relativ kostengünstig ist.

1.4.2 Aufbau der DNA-Nanopartikel

Grundbaustein der entwickelten Nanopartikel ist ein DNA-Strang (UyT-x) bestehend aus einer bestimmten Anzahl x an Basen (Adenin=A, Thymin=T, Guanin=G, Cytosin=C), wobei x variiert werden kann. Ein bestimmte Zahl y dieser Basen sind durch einen Lipidanteil (mittels Alkylketten modifiziertes 2'-Deoxythymin=U) modifiziert, auch y ist variabel. Die DNA-Sequenz ist nicht kodierend.

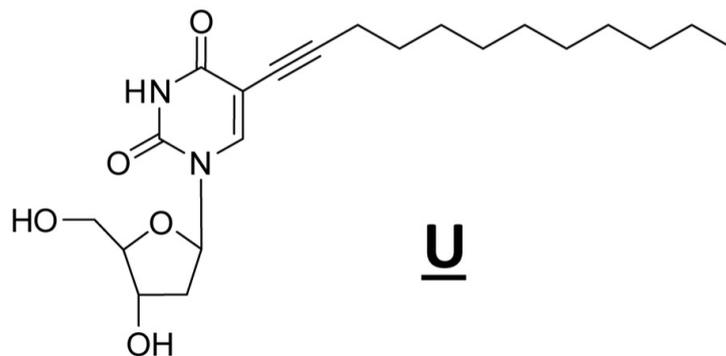


Abbildung 7: modifiziertes 2'-Deoxythymin=U

Der Aufbau der verschiedenen entwickelten Oligonukleotide ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Es werden ebenfalls weitere Modifikationen gezeigt.

Aufbau der verschiedenen Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Basen mit Lipidmodifikation U/prozentualer Anteil
U2M-12	TCC <u>UU</u> GGCGCAG	2/(17%)
U2T-12	<u>UU</u> TGGCGGATTC	2/(17%)
U4T-12	<u>UUUU</u> GCGGATTC	4/(33%)
U4T-18	<u>UUUU</u> GCGGATTC	4/(22%)
U6T-12	<u>UUUUU</u> GGATTC	6/(50%)
U6T-20	<u>UUUUUU</u> GCGGATTCGTCT- GC	6/(30%)
U12R-36	(<u>UUUU</u> GCGGATTC) ₃	12/(33%)
U20R-60	(<u>UUUU</u> GCGGATTC) ₅	20/(33%)
NoU4T	TTTTGCGGATTC	-
sscU4T	GAATCCGCAAAA	-

Tabelle 1: Sequenz und Details der verschiedenen Oligonukleotide, wobei der Name wie folgt dargestellt ist UyT-x mit y \triangleq Anzahl der alkylmodifizierten Basen und x \triangleq Anzahl der Basen insgesamt

Werden diese Oligonukleotide in ein wässriges Milieu gegeben, formen sie Mizellenförmige Nanopartikel (NPs). Hierbei zeigen die hydrophilen DNA-Stränge nach außen, während der hydrophobe alkylmodifizierte Anteil den Kern der Mizelle bildet [33].

Diese Nanopartikel können nun durch Hybridisierung mittels eines komplementären DNA-Stranges funktionalisiert werden. In den weiterführenden Versuchen enthielt der komplementäre DNA-Strang ein 5'-kovalent gebundenes Fluorophor (Atto488 oder Cy3), um die Nanopartikel visualisieren zu können (s. Abb. 8)

Einleitung

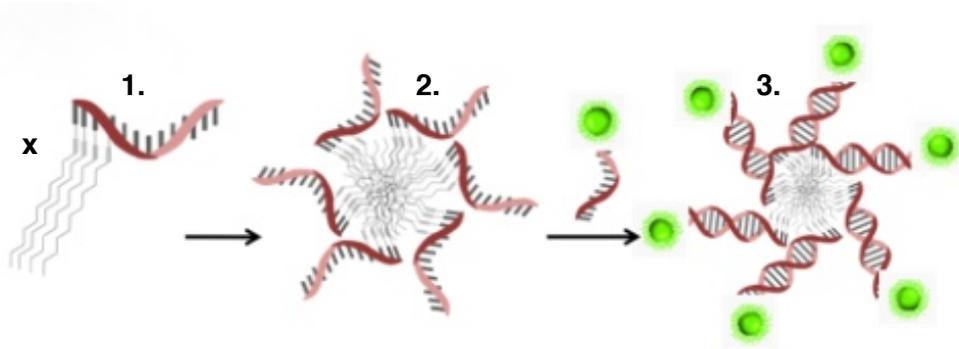


Abbildung 8: Bildung der Nanopartikel; 1. Oligonukleotid mit Alkylmodifikation x; 2. Gebildete Mizelle; 3. mittels Fluorophor (grün) an komplementärem DNA-Strang funktionalisierter Nanopartikel

Weitere Möglichkeiten der Funktionalisierung bestehen in der Beladung des Mizellenkerns sowie der Kopplung mit einem Aptamer, welches dann entsprechend beladen werden kann (s. Abb 9).

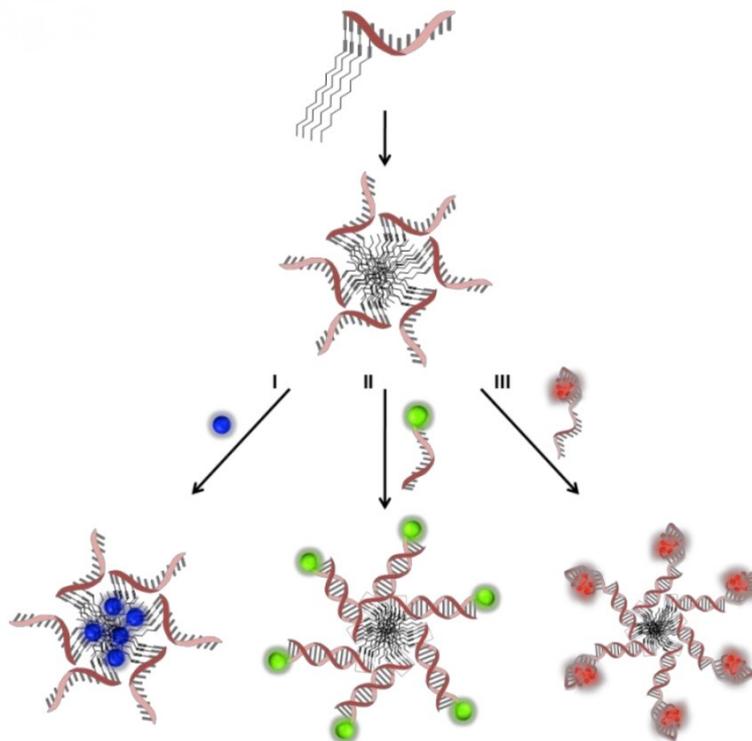


Abbildung 9: Verschiedene Möglichkeiten der Funktionalisierung des Nanopartikels:
I Beladung des Mizellenkerns
II kovalente Bindung (s. auch Abb. 8)
III aptamere Wechselwirkungen

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Wie bereits ausgeführt bestehen vielerlei Probleme bei der Medikamentenapplikation am vorderen Augenabschnitt, wobei jedoch gleichzeitig hieran ein hoher Bedarf besteht. Mithilfe des neu entwickelten Drug-Delivery-Systems auf Lipid-DNA-Basis soll zukünftig die Medikamentenaufnahme am vorderen Augenabschnitt erleichtert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die verschiedenen o.g. entwickelten DNA-Nanopartikel in ersten Proof-of-concept-Studien zunächst in vitro bezüglich ihrer Adhärenz ans corneale Epithel zu untersuchen. Im Falle positiver Ergebnisse sollten weitere In-vivo-Studien erfolgen, um die Funktionalität des neuartigen Medikamentenabgabesystems zu zeigen. Außerdem sollten verschiedene Pufferlösungen und ihr Einfluss auf die Adhärenz der Nanopartikel untersucht werden. Darüber hinaus sollten die Nanopartikel im Hinblick auf eine mögliche spätere klinische Anwendung bezüglich ihrer Toxizität auf verschiedene okuläre Zelllinien untersucht werden.

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob die neuartigen lipidmodifizierten DNA-Nanopartikel als Drug-Delivery-System für weiterführende Studien geeignet sind. Es sollte unter den o.g. verschiedenen entwickelten lipidmodifizierten DNA-Nanopartikeln der - bezogen auf Adhärenz und Toxizität - bestmögliche und geeignetste Nanopartikel in der bestmöglichen Pufferlösung ausgewählt werden, welcher dann für weiterführende Studien, beispielsweise mit Medikamentenbeladung, weiterverwendet werden sollte.

Weiterführend sollte dann im Falle positiver Ergebnisse der bestmögliche Nanopartikel in einer Anwendung mit Medikamentenbeladung auf Adhärenz sowie erhaltene Wirksamkeit des Medikaments im Nanopartikel-Medikamentenkomplex untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und verwendete Software

Name	Hersteller
Kryostat CM 1900	Leica, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop (Axioplan2 imaging®)	Zeiss, Deutschland
Openlab software	Improvision, Deutschland
JMP (Version 11.1.1)	SAS institute Inc., North Carolina, USA
Excel	Microsoft, Washington, USA
Numbers '09	Apple Inc., Kalifornien, USA
Apple Fotos	Apple Inc., Kalifornien, USA
Laminar-Flow-Werkbank	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Brutschrank (Heraeus bad 6220)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Neubauer-Zählkammer	VWR, Pennsylvania, USA
Mikroplattenleser	BioTek, Synergy HT, Deutschland
Fluorophotometer (Fluorotron™ Master)	Ocumetrics, Kalifornien, USA
Stereomikroskop Zeiss Stemi 2000-C	Zeiss, Deutschland
Prog Res C10 Mikroskopkamera	Jetoptik, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Eppendorf-Behälter	Eppendorf AG, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T.	Sakura Finetek, Deutschland
Flüssigstickstoff	WestfalenGas, Deutschland

Material und Methoden

Name	Hersteller
Glasobjektträger (Superfrost plus)	R. Langenbrick Labor- und Medizintechnik, Deutschland
FluorSave	Calbiochem, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-one, Österreich
Gummiringe	Hornbach, Deutschland
6-Well-Platten	Becton-Dickinson, New Jersey, USA
24-Well-Platten	Corning Inc., New York, USA
96-Well-Platten	Corning Inc., New York, USA
Petrifilme	3M, Minnesota, USA

2.1.3 Chemikalien

Name	Hersteller
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Base	Sigma Aldrich, Deutschland
Essigsäure (Acetat)	Carl Roth, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Deutschland
Milli-Q®-Wasser	Merck Millipore, Deutschland
Methanol	VWR, Pennsylvania, USA
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, Deutschland
Salzsäure	Merck, Deutschland
4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI, 0,2µg/ml)	SERVA, Deutschland
Dulbecco`s modified Eagle`s medium	Sigma Aldrich, Deutschland
L-Glutamin	Sigma Aldrich, Deutschland
fötales bovines Serum	Sigma Aldrich, Deutschland
Penicillin G	Sigma Aldrich, Deutschland
Streptomycin Sulfat	Sigma Aldrich, Deutschland
CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent	Promega, Madison, USA

Material und Methoden

Name	Hersteller
Paraformaldehyd	Merck, Deutschland
Kristallviolettlösung	Sigma Aldrich, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Deutschland
CaspaseGlo 3/7 activity kit	Promega, Madison, USA
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Hefeextrakt	Difco Laboratories Inc., Michigan, USA
Trypton	Difco Laboratories Inc., Michigan, USA

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden von kommerziellen Anbietern erworben und ohne weitere Verdünnung verwendet, sofern nicht anders vermerkt.

2.1.4 Tiere/ Tiermaterial/ humanes Gewebe

Name	Hersteller
enukleierte Schweineaugen	vom Schlachthof Gärtringen
Lister-Hooded Ratten	Harlan Winkelmann, Deutschland oder Charles River, Deutschland
Cornearänder	von Organspendern, von der Hornhautbank der Universitätsaugenklinik Tübingen zur Verfügung gestellte Reste nach z.B. Keratoplastik

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Nanopartikel

Herstellung funktionalisierter Nanopartikel (NPs)

Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte in Kooperation mit Partnern der Universität Groningen (Prof. Dr. Andreas Herrmann und Dr. rer. nat. Jan Willem de Vries vom Institut für Polymerchemie des Zernike Institute for Advanced Materials, Groningen, Niederlande). Dort erfolgte die Synthetisierung der lipidmodifizierten DNA-Stränge und somit des Grundbausteins der Nanopartikel. Die aus den lipidmodifizierten DNA-Strängen gebildeten Mizellen wurden in Tübingen vor Ort hergestellt. Hierzu wurde das für den jeweiligen Nanopartikel gewünschte Lipid-modifizierte Oligonukleotid (z.B. U4-T12) in Eppendorf LoBind Tubes in TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer: TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Base 40 mM, Essigsäure (Acetat) 20 mM, EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 1 mM) 1x zu einer Konzentration von 100 μM ($\mu\text{Mol/l}$) verdünnt. Anschließend wurde das Äquivalent der zum gewünschten Oligonukleotid komplementären DNA hinzugefügt. Die Hybridisierung der DNA-Stränge erfolgte unter Verwendung eines Temperaturgradienten. Sie wurden für 30 min auf 90°C erhitzt und anschließend langsam abgekühlt ($-1^\circ\text{C}/2\text{min}$) bis Raumtemperatur erreicht wurde. Hierbei erfolgte die Zusammenlagerung der DNA-Stränge. Die Mizellen bilden sich aufgrund der Amphiphilie der lipidmodifizierten DNA-Stränge, wobei sich die jeweiligen lipidhaltigen Anteile in wässrigem Medium zum Mizellenkern hin ausrichten.

Für die Fluoreszenzphotografie der mit reinem Nanopartikel behandelten Schweine- und Rattenaugen wurde eine 5' Atto488 modifizierte Komplementär-DNA verwendet. Für die mit Kanamycin (Kan) beladenen NPs wurde eine Komplementär-DNA verwendet, welche ein mit Kanamycin beladenes Aptamer sowie zur Visualisierung eine 5' Cy3-Modifikation enthielt.

Herstellung der NP-Augentropfen

Nach der in 2.1.1 beschriebenen Herstellung wurde die NPs/Kan-NPs 5-fach verdünnt. Für die In-vivo-Studien wurde die Lösung in Einzeldosis (EDO)-Behälter abgefüllt und direkt als Augentropfen (AT) verwendet.

Zur Verdünnung wurden folgende drei Lösungen verwendet:

- TAE-Puffer 1x (TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Base 40 mM, Essigsäure (Acetat) 20 mM, EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 1 mM)
- Artelac® splash: Artelac® Splash EDO® enthält 0,2 % Hyaluronsäure und andere Bestandteile wie steriles Wasser, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Dinatriumphosphat-Dodecahydrat und Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat [34].
- Artelac® lipids: Artelac® Lipids EDO® enthält 2 mg Carbomer, mittelkettige Triglyceride und steriles Wasser. Außerdem enthalten sind: Sorbitol, Dinatriumphosphat-Dodecahydrat und Natriumhydroxid [35].

2.2.3 In-vitro-Studien

Versuche an Schweineaugen

Vorbereitung und Versuchsdurchführung

Die Schweineaugen wurden von einem lokalen Schlachthof zur Verfügung gestellt. Nach dortiger Eukleation erfolgte bis zur weiteren Verwendung für die Versuche die Aufbewahrung in TBS-Puffer 1x (Tris-gepufferte Saline-Puffer: TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Base 50 mM, Natriumchlorid 150 mM, Salzsäure zur Adjustierung des pH-Wertes) bei 4°C. Vor der Applikation der Nanopartikel-Augentropfen (NP-AT) wurden die Schweineaugen nochmals in TBS-Puffer gewaschen und auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurden die Schweineaugen mit nach oben ausgerichteter Cornea auf 6-Well-Platten gelegt. Um ein Herablaufen der NP-AT zu verhindern, wurden zwei Gummiringe auf dem Auge positioniert, davon ein großer um die Cornea herum und ein kleiner in der Mitte der Cornea (s. Abb. 10).

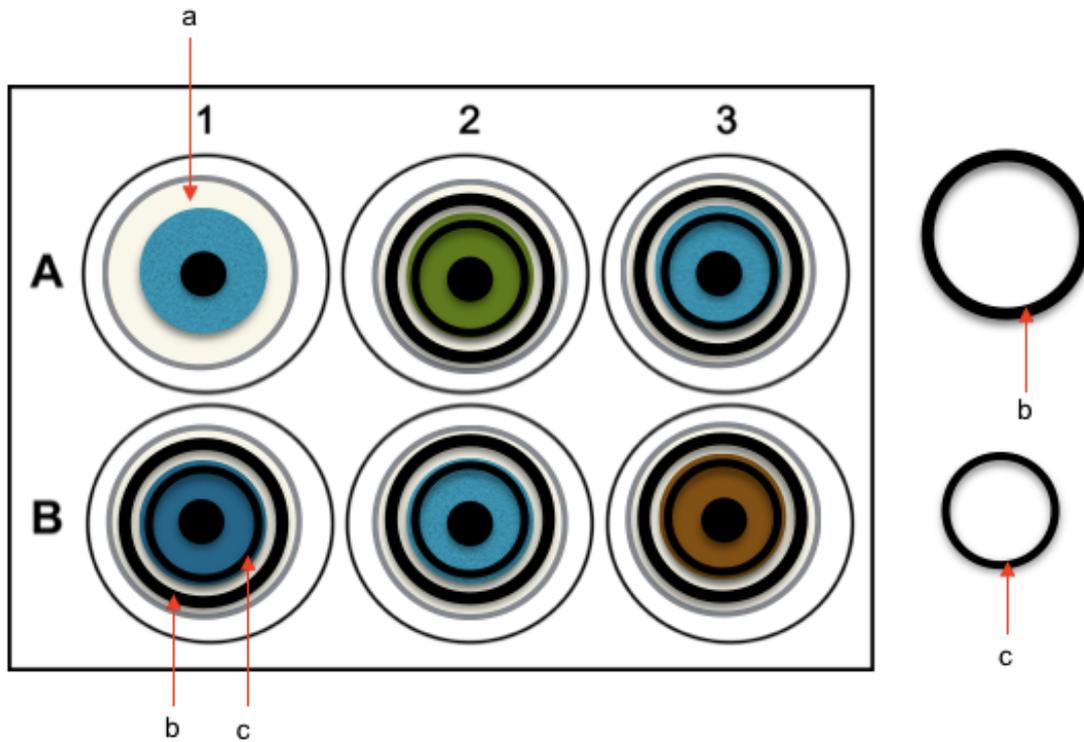


Abbildung 10: schematische Darstellung einer 6-Well-Platte mit 6 Schweineaugen (a: Schweineauge ohne Gummiringe, b: großer Gummiring, c: kleiner Gummiring)

Anschließend wurden auf jedes Auge 15 μl der jeweiligen NP-Lösung (20 μM) aufgetropft und die Augen für die jeweils festgelegten Zeiten inkubiert (5, 15 und 30 min). Danach wurden die Schweineaugen nochmals kurz durch TBS-Puffer gezogen, längs halbiert und lentektomiert. Daraufhin wurden sie direkt in Tissue-Tek O.C.T in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -30°C verwahrt.

Anfertigen der Kryoschnitte

Die Kryoschnitte wurden an einem Kryostat (Leica CM 1900) hergestellt. Es erfolgten 12 μm dicke Längsschnitte des *Bulbus oculi*. Diese wurden anschließend auf Objektträger aufgebracht (Superfrost plus, R.Langenbrinck Labor- und Medizintechnik) und bis zur weiteren Verwendung bei -30°C aufbewahrt.

Färbung der Kryoschnitte

Die Kryoschnitte wurden zunächst mit Methanol (-20°C) für 10 Minuten fixiert und anschließend kurz an der Luft getrocknet. Hiernach wurden die Schnitte für 10 Minuten in TBS-Puffer 1x gewaschen. Anschließend erfolgte eine DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)-Färbung zur Anfärbung der Zellkerne (Nukleinsäuren) sämtlicher Zellen. Hierzu wurden die Schnitte zunächst für eine Minute mit DAPI-Lösung (0,2 µg/ml in TBS-Puffer) inkubiert. Die DAPI-Lösung wurde kurz abgeklopft. Anschließend wurde zweimal mit TBS-Puffer 1x für jeweils fünf Minuten gewaschen und dann einmal für fünf Minuten mit destilliertem Wasser. Danach wurden die Schnitte nochmals kurz luftgetrocknet. Abschließend erfolgte die Einbettung in FluorSave (Calbiochem) sowie die Fluoreszenzmikroskopie (Axioplan 2, Zeiss).

Fluoreszenzmikroskopie

Zur Übersichtsdarstellung erfolgte zunächst die Mikroskopie bei 400 nm zur Darstellung der Zellkerne. Die Detektion der Nanopartikel wurde bei 520 nm (5' Atto488 modifizierte Komplementär-DNA) vorgenommen.

Zur Aufnahme der Fluoreszenzphotografien wurde die Openlab Software, Improvision (s. Abbildung 2 und 3) verwendet.

Auswertung

Es erfolgte zunächst die Detektion der NPs auf dem Corneaepithel sowie anschließend bei Positivität (detektierbare 5' Atto488 markierten NPs) der visuelle Vergleich zwischen den verschiedenen verwendeten Nanopartikeln und den unterschiedlichen Inkubationszeiten.

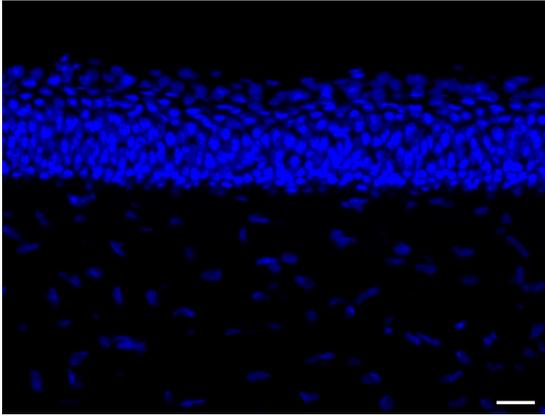


Abbildung 11: DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne

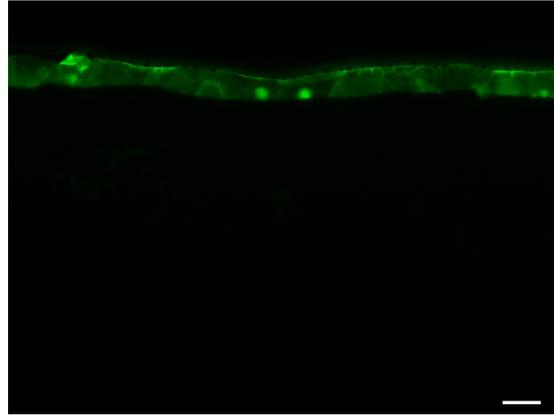


Abbildung 12: Darstellung der 5' Atto488 markierten NPs, selber Bildausschnitt wie in Abb. 2

2.2.4 In-vivo-Studien

Tierversuche

Die Tierversuche wurden an lebenden adulten Ratten (*Rattus norvegicus* forma domestica, Lister-Hooded) durchgeführt. Die Versuchstiere wurden entsprechend der „*Principles of laboratory animal care*“ (NIH publication No. 86-23, überarbeitet 1985), der *OPRR Public Health Service Policy on the Human Care and Use of Laboratory animals* (überarbeitet 1986) und des Deutschen Tierschutzgesetzes gehalten und behandelt. Die Tierversuche wurden unter der Tierversuchsgenehmigung AK3/11, welche vom Regierungspräsidium Tübingen an Dr. rer. nat. Sven Schnichels vergeben wurde, durchgeführt.

Versuchsdurchführung

Die reinen Nanopartikel bzw. die Kanamycin-Nanopartikel wurden wie in 2.2.1 beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgte die Applikation eines einzelnen Tropfens der Lösung (20 μ M) (Verdünnung mit TAE-Puffer, Artelac splash, Artelac lipids) ins jeweilige Rattenauge. Hierzu wurde die Ratte kurz fixiert und der Tropfen mittels Einzeldosisbehälter (wie für übliche Medizinprodukte verwendet wird) appliziert. Blinzeln wurde weder während der Applikation noch danach verhindert. Hiernach wurden die Ratten für die vorgesehene Inkubationszeit (je nach Versuchsreihe 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h)

wieder in ihre Käfige gesetzt. Danach erfolgte die Tötung mittels Kohlenstoffdioxid(CO₂)-Inhalation. Die Augen wurden anschließend sofort enukleiert. Hierzu wurde zunächst eine laterale Kanthotomie mittels Schere durchgeführt sowie das Augenhangsgewebe durchtrennt. Danach wurde das Auge mittels Pinzette kurz hinter dem Eintritt des *Nervus opticus* in die Sklera gegriffen und unter vorsichtigem Zug aus der knöchernen Orbita geborgen. Anschließend wurden die Augen, wie in 2.2.1 für Schweineaugen beschrieben, in flüssigem Stickstoff in TissueTek eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -30°C verwahrt.

Färbung

Zunächst wurden die Kryoschnitte wie in 2.2.3 beschrieben angefertigt. Danach wurden die Zellkerne mittels DAPI-Färbung (wie in 2.2.3 beschrieben) angefärbt. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie (wie in 2.2.3 beschrieben). Für die Kanamycin-NPs erfolgte die Detektion der Nanopartikel bei ca. 610 nm.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dazu wurden die verschiedenen Nanopartikel zunächst die auf der Corneaoberfläche detektiert und fotodokumentiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil an NP-positiven Augen des jeweils verwendeten Nanopartikels zu den unterschiedlichen Inkubationszeiten bestimmt und die verschiedenen Nanopartikel untereinander verglichen. Bei gleichen Ergebnissen zweier verschiedener NPs (vom prozentualen Anteil gesehen) erfolgte der visuelle Vergleich der Menge an NPs auf der Corneaoberfläche.

Dies wurde jeweils für die drei unterschiedlichen verwendeten Verdünnungslösungen ermittelt (TAE-Puffer, Artelac splash, Artelac lipids) und ebenfalls zwischen den verschiedenen Verdünnungslösungen verglichen.

Für die Kanamycin-Nanopartikel wurde nur das via Aptamer an U4T-12 gebundenes Kanamycin in TAE-Puffer zu den verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

2.2.5 Toxizitätsstudien

Die Zytotoxizität der drei am besten adhärenen Nanopartikel wurde bezüglich dreier Parameter - Zellzahl, Zellviabilität und Apoptoseinduktion - an drei unterschiedlichen okulären Zelllinien untersucht.

Verwendete Zelllinien

Verwendet wurde die RGC-5 Zelllinie, die ARPE19-Zelllinie und die 661W-Zelllinie.

Die RGC-5 Zelllinie

Die RGC-5-Zelllinie wurde von Professor Neeraj Agarwal (UNT Health Science Center, Fort Worth, TX, USA) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um eine okuläre Zelllinie, ursprünglich charakterisiert als retinale Ganglienzellen aus der Ratte. Welchen Ursprungs die Zellen sind, wird jedoch seit einiger Zeit diskutiert. [36]

Die ARPE19-Zelllinie

Die ARPE19-Zelllinie (humane Zelllinie retinaler Pigmentepithelzellen) wurde von der American Type Culture Collection erworben. Es handelt sich hierbei um eine Zelllinie humaner Pigmentepithelzellen.

Die 661W-Zelllinie

Die 661W-Zelllinie wurde von Prof. Muayyad Al-Ubaidi (University of Illinois, Chicago, IL, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um murine Photorezeptor-Zellen.

Zellkultur

Die drei o.g. Zelllinien wurden für die gesamte Dauer der Versuche in Dulbecco`s modified Eagle`s medium, welchem 4mM L-Glutamin, 10% fötales bovines Serum, 100U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin Sulfat zugesetzt wurde, kultiviert.

Material und Methoden

Die gesamten Versuche, die in Zusammenhang mit der Zellkultur standen (Herstellung steriler Lösungen/Medien, Zellkultur, Medienwechsel), erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow-Werkbank. Verwendete Materialien wurden vorher entweder autoklaviert oder es handelte sich um steril verpackte Einmal-Instrumente. Die Kultivierung wurde in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ (Kohlenstoffdioxid) mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre durchgeführt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zellsuspension in frischem Medium hergestellt. Anschließend wurden 10 µl der Suspension in eine modifizierte Neubauer-Zählkammer gefüllt und 4 Großquadrate ausgezählt. Die Gesamtzellzahl der Kultur konnte dann wie folgt berechnet werden:

(Anzahl der gezählten Zellen n : 4) × 10⁴ (Zählfaktor der Kammer) = Zellzahl/ml
Zellzahl/ml × Volumen der Zellsuspension = Gesamtzellzahl.

Hieraus konnte dann errechnet werden, welche Menge der Gesamtsuspension verwendet werden musste, um eine bestimmte Anzahl von Zellen auszusäen.

Die Aussaat der Zellen erfolgte auf 96-Well-Platten mit einer Dichte von 10.000 Zellen/well für die ARPE19-Zellen und von 5000 Zellen/well für die RGC-5 und 661W-Zellen. Nach 4h wurde das Medium entfernt und anschließend entweder 90% Medium plus 10% Pufferlösung oder 90% Medium plus 10% NP-Pufferlösung (endgültige Konzentration von 20 µM) hinzugegeben.

MTS Viabilitäts-Assay

Die Zellviabilität wurde mittels des *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kits* ermittelt. Dieses basiert auf dem enzymatischen Abbau von **Methyltetrazoliumsulfat** (MTS) durch lebende Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt. Dieses Produkt ist mittels photometrischer Messung der Absorption bei 490 nm detektierbar.

24 Stunden nach Zusatz der Puffer- bzw. NP-Lösung erfolgte die Zugabe von 20 µl *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Reagenz* in jedes zu analysierende Well. Anschließend wurde für 90 Minuten inkubiert. Schließlich wurde die Absorptionsmessung bei 490 nm mittels eines *Microplate readers* (BioTek, Synergy HT, Bad Friedrichshall, Deutschland) durchgeführt.

Material und Methoden

Als Interferenzkorrektur wurden 690 nm gewählt, um Hintergrundphänomene wie beispielsweise unspezifische Absorptionen zu minimieren.

Die nachgewiesene Menge des Formazans ist proportional zur Aktivität der Zellpopulation. Im Falle einer Schädigung der Zellen kommt es zu einer verminderten Formazanbildung gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Es wurde zwischen den mit Nanopartikel-Lösung behandelten Zellen und nur mit TBS-Puffer versetzten Zellen verglichen.

Kristallviolett-Färbung

Nach dem MTS-Assay wurde das Medium aus den Wells entfernt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mittels 4%-igem Paraformaldehyd (je 100 µl) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser (H₂O, je 200 µl) erfolgte die Anfärbung der Zellen mit Kristallviolett-Lösung (je 100 µl) (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland). Anschließend wurde dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen (je 200 µl) und mit 1%igem SDS (Sodium Dodecyl Sulfat, je 100 µl) für eine Stunde inkubiert.

Mittels der Kristallviolett-Färbung lassen sich nur lebende Zellen darstellen. Tote Zellen werden mit dem Überstand entfernt, da diese keine Adhärenz zur Platte zeigen und sich beim Waschen ablösen. Die Absorptionsmessung erfolgte mittels Microplate reader (BioTek, Synergy HT, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 595 nm.

Caspase 3/7-Aktivitäts-Assay

Die Apoptoseinduktion wurde mithilfe eines *CaspaseGlo*[®] 3/7 activity Kits (Promega, Madison, USA) bestimmt. Caspasen (engl.: *cysteinyI-aspartate specific protease*) sind Zysteinproteasen, welche eine entscheidende Rolle im Rahmen der Apoptose spielen [37].

Mithilfe des Caspase 3/7-Aktivitäts-Assays wird die Aktivität der Caspase 3 und 7 bestimmt. Im Rahmen dessen wird eine Lumineszenzzunahme gemessen, wenn das künstlich zugesetzte Substrat (Z-DEVD-Aminoluziferin) von den Caspasen 3 und 7 gespalten wird. Hierbei wird Aminoluziferin frei, welches als

Material und Methoden

Substrat für die im Kit enthaltene UltraGlo Luziferase dient und unter Lumineszenz (d.h. Lichtemission) gespalten wird (s. Abb. 13).

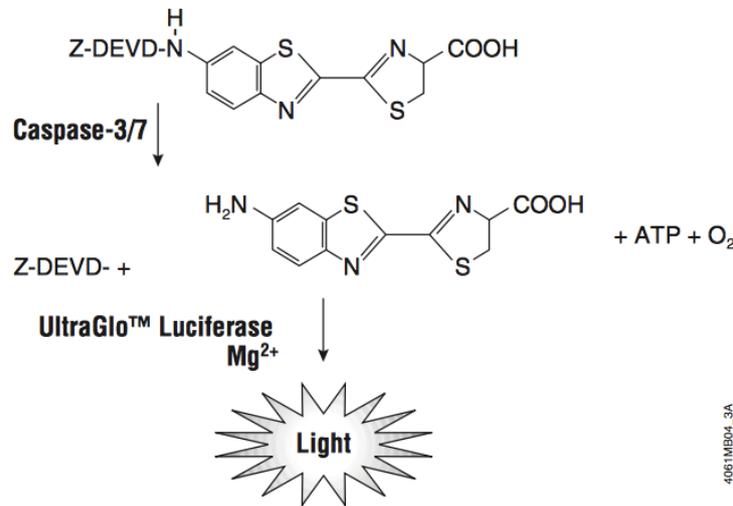


Abbildung 13: Prinzip des Caspase 3/7-Aktivitäts-Assays [38]

Hierzu erfolgte 24 Stunden nach Zusatz der Puffer- bzw. NP-Lösung der Zusatz des CaspaseGlo 3/7 Reagenz (jeweils 100 µl). Weiterhin wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Lumineszenz wurde mithilfe eines Luminometers (BioTek, Synergy HT, Bad Friedrichshall, Deutschland) bestimmt. Die gemessene Lumineszenz ist proportional zur Caspaseaktivität. Als Negativkontrolle diente eine nur mit TBS-Puffer behandelte Probe (zur Bestimmung der basalen Caspaseaktivität). Als Nullkontrolle diente eine Probe, welche nur aus Zellkulturmedium und dem Caspase-Glo-3/7-Reagenz bestand. Hiermit wurde die Hintergrundlumineszenz gemessen, welche anschließend von den anderen Proben abgezogen wurde. Nach Mischung der Proben mit dem Caspase-Reagenz wurden die Proben bei ca. 400 Umdrehungen/min leicht geschüttelt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte nach 3h.

2.2.6 Statistische Auswertung der Zellkultur-Assays

Die statistische Datenauswertung, Berechnung der Mittelwerte sowie Erstellung der Tabellen bzw. Grafiken wurde mithilfe von Microsoft® Excel 2013 und

Numbers'09 durchgeführt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardabweichung (SD; *standard deviation*).

Für jeden Assay wurden fünf bis sechs (n=5-6) Experimente pro Zelllinie und verwendetem Nanopartikel oder TBS-Puffer durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels JMP® (Version 11.1.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte von mit Puffer behandelte Probe (Kontrolle) und der mit NP-Lösung behandelten Proben wurden mittels ANOVA und anschließendem Dunnet's post-hoc Test ermittelt, statistisch signifikante Unterschiede wurden angenommen für $p < 0.05$.

2.2.7 In-vitro-Untersuchungen an humanem Gewebe

Es wurden uns von der Hornhautbank der Universitätsaugenklinik Tübingen Cornearänder menschlicher Corneae (von verstorbenen Organspendern) nach Ausstanzung bei Keratoplastik nach deren Verwendung zur Hornhauttransplantation zur Verfügung gestellt.

Versuchsdurchführung

Die Cornearänder wurden zunächst in drei bis vier ungefähr gleich große Stücke unterteilt und in PBS (Phosphatgepufferte Saline)-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Kan-NP-Lösung oder Pufferlösung, welche nur den Fluoreszenzfarbstoff enthielt (als Kontrolle) auf die Corneaoberfläche appliziert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Corneastücke in eine 24-Well-Platte, welche jeweils 2 ml PBS enthielt, gelegt und für die entsprechende Zeit gewaschen (5 min, 30 min, 2 h).

Versuchsauswertung

Weiterführend wurde mit den Cornearändern wie in 2.2.3 beschrieben verfahren. Zunächst erfolgte die Einbettung in Tissue-Tek O.C.T. in flüssigem Stickstoff bei -30°C . Anschließend wurden die Kryoschnitte hergestellt, mittels DAPI-Färbung angefärbt und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

2.2.8 Fluorophotometerversuche zur Ex-vivo-Quantifizierung der Nanopartikel

Versuchsdurchführung

Die Schweineaugen (vom Schlachthof Gärtringen) wurden mit reiner NP-Lösung, Kan-NP-Lösung sowie dem reinen Fluorophor betropft (jeweils 50 µl, 20 µM). Weiterhin wurde eine unbehandelte Kontrolle verwendet, um die Autofluoreszenz der Schweinecornea zu bestimmen. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität mittels eines Fluorophotometers über das gesamte Auge gemessen. Mittels Fluorophotometrie kann ein Konzentrationsprofil des Fluoreszenzfarbstoffs über das gesamte Auge erstellt werden. Hierbei wird nacheinander an verschiedenen Punkten im Auge, von der Cornea bis zur Retina, die Fluoreszenzintensität bestimmt.

Versuchsauswertung

Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend für die verschiedenen Zeitpunkte über das gesamte Auge aufgetragen. Das Signal wurde anschließend integriert. Das Signal zum Zeitpunkt null Minuten wurde gleich 100 % gesetzt und die anderen Zeitpunkte in Relation dazu.

2.2.9 In-vitro-Evaluation der antibiotischen Aktivität auf Schweinecornea

Versuchsdurchführung

Es wurden Schweinecorneae aus einem lokalen Schlachthof verwendet. Diese wurden zunächst aus dem *Bulbus oculi* ausgeschnitten und auf Petrischalen platziert. Anschließend wurden wie in 2.2.3 beschrieben Gummiringe auf der Cornea platziert, um ein Herunterlaufen der applizierten Lösung zu verhindern. Dann wurden 100 µl Kan-NP-Lösung oder fluoreszenzmarkiertes freies Kanamycin auf die Oberfläche aufgetropft und für fünf Minuten inkubiert. Als Kontrolle wurde eine nur mit PBS behandelte Probe verwendet. Danach wurde die überschüssige Lösung entfernt und die Corneae in ca. 10 ml PBS für die jeweilige Zeit gewaschen (5 min, 30 min, 2 h). Anschließend wurden die

Material und Methoden

Corneae auf Petrifilme (3M, Minnesota, USA), einem Fertigplattensystem zur Kultivierung von Mikroorganismen, gelegt, welche zuvor nach Herstellerangaben vorbereitet und mit 1 ml Milli-Q®-Wasser vorbehandelt worden waren.

Zuvor waren *E. coli*-Bakterien (zur Verfügung gestellt von Sukirthini Balendran, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Tübingen, Deutschland) bei 37°C über Nacht kultiviert worden und anschließend die Menge an *E. coli*-Bakterien pro ml LB-Medium (0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton, 1% Natriumchlorid) bestimmt worden. Diese wurden dann zu einer Konzentration von 10^4 *E. coli*-Bakterien/ml LB-Medium verdünnt. Von dieser Bakteriensuspension wurden dann jeweils 5 µl (d.h. im Schnitt 50 *E. coli*-Bakterien) auf die jeweilige Corneaoberfläche aufgetropft, die Petrifilme geschlossen und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Fotografien der Petrifilme aufgenommen.

Versuchsauswertung

Die Aufnahmen wurden zunächst verblindet. Anschließend wurden die *E. coli*-Kolonien auf der Corneaoberfläche durch drei Personen jeweils zwei Mal ausgezählt. Die statistische Datenauswertung, Berechnung der Mittelwerte sowie Erstellung der Tabellen bzw. Grafiken wurde mithilfe von Microsoft® Excel 2013 und Numbers'09 durchgeführt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert +/- Standardabweichung (SD; *standard deviation*).

Die statistische Analyse erfolgte mittels JMP® (Version 11.1.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte von mit reinem Puffer behandelten Proben (Kontrolle; wurde zu 100% gesetzt) und der mit Kan-NP-Lösung bzw. freier Kanamycin-Lösung behandelten Proben zu den jeweiligen Waschzeiten (mit $n = 3-4$) wurden mittels ANOVA und anschließendem Tukey-Kramer post-hoc Test ermittelt, statistisch signifikante Unterschiede wurden angenommen für $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

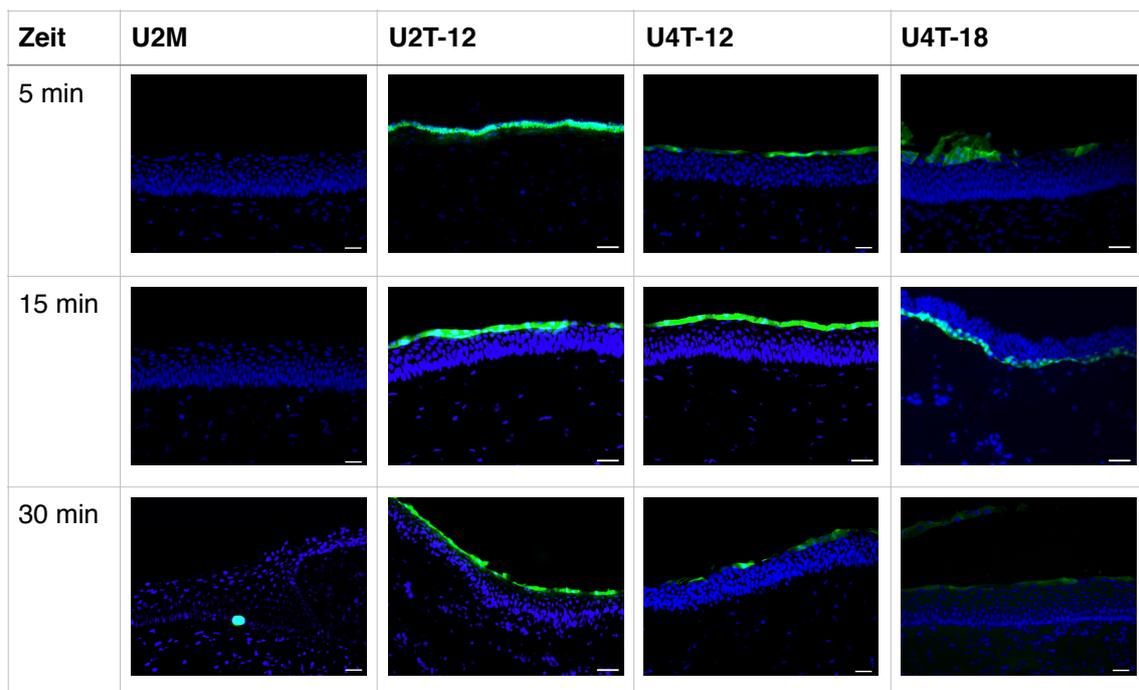
3.1 In-vitro-Studien der verschiedenen entwickelten Nanopartikel

Adhäsion der Nanopartikel am Corneaepithel

Die Auswertung der In-vitro-Versuche an Schweineaugen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop, wie in 2.2.3 beschrieben.

Insgesamt wurden sieben verschiedenen Nanopartikel getestet (U2M-12, U2T-12, U4T-12, U4T-18, U6T-12, U6T-20 und U12R-36; s. Tabelle 1 in der Einleitung). Die verschiedenen NPs sind als UX-Y dargestellt, wobei X den Anteil an hydrophob modifizierten Desoxythymine-Basen darstellt, während Y die Anzahl an Basen insgesamt angibt.

Abbildung 14 zeigt eine Übersichtsdarstellung exemplarischer Aufnahmen der verschiedenen getesteten NPs und der Kontrolle bei einer Inkubationszeit von 5, 15 und 30 min. Als Negativkontrolle wurde reiner TBS-Puffer verwendet, um eine Autofluoreszenz auszuschließen. Außerdem wurden weitere Kontrollen verwendet, welche doppel- und einzelsträngige DNA sowie eine 5' Atto488 Modifikation enthielten, jedoch keine Alkylmodifikation (U).



Ergebnisse

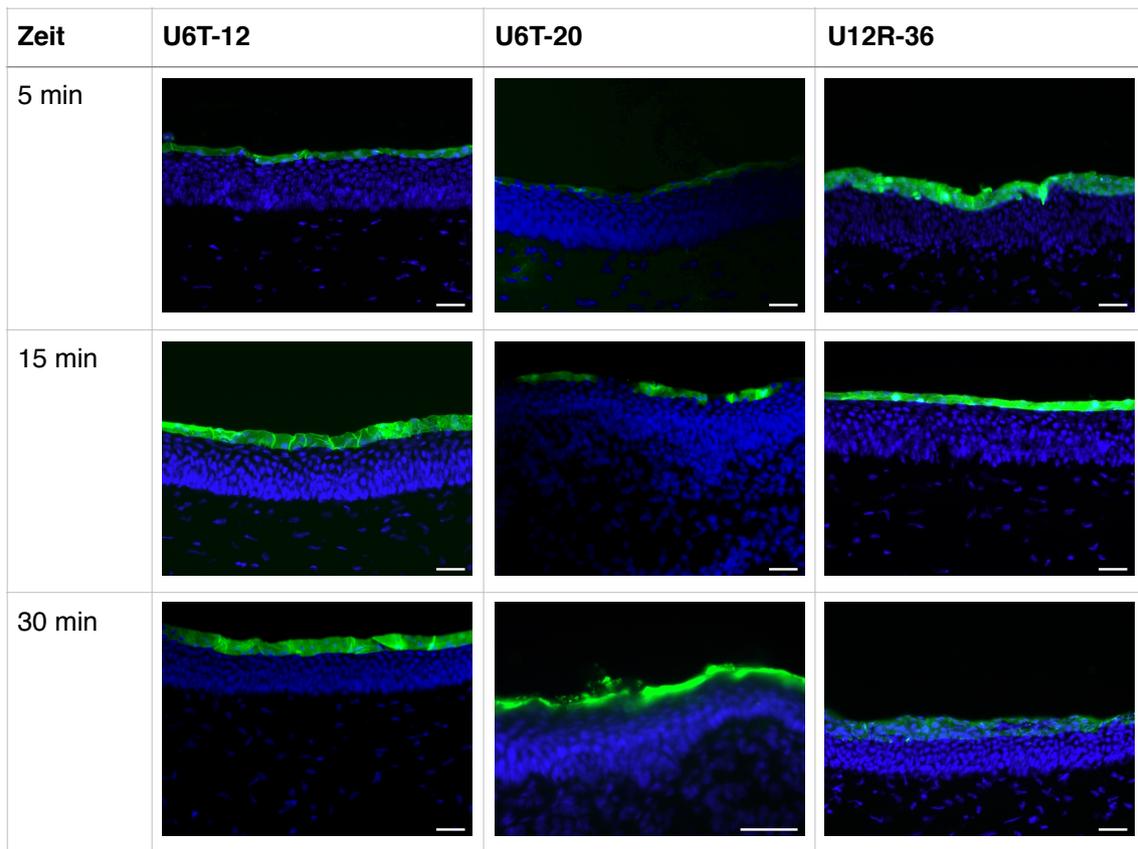


Abbildung 14: Exemplarische Aufnahmen von 7 getesteten Nanopartikeln bei einer Inkubationszeit von 5 min, 15 min und 30 min; Maßstabsbalken unten rechts entsprechend 30µm; blau dargestellt sind die Zellkerne der Corneaepithelzellen (DAPI-Färbung), grün dargestellt sind die 5' Atto488 modifizierten DNA-Nanopartikel; sechs der sieben getesteten NPs zeigen eine gute Adhäsion ans Corneaepithel.

Die Auswertung erfolgte mittels visuellem Vergleich der Menge von am Corneaepithel adhärenter NPs untereinander (s. Abb. 14; grün dargestellt). Von sieben getesteten NPs zeigten sechs eine gute und gleichwertige Adhäsion an der Cornea über alle Inkubationszeiten. U2M-12 zeigte keine Adhäsion (s. Tabelle 2).

Ergebnisse

Zeit	U2T-12	U4T-12	U4T-18	U6T-12	U6T-20	U12R-36	U2M-12
5 min	++	++	++	++	++	++	-
15 min	++	++	++	++	++	++	-
30 min	++	++	++	++	++	++	-

Tabelle 2: Adhäsion sieben verschiedener getesteter Nanopartikel am Corneaepithel (++ = Corneaepithel komplett bedeckt; + = Corneaepithel teilweise bedeckt/NP detektierbar; - = keine NP detektierbar)

Hier konnte somit in ersten In-vitro-Versuchen an Schweineaugen eine grundsätzliche Funktionalität der meisten entwickelten Nanopartikel gezeigt werden. Bis auf den NP U2M-12 zeigten alle entwickelten Nanopartikel eine gute Adhäsion am cornealen Epithel. Es gelang somit ein erster Beweis der Funktionalität des neu entwickelten Drug-delivery-Systems. Die sechs gut adhärennten NPs sowie ein weiterer NP U20R-60 als Weiterentwicklung aus den gut adhärennten NPs U4T-12 und U12R-36 wurden weiter in In-vivo-Versuchen getestet.

3.2 In-vivo-Studien der verschiedenen entwickelten Nanopartikel

Die Durchführung und Auswertung der Versuche erfolgte wie in 2.2.4 dargestellt.

3.2.1 Adhäsion der NPs am Corneaepithel

Es wurden die in In-vitro-Versuchen (s. 3.1) gute Adhäsion zeigenden NPs sowie weitere Modifikationen in TBS-Puffer als Verdünnungslösung getestet. Insgesamt wurden sieben NPs zu 3 unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (exemplarische Aufnahmen s. Abb. 15). Außerdem wurden als Kontrollen ein unbehandeltes Rattenauge verwendet (um Autofluoreszenz auszuschließen) sowie doppel- und einzelsträngige 5' Atto488 modifizierte DNA ohne hydrophobische Modifikation (U) aber gleicher Sequenz (exemplarische Aufnahmen s. Abb. 16).

Ergebnisse

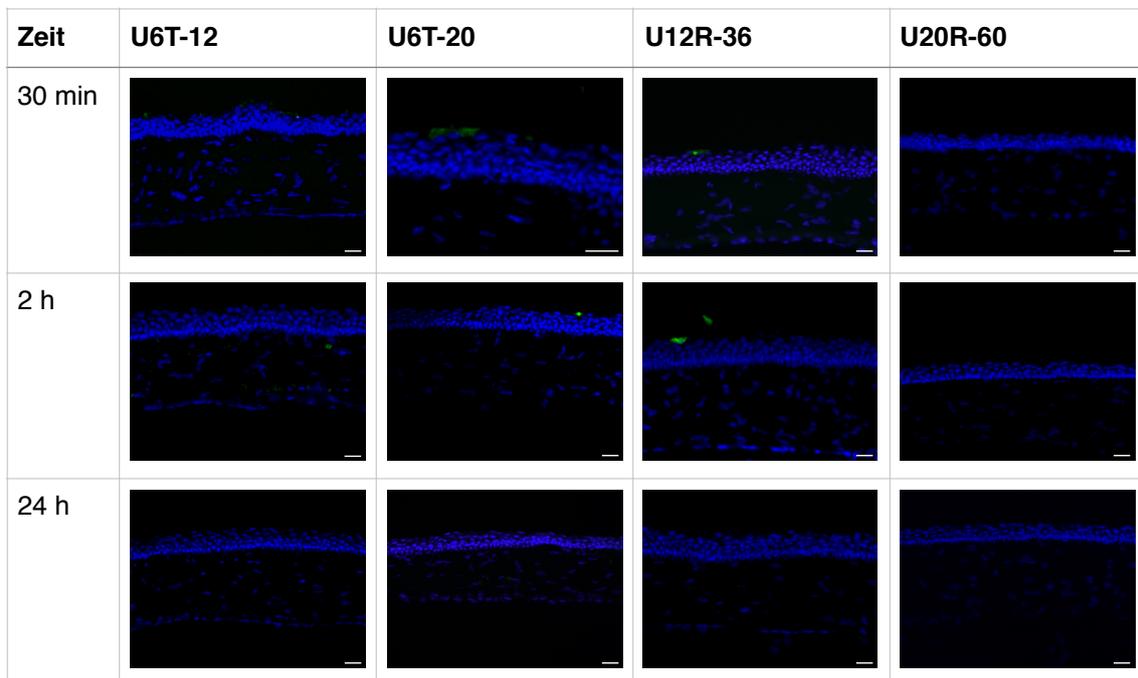
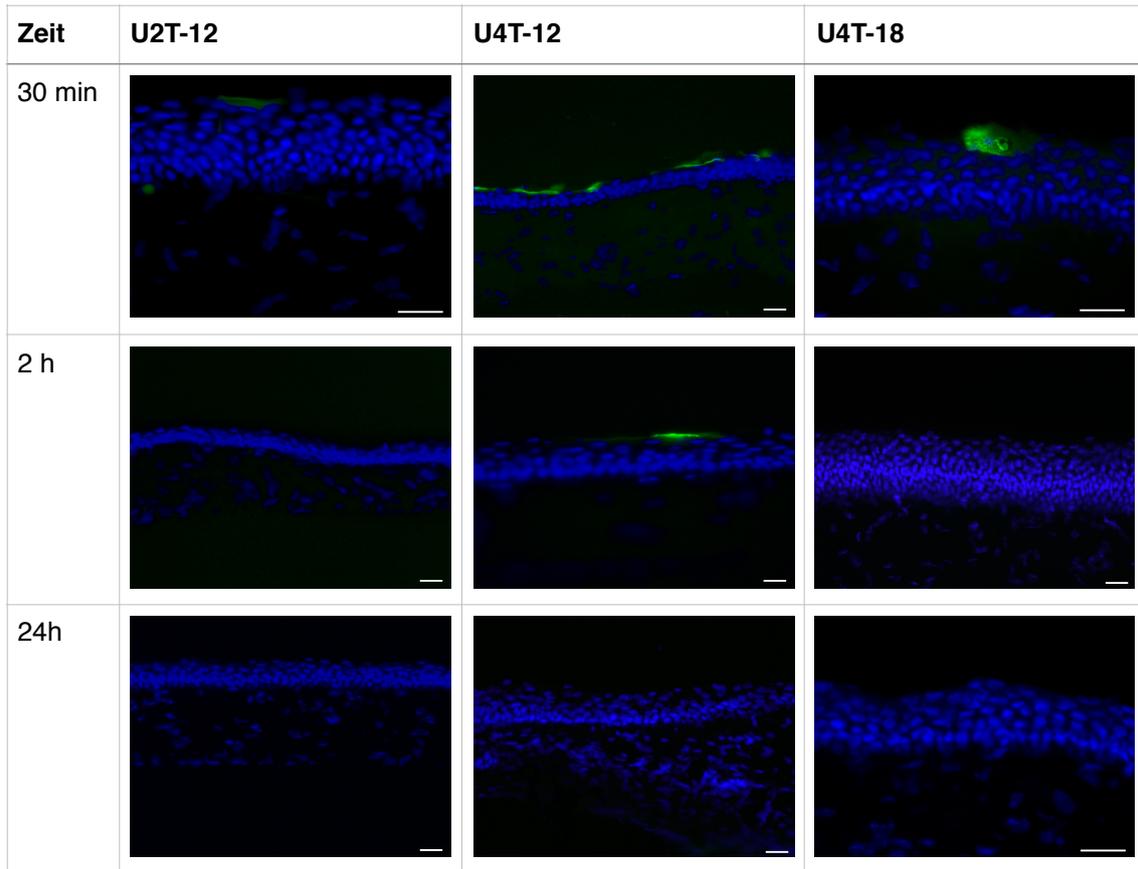


Abbildung 15: Exemplarische Aufnahmen von sieben getesteten Nanopartikeln bei einer Inkubationszeit von 30 min, 2 h und 24 h; der Maßstabsbalken entspricht 30µm; blau dargestellt sind die Zellkerne der Corneaepithelzellen (DAPI-Färbung), grün dargestellt sind die 5' Atto488 modifizierten DNA-Nanopartikel; nach 30 min zeigen noch sechs von sieben getesteten NPs eine gute Adhäsion, nach zwei Stunden sind nur noch vier NPs nachweisbar.

Ergebnisse

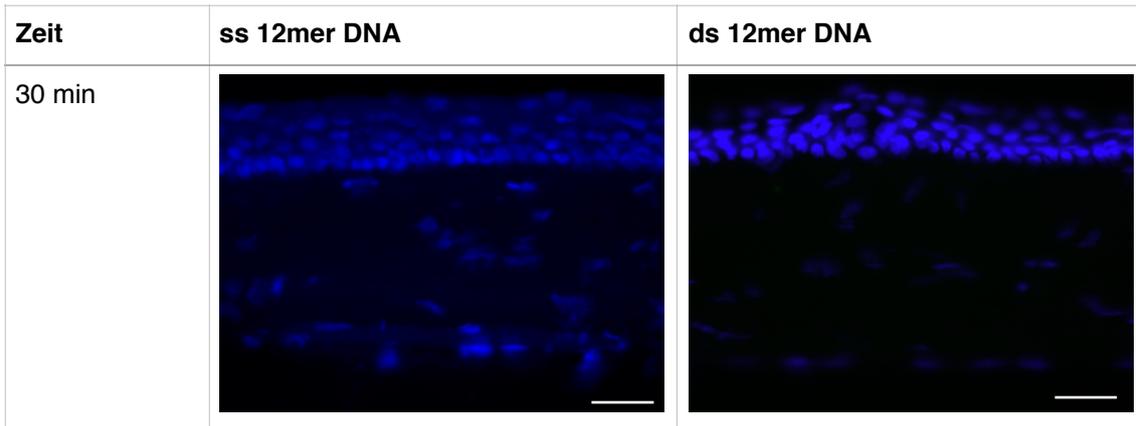


Abbildung 16: Exemplarische Aufnahmen von der ss (single stranded) und ds (double stranded) Kontrollen; Maßstabsbalken entsprechend 30µm; blau dargestellt sind die Zellkerne der Corneaepithelzellen (DAPI-Färbung), grün dargestellt sind die 5' Atto488 modifizierten DNA-Nanopartikel; es zeigte sich keine Adhäsion nach 30 min.

Bewertet wurde zunächst der prozentuale Anteil an Augen, auf welchen NPs detektierbar waren (s. Tabelle 3). Bei gleichem oder ähnlichem Ergebnis erfolgte der visuelle Vergleich der Menge an NPs auf dem Corneaepithel.

Zeit	U2T-12	U4T-12	U4T-18	U6T-12	U6T-20	U12R-36	U20R-60
30 min	2/4 (50%)	6/6 (100%)	3/5 (60%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)
2 h	0/4 (0%)	4/6 (67%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	2/4 (50%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)
24 h	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)

Tabelle 3: NP-positive Rattenaugen X als Bruchteil der insgesamt mit dem jeweiligen NP getropften Augen Y (X/Y), in Klammern der jeweilige prozentuale Anteil

Bei sechs von sieben Nanopartikeln zeigte sich eine gute bis sehr gute Adhäsion am Corneaepithel nach 30 Minuten (50%-100% der getropften Augen positiv). Unterschiede sind insbesondere im Langzeit-Vergleich zu sehen. Hier ist

Ergebnisse

nach zwei Stunden nur noch bei drei der getesteten Nanopartikel - U4T-12, U6T-20 und U12R-36 - eine Adhäsion am Corneaepithel nachweisbar.

Nach 24 Stunden ist keiner der NP mehr nachweisbar.

Im Vergleich untereinander adhären diejenigen Nanopartikel, die einen Anteil von ca. 30% an Lipid-modifizierten Basen (U) aufweisen (U4T-12, U6T-20, U12R-36) am stärksten. In dieser Gruppe zeigt nur U20-R60 keinerlei Adhäsion. Nanopartikel mit höherem oder geringerem Anteil an U - U2T-12 (ca.17%), U4T-18 (ca. 22%), U6T-12 (ca.50%) - weisen eine deutlich schwächere Adhäsion am Corneaepithel auf, insbesondere bei langen Inkubationszeiten.

Im Vergleich der Nanopartikel mit ca. 30% Anteil an alkylmodifizierten Basen U miteinander zeigen diejenigen eine stärkere Adhäsion, deren Gesamtzahl an Basen niedriger ist: d.h. U4T-12 > U6T-20 > U20-R60. U12R-36 zeigt trotz größerer Anzahl an Basen den gleichen prozentualen Anteil an NP-positiven Augen wie U6T-20. Allerdings ergibt hier der visuelle Vergleich bei U6T-20 eine etwas bessere Bedeckung der Corneaoberfläche.

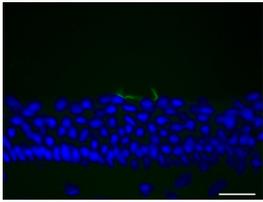
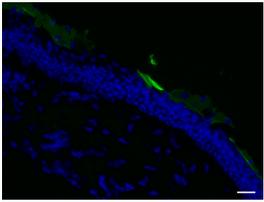
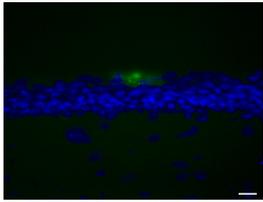
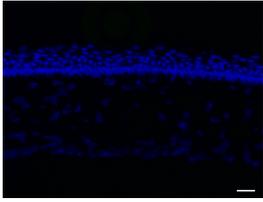
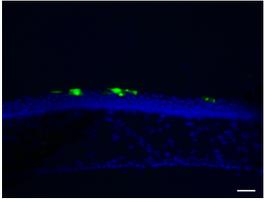
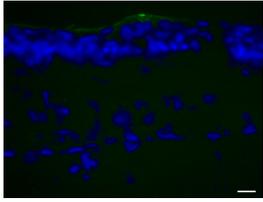
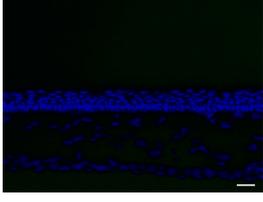
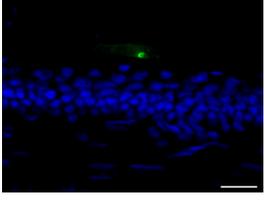
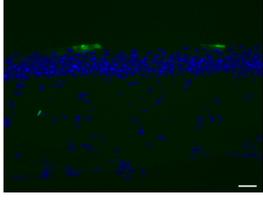
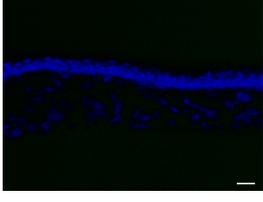
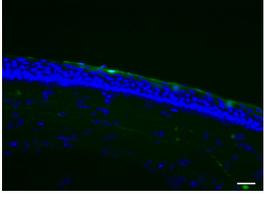
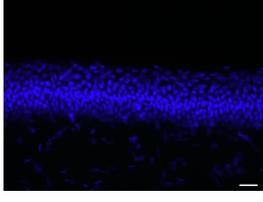
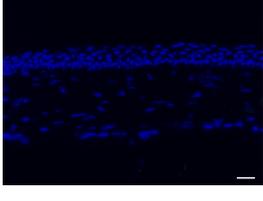
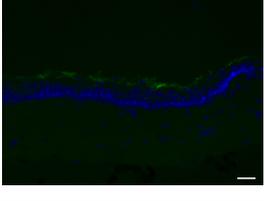
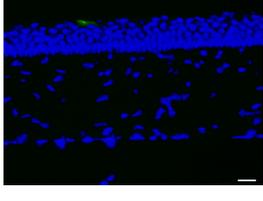
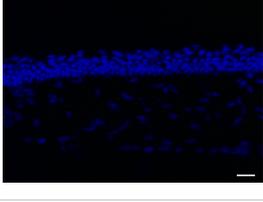
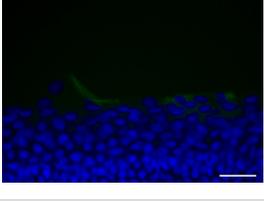
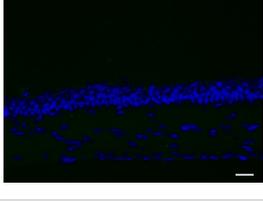
Der Nanopartikel, der die insgesamt stärkste Adhäsion aufweist, ist U4T-12. Hier sind nach 30 Minuten alle Augen positiv und nach zwei Stunden noch zwei Drittel. Bei den Kontrollen, welche fluoreszenzmarkierte 12-basige ss- und ds-DNA, aber keine Alkylmodifikation enthalten, war keine Adhäsion festzustellen.

3.2.2 Adhäsion in Abhängigkeit von der verwendeten Pufferlösung

Als Pufferlösungen wurde, wie in 2.2.4 beschrieben, TAE-Puffer, Artelac splash (enthält Hyaluronsäure) und Artelac lipids (enthält Carbomere) verwendet.

Die drei unterschiedlichen Pufferlösungen wurden an fünf verschiedenen Nanopartikeln sowie den Kontrollen (NoU4T, ss cU4T) getestet. U12R-36 und U20R-60 wurden in diesen Versuchen nicht untersucht, da sie in den o.g. Versuchen als Weiterentwicklung von U4T-12 keine bessere Adhäsion zeigten. Es wurden wiederum histologische Aufnahmen der jeweiligen Nanopartikel in der jeweiligen Verdünnungslösung zum entsprechenden Zeitpunkt angefertigt (exemplarische Aufnahmen s. Abb 17). Auch hier wurde zunächst der prozentuale Anteil an Augen, auf welchen NPs detektierbar waren, bewertet (s. Tabelle 4).

Ergebnisse

Zeit	Lösungsmittel	U2T-12	U4T-12	U4T-18
30 min	TAE			
	splash			
	lipids			
2 h	TAE			
	splash			
	lipids			

Ergebnisse

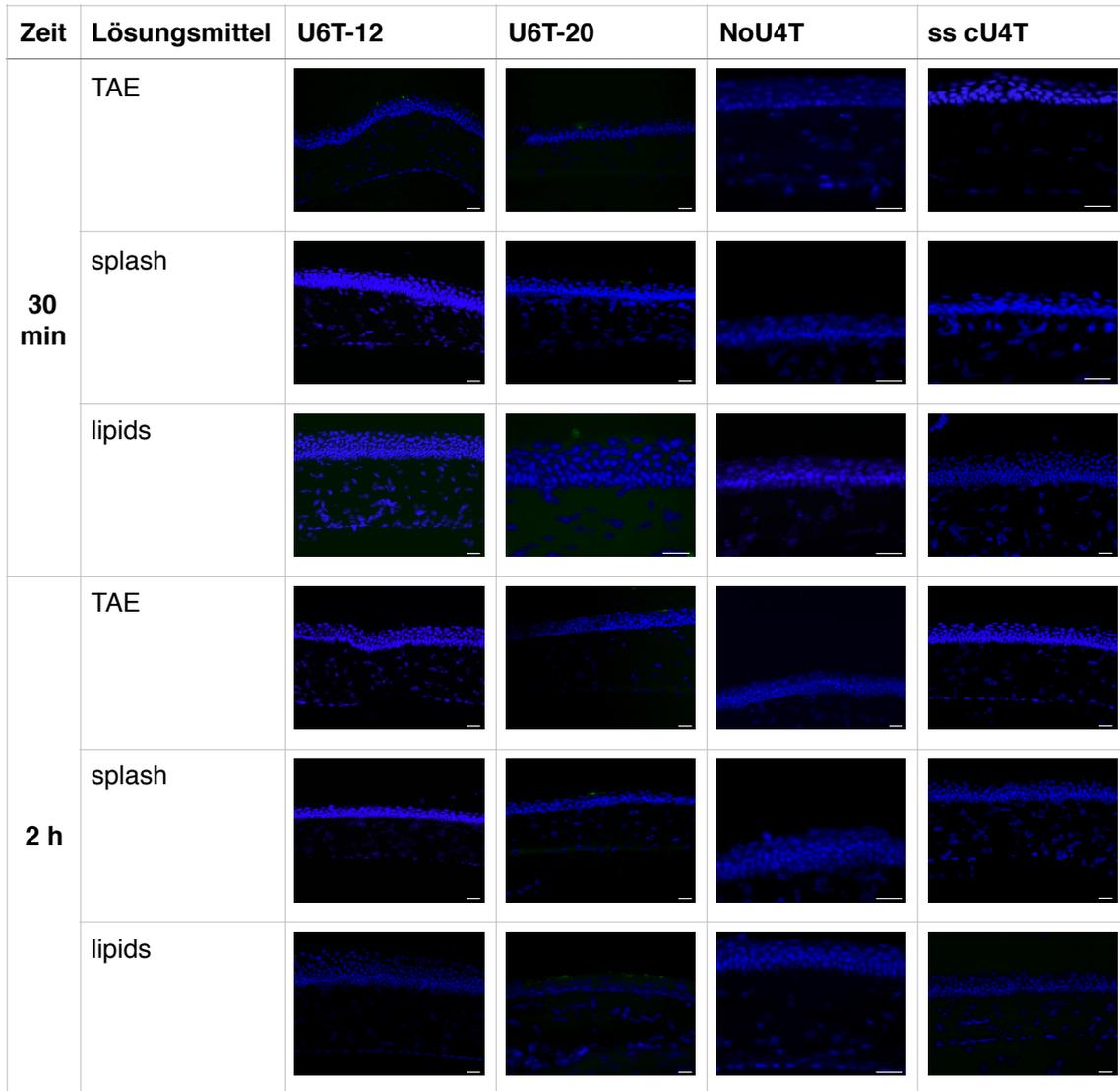


Abbildung 17: Exemplarische Aufnahmen von fünf getesteten Nanopartikeln bei einer Inkubationszeit von 30 min und 2 h in der jeweiligen Verdünnungslösung; der Maßstabsbalken entspricht 30µm; blau dargestellt sind die Zellkerne der Corneaepithelzellen (DAPI-Färbung), grün dargestellt sind die 5' Atto488 modifizierten DNA-Nanopartikel; deutliche Unterschiede zwischen den Verdünnungslösungen ergeben sich insbesondere nach längeren Inkubationszeiten, hier zeigt sich insbesondere für den als best-adhärensten NP identifizierten U4T-12 TAE-Puffer gegenüber den anderen Verdünnungslösungen eine stärkere Adhäsion.

Ergebnisse

		U2T-12	U4T-12	U4T-18	U6T-12	U6T-20	NoU4T	ss cU4T
30 min	TAE	2/4 (50%)	6/6 (100%)	3/5 (60%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
	splash	0/4 (0%)	4/4 (100%)	3/4 (75%)	0/4 (0%)	2/4 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
	lipids	0/4 (0%)	4/4 (100%)	1/5 (20%)	0/4 (0%)	1/4 (25%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
2 h	TAE	0/4 (0%)	4/6 (67%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	2/4 (50%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
	splash	0/4 (0%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)	0/4 (0%)	1/4 (25%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
	lipids	0/4 (0%)	1/4 (25%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	1/4 (25%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)

Tabelle 4: Vergleich der verschiedenen verwendeten Pufferlösungen (TAE-Puffer, Artelac splash (splash) und Artelac lipids (lipids)); dargestellt als X/Y, X entspricht der Anzahl NP-positiver Augen, Y der Gesamtanzahl der jeweils getropften Augen

Bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten zeigten zwei von fünf getesteten Nanopartikeln (U2T-12 und U6T-12), welche in reinem TAE-Puffer verdünnt worden waren, die stärkste Adhärenz gegenüber den anderen Verdünnungslösungen. Bei U6T-20 war der Unterschied etwas geringer ausgeprägt, jedoch war auch hier der mit Puffer verdünnte NP stärker adhärent als der mit Artelac splash verdünnte NP (100% vs. 50%).

Bei einem getesteten NP (U4T-18) war der TAE-Puffer ungefähr gleichwertig zu Artelac splash. U4T-12 zeigte für alle Verdünnungslösungen eine gute Adhärenz nach 30 Minuten. Insgesamt gesehen erbrachten die mit Artelac lipids verdünnten NPs die durchweg schlechteste Adhärenz.

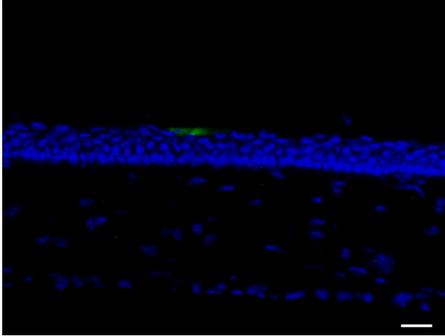
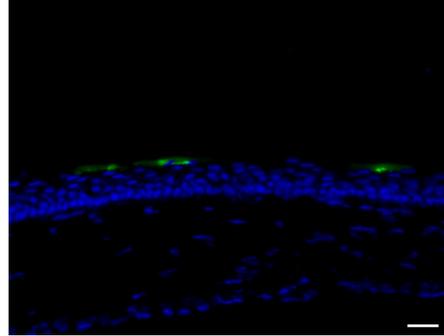
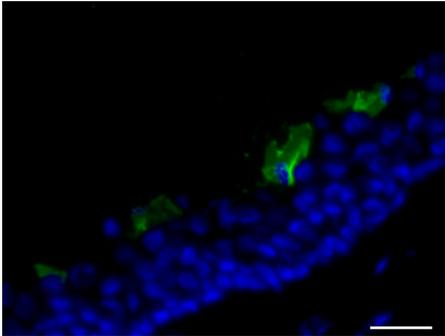
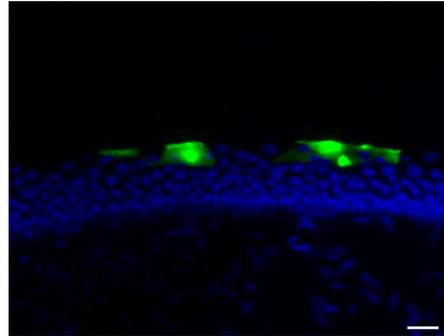
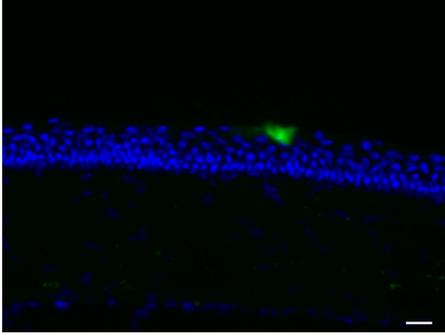
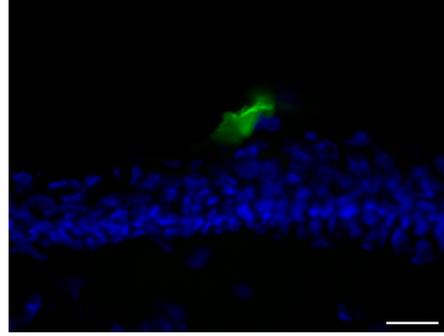
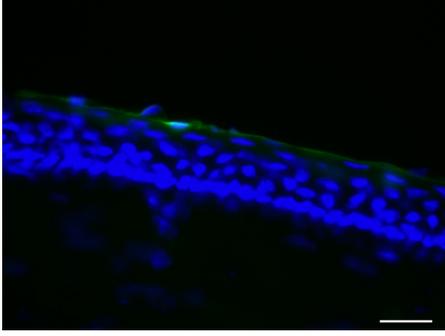
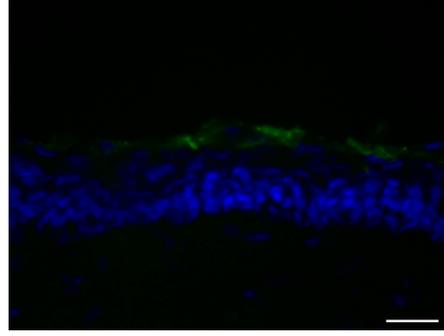
Ergebnisse

Deutliche Unterschiede zwischen den Verdünnungslösungen sind bei längeren Inkubationszeiten zu sehen. Hier sind bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden noch U4T-12 und U6T-20 sowie einmal U4T-18 detektierbar. Insbesondere für U4T-12, welcher in 3.2.1 als der am stärksten adhärenste NP bestimmt wurde (was sich auch hier bestätigt), zeigt sich die stärkste Adhärenz bei Verwendung von reinem TAE-Puffer (67% positive Ergebnisse vs. 50% mit Artelac splash bzw. 25% mit Artelac lipids). Für U6T-20 ergibt sich ebenfalls für den TAE-Puffer die stärkste Adhärenz des NPs (50% mit TAE-Puffer vs. 25% mit Artelac splash bzw. lipids). Die beiden Kontrollen - NoU4T und ss cU4T - waren durchweg negativ (kein NP auf dem Epithel detektierbar).

Zusammenfassend gesehen ergibt sich also für TAE-Puffer die stärkste Adhäsion. Dies gilt insbesondere für den am besten adhärensten NP U4T-12. Bei der Verwendung von Artelac splash und lipids ist die Adhäsion insgesamt schwächer. Die durchweg schwächsten Ergebnisse ergaben sich, wenn Artelac lipids als Verdünnungslösung verwendet wurde.

Deshalb wurde in einem nächsten Schritt U4T-12 in TAE-Puffer und in Artelac splash verdünnt und dann nochmals über mehrere Inkubationszeiten miteinander verglichen (beispielhafte histologische Aufnahmen s. Abb.18). Der prozentuale Anteil an positiven Augen von den insgesamt behandelten Augen wurde wiederum bewertet (s. Tabelle 5).

Ergebnisse

Zeit	U4T-12 in TAE-Puffer	U4T-12 in Artelac splash
15 min		
30 min		
1 h		
2 h		

Ergebnisse

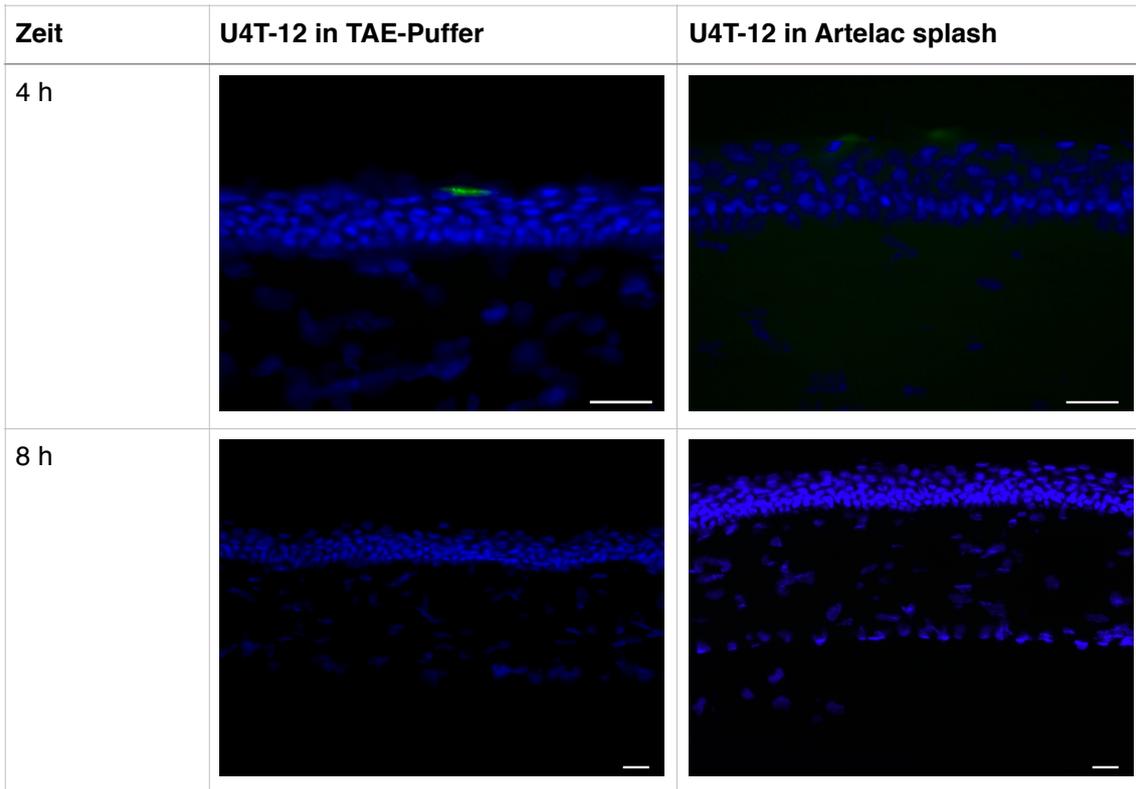


Abbildung 18: Exemplarische Aufnahmen von U4T-12 bei einer Inkubationszeit von 15 min 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h in der jeweiligen Verdünnungslösung; der Maßstabsbalken entspricht 30 μ m; blau dargestellt sind die Zellkerne der Corneaepithelzellen (DAPI-Färbung), grün dargestellt sind die 5' Atto488 modifizierten DNA-Nanopartikel; insgesamt gesehen zeigt sich eine gute Adhäsion bis zu vier Stunden, die visuell deutlichere Adhäsion vor allem bei längeren Inkubationszeiten zeigt sich für TAE-Puffer als Verdünnungslösung.

Zeit	U4T-12 in TAE-Puffer	U4T-12 in Artelac splash
15 min	4/4 (100%)	4/4 (100%)
30 min	6/6 (100%)	4/4 (100%)
1 h	4/4 (100%)	3/4 (75%)
2 h	4/6 (67%)	2/4 (50%)

Ergebnisse

Zeit	U4T-12 in TAE-Puffer	U4T-12 in Artelac splash
4 h	3/4 (75%)	2/4 (50%)
8 h	0/4 (0%)	0/4 (0%)

Tabelle 5: Vergleich der verschiedenen verwendeten Pufferlösungen über engmaschigere Zeitintervalle (TAE-Puffer und Artelac splash) für U4T-12; dargestellt als X/Y, X entspricht der Anzahl NP-positiver Augen, Y der Gesamtanzahl der jeweils getropften Augen, in Klammern der prozentuale Anteil an positiven Augen

Auch hier ist die Adhäsion des in TAE-Puffer verdünnten U4T-12 stärker als für U4T-12 in Artelac splash.

Von insgesamt 28 mit U4T-12 in TAE-Puffer behandelten Augen waren 21 positiv (entspricht 75%). Bei U4T-12 in Artelac splash waren von insgesamt 24 behandelten Augen 15 positiv (entspricht ca. 62%).

Die stärkere Adhäsion des in TAE-Puffer verdünnten NPs gegenüber des in Artelac splash verdünnten NPs zeigt sich insbesondere bei Inkubationszeiten von zwei bis vier Stunden. Hier sind 70% der mit NP-TAE behandelten Augen positiv, während nur 50% der mit NP-splash behandelten Augen positiv sind.

In dieser Versuchsreihe kann außerdem für U4T-12 noch nach vier Stunden eine Adhäsion am Corneaepithel nachgewiesen werden kann. Nach 8 Stunden ist keine Adhäsion mehr nachweisbar.

3.3. Toxizitätsstudien

Ausgewählte Nanopartikel, welche bereits in den o.g. Untersuchungen eine gute Adhärenz aufwiesen, wurden weiterhin bezüglich ihrer möglichen Toxizität untersucht. Dies ist für eine mögliche weitere Verwendung als Medikamententräger essentiell. Zunächst wurde dies an drei verschiedenen okularen Zelllinien durchgeführt und anhand der folgenden drei Parameter untersucht.

Ergebnisse

3.3.1 Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde wie in 2.2.5 beschrieben mittels MTS Viabilitäts-Assay bestimmt. Als Kontrolle wurde eine nur mit TBS-Puffer versetzte Probe verwendet. Es wurde die Zellviabilität der mit U4T-12, U4T-18 und U6T-20 versetzten Zelllösungen bestimmt. Diese drei NPs hatten bisher in der Gesamtbetrachtung insgesamt die besten Ergebnisse erbracht. Anschließend erfolgte die statistische Analyse der Daten (s. Diagramm 1).

Zellviabilität

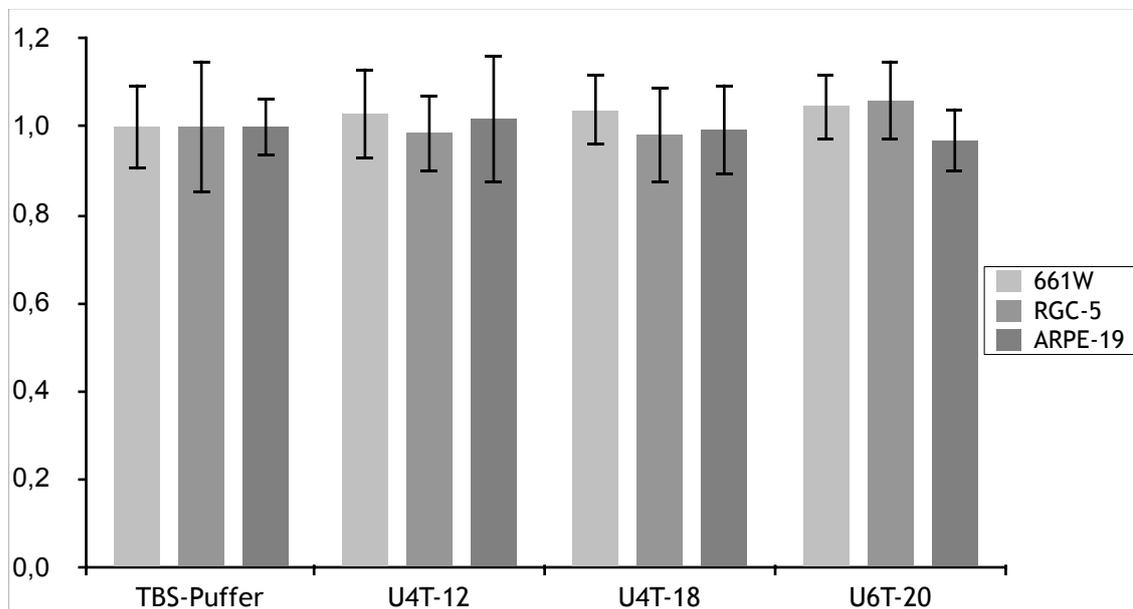


Diagramm 1: Als Balkendiagramm dargestellt ist die Zellviabilität der mit NP-Lösung behandelten Zelllinien im Vergleich zu mit reiner Pufferlösung behandelten Zellpopulationen. Hierbei wurde die Zellviabilität der mit reinem Puffer behandelten Zellen gleich 100% gesetzt und die jeweiligen mit NP-Lösung behandelten Zellen im Vergleich dazu betrachtet. Die Fehlerbalken zeigen jeweils +/- eine Standardabweichung vom Mittelwert an. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 betrachtet.

Es besteht in allen drei Zelllinien - 661W, RGC-5 und ARPE-19 - kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zellviabilität der mit NP-Lösung behandelten Zellen im Vergleich zu mit reinem TBS-Puffer behandelten Zellen.

Ergebnisse

3.3.2 Zellzahl

Die Zellzahl wurde wie in 2.2.5 beschrieben mittels Kristallviolett-Färbung bestimmt und anschließend statistisch ausgewertet (s. Diagramm 2).

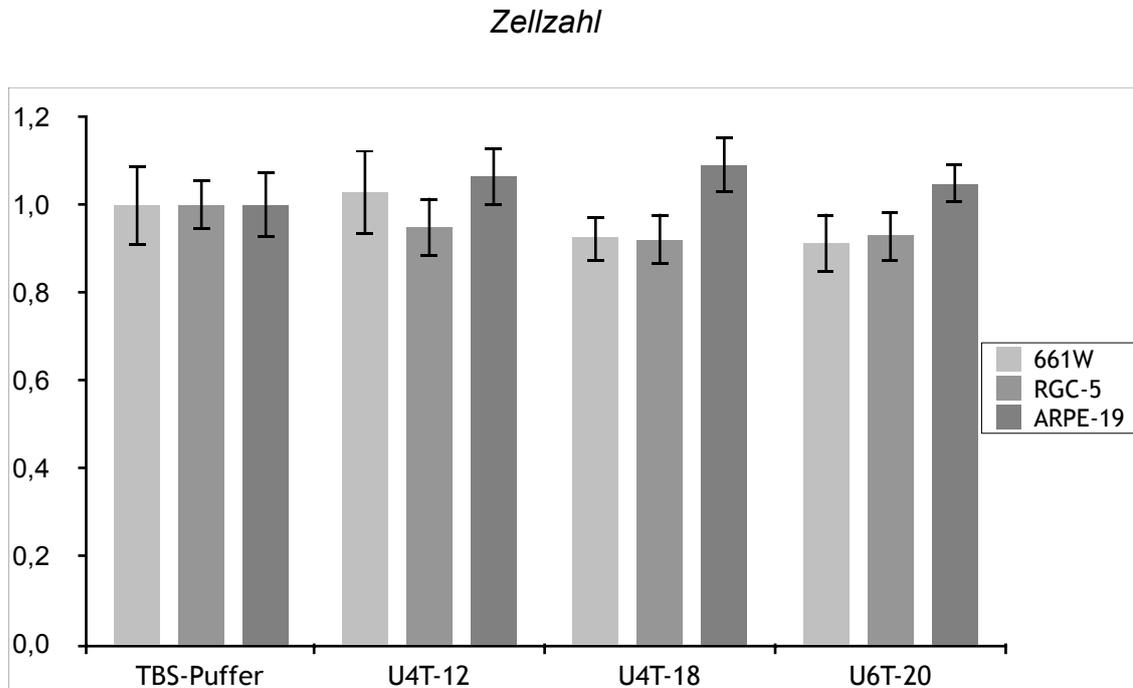


Diagramm 2: Als Balkendiagramm dargestellt ist die Zellzahl der mit NP-Lösung behandelten Zelllinien im Vergleich zu mit reiner Pufferlösung behandelten Zellpopulationen. Hierbei wurde die Zellzahl der mit reinem Puffer behandelten Zellen gleich 100% gesetzt und die jeweiligen mit NiP-Lösung behandelten Zellen im Vergleich dazu betrachtet. Die Fehlerbalken zeigen jeweils +/- eine Standardabweichung vom Mittelwert an. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 betrachtet.

Es zeigte sich in allen drei Zelllinien - 661W, RGC-5 und ARPE-19 - kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zellzahl der mit NP-Lösung behandelten Zellen im Vergleich zu mit reinem TBS-Puffer behandelten Zellen.

3.3.3 Apoptoseinduktion

Die Messung der Apoptoseinduktion erfolgte wie in 2.2.5 beschrieben mittels Caspase 3/7-Aktivitäts-Assay.

Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der Daten (s. Diagramm 3).

Ergebnisse

Apoptoseinduktion

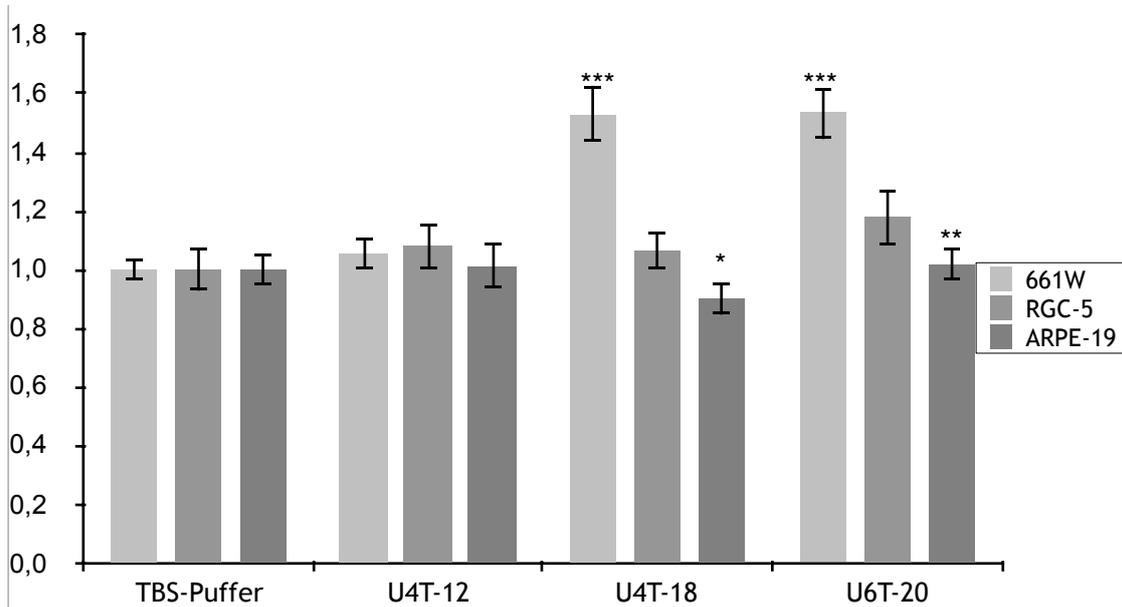


Diagramm 3: Als Balkendiagramm dargestellt ist die Apoptoseinduktion in den mit NP-Lösung behandelten Zelllinien im Vergleich zu mit reiner Pufferlösung behandelten Zellpopulationen. Hierbei wurde die Apoptoseinduktion in den mit reinem Puffer behandelten Zellen gleich 100% gesetzt und die jeweiligen mit NP-Lösung behandelten Zellen im Vergleich dazu betrachtet. Die Fehlerbalken zeigen jeweils +/- eine Standardabweichung vom Mittelwert an. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ betrachtet ($p > 0,05$ -> nicht signifikant; $p < 0,05$ -> *; $p < 0,005$ -> **, $p < 0,0005$ -> ***)

Die mit U4T-12 behandelten Proben weisen hinsichtlich der Apoptoseinduktion in allen drei Zelllinien keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu mit TBS-Puffer behandelten Proben auf. Bei den mit U4T-18 behandelten Proben war in der 661W-Zelllinie eine signifikant größere Apoptoseinduktion nachweisbar. In der ARPE-19 Zelllinien war die Caspase 3/7-Aktivität signifikant vermindert. Mehr als 30% Abweichung von der Kontrolle sind als relevant bzw. kritisch zu betrachten. Bei den mit U6T-20 behandelten Zellpopulationen zeigte sich sowohl in der 661W als auch in der RGC-5-Zelllinie eine signifikant größere Apoptoseinduktion im Vergleich zu mit reiner Pufferlösung behandelten Zellen. Insgesamt gesehen zeigt sich hiermit für U4T-12 keine relevante Toxizität. Für U4T-18 und U6T-20 ergaben sich zumindest in der Apoptoseinduktion relevante Unterschiede im Vergleich zur reinen Pufferlösung. Daher wurde für die weiterführenden Versuche U4T-12 weiterverwendet. Da sich in 3.2.2 TAE-Puffer als

Ergebnisse

bestgeeignetste Pufferlösung erwiesen hatte, wurde für die weiterführenden Versuche mit Antibiotikabeladung U4T-12 in TAE-Puffer verwendet.

3.4 In-vivo-Adhäsion von an U4T-12 gekoppeltem Kanamycin

Die Durchführung der Versuche erfolgte wie in 2.2.4 beschrieben. Die Ratten wurden nun mit an U4T-12 via Aptamer gekoppeltem Kanamycin behandelt. Im Tierversuch an der Ratte zeigte sich eine gute Adhäsion der Kanamycin-NPs (U4T-12-Kan) mit einer Verweildauer von bis zu zwei Stunden an der Corneaoberfläche. Nach vier Stunden konnten keine Kan-Nanopartikel mehr nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe, welche nur mit fluoreszenzmarkiertem Antibiotikum behandelt worden war, konnte bereits nach fünf Minuten keine Adhäsion mehr nachgewiesen werden (s. Abb. 19)

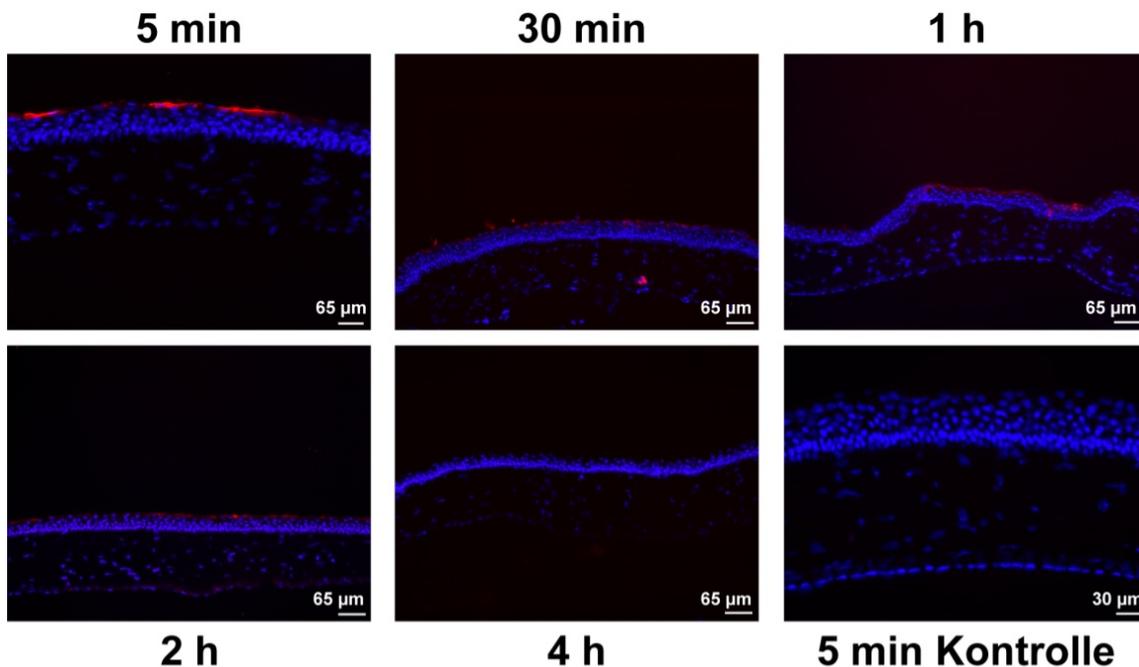


Abbildung 19: Exemplarische Aufnahmen von U4T-12-Kan in TAE-Puffer bei einer Inkubationszeit von 5 min, 30 min, 1 h, 2 h, und 4 h am Rattenauge; der Maßstabsbalken entspricht den angegebenen Werten; blau dargestellt sind die Zellkerne der Corneaepithelzellen (DAPI-Färbung), rot dargestellt sind die 5' Cy3 modifizierten Kan-Nanopartikel; insgesamt gesehen zeigt sich eine gute Adhäsion bis zu zwei Stunden nach Behandlung, während die Kontrollen bereits nach fünf Minuten negativ sind.

3.5 In-vitro-Adhäsion von an U4T-12 gekoppeltem Kanamycin an humanem Gewebe

Bei der In-vitro-Behandlung von humaner Cornea konnte ebenfalls eine gute Adhäsion von U4T-12-Kan gezeigt werden. Der Kanamycin-NP-Komplex war nach bis zu zwei Stunden Waschzeit (zur Simulation von Blinzeln und Tränen Drainage) an der Corneaoberfläche nachweisbar. Auch hier war die Kontrolle, welche nur mit dem freien fluoreszenzmarkierten Antibiotikum behandelt worden war, bereits nach fünf Minuten Waschzeit negativ, d.h. das Antibiotikum bereits ausgewaschen (s. Abb. 20).

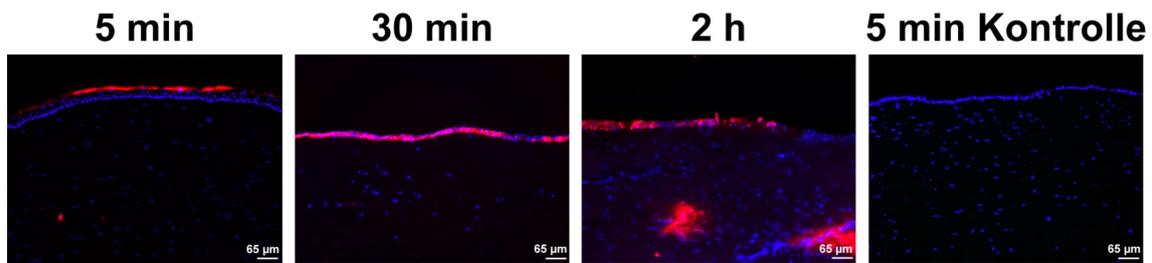


Abbildung 19: Exemplarische Aufnahmen von U4T-12-Kan in TAE-Puffer bei einer Inkubationszeit von 5 min 30 min, 1 h, 2 h, und 4 h an humaner Cornea; der Maßstabsbalken entspricht den angegebenen Werten; blau dargestellt sind die Zellkerne der Corneaepithelzellen (DAPI-Färbung), rot dargestellt sind die 5' Cy3 modifizierten Kan-Nanopartikel; insgesamt gesehen zeigt sich eine gute Adhäsion bis zu zwei Stunden Waschzeit, während die Kontrollen bereits nach fünf Minuten negativ sind.

3.6 Fluorophotometerversuche zur Ex-vivo-Quantifizierung der Kanamycin-Nanopartikel

In 3.4 und 3.5 konnte eine gute Adhärenz der Kan-NP an cornealem Gewebe nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung der Menge von Kan-NP auf der Corneaoberfläche wurde eine Messung der Fluoreszenzintensität mittels Fluorophotometrie durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Fluoreszenzintensität (Einheit RFU = *relative fluorescence units*) über das gesamte Auge zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 24 h) gemessen (s. Abb. 20).

Ergebnisse

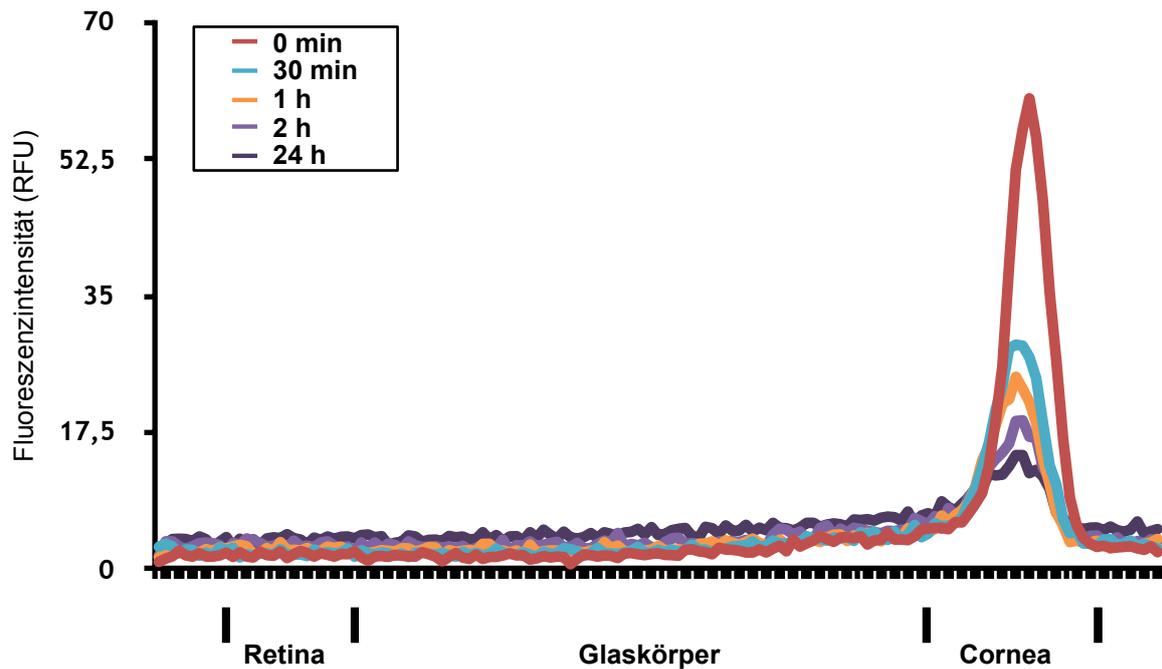


Abbildung 20: Gemessene Fluoreszenzintensität der Kan-NP über das gesamte Auge zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten; die Fluoreszenzintensität nimmt mit der Zeit ab, es zeigt sich nur im Bereich der Cornea Fluoreszenz.

Um die Menge der NPs auf der Corneaoberfläche abzuschätzen, wurde das Signal anschließend integriert und der Zeitpunkt 0 jeweils auf 100 Prozent gesetzt (s. Abb. 21).

Ergebnisse

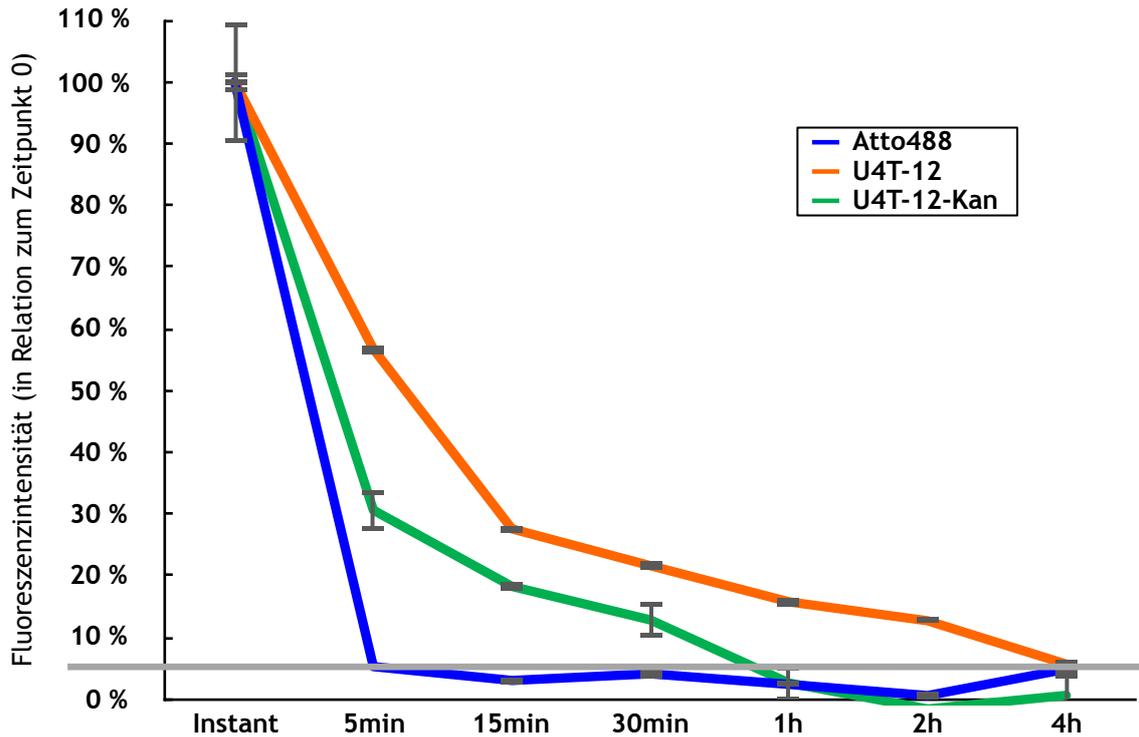


Abbildung 20: Fluoreszenzintensität in Relation zum Zeitpunkt 0 (100%) für U4T-12, U4T-12-Kan sowie das alleinige Fluorophor Atto488 (als Kontrolle), der graue Balken stellt die Autofluoreszenz der Schweinecornea dar; es lässt sich über die Zeit insgesamt für alle drei Proben eine Abnahme beobachten, für U4T-12 und U4T-12-Kan verläuft diese jedoch langsamer.

Das reine Fluorophor ist bereits nach fünf Minuten nicht mehr nachweisbar, das Signal entspricht zu diesem Zeitpunkt bereits in etwa der Autofluoreszenz der Schweinecornea. Sowohl U4T-12 alleine, als auch U4T-12-Kan zeigen eine verlängerte Fluoreszenz und somit eine verlängerte Adhäsion. Hierbei ist U4T-12-Kan mindestens 30 Minuten nachweisbar und U4T-12 alleine mindestens zwei Stunden.

3.7 In-vitro-Evaluation der antibiotischen Aktivität auf Schweinecornea

Die Versuche aus 3.4, 3.5 und 3.6 zeigen eine gute Adhäsion von U4T-Kan sowohl am Rattenaugen in vivo als auch an Schweinecornea sowie menschlichem Gewebe in vitro. Ferner war nun zu klären, ob das Antibiotikum im U4T-Kan-Medikamentenkomplex noch eine Wirksamkeit zeigt. Dies wurde

Ergebnisse

im Folgenden in vitro an Schweinecorneae mittels *E. coli*-Kulturversuchen untersucht.

Die Schweinecorneae wurden wie in 2.2.9 beschrieben entweder mit reinem Puffer behandelt (als Kontrolle) oder es wurde freies Kanamycin bzw. der U4T-12-Kan Nanopartikel verwendet. Die nur mit Puffer behandelte Probe wurde gleich 100 Prozent gesetzt, die jeweils anderen Proben in Relation dazu. Wurde nicht gewaschen (0 min), zeigte sich sowohl für das freie Kanamycin als auch für U4T-12-Kan eine signifikante Reduktion des Bakterienwachstums. Bereits ab einer Waschzeit von fünf Minuten sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Für das freie Kanamycin kann hier kein signifikanter Unterschied im Bakterienwachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mehr nachgewiesen werden. Der U4T12-NP zeigt bis zu 30 Minuten Waschzeit eine signifikante Reduktion des *E. coli*-Wachstums sowohl im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle, als auch mit der mit reinem Kanamycin behandelten Probe. Nach 60 Minuten kann weder für das freie Kanamycin noch für U4T-12-Kan eine signifikante Reduktion des Bakterienwachstums gezeigt werden (exemplarische Aufnahmen s. Abb. 20; Auswertung s. Diagramm 4).

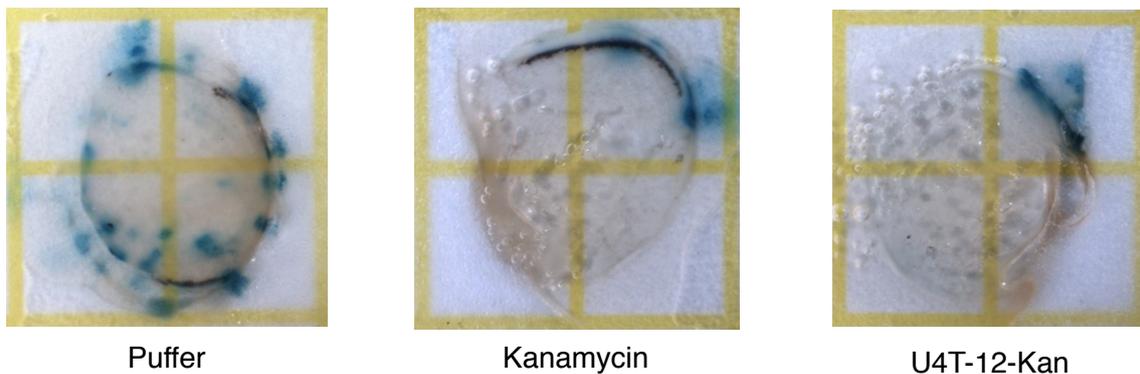


Abbildung 20: Exemplarische Aufnahmen von mit Puffer, freiem Kanamycin bzw. U4T-12-Kan behandelter Cornea auf dem jeweiligen Petrifilm bei einer Waschzeit von 0 min, blau dargestellt sind die *E. coli*-Kolonien, welche anschließend ausgezählt und statistisch ausgewertet wurden (s. Diagramm 4).

Ergebnisse

Bakterienwachstum auf behandelten Hornhäuten

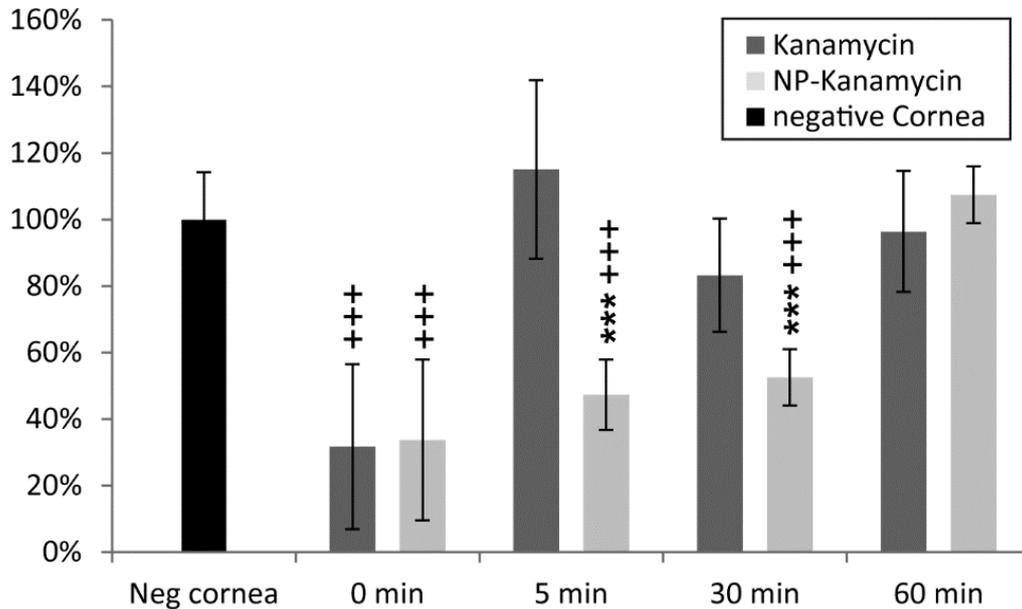


Diagramm 4: Als Balkendiagramm dargestellt ist das Bakterienwachstum von mit reinem Puffer (Neg. cornea), freiem Kanamycin und U4T-12-Kan behandelten Corneae, auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Waschzeiten aufgetragen; die Kolonienzahl der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Kolonienzahlen der antibiotisch behandelten Hornhäute in Relation dazu. Statistische Signifikanzen sind mit *** für $p < 0,001$ in Bezug auf die Kontrolle dargestellt. Unterschiede zwischen Kanamycin und Kan-NP werden als +++ für $p < 0,001$ gezeigt; die Kan-Nps hemmen das Bakterienwachstum sechsmal länger als das freie Antibiotikum.

Hier kann somit eine fortbestehende Funktionstüchtigkeit von Kanamycin im Kan-NP-Komplex nachgewiesen werden.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1 Kurze Adhäsionszeit gängiger Augentropfen auf der Corneaoberfläche

Entsprechend der gängigen Lehrmeinung bestätigte sich in o.g. Versuchen eine kurze Halbwertszeit der topisch applizierten Augentropfen auf der Augenoberfläche in vivo. So konnte gezeigt werden, dass reine fluoreszenzmarkierte DNA ohne Alkylmodifikation und somit nicht in Form eines Nanopartikels im lebenden Modell an der Ratte bereits nach 30 Minuten nicht mehr nachweisbar war (s. Kontrollen in 3.2.1.). Hier wurde allerdings kein gängiges Medikament als Kontrolle verwendet, sondern nur das reine DNA-Trägermaterial des verwendeten Nanopartikels. Es kann jedoch angenommen werden, dass sich Auswaschrates und Adhäsionszeit für gängige Medikamente abhängig von Medikament, Medikamentengröße und -ladung ähnlich verhalten. Ein im Rahmen dieser Arbeit untersuchtes Medikament war Kanamycin. Das reine fluoreszenzmarkierte Antibiotikum war in mehreren Versuchsreihen bereits nach fünf Minuten nicht mehr nachweisbar (s. 3.4 und 3.5). Hiermit wird die generelle Problematik der Medikamentenapplikation am vorderen Augenabschnitt, welche bereits in der Einleitung beschrieben wird, nochmals bestätigt.

4.2 Deutlich verlängerte Adhäsion der getesteten DNA-Nanopartikel

Im Gegenzug zu den verwendeten Kontrollen konnte die Adhäsionszeit am cornealen Epithel durch Verwendung der getesteten Nanopartikel deutlich verlängert werden. In unseren Versuchen waren die DNA-NPs bis zu vier Stunden nach Applikation am lebenden Tier nachweisbar. Als best-adhärenter Nanopartikel wurde U4T-12 identifiziert. Hier besteht ein Verhältnis von 2:1 von unmodifizierten Basen zu alkylmodifizierten Basen. Ein höherer oder niedriger Anteil an alkylmodifizierten Basen führte zu einer schlechteren Adhärenz.

Auch die Gesamtlänge des verwendeten DNA-Strangs spielte eine Rolle in Bezug auf die Adhäsion an der Augenoberfläche. Insgesamt gesehen zeigten DNA-Stränge, welche ungefähr den gleichen prozentualen Anteil an alkylmodifizierten Basen aufwiesen, eine schlechtere Adhärenz, je länger der DNA-Strang insgesamt war.

Somit spielen für die Konstruktion des jeweiligen Nanopartikels sowohl der alkylomodifizierte Anteil, als auch die Gesamtlänge des DNA-Strangs eine entscheidende Rolle in puncto Adhäsion am cornealen Epithel. Dieses Ergebnis ist ein entscheidender Faktor für die spätere Konstruktion des jeweiligen Nanopartikels. So können durch Modifikation der Basenzahl und des alkylomodifizierten Anteils unterschiedliche Halbwertszeiten erreicht werden und somit ein auf das jeweilige Medikament und den Patienten zugeschnittener Verbleib am Wirkort erreicht werden.

4.3 Mögliche Modifikationen des Nanopartikels

Auch verschiedene Modifikationen des als best-adhärenten Nanopartikels identifizierten U4T-12 erbrachten positive Ergebnisse in vitro und in vivo. Hier sei zunächst U12R-36 zu nennen (im Prinzip dreifach aneinandergelinktes U4T-12), während U20R-60 (fünffach aneinandergelinktes U4T-12) in vivo keinerlei Adhäsion zeigte. Dies zeigt, dass eine Vergrößerung des Moleküls trotz Erweiterung um weitere lipidmodifizierte Basen keine Verbesserung der Adhärenz schafft.

Eine weitere Modifikation des Nanopartikels U2T-12, nämlich U2M-12 zeigte ebenfalls keinerlei Adhärenz ans Corneaepithel. Alkylomodifizierte Basen, welche in der Mitte der Basensequenz stehen und somit nicht endständig sind, haben somit keinen Einfluss auf eine verbesserte Adhäsion.

4.4 Zeitabhängigkeit der Adhäsion

In den In-vivo-Versuchen war nicht nur eine gute Adhäsion der Nanopartikel am Corneaepithel nachweisbar. Es zeigte sich auch, dass die Adhäsion von der Zeit abhängig war. Mit zunehmender Dauer nahm die Adhäsion ab. Diese Zeitabhängigkeit ist vergleichbar mit gängiger topischer Medikation.

Allerdings waren die Adhäsionszeit insgesamt und somit auch der späteste Zeitpunkt, an dem noch Nanopartikel nachgewiesen werden konnten, deutlich verlängert. U4T-12 war noch nach mindestens vier Stunden am Corneaepithel lebender Ratten nachweisbar, während Kontrollsequenzen ohne Alkylomodifikation bereits nach 30 Minuten nicht mehr nachzuweisen waren. Ähnliche Ergeb-

nisse zeigten sich für U4T-12 und U4T-12-Kan in den Fluorophotometerversuchen. Auch hier konnte eine zeitabhängige *Clearance* gezeigt werden, welche jedoch im Vergleich zur Kontrolle deutlich verlängert war.

Dieses zeitabhängige Verhalten der *Clearance* sollte auch spätere Berechnungen in Bezug auf mögliche Kumulationsdosen eines Medikaments vereinfachen. Durch eine deutlich verlängerte Adhäsionszeit sollte es in Zukunft einfacher sein, einen gewissen Medikamentenspiegel bei niedrigerer Tropffrequenz zu halten.

4.5 Verwendete Verdünnungslösung

In 3.2.2 konnte gezeigt werden, dass reiner TAE-Puffer als verwendete Verdünnungslösung durchweg gleiche bis bessere Ergebnisse in Bezug auf die Adhärenz des Nanopartikels an der Corneaoberfläche zeigt. Dies ist auch für eine spätere klinische Anwendung von Vorteil. Höhergradig visköse Augentropfen, welche beispielsweise Hyaluronsäure oder Carbomere enthalten (wie beispielsweise die Tränenersatzmittel Artelac® splash und lipids), verursachen häufig Schwommensehen [39], teilweise für eine Dauer von Minuten. Dies führt wiederum dazu, dass die *Compliance* reduziert ist, da eine Anwendung beispielsweise im Arbeitsalltag nicht gut praktikabel ist. Die Verwendung von reinem wässrigem TAE-Puffer kann diese Problematik vermeiden und somit ggf. bei gleicher bzw. sogar besserer Wirksamkeit zu einer verbesserten *Compliance* führen.

4.6 Toxizitätsstudien

Der best-adhärente Nanopartikel U4T-12 zeigte in Bezug auf Zellviabilität, Zellzahl und Apoptoseinduktion keinerlei Toxizität auf drei okularen Zelllinien (RGC-5, ARPE-19, 661W). Es handelt sich hierbei jedoch um retinale Zelllinien. Die Herkunft der RGC-5 Zelllinie wird aktuell diskutiert, zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung ging man jedoch noch davon aus, dass es sich um eine etablierte retinale Ganglienzelllinie handelte. Da der Nanopartikel in Zukunft zunächst topisch auf der Corneaoberfläche angewendet werden soll, sollte in einem

nächsten Schritt eine mögliche toxische Wirkung auf corneale Epithelzellen getestet werden.

4.7 Fluorophotometerversuche

Wie in 4.3 bereits beschrieben besteht eine Zeitabhängigkeit der Adhäsion. Auffällig ist hier, dass U4T-12 deutlich länger adhärent ist, als U4T-12-Kan, obwohl es sich um denselben Nanopartikel handelt. Hier kann hypothetisch angenommen werden, dass U4T-12-Kan schlechter adhärent ist, da das Molekül durch die Nutzung von Aptameren und die Antibiotikabeladung deutlich größer und etwas anders konformiert ist. Nichtsdestoweniger ist die Adhäsion gegenüber der Kontrolle auch hierfür noch deutlich verlängert.

4.8 Vergleich zu anderen Nanopartikeln als potentielle Medikamententräger in der Augenheilkunde

4.8.1 Polymere Nanopartikel

Der Fokus in der Entwicklung von Nanopartikeln liegt momentan auf polymeren Nanopartikeln. Die Herstellung dieser Nanopartikel erfolgt meist durch die Produktion polymerer Mizellen bestehend aus einer Hülle geeigneter Polymere (meist amphiphil), welche dann im Kern mit dem entsprechenden Medikament beladen werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Beladung der Hülle. Die Medikamentenfreisetzung erfolgt somit durch Diffusion aus dem Inneren/der Hülle des Nanopartikels. Die entstehende Lösung besteht dann aus den geformten mit dem Medikament beladenen Polymermizellen sowie einem Lösungsmittel und einem Anteil an gelöstem Medikament (da dieses aus dem Nanopartikel freigesetzt wird).

Die Herstellung ist relativ einfach. Es gibt ausreichend Polymere, welche an sich nicht toxisch auf den menschlichen Körper einwirken (z.B. Chitosan, PLGA). Viele der bisherigen entwickelten Nanopartikel sind jedoch in Bezug auf die Toxizität nicht ausreichend untersucht.

Getestete Chitosan-Nanopartikel zeigten in vitro an humanen Konjunktivaepithelzellen nach einem 24h Erholungsintervall im Anschluss an eine Behand-

lung mit reiner Pufferlösung bzw. verschiedenen Chitosan-NP-Lösungs-Konzentrationen ein signifikant geringeres Zellüberleben auf der Seite der Chitosan behandelten Probe [40]. In einer 24h-Anwendung in vivo (am Hasenmodell) zeigten sich jedoch in der Untersuchung keine Unterschiede zwischen behandeltem und nicht behandeltem Auge. Auch histologisch ergaben sich intakte okuläre Oberflächenstrukturen [40]. Eine intravitreale Anwendung durch Prow et al. zeigte wiederum eine akute Entzündungsreaktion im Glaskörperraum [41].

Auch in Bezug auf PLGA-Nanopartikel wurden teilweise Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt. Hier zeigte sich in einem modifizierten Draize Test keine okuläre Irritation nach bis zu 24h nach der letzten Anwendung von Diclofenac-beladenen-PLGA-Nanopartikeln im Kaninchenmodell [42]. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für Eudragit (Acrylat Copolymere) [41]. Insgesamt gesehen bestehen jedoch keine Langzeit-Toxizitäts-Untersuchungen.

Die gebildeten Nanopartikel sind nicht uniform, d.h. sie variieren in ihrer Größe. Es wird auch über eine begrenzte Langzeit-Stabilität des Polymer-Medikamentenkomplexes berichtet. So wurde beispielsweise bei entwickelten mit 5-FU beladenen Chitosan-Nanopartikeln bei Lagerung über einen Monat als Nanosuspension eine Zunahme des freien Medikaments, bedingt durch Freisetzung aus den Mizellen beobachtet [43].

In Bezug auf die Halbwertszeit des verwendeten Medikaments ergaben sich bei den polymeren Nanopartikeln positive Ergebnisse. So wurde bei entwickelten 5-FU-Chitosan-Nanopartikeln in vivo (am Kaninchenmodell) über einen Zeitraum von acht Stunden durchweg höhere Kammerwasserkonzentrationen gemessen [43]. Untersuchte Natamycin-Chitosan/Lecithin-Nanopartikel zeigten in vivo am Kaninchenmodell abgesehen von den ersten ca. 30 min durchweg höhere Konzentrationen in der untersuchten Tränenflüssigkeit [44]. Insgesamt gesehen kann also durch Verwendung polymerer Nanopartikel wie auch bei den untersuchten DNA-Nanopartikeln eine Verlängerung der Halbwertszeit erreicht werden.

Ein möglicher Nachteil ist, dass verwendete Polymere und Herstellungsmethode an das Zielmedikament angepasst werden müssen. So benötigen hydrophile Medikamente andere Hüllpolymere als hydrophobe Medikamente. Auch eine Beladung ist nur mit Medikamenten begrenzter Molekülgröße möglich.

Die entwickelten DNA-NPs sind jedoch als generelles Trägersystem gedacht. Ihre Beladung in Zukunft soll mit vielen verschiedenen Medikamenten möglich sein, ohne die jeweilige Grundstruktur verändern zu müssen. Die DNA-Nanopartikel können sowohl durch Nutzung einer kovalenten Bindung als auch eines Aptamers (wie bei U4T12-Kan), welches an den U4T-12-Grundbaustein gekoppelt ist, beladen werden. Ebenso ist die Bildung mizellarer Strukturen möglich.

In Bezug auf mögliche Toxizität müssen wie bei den Polymeren noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Ein Vorteil der Verwendung von DNA als Grundbaustein ist jedoch, dass es sich um körpereigenes Material handelt und damit vom Körper durch Spaltung mittels körpereigener DNAsen abgebaut werden kann und somit eine Kumulation unwahrscheinlich ist.

4.8.2 Hydrogele

Hydrogele Nanopartikel oder auch „Nanogelee“ vereinen die Eigenschaften eines Hydrogels sowie eines Nanopartikels. Die Herstellung kann beispielsweise aus synthetischen Polymeren sowie natürlichen hydrophilen Polymeren erfolgen (beispielsweise Chitosan) [45]. In der Regel wird hierbei ein Monomer mit einem Cross-linker copolymerisiert [46]. Der Vorteil der Verwendung natürlicher Polymere liegt in einer besseren Bioabbaubarkeit sowie ihrer Interaktion mit Proteinen und Zellen, was teils erwünscht sein kann. Allerdings zeigen sie zumeist eine geringere mechanische Festigkeit und verstärkte Immunogenität im Vergleich zu synthetischen Polymeren. Da hier ebenfalls Polymere zur Herstellung verwendet werden, gelten die o.g. Nachteile der Polymere teils auch für die Nanogelee.

Eine mögliche Anwendung sind beispielsweise in-situ-gelierende Hydrogele, welche beispielsweise abhängig von pH oder Temperatur im Körper gelieren

und dementsprechend auch als Augentropfen auf der Cornea verwendbar sind, wo es dann zur Gelbildung kommt. Momentan finden Hydrogele allerdings hauptsächlich in der Herstellung weicher Kontaktlinsen ihre Anwendung. Diese können wiederum auch mit einem Medikament beladen werden (drug-eluting contact lens) [47]. Nachteile sowohl bei in-situ-gelierenden Gelen wie auch den medikamentenfreisetzenden Kontaktlinsen sind aber wiederum ein Fremdkörpergefühl sowie möglicherweise entstehendes Verschwommensehen. Es kann hiermit zwar ggf. eine verlängerte Retentionszeit des Medikaments an der Cornea erreicht werden, o.g. Nachteile jedoch nicht umgangen werden.

Da die hier entwickelten DNA-Nanopartikel in einfachem TAE-Puffer gelöst sind, vereinen sie im Gegensatz zu den Hydrogelen den Vorteil einer verlängerten Adhäsionszeit mit der einfachen Anwendung reiner wässriger Augentropfen, welche kein Verschwommensehen sowie Fremdkörpergefühl nach sich ziehen.

4.8.3 Liposomen

Es wurden ebenfalls verschiedenste liposomale Nanopartikel entwickelt. Auch hier zeigte sich eine verlängerte präcorneale Retentionszeit sowie ein verbesserter transcornealer Durchtritt des verwendeten Medikaments. Probleme bereiten jedoch weiterhin bedingt durch die Komplexität ihrer Struktur eine begrenzte Langzeit-Stabilität.

Liposomen können mit unterschiedlicher Oberflächenladung hergestellt werden (positiv/neutral/negativ geladen). Diese kann bzw. muss dann an das gewünschte Medikament angepasst werden. Bei von *Hathout et al.* untersuchten Acetazolamid-Liposomen war die Beladungskapazität bei positiv geladenen Liposomen am größten (Acetazolamid ist eine schwache Säure und somit negativ geladen) [48]. Diese Eigenschaft bedeutet allerdings auch, dass die liposomalen Nanopartikel für jedes Medikament unterschiedlich zusammengesetzt sein müssen, um eine optimale Beladung zu garantieren.

Ein weiteres Problem hierbei ist, dass positiv geladene Liposomen bevorzugt an der negativ geladenen Oberfläche der Cornea abgefangen werden. Außerdem zerfallen die Lipid-Vesikel auf der negativ geladenen Oberfläche der Muzin-

schicht, was zu einer begrenzten Langzeit-Stabilität der Lipid-Aggregate an der Corneaoberfläche führt [46].

Die hier diskutierten DNA-Nanopartikel bestehen demgegenüber immer aus demselben Grundbaustein. Das Medikament wird dann über verschiedene Möglichkeiten (via Aptamer/ kovalenter Bindung /mizellenförmig eingeschlossen) an den Grundbaustein gebunden. Dieser muss nicht an Hydro-/ Lipophilie des Medikaments angepasst werden. Die Stabilität der gebildeten Mizellen an der Corneaoberfläche müsste noch weiterführend untersucht werden. Es kann zwar eine deutlich verlängerte Adhäsionszeit der mittels Fluorophor visualisierten Nanopartikel und Kanamycin-Nanopartikel gezeigt werden, wobei jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden kann, ob es zum Zerfall der Mizellen kommt, da das Fluorophor an einen DNA-Strang gekoppelt ist. Eine anderweitige histologische Darstellung ist jedoch schwierig, da eine Färbung gegen DNA bei der Verwendung der getesteten Substanz auf biologischem Material nicht sinnvoll ist.

4.8.4 Niosomen

Niosomen sind eine spezielle Form der Liposomen, welche amphiphiler Natur sind und aufgrund ihrer Grundbausteine eine bessere Langzeitstabilität als Liposomen aufweisen.

Hier wurden beispielsweise Gentamicin-haltige Niosomen entwickelt, welche in vitro eine verlängerte Freisetzung des Medikaments zeigen. Fehlend sind hier aber In-vivo-Versuche, welche eine tatsächliche Verlängerung der Adhäsionszeit und somit der Wirkdauer zeigen. Außerdem befinden sich die hier entwickelten Niosomen nicht im Nanometerbereich (ca. 0,98-1,37 μm). Auch die Toxizität wurde nur in Bezug auf Augenirritation und -rötung am Albinohasen getestet [28].

Da die Partikelgröße hier eher im Mikrometerbereich liegt, gehen vorteilhafte Eigenschaften der Nanopartikel, wie beispielsweise eine vereinfachte Aufnahme über Diffusion oder Endozytose, verloren.

4.8.5 Dendrimere

Dendrimere sind weitverzweigte Moleküle, welche im Inneren mit Medikamenten beladen werden können. Das meist verwendete Dendrimer ist Polyamidoamin (PAMAM), es existieren jedoch noch weitere biokompatible Dendrimere.

In-vivo-Untersuchungen bezüglich ihrer Retentionszeit am Corneaepithel wurden bisher jedoch nur wenige durchgeführt. Die meisten Daten beziehen sich auf In-vitro-Versuche [49]. Ein Beispiel ist hier ein mit Carteolol reagierendes Phosphor-enthaltendes Dendrimer [49]. In den diesbezüglich durchgeführten In-vivo-Versuchen war zunächst keine Irritation der Augen am Albinohasen festzustellen. Genaue Toxizitätsuntersuchungen fehlen jedoch. Das Carteolol-Dendrimer zeigt nach vier Stunden vergleichbare Kammerwasserkonzentrationen wie Carteolol alleine. Im Rahmen dieser Untersuchung zeigt nur eine schlecht lösliche Dendrimervariante höhere Kammerwasserkonzentrationen als Carteolol alleine nach vier Stunden [49]. Bei schlechterer Löslichkeit ist allerdings wieder zu bedenken, dass es ggf. zu Verschwommensehen kommen kann. Außerdem interagiert das hier entwickelte Dendrimer mit seiner Carbonsäuregruppe mit einer Aminogruppe des Carteolols. Dies bedeutet allerdings, dass das Trägermolekül Dendrimer an das gewünschte Medikament angepasst werden muss, um eine Interaktion zu gewährleisten.

Weitere untersuchte PAMAM-Dendrimere zeigten eine Verlängerung der präcornealen Retentionszeit sowie eine leichte Verbesserung der miotischen bzw. mydriatischen Antwort in Verbindung mit Pilocarpin bzw. Tropicamid. Hier sind die verwendeten Medikamente allerdings nicht an das Dendrimer gebunden, sondern das Dendrimer sorgt vermutlich für eine erhöhte Adhäsion an der Cornea, während das Medikament nur langsamer aus dem Komplex freigesetzt wird [29]. Auch hier fehlen Untersuchungen in Bezug auf Toxizität oder Verträglichkeit.

Insgesamt gesehen können Dendrimere ein mögliches Vehikel darstellen, um eine verlängerte Retentionszeit an der Corneaoberfläche zu erreichen. Bisher gibt es hierzu allerdings noch keine klinische Anwendung. Auch Untersuchungen in Bezug auf die mögliche Toxizität sind eher spärlich. Außerdem muss das

verwendete Medikament angepasst werden. Auch von möglichem Verschwommensehen bei bestimmten Dendrimeren wird berichtet.

Dagegen sollten die hier entwickelten DNA-Nanopartikel im Vergleich zu den Dendrimeren kein Verschwommensehen provozieren. Gegebenenfalls könnte noch die Viskosität weiterführend untersucht werden. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass der Grundbaustein des entwickelten NPs U4T-12 nicht aufwendig an das verwendete Medikament angepasst werden muss.

4.8.6 Cyclodextrine

Hierbei handelt es sich um cyclische Oligosaccharide von 6-8 Glucoseuntereinheiten, welche beispielsweise mit Medikamenten Inklusionskomplexe bilden.

Ein für die Anwendung von Augentropfen ausführlich untersuchtes Cyclodextrin ist 2-hydroxypropyl- β -Cyclodextrin.

Bei ihrer Anwendung werden v.a. drei Probleme beschrieben. Erstens eine mögliche Penetration in die Cornea oder andere okuläre Gewebe, was eher für lipophile Moleküle möglich ist, und somit eine mögliche Irritation herbeiführt. Zweitens eine Extraktion bestimmter Komponenten aus der Cornea wie beispielsweise Phospholipide oder Cholesterol (Membranbestandteile). Dies kann die corneale Penetration fördern, allerdings auch zu Irritation der Augen führen. Drittens wird auch eine mögliche Verkrustung der Augenlider insbesondere bei Lösungen mit hohem Cyclodextrinanteil und trockenen Augen beschrieben [30].

Hier gibt es bereits einige randomisierte klinische Studien zu entwickelten Medikamentenkomplexen. Beispielsweise wurde ein γ -Cyclodextrin-Nanopartikel Augentropfen entwickelt, welcher Dorzolamid enthält. In der Anwendung an 17 Patienten des NP-AT ein Mal/Tag und Trusopt drei Mal/Tag zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Augendrucksenkung. Die Verträglichkeit war subjektiv besser (weniger Augenbrennen) auf Seiten des Nanopartikels [50].

Weiterhin wurden Latanoprost-haltige Cyclodextrin-Augentropfen mit herkömmlichen Latanoprost-Augentropfen zur Behandlung des Glaukoms verglichen. Beide wurden in einer klinischen Studie ein Mal pro Tag angewendet. Insgesamt

samt gesehen waren vergleichbare Effekte bezüglich einer Reduktion des Augendruckes und der Nebenwirkungen festzustellen, allerdings zeigte die Cyclodextrin-Variante eine deutlich bessere Stabilität bei Raumtemperatur [51].

Eine weitere Anwendung, welche eher den hinteren Augenabschnitt erreichen sollte, sind Dexamethason-haltige Cyclodextrin-Nanopartikel [52]. Hier wurde zur Behandlung des diabetischen Makulaödems entweder der Dexamethason-Cyclodextrin-Nanopartikel topisch appliziert (über mehrere Monate) oder es erfolgte eine Behandlung mittels einer Subtenon-Injektion von Triamcinolon. Insgesamt gesehen zeigten sich in der Phase-I-Studie in beiden Gruppen ein signifikanter, allerdings vergleichbarer Visusanstieg und eine Reduktion des Makulaödems. Mit topisch appliziertem Dexamethason alleine (nicht im NP-Komplex) wurde nicht verglichen.

Insgesamt gesehen können die Cyclodextrine die Anwendung des Medikaments durch Verbesserung der Stabilität oder Reduktion der Anwendungsfrequenz vereinfachen. Dennoch zeigen die o.g. Verbesserungen allerdings keine durchschlagenden Ergebnisse, vielmehr zeigen sich eher vergleichbare Ergebnisse im Vergleich zum untersuchten Medikament. Allerdings können durch ihre topische Applikation ggf. invasivere Verfahren wie beispielsweise Subtenon-Injektionen vermieden werden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten DNA-NPs hat sich in den hier durchgeführten Versuchen eine deutlich bessere Adhärenz sowohl für das reine Trägermaterial als auch in der Anwendung mit gekoppeltem Kanamycin erwiesen. Hierdurch kann dann ggf. im Verlauf die Tropffrequenz und auch die Medikamentenkonzentration reduziert werden. Weiterführende anderweitige Medikamentenkopplung an den NP sowie weitere Tierversuche stehen für die hier entwickelten DNA-Nanopartikel noch aus.

4.8.7 Zusammenfassende tabellarische Übersichtsdarstellung der verschiedenen sich in der Entwicklung befindenden Nanomaterialien

	Toxizität	Beladung/Modifikation an entsprechendes Medikament	Verschwommensehen	Langzeit-Stabilität/verlängerte Retentionszeit an der Corneaoberfläche	Halbwertszeit im Vergleich zum Medikament alleine
DNA-NPs	an retinalen Zelllinien nicht nachgewiesen, Langzeit-Untersuchungen noch ausstehend	relativ einfach, keine großartige Modifikation nötig	wässrige Lösung, sollte dies nicht provozieren	DNA mit an sich guter Langzeit-Stabilität/ weitere Untersuchungen in Bezug auf LZ-Stabilität an der Corneaoberfläche nötig	erhöht
Polymere	nicht ausreichend untersucht, unterschiedliche Ergebnisse	nötig, nur begrenzte Molekülgröße möglich, hydrophile und hydrophobe Medikamente benötigen andere Trägerstruktur	keine genaueren Aussagen	reduziert	erhöht
Hydrogele	mögliche erhöhte Immunogenität	ähnlich wie bei Polymeren	möglich insbesondere bei in situ-gelierenden Systemen	häufig, eher geringe mech. Festigkeit	erhöht

Diskussion

	Toxizität	Beladung/Modifikation an entsprechendes Medikament	Verschwommensehen	Langzeit-Stabilität/verlängerte Retentionszeit an der Cornea-oberfläche	Halbwertszeit im Vergleich zum Medikament alleine
Liposomen	keine Langzeit-Ergebnisse, in Bezug auf Augenirritation am Albinohasen untersucht, keine Inflammationsantwort bei liposomalen Chitosan-NPs (<i>Mishra et al.</i>)	Grundstruktur muss an das Medikament angepasst werden	keine genaueren Aussagen	begrenzt	erhöht
Niosomen	nur in Bezug auf Augenirritation und Augenrötung am Albinohasen untersucht	ähnlich der Liposomen	keine genaueren Aussagen	gegenüber Liposomen verbessert	eher Mikrometerbereich, daher reduzierte Aufnahme über Diffusion und Endozytose
Dendrimere	nicht ausreichend untersucht, nur in Bezug auf Augenirritation am Albinohasen	Modifikation an das jeweilige Zielmedikament nötig	kann vermehrt auftreten	leicht erhöht	ggf. leicht verbessert, nur in In-vitro-Versuchen
Cyclo-dextrine	mögliche Irritation durch Penetration in die Cornea	bilden Inklusionskomplexe, anionische CDs besser für kationisches Medikament und umgekehrt (<i>Loftsson et al</i>)	keine genaueren Aussagen, möglicherweise erhöhte Verkrustung der Augenlider	möglicherweise bessere Langzeitstabilität bei Raumtemperatur, vergleichbare in Bezug auf Wirksamkeit des Medikaments	vom Effekt her keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Medikament alleine

4.9 Mögliche weiterführende Untersuchungen

Problematisch bei der Anwendung von Nanopartikeln generell kann Ihre Interaktion mit dem Immunsystem sowie die Auslösung einer Inflammationsantwort sein.

So könnte beispielsweise eine immunmodulierte Antigenantwort ausgelöst werden. Zu vielen Nanopartikeln fehlen hierzu noch hinreichende Daten. Es gibt nur wenige Studien, die kreuzreagierende Antikörper beispielsweise auf Fullerene beschreiben [53].

Eine Nutzung als Adjuvanz beispielsweise bei Impfstoffen kann eine deutlich höhere Antikörperantwort schaffen [54]. Was bei Impfstoffen von Nutzen ist, kann jedoch auch auf Probleme bei der Anwendung therapeutischer Nanopartikel hinweisen, da auch hier ggf. eine deutlich verstärkte Immunantwort provoziert werden kann.

Ein weiterer Faktor ist die Auslösung einer Immunantwort mittels Zytokinen. So kann durch bestimmte Nanopartikel (vor allem positiv geladene, z.B.: kationische Liposomen) beispielsweise die Sekretion von Zytokinen wie TNF (Tumornekrosefaktor), IL-12 (Interleukin-12) oder IFN- α (Interferon- α) ausgelöst werden [55].

Für andere Nanopartikel (z.B.: mit Glucosamin konjugierte Generation-3.5 PAMAM-Dendrimere, Fullerenderivate, polymerisierte Lipid-Nanopartikel welche vornehmlich an Selektine binden) wird eine mögliche Immunsuppression beschrieben [53]. Dies kann beispielsweise in der Therapie von entzündlichen Erkrankungen wünschenswert sein [56]. Allerdings muss dann auch berücksichtigt werden, dass bestimmte Nanopartikel ggf. eine unerwünschte Immunsuppression begünstigen können.

Insgesamt gesehen konnte für verschiedenste Nanopartikel (z.B. Nanoliposomen, PLGA-Nanopartikel, PAMAM-Dendrimere [53]) gezeigt werden, dass eine Interaktion mit dem Immunsystem besteht, was teilweise vorteilhaft genutzt werden kann (beispielsweise bei der Entwicklung von Impfstoffen), aber teilweise auch schädlich für den menschlichen Organismus sein kann.

Daher sind die entwickelten DNA-Nanopartikel auch hinsichtlich einer Stimulation bzw. auch einer Down-Regulation einer Immunantwort weiterführend zu untersuchen.

Besonders zu bedenken bei der Verwendung von DNA-Nanopartikeln ist eine Induktion von Toll-like-Rezeptoren (TLR). Bestimmte Toll-like Rezeptoren sind in der Lage, DNA bzw. RNA zu erkennen und eine Immunantwort entweder über Interleukin-1 oder über Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-12 (IL-12) zu generieren. So erkennt TLR 3 insbesondere doppelsträngige RNA (*ribonucleic acid*), TLR 7/8 einzelsträngige RNA und TLR 9 einzelsträngige DNA [57]. Hierbei werden vor allem unmethylierte CpG-Nukleotide erkannt, welche in bakterieller DNA gehäuft vorkommen, während sie in eukaryotischer DNA relativ selten sind [58]. Diese TLR 9-Aktivierung und somit eine beginnende Immunstimulation konnte auch für synthetische Oligonukleotide gezeigt werden, welche die entsprechenden stimulatorischen Sequenzen aufweisen [59]. Es sollte daher, da hier synthetisch hergestellte DNA-Nanopartikel verwendet werden, auch ihre mögliche Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren bedacht werden sowie auf eine mögliche Induktion einer Immunantwort geachtet werden bzw. diese untersucht werden.

4.10 Weiterentwicklung als *drug delivery* Plattform

Insgesamt gesehen zeigen die entwickelten Nanopartikel gute Ergebnisse in Bezug auf eine Verlängerung der Adhäsionszeit. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die möglichen Medikamententräger untersucht. Ziel ist jedoch eine Weiterentwicklung zur *drug delivery* Plattform. Die gebildeten Nanopartikel können entweder durch Beladung des Mizellenkerns oder über eine kovalente Bindung an den DNA-Strang sowie über aptamere Wechselwirkungen mit dem gewünschten Medikament beladen werden (s. Abbildung 9 in der Einleitung).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde U4T-12 in TAE-Puffer als best-adhärenter Nanopartikel selektiert. Dieser wurde anschließend für weiterführende Untersuchungen als Medikamententräger für Kanamycin verwendet. Durch Verwendung des Nanopartikels als Medikamententräger konnte wie auch in den Vorversuchen ein deutlich verlängerter Verbleib am Wirkort erreicht werden (bis

zu zwei Stunden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vs. fünf Minuten für das reine Medikament).

Die DNA-Nanopartikel sind allerdings als generelles Medikamententrägersystem gedacht. Eine Weiterentwicklung als *drug delivery* Plattform und eine Beladung mit anderen Medikamente ist somit ebenfalls denkbar.

4.11 Beweis der erhaltenen Funktionalität von Kanamycin im Kanamycin-Nanopartikel-Medikamentenkomplex

In den *E. coli*-Kulturversuchen konnte gezeigt werden, dass die Kan-NPs nach fünf Minuten und 30 Minuten mit Tränenfilmsimulation sehr gut wirksam waren und die Kolonienzahl signifikant vermindert war. Die Wirksamkeit war sogar deutlich besser als die des puren Antibiotikums, da letzteres wohl nach fünf Minuten ausgewaschen war.

Dies unterstreicht nochmals einerseits die Problematik der Medikamentenapplikation am vorderen Augenabschnitt mit hoher Auswaschrates des Medikaments. Es beweist aber auch die erhaltene Wirksamkeit von Kanamycin im NP-Medikamentenkomplex.

4.12 Erkrankungen als Behandlungsziele

Erkrankungen des vorderen Augenabschnittes

Ziel ist zunächst eine Behandlung von Vorderabschnittserkrankungen, da mittels der entwickelten Nanopartikel die Adhäsionszeit am Corneaepithel verlängert werden kann und somit zukünftig die Tropffrequenz und auch ggf. die Medikamentenkonzentration verringert werden können, wodurch die *Compliance* erhöht werden könnte und ggf. auch weniger systemische Nebenwirkungen entstehen.

Denkbare Medikamente sind somit weitere Antibiotika, da Infektionserkrankungen des vorderen Augenabschnitts einen Großteil der Vorderabschnittserkrankungen einnehmen. Auch entzündliche Erkrankungen des vorderen Augenabschnittes, wie beispielsweise die anteriore Uveitis sind eine mögliche denkbare Zielerkrankung. Darüber hinaus wäre auch die Behandlung des trockenen Auges eine denkbare Anwendung.

Eine weitere Erkrankung, welche über eine regelmäßige Applikation von Augentropfen behandelt wird, ist das Glaukom. Auch hier kann versucht werden, zukünftig Antiglaukomatosa an die Nanopartikel zu binden, um eine kontinuierlichere Wirkstoffkonzentration am Wirkort zu erlangen und ggf. die Tropffrequenz zu erniedrigen.

Erkrankungen des hinteren Augenabschnittes

Erkrankungen des hinteren Augenabschnittes, wie beispielsweise die feuchte altersbedingte Makuladegeneration oder auch das diabetische Makulaödem, müssen häufig mittels intravitrealer Injektionen von Anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) behandelt werden. Da die entwickelten Nanopartikel als generelles drug delivery System gedacht sind, könnte auch in diesem Bereich eine weitere Anwendung angedacht werden. Allerdings müssen hierfür weitere Versuche im Hinblick auf die intravitreale Injektion des verwendeten Nanopartikels sowie seine Adhäsion an der Retina durchgeführt werden.

Insgesamt gesehen ist also eine breites Anwendungsspektrum des entwickelten DNA-Nanopartikels als Medikamententräger denkbar. Allerdings muss hier zunächst das mögliche Medikament an den Nanopartikel gekoppelt werden und anschließend müssen weitere Untersuchungen in Bezug auf die Adhärenz an die Cornea bzw. Retina sowie Wirksamkeit des Medikaments im Nanopartikel-Medikamentenkomplex durchgeführt werden.

Zusammenfassung

Die Behandlung von Vorderabschnittserkrankungen am Auge erfolgt heute größtenteils mithilfe von Augentropfen. Probleme bereiten hier u.a. ein nur sehr kurzer Verbleib des Wirkstoffs am Wirkort, eine dadurch entstehende hohe Tropffrequenz und eine hieraus oft resultierende reduzierte *Compliance*. Man ist daher auf der Suche nach neuen Medikamententrägersystemen, welche die Halbwertszeit an der Augenoberfläche verlängern können. Nanopartikel sind hier eine vielversprechende Variante.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene neu entwickelte Konformationen von DNA-Nanopartikeln untersucht, welche als Medikamententräger für die topische Medikamentenapplikation dienen können. Sie zeigten sowohl in vitro als auch in vivo eine deutlich verlängerte Retentionsszeit an der Cornea im Vergleich zur Kontrolle. Durch Modifikation der Länge des DNA-Strangs und der Anzahl an lipidmodifizierten Basen kann die Halbwertszeit gesteuert werden. Als best-adhärenter Nanopartikel konnte die Konformation U4T-12 identifiziert werden. Das beste Lösungsmittel war TAE-Puffer, welcher ein Verschwommensehen vermeiden sollte. Toxizitätsuntersuchungen an verschiedenen okulären Zelllinien zeigten keine relevante Toxizität für U4T-12. Eine mögliche Weiterentwicklung mit Antibiotikabeladung zeigte ebenfalls eine deutlich verlängerte Adhäsion an der Cornea sowohl in vitro als auch in vivo. In E.-coli-Kulturversuchen zeigte sich eine signifikante Reduktion des Bakterienwachstums, was eine Wirksamkeit des Medikaments im NP-Medikamentenkomplex beweist.

Im Vergleich zu anderen Nanomaterialien als Medikamententrägersystem ist eine Anpassung an das jeweilige gewünschte Medikament wenig aufwendig. Die Halbwertszeit an der Corneaoberfläche kann deutlich verlängert werden, wodurch zukünftig eine niedrigere Tropffrequenz, ggf. eine Reduktion der Medikamentenkonzentration und eine erhöhte *Compliance* erreicht werden kann. Eine Kopplung an mögliche weitere Medikamente muss noch weiterführend untersucht werden. Insgesamt ist jedoch ein breites Anwendungsspektrum denkbar. Ein breitgefächertes Einsatz bei vielen Erkrankungen, welche einer Applikation von Augentropfen bedürfen, ist denkbar - von der einfachen Konjunktivitis über entzündliche Augenerkrankungen bis hin zum Glaukom.

Bibliographie

1. Burk, A.B., Reinhard O.W., *Checkliste Augenheilkunde*. 5 ed. 2014: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.
2. Zierhut, M.D., P.O.; Klein, R.; Berg, P.A.; Erb, C.; Thiel, H.-J., *Autoantikörpermuster bei Skleritis und Episkleritis*. *Ophthalmologe*, 1997. **94**:157 – 160: p. 157-160.
3. Pleyer, U., *Entzündliche Augenerkrankungen*. 1 ed. 2014: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
4. Schlote, T.G., M.; Mielke, J.; Rohrbach, M., *Taschenatlas Augenheilkunde*. 1 ed. 2004: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.
5. Molokhia, S.A., et al., Anterior eye segment drug delivery systems: current treatments and future challenges. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2013. **29**(2): p. 92-105.
6. McDonald, M., et al., Hydroxypropyl cellulose ophthalmic inserts (lacrisert) reduce the signs and symptoms of dry eye syndrome and improve patient quality of life. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 2009. **107**: p. 214-21.
7. Lüllmann, H., et al., *Pharmakologie und Toxikologie*. 18 ed. 2016: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.
8. Cholkar, K., et al., Novel strategies for anterior segment ocular drug delivery. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2013. **29**(2): p. 106-23.
9. Gaudana, R., et al., *Ocular drug delivery*. *AAPS J*, 2010. **12**(3): p. 348-60.
10. Zimmer, A.K., J., *Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1995: p. 61-73.
11. Bucolo, C., F. Drago, and S. Salomone, *Ocular drug delivery: a clue from nanotechnology*. *Front Pharmacol*, 2012. **3**: p. 188.
12. Watanabe, H., *Significance of mucin on the ocular surface*. *Cornea*, 2002. **21**(2 Suppl 1): p. S17-22.
13. Lai Becker, M., N. Huntington, and A.D. Woolf, *Brimonidine tartrate poisoning in children: frequency, trends, and use of naloxone as an antidote*. *Pediatrics*, 2009. **123**(2): p. e305-11.
14. Cramer, J.A., et al., *Medication compliance and persistence: terminology and definitions*. *Value Health*, 2008. **11**(1): p. 44-7.
15. Hermann, M.M., et al., *Measurement of adherence to brimonidine therapy for glaucoma using electronic monitoring*. *J Glaucoma*, 2011. **20**(8): p. 502-8.
16. Wilczewska, A.Z., et al., *Nanoparticles as drug delivery systems*. *Pharmacol Rep*, 2012. **64**(5): p. 1020-37.
17. Christian, P., et al., *Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media*. *Ecotoxicology*, 2008. **17**(5): p. 326-43.
18. Chithrani, B.D., A.A. Ghazani, and W.C. Chan, *Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells*. *Nano Lett*, 2006. **6**(4): p. 662-8.
19. *Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Katalogeintrag zu HeLa-Zellen*. Stand 12.08.2016]; Available from: https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-57.html?tx_dsmzresources_pi5.
20. Hahn, I.H., P.; Endl, E.; Eter, N., *Einsatz von Nanopartikeln in der Augenheilkunde*. *Ophthalmologe* 2011, 2011. **108**:863–868: p. 863-868.
21. Liu, S., L. Jones, and F.X. Gu, *Nanomaterials for ocular drug delivery*. *Macromol Biosci*, 2012. **12**(5): p. 608-20.
22. Rafie, F., et al., *In vivo evaluation of novel nanoparticles containing dexamethasone for ocular drug delivery on rabbit eye*. *Curr Eye Res*, 2010. **35**(12): p. 1081-9.
23. Oerlemans, C., et al., *Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release*. *Pharm Res*, 2010. **27**(12): p. 2569-89.

Bibliographie

24. Gupta, P., K. Vermani, and S. Garg, Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov Today*, 2002. **7**(10): p. 569-79.
25. Volotinen, M., et al., Ophthalmic timolol in a hydrogel vehicle leads to minor inter-individual variation in timolol concentration in aqueous humor. *Eur J Pharm Sci*, 2009. **36**(2-3): p. 292-6.
26. Sahoo, S.K., F. Dilnawaz, and S. Krishnakumar, *Nanotechnology in ocular drug delivery*. *Drug Discov Today*, 2008. **13**(3-4): p. 144-51.
27. Abdelbary, G., Ocular ciprofloxacin hydrochloride mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm Dev Technol*, 2011. **16**(1): p. 44-56.
28. Abdelbary, G. and N. El-Gendy, Niosome-encapsulated gentamicin for ophthalmic controlled delivery. *AAPS PharmSciTech*, 2008. **9**(3): p. 740-7.
29. Vandamme, T.F. and L. Brobeck, Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide. *J Control Release*, 2005. **102**(1): p. 23-38.
30. Loftsona, T. and T. Jarvinen, Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999. **36**(1): p. 59-79.
31. Yusifov, T.N., et al., Tear lipocalin is the major endonuclease in tears. *Mol Vis*, 2008. **14**: p. 180-8.
32. Heinrich, P.C.M., M.; Graeve, L., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9 ed. 2014: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 660-678.
33. Anaya, M., et al., Tunable hydrophobicity in DNA micelles: design, synthesis, and characterization of a new family of DNA amphiphiles. *Chemistry*, 2010. **16**(43): p. 12852-9.
34. Bausch&Lomb. *Beipackzettel Artelac splash EDO*. 11/2009 Stand 09.07.2016]; Available from: http://www.artelac.de/fileadmin/user_upload/Redakteure_artelac/pdf_dokumente/Artelac_Splash_Edo_At.pdf.
35. Bausch&Lomb. *Beipackzettel Artelac lipids EDO*. 11/2010 Stand 09.07.2016]; Available from: http://www.artelac.de/fileadmin/user_upload/Redakteure_artelac/pdf_dokumente/Artelac_Lipids_Edo_Ag.pdf.
36. Clark, A., et al., On the use of immortalized ocular cell lines in vision research: the unfortunate story of RGC-5. *Exp Eye Res*, 2013. **116**: p. 433.
37. Chang, H.Y. and X. Yang, Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000. **64**(4): p. 821-46.
38. *Caspase-Glo®-3/7-Assay, Technical Bulletin, Promega Corporation*. Available from: <https://www.promega.de/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/caspase-glo%203%207%20assay%20protocol.pdf>.
39. Calonge, M., The treatment of dry eye. *Surv Ophthalmol*, 2001. **45 Suppl 2**: p. S227-39.
40. Enriquez de Salamanca, A., et al., Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. **47**(4): p. 1416-25.
41. Prow, T.W., *Toxicity of nanomaterials to the eye*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2010. **2**(4): p. 317-33.
42. Agnihotri, S.M. and P.R. Vavia, Diclofenac-loaded biopolymeric nanosuspensions for ophthalmic application. *Nanomedicine*, 2009. **5**(1): p. 90-5.
43. Nagarwal, R.C., et al., Chitosan nanoparticles of 5-fluorouracil for ophthalmic delivery: characterization, in-vitro and in-vivo study. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2011. **59**(2): p. 272-8.
44. Bhatta, R.S., et al., Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: In vitro and pharmacokinetics studies. *Int J Pharm*, 2012. **432**(1-2): p. 105-12.

Bibliographie

45. Hamidi, M., A. Azadi, and P. Rafiei, *Hydrogel nanoparticles in drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(15): p. 1638-49.
46. Nagarwal, R.C., et al., Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery. J Control Release, 2009. **136**(1): p. 2-13.
47. Kirchhof, S., A.M. Goepferich, and F.P. Brandl, *Hydrogels in ophthalmic applications*. Eur J Pharm Biopharm, 2015. **95**(Pt B): p. 227-38.
48. Hathout, R.M., et al., Liposomes as an ocular delivery system for acetazolamide: in vitro and in vivo studies. AAPS PharmSciTech, 2007. **8**(1): p. 1.
49. Spataro, G., et al., Designing dendrimers for ocular drug delivery. Eur J Med Chem, 2010. **45**(1): p. 326-34.
50. Gudmundsdottir, B.S., et al., gamma-Cyclodextrin nanoparticle eye drops with dorzolamide: effect on intraocular pressure in man. J Ocul Pharmacol Ther, 2014. **30**(1): p. 35-41.
51. Gonzalez, J.R., et al., Comparison of the stability, efficacy, and adverse effect profile of the innovator 0.005% latanoprost ophthalmic solution and a novel cyclodextrin-containing formulation. J Clin Pharmacol, 2007. **47**(1): p. 121-6.
52. Ohira, A., et al., Topical dexamethasone gamma-cyclodextrin nanoparticle eye drops increase visual acuity and decrease macular thickness in diabetic macular oedema. Acta Ophthalmol, 2015. **93**(7): p. 610-5.
53. Dobrovolskaia, M.A. and S.E. McNeil, Immunological properties of engineered nanomaterials. Nat Nanotechnol, 2007. **2**(8): p. 469-78.
54. Stieneker, F., J. Kreuter, and J. Lower, High antibody titres in mice with polymethylmethacrylate nanoparticles as adjuvant for HIV vaccines. AIDS, 1991. **5**(4): p. 431-5.
55. Tan, Y., et al., The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. Hum Gene Ther, 1999. **10**(13): p. 2153-61.
56. John, A.E., et al., Discovery of a potent nanoparticle P-selectin antagonist with anti-inflammatory effects in allergic airway disease. FASEB J, 2003. **17**(15): p. 2296-8.
57. Wagner, H. and S. Bauer, All is not Toll: new pathways in DNA recognition. J Exp Med, 2006. **203**(2): p. 265-8.
58. Dalpke, A., et al., Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. Infect Immun, 2006. **74**(2): p. 940-6.
59. Krieg, A.M., et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. Nature, 1995. **374**(6522): p. 546-9.

Erklärung zum Eigenanteil

Erklärung zum Eigenanteil

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

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Herrn Dr. rer. nat. Sven Schnichels und Dr. rer. nat. Jan-Willem de Vries) von mir eigenständig durchgeführt. Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte durch Herrn Dr. rer. nat. Jan-Willem de Vries teils im Institut für Polymerchemie des Zernike Institute for Advanced Materials, Groningen, Niederlande und teils in der Universitäts-Augenklinik Tübingen. Die Tierversuche (Tropfenapplikation an den Ratten sowie Tötung der Tiere) wurden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Sven Schnichels durchgeführt. Die Verblindung der Versuche aus 2.2.9 (In-vitro-Evaluation der antibiotischen Aktivität auf Schweinecornea) erfolgte durch Herrn Dr. rer. nat. Jan-Willem de Vries. Die anschließende Auszählung der *E. coli*-Kolonien wurde von Herrn Dr. rer. nat. Sven Schnichels, Herrn Dr. rer. nat. Jan-Willem de Vries und durch mich vorgenommen.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig (nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Sven Schnichels) durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Herrn Dr. med. Martin S. Spitzer und Herrn Dr. rer. nat. Sven Schnichels verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 06.01.2017

Danksagung

Danksagung

Zu guter Letzt ist es Zeit, all denjenigen zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Martin Spitzer, für die Bereitstellung des interessanten Themas und die stets schnellen und zuverlässigen Antworten bedanken.

Herzlicher Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Sven Schnichels für die tolle Betreuung und die stets offene Tür bei Rückfragen und Problemen.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Jan Willem de Vries für die Erklärung der „chemischen Hintergründe“ und die stets gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Weiterer Dank gilt dem gesamten Team des Breuningerbaus, mit dem die Laborarbeit stets Freude bereitet hat.

Dann möchte ich noch den hilfreichen Korrekturlesern dieser Arbeit danken, ohne die vermutlich viel mehr Kommafehler und Wortwiederholungen verblieben wären.

Danke meinen Freunden, die mich unterstützt haben, sei es mit der Bereitstellung von eigenen Erfahrungen oder auch mit Aufmunterung und guten Diskussionen.

Und zu guter Letzt möchte ich besonders meinen Eltern danken für ihre fortwährende Unterstützung und Liebe. Ohne sie wäre so mancher „Durchhänger“ bei der Fertigstellung dieser Arbeit neben Studium und Beginn der Facharztausbildung vermutlich sehr viel mühsamer gewesen.

Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname/Name	Lisa Vanessa Strudel
Geburtsdatum	13.02.1989
Geburtsort	Stuttgart
Anschrift	Haaggasse 30, 72070 Tübingen Tel.: 0173/9736880 e-mail: lisa.strudel@t-online.de
Familienstand	ledig

Berufserfahrung und Praktika

Beruflicher Werdegang

02.2015 - heute	Ärztin in Weiterbildung, Universitäts-Augenklinik Tübingen
-----------------	---

Praktisches Jahr

04.2014 - 07.2014	Chirurgie, Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Tübingen
12.2013 - 04.2014	Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poli- klinik des Universitätsklinikums Tübingen
08.2013 - 12.2013	Augenheilkunde, Universitäts-Augenklinik, Tübingen

Famulaturen

01.03.2013 - 17.03.2013	Universitäts-Augenklinik, Tübingen
03.08.2012 - 26.08.2012	Universitäts-Augenklinik, Tübingen
09.02.2012 - 26.02.2012	Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Tübingen
05.08.2011 - 07.09.2011	Neurochirurgische Klinik des Klinikums Stuttgart (Katharinenhospital)
07.03.2011 - 03.04.2011	Internistische Gemeinschaftspraxis Dr. Jentzsch/ Rall/ Dr. Schiller (Stuttgart)

Hochschulausbildung

10.2008 - 12.2014	Medizinstudium an der Eberhard Karls Universität Tübingen
02.12.2014	Ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote „gut“ (1,83)

Lebenslauf

- 02.12.2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote „sehr gut“ (1,5)
10.09.2010 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote „gut“ (2,5)

Schulbildung

- 2008 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,0) und Baccalauréat (mention très bien)
- Preise:
Aufnahme in die Deutsche Mathematiker-Vereinigung
Scheffel-Preis der Literarischen Gesellschaft
Fachpreis Englisch
- Außerschulisches:
Bundeswettbewerb Fremdsprachen (EW Kreativ, Kurzgeschichten)
der Beitrag wurde in die Gruppe der besten 20 Arbeiten bundesweit eingestuft
Wagenburg-Gymnasium, Stuttgart
Bilingualer Zug (deutsch-französisch)
1999 - 2008 Fuchsrainschule (Grundschule), Stuttgart
1995-1999

Publikationen

Poster:

1. Schnichels S, de Vries JW, **Strudel L**, Kwak M, Hofmann J, Bartz-Schmidt KU, Spitzer MS, Hermann A. A new class of nanoparticles as potential drug carriers for the treatment of anterior segment diseases. *111. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Berlin, 19.9.2013 – 22.9.2013*
2. de Vries JW, Schnichels S, **Strudel L**, Hofmann J, Bartz-Schmidt KU, Hermann A, Spitzer MS. Enhanced antibiotic delivery through a new class of nanoparticles. *111. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Berlin, 19.9.2013 – 22.9.2013*
3. Schnichels S, de Vries JW, **Strudel L**, Kwak M, Hofmann J, Bartz-Schmidt KU, Spitzer MS, Hermann A. DNA-based nanoparticles as potential drug carriers for the treatment of anterior segment diseases. *ARVO 2014 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 04.05.-08.05.2014, in Orlando, FL, USA*

Lebenslauf

4. **Strudel L**, de Vries JW, Kwak M, Hofmann J, Fröblich K, Bartz-Schmidt KU, Herrmann A, Spitzer MS, Schnichels S. Comparison of different DNA-based nanoparticles for the treatment of anterior segment diseases. *112. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Leipzig, 25.9.2014 – 28.9.2014*
5. Schnichels S, de Vries JW, Dammeier S, **Strudel L**, Bartz-Schmidt KU, Herrmann A, Spitzer MS. Efficacy and functionality of antibiotic delivery through DNA based nanoparticles. *112. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Leipzig, 25.9.2014 – 28.9.2014*
6. Schnichels S, Spitzer MS, **Strudel L**, Hurst J, Gruszka A, Deissenroth P, Dammeier S, Bartz-Schmidt KU, Herrmann A, de Vries JW. Efficacy & functionality of antibiotic delivery through DNA based nanoparticles. *ARVO 2015 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 03.05.-07.05.2015, in Denver, CO, USA*
7. **Strudel L**, de Vries JW, Hurst J, Bartz-Schmidt KU, Herrmann A, Spitzer MS, Schnichels S. Adherence, efficacy and safety of antibiotic delivery through DNA based nanoparticles. *Young Researcher Vision Camp, Castle Wildenstein/Leibertingen, 12.-14.06.2015*
8. Fröblich K, Schnichels S, **Strudel L**, Hofmann J, Bartz-Schmidt KU, Herrmann A, Spitzer MS, de Vries JW. Comparison of different DNA-based nanoparticles for the treatment of anterior segment diseases. *Young Researcher Vision Camp, Castle Wildenstein/Leibertingen, 12.-14.06.2015*
9. Schnichels S, Spitzer MS, **Strudel L**, Hurst J, Gruszka A, Deissenroth P, Dammeier S, Bartz-Schmidt KU, Herrmann A, de Vries JW. Efficacy & functionality of antibiotic delivery through DNA based nanoparticles. *Vision Research Day 2015, Zürich, Schweiz, 26.06.2015-27.06.2015*
10. **Strudel L**, de Vries JW, Hurst J, Gruszka A, Bartz-Schmidt KU, Herrmann A, Spitzer MS & Schnichels S. Toxicological evaluation & quantitative comparison of lipid-modified DNA nanoparticles. *113. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Berlin, 01.10.2015-04.10.2015*
11. Schnichels S, Gruszka A, Hurst J, **Strudel L**, Bartz-Schmidt KU, Herrmann A, Spitzer MS & de Vries JW. Quantitative and safety evaluation of topical antibiotic delivery using lipid-DNA nanoparticles. *113. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Berlin, 01.10.2015-04.10.2015*
12. **Strudel L**, Hurst J, de Vries JW, Gruszka A, Bartz-Schmidt KU, Herrmann A, Spitzer MS & Schnichels S. Kanamycin loaded lipid modified DNA-Nanoparticles with superior bacterial growth inhibition. *ARVO 2016 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 01.05.-05.05.2016, in Seattle, WA, USA*

Lebenslauf

13. Schnichels S, Hurst J, Gruszka A, **Strudel L**, Herrmann A, Bartz- Schmidt KU, Spitzer MS & de Vries JW. Antibiotic loaded nanoparticles cause superior bacterial growth inhibition on corneas. *114. Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Berlin, 29.9.2016-02.10.2016*

Diese Poster haben einen Posterpreis gewonnen: 1., 2., 5.

Konferenzbeiträge:

1. Schnichels S, de Vries JW, **Strudel L**, Herrmann A, Spitzer MS. Herausforderungen der okulären Medikamentenapplikation. *97. Jahrestagung der Württembergischen Augenärztlichen Vereinigung (WAV), Tübingen, 15.03.2013*

2. Schnichels S, de Vries JW, **Strudel L**, Herrmann A, Spitzer MS. Evaluation einer neuartigen Klasse von Antibiotika-Nanopartikeln. *98. Jahrestagung der Baden-Württembergischen Augenärztlichen Vereinigung (B-WAV), Tübingen, 28.02.2014-01.03.2014*

3. Spitzer MS; Schnichels S; **Strudel L**; Hofmann J; Bartz-Schmidt KU; Herrmann A; de Vries JW. Enhanced antibiotic delivery through DNA-based nanoparticles. *ARVO 2014 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 04.05.-08.05.2014, in Orlando, FL, USA*

Tübingen, den 06.01.2017