

Supercharged unfolded proteins als periokuläre Medikamententräger

Chiara Seiz¹, José Hurst¹, Thomas T.-M.², Herrmann A.², Sven Schnichels¹

¹Universitäts-Augenklinik Tübingen, Tübingen, Deutschland

²DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien, Aachen, Deutschland

Kontakt: chiara-anna.seiz@student.uni-tuebingen.de

Einleitung

Die aktuelle topische medikamentöse Therapie von Augenerkrankungen wird erheblich durch die Tränenflüssigkeit und den regelmäßige Lidschlag beeinträchtigt. Lediglich wenige Prozent des Wirkstoffs verbleiben im Auge, dazu reduziert häufiges Tropfen die Therapieadhärenz. In Anbetracht ihrer elektrostatischen Interaktion mit den negativ geladenen Muzinen, die auch in der Hornhaut vorhanden sind, stellen kationische *supercharged unfolded polypeptides* (SUPs) eine aussichtsreiche Strategie dar. Durch eine hohe Bindungsaffinität zur Hornhaut würden sie vielversprechende Möglichkeiten bieten, um die Wirkstoffmenge und Tropfhäufigkeit von Augentropfen zu reduzieren. Ziel dieser Studie war es die Lokalisation und Adhäsioneigenschaften der SUPs auf der porcinen Hornhaut zu untersuchen.

Verwendete Supercharged unfolded proteins (SUPs):

Die Polypeptide haben eine elastinähnliche Grundstruktur mit einer wiederholten Pentapeptidsequenz (GVGVP). Diese Grundsequenz kann durch die Einbringung eines Lysin (K)- oder Glutaminsäurerestes (E) an der zweiten Position gezielt positiv oder negativ modifiziert werden. Die SUPs wurden mit dem Fluorophor GFP verknüpft, um ihre Position bei den Experimenten leichter bestimmen zu können.

- K36-GFP: (GAGP[(GVGVP)(GKGVP) 9] 4 GWPH 6)
→ positiv geladen, 36 Lysine
- K72-GFP: (GAGP[(GVGVP)(GKGVP) 9] 8 GWPH 6)
→ positiv geladen, 72 Lysine
- E36-GFP: (VEGEG)36
→ negativ geladen, 36 Glutaminsäuren (Kontrolle)

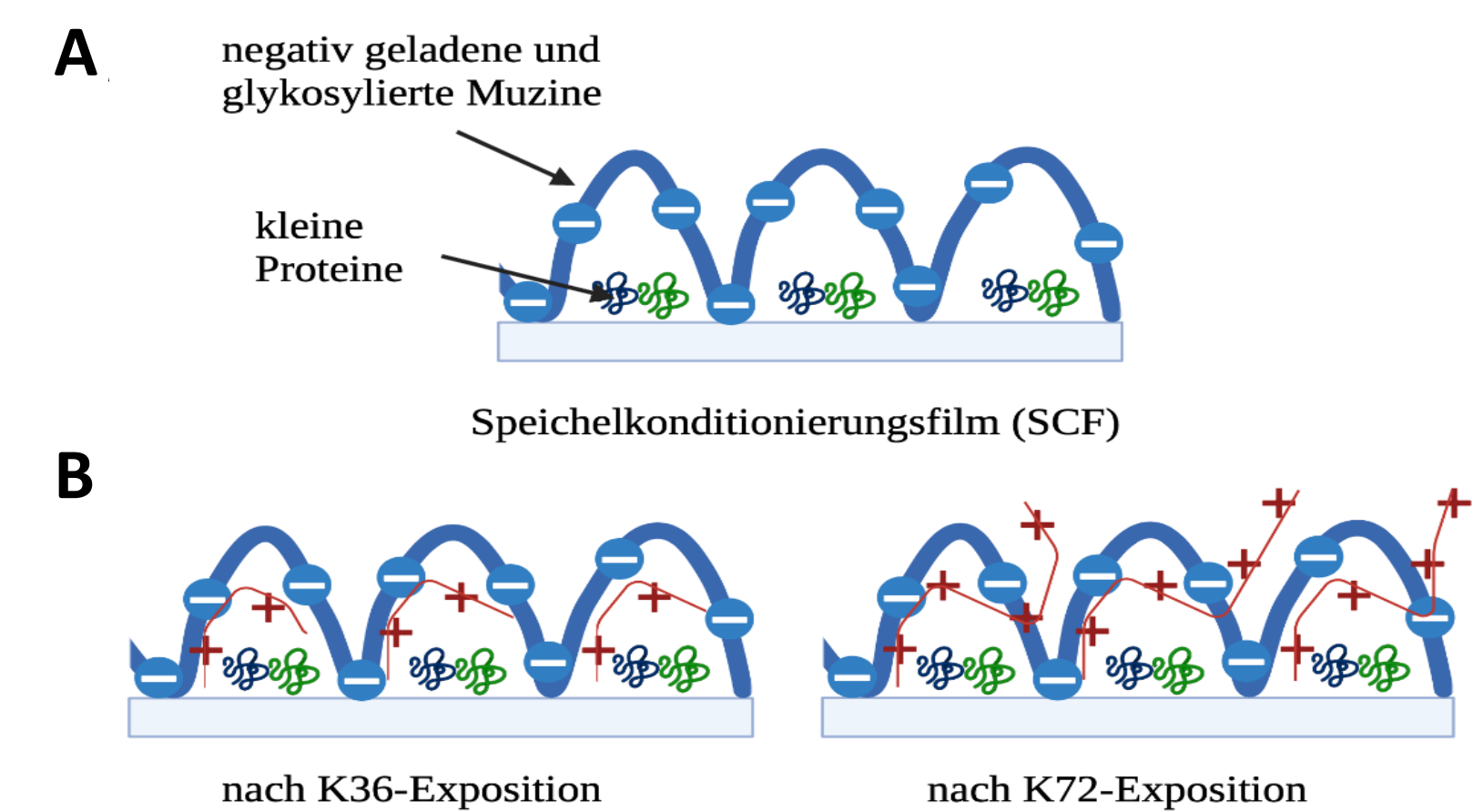


Abb. 1: Interaktionsmodell der SUPs mit Muzinfilmen

A: Schematischer Speichelkonditionierungsfilm (SCF)

B: Erstbehandlung des SCF mit K36 (links) und K72 (rechts). [1]

Methoden

Histologie

Frisch enukleierten Schweineaugen wurde jeweils 100 µl von K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP oder GFP in einer Konzentration von 80 µM appliziert. Nach einer einminütigen Inkubationszeit wurden die Augen verschieden lang (15 min- 48h) in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Augen in Tissue-Tek eingebettet, tiefgefroren und bei -20°C gelagert. Es wurden Kryoschnitte der Hornhaut mit einer Dicke von 14 µm mit Hilfe eines Kryostats erstellt. Diese Schnitte wurden mit DAPI gefärbt und anschließend mit Fluorsafe eingedeckelt. Die hieraus resultierenden Bilder wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskops (ApoTome2, Zeiss) erfasst.

Fluorophotometermessungen:

80 µM von K36-GFP, K72-GFP, E36-GFP und GFP wurden auf *ex vivo*-Schweineaugen appliziert. Ein okuläres Fluorophotometer (Fluorotron™ Master; OcuMetrics, Mountain View) maß die Fluoreszenz über verschiedene Zeitspannen. Vor der Applikation wurde die natürliche Fluoreszenz der Augen gemessen (prescan). Die erste Messung erfolgte post-Applikation, gefolgt von 5, 15, 30 Minuten, sowie 1, 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden. Die Augen wurden zwischen den Messungen in PBS sanft bewegt, um den Lidschlag zu simulieren.

Immunhistologie:

Die Kryoschnitte der behandelten Schweineaugen wurden für die AK-Färbungen gegen MUC1 und Galectin-3 mit Methanol fixiert. Anschließend wurden sie in 5% BSA/PBS geblockt und der 1. Antikörper wurde über Nacht bei 4°C aufgetragen (MUC1, 1:200, Acris; Galectin-3, 1:300, Acris). Nach dem Waschen wurde mit dem 2. Antikörper (1:1000) für 90 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (ApoTome2, Zeiss) aufgenommen.

TUNEL:

Die TUNEL-Färbungen der kryokonservierten Schnitte der behandelten Schweineaugen wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers (Roche, Deutschland) durchgeführt. Zur Markierung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Die nachfolgenden Bildaufnahmen wurden unter Einsatz eines Fluoreszenzmikroskops (ApoTome2, Zeiss) vorgenommen.

Statistische Analyse: Die statistische Analyse wurde mit SPSS durchgeführt. Turkey-HSD wurde für Vergleiche verwendet.

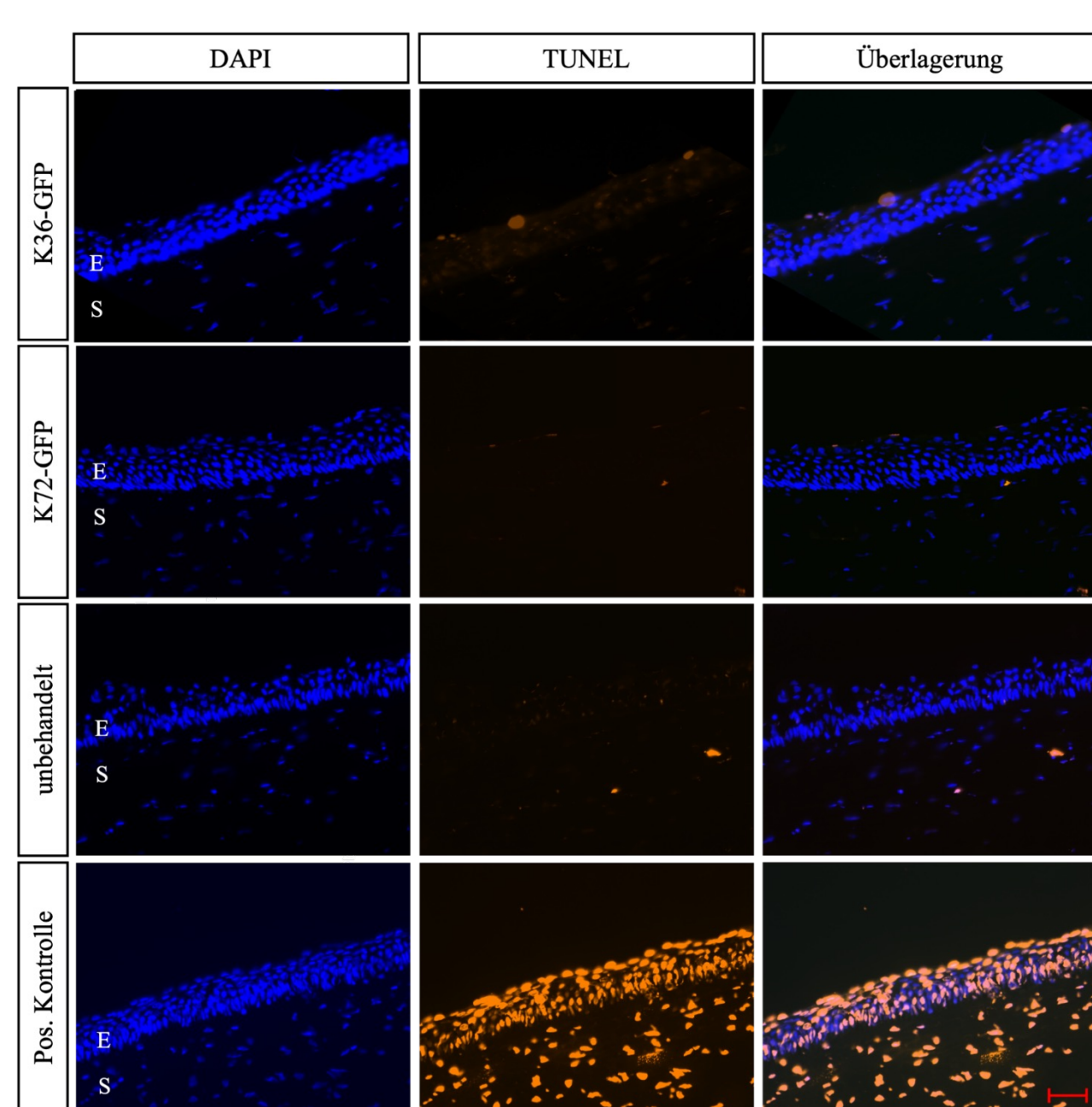


Abb. 5: Keine erhöhte Apoptoserate nach SUP-Applikation in *ex vivo* Schweineaugen.

K36-GFP und K72-GFP wurden in einer Konzentration von 80 µM auf *ex vivo* Schweineaugen getropft. Nach 8h wurde die Apoptoseinduktion in der Hornhaut mittels TUNEL-Assay untersucht. Apoptotische Zellen sind in rot sichtbar. Unbehandelte Augen dienten als Kontrolle.

Es wurde keine gesteigerte Apoptose beobachtet. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken: 50 µm

Zusammenfassung

- Mittels Histologie wurde an *ex vivo* Schweineaugen eine Adhäsion von K36-GFP und K72-GFP über 24h bestätigt.
- Durch fluorophotometrische Untersuchungen wurde nach 24h noch 96% des K36-GFP und K72-GFP auf der Hornhaut gemessen, während die Kontrollen bereits nach 5 Minuten eine starke Reduktion aufwiesen.
- Die Lokalisation der SUPs in der Mucinschicht der Hornhäute wurde mittels Antikörperfärbungen belegt.
- Eine exzellente Biokompatibilität nach SUP-Applikation auf *ex vivo* Schweineaugen konnte mittels TUNEL-Färbung gezeigt werden.

Literaturnachweis:

[1] Veeregowda, D.H., et al., *Recombinant supercharged polypeptides restore and improve biolubrication*. *Advanced Materials*, 2013. **25**(25): p. 3426-3431.

Ergebnisse

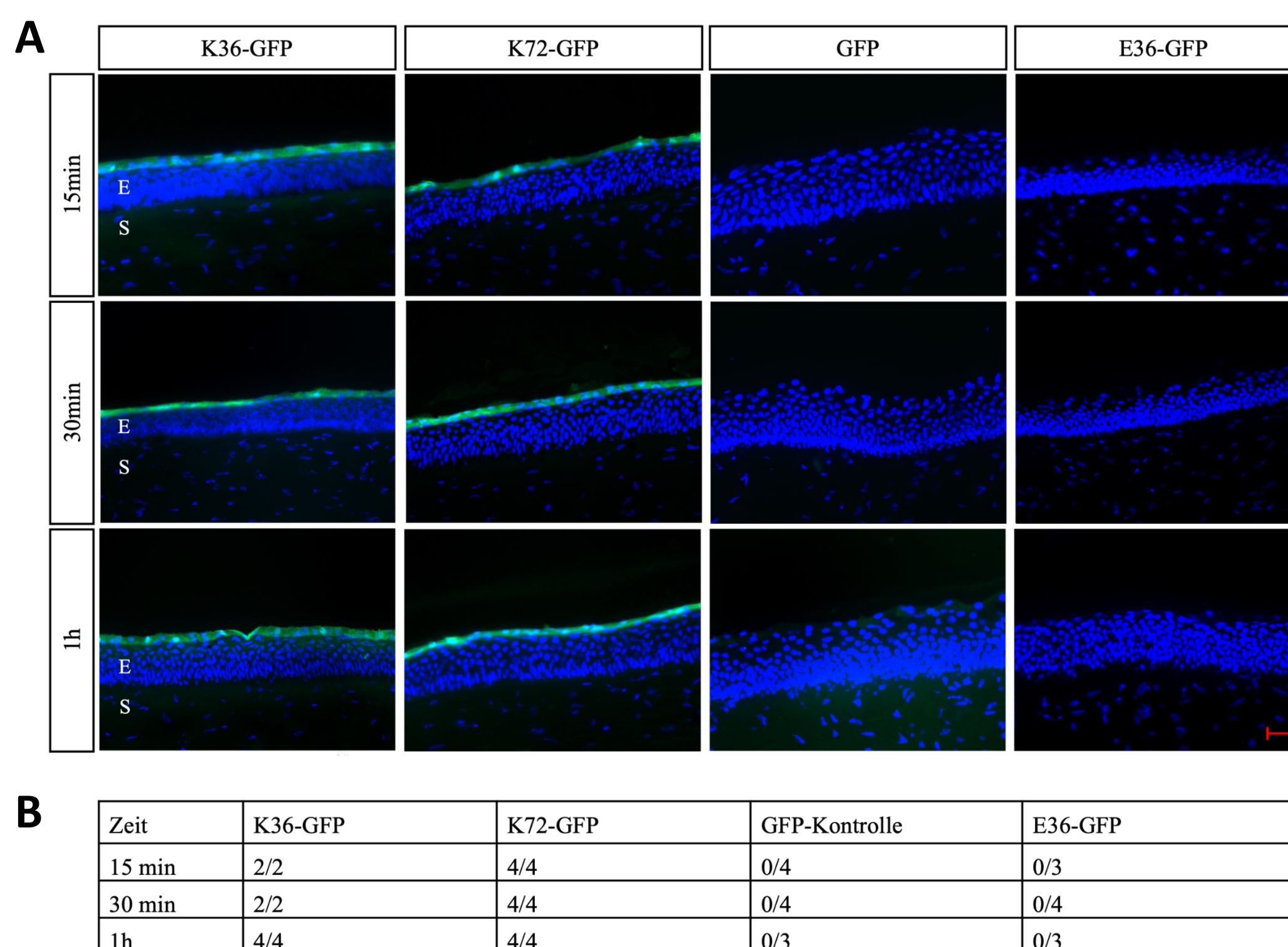


Abb. 2: K36-GFP + K72-GFP haften mind. 1h an porciner Hornhaut

A: Signale von K36-GFP und K72-GFP (grün) waren zu jedem Zeitpunkt nachweisbar. Weder bei E36-GFP noch bei GFP wurden Signale detektiert. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken entspricht 50 µm

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.

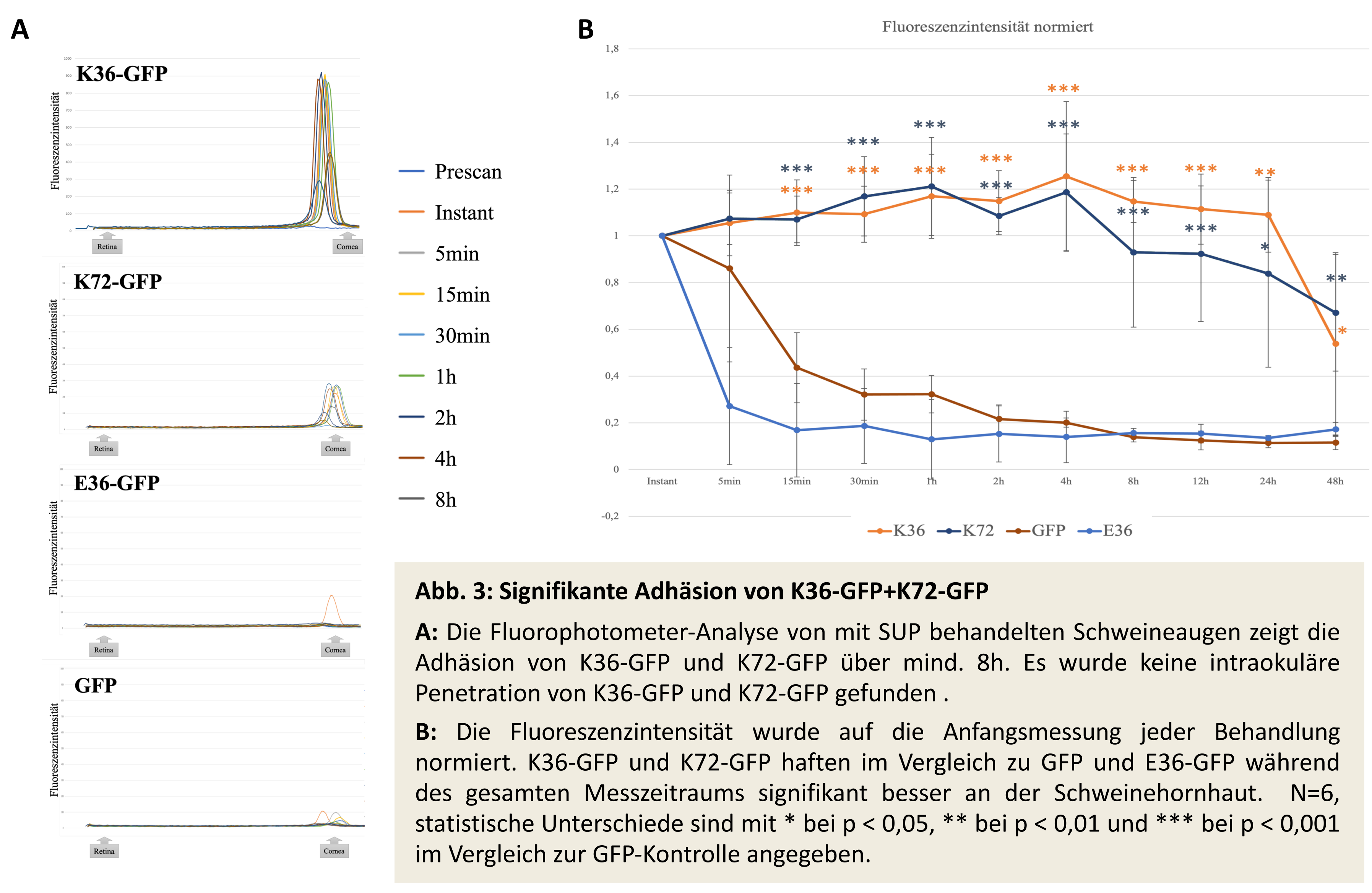


Abb. 3: Signifikante Adhäsion von K36-GFP+K72-GFP

A: Die Fluorophotometer-Analyse von mit SUP behandelten Schweineaugen zeigt die Adhäsion von K36-GFP und K72-GFP über mind. 8h. Es wurde keine intraokuläre Penetration von K36-GFP und K72-GFP gefunden.

B: 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 besser an der Schweinehornhaut. N=6, statistische Unterschiede sind mit * bei p < 0,05, ** bei p < 0,01 und *** bei p < 0,001 im Vergleich zur GFP-Kontrolle angegeben.

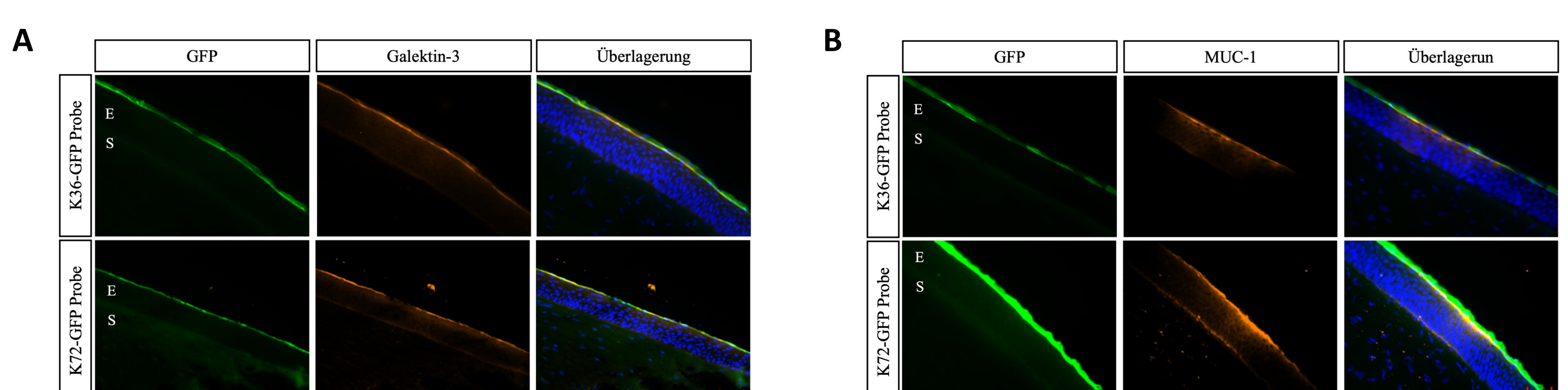


Abb. 4: K36-GFP und K72-GFP adhären in der Muzinschicht

Die Schweineaugen wurden je eine Stunde lang mit K36-GFP oder K72-GFP behandelt.

A: Die Galectin-3-Antikörperfärbung (rot) auf Schweinekryoschnitten belegt die Lokalisation (gelb) von K36-GFP und K72-GFP (grün) in der Muzinschicht.

B: Die MUC-1-Antikörperfärbung (rot) auf den Schweinekryoschnitten zeigt ebenfalls eine Lokalisation (gelb) von K36-GFP und K72-GFP (grün) in der Muzinschicht. Zellkerne sind blau angefarbt. E= Hornhautepithel, S= Stroma; Maßstabsbalken entspricht 50 µm