

Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik

**DNA – Nanopartikel als Medikamententräger
für Vorderabschnittserkrankungen des Auges
– Optimierung der Adhäsion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Breitschwerdt, Aileen

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Spitzer
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Beer-Hammer

Tag der Disputation: 26.05.2017

*Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem
Schlusspunkt sondern mit einem Fragezeichen.*

Hermann Hesse

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	4
II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	6
III Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 Anatomische Grundlagen des Auges	10
1.1.1 Aufbau des Auges im Allgemeinen	10
1.1.2 Aufbau der Cornea	11
1.1.3 Aufbau des Tränenfilms	12
1.1.4 Von den Epithelzellen der Cornea bzw. der Konjunktiva bis zum Tränenfilm	13
1.2 Krankheiten des Auges	18
1.3 Topische Applikation von Medikamenten - Augentropfen	19
1.4 Drug Delivery	20
1.4.1 NP allgemein	20
1.4.2 DNA-NP	21
1.5 Ziel dieser Arbeit	24
2 Materialien und Methoden	25
2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	25
2.2 Geräte und Programme	26
2.3 Lösungen	27
2.3.1 Herstellung von TBS (10x bzw. 1x)	27
2.3.2 TBS-Tween 0,1 % (v/v)	27
2.3.3 5 % (w/v) BSA in PBS bzw. TBS	27
2.3.4 Eosin Y	27
2.4 Methoden	28
2.4.1 Herstellung von funktionalisierten NP	28
2.4.2 Herstellung von Kryoschnitten	29
2.4.3 Tierstudien	29
2.5 Histologie	30
2.5.1 Die PAS-Färbung	30
2.5.2 Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	31
2.5.3 Auswertung der Intaktheit des Hornhautepithels	31
2.5.4 Fluoreszenz	32
2.5.5 Die 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Färbung	33

2.5.6	Antikörper	34
2.5.7	Auswertung der Stärke der fluoreszierenden NP	37
2.6	Statistische Auswertung.....	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Aufnahme der DNA-NP	40
3.2	Stressoren.....	46
3.2.1	Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC	46
3.2.2	Anwendung von Hitzestress	53
3.2.3	Aufnahme der Antibiotika beladene NP ohne und mit Anwendung von Hitzestress.....	57
3.3	Die Lage der NP – Mucin-1, Galektin-3, ZO-1	65
3.3.1	Aufnahme der DNA-NP	65
3.3.2	Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC	67
3.3.3	Anwendung von Hitzestress	68
4	Diskussion.....	71
4.1	Therapien am Auge mit NP	71
4.2	NP – als nicht schädliche Materie	73
4.3	Ädherenz von DNA-NP	74
4.4	Einflussfaktor ACC bzw. BAC	75
4.5	Einflussfaktor Hitzestress.....	77
4.6	Vergleich der Antibiotika – Kanamycin und Neomycin B.....	77
4.7	Corneaaufbau – Mucin-1, Galektin-3, ZO-1	79
4.8	Gewebeversuche mit Schweinen statt mit Ratten – der Nutzen von Schlachthoftieren	80
4.9	Ausblick.....	81
5	Zusammenfassung.....	82
6	Literaturverzeichnis	83
7	Erklärung zum Eigenanteil	90
IV	Danksagung.....	91

II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Die fünf Schichten der Cornea	11
Abbildung 2: Aufbau des präcornealen Flüssigkeitsfilm	12
Abbildung 3: Der Schichtaufbau des Cornea- bzw. Konjunktiva-Epithels.....	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Mucins.	14
Abbildung 5: Die drei unterschiedlichen Gruppen der Galektine	15
Abbildung 6: Vergrößerte Darstellung der <i>Tight junctions</i>	17
Abbildung 7: NP können unterschiedlich geladen werden	23
Abbildung 8: Bewertung der Intaktheit des Hornhautepithels der HE- bzw. PAS-Bilder	32
Abbildung 9: Bewertung der Intaktheit des Hornhautepithels der DAPI-Bilder .	33
Abbildung 10: Vorgang einer Primär- und Sekundär-Antigenbindung.	34
Abbildung 11: Objektträger, wie dessen Schnitte mit Hilfe eines Fettstifts (Dako Pen) umkreist wurden.	35
Abbildung 12: Verdünnung der in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper	36
Abbildung 13: Verdünnung der in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper	36
Abbildung 14: Ein jeweiliges Beispiel der Antikörperfärbungen Mucin-1, Galektin-3 und ZO-1	37
Abbildung 15: DNA-NP – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder (400-fache Vergrößerung) zeigen die Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP) und des Kontrollfarbstoffes (K). Eukleierte Schweineaugen (A) bzw. Rattenaugen (ex-vivo Ratte) (B) und Rattenaugen aus in-vivo Versuchen (C) wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (5 min, 30 min, 2h, 6 h).	41
Abbildung 16: DNA-NP – Intaktheit des Hornhautepithels (A, B, C) und Vergleich der Intaktheiten (D).....	43
Abbildung 17: DNA-NP – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels (A, B, C) und Vergleich zwischen den DAPI-Fluoreszenzstärken (D)	45
Abbildung 18: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Repräsentative DAPI, HE- und PAS-Bilder von eukleierten Rattenaugen	47
Abbildung 19: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Intaktheit des Hornhautepithels von eukleierten Rattenaugen.....	48
Abbildung 20: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels bei eukleierten Rattenaugen.....	49
Abbildung 21:Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder von Rattenaugen aus in-vivo Versuchen	50
Abbildung 22: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Intaktheit des Hornhautepithels von Rattenaugen aus in-vivo Versuchen.....	51
Abbildung 23: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels bei Rattenaugen aus in-vivo Versuchen.....	52
Abbildung 24: Anwendung von Hitzestress – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder.....	54
Abbildung 25: Anwendung von Hitzestress – Intaktheit des Hornhautepithels. .	55

Abbildung 26: Anwendung von Hitzestress – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels (A) und Vergleich zwischen den DAPI-Fluoreszenzstärken (B, C).....	56
Abbildung 27: Das Antibiotikum Neomycin B – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder.....	57
Abbildung 28: Das Antibiotikum Neomycin B – Intaktheit des Hornhautepithels	58
Abbildung 29: Das Antibiotikum Neomycin B – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels.....	58
Abbildung 30: Das Antibiotikum Kanamycin – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder.....	59
Abbildung 31: Das Antibiotikum Kanamycin – Intaktheit des Hornhautepithels	60
Abbildung 32: Das Antibiotikum Kanamycin – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels.....	60
Abbildung 33: Antibiotika mit Anwendung von Hitzestress – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder	62
Abbildung 34: Antibiotika mit Anwendung von Hitzestress – Intaktheit des Hornhautepithels	63
Abbildung 35: Antibiotika mit Anwendung von Hitzestress – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels.....	64
Abbildung 36: DNA-NP – Repräsentative Bilder der Antikörperfärbungen	65
Abbildung 37: DNA-NP – Darstellung der Lage der unbeladenen DNA-NP nach den Antikörperfärbungen.....	66
Abbildung 38: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Repräsentative Bilder der Antikörperfärbungen.....	67
Abbildung 39: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Darstellung der Lage der unbeladenen DNA-NP nach den Antikörperfärbungen.....	68
Abbildung 40: Anwendung von Hitzestress – Repräsentative Bilder der Antikörperfärbungen.....	69
Abbildung 41: Anwendung von Hitzestress – Darstellung der Lage der unbeladenen DNA-NP nach den Antikörperfärbungen.....	70
Tabelle 1: Vergleich der höchsten gemessenen Fluoreszenzstärken	75

III Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
ACC	N-Acetylcystein
aptK	DNA-Aptamer ohne das Antibiotikum Kanamycin
aptN	DNA-Aptamer ohne das Antibiotikum NeomycinB
BAC	Benzalkoniumchlorid
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRDs	Carbohydrate Recognition Domains
Cy3	Cyanine 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DexNP	Dexamethason-γ-Cyclodextrin-Nanopartikel
DNA/RNA	Desoxyribonukleinsäure/Ribonukleinsäure
Fab/Fc	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers/ Fragment das an Komplementproteine oder zelluläre Fc-Rezeptoren binden kann
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
Gal	Galektin
h	Stunde
HCl EtOH	Salzsäure-Alkohol
HE	Hämatoxylin-Eosin
HHS	Hämatoxylin-Lösung
Ig/IgG/IgM	Immunglobulin/ImmunglobulinG/ImmunglobulinM
JAM	Junctional Adhesion Molecule

III Abkürzungsverzeichnis

K	Kontrollfarbstoff
Kan	Kanamycin
ml	Milliliter
min	Minuten
mM	Millimolar
MUC	Mucin
Neo B	Neomycin B
nm	Nanometer
NP	Nanopartikel
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Protonen bzw. Hydronium-Ionen in wässriger Lösung
PLGA	Polymilchsäure-co-Glykolsäure
SD	Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
T	terminal modifiziert
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	Trisphosphatgepufferte Saline
U	mit Lipidketten modifizierte Deoxyuracil
vgl.	vergleichsweise
v/v	Volume/Volume
w/v	Weight/Volume
z. B.	zum Beispiel
ZO	Zonula Occludens (Proteine)

1 Einleitung

1.1 Anatomische Grundlagen des Auges

1.1.1 Aufbau des Auges im Allgemeinen

Das Auge setzt sich aus dem optischen Apparat und seinem Hilfsapparat zusammen. Der optische Apparat ist dafür verantwortlich, ein reelles Bild auf die Netzhaut zu projizieren. Er wird in einen lichtbrechenden und in einen informationsverarbeitenden Teil unterteilt. Das Auge kann so Hell-Dunkel und Farberscheinungen wahrnehmen, indem elektromagnetische Strahlungen (ca. 350 nm bis 750 nm) in den Sinneszellen als elektrische Impulse generiert und im Gehirn verarbeitet werden. Der lichtbrechende Teil projiziert auf der lichtempfindlichen Netzhaut (Retina) ein reelles Bild. Dieses wird durch Sinneszellen (Photorezeptoren) in elektrische Signale verarbeitet. Im informationsverarbeitenden Teil in den Nervenzellschichten der Retina erfolgt dann eine Voranalyse der Informationen. Als Nervenimpulse werden diese über den Nervus opticus den Umschaltstationen, der Sehbahn zugesandt und dort weiter verarbeitet. Die inneren Augenmuskeln können das Bild durch Nah- und Ferneinstellung (Akkommodation) und durch eine Anpassung an die Beleuchtungsverhältnisse (Adaptation) verbessern. Der Hilfsapparat setzt sich aus den äußeren Augenmuskeln, den Augenlidern, der Bindehaut (Konjunktiva) und dem Tränenapparat zusammen, welche zum überwiegenden Teil in der Augenhöhle (Orbita) liegen. Die äußeren Augenmuskeln richten das Auge aus. Augenlider (Palpebrae), Bindehaut und Tränenapparat dienen vor allem dem Schutz des Auges (Kirsch 2010a, Lüllmann-Rauch 2009a).

1.1.2 Aufbau der Cornea

Die Hornhaut (Cornea) stellt den vordersten Abschnitt des Augapfels dar und liegt vor der Pupille. Sie hat keine Blutgefäße, ist durchsichtig und für die Augenfunktion unerlässlich. Sie ist homogen aufgebaut und ist von einem Tränenfilm, bestehend aus der Tränenflüssigkeit, überzogen. Die Brechkraft der Cornea beträgt ca. 40 Dioptrien, wodurch sie zwei Drittel zur Gesamtbrechkraft des Auges beiträgt (Augustin und Collins 2001a, Dua et al. 2013).

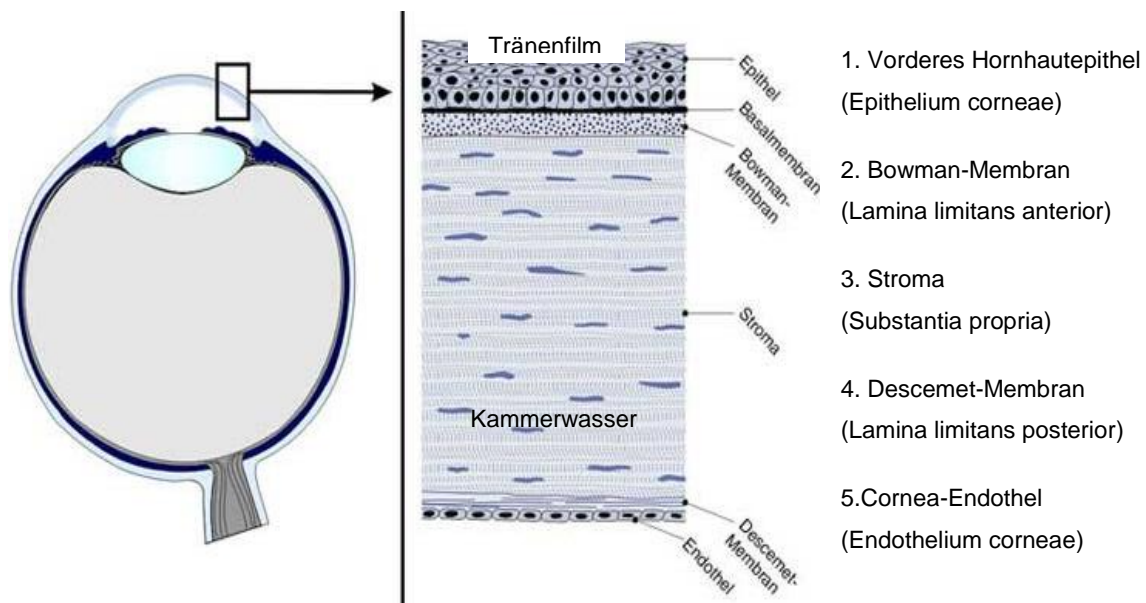


Abbildung 1: Die fünf Schichten der Cornea (Universitäts-Augenklinik Tübingen 2008).

Von außen nach innen werden fünf Schichten der Cornea unterschieden (Abbildung 1). Die äußerste Schicht ist das vordere Hornhautepithel (Epithelium corneae). Sie hat eine Schutzfunktion, z.B. gegen Mikroorganismen und Verdunstung. Nach innen folgt die Bowman-Membran (Lamina limitans anterior), die unter anderem für die Erhaltung der Epithelstruktur wichtig ist. Das Stroma (Substantia propria) ist die mittlere, die dritte Schicht. Es ist ein lockeres Bindegewebe und enthält Nerven. Die vierte Schicht heißt Descemet-Membran (Lamina limitans posterior). Sie ist elastisch und widerstandsfähig, wodurch das Auge vor Infektionen sowie vor chemischer und mechanischer Beanspruchung geschützt wird. Diese letzte innerste Schicht, das Endothelium corneae, ist dünn und hat viele physiologische Funktionen, wie die Stoffaustauschregulierung und die Barrierefunktion (Universitäts-Augenklinik Tübingen 2008, Kirsch 2010b).

1.1.3 Aufbau des Tränenfilms

Der Tränenfilm ist eine Flüssigkeitsschicht, die von der Tränenflüssigkeit gebildet wird und den vorderen Teil des Augapfels bedeckt. Die Tränendrüsen erzeugen die Tränenflüssigkeit, welche über den Augenwinkel und die Tränenwege in die Nasenhöhle abläuft.

Der gesamte Tränenfilm besteht aus zwei unterschiedlichen Arten von Tränenfilmen, dem präokulären und dem präcornealen Tränenfilm. Der präokuläre Tränenfilm bedeckt die Hornhaut (Cornea), die innerhalb der Lidspalte liegt, und die Bindehaut. Die präcorneale Tränenflüssigkeit überzieht nur die Cornea, welche freiliegt, und bildet auf der Augenoberfläche einen dreischichtigen Tränenfilm (Abbildung 2) (Kirsch 2010d, Augustin und Collins 2001b).

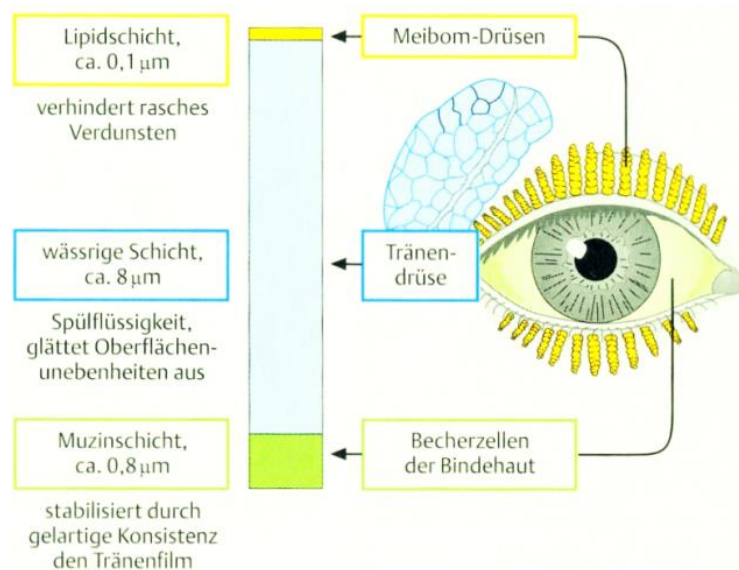


Abbildung 2: Aufbau des präcornealen Flüssigkeitsfilm mit der 1. Mucinschicht, die v.a. aus Becherzellen der Bindehaut besteht und durch die gelartige Konsistenz den Tränenfilm stabilisiert, 2. der wässrigen Schicht, die v.a. aus der Tränendrüse stammt, eine Spülflüssigkeit ist und Oberflächenunebenheiten ausglättet, und 3. der Lipidschicht, dessen Sekret aus den Meibom-Drüsen stammt und die ein rasches Verdunsten verhindert (Kirsch 2010d).

Im Tränenfilm ist die Mucin-Schicht, auch Schleimhautschicht genannt, die innerste, 30 nm bis 800 nm dicke Schicht. Sie enthält eine Glykokalyx aus Transmembranproteinen und Mucinen. Der Ursprung liegt in den Epithelzellen, Becherzellen und Tränendrüsen. Diese Schicht liegt auf der Augenoberfläche, gleicht Unebenheiten der empfindlichen Cornea aus und kann Wasser binden.

Außerdem wird durch diese erste Schicht die Austrocknung des Auges verhindert und die gelartige Konsistenz des Tränenfilmes stabilisiert.

Die wässrige Schicht, die mittlere Schicht, bildet den größten Teil der Tränenflüssigkeit und enthält Proteine, Metabolite und Elektrolyte. Zusätzlich enthält sie ein „Gel“ aus Mucinen, sowie Proteine, Enzyme und Antikörper. Sie ist 6 µm bis 10 µm dick. Ihr Ursprung liegt vor allem in der Tränendrüse. Auch sie glättet Unebenheiten der Oberfläche aus und dient als Spülflüssigkeit.

Die Lipid-Schicht, auch Fettschicht genannt, ist die äußerste 15 nm bis 160 nm dicke Schicht. Sie verhindert, dass der wässrige Anteil über die Lidkante abläuft und nicht so schnell verdunstet. Das Sekret stammt aus den Meibom-Drüsen (Glandulae tarsales).

Die Tränenflüssigkeit hat viele Aufgaben. Sie dient der Immunabwehr und führt Sauerstoff der gefäßlosen Hornhaut und Bindehaut zu, sodass unter anderem das Hornhautepithel ernährt wird. Außerdem befeuchtet sie das Epithel der Horn- und Bindehaut, reinigt den Bindehautsack, schwemmt Fremdkörper, Schmutzpartikel, Bakterien und Viren aus (Partikelentfernung) und hat auch durch ihr Glänzen und ihre Glätte eine optische Funktion (Eule 2007, Kirsch 2010d). Der Lidschlag wird alle 4 bis 6 Sekunden unbewusst ausgeführt. Bei älteren Menschen aber auch bei konzentrierter Arbeit erfolgt er weniger oft. Während des Lidschlags wird ca. ein Milliliter Tränenflüssigkeit gleichmäßig über die Augenoberfläche bei einem Lidschlag verteilt. So wird nach und nach die Tränenflüssigkeit ausgetauscht (Bristow et al. 2005).

1.1.4 Von den Epithelzellen der Cornea bzw. der Konjunktiva bis zum Tränenfilm

Verschiedene Mucine, Galektine und *Tight junctions* stellen wichtige Komponenten im Hinblick auf die Epithelschicht der Cornea bzw. der Konjunktiva bis hin zum Tränenfilm dar (Abbildung 3).

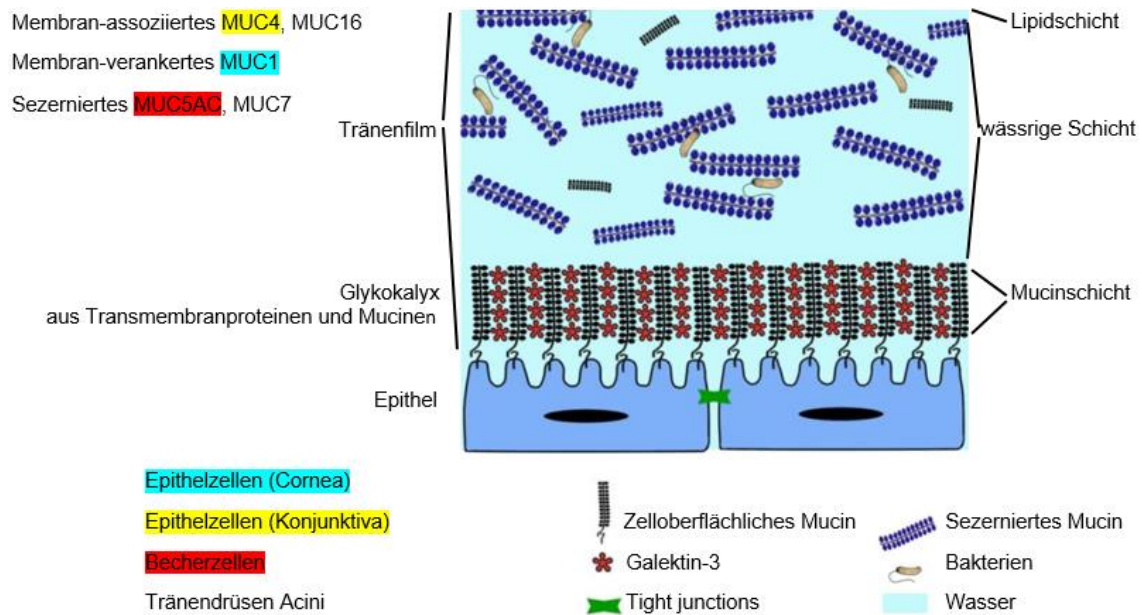


Abbildung 3: Der Schichtaufbau des Cornea- bzw. Konjunktiva-Epithels über die Glykokalyx bis zum Tränenfilm unter anderem mit Epithelzellen in der Cornea und Konjunktiva, Becherzellen, Tränendrüsen Acini, Mucinen (MUC), Galektin-3, *Tight junctions* (verändert nach Guzman-Aranguez und Argueso 2010).

Mucine

Mucine sind Glykoproteine, die aus einer zentralen Proteinkette und relativ langen Seitenketten aus Zuckerverbindungen, den sogenannten Polysacchariden, bestehen (Abbildung 4).



Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Mucins. Der Strich in der Mitte stellt das Protein dar, die davon abgehenden verbundenen Rechtecke die Polysaccharid.

Die langen Seitenketten aus Zuckerverbindungen sorgen dafür, dass die Mucine eine hohe Wasserbindungskapazität besitzen. Ebenfalls wird dadurch das zentrale Protein vor Säureeinwirkungen im Verdauungssystem und vor Abbau durch Enzyme (Proteolyse) geschützt (Hanisch und Muller 2000, Rhodes 1997). Allgemein besteht die wichtigste Aufgabe der Mucine darin, Schleimhäute vor chemischen, mechanischen bzw. physikalischen Reizen zu schützen. Sie sind an der Adhäsion und Barrierefunktion durch Schleimhäute beteiligt. Auch in der Schleimhaut der Augen sind Mucine zum Schutz vorhanden (Miederer 1986, Miederer und Stadelmann 1971). Wie in Abschnitt 1.1.3 erläutert, handelt es sich

bei der inneren Schicht des Tränenfilmes um eine Mucinschicht. Es gibt fünf verschiedene nachgewiesene Mucinarten. Das Mucin-1 ist membranbeständig bzw. membranverankert und so in die Zellmembran der Corneaepithelzellen fest eingebaut. Dieses große und negativ geladene Mucin ist in der Lage, die Adhäsion anderer Zellen, auch die von Bakterien, zu verhindern. Außerdem kommen die sekretorischen Mucine-4, -5AC, -7 und -16 vor, die von den negativen Mucinen-1 abgestoßen werden, sodass sie sich gut über die Augenoberfläche verteilen können. Das Mucin-4 wird von den Epithelzellen der Cornea gebildet und ist membran-assoziiert. Das Mucin-5AC wird von den Becherzellen der Cornea gebildet, ist gelartig im Kern und ist nach außen hin immer wässriger. Das sezernierende Mucin-7 wird von den Tränendrüsen Acini gebildet (Perez-Vilar und Hill 1999). Das Mucin-16 ist auf der Augenoberfläche membran-assoziiert und wird auch von den Tränendrüsen Acini gebildet. Es hat eine Schutzfunktion, indem es Fremdkörper oder ähnliches durch eine Schmierbarriere abweist (Guzman-Aranguez und Argueso 2010, Eule 2007).

Galektine

Die Galektine gehören der Familie der Lektine an, die β -Galaktoside binden können (Cooper 2002, Lahm et al. 2004, Liu, F. T. und Rabinovich 2005). Galektine können eine, oder auch zwei identische Domänen (ca. 130 Aminosäuren) enthalten. Sie werden abhängig von der Anzahl ihrer CRDs, den Domänen, die für die Kohlenhydratbindung verantwortlich sind, in drei Gruppen eingeteilt (Liu, F. T. und Rabinovich 2005).

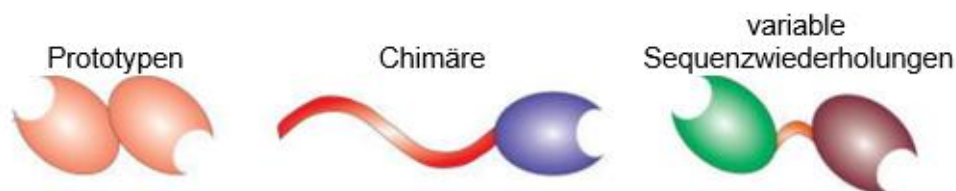


Abbildung 5: Die drei unterschiedlichen Gruppen der Galektine (Prototypen, Chimäre, variable Sequenzwiederholungen (Cummings und Liu 2009)

Bei der ersten Gruppe handelt es sich um die Galektin-Prototypen mit einer CRD. Unter die zweite Gruppe fällt ausschließlich das Galektin-3. Es handelt sich hierbei um ein chimäres Galektin, das ein CRD hat, woran prolin-, glyzin- und

tyrosinreiche Polypeptidketten aus etwa 120 Aminosäuren hängen. Bei der dritten handelt sich um Galektine, die zwei CRDs enthalten, die durch eine 5 bis 70 Aminosäure lange Polypeptidkette verbunden sind (variable Sequenzwiederholungen) (Abbildung 5) (Hahn 2011). Jedes einzelne Galektin bevorzugt eine spezifische Bindung zu einem bestimmten Kohlenhydrat (Brewer et al. 2002). Galektine können sowohl extrazellulär als auch intrazellulär, im Nukleus, Zytoplasma oder an der Plasmamembran vorkommen. Sie werden im Zytoplasma synthetisiert. Von dort aus können sie durch unterschiedliche Liganden (intrazelluläre oder extrazelluläre) verschiedene intrazelluläre und extrazelluläre Signaltransduktionswege und Genexpressionsvorgänge beeinflussen. Durch diese verschiedenen intra- und extrazellulären Liganden können Galektine viele unterschiedliche Funktionen erfüllen. Z. B. die Regulierung der Apoptose, des Zellwachstums und der Differenzierung, die Stimulierung der Zelladhäsion und die Regulierung der malignen Transformation. Außerdem können sie die Embryogenese, die Reproduktion und die Immunmodulation beeinflussen (Liu, F. T. und Rabinovich 2005, Perillo et al. 1998). Ebenfalls können sie die Zelltransformation zum metastatischen Phänotyp und das Zellwachstum von Tumorzellen begünstigen (Barondes et al. 1994, Perillo et al. 1998). Das zur Gruppe der chimären Galektinen gehörende Galektin-3 ist ein β -Galactosid-bindendes Protein und hat viele Aufgaben in und außerhalb von Zellen. Zu dessen Aufgabenbereichen gehören die Zellfunktionen, vor allem die Regulation des Zellwachstums, der Zelladhäsion, der Zelldifferenzierung, der Zell-Zell-Interaktionen und des Zellzykluses. Auch in der Tumorgenese ist seine Funktion entscheidend. Es ist unter anderem für das Tumorwachstum unverzichtbar. Das Galektin-3 ist im menschlichen Organismus in Tumorzellen, Makrophagen, Epithelzellen, Fibroblasten und in aktivierten T-Lymphozyten lokalisiert. Im Auge befindet es sich in der Glycocalyx d.h. in der Mucinschicht zwischen dem membranverankerten Mucin-1 (Guzman-Aranguez und Argueso 2010, Liu, F. T. und Rabinovich 2005, Hahn 2011).

Tight junctions

Die Epithelzellen werden durch sogenannte *Tight junctions* zusammengehalten, welche einen kontinuierlichen Ring um die gesamte Zelle bilden (Guzman-Aranguez und Argueso 2010, Bäuml 2008). Die *Tight junctions* haben mehrere Funktionen. Zum einen haben sie eine Barrierefunktion, indem sie den Intrazellularraum von Epithelzellen abdichten. Hierdurch wird ein parazelluläres Eindringen und ein Ausstrom von Flüssigkeiten aus dem Epithel verhindert. Ein rezeptorvermittelter Transport von Substanzen durch die Epithelzellen hindurch, ein transzytäres Eindringen, wird möglich. Vom mechanischen Gesichtspunkt aus, stabilisieren sie den Epithelzellverband, indem sie die Zytoskelette der Epithelzellen miteinander verbinden. Außerdem sind *Tight junctions* dazu in der Lage, das Wandern und damit das eigenständige Wechseln von Membrankomponenten entlang der Zellmembran zu verhindern. Dadurch bleibt die bestehende Polarität (apikaler und basaler Zellpol) der Epithelzellen erhalten (Anderson und Van Itallie 2009, Bäuml 2008). *Tight Junctions* werden aus zwei Proteinklassen, den Transmembranproteinen und den *Tight junction*-assoziierten Proteinen aufgebaut. Bei den Transmembranproteinen handelt es sich um membranständige Proteine, die eine Membran (Lipiddoppelschicht) durchziehen. Die eigentliche Zell-Zell-Verbindung wird dadurch geschaffen, indem sich die extrazellulären Domänen dieser Transmembranproteine verbinden (Bäuml 2008).

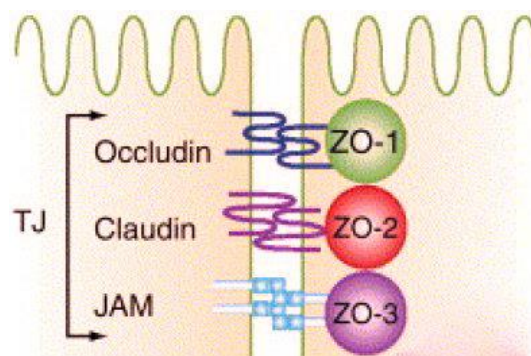


Abbildung 6: Vergrößerte Darstellung der *Tight junctions* (TJ) mit den Transmembranproteinen Occludin, Claudin und JAM (*Junctional Adhesion Molecule*) und den Zonula Occludens Proteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Miyoshi und Takai 2005).

Zu den Transmembranproteinen gehören das Occludin, die Claudine und das JAM (*Junctional Adhesion Molecule*) (Abbildung 6). Die *Tight junction*-assoziierten Proteine liegen auf der cytoplasmatischen Seite, also intrazellulär, und gewähren durch die Transmembranproteinbindung und den Cytoskelettkontakt die Verankerung der *Tight junction*. Hierzu zählen unter anderem die Zonula Occludens Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3. Sie gehören der Familie der Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen (MAGUK) an, sind für die Ausbildung und Erhaltung der Membrandomänen wichtig (Itoh et al. 1993) und werden unter anderem durch die Immunofluoreszenz in unmittelbarer Nähe der *Tight junctions* lokalisiert (Stevenson und Keon 1998).

1.2 Krankheiten des Auges

Kennzeichnend für alle hier erläuterten Erkrankungen des Auges sind Rötung und Schwellung. Hiervon ausgenommen ist das Glaukom. Die an einer Konjunktivitis (Bindehautentzündung) erkrankten Personen leiden unter verklebten Wimpern, brennenden Augen, unter einem Fremdkörpergefühl und einer Rötung der Bindehaut. Ziel einer Therapie ist es, ein Übergreifen in die umliegenden Strukturen zu verhindern. Hierzu werden nach Reinigung des Auges vom Arzt antibiotische Augentropfen verwendet (Sachsenweger 2003c). Die Keratitis (Hornhautentzündung) ist vor allem durch Rötungen des Auges um die Hornhaut herum gekennzeichnet. Da sie bakteriell verursacht wird, muss sie ebenfalls mit antibiotischen Augentropfen therapiert werden. Bei Viren werden virushemmende Substanzen eingesetzt, als Augentropfen z.B. Triherpine® und als Augensalbe z.B. Zovirax® (Sachsenweger 2003b). Bei einem Chalazion (Hagelkorn) handelt es sich um eine wenig schmerzhaftes Erkrankung der Meibom-Drüsen, welche für den fettigen Anteil des Tränenfilmes verantwortlich sind. Ist der Abfluss gestört, kommt es im Drüsenschlauch zur Entzündung. Die Entstehung einer Geschwulst im Lid wird mit antibiotischen Salben behandelt. Oft muss dieser Abszess jedoch operativ entfernt werden (Kirsch 2010c, Sachsenweger 2003d). Beim Hordeolum (Gerstenkorn) kommt es zu einer schmerzhaften Schwellung der Lidkante mit Rötung mit bakterieller Ursache. Es

bildet sich ein Abszess, der das Lid durchbrechen kann und schließlich aufplatzt. Medikamentös wird dies ebenfalls mit antibiotischen Salben behandelt (Kirsch 2010c, Sachsenweger 2003d). Beim Glaukom (grüner Star) kommt es zu einer Schädigung des Sehnervenkopfes. Der Sehnerv verbindet das Auge mit dem Gehirn, sodass eine Schädigung zur Sehverschlechterung bis hin zur Erblindung des Auges führen kann. Ein erhöhter Augeninnendruck ist für diese Erkrankung charakteristisch. Er wird häufig durch einen gestörten Abfluss des Kammerwassers verursacht, seltener durch vermehrte Kammerwasserproduktion. Risikofaktoren sind z.B. eine positive Familienanamnese, niedriger Blutdruck oder auch ein erhöhtes Lebensalter. Ein Glaukom wird oft sehr spät bemerkt, da die Erkrankten keine Auffälligkeiten wie z. B. Schmerzen bemerken. Häufig wird erst bei Gesichtsfeldausfällen (Skotome) ein Augenarzt aufgesucht. Klinisch unterscheidet man zwischen dem chronischen Glaukom, dem Niederdruckglaukom, dem akuten Winkelblockglaukom und entwicklungsbedingten Glaukomen. Therapeutisches Ziel ist immer, das Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern. Bereits aufgetretene Schäden können nicht mehr rückgängig gemacht werden und eine letztliche Erblindung ist häufig nicht mehr aufzuhalten (Sachsenweger 2003a).

1.3 Topische Applikation von Medikamenten - Augentropfen

Die äußere Applikationsform von Arzneimitteln am Auge sind Augentropfen (Oculoguttae). Sie liegen ölig oder wässrig vor und können in Einmaldosisbehältern, aber auch in Fläschchen abgefüllt sein. Da es sich bei der Konjunktiva um eine Schleimhaut handelt, hat sie eine hohe Resorptionsfähigkeit und wird daher als Applikationsweg für viele Medikamente des Auges verwendet. Hierbei werden die Medikamente in den Bindehautsack verabreicht, sodass diese lokal an der Binde- und Hornhaut wirken. Augentropfen werden vor allem bei einer Konjunktivitis, Keratitis oder auch bei einem Glaukom eingesetzt. Ebenso finden sie Anwendung bei operativen Eingriffen am Auge (beispielsweise zur Anästhesie) oder bei der augenärztlichen Diagnostik im Allgemeinen, beispielsweise zur Erzeugung einer Pupillenerweiterung (Mydriasis) (Grehn

2011). Da bei konventionellen Augentropfen nur ca. 1 % des applizierten Wirkstoffs in das Auge gelangt (Schnichels et al. 2015b), ist es wichtig, neue Medikamententräger, wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten DNA-Nanopartikel (NP), zu entwickeln, um die Wirkung am Auge zu optimieren.

1.4 Drug Delivery

Drug Delivery Systeme sind Technologien, die für die gezielte Arzneimittelabgabe bzw. für die gesteuerte Freisetzung von therapeutischen Wirkstoffen entwickelt werden. Sie werden zunehmend wichtiger. Für Patienten wird die Wirksamkeit und Verträglichkeit eines Arzneimittels am Wirkort durch einen effizienten Transport verbessert. Der effiziente Transport spielt vor allem dann eine große Rolle, wenn Wirkstoffe biologische Barrieren nur schwer durchdringen können oder ihr Zielgewebe nicht oder nur in geringen Mengen erreichen. Durch alternative Darreichungsformen kann die Handhabung von Arzneimitteln vereinfacht werden und die Dosiervorschriften durch die Patienten besser eingehalten werden. Die Entwicklung von *Drug Delivery* Systemen ist ein sehr dynamisches und interdisziplinäres Feld. Von der Mikrosystemtechnik über die Materialwissenschaft bis zur Nanotechnologie werden dabei zahlreiche Schlüsseltechnologien der Medizintechnik eingesetzt. Das Anwendungsgebiet des Systems spielt dabei eine Rolle. Werden Arzneimittel und Medizinprodukte zu *Drug Delivery* Systemen kombiniert, sind technische und regulatorische Gesichtspunkte wichtig. Vor allem bei der Herstellung, Prüfung und Zulassung spielen diese eine große Rolle (Liu, S. et al. 2012, Rawas-Qalaji und Williams 2012).

1.4.1 NP allgemein

Als NP werden kleine Teilchen bezeichnet, die zwischen 1 nm bis 100 nm groß sind. NP sind heute bereits in verschiedensten Alltagsprodukten, vom Deodorant bis zur Sonnenmilch enthalten. Ein großes Anwendungsgebiet ist auch die Medizin. Hier werden die winzigen Teilchen als Sphären für Wirkstoffe oder als

Marker bei bildgebenden Verfahren eingesetzt. Ihr Vorteil ist, dass sie auch Barrieren durchdringen können, die normalen Medikamenten verschlossen bleiben, wie beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke. Doch genau dies birgt auch Risiken (Umweltbundesamt 2006, Paschen et al. 2004). So können NP in Zellkerne des Körpers eindringen und hier funktionelle Störungen hervorrufen. Aufgrund ihrer geringen Größe können sie von vielen Zellen im Körper aufgenommen werden und sich durch den gesamten Körper bewegen. Dadurch kann es möglicherweise zu Zell- und Organschäden kommen. Umstritten ist auch, ob sie schon in geringen Konzentrationen als Zellgift (toxisch) wirken (Amini et al. 2014, Umweltbundesamt 2006).

1.4.2 DNA-NP

Ein neues NP-Medikamententrägersystem wurde entwickelt, um eine effizientere Verabreichung zu erzielen und damit die Wirkung von Medikamenten am Auge zu optimieren (Schnichels et al. 2013). Das *Drug Delivery* System basiert auf amphiphilen Oligonukleotiden, die aus konventionellen und alkylierten Nukleotiden bestehen. Diese Amphiphile durchlaufen eine Mikrophasentrennung und organisieren sich selbst in Mizellen. Die resultierenden NP bestehen aus einem hydrophoben Kern und einer Korona von einzelsträngiger DNA.

Die NP können leicht mit verschiedenen Arten von Medikamenten beladen werden. Die Wirkstoffe können durch hydrophobe Wechselwirkungen, eine kovalente Bindung oder nicht-kovalente Wechselwirkungen mit einem Aptamer gebunden werden (Abbildung 7) . Der erste Ansatz beruht auf der Interaktion eines hydrophoben Medikaments mit dem Kern der NP und ermöglicht eine einfache und unkomplizierte Art der Beladung (Herrmann et al. 2015). Bei einer kovalenten Bindung haben Atome eines Moleküls durch Überlappung von Atomorbitalen unter Bildung von Molekülorbitalen gemeinsame Elektronenpaare. Diese kovalente Bindung kann zwischen gleichartigen aber auch zwischen verschiedenartigen Atomen auftreten (Bannwarth et al. 2013). Bei hydrophilen Medikamenten ist das Laden über eine kovalente Bindung möglich. Dies erfordert jedoch eine Modifizierung der chemischen Struktur (Herrmann et al. 2015). Um

diese Einschränkungen zu überwinden, kann auch eine kontrollierte Wirkstoffbeladung über eine Aptamer-Bindung erfolgen. Aptamere sind kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide oder Peptide, die sich selektiv an eine Bindungsstelle anlagern und so als Verbindung zwischen dem Medikament und dem NP wirken (Herrmann et al. 2015). Die hohe Spezifität wird erreicht, indem sich die dreidimensionale Struktur des Oligonukleotides genau um den einen Bindungspartner herumfaltet. Es wird als aptamerische Bindung bezeichnet (Ellington und Szostak 1990). Diese elegantere Möglichkeit erlaubt es, den Wirkstoff ohne chemische Veränderung an den NP zu koppeln. Aptamere können gegen jeden Wirkstoff gebildet werden, was eine breite Anwendbarkeit dieses Verfahrens garantiert. Die Bindung zwischen dem Aptamer und dem NP wird durch eine Verlängerung des Aptamers mit der komplementären Sequenz zum NP gewährleistet (Herrmann et al. 2015). In dieser Arbeit wurden die NP mit dem verlängerten Aptamer hybridisiert, sodass ein doppelsträngiger DNA-NP entstanden ist. Das Aptamer bzw. der NP wurden danach mit dem Medikament (Neomycin B bzw. Kanamycin) geladen.

Um das Potenzial dieses DNA-NP-basierten Trägersystems zu erkunden, ist es bereits in Tierstudien und in Experimenten mit menschlichem Hornhautgewebe erforscht worden. Dabei konnte in Versuchen an Schweinen- und Rattenaugen nachgewiesen werden, dass bis zu vier Stunden nach ihrer Anwendung noch NP an die Hornhaut gebunden waren. Vergleich man dazu die Augentropfen der Kontrollgruppen, die nach weniger als fünf Minuten schon nicht mehr nachweisbar waren, wurde die deutlich längere Verweildauer der NP an der Hornhaut deutlich. Wurden Antibiotika-NP getestet, banden sich diese mindestens zwei Stunden an das Hornhautepithel. Die ungebundenen Antibiotika waren bereits nach fünf Minuten nicht mehr nachweisbar. Die an NP gebundenen Antibiotika wurden durch einen MIC-Test („*minimal inhibitory concentration test*“) nachgewiesen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die NP am Hornhautepithel über natürliche Mechanismen (DNAsen) abgebaut wurden und so die Antibiotika wirken konnten. Eine Testung der Effektivität an Schweineaugen (ex-vivo) zeigte, dass Antibiotika-NP das Bakteriumwachstum (*E. coli*) zehn Mal länger signifikant behinderten als die ungebundenen

Antibiotika. Die NP wurden außerdem bereits auf Toxizität überprüft. In Zelllinien konnten keine Toxizitäten und damit schädliche Eigenschaften festgestellt werden. Auch bei in-vivo Versuchen mit Ratten konnten keine schädigenden Wirkungen der NP auf die Augen festgestellt werden (Schnichels et al. 2013, de Vries et al. 2013, Schnichels et al. 2015a).

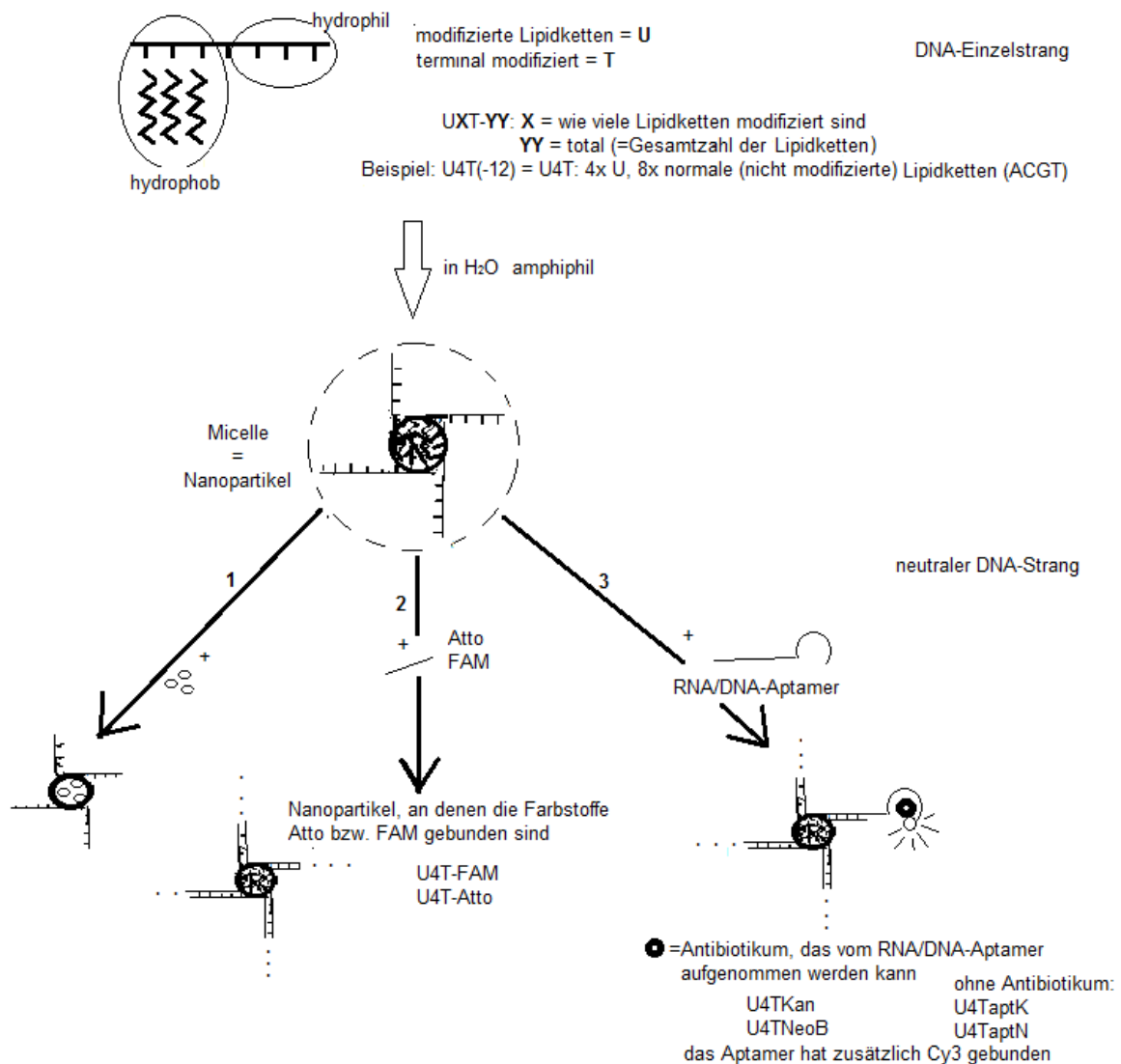


Abbildung 7: NP können unterschiedlich geladen werden: durch hydrophobe Wechselwirkungen (1), kovalente Bindungen (2) oder mit Hilfe von aptamerische Bindungen (3). Die Herstellung der unterschiedlich beladenen funktionalisierten NP wird in Abschnitt 2.4.1 näher erläutert.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Um Vorderabschnittserkrankungen des Auges zu heilen bzw. besser zu behandeln, ist eine hohe Wirkstoffkonzentration erforderlich. Dies kann oft nur durch mehrmaliges Verabreichen von Augentropfen erreicht werden, da die Wirkstoffkonzentration im Auge durch Einflüsse, wie z. B. den Lidschlag, den Tränenfilm, das Hornhautepithel, die Bindehaut, die Blut-Kammerwasser-Barriere oder die Blut-Retinaschranke negativ beeinflusst wird.

Ziel dieser Arbeit war es, die Effektivität der Medikamentenaufnahme am Auge mit Hilfe von DNA-NP zu steigern. Dabei handelt es sich um ein neu entwickeltes Medikamententrägersystem für Vorderabschnittserkrankungen des Auges. Zuerst sollte die Aufnahme von DNA-NP untersucht werden.

Zum einen sollte gezeigt werden, dass bei Anwendung von DNA-NP keine geringere Intaktheit des Hornhautepithels zu befürchten ist. Zum anderen sollte herausgefunden werden, ob sich die Aufnahme der NP mit möglichen Veränderungen der Integrität des Hornhautepithels beeinflussen lässt. Einflussfaktoren sind hierbei N-acetylcystein (ACC), Benzalkoniumchlorid (BAC) und Hitzestress. Außerdem sollten Antibiotika über Aptamere an NP gebunden und getestet werden. Bevor die mit Antibiotika beladenen NP appliziert werden sollten, sollte es in einem weiteren Versuch zur Anwendung von Hitzestress kommen. Auch die Aufnahme dieser beladenen NP sollte getestet werden.

Weiterhin sollte die Bindungsstelle der unbeladenen NP gezeigt werden. Es sollte gezeigt werden, ob nach Anwendung der verschiedenen Versuchsreihen die NP unterschiedlich binden. Dafür hat man die Proteine Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1 am Hornhautepithel sichtbar gemacht. Außerdem sollte die Lokalisation von Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1 am Hornhautepithel bestimmt werden.

Diese Ziele sollten anhand enukleierter Schweineaugen, enukleierter Rattenaugen und Rattenaugen aus in-vivo Versuchen untersucht werden. Parallel dazu sollte untersucht werden, ob dieselbe Versuchsreihe an enukleierten Schweineaugen, enukleierten Rattenaugen und Rattenaugen aus in-vivo Versuchen unterschiedliche Ergebnisse zeigt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

- 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Invitrogen, #D1306
- Alexa Fluor 488 markierter Esel Anti-Kaninchen IgG Antikörper, Invitrogen, #A21206
- Atto488, Atto-Tec GmbH, #AD488-101
- Benzalkonium chloride $\geq 95,0$ % (T) (BAC), Sigma-Aldrich®, #63449-41-2
- BSA (Rinderserumalbumin, Fraction V, 1 % (w/v)), Serva #11930
- Carbocyanin3 (Cy3), VWR prolabo® chemicals international S.A.S, #25-8010-86
- Cy3-Filter, AHF, #F41-007
- Cy3-konjugierte-Ziege Anti-Kaninchen IgG Antikörper (H+L), Dianova, #111-165-003
- DAPI-Filter, AHF, #F36-500
- Deckgläser 24x50mm, Greiner Bio-One
- Eosin Y ws., VWR prolabo® chemicals international S.A.S, #C.I.45380
- Essigsäure, VWR prolabo® chemicals international S.A.S, #20103.364
- Ethanol, Merck #UN1170
- Eukitt, Sigma-Aldrich®, #03989
- Fettstift, Dako Pen, Dako S 2002, #S200230-2
- Fluorescein- bzw. Fluorescein-iso-thio-canat-Filter (FITC), AHF, #2024B
- Fluorsave™ Reagent, Calbiochem, #345789
- Hämatoxylin-Lösung (HHS), Merck KGaA, #C.I.75290
- Methanol, VWR prolabo® chemicals international S.A.S, #67-56-1
- N-Acetyl-L-cysteine ≥ 99 % (TLC) (ACC), Sigma-Aldrich®, #616-91-1
- Natriumchlorid, Merck KGaA, #106406
- Objektträger, Super Frost Plus. R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland, #030060
- PBS (phosphatgepufferte Saline), gibco® by life technologies, #10010031
- Perjodsäure, Merck KGaA, #100524

- Pipettenspitzen (1µl, 20µl, 100µl, 1000µl), Greiner Bio-One
- Polyklonaler CD227/Mucin-1 Antikörper, Acris, #AP10158PU-N
- Polyklonaler Galektin-3 Antikörper, Acris, #AP06132PU-N
- Kaninchen Anti-ZO-1 Antikörper (N-term), Invitrogen™, #40-2300
- Salzsäure 25 % (w/v), Merck KGaA, #1.00312.2500
- Salzsäure Alkohol, AppliChem GmbH, #A2592
- Schiffs Reagens, Roth®, #X900.2
- Skalpell, Aesculap Division
- Stickstoff (N₂) Standardlösung CRM, Merck KGaA, #125043
- Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek, #4583
- TritonX-100, Sigma, #9002-93-1
- Tween 20 Polyoxyethylen (20) Sorbitanmonolaurat, Molekularbiologie, Serva, #3979601
- Trispuffer, Sigma, #C4H11NO3
- Xylol, VWR prolabo® chemicals international S.A.S, #1.08661.2500

2.2 Geräte und Programme

- Adobe Photoshop CS6
- Cryostat, Leica CM 1900
- ImageJ Software (imagej.nih.gov, letzter Besuch 31.01.2016, Version 1.49) mit dem Plugin von Dr. Stephanie Joachim und Dr. Heiko Schmid von der Ruhr-Universität Bochum (GFAPAuswertung_ImageJ_SJoachim_V1.3.docx, GFAP Analyse.ijm, last visited 31.01.2016)
- JMP 11.2.0, Statistical Discovery™, SAS Institute .Inc., Cary, NC, USA
- Magnetrührer IKA COMBIMAG RCT
- Mikroskop, Axioskop, Zeiss, Jena, Deutschland
- Openlap, Improvision CV47HS
- Pipetten, Eppendorf
- Schüttler, Vortex-Genie 2™, Scientific Industries
- Waage, Sartorius LA 120 S

2.3 Lösungen

2.3.1 Herstellung von TBS (10x bzw. 1x)

Zur TBS-Herstellung wurden 60,6 g Trispuffer und 87,7 g Natriumchlorid in 900 ml doppelt destilliertes Wasser gegeben und mit einem Magnetrührer so lange durchmischt, bis die Lösung makroskopisch klar war. Um den gewünschten pH-Wert von 7,6 zu erreichen, wurde 25 % (w/v) Salzsäure in die Lösung titriert. Durch Auffüllen auf einen Liter mit doppelt destilliertem Wasser entstand eine zehnfach konzentrierte TBS-Lösung (TBS 10x). Zur Anwendung auf eine einfache Konzentration wurde diese mit doppelt destilliertem Wasser verdünnt (TBS 1x).

2.3.2 TBS-Tween 0,1 % (v/v)

In 1 000 ml des einfach konzentrierten TBS (TBS 1x) wurde 1 ml 0,1 % (v/v) Tween 20 pipettiert. Die Pipettenspitze wurde hierbei aufgrund der Viskosität des 0,1 % (v/v) Tween 20 schräg abgeschnitten, um die Ein- bzw. Ausflussöffnung zu vergrößern.

2.3.3 5 % (w/v) BSA in PBS bzw. TBS

Um 5 % (w/v) BSA herzustellen, wurden 2,5 g auf 50 ml PBS oder TBS 1x in einem Magnetrührer zu einer makroskopisch klaren Lösung durchmischt.

2.3.4 Eosin Y

Um die Gebrauchslösung von Eosin Y herstellen zu können, wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt. Dazu wurden 5 g Eosin Y und 100 ml Wasser in 400 ml 95 % (v/v) Alkohol gegeben und in einem Magnetrührer homogen durchmischt. Es wurden dann zur Herstellung der Gebrauchslösung 250 ml von der Stammlösung und 5 ml 100 % (v/v) Essigsäure in 750 ml 70 % (v/v) Alkohol getan und ebenfalls durchmischt.

2.4 Methoden

2.4.1 Herstellung von funktionalisierten NP

Ein DNA-Einzelstrang mit vier Lipid-modifizierten Thyminen am terminalen Ende und acht Basen (Adenin-Cytosin-Guanin-Thymin) wurde synthetisiert. Dadurch erhielt der eigentlich hydrophile DNA-Strang eine hydrophobe Seite. Durch den hydrophoben Abschnitt des DNA-Einzelstranges lagerten sich mehrere Stränge in Wasser zu Mizellen zusammen. Die Mizellen wurden in 1x TAE-Puffer bei einer Konzentration von 100 μM hergestellt. Es wurde ein Äquivalent der komplementären DNA zugegeben und unter Verwendung eines thermischen Gradienten hybridisiert. Der komplementäre Strang war mit dem Farbstoff FAM bzw. Atto gekoppelt und wurde dann an den NP hybridisiert (U4T-FAM bzw. U4T-Atto = NP, die mit einem kovalent gebundenen fluoreszierenden Farbstoff FAM bzw. Atto markiert wurden). In dieser Arbeit wurden außerdem die NP mit einem Aptamer hybridisiert, sodass eine komplementäre Sequenz entstanden ist. Das Aptamer bzw. der NP wurden danach mit dem Medikament (Neomycin B bzw. Kanamycin) beladen. Die Bindung zwischen dem Aptamer und dem NP wurde durch eine Verlängerung des Aptamers mit der komplementären Sequenz zum NP gewährleistet.

Antibiotika beladene NP wurden in der benötigten Konzentration (20 μM) in 0,2 x TAE-Puffer hergestellt. Zum Laden von Neomycin B wurde ein RNA-Aptamer verwendet, zum Laden von Kanamycin B wurde ein DNA-Aptamer verwendet. Diese Aptamere können die jeweiligen Antibiotika binden. Beide wurden mit der komplementären Sequenz verlängert. Das Lipid-modifizierte Oligonukleotid und das komplementäre RNA- oder DNA-Aptamer (ein Äquivalent) wurden ebenfalls in einem Eppendorf-Gefäß in der gewünschten Konzentration mit einem thermischen Gradienten geladen. Dies geschah durch eine 30-minütige Inkubation bei 80 °C. Die Temperatur wurde danach alle zwei Minuten um 1 °C bis zur Raumtemperatur gesenkt. Das Lipid-modifizierte Oligonukleotid und das komplementäre RNA- oder DNA-Aptamer wurden danach hybridisiert (U4TKan = NP, die mit dem Antibiotikum Kanamycin beladen wurden bzw. U4TNeoB = NP, die mit dem Antibiotikum Neomycin B beladen wurden). Bei

beiden Antibiotika wurde jeweils eine Cy3 funktionalisierte komplementäre DNA verwendet. Anschließend wurde für Neomycin B zwei Äquivalente Antibiotikum zugegeben und für Kanamycin B ein Äquivalent (10 mM Stammlösung in Reinstwasser). Die Lösung wurde bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten inkubiert und ohne weitere Verdünnung verwendet.

2.4.2 Herstellung von Kryoschnitten

Die Augen wurden direkt nach der Entnahme im Einbettmedium Tissue-Tek in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Augen erfolgte bei -28 °C. Für die Anfertigung der Schnitte wurden die Gewebeblöcke mit Tissue-Tek auf den Kryostat aufgebracht. Die Cornea wurde so ausgerichtet, dass beim Schneiden die Klinge zuerst die Cornea berührte und erst dann den Rest. Es wurde so lange geschnitten und die Schnitte verworfen, bis ein zentraler Teil der Cornea erreicht wurde. Dann wurden 12 µm dicke Kryoschnitte angefertigt, die jeweils auf zehn verschiedene Objektträger aufgebracht wurden. Danach wurden wieder ein paar Schnitte angefertigt und verworfen. Daraufhin wurden erneut zehn Schnitte auf die Objektträger aufgebracht. Pro Objektträger wurden vier Schnitte von Rattenaugen bzw. zwei von Schweineaugen aufgebracht. Anschließend wurden die Objektträger beschriftet und unfixiert bei -28 °C im Gefrierschrank bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Reste der Gewebeblöcke wurden ebenfalls bei -28 °C aufbewahrt.

2.4.3 Tierstudien

In Tierstudien wurde den wachen Ratten ein einzelner Tropfen des Medikaments verabreicht. Der Lidschlag des Auges wurde währenddessen und nach der Applikation nicht behindert. Nach der Inkubationszeit wurden die Ratten durch CO₂-Inhalation getötet und die Augen enukliert und wie in Abschnitt 2.4.2 weiter verarbeitet. Die Tiere wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz (Tierversuchsgenehmigung AK 3/11 an Sven Schnichels) behandelt.

2.5 Histologie

2.5.1 Die PAS-Färbung

Für eine Polysaccharid-Färbung wurde die Perjodsäure-Schiff-Reaktion, PAS, verwendet. Diese Färbung wird in der histologischen Diagnostik routinemäßig für verschiedene Erkrankungen genutzt. Dabei werden neutrale und saure Polysaccharide und neutrale Schleime purpur-rot angefärbt und die Zellkerne werden blau angefärbt. Dies eignet sich zum Nachweis von z.B. Glykogen, Schleim (Mucine), Pilzen und Parasiten (Lüllmann-Rauch 2009b).

Die Kryoschnitte, die noch unfixiert im Gefrierschrank bei -28 °C gelagert wurden, wurden zunächst mit -28 °C kaltem Methanol für zehn Minuten fixiert. Danach wurden die Objektträger einmal für zehn Minuten in TBS (1x) gewaschen. Es folgte ein Waschvorgang mit destilliertem Wasser. Die Objektträger wurden dann für zehn Minuten in ein 50-60 °C warmes mit Perjodsäure gefülltes Gefäß gestellt. Danach wurden sie unter fließendem Wasser gewaschen und wieder für zehn Minuten in ein 50-60 °C warmes Gefäß gestellt. Dieses war nun mit einem Schiffs-Reagens befüllt, das eine fuchsinschweflige Säure aus einem Produkt aus Fuchsin und Schwefeldioxid-Lösung war. Schließlich wurden die Objektträger wieder unter fließendem Wasser gewaschen, damit überschüssige fuchsin-schwefelhaltige Säure entfernt wurde. Durch die Perjodsäure wurden die freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu den Aldehydgruppen oxidiert. Sie bildeten dann mit dem schwefelsauren Fuchsin im Schiff-Reagens purpur-rote Komplexe. Anschließend diente die Hämatoxylinfärbung zur Gegenfärbung der Zellkerne. Hierbei wurden die Objektträger für zehn Minuten in ein mit HHS gefülltes Gefäß gestellt. Danach wurden sie drei Sekunden in Wasser „gedippt“ und dann drei Sekunden in eine Salzsäure-Alkohol-Lösung „gedippt“. Anschließend wurden sie in viel Wasser gewaschen und für zehn Minuten im Wasser stehen gelassen, damit überschüssige Farbe entfernt wurde. Es folgte die Entwässerung der Objektträger über die aufsteigende Alkoholreihe (2x 96 % (v/v), 2x 99 % (v/v)). Die Schnitte wurden in das Intermedium, die Xylolreihe (vier mit Xylol gefüllte Gefäße), „gedippt“. Als letzter Schritt wurden die Objektträger in

Eukitt eingedeckelt. Eukitt diente zum Aufkleben der Deckgläser auf die Objektträger.

2.5.2 Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Diese Färbung wird in der Diagnostik zur Routinefärbung als Übersichtsfärbung von krankhaften Veränderungen genutzt. Das Hämatoxylin färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen wie Zellkerne, Bakterien, Kalk, basophiles Zytoplasma und Knorpelgrundsubstanz blau an, da es ein natürlicher Farbstoff ist, der in Form des basischen Hämalan eine intensiv färbende Eigenschaft entwickelt. Eosin ist ein synthetischer Kunststoff, der alle acidophilen bzw. basischen Bestandteile der Zellstrukturen wie Zytoplasma, Kollagen und Erythrozyten rot anfärbt (Lüllmann-Rauch 2009c).

Wie bei der PAS-Färbung, wurden die Kryoschnitte zunächst für zehn Minuten in Methanol fixiert und danach für zehn Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Es folgte zunächst die Hämatoxylinfärbung. Die Objektträger wurden für zehn Minuten in ein mit HHS gefülltes Gefäß gestellt und danach drei Sekunden in Wasser „gedippt“. Dann wurden sie drei Sekunden in Salzsäure-Alkohol-Lösung „gedippt“ und anschließend in viel Wasser gewaschen. Sie wurden schließlich für zehn Minuten in Wasser stehen gelassen, damit überschüssige Farbe entfernt wurde. Danach wurden die Objektträger für zwei Minuten in Eosin Y gestellt. Nach Abtupfen auf Papiertüchern folgte die Entwässerung der Objektträger über die aufsteigende Alkoholreihe (70 % (v/v), 2x 96 % (v/v), 2x 99 % (v/v)) und das „Dippen“ der Schnitte in das Intermedium Xylol (Xylolreihe: vier mit Xylol gefüllte Gefäße). Final folgte das Eindeckeln mit Hilfe von Eukitt.

2.5.3 Auswertung der Intaktheit des Hornhautepithels

In dieser Arbeit wurde nach den histologischen Färbungen, HE bzw. PAS, eine Bewertung der Intaktheit des Hornhautepithels von --- bis +++ durchgeführt. Die maximale Intaktheit des Hornhautepithels wurde mit +++ bewertet. Dies entsprach einer Intaktheit von 100 %. Die minimale Intaktheit des

Hornhautepithels wurde mit --- bewertet und entsprach einer Intaktheit von 10 %. Die Zwischenstufen wurden wie folgt bewertet: -- entsprach 20 %, - entsprach 40 %, + entsprach 60 % und ++ entsprach 80 % (Abbildung 8).

	<u>HE</u>	<u>PAS</u>		<u>HE</u>	<u>PAS</u>
--- = 10 %			+ = 60 %		
-- = 20 %			++ = 80 %		
- = 40 %			+++ = 100 %		

Abbildung 8: Bewertung der Intaktheit des Hornhautepithels der HE- bzw. PAS-Bilder (400-fache Vergrößerung). Die maximale Intaktheit des Hornhautepithels wurde mit +++ bewertet und entsprach einer Intaktheit von 100 %. Die Zwischenstufen wurden wie folgt bewertet: -- entsprach 20 %, - entsprach 40 %, + entsprach 60 % und ++ entsprach 80 %. Die minimale Intaktheit des Hornhautepithels wurde mit -- bewertet und entsprach einer Intaktheit von 10 %.

2.5.4 Fluoreszenz

Die Absorption von kurzwelligem Licht (380 nm bis 720 nm) mit nachfolgender Emission von länger welligerem Licht wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Durch das Auswechseln der Filter lassen sich mehrere Fluoreszenzfarbstoffe getrennt nachweisen (Sanderson et al. 2014). Der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI, wird vor allem zur Markierung von DNA eingesetzt (Wilson et al. 1990). Carbocyanine sind in der Regel die erste Wahl für die Immunfluoreszenz. Zu diesen gehört der rote Fluoreszenzfarbstoff Carbocyanin 3 (Cy3). Die Cy3 konjugierten Nachweisreagenzien weisen kaum unspezifische Bindungen am biologischen Gewebe auf (Dianova 2015a). Der grüne Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (FITC) gehört der Gruppe der Xanthenfarbstoffe an (Dianova 2015b). Atto 488 ist ebenfalls ein grüner

Fluoreszenzfarbstoff und wird zur Fluoreszenzmikroskopie verwendet (Atto-Tec 2015).

2.5.5 Die 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Färbung

Beim gesamten Färbeporgang mit DAPI wurden die Objektträger in den Wartezeiten mit einem schwarzen Tuch abgedeckt, damit die Färbung nicht verbleichen konnte. Die unfixierten, im Gefrierschrank bei -28 °C gelagerten Kryoschnitte, wurden zunächst in -28 °C kaltem Methanol für zehn Minuten fixiert. Nach kurzem Lufttrocknen der Objektträger wurden diese für zehn Minuten in TBS (1x) gewaschen. 0,2 µg/ml DAPI wurde in TBS (1x) 1:100 verdünnt. Nach zehn Minuten in TBS (1x) wurde die DAPI-Lösung auf die Objektträger pipettiert und eine Minute darauf gelassen. Es folgte ein Waschvorgang mit TBS (1x) für fünf Minuten. Dieser wurde einmal wiederholt. Ein Waschvorgang für ebenfalls fünf Minuten in destilliertem Wasser bildete das Ende der Färbung. Nach kurzem Lufttrocknen der Objektträger wurden diese mit FluorSave eingedeckelt.

Auch nach der DAPI-Färbung wurde eine Bewertung der Intaktheit des Hornhautepithels, wie unter 2.5.3 beschrieben, durchgeführt (Abbildung 9).

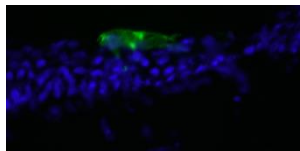

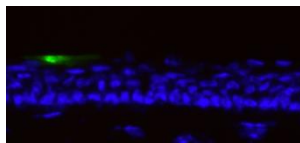
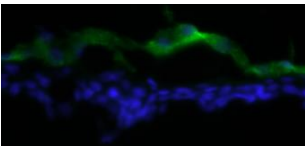
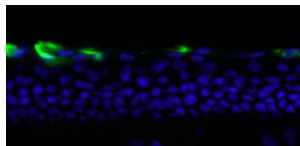
DAPI			
--- = 10 %	Kein Hornhautepithel mit --- bewertet.	+ = 60 %	
-- = 20 %		++ = 80 %	
- = 40 %		+++ = 100 %	

Abbildung 9: Bewertung der Intaktheit des Hornhautepithels der DAPI-Bilder (400-fache Vergrößerung). Die maximale Intaktheit des Hornhautepithels wurde mit +++ bewertet und entsprach einer Intaktheit von 100 %. Die Zwischenstufen wurden wie folgt bewertet: -- entsprach 20 %, - entsprach 40 %, + entsprach 60 % und ++ entsprach 80 %. Die minimale Intaktheit des Hornhautepithels wurde mit --- bewertet und entsprach einer Intaktheit von 10 %.

2.5.6 Antikörper

Primäre und sekundäre Antikörper entsprechen zwei Gruppen von Antikörpern. Primäre Antikörper sind Antikörper die gegen ein bestimmtes antigenes Ziel eingesetzt werden (ein Peptid, ein Protein, ein Kohlenhydrat oder anderes kleines Molekül). Sie sind hoch spezifisch und können nicht nur spezifische Biomoleküle erkennen. Sie können auch den Grad und die Art von Veränderung durch Verfahren wie Phosphorylierung, Methylierung oder Glycosylierung messen (Noll und Schaub-Kuhnen 2000c). Ein sekundärer Antikörper ist ein Antikörper, der sich an primäre Antikörper oder Antikörperfragmente binden kann. Sie sind mit Erkennungsmuster für ganze Ig-(Immunglobulin)-Moleküle oder Antikörperfragmente, wie in die Fc- oder Fab-Regionen, verfügbar. Die Auswahl des sekundären Antikörpers erfolgt nach der Quelle des primären Antikörpers, der Klassifizierung des primären Antikörpers (z. B. IgG oder IgM) und der präferierten Markierung. Die Identifizierung des optimalen sekundären Antikörpers erfolgt normalerweise durch systematisches Ausprobieren (Noll und Schaub-Kuhnen 2000b).

Bei den immunhistochemischen Färbemethoden erfolgt der Antigennachweis mit spezifischen Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, partikulärem Material (z. B. Goldpartikel) oder mit radioaktiven Isotopen markiert sind.

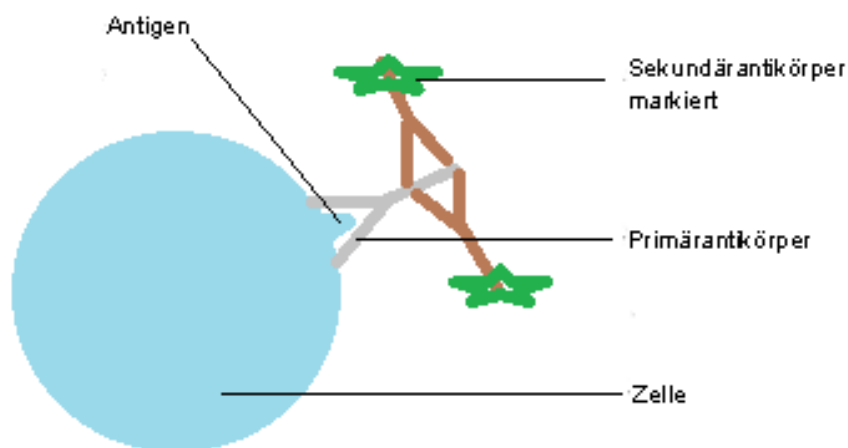


Abbildung 10: Vorgang einer Primär- und Sekundär-Antigenbindung. Der Primärantikörper, der an das Antigen einer Zelle bindet, wonach der markierte Sekundärantikörper an den Primärantikörper bindet.

Ein erster unmarkierter Antikörper (Primärantikörper) bindet mit dem Antigen (Abbildung 10). Anschließend wird dieser über einen zweiten, markierten Antikörper (Sekundärantikörper) gebunden, der an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet. Dieser Sekundärantikörper ist je nach Markierungsart (Fluoreszenz- oder Enzymmarkierung) für die Nachweisreaktion verantwortlich (Noll und Schaub-Kuhnen 2000a).

Beim Antikörperfärbeprovorgang wurden die unfixierten, im Gefrierschrank bei $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Kryoschnitte zunächst für zehn Minuten in eiskaltem Methanol fixiert. Danach wurden die Objektträger für zehn Minuten in TBS 1x gewaschen. Bei Raumtemperatur folgte für eine Stunde ein Blocken der Schnitte auf den Objektträgern mit der Blocklösung 5 % (w/v) BSA in PBS. Zunächst wurden vier Schnitte auf verschiedenen Objektträgern herausgesucht, die später als Kontrollen dienen sollten. Diese wurden separat mit einem Fettstift (Dako Pen) umkreist. Die restlichen Schnitte auf den jeweiligen Objektträgern konnten zusammen umkreist werden. Die Blocklösung wurde in die umkreisten Schnitte pipettiert (Abbildung 11).

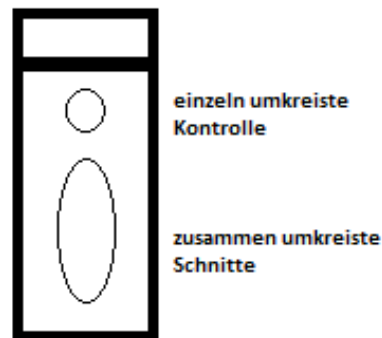


Abbildung 11: Objektträger, wie dessen Schnitte mit Hilfe eines Fettstifts (Dako Pen) umkreist wurden.

Alle Objektträger wurden nun in eine feuchte Kammer gelegt. Diese Kammer diente der Aufbewahrung der Schnitte, damit diese nicht austrocknen konnten. Nach einer Stunde wurde auf die Kontrollen 5 % (w/v) BSA in PBS pipettiert und auf die restlichen Schnitte der Primärantikörper mit seiner Verdünnung (vgl. Abbildung 12) in 5 % (w/v) BSA in PBS. Dies wurde nun über Nacht für 8 bis 16 Stunden im Kühlschrank gelagert.

Polyklonaler CD227/Mucin-1 Antikörper, Acris, Catalog No: AP10158PU-N	Polyklonaler Galektin-3 Antikörper, Acris, Catalog No: AP06132PU-N	Kaninchen Anti-ZO-1 Antikörper (N-term), Invitrogen™, Catalog No: 40-2300
1:600	1:200	1:100

Abbildung 12: Verdünnung der in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper in 5 % (w/v) BSA in PBS.

Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte dreimal je fünf Minuten mit TBST gewaschen. War dieser Waschvorgang abgeschlossen, erfolgte eine einstündige Einwirkung des Sekundärantikörpers in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper wurde in alle umkreisten Schnitte gegeben, egal ob es sich um eine Kontrolle oder um Schnitte, auf denen der Primärantikörper darauf war, handelte. Waren auf den Schnitten grün fluoreszenzmarkierte NP, kamen als Sekundärantikörper Cy3-konjugierte-Ziege Anti-Kaninchen IgG Antikörper (H+L) in einer Verdünnung von 1:1.000 in 5 % (w/v) BSA in PBS zum Einsatz. Waren rot fluoreszenzmarkierte NP vorhanden wurde der Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 markierte Esel Anti-Kaninchen IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in 5 % (w/v) BSA in PBS verwendet (Abbildung 13).

Cy3-konjugierte-Ziege Anti-Kaninchen IgG Antikörper (H+L), Dianova, Code Number: 111-165-003	Alexa Fluor 488 markierter Esel Anti-Kaninchen IgG Antikörper, Invitrogen™, Catalog No: A21206
1:1000	1:500

Abbildung 13: Verdünnung der in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper in 5 % (w/v) BSA in PBS.

Im Anschluss daran wurde wieder für fünf Minuten je dreimal mit TBST gewaschen, bevor für fünf Minuten DAPI mit einer Konzentration von 1 µl/ml auf alle Schnitte in der feuchten Kammer getan wurde. Final wurde nun zweimal für je fünf Minuten mit TBS gewaschen und einmal für fünf Minuten mit destilliertem Wasser. Nach kurzem Lufttrocknen folgte das Eindeckeln mit FluorSave.

Bei der Auswertung der Antikörperbilder wurde zum einen unterschieden, ob NP vorhanden waren oder nicht (Keine). Zum anderen wurde unterschieden, ob, wenn NP vorhanden waren, diese außerhalb des Bereiches der

Antikörperfärbung (Außerhalb) oder diese innerhalb des Bereiches der Antikörperfärbung (Innerhalb) banden (Abbildung 14).

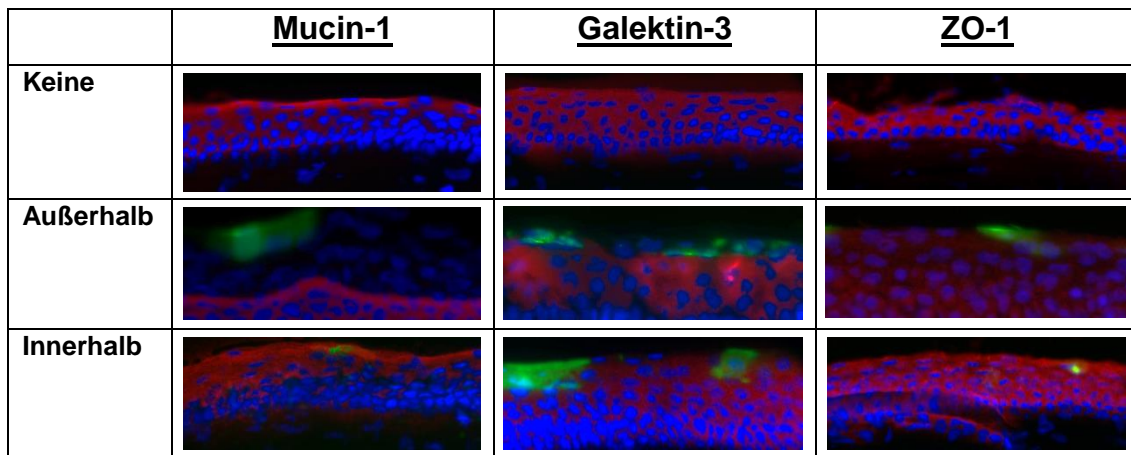


Abbildung 14: Ein jeweiliges Beispiel der Antikörperfärbungen Mucin-1, Galektin-3 und ZO-1 (400-fache Vergrößerung) wenn keine NP vorhanden waren (Keine), wenn die NP außerhalb des Bereiches der Antikörperfärbung (Außerhalb) bzw. innerhalb (Innerhalb) banden.

2.5.7 Auswertung der Stärke der fluoreszierenden NP

Die Auswertung der Fluoreszenzstärke wurde mit Hilfe des Computerauswertungsprogramms ImageJ durchgeführt und einem zusätzlichen Plugin, das von Dr. Stephanie Joachim und Dr. Heiko Schmid von der Ruhr-Universität Bochum erstellt wurde. In dieser Arbeit wurden pro Versuch sieben Bilder aufgenommen und am Ende wurde von diesen ein Durchschnittswert (*Average*) der fluoreszierenden Fläche ermittelt.

Zunächst wurde die Ländereinstellung am Rechner auf USA gesetzt. Nach Öffnen der ImageJ Software (Version 1.49) wurde „Set Measurements“ unter „Analyze“ angeklickt und gleichzeitig „Integrated Density“ und „Area Fraction“ ausgewählt, um die Auswerte-Settings einzustellen. Es wurde „TIFF Image“ geöffnet, wobei unter „File“ „Open“ angeklickt wurde und das gewünschte Bild ausgewählt wurde. Dieses Bild wurde in Grauwerte umgewandelt, dazu wurde unter „Image“ „Type“ „32 bit“ ausgewählt. Um den Hintergrund zu bearbeiten, wurde unter „Process“ „Subtract Background“ angeklickt und bei „Rolling Ball Radius“ auf die für jede Studie ermittelten Pixelwerte eingestellt (bei „Light Background“ wurde das Häkchen entfernt). Für diese Studie wurde der Wert 50 ermittelt. Bei Ermittlung dieses Wertes war es wichtig, dass das Aussehen des

Ausgangsbildes mit dem Bild mit dem eingestellten „*Rolling Ball Radius*“-Pixelwert übereinstimmte. Um den Analysebereich festzulegen, wurde unter „*Image*“ „*Adjust*“ und schließlich „*Threshold*“ angeklickt, „*Default*“ und „*B&W*“ ausgewählt und „*Dark background*“ angeklickt. Nun wurde „*Set*“ ausgewählt und es wurden die oberen und unteren *Threshold*-Werte eingegeben. In dieser Studie wurde als unterer Wert 60 und als oberer Wert 600 verwendet. Auch diese Werte wurden zuvor ermittelt. Bei Ermittlung dieser Werte war es wichtig, dass aus dem Ausgangsbild (Schwarzweiß-Positivbild) nach Eingabe der oberen und unteren *Threshold*-Werte dasselbe Bild als ein Schwarzweiß-Negativbild entstand. Unter „*Analyze*“ wurde „*Analyze Particles*“ angeklickt sowie „*Clear Results*“ und „*Summarize*“, sodass die eigentliche Analyse der Bilder folgte. Unter „*Show*“ konnten beispielsweise „*Masks*“ ausgewählt werden, wodurch in einem neuen Fenster das analysierte Areal angezeigt wurde (dieses sollte dem bearbeiteten Bild entsprechen). Für die Auswertungen sollte unter „*Size*“ *0-infinity* eingetragen sein, sodass alle Partikel gezählt wurden. Bei „*Circularity*“ wurde 0.00-1.00 eingetragen, sodass alle Formen eingeschlossen waren. Die Ergebnisse wurden im „*Summary*“-Fenster angezeigt. Der Bild Name stand bei „*Slice*“. Der interessante Wert war der „*%Area*“-Wert. Er gab prozentual an, wie viel fluoreszierende Fläche die NP in Bezug auf das Gesamtbild als Fläche einnehmen.

Vor Beginn dieser Analyse musste ein hierfür erstelltes Makro zur Analyse von Flächen in mehreren Bildern in ImageJ installiert werden. Hierfür musste in ImageJ in „*Plugins*“, „*Macros*“, „*install*“ ausgewählt werden. Im dann geöffneten Fenster musste man in den „*macros-Ordner*“ wechseln und „*GFAP Analyse.ijm*“ öffnen. Das nun installierte Makro wurde unter „*Plugins*“ „*Macros*“ angezeigt und konnte hier unter *Edit* modifiziert werden. Im neu geöffneten Fenster musste in den „*macros-Ordner*“ gewechselt werden und „*GFAP Analyse.ijm*“ angeklickt werden. In dem geöffneten Bearbeitungsfenster konnten die ermittelten Werte für „*Background Subtraction*“ und „*Threshold*“ entsprechend geändert werden und abgespeichert werden.

Damit nun nicht nur ein Bild sondern ein Bildordner (*Batches*) analysiert werden konnte, musste in ImageJ „*Process*“, „*Batch*“ und schließlich „*Macro*“ ausgewählt werden. Im neu geöffneten Fenster, Batch Process, musste bei „*Input*“ der Ordner mit den Bildern zur Auswertung ausgewählt werden. Bei „*Output*“ musste der Speicherort der analysierten Bilder angegeben werden und bei „*Output Format*“ wurde der Dateityp ausgewählt mit dem die analysierten Dateien gespeichert werden sollten. Bei „*Open*“ musste das Makro „*GFAP Analyse*“ geöffnet werden und bei „*Process*“ startete die Analyse. Das „*Summary*“ Fenster wurde geöffnet. Nach Abschluss der Analyse musste das „*Summary*“ Fenster bei „*File*“, *save as*, [dateiname].xls abgespeichert werden, damit es in Excel zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung stand.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software JMP® 11.2.0 (Statistical Discovery™, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Die Intaktheiten der Hornhautepithelien und die Fluoreszenzstärken der NP wurden mit Hilfe von ANOVA ausgewertet. Die Analyse der Intaktheit der Hornhautepithelien und der Fluoreszenzstärke wurde anschließend mittels Tukey-Kramer post-hoc Test analysiert. Auch der Vergleich zwischen den Schweine- und Rattenaugen wurden mittels Tukey-Kramer analysiert. Die Ergebnisse wurden bei $p < 0,05$ als signifikant (*) angesehen. Signifikanzen ab $p < 0,01$ wurden als ** angegeben und Signifikanzen ab $p < 0,001$ wurden als *** angegeben. Unter den Abbildungen der jeweiligen Versuche wird in jedem Einzelfall gekennzeichnet, welche Parameter zur Berechnung der Signifikanzen herangezogen wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Aufnahme der DNA-NP

In der folgenden Versuchsreihe wurde die Aufnahme der unbeladenen DNA-NP getestet. Zur Markierung der DNA-NP wurde lediglich ein fluoreszierender Farbstoff (FAM) kovalent gebunden. Dieser Farbstoff diente in ungebundener Form (ohne NP) als Kontrolle (K). Die Versuchsreihe wurde an enukleierten Schweineaugen, an enukleierten Rattenaugen und in-vivo ebenfalls an Ratten getestet. Die enukleierten Augen wurden 5, 15 oder 30 Minuten inkubiert. Bei den in-vivo Versuchen wurden die Augen einmal getropft und die Zeit nach 5, 15 und 30 Minuten sowie nach 1, 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden untersucht.

Die NP-Aufnahme fand an den enukleierten Schweineaugen, an den enukleierten Rattenaugen und an Rattenaugen aus in-vivo Versuchen statt (Abbildung 15). Das Hornhautepithel wies unabhängig von den Inkubations- bzw. Wartezeiten Unterschiede bezüglich der Intaktheit auf. Bei den Augen, auf die NP appliziert wurden, war das Hornhautepithel meist intakter, als wenn der reine Kontrollfarbstoff appliziert wurde. Offensichtlich war die Intaktheit bei Rattenaugen höher als bei Schweineaugen. Die meisten NP waren bei Schweineaugen zu finden. Mit fortschreitender Inkubationszeit war die Aufnahme bei den enukleierten Augen scheinbar höher. Bei den in-vivo Versuchen nahm die Aufnahme der NP im Zeitverlauf offensichtlich ab.

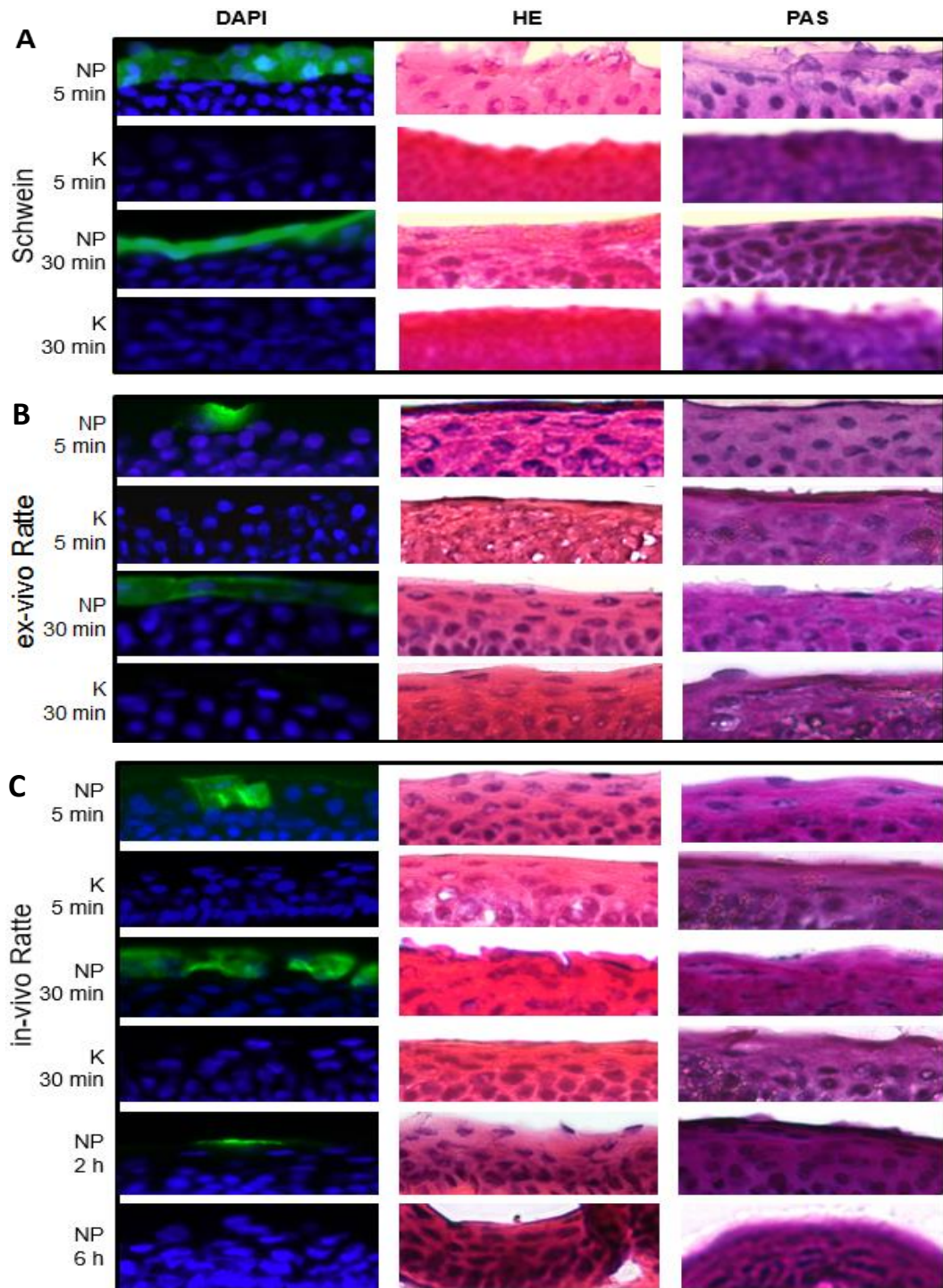


Abbildung 15: DNA-NP – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder (400-fache Vergrößerung) zeigen die Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP) und des Kontrollfarbstoffes (K). Enukleierte Schweineaugen (A) bzw. Rattenaugen (ex-vivo Ratte) (B) und Rattenaugen aus in-vivo Versuchen (C) wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (5 min, 30 min, 2h, 6 h). (Bei den Kontrollen war das Hornhautepithel meist weniger intakt. Offensichtlich war die Intaktheit bei Rattenaugen höher als bei Schweineaugen. Außerdem zeigten die Schweineaugen klar die meisten NP. Scheinbar nahmen sie auch bei den enukleierten Rattenaugen mit der Inkubationszeit zu, wohingegen sie bei den Rattenaugen aus in-vivo Versuchen mit der Wartezeit eher abnahmen.

Die Intaktheit des Hornhautepithels wurde nach einem Scoringsystem verblindet beurteilt (vgl. mit Abbildung 8 und Abbildung 9). Der erste Eindruck aus den Färbungen bestätigte sich. Das Hornhautepithel der enukleierten Augen, auf die der Kontrollfarbstoff appliziert wurde, war signifikant weniger intakt, als die mit NP behandelten Augen (DAPI: Schwein: NP 5 min 80 % \pm 0; K 5 min 40 % \pm 0 $p < 0,001$; NP 15 min 80 % \pm 0; K 15 min 40 % \pm 0 $p < 0,001$; NP 30 min 80 % \pm 0; K 30 min 40 % \pm 0 $p < 0,001$; ex-vivo Ratte: NP 5 min 80 % \pm 0; K 5 min 60 % \pm 7,1 $p < 0,001$; NP 15 min 80 % \pm 0; K 15 min 60 % \pm 0 $p < 0,001$; NP 30 min 80 % \pm 0; K 30 min 60 % \pm 0 $p < 0,001$). Das Hornhautepithel der Rattenaugen aus in-vivo Versuchen war bei Applikation der NP und des Kontrollfarbstoffs jeweils ähnlich intakt (in-vivo-Ratte: NP 5 min 80 % \pm 21,8; K 5 min 70 % \pm 10,0; NP 15 min 70 % \pm 10,0; K 15 min 80 % \pm 0; NP 30 min 67 % \pm 14,4; K 30 min 70 % \pm 10,0; NP 70 % \pm 10,0; NP 2 h 63 % \pm 13,7; NP 4 h 65 % \pm 8,7; NP 6 h 60 % \pm 0; NP 8 h 55 % \pm 8,7; NP 24 h 55 % \pm 8,7). Bei Rattenaugen war die Intaktheit signifikant höher als bei Schweineaugen (DAPI: $p < 0,001$) (Abbildung 16).

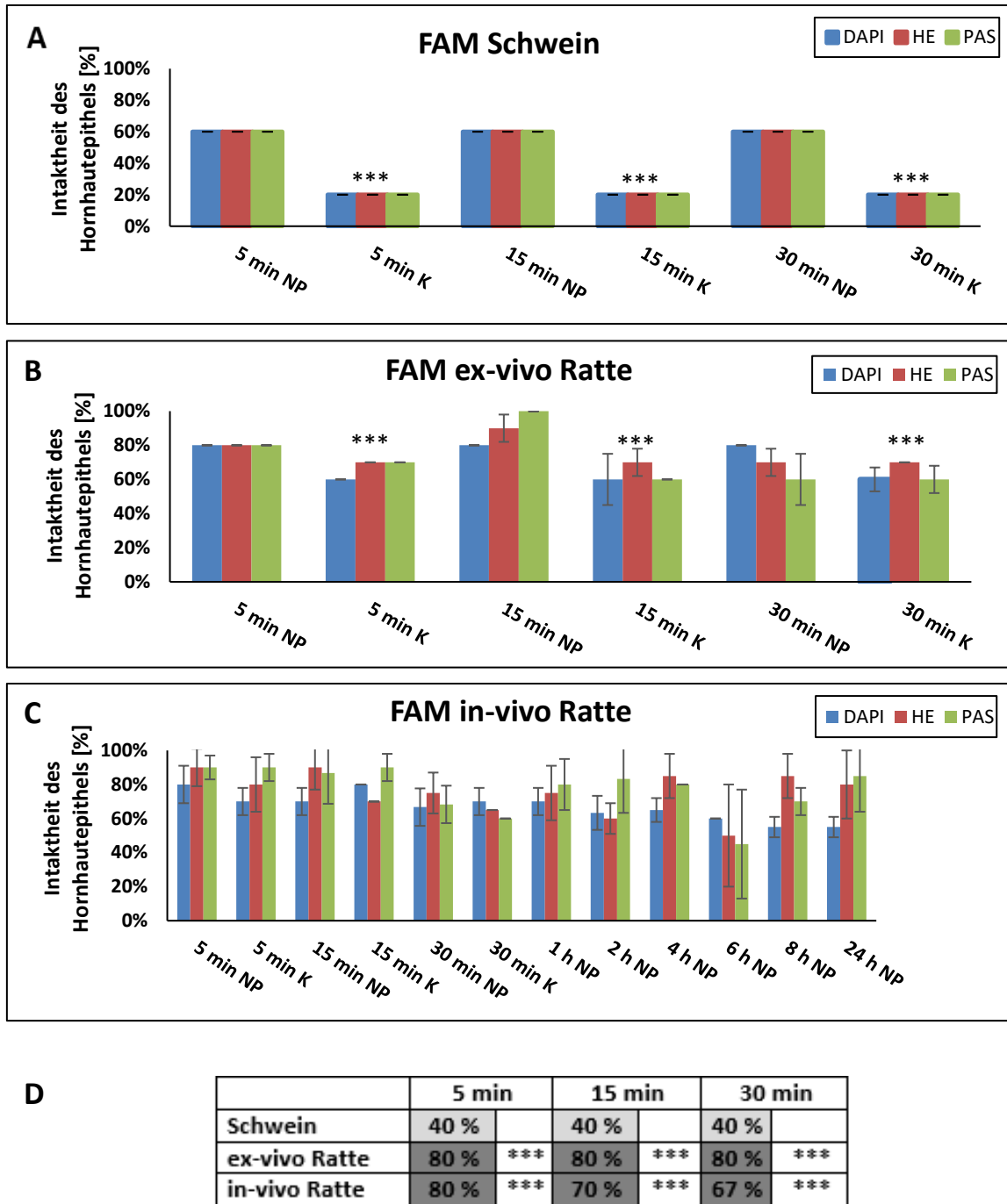


Abbildung 16: DNA-NP – Intaktheit des Hornhautepithels (A, B, C) und Vergleich der Intaktheiten (D). A, B, C: Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP) und des Kontrollfarbstoffes (K) bei A: enukleierten Schweineaugen, B: enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) und C: Rattenaugen aus in-vivo Versuchen. Auf der Y-Achse ist die Intaktheit des Hornhautepithels nach der DAPI(blau)-, HE(rot)- bzw. PAS(grün)-Färbung in Prozent (%) angegeben. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Bearbeitungen der Augen aufgelistet. Das Hornhautepithel der enukleierten Augen auf die der Kontrollfarbstoff appliziert wurde, war signifikant weniger intakt, als die mit NP behandelten Augen. A, B und C: SD (DAPI, blau) *** $p < 0,001$ K gegenüber den dazugehörigen NP (mit den entsprechenden Inkubations- bzw. Wartezeiten). D: Vergleich der Intaktheiten zwischen enukleierten Schweineaugen, enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) und Rattenaugen aus in-vivo Versuchen. Die Intaktheit war bei Rattenaugen signifikant höher als bei den Schweineaugen. SD (DAPI) *** $p < 0,001$ Rattenaugen gegenüber den Schweineaugen. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$, wurden mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test analysiert.

Die Fluoreszenzstärken wurden immer anhand der DAPI-Färbungen gemessen. Die höchste DAPI-Fluoreszenzstärke konnte bei den Schweineaugen gemessen werden (Schwein: NP 5 min 5,5 % \pm 3,0; NP 15 min 5,8 % \pm 1,7; NP 30 min 6,0 % \pm 1,1). Die enukleierten Rattenaugen wiesen eine etwas höhere Fluoreszenzstärke auf als die Rattenaugen aus in-vivo Versuchen. Die Fluoreszenzstärken der Rattenaugen waren jedoch signifikant geringer als bei den Schweineaugen (ex-vivo Ratte: NP 5 min 1,8 % \pm 1,1 p <0,01; NP 15 min 2,3 % \pm 0,9 p <0,001; NP 30 min 2,6 % \pm 1,9 p <0,001; in-vivo-Ratte: NP 5 min 1,9 % \pm 0,4 p <0,01; NP 15 min 1,8 % \pm 1,1 p <0,001; NP 30 min 1,1 % \pm 0,5 p <0,001; NP 1 h 1,0 % \pm 1,1; NP 2 h 0,8 % \pm 0,2; NP 4 h 0,3 % \pm 0,2). Bei den Rattenaugen aus in-vivo Versuchen konnten nach einer Wartezeit von 6 h keine NP mehr nachgewiesen werden. Bei den Kontrollen konnten generell keine Fluoreszenzstärken gemessen werden. Innerhalb der enukleierten Schweine- bzw. Rattenaugen konnten mit NP-Applikation und mit Zunahme der Inkubations- bzw. Wartezeiten signifikant höhere Fluoreszenzstärken gemessen werden (Schwein: 5 min p <0,001; 15 min p <0,001; 30 min p <0,001; ex-vivo Ratte: 5 min p <0,01; 15 min p <0,001; 30 min p <0,001). Innerhalb der Rattenaugen aus in-vivo Versuchen konnten mit NP-Applikation und mit Abnahme der Wartezeit signifikant höhere Fluoreszenzstärken gemessen werden (in-vivo-Ratte: 1 h p <0,05; 30 min p <0,05; 15 min p <0,001; 5 min p <0,001) (Abbildung 17).

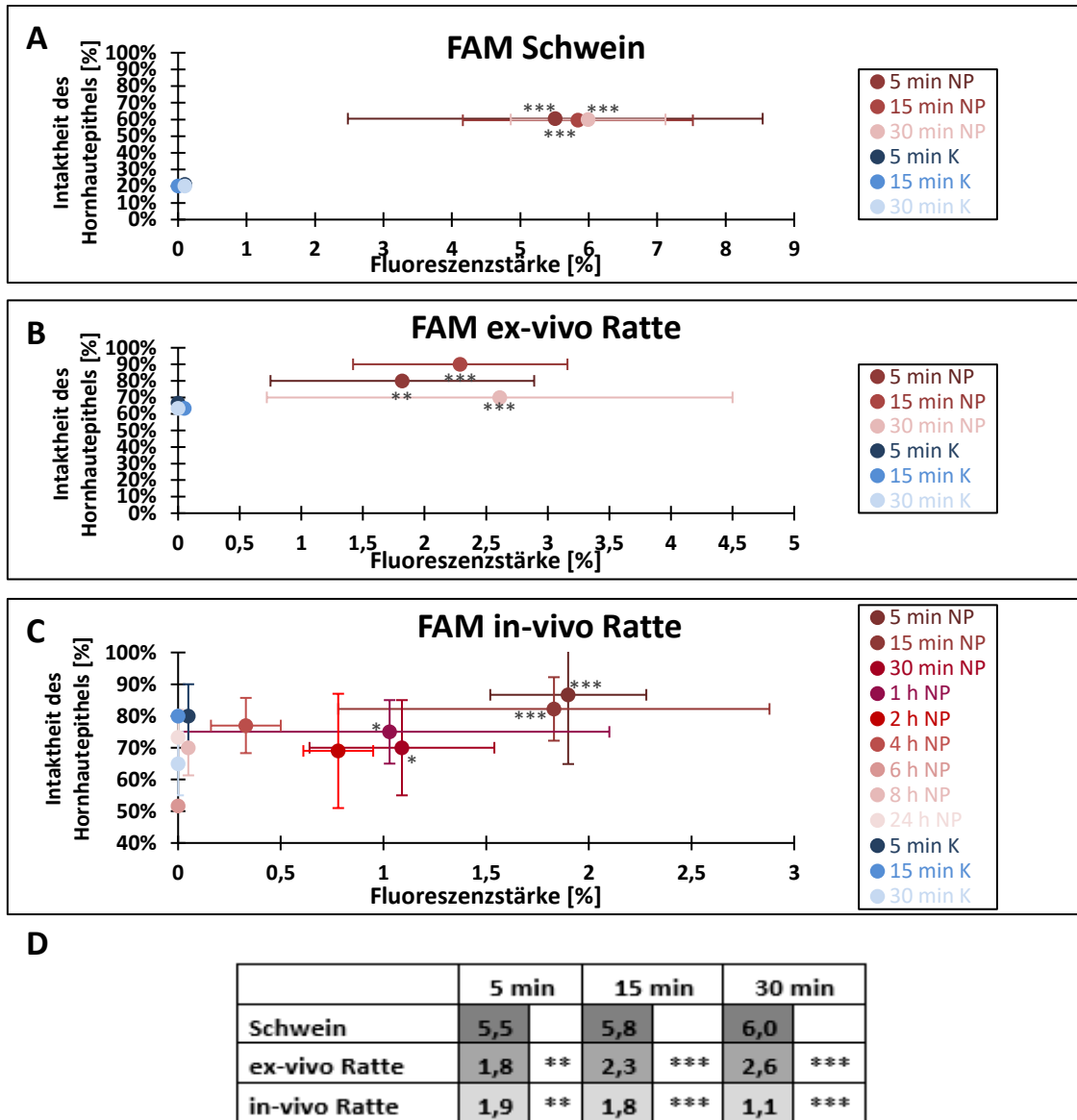


Abbildung 17: DNA-NP – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels (A, B, C) und Vergleich zwischen den DAPI-Fluoreszenzstärken (D) A, B, C: Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP: Rottöne) und des Kontrollfarbstoffes (K: Blautöne) nach unterschiedlichen Inkubations- bzw. Wartezeiten bei A: enukleierten Schweineaugen, B: enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) und C: Rattenaugen aus in-vivo Versuchen. Auf der X-Achse ist die fluoreszierende Fläche in Prozent (%) angegeben, bezogen auf die Gesamtfläche der Bilder. Auf der Y-Achse wird die Intaktheit des Hornhautepithels in Prozent (%) angegeben. Diese setzt sich aus dem Durchschnittswert der Bewertung der DAPI-, HE- und PAS-Bilder zusammen. Die Aufnahme der NP war bei enukleierten Schweine- bzw. Rattenaugen mit längerer Inkubationszeit höher, bei Rattenaugen aus in-vivo Versuchen wurde sie mit der Wartezeit geringer, ab einer Wartezeit von 6 h war keine NP-Bindung mehr nachweisbar. A, B und C: SD * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ NP gegenüber den dazugehörigen Kontrollen (mit den entsprechenden Inkubations- bzw. Wartezeiten). D: Vergleich der Fluoreszenzstärken zwischen enukleierten Schweineaugen (Schwein), enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) und Rattenaugen aus in-vivo Versuchen (in-vivo Ratte). Die Rattenaugen wiesen gegenüber den Schweineaugen eine signifikant geringere Fluoreszenzstärke auf. SD ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Rattenaugen gegenüber den Schweineaugen. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$, wurden mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test analysiert.

3.2 Stressoren

3.2.1 Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC

In der folgenden Versuchsreihe wurde überprüft, ob es zu einer verbesserten NP-Aufnahme kommen kann, wenn N-Acetylcystein (ACC) bzw. Benzalkoniumchlorid (BAC) verwendet werden. ACC und BAC wurden ausgewählt, da Beide das Hornhautepithel permeabler machen, woraus eine verbesserte NP-Aufnahme resultieren könnte. ACC findet oft aufgrund seiner Antikollagenasewirkung und seiner entzündungshemmenden Wirkung ein Bestandteil in Augentropfen Anwendung. BAC wird in Augentropfen oft als Konservierungsmittel eingesetzt. Auf die enukleierten Rattenaugen und die Rattenaugen aus in-vivo Versuchen wurden unbeladene DNA-NP appliziert. Zur Markierung der DNA-NP wurde wiederum ein fluoreszierender Farbstoff (FAM) kovalent gebunden. In weiteren Versuchen wurden ACC, BAC, bzw. ACC und BAC in unterschiedlichen Konzentrationen zu den unbeladenen DNA-NP oder zu dem ungebundenen Farbstoff (ohne NP) hinzugegeben (ACC: 50 mg/ml, 100 mg/ml; BAC: 0,06 mg/ml, 0,1 mg/ml; ACC/BAC: 100/0,1 mg/ml). Auch hier diente der ungebundene Farbstoff (ohne NP) mit ACC und BAC als Kontrolle. Die enukleierten Rattenaugen wurden fünf Minuten inkubiert.

DNA-NP mit den unterschiedlichen ACC- und BAC-Konzentrationen banden immer an das Hornhautepithel der enukleierten Rattenaugen. Bei der Anwendung der Kombination von ACC und BAC wurden scheinbar die meisten NP aufgenommen. Auch die unbeladenen DNA-NP ohne ACC und BAC banden an das Hornhautepithel. Augenscheinlich wiesen alle Hornhautepithelien ähnliche Intaktheiten auf (Abbildung 18).

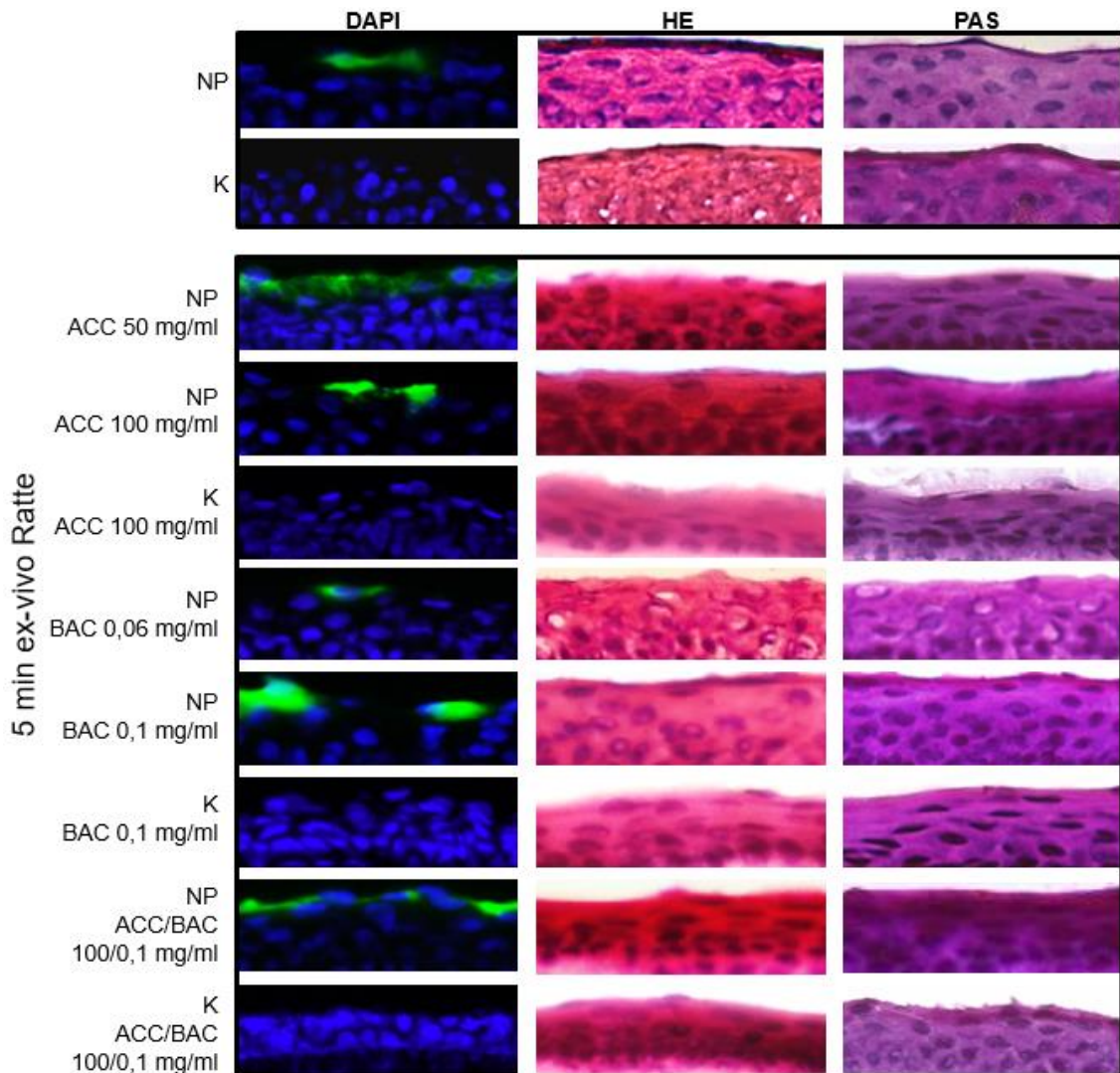


Abbildung 18: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Repräsentative DAPI, HE- und PAS-Bilder von enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) (400-fache Vergrößerung) zeigen die Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP) und des Kontrollfarbstoffes (K), nachdem verschiedene Konzentrationen von ACC bzw. BAC zu den unbeladenen NP bzw. zum Kontrollfarbstoff hinzugegeben wurden. Als Vergleich dienten unbeladene NP bzw. ein Kontrollfarbstoff ohne ACC und BAC. Die enukleierten Rattenaugen wurden fünf Minuten inkubiert. Die NP banden immer an das Hornhautepithel. Bei der Anwendung der Kombination von ACC und BAC wurden scheinbar die meisten NP aufgenommen. Augenscheinlich wiesen alle Hornhautepithelien ähnliche Intaktheiten auf.

Wie in Absatz 3.1 beschrieben, wurde die Intaktheit des Hornhautepithels nach einem Scoringssystem verblindet beurteilt. Auch hier wurde der Eindruck aus den Färbungen bestätigt. Die Hornhautepithelien wiesen bei den jeweiligen Versuchen dieselben Intaktheiten auf (DAPI: 80 % \pm 14,1). Ausschließlich das Hornhautepithel der enukleierten Augen auf die der Kontrollfarbstoff ohne ACC bzw. BAC appliziert wurde, war signifikant weniger intakt, als die restlichen behandelten Augen (DAPI: K 5 min 60 % \pm 0 p<0,001) (Abbildung 19).

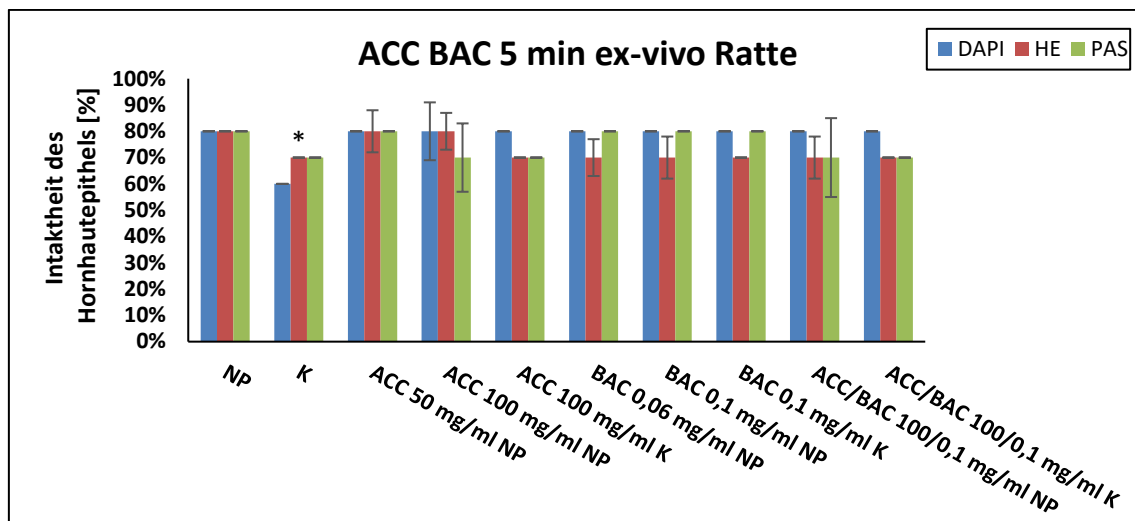


Abbildung 19: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Intaktheit des Hornhautepithels von enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) bei Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP) und des Kontrollfarbstoffes (K), nachdem verschiedene Konzentrationen von ACC bzw. BAC zu den unbeladenen NP bzw. zum Kontrollfarbstoff hinzugegeben wurden. Auf der Y-Achse ist die Intaktheit des Hornhautepithels nach der DAPI(blau)-, HE(rot)- bzw. PAS(grün)-Färbung in Prozent (%) angegeben. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Bearbeitungen der enukleierten Rattenaugen aufgelistet. Ausschließlich das Hornhautepithel der enukleierten Augen, auf die der Kontrollfarbstoff ohne ACC bzw. BAC appliziert wurde, war signifikant weniger intakt, als die restlichen behandelten Augen. SD (DAPI) * $p < 0,05$ K gegenüber aller anderen Versuche in diesem Versuchskomplex. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$, wurden mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test analysiert.

Wenn die unterschiedlichen ACC, BAC, bzw. ACC und BAC Konzentrationen zu den DNA-NP hinzugegeben wurden, wurden etwas höhere DAPI-Fluoreszenzstärken gemessen, als wenn die DNA-NP ohne ACC und BAC getestet wurden (NP 1,8 % \pm 1,1). Wurden die DNA-NP mit bzw. ohne ACC und BAC verglichen, war die Fluoreszenzstärke bei den NP mit ACC/BAC-Kombination signifikant höher (NP ACC/BAC 100/0,1 mg/ml 3,4 % \pm 0,7 $p < 0,05$). Die Fluoreszenzstärken aller Kontrollen waren zu den DNA-NP ohne ACC und BAC signifikant geringer ($p < 0,01$). Außerdem nahm die NP-Aufnahme zu, je geringer die ACC-Konzentration (NP ACC 50 mg/ml 2,7 % \pm 2,0; NP ACC 100 mg/ml 2,5 % \pm 0,9) und je höher die BAC-Konzentration (BAC 0,06 mg/ml 2,2 % \pm 0,7; NP BAC 0,1 mg/ml 3,0 % \pm 0,9) war. Innerhalb der enukleierten Rattenaugen konnten bei den Kontrollen keine Fluoreszenzstärken gemessen werden. Mit NP-Applikation und mit ACC und BAC konnten signifikant höhere Fluoreszenzstärken gemessen werden (NP $p < 0,01$; BAC 0,06 mg/ml $p < 0,001$; ACC 100 mg/ml $p < 0,001$; ACC 50 mg/ml $p < 0,001$; BAC 0,1 mg/ml $p < 0,001$; ACC/BAC 100/0,1 mg/ml $p < 0,001$). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der

Intaktheit des Hornhautepithels und der Fluoreszenzstärke konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 20).

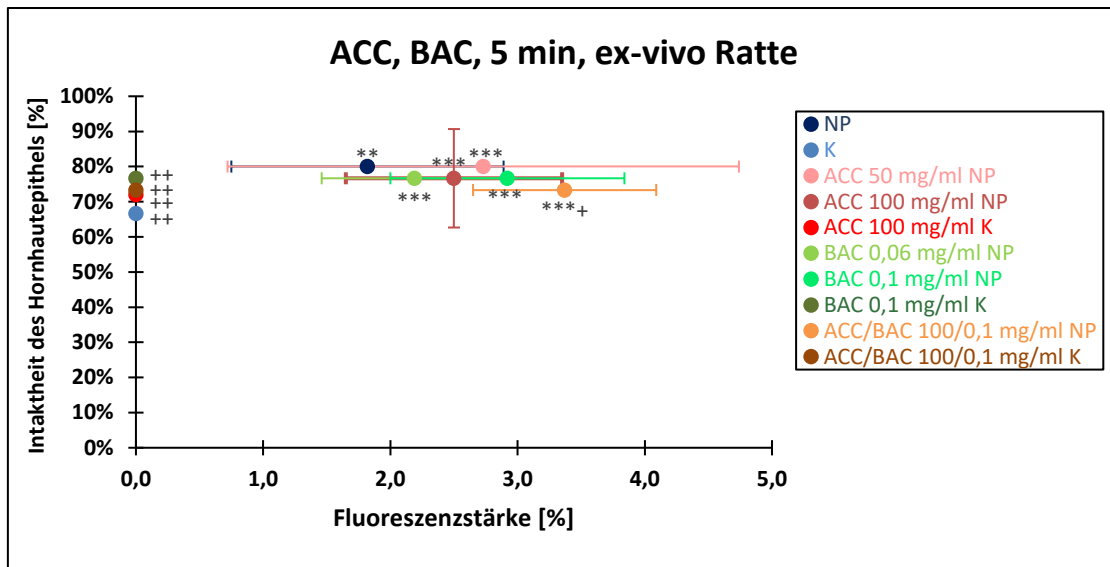


Abbildung 20: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels bei enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) bei Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP) und des jeweiligen Kontrollfarbstoffes (K: hellblau, ACC K: mittelrot, BAC K: dunkelgrün, ACC/BAC K: dunkelbraun) nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von ACC bzw. BAC zu unbeladenen NP bzw. zum Kontrollfarbstoff. Auf der X-Achse ist die fluoreszierende Fläche in Prozent (%) angegeben, bezogen auf die Gesamtfläche der Bilder. Auf der Y-Achse wird die Intaktheit des Hornhautepithels der enukleierten Rattenaugen in Prozent (%) angegeben. Diese setzt sich aus dem Durchschnittswert der Bewertung der DAPI-, HE- und PAS-Bilder zusammen.. Innerhalb der enukleierten Rattenaugen konnten mit NP-Applikation (NP, dunkelblau) und vor allem mit ACC (NP, rosa und dunkelrot) oder BAC (NP, helle Grüntöne) signifikant höhere Fluoreszenzstärken gemessen werden. Bei der ACC/BAC-Kombination (NP, hellbraun) konnte eine signifikant höhere Fluoreszenzstärke gemessen werden. SD ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ NP, ACC, BAC bzw. ACC/BAC gegenüber K. SD + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ K, ACC, BAC bzw. ACC/BAC gegenüber NP. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$, wurden mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test analysiert.

Bei den in-vivo Versuchen wurden die Augen einmal getropft und die Zeit nach 30 Minuten oder 2 Stunden untersucht. Die DNA-NP banden mit den unterschiedlichen ACC- und BAC-Konzentrationen nie an das Hornhautepithel. Im Gegensatz, dazu banden die DNA-NP ohne ACC und BAC an das Hornhautepithel. Alle Hornhautepithelien wiesen ähnliche Intaktheiten auf. Starke Abweichungen kamen augenscheinlich nicht vor (Abbildung 21).

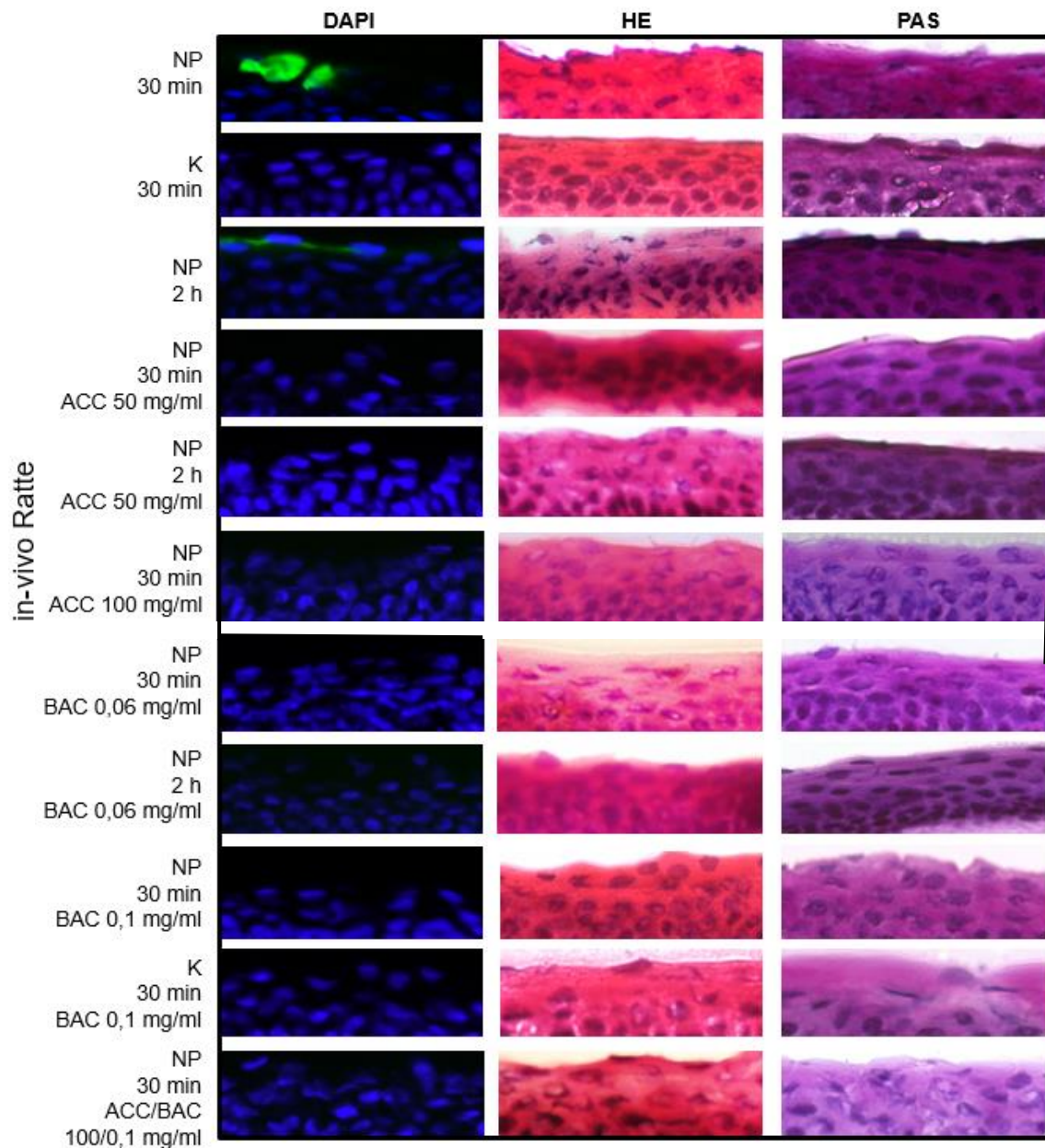


Abbildung 21: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder von Rattenäugen aus in-vivo Versuchen (400-fache Vergrößerung) zeigen die Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP) und des Kontrollfarbstoffes (K), nachdem verschiedene Konzentrationen von ACC bzw. BAC zu den unbeladenen NP bzw. zum Kontrollfarbstoff hinzugegeben wurden. Als Vergleich dienten unbeladene NP bzw. ein Kontrollfarbstoff ohne ACC und BAC. Die Rattenäugen aus in-vivo Versuchen wurden nach 30 Minuten oder 2 Stunden untersucht. Die NP mit den unterschiedlichen ACC- und BAC-Konzentrationen banden nie an das Hornhautepithel. Augenscheinlich wiesen alle Hornhautepithelien ähnliche Intaktheiten auf.

Wiederum bestätigte sich der Eindruck aus den Färbungen. Die Hornhautepithelien wiesen ähnliche Intaktheiten auf (DAPI: NP 2 h 63 % \pm 13,7; NP 30 min 67 % \pm 14,4; K 30 min, NP 2 h BAC 0,06 mg/ml, K 30 min BAC 0,1mg/ml 70 % \pm 10; NP 30 min ACC 50 mg/ml, NP 2 h ACC 50 mg/ml, NP 30 min

ACC 100 mg/ml, NP 30 min BAC 0,06 mg/ml, NP 30 min BAC 0,1 mg/ml, NP 30 min ACC/BAC 100/0,1 mg/ml 80 % \pm 0,0) (Abbildung 22).

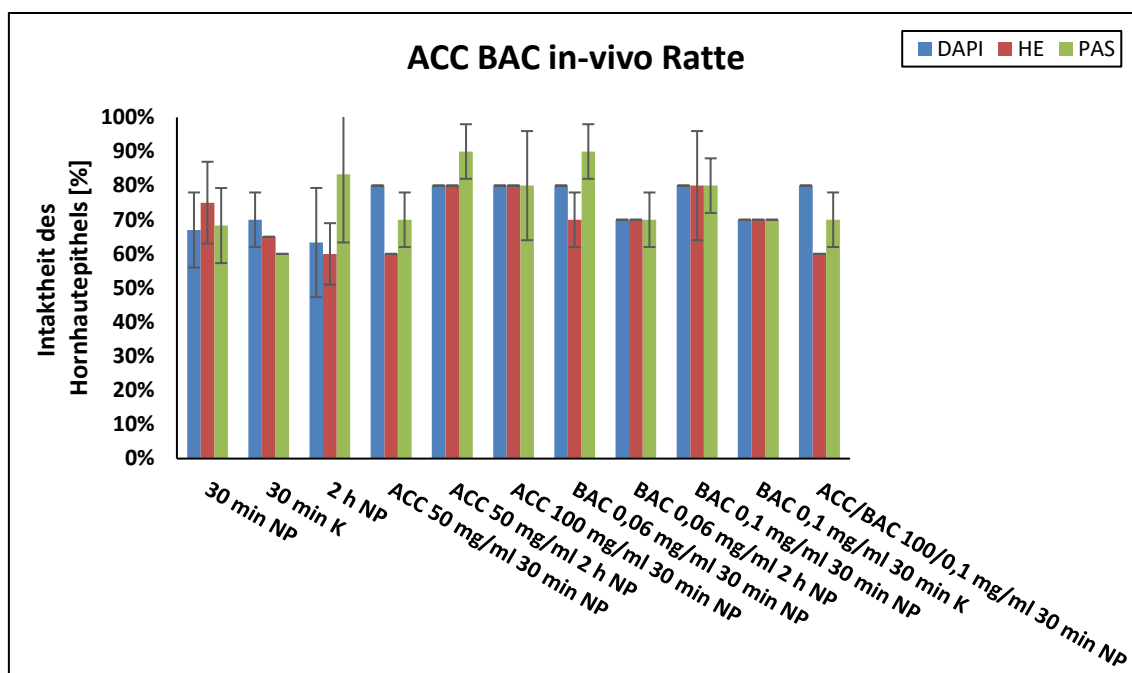


Abbildung 22: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Intaktheit des Hornhautepithels von Rattenaugen aus in-vivo Versuchen zeigen die Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP) und des Kontrollfarbstoffes (K), nachdem verschiedene Konzentrationen von ACC bzw. BAC zu den unbeladenen NP bzw. zum Kontrollfarbstoff hinzugegeben wurden. Auf der Y-Achse ist die Intaktheit des Hornhautepithels nach der DAPI(blau)-, HE(rot)- bzw. PAS(grün)-Färbung in Prozent (%) angegeben. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Bearbeitungen der Rattenaugen aus in-vivo Versuchen aufgelistet. Alle Hornhautepithelien wiesen ähnliche Intaktheiten auf. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$. Nach Analyse mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Wenn ACC, BAC, bzw. ACC und BAC in unterschiedlichen Konzentrationen zu den DNA-NP hinzugegeben wurden, banden keine NP an das Hornhautepithel. Bei allen Kontrollen konnten ebenfalls keine DAPI-Fluoreszenzstärken gemessen werden. Die unbeladenen DNA-NP ohne ACC und BAC banden nicht signifikant an das Hornhautepithel (NP 30 min 1,1 % \pm 0,5; NP 2 h 0,8 % \pm 0,2). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Intaktheit des Hornhautepithels und der Fluoreszenzstärke konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 23).

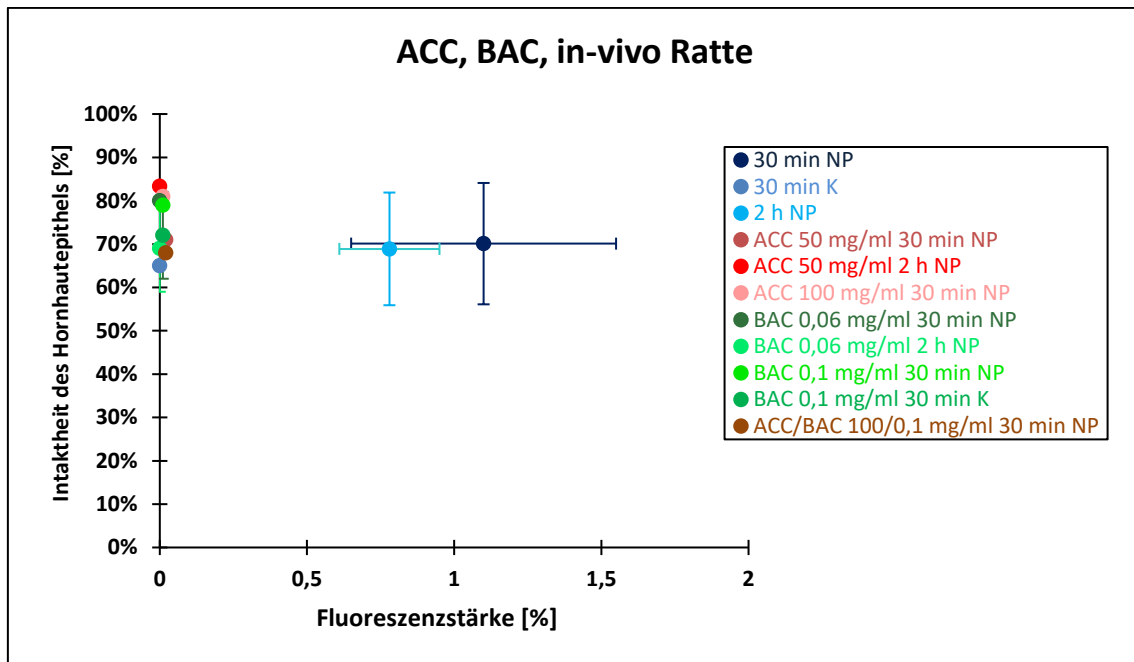


Abbildung 23: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels bei Rattenaugen aus in-vivo Versuchen bei Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP) und des Kontrollfarbstoffes (K: mittlerer Blauton, BAC K: mittlerer Grünton) nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von ACC bzw. BAC zu unbeladenen NP bzw. zum Kontrollfarbstoff. Auf der X-Achse ist die fluoreszierende Fläche in Prozent (%) angegeben, bezogen auf die Gesamtfläche der Bilder. Auf der Y-Achse wird die Intaktheit des Hornhautepithels der Rattenaugen aus in-vivo Versuchen in Prozent (%) angegeben. Diese setzt sich aus dem Durchschnittswert der Bewertung der DAPI-, HE- und PAS-Bilder zusammen. Die DNA-NP mit den unterschiedlichen ACC- und BAC-Konzentrationen (ACC NP: Rottöne, BAC NP: Grüntöne, ACC/BAC NP: dunkelgrün) banden nie. Die unbeladenen DNA-NP ohne ACC und BAC (NP: Blautöne) banden nicht signifikant an das Hornhautepithel. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$. Nach Analyse mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.2.2 Anwendung von Hitzestress

In diesem Versuch wurden die Intaktheit des Hornhautepithels und die NP-Aufnahme der enukleierten Rattenaugen nach Anwendung von Hitzestress überprüft. Hitzestress als Einflussfaktor wurde gewählt, da bereits allgemein bekannt ist, dass jedes Gewebe sensitiv auf Hitze reagiert. Ob und in wie weit Hitze auch die Integrität des Hornhautepithels bzw. die NP-Aufnahme beeinflussen kann, sollte in diesem Versuchskomplex näher erforscht werden. Bevor DNA-NP den Augen appliziert wurden, wurden sie entweder frisch enukleiert, für 6 Stunden in den Kühlschrank gestellt oder bei unterschiedlichen Temperaturen unterschiedlich lange in Wasser erwärmt. Auch wurden zwei unterschiedliche Inkubationstemperaturen untersucht, bei RT oder bei 37 °C.

Unabhängig von der Behandlung banden die NP immer an das Hornhautepithel der enukleierten Rattenaugen. Offensichtlich banden bei höheren Temperaturen und wenn die Augen bei 37 °C inkubiert wurden mehr NP. Wurde der Farbstoff ungebunden als Kontrolle verwendet, wurde sicher keine Fluoreszenz detektiert. Ab einer Temperatur von 60 °C war das Hornhautepithel stark verändert. Bei den anderen Behandlungsparametern waren scheinbar kaum Defekte an den Hornhautepithelien feststellbar (Abbildung 24).

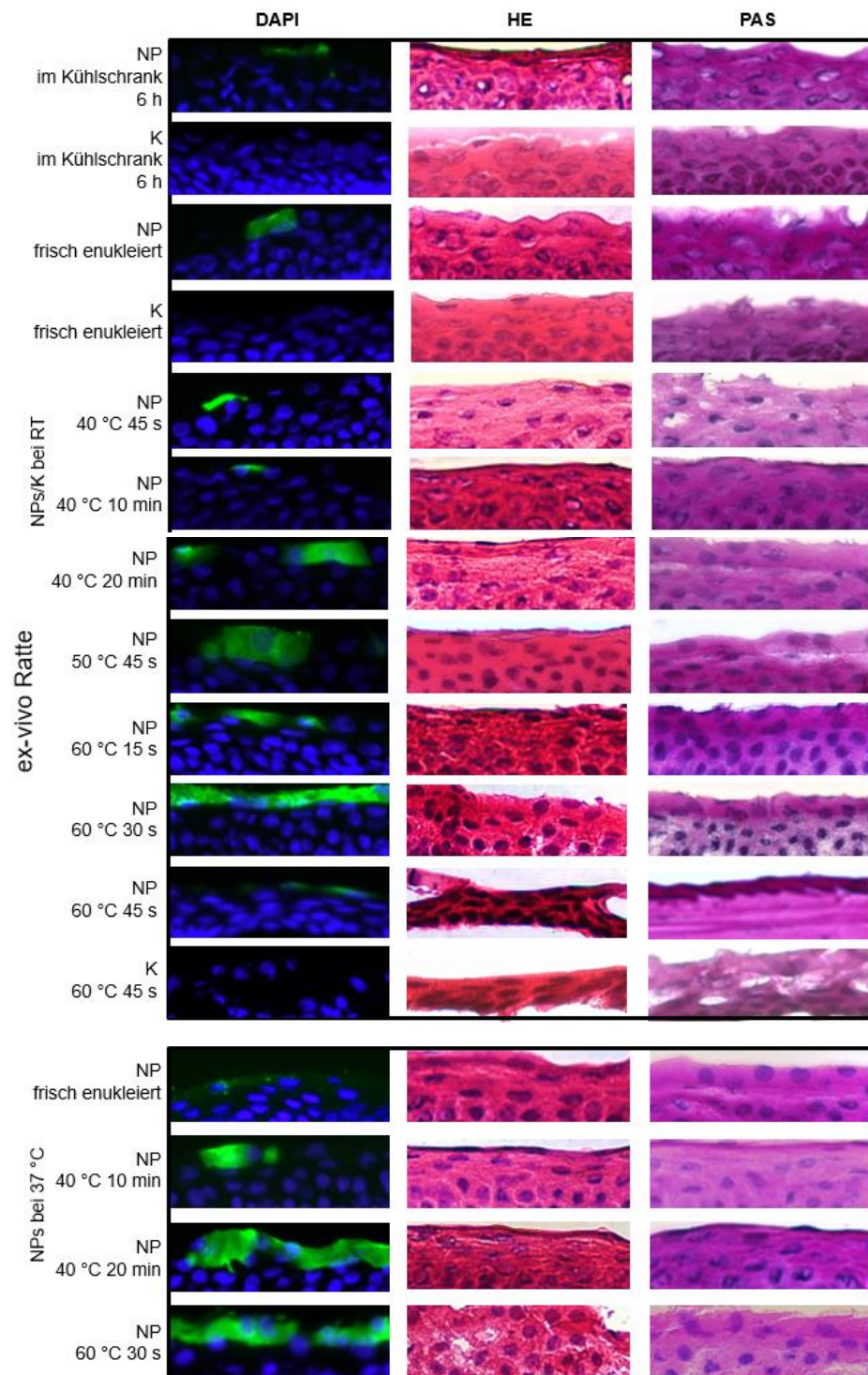


Abbildung 24: Anwendung von Hitzestress – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder (400-fache Vergrößerung) zeigen die Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP) und des Kontrollfarbstoffes (K) nach Anwendung von Hitzestressoren. Bevor unbeladene NP den enukleierten Rattenäugen (ex-vivo Ratten) appliziert wurden, wurden sie entweder für 6 Stunden in den Kühlschrank gestellt, frisch enukleiert oder bei unterschiedlichen Temperaturen unterschiedlich lange in Wasser erwärmt. Die Augen wurden bei RT oder bei 37 °C inkubiert. Offensichtlich banden bei höheren Temperaturen und wenn die Augen bei 37 °C inkubiert wurden mehr NP. Ab einer Temperatur von 60 °C war das Hornhautepithel stark verändert. Bei den anderen Behandlungsparametern waren scheinbar kaum Defekte an den Hornhautepithelien feststellbar.

Wurde die Intaktheit des Hornhautepithels nach einem Scoringsystem verblindet beurteilt, wurde auch hier der Eindruck aus den Färbungen bestätigt. Die Intaktheit des Hornhautepithels wurde ausschließlich ab einer Temperatur von 60 °C signifikant geringer (DAPI: zwischen 40 % und 60 % ± 0 $p < 0,001$). Bei den anderen Behandlungsparametern waren kaum Defekte an den Hornhautepithelien feststellbar. Sie zeigten dieselben Intaktheiten der Hornhautepithelien (DAPI: 80 % ± 0) (Abbildung 25).

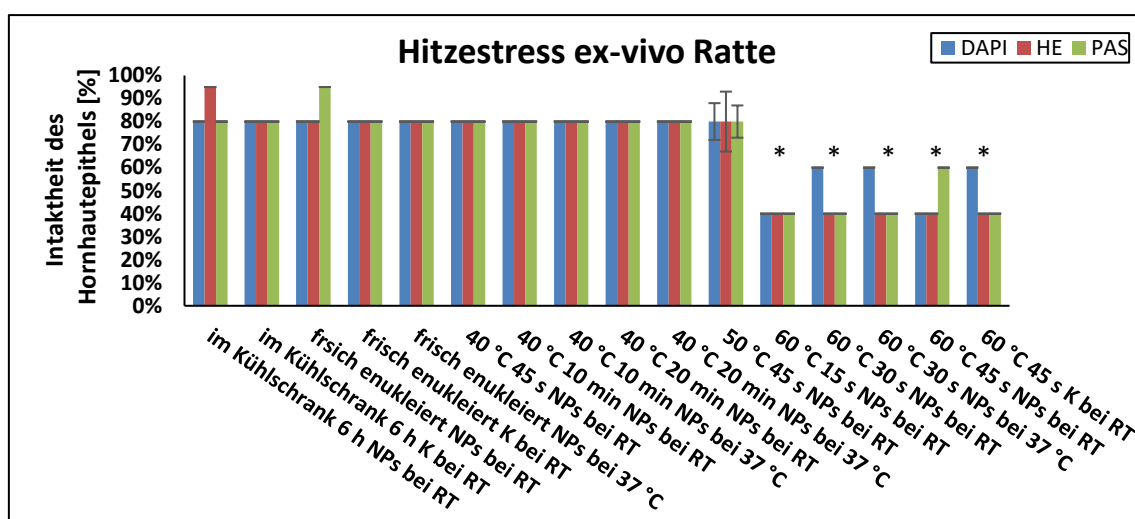
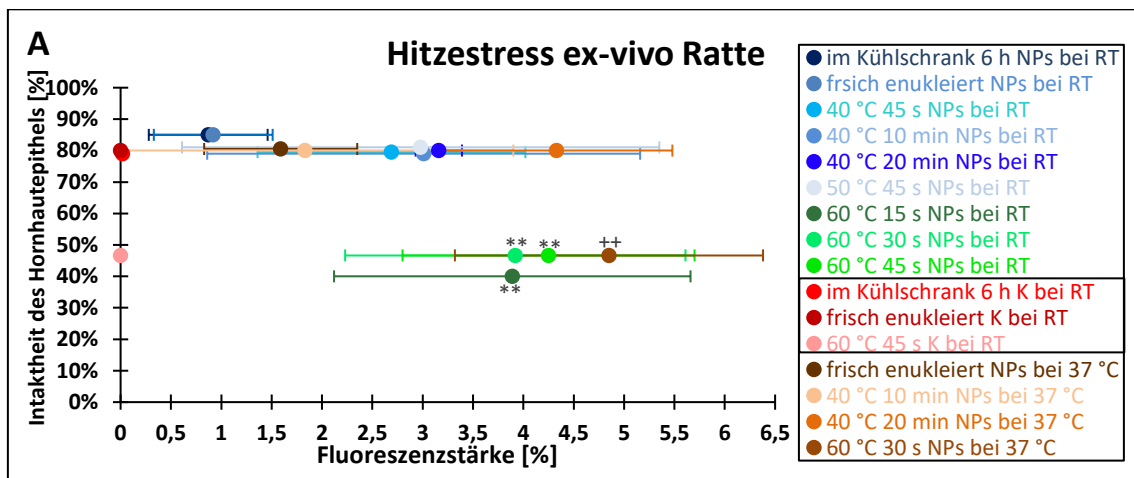


Abbildung 25: Anwendung von Hitze stress – Intaktheit des Hornhautepithels bei Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NP) und des Kontrollfarbstoffes (K) nach Anwendung von Hitze stressoren. Auf der Y-Achse ist die Intaktheit des Hornhautepithels nach der DAPI(blau)-, HE(rot)- bzw. PAS(grün)-Färbung in Prozent (%) angegeben. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Bearbeitungen der enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) aufgelistet. Die Intaktheit des Hornhautepithels wurde ab einer Temperatur von 60 °C signifikant geringer. SD (DAPI) * $p < 0,05$ Augen, die unterschiedlich lange bei 60 °C erwärmt und bei RT oder 37 °C inkubiert wurden gegenüber allen hier verwendeten Versuchsreihen, die entweder für 6 Stunden in den Kühlschrank gestellt, frisch enukleiert oder bei unterschiedlichen Temperaturen (40 °C und 50 °C) unterschiedlich lange in Wasser erwärmt wurden. Die Augen wurden hierbei bei RT oder bei 37 °C inkubiert. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$, wurden mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test analysiert.

Wurden die Augen bei RT inkubiert, stieg die DAPI-Fluoreszenzstärke der DNA-NP bei den Augen signifikant, die zuvor bei 60 °C gekocht wurden (NPs bei RT inkubiert: im Kühlschrank 6 h 0,9 % $\pm 0,6$; frisch enukleiert 0,9 % $\pm 0,6$; 40 °C 45 s 2,7 $\pm 1,3$; 40 °C 10 min 3,0 % $\pm 2,2$; 40 °C 20 min 3,2 $\pm 0,2$; 50 °C 45 s 3,0 % $\pm 2,4$; 60 °C 15 s 3,9 % $\pm 1,8$ $p < 0,01$; 60 °C 30 s 3,9 % $\pm 1,7$ $p < 0,01$; 60 °C 45 s 4,3 % $\pm 1,5$ $p < 0,01$). Auch bei einer Inkubation bei 37 °C stieg die Fluoreszenzstärke bei höheren Temperaturen signifikant (NPs bei 37 °C: frisch enukleiert 1,6 % $\pm 0,8$; 40 °C 10 min 1,8 % $\pm 2,1$; 40 °C 20 min 4,3 % $\pm 1,2$ $p < 0,01$; 60 °C 30 s 4,9 % $\pm 1,5$ $p < 0,01$). Ab einer Temperatur von 60 °C war die Intaktheit des Hornhautepithels

wie bereits erläutert signifikant geringer. Hier konnten allgemein die höchsten Fluoreszenzstärken gemessen werden. Wurden die Augen bei RT inkubiert wurden im Vergleich zu den Kontrollen auch signifikant höhere Fluoreszenzstärken gemessen (NPs bei RT: frisch enukleiert $p < 0,01$, im Kühlschrank 6 h $p < 0,01$, 60 °C 45 s $p < 0,001$). Wurden die Augen bei 40 °C für 20 Minuten erwärmt statt bei anderen Temperaturen und Zeiten und bei 37 °C statt bei RT inkubiert, konnten ebenfalls signifikant höhere Fluoreszenzstärken gemessen werden (NPs bei 37 °C: 40 °C 20 min $p < 0,05$) (Abbildung 26).



	frisch enukleiert		im Kühlschrank 6 h		60 °C 45 s	
K bei RT	0	**	0	**	0	***
NPs bei RT	0,9		0,9		4,3	

	frisch enukleiert		40 °C 10 min		40 °C 20 min		60 °C 30 s	
NPs bei RT	0,9		3,0		3,2		3,9	
NPs bei 37 °C	1,6	n.s.	1,8	n.s.	4,3	*	4,9	n.s.

Abbildung 26: Anwendung von Hitzestress – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels (A) und Vergleich zwischen den DAPI-Fluoreszenzstärken (B, C). A: Aufnahme der unbeladenen DNA-NP (NPs bei RT: Blau-/Grüntöne, NPs bei 37 °C: Brauntöne) und des Kontrollfarbstoffes (K bei RT: Rottöne) nach Anwendung von Hitzestressoren. Auf der X-Achse ist die fluoreszierende Fläche in Prozent (%) angegeben, bezogen auf die Gesamtfläche der Bilder. Auf der Y-Achse wird die Intaktheit des Hornhautepithels der enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) in Prozent (%) angegeben. Diese setzt sich aus dem Durchschnittswert der Bewertung der DAPI-, HE- und PAS-Bilder zusammen. Die Fluoreszenzstärke der DNA-NP stieg bei Temperaturen von 60 °C (Grüntöne bzw. rosa bzw. dunkelbraun) signifikant. Vergleich der NPs bei RT: SD *** $p < 0,01$ gegenüber frisch enukleiert NPs bei RT; Vergleich der NPs bei 37 °C: SD ++ $p < 0,01$ gegenüber frisch enukleiert NPs bei 37 °C. B: Vergleich der Fluoreszenzstärken zwischen den unbeladenen DNA-NP bei RT (NPs bei RT) und des Kontrollfarbstoffes bei RT (K bei RT); C: Vergleich der Fluoreszenzstärken zwischen den unbeladenen DNA-NP bei RT (NPs bei RT) und den unbeladenen DNA-NP bei 37 °C (NPs bei 37 °C). Wurden die Augen bei RT inkubiert und die NP statt die Kontrollen appliziert, konnten bei NP-Applikation signifikant höhere Fluoreszenzstärken gemessen werden. Wurden die Augen bei 40 °C für 20 Minuten erwärmt und bei 37 °C statt bei RT inkubiert (40 °C 20 min NPs bei 37 °C), konnten ebenfalls signifikant höhere Fluoreszenzstärken gemessen werden. SD * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ K bei RT bzw. NPs bei 37 °C gegenüber NPs bei RT. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$, wurden mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test analysiert.

3.2.3 Aufnahme der Antibiotika beladene NP ohne und mit Anwendung von Hitzestress

Als weitere Versuchsreihe wurden zwei verschiedene Antibiotika, Neomycin B und Kanamycin, verwendet. Diese wurden über Aptamere an die NP gebunden. Das Antibiotikum Neomycin B wurde über ein RNA-Aptamer an NP gebunden, das Kanamycin über ein DNA-Aptamer. Die Aufnahme der beladenen NP wurde getestet. Zur Markierung der NP wurde ein fluoreszierender Farbstoff (Cy3) kovalent an die Aptamer-Stränge gebunden. Die Versuchsreihe wurde an Rattenaugen aus in-vivo Versuchen getestet. Die Augen wurden einmal getropft und die Zeit nach 5, 15 und 30 Minuten sowie nach 2 und 4 Stunden untersucht. Bei den Versuchen mit Kanamycin wurde zusätzlich die Zeit nach 6 Stunden untersucht.

Das Hornhautepithel wies bei Neomycin B Unterschiede bezüglich der Intaktheit auf. Mit fortschreitender Wartezeit wurde die Intaktheit anscheinend etwas geringer. Auch die Aufnahme der NP nahm offensichtlich etwas im Zeitverlauf ab. Ab einer Zeit von vier Stunden banden keine NP mehr an das Hornhautepithel (Abbildung 27).

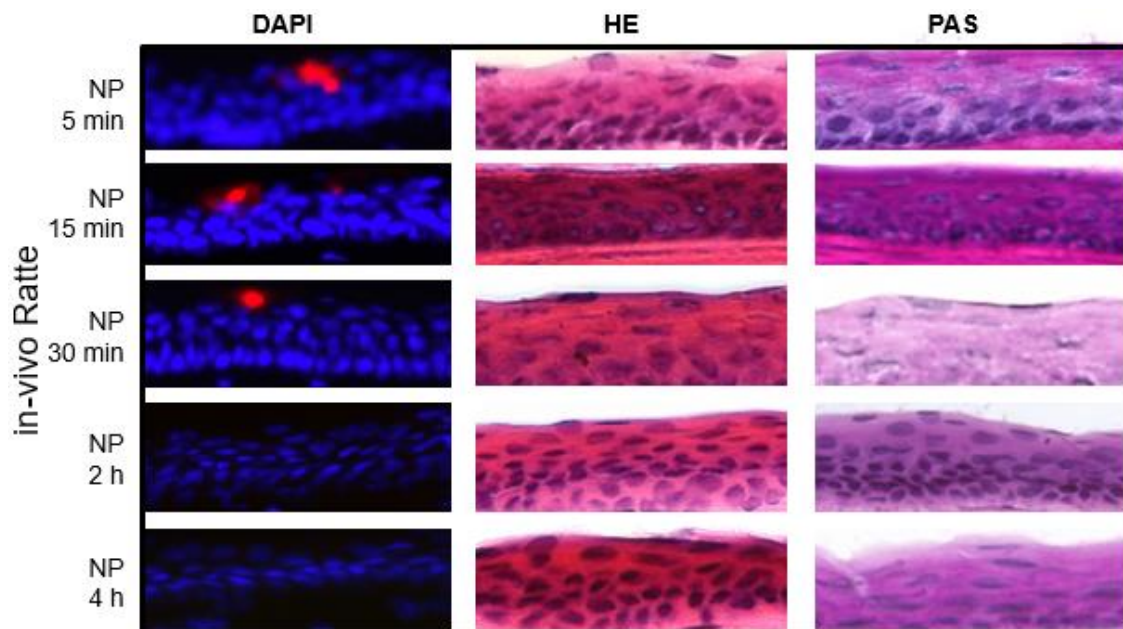


Abbildung 27: Das Antibiotikum Neomycin B – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder (400-fache Vergrößerung) zeigen die Aufnahme der beladenen DNA-NP (NP). Das Antibiotikum Neomycin B wurde zuvor über ein RNA-Aptamer an NP gebunden. Rattenaugen aus in-vivo Versuchen wurden nach unterschiedlichen Wartezeiten untersucht (5 min, 15 min, 30 min, 2 h, 4 h). Offensichtlich wurde mit fortschreitender Wartezeit die Intaktheit etwas geringer. Auch die Aufnahme der NP nahm offensichtlich etwas im Zeitverlauf ab. Ab einer Zeit von vier Stunden banden keine NP mehr an das Hornhautepithel.

Mit fortschreitender Wartezeit wurde die Intaktheit nicht signifikant geringer (DAPI: 5 min 80 % \pm 0; 15 min 72 % \pm 24; 30 min 70 % \pm 17,3; 2 h 60 % \pm 0; 4 h 55 % \pm 8,7) (Abbildung 28).

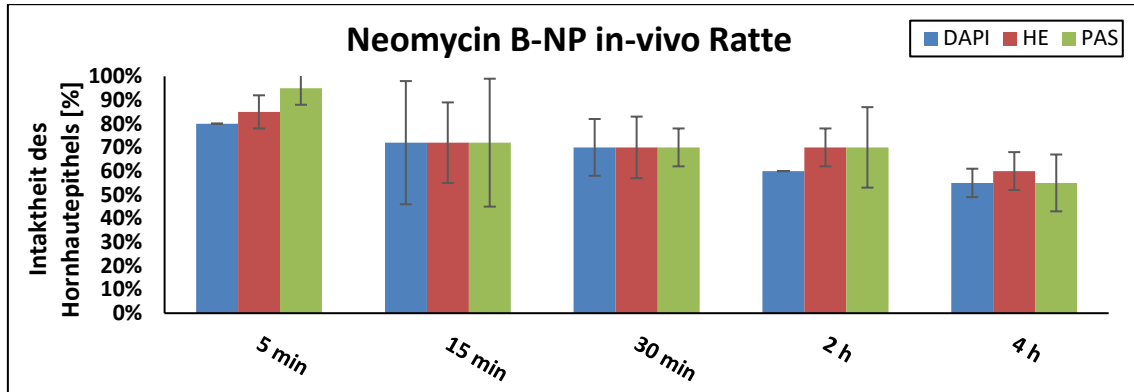


Abbildung 28: Das Antibiotikum Neomycin B – Intaktheit des Hornhautepithels bei Aufnahme der beladenen DNA-NP (NP). Das Antibiotikum Neomycin B wurde zuvor über ein RNA-Aptamer an NP gebunden. Auf der Y-Achse ist die Intaktheit des Hornhautepithels nach der DAPI(blau)-, HE(rot)- bzw. PAS(grün)-Färbung in Prozent (%) angegeben. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Bearbeitungen der Rattenaugen aus in-vivo Versuchen aufgelistet. Mit fortschreitender Wartezeit wurde die Intaktheit nicht signifikant geringer. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$. Nach Analyse mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die gemessene DAPI-Fluoreszenzstärke der NP nahm nicht signifikant im Zeitverlauf ab (5 min 0,1 % \pm 0,3; 15 min 0,1 % \pm 0,1; 30 min 0,01 % \pm 0; 2 h 0,01 % \pm 0). Ab einer Wartezeit von vier Stunden konnten keine NP mehr nachgewiesen werden (Abbildung 29).

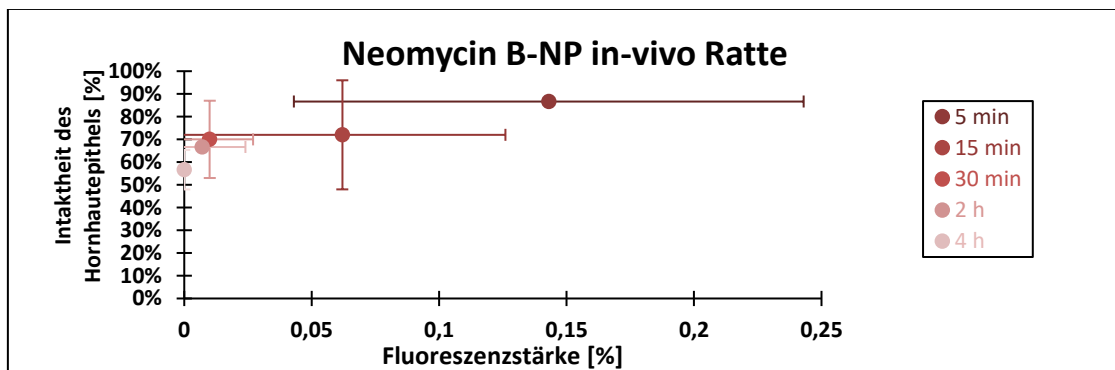


Abbildung 29: Das Antibiotikum Neomycin B – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels bei Aufnahme der beladenen DNA-NP (Rottöne) nach unterschiedlichen Wartezeiten. Das Antibiotikum Neomycin B wurde zuvor über ein RNA-Aptamer an NP gebunden. Auf der X-Achse ist die fluoreszierende Fläche in Prozent (%) angegeben, bezogen auf die Gesamtfläche der Bilder. Auf der Y-Achse wird die Intaktheit des Hornhautepithels der Rattenaugen aus in-vivo Versuchen in Prozent (%) angegeben. Diese setzt sich aus dem Durchschnittswert der Bewertung der DAPI-, HE- und PAS-Bilder zusammen. Die Fluoreszenzstärke der NP war nicht signifikant. Ab einer Wartezeit von vier Stunden konnten keine NP mehr nachgewiesen werden. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$. Nach Analyse mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Das Hornhautepithel wies beim Kanamycin ebenfalls Unterschiede bezüglich der Intaktheit auf. Mit fortschreitender Wartezeit wurde die Intaktheit offensichtlich etwas geringer. Auch die Aufnahme der NP nahm im Zeitverlauf offensichtlich etwas ab. Ab einer Zeit von zwei Stunden banden keine NP mehr an das Hornhautepithel (Abbildung 30).

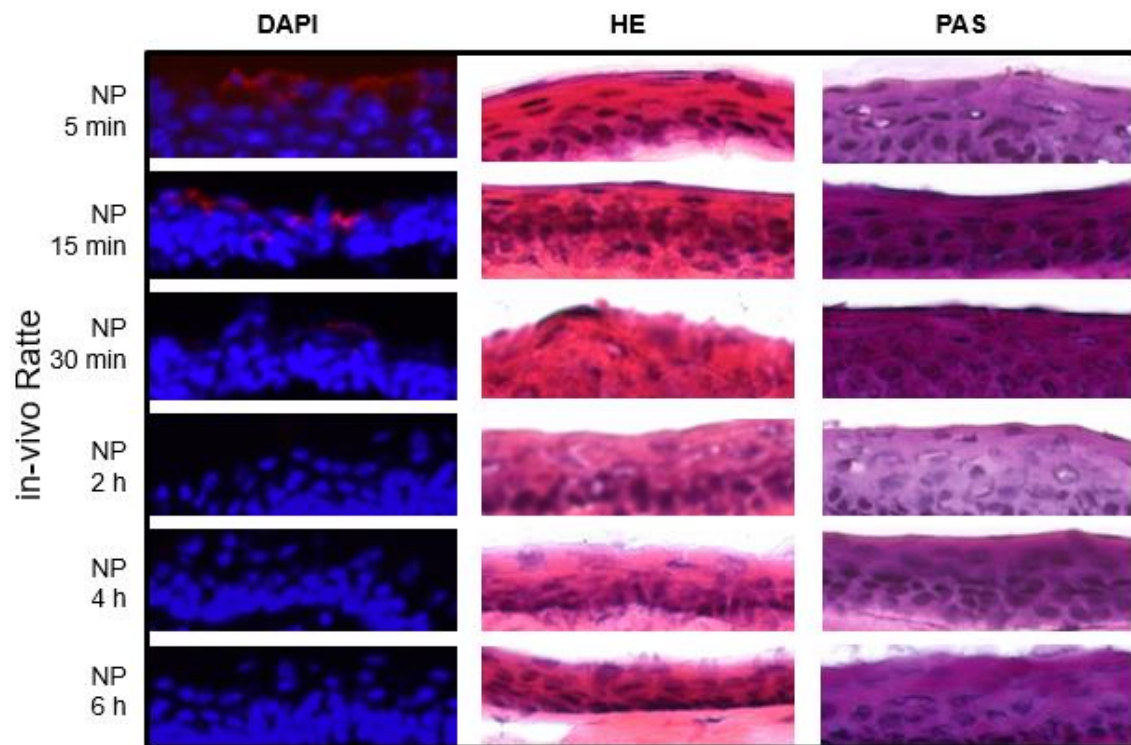


Abbildung 30: Das Antibiotikum Kanamycin – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder (400-fache Vergrößerung) zeigen die Aufnahme der beladenen DNA-NP (NP). Das Antibiotikum Kanamycin wurde zuvor über ein DNA-Aptamer an NP gebunden. Rattenaugen aus in-vivo Versuchen wurden nach unterschiedlichen Wartezeiten untersucht (5 min, 15 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h). Offensichtlich wurde mit fortschreitender Wartezeiten die Intaktheit etwas geringer. Auch die Aufnahme der NP nahm im Zeitverlauf offensichtlich etwas ab. Ab einer Zeit von zwei Stunden banden keine NP mehr an das Hornhautepithel.

Der Eindruck aus den Färbungen bestätigte sich nach der verblindeten Beurteilung nach dem Scoringsystem. Mit fortschreitender Wartezeit wurde die Intaktheit nicht signifikant geringer (DAPI: 5 min 80 % \pm 0; 15 min 70 % \pm 10; 30 min 73 % \pm 14,9; 2 h 70 % \pm 10; 4 h 55 % \pm 8,7; 6 h 55 % \pm 8,7) (Abbildung 31).

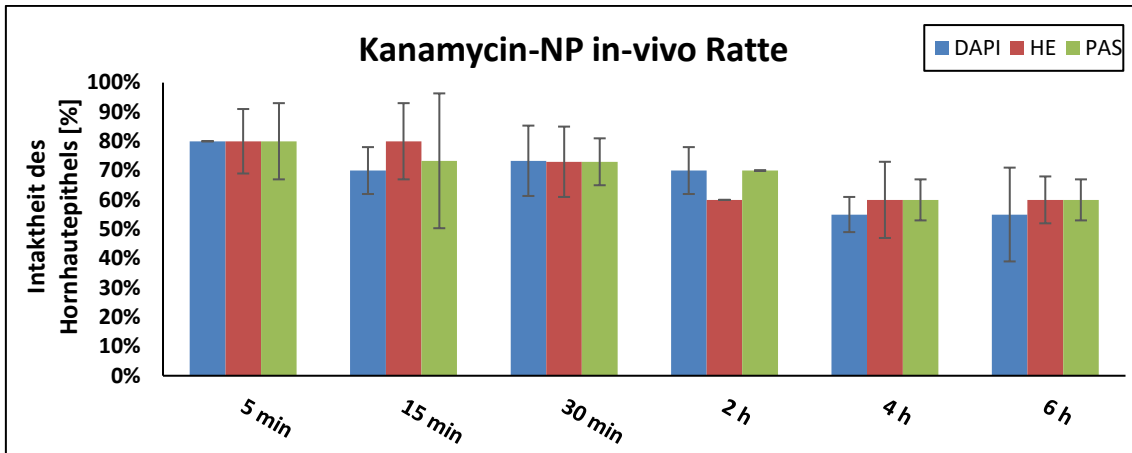


Abbildung 31: Das Antibiotikum Kanamycin – Intaktheit des Hornhautepithels bei Aufnahme der beladenen DNA-NP (NP). Das Antibiotikum Kanamycin wurde zuvor über ein DNA-Aptamer an NP gebunden. Auf der Y-Achse ist die Intaktheit des Hornhautepithels nach der DAPI(blau)-, HE(rot)- bzw. PAS(grün)-Färbung in Prozent (%) angegeben. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Bearbeitungen der Rattenaugen aus in-vivo Versuchen aufgelistet. Mit fortschreitender Wartezeit wurde die Intaktheit nicht signifikant geringer. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$. Nach Analyse mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die gemessene DAPI-Fluoreszenzstärke der NP nahm im Zeitverlauf nicht signifikant ab (5 min 0,07 % $\pm 0,1$; 15 min 0,05 % $\pm 0,1$; 30 min 0,04 % $\pm 0,1$). Ab einer Wartezeit von zwei Stunden konnten keine NP mehr nachgewiesen werden (Abbildung 32).

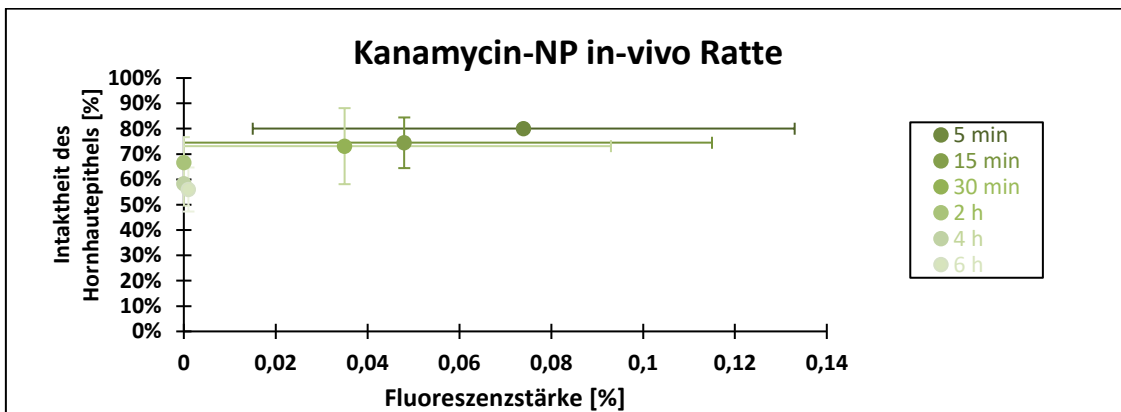


Abbildung 32: Das Antibiotikum Kanamycin – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels der beladenen DNA-NP (Grüntöne) nach unterschiedlichen Wartezeiten. Das Antibiotikum Kanamycin wurde zuvor über ein DNA-Aptamer an NP gebunden. Auf der X-Achse ist die fluoreszierende Fläche in Prozent (%) angegeben, bezogen auf die Gesamtfläche der Bilder. Auf der Y-Achse wird die Intaktheit des Hornhautepithels der Rattenaugen aus in-vivo Versuchen in Prozent (%) angegeben. Diese setzt sich aus dem Durchschnittswert der Bewertung der DAPI-, HE- und PAS-Bilder zusammen. Die Fluoreszenzstärke der NP war nicht signifikant im Zeitverlauf. Ab einer Wartezeit von zwei Stunden konnten keine NP mehr nachgewiesen werden. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$. Nach Analyse mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Abschließend wurde auch die Intaktheit des Hornhautepithels und die NP-Aufnahme der enukleierten Rattenaugen nach Anwendung von Hitzestress überprüft. Bevor die beladenen NP den Augen appliziert wurden, wurden die Augen bei 40 °C für 20 Minuten in Wasser erwärmt. Die Augen wurden bei 37 °C inkubiert. Die einzelnen Aptamere wurden zum Vergleich herangezogen und dienten als Kontrolle (Neomycin B: aptN, Kanamycin: aptK). Zum weiteren Vergleich wurden den Augen unbeladene DNA-NP appliziert, an denen nur ein fluoreszierender Farbstoff (FAM) gebunden war. Auch diese Augen wurden bei RT oder bei 37 °C inkubiert. Bevor die unbeladenen DNA-NP den inkubierten Augen appliziert wurden, wurden sie ebenfalls bei 40 °C für 20 Minuten in Wasser erwärmt.

Bei allen Behandlungsparametern waren offensichtlich kaum noch zusätzliche Defekte an den Hornhautepithelien feststellbar im Vergleich zur Behandlung ohne Hitzestress. Unabhängig von der Behandlung banden die NP immer an das Hornhautepithel der enukleierten Rattenaugen. Scheinbar banden mehr NP, wenn die Augen bei 37 °C inkubiert wurden und wenn Aptamere bzw. die Antibiotika über Aptamere an die NP gebunden waren (Abbildung 33).

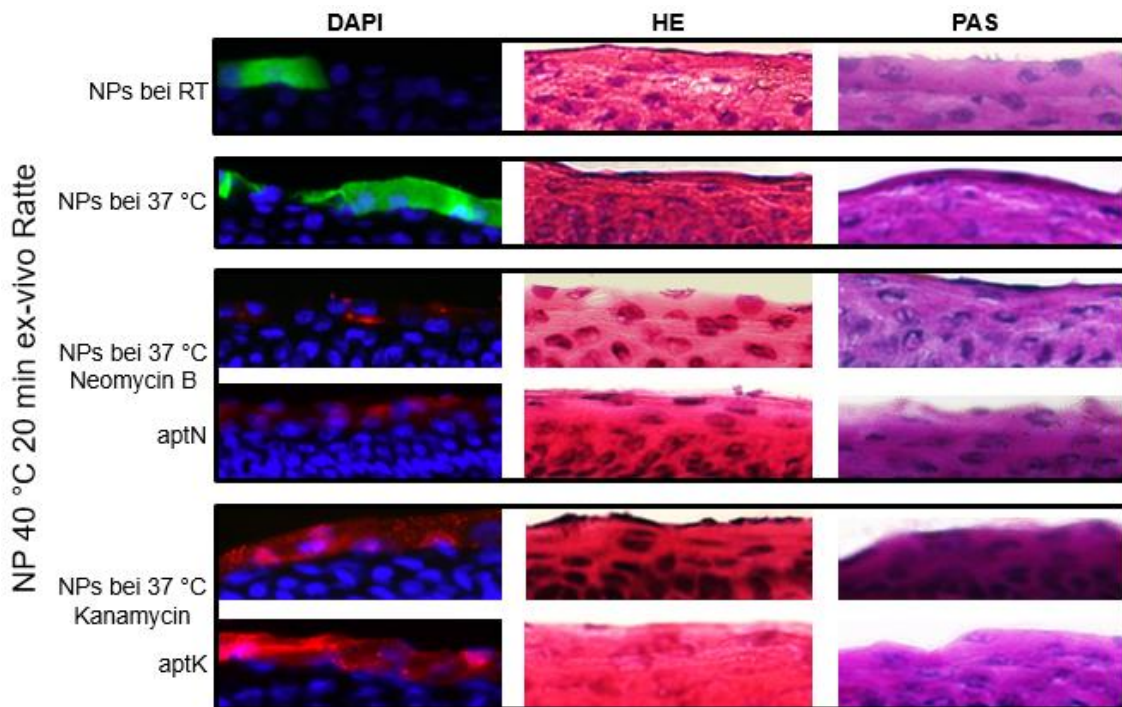


Abbildung 33: Antibiotika mit Anwendung von Hitzestress – Repräsentative DAPI-, HE- und PAS-Bilder von enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) (400-fache Vergrößerung) zeigen die Aufnahme der unbeladenen und beladenen DNA-NP (NP) nach Anwendung von Hitzestressoren. Unter anderem wurden Antibiotika, Kanamycin und Neomycin B, über Aptamere an die NP gebunden. Bevor die beladenen NP den Augen appliziert wurden, wurden sie bei 40 °C für 20 Minuten in Wasser erwärmt. Die Augen wurden bei 37 °C inkubiert. Kontrollen ohne die gebundenen Antibiotika wurden zum Vergleich herangezogen. Die Aptamere waren dennoch an den NP gebunden (Kontrolle vom Neomycin B: aptN, Kontrolle vom Kanamycin: aptK). Zum weiteren Vergleich wurden den Augen unbeladene NP appliziert. Die Augen wurden bei RT oder bei 37 °C inkubiert. An die NP waren weder über Aptamere Antibiotika gebunden, noch die Aptamere selbst waren gebunden. Bevor die unbeladenen DNA-NP den Augen appliziert wurden, wurden sie ebenfalls bei 40 °C für 20 Minuten in Wasser erwärmt. Bei allen Behandlungsparametern waren offensichtlich kaum noch zusätzliche Defekte an den Hornhautepithelien feststellbar. Unabhängig von der Behandlung banden die NP immer an das Hornhautepithel der enukleierten Rattenaugen. Scheinbar banden mehr NP, wenn die Augen bei 37 °C inkubiert wurden und wenn Aptamere bzw. Antibiotika über Aptamere an die NP gebunden waren.

Wurde die Intaktheit des Hornhautepithels beurteilt, wurde ebenfalls der Eindruck aus den Färbungen bestätigt. Unabhängig ob die einzelnen Aptamere bzw. Antibiotika über Aptamere an NP gebunden oder ob die Augen bei RT oder bei 37 °C inkubiert wurden, waren die Intaktheiten der Hornhautepithelien dieselben (DAPI: 80 % \pm 0) (Abbildung 34).

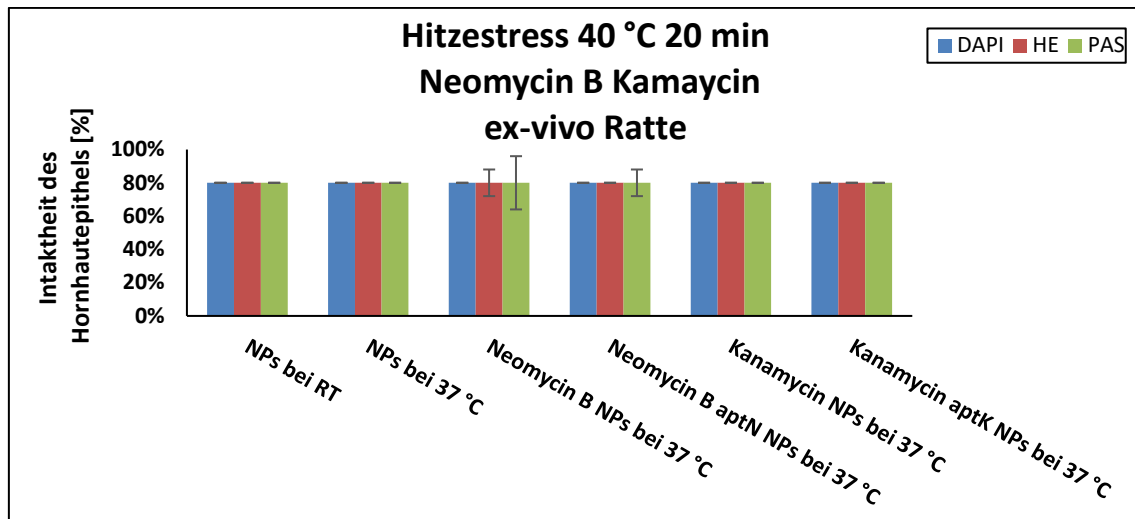


Abbildung 34: Antibiotika mit Anwendung von Hitzestress – Intaktheit des Hornhautepithels bei Aufnahme der unbeladenen und beladenen DNA-NP (NP) nach Anwendung von Hitzestressoren. Auf der Y-Achse ist die Intaktheit des Hornhautepithels nach der DAPI(blau)-, HE(rot)- bzw. PAS(grün)-Färbung in Prozent (%) angegeben. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen Bearbeitungen der enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) aufgelistet. Unabhängig ob die einzelnen Aptamere bzw. Antibiotika über Aptamere an NP gebunden oder ob die Augen bei RT oder bei 37 °C inkubiert wurden, waren die Intaktheiten der Hornhautepithelien dieselben. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$. Nach Analyse mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die DAPI-Fluoreszenzstärke der DNA-NP stieg, wenn die Augen bei 37 °C (NPs bei 37 °C: 4,3 % \pm 1,2) statt bei RT (NPs bei RT: 3,2 \pm 0,2) inkubiert wurden. Wurden die Antibiotika Neomycin B und Kanamycin über Aptamere an NP gebunden und die Fluoreszenzstärke nach Anwendung von Hitzestressoren gemessen, konnten signifikant mehr NP nachgewiesen werden. Bei Neomycin B (Neomycin B NPs bei 37 °C: 7,1 % \pm 0,8 $p < 0,001$) konnten noch mehr NP nachgewiesen werden als bei Kanamycin (Kanamycin NPs bei 37 °C: 6,5 % \pm 1,3 $p < 0,01$). Die einzelnen Aptamere nahmen weniger NP auf. Die gemessene Fluoreszenzstärke war jedoch signifikant höher als bei den DNA-NP, an denen nur der Farbstoff FAM gebunden war (aptN bei 37 °C: 6,8 % \pm 1,1 $p < 0,01$; aptK bei 37 °C: 6,4 % \pm 1,4 $p < 0,01$). Bei allen Behandlungsparametern waren kaum Defekte an den Hornhautepithelien feststellbar. Die Intaktheiten der Hornhautepithelien waren wie bereits erläutert dieselben (Abbildung 35).

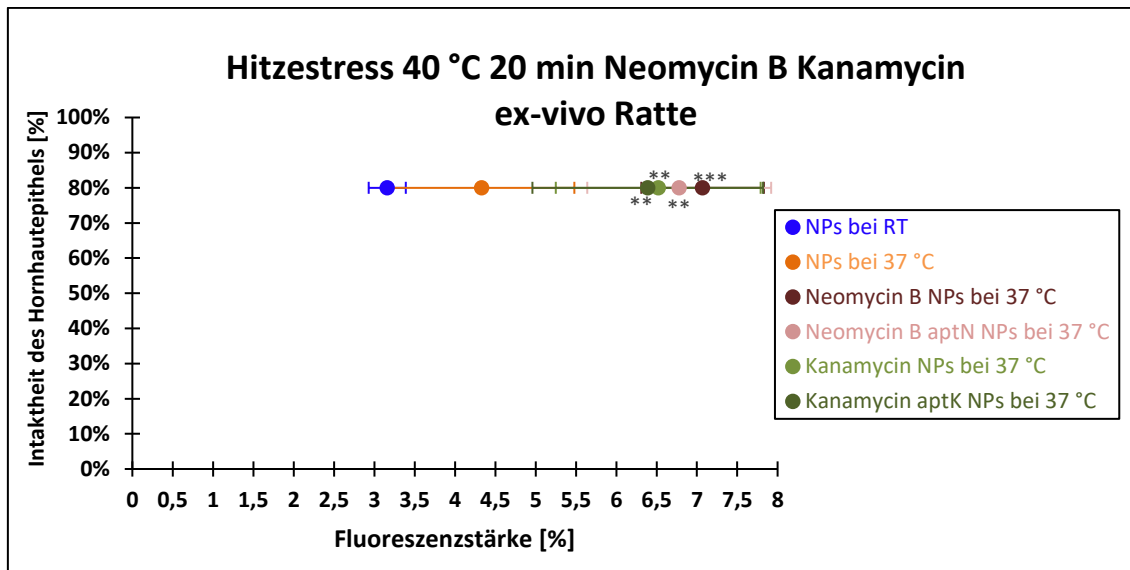


Abbildung 35: Antibiotika mit Anwendung von Hitzestress – Vergleich der DAPI-Fluoreszenzstärke mit der Intaktheit des Hornhautepithels bei Aufnahme der unbeladenen und beladenen DNA-NP (NP) nach Anwendung von Hitzestressoren. Auf der X-Achse ist die fluoreszierende Fläche in Prozent (%) angegeben, bezogen auf die Gesamtfläche der Bilder. Auf der Y-Achse wird die Intaktheit des Hornhautepithels der enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) in Prozent (%) angegeben. Diese setzt sich aus dem Durchschnittswert der Bewertung der DAPI-, HE- und PAS-Bilder zusammen. Die Fluoreszenzstärke der NP stieg, wenn die Augen bei 37 °C (NPs bei 37 °C: hellbraun) statt bei RT (NPs bei RT: blau) inkubiert wurden. Wurden die Antibiotika Neomycin B und Kanamycin über Aptamere an NP gebunden und die Fluoreszenzstärke nach Anwendung von Hitzestressoren gemessen, konnten signifikant mehr NP nachgewiesen werden (Neomycin B NPs bei 37 °C: dunkelrot, Kanamycin NPs bei 37 °C: hellgrün). Die einzelnen Aptamere nahmen im direkten Vergleich zu den Antibiotika weniger NP auf (Neomycin B aptN bei 37 °C: hellrot, Kanamycin aptN bei 37 °C: dunkelgrün). Bei allen Behandlungsparametern waren die Intaktheiten der Hornhautepithelien dieselben. SD ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ NPs bei RT, Neomycin B NPs bei 37 °C, Neomycin B aptN NPs bei 37 °C, Kanamycin NPs bei 37 °C und Kanamycin aptK NPs bei 37 °C, gegenüber NPs bei 37 °C. Alle Zeitpunkte $n \geq 4$, wurden mit ANOVA und Tukey-Kramer post-hoc Test analysiert.

3.3 Die Lage der NP – Mucin-1, Galektin-3, ZO-1

3.3.1 Aufnahme der DNA-NP

Im folgenden Versuchskomplex sollte die Bindungsstelle der unbeladenen NP gezeigt werden. Es sollte gezeigt werden, ob nach Anwendung der verschiedenen Versuchsreihen die NP unterschiedlich binden. Dafür hat man die verschiedenen Proteinschichten Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1 am Hornhautepithel sichtbar gemacht. Außerdem sollte die Lokalisation von Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1 am Hornhautepithel bestimmt werden. Die Aufnahme der NP wurde zuerst getestet. Zur Markierung der NP wurde wiederum der fluoreszierende Farbstoff (FAM) kovalent gebunden. Die Versuchsreihe wurde an enukleierten Schweineaugen, an enukleierten Rattenaugen und Augen aus in-vivo Versuchen getestet. Die enukleierten Augen wurden 5, 15 oder 30 Minuten inkubiert. Bei in-vivo Versuchen wurden die Augen getropft und nach 5, 15 und 30 Minuten untersucht (Abbildung 36).

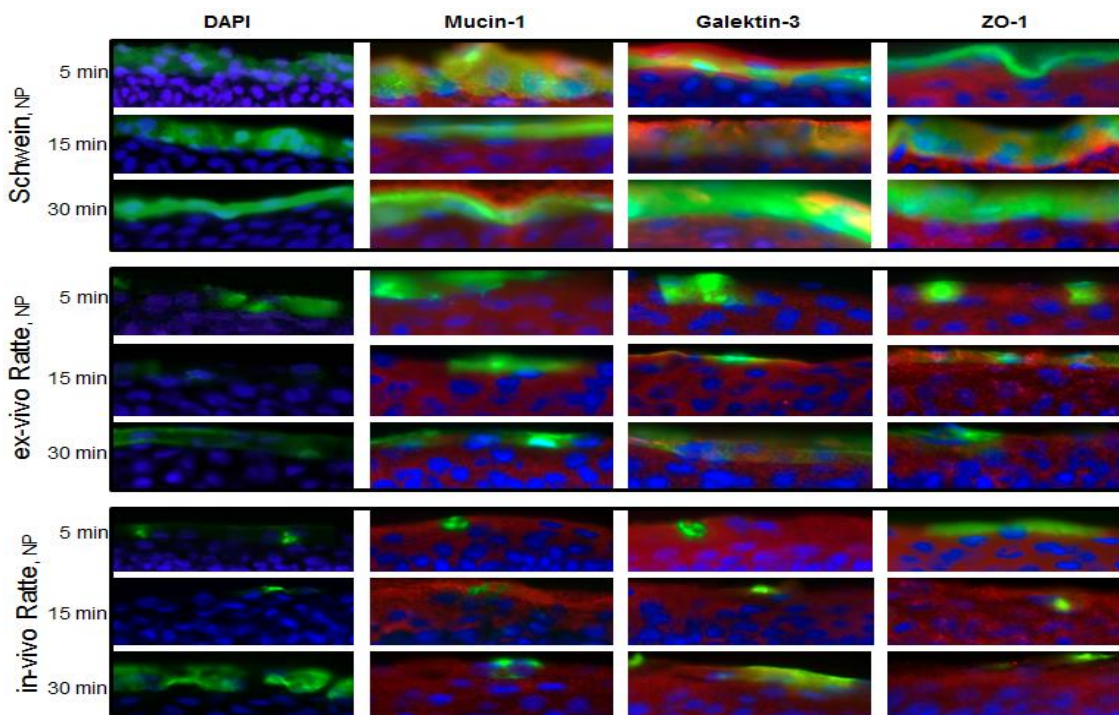


Abbildung 36: DNA-NP – Repräsentative Bilder der Antikörperfärbungen (400-fache Vergrößerung) zeigen die Lage der unbeladenen DNA-NP (NP, grün) nach der DAPI-Färbung (DAPI, blau), Mucin-1-Antikörperfärbung (Mucin-1, rot), Galektin-3-Antikörperfärbung (Galektin-3, rot) und ZO-1-Antikörperfärbung (ZO-1, rot) von enukleierten Schweineaugen, enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) und von Rattenaugen aus in-vivo Versuchen mit unterschiedlich langen Inkubations- bzw. Wartezeiten (5 min, 15 min, 30 min). Offensichtlich banden nahezu alle NP innerhalb der Lokalisation dieser Proteine. Die Lokalisation der Proteine war am Hornhautepithel dieselbe.

Nahezu alle NP banden innerhalb der Bereiche der Mucin-1-, Galektin-3- bzw. des ZO-1-Färbungen (Abbildung 37, hellgrau: Innerhalb). Nach Inkubation der enukleierten Rattenaugen für 15 Minuten banden die NP sowohl innerhalb als auch außerhalb des Bereiches der Mucin-1-Färbung (dunkelgrau: Außerhalb). Bei den Rattenaugen aus in-vivo Versuchen banden die NP nach der Wartezeit von 15 Minuten ebenfalls innerhalb und außerhalb des Bereiches der Galektin-3-Färbung. Die Lokalisation der Proteine Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1 war am Hornhautepithel dieselbe (Abbildung 37).

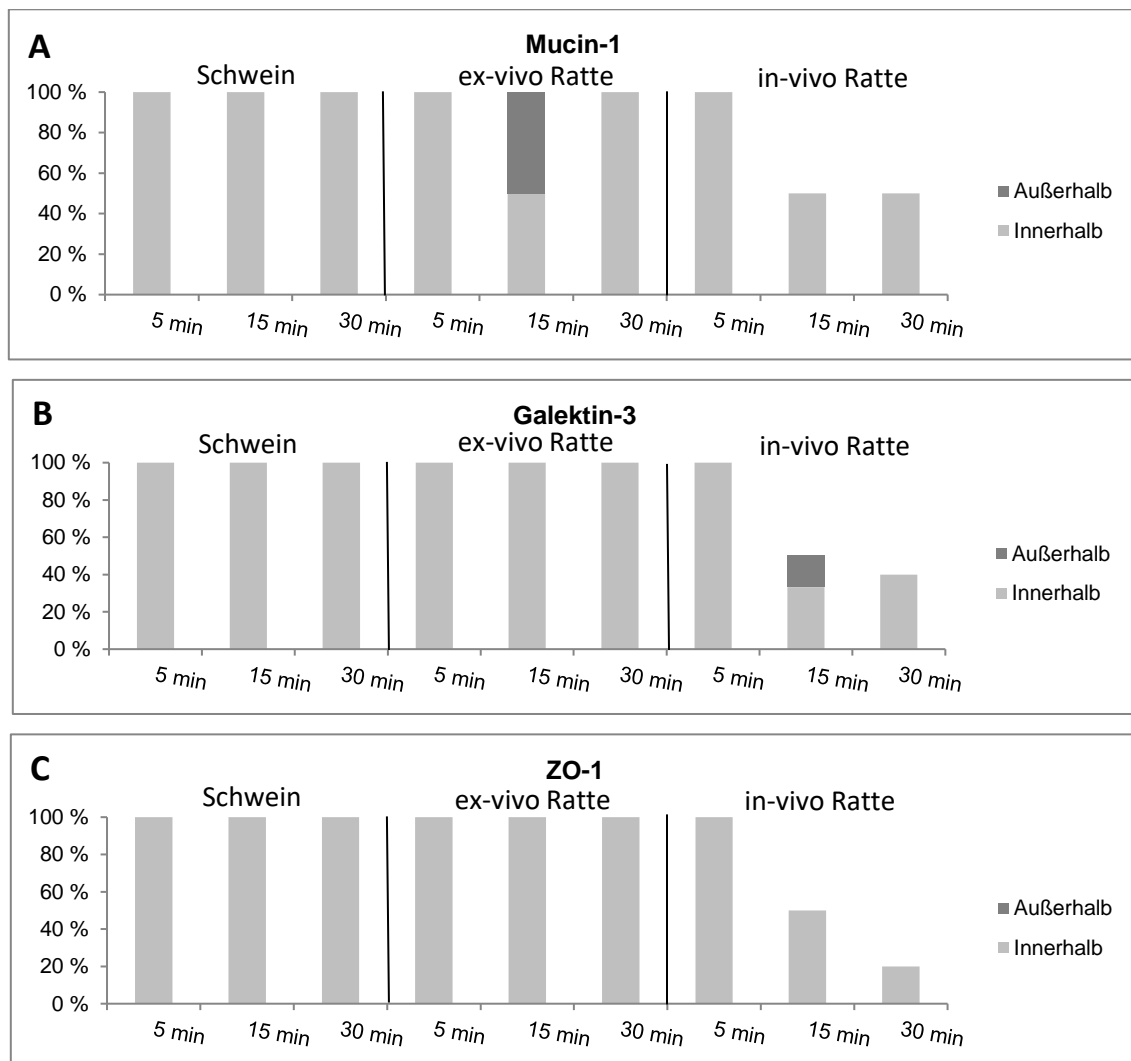


Abbildung 37: DNA-NP – Darstellung der Lage der unbeladenen DNA-NP nach den Antikörperfärbungen; A: Mucin-1-, B: Galektin-3- und C: ZO-1- Antikörperfärbung. Auf der Y-Achse ist prozentual (%) angegeben, ob die NP außerhalb (dunkelgrau: Außerhalb) oder innerhalb der Lokalisation dieser Proteine binden (hellgrau: Innerhalb). Auf der X-Achse werden zunächst enukleierte Schweineaugen, dann enukleierte Rattenaugen (ex-vivo Ratte) und schließlich Rattenaugen aus in-vivo Versuchen mit unterschiedlich langen Inkubations- bzw. Wartezeiten (5 min, 15 min und 30 min) aufgeführt. Die NP banden fast ausschließlich innerhalb von den Bereichen der Färbungen.

3.3.2 Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC

In der folgenden Versuchsreihe sollte gezeigt, wo die unbeladenen DNA-NP am Hornhautepithel binden, wenn zu den DNA-NP ACC, BAC, bzw. ACC und BAC in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben wurden (ACC: 50 mg/ml, 100 mg/ml; BAC: 0,06 mg/ml, 0,1 mg/ml; ACC/BAC: 100/0,1 mg/ml). Auch hier sollte die Lokalisation der NP bzw. von Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1 am Hornhautepithel bestimmt werden. Die Versuchsreihe wurde an enukleierten Rattenaugen getestet. Die Augen wurden jeweils fünf Minuten inkubiert (Abbildung 38).

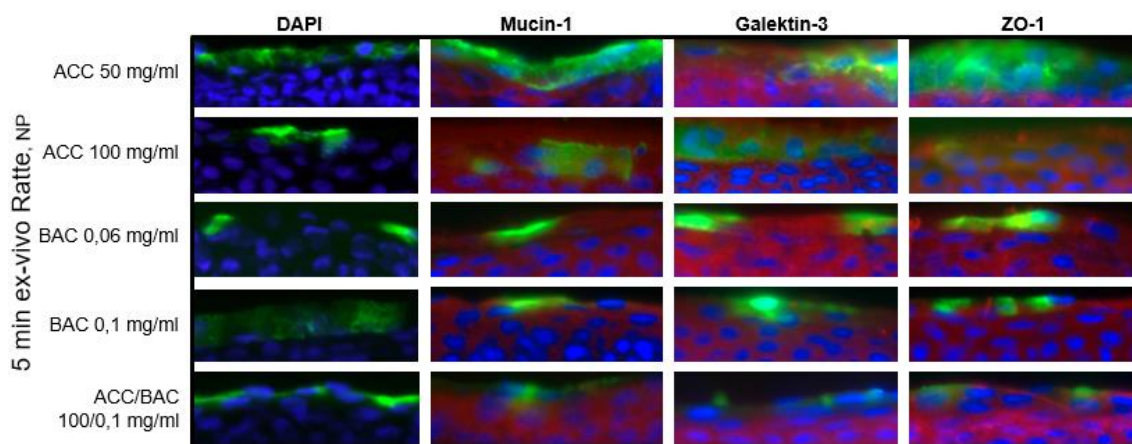


Abbildung 38: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Repräsentative Bilder der Antikörperfärbungen (400-fache Vergrößerung) zeigen die Lage der unbeladenen DNA-NP (NP, grün) nach der DAPI-Färbung (DAPI, blau), Mucin-1-Antikörperfärbung (Mucin-1, rot), Galektin-3-Antikörperfärbung (Galektin-3, rot) und ZO-1-Antikörperfärbung (ZO-1, rot). Zu den unbeladenen DNA-NP wurden ACC, BAC, bzw. ACC und BAC in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. Die enukleierten Rattenaugen wurden fünf Minuten (5 min ex-vivo Ratte) inkubiert. Augenscheinlich banden alle NP innerhalb der Lokalisation dieser Proteine. Die Lokalisation von den Proteinen Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1 war am Hornhautepithel dieselbe.

Alle NP banden innerhalb von den Bereichen der Mucin-1-, Galektin-3- bzw. des ZO-1-Färbungen (Abbildung 39, hellgrau: Innerhalb). Die Lokalisation von den drei Proteinen (Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1) war am Hornhautepithel dieselbe (Abbildung 39).

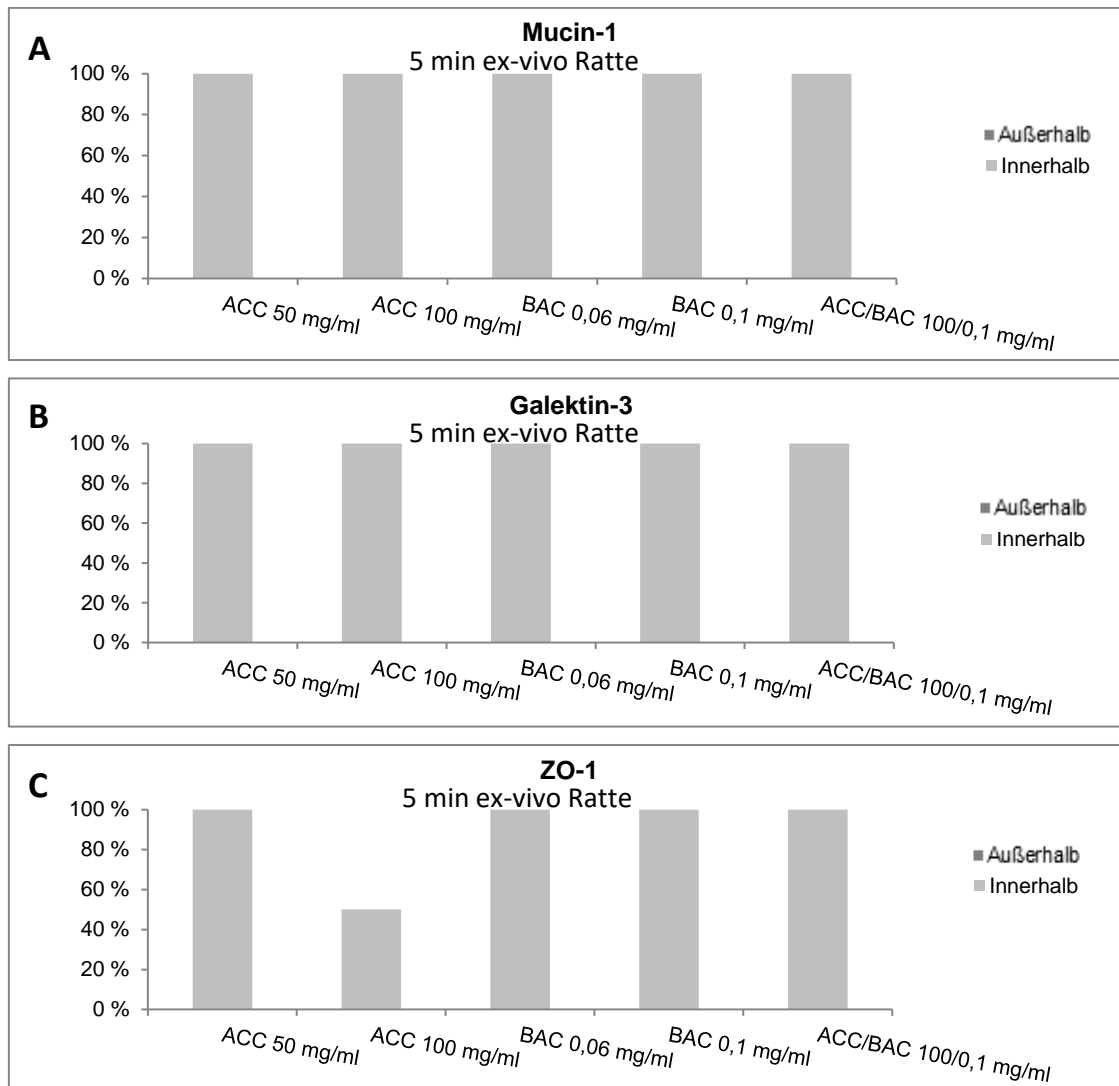


Abbildung 39: Aufnahmeerhöhung durch ACC und BAC – Darstellung der Lage der unbeladenen DNA-NP nach den Antikörperfärbungen; A: Mucin-1-, B: Galektin-3- und C: ZO-1-Antikörperfärbung. Zu den unbeladenen NP wurde ACC, BAC, bzw. ACC und BAC in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben. Die enukleierten Rattenaugen wurden für fünf Minuten inkubiert (5 min ex-vivo Ratte). Auf der Y-Achse ist prozentual (%) angegeben, ob die NP außerhalb (dunkelgrau: Außerhalb) oder innerhalb der Lokalisation dieser Proteine binden (hellgrau: Innerhalb). Auf der X-Achse wird ACC und BAC in unterschiedlichen Konzentrationen aufgeführt, wie sie zu den unbeladenen DNA-NP hinzugegeben wurden. Die NP banden ausschließlich innerhalb von den Bereichen der Färbungen.

3.3.3 Anwendung von Hitzestress

In diesem Versuch sollte gezeigt werden, wo die unbeladenen DNA-NP nach Anwendung von Hitzestress am Hornhautepithel binden. Die Versuchsreihe wurde an enukleierten Rattenaugen getestet. Bevor unbeladene DNA-NP den Augen appliziert wurden, lagerten sie entweder für 6 Stunden im Kühlschrank, wurden frisch enukleiert oder wurden bei unterschiedlichen Temperaturen

unterschiedlich lange in Wasser erwärmt. Die Augen wurden bei RT oder bei 37 °C inkubiert (Abbildung 40).

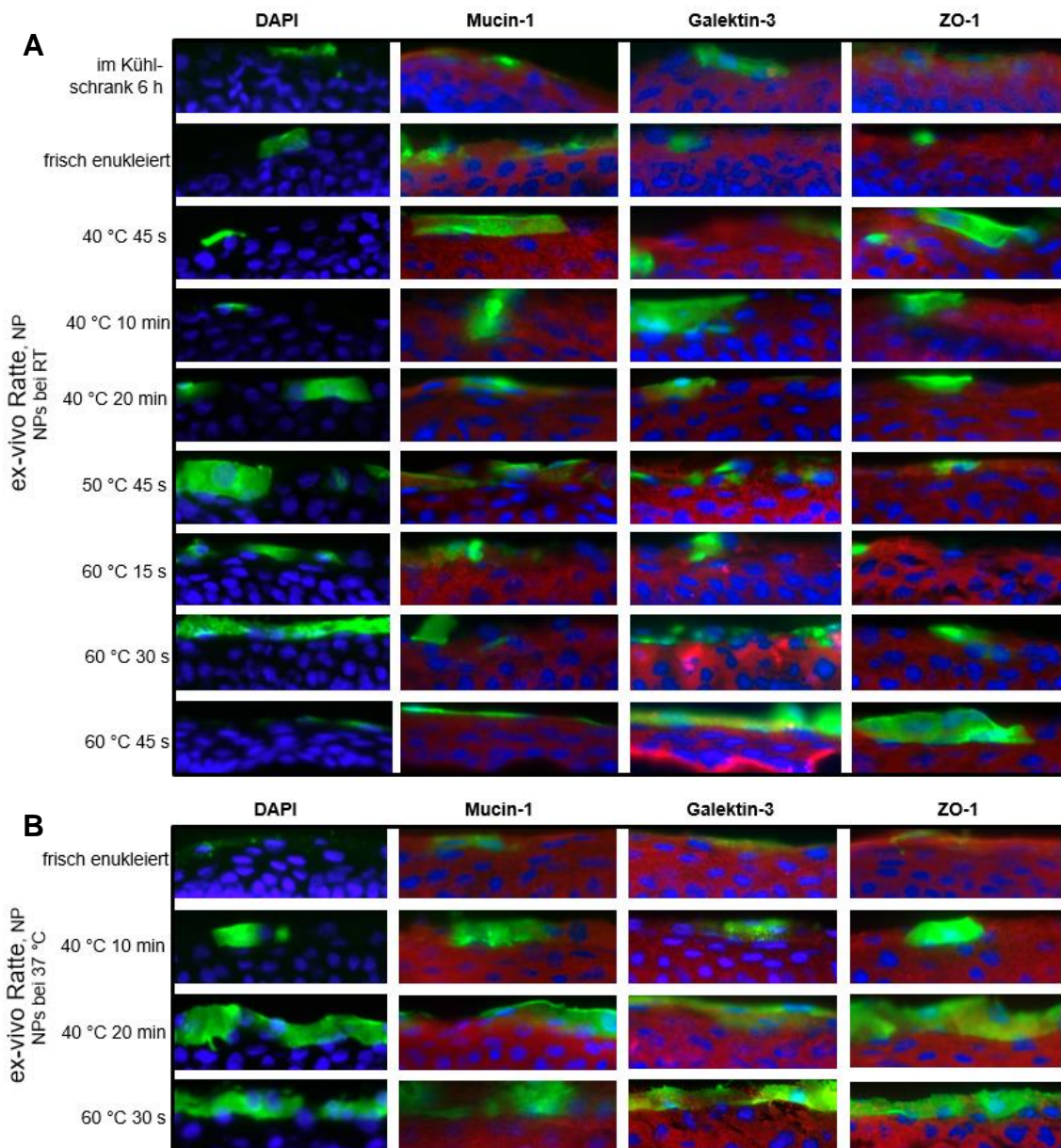


Abbildung 40: Anwendung von Hitzestress – Repräsentative Bilder der Antikörperfärbungen (400-fache Vergrößerung) zeigen die Lage der unbeladenen DNA-NP (NP, grün) nach der DAPI-Färbung (DAPI, blau), Mucin-1-Antikörperfärbung (Mucin-1, rot), Galektin-3-Antikörperfärbung (Galektin-3, rot) und ZO-1-Antikörperfärbung (ZO-1, rot) nach Anwendung von Hitzestressoren. Die enukleierten Rattenäugnen (ex-vivo Ratte) wurden A: bei RT oder B: bei 37 °C inkubiert. Bevor die unbeladenen NP den Augen appliziert wurden, wurden sie entweder für 6 Stunden in den Kühlschrankschrank gestellt, frisch enukleiert oder bei unterschiedlichen Temperaturen unterschiedlich lange in Wasser erwärmt. Offensichtlich banden nahezu alle NP innerhalb der Lokalisation dieser Proteine. Die Lokalisation von Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1 war am Hornhautepithel dieselbe.

Nahezu alle NP banden innerhalb von den Bereichen der Mucin-1-, Galektin-3- bzw. des ZO-1-Färbungen (Abbildung 41, hellgrau: Innerhalb). Wurden die enukleierten Rattenaugen für 30 Sekunden bei 60 °C in Wasser erwärmt und bei RT inkubiert, banden die NP außerhalb des Bereiches der Galektin-3- bzw. ZO-1-Färbung (Abbildung 41, dunkelgrau: Außerhalb).

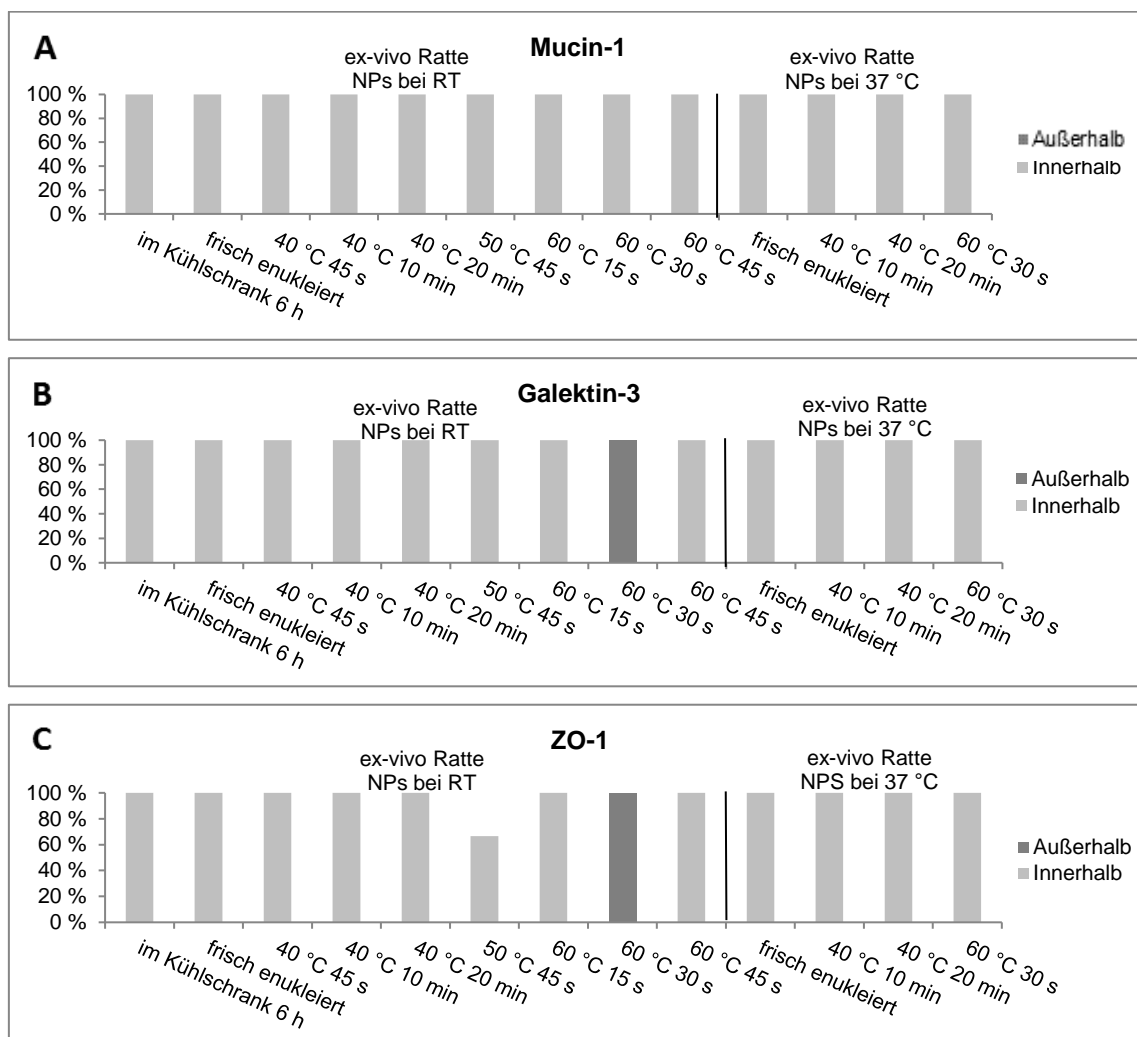


Abbildung 41: Anwendung von Hitzestress – Darstellung der Lage der unbeladenen DNA-NP nach den Antikörperfärbungen; A: Mucin-1-, B: Galektin-3- und C: ZO-1-Antikörperfärbung nach Anwendung von Hitzestressoren. Auf der Y-Achse ist prozentual (%) angegeben, ob die NP außerhalb (dunkelgrau: Außerhalb) oder innerhalb der Lokalisation dieser Proteine (hellgrau: Innerhalb). Auf der X-Achse wird aufgeführt, ob die unbeladenen NP entweder für 6 Stunden in den Kühlschrank gestellt, frisch enukleiert oder bei unterschiedlichen Temperaturen unterschiedlich lange in Wasser erwärmt wurden, bevor sie den enukleierten Rattenaugen (ex-vivo Ratte) appliziert wurden. Die Augen wurden bei RT (NPs bei RT) oder bei 37 °C (NPs bei 37 °C) inkubiert. Die NP banden fast ausschließlich innerhalb von den Bereichen der Färbungen.

4 Diskussion

4.1 Therapien am Auge mit NP

In den vergangenen Jahrzehnten sind viele synthetische Polymere für die medizinische Anwendung von NP und für Arzneimittelabgabesysteme in Studien untersucht worden. Zu diesem Zweck müssen Polymere ungiftig, biologisch abbaubar und biokompatibel sein. Polymilchsäure-co-Glykolsäure (PLGA) ist eines der am besten untersuchten Polymere. Es ist vollständig biologisch abbaubar und kann sich in Nanometer große Mizellen organisieren, die kleinere Moleküle wie Arzneimittel aufnehmen können und sie im Körper zeitabhängig freisetzen können. Trotz guter Eigenschaften der PLGA-polymerisierten-NP ist die Anwendung immernoch eine Herausforderung. PLGA-polymerisierte-NP haben eine schlechte Stabilität in Wasser und große Durchmesser. Außerdem werden sie aus dem Blutstrom durch die Leber und Milz beseitigt. Polyethylenglykol (PEG) ist das am häufigste verwendete Polymer für *Drug-Delivery*-Anwendungen. Das erste PEGylierte Produkt (Adagen[®], eine PEGylierte Rinder-Adenosin-Desaminase, hergestellt von Enzon Pharmaceuticals Inc., USA) ist seit über 20 Jahren auf dem Markt (Cheng et al. 2007, Sigma-Tau Pharmaceuticals 2011, Locatelli und Franchini 2012). Durch PEGylierung kann die schnelle Erkennung als "Fremdstoff" durch das Immunsystem gehemmt werden und der schnelle Abbau z.B. durch Proteasen geschützt werden. PEGylierte Produkte können so länger im Körper verweilen und es kann die therapeutische Wirkung am Bestimmungsort länger und effizienter entfalten werden. PEG ist außerdem hydrophil, nicht toxisch und nicht immunogen (Abuchowski et al. 1977, Fee 2003, Becker 2012). Das PLGA-PEG-Blockcopolymer ist ein aufstrebendes System, weil es leicht synthetisiert werden kann und es alle guten Eigenschaften von PLGA und PEG besitzt. Auch für NP-Augentropfen ist so eines der vielversprechendsten Systeme für die NP-Wirkstoffbeladung und für die Anwendungen der in-vivo Medikamentenabgabe entstanden (Cheng et al. 2007, Locatelli und Franchini 2012).

Für die medizinische Anwendung von NP sind weiterhin Cyclodextrine untersucht worden. Diese konnten erstmals vor mehr als 100 Jahren beim Abbau von Stärke isoliert werden (Villiers 1891), bevor sie im Laufe der Zeit eine Substanzklasse aus zyklischen Makromolekülen darstellten, die aus mehreren verknüpften Glukoseeinheiten aufgebaut sind (Freudenberg und Cramer 1948). Cyclodextrine haben im Inneren aufgrund glykosidischen Bindungen und Methingruppen einen lipophilen Charakter und können unter anderem durch Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen lipophile Moleküle aufnehmen. Nach Außen weisen sie aufgrund der Hydroxygruppen einen polaren Charakter auf (Franz und Alban 1999). Ohira et al. randomisierten in ihrer Studie 22 Augen von 22 Patienten mit diabetischem Makulaödem und behandelten sie topisch mit 1,5 prozentigen Dexamethason- γ -Cyclodextrin-NP-Augentropfen (DexNP-Augentropfen) zunächst 3x/Tag, dann 2x/Tag und schließlich 1x/Tag jeweils vier Wochen lang oder mit einer Injektion von 20 mg Triamcinolonacetonid. Die Studienteilnehmer wurden zu Beginn der Studie und 4, 8, 12 und 16 Wochen danach untersucht. Sie belegten anhand dieser Studie, dass bei Anwendung von topischen DexNP-Augentropfen eine durch die Augenerkrankung verminderte Sehschärfe deutlich verbessert wird und die Netzhautdicke bei Patienten mit diabetischem Makulaödem verringert wird. Beide Effekte sind bei Triamcinolonacetonid ähnlich. Bei den topischen DexNP-Augentropfen wird der Augeninnendruck moderat erhöht. Nach dem Absetzen dieser Behandlung normalisiert sich der Augeninnendruck jedoch wieder. Bei Triamcinolonacetonid ist es zu keinem Zeitpunkt zu einer Erhöhung des Augeninnendrucks gekommen (Ohira et al. 2015).

Auch Liposome können als Transportsystem für Arzneistoffe verwendet werden. Aufgrund ihrer amphiphilen Natur sind Liposome sowohl in der Lage in ihrem Kern hydrophile Medikamente zu umhüllen als auch im Kern ihrer hydrophoben Vesikelmembran lipophile Stoffe aufzunehmen. Sie dienen somit als Vehikel für hydrophile bzw. lipophile Arzneistoffe. Liposome, deren Hauptkomponenten Bestandteile der Membran von Säugetierzellen sind (Phospholipide und Cholesterol) (Poeggel 2009), sind durch eine normale Metabolisierung und durch eine geringe Toxizität und Immunogenität gekennzeichnet, sodass sie

biokompatibel sind (Gregoriadis und Buckland 1973). Liposomale Augentropfen werden heute bei der Behandlung von trockenen Augen angewendet. Dabei ist speziell die Lipidschicht des Tränenfilms gestört. Die Applikation von Phospholipiden in Form liposomaler Augentropfen stellt dabei eine gute Therapieform dar (Lee et al. 2004). Die Liposome gelangen über die Lidränder in das Auge, werden in den Lipidfilm eingebaut und stabilisieren so den Tränenfilm. Ein Beispiel ist LipoNit (Optima Medical Swiss AG 2016). In Zukunft kann durch eine Kombination von liposomalen Augentropfen und solchen, welche Hyaluronsäure oder vergleichbare Substanzen als Tränenersatzflüssigkeiten enthalten, die Behandlung von trockenen Augen stattfinden (Lee et al. 2004).

4.2 NP – als nicht schädliche Materie

Allgemein kann man NP verschieden differenzieren. Durch ihre künstliche Herstellung können sie mit speziellen Eigenschaften und Funktionen versehen werden. Das breite Nutzspektrum hat einen schnellen Anstieg in der Herstellung und Anwendung der verschiedenen Arten von NP zur Folge. Es gibt unter anderem kohlenstoffhaltige NP (z.B. Fullerene, Nanoröhrchen, Carbon black), Metalloxide (z.B. Titandioxid), Halbleiter (z.B. Silizium) und Metalle (z.B. Gold) (Umweltbundesamt 2006). Sie finden Anwendung in der Lebensmittelindustrie (Amini et al. 2014, Weber 2010), bei Materialien im Haushalt (z.B. bei Sonnencremes), in der Medizin, in der Elektrotechnik und in der Waffenindustrie. Die Verwendung von NP in der Medizin ist bis heute sehr umstritten (Umweltbundesamt 2006). NP dienen als Vehikel für Wirkstoffe. Sie können beispielsweise zum zielgerichteten Transport von Medikamenten im Körper dienen (Peer et al. 2007). Einige NP (z.B. Siliziumdioxid-NP) können in Zellkerne des Körpers eindringen und hier funktionelle Störungen hervorrufen. Außerdem ist umstritten, ob sie in geringen Konzentrationen als Zellgift (toxisch) wirken und ob sie aufgrund ihrer geringen Größe von vielen Zellen im Körper aufgenommen werden und sich so durch den gesamten Körper bewegen können. Durch einige NP kann es zu Zell- und Organschäden kommen, da sie in Geweben und Organen Radikale bilden können (Umweltbundesamt 2006).

Trotz der allgemein umstrittenen Verwendung von NP zeigte sich, dass das Hornhautepithel nicht weniger intakt ist, wenn Augen mit NP appliziert werden. Binden NP an das Hornhautepithel, ist es meist sogar intakter, als wenn keine NP appliziert und gebunden werden. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um Schweine- oder Rattenaugen handelt (vgl. Abbildung 16 A, B, C). In dieser Arbeit werden DNA-NP verwendet. Da es sich bei DNA um körpereigenes Material handelt, ist es nicht toxisch.

4.3 Ädherenz von DNA-NP

Wurden die DNA-NP appliziert, werden die Aufnahme und die DAPI-Fluoreszenzstärke bei enukleierten Schweine- bzw. Rattenaugen mit längerer Inkubationszeit signifikant höher. Bei den Rattenaugen aus in-vivo Versuchen nimmt sie mit Abnahme der Wartezeiten signifikant zu. Innerhalb der enukleierten Schweineaugen, der enukleierten Rattenaugen bzw. der Rattenaugen aus in-vivo Versuchen ist das Hornhautepithel bei NP-Applikation ähnlich intakt. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Intaktheit des Hornhautepithels und der Fluoreszenzstärke kann nicht festgestellt werden (vgl. Abbildung 17 A, B, C). Es bedarf mehrere und weitere Untersuchungen, um dies zu klären. Bei Schweineaugen kann die höchste Fluoreszenzstärke gemessen werden. Die Fluoreszenzstärken bei Ratten sind signifikant geringer als bei den Schweineaugen (vgl. Abbildung 17 D). Dies kann daran liegen, dass das Hornhautepithel der Ratten signifikant intakter ist, als das der Schweine (vgl. Abbildung 16 D). Durch die geringere Intaktheit der Schweineaugen können vermutlich mehr NP am Hornhautepithel binden.

Ein Vergleich der Fluoreszenzstärken zeigt Tabelle 1 und wird im Folgenden diskutiert. Es wird sofort deutlich, dass bei allen ex-vivo Versuchen die Fluoreszenzstärken der NP höher sind als bei den in-vivo Versuchen. Auch auf dies wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen. Außerdem wird zwar auch das Erhitzen des Auges aufgeführt, dies dient jedoch nicht zur Verbesserung der Wirkstoffaufnahme, sondern lediglich darum, eine möglich temperaturabhängige Aufnahmekinetik zu bestimmen (vgl. 4.5).

Tabelle 1: Vergleich der höchsten gemessenen Fluoreszenzstärken bei NP-Applikation mit den unterschiedlichen Anwendungen (Spalte 1). Spalte 2 gibt die fluoreszierende Fläche der NP in Prozent (%) an, bezogen auf die Gesamtfläche der jeweiligen zur Auswertung herangezogenen Bilder.

Ex-vivo Ratte, Neomycin B Hitzestress 40 °C 20 min, NPs bei 37 °C	7,1 %
Schwein, 30 min	6,0 %
Ex-vivo Ratte, Hitzestress 60 °C 30 s NPs bei 37 °C	4,9 %
Ex-vivo Ratte, Hitzestress 60 °C 45 s NPs bei RT	4,3 %
Ex-vivo Ratte, ACC/BAC 100/0,1 mg/ml	3,4 %
Ex-vivo Ratte, 30 min	2,6 %
In-vivo Ratte, 5 min	1,9 %
In-vivo Ratte, Neomycin B 5 min	0,14%
In-vivo Ratte, Kanamycin 5 min	0,07%
In-vivo Ratte, ACC/BAC	0,0%

4.4 Einflussfaktor ACC bzw. BAC

Das ACC wirkt aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften lokal entzündungshemmend. Es wirkt außerdem mukolytisch und reinigend (Akyol-Salman et al. 2010, Ungemach 2006). Durch die Antikollagenasewirkung von ACC kann die zerstörende Wirkung der Corneakollagenase, wie sie bei ophthalmologischen Erkrankungen, wie z. B. bei der ulzerativen Keratitis und Keratokonjunktivitis sicca vorkommt, gehemmt werden. Die Kollagenaseaktivität wird gehemmt, indem die freie SH-Gruppe des ACC die Disulfidbindungen des Enzyms direkt spaltet und indem die freien Kalzium- und Zinkionen, die für die enzymatische Kollagenaseaktivität wichtig sind, durch ACC cheliiert werden (Akyol-Salman et al. 2010).

BAC dient als Konservierungsmittel in Augentropfen. Wegen möglichen Schäden sollten mit BAC konservierte Augentropfen nicht sehr lange und nur unter ärztlicher Betreuung angewendet werden (Baudouin 2008, Stiftung Warentest 2015). Werden Epithelzellen in der Cornea bzw. in der Konjunktiva des Menschen ausschließlich mit BAC behandelt, so zeigt sich im Vergleich zu Zellen, die mit PBS oder alternativen Konservierungsmitteln behandelt werden, eine reduzierte Zelllebensfähigkeit, eine erhöhte Apoptose und einen oxidativen Stress-Marker (Ammar et al. 2010). Außerdem kann BAC die Stabilität des Tränenfilms verringern und bei einer längeren Anwendung ein trockenes Auge verursachen. Es kann die tieferen Zellschichten in der Hornhaut angreifen und

diese eventuell ausdünnen, was zu Hornhautschäden führen kann (Baudouin 2008, Stiftung Warentest 2015).

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob die Hornhaut durch ACC bzw. BAC permeabler wurde, woraus eine verbesserte NP-Aufnahme resultieren könnte. Wenn ACC, BAC, bzw. ACC und BAC in unterschiedlichen Konzentrationen zu den unbeladenen DNA-NP hinzugegeben wurden, binden nie NP an das Hornhautepithel von Rattenaugen aus in-vivo Versuchen (vgl. Abbildung 23). Vermutlich ist dies durch äußere Gegebenheiten wie den Lidschlag oder den Tränenfilm in Kombination von ACC bzw. BAC begründet. Oikawa et al. zeigten außerdem in einer Studie, dass ACC Verbindungen von Desoxyribose (Zucker) und Phosphatsäureresten (Phoshat) im DNA-Strang (Zucker-Phosphat-Rückgrat) trennen kann und eine Basenmodifikation verursachen kann, v.a. Thymin und Guanin werden modifiziert. ACC kann H_2O_2 erzeugen und anschließend die zelluläre und isolierte DNA oxidativ schädigen (Oikawa et al. 1999). Da die verwendeten NP aus einer Korona von einzelsträngiger DNA bestehen, können DNA-NP vermutlich unter diesen Mechanismen aufgelöst werden. Bei den enukleierten Rattenaugen binden die DNA-NP immer an das Hornhautepithel. Äußere Gegebenheiten (Lidschlag oder Tränenfilm) wie bei Rattenaugen aus in-vivo Versuchen können hier keine Rolle spielen. Innerhalb der enukleierten Rattenaugen können mit NP-Applikation und mit ACC und BAC signifikant höhere Fluoreszenzstärken gemessen werden. Wurden die unbeladenen DNA-NP mit bzw. ohne ACC und BAC verglichen, ist die Fluoreszenzstärke bei den NP mit ACC/BAC-Kombination signifikant höher (vgl. Abbildung 20). Es ist zu einer Aufnahmeerhöhung der NP gekommen. Die Aufnahmeerhöhung kann nicht darin begründet sein, dass ACC und BAC Schäden am Hornhautepithel verursacht haben könnten, wodurch NP besser binden könnten. Alle Hornhautepithelien (mit und ohne BAC) weisen nämlich ähnliche Intaktheiten auf (vgl. Abbildung 19). Für die Aufnahmeerhöhung ist vermutlich eine Veränderung auf molekularer Ebene ursächlich. Jedoch um sicher zu sein, dass keine Zellen durch ACC bzw. BAC abgestorben sind, müsste man dies im TUNNEL näher untersuchen.

4.5 Einflussfaktor Hitzestress

Bevor die DNA-NP den Augen appliziert wurden, wurden die Augen in den Kühlschrank gestellt, frisch enukleiert oder in Wasser erwärmt. Durch diese Stressoren werden mehr unbeladene DNA-NP an das Hornhautepithel gebunden. Die Fluoreszenzstärke nimmt mit der Wassertemperatur, in der die Augen erwärmt werden, signifikant zu. Werden die Augen in 60 °C warmem Wasser erwärmt, nimmt die Fluoreszenzstärke nochmals signifikant zu (vgl. Abbildung 26 A), die Intaktheit des Hornhautepithels nimmt jedoch auch signifikant ab (vgl. Abbildung 25). Die signifikant höhere NP-Aufnahme kann dadurch begründet sein, dass mit Temperaturzunahme des Wassers das Hornhautepithel beschädigt wird, wodurch letztendlich mehr NP binden können. Yarmolenko et al. haben bereits zusammenfassend dargestellt, dass jedes normale Gewebe thermisch beschädigt werden kann (Yarmolenko et al. 2011). Jedes Gewebe reagiert sensitiv auf Hitze. So kann auch das Hornhautepithel durch Hitze beschädigt werden. Wurden die Augen bei 37 °C statt bei RT inkubiert, werden ebenfalls signifikant mehr NP gebunden (vgl. Abbildung 26 C). Bei höheren Temperaturen ist der Stoffwechsel höher. Die NP-Aufnahme ist vermutlich stoffwechselabhängig, da mehr NP bei 37 °C statt bei RT am Hornhautepithel binden konnten.

Diese Temperaturversuche dienten nur dazu, um eine möglich temperaturabhängige Aufnahmekinetik näher zu bestimmen. Selbstverständlich mit dem Wissen, dass ein solcher Ansatz klinisch nicht praktikabel wäre. Das Erhitzen des Auges ist kein therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Wirkstoffaufnahme.

4.6 Vergleich der Antibiotika – Kanamycin und Neomycin B

Sowohl Kanamycin als auch Neomycin B sind Arzneimittel, die antibiotisch wirken und aus der Gruppe der Aminoglykoside-Antibiotika stammen. Da sie bakterizid wirken, wird z.B. Kanamycin in Form von Augentropfen zur Behandlung von bakteriellen Augeninfektionen angewendet (Begg und Barclay 1995).

Neomycin B wird in der Regel nicht in Form von Augentropfen angewandt, da der Wirkstoff zu Kontaktallergien führen kann (Ansari und Onyema 2008).

Die Antibiotika, Neomycin B und Kanamycin, wurden über Aptamere an NP gebunden (Antibiotika-Aptamer-NP). Die Antibiotika-Aptamer-NP wurden dann Rattenaugen aus in-vivo Versuchen appliziert. Die mit Neomycin B beladenen NP binden mindestens zwei Stunden an das Hornhautepithel (vgl. Abbildung 29). Mit Kanamycin beladene NP binden mindestens 30 Minuten (vgl. Abbildung 32). Danach sind keine NP mehr nachweisbar. Schnichels et al. und de Vries et al. zeigten bereits, dass ungebundene Antibiotika bereits nach fünf Minuten nicht mehr nachweisbar sind. Sie wiesen bereits die an NP gebundenen Antibiotika durch einen MIC-Test („minimal inhibitory concentration test“) nach. Weiterhin konnten sie zeigen, dass die NP über natürliche Mechanismen (DNAsen) abgebaut werden. Eine Testung der Effektivität auf ex-vivo Augen zeigte außerdem, dass Antibiotika-NP das Bakteriumwachstum von E. coli zehn Mal länger signifikant behindert als die ungebundenen Antibiotika (Schnichels et al. 2013, de Vries et al. 2013, Schnichels et al. 2015a).

Bei enukleierten Rattenaugen wurde ebenfalls die Adhesion der Antibiotika evaluiert, jedoch zusätzlich mit Anwendung von Hitzestress. Bevor die Antibiotika-Aptamer-NP appliziert wurden, wurden die Augen für 20 Minuten in 40 °C warmen Wasser erwärmt. Auch an NP gebundene Aptamere ohne Antibiotika (Aptamer-NP) wurden so appliziert. In beiden Fällen binden signifikant mehr NP an das Hornhautepithel, als wenn unbeladene NP (ohne Antibiotika) mit derselben Vorbehandlung appliziert werden (vgl. Abbildung 35). Die Aptamere können die Intaktheit des Hornhautepithels nicht verringert haben, damit die NP-Aufnahme erleichtert bzw. verbessert wird, da bei allen Behandlungsparametern das Hornhautepithel gleich intakt ist (vgl. Abbildung 34). Sowohl die Aptamere als auch die an den Aptameren gebundenen Antibiotika müssen eine positive Wirkung auf die Bindung der NP an das Hornhautepithel haben.

Werden bei den Antibiotika-Aptamer-NP die in-vivo Versuche mit den ex-vivo Versuchen verglichen, wird deutlich, dass die Fluoreszenzintensitäten bei den in-vivo Versuchen deutlich geringer sind, vgl. Abbildung 29 Neomycin B-NP in-vivo

Ratte 0,1 % \pm 0,3 und Abbildung 32 Kanamycin-NP in-vivo Ratte 0,07 % \pm 0,1 mit Abbildung 35 Hitzestress 40 °C 20 min Neomycin B-NP ex-vivo Ratte bei 37 °C 7,1 % \pm 0,8 und Hitzestress 40 °C 20 min Kanamycin-NP ex-vivo Ratte bei 37 °C 6,5 % \pm 1,3. Auch hier kann dies (wie bei 4.4.) bei den in-vivo Versuchen durch äußere Gegebenheiten wie beispielsweise den Lidschlag begründet sein. Zusätzlich muss hier jedoch auch berücksichtigt werden, dass bei den ex-vivo Versuchen Hitzestress verwendet wurde, wodurch ebenfalls mehr NP aufgenommen worden sind und die Fluoreszenzstärke damit höher war.

4.7 Corneaaufbau – Mucin-1, Galektin-3, ZO-1

Im folgenden Versuchskomplex sollte die Bindungsstelle der unbeladenen NP gezeigt werden. Es sollte gezeigt werden, ob nach Anwendung der verschiedenen Versuchsreihen (ACC, BAC bzw. Hitzestress) die NP unterschiedlich binden. Dafür hat man die Proteine Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1 am Hornhautepithel sichtbar gemacht. Außerdem sollte die Lokalisation von Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1 am Hornhautepithel bestimmt werden.

Epithelzellen bilden die Epithelschicht und werden durch sogenannte *Tight junctions* zusammengehalten, welche einen kontinuierlichen Ring um die gesamte Zelle bilden (Guzman-Aranguez und Argueso 2010, Bäuml 2008). *Tight junction*-assoziierte Proteine liegen auf der cytoplasmatischen Seite und gewähren durch die Transmembranproteinbindung und den Cytoskelettkontakt die Verankerung der *Tight junction*. Hierzu zählt unter anderem das Zonula Occludens Protein ZO-1. Über der Epithelschicht befindet sich das Protein Mucin-1, das membranbeständig bzw. membranverankert ist und so in die Zellmembran der Corneaepithelzellen fest eingebaut ist (Guzman-Aranguez und Argueso 2010, Perez-Vilar und Hill 1999, Eule 2007). Galektin-3 ist ein Protein in der Glycocalyx zwischen dem membranverankerten Mucin-1 lokalisiert (Guzman-Aranguez und Argueso 2010, Liu, F. T. und Rabinovich 2005, Hahn 2011). Daraus lässt sich schließen, dass Mucin-1 und Galektin-3 in einer Ebene liegen müssten. Als *Tight junction*-assoziiertes Protein müsste ZO-1 in der Cornea weiter innen liegen zwischen den einzelnen Epithelzellen.

Laut der oben genannten Literatur würden wir am Auge eine klare Abgrenzung zwischen den Proteinen Mucin-1/Galektin-3 und ZO-1 sehen. Für uns sieht es so aus, dass die Lokalisation von Mucin-1, Galektin-3 und ZO-1 am Hornhautepithel dieselbe ist (vgl. Abbildung 36, 38, 40). Als Bestandteile der Epithelschicht besäße Mucin-1, Galektin-3 und ZO-1 damit dieselbe Ausdehnung und würden sich überlagern. Wir haben jedoch keine hohe Auflösung an unserem Mikroskop. Außerdem wissen wir, dass sie auf zellulärer Basis unterschiedlich sind. Die NP binden innerhalb von den Bereichen der Proteine. ACC, BAC und Hitzstress haben darauf keinen Einfluss (vgl. Abbildung 37, 39, 41). Aufgrund methodischer Limitationen hat uns der Versuch nicht weitergebracht. Die Lokalisation mit der hier angewandten Methode konnte nicht differenziert werden.

4.8 Gewebeversuche mit Schweinen statt mit Ratten – der Nutzen von Schlachthoftieren

Für die Forschung spielen experimentelle Studien auf der Basis von Tiermodellen eine wesentliche Rolle. Neben in-vivo Versuchen, die vor allem bei Ratten durchgeführt werden, werden alternativ ex-vivo Versuche angewendet. In dieser Arbeit wurden die Versuche sowohl anhand in-vivo als auch an ex-vivo Tieren durchgeführt. Ein Vergleich zwischen in- und ex-vivo Versuchen zeigt, dass es zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann. Diese wurden in Abschnitt 4.3, 4.4 und 4.6 erläutert. Die ex-vivo Versuche basieren vor allem auf Schweinen, welche Schlachthoftiere sind und für die Forschung von Schlachthöfen bereitgestellt werden. Ein wichtiger Faktor ist, dass Schweineaugen den humanen Augen viel ähnlicher sind. Die Anatomie, der Gefäßverlauf und der Photorezeptoraufbau ist den humanen Augen sehr ähnlich (Guduric-Fuchs et al. 2009). Rattenaugen haben im Vergleich zu humanen Augen keine Fovea centralis und einen anderen Gefäßverlauf (Steck 2014). Wesentlicher Vorteil von diesen ex-vivo Versuchen gegenüber Versuchen am lebenden Tier sind die geringeren Kosten. Außerdem bieten sie ethische Vorteile. Es werden Augen von Tieren verwendet, welche für die Herstellung von Lebensmitteln getötet werden. Die Augen würden ungenutzt entsorgt werden, da sie für die

Lebensmittelherstellung nicht genutzt werden können. Die Tiere werden so nicht nur für Forschungsversuche getötet. Des Weiteren sind Schweineaugen verhältnismäßig groß, was die Durchführung der Versuche erleichtert. Rattenaugen sind sehr viel kleiner. Wesentlicher Nachteil von ex-vivo Schweineaugen ist die Entnahme der Augen. Die Schweine werden abgebrüht und dadurch werden auch die Augen mechanisch beansprucht. Außerdem können die Augen unterschiedlich alt sein, da sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen werden. Der Gewebeerhalt kann so sehr unterschiedlich sein. Die Versuchsparameter sind dementsprechend nicht immer konstant. Bei Schweineaugen von Schlachthöfen können außerdem keine in-vivo Versuche durchgeführt werden.

4.9 Ausblick

In der gesamten Arbeit wird deutlich, dass es bei DNA-NP als Medikamententräger weiteren Forschungsbedarf gibt. Es sollte die Bindung von NP am Hornhautepithel verbessert werden. Um dies zu ermöglichen, sollte z. B. die Bindung von NP an Mucine verbessert werden. Keine Option wäre es, die Epithelschicht menschlicher Augen durch Hitze zu zerstören, damit die NP-Aufnahme erhöht wird. Bei häufigem Tropfen würde das Epithel irreversibel zerstört werden. Trotzdem haben wir die NP-Applikation in Verbindung mit Hitzestress getestet, um herauszufinden, ob verschiedene Temperaturen Einfluss auf die NP-Aufnahme haben. Sie ist erhöht, wenn Aptamere an die NP gebunden werden. So könnten zunächst im Zellversuch Corneaepithelzellen mit Mucinaptamere inkubiert werden. Zur Markierung kann ein fluoreszierender Farbstoff kovalent gebunden werden. Dasselbe kann mit Mucinaptameren, die an NP gebunden werden, durchgeführt werden. Durch eine DAPI-Färbung kann nachgewiesen werden, in wieweit die Mucinaptamere an die Corneaepithelzellen binden. Wenn gezeigt werden kann, dass eine Bindung an die Corneaepithelzellen stattgefunden hat, können Mucinaptamere gebunden an NP auf Schweine-/Rattenaugen appliziert werden. Es kann getestet werden, ob die NP-Aufnahme sowie die daran gekoppelte Medikamentenaufnahme durch Anwendung von Mucinaptameren verbessert bzw. signifikant erhöht werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Aufnahme von DNA-Nanopartikeln (NP) untersucht werden. Die NP sind ein neu entwickeltes Medikamententrägersystem für Vorderabschnittserkrankungen des Auges. Ziel dieser Arbeit war es, die Menge und die damit verbundene Effektivität der Aufnahme von Medikamenten, die in das Auge gelangen, zu steigern. Dies wurde anhand enukleierter Schweine- und Rattenaugen und Rattenaugen aus in-vivo Versuchen untersucht. Parallel dazu wurden die Augen untereinander verglichen. Es sollte gezeigt werden, dass bei Anwendung von NP keine geringere Intaktheit des Hornhautepithels zu befürchten ist. Weiterhin galt herauszufinden, ob sich die Aufnahme der NP mit möglicher Veränderung der Intaktheit des Hornhautepithels beeinflussen lässt. Einflussfaktoren waren N-acetylcystein (ACC), Benzalkoniumchlorid (BAC) und Hitzestress. Außerdem wurden Antibiotika über Aptamere an NP gebunden und mit und ohne Anwendung von Hitzestress appliziert und getestet. Bei Anwendung von NP wurde die Intaktheit des Hornhautepithels nicht geringer. Das Hornhautepithel der Ratten war signifikant intakter als bei Schweinen. Wurden Augen in 60 °C warmem Wasser erwärmt, nahm die Aufnahme signifikant zu und die Intaktheit des Hornhautepithels signifikant ab. Diese Temperaturversuche dienten nur dazu, die Aufnahmekinetik näher zu untersuchen, wohlwissend, dass ein solcher Ansatz klinisch nicht praktikabel wäre. Antibiotika-Aptamer-NP zeigten in Verbindung mit Hitzestress die höchste NP-Aufnahme. So mussten Aptamere und Hitze eine positive Wirkung auf die NP-Aufnahme haben. Weiterhin sollte die Bindungsstelle der unbeladenen NP gezeigt werden. Dafür hat man die Proteine Mucin-1, Galektin-3 bzw. ZO-1 sichtbar gemacht. Nahezu alle NP banden innerhalb der Lokalisation dieser Proteine. Die Lokalisation der Proteine war am Hornhautepithel dieselbe, differenziert werden konnte sie aufgrund methodischer Limitationen nicht.

6 Literaturverzeichnis

- Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T. und Davis, F. F. (1977): Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J Biol Chem.* 252(11): S. 3582-6.
- Akyol-Salman, I., Azizi, S., Mumcu, U. und Baykal, O. (2010): Efficacy of topical N-acetylcysteine in the treatment of meibomian gland dysfunction. *J Ocul Pharmacol Ther.* 26(4): S. 329-33.
- Amini, S. M., Gilaki, M. und Karchani, M. (2014): Safety of nanotechnology in food industries. *Electron Physician.* 6(4): S. 962-8.
- Ammar, D. A., Noecker, R. J. und Kahook, M. Y. (2010): Effects of benzalkonium chloride-preserved, polyquad-preserved, and sofZia-preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells. *Adv Ther.* 27(11): S. 837-45.
- Anderson, J. M. und Van Itallie, C. M. (2009): Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(2): S. a002584.
- Ansari, I. A. und Onyema, E. (2008): Severe generalised hypersensitivity reaction to topical neomycin after cataract surgery: a case report. *J Mead Case Rep.* 2: S. 57.
- Atto-Tec (2015): Atto 488, [online]. - Atto-Tec Fluorescent Labels and Dyes. URL: http://www.attotec.com/attotecshop/product_info.php?info=p99_atto-488.html [Zugriff: 19.03.2015].
- Augustin, A. J. und Collins, J. F. (2001a): Hornhaut, In: A. J. Augustin und J. F. Collins (Hrsg.): *Augenheilkunde, 2.*, Springer-Verlag GmbH & Co. KG Berlin, S. 225-254.
- Augustin, A. J. und Collins, J. F. (2001b): Tränenwege, In: A. J. Augustin und J. F. Collins (Hrsg.): *Augenheilkunde, 2.*, Springer-Verlag GmbH & Co. KG Berlin, S. 193-202.
- Bannwarth, H., Kremer, B. P. und Schulz, A. (2013): kovalente Bindung: Atom- oder Elektronenpaarbindung, In: H. Bannwarth, B. P. Kremer und A. Schulz (Hrsg.): *Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie: Vom Atom bis zur Atmung - für Biologen, Mediziner und Pharmazeuten, 3.*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 202-210.
- Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K. und et al. (1994): Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell.* 76(4): S. 597-8.
- Baudouin, C. (2008): Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmol.* 86(7): S. 716-26.
- Bäumli, G. (2008): Interaktion des humanen Tight Junction Proteins ZO-1 mit dem Ras-Effektor AF6 und Untersuchungen am Zellwandprotein Aga2 von *Saccharomyces cerevisiae* [online]. - Universitätsbibliothek Regensburg, Dissertation. URL: <http://epub.uni-regensburg.de/10738> URN: urn:nbn:de:bvb:355-opus-9680: [Zugriff: 15.03.2016].

- Becker, R. (2012): PEGylierung, In: D. Fischer und J. Breitenbach (Hrsg.): Die Pharmaindustrie, 4., Springer Verlag Berlin Heidelberg S. 141-143.
- Begg, E. J. und Barclay, M. L. (1995): Aminoglycosides--50 years on. *Br J Clin Pharmacol.* 39(6): S. 597-603.
- Brewer, C. F., Miceli, M. C. und Baum, L. G. (2002): Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 12(5): S. 616-23.
- Bristow, D., Haynes, J. D., Sylvester, R., Frith, C. D. und Rees, G. (2005): Blinking suppresses the neural response to unchanging retinal stimulation. *Curr Biol.* 15(14): S. 1296-300.
- Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F. X., Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A. F., Langer, R. und Farokhzad, O. C. (2007): Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials.* 28(5): S. 869-76.
- Cooper, D. N. (2002): Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta.* 1572(2-3): S. 209-31.
- Cummings, R. D. und Liu, F. T. (2009): Galectins, In: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart und M. E. Etzler (Hrsg.): *Essentials of Glycobiology*, 2nd. Cold Spring Harbor (NY).
- de Vries, J. W., Schnichels, S., Strudel, L., Hofmann, J., Bartz-Schmidt, K. U., Herrmann, A. und Spitzer, M. (2013): Enhanced antibiotic delivery through DNA-based nanoparticles *Ophthalmologie Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft DOG 2013 Abstracts zum 111. DOG-Kongress* [online]. - *Ophthalmologie 2015* 113. DOG-Kongress, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. URL: http://download.springer.com/static/pdf/750/art%253A10.1007%252Fs00347-013-2942-7.pdf?auth66=1426760164_74541c8189530587aa7cab145af2aceb&ext=.pdf URN: 10.1007/s00347-013-2942-7.
- Dianova (2015a): Cyanin Farbstoffe, [online]. - Dianova. URL: <http://www.dianova.com/service/hilfe-faq/informationen-zu-fluoreszenzfarbstoffen-und-konjugaten/fluoreszenzfarbstoffe/> [Zugriff: 19.03.2015].
- Dianova (2015b): FITC, [online]. - Dianova. URL: <http://www.dianova.com/service/hilfe-faq/informationen-zu-fluoreszenzfarbstoffen-und-konjugaten/fluoreszenzfarbstoffe/> [Zugriff: 19.03.2015].
- Dua, H. S., Faraj, L. A., Said, D. G., Gray, T. und Lowe, J. (2013): Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology.* 120(9): S. 1778-85.
- Ellington, A. D. und Szostak, J. W. (1990): In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 346(6287): S. 818-22.
- Eule, C. (2007): *kleintier.konkret 10: Der Tränenfilm - Überlebensfaktor für das Auge* [online]. - Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG Stuttgart URL: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2007-967142> URN: 10.1055/s-2007-967142: [Zugriff: 12.03.2016].

- Fee, C. J. (2003): Size-exclusion reaction chromatography (SERC): a new technique for protein PEGylation. *Biotechnol Bioeng.* 82(2): S. 200-6.
- Franz, G. und Alban, S. (1999): Cyclodextrine, In: R. Hänsel, O. Sticher und E. Steinegger (Hrsg.): *Pharmakognosie-Phytopharmazie*, 6., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 337-339.
- Freudenberg, K. und Cramer, F. (1948): Die Konstitution der Schardinger-Dextrine α , β und γ *Zeitschrift für Naturforschung* *Contens Volume 3b* [online]. - URL: http://zfn.mpg.de/data/Reihe_B/3/ZNB-1948-3b-0457.pdf [Zugriff: 14.03.2016].
- Gregoriadis, G. und Buckland, R. A. (1973): Enzyme-containing liposomes alleviate a model for storage disease. *Nature.* 244(5412): S. 170-2.
- Grehn, F. (2011): Bindehaut, In: F. Grehn (Hrsg.): *Augenheilkunde*, 31., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 87-108.
- Guduric-Fuchs, J., Ringland, L. J., Gu, P., Dellett, M., Archer, D. B. und Cogliati, T. (2009): Immunohistochemical study of pig retinal development. *Mol Vis.* 15: S. 1915-28.
- Guzman-Aranguez, A. und Argueso, P. (2010): Structure and biological roles of mucin-type O-glycans at the ocular surface. *Ocul Surf.* 8(1): S. 8-17.
- Hahn, M. (2011): Galectin-3 und seine Bedeutung bei der Stromareaktion von Tumoren [online]. - Universitätsbibliothek Regensburg, Dissertation. URL: <http://epub.uni-regensburg.de/24266> URN: urn:nbn:de:bvb:355-epub-242663: [Zugriff: 12.03.2015].
- Hanisch, F. G. und Muller, S. (2000): MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology.* 10(5): S. 439-49.
- Herrmann, A., De Vries, J. W., Spitzer, M. S. und Schnichels, S. O. (2015): Means and methods for ocular drug delivery [online]. - Patentscope WIPO. URL: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2015041520&recNum=1&maxRec=&office=&prevFilter=&sortOption=&queryString=&tab=PCT+Biblio> Pub. No.: WO/2015/041520 International Application No.: PCT/NL2014/050634 [Zugriff: 21.03.2016].
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Kitani-Yasuda, T., Tsukita, S. und Tsukita, S. (1993): The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol.* 121(3): S. 491-502.
- Kirsch, J. (2010a): Auge - Sehorgan, In: G. Aumüller, G. Aust, A. Doll, J. Engele, J. Kirsch, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spanel-Borowski, W. Wolff, L. J. Wurzinger und H.-G. Zilch (Hrsg.): *Duale Reihe Anatomie*, 2., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 952-976.
- Kirsch, J. (2010b): Bulbus oculi, In: G. Aumüller, G. Aust, A. Doll, J. Engele, J. Kirsch, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spanel-Borowski, W. Wolff, L. J. Wurzinger und H.-G. Zilch (Hrsg.): *Duale Reihe Anatomie*, 2., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 962.
- Kirsch, J. (2010c): Gerstenkorn, Hagelkorn, In: G. Aumüller, G. Aust, A. Doll, J. Engele, J. Kirsch, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spanel-Borowski, W. Wolff, L. J. Wurzinger und

- H.-G. Zilch (Hrsg.): Duale Reihe Anatomie, 2., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 958.
- Kirsch, J. (2010d): Tränenapparat, In: G. Aumüller, G. Aust, A. Doll, J. Engele, J. Kirsch, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spaniel-Borowski, W. Wolff, L. J. Wurzinger und H.-G. Zilch (Hrsg.): Duale Reihe Anatomie, 2., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 959-961.
- Lahm, H., Andre, S., Hoefflich, A., Kaltner, H., Siebert, H. C., Sordat, B., von der Lieth, C. W., Wolf, E. und Gabius, H. J. (2004): Tumor galectinology: insights into the complex network of a family of endogenous lectins. *Glycoconj J.* 20(4): S. 227-38.
- Lee, S., Dausch, S., Maierhofer, G. und Dausch, D. (2004): [A new therapy concept for the treatment of dry eye--the usefulness of phospholipid liposomes]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 221(10): S. 825-36.
- Liu, F. T. und Rabinovich, G. A. (2005): Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 5(1): S. 29-41.
- Liu, S., Jones, L. und Gu, F. X. (2012): Nanomaterials for ocular drug delivery. *Macromol Biosci.* 12(5): S. 608-20.
- Locatelli, E. und Franchini, M. C. (2012): Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system [online]. - Springer Netherlands. URL: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11051-012-1316-4#page-1> URN: 10.1007/s11051-012-1316-4: [Zugriff: 12.03.2016].
- Lüllmann-Rauch, R. (2009a): Auge, In: R. Lüllmann-Rauch (Hrsg.): Tachenlehrbuch Histologie, 3., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 572-598.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009b): PAS-Färbung, In: R. Lüllmann-Rauch (Hrsg.): Tachenlehrbuch Histologie, 3., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 602.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009c): Prinzip der histologischen Standardfärbungen, In: R. Lüllmann-Rauch (Hrsg.): Tachenlehrbuch Histologie, 3., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 600-601.
- Miederer, S. E. (1986): The gastric mucosal barrier. *Hepatogastroenterology.* 33(2): S. 88-91.
- Miederer, S. E. und Stadelmann, O. (1971): [Physiology and physiopathology of gastric secretion]. *Med Klin.* 66(47): S. 1587-93.
- Miyoshi, J. und Takai, Y. (2005): Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev.* 57(6): S. 815-55.
- Noll, S. und Schaub-Kuhnen, S. (2000a): Primärantikörper, In: H. Höfler und K.-M. Müller (Hrsg.): Praxis der Immunhistochemie, 1., Urban und Fischer München, S. 60-65.
- Noll, S. und Schaub-Kuhnen, S. (2000b): Sekundärantikörper, In: H. Höfler und K.-M. Müller (Hrsg.): Praxis der Immunhistochemie, 1., Urban und Fischer München, S. 66-68.
- Noll, S. und Schaub-Kuhnen, S. (2000c): Was versteht man unter Antikörper, polyklonale Antikörper, monoklonale Antikörper, Reaktionsmuster bei Antikörper für die Immunhistochemie, Nachweismethoden, Immunhistochemie an Gefrierschnitten, Immunhistochemie an bereits gefärbten Präparaten, Immunfluoreszenz, kompetitive Hemmung,

- Verstärkungsmethoden In: H. Höfler und K.-M. Müller (Hrsg.): Praxis der Immunhistochemie, 1., Urban und Fischer München, S. 1-19, 90-111.
- Ohira, A., Hara, K., Johannesson, G., Tanito, M., Asgrimsdottir, G. M., Lund, S. H., Loftsson, T. und Stefansson, E. (2015): Topical dexamethasone gamma-cyclodextrin nanoparticle eye drops increase visual acuity and decrease macular thickness in diabetic macular oedema. *Acta Ophthalmol.* 93(7): S. 610-5.
- Oikawa, S., Yamada, K., Yamashita, N., Tada-Oikawa, S. und Kawanishi, S. (1999): N-acetylcysteine, a cancer chemopreventive agent, causes oxidative damage to cellular and isolated DNA. *Carcinogenesis.* 20(8): S. 1485-90.
- Optima Medical Swiss AG (2016): LipoNit Augentropfen, [online]. - URL: http://www.liponit.de/images/microsites/liponit/liponit_augentropfen01_gi.pdf [Zugriff: 14.03.2016].
- Paschen, H., Coenen, C., Fleischer, T., Grünwald, R., Oertel, D. und Revermann, C (2004): Nanotechnologie – Forschung, Entwicklung, Anwendung, 2., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, S. 1-326.
- Peer, D., Karp, J. M., S., Hong, C., Farokhzad O., Margalit, R. und R., Langer (2007): Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy 2 [online]. - *Nature Nanotechnology.* URL: <http://www.nature.com/nnano/journal/v2/n12/abs/nnano.2007.387.html> URN: 10.1038/nnano.2007.387: [Zugriff: 20.03.2016].
- Perez-Vilar, J. und Hill, R. L. (1999): The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem.* 274(45): S. 31751-4.
- Perillo, N. L., Marcus, M. E. und Baum, L. G. (1998): Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med (Berl).* 76(6): S. 402-12.
- Poeggel, G. (2009): Proteine, Zytoplasmamembran, In: G. Poeggel (Hrsg.): *Biologie*, 2., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 9, 16-25.
- Rawas-Qalaji, M. und Williams, C. A. (2012): Advances in ocular drug delivery. *Curr Eye Res.* 37(5): S. 345-56.
- Rhodes, J. M. (1997): Mucins and inflammatory bowel disease. *QJM.* 90(2): S. 79-82.
- Sachsenweger, M. (2003a): Glaukom, In: M. Sachsenweger (Hrsg.): *Duale Reihe Augenheilkunde*, 2., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 213-238.
- Sachsenweger, M. (2003b): Infektiöse Keratitis, Nichtinfektiöse Keratitis, In: M. Sachsenweger (Hrsg.): *Duale Reihe Augenheilkunde*, 2., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 114-128.
- Sachsenweger, M. (2003c): Konjunktivitis, In: M. Sachsenweger (Hrsg.): *Duale Reihe Augenheilkunde*, 2., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 78-94.
- Sachsenweger, M. (2003d): Lidrandentzündung, Lidrüsenentzündung, In: M. Sachsenweger (Hrsg.): *Duale Reihe Augenheilkunde*, 2., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 25-28.
- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I. und Bootman, M. D. (2014): Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014(10): S. pdb top071795.
- Schnichels, S., de Vries, J. W. , Strudel, L., Kwak, M., Hofmann, J., Bartz-Schmidt, K. U., Spitzer, M. und Herrmann, A. (2013): A new class of

- nanoparticles as potential drug carriers for the treatment of anterior eye segment diseases Ophthalmologe Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft DOG 2013 Abstracts zum 111. DOG-Kongress [online]. - Ophthalmologe 2015 113. DOG-Kongress, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. URL: http://download.springer.com/static/pdf/750/art%253A10.1007%252Fs00347-013-2942-7.pdf?auth66=1426760164_74541c8189530587aa7cab145af2aceb&ext=.pdf URN: 10.1007/s00347-013-2942-7.
- Schnichels, S., Gruszka, A., Hurst, J., Dammeier, S., Strudel, L., Bartz-Schmidt, K. U., Herrmann, A., Spitzer, M. S. und de Vries, J. W. (2015a): Quantitative and safety evaluation of topical antibiotic delivery using lipid-DNA nanoparticles Ophthalmologe Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft DOG 2015 Abstracts zum 113. DOG-Kongress 112 [online]. - Ophthalmologe 2015 113. DOG-Kongress, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. URL: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00347-015-0116-5#page-1> URN: 10.1007/s00347-015-0116-5: [Zugriff: 19.03.2016].
- Schnichels, S., Spitzer, M. S. und De Vries, J. W. (2015b): Nanopartikel machen Augentropfen wirksamer, [online]. - Gesundheitsindustrie BW, BIOPRO Baden-Württemberg GmbH. URL: <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/de/fachbeitrag/aktuell/nanopartikel-machen-augentropfen-wirksamer/> [Zugriff: 13.04.2016].
- Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc. (2011): Adagen, [online]. - Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc. URL: <http://adagen.com> [Zugriff: 17.03.2016].
- Steck, J. (2014): Netzhautgefäßpathologien in einem Rattenmodell für periventrikuläre Leukomalazie : ein neues Modell für die Frühgeborenenretinopathie beim Menschen? [online]. - Justus-Liebig-Universität Gießen. URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2014/10923/> URN: urn:nbn:de:hebis:26-opus-109234: [Zugriff: 20.03.2016].
- Stevenson, B. R. und Keon, B. H. (1998): The tight junction: morphology to molecules. Annu Rev Cell Dev Biol. 14: S. 89-109.
- Stiftung Warentest (2015): Konservierungsmittel in Augentropfen und Nasensprays oder -tropfen, [online]. - Stiftung Warentest.de. URL: https://www.test.de/medikamente/selbstmedikation/allergien/allergie/allergie/konservierungsmittel_augentropfen/ [Zugriff: 19.03.2015].
- Umweltbundesamt (2006): Chancen und Risiken für Mensch und Umwelt, [online]. - Umweltbundesamt für Mensch und Umwelt. URL: http://www.bubw.de/PDF_Dateien/News/2006/09_September/nanotechnik.pdf [Zugriff: 13.03.2016].
- Ungemach, F. R. (2006): Mukolytika, In: W. Löscher, F. R. Ungemach und R. Kroker (Hrsg.): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, 4., Parey Berlin S. 178-185.
- Universitäts-Augenklinik Tübingen (2008): Anatomie und Funktion der Hornhaut, [online]. - Universitäts-Augenklinik Tübingen. URL: <http://www.medizin.uni-tuebingen.de/uktmedia/Einrichtungen/Kliniken/Augenklinik/Augenheilkun>

- de+l/Bild_Archiv/Hornhautsprechstunde/hh_1_425-width-396-height-552.jpg [Zugriff: 17.03.2015].
- Villiers, A. (1891): Gärung der Stärke durch das Buttersäureferment Chemisches Zentralblatt [online]. - URL: <http://archive.org/stream/chemischeszentr01chemgoog#page/n862/mode/2up> [Zugriff: 14.03.2016].
- Weber, H. (2010): Nanotechnologie - Überblick und aktuelle Entwicklungen, Nanomaterialien in Lebensmitteln aus Sicht der Risikobewertung, In: H. Weber (Hrsg.): Nanotechnologie in der Lebensmittelindustrie: Zum Kenntnisstand nanoskaliger Wirkstoffcarrier in Lebensmitteln und Verpackungsmaterialien, 1., Behr's Verlag GmbH & Co. KG Berlin, S. 1-22.
- Wilson, W. D., Tanious, F. A., Barton, H. J., Jones, R. L., Fox, K., Wydra, R. L. und Streckowski, L. (1990): DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry*. 29(36): S. 8452-61.
- Yarmolenko, P. S., Moon, E. J., Landon, C., Manzoor, A., Hochman, D. W., Vigiante, B. L. und Dewhirst, M. W. (2011): Thresholds for thermal damage to normal tissues: an update. *Int J Hyperthermia*. 27(4): S. 320-43.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Ich, Aileen Breitschwerdt, erkläre hiermit, die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „DNA – Nanopartikel als Medikamententräger für Vorderabschnittserkrankungen des Auges – Optimierung der Adhäsion“ verfasst zu haben und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet zu haben.

Die Ergebnisse folgender Versuche habe ich von den genannten Mitarbeitern des Breuningerbaus und der Augenklinik der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt bekommen:

Prof. Dr. M. Spitzer und Dr. S. Schnichels überließen mir das Thema, halfen bei der Konzeption und betreuten die Arbeit.

Ich erkläre hiermit, dass ich alle Daten, Ergebnisse und Bilder eigenständig erarbeitet und angefertigt habe. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Die Arbeit habe ich selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt. Die verwendeten Quellen und Hilfsmittel sind im Literaturverzeichnis vollständig aufgeführt. Ich versichere alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen übernommen wurde.

Tübingen, den 05.07.2016


(Unterschrift)

IV Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. med. Karl-Ulrich Bartz-Schmidt für die Bereitstellung der Mittel.

Herrn Prof. Dr. med. Martin Spitzer für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die Hilfsbereitschaft, die ich während der ganzen Zeit erfahren durfte.

Herrn Dr. rer. nat. Sven Schnichels für seine erstklassige Betreuung, sein Engagement und seine Hilfsbereitschaft. Er hat mich in das wissenschaftliche Denken eingeführt, mir methodisch und technisch viel beigebracht und sich sehr für meine Arbeit engagiert. Ohne seine Omnipräsenz wäre die ganze Arbeit nicht so gut geworden und hätte mit Sicherheit auch nicht so viel Spaß gemacht.

Herrn Ph. D. Jan Willem de Vries für die Mitbetreuung der Arbeit und die Unterstützung in meiner praktischen Arbeit im Labor.

Bei allen Beschäftigten des Breuningerbaus, vor allem Johanna Hofmann und Dr. rer. nat. José Hurst, die bei Fragen jederzeit geholfen haben.

Meinen Eltern, die mir meine wundervolle Kindheit, mein Studium und meine Promotion ermöglichten und mir viel Kraft und Liebe gaben.

Ein besonderer Dank geht an meine Schwester Anke und meinen Schwager Jürgen, die mich immer wieder neu motiviert haben.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Nichte Emily bedanken, die mich mit Ihrem Lächeln und Ihrer wundervollen Art immer neu motiviert hat.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Freund Julius für den Rückhalt in schwierigen Situationen und für seine Unterstützung bedanken.