

Universitäts-Augenklinik Tübingen

AG Schnichels

***Supercharged unfolded proteins* als periokuläre  
Medikamententräger**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Seiz, Chiara Anna

Promotionsjahr

2024

Dekan: Prof. Dr. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Dr. rer. nat. Sven Schnichels

2. Berichterstatter: Professor Dr. Wilhelm K. Aicher

Tag der Disputation: 06.06.2024

## **Widmung**

Mein besonderer Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie für die kontinuierliche Unterstützung und Motivation.

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Abbildungsverzeichnis.....                                               | V         |
| Tabellenverzeichnis.....                                                 | VII       |
| <b>1. Einleitung.....</b>                                                | <b>1</b>  |
| 1.1 Die Hornhaut.....                                                    | 1         |
| 1.1.1 Anatomie und Morphologie der Hornhaut.....                         | 2         |
| 1.1.2 Die Tränendrüse und der Tränenfilm .....                           | 3         |
| 1.1.3 Das trockene Auge.....                                             | 4         |
| 1.1.4 Verabreichung von Arzneimitteln am Auge .....                      | 5         |
| 1.1.5 <i>Supercharged unfolded polypeptides</i> (SUPs).....              | 8         |
| 1.2 Ziel der Arbeit .....                                                | 12        |
| <b>2. Material und Methoden .....</b>                                    | <b>13</b> |
| 2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....                            | 13        |
| 2.2 Geräte und Software .....                                            | 14        |
| 2.3 Lösungen.....                                                        | 15        |
| 2.3.1 TBS-Puffer.....                                                    | 15        |
| 2.3.2 PFA (4 %).....                                                     | 15        |
| 2.3.3 Permeabilisierungslösung.....                                      | 15        |
| 2.4 Partikel.....                                                        | 16        |
| 2.4.1 Herstellung der Polypeptide.....                                   | 16        |
| 2.5 Lokalisation der SUPs in den Augenstrukturen mittels Histologie..... | 16        |
| 2.5.1 Vorbereitung der Augen.....                                        | 16        |
| 2.5.2 <i>Ex vivo</i> -Behandlung .....                                   | 17        |
| 2.5.3 <i>In vivo</i> -Behandlung.....                                    | 19        |
| 2.5.4 Kryoschnitte.....                                                  | 19        |
| 2.5.5 DAPI-Färbung.....                                                  | 20        |
| 2.5.6 Immunofluoreszenz.....                                             | 20        |
| 2.5.7 HE-Färbung .....                                                   | 22        |
| 2.5.8 PAS-Färbung.....                                                   | 22        |
| 2.5.9 TUNEL-Färbung.....                                                 | 23        |
| 2.5.10 Untersuchung der Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop.....         | 23        |
| 2.6 Fluorophotometer .....                                               | 24        |

|                                                                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7 <i>In vitro</i> -Tests .....                                                                                                    | 27        |
| 2.7.1 Epithelzellen der Hornhaut.....                                                                                               | 27        |
| 2.7.2 MIO-M1-Zellen.....                                                                                                            | 29        |
| 2.7.3 Isolation und Kultivierung von porcinen Müllerzellen.....                                                                     | 29        |
| 2.8 Phasenkontrastmikroskopie .....                                                                                                 | 29        |
| 2.9 Adhäsion von SUPs an Zellen .....                                                                                               | 30        |
| <b>3. Ergebnisse.....</b>                                                                                                           | <b>31</b> |
| 3.1 Adhäsionsprüfung der SUPs an <i>ex vivo</i> Schweineaugen .....                                                                 | 31        |
| 3.1.1 K36-GFP kann über 48 h in Schweineaugen nachgewiesen werden.....                                                              | 31        |
| 3.2 Die Fluorophotometer-Analyse ergab keinen Unterschied zwischen K36-GFP und K72-GFP hinsichtlich Adhäsion und Eindringtiefe..... | 37        |
| 3.3 Sowohl K72-GFP als auch K36-GFP sind in der Muzinschicht lokalisiert .....                                                      | 44        |
| 3.4 K36-GFP haftet an der Hornhaut von <i>ex vivo</i> Kaninchenaugen.....                                                           | 46        |
| 3.5 Adhäsion der positiven SUPs auf der murinen Hornhaut <i>in vivo</i> .....                                                       | 48        |
| 3.5.1 Bestätigung der Lokalisierung von K36-GFP in der murinen Muzinschicht .....                                                   | 53        |
| 3.6 Zelluläre Adhäsion von SUPs in drei verschiedenen Zelllinien .....                                                              | 54        |
| 3.7 SUPs zeigen eine sehr gute Biokompatibilität .....                                                                              | 57        |
| 3.7.1 Keine zellulären morphologischen Auffälligkeiten nach SUP Behandlung.....                                                     | 57        |
| 3.7.2 Ungestörte zelluläre Integrität nach SUP-Behandlung .....                                                                     | 59        |
| 3.7.3 Keine erhöhte Apoptose durch SUP-Behandlung .....                                                                             | 62        |
| <b>4. Diskussion .....</b>                                                                                                          | <b>66</b> |
| 4.2 Zelluläre Aufnahme .....                                                                                                        | 68        |
| 4.3 Biokompatibilität .....                                                                                                         | 69        |
| 4.4 Aktuelle Therapie des trockenen Auges .....                                                                                     | 70        |
| 4.5 Vergleich verschiedener okulärer Arzneimittelabgabesysteme .....                                                                | 72        |
| 4.6 Weitere Studien und Ausblick .....                                                                                              | 76        |
| <b>5. Zusammenfassung.....</b>                                                                                                      | <b>77</b> |
| <b>6. Literaturverzeichnis .....</b>                                                                                                | <b>77</b> |
| <b>7. Erklärung zum Eigenanteil .....</b>                                                                                           | <b>78</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1 Anatomie der Hornhaut und des Tränenfilms .....                                                                                                        | 1  |
| Abbildung 2 Aufbau des Hornhautepithels mit seiner Glykokalyx und dem Tränenfilm. ....                                                                             | 4  |
| Abbildung 3 Vereinfachte schematische Darstellung der verwendeten <i>supercharged unfolded Proteins</i> (SUPs) K36, K72 und E36.....                               | 9  |
| Abbildung 4 Wechselwirkung der überladenen ungefalteten Proteine K36 und K72 mit Speichelkonditionierungsfilmen.....                                               | 11 |
| Abbildung 5 Behandlung der <i>ex vivo</i> Schweineaugen .....                                                                                                      | 18 |
| Abbildung 6 Repräsentatives Bild einer Schweinehornhaut eines nativen <i>ex vivo</i> Schweineauges. ....                                                           | 24 |
| Abbildung 7 Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme von isolierten Epithelzellen vom Schwein. Links in 200x Vergrößerung und rechts in 400x Vergrößerung. .... | 28 |
| Abbildung 8 K36-GFP und K72-GFP haften mind. 1 h an porciner Hornhaut mit Methanolfixierung. ....                                                                  | 32 |
| Abbildung 9 K36-GFP haftet 48 h an porciner Hornhaut mit Methanolfixierung.....                                                                                    | 33 |
| Abbildung 10 K36-GFP und K72-GFP haften mind. 1 h an porciner Hornhaut mit PFA-Fixierung .....                                                                     | 34 |
| Abbildung 11 K36-GFP haftet 48 h an porciner Hornhaut mit PFA-Fixierung .....                                                                                      | 35 |
| Abbildung 12 Keine intraokuläre Penetration von K36-GFP und K72-GFP.....                                                                                           | 38 |
| Abbildung 13 K36-GFP ist auf dem <i>ex vivo</i> Schweineauge mit dem Fluorophotometer 48 h lang nachweisbar. ....                                                  | 39 |
| Abbildung 14 K72-GFP ist auf dem <i>ex vivo</i> Schweineauge mit dem Fluorophotometer für 48 h nachweisbar.....                                                    | 40 |
| Abbildung 15 Im Fluorophotometer wurde keine langanhaltende Adhäsion von GFP auf <i>ex vivo</i> Schweineaugen beobachtet.....                                      | 41 |
| Abbildung 16 Die fluorophotometrische Untersuchung ergibt keine anhaltende Adhäsion von E36-GFP auf Schweineaugen.....                                             | 42 |
| Abbildung 17 Die Fluorophotometeranalyse ergab eine signifikante Adhäsion von K36-GFP und K72-GFP an der Hornhaut von Schweineaugen. ....                          | 43 |
| Abbildung 18 K36-GFP und K72-GFP adhärieren in der Muzinschicht.....                                                                                               | 45 |
| Abbildung 19 K36-GFP haftet mindestens 30 Minuten lang am Hornhautepithel von Kaninchen (mit Methanolfixierung).....                                               | 46 |
| Abbildung 20 K36-GFP haftet mindestens 30 Minuten lang am Hornhautepithel von Kaninchen (mit PFA-Fixierung). ....                                                  | 47 |

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 21 K36-GFP und K72-GFP zeigen Adhärenz auf <i>in vivo</i> Rattenäugen.....                               | 49 |
| Abbildung 22 K36-GFP ist nach 4 h in <i>in vivo</i> Rattenäugen nachweisbar. ....                                  | 50 |
| Abbildung 23 K72-GFP ist nach 2 h bei <i>in vivo</i> Rattenäugen nachweisbar. ....                                 | 51 |
| Abbildung 24 K36-GFP haftet bei <i>in vivo</i> Rattenäugen in der Mucinschicht. ....                               | 53 |
| Abbildung 25 Positiv geladene SUPs zeigen Adhäsion an Zellen. ....                                                 | 55 |
| Abbildung 26 Regelmäßige Morphologie in HE-Färbung nach SUP-Behandlung von<br>Schweineäugen.....                   | 58 |
| Abbildung 27 Unveränderte Morphologie in HE-Färbung nach SUP-Behandlung von<br>Rattenäugen.....                    | 59 |
| Abbildung 28 Intakte Zellintegrität nach PAS-Färbung von <i>ex vivo</i> Schweineäugen nach<br>SUP-Behandlung.....  | 60 |
| Abbildung 29 Ungestörte Zellintegrität nach PAS-Färbung von <i>in vivo</i> Rattenäugen nach<br>SUP-Behandlung..... | 61 |
| Abbildung 30 Keine erhöhte Apoptoserate nach SUP-Applikation auf <i>ex vivo</i> Schweineäugen.<br>.....            | 63 |
| Abbildung 31 Keine erhöhte Apoptoserate nach SUP-Applikation auf <i>in vivo</i> Rattenäugen.                       | 64 |
| Abbildung 32 Mucin-Nanopartikel haften an porcinem Hornhautepithel .....                                           | 75 |

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1 Übersicht über die einzelnen molaren Massen der verwendeten SUPs .....                                                              | 16 |
| Tabelle 2 Überblick über die Behandlung von <i>ex vivo</i> Schweineaugen bei unterschiedlichen<br>Waschzeiten mit den SUPs. ....              | 18 |
| Tabelle 3 Überblick über die Behandlung von <i>ex vivo</i> Kaninchenaugen bei unterschiedlichen<br>Inkubationszeiten mit den SUPs. ....       | 19 |
| Tabelle 4 Überblick über die Behandlung von Rattenaugen zu verschiedenen<br>Inkubationszeiten mit den SUPs. ....                              | 19 |
| Tabelle 5 Übersicht über die bei den Färbungen verwendeten Antikörper.....                                                                    | 21 |
| Tabelle 6 Zeitplan für die Fluorophotometer-Messungen.....                                                                                    | 26 |
| Tabelle 7 Überblick über die mit 80µM. K36-GFP, E36-GFP, K72-GFP oder GFP-Kontrolle<br>behandelten Hornhautepithelproben von Schweinen. ....  | 36 |
| Tabelle 8 Überblick über die mit 80 µM K36-GFP und GFP-Kontrolle behandelten<br>Hornhautepithelproben von Kaninchen .....                     | 47 |
| Tabelle 9 SUPs haften an <i>in vivo</i> Rattenaugen.....                                                                                      | 52 |
| Tabelle 10 Quantifizierung der mit K36-GFP, E36-GFP, K72-GFP oder GFP-Kontrolle<br>behandelten Zelllinien. ....                               | 56 |
| Tabelle 11 Quantifizierung der TUNEL Färbungen von porcinen und murinen Kryoschnitten<br>welche mit K36-GFP und K72-GFP behandelt wurden..... | 65 |

## Abkürzungsverzeichnis

|            |                                                                          |
|------------|--------------------------------------------------------------------------|
| AB         | Antikörper                                                               |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser                                                     |
| BSA        | Rinderserumalbumin                                                       |
| DAPI       | 4'6-diamidino-2-phenylindol                                              |
| DNA        | Desoxyribonukleinsäure                                                   |
| DPBS       | Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung                              |
| EDTA       | Ethylendiamintetraessigsäure                                             |
| FDA        | Food and Drug Administration                                             |
| FKS/FBS    | Fötales Bovines Serum                                                    |
| h          | Stunden                                                                  |
| HCl        | Salzsäure                                                                |
| min        | Minuten                                                                  |
| MUC        | Muzine                                                                   |
| NaCl       | Natriumchlorid                                                           |
| NP         | Nanopartikel                                                             |
| P/S        | Penicillin/Streptomycin                                                  |
| PBS        | Phosphatgepufferte Saline                                                |
| PFA        | Paraformaldehyd                                                          |
| PLA        | Polylactidsäure                                                          |
| PLGA       | Polylactid-co-Glycolid                                                   |
| RNA        | Ribonukleinsäure                                                         |
| RPE        | Retinales Pigmentepithel                                                 |
| SD         | Standardabweichung                                                       |
| SUP        | <i>Supercharged unfolded protein</i> – überladenes, ungefaltetes Protein |

|           |                                            |
|-----------|--------------------------------------------|
| TAE       | Tris-acetate-EDTA                          |
| TBS       | Trisgepufferte Kochsalzlösung              |
| TBS-T     | Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 |
| Tris base | Tris(hydroxymethyl)aminomethan             |
| µg        | Mikrogramm                                 |
| µL        | Mikroliter                                 |
| µm        | Mikrometer                                 |
| µM        | Mikromolar                                 |

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Hornhaut

Die Hornhaut ist Teil des vorderen Augensegments und spielt eine bedeutende Rolle bei refraktiven Prozessen [1]. Zusammen mit der Sklera bildet sie die äußere Schicht des Auges (*Tunica fibrosa bulbi*). Der *Limbus cornea* bildet die Grenze zwischen Hornhaut und Sklera, bzw. dem Hornhautepithel und der Bindehaut, welche den vorderen Teil der Sklera bedeckt. Er ist mit den Stammzellen für das Hornhautepithel ausgestattet, welche sich insgesamt alle sieben Tage erneuern. Da die *Tunica fibrosa bulbi* das Auge zur Außenwelt hin abgrenzt, ist über sie eine topische Behandlung zahlreicher Augenerkrankungen möglich. Besonders die oberflächlichen Anteile – Hornhautepithel und Bindehaut- tragen zur Bindung und Aufnahme von Medikamenten bei und sind daher hier von großem Interesse [2]. In der vorliegenden Arbeit wird sich hauptsächlich auf den kornealen Weg der topischen Medikation fokussiert.

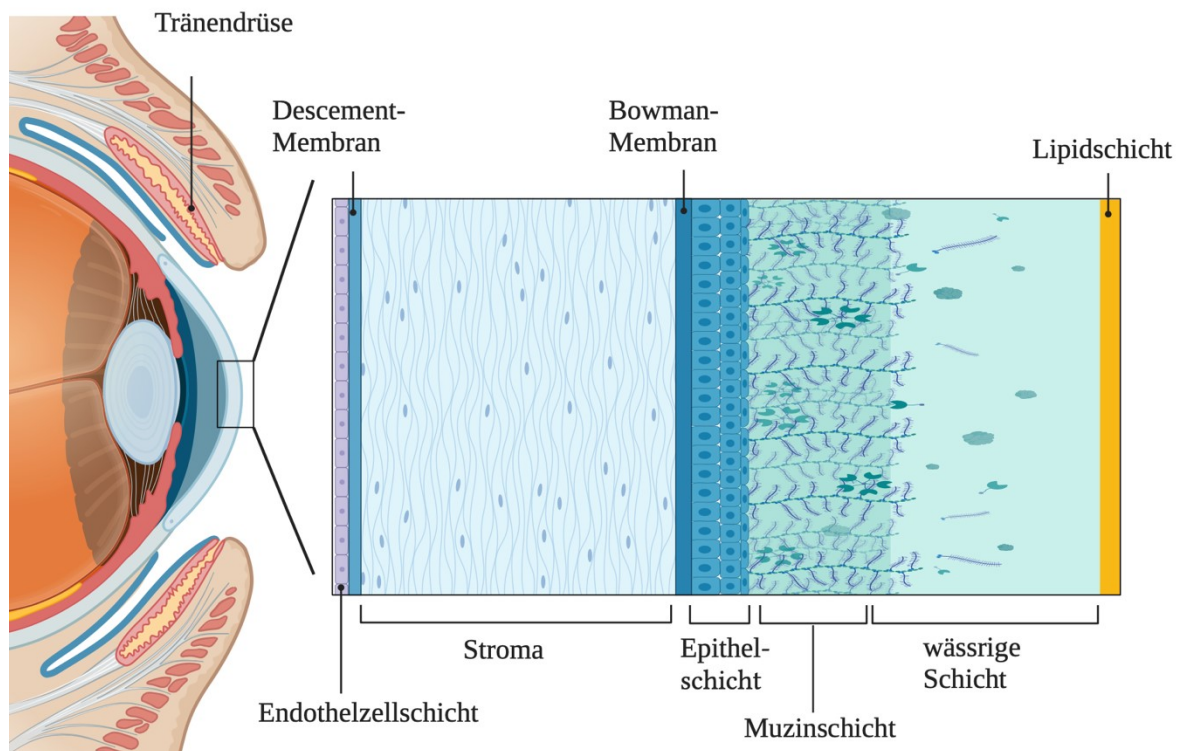


Abbildung 1 Anatomie der Hornhaut und des Tränenfilms

Schematisch dargestellt sind die verschiedenen Schichten der Hornhaut und die des Tränenfilms. Die Hornhaut besteht von außen nach innen aus folgenden Schichten: Epithelschicht, Bowman-Membran, Stroma, Descement-Membran und Endothelzellschicht. Der auf dem Hornhautepithel liegende Tränenfilm besteht aus drei Schichten. Der innere Muzinschicht, welche an die Epitheloberfläche grenzt, der wässrige Zwischenschicht und der Lipidschicht, welche an die Luftoberfläche grenzt. Das Schema wurde mit BioRender.com erstellt, verändert aus: [3].

### 1.1.1 Anatomie und Morphologie der Hornhaut

Die Hornhaut ist lichtdurchlässig, etwa 0,5 mm dick und frei von Gefäßen. Ihr Durchmesser beträgt etwa 10 bis 12 mm. Ihre Struktur gliedert sich in das Epithel, das Stroma und das Endothel. Dazwischen befinden sich die Bowman-Membran und die Descement-Membran (Abbildung 1) [4].

Das Hornhautepithel (*Epithelium anterius*) ist ein sechslagiges unverhorntes Plattenepithel, welches aus dem Oberflächenektoderm hervorgeht. Die Epithelzellen sind über Desmosomen oder Hemidesmosomen, Adhäsionskontakte und *Gap Junctions* miteinander verbunden. Die oberflächlichen Zellen besitzen Mikropliae und sorgen durch *Gap Junctions* für die Diffusionsbarriere des Tränenfilms. Die Oberfläche des Hornhaut- und Bindehautepithels ist ständig mit Tränenfilm bedeckt. Dies ist eine absolute Voraussetzung für die Integrität des Organs. Außerdem ist das Hornhautepithel eines der empfindlichsten Oberflächen des menschlichen Körpers. Es wird durch den *Nervus ophthalmicus* innerviert, welcher ausgehend vom *Limbus corneae* in die Hornhaut einstrahlt.

Die Bowman-Membran verbindet das Epithel mit dem Stroma. Sie ist zellfrei und erscheint unter dem Lichtmikroskop strukturlos und homogen. Im Grunde entspricht sie einer besonders differenzierten der epithelialen Basalmembran.

Das Stroma beansprucht ca. 90 Prozent der Hornhautdicke und besteht zu ca. 80% aus Wasser. Seine Aufgabe ist der Auf- und Abbau der hornhautspezifischen extrazellulären Matrix mit Hilfe von Kollagenfibrillen, Proteoglykane, Wasser und Keratozyten. Den Hauptteil des Stromas bilden lamellenförmig angeordnete Kollagenfibrillen (vor allem Typ I). Zwischen den Lamellen befinden sich zum einen die Keratozyten und zum anderen die Proteoglykane wie Lumican, welche Wasser ziehen. Die limitierte Anzahl von Blutkapillaren und der niedrige Stoffwechsel im Stroma bringt einerseits eine geringe Regenerationsfähigkeit mit sich, andererseits verleiht es der Hornhaut eine immunologische Sonderstellung. Diese Besonderheit hat den Vorteil, dass eine Typisierung bei einer Hornhauttransplantation im Vergleich zu anderen Präparaten in den meisten Fällen nicht erforderlich ist. [2, 5]

An der darunterliegenden Descement-Membran (*Lamina limitans posterior*) haftet das Endothel (*Epithelium posterius*). Es ist eine lückenlose, einschichtige Zellschicht auf der Rückseite der Hornhaut. Durch Iontentransporter kontrolliert sie den Wassergehalt des Stomas und ist somit für die Kornea-Transparenz hauptverantwortlich. [2]

### 1.1.2 Die Tränendrüse und der Tränenfilm

Die Hornhautzellen werden durch den Tränenfilm geschützt, damit sie unter der ständigen Lichteinwirkung keinen Schaden nehmen. Diese biologische Barriere bietet Schutz, ohne die Funktion der Hornhaut zu beeinträchtigen. Der Tränenfilm wird von der Tränendrüse (*Glandula lacrimalis*) gebildet, welche sich unterhalb des seitlichen Oberrandes der knöchernen Augenhöhle befindet. Sie ist eine verzweigte tubuloalveoläre Drüse, deren Endstücke den der Mundspeicheldrüsen ähneln, jedoch ein breites Lumen aufweisen. Ihre Ausführungsgänge münden in den oberen Fornix und sind am Ende mit Zellen ausgestattet, welche die isotopische Tränenflüssigkeit produzieren. Sie sezernieren zudem verschiedene antimikrobielle Substanzen (z. B. Defensine, Lysozym, Lactoferrin), Wachstumsfaktoren (z. B. epidermaler Wachstumsfaktor), IgA und diverse Muzine. [2]

Der Tränenfilm, der die Epithelien von Hornhaut und Bindehaut bedeckt, ist bis zu 40 µm dick. Je nach Lokalisation unterscheidet sich die primäre Funktion des Tränenfilms. Der präokulare Tränenfilm, welcher sich zwischen der Lidspalte und der Hornhaut befindet, ermöglicht das Gleiten des Oberlids. Er ist im Wesentlichen dafür verantwortlich, die freiliegende Hornhaut vor Infektionen zu schützen und sie zu ernähren. Aufgebaut ist der Tränenfilm aus drei Hauptschichten: einer dünnen äußeren Lipidschicht (die von den Meibom-Drüsen produziert wird, um die Verdunstung zu verhindern), einer dicken mittleren wässrigen Schicht und einer inneren Muzinschicht oder Glykokalyx, die am Hornhautepithel haftet (Abbildung 1). [6]

#### 1.1.2.1 Die Muzinschicht

Die Muzinschicht, welche Teil der Glykokalyx ist, enthält zum einen die membrangebundenen Muzine MUC1, MUC4, MUC16 und zum anderen die von der Tränendrüse gebildeten, nicht membrangebundenen Muzine MUC2, MUC5AC. [7] Muzine sind Glykoproteine, die reich an Serin und Threonin sind, an deren Hydroxylgruppen die O-Typ-Glykosylierung des Proteins stattfindet. Der Gesamtzuckergehalt des Proteins beträgt >50 % seines Molekulargewichts. Die hohe Wasserbindungsaffinität der Muzine wird durch diese Polysaccharide ermöglicht, und sie dienen dazu, zentrale Proteine vor enzymatischem Abbau (Proteolyse) oder dem Kontakt mit Säuren zu schützen. [8] Das membrangebundene Muzin MUC1 ist hervorgehoben, da es aufgrund seiner Größe und seiner negativen Ladungen das Anhaften anderer Zellen und Mikroorganismen an den Epithelzellen verhindert. Die Mikrovilli werden von MUC1 überragt und verhindern so ein Erreichen von Bakterien der äußeren Epithelzellmembranen. Es dient also dem Schutz des äußeren Auges. [9] Zudem ist MUC1 ein wichtiger Teil der

Glykokalyx, die die Zellmembran stabilisiert und die Zellen vor mechanischen und chemischen Schäden schützt. Die Glykokalyx selbst ist 300 nm dick und besteht aus membrangebundenem Muzin, das mit Galektin-3, einem Lektin, quervernetzt ist (Abbildung 2). [10] Eine gestörte Integrität der Glykokalyx hat unter anderem ein trockenes Auge zur Folge.

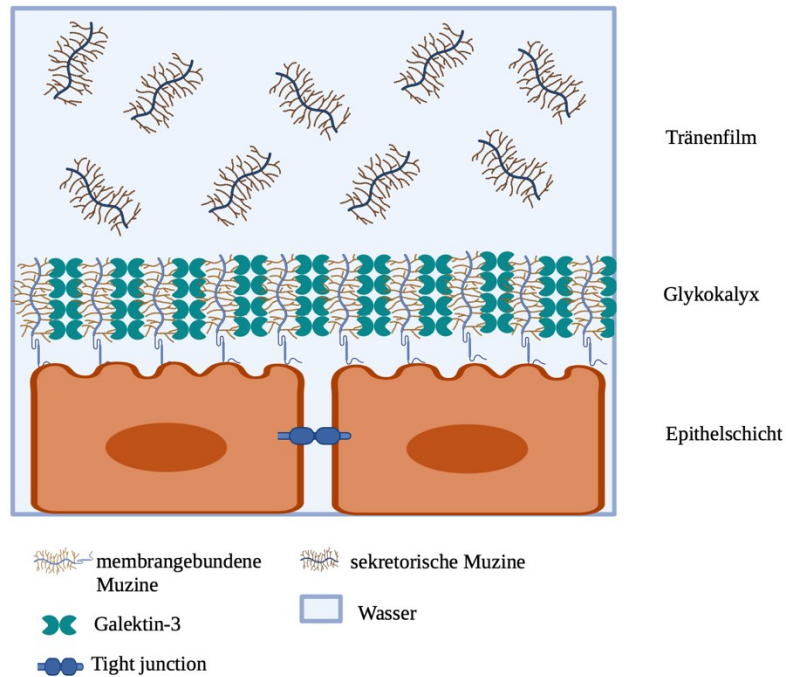


Abbildung 2 Aufbau des Hornhautepithels mit seiner Glykokalyx und dem Tränenfilm

Schematisch dargestellt ist die Hornhautepithelschicht mit der Glykokalyx und dem Tränenfilm. Die Glykokalyx befindet sich zwischen dem Hornhautepithel und dem Tränenfilm. Für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Transmembran-Mucin-Glykane Pentamere mit Galectin-3 bilden. Das Schema wurde mit BioRender.com erstellt, modifiziert aus: [6]

### 1.1.3 Das trockene Auge

Über das Blinzeln und den präkornealen Tränen clearance-Mechanismus wird die Integrität der Hornhaut gewährleistet. Schädliche Substanzen, aber auch Medikamente werden so von der Augenoberfläche entfernt. Probleme in diesem Mechanismus führen zu einem trockenen Auge. Das trockene Auge (*Keratoconjunctivitis sicca*, Sicca-Syndrom) ist eine der häufigsten Diagnosen in der augenärztlichen Praxis. Die Erkrankung ist vor allem mit Benetzungstörungen, Trockenheit, Fremdkörpergefühl und Schädigungen der Augenoberfläche verbunden. Dies führt zu chronischen Reizungen, aber nicht selten auch zu reflexartiger Hypersekretion bis hin zu Sehstörungen. Auf histologischer Ebene äußert sich das Trockene Auge durch eine Zerstörung der Glykokalyx der Hornhaut. [11] Mögliche Folgen

können zunächst eine Schädigung der oberen Epithelschichten mit begleitender Entzündung sein. Später können sich tiefere Epitheldefekte, Keimbesiedlung und schließlich Stromadefekte und Hornhautgeschwüre bilden. Eine Beeinträchtigung der Oberflächenlubrikation des Auges kann entweder auf eine reduzierte Tränenproduktion oder eine gesteigerte Verdunstung des Tränenfilms zurückgeführt werden. Eine Funktionsstörung der Meibom-Drüsen ist die häufigste Ursache des trockenen Auges. Der Tränenfilm verdunstet zu schnell, und es entstehen trockene Stellen. Aber auch bei verminderter Tränensekretion (z. B. Sjögens-Syndrom) oder unzureichendem Lidschluss trocknen die Oberflächen aus und es fehlt die Gleit- und Spülwirkung sowie die antimikrobielle Wirkung des Tränenfilms. Im Verlauf der Erkrankung können sich beide Formen gegenseitig negativ beeinflussen, und es kann sich ein Mischbild entwickeln, bei dem sowohl ein Mangel an Tränenflüssigkeit als auch eine erhöhte Verdunstung durch eine gestörte Lipidphase des Tränenfilms auftreten kann. Dem DEWSII (Dry Eye Workshop II) -Bericht zufolge ist „mäßiges bis schweres trockenes Auge mit erheblichen Schmerzen, Einschränkungen im täglichen Leben, verminderter Vitalität und einem insgesamt schlechteren Gesundheitszustand sowie häufig mit Depressionen verbunden“ [12]. Die Prävalenz des trockenen Auges wird gemäß den Erkenntnissen der KORA-Age Studie ("Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg") für den süddeutschen Raum auf einen Bereich von 15-17% angegeben. [13] Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass abweichende Schätzungen die Spanne von 5% bis 50% der Gesamtbevölkerung umfassen, was auf das Fehlen einer einheitlichen und anerkannten Definition mit konstanten diagnostischen Kriterien für diese Erkrankung zurückzuführen ist. [14] Eine Abhängigkeit der Erkrankung zeigt sich auch nach Alter, ethnischer Zugehörigkeit sowie nach geografischen und klimatischen Einflussfaktoren. [12]

Zur Behandlung des trockenen Auges werden hauptsächlich topische Tränenersatzmittel verwendet. Die Augentropfen müssen in der Regel in einer Frequenz von 1-2 Stunden getropft werden. Diese Tropfhäufigkeit ist für den Patienten oft sehr belastend und im Alltag meist nicht umsetzbar.

#### 1.1.4 Verabreichung von Arzneimitteln am Auge

Neben dem Einsatz topischer Augentropfen gibt es noch weitere Applikationsmethoden für die Verabreichung von Arzneimittel im Auge. Dabei spielen auch die Dosierung, sowie die Verteilung und der Stoffwechsel eine wichtige Rolle. In der Pharmakokinetik wird dies durch das LADME-Prinzip dargestellt. Dieses Akronym setzt sich wie folgt zusammen: das L steht

für die Freisetzung (*Liberation*) des Stoffes, das A für die Resorption (*Absorption*), das D für die Verteilung (*Distribution*), das M für den Metabolismus (*Metabolism*) und das E für die Ausscheidung (*Excretion*) des Arzneimittelstoffs. [15] Diese pharmakokinetischen Prozesse werden in der Literatur meist im Kontext mit systemischen Arzneimitteln, die über die Blutbahn wirken, beschrieben. Die okuläre Pharmakokinetik versucht diese Prinzipien auf das Auge anzuwenden, was aufgrund der Anatomie und der komplexen Physiologie gehäuft Schwierigkeiten aufweist. Darüber hinaus wurden einige Studien auf diesem Gebiet an Labortieren (gehäuft Kaninchen) durchgeführt, die sich in Bezug auf die Pharmakokinetik des Auges oft erheblich vom Menschen unterscheiden. [16] So ist beispielsweise die Kaninchenkornea deutlich dünner als die des Menschen und wird mit zunehmendem Kaninchenalter signifikant undurchlässiger für hydrophile Substanzen. [17] Die drei gängigsten Methoden zur Verabreichung von Arzneimitteln in das Auge sind die systemische Verabreichung von Arzneimitteln über die Blut-Retina-Schranke, die direkte intravitreale Injektion in das Auge und die am häufigsten verwendete topische Verabreichung. [18]

#### 1.1.4.1 Systemische Verabreichung

Medikamente, die entweder oral oder parenteral verabreicht werden, finden in der Augenheilkunde Anwendung, wenn Grundkrankheiten wie *Diabetes mellitus*, Sarkoidose oder andere Autoimmunerkrankungen sich im Auge zeigen. Auch entzündliche Augenerkrankungen, die durch Viren wie die Herpes-simplex-Keratitis oder durch Pilze wie die mykotische Konjunktivitis verursacht werden, werden oft mit geeigneten systemischen Medikamenten behandelt. [19] In den meisten Fällen wird jedoch bei systemischer Anwendung nicht die ausreichende Wirkstoffkonzentration im Auge erreicht. Grund dafür sind einige nahezu undurchdringliche Barrieren, wie beispielsweise die Blut-Retina-Schranke oder auch die Blut-Kammerwasser-Schranke, die verhindern, dass Proteine durch das Gefäßsystem ins Kammerwasser oder in die Hinterkammer des Auges gelangen. Selbst wenn es Arzneimitteln gelingt, diese Schranke zu überwinden, besteht immer noch die Möglichkeit systemischer Nebenwirkungen.

#### 1.1.4.2 Intravitreale chirurgische Medikamentenverabreichung

Bei der chirurgischen Medikamentenverabreichung intravitreal wird das Präparat mithilfe einer feinen Nadel unter lokaler Betäubung direkt in den Glaskörper injiziert. So kommt der Wirkstoff dem Zielgewebe ausreichend nahe, ohne dass systemische Nebenwirkungen

auftreten. Indikationen hierfür sind vor allem die diabetische Retinopathie und die altersbedingte Makuladegeneration. Makulaödeme können ebenfalls durch eine intravitreale Applikation von Dexamethason therapiert werden. [19] Vorteil ist, dass bei der direkten Injektion in den Glaskörper eine sehr niedrige Wirkstoffdosis erforderlich ist. Jedoch ist es ein invasiver Eingriff mit allen damit verbundenen Risiken. Zudem ist für diese Form der Anwendung immer ein Facharzt erforderlich.

#### 1.1.4.3 Topische Medikation

Die topische Verabreichung von Arzneimitteln ist die häufigste Art der Verabreichung von Arzneimitteln am Auge und kann vom Patienten eigenständig vorgenommen werden. Es können zwei Resorptionsmechanismen unterschieden werden. Der nicht-korneale Weg über die Bindehaut, welcher für Medikamente mit schlechter Hornhautdurchlässigkeit, wie Gentamicin, geeignet ist, und der korneale Weg direkt durch die Hornhaut in die vordere Augenkammer. [19] Letzterer wird am häufigsten verwendet. Die Überwindung der Hornhaut stellt für die meisten Arzneimittel ein großes Problem dar. Bei hydrophilen Verbindungen ist das Epithel die Hauptbarriere, da nur sehr kleine hydrophile Moleküle aufgrund der starken *Tight junctions* parazellulär diffundieren können. Lipophile Verbindungen dringen schneller ein, allerdings stellt hierbei das Stroma ein großes Hindernis dar. Die Überwindung aller drei verschiedenen Hornhautschichten erfordert sehr spezifische chemische Eigenschaften für Arzneimittel.

Die Fähigkeit einer Substanz, die Hornhaut zu passieren, hängt von ihrer Molekülgröße und ihrem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (logP-Wert) ab. Der logP-Wert hilft bei der Charakterisierung der hydrophil-lipophilen Eigenschaften des Arzneimittels. Ein logP-Wert größer als eins zeigt an, dass die Substanz besser in fettähnlichen Lösungsmitteln wie n-Octanol löslich ist, während ein logP-Wert kleiner als eins darauf hindeutet, dass sie besser in Wasser löslich ist. Die Haupteinschränkung für die intrakorneale Verabreichung von Arzneimitteln ist das Epithel. Seine Permeabilität beträgt bis zu 90 % für lipophile Substanzen, was einen hohen logP-Wert bedingt, während Makromoleküle (mit einem Radius von mehr als 10 Å) unter anderem aufgrund der *Gap junctions* fast vollständig ausgeschlossen werden. Das hydrophile Stroma ist weniger vom logP, sondern mehr vom Radius der Moleküle abhängig und bietet somit eine große Barriere für lipophile Verbindungen mit geringer Größe (Radius < 10 Å). Die Permeation durch die Endothelschicht hängt sowohl vom logP als auch von der Größe des Moleküls ab. Sie ist für lipophile kleine Moleküle etwas undurchlässiger als das Hornhautstroma. [20]

#### 1.1.4.4 Limitationen der topischen Medikation

Viele infektiöse Erkrankungen der Hornhaut oder Bindehaut, wie z. B. die bakterielle Keratitis, müssen in schwerwiegenden Fällen oftmals stündlich mit antibiotischen Augentropfen behandelt werden. [21] Die Tränenflüssigkeit, der Lidschlag und auch unsachgemäße Anwendung von Augentropfen führen dazu, dass bei geriatrischen Patienten oft keine fünf Prozent des auf die Augenoberfläche aufgetragenen Wirkstoffs ausreichend lange verweilen, um eine therapeutische Wirkung zu entfalten. [22, 23] Der größte Teil der verabreichten Menge wird zudem direkt mit der Tränenflüssigkeit abtransportiert und dann über die Nasenschleimhaut oder den Magen-Darm-Trakt resorbiert. [24]

Die natürlichen Schutzbarrieren auf der Oberfläche des Auges bieten einerseits eine effektive Abwehr gegen bakterielle und virale Erreger, stellen andererseits jedoch ein bedeutendes Hindernis für die meisten lokal angewendeten Therapien in der Augenheilkunde dar. Um Augenerkrankungen wirksam zu behandeln, sind Augenärzte häufig gezwungen, sehr hohe Medikamentendosen zu verordnen. Dies kann jedoch häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie Sehstörungen führen und birgt Risiken, die wiederum die Bereitschaft (*Adhärenz*) der Patienten, die Therapie konsequent zu befolgen, beeinträchtigen. Patienten berichten häufig, dass sie die verordneten Medikamente zum falschen Zeitpunkt oder gar nicht einnehmen, vor allem wenn die Tropfen mehrmals täglich appliziert werden müssen. [25]

Daher besteht ein großes Interesse an periokulären Medikamententrägern, die stark an die Hornhaut binden, was eine geringeren Tropfhäufigkeit zur Folge hat. Zudem würde es zu einer Reduktion der Nebenwirkungen aufgrund der niedrigeren Kumulativdosis kommen. Solche potenziell stark an die Hornhaut haftende periokulären Medikamententräger stellen die *supercharged, unfolded polypeptides* (SUPs) dar, welche im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen.

#### 1.1.5 *Supercharged, unfolded polypeptides* (SUPs)

Ein supercharged, unfolded polypeptide (SUP) ist ein unstrukturiertes supergeladenes Polypeptid, das mindestens eine Nettoladung pro Kilodalton seines Molekulargewichts enthält. [26] SUPs sind technisch über rekombinante Proteinexpression in *Escherichia coli* herzustellen, kommen aber auch in der Natur vor. Die natürlich vorkommenden überladenen unstrukturierten Proteine haben essentielle Funktionen im Organismus. Sie steuern Phasentrennungen, schützen mechanische Eigenschaften und unterstützen die

Kalziumeinlagerung in den Zellen. Durch die Aufladung von Proteinen können deren Eigenschaften wie Temperatur oder katalytische Aktivität verändert werden. SUPs können auch mit künstlichen Einheiten komplexiert werden, um thermotrope oder lyotrope Flüssigkristalle und Flüssigkeiten herzustellen. [27]

In dieser Arbeit werden SUPs verwendet, die ein elastinähnliches Polypeptid (ELP) als Grundsequenz haben, das aus einer sich wiederholenden Pentapeptidsequenz der drei aliphatischen Aminosäuren Glycin (G), Valin (V) und Prolin (P) besteht. Sie können durch die Einführung eines Lysin- oder Glutaminsäurerestes an der zweiten Position der repetitiven Pentapeptidsequenz (GVGVP) positiv oder negativ "überladen" werden. Im Anschluss werden diese polymerisiert (Abbildung 3). Hier wurden folgende positiv geladene Varianten verwendet: K36 (Aminosäuresequenz: GAGP[(GVGVP)(GKGVP) 9] 4 GWPH 6) und K72 (Aminosäuresequenz: GAGP[(GVGVP)(GKGVP) 9] 8 GWPH 6). Somit ist die positive Variante K72 deutlich länger und enthält genau doppelt so viel Lysin wie die K36 Variante. Die negativ geladene Variante E36 hat die Sequenz (VEGEG)<sub>n</sub> (n=36). Alle drei SUPs wurden mit GFP verknüpft, um ihre Position bei den histologischen Untersuchungen leichter bestimmen zu können.

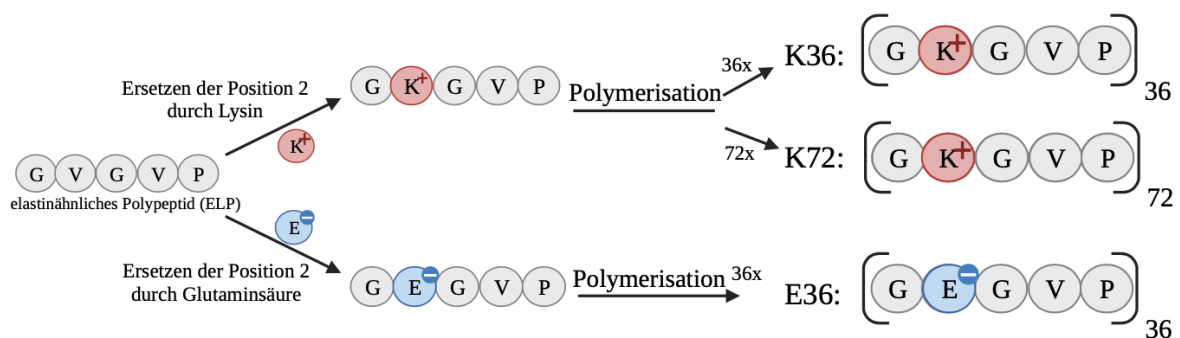


Abbildung 3 Vereinfachte schematische Darstellung der verwendeten supercharged unfolded Proteins (SUPs) K36, K72 und E36

Die neutrale, elastinähnliche Pentasequenz GVGVP, die aus den Aminosäuren Glycin (G), Valin (V) und Prolin (P) besteht, fungiert als Grundsequenz für die Herstellung von sogenannten supergeladenen ungefalteten Proteinen (SUPs). Dabei erfolgt die Substitution der Aminosäure an der zweiten Position (Valin) entweder durch ein Lysin (positiv geladen) oder eine Glutaminsäure (negativ geladen), was zu einer Überladung des Peptids führt. Die Gesamtladung des Peptids wird durch die Anzahl der in der Sequenz vorhandenen Polymere bestimmt. Innerhalb dieser SUPs gibt es drei Hauptvarianten:

1. K36: SUPs, mit 36 Lysin-Aminosäuren und positiver Gesamtladung des Peptids.
2. K72: SUPs, mit 72 Lysin-Aminosäuren und positiver Gesamtladung des Peptids.
3. E36: SUPs, mit 36 Glutaminsäure-Aminosäuren und negativer Gesamtladung des Peptids.

Das Schema wurde mit BioRender.com erstellt.

Die Hypothese der Interaktion basiert auf der elektrostatischen Wechselwirkung der positiv geladenen SUPs mit den negativ geladenen Muzinen der Hornhautoberfläche. *Veeregowda et al.* [27] konnten zeigen, dass kationische SUPs Komplexe mit anionischen Muzinen in der Mundhöhle bilden und so bestehende SCF (Speichelkonditionierungsfilm) stabilisieren. Basierend auf der Rasterkraftmikroskopie (AFM) mit einer Kolloidsonde, der Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) und der Quarzkristallmikrowaage mit Dissipationsüberwachung (QCM-D) wurde das folgende Modell zur Veranschaulichung entwickelt (Abbildung 4). Dieser Ansatz, bei dem die Speichelbestandteile stabilisiert und nicht ersetzt werden, unterscheidet sich grundlegend von der derzeitigen Behandlungsmethode. Das Prinzip sollte auf das Auge übertragbar sein, da die Schmierung (*Lubrikation*) des Auges starke Ähnlichkeiten mit der Schmierung des Mundes aufweist. Demnach ist davon auszugehen, dass die positiv geladenen SUPs am negativ geladenen Tränenfilm haften und diesen stabilisieren. Aufgrund ihrer Länge, der Zusammensetzung ihrer Ladungsdichte und ihrer Aufspaltung in natürlich vorkommende Aminosäuren kann davon ausgegangen werden, dass kaum eine Toxizität vorliegt. [27] *Pesce et al.* fanden mit Hilfe von ATP-Tests eine bemerkenswert geringe Zytotoxizität der hier verwendeten SUPs für A549-Zellen (Ursprung: Adenokarzinom der Lunge). [28]

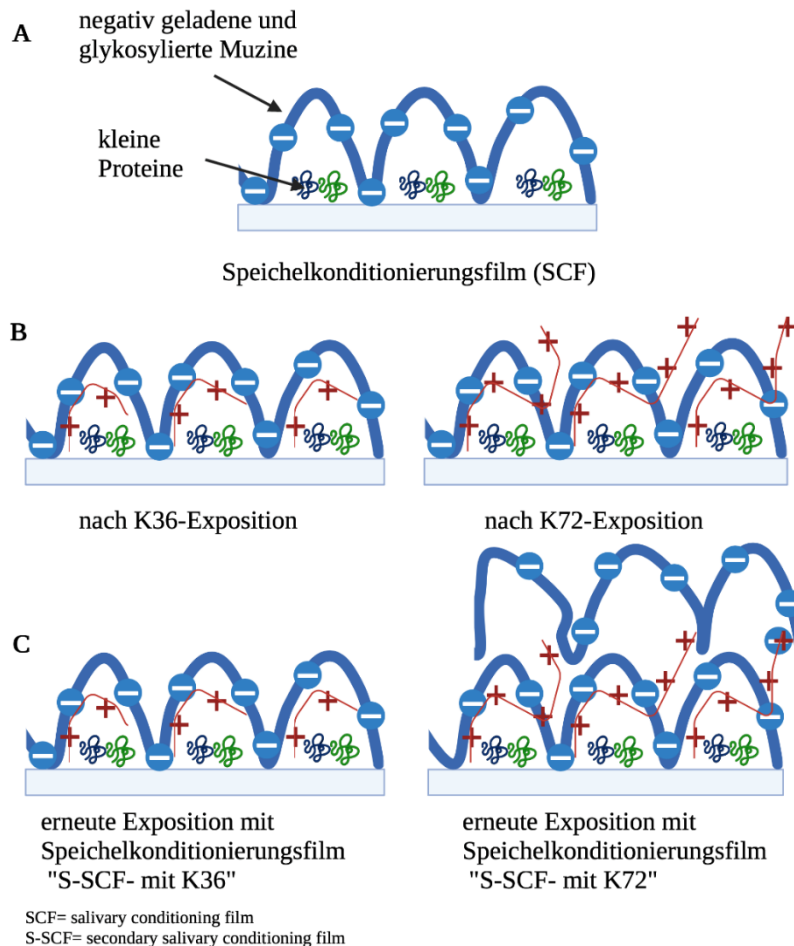


Abbildung 4 Wechselwirkung der überladenen ungefalteten Proteine K36 und K72 mit Speichelkonditionierungsfilmen.

Dargestellt ist die Behandlung von Speichelkonditionierungsfilmen (SCFs) mit verschiedenen positiven Ladungszahlen rekombinanter kationischer SUPs und deren erneute Exposition gegenüber sekundären Speichelkonditionierungsfilmen (S-SCFs). **A** Schematischer Speichelkonditionierungsfilm (SCF) mit negativ geladenen glykosylierten Muzinen in Schleifen über einer Schicht aus niedermolekularen Proteinen. **B** Erstbehandlung des SCF mit K36 (links) und K72 (rechts). Die SUPs interagieren mit den negativ geladenen glykosylierten Muzinen und lassen die glykosylierte Struktur durch elektrostatische Wechselwirkung kollabieren. Bei dem längeren K72 sind nicht alle positiven Ladungen mit den Muzinen verbunden. **C** Erneute Exposition von Speichelkonditionierungsfilmen (SCF), die mit K36 (links) und K72 (rechts) behandelt wurden. Von K36 (links) werden keine Muzine zurückgewonnen, aber die verbleibenden positiven Ladungen von K72 (rechts) rekrutieren glykosylierte Muzine, die eine weiche Muzinschicht über der dichten SCF bilden. Erstellt mit BioRender.com, modifiziert aus: [27]

## 1.2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, *supercharged unfolded polypeptides* (SUPs) hinsichtlich ihrer potenziellen Stabilisation des Tränenfilms und ihrer möglichen Fähigkeit als periokuläre Medikamententräger zu untersuchen. Die derzeitige medikamentöse topische Behandlung von Augenkrankheiten wird durch die Tränenflüssigkeit und das Blinzeln der Augenlider stark beeinträchtigt. Nur wenige Prozent des Wirkstoffs verbleiben im Auge und das häufige (Nach-)Tropfen schränkt die Therapieadhärenz vieler Patienten deutlich ein. Aufgrund ihrer elektrischen Wechselwirkung mit den negativ geladenen Muzinen der Hornhaut, stellen die kationischen SUPs einen vielversprechenden Ansatz dar, um eine hohe Affinität zur Hornhaut aufzubauen und so eine Reduzierung der Wirkstoffkonzentration und der Tropfhäufigkeit von Augentropfen zu bewirken. Davon würde vor allem die große Patientenpopulation, die unter trockenem Auge leidet, profitieren.

Zunächst wurde die Lokalisierung und Anhaftung der SUPs an der Hornhaut histologisch getestet. Hierfür wurden fluoreszenzmarkierte SUPs verwendet, um die Verteilung mittels Kryoschnittmethode nachzuweisen. Diese Versuche wurden *ex vivo* an Schweineaugen und *in vivo* an Ratten mit unterschiedlichen Konzentrationen und verschiedenen Inkubationszeiten der SUPs durchgeführt. Der Tränenfilm wurde bei den Schweineaugen durch Puffer simuliert. Darüber hinaus wurde die zelluläre Adhäsion und die mögliche zelluläre Aufnahme der SUPs in verschiedenen porcinen und humanen Zelllinien untersucht.

Zur quantitativen Bestimmung der Adhäsion, der Adhäsionsdauer und der Eindringtiefe der Partikel wurde das Fluoreszenzsignal der SUPs bei *ex vivo* Schweineaugen mit einem Fluorotron™ Master Fluorophotometer gemessen. Dieses Gerät misst die Fluoreszenzverteilung und -menge von der Hornhaut bis zur Netzhaut. Es ist der industrielle Goldstandard für die Entwicklung von Augentropfen.

Um die hohe Biokompatibilität der SUPs zu verifizieren, wurde die Expression von Zelltodmarkern (TUNEL) histologisch untersucht, wie auch eine PAS- und HE-Färbung an den Kryoschnitten durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

- SuperFrost Plus Objektträger, R. Langenbrinck GmbH, Deutschland
- Glaseinsatz 70mm, pol., Leica, Deutschland
- Messer: Microtome blade Typ C35, feather
- Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Deutschland
- 24\*60mm Deckgläser, Glasdicke 0,13-0,16 R. Langenbrinck GmbH, Deutschland
- Fluorsave™ Reagenz, Merck KGaA, Deutschland
- TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)-Puffer, Sigma Aldrich, Deutschland
- Natriumchlorid, VWR Chemikalien, USA
- Milli-Q-Wasser, Merck Millipore, Deutschland
- Salzsäure (25%), AppliChem GmbH, Deutschland
- Tween 20, SERVA Elektrophorese GmbH, Deutschland
- Paraformaldehyd, Merck KGaA, Deutschland
- PBS Dulbecco, Biochrom GmbH, Deutschland (LOT:1396D)
- Natronlauge, Roth, Deutschland
- Platten:
  - 24-Well Platte, Poly-D-Lysin, Corning, USA
  - 96-Well Platte, Poly-D-Lysin, Corning, USA
  - 6-Well Platte, Corning, USA
- Dichtungsringe, Hornbach, Deutschland
- Flüssiger Stickstoff, WestfalenGas, Deutschland
- 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), AppliChem GmbH, (#A4099) , Deutschland
- Methanol, Honeywell Riedel-de Haën AG, Deutschland
- BSA, albumin fraction V, AppliChem GmbH, Deutschland
- Harris Hämatoxilinsolution, O. Kindler, Deutschland
- Salzsäure-Ethanol, AppliChem GmbH, Deutschland
- Eosin FIG, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
- Ethanol, SAV Flüssigproduktion GmbH, Deutschland
- Eukitt, O. Kindler, Deutschland
- Periodsäure-Lösung, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
- Schiff'sches Reagenz, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
- Xylol, VWR-Chemikalien (28975-325), USA
- TritonX-100, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (#9002-93-1)
- Natriumcitrat, Sigma Aldrich, Deutschland
- DNase, DNase-Puffer, AppliChem GmbH, Deutschland

- In Situ Cell Death Detection Kit TMR red, Roche Holding, Basel, Schweiz
- Iod, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
- CellnTec CnT-PR, CELLnTEC advanced cell systems AG, Bern, Schweiz
- Penicillin/Streptomycin 100ml, Gibco (#15140-122), Thermo Fisher Scientific, USA
- Gentamycin, Thermo Fisher Scientific, USA
- Trypsin-EDTA, Biozym Scientific GmbH, Deutschland
- FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA
- DMEM hohe Glukose (4.5g/l), Gibco Thermo Fisher Scientific, USA
- DMEM niedrige Glukose (1g/l), Gibco Thermo Fisher Scientific, USA
- HBSS, Carl Roth GmbH + Co. KG (# 9117), Deutschland
- Papain, Thermo Fischer Scientific, (# 88285), USA
- DNase, AppliChem GmbH (#A3778), Deutschland
- Gelatine, 4582.4 Carl Roth, Deutschland
- Kammer-Objektträger, Thermo Fischer Scientific, USA (#154534)
- Sezierbesteck (Pinzette, Schere, Skalpell), B. Braun, Deutschland
- Dako-Pen, Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Deutschland

## 2.2 Geräte und Software

- Fluoreszenzmikroskop Z1 Inverted, Zeiss, Deutschland
- Kryostat CM1950, Leica, Deutschland
- Magnetrührer IKA combimag rct, Deutschland
- Microsoft® Word Version 16.77.1, USA
- Microsoft® PowerPoint Version 16.77.1., USA
- Microsoft® Excel VVersion 16.73, USA
- SPSS Statistics, Version 27
- Sterilbank MSC-Advantage, Thermo Fischer, Deutschland
- Thermomischgerät Comfort, Eppendorf, Deutschland
- Vortex-Mixer, 4 Basic, IKA, Deutschland
- Kompaktwaage EMB, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
- Zellzahlmessgerät R1-SLI, Olympus, Japan
- Multipette plus, Eppendorf, Deutschland
- Pipette Eppendorf Xplorer® plus, Deutschland
- Tischenzentrifuge, Megafuge 8R, Thermo Fischer Scientific, (# 88285), USA

- Zentrifuge, micro star 17R, VWR, USA
- Magnetrührer mit Heizplatte, neolab, Deutschland
- Heiz- und Magnetrührer Rotilab MH 15, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
- Fluorotron™ Master: Ocumetrics, Mountain View, USA
- Fluoroton Master-Software, Mountain View, USA
- Inkubator, Heracell 150, Thermo Scientific, USA
- Tischzentrifuge mega star 3.0 R, VWR, USA
- Thermoschüttler CAT SH 26, Deutschland
- Färbekammer, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
- pH-Meter, Microprocessor ph211, Hanna instruments, USA

## 2.3 Lösungen

### 2.3.1 TBS-Puffer

Zur Herstellung von 1000 ml TBS-Puffer (10x TBS) wurden 60,6 g TRIS-Puffer und 87,7 g NaCl in 900 ml Milli-Q Wasser in einer Glasflasche mit Hilfe eines Magnetrührers gelöst. Sobald die Lösung klar war, wurde der pH-Wert mittels pH-Meter bestimmt und durch Titration mit 25 %iger Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt. Anschließend wurde die verbliebene Mengendifferenz zu einem Liter mit Milli-Q Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der 10x TBS-Puffer in einem Verhältnis von 1:10 mit Milli-Q Wasser verdünnt, um 1x TBS Puffer herzustellen. 1x TBS-T-Puffer wurde durch weitere Zugabe von 1 ml Tween 20 (0,1 %) in 1 l 1xTBS-Puffer generiert.

### 2.3.2 PFA (4 %)

40 g PFA wurden zu 1000 ml 1x PBS hinzugefügt. Die Lösung wurde unter ständigem Rühren mit dem Magnetrührer auf 60 °C erhitzt. Zusätzlich wurden 40 Tropfen 1 M NaOH hinzugefügt. Es wurde so lange gerührt, bis die Flüssigkeit klar war. Nach dem Abkühlen wurde der pH-Wert gemessen und mit 25 %iger Salzsäure auf pH 7,2 titriert. Nach dem Aliquotieren wurde die nun 4%ige PFA-Lösung eingefroren und bei -20 °C gelagert.

### 2.3.3 Permeabilisierungslösung

Für die Permeabilisierungslösung wurden 0,1 % Triton X-100 und 0,1 % Natriumcitrat in Milli-Q Wasser gelöst.

## 2.4 Partikel

### 2.4.1 Herstellung der Polypeptide

Die SUPs wurden von Wissenschaftlern des Instituts für Technische und Makromolekulare Chemie der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt. Die Varianten wurden jeweils durch rekombinante Proteinexpression in *Escherichia coli* hergestellt. Die gereinigten Polypeptide wurden auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die produkthaltigen Fraktionen wurden gepoolt und gegen Reinstwasser dialysiert. Die positiven K-Varianten wurden durch Affinitätschromatographie mit einer Heparin-HP-Säule und die negativen E-Varianten durch Anionenaustauschchromatographie mit einer Q-HP-Säule weiter gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. [27]

Die gefrorenen Peptide wurden in unser Labor geliefert, aufgetaut und mit 1xPBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Entsprechend der molaren Massen wurde das jeweilige PBS-Volumen errechnet (Tabelle 1).

|                   | K36-<br>GFP | K72-<br>GFP | E36-GFP | GFP   | K36   | K72   | E36   |
|-------------------|-------------|-------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| Dalton<br>(g/mol) | 46500       | 64000       | 46600   | 28300 | 19000 | 36400 | 19000 |

Tabelle 1 Übersicht über die einzelnen molaren Massen der verwendeten SUPs

## 2.5 Lokalisation der SUPs in den Augenstrukturen mittels Histologie

### 2.5.1 Vorbereitung der Augen

#### 2.5.1.1 Vorbereitung der *ex vivo* Schweineaugen

Die frischen enukleierten Schweineaugen wurden vom Städtischen Schlachthof Balingen, einem lokalen Schlachthof, bezogen (Registriernummer: DE08416112321). Sie wurden direkt nach der Schlachtung entnommen und bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gekühlt. Zusätzlich wurde das restliche Muskel- und Bindegewebe der Augen abgeschnitten und verworfen.

### 2.5.1.2 Vorbereitung der *ex vivo* Kaninchenaugen

Die frischen enukleierten Kaninchenaugen stammten aus einer Kooperation mit der Thorax-Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen, welche frisch post-mortem entnommen wurden. Anschließend wurden die Augen gekühlt ins Labor gebracht. Sie wurden ebenfalls von restlichem Muskel- und Bindegewebe mittels Schere und Skalpell bereinigt.

### 2.5.1.3 Präparation der Augen von lebenden Ratten

Die Untersuchungen an lebenden Ratten (*Rattus norvegicus forma domestica*, Lister Hooded) wurden im Tier-Operationssaal der Augenklinik in Tübingen durchgeführt. Die Ratten wurden von der Firma Charles River Laboratories aus Sulzfeld bezogen. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Entsprechende Tierversuchsgenehmigungen waren zuvor beim Regierungspräsidium Tübingen (AK 1/15, AK7/22G) eingeholt worden. Die Entnahme der Augen wird im Folgenden beschrieben (2.5.4.).

## 2.5.2 *Ex vivo*-Behandlung

### 2.5.2.1 Behandlung der Schweineaugen

Die frischen enukleierten Schweineaugen wurden dem Kühlschrank entnommen und in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Augen in einer Platte mit sechs Vertiefungen so positioniert, dass die Hornhaut nach oben gerichtet war. Um zu vermeiden, dass die Reagenzien von der gekrümmten Hornhaut abfließen, wurden Gummiringe auf die Augen gelegt, die die Hornhaut begrenzten. Auf jede Hornhaut wurden 100 µl der SUPs (80 µM) getropft. Nach einer einminütigen Inkubationszeit wurden die Augen je nach Versuch 15 Minuten bis 48 Stunden lang in 1xPBS gewaschen (Tabelle 2). Während dieser Zeit befand sich der 1xPBS-Becher mit den Augen auf einem Schüttler mit einer Frequenz von 16Hz, um den Tränenfilm und das Blinzeln zu simulieren. GFP diente als Kontrolle, mit einer Konzentration von ebenfalls 80 µM. Danach wurden die Augen in Tissue-Tek eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert (Abbildung 5).

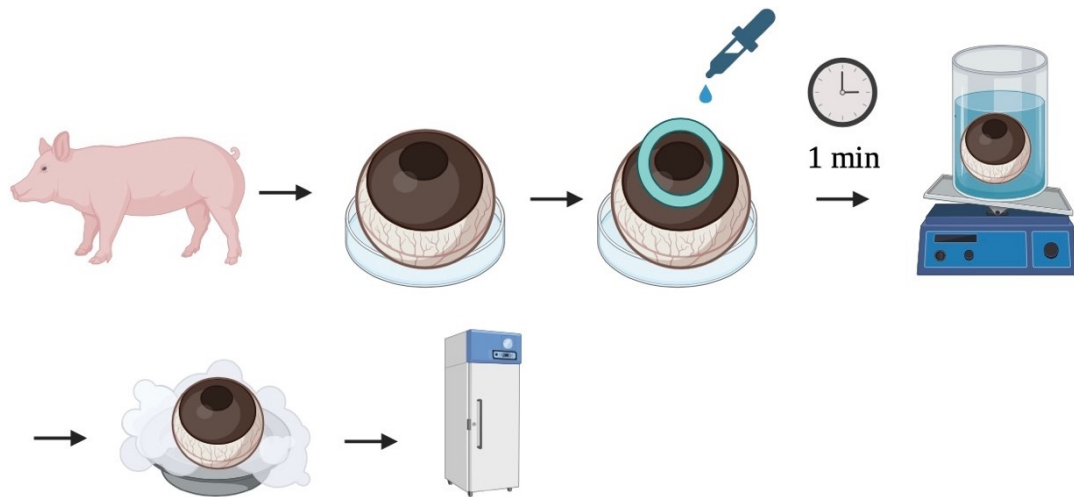


Abbildung 5 Behandlung der *ex vivo* Schweineaugen

Die frischen Schweineaugen wurden präpariert, in einer 6-Well-Kulturplatte positioniert und mit Gummiringen versehen. Anschließend wurden sie mit 100  $\mu$ l der SUPs (80  $\mu$ M) behandelt und für eine Minute inkubiert. Danach wurden die Augen in PBS auf einem Schüttler entsprechend der jeweiligen Waschzeit gewaschen. Im Anschluss erfolgte das Einfrieren mit flüssigem Stickstoff (Erstellt mit Biorender.com).

| Behandlung | Waschzeit                                   | Anzahl der Augen pro Versuchszeit |
|------------|---------------------------------------------|-----------------------------------|
| K36-GFP    | 15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h | 4                                 |
| K72-GFP    | 15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h | 4                                 |
| GFP        | 15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 48h               | 4                                 |
| E36-GFP    | 15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 48h               | 4                                 |

Tabelle 2 Überblick über die Behandlung von *ex vivo*-Schweineaugen bei unterschiedlichen Waschzeiten mit den SUPs.

#### 2.5.2.2 Behandlung von Kaninchenaugen

Es wurde das gleiche Verfahren wie bei den Schweineaugen (s. 2.5.2) durchgeführt, mit dem Unterschied, dass das Volumen der Behandlung auf 50  $\mu$ l pro Auge reduziert wurde. Der Zeitplan für die Tests ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tabelle 3).

| Behandlung | Waschzeit    | Anzahl der Augen pro Versuchszeit |
|------------|--------------|-----------------------------------|
| K36-GFP    | 15min, 30min | 2                                 |
| GFP        | 15min        | 2                                 |

Tabelle 3 Überblick über die Behandlung von *ex vivo* Kaninchenaugen bei unterschiedlichen Inkubationszeiten mit den SUPs.

### 2.5.3 *In vivo*-Behandlung

Die vorbereiteten SUPs sowie die GFP-Kontrolle (50 µl und 80 µM) wurden auf die Augen der Ratten getropft und für verschiedene Zeiträume inkubiert (Tabelle 4). Zur Applikation der Tropfen wurden die Ratten von einer zweiten Person kurz fixiert. Das Blinzeln der Versuchstiere wurde weder beim Tropfen der SUPs noch während der Inkubationszeit verhindert. Die Ratten wurden anschließend wieder in ihre Käfige gesetzt und nach den verschiedenen Inkubationszeiten mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation euthanasiert. Die Augen wurden entnommen und in Tissue-Tek eingebettet. Anschließend wurden sie mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

| Behandlung | Inkubationszeit   | Anzahl der Augen pro Inkubationszeit |
|------------|-------------------|--------------------------------------|
| K36-GFP    | 30min, 1h, 2h, 4h | 4                                    |
| K72-GFP    | 30min, 1h, 2h, 4h | 4                                    |
| E36-GFP    | 30min             | 4                                    |
| GFP        | 30min             | 4                                    |

Tabelle 4 Überblick über die Behandlung von Rattenaugen zu verschiedenen Inkubationszeiten mit den SUPs.

### 2.5.4 Kryoschnitte

Die Gewebeblöcke mit den eingebetteten Augen wurden in den Kryostaten - Kryostat CM1950, Leica - eingespannt. 14 µm Mikrometer dicke Hornhautschnitte wurden hergestellt und auf Objektträger übertragen. Für jedes Auge wurden acht Objektträger verwendet, auf denen die

Schnitte so angeordnet waren, dass Schnitte aus verschiedenen Schichten auf jedem Objektträger untersucht werden konnten. Bei Schweineaugen wurden zwei Schnitte, bei Kaninchenaugen drei Schnitte und bei Rattenaugen drei bis vier Schnitte auf je einen Objektträger positioniert. Nachdem die Objektträger an der Luft getrocknet waren, wurden sie bis zur Färbung im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

#### 2.5.5 DAPI-Färbung

4'6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an AT-reiche Bereiche der DNA anlagert. Er wird in der Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie zur Darstellung von Zellkernen verwendet. [29] Für die Fixierung der Kryoschnitte wurden zwei verschiedene Methoden der Fixierung durchgeführt:

- Methanolfixierung: Die Kryoschnitte wurden zehn Minuten lang in eiskaltem Methanol fixiert, an der Luft getrocknet und weitere zehn Minuten mit TBS gewaschen.
- PFA-Fixierung: Die Kryoschnitte wurden 20 Minuten lang in PFA (4 % mit PBS) fixiert, an der Luft getrocknet und weitere 20 Minuten mit TBS gewaschen.

Nach der Fixierung wurden die Objektträger fünf Minuten lang mit 0,2 µg/ml DAPI in PBS inkubiert. Danach wurden die Objektträger zweimal mit TBS und einmal mit Wasser (*Aqua dest.*) für jeweils fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurden sie zum Trocknen im Dunkeln belassen. Sobald die Objektträger trocken waren, wurden sie mit Fluorsave-Reagenz beträufelt und mit einem Deckglas abgedeckt.

#### 2.5.6 Immunfluoreszenz

Immunhistochemische Färbungen ermöglichen die Visualisierung von Proteinen und anderen Molekülen in biologischem Gewebe. Dies geschieht durch die Verwendung von Antikörpern, die spezifisch an die zu untersuchende Zielstruktur binden. In der direkten Immunfluoreszenz können diese Antikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Alternativ, wie in dieser Arbeit durchgeführt, erfolgt die Markierung der Antikörper indirekt. Dabei binden die primären Antikörper an die Zielstruktur und werden anschließend durch einen zweiten Antikörper spezifisch gebunden, der mit einem fluoreszierenden Molekül markiert ist. Dieser zweistufige Prozess ermöglicht eine erhöhte Signalverstärkung und präzisere Lokalisierung der untersuchten Moleküle, was die indirekte Immunfluoreszenz zu einer wertvollen Methode in der biochemischen Forschung und Diagnostik macht. [30] Die Zielstruktur der primären

Antikörper war einerseits das MUC1-Glykoprotein und andererseits das Galectin-3-Protein der Hornhautepithelzellen.

Die Objektträger mit den Proben wurden zunächst für zehn Minuten in eiskaltem Methanol fixiert und für ca. 30 Sekunden an der Luft getrocknet. Hiernach wurden sie dreimal für jeweils fünf Minuten mit TBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Proben 60 Minuten lang mit 5 % BSA geblockt und über Nacht mit 100 µl pro Objektträger des verdünnten primären Antikörpers (Tabelle 5) bei 4 °C inkubiert (Tabelle 5). Die Negativkontrolle erhielt lediglich 100 µl 5 % BSA. Am nächsten Tag wurde der erste Antikörper durch dreimaliges fünfminütiges Waschen mit TBS entfernt. Anschließend wurde der Antikörper mit dem verdünnten zweiten Antikörper für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 5). Danach erfolgte die DAPI-Färbung wie in 2.5.5. beschrieben.

Alle Proben wurden während der Inkubationszeiten abgedeckt, um einen Fluoreszenzverlust der Farbstoffe zu verhindern.

| Primärer Antikörper                                                               | Verdünnung mit 5% BSA in PBS | Sekundärer Antikörper                                                                                       | Verdünnung mit 5% BSA in PBS |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Galectin-3<br><br>(Wirt: Kaninchen,<br>Hersteller: Acris,<br>Nummer: APO6132PU-N) | 1:300                        | Ziel: Anti-Kaninchen<br><br>(Wirt: Ziege, Hersteller:<br>Thermo Fisher, Nummer:<br>A21428, Alexa Fluor 555) | 1:1000                       |
| MUC1<br><br>(Wirt: Kaninchen,<br>Hersteller: Acris,<br>Nummer: AP10158PU-N)       | 1:500                        | Ziel: Anti-Maus<br><br>(Wirt: Ziege, Hersteller:<br>Thermo Fisher, Nummer:<br>A21422, Alexa Fluor 555)      | 1:1000                       |

Tabelle 5 Übersicht über die bei den Färbungen verwendeten Antikörper

### 2.5.7 HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist ein Färbeverfahren in der Histologie, mit dem sich verschiedenen Strukturen eines feinen Gewebeschnitts färben lassen. Sie wird meist für Übersichtsfärbungen verwendet. [31] Zunächst wurden die Kryoschnitte 10 Minuten lang mit Methanol fixiert und anschließend für 10 Minuten mit TBS gewaschen. Nach einem kurzen Waschen mit Aqua dest. (2 mal 1 Minute) wurden die Schnitte für 10 Minuten in Harris Hämatoxilinsolution (HHS) eingelegt. Danach wurde zweimal mit Leitungswasser gewaschen. Dann wurden die Objektträger für zwei Sekunden in Salzsäure-Ethanol inkubiert. Es folgte ein weiteres Waschen mit Leitungswasser, diesmal für 10 Minuten. Danach wurde 2 Minuten lang in Eosin FIG. inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch eine aufsteigende Linie von Alkohol gezogen (einmal in 70 %igem Ethanol, dann zweimal in 96 % (v/v) und zweimal in 99 % (v/v)). Schließlich wurden vier Inkubationen von 30 Sekunden bis 1 Minute in reinem Xylol durchgeführt. Die Proben wurden mit Eukitt abgedeckt und im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2.5.8 PAS-Färbung

Bei der PAS-Färbung werden Kohlenhydrate, wie Glykogen, Glykoproteine, Mukopolysacchariden oder Glykolipide, angefärbt. Das Ergebnis der Färbung zeigt eine Färbung von neutralen Mucopolysacchariden in einem Farbspektrum von magentarot bis zartrosa, während die Zellkerne in blauvioletten Tönen erscheinen. Das Cytoplasma zeigt eine dezente Rosafärbung, die bei höheren RNA-Konzentrationen ins Bläuliche übergeht. [32] Nach der 10-minütigen Fixierung mit Methanol und einem 10-minütigen Waschen mit TBS wurden die Schnitte zweimal für jeweils eine Minute in Aqua dest gelegt. Die Proben wurden in 1 %ige (Abb./v) Periodsäure getaucht und fünf Minuten lang inkubiert. Die Säure wurde mit destilliertem Wasser abgewaschen, und die Proben wurden für zehn Minuten in Schiffsschem Reagenz inkubiert. Anschließend wurden die Proben gründlich mit Leitungswasser gewaschen und nach zwei Minuten in Wasser für zehn Minuten in Harris-Hämatoxylin getaucht. Danach wurden sie erneut mit Leitungswasser gewaschen und zwei Sekunden lang in Salzsäure-Ethanol inkubiert. Schließlich wurden die Proben zweimal in 96 % (v/v), zweimal in 99 % (v/v) und viermal in reinem Xylol getaucht. Die Proben wurden mit Eukitt abgedeckt und im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2.5.9 TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Färbung wird zur Visualisierung apoptotischer Zellen verwendet. Während der Apoptose wird die DNA durch Endonukleasen fragmentiert und es entstehen freiliegenden Hydroxygruppen (3'-OH-Gruppen). Die TUNEL-Reagenz besteht aus den Enzymen terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (tdT) und dem fluoreszenzmarkierten Desoxyuridintriphosphat (dUTP). Das Enzym dUTP bindet an die freiliegenden Hydroxygruppen (3'-OH-Gruppen) der markierten Nukleotide und das Enzym tdT katalysiert die kovalente Bindung. Mittels Fluoreszenzmikroskopie ist ein Nachweis der Bindung von dUTP an freiliegenden Hydroxygruppen (3'-OH-Gruppen) und somit die Visualisierung apoptotischer Zellen möglich. [33]

Die Proben wurden mit einem Dako-Stift eingekreist und dann in eine feuchte Kammer gelegt. Zur Fixierung wurde 4 % PFA für 20 Minuten verwendet. Danach wurden die Proben 30 min lang mit TBS gewaschen. Es folgte eine zweiminütige Permeabilisierung mit Permeabilisierungslösung auf Eis. Die Proben wurden zweimal für 5 Minuten mit TBS gewaschen. Nun wurde die Positivkontrolle 10 Minuten lang mit DNase (11 µl DNase + 40 µl DNase-Puffer) und die Negativkontrolle 10 Minuten lang mit TBS behandelt. Anschließend wurden die Positiv- und Negativkontrolle jeweils zweimal für 5 min mit TBS gewaschen. Die Proben und die Positivkontrolle erhielten jeweils 50 µl Reaktionsgemisch, bestehend aus 450 µl Markierungslösung und 50 µl Enzymlösung. Die Negativkontrolle wurde einzig mit 50 µl Markierungslösung behandelt. Alle Proben wurden 1 Stunde lang im Inkubator (37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bei 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBS gewaschen und dann mit DAPI gefärbt (siehe 1.5.5).

### 2.5.10 Untersuchung der Proben mit dem Fluoreszenzmikroskop

Die Fluoreszenz basiert auf der Absorption von kurzwelligem Licht und der anschließenden Emission von langwelligerem Licht. In den durchgeführten Experimenten wurden die spezifischen Fluorophore DAPI (Absorptionsmaximum bei 400 nm) und GFP (unter Verwendung eines FITC-Filters mit einem Emissionsmaximum bei 520 nm), sowie Mucin (unter Verwendung eines Cy3-Filters mit einem Emissionsmaximum bei 560 nm) verwendet. Die Fluorophore und Mucin wurden getrennt nachgewiesen, indem Filter eingesetzt wurden, die die durchgelassene Strahlung je nach Wellenlänge abschwächen (Extinktion) [33]. Alle Proben wurden bei einer 200-fachen Vergrößerung mikroskopiert. Die ZEISS-Software

ermöglichte die Aufnahme und Bearbeitung der Probenbilder. Die Auswertung der Bilder erfolgte mithilfe von Fiji (Version: Fiji for Mac OS X) und Excel (Version 16.73).

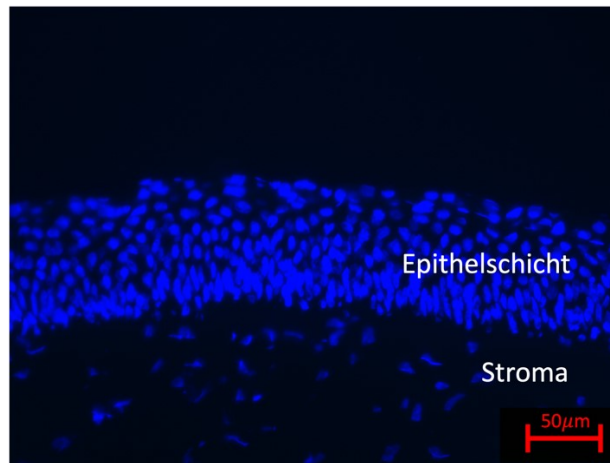


Abbildung 6 Repräsentatives Bild einer Schweinehornhaut eines nativen *ex vivo* Schweineauges  
Mikroskopische Aufnahme einer unbehandelten Schweinehornhaut. Die Zellkerne sind mit DAPI blau angefärbt. Die Epithelschicht besteht aus einem mehrschichten unverhorntem Plattenepithel, im Stroma finden sich nur vereinzelnde Zellkerne. Skalenleiste: 50 µm.

## 2.6 Fluorophotometer

Das Prinzip eines Fluorophotometers ist mit dem eines Photometers vergleichbar. Im Unterschied zur Photometrie erfolgt die Messung der Strahlungsintensität der Emission senkrecht zur Ausrichtung der Anregungsstrahlen, um diese nicht zu erfassen. [34]

Das Fluorophotometer (Fluorotron™ Master: OcuMetrics, Mountain View, CA) misst die Fluoreszenzkonzentration in den verschiedenen Schichten des Auges. Die Daten werden grafisch und in Tabellenform dargestellt, um die Fluoreszenzkonzentrationen in den verschiedenen Tiefen der einzelnen Augensegmente zu zeigen. Zur Analyse der Fluoreszenzkonzentration wurde die Software Fluorotron Master verwendet. Jedes Auge wurde frontal zum Fluorophotometer ausgerichtet und zuerst allgemein gescannt.

Zunächst wurde die Basalfluoreszenz des Auges gemessen, um die Basisdaten jedes Auges zu erhalten. Danach wurde das Auge behandelt, vor das Messgerät platziert und zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Tabelle 6). Zu jedem Zeitpunkt wurden drei Scans durchgeführt, und zwischen den verschiedenen Zeitpunkten wurden die Augen in PBS auf einem Schüttler (10 rpm) inkubiert.

100 µl der Probe wurden durch Pipettieren direkt auf die Hornhaut aufgetragen. Wie bei der *ex vivo*-Behandlung wurden Gummiringe verwendet, um die Abweichung der Reagenzien von der gekrümmten Hornhaut zu vermeiden. Für die Polypeptide K36, K72, E36 und die GFP-Kontrolle wurde jeweils eine Konzentration von 80 µM verwendet. Für jede Probe wurden sechs Augen verwendet.

Die Daten aus der Fluoroton Master Software wurden zunächst in eine Excel-Tabelle übertragen. Um die einzelnen Zeitpunkte und Augen vergleichen zu können, wurde die Fluoreszenz der drei Messungen pro Zeitpunkt zunächst gemittelt und dann integriert. Um einen genaueren Vergleich zu ermöglichen, wurde der Bereich, in dem kein Signal vorhanden war, vom Gesamtintegral subtrahiert.

Die folgende Formel wurde zur Berechnung der Werte für jedes Diagramm verwendet:

$$\int \text{alle Werte} - \int \text{Durchschnitt der Werte ohne Signal} * \text{Betrag aller Werte}$$

Dieser Wert wurde für jeden Zeitpunkt für alle untersuchten Augen ermittelt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden dann für jeden Zeitpunkt mit Excel 2010 berechnet.

Die folgenden statistischen Tests wurden mit SPSS (Version 27) durchgeführt: ANOVA und Tukey-HSD. Die Signifikanzen werden wie folgt bewertet: \* für den Wert von  $P \leq 0,05$ , \*\* für den Wert von  $P \leq 0,01$  und \*\*\* für den Wert von  $P \leq 0,001$ .

| <b>Augenbehandlung</b>                     | <b>Messzeitpunkte</b> |
|--------------------------------------------|-----------------------|
| Vor Applikation der SUP                    | -5 Minuten            |
| Applikation und Inkubation für eine Minute | -                     |
| direkte Messung                            | 0 Minuten             |
| Auge in PBS + Schüttler                    | 5 Minuten             |
| Auge in PBS + Schüttler                    | 15 Minuten            |
| Auge in PBS + Schüttler                    | 30 Minuten            |
| Auge in PBS + Schüttler                    | 60 Minuten            |
| Auge in PBS + Schüttler                    | 120 Minuten           |
| Auge in PBS + Schüttler                    | 240 Minuten           |
| Auge in PBS + Schüttler                    | 8 Stunden             |
| Auge in PBS + Schüttler                    | 12 Stunden            |
| Auge in PBS + Schüttler                    | 24 Stunden            |
| Auge in PBS + Schüttler                    | 48 Stunden            |

Tabelle 6 Zeitplan für die Fluorophotometer-Messungen

## 2.7 *In vitro*-Tests

### 2.7.1 Epithelzellen der Hornhaut

#### 2.7.1.1 Gewinnung von Epithelzellen aus Schweineaugen

Die Schweineaugen wurden zunächst zur Desinfektion für 1-2 Sekunden in 70 % Ethanol getaucht. Anschließend wurden sie für fünf Minuten in einer 5%igen Jodlösung vollständig benetzt. Nach einer 3-sekündigen Spülung mit PBS wurden die Augen präpariert, indem der *Limbus corneae*, in welchem die Stammzellen der kornealen Epithelzellen sitzen, aus dem Auge herausgeschnitten und der Rest des Gewebes verworfen wurde.

Der extrahierte Limbus wurde in kleine Stücke geschnitten und in eine 25-ml-Zellkulturflasche gegeben. Jedes Stück wurde mit einem Tropfen Epithelmedium (CellnTec CnT-PR mit 2 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, PAA 11-010) bedeckt. Die Zellkulturflasche wurde in einen Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag wurde zusätzliches Medium (5 ml) hinzugefügt. Im Verlauf der Zeit wurde das Medium einmal wöchentlich gewechselt, bis die Zellen ausreichend wuchsen, um für Experimente verwendet zu werden. Während dieser Zeit wurden die Zellen regelmäßig mit einem Mikroskop (Zeiss Axio Observer) überprüft, um ihre korrekte Entwicklung zu überwachen.

### 2.7.1.2 Aussaat der porcinen Epithelzellen

Etwa zwei Wochen nach der Isolierung kornealer Stammzellen zeigte sich eine konfluente Zellpopulation (Abbildung 7). Daraufhin wurden die Zellen aus ihren Kulturgefäßen entnommen und für einen Versuchsaufbau in eine Wellplatte überführt. Hierbei wurde das gegenwärtige Kulturmedium verworfen, und die Zellen wurden mit 2 ml PBS gewaschen.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml 0,25 % Trypsin-EDTA (Gibco 25200-072) zu den Zellen, woraufhin sie für etwa drei Minuten in einen Inkubator gestellt wurden (bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter einer Luftfeuchtigkeit von 95 %). Sobald etwa 90 % der Zellen in Suspension waren, wurde mindestens 1 ml einer 20 %igen Lösung von fötalem Kälberserum (FBS) in PBS zugegeben. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und in einen 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt.

Nach einer Zentrifugation (bei 300 G für fünf Minuten) wurde der Überstand verworfen, und das Pellet aus Zellen wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellzähler quantifiziert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation für fünf Minuten bei 300 G, und die Zellen wurden mit der entsprechenden Menge Epithelmedium aufgefüllt, um die gewünschte Zellkonzentration zu erreichen.

Nun wurden in jedes der Wells einer 24-Well-Platte 500 µl Suspension mit 120.000 Epithelzellen pipettiert. Die restlichen Zellen wurden in eine neue Zellkulturflasche gegeben und erneut kultiviert. Die 24-Well-Platte wurde für 24 Stunden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter einer Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert und war dann bereit für die anschließende Behandlung.

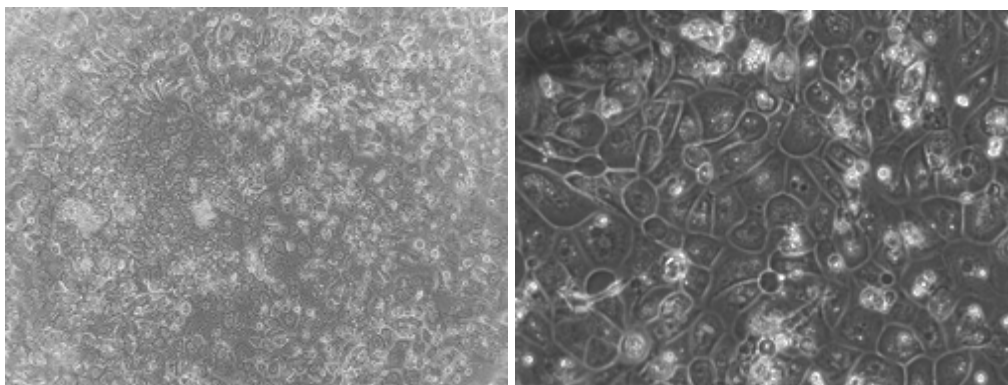


Abbildung 7 Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme von isolierten Epithelzellen vom Schwein. Links in 200x Vergrößerung und rechts in 400x Vergrößerung

### 2.7.2 MIO-M1-Zellen

MIO-M1-Zellen sind spontan immortalisierte Müllerzellen. Diese Zelllinie wurde aus der Arbeitsgruppe von Prof. Limb, University College London erworben und gemäß den Empfehlungen kultiviert. Die Zellen wurden in DMEM-Medium mit hohem Glukosegehalt (45 g/l) (Gibco, Carlsbad, Kalifornien) kultiviert, das mit 10 % FBS und Antibiotika (1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Gentamycin) ergänzt wurde. Die Zellen wurden in einem Inkubator (37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bei 95 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die Passagenzahl aller verwendeten Zellen lag bei mindestens 2.

#### 2.7.2.1 Aussaat der MIO-M1-Zellen

Vor der Verwendung der Zellen für den Versuch wurde zunächst eine Zählung mit dem Olympus LS Zellzähler durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen gemäß den Anweisungen in Abschnitt 2.7.1.2 zunächst dissoziiert und nach der Zentrifugation in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Es wurden 80.000 Zellen pro Vertiefung der 24-Well-Platte mit je 500 µl ausgesät.

### 2.7.3 Isolation und Kultivierung von porcinen Müllerzellen

Die Schweineaugen wurden für fünf Minuten in Ethanol desinfiziert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Hornhaut und Sklera wurden vollständig entfernt, und der Glaskörper wurde extrahiert. Der verbleibende Augenbecher wurde kleeblattförmig aufgeschnitten. Der geöffnete Augenbecher wurde in eine Petrischale mit Neurobasal-Medium gelegt, um die Netzhaut vollständig von der RPE-Schicht zu trennen. Die abgelöste Netzhaut wurde in HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*) eingelegt. In 1 ml Netzhautsuspension wurden 10 µl Papain und 10 µl DNase hinzugefügt. Nach 30 Minuten Schütteln bei 37 °C wurde die Retina vollständig dissoziiert, indem sie durch Auf- und Abpipettieren behandelt wurde. Der Überstand wurde nach einer Zentrifugation (4 Minuten bei Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge) entfernt und durch Zugabe von 1 ml Müllerzellmedium (DMEM low Glucose (1 g/l) Medium, ergänzt mit 10 % FBS und 1% Penicillin/Streptomycin) ersetzt. Die 24-Well-Platte wurde mit Gelatine (500 µl/Vertiefung) beschichtet und anschließend eine halbe Stunde lang im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden die Zellen (80.000 in 500 µl/Vertiefung) in die mit Gelatine beschichtete Platte gegeben.

## 2.8 Phasenkontrastmikroskopie

Für die Phasenkontrastmikroskopie wurde das Fluoreszenzmikroskop Z1 Inverted verwendet. Die Proben wurden unter dem Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung untersucht und anschließend mit der ZEN-Software aufgenommen und verarbeitet.

## 2.9 Adhäsion von SUPs an Zellen

Die zelluläre Bindung von SUPs wurde an zwei primären Zelltypen - porcine Korneaepithelzellen sowie porcinen Müllerzellen- und an der MIO-M1 Zelllinie, getestet. Dazu wurden die Zellen in einer 24-Well-Platte ausgesät, wie in 2.7. beschrieben (Cornea Epithelzellen 120.000/Well, MIO-M1 80.000/Well, Müllerzellen 80.000/Well). Die Well-Platten wurden über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter einer Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Absaugen des Mediums. Anschließend in jedes Well das SUP (K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP) oder GFP als Kontrollsubstanz in einer Konzentration von 20 µM, gelöst in dem spezifischen Medium der einzelnen Zellen, hinzugegeben. Nach einer Zeitspanne von 24 Stunden erfolgte das Abklopfen des Mediums, gefolgt von einer Fixierung der Zellen mit 4% PFA und einer anschließenden Färbung mit DAPI.

Für die Auswertung wurden die Zellen zuerst manuell ausgezählt. Im Rahmen der statistischen Analyse wurden zunächst die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Messungen berechnet. Anschließend wurde mit Hilfe von Excel (Version 16.73) ein t-Test und der *Standard Error of the Mean* (SEM) durchgeführt.

## 2.10 Statistische Auswertung

Im Verlauf der statistischen Analyse wurden zuerst die Durchschnittswerte und die Streuungen der einzelnen Messungen ermittelt. Die Darstellung und Auswertung erfolgte danach mithilfe von Excel (Version 16.73) oder SPSS (Version 27). Dabei wurde mittels t-Test, ANOVA, SEM und Tukey-Test nach Unterschieden zwischen den zu vergleichenden Gruppen gesucht. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgesetzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Adhäsionsprüfung der SUPs an *ex vivo* Schweineaugen

Für die ersten Adhäsionstestungen wurden frische *ex vivo* Schweineaugen gewählt. Sie besitzen etwa dieselbe Größe eines menschlichen Augapfels und ihr anatomischer Aufbau ähnelt stark dem der menschlichen Hornhaut. [35] Zudem haben sie eine hohe Verfügbarkeit, da es sich hierbei um Abfallprodukte der Lebensmittelindustrie handelt. Der bedeutendste Nachteil bei diesen *ex vivo* Modellen stellt der fehlende Tränenfilm und das fehlende Blinzeln dar. [36]

##### 3.1.1 K36-GFP kann über 48 h in Schweineaugen nachgewiesen werden

Um die Kryoschnitte der Versuchsaugen zu fixieren, wurden zwei verschiedene Methoden angewendet: die Fixierung mit Methanol und die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA). Diese Ansätze wurden getestet, da die Fixierung die Lebensprozesse von Zellen und Geweben durch Denaturierung der Proteine stoppt. Die verwendeten Proteinausfällmittel bei der Fixierung verhindern strukturelle Veränderungen durch Autolyse, Substanzverluste während der weiteren Behandlung und postmortale Strukturveränderungen. [33] Da es sich bei den SUPs um Proteine handelt, war es von Interesse zu untersuchen, ob die Art der Fixierung das Ergebnis der Untersuchung beeinflusst. Gemäß *Veeregowda et al.* interagieren die positiv geladenen SUPs (K36-GFP und K72-GFP) mit der negativ geladenen Hornhaut und haften so an dieser. [24] Als Kontrolle wurde zum einen das Fluorophor GFP verwendet, um zu testen, ob es selbst ohne den SUP-Tag an dem Hornhautepithel bindet. Zum anderen diente das negativ geladene SUP E36-GFP als weitere Kontrolle, da es gemäß dem coulombschen Gesetz von der Hornhaut abgestoßen werden sollte. [26] Alle Proben wurden in einer Konzentration von 80 µM und einem Volumen von 100 µl aufgetragen und eine Minute lang inkubiert, gefolgt von einem Waschprozess in PBS über einen Zeitraum von 15 Minuten bis 48 Stunden (Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11). Die Festlegung der Konzentration erfolgte in Absprache mit dem Kooperationspartner der Universität Aachen.

Die positiv geladenen SUPs K36-GFP und K72-GFP sind nach Methanolfixierung 15 min, 30 min, sowie nach einer Stunde nach Tropfengabe als durchgängige grünleuchtende Signale am apikalen Hornhautepithel zu beobachten. Die Kontrollen, E36-GFP und GFP, weisen kein Signal zu diesen Zeitpunkten auf (Abbildung 8). Aus diesem Grund wurden sie für die Testung weiterer Zeitpunkte ausgelassen, um Ressourcen zu disponieren.

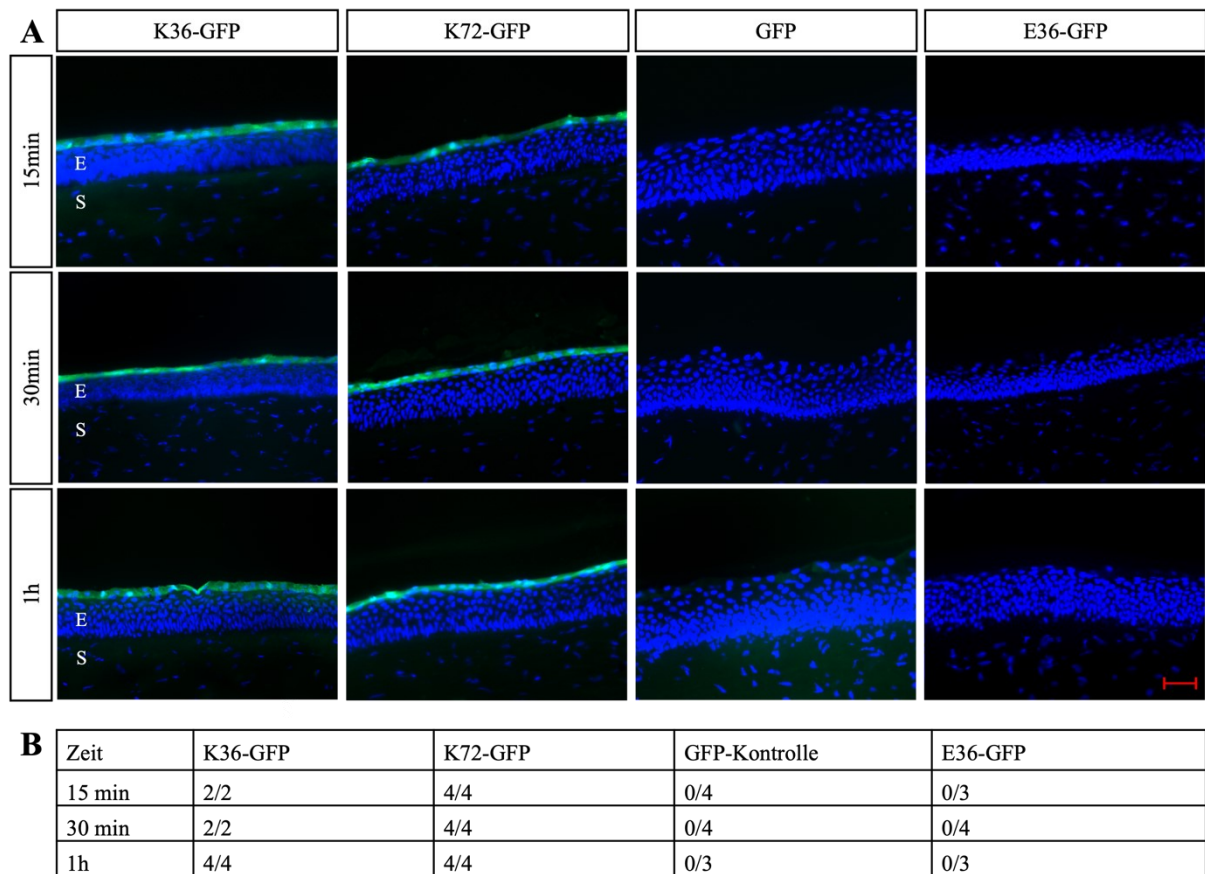


Abbildung 8 K36-GFP und K72-GFP haften mind. 1 h an porciner Hornhaut mit Methanolfixierung.

Adhäsionstestung von K36-GFP, E36-GFP, K72-GFP oder GFP-Kontrolle auf porcinen Augen mittels Histologie. (A): Repräsentative Bilder des Hornhautepithels von Schweinen, welches mit K36-GFP, E36-GFP, K72-GFP oder GFP-Kontrolle mit jeweils 80  $\mu$ M für eine Minute inkubiert wurde und verschieden lang in PBS gewaschen wurde. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Signale von K36-GFP und K72-GFP (grün) sind in jedem Zeitpunkt beobachtbar. Es sind zu keinem Zeitpunkt Signale von E36-GFP und GFP sichtbar. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m (B): Anzahl der Augen, in denen ein Signal von K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP oder GFP gefunden wurde, bezogen auf die Gesamtzahl der Augen, denen die SUPs und GFP verabreicht wurden.

Bei längeren Waschzeitpunkten mit anschließender Methanolfixierung zeigt sich bei K36-GFP ein bandförmiges grünleuchtendes Signal, das bis zu 8 Stunden kontinuierlich erkennbar bleibt. Danach nimmt die Signalstruktur zu punktförmiger Gestalt ab, ist aber in einer von drei Proben bis einschließlich 48 Stunden weiterhin beobachtbar. Die Signalintensität von K36-GFP nimmt nach 12 Stunden kontinuierlich ab. Bei K72-GFP zeigt sich ein ähnliches Verhalten, jedoch erlischt das punktförmige grüne Signal bei 48 Stunden (Abbildung 9). Die Signalintensität von K72-GFP verringert sich bereits nach 4 Stunden.

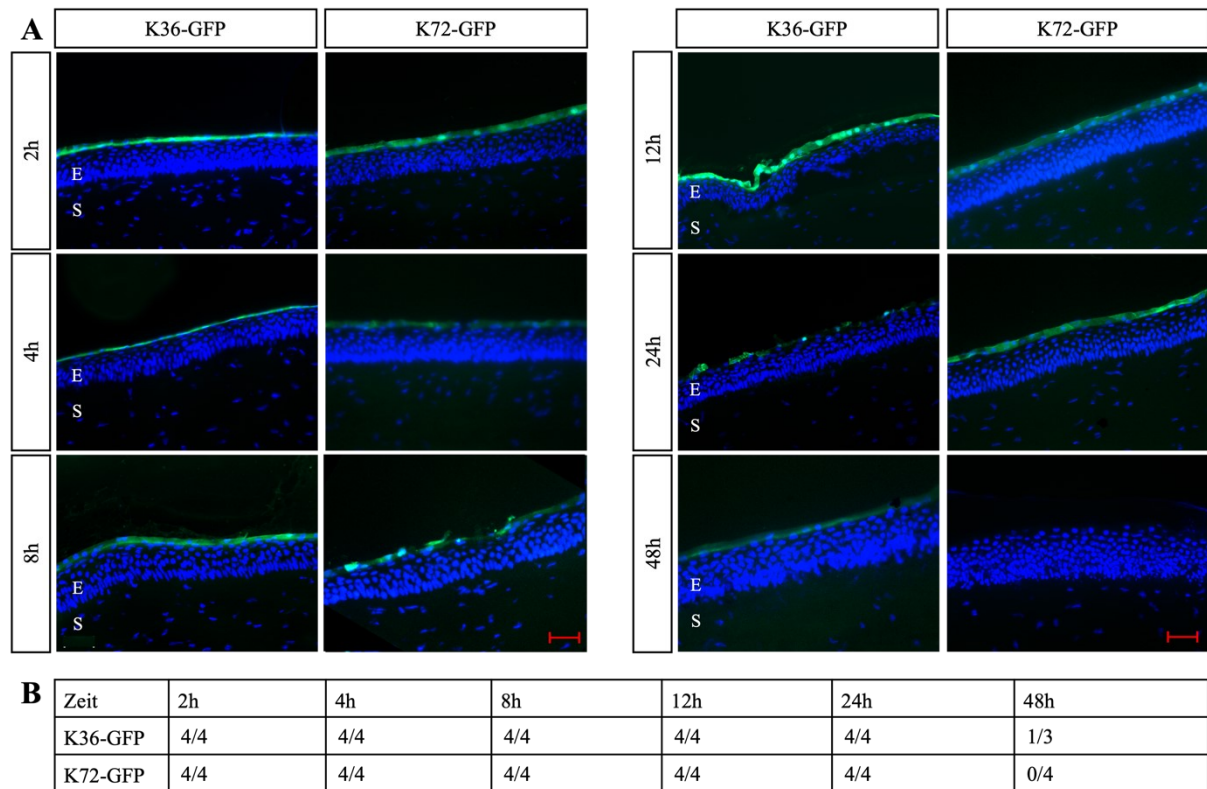


Abbildung 9 K36-GFP haftet 48 h an porciner Hornhaut mit Methanolfixierung

Untersuchung der Haftung von K36-GFP und K72-GFP an porcinen Augen durch histologische Analysen. (A): Exemplarische Abbildungen des Hornhautepithels von Schweinen, das mit 80  $\mu$ M K36-GFP oder K72-GFP (beide in grüner Farbe dargestellt) behandelt wurde und nach unterschiedlichen Zeiträumen der PBS-Spülung (2-48 Stunden) untersucht wurde. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Sowohl K36-GFP als auch K72-GFP Signale waren zu allen Zeitpunkten nachweisbar E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m (B): Anzahl der Fälle, in denen ein K36-GFP- oder K72-GFP-Signal in Bezug auf die Gesamtzahl der mit K36-GFP oder K72-GFP behandelten Augen nachgewiesen wurde.

In der PFA-Fixierung ist ein durchgängiges grünleuchtendes Signal, sowohl bei K36-GFP als auch bei K72-GFP zu erkennen. In den Kontrollen zeigt sich nach 15min bei E36-GFP ein stellenweises grünes Signal am apikalen Teil der porcinen Hornhaut in einer der drei Proben. Die GFP-Kontrolle weist ein leichtes punktförmiges positives Signal nach 30min in einer von vier Proben auf (Abbildung 10).

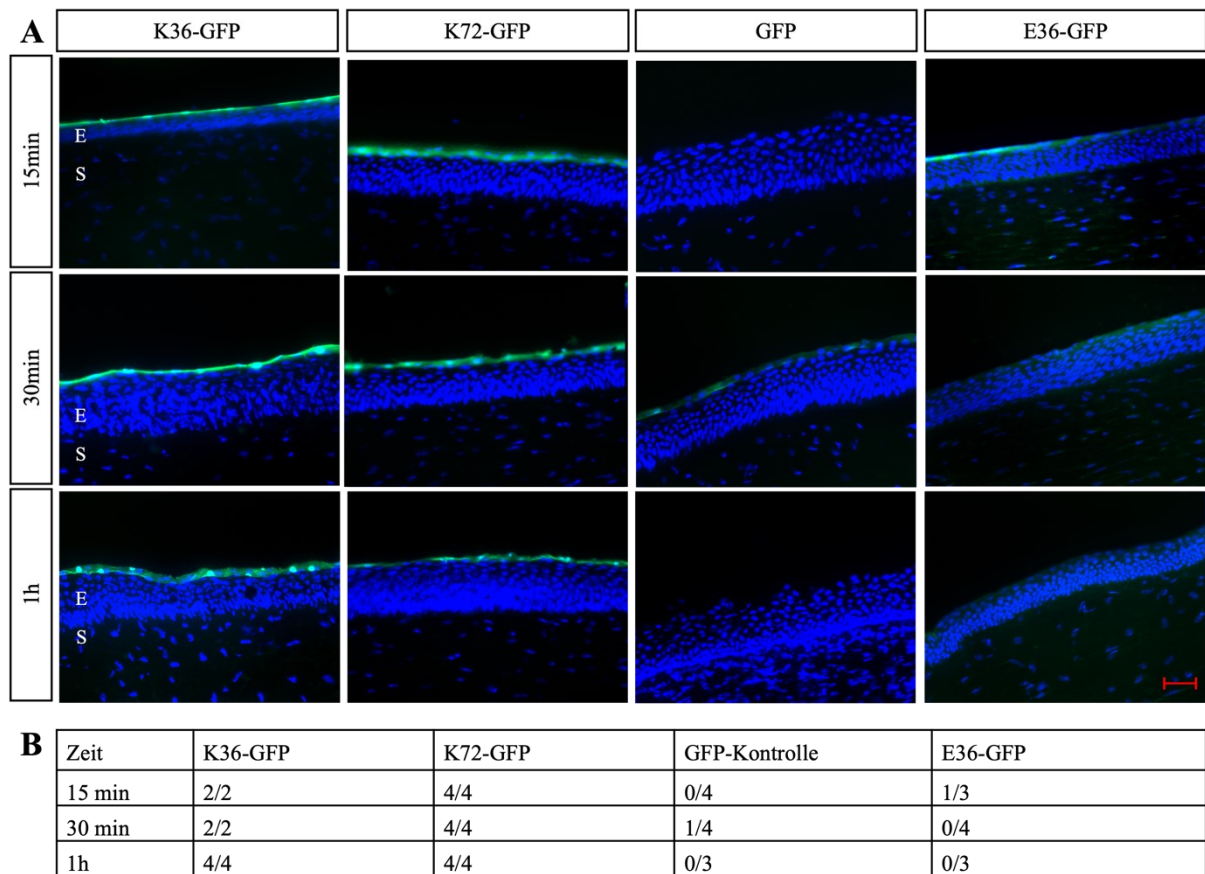


Abbildung 10 K36-GFP und K72-GFP haften mind. 1 h an porciner Hornhaut mit PFA-Fixierung

Adhäsionstestung von K36-GFP, E36-GFP, K72-GFP oder GFP-Kontrolle auf porcinem Hornhautepithel mittels Histologie. Die Kryoschnitte wurden mit PFA fixiert. (A): Repräsentative Bilder des Hornhautepithels von Schweinen, welches mit K36-GFP, E36-GFP, K72-GFP oder GFP-Kontrolle mit jeweils 80  $\mu$ M für eine Minute inkubiert wurde und verschieden lang in PBS gewaschen wurde. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Signale von K36-GFP und K72-GFP (grün) sind in jedem Zeitpunkt beobachtbar. Es sind zu keinem Waschzeitpunkt Signale von E36-GFP und GFP sichtbar. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m (B): Anzahl der Augen, in denen ein Signal von K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP oder GFP gefunden wurde, bezogen auf die Gesamtzahl der Augen, denen die SUPs und GFP verabreicht wurden.

K36-GFP und K72-GFP zeigen auch bei längeren Waschzeiten in der PFA-Fixierung positive Signale. Diese stellen sich bis einschließlich 8 Stunden bandförmig apikal des Hornhautepithels dar. Anschließend punktförmig bis zu 48 Stunden bei K36-GFP und bis zu 24 Stunden bei K72-GFP (Abbildung 11). Die Signalintensität nimmt sowohl bei K36-GFP als auch bei K72-GFP nach 8 h (Abbildung 11A) kontinuierlich in geringem Maße ab.

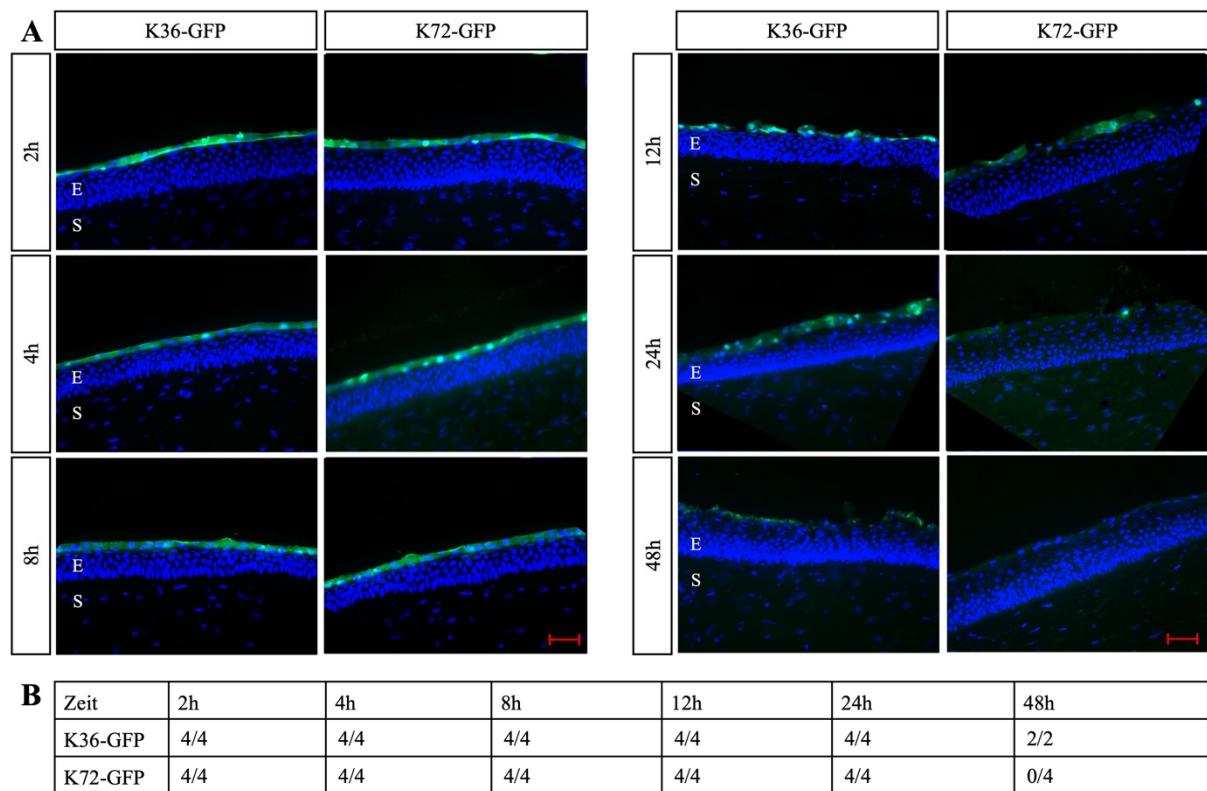


Abbildung 11 K36-GFP haftet 48 h an porciner Hornhaut mit PFA-Fixierung

Histologische Analyse der Haftung von K36-GFP und K72-GFP an Schweineaugen. (A): Repräsentative Bilder des Hornhautepithels von Schweinen, welches mit K36-GFP oder K72-GFP (beides grün) mit jeweils 80  $\mu$ M behandelt wurde und unterschiedlich lange in PBS gewaschen wurde (2h-48h). Die Kryoschnitte wurden mit PFA fixiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Sowohl K36-GFP als auch K72-GFP Signale waren zu allen Zeitpunkten erkennbar. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m (B): Anzahl der Augen, in denen ein Signal von K36-GFP oder K72-GFP gefunden wurde, bezogen auf die Gesamtzahl der Augen, denen die mit K36-GFP oder K72-GFP verabreicht wurden.

Die positiv geladenen SUPs K36-GFP und K72-GFP hafteten beide am apikalen Epithel des Schweineauges. Es zeigte sich ein durchgängiges grün fluoreszierendes Signalband über 24 h hinweg mit nahezu konstanter Signalhäufigkeit sowohl in der Methanolfixierung (Abbildung 8B und Abbildung 9B), wie auch der PFA-Fixierung (Abbildung 10B und Abbildung 11B). Dies deutet auf eine hohe Adhärenz an der apikalen Hornhaut beider positiv geladener Polypeptide hin, mit subjektiv stärkerer Haftung des K36-GFPs.

Der fluoreszierende Kontrollfarbstoff GFP wurde bei der Methanolfixierung vollständig und bei der PFA-Fixierung nahezu vollständig (einmaliges Signal bei der 30-minütigen Inkubationszeit s. Abbildung 10) ausgewaschen. Das negativ geladene SUP E36-GFP zeigte ebenfalls kein Signal, was die Hypothese der Bindung unterstützt.

Insgesamt konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Methanol- und der PFA-Fixierung beobachtet werden (Tabelle 7). Eine Quantifizierung der Methode erfolgte im Anschluss mittels Fluorometrie.

| Wasch-<br>zeit | K36-GFP |   | E36-GFP |   | K72-GFP |   | GFP-Control |   |
|----------------|---------|---|---------|---|---------|---|-------------|---|
|                | M       | P | M       | P | M       | P | M           | P |
| 15 min         |         |   |         |   |         |   |             |   |
| 30 min         |         |   |         |   |         |   |             |   |
| 1 h            |         |   |         |   |         |   |             |   |
| 2 h            |         |   | -       | - |         |   | -           | - |
| 4 h            |         |   | -       | - |         |   | -           | - |
| 8 h            |         |   | -       | - |         |   | -           | - |
| 12 h           |         |   | -       | - |         |   | -           | - |
| 24 h           |         |   | -       | - |         |   | -           | - |
| 48 h           |         |   | -       | - |         |   | -           | - |

Tabelle 7 Überblick über die mit 80µM. K36-GFP, E36-GFP, K72-GFP oder GFP-Kontrolle behandelten Hornhautepithelproben von Schweinen

Dargestellt ist die Anzahl der Augen, in denen ein Signal von K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP oder GFP gefunden wurde, bezogen auf die Gesamtzahl der Augen in Prozent. Bei der PFA-Fixierung zeigten je eine GFP-Kontrolle, wie auch eine E36-GFP Probe ein Signal auf, während bei der Methanolfixierung die Kontrollen zu jedem Zeitpunkt kein Signal aufwiesen. Bei der K36-GFP-Färbung zeigten nach 48 Stunden alle mit PFA fixierten Proben ein Signal, während es bei der Methanolfixierung nur 33 % waren. Die restlichen Proben wiesen keine weiteren Unterschiede hinsichtlich der Fixierungsmethode auf. ■ = 100 %, ■ = 33 %, ■ = 25 %, ■ = 0 %. M= methanolfixiert, P = PFA-fixiert.

### 3.2 Die Fluorophotometer-Analyse ergab keinen Unterschied zwischen K36-GFP und K72-GFP hinsichtlich Adhäsion und Eindringtiefe

Die verschiedenen SUPs wurden mit 80  $\mu\text{M}$  auf die Hornhaut von *ex vivo* Schweineaugen aufgetragen und die Fluoreszenzsignale mit einem okulären Fluorophotometer quantifiziert. Wie in 2.4. beschrieben, kann dieses Gerät die Intensität in Abhängigkeit von der Tiefe messen, indem es nacheinander Punkte entlang der optischen Achse (von der Netzhaut zur Hornhaut) durch das gesamte Auge fokussiert. Anschließend kombiniert es diese Signale zu einem Fluoreszenzprofil, das direkt proportional zur Konzentration der verwendeten SUP ist. Vor der Applikation wurde die native Fluoreszenz der Schweineaugen gemessen (prescan), um die gemessene Fluoreszenz nach der Applikation mit der Situation vor der Behandlung zu vergleichen. Die erste Messung wurde direkt nach der Applikation des Polypeptids durchgeführt. Das Signal wurde dann nach 5, 15, und 30 Minuten, sowie 1, 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden gemessen. In Abbildung 12 ist eine typische Fluoreszenzmessung für jedes gemessene SUP und die GFP-Kontrolle dargestellt.

Da die Fluoreszenzintensität stark vom Messgerät und dem Messaufbau abhängt, konnten keine SI-Einheiten angegeben werden. Während dieser Arbeit wurde der Versuchsaufbau stets konstant gehalten. Das höchste Signal wurde in der Regel direkt nach dem Auftragen auf die Hornhaut gemessen (instant). Die maximale Fluoreszenzintensität lag hier zwischen 1000-5000 Einheiten.

Die Messungen durch das Fluorophotometer (Abbildung 12) zeigen auch eine stetige Abnahme des Signals über die Zeit, was auf eine Diffusion der SUPs von der Hornhaut weg in die PBS-Lösung hinweist, während der Inkubation im PBS-Becher zwischen den unterschiedlichen Messpunkten. Das Eindringen der positiv geladenen SUPs ist nicht nachweisbar, da das Maximum der Fluoreszenzintensität immer am selben Punkt auf der optischen Achse bleibt.

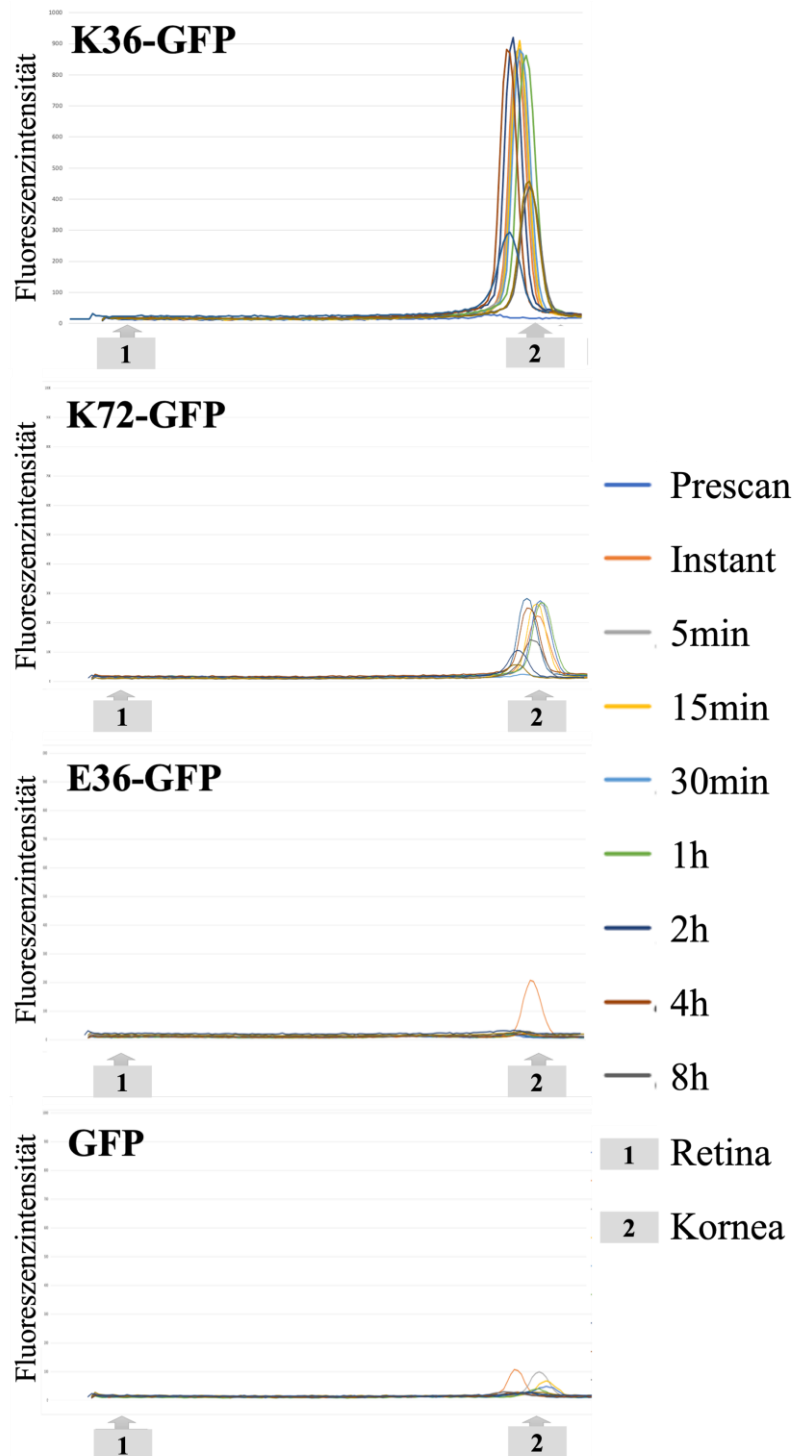


Abbildung 12: Keine intraokuläre Penetration von K36-GFP und K72-GFP

Fluorophotometer-Analyse von mit SUP behandelten Schweineaugen zeigt die Adhäsion von K36-GFP und K72-GFP über mind. 8 h. Die Fluoreszenzintensität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach topischer Verabreichung der SUPs (80  $\mu$ M) entlang der optischen Achse (X-Achse) in *ex vivo* Schweineaugen gemessen. Nach Verabreichung der SUPs wurden die Schweineaugen bis zu 8h in PBS gewaschen. Die mit der Zeit abnehmende Intensität zeigt die Diffusion der SUPs in das PBS an. (A) K36-GFP: hohe Fluoreszenzintensität über 8h, kein Hinweis auf Penetration (B) K72-GFP: anhaltende Fluoreszenzintensität über 8h, kein Hinweis auf Penetration (C) E36-GFP: kein Nachweis von Adhäsion (D) GFP: geringe Adhäsion über kurze Zeit.

Schweineaugen, behandelt mit 80  $\mu$ M K36-GFP, manifestierten konstante Fluoreszenzsignale über alle Erfassungszeitpunkte hinweg (Abbildung 13). Die Absolutwerte lagen im Bereich von 1700-5300 Einheiten. Im Vergleich zur Instant-Messung wurde nach einer Stunde eine 135 %ige Zunahme der Fluoreszenzintensität festgestellt, die erst nach vier Stunden abnahm. Schließlich sank die Intensität nach 48 Stunden auf 48 % im Vergleich zur Anfangsmessung (Abbildung 13). Diese Daten weisen auf eine sehr starke Bindung von K36-GFP an das Hornhautepithel hin.

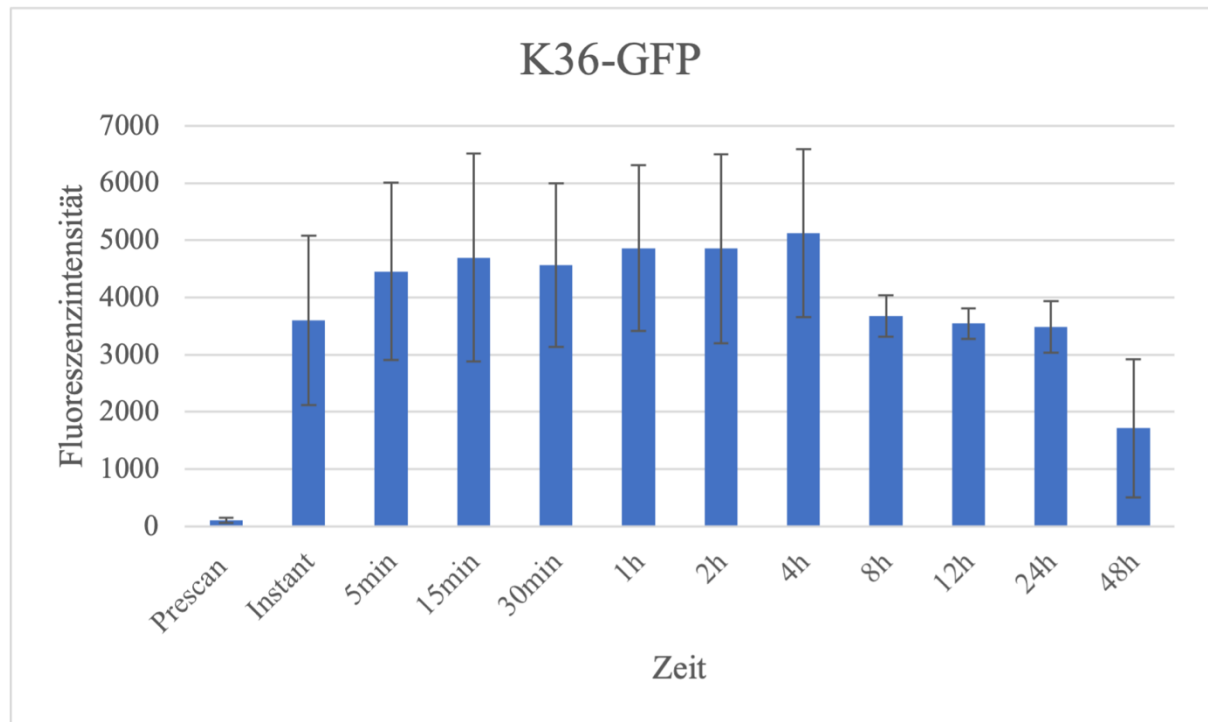


Abbildung 13 K36-GFP ist auf dem *ex vivo* Schweineauge mit dem Fluorophotometer 48 h lang nachweisbar

Integrierte Fluoreszenzintensität zu verschiedenen Zeitpunkten vor (prescan) und nach der Applikation von 80  $\mu$ M K36-GFP auf die Hornhaut in *ex vivo* Schweineaugen. Der Verlauf der nachgewiesenen Fluoreszenz im Laufe der Zeit deutet auf eine hohe Adhärenz von K36-GFP auf der Hornhaut des Schweineauges hin. N=6, Mittelwerte  $\pm$  SD.

Ähnliche Muster wie jene, die in den mit K36-GFP behandelten Schweineaugen zu beobachten waren, lassen sich ebenfalls bei der Exposition gegenüber K72-GFP erkennen. Die Fluoreszenzsignale blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg stabil. Im Gegensatz zur K36-GFP-Behandlung waren die absoluten Fluoreszenzwerte jedoch niedriger, im Durchschnitt um etwa 60 % (Abbildung 14). Außerdem lag das Fluoreszenzsignal bereits 12 Stunden nach der Behandlung unter dem Wert der unmittelbaren Messung. Schließlich konnte nach 48 h noch eine Intensität von 72 % nachgewiesen werden (Abbildung 14). Diese Daten verweisen ebenso auf eine ausgeprägte Affinität von K72-GFP zum Hornhautepithel.

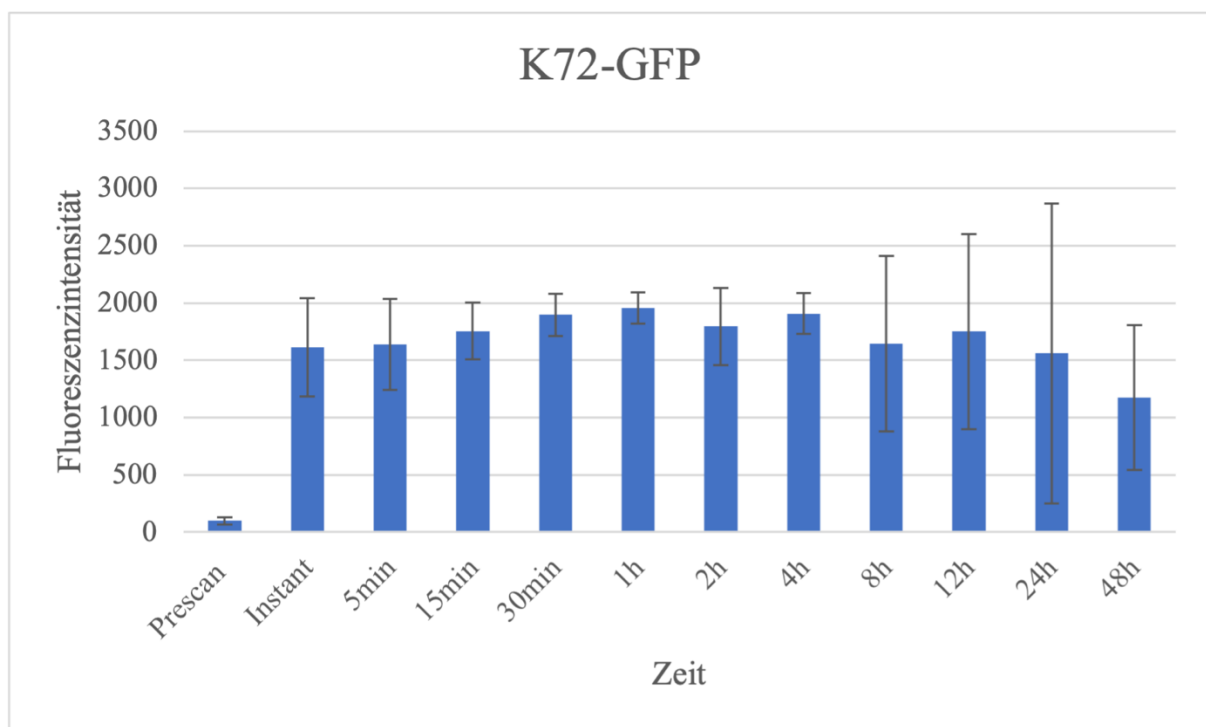


Abbildung 14 K72-GFP ist auf dem *ex vivo* Schweineauge mit dem Fluorophotometer für 48 h nachweisbar

Die Fluoreszenzintensität wurde vor (prescan) und nach Zugabe von 80  $\mu$ M K72-GFP auf die Hornhaut auf *ex vivo* Schweineaugen gemessen, und zwar zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Zunahme der nachweisbaren Fluoreszenz im Verlauf der Zeit legt nahe, dass K72-GFP eine längere Verweildauer auf der Hornhaut des Schweineauges aufweist. N=6, Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die Verwendung von reinem GFP ohne jegliche Zusätze wurde als Kontrolle durchgeführt, um den Vergleich zu ermöglichen (Abbildung 15). Bereits fünf Minuten nach der unmittelbaren Messung ist eine deutliche Abnahme des Signals um 30 % festzustellen. Nach Ablauf von 30 Minuten sind lediglich noch 28 % der anfänglichen Fluoreszenzintensität nachweisbar, und ab vier Stunden stabilisiert sich das Niveau bei konstanten 13 % bis zum Ende der Messperiode (Abbildung 15). Diese Beobachtungen deuten auf eine fehlende signifikante Bindung von GFP an die porcine Hornhaut hin und stärken die Hypothese, dass lediglich die positiv geladenen SUPs mit der negativ geladenen Kornea eine Wechselwirkung eingehen.

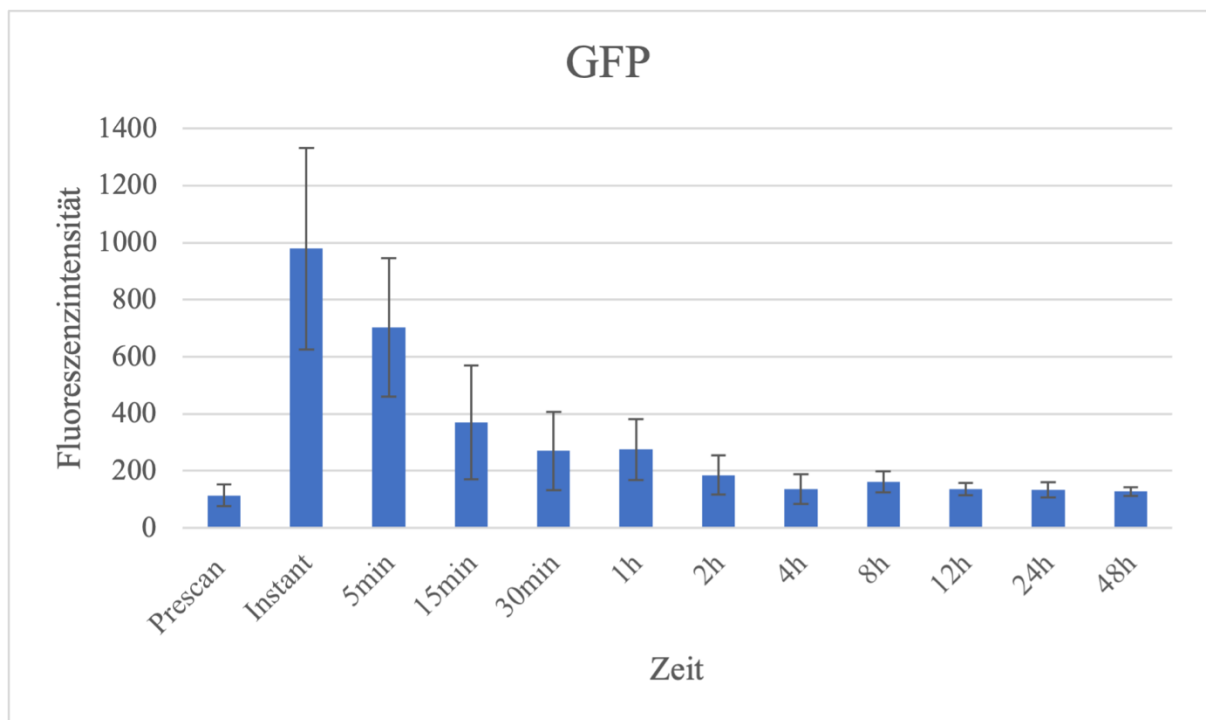


Abbildung 15 Mittels Fluorophotometrie wurde keine langanhaltende Adhäsion von GFP auf *ex vivo* Schweineaugen beobachtet

Integrierte Fluoreszenzintensität zu verschiedenen Zeitpunkten vor (prescan) und nach der Applikation von 80  $\mu$ M GFP auf die Hornhaut in *ex vivo* Schweineaugen. Die deutliche Verringerung der nachgewiesenen Fluoreszenz im Verlauf der Zeit lässt darauf schließen, dass das GFP auf der Hornhaut der Schweineaugen nur für eine begrenzte Zeitspanne verbleibt. N=6, Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die E36-GFP-Kontrolle (Abbildung 16) ist negativ geladen und sollte daher theoretisch von der elektrisch negativen Hornhaut abgestoßen werden. Die Fluoreszenzmessdaten unterstützen diese Theorie. Bereits nach 5 Minuten waren nur noch 20 % der Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Instant-Messwert messbar (Abbildung 16). Nach 15 min betrug das Fluoreszenzsignal nur noch 12 % und blieb bis 48 h - dem Ende der Messung - auf diesem Wert.

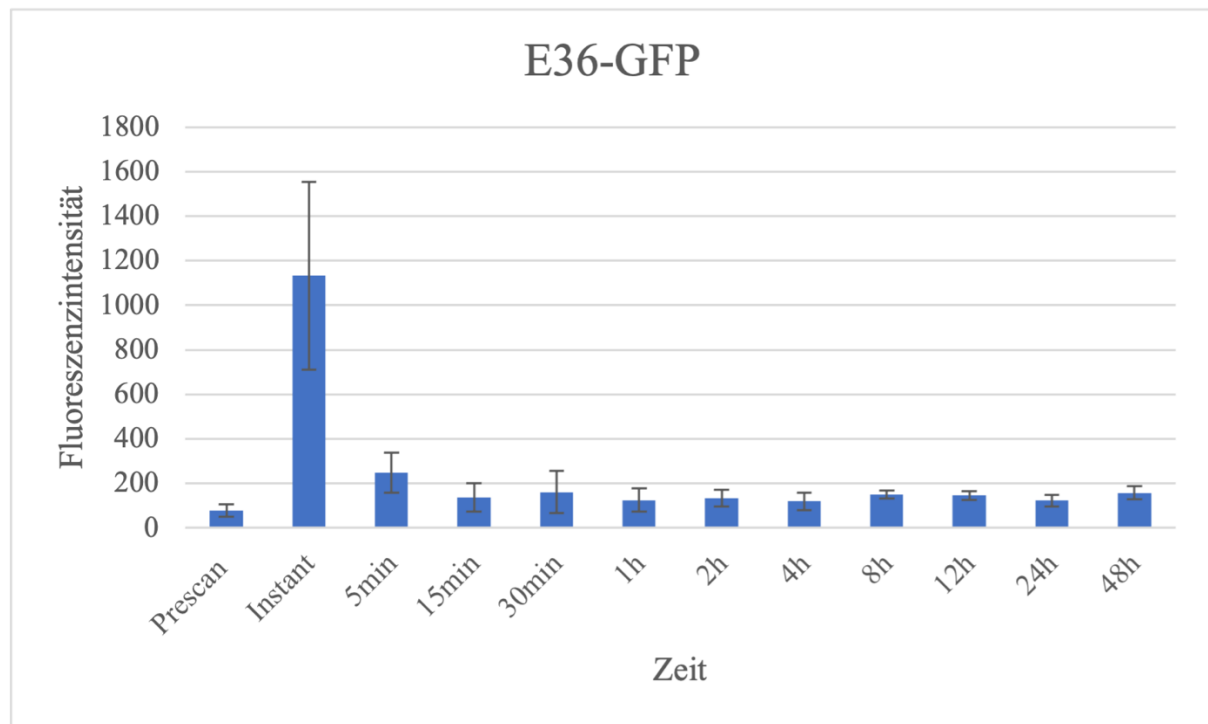


Abbildung 16 Die fluorophotometrische Untersuchung ergibt keine anhaltende Adhäsion von E36-GFP auf Schweineaugen

Integrierte Fluoreszenzintensität zu verschiedenen Zeitpunkten vor (prescan) und nach der Applikation von 80  $\mu$ M E36-GFP auf die Hornhaut in *ex vivo* Schweineaugen. Die deutliche Reduktion der festgestellten Fluoreszenz im zeitlichen Verlauf deutet auf eine kurze Verweildauer von E36-GFP auf der Hornhaut des Schweineauges hin. N=6, Mittelwerte  $\pm$  SD.

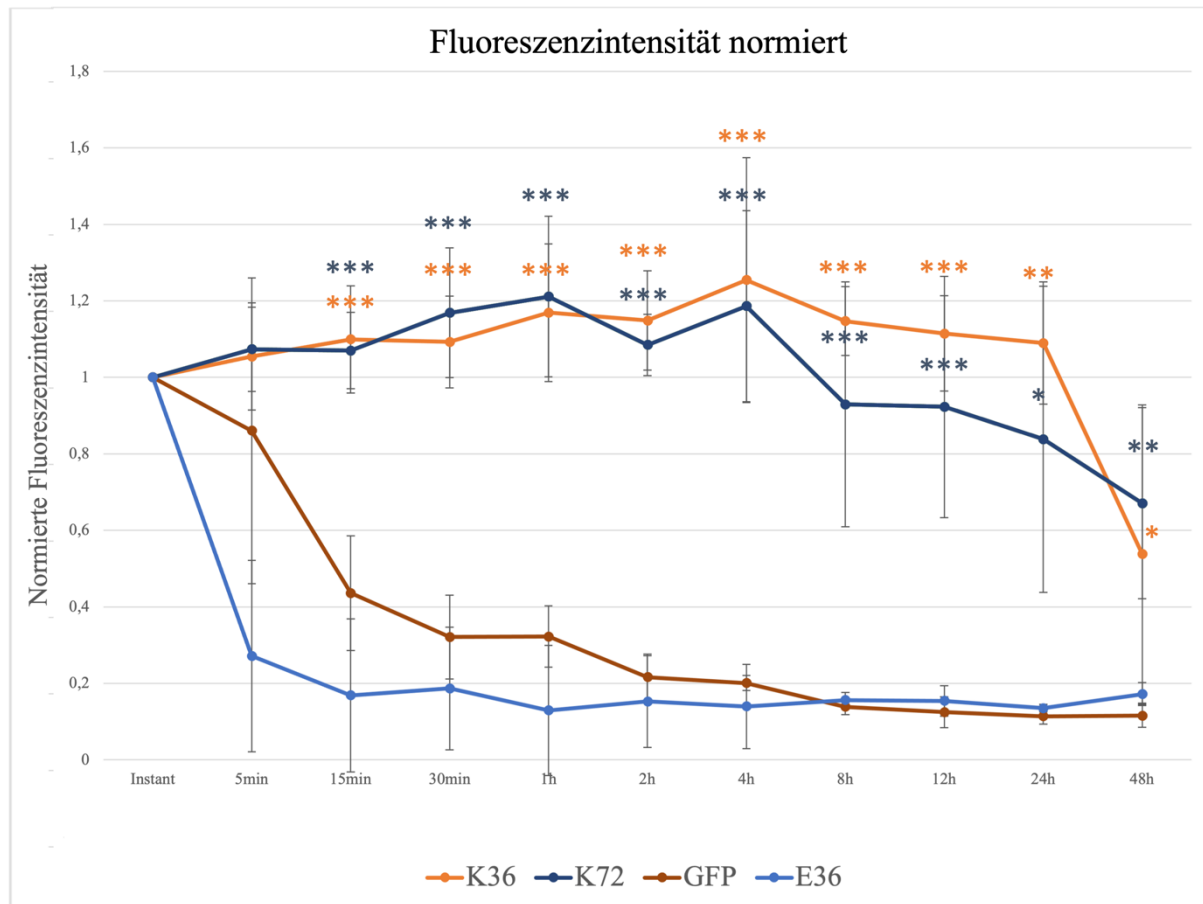


Abbildung 17 Die Fluorophotometeranalyse ergab eine signifikante Adhäsion von K36-GFP und K72-GFP an der Hornhaut von Schweineaugen

Die Schweineaugen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 80  $\mu$ M K36-GFP, K72-GFP, GFP und E36-GF behandelt. Die Fluoreszenzintensität wurde auf die Anfangsmessung jeder Behandlung normiert. K36-GFP und K72-GFP haften im Vergleich zu GFP und E36-GFP während des gesamten Messzeitraums signifikant an der Schweinehornhaut. N=6, Tukey-HSD, statistische Unterschiede sind mit \* bei  $p < 0,05$ , \*\* bei  $p < 0,01$  und \*\*\* bei  $p < 0,001$  im Vergleich zur GFP-Kontrolle angegeben.

Um die verschiedenen SUPs miteinander vergleichen zu können, wurde eine Normalisierung auf die erste Messung, welche unmittelbar nach der Applikation gemessen wurde, durchgeführt (Abbildung 17). In der Fluorophotometer-Analyse zeigten sowohl K36-GFP als auch K72-GFP eine lange Adhärenz an der Hornhaut (Abbildung 17). Im Vergleich zur GFP-Kontrolle war die Adhäsion von K36-GFP und K72-GFP an der Hornhaut durchgehend signifikant (Abbildung 17).

### 3.3 Sowohl K72-GFP als auch K36-GFP sind in der Muzinschicht lokalisiert

Zur genaueren Bestimmung der exakten Bindungslokalisation von K36-GFP und K72-GFP an der porcinen Hornhaut wurden Antikörperfärbungen mit Galektin-3 und Mucin-1 durchgeführt. Beide Substanzen sind essenzielle Bestandteile der Glykokalyx, welche wiederum den basalen Anteil der Muzinschicht darstellt. Galektin-3 ist ein multimeres kohlenhydratbindendes Protein, das von den Epithelien der Augenoberfläche exprimiert wird. Unter physiologischen Bedingungen bildet es eine Barrierefunktion, indem es mit Transmembranschleimhäuten auf der apikalen Glykokalyx interagiert. [11] MUC1 ist ein membrangebundenes Muzin der Muzinschicht, wie in 1.1.2.1. beschrieben.

In der Galektin-3 Antikörperfärbung (Abbildung 18A) zeigen sowohl die K36-GFP als auch die K72-GFP Proben ein ähnliches Muster. Das jeweilige SUP ist im GFP-Kanal als durchgehende grüne Linie im apikalen Teil der kornealen Epithelschicht zu erkennen. Bei der Galektin-3 Darstellung ist ebenfalls in beiden Proben (K36-GFP und K72-GFP) ein nahezu durchgängiges oranges Signal zu sehen. Die Überlagerung der Kanäle zeigt ein gelbes Signal, was auf eine Kollokalisierung des SUPs und des Galektin-3 in der apikalen Epithelschicht hinweist.

Bei der MUC 1-Antikörperfärbung (Abbildung 18B) erscheinen beide Signale durchgängig an der apikalen Seite der Hornhaut. Das grünleuchtende Signal von K36-GFP und K72-GFP und das orangeleuchtende Antikörpersignal des MUC1-Moleküls sind in der Überlagerung stellenweise gelb zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass sowohl K36-GFP als auch K72-GFP nach Applikation auf die porcine Hornhaut in der Muzinschicht lokalisiert sein. Diese Beobachtungen unterstützen erneut die Hypothese, dass die positiv geladenen SUPs an das negativ geladene apikale Epithel der porcinen Hornhaut binden.

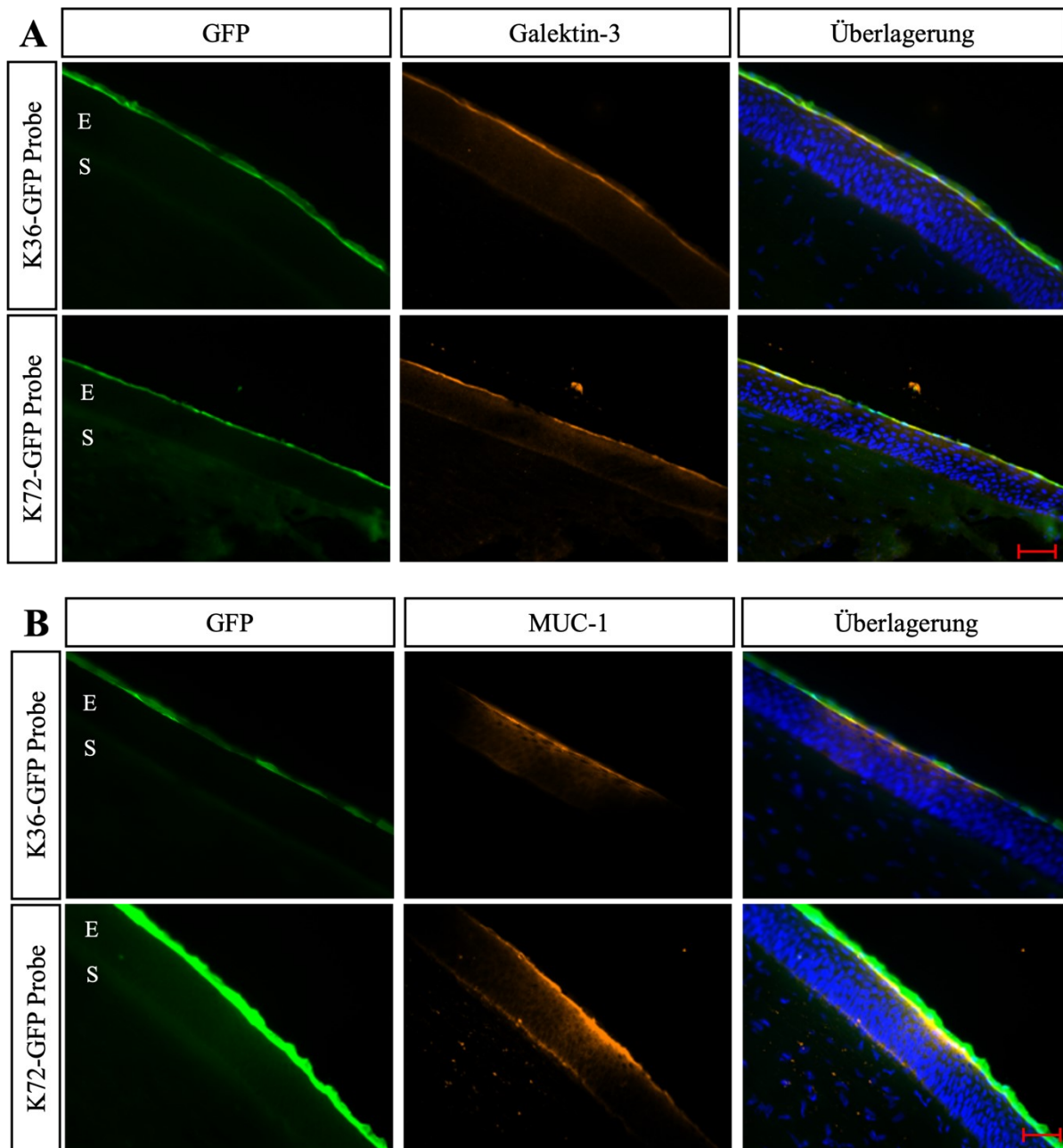


Abbildung 18 K36-GFP und K72-GFP adhäreren in der Muzinschicht

- A. Galektin-3-Antikörperfärbung auf Schweinekryoschnitten weist auf die Lokalisation von K36-GFP und K72-GFP in der Muzinschicht hin. Die Schweineaugen wurden je eine Stunde lang mit K36-GFP oder K72-GFP behandelt. Die Signale von GFP (grün) und Galektin-3 (rot) sind bei K72-GFP- und K36-GFP-Proben kolokalisiert (gelb).  
E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m
- B. Die MUC-1-Antikörperfärbung auf den Schweinekryoschnitten gibt Hinweis auf die Lokalisation von K36-GFP und K72-GFP in der Muzinschicht. Die Schweineaugen wurden je eine Stunde lang mit K36-GFP oder K72-GFP behandelt. Die Signale von GFP (grün) und Mucin-1 (orange) werden von K72-GFP- und K36-GFP-Proben kolokalisiert (gelb).  
E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m

### 3.4 K36-GFP haftet an der Hornhaut von *ex vivo* Kaninchenaugen

In Anbetracht der Tatsache, dass K36-GFP in den vorherigen Experimenten tendenziell die bemerkenswertesten Signale bei den histologischen Untersuchungen hervorbrachte (vgl. Abbildung 7-10), wurde dieses Fluoreszenzprotein gezielt zur Adhäsionstestung an *ex vivo* Kaninchenaugen eingesetzt. Hierbei diente die Nutzung von Kaninchenaugen als zusätzliche Spezies dazu, die Erkenntnisse aus den Untersuchungen an Schweineaugen zu erweitern und zu validieren. 80  $\mu$ M K36-GFP wurden auf Kaninchenaugen getropft und für 15 und 30 Minuten inkubiert. In den Kryoschnitten zeigte K36-GFP sowohl nach 15 als auch nach 30 Minuten ein starkes Fluoreszenzsignal (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu war in mit der GFP-Kontrolle behandelten Augen nach 15 min kein Signal mehr nachweisbar (Abbildung 19). Da die frühere Inkubationszeit bereits kein Signal zeigte, wurden nach 15 min keine weiteren Zeitpunkte für GFP getestet.

Zudem wurde verglichen, ob eine unterschiedliche Fixierung (Methanol / PFA) zu einer Verstärkung oder einer Verringerung des GFP-Signals führt. Im Vergleich zu den Methanol-fixierten Schnitten (Abbildung 19) zeigten die PFA-fixierten Schnitte ein intensiveres Signal (Abbildung 20). Die GFP-Kontrolle war bei beiden Fixierungsarten - PFA (Abbildung 20) und Methanol (Abbildung 19) - negativ.

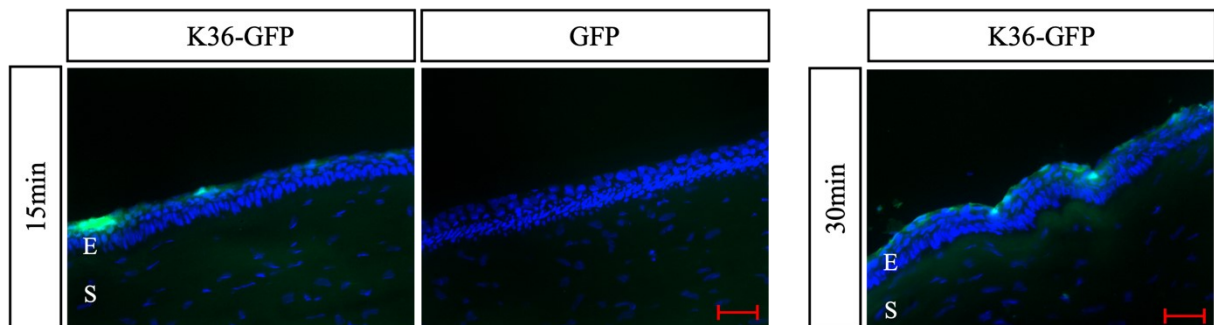


Abbildung 19 K36-GFP haftet mindestens 30 Minuten lang am Hornhautepithel von Kaninchen (mit Methanolfixierung)

Repräsentative Bilder des Hornhautepithels von *ex vivo* Kaninchen, das mit 80  $\mu$ M K36-GFP oder GFP-Kontrolle behandelt wurde. Zellkerne gefärbt mit DAPI (blau), Fixierung: Methanol. Signale von K36-GFP (grün) nach 15 und 30 Minuten. Kein GFP-Kontrollsignal nachweisbar. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m.

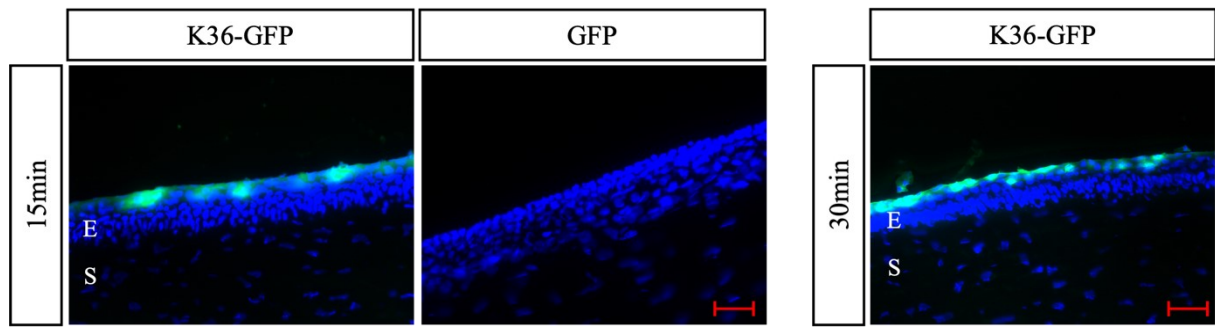


Abbildung 20 K36-GFP haftet mindestens 30 Minuten lang am Hornhautepithel von Kaninchen (mit PFA-Fixierung)

Exemplarische Aufnahmen des Hornhautepithels *ex vivo* von Kaninchen, welches einer Behandlung mit 80  $\mu$ M K36-GFP oder einer GFP-Kontrolle unterzogen wurde. Die K36-GFP-Signale (grün) waren nach 15 und 30 Minuten erkennbar. Hingegen war kein nachweisbares GFP-Kontrollsignal feststellbar. Zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI (blau) verwendet. Die Fixierung erfolgte mittels PFA.. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken 50  $\mu$ m.

| Zeit   | K36-GFP  |     | GFP-Kontrolle |     |
|--------|----------|-----|---------------|-----|
|        | Methanol | PFA | Methanol      | PFA |
| 15 min | 2/2      | 2/2 | 0/2           | 0/2 |
| 30 min | 2/2      | 2/2 | -             | -   |

Tabelle 8 Überblick über die mit 80  $\mu$ M K36-GFP und GFP-Kontrolle behandelten Hornhautepithelproben von Kaninchen

Anzahl der Augen, in denen ein Signal von K36-GFP oder GFP gefunden wurde, bezogen auf die Gesamtzahl der Augen, denen die Augentropfen verabreicht wurden. K36-GFP war zu jedem Zeitpunkt und in jeder Fixierungsart zu 100% nachweisbar, während die GFP-Kontrolle stets negativ war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keinen deutlichen Unterschied zwischen den verschiedenen Fixierungsmethoden hinsichtlich des Vorhandenseins des Signals gab (Tabelle 8).

### 3.5 Adhäsion der positiven SUPs auf der murinen Hornhaut *in vivo*

Letztendliches Ziel der SUP-Anwendung ist ihre Verwendung als periokuläre Trägerstoffe beim Menschen. Hierbei ist es essenziell sicherzustellen, dass die Polypeptide auch an einem lebenden Auge adhäreren können. Die Simulation des Tränenfilms und der Lidschlag konnte in den bisherigen *ex vivo* Experimenten nur begrenzt nachgeahmt werden. Diese Aspekte spielen jedoch eine herausragende Rolle für die Haftung der SUPs an der Hornhaut aufgrund ihrer signifikanten mechanischen Einflüsse. Vor diesem Hintergrund wurde eine *in vivo* Testreihe an Rattenaugen durchgeführt.

Die SUPs (K36-GFP, K72-GFP und die Negativkontrolle E36-GFP) sowie GFP allein wurden in einer Konzentration von 80 µM und einem Volumen von 50 µl einmalig auf die Augen von Ratten appliziert. Nachfolgend erfolgte eine Wartezeit von 30 Minuten, bevor die Ratten euthanasiert wurden. Die Auswahl dieser vergleichweisen kurzen Zeitspanne wurde getroffen, um primär zu eruieren, ob eine Bindung der Substanzen erfolgt.

Ein nachweisbares Fluoreszenzsignal war bei den positiv geladenen SUPs verifizierbar (Abbildung 21A). K36-GFP und K72-GFP zeigten jeweils in drei von vier Schnitten Adhäsionssignale (Abbildung 21B). E36-GFP, die negativ geladene Variante von K36-GFP, wurde als Negativkontrolle getestet (Abbildung 21A). Sowohl die Kontrollen - GFP als auch E36-GFP - wiesen in sämtlichen Abschnitten keine Adhäsionssignale auf. Vor diesem Hintergrund kann man annehmen, dass die positiv geladenen SUPs und nicht das GFP an den Hornhäuten anhaften. Daraus resultierte die Entscheidung, die Kontrollen bei längeren Inkubationszeiten zu umgehen, mit dem Ziel, die Anzahl der notwendigen Tierversuche zu minimieren.

Aufgrund der positiven Adhäsion von K36-GFP und K72-GFP über 30 Minuten wurden anschließend auch längere Zeiträume getestet. Diese wurden auf 1, 2 und 4 Stunden festgelegt.

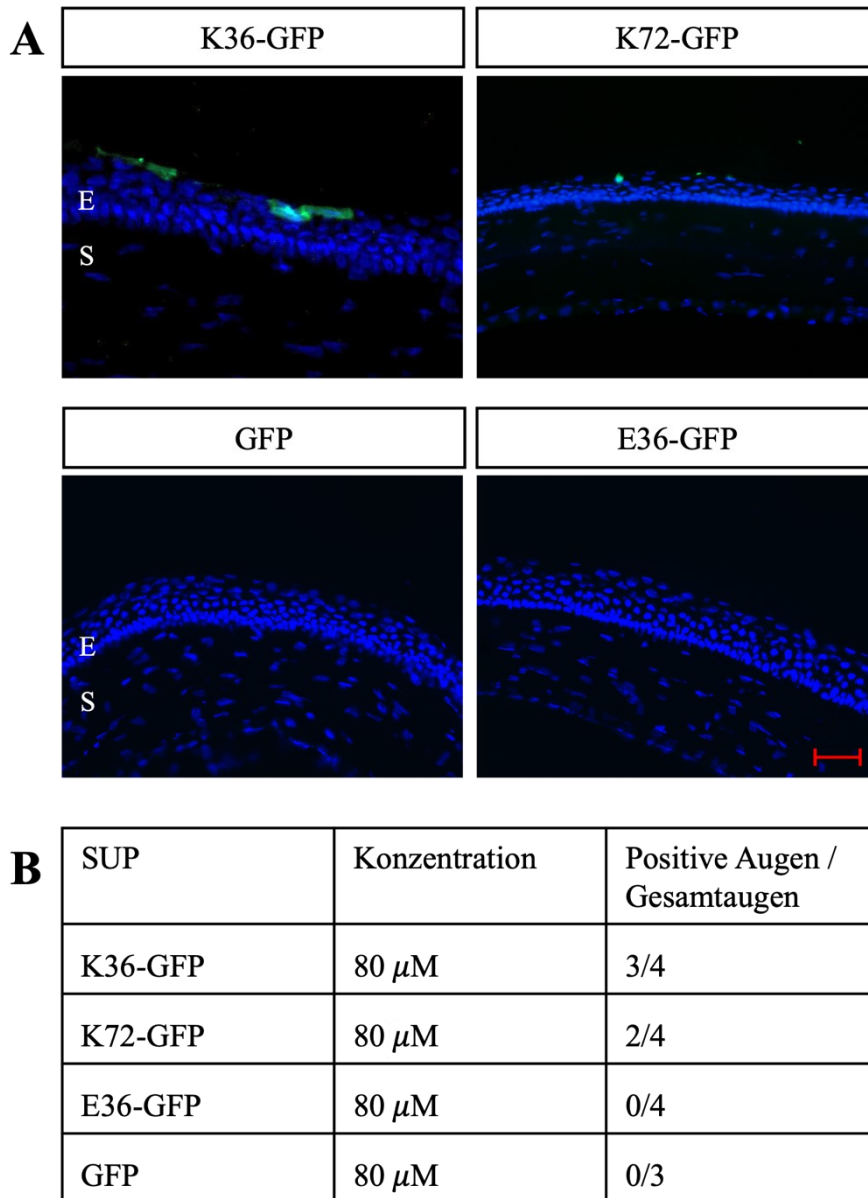


Abbildung 21 K36-GFP und K72-GFP zeigen Adhärenz auf *in vivo* Rattenaugen

Rattenaugen, die *in vivo* 30 Minuten lang mit der optimalen Konzentration von 80  $\mu$ M aller SUPs behandelt wurden (A): Darstellungen des murinen Hornhautepithels nach einer 30-minütigen Behandlung mit K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP und GFP, jeweils in einer Konzentration von 80  $\mu$ M. Die K36-GFP- und K72-GFP-Signale (in grün) sind nachweisbar. Die Zellkerne wurden durch DAPI (blau) eingefärbt. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m (B): Anzahl der Augen, in denen ein Signal von K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP oder GFP gefunden wurde, bezogen auf die Gesamtzahl der Augen, denen die Augentropfen verabreicht wurden.

Die stärksten Signale von K36-GFP wurden nach 30 Minuten und 1 Stunde (Abbildung 22A) mit positiven Signalen in 3 von 4 Schnitten beobachtet. Mit zunehmender Inkubationszeit nahm die Stärke des Fluoreszenzsignals immer mehr ab (Abbildung 22A, B). Nach 4 Stunden hatte noch einer von 4 Abschnitten positive Signale (Abbildung 22B).

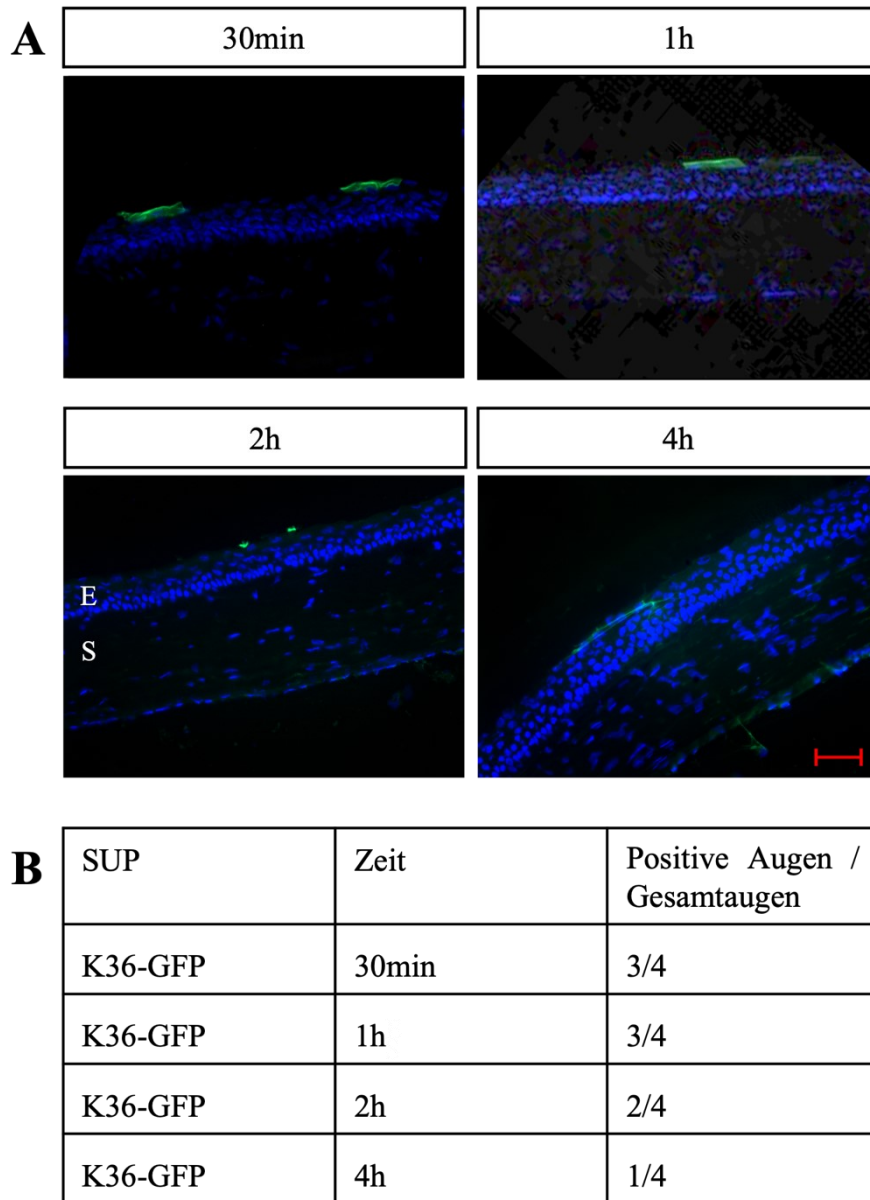


Abbildung 22 K36-GFP ist nach 4 h in *in vivo* Rattenaugen nachweisbar

Rattenaugen, die *in vivo* mit K36-GFP behandelt wurden und unterschiedlichen Inkubationszeiten unterlagen. (A): Repräsentative Bilder des Hornhautepithels der Ratte, das mit 80  $\mu$ M K36-GFP behandelt und für 0,5-4 h inkubiert wurde. Zu allen gemessenen Zeitpunkten konnte eine Adhärenz des K36-GFPs nachgewiesen werden, wobei nach 1h Inkubationszeit weniger Signale gemessen wurden. Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m (B): Anzahl der Augen, in denen ein Signal von K36-GFP gefunden wurde, bezogen auf die Gesamtzahl der Augen, denen die Augentropfen verabreicht wurden.

K72-GFP hat die gleiche, aber doppelt so lange Sequenz wie K36-GFP und somit ebenfalls eine positive Ladung. Ein Signal von K72-GFP ist nach 30 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden Inkubationszeit zu sehen (Abbildung 23A). Im Vergleich zu K36-GFP (Abbildung 22) waren die Signale von K72-GFP sehr klein und schmaler (Abbildung 23A). Darüber hinaus wurde nach 4 Stunden kein Signal von K72-GFP mehr festgestellt (Abbildung 23A,B).

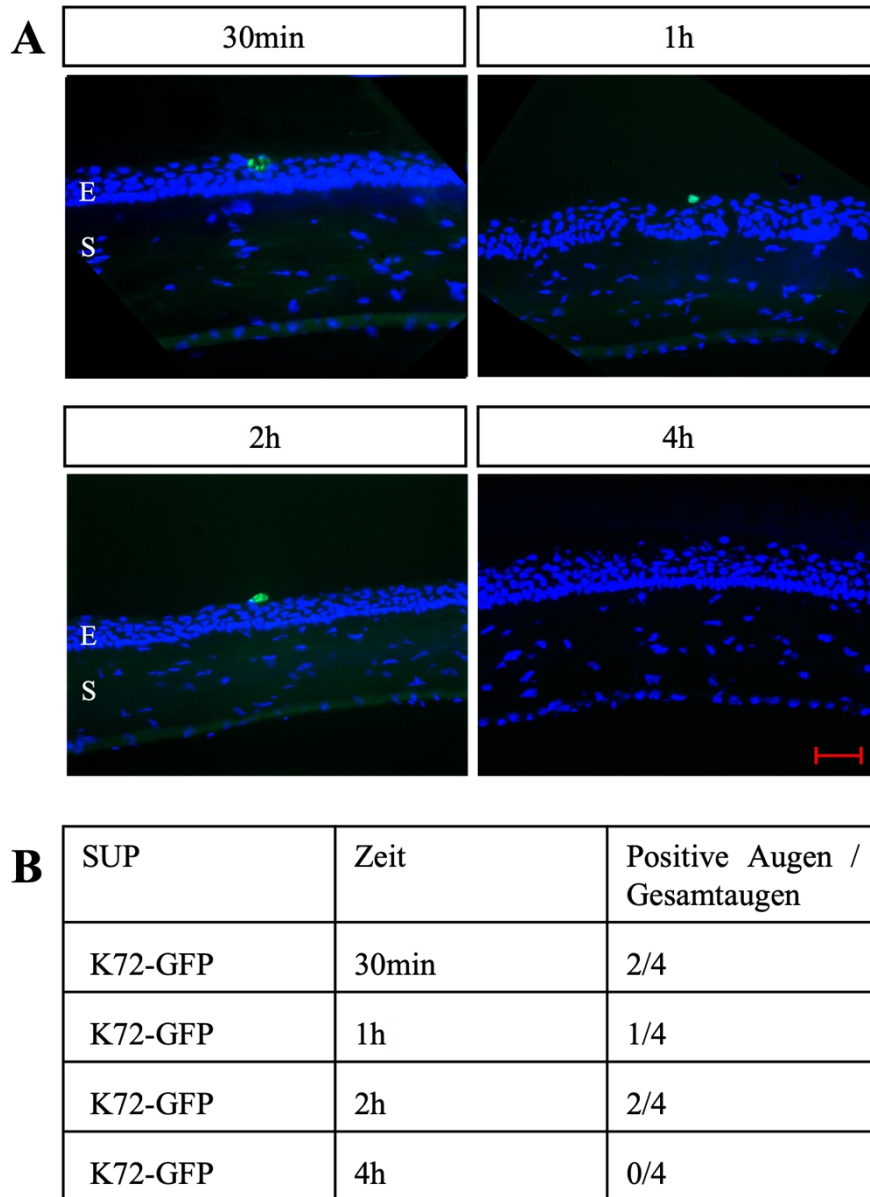


Abbildung 23 K72-GFP ist nach 2 h bei *in vivo* Rattenäugen nachweisbar

*In vivo* mit K72-GFP behandelte Rattenäugen für verschiedene Inkubationszeiten (A): Repräsentative Bilder des Hornhautepithels der Ratte, das mit K72-GFP mit 80µM und unterschiedlichen Inkubationszeiten behandelt wurde. Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Signale von K72-GFP (grün) nach 30 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken: 50 µm (B): Anzahl der Augen, in denen ein Signal von K72-GFP gefunden wurde, bezogen auf die Gesamtzahl der Augen, denen die Augentropfen verabreicht wurden.

Die umfassende Bewertung der Adhäsionseigenschaften der SUPs an *in vivo* Rattenaugen (Tabelle 9) verdeutlicht eine Haftung von K36-GFP über einen Zeitraum von 4 Stunden und von K72-GFP über 2 Stunden. In den Kontrollversuchen (GFP und E36-GFP) wurde bei einer Konzentration von 80  $\mu$ M kein detektierbares Signal erfasst. Im Verlauf der Zeit ließ sich eine Abnahme der nachweisbaren Signale von K36-GFP und K72-GFP beobachten.

| Zeit  | K36-GFP | E36-GFP | K72-GFP | GFP-Kontrolle |
|-------|---------|---------|---------|---------------|
| 30min | 3/4     | 0/4     | 2/4     | 0/4           |
| 1h    | 3/4     | 0/4     | 1/4     | 0/4           |
| 2h    | 2/4     | 0/4     | 2/4     | 0/4           |
| 4h    | 1/4     | 0/4     | 0/4     | 0/4           |

Tabelle 9 SUPs haften an *in vivo* Rattenaugen

Überblick über die mit K36-GFP, E36-GFP, K72-GFP oder GFP-Kontrolle behandelten Hornhautepithelproben von Ratten, jeweils 80  $\mu$ M. Dargestellt ist die Anzahl der Augen, in denen ein Signal eines SUPs gefunden wurde, bezogen auf die Gesamtzahl der getesteten Augen. K36-GFP zeigte die stärksten und längsten Signale (4h), gefolgt von K72-GFP, dass nur bis zu 2h Signale zeigte. Bei den Kontrollen GFP und E36-GFP konnten keine Signale festgestellt werden. .  = 75 %,  = 50 %,  = 25 %,  = 0 %.

### 3.5.1 Bestätigung der Lokalisierung von K36-GFP in der murinen Muzinschicht

Um die Lokalisierung der SUPs in der murinen Muzinschicht zu prüfen, wurden auch bei den Schnitten der Rattenaugen eine Mucin-Antikörperfärbung durchgeführt (s. Kapitel 2.6). Durch eine Ko-färbung lässt sich so mit den GFP-gekoppelten SUPs eine Kolokalisierung überprüfen. Die Rattenaugen wurden mit K36-GFP in einer Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  behandelt und anschließend 30 Minuten inkubiert. Eine Ko-Lokalisierung des K36-GFP mit MUC-1 konnte beobachtet werden (Abbildung 24), was auf eine Adhärenz des SUPs in der Muzinschicht hinweist. Dies steht im Einklang mit der Theorie, dass ihre positive Ladung mit der negativen Ladung der Muzinschicht interagiert und somit eine Bindung an dieser stattfindet.

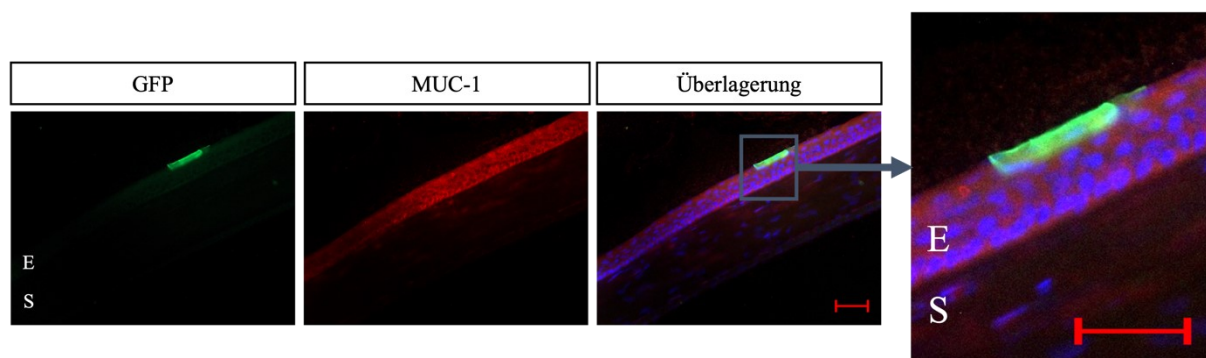


Abbildung 24 K36-GFP haftet bei *in vivo* Rattenaugen in der Mucinschicht

MUC-1-Antikörper auf Hornhautepithelproben von Ratten zeigen die Adhäsion von K36-GFP in der Muzinschicht. Die Augen wurde 30 Minuten lang mit K36-GFP behandelt und anschließend mit DAPI (blau) gefärbte Zellkerne. Die Signale von K36-GFP (grün) sind mit den Mucin-1-Signalen (rot) kolokalisiert. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken: 50  $\mu\text{m}$

### 3.6 Zelluläre Adhäsion von SUPs in drei verschiedenen Zelllinien

Um zu sehen, wie die SUPs auf zellulärer Ebene binden, wurden primäre Müller- und Hornhautzellen aus Schweineaugen sowie die menschliche Müllerzelllinie MIO-M1 verwendet.

Primäre Epithel und Müllerzellen, als auch die humane MIO-M1 Zelllinie wurden 24 Stunden lang mit 20  $\mu$ M SUPs (K36-GFP, E36-GFP, K72-GFP und GFP-Kontrolle) inkubiert, fixiert und anschließend mit DAPI gefärbt. In der DAPI-Färbung zeigen die SUPs eine lebendige grüne Fluoreszenz in den Hornhautepithelzellen, sowohl peri- als auch intrazellulär. In den MIO-M1-Zellen hingegen ist ihre Präsenz zwischen den Zellen bei K36-GFP deutlich geringer und bei K72-GFP punktuell erkennbar. Ein ähnliches Muster ist bei den Müllerzellen zu beobachten, wobei K36-GFP und K72-GFP hier diffus punktuell erscheinen (Abbildung 25).

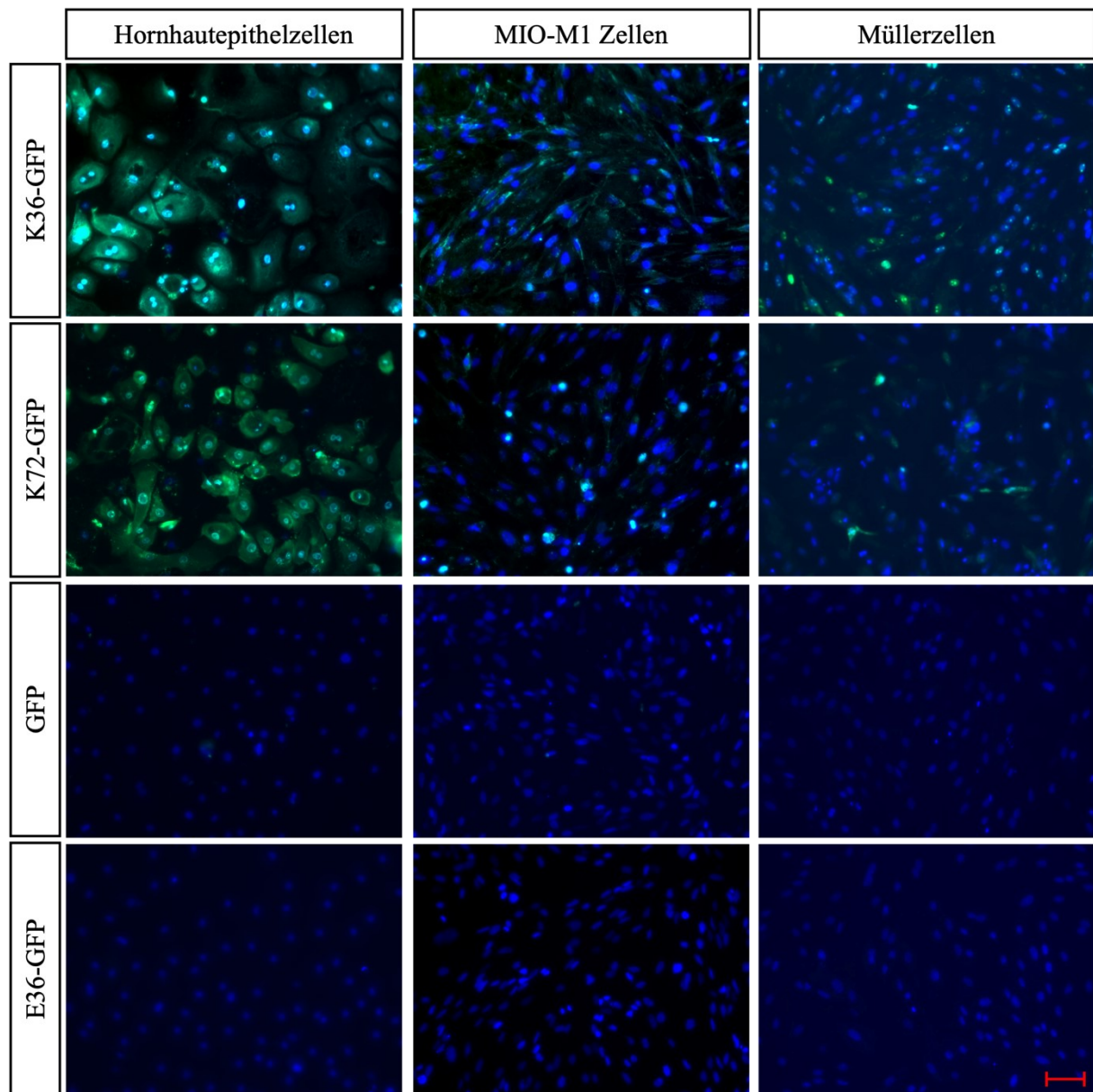


Abbildung 25 Positiv geladene SUPs zeigen Adhäsion an Zellen

Repräsentative Bilder von Hornhautepithel- / MIO-M1- / Müller-Zellen, die 24 Stunden lang mit 20  $\mu$ M K36-GFP, E36-GFP, K72-GFP oder GFP-Kontrolle inkubiert wurden. Signale von K36-GFP (grün) und K72-GFP (grün) sind in jedem Zelltyp nachweisbar, am meisten jedoch in Epithelzellen. Es sind keine Signale von E36-GFP oder GFP-Kontrolle nachweisbar. Mit DAPI (blau) gefärbte Zellkerne. Maßstabsbalken 50  $\mu$ m.

|                      | <b>K36-GFP</b>         | <b>K72-GFP</b>         | <b>E36-GFP</b>        | <b>GFP</b>            |
|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Epithelzellen</b> | 84.3<br>(SEM: +/- 1.8) | 89.0<br>(SEM: +/- 3.0) | 0.7<br>(SEM: +/- 0.7) | 3.1<br>(SEM: +/- 1.8) |
| <b>MIO-M1</b>        | 21.5<br>(SEM: +/- 9.5) | 20.5<br>(SEM: +/- 0.5) | 0.0<br>(SEM: +/- 0)   | 0.0<br>(SEM: +/- 0)   |
| <b>Müllerzellen</b>  | 21.6<br>(SEM: +/- 3.6) | 11.3<br>(SEM: +/- 1.7) | 0.0<br>(SEM: +/- 0)   | 0.0<br>(SEM: +/- 0)   |

Tabelle 10 Quantifizierung der mit K36-GFP, E36-GFP, K72-GFP oder GFP-Kontrolle behandelten Zelllinien

Angegeben ist der Gesamtdurchschnitt der SUP-positiven Epithel- / MIO-M1- / Müllerzellen pro Epithel- / MIO-M1- / Müllerzellen in % mit SEM.

Eine Adhäsion (grünes Signal) von positiv geladenen SUPs wurde bei allen drei Zelltypen gefunden, besonders aber bei den porcinen Hornhautepithelzellen (Abbildung 25). Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals bestätigte den offensichtlichen Befund (Tabelle 10). Bei Epithelzellen hafteten K36-GFP ( $p < 0,0005$ ) und K72-GFP ( $p < 0,0005$ ) signifikant besser als die GFP-Kontrolle. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Adhäsion zwischen den positiv geladenen SUPs auf Hornhautepithelzellen. Bei MIO-M1-Zellen hafteten K36-GFP ( $p < 0,05$ ) und K72-GFP ( $p < 0,0005$ ) ebenfalls signifikant besser als die GFP- und E36-GFP-Kontrollen. Das gleiche Ergebnis konnte bei den Müllerzellen beobachtet werden (K36-GFP  $p < 0,005$  ; K72-GFP  $p < 0,005$ ). Zwischen den Zelltypen hafteten die positiv geladenen SUPs signifikant stärker an den Epithelzellen ( $p < 0,0005$ ). Dies beweist die signifikante Anhaftung von positiv geladenen SUPs an Zellen.

### 3.7 SUPs zeigen eine sehr gute Biokompatibilität

Die Biokompatibilität wurde bereits, wie in der Einleitung beschrieben, von *Pesce et. al.* [28] mit verschiedenen *in vitro*-Tests überprüft. Jedoch wurden diese Tests nicht spezifisch am Hornhautepithel durchgeführt. Daher wurden zur Evaluierung der Biokompatibilität HE-, PAS- und TUNEL-Färbungen eingesetzt.

#### 3.7.1 Keine zellulären morphologischen Auffälligkeiten nach SUP Behandlung

Die HE-Färbung wird für morphologische Untersuchungen verwendet. Anhand der Morphologie der Zellen kann eine erste Einschätzung hinsichtlich einer möglichen toxischen Wirkung der zu untersuchenden Substanz vorgenommen werden. Nekrose wäre zytologisch vor allem durch Kernveränderungen erkennbar: Pyknose (Kernschrumpfung), Karyorrhexis und Karyolysis. Bei der HE-Färbung wäre eine starke Eosinophilie des Zytoplasmas ebenfalls ein Hinweis auf nekrotische Prozesse.

Nach einer Expositionsdauer von vier Stunden gegenüber einer Konzentration von 80 µM K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP oder GFP zeigt das porcine Hornhautepithel eine unveränderte morphologische Struktur, wie in Abbildung 26 dargestellt. Die Zellkerne weisen eine regelmäßige Anordnung auf und sind von normativer Größe, ohne Anzeichen von Pyknose. Das Zytoplasma offenbart bei jeder Einzelbehandlung (K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP und GFP) eine subtile rosafarbene Tönung. Es sind keinerlei morphologische Abweichungen zwischen den verschiedenen Behandlungen festzustellen.

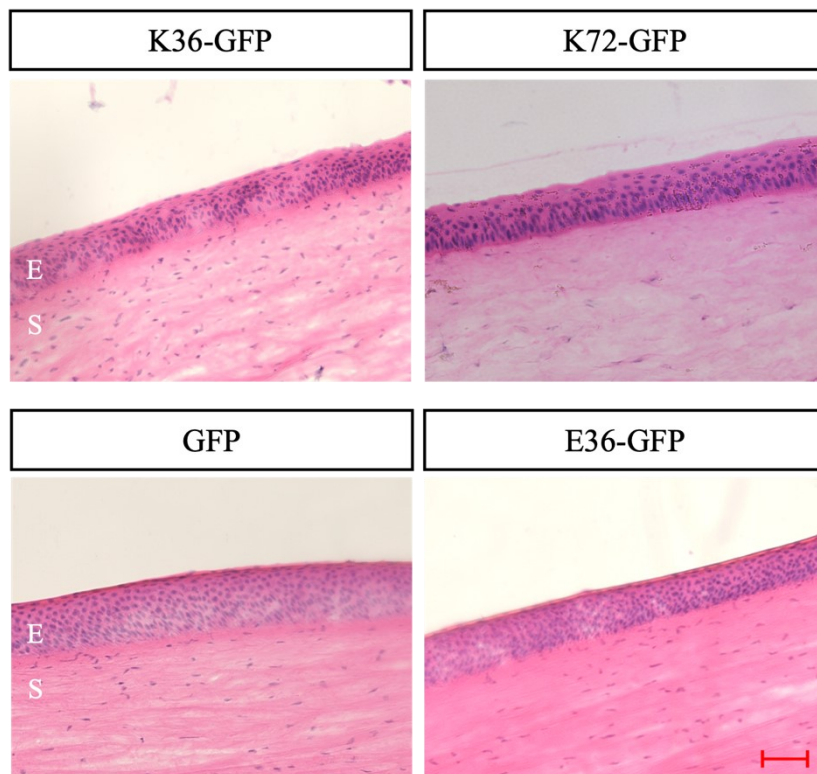


Abbildung 26 Regelhafte Morphologie in HE-Färbung nach SUP-Behandlung von Schweineaugen

HE-Färbung von Schweinekryoschnitten, die vier Stunden lang mit K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP und GFP mit 80  $\mu$ M behandelt wurden. Es zeigt sich eine normal konfigurierte Zellmorphologie. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

Die morphologische Analyse der Hornhautepithelstrukturen der Rattenaugen nach einer vierstündigen SUP-Behandlung zeigt, wie auch bei den Schweineaugen (Abbildung 26), eine unveränderte Erscheinung (Abbildung 27). Die Zellkerne präsentieren ebenfalls eine unauffällige morphologische Konfiguration. Sie weisen eine regelmäßige Anordnung und normale Größe auf, während eine homogene Größenverteilung der Zellen untereinander festzustellen ist (Abbildung 27). Das Zytoplasma zeigt sich in jeder der einzelnen Behandlungen (K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP und GFP) regelhaft.

Um eine genauere quantitative Bewertung durchzuführen, wurde das Verhältnis von Hornhautepithel zu Stroma in Rattenaugen ermittelt. Potenziell abweichende Verhältnisse könnten auf mögliche toxische Effekte hindeuten. Die Berechnung des Epithel-zu-Stroma-Verhältnisses ergab für alle durchgeführten Behandlungen (E36-GFP, K36-GFP, K72-GFP und GFP) einen durchschnittlichen Wert von 0,34, begleitet von einer Standardabweichung von 0,013. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass keine signifikanten Unterschiede in den Verhältnissen festzustellen sind.

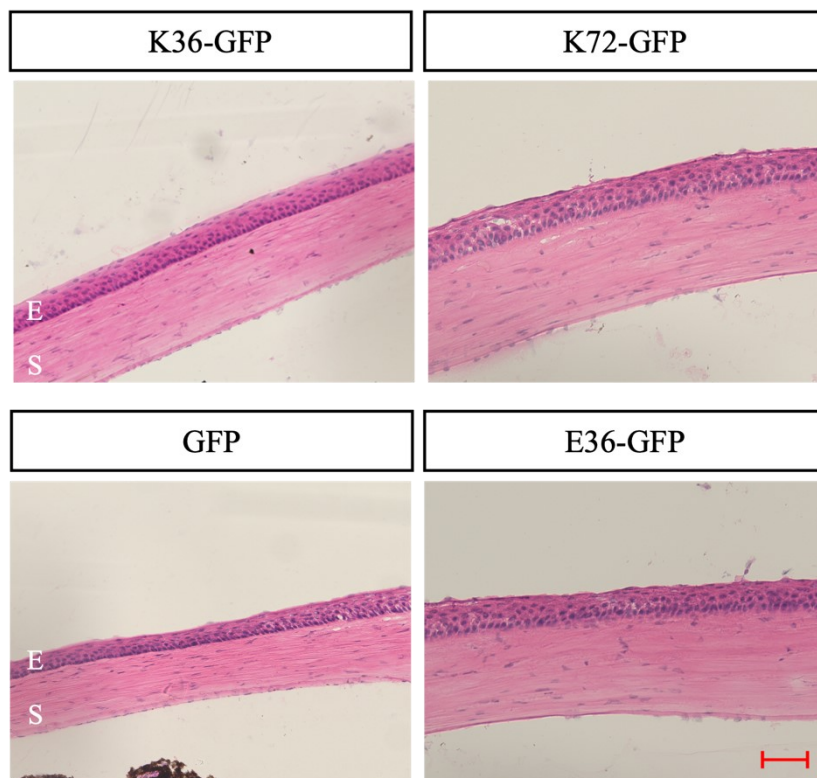


Abbildung 27 Unveränderte Morphologie in HE-Färbung nach SUP-Behandlung von Rattenäugen

Die HE-Färbung von Rattenkryoschnitten zeigte keine toxische Wirkung der SUPs. Die Kryoschnitte wurden vier Stunden lang mit K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP und GFP mit 80  $\mu$ M behandelt. Die Zellmorphologie ist bei jeder Behandlung normal konfiguriert. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

### 3.7.2 Ungestörte zelluläre Integrität nach SUP-Behandlung

Die PAS-Färbung ermöglicht eine bessere Visualisierung von Bindegewebe, Basalmembran und Zellmembran. Dies gibt Aufschluss über die Integrität der Zellen. Die histologische Färbung erfolgte gemäß den Methoden, wie sie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben sind, an den Kryoschnitten der Ratten- und Schweineäugen. Diese Schnitte waren zuvor einer vierstündigen Exposition gegenüber einer Konzentration von 80  $\mu$ M K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP oder GFP ausgesetzt worden. In der PAS- Färbung der Schweineäugen ist in jeder Behandlung eine lückenlose Zellkonfigurationen zu erkennen (Abbildung 28). Die Basalmembranen erscheinen homogen und ohne Unterbrechung.

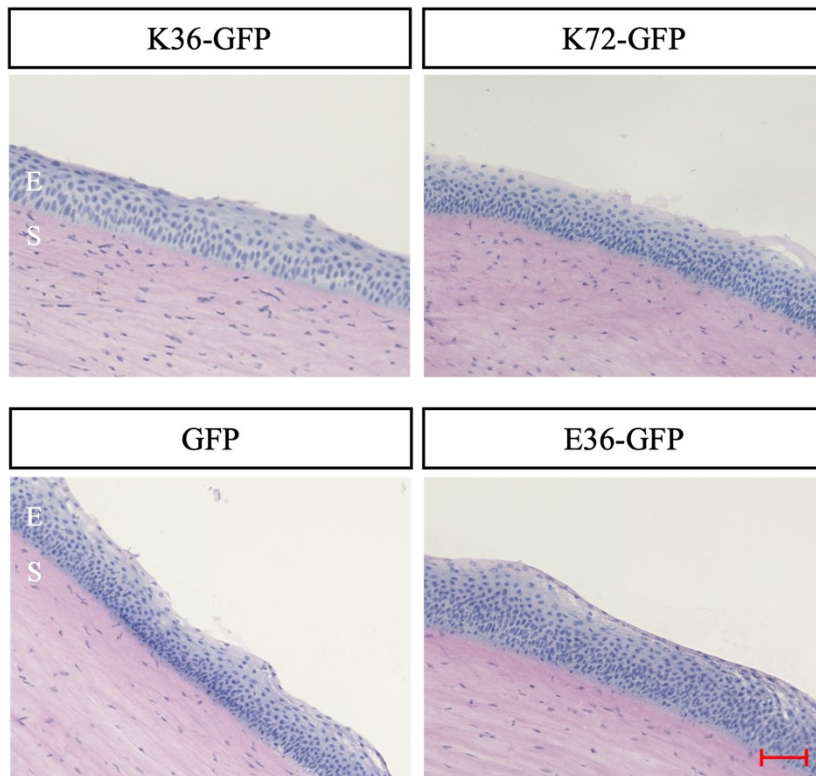


Abbildung 28 Intakte Zellintegrität nach PAS-Färbung von *ex vivo* Schweineaugen nach SUP-Behandlung

PAS-Färbung von Schweinekryoschnitten, die vier Stunden lang mit K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP und GFP mit 80  $\mu$ M behandelt wurden. Es zeigt sich eine normal konfigurierte Zellmorphologie. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

Bei den mit den SUPs behandelten Rattenäugen weist die Basallamina des Hornhautepithels in jeder Behandlung (K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP oder GFP) eine magentafarbenen Färbung, die auf die Präsenz von Glykoproteinen und Glykogen hinweist, auf (Abbildung 29). Die Epithelzellen sind klar abgegrenzt und präsentieren eine rechteckige Form mit regelmäßigen Kernen. Die Zellkerne sind zentral gelegen, von gleichmäßiger Größe und Form, ohne Anzeichen von Pyknose oder nukleären Abnormalitäten. Die Stromaebene zwischen dem Epithel und der Descemet-Membran erscheint weniger intensiv gefärbt und zeigt eine gleichmäßige Verteilung von Kollagenfasern. Insgesamt deutet die PAS-Färbung in jeder Behandlung (K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP und GFP) auf eine intakte und gut strukturierte Hornhaut hin, ohne Anzeichen von zellulären Abnormalitäten oder Gewebeschäden.

Die Bestimmung des Verhältnisses von Epithel zu Stroma erfolgte in Rattenäugen, wobei ein mittlerer Wert von 0,34 bei einer begleitenden Standardabweichung von 0,03 ermittelt wurde. In Bezug auf die Messungen der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Periodic Acid-Schiff (PAS)-Färbung ( $p = 0,1$ ). Weder die HE-Färbung noch die PAS-Färbung offenbarten Anhaltspunkte für potenzielle toxische Effekte der SUPs auf die betreffenden Hornhautstrukturen.

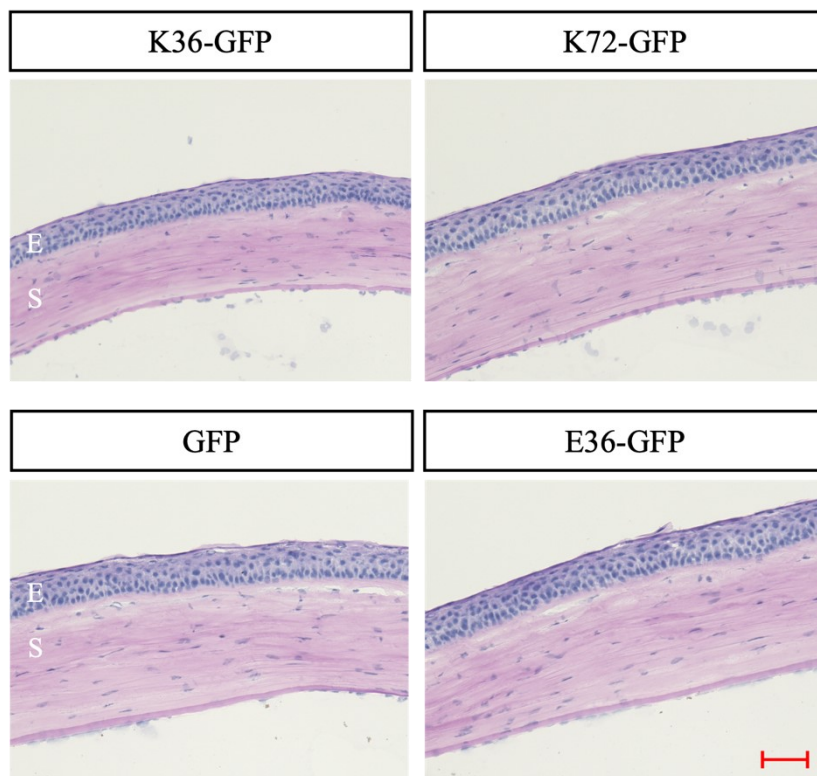


Abbildung 29 Ungestörte Zellintegrität nach PAS-Färbung von *in vivo* Rattenäugen nach SUP-Behandlung

PAS-Färbung von Rattenkryostücken, die vier Stunden lang mit K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP und GFP mit  $80\mu\text{M}$  behandelt wurden. Es zeigt sich eine normal konfigurierte Zellmorphologie. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken:  $50\mu\text{m}$ .

### 3.7.3 Keine erhöhte Apoptose durch SUP-Behandlung

Mit Hilfe der TUNEL-Färbung können Zellen, die eine Apoptose durchlaufen, sichtbar gemacht werden. In der Positivkontrolle sind diese deutlich rot gefärbt. Um die Anzahl der apoptotischen Zellen zu quantifizieren, wurden porcine, wie murine Kryoschnitte nach SUP Behandlung mit TUNEL und DAPI angefärbt. Bei den Schweineproben (Abbildung 30) wurden insgesamt kaum TUNEL-positive Zellen nachgewiesen. In der K36-GFP Behandlung, wie auch der K72-GFP Behandlung zeigt das Hornhautepithel minimale TUNEL-positiv markierte Zellen, was auf einen möglichen geringfügigen apoptotischen Prozess hinweisen kann. Es sind keine auffälligen Ansammlungen von TUNEL-positiven Zellen erkennbar. Um diesen Sachverhalt quantitativ zu erfassen, wurde eine systematische Zellzählung durchgeführt. Im Rahmen der K36-GFP-Behandlung wurden in fünf ausgewählten Bildern im Durchschnitt 1,5 von 100 Zellen als apoptotisch identifiziert. In der K72-GFP-Behandlungsgruppe wies im Durchschnitt 1,9 von 100 Zellen Anzeichen von Apoptose auf (Tabelle 11). Als Referenzpunkt sei erwähnt, dass in einer unbehandelten Kontrollgruppe ebenfalls eine Apoptoserate von 1,9 von 100 Zellen verzeichnet wurde. Dies legt nahe, dass es sich um keine erhöhte Apoptoserate handelt.

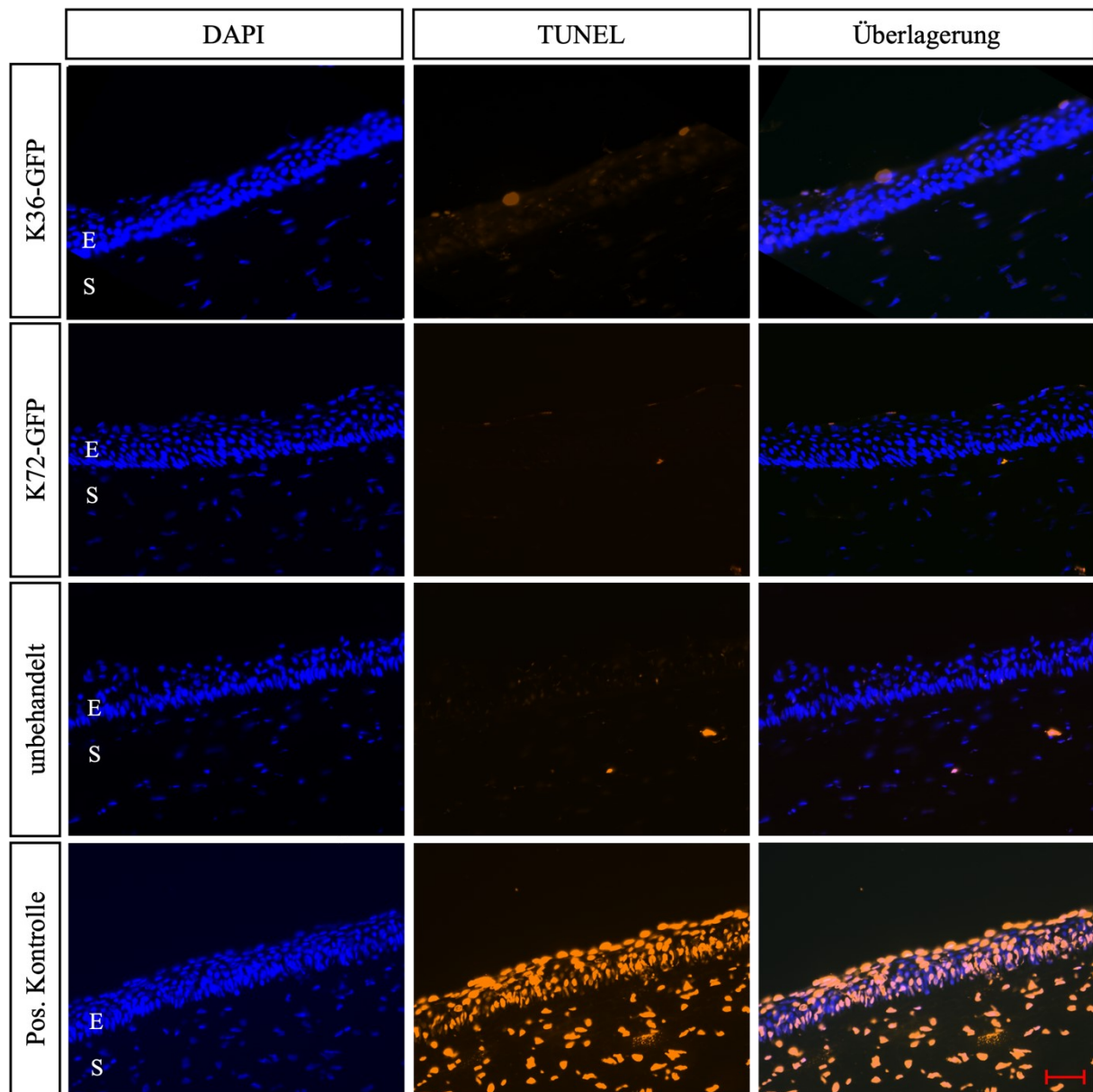


Abbildung 30 Keine erhöhte Apoptoserate nach SUP-Applikation auf *ex vivo* Schweineaugen

K36-GFP und K72-GFP wurden in einer Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  auf *ex vivo* Schweineaugen verabreicht. Nach acht Stunden wurde die Apoptoseinduktion in der Hornhaut mittels TUNEL-Assay untersucht. Apoptotische Zellen sind in rot sichtbar. Unbehandelte Augen dienten als Kontrolle. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken: 50  $\mu\text{m}$ .

Bei den Rattenäugen scheint die apoptotische Aktivität in den behandelten Schnitten ebenfalls gering zu sein (Abbildung 31). In beiden Behandlungsgruppen (K36-GFP und K72-GFP) zeigen die Epithelzellen nur sporadisch TUNEL-positive Kerne, was auf eine reguläre Apoptoserate hinweist. Im übrigen Gewebe sind keine Zellen zu erkennen, die eine positive Reaktion in der TUNEL-Färbung zeigen. Im Durchschnitt zeigten sich 4,7 von 100 Zellen in der K36-GFP-Behandlungsgruppe und 3,1 von 100 Zellen in der K72-GFP-Behandlungsgruppe

als apoptotisch (siehe Abbildung 31 und Tabelle 10). In der unbehandelten Kontrollgruppe waren 3,4 von 100 Zellen apoptotisch (Tabelle 10). Die Ergebnisse wurden mittels eines t-Tests analysiert, der keinen signifikanten Unterschied zwischen der SUP-Behandlung und dem unbehandelten Rattenauge zeigte. Daher kann keine gesteigerte Apoptoserate im Zusammenhang mit der Behandlung von K36-GFP oder K72-GFP angenommen werden.

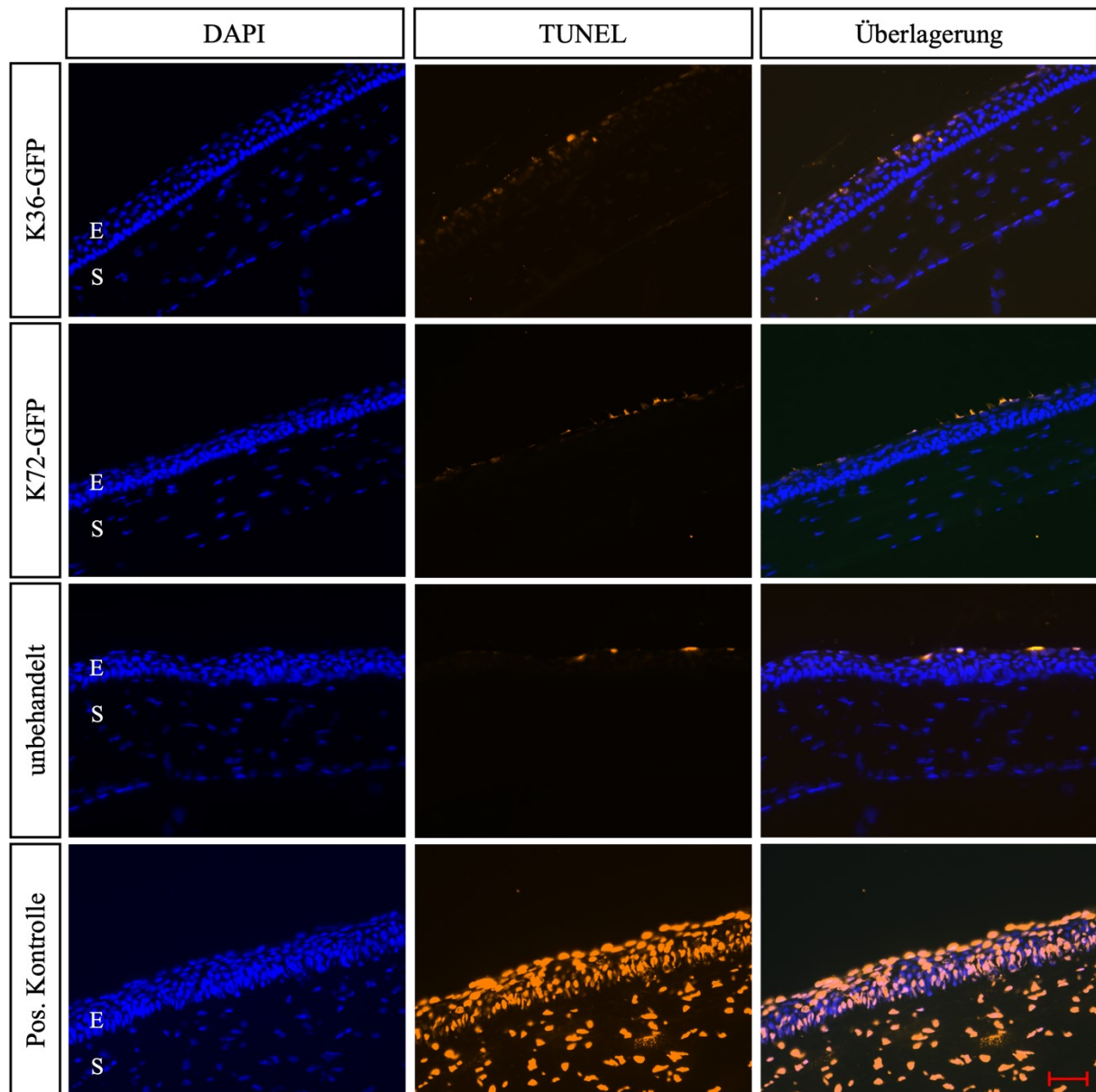


Abbildung 31 Keine erhöhte Apoptoserate nach SUP-Applikation auf *in vivo* Ratteneaugen.

K36-GFP und K72-GFP wurden in einer Konzentration von 80  $\mu$ M als einzelne Augentropfen verabreicht. Nach vier Stunden wurde die Apoptoseinduktion in der Hornhaut mittels TUNEL-Assay untersucht. Apoptotische Zellen sind in rot sichtbar. Unbehandelte Augen dienten als Kontrolle. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

|                      | <b>K36-GFP</b>        | <b>K72-GFP</b>        | <b>unbehandelt</b>    |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Rattenaugen</b>   | 4.9<br>(SEM: +/- 1.4) | 3.1<br>(SEM: +/- 0.6) | 3.4<br>(SEM: +/- 1.1) |
| <b>Schweineaugen</b> | 1.5<br>(SEM: +/- 0.5) | 1.9<br>(SEM: +/- 0.6) | 1.9<br>(SEM: +/- 0.9) |

Tabelle 11 Quantifizierung der TUNEL Färbungen von porcinen und murinen Kryoschnitten welche mit K36-GFP und K72-GFP behandelt wurden. Angegeben ist der Gesamtdurchschnitt der TUNEL-positiven Zellen pro Gesamtepithelzellen in % mit SEM.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die TUNEL-Färbung geringfügige Anzeichen für Apoptose in den untersuchten Hornhautschnitten (porcin und murin) zeigt, die jedoch im Rahmen normaler physiologischer Prozesse liegen. Es gibt keine Hinweise, dass K36-GFP oder K72-GFP massive oder pathologische apoptotische Ereignisse induzieren. Diese Ergebnisse lassen sich mit den vorangegangenen Studien von *Pesce et al.* [25] hinsichtlich der unbedenklichen Biokompatibilität der SUPs vereinigen.

## 4. Diskussion

Um die topische Verabreichung von Arzneimitteln über das Auge effektiver zu gestalten ist es von großem Nutzen einen okulären Trägerstoff zu haben, welcher länger an der Hornhaut haftet. Auf diese Weise wird weniger Wirkstoff über den Tränenfilm entfernt, was zu einer Reduktion systemischer Nebenwirkungen führt. Außerdem würde es den Patienten dadurch leichter fallen, ihre Medikamente einzunehmen und sie genauer und konsequenter zu verabreichen. SUPs stellen eine potenzielle Lösung dar und wurden in dieser Arbeit auf ihre Adhäsion, Penetration und Biokompatibilität an der Hornhaut getestet.

### 4.1 Haftung der SUPs auf der Hornhaut

Bei den Schweineaugen waren die Signale sowohl für K72-GFP als auch für K36-GFP noch nach 24 Stunden nachweisbar. In den *in vivo*-Augen von Ratten betrug die maximale Inkubationszeit vier Stunden, und die Signale waren deutlich sporadischer und erstreckten sich nicht über die gesamte Hornhaut. Dieses Verhalten wird auch in anderen Studien beobachtet, wie unter anderem von *Schnichels et al.* [37] Hier wurde die Adhäsion von mit Travoprost beladenen NPs mit der gleichen Methode untersucht. Diese Methode wurde zudem auch bei Brimonidin beladenen NPs angewandt. [38] Einen Hauptgrund für die kürzere Haftungszeit *in vivo* stellt bei den Rattenaugen das Blinzeln und der Tränenfilm dar, welcher bei den Schweineaugen mit Hilfe von Puffer und Schüttler nur bedingt nachgestellt werden kann. Allerdings blinzeln Ratten deutlich häufiger als Menschen. Bei bis zu 300 Mal pro Minute, blinzeln die Tiere ca. 60 Mal häufiger als der Mensch. [39] Infolgedessen erfährt das Auge eine wesentlich stärkere mechanische Reizung, was die Auswaschung von Augentropfen stark beschleunigt.

Durch fluorophotometrische Messungen konnte eine starke Adhäsion der positiv geladenen SUPs an der Hornhaut von Schweineaugen nachgewiesen werden. Im Kontrast dazu offenbarte die negative Kontrollvariante (E36-GFP) keinerlei Anhaftung an der Hornhaut und demonstrierte sogar eine noch kürzere Verweildauer im Vergleich zur reinen GFP-Kontrolle. Damit unterstützen die Daten die Hypothese der Ladungswechselwirkung von *Veeregowda et al.* (siehe 1.3.3), bei welcher es zwischen den positiv geladenen SUPs und der negativ geladenen Hornhaut nach dem Coulombschen Gesetz zur Anziehung kommt. Dass die negative Kontrollvariante eine kürzere Verweildauer als die reine GFP-Kontrolle aufzeigte kann damit begründet werden, dass es zu einer Größeren Abstoßung kommt, wenn zwei negative Ladungen aufeinander treffen, als bei einer negativen und neutralen Ladung (= GFP-Kontrolle).

In früheren Studien und dem daraus resultierenden Adhäsionsmodell zeigte K72-GFP die beste Bindungsfähigkeit. [24, 25] Histologische Untersuchungen in dieser Arbeit (Abbildung 8-11; 21-23) illustrieren zunächst eine subjektiv bessere Adhäsion von K36-GFP. Dieser Effekt kann möglicherweise durch die Molekülgröße erklärt werden, da mehr GFP binden kann. Eine objektivere Beobachtung im Fluorophotometer zeigte keinen ausreichend signifikanten Unterschied in der Adhäsion zwischen K36-GFP und K72-GFP. Nach 24 Stunden hafteten sowohl K36-GFP als auch K72-GFP noch zu 96 % an der Hornhaut von *ex vivo* Schweineaugen. Dass dies eine sehr hohe Konzentration über einen sehr langen Zeitraum darstellt, zeigt sich in vorherigen Studien, in welchen es bei potenziellen topischen okulären Arzneimittelabgaben schon nach 5 Minuten zu einem Konzentrationsverlust von 60% kommt. [37] Ein weiteres Beispiel stellen die mit Brimonidin beladenen Nanopartikel dar, welche nach einer Stunde einen Haftungsverlust von 81 % aufwiesen. [38] Daher war die langanhaltende und kontinuierliche Bindung in den *ex vivo*-Versuchen besonders bemerkenswert. Im Kontrast dazu war *in vivo* die Signalstärke nicht so konsistent, aber immer noch vorhanden (Abbildung 21-23), was durch die hohe Blinzelrate der Ratten erklärt werden könnte. Eine zusätzliche Erklärung liegt darin, dass Schweine und Ratten unterschiedliche Spezies sind, die jeweils divergente Hornhautstrukturen entwickelt haben können. Dies kann zu variierendem Haftverhalten von Substanzen auf ihren Hornhäuten führen, was wiederum auf evolutionäre Anpassungen an ihre spezifischen Lebensräume und Verhaltensweisen zurückzuführen ist.

Sowohl die Antikörper- als auch die Fluorophotometer-Studien liefern deutliche Hinweise auf eine Bindung auf der Ebene der Muzinschicht der Hornhaut. Sowohl in Ratten- als auch in Schweineaugen wurde eine Ko-lokalisierung von SUPs mit MUC1, einem membrangebundenen Muzin, festgestellt (Abbildung 18, 24). In den Schweineaugen wurde auch eine Kolokalisierung mit Galektin-3 nachgewiesen, das sich ebenfalls in dieser Schicht befindet (Abbildung 18). Das Fluorophotometer zeigte keine intraokulare Aufnahme an. Dies kann auch auf die Konzentration zurückzuführen sein. Die Penetration der Hornhaut gestaltet sich schwierig, da es neben den chemischen Eigenschaften auch einen erheblichen Konzentrationsverlust gibt. *Subrizi et al.* haben die Penetration einer Substanz durch die Hornhaut mathematisch beschrieben, da sie stark von der Dosierung und der Wirksamkeit des Medikaments abhängt. Demnach kann die Arzneimitteldosis  $D$  wie folgt berechnet werden: „ $D = C_{ss,av} \cdot CL \cdot t/F$ , wobei  $C_{ss,av}$  die durchschnittliche Steady-State-Konzentration am Zielort,  $CL$  die Arzneimittel-Clearance aus dem Zielkompartiment,  $t$  das Dosierungsintervall und  $F$  die Bioverfügbarkeit ist.“ [18] So ist beispielsweise eine Medikamentendosis von >30 mg erforderlich, um eine Zielkonzentration von 100 mM in der Vorderkammer zu erreichen (das

Gewicht eines Augentropfens beträgt etwa 30-40 mg). [18] Dies würde erklären, warum im Adhäsionsversuch keine Penetration von SUPs durch die Hornhaut zu erkennen ist, in der Zellkultur jedoch eine zelluläre Aufnahme beobachtet werden kann. Zudem können weitere strukturelle Faktoren die Aufnahme verhindern, wie beispielsweise die *tight junctions* von Epithelzellen, welche selektive Schleusen bilden und die parazelluläre Diffusion von Ionen und gelösten Stoffen kontrollieren. [40]

## 4.2 Zelluläre Aufnahme

Die meisten nicht-viralen Transporter sind kationisch, da sie an die negativ geladenen Zellmembrankomponenten binden können und dann entweder durch Endozytose oder einfaches Membranrecycling internalisiert werden. [41] So konnte beispielsweise die Zellpermeabilität von GFP durch Arginin-Transplantation verbessert werden. [42]

*Thompson et al.* untersuchten die zelluläre Aufnahme von SUPs auf Säugetierzellen. Ihnen zufolge erfolgt die zelluläre Aufnahme von supercharged GFP bei etwa +21 Ladungseinheiten. [43] Sie ist stark ladungsabhängig, aber nicht pH-abhängig. *Pesce et al.* [28] untersuchten den Endozytosepfad von supercharged GFP auf A549-Zellen unter Verwendung verschiedener Endozytose-Inhibitoren. Bei der Aufnahme von GFP-K72 mit Filipin wurde eine Verringerung der Aufnahme um >70 % beobachtet. [28] Es ist bekannt das Filipin, ein Lipidfarbstoff, die Caveolae-vermittelte Endozytose hemmt. Die Caveolae-vermittelte Endozytose umgeht den lysosomalen Weg, in welchem Makromoleküle intrazellulär abgebaut werden. Im Hinblick auf die therapeutische Proteinverabreichung ist dies eine attraktive Eigenschaft, da der Proteinabbau in den Lysosomen umgangen wird.

Die Versuche an primären Hornhautepithel und Müllerzellen vom Schwein, als auch humanen MIO-M1-Zellen zeigten ebenfalls nur Signale in den positiven SUPs, was die Hypothese der kationischen Transporter unterstützt (Abbildung 25). Allerdings waren die Signale von K36-GFP und K72-GFP in Epithelzellen deutlich stärker. Ein potenzieller Ansatz zur Erklärung könnte erneut in den *Tight Junctions* der Epithelzellen liegen. [40] Darüber hinaus haben sie einen großen Einfluss auf die apikobasale Polarisierung, was ebenfalls eine Hypothese für das Phänomen ist. Müllerzellen sind spezielle Gliazellen in der Retina, die eine stützende Rolle spielen. Sie erstrecken sich radial durch die Retina und sind über *Gap Junctions* miteinander verbunden. Diese *Gap Junctions* erlauben den direkten Ionen- und Molekültransfer zwischen benachbarten Müllerzellen. [44] Sie besitzen ein stark negatives Ruhepotential  $-88.5 \pm 6.9$  mV,

was eine elektrostatische Haftung begünstigt würde. [45] Weswegen eine verminderte Internalisierung stattgefunden hat, lässt sich nur mutmaßen. Weitere Untersuchungen zur zellulären Aufnahme sind notwendig, um genauere Aussagen zu treffen. Viele Faktoren wie die Ionenstärke des Mediums, die Konzentration der Peptide, sowie die Art der Zelllinie haben einen großen Einfluss auf den Aufnahmemechanismus. [46]

#### 4.3 Biokompatibilität

Das Hornhautepithel ist ein regenerierbarer Teil des Auges, während andere Augenstrukturen wie die Linse oder die Netzhaut nicht regenerierbar sind. [47] Dennoch muss der Toxizität und Verträglichkeit von Substanzen auch bei regenerierbarem Gewebe Aufmerksamkeit gewidmet werden. Zu den Problematiken bei der topischen Anwendung gehören Off-Target-Toxizität, Reizung, Zytotoxizität von Hilfsstoffen und Penetration durch arzneimittelhaltige Partikel. [48] Es ist jedoch sehr schwierig, ein geeignetes Modell zu finden, mit dem sich die Biokompatibilität einer Substanz am menschlichen Auge konkret vorhersagen lässt.

Bei den SUPs handelt es sich um organische Polymere, die in ungiftige, natürlich vorkommende Aminosäuren zerlegt werden können, was zu einer geringen Toxizitätsgefahr führt. [27] *Pesce et al.* konnten die Sicherheit der SUPs anhand verschiedener *in vitro*-Tests nachweisen. [28] Es muss jedoch sichergestellt werden, dass keine kurz- oder langfristigen Schäden an der Hornhaut auftreten. Aus klinischer Sicht sind Veränderungen des Hornhaut- und Bindehautepithels eines der wichtigsten klinischen Merkmale des trockenen Auges. [49] Daher wurden verschiedene histopathologische Färbungen durchgeführt: PAS, HE und TUNEL. In allen Färbungen gab es keinen Hinweis auf eine signifikante toxische Wirkung (Abbildung 26-31). Die Morphologie der Hornhäute hatte sich nicht verändert, und die Anzahl der apoptotischen Zellen in den TUNEL-Färbungen lag im sicheren Bereich (Abbildung 30,31). Bei der TUNEL-Färbung gibt es kein grünes Signal von den SUPs, da bei dieser Färbemethode eine Permeabilisierung stattfindet, die die Proteine auswäscht.

*In vivo*-Modelle bieten den Vorteil, dass die Gesamtoxizität für das Auge bewertet werden kann und nicht nur die lokale Toxizität, wie es beispielsweise bei *in vitro*-Tests der Fall ist. [48] Allerdings entspricht die Bewertung der Toxizität an tierischem Gewebe möglicherweise nicht den Bedingungen im menschlichen Auge. Zudem wurde die Inkubationszeit in diesen Versuchen der vorliegenden Arbeit zunächst auf vier Stunden begrenzt, wobei der angestrebte Haftungszeitraum *in vivo* ein deutlich längerer ist. Eine Lösung könnten 3D-Zellkulturmodelle

von menschlichen Hornhautzellen sein. Die Kombination von Stammzelltechnologie und Tissue Engineering könnte eine Möglichkeit sein, künstliche Hornhäute im Miniaturformat herzustellen. [50] Bereits 1999 wurde das erste dreidimensionale Hornhautäquivalent, bestehend aus Epithel, Stroma und Endothel auf der Grundlage immortalisierter menschlicher Hornhautzellen, vorgestellt. [51] Eine der Herausforderungen für die Zukunft besteht darin, menschliche Hornhautkulturmodelle weiter zu verbessern, so dass sie der nativen menschlichen Hornhaut so nahe wie möglich kommen. Durch die Integration von Bioprinting und modernem Tissue Engineering könnte ein solcher Fortschritt erzielt werden, der sich derzeit noch in der Entwicklungsphase befindet. Ein solches Modell wäre ein großer Fortschritt für schnellere und bessere Biokompatibilitätstests am Auge in der Zukunft. [50]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der organischen Struktur der SUPs und der bisherigen Toxizitätstests davon ausgegangen werden kann, dass von den SUPs *in vivo* kein Risiko ausgeht. Um die lokale Toxizität für die Hornhautzellen vorherzusagen, wäre es wichtig, *in vitro*-Tests durchzuführen. Da jedoch die Architektur und die Flüssigkeitsdynamik des Auges sehr komplex sind, kann die tatsächliche toxische Wirkung nur anhand von *in-vivo*-Modellen zuverlässig vorhergesagt werden. Demnach sind zur genaueren Beurteilung weitere Studien notwendig.

#### 4.5 Aktuelle Therapie des trockenen Auges

Die Prävalenz des trockenen Auges liegt in Süddeutschland bei 15-17% der Gesamtbevölkerung. [13] Zusätzlich zeigt die COVID-19-Pandemie eine erhöhte Augenbelastung, die insbesondere Personen mit mäßig trockenem Auge betrifft. Dies kann die ohnehin schon hohe gesellschaftliche Belastung durch das Trockene Auge noch verschärfen. [52] Zur Behandlung empfiehlt die Leitlinie von BVA und DOG einen Vier-Stufen-Plan. Bereits auf der ersten Stufe stehen Tränenersatzmittel, die manchmal hauptsächlich den Tränenfilm ersetzen, anstatt den noch vorhandenen zu stabilisieren. [53] Im DEWS II-Bericht empfehlen die TFOS-Experten, nur Tränenersatzmittel ohne Konservierungsstoffe (insbesondere Benzalkoniumchlorid) zu verwenden. [12] Tränenersatzmittel lindern normalerweise sofort die Trockenheit und Reizung der Augen, ihre Wirksamkeit ist jedoch oft zeitlich stark beschränkt. Dies liegt daran, dass Tränenersatzmittel nicht die Vielzahl von Wirkstoffen enthalten können, die in natürlichen Tränen vorhanden sind, wodurch ihre Funktionalität begrenzt ist. Außerdem werden künstliche Tränenersatzmittel, genau wie natürliche Tränen, über die Tränenkanäle abtransportiert. Außerdem trocknet die zugeführte

Flüssigkeit – oft hauptsächlich Wasser – das Auge aus, genau wie die natürlichen Tränen. Daher besteht der übliche Ansatz darin, das in den Tränen enthaltene Wasser durch große Moleküle zu binden, um die Verdunstung einzuschränken. Der Zusatz von Ölen/Lipiden kann die Verdunstung verringern und eine anhaltende Verbesserung bewirken. Daher müssen hydrophile Tränenersatzmittel wiederholt über den Tag verteilt aufgetragen werden – beispielsweise zwei Stunden bis stündlich, je nach Schweregrad des trockenen Auges und dem entsprechenden Tränenersatzmittel. Hyaluronsäure wird häufig wegen der hygroskopischen Wirkung verwendet. Daher können Tränenersatzmittel in HA-haltige und nicht-HA-haltige unterteilt werden. Ein Beispiel ist Thealoz® Duo, das erste Tränenersatzmittel, das Trehalose und Hyaluronsäure ohne Konservierungsstoffe kombiniert. *Pinto-Bonilla et al.* [54] konnten zeigen, dass Augentropfen, die sowohl Trehalose als auch Hyaluronat enthalten, mindestens so wirksam sind wie die üblicherweise verwendeten Systane®-Augentropfen und bei einigen Parametern sogar noch wirksamer. Zukünftige Studien an größeren Patientengruppen werden mit Interesse erwartet. Einen weiteren Ansatz bietet Evotears, welches aus Perfluorhexyloctan (F6H8) besteht, das zur Familie der semifluorierten Alkane (SFAs) gehört. [55] Ursprünglich sollte es als Träger für Cyclosporin A verwendet werden, wird aber inzwischen auch einzeln zur Behandlung des trockenen Auges eingesetzt. [56] In einer 6-wöchigen Beobachtungsstudie mit 30 Patienten zeigte die wasserfreie Verbindung eine signifikante Verbesserung des Corneal Stainings, der Schirmer-Scores, die *Tear Break Up Time* (TBUT) und der *ocular surface disease index* (OSDI)-Scores gegenüber dem Ausgangswert. [55] Aufgrund der hohen Lipophilie von F6H8 sind jedoch Wechselwirkungen mit zellulären Lipoproteinmembranen und andere toxische Wirkungen zu berücksichtigen und sollten weiter untersucht werden. [57] *Yang et.al* [58] untersuchten in einer Meta-Analyse die Wirksamkeit von Hyaluronsäure (HA)- und nicht-HA-basierten Augentropfen, einschließlich Kochsalzlösung und herkömmlicher künstlicher Tränen (Ats), bei der Behandlung von Erkrankungen des trockenen Auges. Auf der Grundlage des SH-Tests zeigte die HA-Gruppe eine verbesserte Tränenproduktion im Vergleich zur Nicht-HA-Gruppe (SMD 0,18; 95% CI 0,03, 0,33). Die Behandlung mit HA-Augentropfen allein kann die Anzeichen und Symptome des trockenen Auges bei Patienten mit trockenen Augen im Vergleich zu nicht-HA-basierten ophthalmischen Lösungen verringern. SUPs bieten aufgrund ihrer elektrostatischen Wechselwirkung mit dem Tränenfilm einen interessanten und vielversprechenden Ansatz, und Adhäsionstests geben Anlass zur Hoffnung auf eine längere Wirkungsdauer. Möglicherweise ist auch eine Kombination der verschiedenen Ansätze denkbar.

#### 4.6 Vergleich verschiedener okulärer Arzneimittelabgabesysteme

Die SUPs zeigen eine vielversprechende Adhäsion an der Hornhaut und eine gute Stabilisierung des Tränenfilms, was insbesondere beim Syndrom des trockenen Auges von großem Nutzen sein kann. Aufgrund dieser Adhäsionsfähigkeit und der möglichen intrazellulären Aufnahme können sie auch als potenzielle Medikamententräger betrachtet werden. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation leben weltweit etwa 2,2 Milliarden Menschen mit einer Form der Beeinträchtigung des Fern- oder Nahsehens. [59] Von den mehr als 100 anerkannten Augenkrankheiten können viele topisch behandelt werden. [20] Daher sollte die Entwicklung fortschrittlicher Formulierungen für das Auge mit großem Interesse verfolgt werden. In den letzten Jahrzehnten wurde viel zu diesem Thema geforscht, und einige vielversprechende Substanzen werden im Folgenden kurz besprochen. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf Nanopartikeln. Deren Potenzial als Wirkstoffträgersystem basiert hauptsächlich auf drei Technologien: Zum einen die PEGylierung: die Bindung zwischen Polyethylenglykol und einem Wirkstoff. Zum anderen der zielgerichtete Wirkstofftransfer durch Konjugation z.B. von Zellmembran-Antikörpern und Wirkstoffträgern. Und nicht zuletzt die Entdeckung des „enhanced permeation and retention effect“ (EPR), bei dem der zielgerichtete Wirkstofftransfer durch passiven Transport erreicht wird. Es gibt z.B. Nanopartikel, die sich im undichten Gefäßsystem eines Tumors festsetzen. Die größten Vorteile bei der Verwendung als Arzneimittelträger in der Hornhaut sind vor allem die Adhäsion an der Hornhaut, die geringe Toxizität und die Möglichkeit der Beladung mit Arzneimitteln. [60]

#### Polymere

Polymere sind die bisher am besten untersuchten Nanopartikel. Die meisten von ihnen sind PEGyliert, um einen schnellen Abbau durch das Immunsystem zu verhindern. Die Polymer-Nanopartikel setzen sich aus zahlreichen meist amphiphilen Polymeren zusammen, welche die Bildung von Mizellenstrukturen bewirken. Wirkstoffe können im Kern der Mizellen eingeschlossen werden und gelangen dann durch Diffusion an die Peripherie an den gewünschten Ort. Auch die Hülle selbst kann mit Wirkstoffen befüllt werden. Neben ihrer ausgezeichneten Haftfähigkeit bieten polymerbasierte Nanopartikel den zusätzlichen Vorteil einer vergleichsweise unkomplizierten und kostengünstigen Herstellung sowie der Verfügbarkeit einer Vielzahl geeigneter Moleküle. [61, 62]

## Cyclodextrine

Cyclodextrine (CD) sind Oligosaccharide mit einem hydrophoben Zentrum und einer polaren Außenfläche. [63] Daher können sie Einschlussbindungen, in der Regel Wasserstoffbrücken oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, mit anderen lipophilen Molekülen bilden, was sie zu einem Kandidaten für den Transport vieler Arzneimittel macht. *Ohira et al.* haben bereits in klinischen Studien gezeigt, dass die Anwendung von Cyclodextrin-Nanopartikeln im Vergleich zur Injektion von Triamcinolonacetonid bei der Behandlung des diabetischen Makulaödems zu einer besseren Sehschärfe und einer geringeren Makuladicke führt. [64] Allerdings wurde auch ein erhöhter Augeninnendruck festgestellt. Die Patienten berichteten auch über verkrustete Augenlider nach der Behandlung mit CD-Medikamenten. Die genaue Toxizität hinsichtlich der enthaltenen Phospholipide sowie Benzalkoniumchlorid und Parabene ist noch nicht abschließend geklärt.

## Dendrimere

Dendrimere sind verzweigte Moleküle, welche aus einem zentralen Kern und sich wiederholenden Einheiten zusammengesetzt sind. Diese Struktur erlaubt die Beladung mit verschiedenen Wirkstoffen. [65] Anfangs fanden Dendrimere ihre Anwendung zunächst in der Onkologie sowie im Transport von antiretroviralen Medikamenten. [66] Zusätzlich existieren einige präklinische Untersuchungen, die die Anwendung der verzweigten Moleküle als Trägersysteme für Arzneimittel in der Ophthalmologie untersuchen. Antibiotika wie Prulifloxacin oder Nadifloxacin wurden mit einem PAMAM-Dendrimer verbunden, um infektiöse Keratide zu behandeln, und *in vitro* getestet. Sie zeigten eine verlängerte Verweildauer im Vergleich zum freien Arzneimittel, was sich durch die verbesserte Haftung des Dendrimers an der Hornhaut erklären lässt. Aktuell sind keine Präparate verfügbar, die in der klinischen Praxis angewendet werden. Dies liegt zum einen an kaum vorhandenen Toxizitätsstudien, wie auch an dem großen Aufwand Medikamente anzupassen, bevor sie mit Dendrimeren kombiniert werden können. [67]

## Liposomen

Liposomen bestehen aus einer Lipid-Doppelmembran, die in einer Bläschenstruktur angeordnet ist. Sie wurden zunächst auch als Trägersysteme in der Onkologie eingesetzt. [68] Aufgrund

ihrer spezifischen molekularen Struktur, die sowohl hydrophile (wasserliebende) Moleküle im Kern und auch hydrophobe Moleküle in der Hülle aufnehmen kann, erweisen sich Dendrimere als besonders geeignet, verschiedene Arzneimittel durch die Barrieren des vorderen Augensegments zu transportieren und sie gezielt zur Zielstruktur zu leiten. Die Auswahl der Membranbausteine durch die Hersteller ermöglicht zudem die Anpassung der Oberflächenladung an das jeweilige Arzneimittel, was jedoch mit erheblichen zusätzlichen Kosten verbunden ist. Häufig beschränken sich Forschungsprojekte zu Liposomen als Verabreichungssysteme für die topische Applikation von Medikamenten in der Augenheilkunde auf präklinische Studien. Dies liegt daran, dass bedeutende Herausforderungen wie die Tendenz zur Aggregation, die Unbeständigkeit auf der Muzinschicht, wie auch die frühzeitige Freisetzung des zu befördernden Medikaments oder die Anfälligkeit für Phagozytose bewältigt werden müssen. [69]

#### Mucin-Nanopartikel

Die wohl eleganteste Lösung zur Bindung von Wirkstoffen bieten Mucin-Nanopartikel (Mucin-NP), die in Zusammenarbeit mit Wissenschaftlern aus der Tübinger Arbeitsgruppe von Dr. Schnichels und der Aachener Arbeitsgruppe von Prof. Herrmann erfunden wurden. Die DNA-Nanopartikel (NP) bestehen aus synthetisch produzierten amphiphilen DNA-Strängen, welche aus Nukleotiden mit Alkylmodifikationen (insbesondere Dodecen-modifizierte Desoxyurin-Gruppen) erzeugt werden. Die DNA-Stränge unterliegen einer Mikrophasentrennung, wodurch Mizellen entstehen, die wiederum Nanopartikel mit einem inneren, wasserunlöslichen Lipidkern bilden. Zusätzlich können sie mit einem Mucin-Aptamer gekoppelt werden, um eine gezielte Wirkstoffanbindung zu erreichen. Dadurch wird sichergestellt, dass die NP spezifisch an das gewünschte Gewebe haften. [70]

Der Wirkstoff kann mit einem speziellen Aptamer an die NP gebunden werden. Dies hat den Vorteil, dass zugelassene Wirkstoffe in die NP eingearbeitet werden können und für jeden Wirkstoff ein eigenes Aptamer gebildet werden kann. Auch die Bindungseffizienz und Beladung der NP kann entsprechend angepasst werden. Dies gewährleistet die breite Allerdings zeigen die NP in den Fluorophotometer-Studien eine kürzere Adhäsion an der Hornhaut als die SUPs. Nach 5 Minuten sind nur noch 50 % der Mucin-NP nachweisbar, während 100 % der SUPs noch vorhanden waren (Abbildung 32). Die schwächere Bindung könnte auf die geringe Molekülgröße zurückzuführen sein.

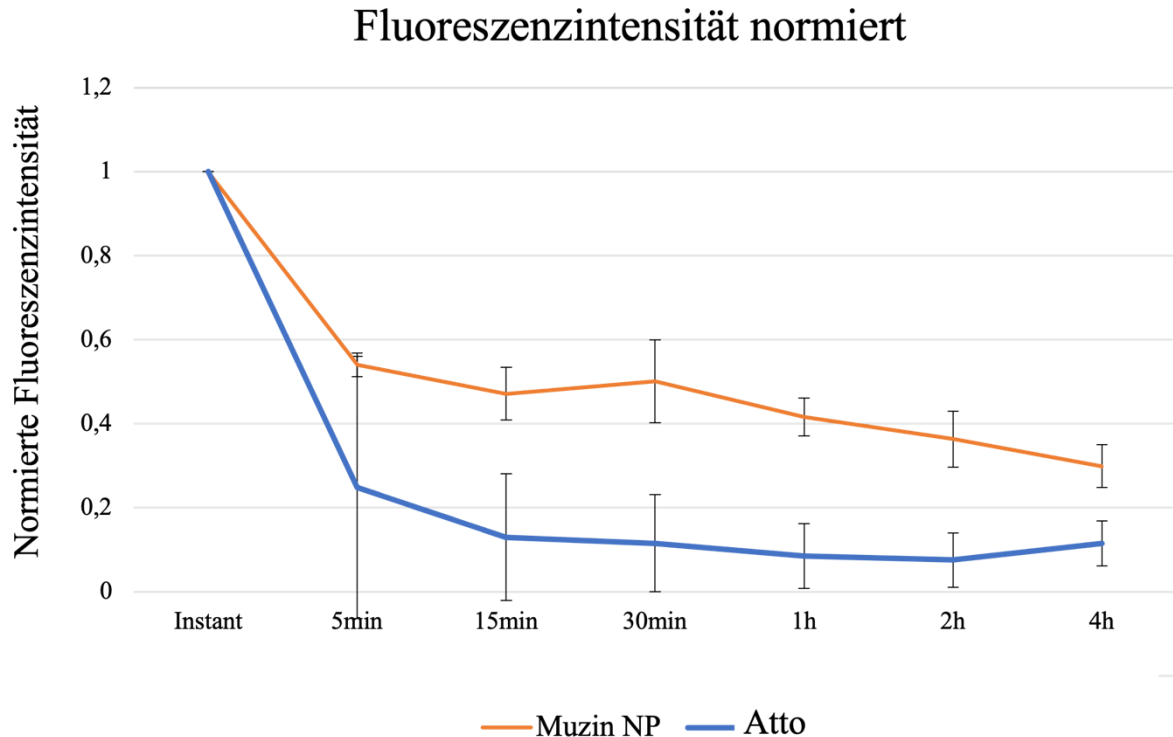


Abbildung 32 Muzin-Nanopartikel haften an porcinem Hornhautepithel

Integrierte Fluoreszenzintensität zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von Muc1-NP (orange) und atto (blau). jeweils 20  $\mu$ M auf die Hornhaut in *ex vivo* Schweineaugen (n=6), Standardabweichung hinzugefügt.

Im Allgemeinen ist es für jeden neuen Anbieter von Augenarzneimitteln besonders wichtig, deren potenziell schädliche Auswirkungen auf das Auge zu untersuchen. Bislang wurde häufig die kurzfristige Exposition des Augengewebes gegenüber Penetrationsförderern untersucht. Über die längerfristige Exposition und mögliche chronische Anwendungen ist sehr wenig bekannt, und dies sollte weiterverfolgt werden. Eine weitere Herausforderung sind die technischen Probleme bei der Standardisierung von Partikelladung und Partikelgröße.

Innerhalb der vielfältigen Ansätze zur ophthalmischen Arzneimittelverabreichung erweisen sich die SUPs ebenfalls als vielversprechende Kandidaten. Ihre herausragende Haftfähigkeit an der Hornhaut macht sie äußerst attraktiv. Die weiteren Aspekte dieses Potenzials erfordern jedoch weitere eingehende Untersuchungen.

#### 4.6 Weitere Studien und Ausblick

Die Therapie von Erkrankungen sowohl im vorderen als auch hinteren Augenabschnitt mittels topisch applizierter Medikamente gestaltet sich aufgrund zahlreicher anatomischer und physiologischer Barrieren äußerst komplex und anspruchsvoll. Daher hat die Erforschung und Entwicklung neuer, effizienterer Tropfpräparate in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen und bleibt nach wie vor ein vorrangiges Anliegen sowie ein Ziel intensiver Forschungsbemühungen in der Ophthalmologie. Wenn die Verweildauer der Medikamente am Zielort durch Trägersysteme verlängert wird, müssen die Medikamente seltener getropft werden und können mit niedrigeren Dosen behandelt werden, was die Nebenwirkungen verringert und die Adhärenz erhöht. Darüber hinaus ermöglichen Trägersysteme die Verabreichung potenziell toxischer Medikamente in niedrigeren, weniger gefährlichen Konzentrationen. Die SUPs erweisen sich daher als äußerst vielversprechend und verdienen eine ausführliche weitere Erforschung und Entwicklung in der Zukunft. Die Experimente dieser Arbeit haben gezeigt, dass SUPs gut auf der Hornhaut haften und vermutlich den Tränenfilm stabilisieren. Dieser zweite Effekt hätte ein großes Potenzial für die Behandlung von Erkrankungen des trockenen Auges. Um ihr Potenzial als Medikamentenlieferanten zu testen, muss untersucht werden, wie Medikamente an sie binden können und wie sie freigesetzt werden. Außerdem gibt es Hinweise auf eine intrazelluläre Aufnahme über den Caveolae-Weg. Dies kann durch Zellexperimente an Hornhautepithelzellen getestet werden. Derzeit gibt es keine Hinweise auf eine toxische Wirkung der SUPs auf die Hornhaut. Dennoch sind vor der Anwendung beim Menschen weitere Toxizitätsstudien erforderlich.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung von positiv geladenen *supercharged unfolded proteins* (SUP) hinsichtlich ihrer potenziellen Eignung als *topical ocular drug deliverers*. Hierfür wurden die SUPs K36 und K72 verwendet. Sie wurden bezüglich der Haftung an der Hornhaut, der Dauer der Haftung, der Penetration der Hornhaut und deren Biokompatibilität untersucht. Zudem wurde die zelluläre Interaktion geprüft.

Die Adhäsion der SUPs an der Hornhaut konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Mittels Histologie konnte bei den *ex vivo* Schweineaugen eine Adhäsion von über 24 h bestätigt werden, bei den *in vivo* Rattenaugen von über 4 h. Die Lokalisation der SUPs auf den Hornhäuten wurde mittels Antikörperfärbungen eruiert. Diese zeigten eine Lokalisation in der Muzinschicht der Hornhaut.

Um die quantitative Adhäsion und die Eindringtiefe der SUPs zu bestimmen wurde die Methode der Fluorophotometrie angewandt. Nach 24 h hafteten noch 96 % des K36-GFPs und des K72-GFPs auf der Hornhaut, während die Kontrollen bereits nach wenigen Minuten eine deutliche Reduktion in der Haftung aufwiesen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden SUP-Typen hinsichtlich ihrer Haftungseigenschaften.

Die fehlende Eindringfähigkeit der SUPs in der Fluorometrie-Methode kann auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden und schließt nicht generell aus, dass eine zelluläre Penetration stattfindet. Frühere Studien haben gezeigt, dass SUPs über den caveolae Endozytoseweg von Zellen aufgenommen werden können. Aus diesem Grund wurde das Verhalten der SUPs auf zellulärer Ebene in drei verschiedenen Zelltypen untersucht: primäre porcine Hornhautepithelzellen, primäre porcine Müllerzellen und MIO-M1 Zellen. Nach 24 h waren vor allem in den primären porcinen Hornhautepithelzellen Anzeichen für die Anwesenheit der positiv geladenen SUPs erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass eine mögliche zelluläre Aufnahme erfolgen könnte.

Für die Biokompatibilitätstestung wurden die Hornhäute mittels PAS- und HE-Färbung sowie TUNEL-staining evaluiert. In keiner der Färbungen gab es Hinweise auf eine mögliche toxische Wirkung. Zusammenfassend ist zu sagen, dass K36 und K72 eine vielversprechend lange Haftung an der Hornhaut zeigen und toxisch als unbedenklich in den getesteten Konzentrationen anzusehen sind.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Gekle, M., et al., *Taschenlehrbuch Physiologie*. 2010: Georg Thieme Verlag.
2. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage ed.* 2009, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
3. Yazdani, M., et al., *Tear metabolomics in dry eye disease: a review*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(15): p. 3755.
4. Sachsenweger, M., V. Klauss, and J. Nasemann, *Duale Reihe Augenheilkunde*. Thieme Verlag Stuttgart, 2003. **2**: p. 213-235.
5. Lang, G.K., *Augenheilkunde*. 2014: Georg Thieme Verlag.
6. Uchino, Y., *The ocular surface glycocalyx and its alteration in dry eye disease: a review*. Investigative ophthalmology & visual science, 2018. **59**(14): p. DES157-DES162.
7. Spurr-Michaud, S., P. Argüeso, and I. Gipson, *Assay of mucins in human tear fluid*. Experimental eye research, 2007. **84**(5): p. 939-950.
8. Steen, P.V.d., et al., *Concepts and principles of O-linked glycosylation*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 1998. **33**(3): p. 151-208.
9. Hodges, R.R. and D.A. Dartt, *Tear film mucins: front line defenders of the ocular surface; comparison with airway and gastrointestinal tract mucins*. Experimental eye research, 2013. **117**: p. 62-78.
10. Argüeso, P., et al., *Mucin characteristics of human corneal-limbal epithelial cells that exclude the rose bengal anionic dye*. Investigative ophthalmology & visual science, 2006. **47**(1): p. 113-119.
11. Uchino, Y., et al., *Role of galectin-3 in dry eye disease*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2013. **54**(15): p. 2666-2666.
12. Knop, E., N. Knop, and J. Menzel-Severing, *Das Trockene Auge: Update anhand des DEWS-II-Reports*. Teil III: Das iatrogene Trockene Auge sowie Diagnostik und Therapie des Trockenen Auges. Z prakt Augenheilkd, 2019. **40**: p. 151-164.
13. Reitmeir, P., et al., *Common eye diseases in older adults of southern Germany: results from the KORA-Age study*. Age and ageing, 2017. **46**(3): p. 481-486.
14. Craig, J.P., et al., *TFOS DEWS II report executive summary*. The ocular surface, 2017. **15**(4): p. 802-812.
15. Diener, H.-C., *Klinische Pharmakologie*. 2005: Georg Thieme Verlag.
16. Worakul, N. and J.R. Robinson, *Ocular pharmacokinetics/pharmacodynamics*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 1997. **44**(1): p. 71-83.
17. Becker, M., et al., *Pharmakokinetik systemischer, regionaler und lokaler Medikamente in der Therapie intraokularer Entzündungen*. Ophthalmologe, 2014. **111**: p. 121-127.
18. Subrizi, A., et al., *Design principles of ocular drug delivery systems: importance of drug payload, release rate, and material properties*. Drug discovery today, 2019. **24**(8): p. 1446-1457.
19. Grehn, F., *Grundlagen der Augenheilkunde*. Augenheilkunde, 2008: p. 1-13.
20. Moiseev, R.V., et al., *Penetration enhancers in ocular drug delivery*. Pharmaceutics, 2019. **11**(7): p. 321.
21. Allan, B. and J. Dart, *Strategies for the management of microbial keratitis*. The British journal of ophthalmology, 1995. **79**(8): p. 777.
22. Amrite, A.C., H.F. Edelhauser, and U.B. Kompella, *Modeling of corneal and retinal pharmacokinetics after periocular drug administration*. Investigative ophthalmology & visual science, 2008. **49**(1): p. 320-332.
23. Zhang, W., M.R. Prausnitz, and A. Edwards, *Model of transient drug diffusion across cornea*. Journal of controlled release, 2004. **99**(2): p. 241-258.

24. Wang, R.-F., et al., *Effect of oxymetazoline on aqueous humor dynamics and ocular blood flow in monkeys and rabbits*. Archives of Ophthalmology, 1993. **111**(4): p. 535-538.
25. Hermann, M.M., et al., *Measurement of adherence to brimonidine therapy for glaucoma using electronic monitoring*. Journal of glaucoma, 2011. **20**(8): p. 502-508.
26. Ma, C., et al., *Supercharged Proteins and Polypeptides*. Advanced Materials, 2020. **32**(20): p. 1905309.
27. Veeregowda, D.H., et al., *Recombinant supercharged polypeptides restore and improve biolubrication*. Advanced Materials, 2013. **25**(25): p. 3426-3431.
28. Pesce, D., et al., *Enhancing cellular uptake of GFP via unfolded supercharged protein tags*. Biomaterials, 2013. **34**(17): p. 4360-4367.
29. Kapuscinski, J., *DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*. Biotech Histochem, 1995. **70**(5): p. 220-33.
30. Neumeister, B., et al., *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie*. 2009: Georg Thieme Verlag.
31. Avwioro, G., *Histochemical uses of haematoxylin—a review*. Jpcs, 2011. **1**(5): p. 24-34.
32. Baum, S., *The PAS reaction for staining cell walls*. Cold Spring Harbor Protocols, 2008. **2008**(8): p. pdb. prot4956.
33. Jewell, J. and A.M. Mastro, *Using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) enzyme to detect TUNEL-positive, GFP-expressing apoptotic cells*. Appl Cell Notes, 2002. **3**: p. 13-4.
34. Gey, M.H., *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*. 2015: Springer-Verlag.
35. Wolf, J., et al., *Protocol to quantify enzymatic effects on vitreous liquefaction in porcine eyes using a transwell-plate system*. STAR protocols, 2022. **3**(4): p. 101754.
36. Willem de Vries, J., et al., *DNA nanoparticles for ophthalmic drug delivery*. Biomaterials, 2018. **157**: p. 98-106.
37. Schnichels, S., et al., *Self-assembled DNA nanoparticles loaded with travoprost for glaucoma-treatment*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2020. **29**: p. 102260.
38. Schnichels, S., et al., *Improved treatment options for glaucoma with brimonidine-loaded lipid DNA nanoparticles*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021. **13**(8): p. 9445-9456.
39. Munger, R.J. and M. Collins, *Assessment of ocular toxicity potential: basic theory and techniques*, in *Assessing ocular toxicology in laboratory animals*. 2012, Springer. p. 23-52.
40. Zihni, C., et al., *Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates*. Nature reviews Molecular cell biology, 2016. **17**(9): p. 564-580.
41. Wadia, J.S., R.V. Stan, and S.F. Dowdy, *Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis*. Nature medicine, 2004. **10**(3): p. 310-315.
42. Fuchs, S.M. and R.T. Raines, *Arginine grafting to endow cell permeability*. ACS chemical biology, 2007. **2**(3): p. 167-170.
43. Thompson, D.B., J.J. Cronican, and D.R. Liu, *Engineering and identifying supercharged proteins for macromolecule delivery into mammalian cells*, in *Methods in enzymology*. 2012, Elsevier. p. 293-319.
44. Eberhardt, C., *Die Bedeutung der Müllerzelle für die Pathogenese der equinen rezidivierenden Uveitis und Etablierung einer equinen Müllerzelllinie*. 2011, lmu.

45. Witkovsky, P., S. Stone, and H. Ripps, *Pharmacological modification of the light-induced responses of Mu<sup>+</sup> ller (glial) cells in the amphibian retina*. Brain Research, 1985. **328**(1): p. 111-120.
46. Guterstam, P., et al., *Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate*. Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes, 2009. **1788**(12): p. 2509-2517.
47. Kolmer, W. and H. Lauber, *Die Hornhaut (Cornea)*. Haut Und Sinnesorgane: Auge, 1936: p. 9-61.
48. Thackaberry, E.A., et al., *The safety evaluation of long-acting ocular delivery systems*. Drug Discovery Today, 2019. **24**(8): p. 1539-1550.
49. Aragona, P., et al., *Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye*. British journal of ophthalmology, 2002. **86**(2): p. 181-184.
50. Rönkkö, S., et al., *Human corneal cell culture models for drug toxicity studies*. Drug delivery and translational research, 2016. **6**(6): p. 660-675.
51. Griffith, M., et al., *Functional human corneal equivalents constructed from cell lines*. Science, 1999. **286**(5447): p. 2169-2172.
52. Saldanha, I.J., et al., *Impact of the COVID-19 pandemic on eye strain and dry eye symptoms*. The ocular surface, 2021. **22**: p. 38-46.
53. Korbmacher, J.P. and G. Geerling, *Therapie des Trockenen Auges*. Spektrum der Augenheilkunde, 2021. **35**(5): p. 177-194.
54. Pinto-Bonilla, J.C., et al., *A randomized crossover study comparing trehalose/hyaluronate eyedrops and standard treatment: patient satisfaction in the treatment of dry eye syndrome*. Therapeutics and Clinical Risk Management, 2015. **11**: p. 595.
55. Geerling, G., et al., *Emerging strategies for the diagnosis and treatment of meibomian gland dysfunction: proceedings of the OCEAN group meeting*. The ocular surface, 2017. **15**(2): p. 179-192.
56. Chachaj-Brekiesz, A., et al., *Perfluorohexyloctane (F6H8) as a delivery agent for cyclosporine A in dry eye syndrome therapy—Langmuir monolayer study complemented with infrared nanospectroscopy*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019. **184**: p. 110564.
57. Mertens, S., J. Bednarz, and K. Engelmann, *Evidence of toxic side effects of perfluorohexyloctane after vitreoretinal surgery as well as in previously established in vitro models with ocular cell types*. Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology, 2002. **240**(12): p. 989-995.
58. Yang, Y.-J., et al., *A meta-analysis of the efficacy of hyaluronic acid eye drops for the treatment of dry eye syndrome*. International journal of environmental research and public health, 2021. **18**(5): p. 2383.
59. Bourne, R., et al., *Trends in prevalence of blindness and distance and near vision impairment over 30 years: an analysis for the Global Burden of Disease Study*. The Lancet Global Health, 2021. **9**(2): p. e130-e143.
60. Loscher, M., et al., *[Nanoparticles as drug delivery systems in ophthalmology]*. Ophthalmologie, 2018. **115**(3): p. 184-189.
61. Robinson, J.R. and G.M. Mlynek, *Bioadhesive and phase-change polymers for ocular drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1995. **16**(1): p. 45-50.
62. Hoffman, A.S., *The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems*. Journal of controlled release, 2008. **132**(3): p. 153-163.
63. Freudenberg, K. and F. Cramer, *Die Konstitution der Schardinger-Dextrine  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$* . Zeitschrift für Naturforschung B, 1948. **3**(11-12): p. 464-466.

64. Ohira, A., et al., *Topical dexamethasone  $\gamma$ -cyclodextrin nanoparticle eye drops increase visual acuity and decrease macular thickness in diabetic macular oedema*. *Acta ophthalmologica*, 2015. **93**(7): p. 610-615.
65. Thassu, D. and G.J. Chader, *Ocular drug delivery systems: barriers and application of nanoparticulate systems*. 2012: CRC Press.
66. Tomalia, D.A., et al., *A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules*. *Polymer journal*, 1985. **17**(1): p. 117-132.
67. Cheng, Y., et al., *Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as biocompatible carriers of quinolone antimicrobials: an in vitro study*. *European journal of medicinal chemistry*, 2007. **42**(7): p. 1032-1038.
68. Gregoriadis, G., et al., *Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy*. *The Lancet*, 1974. **303**(7870): p. 1313-1316.
69. Agarwal, R., et al., *Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update*. *Drug delivery*, 2016. **23**(4): p. 1075-1091.
70. Schnichels, S., et al., *Lipid-DNA Nanoparticles as Drug-Delivery Vehicles for the Treatment of Retinal Diseases*. *Pharmaceutics*, 2023. **15**(2): p. 532.

## 7. Erklärung zum Eigenanteil

Ich, Chiara Anna Seiz, versichere, dass die Arbeit an der Universitäts-Augenklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Dr. rer. nat. Sven Schnichels durchgeführt wurde. Die Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die Herstellung der SUP erfolgte durch die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Andreas Herrmann am Institut für Technische und Makromolekulare Chemie an der RWTH Aachen. Die Tierversuche wurden von Dr. rer. nat. Sven Schnichels und Dr. rer. nat. José Hurst durchgeführt. Alle direkt oder indirekt verwendeten Quellen fremder Arbeiten sind als Referenzen angegeben.

Datum:

Unterschrift: