

Entwicklung und Charakterisierung von Gelatine-basierten Hydrogelen und PLGA-basierten Janus-Partikeln



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

angefertigt am
Universitätsklinikum Würzburg - Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
und Karlsruher Institut für Technologie - Institut für Funktionelle Grenzflächen



vorgelegt von
Sina Maria Siglinde Schönwälder
geboren in
Schwäbisch Gmünd

Würzburg 2016

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Heike Walles

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

In der Regenerativen Medizin sind polymerbasierte Biomaterialien von großer Bedeutung für die Entwicklung und Anwendung verbesserter bzw. neuer Therapien. Die Erforschung der Oberflächeneigenschaften von Biomaterialien, welche als Implantate eingesetzt werden, ist eine grundlegende Voraussetzung für deren erfolgreichen Einsatz. Die Protein-Oberflächen-Interaktion geschieht initial, sobald ein Implantat mit Körperflüssigkeiten oder mit Gewebe in Kontakt kommt, und trägt maßgeblich zur direkten Wechselwirkung von Implantat und umgebenden Zellen bei. Dieser Prozess wird in der vorliegenden Arbeit an Gelatine untersucht. Daher bestand ein Ziel darin, stabile, nanometerdünne Gelatineoberflächen herzustellen und darauf die Adsorption von humanen Plasmaproteinen und bakteriellen Proteinen zu analysieren.

Die Abscheidung der Gelatinefilme in variabler Schichtdicke auf zuvor mit PPX-Amin modifizierten Oberflächen wurde unter Verwendung eines Rotationsbeschichters durchgeführt. Um stabile Hydrogelfilme zu erhalten, wurden die Amingruppen der disaggregierten Gelatinefibrillen untereinander und mit denen der Amin-Modifizierung durch ein biokompatibles Diisocyanat quervernetzt. Dieser Prozess lieferte einen reproduzierbaren und chemisch stabilen Gelatinefilm, welcher durch die substratunabhängige Amin-Modifizierung kovalent auf unterschiedlichste Oberflächen aufgebracht werden konnte. Die durch den Herstellungsprozess präzise eingestellte Schichtdicke (Nano- bzw. Mikrometermaßstab) wurde mittels Ellipsometrie und Rasterkraftmikroskopie ermittelt. Die ebenso bestimmte Rauheit war unabhängig von der Schichtdicke sehr gering. Gelatinefilme, die auf funktionalisierte und strukturierte Proben aufgebracht wurden, konnten durch Elektronenmikroskopie dargestellt werden. Mit Hilfe der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie wurden die Gelatinefilme im Hinblick auf ihre Stabilität chemisch charakterisiert. Zur Quantifizierung der Adsorption humaner Plasmaproteine (Einzelproteinlösungen) und komplexer Proteingemische aus steril filtrierten Kulturüberständen des humanpathogenen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* wurde die Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsüberwachung eingesetzt. Hiermit konnte nicht nur die adsorbierte Menge an Proteinen auf dem Gelatinehydrogel bzw. Referenzoberflächen (Gold, PPX-Amin, Titan), sondern auch die viskoelastischen Eigenschaften des adsorbierten Proteinfilms bestimmt werden. Allgemein adsorbierte auf dem Gelatinehydrogel eine geringere Proteinmasse im Vergleich zu den Referenzoberflächen. Circa ein Viertel der adsorbierten Proteine migrierte in die Poren des gequollenen Gels und veränderte dessen viskoelastische Eigenschaften. Durch anschließende MALDI-ToF/MS- und MS/MS-Analyse konnten die bakteriellen Proteine auf den untersuchten Oberflächen identifiziert und untereinander verglichen werden. Hierbei zeigten sich nur geringfügige Unterschiede in der Proteinzusammensetzung. Zudem wurde eine Sekundärionenmassenspektrometrie mit Flugzeitanalyse an reinen Gelatinefilmen und an mit humanen Plasmaproteinen beladenen Gelatinefilmen durchgeführt. Durch eine anschließende multivariante Datenanalyse konnte zwischen den untersuchten Proben eindeutig differenziert werden. Dieser Ansatz ermöglicht es, die Adsorption von unterschiedlichen Proteinen auf proteinbasierten Oberflächen markierungsfrei zu untersuchen und kann zur Aufklärung der *in vivo*-Situation beitragen. Darüber hinaus bietet dieser Untersuchungsansatz neue Perspektiven für die Gestaltung und das schnelle und effiziente Screening von unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen.

Biomaterialien können jedoch nicht nur als Implantate oder Implantatbeschichtungen eingesetzt werden. Im Bereich des *drug delivery* und der Depotarzneimittel sind biologisch abbaubare Polymere, aufgrund ihrer variablen Eigenschaften, von großem Interesse. Die Behandlung von bakteriellen und fungalen Pneumonien stellt insbesondere bei Menschen mit Vorerkrankungen wie Cystische Fibrose oder primäre Ziliendyskinesie eine große Herausforderung dar. Oral oder intravenös applizierte Wirkstoffe erreichen die Erreger aufgrund der erhöhten Zähigkeit des Bronchialsekretes oft nicht in ausreichender Konzentration. Daher besteht ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit darin, mittels *electrohydrodynamic co-jetting* mikrometergroße, inhalierbare, wirkstoffbeladene Partikel mit zwei Kompartimenten (Janus-Partikel) herzustellen und deren Eignung für die therapeutische Anwendung bei Lungeninfektionen zu untersuchen.

Durch das in dieser Arbeit entwickelte Lösungsmittelsystem können Janus-Partikel aus biologisch abbaubaren Co-Polymeren der Polymilchsäure (Poly(lactid-co-glycolid), PLGA) hergestellt und mit verschiedenen Wirkstoffen beladen werden. Darunter befinden sich ein Antibiotikum (Aztreonam, AZT), ein Antimykotikum (Itraconazol, ICZ), ein Mukolytikum (Acetylcystein, ACC) und ein Antiphlogistikum (Ibuprofen, IBU). Die Freisetzung der eingelagerten Wirkstoffe, mit Ausnahme von ICZ, konnte unter physiologischen Bedingungen mittels Dialyse und anschließender Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gemessen werden. Die Freisetzungsraten wurden von der Kettenlänge des Polymers beeinflusst, wobei eine kürzere Kettenlänge zu einer schnelleren Freisetzung führt. Das in die Partikel eingelagerte Antimykotikum zeigte *in vitro* eine gute Wirksamkeit gegen *Aspergillus nidulans*. Durch das Einlagern von ICZ in die Partikel ist es möglich diesen schlecht wasserlöslichen Wirkstoff in eine für Patienten zugängliche und wirksame Applikationsform zu bringen. In Interaktion mit *P. aeruginosa* erzielten die mit Antibiotikum beladenen Partikel *in vitro* bessere Ergebnisse als der Wirkstoff in Lösung, was sich in einem *in vivo*-Infektionsmodell mit der Wachsmotte *Galleria mellonella* bestätigte. AZT-beladene Partikel hatten gegenüber einer identischen Wirkstoffmenge in Lösung eine 27,5 % bessere Überlebensrate der Wachsmotten zur Folge. Des Weiteren hatten die Partikel keinen messbaren negativen Einfluss auf die Wachsmotten. Dreidimensionale Atemwegsschleimhautmodelle, hergestellt mit Methoden des Tissue Engineering, bildeten die Basis für Untersuchungen der Partikel in Interaktion mit humanen Atemwegszellen. Die Untersuchung von Apoptose- und Entzündungsmarkern im Überstand der 3D-Modelle zeigte diesbezüglich keinen negativen Einfluss der Partikel auf die humanen Zellen. Diese gut charakterisierten und standardisierten *in vitro*-Testsysteme machen es möglich, Medikamentenuntersuchungen an menschlichen Zellen durchzuführen. Hinsichtlich der histologischen Architektur und funktionellen Eigenschaften der 3D-Modelle konnte eine hohe *in vitro*-/*in vivo*-Korrelation zu menschlichem Gewebe festgestellt werden. Humane Mucine auf den 3D-Modellen dienten zur Untersuchung der schleimlösenden Wirkung von ACC-beladenen Partikeln. Standen diese in räumlichem Kontakt zu den Mucinen, wurde deren Zähigkeit durch das freigesetzte ACC herabgesetzt, was qualitativ mittels histologischen Methoden bestätigt werden konnte.

Die in dieser Arbeit entwickelten Herstellungsprotokolle dienen als Grundlage und können für die Synthese ähnlicher Systeme, basierend auf anderen Polymeren und Wirkstoffen, modifiziert werden. Gelatine und PLGA erwiesen sich als vielseitig einsetzbare Werkstoffe und bieten eine breite Anwendungsvielfalt in der Regenerativen Medizin, was die erzielten Resultate bekräftigen.

Abstract

In the field of regenerative medicine, polymer-based biomaterials are of great importance for the development and application of improved or new therapies. The research on the surface properties of biomaterials, which are used as implants, is essential for their successful use. The protein-surface interaction is the initial step and occurs when an implant comes into contact with bodily fluids or tissues and significantly increases direct interaction of the implant and the surrounding cells. This thesis investigates these processes on gelatin. Accordingly, one of the project's major goals was to produce stable nanometer-thin gelatin surfaces and analyze the adsorption of human plasma and bacterial proteins.

The deposition of gelatin films and the assortment of layer thicknesses on PPX-amine modified surfaces were carried out using a spin coater. To gain hydrogel films with reproducible properties, the amine groups of the disaggregated gelatin fibrils were cross-linked with each other and with those of the amine modification by a biocompatible diisocyanate. The result was a reproducible and chemically stable gelatin film, which could be applied to a wide variety of surfaces through the substrate-independent amine modification. The manufacturing process precisely adjusted the layer thickness to the nano- or micrometer scale which could be determined applying ellipsometry and atomic-force microscopy. The roughness was very low regardless of the layer thickness. Gelatin films applied to the functionalized and patterned samples could be visualized by electron microscopy. With the help of infrared reflection absorption spectroscopy, the gelatin films were chemically characterized in terms of stability. The adsorption of human plasma proteins (single protein solutions) as well as the complex protein mixtures of sterile filtered supernatants belonging to *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogenic bacterium, were quantified by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. Both the adsorbed amount of proteins on the gelatin hydrogel or reference surfaces (gold, PPX-amine, titanium) and the viscoelastic properties of the adsorbed protein film were determined. In general, there was less protein mass adsorbed on the gelatin hydrogel compared to the reference surfaces. About a quarter of the adsorbed proteins migrated into the pores of the swollen gel and changed its viscoelastic properties. Subsequent MALDI-ToF/MS and MS/MS analysis were used to identify and compare the adsorbed bacterial proteins on the investigated surfaces. Only slight differences were found in the adsorbed protein composition. A secondary ion mass spectrometry with time-of-flight analysis was performed on pure gelatin films and gelatin films loaded with human plasma proteins. By subsequent multivariate data analysis, it was possible to clearly differentiate between the examined samples. Not only does this approach enable us to screen the adsorption of different proteins on protein-based surfaces without labeling, but it also contributes to the elucidation of the *in vivo*-situation. In addition, this approach provides new perspectives regarding the design and efficient screening of different protein compositions.

However, the usage of biomaterials is not limited to implants or implant coatings. In the field of drug delivery and extended-release drugs, biodegradable polymers are of great interest due to their variable properties. The treatment of bacterial and fungal pneumonia

is a major challenge. This is especially true for people with pre-existing conditions such as cystic fibrosis or primary ciliary dyskinesia, where oral or intravenously administered drugs cannot reach the pathogens in a sufficiently high concentration due to the increased viscosity of the bronchial secretion. Therefore, another major goal of this project was to prepare micrometer-sized, inhalable, dual-compartmentalized, drug-loaded particles (Janus particles) by means of electrohydrodynamic co-jetting and subsequently examine their suitability for therapeutic use in lung infections.

Through the solvent system developed in this work, Janus particles can be produced from biodegradable co-polymers of polylactic acid (poly(lactic-co-glycolic acid, PLGA) and loaded with various active agents. These include an antibiotic (aztreonam, AZT), an antimycotic (itraconazole, ICZ), a mucolytic (acetylcysteine, ACC), and an antiphlogistic agent (ibuprofen, IBU). The particle-loaded active agents, with the exception of ICZ, were released under physiological conditions and detected using dialysis and high-performance liquid chromatography. It was observed that the release rates were affected by the chain length of the polymer, with a shorter chain length resulting in a faster release. ICZ-loaded particles *in vitro* showed strong antimycotic activity against *Aspergillus nidulans*. By loading ICZ into the particles, the poorly water-soluble active agent becomes accessible and effective for patients. The antibiotic-loaded particles produced more favourable results through its *in vitro* interaction with *P. aeruginosa* versus its active substance in solution. This was confirmed *in vivo* with the wax moth *Galleria mellonella*. AZT-loaded particles had a better survival rate compared to the same amount of drug in solution in the *in vivo* infection model. Furthermore, the particles had no measurable negative influence on the wax moths. Three-dimensional respiratory mucosa models produced by methods of tissue engineering formed the basis for studies of the particles in interaction with human cells. The investigation of apoptotic and inflammatory markers in the supernatant of the 3D-models showed no negative influence caused by the particles. These well-characterized and standardized *in vitro* test systems enabled us to perform drug tests on human cells. Regarding the histological architecture and functional properties of the 3D models, a high *in vitro* / *in vivo* correlation to human tissue could be established. Human mucins on the 3D-models were used to investigate the liquefying ability of ACC-loaded particles. If these came into spatial contact to the mucins, their tenacity was reduced by the released ACC and thus, qualitatively confirmed by means of histological methods.

The operation procedures developed in this work serve as a foundation and can be modified for the synthesis of similar systems based on other polymers and active agents. Gelatin and PLGA are versatile materials, which offer a wide range of applications in regenerative medicine as shown by the results achieved.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Verwendete Einheiten	VII
1 Einleitung	1
1.1 Motivation und Zielsetzung dieser Arbeit	1
1.2 Biomaterialien in der Medizin	2
1.2.1 Biologisch abbaubare Materialien in der Regenerativen Medizin . .	3
1.2.2 Funktionalisierung von medizinischen Oberflächen	6
1.2.3 Gelatine-basierte Implantate und Implantatbeschichtungen	7
1.2.4 Milchsäurebasierte, partikuläre Wirkstofffreisetzungssysteme	10
1.3 Schwer behandelbare Pneumonien	12
1.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.3.2 <i>Aspergillus spp.</i>	15
1.3.3 Krankheitsbild der Cystischen Fibrose	17
1.4 <i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Testsysteme für die Medikamentenforschung	20
1.4.1 2D-Zellkultur vs. 3D-Gewebemodelle	23
1.4.2 <i>In vivo</i> -Infektionsmodell <i>Galleria mellonella</i>	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Biologisches Material	25
2.1.2 Nährmedien und Lösungen	27
2.1.3 Kits	28
2.1.4 Antikörper, Puffer und Lösungen für die Histologie	28
2.1.5 Chemikalien	29
2.1.6 Geräte, Software und Datenbanken	31
2.1.7 Labor- und Verbrauchsmaterialien	35
2.2 Methoden	37
2.2.1 Herstellung von Gelatine-basierten Filmen und deren chemische und physikalische Charakterisierung	37
2.2.1.1 Chemische Funktionalisierung von Oberflächen	37
2.2.1.2 Ermittlung von Schichtdicken	37
2.2.1.3 Rotationsbeschichtung von Oberflächen	38
2.2.1.4 Quervernetzung der Gelatine-basierten Filme	38

2.2.1.5	Visualisierung der Oberflächen mittels Rasterelektronenmikroskopie (<i>environmental scanning electron microscopy</i> , ESEM)	39
2.2.1.6	Chemische Charakterisierung der Stabilität von Gelatinebasierten Filmen mittels Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie	40
2.2.1.7	Ermittlung der Oberflächenmorphologie und -topographie sowie des Elastizitätsmoduls der Gelatine-basierten Filme	40
2.2.1.8	Statische Kontaktwinkelmessung	41
2.2.2	Kultivierung, Lagerung und Stammerhaltung von <i>P. aeruginosa</i>	41
2.2.3	Kultivierung, Lagerung und Stammerhaltung von <i>A. nidulans</i>	42
2.2.4	Untersuchung der Proteinadsorption mittels Quarzkristall-Mikrowaage	42
2.2.5	Charakterisierung der adsorbierten Proteine	44
2.2.5.1	Berechnung des Schermoduls	44
2.2.5.2	Differenzierung von mit humanen Proteinen beladenen und unbeladenen Gelatine-basierten Filmen	45
2.2.5.3	Identifizierung adsorbierter, bakterieller Proteine auf unterschiedlichen Oberflächen	45
2.2.6	Herstellung von PLGA-basierten Janus-Partikeln	47
2.2.7	Chemische und physikalische Charakterisierung von wirkstoffbeladenen Janus-Partikeln	49
2.2.7.1	Mikroskopische Analyse der Partikel	49
2.2.7.2	Ermittlung der Partikelgröße mittels ImageJ	50
2.2.7.3	Messung der Wirkstofffreisetzungsraten	50
2.2.8	Biologische Charakterisierung der mit Wirkstoffen beladenen Partikel <i>in vitro</i>	51
2.2.8.1	Hemmhofstests	51
2.2.8.2	Allgemeine Zellkulturtechnik	52
2.2.8.3	Untersuchung und Nachweis von Janus-Partikeln auf 2D-Zellkulturen	55
2.2.8.4	Aufbau von 3D- <i>in vitro</i> -Testsystemen der Atemwegsschleimhaut	55
2.2.8.5	Vorbereitung der Partikel, deren Inkubation mit den 3D-Modellen und die Fixierung	56
2.2.8.6	Charakterisierung der 3D- <i>in vitro</i> -Testsysteme	57
2.2.9	Histologische Analyseverfahren	59
2.2.9.1	Herstellung von histologischen Dünnschnittpräparaten	59
2.2.10	Charakterisierung der mit Antibiotikum beladenen Janus-Partikel <i>in vivo</i>	62
2.2.11	Statistische Auswertung der Messdaten	64
3	Ergebnisse	65
3.1	Chemische und physikalische Charakterisierung Gelatine-basierter Oberflächenbeschichtungen	65
3.1.1	Oberflächenanalyse von Amin-modifiziertem und unmodifiziertem Paracyclophan	65

3.1.2	Herstellung der Gelatine-basierten Oberflächenbeschichtungen	66
3.1.3	Ermittlung der Schichtdicke und der Rauheit von Oberflächenbeschichtungen	68
3.1.4	Ermittlung des reduzierten Elastizitätsmoduls der dünnen Gelatine-basierten Hydrogele	72
3.1.5	Ermittlung der Kontaktwinkel auf unterschiedlichen Oberflächen	72
3.1.6	Chemische Charakterisierung der Gelatine-basierten Filme	74
3.2	Proteinadsorption auf medizinisch relevanten Oberflächen	75
3.2.1	Quantitative Charakterisierung der Proteinadsorption	76
3.2.2	$\Delta D_n/(-\Delta f_n)$ -Verhältnisse während der Proteinadsorption und die Berechnung des Schermoduls	79
3.2.3	Charakterisierung der Adsorptionskinetik mittels exponentiellem Fitting	80
3.3	Charakterisierung der mit Proteinen beladenen Gelatinefilme	82
3.3.1	Analyse der Adsorption von HSA und humanem Fibrinogen	82
3.3.2	Identifizierung der adsorbierten bakteriellen Proteine	85
3.4	Herstellung und Charakterisierung der Janus-Partikel	86
3.4.1	Morphologische Charakterisierung der Partikel	86
3.4.2	Wirkstofffreisetzung aus den Partikeln	90
3.5	Biologische Charakterisierung der wirkstoffbeladenen Partikel <i>in vitro</i>	92
3.5.1	Antimikrobielle Wirkung	92
3.5.2	Aufbau und Charakterisierung von 3D-Testsystemen der Atemwegschleimhaut	95
3.5.3	Interaktion der Janus-Partikel mit humanen Zellen in der 2D-Kultur	97
3.5.4	Interaktion der Partikel mit den 3D-Testmodellen	97
3.5.4.1	Ultrastrukturanalyse mittels TEM und REM	103
3.5.4.2	Untersuchung des Zilienschlags und des Partikeltransports	104
3.5.4.3	Apoptose- und Entzündungsmarker	109
3.5.4.4	Transport der 3D-Modelle	110
3.5.4.5	Nachweis der metabolischen Aktivität der Zellen in den 3D-Modellen	110
3.5.4.6	Bestimmung der Anzahl an Epithelzellen auf den 3D-Modellen	110
3.6	Charakterisierung der Antibiotikum-beladenen Partikel <i>in vivo</i>	111
4	Diskussion und Ausblick	115
4.1	Einführung	115
4.2	Etablierung von stabilen Gelatine-basierten Filmen in unterschiedlichen Schichtdicken	116
4.3	Chemische und physikalische Eigenschaften von Gelatine-basierten Filmen	117
4.4	Beurteilung der Protein-Hydrogel-Interaktion	118
4.4.1	Die Adsorption von humanen Plasmaproteinen	119
4.4.2	Die Adsorption von bakteriellen Proteinen	120
4.5	Bewertung von Gelatine als Implantatmaterial bzw. als Implantatbeschichtung	122
4.6	Etablierung eines partikulären Wirkstofftransportsystems für die inhalative Applikation	123
4.7	Chemische und physikalische Eigenschaften von PLGA-basierten Partikeln	124

4.8	Beurteilung der Interaktion von wirkstoffbeladenen Partikeln mit Bakterien und Pilzen <i>in vitro</i>	125
4.9	Beurteilung der Interaktion von wirkstoffbeladenen Partikeln und humanen Zellen <i>in vitro</i>	126
4.10	Charakterisierung der Interaktion von wirkstoffbeladenen Partikeln mit einem <i>in vivo</i> -Infektionsmodell	128
4.11	Bewertung der PLGA-basierten Partikel als Wirkstoffträger für die inhalative Applikation	128
4.12	Ausblick	131
	Literaturverzeichnis	133
	Anhang	160
A	Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen	160
A.1	Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften	161
A.2	Eingereichtes Patent	161
A.3	Innovationswettbewerb	161
A.4	In Vorbereitung befindliche Publikationen	161
A.5	Abstracts auf Konferenzen	161
A.6	Vorträge	162
A.7	Poster	162
B	Standardprotokolle	163
C	Aminosäurezusammensetzung der untersuchten Proteine	175
D	Danksagung	177
E	Eidesstattliche Erklärung	180

Abbildungsverzeichnis

1.1	Systematik der Biokunststoffe.	6
1.2	Schematischer Aufbau der tripelhelikalen Struktur von Kollagen und die Größenangaben der einzelnen Bestandteile.	7
1.3	Schematische Darstellung der Vorgänge bei der chemisch-thermischen Gewinnung von Gelatine aus Kollagen.	8
1.4	Strukturformel von PLGA	10
1.5	Schema eines PLGA-basierten, partikulären Wirkstofffreisetzungssystems aus drei Kompartimenten.	11
1.6	Schema der bakteriellen Biofilmbildung.	14
1.7	Schema des Ionentransportes durch den CFTR- und ENaC-Ionenkanal in der Epithelzellmembran und die Auswirkung auf den Wassergehalt im Bronchialsekret.	18
1.8	Schematischer Querschnitt durch ein gesundes (links) und ein CF-Bronchiol (rechts).	18
2.1	Schema zur Herstellung von Gelatine-basierten Filmen.	39
2.2	Versuchsablauf für die Identifizierung adsorbierter bakterieller Proteine.	46
2.3	Schema EHD co-jetting für einen Partikel mit zwei Kompartimenten	48
2.4	3D-Modell der Atemwegsschleimhaut aufgespannt auf der Halterung eines Bioreaktors.	57
2.5	Beimpfung von <i>G. mellonella</i> (a) ventral (b) dorsal.	63
3.1	Nachweis der Amin-Modifizierung mittels ToF-SIMS.	66
3.2	Bestätigung der Notwendigkeit einer Amin-Modifizierung für kovalent auf der Oberfläche quervernetzte Gelatinefilme.	67
3.3	Strukturierte Amin-Modifizierung und darauf quervernetzte Gelatinefilme.	68
3.4	Lichtmikroskopische Aufnahme einer mit PPX-Amin strukturierten und mit Gelatine beschichteten Probe während der AFM-Messung.	69
3.5	Topographische Aufnahme der strukturierten Oberflächen mittels AFM.	70
3.6	Schichtdickenmessung eines quervernetzten Gelatinefilms auf einer Amin-Modifizierung.	71
3.7	Ermittlung der Schichtdicke und der Rauheit von quervernetzten Gelatinefilmen mittels AFM	72
3.8	Statische Kontaktwinkelmessung von einer mit PPX-Amin beschichteten Oberfläche.	73
3.9	Statischer Kontaktwinkel von Wasser auf verschiedenen Substraten mit glatter Oberfläche	73
3.10	Lokale Elementanalyse von strukturierten Oberflächen.	74
3.11	Chemische Charakterisierung von Gelatine-basierten Filmen mittels IRRAS.	75

3.12	Schema der Proteinadsorption auf verschiedenen Oberflächen.	76
3.13	Frequenz- und Dissipationsänderung während der Adsorption von Fibrinogen bzw. HSA auf unterschiedlichen Oberflächen.	77
3.14	Adsorbierte Voigt-Masse von HSA und Fibrinogen auf unterschiedlichen Oberflächen.	78
3.15	Adsorbierte Voigt-Masse der bakteriellen Proteine auf unterschiedlichen Oberflächen.	78
3.16	Verhalten der Dissipations- zur Frequenzänderung während der Adsorption von Fibrinogen.	79
3.17	$\Delta D_n/(-\Delta f_n)$ -Verhältnisse und Schermodule der adsorbierten humanen Proteine auf unterschiedlichen Oberflächen	80
3.18	Exponentielle Annäherung der $(-\Delta f_5)$ -Verhältnisse während der Fibrinogenadsorption	81
3.19	Auswertung der Hauptkomponentenanalyse zur Differenzierung zwischen unterschiedlichen Proteingemischen.	84
3.20	Elektronenmikroskopische Aufnahme der Janus-Partikel.	87
3.21	Auswertung der Partikelgröße, -form und deren Verteilung mit ImageJ.	88
3.22	Kompartimentierung der Janus-Partikel, untersucht mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop.	89
3.23	Kompartimentierung der Janus-Partikel untersucht mit einem hochauflösenden Mikroskop.	90
3.24	Freisetzungsraten der eingelagerten Wirkstoffe, in % über 96 h	91
3.25	Freisetzungsraten von ACC der Partikel aus unterschiedlichen Polymeren über 96 h.	92
3.26	Antimikrobielle Wirkung von AZT-beladenen Janus-Partikel gegen CI5523.	93
3.27	Antimikrobielle Wirkung von AZT-beladenen Partikeln gegen den <i>P. aeruginosa</i> -Wildtyp und unterschiedlichen klinischen Isolaten.	93
3.28	Relative Inhibition von Bakterien durch AZT-beladene Partikel im Vergleich zu AZT in Lösung.	94
3.29	Hemmhöfe der ICZ-beladenen Partikel in Interaktion mit <i>A. nidulans</i>	95
3.30	Histologische Charakterisierung des 3D- <i>in vitro</i> -Testsystems der Atemwegschleimhaut	96
3.31	Nachweis der Partikel nach der Inkubation mit humanen Zellen in 2D.	97
3.32	Interaktion von Partikeln mit den Kinozilien des 3D- <i>in vitro</i> -Testsystems der Atemwegschleimhaut.	98
3.33	Homogene Partikelverteilung auf einem Calu-3-Modell.	99
3.34	Lokalisation der Partikel auf den 3D-Modellen bzw. humanem Bronchusgewebe.	100
3.35	Hemmhofdurchmesser der mit AZT-beladenen Partikel in Kombination mit Schleim der 3D-Modelle.	101
3.36	Untersuchung der schleimlösenden Eigenschaft von ACC-beladenen Partikeln an einem Calu-3-Modell.	102
3.37	Untersuchung der schleimlösenden Eigenschaft von ACC-beladenen Partikeln an humanem Bronchusgewebe.	103
3.38	Ultrastrukturelle Untersuchung der Kinozilien.	104
3.39	Schlagfrequenz der Zilien von humanem Bronchusgewebe.	105

3.40	Schlagfrequenz der Zilien eines 3D-Modells der Atemwegsschleimhaut. . . .	106
3.41	Schlagfrequenz der Zilien eines 3D-Modells der Atemwegsschleimhaut. . . .	107
3.42	Partikeltransport auf einem zilientragenden 3D-Modell der Atemwegsschleimhaut.	108
3.43	IL-6-Konzentrationen im basalen Überstand der 3D-Modelle vor und nach der Partikelinkubation.	109
3.44	Nachweis der metabolischen Aktivität eines 3D-Modells der Atemwegsschleimhaut.	110
3.45	Bestimmung der Anzahl von Epithelzellen auf den differenzierten 3D-hTEC-Modellen.	111
3.46	<i>G. mellonella</i> nach <i>P. aeruginosa</i> -Infektion und Kontrollgruppen.	112
3.47	Überlebensrate von <i>G. mellonella</i> nach Infektion und Partikelgabe.	113
3.48	Überprüfung der Partikelverträglichkeit in <i>G. mellonella</i>	114
4.1	Schema einer inhalativen Gabe von Partikeln mit drei Kompartimenten. . .	129

Tabellenverzeichnis

1.1	Vor- und Nachteile von <i>in vitro</i> -Testsystemen für die Wirkstofftestung. . .	22
2.1	Eukaryotische Zellen und Modellorganismen	26
2.2	Bakterien und Pilze	26
2.3	Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur	27
2.4	Nährmedien und Lösungen für Bakterien- und Pilzkulturen	27
2.5	Kits	28
2.6	Antikörper	28
2.7	Puffer und Lösungen für histologische Untersuchungen	29
2.8	Chemikalien	29
2.9	Geräte	31
2.10	Software	34
2.11	Datenbanken	34
2.12	Labormaterialien	35
2.13	Verbrauchsmaterialien	36
2.14	Partikelzusammensetzung	49
2.15	Protokoll für die Paraffineinbettung von PFA-fixierten Proben.	59
2.16	Protokoll für die HE-Färbung.	60
2.17	Protokoll für die Alcianblau-Färbung.	61
2.18	Eingesetzte Antikörperverdünnungen und angefärbte Strukturen	62
3.1	Zuordnung der mittels IRRAS gemessenen Banden.	75
3.2	$\Delta D_5/(-\Delta f_5)$ und das Schermodul des adsorbierten Proteinfilms auf unterschiedlichen Oberflächen.	79
3.3	Analysierte Signale der Sekundärionenspektren (positive Polarität).	82
3.3	Analysierte Signale der Sekundärionenspektren (positive Polarität).	83
3.4	Adsorbierte bakterielle Proteine.	85
3.5	Zuordnung und Funktion der adsorbierten bakteriellen Proteine.	86
3.6	Morphologische Auswertung der Janus-Partikel mittels ImageJ	89
3.7	Ergebnisse der Hemmhofauswertung in Interaktion mit Bakterien	94
3.8	IL-6-Konzentration im basalen Nährmedium der Kontrollmodelle sowie vor und nach der Partikelinkubation	109
3.9	Überlebende <i>Galleria mellonella</i> nach 48 h Inkubation.	112

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetylcystein
AECG	<i>Airway Epithelial Cell Growth Medium</i>
AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>atomic-force microscope</i>)
AZT	Aztreonam
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CF	Cystische Fibrose
CVD	Chemische Gasphasenabscheidung (<i>chemical vapor deposition</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
dH₂O	Einfach destilliertes Wasser
ddH₂O	Zweifach destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	Fötales Kälberserum
Gew.-%	Gewichtsprozent
HE	Hämalaun-Eosin
HGK	Hochgeschwindigkeitskamera
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSA	Humanalbumin (<i>human serum albumin</i>)
IBU	Ibuprofen
ICZ	Itraconazol
IFG	Institut für Funktionelle Grenzflächen

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
LDI	L-Lysin diisocyanat ethyl ester
MALDI-ToF/MS	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse und Massenspektrometrie (<i>matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry</i>)
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
Milli-Q[®]-H₂O	Milli-Q [®] - / Reinstwasser (zweifach deionisiert und filtriert)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis (<i>mass-to-charge ratio</i>)
OD	Optische Dichte
PBS⁺	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Magnesium- und Kalziumionen
PBS⁻	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Magnesium- und Kalziumionen
PC	Hauptkomponente (<i>principal component</i>)
PDMS	Polydimethylsiloxan
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PLA	Polymilchsäure (<i>polylactic acid</i>)
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid) (<i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>)
QCM-D	Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsüberwachung (<i>quartz crystal microbalance with dissipation monitoring</i>)
RT	Raumtemperatur
SIS	Submucosa des Dünndarms (<i>small intestinal submucosa</i>)
ToF-SIMS	Sekundärionen-Massenspektrometrie (<i>time of flight secondary ion mass spectrometry</i>)
UV	Ultraviolett
VE-H₂O	Vollentsalztes Wasser
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
YAG	<i>Yeast Agar Glucose Medium</i>

Verwendete Einheiten

A	Ampere
a.u.	<i>arbitrary unit</i>
bar	Bar
°C	Grad Celsius
eV	Elektronenvolt
g	Gramm
h	Stunde (<i>hour</i>)
Hz	Hertz
l	Liter
m	Meter
M	Mol
min	Minute
N	Newton
Pa	Pascal
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
s	Sekunde
Torr	Torr
V	Volt
1/m	Wellenzahl

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Motivation und Zielsetzung dieser Arbeit

Seit vielen Jahrzehnten zeigt sich das enorme Potenzial von polymerbasierten Implantaten und Wirkstoffträgersystemen in der breiten klinischen Anwendung. Die Erforschung polymerbasierter Biomaterialien stützt sich auf den erheblichen Bedarf an Biomaterialien mit vielfältiger Funktionalität für die Entwicklung und Anwendung verbesserter bzw. neuer Therapien. Es besteht ein großes wissenschaftliches Interesse daran, die Funktionen und den Aufbau von biologischen Materialien im Detail zu verstehen, um sie als Bauplan für neue Materialien einzusetzen. Beim Design dieser Materialien stehen spezifische Eigenschaften und Funktionen für eine bestimmte Anwendung im Vordergrund, welche individuell angepasst werden müssen.

Ziel dieser Arbeit ist es, unterschiedliche Biomaterialsysteme auf ihre Eignung als Implantat bzw. Implantatbeschichtung und als partikuläres Wirkstoffträgersystem zu untersuchen und näher zu charakterisieren. Für die Untersuchungen werden zwei Biokunststoffe, ein Copolymer der Polymilchsäure (PLA) und Schweinegelatine, eingesetzt. Schweinegelatine ist ein biologisch abbaubares und aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnenes Biopolymer tierischen Ursprungs. Die zentralen Aspekte sind hierbei die Herstellung sowie die detaillierte chemische und physikalische Charakterisierung von stabilen, nanometerdünnen, unter Durchfluss und Wärme haltbaren Gelatinehydrogelfilmen auf definierten Oberflächen. Des Weiteren wird die Proteinadsorption von humanen Plasmaproteinen und bakteriellen Proteinen auf den Hydrogeloberflächen untersucht, woraufhin das Material im Hinblick auf seine Eignung als Implantat bzw. Implantatbeschichtung näher charakterisiert und beurteilt wird.

Der aktuelle Wissensstand zeigt, dass die Behandlung von bakteriellen und fungalen Erkrankungen in der Lunge eine große Herausforderung darstellt (Ewig, 2015). Meist besteht eine Co-Infektion mit unterschiedlichen Erregern, wodurch die Behandlung zusätzlich erschwert wird. Bei Patienten mit Vorerkrankungen wie Cystischer Fibrose (engl. *cystic fibrosis*, CF) oder primärer Ziliendyskinesie wird aufgrund der eingeschränkten Reinigungsfunktion der Lunge und des viskosen Bronchialsekrets das mikrobielle Wachstum sowie die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen zusätzlich unterstützt und die Wirkung von Medikamenten aufgrund robusterer Erreger herabgesetzt. Therapieverfahren und Medikamente müssen durch die neuen Forschungserkenntnisse im Bezug auf deren Verträglichkeit, Wirkung und Anwendung schnellstmöglich verbessert und getestet werden. Hierbei steht der gezielte

Transport von hochwirksamen Medikamenten an den Ort der Wirkung mittels einfacher, schneller und schmerzfreier Applikationen im Vordergrund.

Aus diesem Grund ist das zweite in dieser Arbeit untersuchte biologisch abbaubare Biomaterial das Poly(lactid-co-glycolid) (engl. *poly(lactic-co-glycolic acid)*, PLGA), welches dazu verwendet wird, wirkstoffbeladene Partikel im Mikrometermaßstab herzustellen. Ziel dieser Formulierung ist eine inhalative Gabe bei bakteriellen und fungalen Infektionen der Lunge. Die Etablierung eines geeigneten Lösungsmittelsystems bildet die Basis für die Synthese von wirkstoffbeladenen Partikeln. Diese werden über ihre Größe, Oberflächenbeschaffenheit und Wirkstofffreisetzung chemisch und physikalisch charakterisiert. Die biologische Funktionalität wird abschließend *in vitro* in Interaktion mit *P. aeruginosa*, *Aspergillus nidulans* und einem humanen 3D-Testsystem der Atemwegschleimhaut sowie *in vivo* in einem *G. mellonella*-Infektionsmodell untersucht.

1.2 Biomaterialien in der Medizin

Historisch gesehen wird die Begrifflichkeit „Biomaterialien“ seit den 1960er Jahren verwendet, eingesetzt wurden sie allerdings schon wesentlich früher (Abke, 2003). Bereits um 1800 v. Ch. vernähten die alten Ägypter Wunden mit Pflanzenfasern, Haaren, Sehnen und Wollfäden, welche in mumifizierten Überresten nachgewiesen wurden (Scott, 1983; Snyder, 1977). Sie verklebten die Wunden aber auch mit Harz oder klammerten sie mit Ameisenscheren (Vorsatz, 2008). Im zweiten Jahrhundert nach Christus verwendeten die Maya Perlmutter von Seemuscheln oder Gold als Zahnersatz. Im Laufe der Jahrhunderte kamen Glasaugen und Holzzähne zum Einsatz, was in alten Schrifttümern festgehalten wurde (Ratner et al., 2004; Wintermantel und Ha, 2009). Um 1887 wurde die Kontaktlinse von Adolf G. E. Fick erfunden (Kleberger, 1961) und drei Jahre später entwickelte der Berliner Themistokles Gluck Hüftköpfe aus Elfenbein (Lange, 2004). Mit der Entwicklung der aseptischen Operationstechnik Ende des 19. Jahrhunderts kam den Biomaterialien eine neue Bedeutung zu. Es wurde an verschiedenen Metallen und Legierungen sowie, seit Aufkommen der Kunststoffindustrie in den 1930er Jahren, vermehrt an Polymeren geforscht (Abke, 2003). Die Badische Anilin- & Soda-Fabrik (BASF) entwickelte 1939 einen ummantelten Polyamidfaden, welcher 1946 als Nahtmaterial im klinischen Bereich eingeführt wurde. Es folgten synthetische Kollagenfäden und Fäden aus Polyester (Nockemann, 1992).

Die Fortschritte im Bereich der Naht- und Operationstechnik machten es möglich, Herzklappen und Blutgefäße zu ersetzen. Dr. Charles Hufnagel und seine Kollegen implantierten 1952 die erste mechanische Herzklappenprothese. Sie bestand aus einer Acrylkugel, die sich durch den Druck im Herzen in einer zylindrischen Kammer auf und ab bewegte (Hufnagel und Gomes, 1976). Die erste Implantation einer künstlichen auf Polyester basierenden Gefäßprothese wurde Mitte der 1950er Jahre erfolgreich am Menschen durchgeführt (Wintermantel und Ha, 2009). 1958 wurde in Stockholm der erste vollständig in den menschlichen Körper eingebettete Herzschrittmacher implantiert. Zu Beginn waren diese Implantate faustgroß. Heute sind moderne Schrittmacher etwa so groß wie ein Zweieurostück und verbleiben ungefähr fünf bis zehn Jahre im Körper, je nachdem wie häufig das Gerät aktiv werden muss (zu Knyphausen, 2011). Die erste in Deutschland erfolgreich eingesetzte künstliche

Hüfte setzte sich aus einer Kunststoffpfanne, die aus ultra-hochmolekularem Polyethylen bestand, und einer Kopfprothese aus einer Chrom-Kobalt-Legierung zusammen. Fixiert wurde das Implantat mit Knochenzement. Diese zementierbare Totalprothesenkonstruktion wurde 1963 in Hamburg von Prof. Hans-Wilhelm Buchholz eingesetzt (Urbschat, 2014). Dies sind nur einige Beispiele für die geschichtliche Entwicklung von Biomaterialien, welche durch die enormen Fortschritte in der Medizin, Medizintechnik und Biotechnologie bis heute eine immense Weiterentwicklung durchlaufen haben.

Der Begriff „Biomaterial“ bezieht sich vor allem auf die stofflichen, insbesondere die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Materials. Die aus diesen Eigenschaften resultierende Biokompatibilität, welche sich sowohl durch die funktionale Ähnlichkeit zu körpereigenen Strukturen, als auch durch eine angemessene biologische Verträglichkeit im Körper auszeichnet, charakterisiert das Biomaterial. Demgegenüber beschreiben die Begrifflichkeiten „Implantat“ oder „Prothese“ (wie etwa Hüftprothesen oder Herzschrittmacher) eine konkrete Funktion eines Medizinproduktes im Hinblick auf eine bestimmte Anwendung, aufgebaut aus einem oder mehreren Biomaterialien (Wintermantel und Ha, 2009). Die Verträglichkeit und Lebensdauer von Implantaten zu erhöhen gestaltet sich bis heute als Herausforderung für Wissenschaftler und Kliniker.

1.2.1 Biologisch abbaubare Materialien in der Regenerativen Medizin

Die Regenerative Medizin beschäftigt sich als Teilbereich der Biomedizin mit der Heilung unterschiedlichster Erkrankungen durch die Wiederherstellung funktionsgestörter Zellen, Gewebe und Organe. Es wird der biologische Ersatz in Form von lebenden Zellen oder bioartifiziellem Gewebe sowie die Anregung körpereigener Regenerations- und Reparaturprozesse verfolgt (Wanka, 2013).

Gewebereaktionen aufgrund von Implantaten waren in den 1980er Jahren schon bekannt, eine Kategorisierung oder Konsensbeschreibung gab es jedoch noch nicht. Die European Society of Biomaterials (ESB) veranstaltete im Jahr 1986 eine Konferenz mit dem Ziel, klare biomaterialwissenschaftliche Definitionen für die Wirkung von Implantatmaterialien im Körper zu erstellen (Kubon und Stett, 2016). Hierbei wurde unter anderem die Biokompatibilität durch die Implantatregion, den verbleibenden Zeitraum im Körper und die Anwendung des Implantats beschrieben (Williams und European Society for Biomaterials, 1987). Aufgrund der immer weiter fortschreitenden Verbesserung und Weiterentwicklung von Biomaterialien legte Williams (1999) die Definitionen im „Williams Dictionary“ wie folgt fest:

Biomaterialien: „*A material intended to interface with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissue, organ or function of the body.*“

Biokompatibilität: „*The ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application.*“

Im Laufe der Zeit wurde der Aufbau von Biomaterialien und daraus bestehenden Implantaten zunehmend komplexer. Aus diesem Grund wurden 2003 die Williams-Definitionen ausgehend von den Materialeigenschaften eines Biomaterials hin zu seiner Funktion und Anwendung überarbeitet (Williams, 2003). 2005 fand aufgrund des enormen Fortschritts im Bereich Regenerative Medizin und Tissue Engineering erneut eine Konsensuskonferenz der ESB statt. Daraus resultierten die momentan aktuellen Definitionen für „bioaktive Biomaterialien“, welche neue Anwendungen in Therapie- und Diagnoseverfahren beinhalten (Kubon und Stett, 2016).

Biomaterial: „A biomaterial is a substance that has been engineered to take a form which, alone or as part of a complex system, is used to direct, by control of interactions with components of living systems, the course of any therapeutic or diagnostic procedure, in human or veterinary medicine.“ (Williams, 2009)

Biokompatibilität: “Biocompatibility refers to the ability of a biomaterial to perform its desired function with respect to a medical therapy, without eliciting any undesirable local or systemic effects in the recipient or beneficiary of that therapy, but generating the most appropriate beneficial cellular or tissue response in that specific situation, and optimizing the clinically relevant performance of that therapy.“ (Williams, 2008)

Bei der Entwicklung von biologisch abbaubaren Materialien für die Medizin stehen unter anderem die Resorption, Bioaktivität, Biokompatibilität, Biostabilität und die Funktion dieser Materialien für eine bestimmte Anwendung im Fokus. Implantate müssen am Implantationsort den biologischen, chemischen und physikalischen Belastungen standhalten (Biostabilität) und sich gleichzeitig in ihre biologische Umgebung integrieren (Bioaktivität), ohne durch ihre Materialbeschaffenheit, Form und Funktion das umliegende Gewebe zu irritieren (Biokompatibilität). Begleitende Gewebereaktionen sind durch unterschiedliche physikochemische und geometrische Eigenheiten von der Materialoberfläche beeinflusst. Die biomedizinische Forschung strebt die Entwicklung von Biomaterialien an, welche eine spezifische Gewebeantwort hervorrufen und dadurch zu einem einheitlichen Heilungsprozess führen (Williams und European Society for Biomaterials, 1987).

Ein „ideales“ Biomaterial führt zu einer minimalen Zellanregung und infolgedessen zur Vermeidung einer Fibrinkapsel. Im besten Fall bildet das umliegende Gewebe eine Bindung mit dem Implantat aus und heilt in dieses ein (Hench und Polak, 2002; Schmidt, 1999). Nahtmaterialien, Schrauben, Kleber oder Implantate werden vom umliegenden Gewebe nach einer im Biomaterial chemisch eingestellten Nutzungsphase am Implantationsort abgebaut, resorbiert und gegebenenfalls mit körpereigenen Zellen ersetzt. Zentral hierfür ist die Bioabbaubarkeit. Die in der Regel atoxischen Abbauprodukte können vom Organismus über Stoffwechselprozesse abtransportiert werden. So sollen weitere Operationen oder Eingriffe vermieden und die ursprüngliche Funktion auf natürliche Weise wiederhergestellt werden (Beier, 2009). Das Zusammenspiel dieser Eigenschaften bildet die Basis für die Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System sowie für die Eigenschaft, in einer biologischen Umgebung eine gewünschte Funktion zu erfüllen und im Idealfall keine schädliche Reaktion auszulösen (Ratner und Bryant, 2004; Kubon und Stett, 2016).

Die Biokompatibilität gliedert sich in zwei Hauptkategorien, die **statische** und die **dynamische Biokompatibilität** (Wintermantel und Ha, 2009). Bei der statischen Biokompatibilität wird wiederum zwischen Struktur- und Oberflächenkompatibilität unterschieden. Die Strukturkompatibilität beschreibt die Anpassung der Implantatstruktur an das mechanische Verhalten des Empfängergewebes. Hierfür sind sowohl die Formgebung als auch die „innere Struktur“ (z. B. die Ausrichtung von Fasern in anisotropen Werkstoffen) ausschlaggebend, wobei versucht wird, die Struktur des umgebenden Zielgewebes nachzuahmen (Ratner und Bryant, 2004). Bei der Oberflächenkompatibilität werden die chemischen, physikalischen, biologischen und morphologischen Oberflächeneigenschaften des Implantats an das Empfängergewebe mit dem Ziel einer klinisch erwünschten Wechselwirkung angepasst (Wintermantel und Ha, 2009). Für die dynamische Biokompatibilität ist die Kontaktzeit der angestrebten Verbindung zwischen Implantat und dem Empfängergewebe entscheidend. Eine Schulterprothese wäre demnach über Jahrzehnte zu beurteilen, ein biologisch abbaubarer Faden über Wochen (ebd.).

Seit 2009 muss für alle Medizinprodukte, die direkt oder indirekt mit dem menschlichen Körper in Kontakt kommen, eine biologische Beurteilung nach DIN EN ISO 10993 durchgeführt werden (Bucher et al., 2016). Die Norm ISO 10993 ist eine ISO-Normenreihe und vor allem für Hersteller von Medizinprodukten und Prüflaboratorien relevant. In ihr ist die biologische Beurteilung hinsichtlich der Verträglichkeit der eingesetzten Materialien mit dem Körper geregelt. Abgesehen von der biologischen Prüfung beinhaltet die Norm zusätzlich physikalisch-chemische Prüfungen und Analysen von gelösten Stoffen und Substanzen und schreibt das Einhalten von Grenzwerten bei herauslösbaren Substanzen vor. Es werden Abbauprodukte und Ausgangsstoffe zur Herstellung von Medizinprodukten untersucht (DIN EN ISO NORM, 2009; Doser, 2015). Biokunststoffe sind aufgrund ihrer vielseitigen Verwendbarkeit und ihrer guten Verträglichkeit als Biomaterial unverzichtbar. Das Bundesumweltamt hat die Biokunststoffe in die drei Hauptkategorien „biologisch nicht abbaubar“, „biologisch abbaubar aus nachwachsenden Rohstoffen“ und „biologisch abbaubar aus fossilen Rohstoffen“ eingeteilt (Abbildung 1.1; Beier (2009)). Relevant für die vorliegende Arbeit sind zwei Biokunststoffe, Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) und Gelatine.

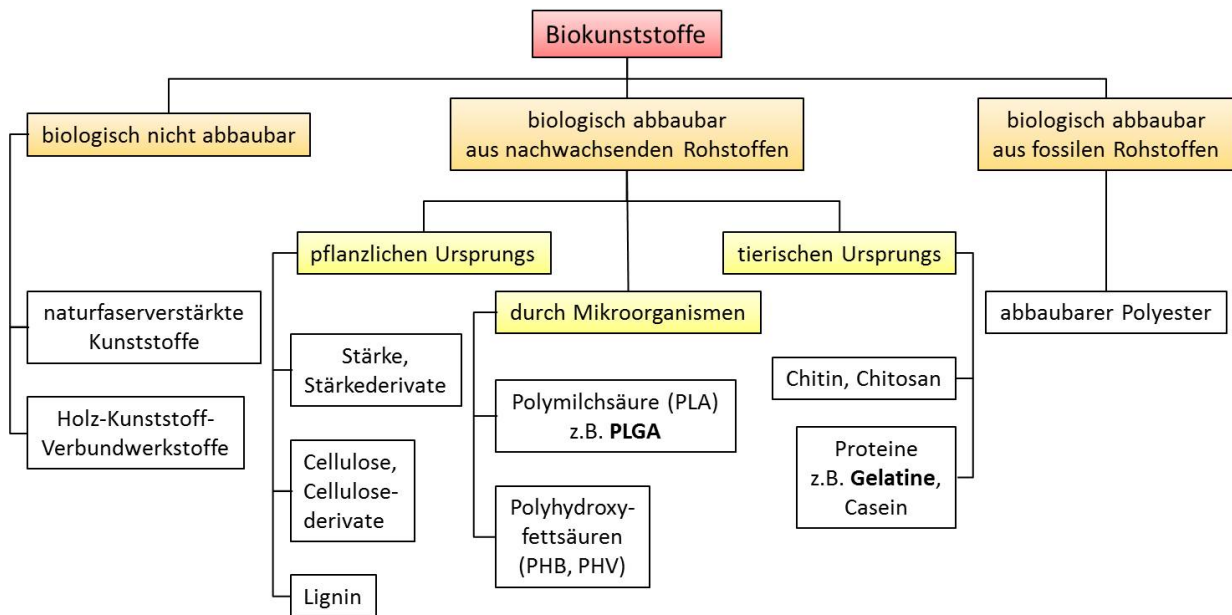


Abbildung 1.1: Systematik der Biokunststoffe. Hervorgehoben sind die in dieser Arbeit verwendeten Biokunststoffe Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) und Gelatine. (Abbildung verändert nach Beier (2009))

1.2.2 Funktionalisierung von medizinischen Oberflächen

Die Protein-Oberflächen-Interaktion ist der initiale Prozess, wenn ein Implantat mit Körperflüssigkeiten in Kontakt kommt und ein erster Indikator für die Biokompatibilität und Biofunktionalität (Silva-Bermudez und Rodil, 2013). Für die Bio- und Hämokompatibilität ist die Materialoberfläche von entscheidender Bedeutung. Hierbei ist die Interaktion zwischen Implantatoberfläche und den adsorbierten Proteinen wie auch die physikochemische Oberflächenbeschaffenheit ausschlaggebend (Ratner, 1993). Bei der Funktionalisierung von medizinischen Oberflächen steht die maßgeschneiderte Veränderung der Oberfläche im Vordergrund. Ziel ist es, die Biokompatibilität und Biostabilität eines Implantats der Anwendung entsprechend zu verbessern (Ratner und Bryant, 2004; Kubon, 2015). Basierend auf der Art des Biomaterials gibt es hierzu unterschiedliche Möglichkeiten. Es kann eine neue Materialschicht auf ein bestehendes Biomaterial aufgebracht oder die Oberflächeneigenschaft durch Abtragen einer Materialschicht mit bestimmter Dicke verändert werden. Darüber hinaus kann das bestehende Biomaterial durch verschiedene Techniken in seinen Oberflächeneigenschaften modifiziert werden, ohne dessen Volumen zu ändern. Weitere Ziele der Oberflächenfunktionalisierung sind vielfältig und beinhalten unter anderem eine hydrophile/hydrophobe Beschichtung, eine gezielte Beeinflussung der Proteinadsorption und bakteriellen Biofilmbildung sowie die Abgabe von Wirkstoffen. Ebenso werden eine spezifische Beeinflussung von Zelladhäsion, -differenzierung und -wachstum, die Erhöhung der Gleitfähigkeit oder der antibakteriellen und infektionshemmenden Eigenschaften der Oberfläche angestrebt (Bucher et al., 2016; Narayan, 2009).

Für die Funktionalisierung von Oberflächen werden unter anderem folgende Beschichtungsverfahren eingesetzt: Physikalische Gasphasenabscheidung, Chemische Gasphasenabscheidung (CVD), Plasmaunterstützte Chemische Gasphasenabscheidung, Plasmainduzierte Pflöpfung, Reaktives Ionenätzen, *atomic layer deposition*, elektrochemische Abscheidungsverfahren, sowie Tauch-, Sprüh- und Rotationsbeschichtung (Bucher et al., 2016). So dient in dieser Arbeit eine Amin-Modifizierung, welche mittels CVD auf eine Silizium-, Glas- oder Gold-Oberfläche aufgebracht wurde, als Vermittlerschicht mit chemischen Bindungsstellen. Durch eine Rotationsbeschichtung wurden Gelatinefilme mit einer Schichtdicke im Mikro- oder Nanometerbereich auf unterschiedliche Substrate aufgeschleudert. Um kontrastarme Bilder und Aufladungseffekte zu vermeiden, wurden alle Proben, welche mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht wurden, mittels physikalischer Gasphasenabscheidung mit einer leitenden Edelmetallschicht beschichtet.

1.2.3 Gelatine-basierte Implantate und Implantatbeschichtungen

Gelatine ist ein biogenes Stoffgemisch aus tierischen Proteinen, deren Hauptbestandteil denaturiertes bzw. hydrolysiertes Kollagen ist. Kollagen ist in Haut, Knochen, Sehnen und Bindegewebe enthalten und ist die im tierischen und menschlichen Organismus mit 25 % aller Proteine am häufigsten vorkommende Proteinklasse (Babel, 1996; Roller, 2015). Des Weiteren übernimmt Kollagen die zentrale Binde- und Stützfunktion in der extrazellulären Matrix (Roller, 2015). Es sind über 20 verschiedene Kollagentypen (Kollagenpolymorphismus) bekannt. Allen Kollagentypen gemeinsam ist der tripelhelikale Aufbau, bei dem freie Proteinketten (alpha-Ketten) in Form eines starren Seils umeinander gewunden sind (Abbildung 1.2).

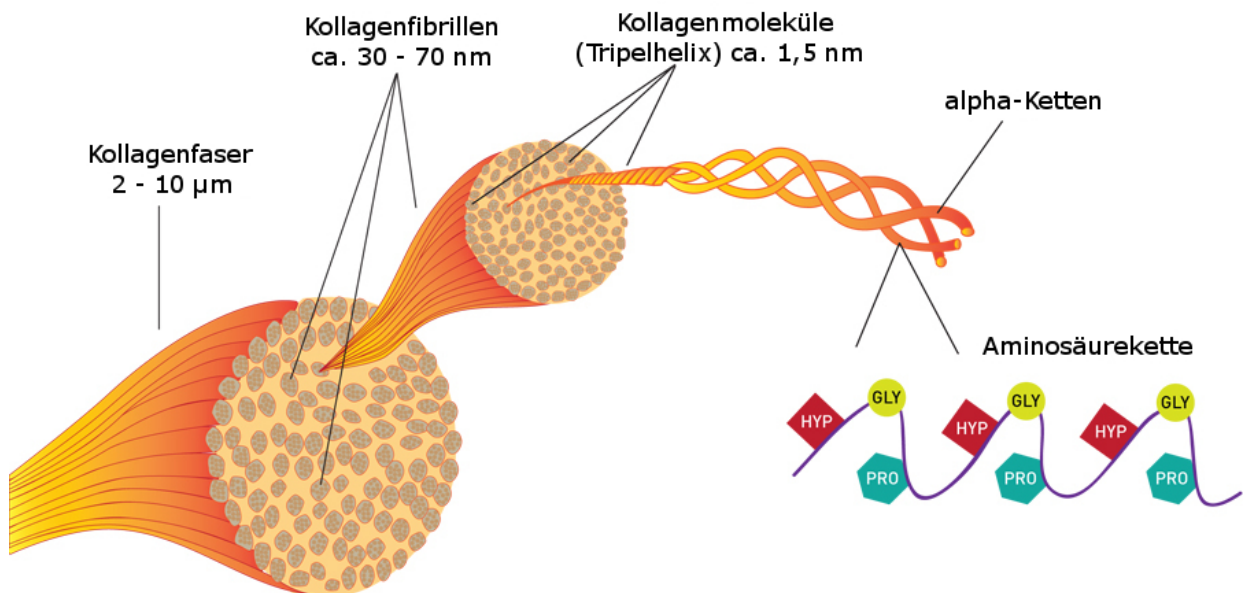


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau der tripelhelikalen Struktur von Kollagen und die Größenangaben der einzelnen Bestandteile (Durchmesser, (Kühnel, 2014)). Prolin (PRO), Hydroxyprolin (HYP), Glycin (GLY)). (Abbildung verändert nach proto-col world (2014))

Die Länge dieser Tripelhelix sowie Art und Lage der nichthelikalen Bereiche variieren von einem Kollagentyp zum anderen (Babel, 1996; Roller, 2015). Das Kollagen ist aus ca. 300-1000 Aminosäuren pro Kette aufgebaut. Jede dritte Aminosäure ist Glycin. Dazwischen kommen überwiegend die Aminosäuren Prolin, Hydroxyprolin, Lysin und Hydroxylysin vor. Mit 10,5% ist Prolin-Hydroxyprolin-Glycin die häufigste Abfolge in fibrillären Kollagenen (Abbildung 1.2) (Shoulders und Raines, 2009). Gelatine wird durch chemisch-thermische Verfahrensschritte aus dem faserartig aufgebauten Kollagen, meist aus dem Bindegewebe von Schweinen und Rindern, gewonnen. Aus einer Vielzahl an Gelatinetypen wird hauptsächlich Gelatine A, durch sauren Aufschluss (24-48 h bei pH 1-2), und Gelatine B, durch alkalischen Aufschluss (8-12 Wochen bei pH 12-13), gewonnen. Nach dem sauren bzw. alkalischen Aufschluss werden die das Kollagen stabilisierenden Bindungen beim Erwärmen auf 55-100 °C zerstört. Beim Abkühlen entsteht Gelatine, eine ungeordnete Molekülstruktur aus Knäueln, deren Faltung zufällig entsteht (Abbildung 1.3) (Babel, 1996).

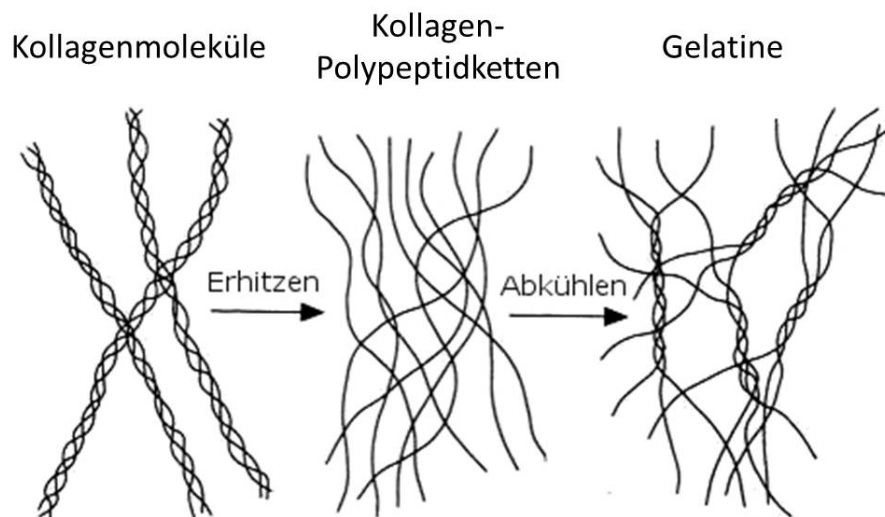


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Vorgänge bei der chemisch-thermischen Gewinnung von Gelatine aus Kollagen. (Abbildung verändert nach Babel (1996))

Gelatine besitzt ein sehr breites Anwendungsspektrum. So wird sie in der Lebensmittelindustrie beispielsweise als Binde- und Gelmittel oder zur Klärung von Apfelsaft oder Wein eingesetzt. Als Trägermaterial und Emulgator ist Gelatine auch in der Foto- und Papierindustrie von Bedeutung. In der pharmazeutischen Industrie wird Gelatine vor allem als Kapselmaterial für Hart- und Weichkapseln von Arzneimitteln und als Verdickungsmittel zur Viskositätserhöhung von flüssigen Arzneizubereitungen verwendet. Sie wird im Bereich der Optik zur Hornhautbefestigung eingesetzt und dient als Kontaktlinsenmaterial bzw. als Implantatbeschichtung wie beispielsweise bei Gefäßprothesen oder Stents (Inoue et al., 2013; Zhao et al., 2015; Hasan et al., 2015). In der Regenerativen Medizin werden Gelatine-basierte Hydrogele, je nach Anwendung, mit Zellen besiedelt oder unbesiedelt zur Gewebe-, Knorpel-, Knochen- und Nervenregeneration eingesetzt (Wang et al., 2013; Ma et al., 2016; Zhang et al., 2016; Chiba et al., 2016). Sie können alleine oder modifiziert mit anderen synthetischen oder natürlichen Biopolymeren, wie etwa Polymilchsäuren, Polyethylenterephthalat oder

Chitosan, gezielt mit Wirkstoffen beladen werden und dienen in dieser Form als biologisch abbaubare Wirkstofffreisetzungssysteme (Ma et al., 2016; Inoue et al., 2013; Tang et al., 2012). Des Weiteren können sie als Trägerstruktur für wirkstoffbeladene, partikuläre Systeme fungieren (Khan et al., 2016). Je nach Anwendung werden die Hydrogele mit geeigneten Resorptionszeiten ausgestattet (Beier, 2009). Dies kann unter anderem über eine chemische Quervernetzung der Aminogruppen der Gelatinefibrillen erfolgen, da sich unmodifizierte Gelatinehydrogele bei 37°C in Wasser auflösen und daher für Implantationszwecke zu instabil sind. Durch den Grad der Quervernetzung wird die Abbaugeschwindigkeit im Wirtsorganismus beeinflusst (Wintermantel und Ha, 2009).

Gelatine ist ein vollständig biologisch abbaubares, atoxisches, günstiges Biopolymer mit konstanter Verfügbarkeit, Biokompatibilität und Resorbierbarkeit. Es ist ein denaturiertes Ausgangsmaterial und daher weniger immunogen als Kollagen (Elzoghby et al., 2012). Gelatinehydrogele haben große Ähnlichkeit mit körpereigenem Gewebe bzw. können je nach Anwendung dahingehend modifiziert werden (Van Vlierberghe et al., 2011). Diese biomimetische Eigenschaft ist der Grund, warum die Hydrogele vom Körper nicht unmittelbar als fremd erkannt und daher nicht vom Immunsystem bekämpft werden; wodurch das Abstoßungsrisiko beträchtlich minimiert wird (Lendlein, 2013). In vielen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Gelatine-basierte Matrices oder mit Gelatinehydrogel modifizierte Anwendungen die Blutplättchenablagerung und deren Aktivierung minimieren, jedoch die Zelladhäsion und Proliferation von Endothelzellen drastisch verbessern (Merkle et al., 2015; Ino et al., 2013; Manju et al., 2011). Die Zelladhäsion wird zu einem großen Teil von der Proteinadsorption, jedoch auch von vorhandenen Bindungsstellen auf dem Implantat, gesteuert. Proteinketten der Gelatine haben viele Motive wie Arginin-Glycin-Asparaginsäure, sogenannte RGD-Sequenzen. Diese vermitteln unter anderem die Zelladhäsion und sind ein großer Vorteil von Gelatine gegenüber anderen Polymeren, welche diese Sequenzen nicht aufweisen (Ng et al., 2012; Ruoslahti und Pierschbacher, 1987). Zusätzlich kann durch die Porengröße die Zell-Implantat-Interaktion maßgeblich gesteuert werden. Umgebende Zellen adhären an RGD-Sequenzen und können anschließend, je nach Porengröße, in die Matrix migrieren. Das Implantat wird sozusagen in das umgebende Gewebe integriert und im besten Fall nach vollständiger Resorption von den umliegenden Zellen ersetzt. Im Bereich des Tissue Engineering zeichnet sich Gelatine als vielseitiges Matrixmaterial aus, da es die Zelladhäsion unterstützt, jedoch den Phänotyp der Zellen nicht verändert (Wang et al., 2012).

Gelatine besitzt eine große Vielfalt an zugänglichen funktionellen Gruppen (z. B. freie Amine), welche für chemische Modifikationen genutzt werden können. Sie machen es möglich, Quervernetzer oder Ziel-Liganden zu koppeln und so ein gezieltes Wirkstofffreisetzungssystem zu entwickeln (Ayre et al., 2014). Basierend auf diesem langjährigen und fundierten Wissen ist der Rohstoff Gelatine für das Tissue Engineering und zur Zelltherapie ein vielversprechendes, natürliches, biologisch abbaubares Makromolekül zum Wirkstofftransport (Su und Wang, 2015). Jedoch müssen die Interaktionen zwischen dem Zielorganismus und dem Biomaterial genau charakterisiert und gut verstanden werden, um ein optimales Implantatmaterial für spezielle *in vivo*-Anwendungen zu designen.

1.2.4 Milchsäurebasierte, partikuläre Wirkstofffreisetzungssysteme

Polymilchsäuren (engl. *polylactic acid*, PLA) sind aliphatische Polyester auf Milchsäurebasis und bereits seit 1845 bekannt. Zu dieser Zeit beobachtete Théophile-Jules Pelouze eine Kondensation der Milchsäuremoleküle und die Bildung von Oligomeren und Polymeren, als er versuchte, Milchsäure durch Erhitzen und Entfernung von Wasser aufzureinigen (Benninga, 1990). Das Monomer dieses Polymers, die Milchsäure, kann durch bakterielle Fermentation aus stärkehaltigen Pflanzenbestandteilen gewonnen werden. Ob eine D- oder L-Milchsäure produziert wird, entscheidet hierbei die Wahl des Mikroorganismus. Als Basischemikalie werden weltweit etwa 250 000 Tonnen Milchsäure pro Jahr (Stand 2010), vorrangig unter Nutzung von Maisstärke, hergestellt (Soetaert und Vandamme, 2010; Buss und Rauh, 2013). PLA und PLA-Mischungen werden sowohl in der Lebensmittelindustrie als auch im medizinischen Bereich als Spezialpolymere und in zunehmendem Maße als Verpackungs- und Faserwerkstoffe eingesetzt (Beier, 2009).

Die PLA und ihre Copolymere sind aus vielen chemisch aneinander gebundenen Milchsäuremolekülen aufgebaut. Sie können im Körper vollständig in gewebeverträgliche, nicht toxische Produkte abgebaut werden, die unverändert oder nach Metabolisierung eliminiert werden. Dies wurde erstmals 1966 an PLA-basiertem Nahtmaterial beobachtet (Kulkarni et al., 1966). Aus PLA können durch Wärmezufuhr verformbare, biokompatible Kunststoffe (Thermoplaste) hergestellt werden. In den vergangenen zwei Jahrzehnten entwickelte sich das PLGA, ein Copolymer der PLA, zu einer vielversprechenden Trägerstruktur im Bereich der medizinischen Anwendung (Price et al., 1996; Agrawal et al., 1995; Yamakawa et al., 1997; Cowan et al., 2004). PLGA wird über seine molekulare Masse und durch das Lactid-Glycolid-Verhältnis definiert. In Abbildung 1.4 ist die Strukturformel von PLGA dargestellt, wobei x für die Anzahl an Milchsäure-Einheiten (Lactide) und y für die Anzahl an Glycolsäure-Einheiten (Glycolide) steht.

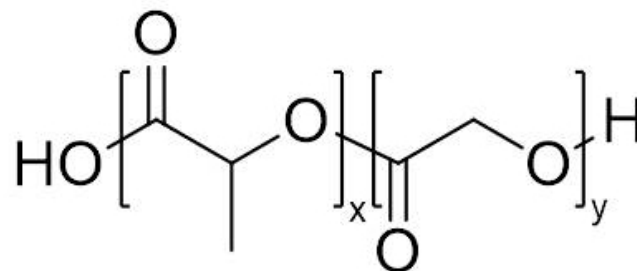


Abbildung 1.4: Strukturformel von PLGA

PLGA ist ein von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassenes Biopolymer, welches durch die Wahl der Enantiomere und/oder durch unterschiedliche Verhältnisse von Milch- und Glycolsäure-Einheiten sowie die Wahl unterschiedlicher Endgruppen und spezieller Modifikationen variable Abbauzeiten und mechanische Eigenschaften aufweist (Astete und Sabliov, 2006). Aufgrund dessen lassen sich Implantate oder deren Beschichtung

für zahlreiche medizinische Anwendungen wie beispielsweise als Knochenersatzmaterial, Nägel und Schrauben, aber auch für Platten oder Stents, realisieren (Cosse et al., 2016; An et al., 2015).

Abhängig von der chemischen Zusammensetzung, Kristallinität und Porosität verbleiben die Implantate von einigen Monaten bis zu mehreren Jahren im Körper, bis sie abgebaut sind. Im Gegensatz dazu wird PLGA-basiertes Nahtmaterial in einigen Tagen vollständig resorbiert (Smeets und Kolk, 2016). PLGA wird darüber hinaus auch als Gerüstmaterial für das Tissue Engineering eingesetzt. Hierfür werden poröse Strukturen aus PLGA-Fasern hergestellt, an die sich unterschiedliche Zelltypen, abhängig von der Porengröße und der Oberflächenbeschaffenheit, anheften können (Mironov et al., 2016; Lih et al., 2016). Des Weiteren findet PLGA als vollständig resorbierbares Depotarzneimittel mit variablem Abbauverhalten häufig Anwendung im Bereich der Knorpel- und Nervenregeneration (Makadia und Siegel, 2011; Orive et al., 2009; Ma et al., 2016). Bei allen Implantaten besteht jedoch der Vorteil, dass ein zweiter Eingriff zur Entfernung des Implantats in der Regel entfällt, wodurch den Patienten eine zweite Operation erspart bleibt.

PLGA kann außerdem auch als Träger für Arzneistoffe zur gesteuerten Abgabe von niedermolekularen Wirkstoffen, Proteinen und anderen Makromolekülen eingesetzt werden (Orive et al., 2009; Holmkvist et al., 2016). Für Letzteres eignen sich, je nach Anwendungsgebiet, partikuläre Strukturen. Sie können gezielt an den gewünschten Wirkort appliziert werden und dort die eingelagerten Wirkstoffe kontrolliert freisetzen. Insbesondere Partikel, die aus mehreren Kompartimenten mit unterschiedlichen physikalischen oder chemischen Eigenschaften und Funktionalisierungen bestehen, sind hierfür eine innovative Lösung und variabel einsetzbar. Partikel, welche aus zwei Kompartimenten bestehen, werden auch als Janus-Partikel bezeichnet (Roh et al., 2005). Abbildung 1.5 zeigt das Schema eines PLGA-basierten, partikulären Wirkstofffreisetzungssystems aus drei Kompartimenten mit einem Durchmesser von 1 - 3 μm .

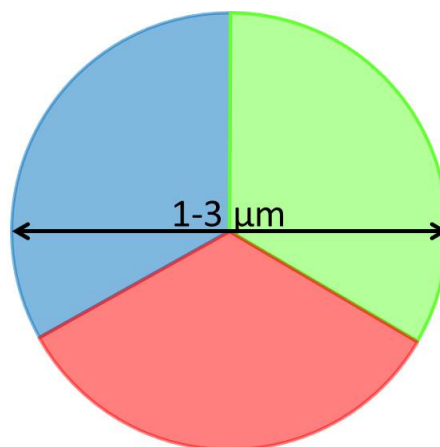


Abbildung 1.5: Schema eines PLGA-basierten, partikulären Wirkstofffreisetzungssystems aus drei Kompartimenten mit einem Durchmesser von 1 - 3 μm .

Diese Partikel werden mit dem patentierten Verfahren *electro hydrodynamic* (EHD) *co-jetting* (Patent US 20060201390 A1) hergestellt. Dabei werden im gleichen Verfahrensschritt

komplett voneinander getrennte Kompartimente, die mit einem oder mehreren Wirkstoffen beladen werden, erzeugt (Lahann, 2011). Ein Kompartiment ist ein in sich geschlossener Bereich innerhalb eines Partikels mit einer eigenen chemischen Zusammensetzung und einer eigenen Freisetzungsrate für den enthaltenen Wirkstoff. Aufgrund ihrer Größe sind die Wirkstoffe nicht in der Lage, in andere Kompartimente zu migrieren. Es ist möglich, dass einzelne Kompartimente des Partikels geöffnet werden bzw. sich auflösen, ohne dass andere Kompartimente des Partikels davon betroffen sind. Durch diese Beschaffenheit werden Partikel für eine bestimmte Anwendung funktionalisiert und modifiziert.

1.3 Schwer behandelbare Pneumonien

Bei einer Pneumonie (Lungenentzündung) handelt es sich um eine akut oder chronisch verlaufende Entzündung in der Lunge, welche meist durch Bakterien, Pilze oder Viren verursacht wird. Es kommt zu einer Anschwellung und vermehrten Durchblutung des betroffenen Lungenareals und sehr häufig zu einer Flüssigkeitsansammlung im Lungengewebe (Ödem). Pneumonien, welche durch die Inhalation giftiger Stoffe oder aufgrund immunologischer Vorgänge ausgelöst werden, sind sehr selten (Krüll, 2010).

Nach Durchfallerkrankungen ist die ambulant erworbene Pneumonie (*community acquired pneumonia* (CAP)) die am zweithäufigsten registrierte Infektionskrankheit weltweit und daher von hoher sozialmedizinischer und ökonomischer Bedeutung (World Health Organization, 2004; Lopez und Murray, 1998). Sie wird im privaten oder beruflichen Umfeld erworben und ist zu ca. 90 % bakteriellen Ursprungs (Society, 1995). Unter Annahme einer Hospitalisierungsrate von 30 - 50 % liegt die Anzahl neuer Erkrankungsfälle einer ambulant erworbenen Pneumonie in Deutschland bei ca. 400 000 bis 600 000 Fällen pro Jahr (Höffken et al., 2009; Marrie et al., 2000). Damit führen ambulant erworbene Pneumonien häufiger zu stationären Aufnahmen als Herzinfarkte (132 000 Aufnahmen) oder Schlaganfälle (162 000 Aufnahmen) (Krüll, 2010; Pletz et al., 2010).

Die Erkrankung kann sich in Abhängigkeit des allgemeinen Gesundheitszustandes des Patienten und von der Art des Erregers sehr unterschiedlich entwickeln. Bei nur einem Drittel der Patienten ist die mikrobiologische Erregeridentifikation erfolgreich. Die häufigsten Erreger sind Pneumokokken und Staphylokokken (Lorenz, 2013). In Abhängigkeit regionaler, saisonaler, epidemiologischer und demografischer Faktoren weist das Erregerspektrum der CAP große Variationen auf, die durch klinische und pathophysiologische Parameter zusätzlich modifiziert werden. In Deutschland spielt *Streptococcus pneumoniae* als Haupterreger der CAP die größte Rolle (Höffken, 2009; Krüll, 2010). Rein virale Pneumonien sind beim immunkompetenten Patienten relativ selten und haben, solange keine bakterielle Co-Infektion vorliegt, oftmals einen harmlosen Verlauf (Pletz et al., 2011). Das Risiko, an einer Pneumonie zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter, bei Vorliegen einer akuten oder chronischen Primärerkrankung wie CF oder durch die Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) stark an (File, 2004; Hament et al., 1999; Prass et al., 2003). Zur Risikogruppe gehören daher vor allem ältere Patienten über 60 Jahren und Menschen mit schweren, chronischen Erkrankungen sowie Säuglinge und Kleinkinder. Sie sind durch

ihr geschwächtes bzw. noch nicht ganz ausgereiftes Immunsystem besonders anfällig für die Entwicklung einer Pneumonie (Hamouda et al., 2016; Steven Schmitt, 2010; Höffken, 2009).

Insgesamt konnte die Sterblichkeit aufgrund schwerer Pneumonien durch den Einsatz von Antibiotika drastisch gesenkt werden. Jedoch hat sich gezeigt, dass sich durch Weiterentwicklung der antibiotischen Therapie dieser Stand nicht mehr steigern lässt (Hippenstiel et al., 2007). Die zunehmend eingeschränkte Wirksamkeit von Antibiotika aufgrund resistenter Erreger weist deutlich darauf hin, dass neue Therapieansätze benötigt werden (Guillamet et al., 2016).

Im ambulanten Bereich liegt die Letalität bei nur 0,6 %. Besonders gefährlich sind jedoch die Erkrankungen, die im stationären Bereich (Krankenhaus) erworben werden, die sogenannten nosokomialen Pneumonien. Hier liegt die Letalität mit bis zu 13 % deutlich höher (40 000-50 000 Todesfälle pro Jahr in Deutschland Gröner (2013)). Diese Pneumonien sind aufgrund der oft ausgeprägten Antibiotikaresistenz der Erreger nur schwer behandelbar (Lorente et al., 2007; Pugin, 2007). Einer der häufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen ist *Pseudomonas aeruginosa*, ein Bakterium das sowohl durch seine Fähigkeit Biofilme zu bilden als auch durch seine Antibiotikatoleranz schwer zu behandeln ist (Boisvert et al., 2016).

1.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa ist ein Gram-negatives, polar begeißeltes, stäbchenförmiges Bakterium, welches zur Klasse der γ -Proteobakterien gehört. Als fakultativer Anaerobier bevorzugt *P. aeruginosa* die aerobe Lebensweise, ist aber in der Lage, durch die aerobe und anaerobe Atmung oder durch Fermentation Energie zu gewinnen (Stover et al., 2000; Williams et al., 2007). *Pseudomonas spp.* leben in der Natur sowie im industriellen und medizinischen Bereich vorzugsweise im sessilen Verband, dem Biofilm, zusammen (Fazli et al., 2014; Boisvert et al., 2016). Bei Biofilmen handelt es sich um dynamische, mono- bzw. polymikrobielle bakterielle Gemeinschaften, adhärirt an feste oder viskose Oberflächen (Madigan et al., 2009). In diesem Verband sind die Bakterien umgeben von einer selbstproduzierten, extrazellulären polymeren Substanz aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und extrazellulärer DNA (Costerton et al., 1995; Dufour und Leung, 2010). Biofilme sind eine außerordentlich komplexe, an gegebene Umweltbedingungen angepasste Überlebensstrategie, welche vom Nährstoffangebot, der bakteriellen Motilität, der Zell-Zell-Kommunikation und von physikalischen und chemischen Faktoren beeinflusst wird (Costerton et al., 1995; Flemming und Wingender, 2010; Hall-Stoodley et al., 2004).

Der initiale Schritt zur Bildung eines Biofilms ist der sogenannte *Conditioning Film*. Dieser besteht, je nach umgebender Flüssigkeit (z. B. Blut oder Speichel), aus adsorbierten molekularen Inhaltsstoffen, vor allem Polysacchariden und Proteinen (Glycoproteine). Der *Conditioning Film* erleichtert es den Bakterien, sich an eine Oberfläche anzuheften (Habash und Reid, 1999). Die Biofilmbildung wird in fünf Phasen eingeteilt, welche fließend ineinander übergehen, und erfolgt nach der Ausbildung des *Conditioning Films* (Abbildung 1.6).

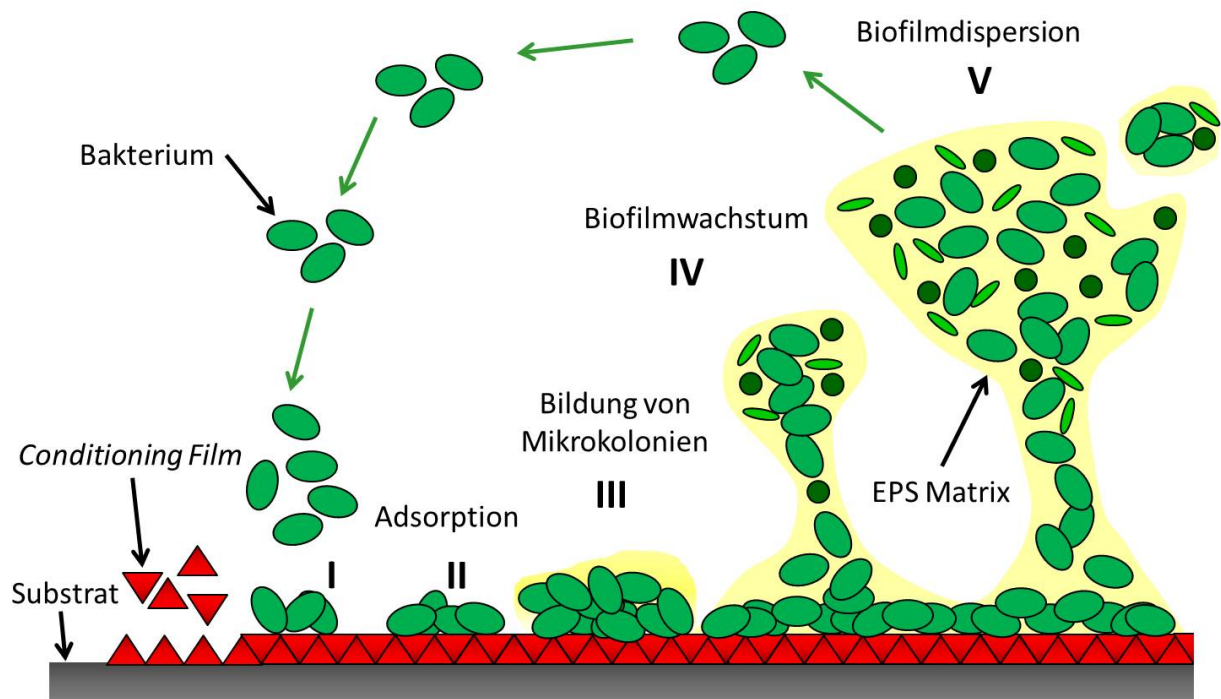


Abbildung 1.6: Schema der bakteriellen Biofilmbildung auf initialem *Conditioning Film*. (Abbildung in Anlehnung an Aalexopo (2011))

In Phase I nähern sich Bakterienzellen der durch den *Conditioning Film* modifizierten Oberfläche und adhären reversibel. In Phase II adhären die Bakterien irreversibel an die Oberfläche. Phase III ist durch die Produktion der extrazellulären Matrix und die Bildung von Mikrokolonien gekennzeichnet. Anschließend wächst der Biofilm in Phase IV weiter an. Es bilden sich Makrokolonien und komplexe Biofilmstrukturen, bis sich in Phase V schließlich einzelne Zellen oder Zellaggregate aus der Biofilmpopulation lösen und mit der Oberflächenbesiedelung an einer anderen Stelle erneut beginnen (Aalexopo, 2011).

Der Biofilm schützt die Bakterien vor physikalischen Einflüssen, vor der Immunabwehr des Wirtsorganismus und vor antimikrobiellen Substanzen, wie Antibiotika. Er ist zum großen Teil für die ausgeprägten Antibiotikaresistenzen von *P. aeruginosa* verantwortlich, was eine Behandlung zusätzlich erschwert. Biofilme sind eine favorisierte Nische für Bakterien, in welchen sie räumlich eng zusammen leben und so miteinander kommunizieren, auf Veränderungen reagieren oder Erbinformationen austauschen können (Madigan et al., 2009; Rehm, 2008; Dufour und Leung, 2010).

P. aeruginosa ist ein weitverbreitetes und bedeutendes, opportunistisch humanpathogenes Bakterium, das bei immunsupprimierten Patienten für zahlreiche nosokomiale und chronische Infektionen verantwortlich ist (Bielecki et al., 2008; Kerr und Snelling, 2009). Neben *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae* ist *P. aeruginosa* eine Ursache von Lungen- und Harnwegsinfektionen, Infektionen von Brand- und Operationswunden sowie Sepsen (Micek et al., 2015; Lebeaux und Ghigo, 2014; Page und Heim, 2009). Ferner ist

P. aeruginosa der Haupterreger von chronischen Lungeninfektionen mit starker Biofilmbildung bei erwachsenen Patienten mit CF (siehe Kapitel 1.3.3) (Boucher et al., 1996; Höffken, 2009; Bjarnsholt et al., 2009).

Die Therapie von *P. aeruginosa* Biofilminfektionen gestaltet sich aufgrund der erhöhten Toleranz von Biofilmen gegenüber Antibiotika problematisch. Daher muss die Ausbildung eines Biofilms nach Möglichkeit verhindert werden. Hierfür sind die Oberflächeneigenschaften der Biomaterialien zu Implantationszwecken von entscheidender Bedeutung. Diese müssen so modifiziert werden, dass die Ausbildung des *Conditioning Films* beeinflusst werden kann und die bakterielle Adhäsion auf Implantatmaterialien erschwert wird, jedoch die humane Zelladhäsion nicht negativ beeinflusst wird. Eine weitere Möglichkeit zur Eingrenzung von Biofilmen ist eine gezielte Modifikation der Oberfläche mit antimikrobiellen Eigenschaften (Bjarnsholt et al., 2011).

1.3.2 *Aspergillus spp.*

Schimmelpilze sind eukaryotische Lebewesen und werden einem eigenen Reich in der Domäne der Eukaryoten zugeteilt. Im Gegensatz zu Bakterien zeichnen sich Schimmelpilze durch das Vorhandensein eines Zellkerns aus, in welchem die DNA von einer Membran umgeben ist. Die Mehrzahl der weltweit verbreiteten Pilze lebt saprophytisch, d. h. sie decken ihren Energiebedarf durch den Abbau von totem organischen Material oder leben parasitär auf und in Pflanzen, Tieren oder Menschen (Mullins et al., 1976; Weiß und Edelman, 2009; Wiesmüller et al., 2013). Die Zahl der tatsächlich existierenden Pilzarten ist unbekannt. Schätzungen zufolge existieren 1,5 Millionen Pilzspezies (Hawksworth, 2001) von denen etwa 100 000 wissenschaftlich erfasst sind, jedoch lösen nur wenige Arten beim Menschen Erkrankungen aus (Luther, 2007; Wiesmüller et al., 2013).

Am häufigsten treten Pilzinfektionen (Mykosen) an den Nägeln (Onychomykosen) oder auf der Haut (Dermatomykosen) auf. Zu systemischen Pilzinfektionen, d. h. Infektionen anderer Organe, kommt es hauptsächlich bei immungeschwächten Menschen sowie Menschen im hohen Alter. In Europa treten vor allem drei Formen von systemischen Mykosen auf: die *Candida*-Mykose (Soor), die Aspergillose und die Kryptokokkose. Eine Ansteckung erfolgt häufig über das Einatmen von Pilzsporen, die sich in pflanzlichen Materialien wie Heu, Kompost oder Erde befinden (Weiß und Edelman, 2009).

Pilze der Gattung *Aspergillus spp.* sind in der Lage, verschiedene Organe des menschlichen Körpers zu besiedeln und dort parasitär gefährliche Erkrankungen zu verursachen (Ainsworth und Sussman, 1966). Es gibt insgesamt etwa 350 in der Umwelt vorkommende *Aspergillus*-Arten, wovon die Art *Aspergillus fumigatus* für ca. 90 % aller *Aspergillus*-Infektionen verantwortlich ist (Latge, 1999; Samson, 1999; Denning, 1998). *A. fumigatus* besitzt grüne, echinulate Sporen, auch Konidien genannt, welche es ihm möglich machen, auch bei schlechten Umweltbedingungen zu überleben (Luther, 2007).

A. fumigatus hat seine sehr hohe klinische Relevanz dadurch erlangt, dass er in passiv oder aktiv immungeschwächten Patienten eine gewebsschädigende, teils systemische Mykose hervorrufen kann (invasive Aspergillose), die schwierig zu behandeln ist (Denning, 1998;

Latge, 1999). Hierbei kommt es anfangs - wie auch bei anderen Mykosen - lediglich zu einem Wachstum des Pilzes innerhalb der Atemwege. Es folgt ein invasiver Verlauf der Erkrankung, welcher zur Infiltrierung von Parenchymenten, der Penetration von anatomischen Barrieren sowie zur Invasion von Blutgefäßen mit nachfolgender hämatogener Streuung des Erregers führt (Reichard et al., 1995). *A. fumigatus* kann Allergien auslösen. Im Gegensatz zur allergischen Sinusitis oder Alveolitis, bei der es nicht zur Kolonisierung kommt, ist die allergische bronchopulmonale Aspergillose als wesentlich dramatischer einzustufen. Diese tritt meist bei Personen auf, welche unter atopischem Asthma oder CF leiden (Basich et al., 1981; Krasnick et al., 1995; Kataoka et al., 2002). Die Pilzsporen werden durch den zähflüssigen Mukus in der Lunge von CF-Erkrankten und die dadurch gestörte mukoziliäre Reinigung nicht aus der Lunge transportiert. Diese Gegebenheit fördert das Auftreten von Pilzinfektionen in der Lunge der Patienten.

In vielen Fachgebieten der Medizin ist eine Zunahme der invasiven Mykosen zu beobachten (Beck-Sague und Jarvis, 1993; Latge, 1999; Fridkin und Jarvis, 1996). *Aspergillus*- und *Candida*-Infektionen sind in Europa die klinisch wichtigsten opportunistischen Mykosen (De Marie, 2000). Aufgrund der steigenden Zahl an immunsupprimierten Patienten, verursacht unter anderem durch Chemotherapie oder Infektionskrankheiten wie HIV, hat sich die Anzahl an invasiven Aspergillosen zwischen 1987 und 1999 vervierfacht (Latge, 1999). Die frühzeitige Erkennung ist der wichtigste Punkt für eine erfolgreiche Therapie aller *Aspergillus*-assoziierten Erkrankungen (Urbanowicz et al., 2016). Eine späte Diagnose ist verbunden mit einer Sterblichkeitsrate von ca. 80 %. Wird die invasive Aspergillose früh erkannt und eine aktive Therapie eingeleitet, sinkt die Sterblichkeitsrate auf etwa 29 % (Herbrecht et al., 2002; Latge, 1999). Viele Patienten weisen typische Krankheitssymptome nicht bzw. nicht zur erwarteten Zeit auf (Greenberger et al., 1993). Das gestaltet die Diagnose einer Aspergillose oft schwierig. Zur frühzeitigen Erkennung einer *Aspergillus*-Infektion fehlen nach wie vor klinische Diagnoseverfahren und Therapiemaßnahmen sind nur begrenzt verfügbar. Eine Möglichkeit der Impfung gegen die Infektion ist ebenfalls bisher nicht gegeben (Hasenberg, 2008). Die Tatsache, dass *Aspergillus spp.* zu den Eukaryonten gehört und somit einige Ähnlichkeiten mit den biologischen Prozessen in menschlichen Zellen bestehen, gestaltet die Behandlung einer invasiven Aspergillose schwierig. Medikamente für eine Langzeittherapie sind daher meist schädlich (Odds et al., 2003). Zurzeit werden für die Behandlung Amphotericin B und Itraconazol eingesetzt. Amphotericin B greift Ergosterol, einen Bestandteil der Pilzmembran, an. Es kommt zu einer Störung der Membranfunktion. Ist diese Therapie nicht erfolgreich, kommt unter anderem auch Itraconazol, ein Antimykotikum mit breitem Wirkspektrum, zum Einsatz. Itraconazol hemmt die Cytochrom P-450-abhängigen Enzyme und verhindert so die Ergosterolsynthese, was ebenfalls eine Membranfunktionsstörung der Pilzelle bewirkt (Denning, 1998). *In vitro* konnten mit diesen beiden Antimykotika gute Ergebnisse erzielt werden, wohingehend der Erfolg *in vivo* nicht zwingend korreliert und teilweise sehr gering ist (Muller et al., 2001; Groll und Ritter, 2005; Muthig, 2006).

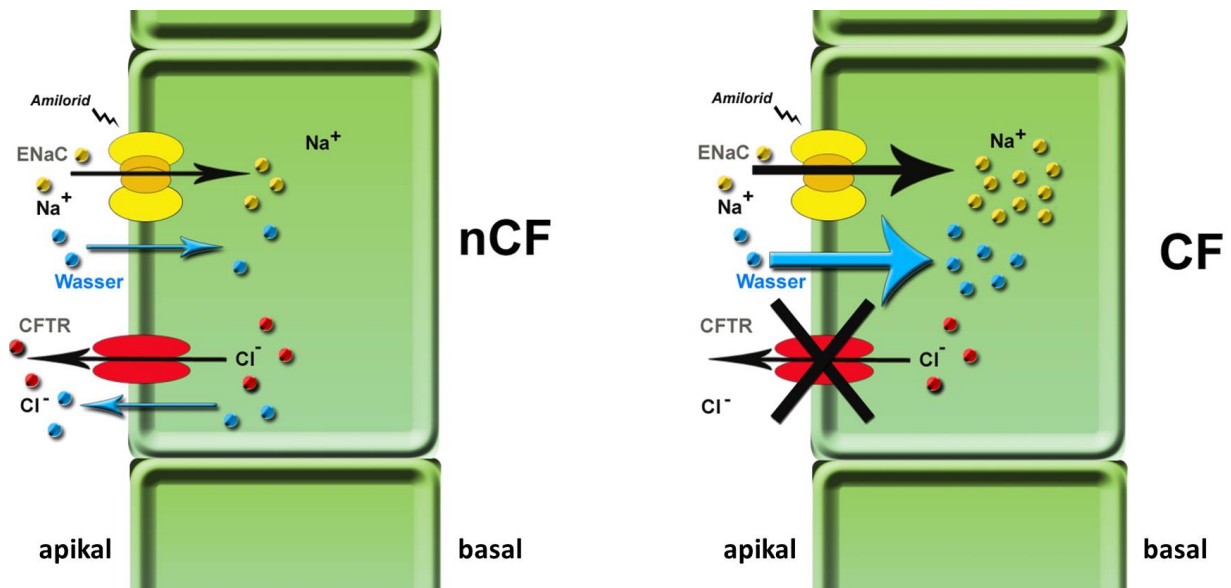
Voriconazol und Caspofungin, Antimykotika der neueren Generation, werden aktuell zur Therapie eingesetzt, wenn eine Resistenz oder Intoleranz des Erregers gegen Amphotericin B oder Itraconazol besteht (Jeu et al., 2003; Gurcan et al., 2010; Ahmad et al., 2015). Aktuell wird an unterschiedlichen Kombinationen von Wirkstoffen geforscht. Li und Kollegen kombi-

nierten erfolgreich Itraconazol und Voriconazol mit Tetrandrin, einem Wirkstoff, welcher die Efflux-Pumpe für die Antimykotika in den Pilzzellen blockiert, und erreichten dadurch eine deutliche Wirkungssteigerung (Li et al., 2015). Zudem demonstrierten Urbanowicz et al. die effiziente Behandlung einer invasiven Aspergillose eines 61-jährigen Mannes nach einer Herztransplantation durch die Kombination von Voriconazol und Caspofungin (Urbanowicz et al., 2016). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die kombinierte Gabe von unterschiedlichen Wirkstoffen zu einer schnelleren Genesung beitragen kann. Dies könnte in Zukunft etwa in kompartimentierten Formulierungen mit unterschiedlichen Freisetzungsraten realisiert werden (siehe Abbildung 1.5).

1.3.3 Krankheitsbild der Cystischen Fibrose

Cystische Fibrose, auch Mukoviszidose genannt, ist innerhalb der weißen Bevölkerung (Kaukasier) die häufigste genetisch bedingte Stoffwechselerkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang. Mutationen im CF-Transmembran-Regulator (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR) auf Chromosom 7, welcher für einen Chloridionenkanal in der Membran von Epithelzellen kodiert, ist der Auslöser der Erkrankung (Rehm, 2008; Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989). Mittlerweile sind knapp 2 000 Mutationen im CFTR-Gen bekannt, die zu unterschiedlich stark ausgeprägten Symptomen beim Patienten führen (Duesberg, 2015). Es sind mehrere Organe betroffen, unter anderem die Verdauungsorgane Pankreas, Leber und Darm, wodurch die Patienten oft an starkem Untergewicht und Verdauungsproblemen leiden (Duesberg, 2015). Hauptsächlich betroffen sind jedoch die Atemwege.

Der CFTR-Kanal transportiert Chlorid nach außen und Wasser folgt diesem aufgrund von lokaler Osmose. Die ebenso in der Zellmembran sitzenden Natrium-Kanäle ENaC befördern Natrium aus dem apikal aufliegenden Bronchialsekret in die Zellen und Wasser wird osmotisch in das Zellinnere transportiert. Diese beiden fein aufeinander abgestimmten Transportvorgänge sorgen für den optimalen Wassergehalt des Bronchialsekretes (Abbildung 1.7 links). Beim Krankheitsbild der CF sind diese Transportwege gestört. Der defekte CFTR-Kanal führt zu einer verringerten Sekretion von Chloridionen am apikalen Pol der Epithelzellen. Durch die verringerte Sekretion fehlt es dem Bronchialsekret an Wasser und es weist eine erhöhte Viskosität auf. Darüber hinaus ist die Funktion des ENaC-Kanals beeinträchtigt. Dies trägt zu einer Na^+ -Hyperabsorption bei, welche dem Bronchialsekret zusätzlich Wasser entzieht und infolgedessen die Viskosität weiter steigert (Abbildung 1.7 rechts) (Weber und Sobbczak, 2016).



(a) Wasser- und Ionen-Transport beim Gesunden. Wasserzufuhr durch den Chloridkanal CFTR und Wasserentzug durch den Natriumkanal ENaC stehen in einer fein abgestimmten Balance.

(b) Gestörter Wasser- und Ionen-Transport im Atemtrakt von CF-Patienten. Durch einen genetischen Defekt des CFTR wird dem Mukus kein Wasser mehr zugeführt, während die Natrium-Hyperabsorption durch ENaC dem Mukus zusätzlich Wasser entzieht.

Abbildung 1.7: Schema des Ionentransportes durch den CFTR- und ENaC-Ionenkanal in der Epithelzellmembran und die Auswirkung auf den Wassergehalt im Bronchialsekret. (Abbildung verändert nach Weber und Sobczak (2016))

Aufgrund des zähen Bronchialsekrets ist der mukoziliäre Transport von eingeatmeten Krankheitserregern, Staub- und anderen eingeatmeten Teilchen aus der Lunge extrem eingeschränkt, was das mikrobielle Wachstum eingeatmeter Erreger und die Ausbildung chronischer Infektionen stark begünstigt (Abbildung 1.8) (Bjarnsholt et al., 2011; Duesberg, 2015; Boisvert et al., 2016).

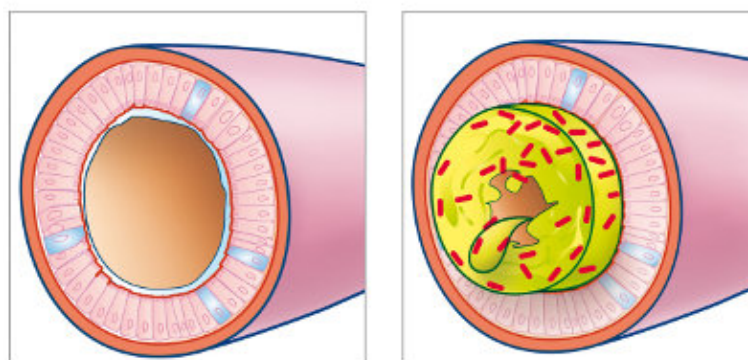


Abbildung 1.8: Schematischer Querschnitt durch ein gesundes (links) und ein CF-Bronchiol (rechts). (Quelle: Roche Pharma (2015))

Die im Mukus enthaltenen Aminosäuren, Mucine, Ionen und Lipide bilden einen idealen Nährboden für die Kolonisation von opportunistischen, pathogenen Erregern wie *Aspergillus spp.* und *Candida spp.* sowie *S. aureus* und *P. aeruginosa*. *S. aureus* dominiert die Infektionen bei Patienten zwischen 18-24 Jahren mit 67%, während *P. aeruginosa*-Infektionen bei erwachsenen Patienten (ab 25 Jahren) sehr häufig auftreten (80%) (Moreau-Marquis et al., 2009; Heijerman, 2005). Diese bakteriellen Infektionen stimulieren Abwehrmechanismen des menschlichen Immunsystems und veranlassen Fresszellen dazu, in das Gewebe einzuwandern. Ist ihre Lebensdauer von einigen Tagen überschritten, lysieren sie und der Inhalt der Zellen wird in die Umgebung abgegeben. Die in den Fresszellen enthaltene DNA bildet netzartige Strukturen und macht das Bronchialsekret noch zäher, was es den Bakterien erleichtert, größere Areale der Lunge zu besiedeln.

Aufgrund von phänotypischen Veränderungen, Resistenzmechanismen und der Entwicklung von Multiresistenzen gegenüber Antibiotika lassen sich chronische Infektionen, ausgelöst durch *P. aeruginosa*, häufig nur sehr schwer mit Antibiotika behandeln (Hancock und Speert, 2000; Rajan und Saiman, 2002; Wagner und Iglewski, 2008). Im Hinblick auf die Patienten ist es wichtig, Kreuzkontaminationen von schon chronisch mit beispielshalber *P. aeruginosa* infizierten Patienten zu vermeiden. Während der frühen Infektion, wenn sich *P. aeruginosa* noch in der akuten Phase der Infektion befindet, kann diese mit Antibiotika, z. B. Ciprofloxacin, Colistin und Tobramycin, erfolgreich behandelt werden. Darüber hinaus wird die tägliche Inhalation von DNase I (Pulmozyme®) empfohlen, was zum Abbau von extrazellulärer DNA im Bronchialsekret beiträgt und somit zu dessen Verflüssigung führt (Frederiksen et al., 2006). Wird die Infektion jedoch chronisch, mit möglicher Gewebeerstörung und einhergehender Biofilmbildung, ist eine Behandlung sehr problematisch, da die Bakterien im Biofilm gut geschützt vor Antibiotika und Immunzellen eingebettet sind (Singh et al., 2000). Durch dauerhafte medikamentöse Behandlung lässt sich die Lebenserwartung des CF-Patienten aktuell auf ca. 40 Jahre erhöhen, die Lebensqualität ist aber oft sehr eingeschränkt (Doring et al., 2004; Vázquez-Espinosa et al., 2015).

Die Therapie von CF beruht im Wesentlichen auf drei Säulen: die medikamentöse Therapie, die Physiotherapie in Verbindung mit Sport und die Ernährungstherapie im Zusammenspiel mit hochkalorischer Kost (Schwarz, 2013). Aktuelle Behandlungspläne bei bakteriellen und fungalen Lungeninfektionen beinhalten die Gabe von schleimlösenden und/oder bronchienerweiternden Substanzen, gefolgt von entzündungshemmenden Medikamenten und Antibiotika, z. B. als Aerosol, nach genau festgelegten Zeitpunkten. Letzteres kann auch in Tablettenform oder als Injektion verabreicht werden. Bei beiden Darreichungsformen ist die Wirkung aufgrund des zähflüssigen Bronchialsekretes reduziert. Die zum Teil niedrige, lokale Antibiotika-Konzentration im Mukus kann die Bildung von resistenten Erregern zur Folge haben, was zu enormen Komplikationen, bis hin zum Tod des Patienten, führen kann. Aufgrund der oralen oder intravenösen Verabreichung hoher Dosen an Mukolytika, Antimykotika sowie Antibiotika treten vermehrt Nebenwirkungen wie akutes Nierenversagen, starke Müdigkeit, vermehrter Husten, erhöhte Schleimproduktion, Atembeschwerden, Bronchialkrämpfe und Schleimhautentzündungen auf (Flamme, 2014). Infolge der mühsamen und zeitaufwändigen medikamentösen und physiotherapeutischen Behandlung, der starken Nebenwirkungen der Medikamentencocktails und der großen psychischen Belastung, ist es den Patienten nur noch eingeschränkt möglich, am alltäglichen Leben teilzunehmen. Daher

ist es dringend erforderlich, effizientere Medikamente und Therapiemethoden zu entwickeln, um die Lebensqualität der Patienten wesentlich zu verbessern.

Aktuell zugelassene Wirkstoffe für die Inhalationstherapie bei CF-Patienten sind Tobramycin, Colistin und Aztreonam (Schwarz, 2013). Tobramycin, ein Aminoglykosid, war 1997 das erste zugelassene Aerosol zur inhalativen Antibiotikatherapie (Tobi[®]-Inhalationslösung, Novartis) und wird dementsprechend schon seit vielen Jahren bei CF-Patienten erfolgreich eingesetzt. Neu auf dem Markt ist die passive Pulverinhalation (Trochena[®]) von Aztreonam (Handelsname Cayston[®], seit 2010) und Tobramycin (Handelsname Podhaler[®], seit 2012) für CF-Patienten mit chronischer *P. aeruginosa*-Besiedelung der Lunge (Yu et al., 2012; Schwarz, 2013). Die Patienten haben einen großen zeitlichen Vorteil durch die Trochena[®] (mittlere Inhalationszeit von 5,6 Minuten (min)) im Vergleich zur Feuchteinhalation (mittlere Inhalationszeit 19,7 min) (Schwarz, 2013). Aztreonam ist ein allgemein gut verträgliches Antibiotikum der Klasse der Monobaktame und hemmt die bakterielle Zellwandsynthese (Tiddens et al., 2015). Es verfügt über ein breites Spektrum mit seiner Aktivität gegen Gram-negative Bakterien, einschließlich *P. aeruginosa* und hat eine gute Verträglichkeit (Retsch-Bogart et al., 2009). Tobramycin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglykoside, dessen Wirkung auf der Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese durch Bindung an die 30S-Untereinheit der Ribosomen beruht (Vázquez-Espinosa et al., 2015).

In vielen Studien wurde gezeigt, dass die kombinierte Gabe von Aztreonam und Tobramycin zu einer effektiveren Biofilmdestabilisierung und Abtötung von unterschiedlichen klinischen Isolaten von *P. aeruginosa* führte (Yu et al., 2012; Hansen und Skov, 2015). Yu et al. (2012) sahen in ihren Versuchen große Unterschiede bei unterschiedlichen klinischen Isolaten von *P. aeruginosa*. Eine enorme Wirkungssteigerung erreichten Moreau-Marquis und Kollegen durch die Kombination von Aztreonam und Tobramycin mit Eisen-Chelatbildnern (Moreau-Marquis et al., 2009, 2015). Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut, dass die kombinierte Gabe von unterschiedlichen Wirkstoffen zu einer effizienteren Abtötung der Keime führen kann. Auf dieser Basis stellen die kompartimentierten Partikel, beladen mit unterschiedlichen Wirkstoffen, für eine pulmonale Applikation eine vielversprechende Anwendung dar (siehe Abbildung 1.5). Hierfür müssen jedoch Wechselwirkungen der eingelagerten Medikamente ausgeschlossen werden.

1.4 *In vitro*- und *in vivo*-Testsysteme für die Medikamentenforschung

Die Abschätzung der Wirkung sowie möglicher Neben- und Wechselwirkungen zählt zu den wichtigsten Aufgaben bei der Charakterisierung neuer Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen und Materialien für die Medizin. Dieser Prozess wird von der Forschung und Entwicklung von Anfang an begleitet. Es gilt, die akute und die chronische Toxizität, die Kanzerogenität, die Mutagenität sowie die Reproduktionstoxizität abzuklären. Außerdem sind häufig noch die Ökotoxikologie, die Anreicherung in Pflanzen, Tieren und im Boden oder die Sensibilisierung von Haut, Augen und Schleimhäuten zu klären. Hierfür werden

die unterschiedlichsten Zielorganismen, angefangen von einfachen zellulären Systemen wie Bakterien, Algen, Zellkulturen, über Kleinkrebse und Fische, bis hin zu Versuchen an Säugetieren und Menschen, eingesetzt (Kaiser, 2009).

In der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung werden Tierexperimente im allgemeinen zur Prüfung und Charakterisierung der Verträglichkeit und Unbedenklichkeit vieler Substanzen eingesetzt. Im Rahmen der Entwicklung und Prüfung von Arzneimitteln wird ein großer Teil dieser Untersuchungen nach § 2 des Arzneimittelgesetzes durchgeführt (Mühlenfeld, 1999). Ein zunehmendes Bewusstsein für die Verantwortung des Menschen gegenüber der Natur in Kombination mit einer rasanten Entwicklung der Zellkulturtechnik hat dazu geführt, dass immer öfter über Ersatz- bzw. Ergänzungsmethoden zum Tierversuch nachgedacht wird. Hierbei handelt es sich um *in vitro*-Testsysteme, die einfache oder komplexe physiologische und biochemische bzw. pathophysiologische und pathobiochemische Prozesse bzw. Reaktionen des Gesamtorganismus repräsentieren. In der Pharmaforschung eingesetzt, weisen sie ein enormes Potenzial zur Untersuchung der Wirkung, Nebenwirkung und Toxizität von Wirkstoffen auf. Die Eignung zur Aufklärung von speziellen Fragen wie Mechanismus, Wirkort und Disposition von Arzneistoffen zeichnet sie aus. Darüber hinaus können *in vitro*-Systeme auch zur Produktion und Gewinnung von Wirkstoffen bzw. Diagnostika dienen (Mühlenfeld, 1999).

Die Erfassung des akuten zytotoxikologischen Risikopotenzials mit Hilfe von Zellkulturen steht dabei immer am Anfang einer Wirkstofffindung, lange vor den klinischen Phasen. Gerade in der Pharmakologie kann so auf eine große Anzahl von Tierversuchen verzichtet werden, da nur mit den aussichtsreichsten Kandidaten weitergearbeitet wird (Kaiser, 2009). Mit etablierten humanen Zellkulturen gleichbleibender und kontrollierter Qualität ist es nicht nur möglich, die akute Toxizität eines Stoffes mit annähernd derselben Genauigkeit wie in Tierexperimenten zu erfassen, sondern die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das System Mensch deutlich zu verbessern (Chitrangi et al., 2016; Lauschke et al., 2016).

Die unzureichende behördliche Akzeptanz stellt derzeit noch eines der größten Hindernisse für die Verbreitung von *in vitro*-Testsystemen dar. Im Bereich der Medizinprodukte ist zwischenzeitlich die toxikologische Prüfung an Zellkulturen durch DIN EN ISO 10993 Teil 5 („Norm zur biologische Beurteilung von Medizinprodukten“) geregelt (DIN EN ISO NORM, 2009).

Angesichts der Tierversuchsproblematik gewinnen die einzelnen *in vitro*-Modelle und Testsysteme immer mehr an Bedeutung. So sollten prinzipiell *in vitro*-Untersuchungen jedoch keinen anderen Aussagewert erzielen als jene aus Studien am Ganztier. Viele Untersuchungen, die im Zusammenhang mit der Arzneistoffmittelentwicklung stattfinden, sind am Ganztier nicht möglich oder führen zu fehlerhaften Aussagen (Olson et al., 2000). Der Einsatz durch unterschiedliche Testsysteme mit variierendem Komplexitätsgrad macht es möglich, *in vivo*-Verhältnissen näherzukommen und erhöht die Aussagekraft der Ergebnisse (Mühlenfeld, 1999). Trotz des fortgeschrittenen Entwicklungsstandes von Ersatz- und Ergänzungsmethoden stehen den vielen Vorteilen eine Reihe von Nachteilen gegenüber. Diese sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tabelle 1.1: Vor- und Nachteile von *in vitro*-Testsystemen für die Wirkstofftestung (in Auszügen nach Spielmann (1997)).

Vorteile von <i>in vitro</i> -Testsystemen	Nachteile von <i>in vitro</i> -Testsystemen
* Reduzierung der Tierversuche	* Keine Erfassung systemischer Einflüsse
* Menschliche Zellen und Gewebe können getestet werden	* Unzureichende Erfassung organspezifischer Effekte
* Kontrollierte Versuchsbedingungen	* Keine Erfassung komplexer toxischer Wirkungen
* Geringere Mengen an Testchemikalien erforderlich	* Erfassung chronischer Effekte nur bedingt möglich
* Zeitabhängige wiederholte Probenentnahme leicht möglich	* Wenig internationale, behördliche Akzeptanz der toxikologischen Einstufung und Kennzeichnung chemischer Stoffe und Zubereitungen
* Prüfung an verschiedenen Testsystemen (Zellen oder Gewebe)	* Minimale Erfassung der Interaktionen zwischen verschiedenen Geweben, Organen und Organsystemen
* Einfachere Validierung der Versuchsbedingungen	* Geringe Erfassung der Reversibilität oder Heilung toxischer Effekte
* Ausschaltung systemischer Einflüsse	

In vitro-Systeme sind unter ethischen Aspekten den klassischen Tierversuchen deutlich überlegen. Vom wirtschaftlichen Standpunkt aus kann keine allgemeingültige Aussage zu *in vitro*- bzw. *in vivo*-Modellen getroffen werden. Den zum Teil sehr teuren Kulturmedien der *in vitro*-Systeme (z. B. für induzierte pluripotente Stammzellen) steht eine aufwändige *in vivo*-Versuchstierhaltung gegenüber. Jedoch darf nicht vergessen werden, dass *in vitro*-Systeme im Hinblick auf ihre Aussagekraft mit den Ergebnissen von Versuchen am ganzen Tier nicht verglichen werden können, da sowohl pharmakokinetische wie auch interferierende, maternale Faktoren (Kombinationseffekt und Metabolismus) nicht berücksichtigt werden können. Bei sorgfältiger Standardisierung kann der direkte Effekt einer Testsubstanz aufgrund des Entfallens von maternalen Faktoren zu einem genau definierten Zeitpunkt in festgelegter Konzentration und über einen bestimmten Zeitraum untersucht werden (Bücken, 2006).

Allgemein sind die Einsatzmöglichkeiten von *in vitro*-Modellen abhängig von ihren erreichbaren Endpunkten. Das Modell muss in der Lage sein, die *in vivo*-Situation reell nachzustellen. Der entscheidende Parameter ist hierbei der Grad der Komplexität des *in vitro*-Systems (Neubert, 1985). Ob als 2D-Zellkultur oder als 3D-Gewebemodell, ein intakter Organismus spiegelt immer noch das komplexeste System wider (Bücken, 2006).

1.4.1 2D-Zellkultur vs. 3D-Gewebemodelle

Das Tissue Engineering ist ein relevantes Werkzeug mit großem Potenzial, um organähnliche 3D-Gewebemodelle für die Wirkstoffentwicklung, Substanztestung, Regenerative Medizin und Grundlagenforschung zu generieren. Es gibt eine Vielzahl an etablierten Modellen, wie Haut- und Tumormodelle (Vorsmann et al., 2013; Groeber et al., 2016; Fecher et al., 2016). Im Durchschnitt wird nur ein Wirkstoff unter 10 000 getesteten Wirkstoffen von der FDA anerkannt. Die Zulassung dauert pro Medikament mit neuem Wirkstoff ungefähr 10-13 Jahre und kostet ca. 1 Milliarde US-Dollar. 30 % der in Tieren getesteten Substanzen scheitern in der klinischen Studie (Graf-Hausner, 2014).

Klassische 2D-Zellkulturen simulieren die physiologische Zellumgebung nur bedingt und weisen im Vergleich zur 3D-Kultur starke Limitierungen auf (Graf-Hausner, 2014). So ist beispielsweise das Zellverhalten (Vermehrung, Differenzierung, Metabolismus) der 2D-Kultur sehr unterschiedlich zur 3D-Kultur. Diese werden durch Faktoren beeinflusst, die erst im Gewebeverbund auftreten, wie etwa der Einfluss von Bestandteilen der extrazellulären Matrix auf die Zellen. Es besteht eine erhöhte Vermehrungsrate der Zellen in 3D-Modellen, verglichen mit der 2D-Zellkultur (Jeanes et al., 2011). Des Weiteren zeigten Dhiman und Kollegen, dass Zellen in 3D eine andersartige metabolische Aktivität aufweisen (Dhiman et al., 2005). Die 3D-Kulturen zeigten mehr Laktatproduktion von MCF-7 (Brustkrebs-Zelllinie) und eine höhere Tamoxifen-Resistenz. Ergänzend ist der sogenannte *cross talk*, die Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen, in der 3D-Kultur von enormer Bedeutung. Dies ist in der 2D-Kultur nicht gegeben (Majety et al., 2015; Froeling et al., 2010).

3D-Gewebemodelle liefern aussagekräftigere Daten, erhöhen die Berechenbarkeit, ermöglichen eine frühe Beurteilung der Sicherheit von Substanzen und deren Risiken, beschleunigen den kostenintensiven Prozess der Wirkstoffentwicklung und tragen zu einer drastischen Reduzierung von Tierversuchen bei. Darüber hinaus haben Tiermodelle bei der Untersuchung der Pathomechanismen von human obligaten Krankheitserregern meist eine sehr geringe *in vivo*-Relevanz. 3D-Gewebemodelle bieten aufgrund der hohen *in vitro*-/*in vivo*-Korrelation eine solide Basis, um molekulare Infektionsmechanismen weiter zu erforschen. Der Einfluss einzelner Faktoren auf das Zellverhalten kann in 3D-Kulturen zum Teil sogar wesentlich genauer untersucht werden als in *in vivo*-Versuchen, in denen meist viele verschiedene Einflussfaktoren nebeneinander bzw. komplex miteinander verzahnt vorliegen (Meffert, 2014). Es besteht allgemein ein großes Marktbedürfnis von 3D-Zellkulturmodellen für unterschiedlichste Anwendungen (Graf-Hausner, 2014). Hierbei kann zwischen gerüstbasierten und gerüstfreien Modellen unterschieden werden. Hydrogele, Polycaprolactone, Polymilchsäuren oder zellfreie Kollagengewebe können als Matrix verwendet werden, um den Zellen die nötige räumliche Anordnung zu geben. Als gerüstfreie Anwendung ist z. B. die *hanging drop technology* zu nennen (Graf-Hausner, 2014). Je nach Anwendungsgebiet, Zelltypen und anschließenden Analysemethoden muss ein geeignetes System ausgewählt bzw. etabliert werden. In der vorliegenden Arbeit wird auf das BioVaSc-TERM[®]-System zurückgegriffen.

Diese Ansätze bilden die Grundlage für die personalisierte Medizin. Sie eröffnen die Möglichkeit, an zuvor entnommenen Patientenzellen gezielt Wirkstoffe zu testen und für den

Patienten die optimale Dosierung zu finden. Zudem können Wirkstoffkombinationen und deren synergistische Effekte untersucht und so gefährliche Kreuz- und Nebenreaktionen früher erkannt werden.

In humanen 3D-*in vitro*-Gewebe-Modellen haben die eingesetzten Zellen nach ihrer Entnahme aus dem menschlichen Körper und der Zellexpansion in der 2D-Kultur ihre ursprüngliche Funktion weitestgehend wieder entwickelt. Ausgiebig und detailliert charakterisierte humane 3D-*in vitro*-Atemwegsschleimhautmodelle dienen in dieser Arbeit als Testsysteme zur Untersuchung der Interaktion mit den PLGA-basierten, partikulären Wirkstoffträgersystemen (Schweinlin et al., 2016). Beim histologischen und ultrastrukturellen Vergleich humaner Atemwegsschleimhaut mit den 3D-*in vitro*-Atemwegsschleimhautmodellen, die mit bronchialen Fibroblasten und Epithelzellen besiedelt sind, ist eine sehr große *in vitro/in vivo*-Korrelation festzustellen. Aufgrund der enormen funktionellen Ähnlichkeit eignen sich diese Modelle hervorragend zur Testung von Medikamenten und kombinierten Formulierungen, welche zum inhalativen Einsatz bestimmt sind.

1.4.2 *In vivo*-Infektionsmodell *Galleria mellonella*

Die Große Wachsmotte (*Galleria mellonella*) ist ein Kleinschmetterling, welcher zur Unterfamilie der Wachsmotten (Galleriinae) und damit zur Familie der Zünsler (Pyralidae) gehört. Die Aufzuchtvoraussetzungen sind sehr günstig. Die Raupen sind ganzjährig verfügbar, haben eine hohe Vermehrungsrate und einen kurzen Entwicklungszyklus. Um teure und ethisch fragliche Infektionsstudien an Säugetieren zu umgehen, sind sie eine ideale Lösung: Sie sind sensitive und zugleich robuste Modelle, um die bakterielle und fungale Virulenz verschiedener Mikroorganismen zu untersuchen (Danis-Wlodarczyk et al., 2016). Im Vergleich zu anderen Invertebraten-Modellen wie Fadenwürmern haben Insekten ein relativ fortschrittliches System der antimikrobiellen Abwehr und eignen sich daher besser als Infektionsmodell. Wie Säugetiere besitzen Insekten ein komplexes angeborenes Immunsystem. Für eine bakterielle Infektion sind die Zelladhäsion, die Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden, der Gewebeabbau und die Anpassung an oxidativen Stress in Insekten und Säugetieren grundlegend gleich (Lemaitre und Hoffmann, 2007).

Die Pathogenese einer Vielzahl von mikrobiellen Infektionen, einschließlich Pilzerregern die Säugetiere befallen (*Fusarium oxysporum*, *A. fumigatus*, *C. albicans*) und bakterielle Krankheitserreger wie *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* oder *Enterococcus faecalis* werden in *G. mellonella* schon seit vielen Jahren erfolgreich untersucht (Urrialde et al., 2016; Purves et al., 2010; Jander et al., 2000; Chadwick et al., 1990).

Um Gelatine-basierte Hydrogele und PLGA-basierte Wirkstoffträgersysteme näher zu charakterisieren, werden in den folgenden Kapiteln die entwickelten Herstellungsmethoden und Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Die abschließende Beurteilung beider Biomaterialien zeigt, dass diese großes Potenzial als Implantatmaterial oder für die Implantatbeschichtung bzw. als inhalatives, partikuläres Wirkstofffreisetzungssystem aufweisen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

In diesem Kapitel ist das verwendete biologische Material und die Zusammensetzung der zur Isolation, Kultivierung und Lagerung genutzten Nährmedien angegeben. Des Weiteren sind die eingesetzten Antikörper und die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen für die histologischen Untersuchungen beschrieben. Für die Herstellung der Puffer-, Protein- und Gelatinelösungen wurde Reinstwasser aus einer Milli-Q® Plus Anlage (Millipore; Schwalbach, Deutschland) verwendet. Zudem sind die verwendeten Chemikalien, Geräte, deren Datenerfassungs- und Auswertungssoftware, Datenbanken sowie verwendete Labor- und Verbrauchsmaterialien in tabellarischer Form aufgelistet.

2.1.1 Biologisches Material

Resektionsmaterial für die Zellisolierung wurde vom Universitätsklinikum Würzburg, Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie, durch Professor Dr. med. Thorsten Walles zur Verfügung gestellt. Humane tracheobronchiale Epithelzellen und -fibroblasten wurden mit Einverständnis der Patienten aus Biopsaten des tracheobronchialen Gewebes am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin isoliert. Für die Isolierung von Primärzellen liegt eine Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Würzburg vor (Votum 182/10; 4. April 2011). Die Zellisolation und Kultivierung erfolgte unter standardisierten Bedingungen und ist in Kapitel 2.2.8.2 detailliert beschrieben. Der Aufbau der 3D-*in vitro*-Testsysteme für die Atemwegsschleimhaut wurde mit den in Tabelle 2.1 aufgelisteten Primärzellen und Zelllinien durchgeführt. Humane tracheobronchiale Biopsate wurden, wenn sie nicht zur Zellisolation dienten, zur Untersuchung der Partikel-Zell-Interaktion, des ziliären Partikeltransportes sowie zur Untersuchung der schleimlösenden Aktivität ACC-beladener Partikel verwendet. Die Durchführung der *in vivo*-Infektionsversuche mit *P. aeruginosa* (Tabelle 2.2) erfolgte an dem Modellorganismus *G. mellonella* (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Eukaryotische Zellen und Modellorganismen

Zellen und Modellorganismen	Verwendung	Bezugsquelle
Humane Primärzellen und Zelllinien		
Tracheobronchiale Epithelzellen (hTEC)	3D-Atemwegsschleimhautmodell	Resektionsmaterial Universitätsklinikum Würzburg (variable Spender)
Tracheobronchiale Fibroblasten (HBF)	3D-Atemwegsschleimhautmodell	Resektionsmaterial Universitätsklinikum Würzburg (variable Spender)
Atemwegsepithelzelllinie (Calu-3)	3D-Atemwegsschleimhautmodell	ATCC; Manassas, USA
Modellorganismus		
<i>Galleria mellonella</i>	Insekten-Infektionsmodell	Fauna Topics; Marbach, D

P. aeruginosa-Stämme (Wildtyp und klinische Isolate; engl. *clinical isolates*, CI), sowie zwei Stämme von *A. nidulans* (FGSCA4 und TNO2A3) wurden für *in vitro*-Untersuchungen eingesetzt (Tabelle 2.2). Die klinischen Isolate wurden aus Bronchialsekret von CF-Patienten isoliert und weisen eine Reihe von Antibiotikaresistenzen auf (Berditsch et al., 2015). Für *in vivo*-Untersuchungen an der Wachsmottenlarve *G. mellonella* wurde ausschließlich *P. aeruginosa* PA01 Wildtyp verwendet.

Tabelle 2.2: Bakterien und Pilze

Stamm	Beschreibung / Genotyp	Referenz
<i>P. aeruginosa</i>		
PA01	Wildtyp	Stammsammlung; Stover et al. (2000)
CI5517	Klinisches Isolat	Berditsch et al. (2015)
CI5520	Klinisches Isolat	Berditsch et al. (2015)
CI5521	Klinisches Isolat	Berditsch et al. (2015)
CI5523	Klinisches Isolat	Berditsch et al. (2015)
CI5524	Klinisches Isolat	Berditsch et al. (2015)
CI5525	Klinisches Isolat	Berditsch et al. (2015)
CI5529	Klinisches Isolat	Berditsch et al. (2015)
CI5530	Klinisches Isolat	Berditsch et al. (2015)
CI5417	Klinisches Isolat	Berditsch et al. (2015)
<i>A. nidulans</i>		
FGSCA4	Glasgow wild type (veA+)	Fungal Genetic Stock Center (FGSC); Missouri, USA
TNO2A3	pyrG89; argB2; nkuA::argB; pyrA4	Fungal Genetic Stock Center (FGSC); Missouri, USA

2.1.2 Nährmedien und Lösungen

In Tabelle 2.3 aufgelistete sterile Medien und Lösungen wurden zur Anzucht und Erhaltung sowie zur Untersuchung der humanen Zellkulturen verwendet. In Tabelle 2.4 aufgelistete Medien und Lösungen wurden zur Anzucht und Erhaltung der Bakterien- und Pilzkulturen verwendet. Fest- sowie Flüssigmedien wurden 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

Tabelle 2.3: Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
Medien	
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	DMEM (4,5 g/l Glukose) mit Phenolrot + 10 % FKS (v/v)
<i>Minimum Essential Media</i>	MEM GlutaMAX™ mit Phenolrot + 10 % FKS + 1 % Natriumpyruvat (v/v)
<i>Airway Epithelial Cell Growth Medium</i>	AECG-Medium mit Supplement 1-3, kein Antibiotikum
Lösungen	
MTT-Stammlösung	200 mg MTT in 50 ml PBS ⁺
MTT-Arbeitslösung	1 ml MTT-Stammlösung in 3 ml des jeweiligen Zellkulturmediums
PBS ⁻ /EDTA (0,54 mmol/l)	500 µl EDTA (0,54 mol/l) in 500 ml PBS ⁻
Trypanblau (0,4 %)	0,4 % Trypanblau mit 0,9 % NaCl in VE-H ₂ O (w/v)
1×Trypsin/EDTA (0,05 %)	10×Trypsin-EDTA (0,5 %) gelöst in PBS ⁻ (10%; (v/v))

Tabelle 2.4: Nährmedien und Lösungen für Bakterien- und Pilzkulturen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Medien	
Basal-Medium 2 (BM2) (10×)	7 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 40 mM K ₂ HPO ₄ , 22 mM KH ₂ PO ₄ , in dH ₂ O, mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt; autoklaviert (Overhage et al., 2008)
BM2	100 ml BM2 Salze (10×), 10 ml Glukose (40 %, w/v), 10 ml MgSO ₄ (200 mM), 1 ml FeSO ₄ (10 mM), in 1 l sterilem dH ₂ O (zugegebene Lösungen wurden separat autoklaviert)
Luria-Bertani-Medium (LB)	25 g LB-Medium Pulver in 1 l dH ₂ O; autoklaviert
LB-Agar	25 g LB-Medium Pulver mit 15 g Agar-Agar in 1 l dH ₂ O; autoklaviert
<i>Yeast Agar Glucose Medium</i> (YAG)	5 g Hefeextrakt, 10 g Glukose, 1 ml Spurenelementlösung, 2 mM MgSO ₄ ×7H ₂ O in 1 l dH ₂ O; autoklaviert
YAG-Agar	5 g Hefeextrakt, 10 g Glukose, 1 ml Spurenelementlösung, 10 mM MgSO ₄ ×7H ₂ O, 15 g Agar-Agar in 1 l dH ₂ O; autoklaviert
Medienkomponenten	
FeSO ₄ -Lösung	10 mM FeSO ₄ ×7H ₂ O in dH ₂ O; Zusatz von 1 ml HCl (32%; (w/v))/50 ml; steril filtriert
Glukose-Lösung	40 % (w/v) Glukose in dH ₂ O; autoklaviert
MgSO ₄ -Lösung	200 mM MgSO ₄ ×7H ₂ O in dH ₂ O; autoklaviert
Spurenelementlösung (1 000×)	22 g ZnSO ₄ ×7H ₂ O, 11 g H ₃ BO ₃ , 5 g MnCl ₂ ×4H ₂ O, 5 g FeSO ₄ ×7H ₂ O, 1,6 g CoCl ₂ ×5H ₂ O, 1,6 g CuSO ₄ ×5H ₂ O, 1,1 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ×4H ₂ O, 50 g Na ₄ EDTA, mit KOH-Plättchen auf pH 6,5-6,8 eingestellt
Uracil	mit YAG-Medium autoklaviert; 1 g auf 1 l Medium
Uridin	mit YAG-Medium autoklaviert; 1 g auf 1 l Medium
Pyridoxin-HCl (0,1 %)	sterilfiltriert; 1 ml auf 1 l YAG-Medium

2.1.3 Kits

In Tabelle 2.5 sind die verwendeten Kits aufgelistet.

Tabelle 2.5: Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
M30 CytoDeath ELISA Kit	Apoptose Assay (10900)	Peviva; Sundbyberg, SE
Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go! Kit	Entzündungs-Assay	affymetrix; eBioscience, San Diego, US
DAB Substrat Kit	Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem	DCS Innovative Diagnostik-Systeme; Hamburg, DE

2.1.4 Antikörper, Puffer und Lösungen für die Histologie

Immunhistologische- und Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit in Tabelle 2.6 aufgelisteten Antikörpern durchgeführt. Tabelle 2.7 fasst die verwendeten Puffer und Lösungen für die histologischen Untersuchungen zusammen.

Tabelle 2.6: Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
Primärantikörper		
Anti- β -Tubulin IgG	monoklonal Maus, anti-human	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Anti-Cytokeratin 5/6 IgG	monoklonal Maus, anti-human	Dako; Hamburg, DE
Anti-Cytokeratin 18 IgG	monoklonal Maus, anti-human	Dako; Hamburg, DE
Anti-MUC5AC IgG	monoklonal Maus, anti-human	Thermo Fisher; Karlsruhe, DE
Anti-MUC5B IgG	polyklonal Kaninchen, anti-human	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Anti-Vimentin IgG	monoklonal Kaninchen, anti-human	Abcam; Cambridge, UK
Anti-IgG1	polyklonal Maus, anti-human, Isotypkontrolle	Dako; Hamburg, DE
Sekundärantikörper		
Alexa Fluor [®] 555 IgG (H+L)	polyklonal Esel, anti-Kaninchen	Invitrogen; Karlsruhe, DE
Alexa Fluor [®] 647 IgG (H+L)	polyklonal Esel, anti-Maus	Invitrogen; Karlsruhe, DE

Tabelle 2.7: Puffer und Lösungen für histologische Untersuchungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Puffer	
10×PBS-Waschpuffer	95,55 g PBS Dulbecco in 1000 ml dH ₂ O gelöst
1×PBS-Waschpuffer	10×PBS in dH ₂ O (10%; (v/v))
PBS-Waschpuffer (Arbeitslösung)	1 l 1×PBS mit 5 ml Tween-20 gemischt (0,5%; (v/v))
10×Citrat Puffer	42 g Citronensäuremonohydrat in 1,5 l dH ₂ O gelöst, mit 5 M NaOH auf pH 6 eingestellt, auf 2 l aufgefüllt und gut gemischt
1×Citrat Puffer (Arbeitslösung)	10×Citrat Puffer mit dH ₂ O gemischt (10%; (v/v))
TRIS-EDTA Puffer (Arbeitslösung)	24,23 g TRIS und 7,45 g EDTA in 1,5 l dH ₂ O gelöst, mit 1 M NaOH auf pH 9 eingestellt, auf 2 l aufgefüllt und gut gemischt
Lösungen	
H ₂ O ₂ -Lösung (3%)	30%-ige H ₂ O ₂ -Lösung in dH ₂ O (10%; (v/v))
Essigsäure (3%)	Essigsäure in ddH ₂ O (3%; (v/v))
Ethanol (70%)	Ethanol in ddH ₂ O (70%; (v/v))
HCl-Alkohol	Salzsäure zu 70 %-igem Ethanol zugegeben (3%; (v/v))
Blockierlösung I	5% (w/v) BSA in PBS ⁻ gelöst und steril filtriert
Blockierlösung II	1% (w/v) BSA mit 5% donkey serum in PBS ⁻ gelöst und steril filtriert

2.1.5 Chemikalien

Die in Tabelle 2.8 aufgeführten Chemikalien wurden für die Untersuchungen und Analysen eingesetzt.

Tabelle 2.8: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
Aceton Chromasolv®Plus 99,9%	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Acetonitril (ACN), HPLC grade, ≥ 99,9%	VWR; Darmstadt, DE
Ammoniumhydrogencarbonat ≥ 99,5%	Fluka; Buchs, CH
<i>Airway Epithelial Cell Growth Medium</i> (AECG-Medium)	Pelobiotech; Planegg, DE
Alcianblau	Biozym; Hessisch Oldendorf, DE
Antikörperverdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostik Systeme; Hamburg, DE
Aztreonam (AZT)	Molekula; München, DE und Alfa Aesar; Karlsruhe, DE
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Bacillol	VWR; Darmstadt, DE
CHCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) ≥ 99,0%	Fluka; Buchs, CH
Chloroform, HPLC grade, ≥ 99,9%	VWR; Darmstadt, DE
Ciprofloxacin Hydrochlorid	AppliChem; Darmstadt, DE
Citronensäuremonohydrat	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Colistinsulfat	AppliChem; Darmstadt, DE
DAPI-Fluoromount G (455 nm)	Southern Biotech; Birmingham, US
Descosept AF	Seidel medipool; Gauting-Buchendorf, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + GlutaMAX™	Gibco® Life Technologies; Frankfurt, DE
DMF (N,N-Dimethylformamide) wasserfrei	VWR; Darmstadt, DE
DMF ≥ 99%	Sigma-Aldrich; München, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid), flüssig, ≥ 99,9% (v/v)	Sigma-Aldrich; München, DE
DMSO, flüssig, ≥ 99,5% (v/v)	Carl Roth; Karlsruhe, DE
EDTA-Natriumsalz × 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich; München, DE
Entellan Einschlußharz	Merck; Darmstadt, DE
Epon812 (Glycid ether 100)	Serva; Heidelberg, DE
Eosin 1%, methanolisch	Morphisto; Frankfurt am Main, DE
Essigsäure	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Ethanol (EtOH) Ultra Pure, 99,9% (v/v)	VWR; Darmstadt, DE
EtOH absolut, ≥ 99,5%	Carl Roth; Karlsruhe, DE

Tabelle 2.8: Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	Hersteller
EtOH, vergällt, 95-97 % (v/v)	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Fetales Kälberserum (FKS)	Bio&SELL; Feucht bei Nürnberg, DE
Fibrinogen aus humanem Plasma	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE
Gelatine (Schwein, Typ A; Gelstärke ~ 175 Bloom)	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Gentamicinsulfat	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Glukose, wasserfrei	VWR; Darmstadt, DE
Glutaraldehyd-Lösung 25 % in H ₂ O	Sigma-Aldrich; München, DE
Hämatoxylin, nach GILL - III	Morphisto; Frankfurt am Main, DE
Hefeextrakt, Pulver	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Hellmanex® II Lösung (1 Vol.-% Lösung in H ₂ O)	Hellma; Müllheim, DE
Histofix	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Humanalbumin (HSA; Fraktion V, hohe Reinheit)	Merck Millipore; Darmstadt, DE
Hydrogenperoxidase (H ₂ O ₂) 30 %	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Ibuprofen (IBU) ≥ 98 %	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Isopropanol zur Analyse EMSURE®	Merck Millipore; Darmstadt, DE
Isopropanol ≥ 70,0 %	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Itraconazol (ICZ)	Cayman Chemical Company; Michigan, US
Kakodylsäure ≥ 98,0 %	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Kalibrations-Standardkit für MALDI, AB Sciex	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE
Kaliumhydroxid ≥ 85 %, p.a., in Plätzchen	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kernechtrot	Merck Millipore; Darmstadt, DE
Kollagenase NB 4 Standard Grade	Serva; Heidelberg, DE
L-Lysin diisocyanat ethyl ester (LDI)	Yipeng Chemical Co.; Hangzhou-Zhejiang, CN
Low Melt Agarose 1,5 %, Geling Temp. 26-30 °C	Biozym; Hessisch Oldendorf, DE
Luria-Bertani (LB), Pulver	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Minimum Essential Media (MEM)	Gibco® Life Technologies; Frankfurt, DE
Meropenem	Molekula; Garching, DE
Methanol (MetOH) Ultra Pure, 99,9 % (v/v)	VWR; Darmstadt, DE
Methanol	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Mowiol	Sigma-Aldrich; München, DE
MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	SERVA; Heidelberg, DE
Müller-Hinton (MH) broth, Pulver	Merck Millipore; Darmstadt, DE
N-Acetyl-L-Cystein (ACC)	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich; München, DE
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem; Darmstadt, DE
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid (NaOH) in Plätzchen	Carl Roth; Karlsruhe, DE
ortho-Phosphorsäure (H ₃ PO ₄) ≥ 85 %	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Paraffin Roti-Plast	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Paraformaldehyd (PFA) 4 % (w/v)	AppliChem; Darmstadt, DE
PBS Dulbecco für die Histologie	Biochrom Merck; Berlin, DE
PBS Tabletten, pH 7,4	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE
PBS ⁻ für die Zellkultur	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
PBS ⁺ für die Zellkultur	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Phalloidin Alexa Fluor® 647	Invitrogen; Karlsruhe, DE
Pyridoxin Hydrochlorid ≥ 99 %	Carl Roth; Karlsruhe, DE
ProLong Gold™	Cell Signaling Technology; Leiden, NL
Poly[(m-phenylenevinylene)-alt-(2,5-dihexyloxy-p-phenylenevinylene)] (blau)	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Poly(9,9-dioctylfluorene-alt-benzothiadiazole) (grün)	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) 85-15, Molekulargewicht 50-75 kDa	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
PLGA PURASORB PDLG 5004A, Molekulargewicht 40 kDa	Corbion; Amsterdam, NL
PLGA PURASORB PDLG 5002A, Molekulargewicht 17 kDa	Corbion; Amsterdam, NL
Rinderserumalbumin	Bio&Sell; Feucht, DE
Roti®-Histofix 4 %	Merck; Darmstadt, DE
Salzsäure (HCl) 37 %, 10 M	Merck; Darmstadt, DE
Sodium dodecyl sulfate (SDS), Pellets	Serva Electrophoresis; Heidelberg, DE
Sterillium UN 1987	Bode Chemie; Hamburg, DE
Tetrazyklin Hydrochlorid, Calbiochem®	Merck Millipore; Darmstadt, DE
Tobramycin	Sigma-Aldrich; München, DE
Trifluoressigsäure (TFA) ≥ 99 %	Merck; Darmstadt, DE
3-(Trimethoxysilyl)-propyl Methacrylate 98 %	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich; München, DE

Tabelle 2.8: Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	Hersteller
Triton X-100	Carl Roth; Karlsruhe, DE und Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich; Karlsruhe, DE
Trypsin, Schwein, Sequencing Grade	Promega; Mannheim, DE
Trypsin-EDTA 0,5 % (10x)	Life Technologies; Frankfurt, DE
Tween-20 [®]	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE
Uracil \geq 99 %	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Uranylacetat \geq 98,0 %	Sigma-Aldrich; München, DE
Uridin \geq 99,0 %	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Xylol	Carl Roth; Karlsruhe, DE

2.1.6 Geräte, Software und Datenbanken

In Tabelle 2.9 aufgelistete Geräte wurden für die Analysen verwendet.

Tabelle 2.9: Geräte

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Absaugeinrichtung	Vacusafe	Integra Bioscience; Fernwald, DE
Abzug	mc6	Waldner; Wangen, DE
Analysenwaagen	LC220S Pioneer 65G	Sartorius; Göttingen, DE Ohaus; Nänikon, CH
Aufblockstation	EG1150H	Leica Mikrosysteme; Wetzlar, DE
Autoklaven	Laboklav 135MSLV\vertikal Tecnoclav VX-150 Varioklav [®]	SHP Steriltechnik; Detzel, DE Integra Biosciences; Fernwald, DE Systec; Wettenberg, DE H+P; Oberschleißheim, DE
Begasungsbrutschrank	BBD6220	Heraeus Holding; Hanau, DE
Beleuchtungseinrichtung	Fluo- reszenzmikroskop	HXP120C Zeiss; Oberkochen, DE
Beschichtungsanlage	Bal-Tec MED 020	BALTIC Präparation; Niesgrau, D
Brutschränke	KB400 HERAEUS BB 6220	Binder; Tuttingen, DE Thermo Electron LED; Langensfeldbold, DE
Dampfgarer	Multiquick FS20	Braun; Kronberg/Taunus, DE
Dampftopf	Varioklav Typ 400DT	HP Medizintechnik; Oberschleißheim, DE
Drehschieberpumpe	RZ 6	Vacuubrand; Wertheim, DE
Durchlichtmikroskope	Eclipse E200 Eclipse 80i Axiovert 40 C Axio Lab.A1	Nikon; Düsseldorf, DE Nikon; Düsseldorf, DE Zeiss; Göttingen, DE Zeiss; Göttingen, DE
Einbettautomaten	Microm STP 120 Shandon Citadel 1000	Thermo Scientific; Karlsruhe, DE Thermo Scientific; Karlsruhe, DE
Einhängethermostat Wasserbad	Alpha A	Lauda; Lauda-Königshofen, DE
Eismaschine	AF 80	Scotsman; Sprockhövel, DE
Ellipsometer	J.A. Woollam M-44	J.A. Woollam Co.; Lincoln NE, US
Exsikkator (60 × 60 cm)	Techni-Dome [®] Vacuum Desiccator	Bel-Art Products; New York, US
Feldemissions- Rasterelektronenmikroskop	JEOL JSM-7500F	JOEL; Freising, DE
Fluoreszenzmikroskope	Axioplan 2 BZ-9000	Zeiss, Oberkochen, DE Keyence; Neu-Isenburg, DE
Gefrierschränke	-20 °C, 900 Series -80 °C -80 °C, Heraeus Herafreeze	Lieber; Biberach a.d. Riss, DE Kendro; München, DE Thermo Fischer Scientific; Karlsruhe, DE
Heißluftsterilisator	SNB 300	Memmert; Schwabach, DE
Hochgeschwindigkeitskamera	Motion Traveller 100	Teledyne DALSA; Waterloo, CA

Tabelle 2.9: Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Hochspannungsnetzgerät, U_{max} 20 kV	HYN	FuG Elektronik; Schechen, DE
HPLC-Säulen	LiChrospher RP C18, 150 × 4,0 mm, Partikelgröße 5 µm, Porengröße 100 Å	Altmann Analytik; München, DE
	LiChrospher SunFire™ RP C18, 150 × 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm, Porengröße 100 Å	Waters; Dublin, IE
HPLC-System	Agilent 1100 Serie	Agilent; Waldbronn, DE
FTIR-Spektrometer (IRRAS)	Vertex 80	Bruker Optik; Ettlingen, DE
Inkubationsbox	Certomat®	Sartorius; Göttingen, DE
Inkubatoren	Schüttelinkubator MaxQ™ 4000	Thermo Fischer Scientific; Karlsruhe, DE
	Heraeus 6000	Heraeus; Instruments, Hanau, DE
Kamera 4K (TEM)	Tietz Video und Image Processing Systems	TVIPS; Gauting, DE
Konfokalmikroskop	Leica TCS SP5	Leica Mikrosysteme; Wetzlar, DE
Kontaktwinkelmessgerät	DSA100	KRÜSS; Hamburg, DE
Kritischer-Punkt-Trockner	Bal-Tec CPD 030	BALTIC präparation; Niesgrau, DE
Kühlplatte	EG1150 C	Leica Mikrosysteme; Wetzlar, DE
Kühlraum	4°C	Genheimer; Höchberg, DE
Kühlschränke	SANTO	AEG Electrolux; Nürnberg, DE
	MEDline	Liebherr; Biberach an der Riß, DE
Kühlzentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Couter; Krefeld, DE
Laborspülmaschine	G 7883 CD	Miele; Gütersloh, DE
Magnetrührer mit Heizplatte	MR3001K	Heidolph; Schwabach, DE
	RCT basic IKAMAG®	VWR; Darmstadt, DE
MALDI-ToF/ToF Massenspek- trometer	Applied Biosystems/MDS	SCIEX, Foster City, CA
Mikrotom	SM 2010R	Leica Mikrosysteme; Wetzlar, DE
Mikrowaage	Cubis MSE	Sartorius; Göttingen, DE
Mikrowelle	NN-E201W	Panasonic; Wiesbaden, DE
Multimode-Mikroplatten Photo- meter	TECAN Infinite® M200	TECAN; Crailsheim, DE
Manueller Kassettendrucker	VCP5001	Vogel; Fernwald, DE
Objektträger-Schnelltrockner (Schrank)	TDO 66	MEDITE; Dietikon, DE
pH-Meter	766 Calimatic SevenEasy	Knick; Berling, DE Mettler Toledo; Gießen, DE
Pipettenstopfmaschine	115V	BELLCO Biotechnology; Vineland, US
Quarzkristall-Mikrowaagen mit Dissipations Analyse	Q-Sense E4	L.O.T. Oriol, Darmstadt, DE
Rasterelektronenmikroskope	Philips XL 30 ESEM LEO Gemini 1530	Philips; Eindhoven, NL Zeiss; Oberkochen, DE
Rasterkraftmikroskop	MFP-3D BIO	Asylum Research; Santa Barbara, US
Rasterkraftmikroskop Spitze	MLCT shape C tips	Nano&more; Wetzlar, DE
Rasterkraftmikroskop Träger	HQ:NSC-18/NoAL	MikroMasch; Wetzlar, DE
Reinigungsautomat für Glaspip- petten	PSD	Hölzel; Hörlkofen, DE
Reinigungs- und Desinfektions- automat	Typ 26-03	Riebesam; Murrhardt, DE
Reinstwasseranlage	Milli-Q® Gradient, Q-Grad®2	Millipore; Schwalbach, DE
Rotationsbeschichter	WS-650 23 NPP Series; S/N 12820	Laurell Technologies; North Wales, US
Sekundärionenmassenspektrometer	TOF.SIMS5	ION-TOF; Münster, DE
Septophag mit Fußbedienung	22	Hesse; Emmerich, DE
Schlauchpumpe	ISM 597	Ismatec; Wertheim, DE
Schlittenmikrotom	SM2010R	Leica Mikrosysteme; Wetzlar, DE
Schüttelplatte	KM-2 Akku	Edmund Bühler; Hechingen, DE
Spritzenhalterung	micromedics, SA-3303	Nordson medical; St. Paul, US
Spritzenpumpe	LA100	HLL; Langenargen, DE
Sterilwerkbänke	Laminar Air Holten MSC-Advantage Safe2020	Thermo Scientific; Karlsruhe, DE Thermo Fischer Scientific; Karlsruhe, DE Thermo Fischer Scientific; Karlsruhe, DE
Streckbad für Paraffinschnitte	1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel, DE

Tabelle 2.9: Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Hochauflösendes Mikroskop	Elyra PS.1-Prototyp	Zeiss; Oberkochen, DE
Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	JEM-2100 TEM	JOEL; Freising, DE
Ultraschallbäder	5800 USC300TH	Branson; Danbury, US VWR; Leuven, FR
Ultraschallprozessor	Q700 Sonicator	Qsonica; Newtown, US
Vis-Spektralphotometer	U-5100	Hitachi; Düsseldorf, DE
Vortex-Schüttler	Genesys 10S	Thermo Fischer Scientific; Karlsruhe, DE
Vortex-Schüttler temperierbar	Vortex-Genie®2	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Wasserbad	MAXQ4000	Thermo Fischer Scientific; Karlsruhe, DE
Wasserbad mit Einhängethermostat	Lauda Alpha	Lauda; Lauda-Königshofen, DE
Wippschüttler	SW1-VL, ED	Julabo; Seelbach, DE
Zentrifugen	Unimax2010	Heidolph Instruments; Schwabach, DE
	Rocking Platform	VWR; Darmstadt, DE
	Centrifuge 5810	Eppendorf; Hamburg, DE
	5430R	Eppendorf; Hamburg, DE
	Fresco 21	Heraeus; Hanau, DE
	Biofuge pico	Heraeus; Hanau, DE
	Avanti® J-26 XP	Beckman Coulter; München, DE
	Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fischer Scientific; Dreieich, DE

Es wurde mit der Software und den Datenbanken in Tabelle 2.10 und 2.11 gearbeitet.

Tabelle 2.10: Software

Software	Hersteller	Referenz / Link
ARgyle light™	Asylum Research; Santa Barbara, US	www.asylumresearch.com
AxioVision Rel. 4.8	Zeiss; Göttingen, DE	www.zeiss.de
Bruker OPUS 7.2	Bruker; Karlsruhe, D	www.bruker.com
ChemDraw 15.1	PerkinElmer; Waltham, US	www.perkinelmer.de
ChemStation B.03.01	Agilent; Waldbronn, DE	www.chem-agilent.com
Data Explorer 4.9	Applied Biosystems/MDS SCIEX, Foster City, CA	www.appliedbiosystems.com
DSA3	KRÜSS; Hamburg, DE	www.kruss.de
Explorer, Serie 4000, 3.5.3	Applied Biosystems/MDS SCIEX, Foster City, CA	www.appliedbiosystems.com
iControl	Tecan Group; Crailsheim, DE	www.lifesciences.tecan.com
IGOR Pro	WaveMetrics; Portland, US	www.wavemetrics.com
ImageJ v1.50i	Wayne Rasband; National Institutes of Health (NHI), US	https://imagej.nih.gov/ij
JabRef 2.10	Oliver Kopp	www.jabref.org
LAS AF	Leica Mikrosysteme; Wetzlar, DE	www.leica-microsystems.com
L ^A T _E X	MiK _T E _X 2.90, Christian Schenk	www.miktex.org
MATLAB®	MathWorks; Natick, Massachusetts, US	https://de.mathworks.com
MFP-3D 120804	WaveMetrics; Portland, US	www.wavemetrics.com
Motion Traveller 2.32.0.5736	Teledyne DALSA; Waterloo, CA	www.imaging-solutions.de
OriginPro 8.6	OriginLab Corporation; Northampton, US	www.originlab.de
QSoft 401	Q-Sense AB; Göteborg, SE	www.biolinscientific.com
QTools	Q-Sense AB; Göteborg, SE	www.biolinscientific.com
Sepera GigE Server 1.90.01.0269	Teledyne DALSA; Waterloo, CA	www.teledynedalsa.com
T _E XnicCenter 2.02	Tino Weinkauff	www.texniccenter.org
Windows Office 2010	Microsoft; Redmond, WA, US	www.microsoft.com
WVASE32 3.442	J.A. Woollam Co., Inc.; Lincoln NE, US	www.jawoollam.com
ZEN blue edition	Zeiss; Göttingen, DE	www.zeiss.de

Tabelle 2.11: Datenbanken

Datenbank	Anbieter / Programmiersprache	Referenz / Link
NCBI	National Center for Biotechnology Information	www.ncbi.nlm.nih.gov
<i>Peptid mass fingerprint</i> für <i>P. aeruginosa</i> -Wildtyp Proteine	PHP & XML	Siegfried Hohmann*
Schnittmengenermittlung von <i>String</i> -Listen	PHP	Siegfried Hohmann*
Ermittlung von MS/MS <i>Precursormassen</i>	PHP & XML	Siegfried Hohmann*
Ermittlung fehlender Sequenzen für theoretische Fragmentierung	PHP & .ref	Siegfried Hohmann*
<i>Fragment mass fingerprint</i> zur Verifikation der identifizierten Proteine	PHP & .ref	Siegfried Hohmann*

*Karlsruher Institut für Technologie - Institut für Funktionelle Grenzflächen

2.1.7 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Folgende Labor- und Verbrauchsmaterialien wurden für die Versuche verwendet (Tabelle 2.12 und 2.13). Glaswaren wurden 4 h im Hitzesterilisator bei 180 °C sterilisiert.

Tabelle 2.12: Labormaterialien

Material	Hersteller / Lieferant
Abwurfgestell	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Aufbewahrungsbox, Plastik	neoLab; Heidelberg, DE
Accurpette	VWR; Darmstadt, DE
Bechergläser	Schott; Mainz, DE
Beschwerungsringe	Hartenstein; Würzburg, DE
Desinfektionswanne	Schülke; Norderstedt, DE
Digitaler Kurzzeitmesser	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Doppelspatel	VWR; Darmstadt, DE
Edelstahlplatten, poliert, 30 × 30 cm	KIT, Campus Nord, Werkstatt; Karlsruhe, DE
Edelstahlnadeln, Länge 51 mm, Durchmesser 0,26 mm	Hamilton™; Bonaduz, CH
Edelstahlgießformen	Sakura Finetek; Staufen im Breisgau, DE
Erlenmeyerkolben, Glas	Schott; Mainz, DE
Fettstift	Dako; Hamburg, DE
Gießförmchen für Paraffinblöcke	Labonord; Mönchengladbach, DE
Glasflaschen	Schott; Mainz, DE
Glaskugeln	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Glaspipetten (2/5/10/25 ml)	Brand; Wertheim, DE
Glasspritzen	Hamilton; Reno, Nevada, US
Hand-Stückzähler (0-9999)	neoLab; Heidelberg, DE
Impfösen, Metall	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Inokulationspritze Hamilton® Gastight #1750, luer-Lock	Sigma-Aldrich; Steinheim, DE
Kryohandschuhe	VWR; Darmstadt, DE
Laborglas	Schott; Mainz, DE
Magnetrührstäbchen	Hartenstein; Würzburg, D / VWR; Darmstadt, DE
Magnetstab	Hartenstein; Würzburg, D / VWR; Darmstadt, DE
Medibox Entsorgungsbehälter	Braun; Melsungen, DE
Messzylinder	Brand; Wertheim, DE
Metallbesteck	Lager Campus Nord; Karlsruhe, DE
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific; Karlsruhe, DE
Multistep Pipette, Multipipette® pro	Eppendorf; Hamburg, DE
Neubauer-Zählkammer	Thermo Scientific; Karlsruhe, DE
Objektträgerboxen	Hartenstein; Würzburg, DE
Objektträgerhalterung, Glas oder Edelstahl	neoLab; Heidelberg, DE
Pasteurpipetten aus Glas	Mercateo; München, DE
Pinsel	Brand; Wertheim, DE
Pinzetten	Leica Mikrosysteme; Wetzlar, DE
Pipetten Peqpette	Assistent; Sondheim, DE
Pipetten Research®Plus	Peqlab; Erlangen, DE
Pipettierhilfe PIPETBOYacu	Eppendorf; Hamburg, DE
Präzisionspinzetten K2A / K35A / 7-SA, rubis®	Brand; Wertheim, DE
Pulvertrichter	VWR; Darmstadt, DE
Reaktionsgefäß-Ständer	neoLab; Heidelberg, DE
Rührfische	neoLab; Heidelberg, DE
Rührfische	Hartenstein; Würzburg, DE
Saugaufsatz für Pasteurpipetten	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Septophag 22 mit Fußbedienung	Lager KIT Campus Nord; Karlsruhe, DE
Skalpellklingenhalter	Hesse; Emmerich, DE
Spritzflaschen	Bayha; Tuttlingen, DE
Zellkronen	neoLab; Heidelberg, DE
Zellkulturröhrchenständer	Werkstatt Universitätsklinikum; Würzburg, DE
	Carl Roth; Karlsruhe, DE

Tabelle 2.13: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller / Lieferant
Cell Strainer, Porengröße 40 µm	BD Biosciences, Heidelberg, DE
<i>chamber slides</i>	Nunc; Wiesbaden, DE
Deckgläser	Menzel-Gläser; Braunschweig, DE
Dialyseschläuche (Float-A-Lyzer® G2, MWCO 100 kD)	Spectrum Labs; California, US
Dichtscheiben, PTFE	A-Z Analytik-Zubehör; Langen, DE
Doppelseitig klebendes leitfähiges Kohlenstoffband	Plano; Wetzlar, DE
Dünnstegnetzchen (<i>mixed mesh</i>); Nickel	Plano; Wetzlar, DE
Einbettfilterpapier	Labonord; Mönchengladbach, DE
Einbettkassetten mit Deckel	Klinipath; Duiven, NL
Einmalhandschuhe Dermatril™ P, Nitril	KCL; Eichenzell, DE
Einmalhandschuhe rotiprotect, Latex	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Einmalhandschuhe Peha-soft®, Latex	Hartmann; Heidenheim, DE
Einmalhandschuhe Touch N Tuff, Nitril	Ansell; Brüssel, BE
Einmalhandschuhe, SensiCareIce, Nitril	Medline International; Kleve, DE
Einmalimpfösen	VWR; Darmstadt, DE
Einmalpipetten Polystyrol	Greiner Bio-One; Frickenhausen, DE
Einmalspatel, Plastik	VWR; Darmstadt, DE
Einmalspritzen zweiteilig (B. Braun)	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Entsorgungsbeutel Zellkultur	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Filterpapier zum Einbetten	Labonord; Mönchengladbach, DE
Filter zum Sterilfiltrieren 0,2 µm	Sarstedt AG; Nürnberg, DE
Gewindeflaschen, Glas, 20 ml, braun oder klar	A-Z Analytik-Zubehör; Langen, DE
Injektionskanüle sterican	B. Braun; Melsungen, DE
KIMTECH SCIENCE Präzisionstücher	Kimberly-Clark; Koblenz-Rheinhafen, DE
Kryoröhrchen (1,5 ml)	Nunc; Wiesbaden, DE
Küvetten 1,5 ml Makro PS	VWR; Darmstadt, DE
Laboralufolie	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Leitfähige Haftaufkleber (Leit-Tabs)	Plano; Wetzlar, DE
Mikrotom Klingen, Typ A35	pfm medical; Köln, DE
Multiwellplatten CELLSTAR®	Greiner Bio-One; Kremsmünster, AT
Mundschutz Visma earloop (B. Braun)	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Objektträger SuperFrost® Plus	R. Langenbrick; Emmendingen, DE
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Thermo Scientific; Karlsruhe, DE
Objektträger Menzel-Gläser Polysine® Slides	Thermo Scientific; Karlsruhe, DE
Parafilm® M	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Pasteurpipetten	Brand; Wertheim, DE und Carl Roth; Karlsruhe, DE
Petrischalen	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Petrischalen CELLSTAR®	Greiner Bio-One; Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen, steril	Eppendorf; Hamburg, DE
Plastikschaber (blue)	ScrapeRite; Florida, US
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf; Hamburg, DE und Sarstedt; Nümbrecht, DE
Schraubkappen, PP	A-Z Analytik-Zubehör; Langen, DE
Serologische Einmalpipetten CELLSTAR® (5, 10, 25 und 50 ml)	Greiner Bio-One; Kremsmünster, AT
Serologische Einmalpipetten (5, 10, 25 und 50 ml)	Nerbepius; Winsen, DE
Septophag-Beutel	Porod; Frauenhofen, AT
Siliziumoberflächen	Silicon Materials; Kaufering, DE
Skalpellklingen	Bayha; Tuttlingen, DE
Sterilfilter (0,2 µm)	Merck Millipore; Darmstadt, DE
96-well Platten	Nunc; Wiesbaden, DE
Spritzen, mit Dichtungsgummi, 1 ml	BD Plastikpak; Heidelberg, DE
Spritzenfilter Rotilabo PVDF, Porengröße 0,22 µm, steril	Carl Roth; Karlsruhe, DE
QCM-D Sensoren, Gold, QSX301, 5 MHz	Q-Sense; Göteborg, SE
QCM-D Sensoren, Titan, QSX 335, 5 MHz	Q-Sense; Göteborg, SE
Vernichtungsbeutel	Hartenstein; Würzburg, DE
Wägebepapier	VWR; Leuven, FR
Wägeschalen Plastik	VWR; Darmstadt, DE
Weithalsflaschen	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Zellkulturflaschen (25/50/75/150 cm ²)	TPP; Trasadingen, CH
Zellkulturplatten Multiwell (6/12/24/96)	TPP; Trasadingen, CH
Zellkulturschaber	Sarstedt AG; Nürnberg, DE
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One; Frickenhausen, DE und Carl Roth; Karlsruhe, DE
Zip-Tip®, U-C18; P10	EMD Millipore Corporation; Billerica, US

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Gelatine-basierten Filmen und deren chemische und physikalische Charakterisierung

2.2.1.1 Chemische Funktionalisierung von Oberflächen

Um die Haftvermittlung für die nachfolgende Amin-Modifizierung zu verbessern, wurden Silizium- und Glasoberflächen mit 3-(Trimethoxysilyl)-propylmethacrylat im Vakuum für 3 h silanisiert. Mittels chemischer Gasphasenabscheidung (engl. *chemical vapor deposition*, CVD) wurden Silizium-, Gold- und Glasoberflächen sowie goldbeschichtete QCM-D Kristalle mit freien Amin-Gruppen modifiziert. Hierbei wurde ein Amin-funktionalisiertes Paracyclophan bei 660 °C pyrolysiert und über die Gasphase auf die Oberflächen gleichmäßig aufgedampft (Chen et al., 2008). Die Schichtdickenzunahme des auf den Oberflächen gebildeten Poly(4-aminomethyl-p-xylylen-co-p-xylylen) (PPX- CH_2NH_2 bzw. PPX-Amin), wurde über einen Schwingquarz in der Probenkammer kontrolliert. Es wurden 10 - 20 nm PPX-Amin auf jede Oberfläche aufgebracht. Die freien Amin-Gruppen auf den Oberflächen dienen als Bindungsstellen beim späteren Quervernetzungsprozess des Gelatinefilms mit dem Substrat (2.2.1.4). Um eine strukturierte Modifizierung der Oberfläche zu erhalten, wurden vor dem CVD-Prozess Dünnstegnetzchen aus Nickel oder Silikon-basierte Stempel (Polydimethylsiloxan; PDMS) mit einer Maschenweite von 50 - 200 μm auf die Oberflächen aufgelegt und nach der Beschichtung vorsichtig abgenommen.

2.2.1.2 Ermittlung von Schichtdicken

Mittels eines Multiwellenlängen-Rotations-Ellipsometers (J.A. Woollam M-44; Wellenlängenbereich 400 - 800 nm; Einfallswinkel 75°) wurden die Schichtdicken der Amin-Modifizierung wie auch der Gelatine-basierten Filme sowohl vor als auch nach der Quervernetzung, im trockenen Zustand gemessen. Bei der Ellipsometrie handelt es sich um ein Messverfahren, bei dem die Änderung des Polarisationszustandes von Licht bei Reflexion an einer Oberfläche oder an einem Schichtsystem gemessen wird. Die Proben wurden auf der Messplattform des Ellipsometers platziert, so dass der Lichtstrahl auf die zu messende Oberfläche fiel. Vor jeder Messung wurde eine unbehandelte Referenzoberfläche gemessen. Die Auswertung der Daten wurde mit der Software WVASE32[®] 3.442 unter Annahme eines optischen Schichtmodells durchgeführt. Die optischen Eigenschaften des Substrats wurden aus der Messung der unbehandelten Referenzoberfläche, durch Anpassung von Materialwerten aus der Datenbank der Software, bestimmt. Es wurde berücksichtigt, dass sich auf dem Substrat eine transparente, organische Schicht befand, wodurch der Brechungsindex unter Verwendung eines *cauchy dispersion line shape* berechnet wurde. Jede Probe wurde an drei unterschiedlichen Stellen gemessen und der Mittelwert wurde als Schichtdicke angegeben.

2.2.1.3 Rotationsbeschichtung von Oberflächen

Basierend auf dem Herstellungsprotokoll für dicke Gelatinehydrogele im Makrometermaßstab von Tronci et al. (2010) wurde ein neues Herstellungsprotokoll für dünne Gelatinefilme (Mikro- und Nanometermaßstab), welche kovalent auf Oberflächen gebunden sind, entwickelt. Unter Verwendung eines Rotationsbeschichters (engl. *spin coater*; WS-650 23 NPP, Laurell Technologies) war es möglich, Gelatine in unterschiedlichen Schichtdicken reproduzierbar und gleichmäßig auf modifizierte Glas-, Gold- oder Siliziumoberflächen aufzubringen. Hierzu wurden Versuchsreihen zur Ermittlung der optimalen Gelatinezusammensetzung sowie zum Beschichtungsprogramm durchgeführt. Mit einer eingewichtsprozentigen (Gew.-%) Gelatine-lösung und einem Zwei-Stufen-Beschichtungsprogramm wurden 15 nm dünne Gelatinefilme erzielt. Hierzu wurde die Schweinegelatine in Milli-Q[®]-H₂O bei 55 °C im Wasserbad unter ständigem Rühren langsam gelöst, bis die Lösung nach ca. 30 min luftblasenfrei und klar war. Die mit PPX-Amin modifizierten Oberflächen wurden mittels Vakuumpattform im Rotationsbeschichter fixiert, mit ca. 500 µm der wässrigen Gelatinelösung komplett bedeckt und das Programm gestartet. Im ersten Schritt (5 s) wurde bei geringer Beschleunigung (500 rpm/s) und geringer Drehzahl (1 000 rpm) die Gelatinelösung gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Im sofort folgenden zweiten Schritt (60 s) wurde bei hoher Beschleunigung (4 200 rpm/s) und hoher Drehzahl (12 000 rpm) der Film dünn aufgebracht und getrocknet. Die Schichtdicke der trockenen Gelatinefilme wurde anschließend mit dem Ellipsometer gemessen (Kapitel 2.2.1.2).

Durch unterschiedliche Gelatinekonzentration und Änderungen im Beschichtungsprogramm wurde die Dicke des Gelatinefilms variiert. Mit einer 10 Gew.-% Gelatinelösung und dem oben beschriebenen Beschichtungsprogramm wurden Filme im Bereich von 350 nm erhalten. Mit einem Ein-Stufen-Programm von 60 s bei 1 500 rpm und 500 rpm/s Beschleunigung wurden bei einer 10 Gew.-% Gelatinelösung Filme im Bereich von 1,7 µm erhalten.

2.2.1.4 Quervernetzung der Gelatine-basierten Filme

Die Quervernetzung der dünnen Gelatinefilme (bis 50 nm Schichtdicke) wurde in 10 mM L-Lysin diisocyanat ethyl ester (LDI), einem chemischen Quervernetzer mit zwei reaktiven Gruppen, in Dimethylformamid (DMF) unter Argonatmosphäre durchgeführt, um die Reaktion des LDI mit dem vorhandenen Wasser in der Luft zu verhindern. Die Quervernetzung der Gelatinefilme ab einer Schichtdicke von 50 nm wurde in 10 mM LDI in wasserfreiem DMSO, ebenfalls für 1 h unter Argonatmosphäre, durchgeführt. Die Quervernetzung in DMSO begünstigt die Quellung des Gelatinefilms und die Migration des chemischen Quervernetzers in den Gelatinefilm bis hin zur Substratoberfläche und resultierte in einer gleichmäßigen Quervernetzung. Das LDI wurde vor Verwendung unter Vakuum destilliert, unter Argon (Schutzatmosphäre) aseptisch verschlossen und bei -18 °C aufbewahrt. Um ein hochreines und voll reaktives Produkt zu gewährleisten, wurde die Destillation alle drei Monate, oder bei Bedarf, d. h. bei sichtbarem Wassereinschluss (Kristalle), wiederholt. Die mit Gelatine beschichteten Oberflächen wurden für 60 min in die Quervernetzerlösung getaucht. Es wurden ca. 7 µM LDI pro 1 ng Gelatine eingesetzt. Bei dieser Quervernetzungreaktion wurden die freien Amin-Gruppen der Gelatinefibrillen untereinander (z. B. über

die freien Amin-Gruppen des Lysins) sowie mit den freien Amin-Gruppen der Gelatinefibrillen mit den freien Amin-Gruppen auf der Substratoberfläche über die Bildung von Harnstoffbindungen vernetzt. Hierdurch wird das Hydrogel auf der Oberfläche und in sich selbst stabilisiert. Anschließend wurden die Filme für 24 h unter dem Abzug getrocknet. Es folgten drei Waschschrte à 10 min bei 37°C und 100 rpm in Milli-Q®-H₂O. Die Oberflächen wurden erneut unter dem Abzug getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur (RT) trocken und dunkel gelagert. Die Schichtdicke der trockenen, Gelatine-basierten Filme wurde vor und nach den Waschschrten mittels Ellipsometer gemessen (Kapitel 2.2.1.2). Eine Übersicht des Herstellungsprozesses ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

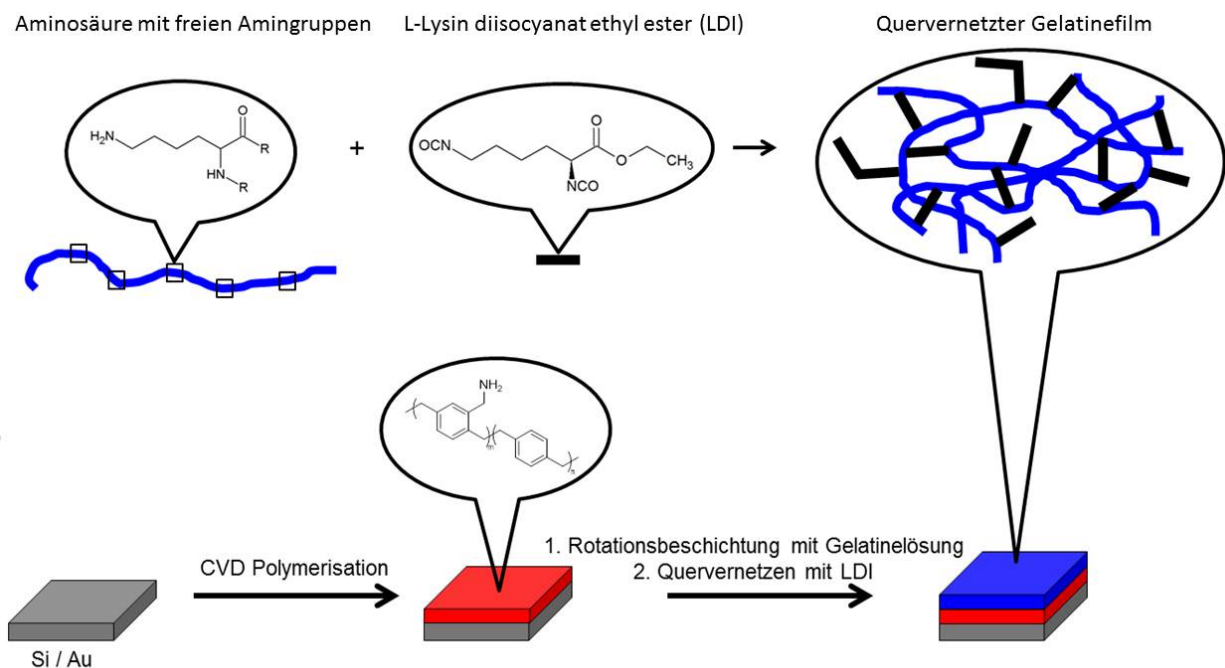


Abbildung 2.1: Schema zur Herstellung von Gelatine-basierten Filmen. Es ist der schematische Herstellungsprozess sowie die chemischen Strukturen und der Aufbau des Gelatinefilms nach der Quervernetzung dargestellt. (Abbildung verändert nach Schönwälder et al. (2014), genehmigt von der *American Chemical Society* vertreten durch Dr. Darla Henderson).

2.2.1.5 Visualisierung der Oberflächen mittels Rasterelektronenmikroskopie (*environmental scanning electron microscopy*, ESEM)

Die Oberflächen wurden mit einem leitfähigen Kupfer/Nickel-Band bzw. Leit-Tabs (Plano, Wetzlar) auf REM-Halterungen fixiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Gelatine-basierten Filme wurden an einem Philips XL 30 FEG ESEM angefertigt. Das Mikroskop verfügt über eine Feldemissionskathode und kann bei variablen Drücken bis ca. 1500 Pa betrieben werden. Unbeschichtete Proben wurden bei einem Kammerdruck von ca. 70 Pa, einem Arbeitsabstand von 8-10 mm und einer Anregungsspannung von 5 kV mit dem LFD-Detektor untersucht. Zur Verbesserung der Abbildungsqualität und zur Vermeidung von Aufladungseffekten wurden die Proben an einer Kleinbeschichtungsanlage BalTec MED 020

mit einer dünnen Au/Pd (80/20) - Schicht besputtert (10 nm) und bei einem Kammerdruck von 1 Torr, einem Arbeitsabstand von 8 - 10 mm und einer Anregungsspannung von 12 kV im Sekundärelektronen-Modus untersucht. Zur energiedispersiven Röntgenfluoreszenz-Analytik (*energy dispersive X-ray spectroscopy*, EDX) wurde ein stickstoffgekühlter Saphir Si(Li) Detektor von EDAX bei einer Anregungsspannung von 12 kV eingesetzt. Die Messdauer pro Spektrum betrug 2 bis 6 min.

2.2.1.6 Chemische Charakterisierung der Stabilität von Gelatine-basierten Filmen mittels Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie

Die Gelatine-basierten Filme (quervernetzt und nicht quervernetzt; bzw. gewaschen und nicht gewaschen) wurden auf Goldoberflächen, wie in Kapitel 2.2.1.3 und 2.2.1.4 beschrieben, aufgebracht und mit der Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (engl. *infrared reflection absorption spectroscopy*, IRRAS) chemisch charakterisiert (nach Kattner und Hoffmann (2002)). Diese Messungen wurden zur Untersuchung der Stabilität hinsichtlich der Quervernetzung der Gelatine-basierten Filme durchgeführt. Hierzu wurde die Reflexion bei einem streifenden Einfall von 80° auf die trockenen Proben gemessen. Für die Referenzmessungen wurde ein vollständig deuteriertes Hexadecanthiol SAM (*self assembled monolayer*) auf einem Gold-Substrat verwendet (1024 Scans). Während der Messung der beschichteten Probe wurde kontinuierlich trockene Luft in das Spektrometer und die Probenkammer geleitet. Es wurden jeweils so viele Einzelscans gestapelt, bis die Signale von Wasserdampf aus der Umgebungsluft vollständig kompensiert waren (1 200 - 1 700 Scans).

2.2.1.7 Ermittlung der Oberflächenmorphologie und -topographie sowie des Elastizitätsmoduls der Gelatine-basierten Filme

Die Oberflächentopographie der getrockneten Gelatinefilme sowie das Elastizitätsmodul der Gelatinehydrogele wurde mit dem Rasterkraftmikroskop (engl. *atomic-force microscope*, AFM; MFP-3D BIO, Asylum Research, Oxford Instruments) gemessen. Hierbei wurde die Oberfläche der trockenen Filme bei 25 °C an Luft im Wechselspannungs-Modus (*AC mode*) mittels einer Messnadel, dem sogenannten *Cantilever*, zeilenweise abgerastert und mit der Software ARgyle light ausgewertet. Es wurde eine HQ:NSC-18/NoAL Messnadel (Mikro-Masch, Wetzlar) bei einer nominalen Frequenz von 75 kHz und einer Nennfederkonstante von 3,5 N/m verwendet.

Des Weiteren wurde das reduzierte Elastizitätsmodul (engl. *reduced E-modulus*) der quervernetzten, Gelatine-basierten Hydrogele in gequollenem Zustand gemessen. Hierzu wurden die Hydrogele 1 h in Milli-Q®-H₂O bei RT gequollen. Die Messung wurde mit einer MLCT (*metal-to-ligand charge transfer*) geformten C-Spitze (Bruker, Karlsruhe) mit einer Nennfederkonstante von 0,024 N/m durchgeführt. Für jeden Datenpunkt wurden zehn Vertiefungen bei 0,2 Hz, einer Scangröße von 25 und einer Temperatur von 25 oder 37 °C gemessen.

2.2.1.8 Statische Kontaktwinkelmessung

Alle Kontaktwinkel in dieser Arbeit wurden mit Milli-Q[®]-H₂O gemessen. Wasser hat mit 72,75 mN/m eine relativ hohe Oberflächenspannung. Dies sichert gut zu vermessende Tropfenkonturen, welche nur dann entstehen, wenn die Oberflächenspannung der Flüssigkeit die des Substrats übertrifft.

Mit dem Kontaktwinkelmessgerät (DSA100; KRÜSS) wurden die Kontaktwinkel von unbeschichteten Referenzoberflächen (Silizium- und Goldoberflächen, sowie goldbeschichtete QCM-D Kristalle) und mit PPX-Amin bzw. Gelatine beschichtete Oberflächen gemessen. Hierbei wurde ein Tropfen mit definiertem Volumen an einer Kanülenspitze gebildet und anschließend automatisiert auf die zu vermessende Oberfläche aufgebracht (statische Bedingungen). Durch die Tropfenkonturanalyse (engl. *drop shape analysis*, DSA) wurde der Kontaktwinkel aus dem Schattenbild eines liegenden Tropfens und der Oberflächenspannung ermittelt. Je nach Oberflächenbeschaffenheit und chemischer Modifizierung ändert sich der Kontaktwinkel des Tropfens sehr empfindlich. Bei RT wurden 3 µl Milli-Q[®]-H₂O mit einer Rate von 50 µl/min auf die jeweilige feste Oberfläche dosiert (liegender Tropfen). Mit Hilfe einer Kamera wurde ein Bild des Tropfens aufgenommen und in die Tropfenkonturanalyse-Software DSA übertragen. Es folgte, anhand einer Graustufenanalyse des Bildes, eine Konturerkennung des Tropfens. Anschließend wurde ein die Tropfenkontur beschreibendes geometrisches Modell an die Kontur angenähert. Der Kontaktwinkel wurde automatisiert von der Software aus dem Winkel zwischen der ermittelten Tropfenkontur-Funktion und der Probenoberfläche berechnet. Die Tropfenkontur wurde mittels einer Polynom-Methode, mit keiner Vorannahme über die Form, modelliert. Um vergleichbare Messergebnisse zu generieren ist es wichtig, dass der Winkel immer nach derselben Zeit, nach Absetzen des Tropfens auf die Oberfläche, gemessen wird, da Verdunstungseffekte bei diesen kleinen Volumina schon nach wenigen Minuten große Auswirkung auf den Kontaktwinkel haben würden. Je Probe wurden 10 Oberflächen ausgewertet.

2.2.2 Kultivierung, Lagerung und Stammerhaltung von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa-Flüssigkulturen wurden in LB-Medium unter Schütteln bei 170 rpm und 37 °C kultiviert. Ausstriche auf LB-Agar wurden bis zu sieben Tage bei RT und 14 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Zur längerfristigen Aufbewahrung von *P. aeruginosa* wurden DMSO- (Dimethylsulfoxid) Gefrierkulturen hergestellt. Hierzu wurden 925 µl der Bakterienkultur mit 75 µl (7,5 %, (v/v)) DMSO gemischt und bei -80 °C gelagert. Bei Bedarf wurde mittels einer Impföse etwas Material von der Gefrierkultur entnommen, auf LB-Agar ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C kultiviert.

Für die Proteinadsorptionsmessungen mittels QCM-D (siehe Kapitel 2.2.4) wurden in einen 500 ml Kolben 70 ml BM2 Medium vorgelegt und mit einer Bakterienkolonie des *P. aeruginosa* Wildtyps inokuliert. Das BM2 Medium wurde vor der Verwendung steril filtriert (Porengröße 0,2 µm). Die Inkubation erfolgte bei 170 rpm und 37 °C für 24 h. Die Kulturen wurden anschließend bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert und der

Überstand mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,2 μm) steril filtriert. Der Überstand wurde für die QCM-D Messungen eisgekühlt verwendet.

2.2.3 Kultivierung, Lagerung und Stammerhaltung von *A. nidulans*

A. nidulans-Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben in YAG-Flüssigmedium mit 10^6 Sporen/ml angeimpft und im Schüttler bei 180 rpm und 37°C über Nacht inkubiert. Den Medien wurden je nach Bedarf die entsprechenden Auxotrophiemarker zugegeben (Tabelle 2.4, Medienkomponenten). Ausstriche auf YAG-Agar wurden 2-3 Tage bei 37°C inkubiert und anschließend bis zu 14 Tage bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Herstellung einer Sporenlösung wurden die Konidiosporen mit Hilfe eines Spatels und unter Zugabe von 10 ml einer 0,1%igen Tween-20 Lösung von der Agar-Platte geerntet. Um die Sporen von den Hyphen und Konidiophoren zu trennen, wurde die Lösung durch einen Cell Strainer (Porengröße 40 μm) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gefiltert und zur Auflösung möglicher Sporenzusammenschlüsse leicht gevortext. Die Sporen wurden 10 min bei 4°C und 5000 rpm pelletiert, nach Verwerfen des Überstands mehrmals mit ddH₂O gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die gewaschenen Sporen in 10-20 ml ddH₂O resuspendiert und die Sporenanzahl pro ml mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Zur längerfristigen Aufbewahrung von *A. nidulans* wurden Kryokulturen der Sporenlösung in 12,5% Glycerol angefertigt und diese bei -80°C gelagert.

2.2.4 Untersuchung der Proteinadsorption mittels Quarzkristall-Mikrowaage

Quarzkristall-Mikrowaagen mit Dissipationsüberwachung (engl. *quartz crystal microbalance with dissipation monitoring*, QCM-D) sind Mikrowaagen, deren Sensor auf einem Schwingquarz basiert (Kerstan et al., 2010; Syguda et al., 2012). Durch den piezoelektrischen Effekt oszillieren die Quarzkristalle bei Anlegen einer passenden Sinus-Spannung im *shear mode* bei ihrer Grundfrequenz von ca. 5 MHz. Die adsorbierte Proteinmasse auf der Oberfläche des Sensors beeinflusst die Resonanzfrequenz des Schwingquarzes. Das abflachende Signal des Grundtones sowie der ungeraden Obertöne wird aufgenommen und an eine gedämpfte Schwingung angepasst. Mit dieser Messtechnik wird die adsorbierte Proteinmasse wie auch deren viskoelastische Eigenschaften sensitiv aufgenommen (Navarro und Planell, 2012).

Gold- und titanbeschichtete Quarzkristalle dienten als Referenzoberflächen für die Untersuchung der Proteinadsorption. Die goldbeschichteten Quarzkristalle wurden des Weiteren mit einer Amin-Modifizierung, wie in den Kapiteln 2.2.1.1 beschrieben, bzw. mit einer Amin-Modifizierung und dem Gelatinefilm, wie in Kapitel 2.2.1.3 und 2.2.1.4 beschrieben, beschichtet. Durch die gegebene Messtechnik mussten die Gelatine-basierten Hydrogele, aufgrund ihrer quellenden Eigenschaften, sehr dünn und unter Fluss stabil sein.

Zur Untersuchung der Proteinadsorption von humanen Plasmaproteinen auf den unterschiedlichen Oberflächen wurde eine Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsmessung, Q-Sense

E4 Instrument (L.O.T. Oriol), mit der Software QSoft 401 verwendet. Vor jeder Messung wurden die Schläuche des Gerätes mit Milli-Q[®]-H₂O, gefolgt von 1 %-iger Hellmanex[®] II-Lösung und erneut Milli-Q[®]-H₂O gespült. Die Proteinadsorption wurde, nach Erhalten einer stabilen Frequenz- und Dissipations-Basislinie, in PBS-Puffer (0,01 M Phosphatpuffer, pH mit Salzsäure auf 7,4 eingestellt; 10 min mit Helium entgast) bei einer konstanten Flussrate von 50 µl/min und 37 °C der QCM-D Flusszelle gemessen. 1 mg/ml Humanalbumin (HSA) oder humanes Fibrinogen in PBS pH 7,4 wurden für die Adsorptionsmessungen der Plasmaproteine eingesetzt. Im Anschluss an die Proteinadsorption wurde das System unter den gleichen Bedingungen mit PBS-Puffer gespült, um nicht gebundene Proteine von der Sensoroberfläche zu entfernen und abschließend mit Luft geflutet. Nach der Messung wurden die Chips vorsichtig aus den Flusszellen entnommen und verbleibende Flüssigkeitstropfen mit Stickstoff abgeblasen.

Für die Untersuchung der Adsorption von bakteriellen Proteinen auf Gold, Titan, PPX-Amin und Gelatinehydrogel wurde steril filtrierter, zellfreier Überstand von *P. aeruginosa* nach 24-stündiger Kultivierung verwendet. Hierzu wurde wie oben beschrieben vorgegangen, jedoch wurde für die Einstellung der Basislinie ein BM2-Medium anstelle von PBS-Puffer eingesetzt. Um nach der Proteinadsorptionsmessung einen Großteil der im Nährmedium befindlichen Salze zu entfernen, welche die anschließende Proteinidentifikation mittels MALDI-ToF/MS-Analyse stören würden, wurde mit 10 mM NH₄HCO₃-Lösung anstelle von PBS gespült.

Die Auswertung der Daten wurde mit der Software QTools durchgeführt. Die Schichtdicke und die Feuchtmasse der adsorbierten Proteine wurde mit dem viskoelastischen Modell nach Voigt berechnet (Voinova et al., 1999). Mit diesem Modell wurde aus den gemessenen Daten die Resonanzfrequenz- (Δf) und Energiedissipationsänderungen (ΔD) als Funktion der Zeit für den dritten, fünften und siebten Oberton ermittelt und aus diesen Daten die Feuchtmasse der adsorbierten Proteine und die viskoelastischen Eigenschaften des adsorbierten Proteinfilms berechnet (Kapitel 2.2.5.1). Es wurde von einer Dichte von 1050 kg/m³ des adsorbierten Proteinfilms ausgegangen (Dutta et al., 2008).

Die QCM-D-Flusszellen wurden nach der Messung in einer Lösung aus 2,0 vol-% SDS und 0,1 vol-% Tween-20 für 10 min im Ultraschallbad bei 40 °C gereinigt und anschließend dreimal für 10 min im Ultraschallbad mit Milli-Q[®]-H₂O bei 40 °C gespült. Zum Schluss wurden die Zellen mit Stickstoff getrocknet und bis zur nächsten Messung in Glasbehältern trocken gelagert.

2.2.5 Charakterisierung der adsorbierten Proteine

2.2.5.1 Berechnung des Schermoduls

Das Schermodul G ist eine Proportionalitätskonstante zwischen der Scherkraft und der eintretenden Deformation eines Körpers (Mezger, 2012). Über die Berechnung des Schermoduls konnten die adsorbierten Proteine im Hinblick auf ihre Anordnung und die Interaktion mit der Oberfläche näher charakterisiert werden.

Das Schermodul wird durch die Steigung im $\frac{\Delta D_n}{-\Delta f_n}$ -Plot charakterisiert. Ein proportionales Verhalten der Dissipations- (ΔD) zur Frequenzänderung (Δf) ist die Voraussetzung für die Berechnung. Diese Werte wurden aus den QCM-D Messungen erhalten. Im Folgenden ist die Herleitung der Gleichung 2.3 beschrieben, mit welcher das Schermodul des adsorbierte Proteinfilms in dieser Arbeit berechnet wurde.

Das Verhältnis $\frac{\Delta \Gamma}{-\Delta f}$ gemessen für einen dünnen, weichen Film auf einem QCM-D Sensor in Flüssigkeit kann von Gleichung 2.1 abgeleitet werden (Du und Johannsmann, 2004).

$$\frac{\Delta \Gamma_n}{-\Delta f_n} = 2\pi n f_0 \eta J'_f \quad (2.1)$$

f beschreibt die Resonanzfrequenz, Γ den imaginären Teil der Resonanzfrequenz, n die harmonische Ordnung, f_0 die Grundfrequenz, η die Viskosität der Flüssigkeit und J'_f ist der Realteil der Schernachgiebigkeit. Das Δ steht für den Unterschied zur Ausgangssituation.

Über die Beziehung zwischen der Dissipation (D) zum imaginären Teil der Resonanzfrequenz (Γ) (z. B. $D = \frac{2\Gamma}{f}$) und dem Wissen, dass $f_n \approx n f_0$, kann Gleichung 2.1 folgendermaßen umgeschrieben werden:

$$J'_f = \frac{1}{4\pi\eta} \frac{\Delta D_n}{-\Delta f_n} \quad (2.2)$$

Die Schernachgiebigkeit ist definiert als $J = \frac{1}{G}$. Ist der adsorbierte Film viel starrer als die Flüssigkeit (was hier der Fall ist), ist der imaginäre Teil der Gleichung J''_f viel kleiner als J'_f und $G' = \frac{1}{J}$ (Du und Johannsmann, 2004). Daraus resultiert, dass das Schermodul des dünnen adsorbierten Proteinfilms mit folgender Gleichung bestimmt werden kann:

$$\text{Schermodul : } G_f = \frac{4\pi\eta}{-\frac{\Delta D_n}{\Delta f_n}} \quad (2.3)$$

2.2.5.2 Differenzierung von mit humanen Proteinen beladenen und unbeladenen Gelatine-basierten Filmen

Eine erweiterte chemische Charakterisierung der mit HSA bzw. Fibrinogen beladenen Gelatinefilme wurde mittels ToF-SIMS durchgeführt. Diese Untersuchung konnte nicht mit dem IRRAS durchgeführt werden, da eine Unterscheidung zwischen Proteinen der Schweinegelatine und humanen Plasmaproteinen mit dieser Methode nicht möglich ist.

Sekundärionenmassenspektrometrie mit Flugzeitanalyse (engl. *time-of-flight secondary ion mass spectrometry*, ToF-SIMS) wurde an einem TOF.SIMS5 Instrument (ION-TOF) durchgeführt. Dieses Gerät ist ausgestattet mit einer Bismut-Primärionenquelle und einem nichtlinearen Flugzeitanalysator. Die Proben werden im Ultrahochvakuum mit schnellen Primärionen beschossen, um Sekundärionen aus der Probenoberfläche herauszuschlagen. Mittels des Flugzeitanalysators werden Massenspektren des Probenmaterials angefertigt. Der Basisdruck des Ultrahochvakuums wurde unter 5×10^{-9} mbar gehalten. Für eine hohe Massenauflösung wurde die Bi-Quelle im *high current bunched* Modus, mit einem Bi_3^+ Primärionenpuls von 25 keV Energie und einer lateralen Auflösung von ca. $4 \mu\text{m}$ betrieben. Die kurzen Pulse von 1,0 bis 1,2 ns machen eine Hochmassenauflösung ($m/\Delta m > 4000$) möglich. Der Primärionenstrahl wurde über eine Fläche von $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ gerastert und 128×128 Datenpunkte aufgenommen. Die Primärionendosen wurden unter 10^{11} Ionen/ cm^2 , dem statischen SIMS Limit, gehalten (Muramoto et al., 2012; Vickerman und Briggs, 2013). Die Spektren wurden an den allgegenwärtigen C^- , C_2^- , und C_3^- oder an den C^+ , CH^+ , CH_2^+ , und CH_3^+ Peaks kalibriert.

Nach dem QCM-D Experiment wurden die Sensoren mit Milli-Q[®]-H₂O gespült, mit N₂ getrocknet und bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt. Die Charakterisierung der mit humanen Plasmaproteinen beladenen, Gelatine-basierten Filme auf den QCM-D Sensoren wurde innerhalb von 24 h nach dem QCM-D Experiment durchgeführt. Die Proben wurden dafür auf einem *backmount* Probenhalter positioniert und nach den oben aufgeführten Parametern gemessen.

Für die Hauptkomponentenanalyse der aufgenommenen Proteindaten in positiver Polarität wurden die Datensätze in vier Felder a $250 \times 250 \mu\text{m}^2$ aufgeteilt und Peaklisten mit charakteristischen Fragmenten der Aminosäureseitenketten berechnet. Die Peakintensitäten wurden zu den Signalen der entsprechenden Datensets normalisiert. Die Hauptkomponentenanalyse wurde mit einem Softwarepaket für MATLAB[®] (Graham et al., 2006) durchgeführt. Die statistische Analyse der Messergebnisse basiert auf einer durch Wagner und Castner (2001) beschriebenen Methode.

2.2.5.3 Identifizierung adsorbierter, bakterieller Proteine auf unterschiedlichen Oberflächen

Die Adsorption von bakteriellen Proteinen aus einem komplexen Probengemisch wurde mittels QCM-D Analyse auf unterschiedlichen Oberflächen aufgezeichnet (Kapitel 2.2.4, Abbildung 2.2 c und d). Um die adsorbierten, bakteriellen Proteine (a bzw. b) zu identifizieren, wurden die Oberflächen der proteinbeladenen QCM-D Sensorkristalle (c) mit

Trypsin behandelt (e), mittels Zip-Tip[®] (chromatographisches C18-Material in einer Pipettenspitze) die verdauten Peptide angereichert und entsalzt (f) und anschließend mit massenspektrometrischen Analysen (g) untersucht.

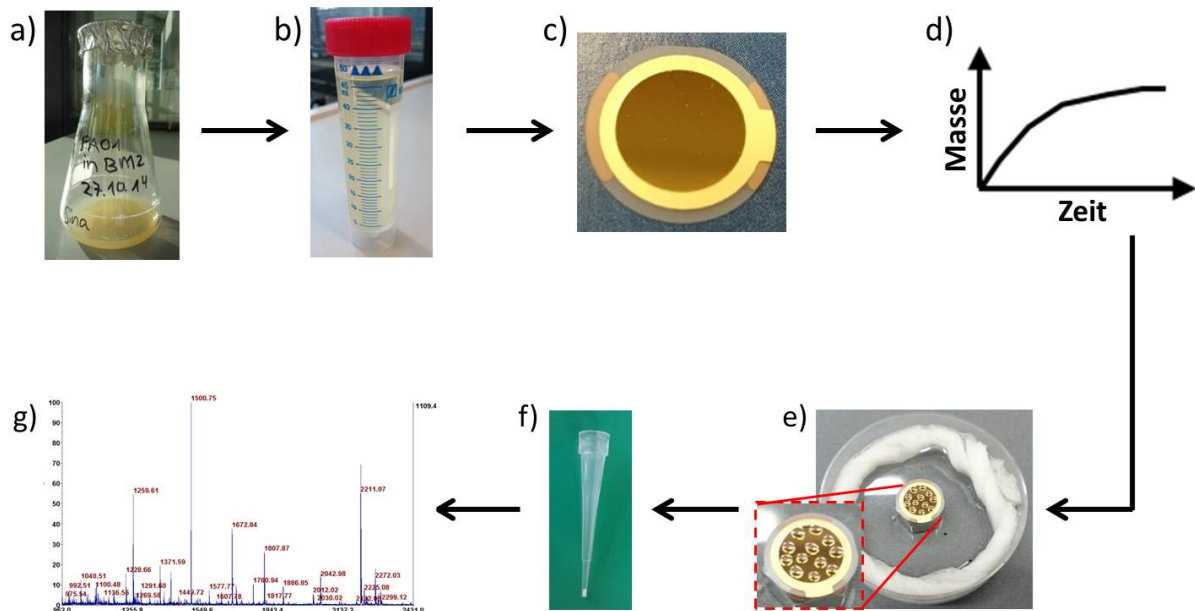


Abbildung 2.2: Versuchsablauf für die Identifizierung adsorbierter bakterieller Proteine. Bakterienkultur (24 h) im Schüttelkolben (a), steril filtrierter Überstand der Bakterienkultur (b), QCM-D Adsorptionsmessung (c), Auswertung des QCM-D Versuchs (d), tryptischer Verdau der Proteine auf dem QCM-D Sensor (e), Peptidanreicherung (f) und Aufnahme der Peptidspektren mittels MALDI-TOF/MS und MS/MS (g).

Hierfür wurde der pH-Wert einer Trypsin-Stocklösung (200 ng/ μ l in 1 mM AcOH) durch Verdünnen der Lösung mit 10 mM NH_4HCO_3 (Verhältnis 1:3) auf ein pH-Wert-Optimum von 8-9 eingestellt. Anschließend wurden je 10 μ l der Trypsin-Lösung auf die mit Proteinen beladenen QCM-D Kristalle aufgebracht und mehrmals auf der gesamten Chipoberfläche hoch und runter pipettiert. Die Trypsin-Lösung wurde als einzelne kleine Tropfen auf der Chipoberfläche verteilt und über Nacht bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert (Kirschhöfer et al., 2013) (Abbildung 2.2 e, Vergrößerung). Trypsin verdaut die adsorbierten Proteine und schneidet spezifisch an den Lysin- und Arginin-Seitenketten.

Am nächsten Tag wurden die verdauten Peptide mittels eines Zip-Tip[®]-Verfahrens angereichert und entsalzt (Abbildung 2.2 f). Hierzu wurde zu Beginn das chromatographische C18-Säulenmaterial in der Pipettenspitze wie vom Hersteller beschrieben luftblasenfrei konditioniert. Begonnen wurde mit 10 μ l ACN, gefolgt von 10 μ l 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) in 50 % ACN und 10 μ l 0,1 % TFA. Anschließend wurden die verdauten Peptide von den Chipoberflächen langsam durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren der gesamten Lösung in die Säule aufgenommen. Wasserlösliche Salze binden nicht an der Säule und verbleiben in der Flüssigkeit. Die Peptide wurden mit 2 μ l einer MALDI-Matrix, bestehend aus 10 mg/ml CHCA in ACN:Milli-Q[®]-H₂O (7:3) und 0,1 % TFA, direkt auf eine MALDI-Platte eluiert und mit Stickstoff getrocknet.

MALDI-ToF/MS- und MS/MS-Experimente wurden mit einem 4 800 MALDI-ToF/ToF-Massenspektrometer (Applied Biosystems/MDS SCIEX), ausgestattet mit einem gepulsten Nd:YAG Laser (355 nm Wellenlänge und 200 Hz Wiederholungsrate), der Explorer Software 4 000 und der Software Data Explorer durchgeführt. Die MS-Spektren wurden im positiven Reflektormodus (Fokusmasse 1 200 bzw. 1 500 Da) aufgenommen. Jedes Massespektrum bestand aus durchschnittlich 1 000 zufällig über die Spotfläche verteilten Subspektren. Die Laserintensität betrug 3 400 und das Massenspektrum wurde im Bereich von 800 - 4 000 m/z aufgenommen.

Um eine hohe Massengenauigkeit zu erhalten, wurden 0,5 µl einer Kalibrationslösung, bestehend aus des-Arg-Bradykinin (m/z = 904,47 Da), Angiotensin I (m/z = 1 296,69 Da), Glu-Fibrinopeptid B (m/z = 1 570,68 Da), ACTH clip 1 - 17 (m/z = 2 093,09 Da) und ACTH clip 18 - 39 (m/z = 2 465,20 Da) in CHCA-Lösung auf die MALDI-Platte aufgetragen und mit Stickstoff getrocknet. Nach jeder Probe wurde eine Kalibrationsprobe gemessen. Für das MS/MS-Spektrum wurde das Fenster auf 50 *full-width half-maximum* relativ zur *Precursormasse* des Peptids eingestellt. MS/MS-Spektren wurden aus durchschnittlich 1 000 - 2 500 zufällig über die Spotfläche verteilten Subspektren akkumuliert.

Die gefundenen Proteine in der ersten *peptid mass fingerprint*-basierten Datenbanksuche wurden verwendet, um eine Subdatenbank zu erstellen, die nur Proteine beinhaltet, die in allen der drei Replikaten gefunden wurden. Eine zweite Datenbanksuche unter Verwendung der Subdatenbank und der ASCII-Dateien der Spektren machte es möglich, die Zielmassen für die MS/MS-Experimente zu identifizieren. Vier Peptidmassen pro Protein mit einer Toleranz von 0,2 Da wurden dabei als Verifikationskriterium gewählt. In einer dritten Datenbankauswertung wurden die Peaklisten der erhaltenen MS/MS-Spektren mit theoretischen MS/MS-Fragmentmassen der vermuteten Peptide verglichen, um deren Zuordnung in den vorausgegangenen Schritten zu verifizieren. Die Ergebnisse der MS- und MS/MS-Messungen wurden in einem *Score* vereint, um die Proteine nach der Wahrscheinlichkeit ihrer korrekten Identifizierung zu sortieren.

2.2.6 Herstellung von PLGA-basierten Janus-Partikeln

Zur Partikelherstellung wurden die biologisch abbaubaren Polymere PLGA 85-15 (Molekulargewicht 50 - 75 kDa), PLGA 5004A (Molekulargewicht 40 kDa) und PLGA 5002A (Molekulargewicht 17 kDa) verwendet. Allgemein können eine Vielzahl an PLA und deren Copolymere, mit verschiedenen Lactid-Glycolid-Zusammensetzungen und Molekulargewichten, eingesetzt werden.

EHD *co-jetting* ist ein spezielles Herstellungsverfahren, mit dem Partikel, bestehend aus verschiedenen Kompartimenten, erzeugt werden können. Diese wurden in der hier vorliegenden Arbeit im gleichen Verfahrensschritt mit einem oder mehreren Wirkstoffen in komplett voneinander getrennten Hemisphären beladen. Die Methode wurde ursprünglich im Patent US 20060201390 A1 beschrieben (Lahann et al., 2006).

In zuvor durchgeführten Testreihen wurde ein für die Polymere und Wirkstoffe geeignetes Lösungsmittelsystem ermittelt und ein entsprechendes Herstellungsprotokoll etabliert. Anschließend wurde die maximal lösliche Menge der einzelnen Wirkstoffe in den eingesetzten

Polymer-Lösungsmittel-Systemen untersucht. Zur Partikelsynthese wurden 4 % Polymer (w/v) und 20 Gew.-% des entsprechenden Wirkstoffes (Berechnung nach Gleichung 2.4) in einem 1:1 Verhältnis aus Dimethylformamid (DMF) und Chloroform (CHCl_3 , mit oder ohne Fluoreszenzfarbstoff) gelöst.

$$\text{Gewichtsprozent} = \frac{\text{Wirkstoffmenge}}{\text{Wirkstoffmenge} + \text{Polymermenge}} \cdot 100 \quad (2.4)$$

Zur bildlichen Darstellung der Kompartimentierung wurden unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, Poly[(m-phenylenevinylene)-alt-(2,5-dihexyloxy-p-phenylenevinylene)] (blau) oder Poly(9,9-dioctylfluorene-alt-benzothiadiazole) (grün), in die separaten Hemisphären der Partikel eingelagert. Die Konzentration der Fluoreszenzfarbstoffe betrug 0,05 mg/ml in Chloroform. Diese Lösung wurde für 2 h im eisgekühlten Ultraschallbad gelöst, mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,45 μm) gefiltert und bei RT dunkel und luftdicht in einem Glasgefäß aufbewahrt.

Das Polymer-Wirkstoff-Lösungsmittelgemisch wurde für mindestens 20 min bei RT unter Lichtausschluss geschüttelt, bis eine klare, viskose Lösung entstanden ist. Diese wurden mit Hilfe einer Spritzenpumpe, wie in Abbildung 2.3 dargestellt, mit 0,2 ml/min durch die Nadeln gedrückt (Nadelinnendurchmesser 0,26 mm). Der Abstand der Nadelspitzen zum Edelstahltablett betrug 25 - 45 cm. Es wurde eine positive Spannung im Bereich von 8 - 20 kV zwischen den Nadeln und dem Edelstahltablett angelegt.

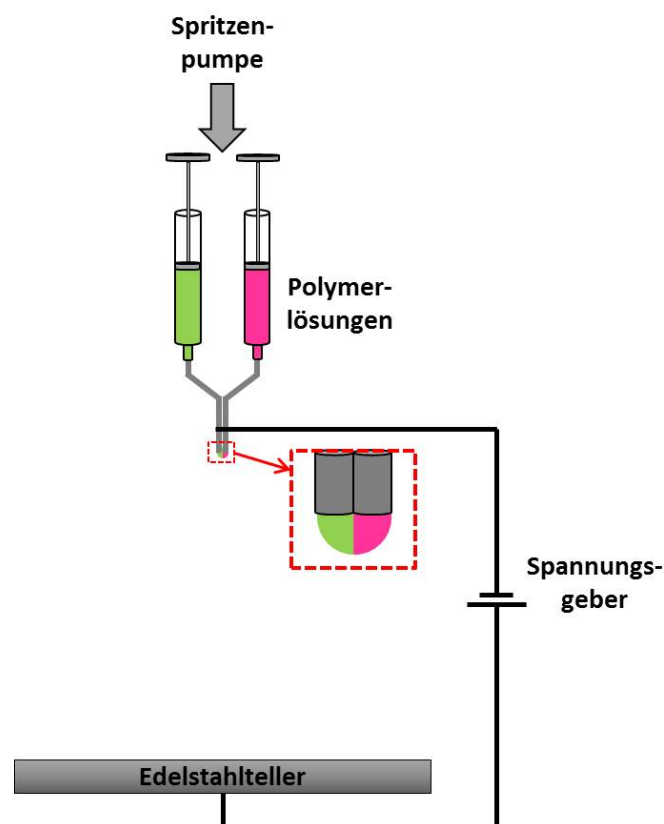


Abbildung 2.3: Schema EHD co-jetting für einen Partikel mit zwei Kompartimenten

PLGA 85-15 wurde in den Kompartimenten, in denen Acetylcystein (ACC; Mukolytikum), Aztreonam (AZT; Antibiotikum), Ibuprofen (IBU; Antiphlogistikum) und Itraconazol (ICZ; Antimykotikum) eingelagert wurde, verwendet. PLGA 5004A und PLGA 5002A wurden zu Testzwecken in dem Kompartiment verwendet, in welches ACC eingelagert wurde, um das auf dem Molekulargewicht basierende, eventuell veränderte Freisetzungverhalten und die daraus entstehende Partikelfunktionalisierung zu untersuchen. Zu Versuchszwecken wurden Partikel mit zwei Kompartimenten und derselben Wirkstoffbeladung in beiden Kompartimenten, sowie unterschiedlicher Wirkstoffbeladung in beiden Kompartimenten hergestellt (Tabelle 2.14).

Tabelle 2.14: Partikelzusammensetzung

Polymer	Wirkstoffbeladung Kompartiment I	Wirkstoffbeladung Kompartiment II
PLGA 85-15 (50-75 kDa*)	ohne Beladung	ohne Beladung
	ACC	ACC
	AZT	AZT
	IBU	IBU
	ICZ	ICZ
	ACC	AZT
	AZT	IBU
PLGA 5004A (40 kDa*)	IBU	ACC
	ACC	ACC
PLGA 5002A (17 kDa*)	ACC	ACC

*Molekulargewicht der eingesetzten Polymere

Die Partikel wurden während des Herstellungsprozesses auf Edelstahl, Silizium oder Glasoberflächen aufgebracht und anschließend für zwei Wochen dunkel bei RT unter Vakuum getrocknet, um enthaltene Lösemittelreste zu entfernen. Sie wurden anschließend mit Plastikschabern trocken in Glasgefäße abgenommen, mit Argon geflutet, luftdicht verschlossen und mittels einer Gamma-Quelle für 24 h sterilisiert. Bis zur Verwendung wurden sie unter Argonatmosphäre bei 4°C gelagert.

2.2.7 Chemische und physikalische Charakterisierung von wirkstoffbeladenen Janus-Partikeln

2.2.7.1 Mikroskopische Analyse der Partikel

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die auf Siliziumoberflächen aufgebracht und unter Vakuum getrockneten Proben wurden auf einer REM-Halterung aus Aluminium fixiert und wie unter 2.2.1.5 beschrieben mit einer dünnen elektronenleitenden Schicht aus Gold-Palladium bedampft. Die Aufnahmen wurden mit dem LEO Gemini 1530 (Zeiss) mit Feldemissionsquelle unter Verwendung des InLens Detektors mit einem Arbeitsabstand von 1,5-1,7 mm und 15 kV Beschleunigungsspannung gemacht.

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die auf Objektträger oder Glasplättchen aufgebracht und getrockneten Partikel wurden am konfokalen Fluoreszenzmikroskop auf ihre Kompartimentierung und Morphologie untersucht. Die Aufnahmen wurden mit einem TCS SP5 von Leica und einem 63× oder 100× Immersionsöl-Objektiv gemacht. Ein Argonlaser bei 488 nm Anregungswellenlänge und einer Laserleistung von 50-70 % wurde für die Anregung der grünen Fluoreszenz eingesetzt. Die blaue Fluoreszenz wurde von einem UV-Laser bei 405 nm Anregungswellenlänge mit einer Laserleistung von 50-70 % angeregt und bei einer Emissionsbandbreite von 529-616 nm gemessen. Zur Verbesserung der Aufnahmequalität wurde der Notchfilter 488/561/633 verwendet. Die Aufnahmen wurden mit der Leica Software LAS AF 2.1 aufgenommen und bearbeitet.

Structured Illumination Microscopy (SIM)

Die Partikel wurden auf Objektträger in Mowiol eingebettet. Die Aufnahmen wurden mit einem Elyra PS.1-Prototyp, welches für hochauflösende Aufnahmen geeignet ist, von Kai Weißenbruch am Zoologischen Institut des KITs durchgeführt. Für die Aufnahmen wurde ein Plan Achromat 63×/1.4 Ölimmersions-Objektiv verwendet. Das Gitter für die strukturierte Beleuchtung wurde dreimal rotiert und pro Rotation in fünf Phasen verschoben. Eingelagerte Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit Lasern der Wellenlänge 405 nm und 488 nm angeregt. Die entstandenen 15 Rohbilder wurden unter Verwendung der Software ZEN black (Zeiss, Oberkochen) zu einem hochaufgelösten Bild verrechnet.

2.2.7.2 Ermittlung der Partikelgröße mittels ImageJ

Die Partikelgröße und Größenverteilung wurde mit der frei verfügbaren Software ImageJ (Wayne Rasband; National Institutes of Health) analysiert. Die mit dem Rasterelektronenmikroskop aufgenommenen Bilder wurden in ImageJ geladen. Die Größenskalierung wurde vom Messbalken auf das Bild übertragen. Anschließend wurde der Hintergrund (Staub und sehr kleine Partikel) mittels der Funktion *erode* und *dilate* abgezogen. Die Bilder wurden zur Maske übertragen und die *watershed* Funktion genutzt, um sich berührende Partikel voneinander abzugrenzen. Nach dieser Vorbereitung waren die Aufnahmen bereit für die automatisierte Partikelgrößen- und Größenverteilungs-Analyse. Hierbei wurden die Konturen (*outlines*) der Partikel zur Evaluation verwendet. Die Längen- und Breiten-Verteilung sowie die *roundness* der Partikel (Gleichung 2.5), wurde automatisiert in Balkendiagrammen dargestellt.

$$roundness = 4 \cdot \frac{[Fläche]}{\pi \cdot [Länge]^2} \quad (2.5)$$

2.2.7.3 Messung der Wirkstofffreisetzungsraten

Die Wirkstofffreisetzung aus den Partikeln wurde mittels Dialyse und anschließender Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC)

gemessen. Hierzu wurden die Dialyseschläuche, wie vom Hersteller beschrieben, vorbereitet, um die maximale Durchlässigkeit der Membran zu erreichen und das in der Membran sitzende Glycerin zu entfernen. Die Dialyseschläuche wurden zunächst für 10 min mit 10 % Isopropanol in dH₂O angefeuchtet und anschließend mit dH₂O für 15-20 min gewaschen. Zum Schluss wurde die Membran nochmal mit dH₂O gespült, bevor sie mit sterilem PBS-Puffer (0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4) konditioniert wurde. In jeden Dialyseschlauch (durchlässige Molekulargröße 100 kDa) wurden 10-20 mg der Partikel bzw. 0,4 mg ACC mit 5 ml sterilem PBS befüllt und geschlossen. Der Dialyseschlauch wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 40 ml sterilem PBS gegeben und 96 h bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten (0,5 h, 1 h, 2 h, 6 h, 18 h, 24 h, 48 h) wurde der Dialyseschlauch in ein neues Zentrifugenröhrchen mit 40 ml sterilem PBS überführt. Die den Dialyseschlauch umgebende Flüssigkeit wurde nach jeder Entnahme des Schlauches direkt und ohne weitere Vorbereitungsschritte mit der HPLC (Agilent System 1100 Serie) gemessen. Dieses HPLC-System bestand aus einer binären Pumpe mit Online-Entgaser, einem Autosampler und einem UV/Vis Diodenarray-Detektor (DAD). Es wurden bei RT 30 µl der Probe in eine LiChrospher-Säule injiziert. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 ml pro min. Die mobile Phase bestand aus (A) MeOH und (B) H₃PO₄ (0,025 mol in Milli-Q[®]-H₂O; mit Helium entgast). Die chromatografische Trennung von ACC, AZT und IBU erfolgte mit folgendem Gradienten-Programm, welches speziell für diese Proben etabliert wurde: 0-20 min, linearer Gradient von 80 zu 10 % (B); 21-30 min, isokratisch bei 10 % (B), gefolgt von 20 min linearem Gradient von 10 zu 80 % (B). Die letzten 20 min dienen in jedem Lauf zur Stabilisierung der mobilen Phase sowie zur Gewährleistung der initialen Bedingungen. Mittels des DAD wurden die Signale bei 215 nm für ACC mit 6 min Retentionszeit, 254 nm für AZT mit 12,5 min Retentionszeit und 230 nm für IBU mit 25,5 min Retentionszeit aufgenommen. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software ChemStation (Agilent). Mit Hilfe einer Drei-Punkt-Kalibration (Konzentrationen der Standards: 5, 10 und 50 ppm) wurde die freigesetzte Menge jedes Wirkstoffes berechnet. Zudem wurde die Haltbarkeit der Proben bei RT, 4 und -18 °C über eine maximale Lagerzeit von 7 Tagen überprüft.

2.2.8 Biologische Charakterisierung der mit Wirkstoffen beladenen Partikel *in vitro*

In den folgenden Abschnitten ist die Testung der Partikel in Interaktion mit Bakterien, Pilzen und humanen Zellen beschrieben.

2.2.8.1 Hemmhoftests

In sogenannten „Hemmhoftests“ wurde die antibiotische bzw. antimykotische Wirksamkeit der wirkstoffbeladenen Partikel in Interaktion mit Bakterien bzw. Pilzen untersucht.

Vorbereitung der Bakterien- und Partikellösung

Für diese Untersuchungen wurde der *P. aeruginosa*-Wildtyp sowie die klinischen *P. aeruginosa*-Isolate, isoliert aus dem Bronchialsekret von CF-Patienten, verwendet. Die Kultivierung der

Bakterienstämme erfolgte auf LB-Agar oder in LB-Flüssigmedium bei 37°C. Die Übernachtskulturen wurden auf eine OD von 0,1 in frischem LB-Medium verdünnt und je 100 µl der Suspension wurden mit Hilfe von sterilen Glaskugeln auf LB-Agarplatten ausplattiert. 10 µl der Partikellösung (1 mg/ml und 2 mg/ml in sterilem VE-H₂O) oder der freie Wirkstoff (0,25, 0,5 und 1 mg/ml in sterilem VE-H₂O) bzw. steriles VE-H₂O (als Kontrolle) wurden auf markierte Bereiche der Agarplatte aufgetropft. Nach einer 24 h- und 48 h-Inkubation bei 37°C wurden die Hemmhöfe fotografiert, ausgemessen und statistisch ausgewertet (Anzahl unabhängiger Versuche ≥ 5).

Vorbereitung der Pilzsporen- und Partikellösung

A. nidulans-Sporen (FGSCA4 und TN02A3) wurden in 1 ml YAG-Flüssigmedium suspendiert und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Sporensuspension wurde mit frischem YAG-Medium 1:10 verdünnt und die Sporenanzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Es wurde eine Sporenlösung mit 10⁵ Sporen je 100 µl YAG-Flüssigmedium angesetzt und auf YAG-Agarplatten mit Glaskugeln ausplattiert. ICZ wurde aufgrund seiner sehr schlechten Wasserlöslichkeit zuerst in DMSO (5 g/l; (D'Auria et al., 1994)) gelöst und dann in sterilem VE-H₂O (Endkonzentration 25, 50 oder 200 µg/ml) verdünnt. Die Partikellösungen wurden genauso behandelt. Es wurden 10 µl der Partikellösung (Konzentration 1 mg/ml), der freie Wirkstoff, steriles VE-H₂O oder eine DMSO-VE-H₂O-Mischung (als Kontrolle) auf die markierten Bereiche der Agarplatte aufgetropft. Nach 48 h- und 72 h-Inkubation bei 37°C wurden die Hemmhöfe ausgemessen, statistisch ausgewertet und durch Fotoaufnahmen dokumentiert (Mindestanzahl unabhängiger Versuche, $n \geq 5$).

2.2.8.2 Allgemeine Zellkulturtechnik

Das in diesem Kapitel beschriebene human-biologische Material wurde unter Einhaltung der geltenden Gesetze und ethischen Konventionen am Universitätsklinikum Würzburg, Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie (Professor Dr. med. Thorsten Walles), entnommen. Primäre, respiratorische Epithelzellen und Fibroblasten wurden mit Einverständnis der Patienten aus OP-Biopsaten der Trachea am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg isoliert. Für die Isolierung von Primärzellen liegt eine Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Würzburg vor (Votum 182/10).

Steriler Arbeitsplatz

Alle sterilen Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank der Stufe II, mit kontinuierlichem, laminarem Luftstrom durchgeführt. Durch diesen wurde eine keimfreie Umgebung geschaffen und Kontaminationen der Zellkultur vermindert. Verwendete Medien und Puffer wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt und die Flaschen mittels Sprühdesinfektion mit Descosept AF desinfiziert, bevor sie unter der Sicherheitswerkbank geöffnet wurden. Des Weiteren wurden Oberflächen und andere Materialien vor und nach den Arbeiten mit Descosept AF sprühdesinfiziert. Alle Zelltypen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Regelmäßige Kontrollen auf Sterilität wurden durch mikroskopische Durchsicht der Zellkulturen und der Überstände

durchgeführt. Zur Kontrolle des Überstandes wurden 0,5- 1 ml des zu testenden Mediums in eine 24-Wellplatte überführt, über Nacht im Brutschrank inkubiert und am Folgetag lichtmikroskopisch auf Kontaminationen (Bakterien und Pilze) untersucht. Die Zellkulturen wurden des Weiteren regelmäßig auf Mycoplasmen getestet.

Zellisolation primärer Zellen aus humanen Biopsien

Respiratorische Epithelzellen und Fibroblasten wurden aus Trachea-Resektaten isoliert (Zellisolation), vermehrt (Zellexpansion) und für die 3D-*in vitro*-Gewebeherstellung eingesetzt. Die Resektate wurden in der Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg operativ entnommen, in Zentrifugenröhrchen mit AECG-Medium 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) überführt und bei 4°C gekühlt an den Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin verschickt. Die Resektate wurden innerhalb von 24 h, spätestens 48 h nach der Entnahme, für die Zellisolation verwendet.

Zu Beginn wurde das Transportmedium vorsichtig abgesaugt und das Resektat mit frischem AECG-Medium (1 % Pen/Strep) gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe in eine sterile Petrischale überführt und mit einem Skalpell und Pinzette Blut, Knorpel und Fett entfernt. Daraufhin wurde das Gewebe in kleine Stücke geschnitten und mit 3-4 Tropfen warmem AECG-Medium pro Stück betropft. Die Petrischale wurde geschlossen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Wichtig war, dass die Gewebestücke den Boden der Petrischale berührten. Am nächsten Tag wurde frisches AECG-Medium zugegeben, so dass gerade der Boden der Petrischale bedeckt war. Nach ca. 2-3 Tagen Inkubation wuchsen die Epithelzellen aus. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Nach 5-7 Tagen wurden die Gewebestücke für die Fibroblastenisolation entnommen und in eine neue sterile Petrischale überführt. Die Stücke wurden dreimal mit PBS⁺ gewaschen und es wurden 10 ml PBS⁻ zugegeben. Anschließend wurden die Gewebestücke mittels eines Skalpells in sehr kleine Stücke geschnitten und in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Kollagenase überführt. Die Petrischale wurde mit 5 ml Kollagenase ausgewaschen und diese Lösung wurde ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Gewebestücke wurden, nach einer 45-minütigen Inkubation bei 37°C, für 5 min bei 1 200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 10 ml Fibroblastenmedium (DMEM) gewaschen und erneut für 5 min bei 1 200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, das Pellet in DMEM resuspendiert, in eine Zellkulturflasche ausgesät und bei 37°C inkubiert. Das DMEM Volumen und die Größe der Zellkulturflasche war abhängig von der Pelletgröße. Der Boden der Zellkulturflasche war von Medium bedeckt, jedoch schwammen die kleinen Gewebestücke nicht auf. Die Gewebestücke wurden erst nach Auswachsen der Fibroblasten entfernt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage vorsichtig gewechselt.

Da bei dieser Art der Zellgewinnung oft ein Mangel an Primärzellen herrscht, wurde unter anderem auch die Calu-3 Zelllinie, ursprünglich aus einem humanen Lungenkarzinom, für die folgenden 3D-Gewebemodelle eingesetzt.

Ablösen, Passagieren und Kultivieren von humanen Zellen

Tracheobronchiale Epithelzellen und Fibroblasten sowie Calu-3 Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80 % passagiert. Hierzu wurden die Zellen mikroskopisch auf typische Kriterien wie Morphologie, Zelldichte und Kontaminationen überprüft. Die benötigten

Lösungen wurden temperiert bei 37°C verwendet. Zu Beginn wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS⁻/EDTA gespült und anschließend die Lösung erneut abgesaugt. Die Epithel- und Calu-3 Zellen wurden mit 5 ml PBS⁻/EDTA bei 37°C für 10 min vorinkubiert und die Lösung erneut abgesaugt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, wenn die Zellen noch nicht von der Zellkulturflasche abgelöst waren. Zum Ablösen der Zellen wurde allen Zelltypen 5 ml Ablösepuffer (Trypsin-PBS⁻/EDTA) zugegeben und die Zellen für 3 bis maximal 5 min bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop zu verschiedenen Zeitpunkten kontrolliert und durch Klopfen an der Zellkulturflasche unterstützt. Die Enzymreaktion des Trypsins wurde durch die Zugabe von 1 ml FKS gestoppt. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellkulturflasche wurde erneut mit 10 ml PBS⁻/EDTA gespült und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1 200 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde in 2 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen und gut resuspendiert (Volumen der Zellsuspension, $V_{ZS} = 2$ ml). Davon wurden 20 µl mit 20 µl Trypanblau gemischt (Verdünnungsfaktor Trypanblau, $f_V = 2$) und für 2 min inkubiert. 10 µl dieses Probengemisches wurden in die Neubauer-Zählkammer (Kammerfaktor, $f_K = 10\,000$) gegeben. Trypanblau färbt tote Zellen blau, lebende Zellen hingegen werden nicht angefärbt. Die ungefärbten Zellen wurden unter dem Mikroskop in allen vier Quadranten ausgezählt und der Mittelwert gebildet (Mittelwert der lebende Zellen, (\bar{n}_K)). Mit Gleichung 2.6 wurde die Gesamtzellzahl (n_Z) der Ausgangssuspension berechnet.

$$n_Z = \bar{n}_K \cdot f_K \cdot f_V \cdot V_{ZS} \quad (2.6)$$

Das zellspezifische Medium wurde in die neue Zellkulturflasche vorgelegt und die gewünschte Zellzahl ausgesät. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Die Fibroblasten wurden maximal bis Passage 8, die Epithelzellen bis Passage 4 für den Aufbau der 3D-*in vitro*-Testsysteme der Atemwegsschleimhaut eingesetzt. Die Calu-3 Zelllinie wurde unabhängig von der Passagezahl eingesetzt.

Zellen einfrieren und auftauen

Die Zellen wurden wie oben beschrieben abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl wurde auf mindestens 1 Mio. Zellen pro ml kaltes zellspezifisches Medium eingestellt. Es wurden 10 % DMSO und 10 % FKS zu der Zellsuspension zugegeben und je 1 ml pro Kryoröhrchen aliquotiert. Die Kryoröhrchen wurden in einen Einfrier-Container (Mr. Frosty™; Kühlrate von ca. 1°C/min) einsortiert, welcher bei -80°C über Nacht bei -80°C gelagert wurde. Anschließend wurden die Röhrchen aus Mr. Frosty™ entnommen und in Tanks mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Röhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde anschließend sofort in ein mit 10 ml warmen Medium gefüllten Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen, in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (75 cm²) ausgesät. Aufgrund der zellschädigenden Wirkung von DMSO wurde das Medium nach 24 h gewechselt.

2.2.8.3 Untersuchung und Nachweis von Janus-Partikeln auf 2D-Zellkulturen

Diese Versuche dienten als Vorversuche zur ersten Abschätzung der Interaktion zwischen humanen Zellen und den Janus-Partikeln. Des Weiteren wurde getestet, ob die Partikel nach den folgenden Fixier- und Färbeschritten nachweisbar sind. Die Fibroblasten, Calu-3 oder Epithelzellen wurden wie oben beschrieben abgelöst und mit einer Zelldichte von 50 000 bzw. 100 000 Zellen pro 500 μ l in eine Vertiefung des 4-*well-chamber slides* ausgesät. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50-60 % im Brutschrank kultiviert, was meistens nach 24 oder 48 h erreicht war. Die Partikel wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (0,5, 1 und 2 mg/ml) in zellspezifischem Medium suspendiert und für 2 h bzw. 4 h mit den Fibroblasten, Calu-3 oder Epithelzellen inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und jede Kammer mit 1 ml PBS⁻ gespült. Daraufhin wurde ein eisgekühltes Ethanol-Aceton-Gemisch (1:1) oder Paraformaldehyd (PFA) in die Kammern gegeben und für 10 min bei geschlossenem Deckel inkubiert. Die Lösungen wurden daraufhin abgekippt und die *chamber slides* unter dem Abzug ausgedampft. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur histologischen Auswertung mit Deckel bei -20 °C. Für die histologische Auswertung wurden die Kammern mit PBS⁻, 0,2 % Triton X-100 in PBS⁻ und 0,5 ml Waschpuffer pro Kammer für je 5 min gewaschen. Anschließend wurde die Oberfläche mit 0,5 ml Blockierlösung gesättigt, nochmals in Waschpuffer gewaschen, die Kammern vorsichtig vom Objektträger entfernt und mit Mowiol-DAPI eingedeckt. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

2.2.8.4 Aufbau von 3D-*in vitro*-Testsystemen der Atemwegsschleimhaut

Die Hauptkomponenten von Atemwegsschleimhaut-Gewebemodellen sind Bindegewebe, Fibroblasten und respiratorisches Epithel. Zum Aufbau des Testsystems wurde am Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM, Würzburg) weiblichen, etwa sieben Wochen alten Hausschweinen mit 17-20 kg Körpergewicht operativ der Leerdarm (Jejunum) entnommen. Die Schweine wurden nach den Richtlinien des NIH (*Guide for the care and use of laboratory animals*, (Garber et al., 2011)) gehalten und aufgezogen. Ihnen wurde am Tag der Operation zuerst Heparin gespritzt und im Anschluss wurden sie durch Injektion von T-61 eingeschläfert. Die entnommenen Darmstücke wurden in PBS⁻ mit 1 % (v/v) Pen/Strep bei 4 °C für maximal einen Tag gelagert, unter standardisierten Bedingungen gespült, azellularisiert, sterilisiert (BioVaSc-TERM[®]) und dient als 3D Trägerstruktur (*small intestine submucosa*; SIS-Matrix) (Schweinlin et al., 2016). Zur Rebesiedelung wurde der SIS-Matrix die Serosa (äußerste Schicht der Darmwand) abpräpariert und die Matrix mit dieser Seite apikal in sogenannte Zellkronen eingespannt. Diese bestanden aus zwei ineinander steckbaren Metallringe, wobei der größere, äußere Ring Füßchen hatte. Dadurch wurde ein Spalt zur 6-*well*-Platte gewährleistet und die Zellen hierdurch basal mit zellspezifischem Medium versorgt.

Die eingespannte Matrix wurde zu Beginn für 2 h mit Fibroblastenmedium (DMEM + 10 % FKS) bei 37 °C äquilibriert. Nach dieser Zeit wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abgesaugt und die Matrix apikal mit 50 000 humanen respiratorischen Fibroblasten

pro 500 μ l DMEM besiedelt. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurden 1,5 ml DMEM je Zellkrone basal und luftblasenfrei zugegeben und unter den gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium basal abgesaugt und 250 000 primäre, respiratorische Epithelzellen (hTEC) oder 30 000 Calu-3 Zellen oder eine Mischung aus beiden Zellarten (220 000 Epithel- und 30 000 Calu-3 Zellen) pro 500 μ l in zellspezifischem Medium bzw. Mischmedium (1:1) apikal ausgesät. Es wurden pro Zellkrone 3 ml des zellspezifischen Mediums basal zugegeben. Am darauffolgenden Tag, welcher als Tag „0“ bezeichnet wird, wurden 500 μ l Mischmedium apikal zugegeben. An Tag 1 wurde das Medium apikal sowie basal abgesaugt und 3 ml Mischmedium basal zugegeben. Die Modelle wurden für 21 Tage unter *airlift*-Bedingungen, d. h. apikal an Luft, kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage basal gewechselt und einmal die Woche die Zelloberfläche apikal mit Mischmedium gewaschen, um tote Zellen und Abbauprodukte zu entfernen und um den Zellen den Anreiz von Luft zu geben. Eine nicht besiedelte Matrix wurde als Kontrolle mitgeführt. Sterilkontrollen des basalen Mediums wurden ebenfalls wöchentlich durchgeführt. In der drei- bis vierwöchigen Inkubation bei 37°C unter *airlift*-Bedingungen fand die Zelldifferenzierung und die Reifung des 3D-Modells statt (Schweinlin et al., 2016).

2.2.8.5 Vorbereitung der Partikel, deren Inkubation mit den 3D-Modellen und die Fixierung

Die sterilisierten und getrockneten Partikel (Abschnitt 2.2.6 und Tabelle 2.14) wurden in zellspezifischem Medium suspendiert (1 bzw. 2 mg/ml) und gut gemischt. Die Zellen in den *chamber slides*, die 3D-Gewebemodelle oder die Stücke der Bronchusbiopsate wurden mit den Partikelsuspensionen oder den freien Wirkstoffen im entsprechenden Zellkulturmedium für 2 bzw. 4 h bei 37°C apikal inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Modelle zur Entfernung des Zellkulturmediums dreimal mit PBS⁻ vorsichtig gespült und anschließend für die ultrastrukturelle Analyse oder das Einparaffinieren vorbereitet.

Die 3D-Modelle, welche mit der Hochgeschwindigkeitskamera untersucht wurden, wurden anschließend für die ultrastrukturelle Untersuchung fixiert. Für die ultrastrukturelle Analyse mittels TEM und REM wurden die ausgewählten 3D-Gewebemodelle zur Fixierung über Nacht bei 4°C in 5 ml Glutaraldehyd-basierten Puffer gelagert (TEM Kapitel 2.2.8.6). Die restlichen 3D-Gewebemodelle wurden in 4%-igem PFA bzw. in Histofix für 2 h unter dem Abzug fixiert. Nach der Fixierung wurden die Modelle aus den Zellkronen entnommen und auf Leitungswasser-getränktem Filterpapier in Einbettkassetten ausgebreitet. Die Modelle wurden anschließend, wie in Tabelle 2.15 angegeben, in Paraffin eingebettet und für histologische-, immunhistologische- und Immunfluoreszenzfärbungen mit zelltypspezifischen Markern verwendet. Die Stücke des humanen Bronchusbiopsates wurden identisch zu den 3D-Gewebemodellen behandelt. Jedoch wurden die Biopsate aufgrund ihrer Größe für 36-48 h in 4%-igem PFA fixiert.

2.2.8.6 Charakterisierung der 3D-*in vitro*-Testsysteme

Untersuchung des Zilienschlages und des Partikeltransportes

Nach drei Wochen wurden die differenzierten Modelle aus ihren Zellkronen gelöst und in einen umfunktionierten Bioreaktor mittels steriler Stecknadeln aufgespannt (Abbildung 2.4 a). Der Bioreaktor wurde in eine kleine Petrischale mit warmem Zellmedium gelegt und das Modell mikroskopisch ausgewertet (Abbildung 2.4 b).

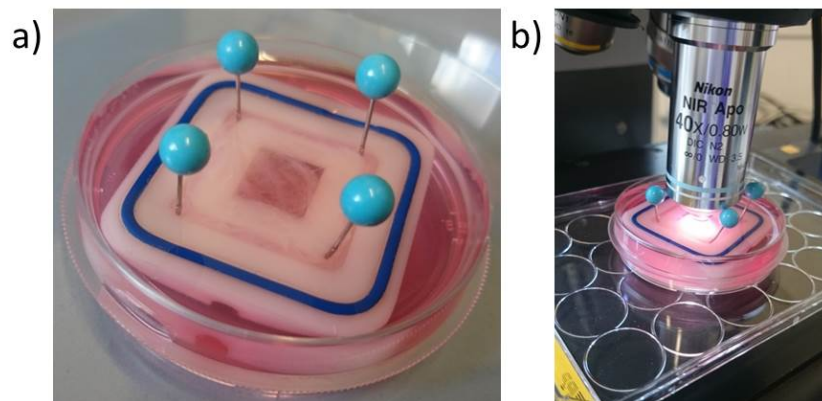


Abbildung 2.4: 3D-Modell der Atemwegsschleimhaut aufgespannt auf der Halterung eines Bioreaktors (a) und unter dem Mikroskop (b).

Es wurden Videoaufnahmen mit einer Hochgeschwindigkeitskamera (Motion Traveller 100, Teledyne DALSA) unter Verwendung eines $40\times$ APO Tauchobjektivs gemacht. 1024 Einzelbilder wurden bei einer Bildrate von 300 Bilder/s und einer Bildgröße von 320×240 Pixel aufgenommen. Die Auswertung dieser Videos erfolgte mittels der freien Software ImageJ und wurde am Biozentrum des Universitätsklinikums Würzburg von Juan Pablo Prada Salcedo durchgeführt. Das aufgenommene Bild wurde in ein Raster unterteilt und es wurde die Gesamtaktivität (*total activity*) in jedem Raster ausgewertet. Stellen mit starker Bewegung wurden in der Übersicht mit großen Kreisen, Stellen mit wenig Bewegung hingegen mit kleinen Kreisen, dargestellt. Die Auswertung eines jeden einzelnen Kreises wurde separat über die Zeit aufgetragen und in der Einzelauswertung analysiert. Es wurde die durchschnittliche Bewegung (*speed of movement*) der Zilien aus den Amplituden über die Zeit berechnet und mit Werten von humanen Bronchusaufnahmen verglichen. Die Modelle wurden anschließend für die ultrastrukturelle Untersuchung mittels TEM und REM, wie nachfolgend beschrieben, fixiert.

TEM-Analyse (ultrastrukturelle Darstellung des Modell-Querschnitts)

Die Proben wurden zunächst in 2,5 % Glutaraldehyd, 2,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl und 50 mM Kakodylsäure, pH 7,2, bei $4^\circ C$ für 12-18 h fixiert und anschließend dreimal mit 50 mM Kakodylsäure, pH 7,2 gewaschen. Die Proben wurden anschließend mit 2 % OsO_4 in 50 mM Kakodylsäure, pH 7,2 bei $4^\circ C$ für 2 h gefärbt, mit Wasser gewaschen und mit 0,5 % wässrigem Uranylacetat bei $4^\circ C$ über Nacht erneut gefärbt. Die Proben wurden nochmals mit Wasser gewaschen, dehydriert und in Epon812 eingebettet. Ultradünnschnitte von

50-70 nm Dicke wurden für 15-20 min mit 2% Uranylacetat in Ethanol und anschließend für 8-10 min mit Bleizitrat nach Reynold nachkontrastiert. Die Aufnahmen wurden mit einem JEM-2100 TEM von JEOL bei 200 kV mit einer 4K Kamera gemacht.

REM Analyse (Visualisierung der Modelloberfläche)

Die Proben wurden zunächst in 2,5% Glutaraldehyd, 2,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl und 50 mM Kakodylsäure, pH 7,2, bei 4°C für 12-18 h fixiert und anschließend dreimal mit 50 mM Kakodylsäure, pH 7,2 gewaschen. Die Proben wurden schrittweise mit Ethanol dehydriert, einer kritischen Punkttrocknung unterzogen und mit einer 10 nm dünnen Schicht Gold-Palladium besputtert. Die Auswertung erfolgte mit einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop unter der Verwendung des SE Detektors bei 5 kV.

Untersuchung von Apoptose- und Entzündungsmarkern

Der M30 ELISA-Test wurde wie im Protokoll „M30 ELISA - Zellkultur: Apoptosebestimmung“ (Anhang B) beschrieben mit basal abgenommenem Überstand durchgeführt. Der IL-6 ELISA wurde wie vom Hersteller beschrieben (Anhang B) ebenfalls mit basal abgenommenem Überstand durchgeführt. Der Überstand wurde für beide Tests in der 2. Woche, sowie in der 4. Woche vor und nach der Partikelinkubation entnommen und bei RT gelagert, wenn die Tests am gleichen Tag durchgeführt wurden. Die Proben wurden innerhalb von 2 Wochen für die Untersuchungen eingesetzt und bis zu diesem Zeitpunkt bei -80°C gelagert. Für den M30 ELISA wurde der Überstand unverdünnt und für den IL-6 ELISA 1:10 und 1:100 verdünnt (in entsprechendem Zellkulturmedium) eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit dem Mikroplatten-Photometer TECAN Infinite® M200. Die Platte wurde zu Beginn 5s mit einer linearen Amplitude von 1 mm geschüttelt, gefolgt von einer anschließenden Wartezeit von 5 min. Die Absorption wurde bei 450 nm mit einer Bandbreite von 9 nm und einer Blitzanzahl von 25 je Probe bei RT gemessen. Für die Auswertung des IL-6 ELISA wurde zusätzlich eine Referenzwellenlänge bei 570 nm mit einer Bandbreite von 9 nm gemessen und von den Messwerten bei 450 nm abgezogen. Es wurden auf jeder Platte interne Standards vom Hersteller mitgeführt.

Qualitativer Nachweis der metabolischen Aktivität der 3D-Gewebemodelle

Die metabolische Aktivität der Zellen in den 3D-Gewebemodellen wurden mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) nachgewiesen. In stoffwechsellaktiven Zellen wird das gelbe Tetrazoliumsalz zu einem purpurnen Formazan reduziert. Um dies zu testen, wurden kleine Stücke der ausdifferenzierten Gewebemodelle in die Vertiefungen einer 24-well-Platte gelegt und 1 ml MTT-Lösung (1 mg/ml MTT; gelöst in entsprechendem Zellkulturmedium) zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurden die Gewebestücke mit PBS⁺ gewaschen und das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

Transport der 3D-Modelle

Die Modelle wurden zu Testzwecken transportiert und 24 h bei RT bzw. im Kühlschrank gelagert. Hierbei wurde das Protokoll „*Transportation of 3D models*“ etabliert (Anhang B). Anschließend wurde die metabolische Aktivität der Zellen mittels MTT-Test untersucht und die Modelle histologisch ausgewertet.

2.2.9 Histologische Analyseverfahren

2.2.9.1 Herstellung von histologischen Dünnschnittpräparaten

Der dreidimensionale Aufbau von biologischen Proben wurde mittels histologischen Methoden näher untersucht und charakterisiert. Hierzu wurden die Proben zuerst fixiert und anschließend Dünnschnittpräparate angefertigt, welche mittels mikroskopischer Verfahren beurteilt wurden.

Viele der eingesetzten Lösungen sind toxisch, daher wurden sämtliche Arbeiten, wenn nicht anders ausgezeichnet, mit entsprechender Schutzausrüstung unter dem Abzug durchgeführt. Viele Arbeitsschritte wurden unter der Einhaltung standardisierter Arbeitsanweisungen (SOPs) durchgeführt, die in Anhang B aufgeführt sind.

Bei der Fixierung mittels PFA bzw. Histofix wurde pro Millimeter Gewebedicke ca. 1 h inkubiert. Die fixierten Proben wurden auf nassem Filterpapier in Einbettkassetten ausgebreitet, 2 h in einem mit Leitungswasser gefüllten Becherglas gewässert und anschließend in den Einbettautomat überführt (Protokoll in Tabelle 2.15). In den ersten Schritten wurde das PFA entfernt und die Probe durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe entwässert. Anschließend wurde zunächst das Ethanol durch Isopropanol, dann das Isopropanol durch Xylol ersetzt. Im letzten Schritt wurden die Proben in 60 °C heißes Paraffin getaucht, wodurch das eingelagerte Xylol verdampfte und das Paraffin in der Probe zurück blieb.

Tabelle 2.15: Protokoll zur Paraffineinbettung von PFA-fixierten Proben mittels Einbettautomaten (Microm STP 120, Thermo Scientific).

Schritt	Lösung	Zeit [Stunden]
1	Leitungswasser I	2
2	Ethanol 50 %	1
3	Ethanol 70 %	1
4	Ethanol 90 %	1
5	Ethanol 96 %	1
6	Isopropanol I 100 %	1
7	Isopropanol II 100 %	1
8	Isopropanol:Xylol; 1:1	1
9	Xylol I	1
10	Xylol II	1
11	Paraffin I	3
12	Paraffin II	3

*Schritt 1 bis 10 finden bei RT, Schritt 11 und 12 bei 60 °C statt.

Die in Paraffin eingebetteten Proben wurden anschließend in Paraffinblöcke gegossen. Hierzu wurden die Einbettkassetten aus dem Einbettautomat entnommen und in den Behälter mit warmem Paraffin der Blockstation überführt (mindestens 15 min). Die Proben wurden nun einzeln aus ihren Einbettkassetten entnommen, mit einer vorgeheizten Pinzette und

Skalpell zwei- bis dreimal der Länge nach durchgeschnitten und mit der Schnittfläche nach unten in eine mit flüssigem Paraffin gefüllte Metallschale gestellt. Der Deckel wurde von der Einbettkassette getrennt, der beschriftete Teil der Kassette auf das noch flüssige Paraffin in der Metallschale gelegt und die Metallschale mit Paraffin aufgefüllt. Der eingegossene und beschriftete Deckel diente als Halterung und benannte die Probe. Nach dem Abkühlen und Aushärten des Paraffins wurden die Proben durch leichtes Klopfen aus den Metallkassetten entnommen, unter Verwendung einer Kühlplatte abgekühlt und mittels eines Schlittenmikrotoms in 3-5 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden in einem 45 °C warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden mit 70-%igem Ethanol und Filterpapier angedrückt und in entsprechende Halterungen bei 37 °C über Nacht getrocknet. Im Anschluss wurden die Präparate bei 60 °C für ca. 1 h entparaffiniert und je nach Färbung rehydriert oder demaskiert.

Im Folgenden sind die durchgeführten Färbungen näher beschrieben. Die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Übersichtsfärbung, bei der die Zellkerne blau und das Zytoplasma sowie die extrazelluläre Matrix rot angefärbt sind (Tabelle 2.16).

Tabelle 2.16: Protokoll für die HE-Färbung.

Schritt	Lösung	Zeit [min]
1	Wärmeschrank 60 °C	60
2	Xylol I	10
3	Xylol II	10
4	Ethanol 96 % I	3 × auf- und abtauchen
5	Ethanol 96 % II	3 × auf- und abtauchen
6	Ethanol 70 %	3 × auf- und abtauchen
7	Ethanol 50 %	3 × auf- und abtauchen
8	VE-H ₂ O	Schwenken, bis keine Turbulenzen mehr sichtbar
9	Hämalaun	8
10	VE-H ₂ O	schwach fließend, bis keine Farbe mehr auswäscht
11	HCl-Alkohol	2 × kurz eintauchen
12	VE-H ₂ O	Spülen
13	Leitungswasser	5
14	Eosin	1
15	VE-H ₂ O	schwach fließend, bis keine Farbe mehr auswäscht
16	Ethanol 70 %	2 × kurz eintauchen
17	Ethanol 96 %	2
18	Isopropanol I	5
19	Isopropanol II	5
20	Xylol I	5
21	Xylol II	5

*Schritt 1 findet bei 60 °C und Schritt 2 bis 21 bei RT statt.

Die Objektträger wurden mit Hilfe einer Pinzette aus dem Xylol entnommen, mit Entellan und einem Deckglas luftblasenfrei eingedeckt und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

Zusätzlich zur HE-Färbung wurden die 3D-Modelle und das humane Bronchusgewebe mit der Alcianblau-Färbung angefärbt. Hierbei sind die Zellkerne rot und die extrazelluläre Matrix des Knorpelgewebes (negativ geladene, sulfatierte Proteoglykane sowie saure, epitheliale Mucine) blau angefärbt (Tabelle 2.17).

Tabelle 2.17: Protokoll für die Alcianblau-Färbung.

Schritt	Lösung	Zeit [min]
1	Wärmeschrank 60 °C	60
2	Xylol I	10
3	Xylol II	10
4	Ethanol 96 % I	3 × auf- und abtauchen
5	Ethanol 96 % II	3 × auf- und abtauchen
6	Ethanol 70 %	3 × auf- und abtauchen
7	Ethanol 50 %	3 × auf- und abtauchen
8	VE-H ₂ O	Schwenken, bis keine Turbulenzen mehr sichtbar
9	3 % Essigsäure	3
10	1 % Alcianblau	30
11	VE-H ₂ O	Spülen
12	Ethanol 70 %	2 × kurz eintauchen
13	Ethanol 96 %	2
14	Isopropanol I	5
15	Isopropanol II	5
16	Xylol I	5
17	Xylol II	5

*Schritt 1 findet bei 60 °C und Schritt 2 bis 17 bei RT statt.

Alle immunhistologischen Färbungen wurden wie im Protokoll „Immunhistologische Färbung mit Meerrettichperoxidase-basiertem Nachweissystem - Immunhistologie“ (Anhang: B) beschrieben durchgeführt. Die Proben für die Anti-β-Tubulin-, Anti-Cytokeratin 5/6 und 18 wurden mit TRIS-EDTA Puffer (pH 9) und alle anderen Färbungen mit Citrat Puffer (pH 6) demaskiert.

Immunfluoreszenzfärbungen wurden wie im Protokoll „Immunfluoreszenz mit Fluorochrom - Immunfluoreszenz“ (Anhang: B) beschrieben durchgeführt. Die Primärantikörper wurden in Blockierlösung bzw. Antikörperverdünnungslösung angesetzt und über Nacht dunkel bei 4 °C inkubiert. Es wurden folgende Marker für spezielle Zelltypen und Strukturen im respiratorischen Epithel verwendet (Tabelle: 2.18).

Tabelle 2.18: Eingesetzte Antikörperverdünnungen und angefärbte Strukturen

Antikörper	Verdünnung	spezifisch angefärbte Struktur
Primärantikörper		
Anti-Vimentin IgG	1:2000	Typ-III Intermediärfilamente (Bestandteil des Zytoskelettes von Fibroblasten)
Anti- β -Tubulin IgG	1:2000	Tubulin (Bestandteil der Röhren des Ziliengerüsts von Epithelzellen)
Anti-Cytokeratin 5/6 IgG	1:200	zelltypspezifische Intermediärfilamente (Basalzellen)
Anti-Cytokeratin 18 IgG	1:100	epithelspezifische Intermediärfilamente (Epithelzellen)
Anti-MUC5AC IgG	1:1000	Glykoproteine (Mucus)
Anti-MUC5B IgG	1:250	Glykoproteine (Mucus)
Anti-IgG	Entsprechend Primärantikörper	Hintergrundsignal des Isotyp-Kontrollantikörper ausschließen
Sekundärantikörper		
Alexa Fluor® 647 IgG	1:400	entsprechend Primärantikörper
Alexa Fluor® 555 IgG	1:400	entsprechend Primärantikörper

Phalloidin Alexa Fluor® 647 isoliert aus *Amanita phalloides* (grüner Knollenblätterpilz) wurde in der Konzentration 1:400 eingesetzt, um F-Aktin selektiv in Gewebeschnitten zu quantifizieren. Von der Intensität ist Phalloidin der Antikörperfärbung überlegen. Als Negativkontrolle wurde Antikörperverdünnungslösung eingesetzt. Um die Zellkerne anzufärben, wurden die Proben mit Mowiol-DAPI eingedeckt, für 24 h dunkel bei 4 °C gefärbt und anschließend auch unter diesen Bedingungen gelagert. Die unterschiedlichen Färbungen wurden mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Die Lokalisierung der Partikel wurde über die Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

2.2.10 Charakterisierung der mit Antibiotikum beladenen Janus-Partikel *in vivo*

Vorbereiten der Bakterien- und Partikellösungen

Die mittels Gamma-Quelle sterilisierten Partikel (unbeladen oder beladen mit 10 oder 20 Gew.-% AZT) wurden in sterilem PBS suspendiert. Das freie AZT wurde in sterilem PBS gelöst (0,5 oder 0,1 mg/ml) und steriles PBS alleine wurde als Kontrolle verwendet. Alle Lösungen wurden vor der Applikation mittels eines Vortexers gut durchgemischt. Der *P. aeruginosa*-Wildtyp wurde in LB-Medium über Nacht bei 170 rpm und 37 °C kultiviert. 1 ml der Übernachtskultur wurde bei 10 000 rpm für 2 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 1 ml sterilem PBS gewaschen. Nach diesen Zentrifugations- und Waschschritten war die Bakteriensuspension frei von extrazellulären polymeren Substanzen. Die Zelldichte der Bakteriensuspensionen wurde mit dem Photometer über die optische Dichte bei 600 nm (OD600) bestimmt. Eine OD600 von 1 entspricht einer Zellzahl von 1×10^9 Zellen pro ml. Von der mit PBS verdünnten Bakteriensuspension (OD600 = 0,1) wurde eine Verdünnungsreihe bis zu 10^3 Bakterienzellen je ml in sterilem PBS hergestellt.

Um die exakte Zahl der injizierten Bakterien, welche pro Larve verabreicht wurden, zu kontrollieren, wurden je 10 μl der injizierten Verdünnungen sowie der Verdünnungen darüber und darunter im 5-fach-Ansatz auf LB-Agar aufgetropft, über Nacht bei 37°C inkubiert und am darauf folgenden Tag ausgezählt.

Beimpfung der Wachsmottenlarven und Inkubation

Nur gesunde und agile *G. mellonella*-Larven mit ähnlicher Größe, Farbe und Gewicht wurden für die Experimente verwendet. Zu Beginn des Experiments wurden ca. 10 Larven in große Petrischalen gruppiert. Für die Injektion wurden die Larven einzeln aus den Petrischalen entnommen und in einer 96-well-Platte kopfüber fixiert. Die Larven wurden, je nach Versuchsgruppe, zuerst ventral, zwischen das letzte Beinpaar, mit 10 μl der Partikellösung (1 mg/ml) oder dem Wirkstoff in PBS oder sterilem PBS und anschließend mit 10 μl der Bakterienlösung (10^3 Bakterien/ml) dorsal beimpft. Larven, welche keine Bakterien gespritzt bekamen, wurden ein zweites Mal mit PBS beimpft. Nach jeder Injektion wurden die Larven in eine zweite Petrischale gesetzt, um beimpfte von unbeimpften Larven sofort unterscheiden zu können. Die Larven wurden bei 37°C für 48 h inkubiert und in regelmäßigen Abständen ausgewertet.

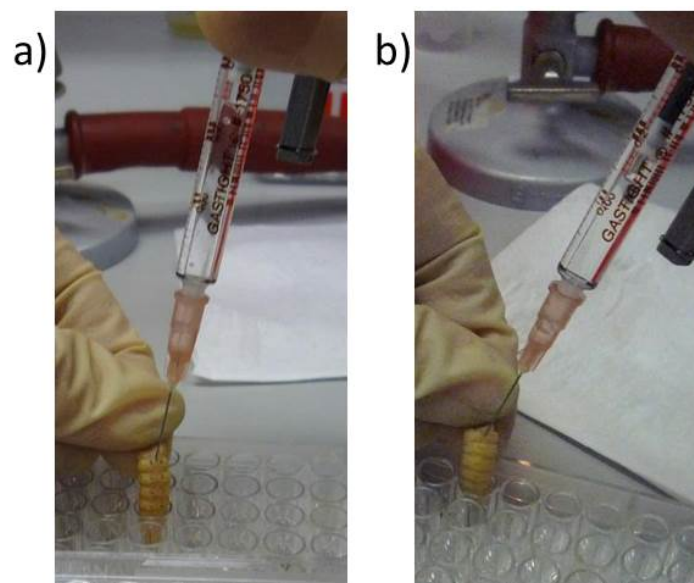


Abbildung 2.5: Beimpfung von *G. mellonella* (a) ventral (b) dorsal.

Evaluation der Wachsmottenlarven

Die Auswertung erfolgte anhand der Beweglichkeit und der Melanisierung der Haut. Dabei wurden agile und hell gefärbte Larven als lebendig, schwarze/dunkle und keine Bewegung zeigende Larven als tot gewertet. *G. mellonella* erwies sich als ein sehr sensibles System für diese Art von Wirkstoffprüfung. Die Larven wurden mehrmals täglich auf ihre Lebendigkeit, Beweglichkeit und Farbe kontrolliert. Tote Larven wurden nach jedem Auszählen mit Fotodokumentation aus der Petrischale entnommen und autoklaviert. Die Auswertung erfolgte mit der Kaplan-Meier-Methode (Kaplan und Meier, 1958; Ziegler et al., 2007).

2.2.11 Statistische Auswertung der Messdaten

Die statistische Auswertung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, mit dem zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben. Die Daten wurden zuvor mittels David-Test (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$) auf Normalverteilung geprüft.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Chemische und physikalische Charakterisierung Gelatine-basierter Oberflächenbeschichtungen

Um die Materialeigenschaften von Gelatine als Implantatmaterial chemisch und physikalisch zu charakterisieren, wurde ein Beschichtungsverfahren für die Herstellung von stabilen Gelatinefilmen in gewünschter Schichtdicke (Mikro- und Nanometerbereich) etabliert. Diese Gelatine-basierten Oberflächenbeschichtungen wurden anschließend im Hinblick auf ihre Quervernetzung, Schichtdicke, Rauheit, Elastizität, Oberflächenspannung und chemische Zusammensetzung untersucht.

3.1.1 Oberflächenanalyse von Amin-modifiziertem und unmodifiziertem Paracyclophan

Damit die Gelatinefilme auf unterschiedlichen Substraten kovalent verknüpft werden können, wurde vor der Beschichtung mit Gelatine eine Haftvermittlerschicht mit freien Amin-Bindungsstellen aufgebracht. Für den Nachweis der Amin-Modifizierung wurde unmodifiziertes Paracyclophan und Amin-modifiziertes Paracyclophan mittels eines CVD-Prozesses auf Goldoberflächen aufgedampft und anschließend mittels ToF-SIMS untersucht. Aufgrund der Anwesenheit von charakteristischen C_xNH_y -Banden (Abbildung 3.1 Spektrum a), in positiver Polarität des Sekundärionenspektrums, konnte die Amin-Modifizierung (PPX- CH_2NH_2 bzw. PPX-Amin) eindeutig nachgewiesen werden. Unmodifiziertes PPX weist diese für Amin spezifischen Banden nicht auf (Abbildung 3.1 Spektrum b).

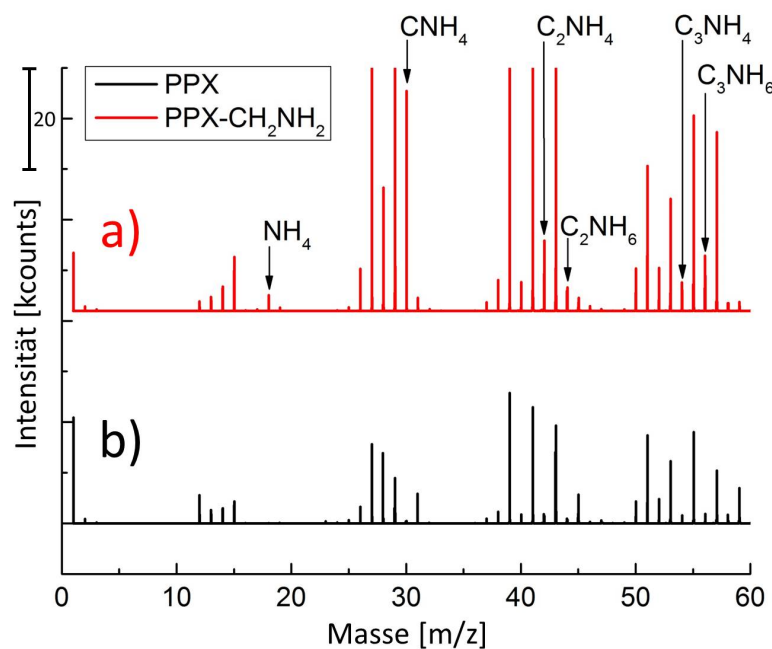


Abbildung 3.1: Nachweis der Amin-Modifizierung mittels ToF-SIMS. Dargestellt sind die Spektren der PPX-CH₂NH₂-funktionalisierten (a) und der PPX-funktionalisierten Oberfläche (b). Fragmente, welche die Anwesenheit der Amingruppen bestätigen, sind mit den zugehörigen chemischen Formeln gekennzeichnet.

3.1.2 Herstellung der Gelatine-basierten Oberflächenbeschichtungen

Zum Beschichten der Amin-modifizierten Oberflächen mit Gelatine erwies sich die Rotationsbeschichtung als eine reproduzierbare Methode. Mit diesem Beschichtungsprozess konnten Gelatine-basierte Filme gezielt in unterschiedlichen Schichtdicken hergestellt werden. Nach dem anschließenden Quervernetzen, Waschen und Trocknen war bei Gelatinefilmen im Mikrometer-Schichtdickenbereich eine erfolgreiche Quervernetzung mit bloßem Auge erkennbar (Abbildung 3.2 b). Je nach Herstellungsprozess wurden Gelatinefilme mit einer Schichtdicke von 15 nm bis 1,7 µm erhalten. Ohne die Amin-Modifizierung hingegen schwamm das quervernetzte Hydrogel beim Waschen ab (Abbildung 3.2 a).

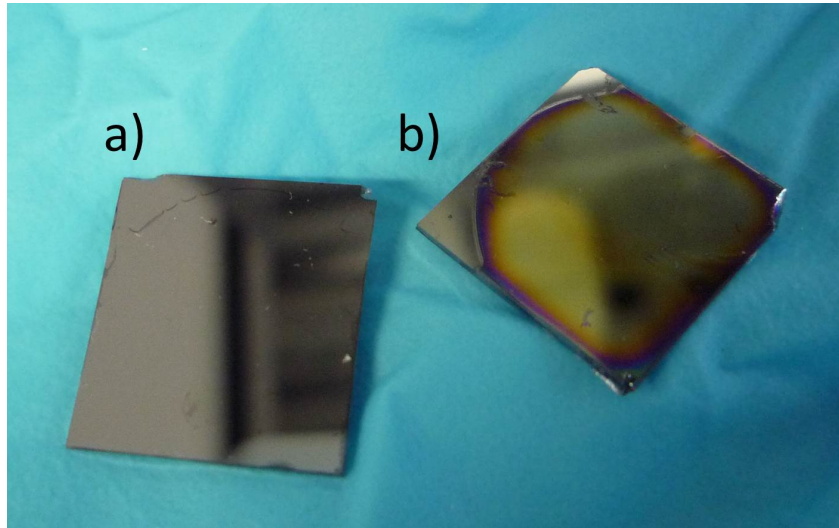


Abbildung 3.2: Bestätigung der Notwendigkeit einer Amin-Modifizierung für kovalent auf der Oberfläche quervernetzte Gelatinefilme. PPX-modifizierte Siliziumoberfläche (a) bzw. PPX- CH_2NH_2 -modifizierte Siliziumoberfläche (b). Aufgrund der fehlenden Bindungsstellen zur Oberfläche ist das quervernetzte Hydrogel von Substrat (a) während der Waschstreife abgeschwommen. Der auf der Amin-modifizierten Oberfläche quervernetzte Gelatinefilm ist nach dem Waschen und Trocknen stabil auf der Oberfläche gebunden (b). (Kantenlänge der Substrate ca. 1 cm).

Um die Oberflächen während des CVD-Prozesses gezielt mit PPX-Amin zu modifizieren, wurden metallische Dünnstegnetzchen und PDMS-basierte Stempel eingesetzt. Die metallischen Netze ($50\ \mu\text{m}$) haben gegenüber den PDMS-basierten Stempeln ($200\ \mu\text{m}$) eine deutlich geringere Maschenweite. Der schematische Querschnitt einer PPX-Amin-strukturierten, mit Gelatine beschichteten und quervernetzten Probe sowie das für den CVD-Prozess verwendete metallische Netz mit gemischter Maschenweite sind in Abbildung 3.3 a dargestellt. Die daraus resultierende strukturierte Beschichtung der Oberfläche wurde mit dem Elektronenmikroskop untersucht (Abbildung 3.3 b und Vergrößerung in c). Eine lichtmikroskopische Aufnahme des zur Amin-Modifizierung verwendeten PDMS-Stempels ist in Abbildung 3.3 d abgebildet. Der quervernetzte und gewaschene Gelatine-basierte Film kann aufgrund seiner Autofluoreszenz mit dem Fluoreszenzmikroskop auf der strukturiert modifizierten Oberfläche dargestellt werden (Abbildung 3.3 e).

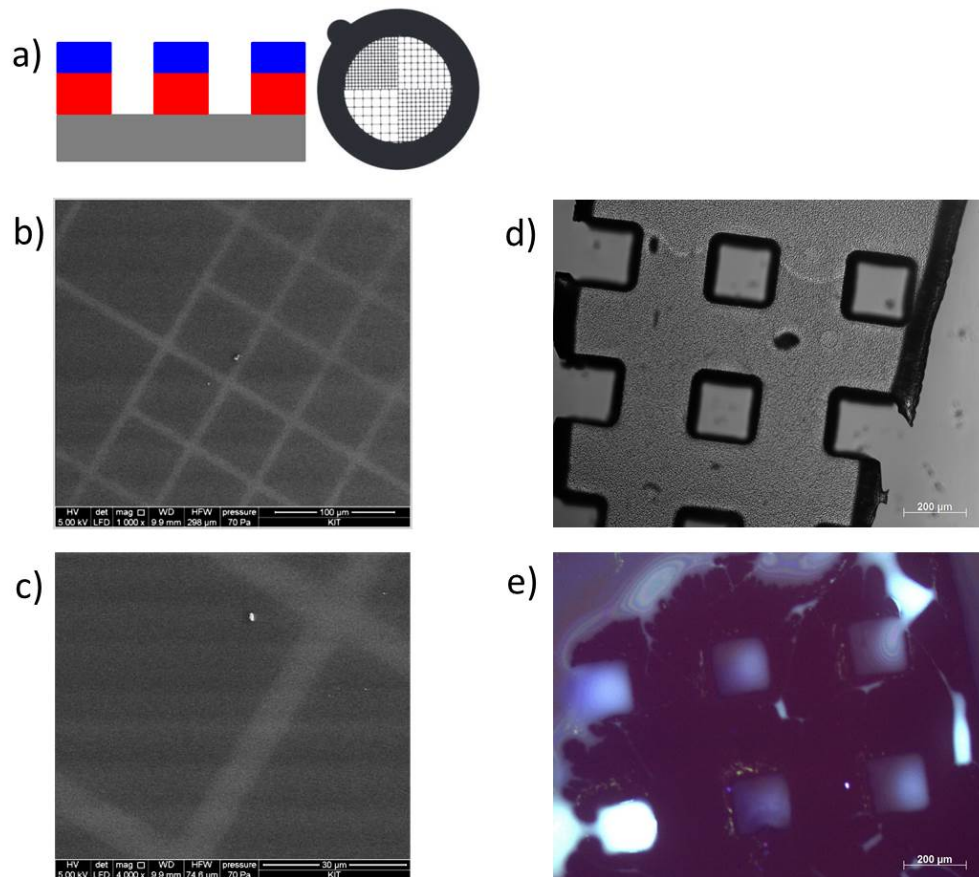


Abbildung 3.3: Strukturierte Amin-Modifizierung und darauf quervernetzte Gelatinefilme. Dargestellt ist der schematische Querschnitt einer PPX-Amin (rot) strukturierten und anschließend mit Gelatine (blau) beschichteten Oberfläche, sowie das hierfür verwendete Netz (a). (b) zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme einer PPX-Amin strukturierten und mit Gelatine beschichteten Oberfläche (Maßstab 100 μm) und (c) eine Vergrößerung (Maßstab 30 μm). In (d) ist eine lichtmikroskopische Aufnahme eines PDMS-Stempels mit einer Maschenweite von 200 μm abgebildet und in (e) eine Fluoreszenzaufnahme des dazugehörigen quervernetzten Gelatinefilms auf der mit PPX-Amin strukturiert modifizierten Oberfläche (Maßstab 200 μm). Hierfür wurde der rote, grüne und blaue Kanal übereinander gelegt.

3.1.3 Ermittlung der Schichtdicke und der Rauheit von Oberflächenbeschichtungen

Die Schichtdicke der Amin-Modifizierung sowie der trockenen Gelatinefilme wurden mit dem Ellipsometer bestimmt. Die Amin-Modifizierung wurde mit einer Schichtdicke von 10 nm - 20 nm, kontrolliert durch einen Schwingquarz in der Probenkammer, aufgedampft. Die Schichtdicke wurde anschließend mit dem Ellipsometer für jede Oberfläche kontrolliert. Mit der in Kapitel 2.2.1.3 und 2.2.1.4 beschriebenen Methode wurden reproduzierbar $15 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ dünne quervernetzte Gelatinefilme auf die Amin-Modifizierung aufgebracht ($n > 100$). Die nicht quervernetzten Gelatinefilme hatten nach dem Waschen eine Dicke von $1,5 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ auf der Amin-Modifizierung ($n = 10$) und $\pm 0 \text{ nm}$ auf Silizium ($n = 10$). Bei Variation des Gelatinegehaltes in der Lösung (1 bzw. 10 Gew.-%) und durch Änderung des

Beschichtungsprozesses wurden dickere Gelatinefilme mit Schichtdicken im Mikrometermaßstab erzielt. Diese konnten jedoch mit dem Ellipsometer nicht mehr mit ausreichender Genauigkeit gemessen werden. Aus diesem Grund, und um die mit dem Ellipsometer erhaltenen Schichtdicken der dünnen Gelatinefilme durch eine zweite Messmethode zu bestätigen und zusätzlich die Oberflächenbeschaffenheit der Gelatinefilme näher zu charakterisieren, wurden die Proben ergänzend mit dem AFM untersucht (Abbildung 3.4).

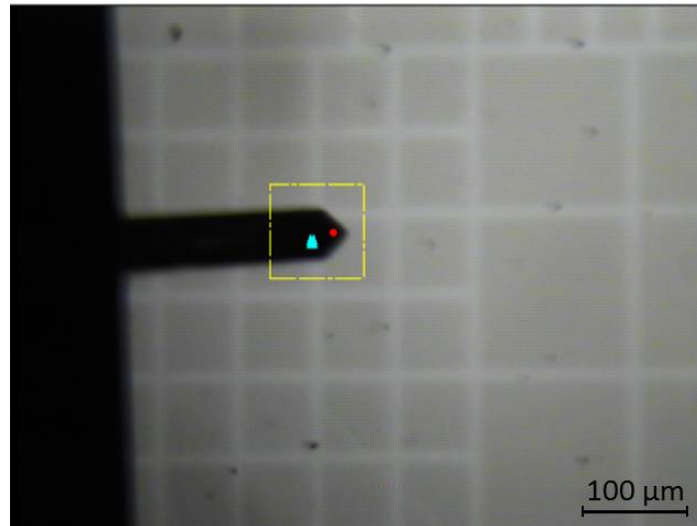


Abbildung 3.4: Lichtmikroskopische Aufnahme einer mit PPX-Amin strukturierten und mit Gelatine beschichteten Probe während der AFM-Messung. Aufsicht auf den *Cantilever* und gelb eingezeichneter Scanbereich. (Bildmaß $670 \times 500 \mu\text{m}^2$).

Es wurden Bereiche zwischen $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ bis $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ untersucht. Eine mit PPX-Amin modifizierte Oberfläche und der durch das Netz abgedeckte Bereich sind in Abbildung 3.5 (a) und das dazugehörige Höhenprofil in Abbildung 3.5 (b) dargestellt. Da die metallischen Netze während der CVD-Beschichtung nur bedingt auf der Substratoberfläche aufliegen, ist ein fließender Übergang der Modifikation zu erkennen. Die unterschiedlichen Bereiche einer mit PPX-Amin strukturierten und mit Gelatine beschichteten Oberfläche wurden durch einen nachträglichen mechanischen Materialabtrag bis auf die Ebene des Probenträgers voneinander getrennt (Abbildung 3.5 c). Im Höhenprofil (Abbildung 3.5 d) hat die Substratoberfläche mit Amin-Modifizierung ca. 18 nm und der quervernetzte Gelatinefilm ca. 15 nm Schichtdicke bei RT in trockenem Zustand. Die Schichtdicke von 15 nm für den trockenen Gelatinefilm konnten durch die Analyse von Referenzoberflächen mit dem Ellipsometer bestätigt werden.

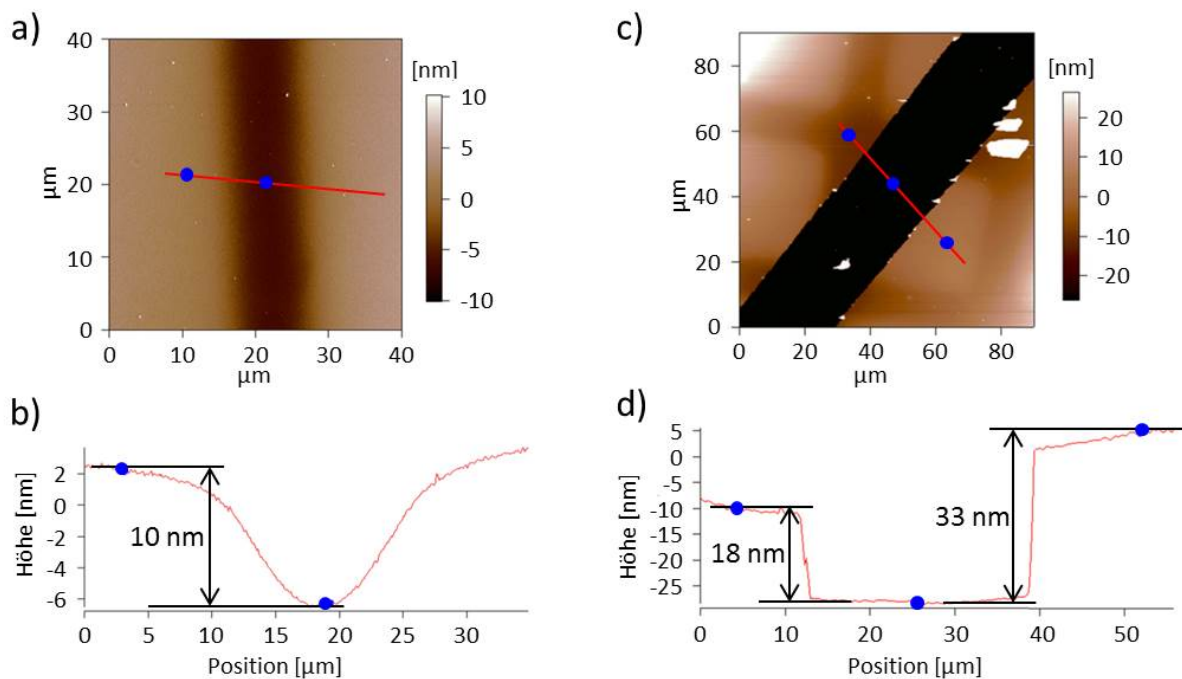


Abbildung 3.5: Topographische Aufnahme der strukturierten Oberflächen mittels AFM. Durch ein Dünnstegnetzchen strukturierte Amin-Modifizierung auf Siliziumoberfläche in (a) und das dazugehörige Höhenprofil in (b). Dünner Gelatinefilm auf Amin-strukturierter Oberfläche modifiziert durch nachträglichen mechanischen Materialabtrag in (c) und das dazugehörige Höhenprofil in (d).

Durch den Materialabtrag auf einer mit PPX-Amin (15 ± 1 nm) und Gelatine (15 ± 1 nm) modifizierten Oberfläche (Abbildung 3.6 a) war es möglich, ein Höhenprofil im 90° -Winkel zur Abtragung (rote Linie, Abbildung 3.6 b) zu erstellen. Die Gesamthöhe war wie erwartet 30 nm, was durch mitgeführte Referenzoberflächen ellipsometrisch bestätigt werden konnte. Die durchschnittliche Rauheit der Substratoberfläche betrug $\pm 0,33$ nm (Abbildung 3.6 c) und die des Gelatinefilms $\pm 0,84$ nm (Abbildung 3.6 d). Die Verteilung der Rauheit im Verhältnis zur Gesamtschichtdicke ist in Abbildung 3.6 (e) dargestellt. Die Abtragung der Oberflächenbeschichtungen wurde unter Verwendung einer Plastik-Pinzette, welche die Siliziumoberfläche aufgrund der geringeren Härte nicht verletzt, durchgeführt. Dies ist an der geringen Schichtdicke von $\pm 0,33$ nm im abgetragenen Bereich zu erkennen. Die negativen Werte in (c) und (d) kommen durch die Position des *Cantilevers* zustande. Die Differenz der beiden Werte ($-899,69$ nm und $-869,98$ nm) stellt die Schichtdicke von 30 nm dar.

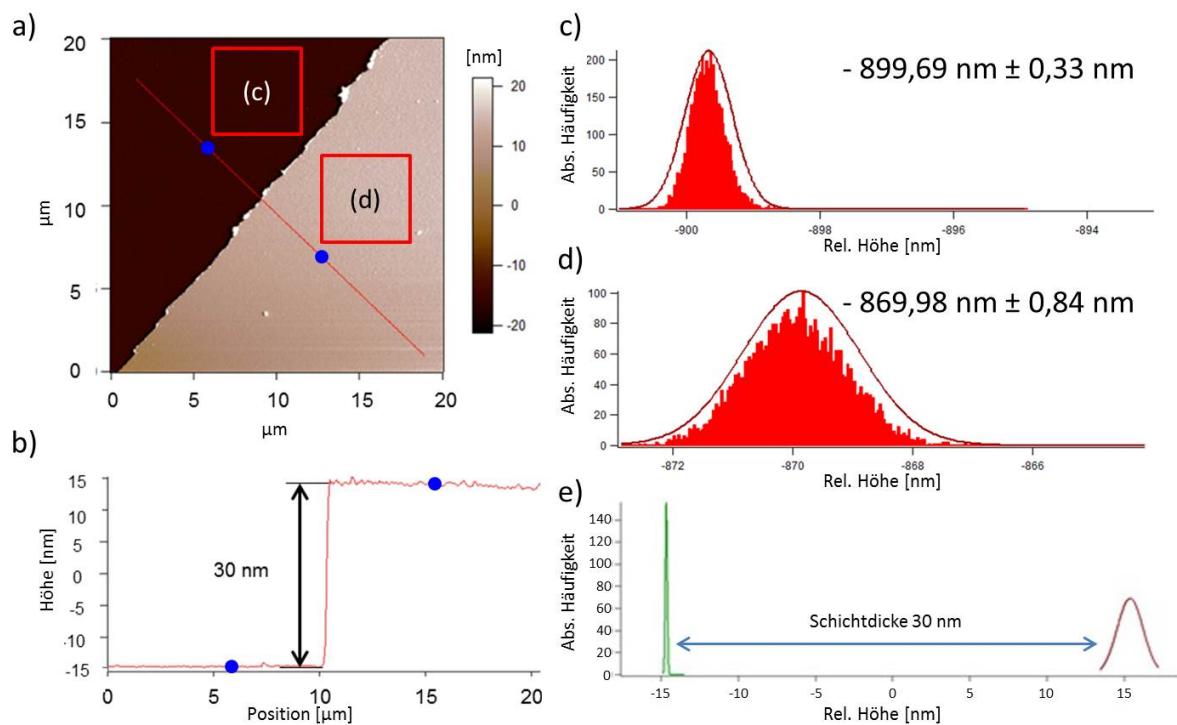


Abbildung 3.6: Schichtdickenmessung eines quervernetzten Gelatinefilms auf einer Amin-Modifizierung. Dargestellt ist die AFM-Aufnahme eines quervernetzten trockenen Gelatinefilms auf einer Amin-Modifizierung (a) und das markierte Höhenprofil entlang der roten Linie (b). Die Verteilung der Rauheitsmessung des abgetragenen Bereiches ist in (c), die des Gelatinefilms ist in (d) sowie die Verteilung der Rauheit bezogen auf die Schichtdicke ist in (e) dargestellt. Die Bereiche der Rauheitsmessung von (c) und (d) sind in (a) markiert. (Abbildung verändert nach Schönwälder et al. (2014)).

Durch Variieren der Gelatinekonzentration von 1 auf 10 Gew.-%, was eine Änderung der Viskosität zur Folge hat, und Modifikationen im Beschichtungsprogramm wurden stabile Gelatinefilme mit einer Schichtdicke von 352 nm (Abbildung 3.7 a-c) und 1,67 μm (Abbildung 3.7 d-f) hergestellt. Diesen Proben wurde ebenfalls vor der AFM-Messung gezielt mechanisch Material abgetragen und die Oberflächentopographie im Übergangsbereich gemessen. Die Rauheit eines 1,7 μm dicken Gelatinefilms (Abbildung 3.7 g) betrug ± 1 nm (Höhenprofil und die Verteilung der Rauheit in Abbildung 3.7 h und i). Dieses Ergebnis zeigt den homogenen Auftrag der Gelatinefilme in trockenem Zustand bei RT und die daraus resultierende geringe Rauheit von ± 1 nm. Diese Filme wurden auf Glasoberflächen aufgebracht und mit Ethylenoxid sterilisiert. Der Kooperationspartner im Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf untersuchte die Interaktion des Gelatinehydrogels mit humanen Zellen. Die Hydrogele erwiesen sich als stabil, hatten keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum und die Versuche ließen sich mit dem Mikroskop problemlos auswerten.

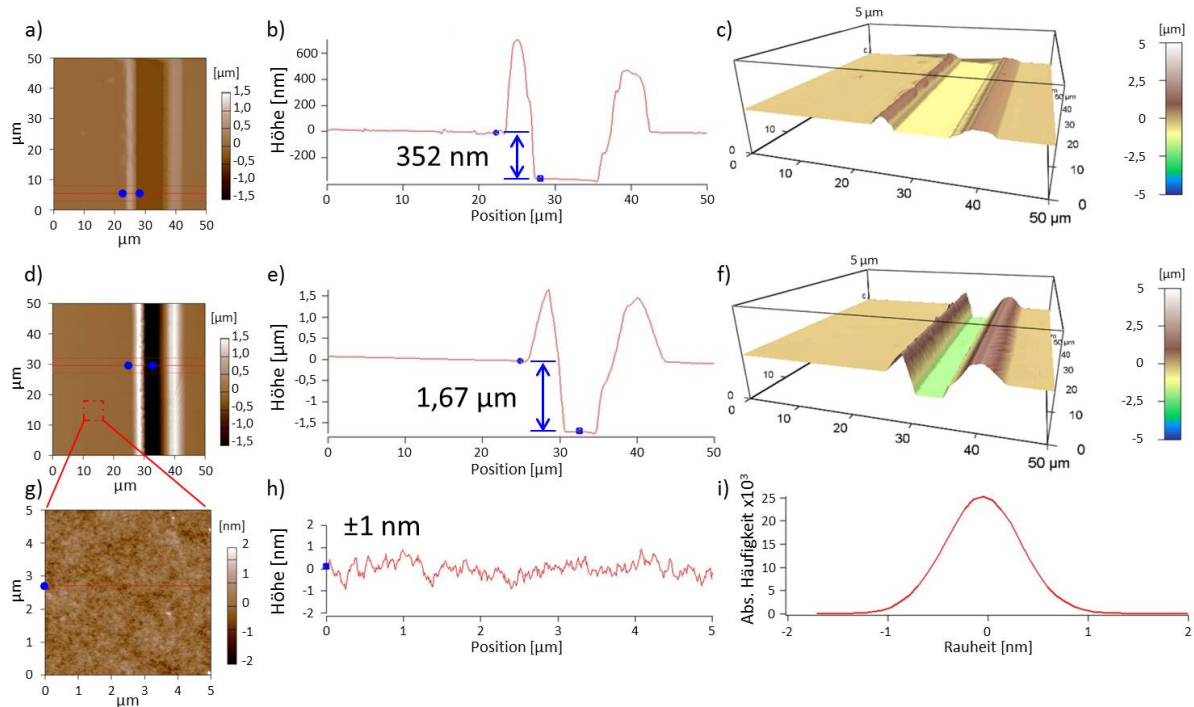


Abbildung 3.7: Ermittlung der Schichtdicke und der Rauheit von quervernetzten Gelatinefilmen mittels AFM. Aufnahmen eines ca. 350 nm dicken Gelatinefilms in (a) und ermitteltes Höhenprofil in (b) mit 3D-Darstellung in (c). Aufnahme eines ca. 1,7 µm dicken Gelatinefilms in (d) und ermitteltes Höhenprofil in (e) mit 3D-Darstellung in (f), sowie Ausschnitt der Rauheitsmessung in (g) und ermitteltes Höhenprofil in (h) mit der Verteilung der Rauheit im Histogramm in (i).

3.1.4 Ermittlung des reduzierten Elastizitätsmoduls der dünnen Gelatine-basierten Hydrogele

Durch Eindringen des Cantilevers wurde mittels AFM das reduzierte Elastizitätsmodul (E_r) der gequollenen Gelatine-basierten Hydrogele bei 25 °C und 37 °C gemessen. Die Daten aus den Kraft-Abstands-Messungen an verschiedenen Stellen auf den Hydrogelen zeigten Werte von $E_r = 27 \pm 3$ kPa und 174 ± 51 kPa bei 25 °C, abhängig von der Eindrückkraft (8 nN und 1 nN). Niedrigere E_r Werte wurden bei 37 °C (18 ± 2 kPa und 106 ± 19 kPa) erhalten.

3.1.5 Ermittlung der Kontaktwinkel auf unterschiedlichen Oberflächen

Um hydrophile bzw. hydrophobe Eigenschaften der verwendeten Substrate und Modifikationen zu messen und Rückschlüsse auf eine homogene Beschichtung und das mögliche Verhalten der Oberflächen bei Proteinkontakt treffen zu können, wurde der Kontaktwinkel gemessen. Eine statische Kontaktwinkelmessung auf einer mit PPX-Amin modifizierten Oberfläche ist beispielhaft in Abbildung 3.8 dargestellt. Von den untersuchten Oberflächen (Silizium, Gold, PPX-Amin und Gelatine) hat Silizium den geringsten Kontaktwinkel

mit $32,5 \pm 1,3^\circ$. Die Amin-Modifizierung hat aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften mit $92,4 \pm 1,5^\circ$ den größten Kontaktwinkel. Die Goldoberfläche des QCM-D-Kristalls bzw. des Goldsubstrates hat einen Kontaktwinkel von $66,3 \pm 1,2^\circ$ bzw. $65,9 \pm 1,0^\circ$ und der Gelatinefilm einen von $57,4 \pm 2,1^\circ$ (Abbildung 3.9). Die Mittelwerte ($n = 10$) der gemessenen Kontaktwinkel auf Silizium, Gold und PPX-Amin sind im Vergleich zu Gelatine mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ unterschiedlich. Die Ergebnisse unterstreichen die erfolgreiche und homogene Modifikation der Oberfläche mit PPX-Amin bzw. Gelatine.

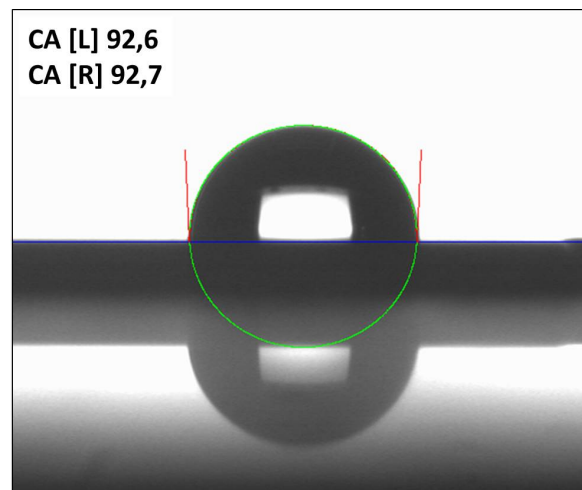


Abbildung 3.8: Statische Kontaktwinkelmessung von einer mit PPX-Amin beschichteten Oberfläche. (CA = *contact angle* [°]; L = links; R = rechts)

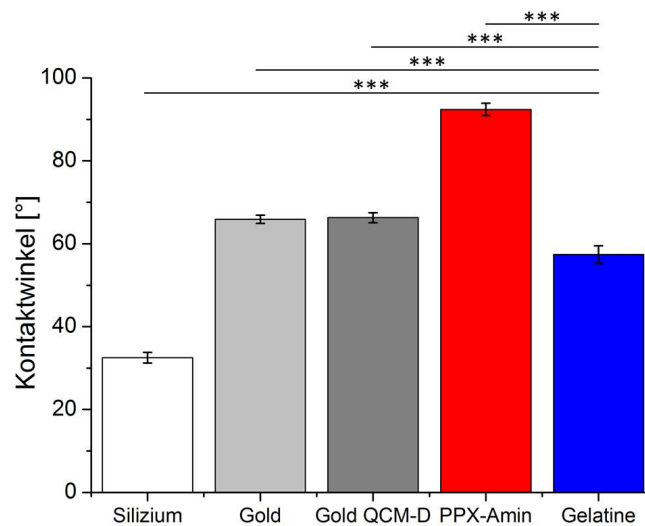


Abbildung 3.9: Statischer Kontaktwinkel von Wasser auf verschiedenen Substraten mit glatter Oberfläche ($n = 10$). Die statistische Signifikanz des Unterschieds der Mittelwerte wurde mit dem zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben bestimmt (***: $p \leq 0,001$).

3.1.6 Chemische Charakterisierung der Gelatine-basierten Filme

Mit dem Rasterelektronenmikroskop konnte die Oberfläche nicht nur visualisiert werden, es wurden auch lokale Elementanalysen mittels EDX durchgeführt. Ein Teil der Gelatinefilme (Schichtdicke ca. 15 nm, Abbildung 3.10 a) wurde hierfür mittels einer Kunststoffpinzette teilweise abgetragen und die Elementanalyse an den markierten Stellen durchgeführt. Der gelbe Bereich markiert den unberührten Gelatinefilm (Spektrum in b) und der grüne Bereich die abgetragene Oberfläche (Spektrum in c). Die Anwesenheit der Kohlenstoffbande (gekennzeichnet mit C) ist charakteristisch für organische Verbindungen und identifiziert die Gelatine (Abbildung 3.10 Spektrum b). Diese Bande ist wesentlich kleiner an der abgetragenen Stelle (PPX-Amin bzw. Gold; Spektrum in c) wie auch der Amin-modifizierten Referenzprobe (Abbildung 3.10 d und Spektrum in e).

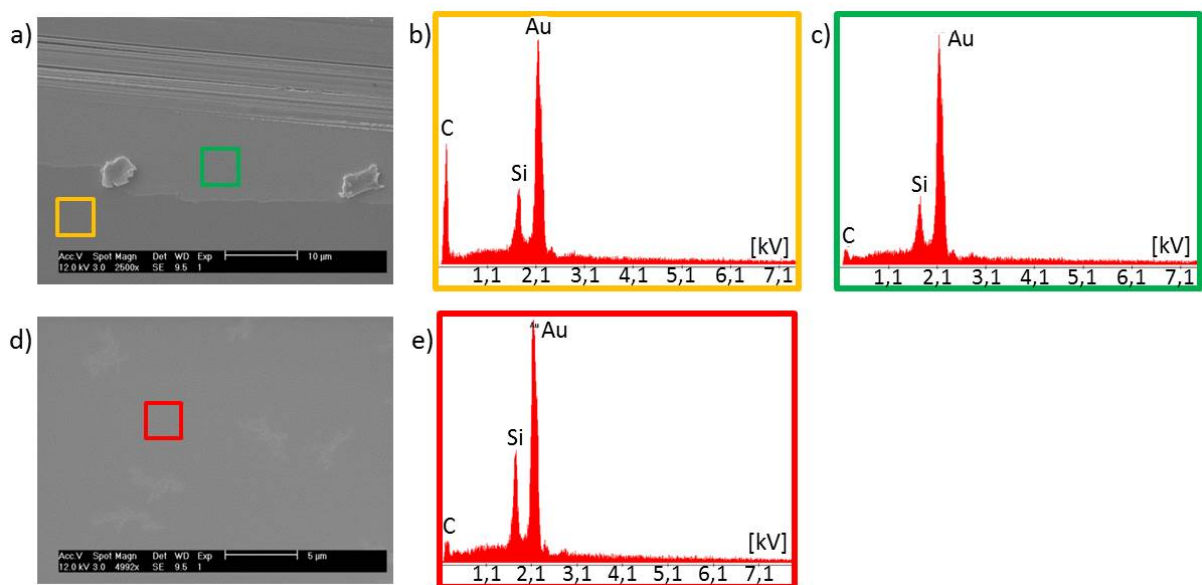


Abbildung 3.10: Lokale Elementanalyse von strukturierten Oberflächen. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen mit EDX-Analyse eines Gelatine-basierten Films auf einem PPX-Amin-modifizierten Goldsubstrat (a, Maßstab 10 µm) und den dazugehörigen Spektren (b, Gelatinefilm; c, abgetragener Bereich) sowie einer mit PPX-Amin modifizierten Referenzprobe (d, Maßstab 5 µm) und zugehöriges Spektrum (e).

Mittels Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) wurde die chemische Zusammensetzung der unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen untersucht. Die mit PPX-Amin modifizierte Referenzoberfläche (Spektrum 1), die unvernetzte Gelatine-beschichtete Oberfläche nach dem Waschschrift (Spektrum 2) sowie die mit quervernetzter Gelatine beschichtete Oberfläche vor dem Waschschrift (Spektrum 3) und nach dem Waschschrift (Spektrum 4) wurden mit dem IRRAS gemessen und sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Die gemessenen Banden von Gelatine wurden mit Hilfe häufig gefundener Banden von biologischen Materialien verglichen und zugeordnet (Tabelle 3.1, Naumann (2001)). Auch nach intensiven Waschschriften bleibt der quervernetzte Gelatinefilm stabil auf der zuvor mit PPX-Amin modifizierten Oberfläche bestehen (Abbildung 3.11). Die breite Hydroxylbande bei 3500 cm^{-1} und die Amidbanden I-III bei 1600 cm^{-1} sind ein Indikator für

die Anwesenheit von Gelatineproteinen auf der Oberfläche von Spektrum 4. Unvernetzte Gelatine (Spektrum 2) wird nach drei Waschschrritten bei 37 °C entfernt. Die Abwesenheit einer Bande bei 2 250 cm⁻¹ zeigt, dass die zum Quervernetzen genutzte Isocyanat-Gruppe vollständig reagiert hat.

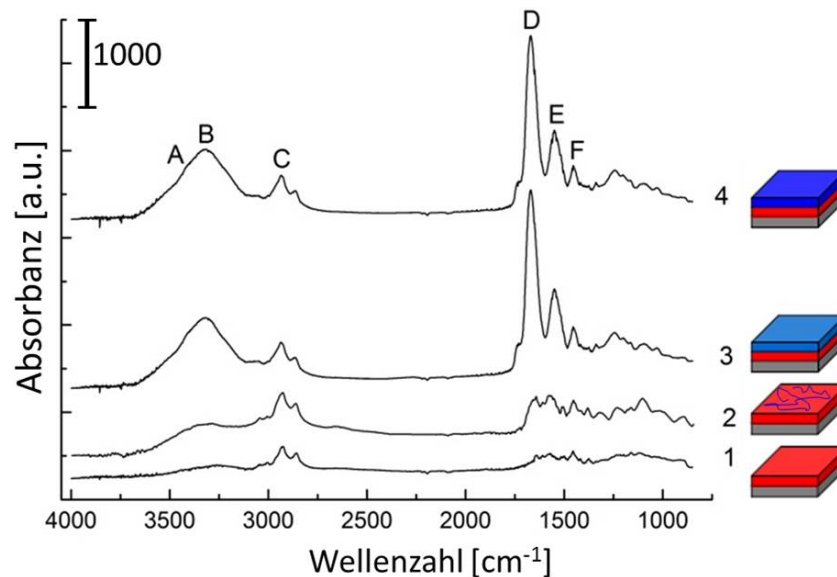


Abbildung 3.11: Chemische Charakterisierung von Gelatine-basierten Filmen mittels IRRAS. Mit PPX-Amin modifizierte Referenzoberfläche (Spektrum 1), mit unvernetzter Gelatine beschichtete Oberfläche nach dem Waschschrtritt (Spektrum 2), mit quervernetzter Gelatine beschichtete Oberfläche vor dem Waschschrtritt (Spektrum 3) und nach dem Waschschrtritt (Spektrum 4). (Abbildung verändert nach Schönwälder et al. (2014)).

Tabelle 3.1: Zuordnung der mittels IRRAS gemessenen Banden (Naumann, 2001).

Buchstabe	Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung
A	3300-3600	O-H (Hydroxylgruppen)
B	3200-3300	N-H (Amingruppen)
C	2800-2950	C-H (Methylgruppe)
D	1600-1700	Amid I
E	1400-1550	Amid II
F	1300-1400	Amid III

3.2 Proteinadsorption auf medizinisch relevanten Oberflächen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Oberflächenmodifikation auf das Adsorptionsverhalten von humanen und bakteriellen Proteinen hat, wurden QCMD-Analysen durchgeführt.

Die anschließende Charakterisierung der adsorbierten Proteine ermöglicht eine Beurteilung der Substratoberflächen im Hinblick auf ihr Potenzial als Implantatmaterial oder -beschichtung.

3.2.1 Quantitative Charakterisierung der Proteinadsorption

Für die quantitative Messung der Proteinadsorption (Abbildung 3.12) mit der QCM-D sind dünne Gelatinehydrogele (< 100 nm, in gequollenem Zustand) die Voraussetzung, um eine starke Dämpfung der Scherwellen-Oszillation durch viskoelastische Verluste innerhalb des Hydrogels zu vermeiden. Ausgehend von den 15 nm dicken Gelatinefilmen in trockenem Zustand wird die Schichtdicke des Gelatinefilms in hydratisiertem Zustand auf 35-40 nm geschätzt, was einem Quellungsgrad von 230-270 Volumenprozent entspricht. Diese Annahme beruht auf unveröffentlichten Untersuchungen von makroskopischen Hydrogelen mit ähnlicher Quervernetzung (Dr. Tim Gebauer und Dr. Alexander Neffe; Kooperationspartner am Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Institut für Biomaterialforschung). Die Messergebnisse zeigen, dass die Schichtdicke der gequollenen Hydrogele das Abklingen der QCM-D-Scherschwingung nicht beeinflussen. Somit sind die Voraussetzungen für die Messung der Proteinadsorption mit der QCM-D erfüllt.

Für die Adsorptionsmessungen wurden die humanen Plasmaproteine Fibrinogen und HSA eingesetzt (1 mg/ml in PBS). Zur Untersuchung der Adsorption von bakteriellen Proteine wurde *P. aeruginosa* für 24 h kultiviert und anschließend steril filtriert. Der zellfreie Überstand wurde für die QCM-D-Messungen verwendet.

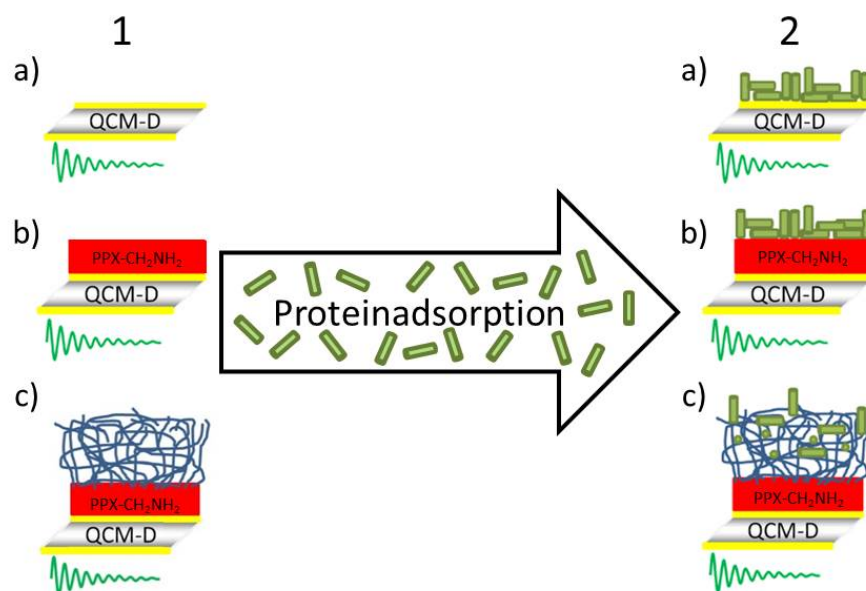


Abbildung 3.12: Schema der Proteinadsorption auf verschiedenen Oberflächen untersucht mit der QCM-D. QCM-D-Kristalloberflächen Gold (1a), PPX-Amin (1b) und Gelatinehydrogel (1c) vor und Gold (2a), PPX-Amin (2b) und Gelatinehydrogel (2c) nach der Proteinadsorption. Adsorbierte Proteine sind schematisch in unterschiedlicher Ausrichtung als grüne Zylinder dargestellt.

Während der Adsorption der humanen Plasmaproteine wurde die Frequenzänderung und die Dissipationsänderung aufgenommen. Die Frequenzänderung des dritten Obertones nimmt mit zunehmender Proteinmasse auf der Chipoberfläche ab (Abbildung 3.13 a und c), hingegen nimmt der gemessene Dissipationsshift während der Proteinadsorption auf den verschiedenen Oberflächen (Gelatine, Gold, PPX-Amin) zu (Abbildung 3.13 b und d).

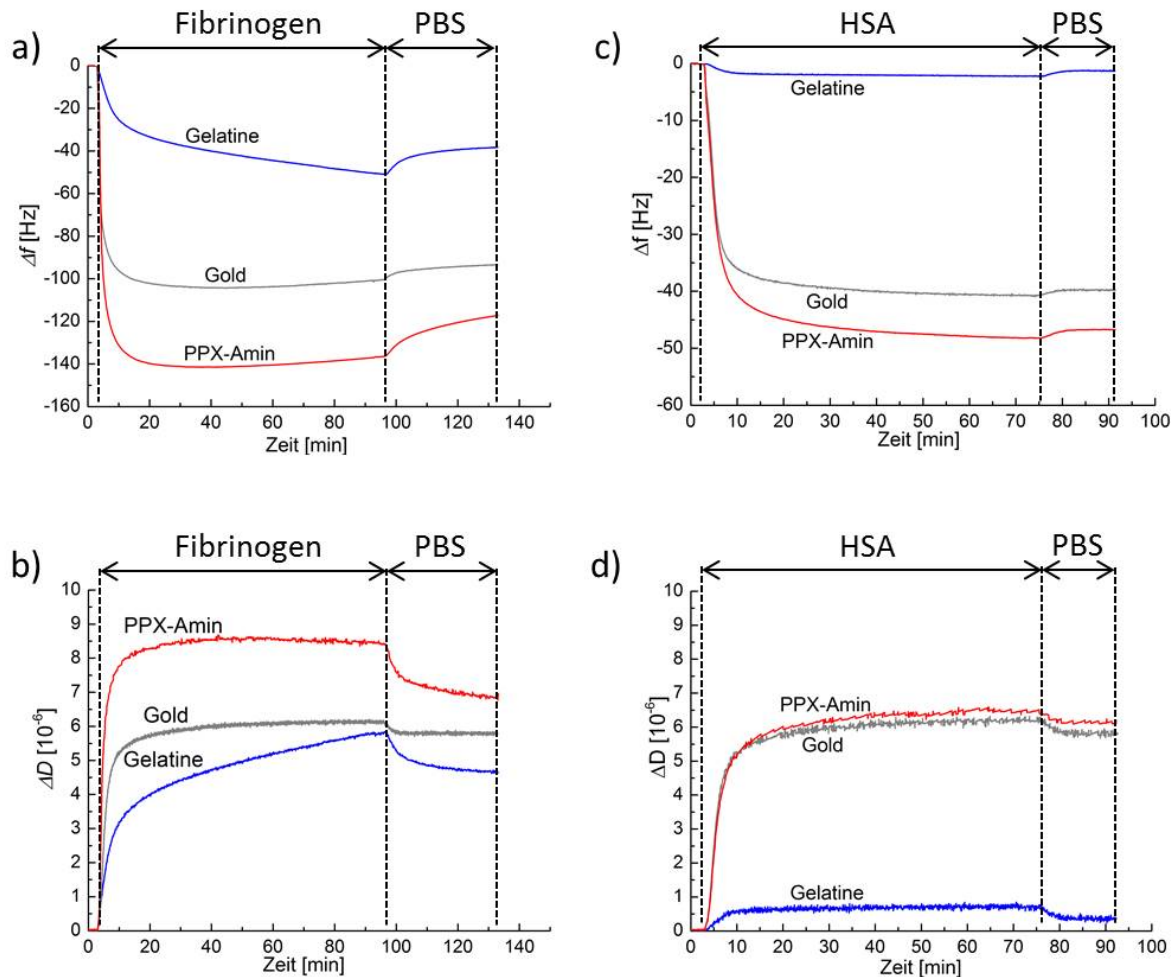


Abbildung 3.13: Frequenz- und Dissipationsänderung während der Adsorption von Fibrinogen bzw. HSA (1 mg/ml in PBS) auf unterschiedlichen Oberflächen. Dargestellt sind die Frequenzänderungen (a und c), sowie die Dissipationsänderungen (b und d) des dritten Obertones ($f = 15$ MHz) bei 37°C während der Adsorption von Fibrinogen bzw. HSA auf PPX-Amin-modifizierten Oberflächen (rot), Gold (grau) und Gelatinehydrogel (blau). (Abbildung verändert nach Schönwälder et al. (2014)).

Die Massen der adsorbierten Proteine auf den Sensorkristallen wurden von den erhaltenen Frequenz- und Dissipationsdaten unter Verwendung des Voigt-Modells berechnet und sind für HSA und Fibrinogen in Abbildung 3.14 dargestellt. Die adsorbierte Masse an humanen Proteinen auf dem Gelatinehydrogel ($7,9 \pm 0,8 \text{ mg/m}^2$, $n = 13$, für Fibrinogen und $0,4 \pm 0,1 \text{ mg/m}^2$, $n = 8$, für HSA) war viel geringer als auf PPX-Amin oder auf Gold ($35,8 \pm 0,9 \text{ mg/m}^2$, $n = 7$; $18,1 \pm 1,0 \text{ mg/m}^2$, $n = 5$, für Fibrinogen und $11,4 \pm 1,3 \text{ mg/m}^2$,

$n = 12$; $12,0 \pm 1,6 \text{ mg/m}^2$, $n = 5$, für HSA). Die geringen statistischen Abweichungen deuten auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hin (Abbildung 3.14).

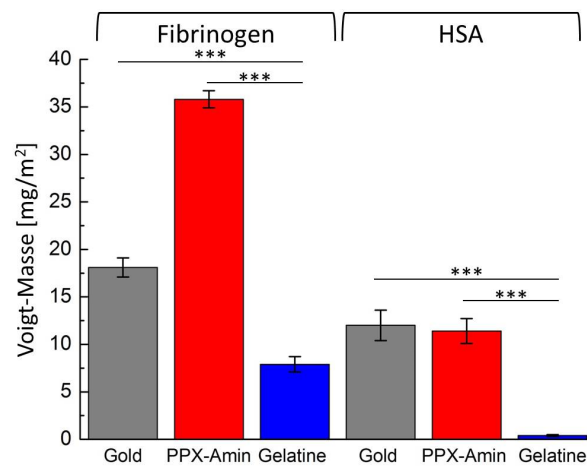


Abbildung 3.14: Adsorbierte Voigt-Masse von HSA und Fibrinogen auf unterschiedlichen Oberflächen. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte für Fibrinogen auf Gold $n = 12$, PPX-Amin $n = 7$ und Gelatinehydrogel $n = 13$; HSA auf Gold $n = 5$, PPX-Amin $n = 12$ und Gelatinehydrogel $n = 8$. Die Fehlerbalken repräsentieren die zugehörigen Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen T-Test für unabhängige Stichproben ($***: p \leq 0,001$). (Abbildung verändert nach Schönwälder et al. (2014)).

Die Voigt-Masse der adsorbierten Proteine aus dem steril filterten Überstand von *P. aeruginosa* (24 h, BM2-Flüssigmedium) betrug auf Gold $4,3 \pm 1,1 \text{ mg/m}^2$, $n = 5$, auf Titan $4,8 \pm 2,0 \text{ mg/m}^2$, $n = 4$, auf PPX-Amin $16,0 \pm 3,4 \text{ mg/m}^2$, $n = 4$ und auf Gelatinehydrogel $2,8 \pm 1,3 \text{ mg/m}^2$, $n = 4$ (Abbildung 3.15).

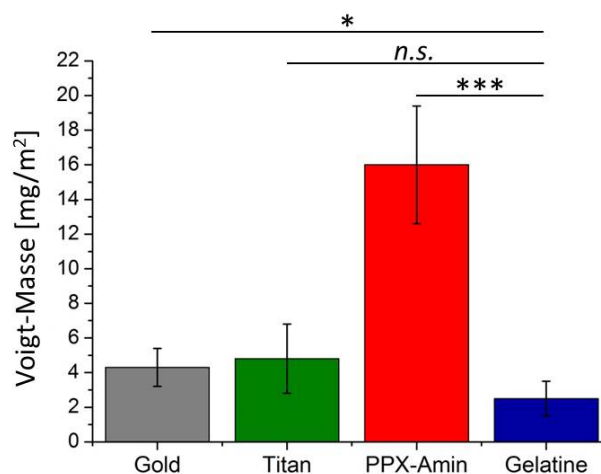


Abbildung 3.15: Adsorbierte Voigt-Masse der bakteriellen Proteine auf unterschiedlichen Oberflächen. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte für Gold $n = 5$, Titan $n = 4$, PPX-Amin $n = 4$ und Gelatinehydrogel $n = 4$. Die Fehlerbalken repräsentieren die zugehörigen Standardabweichungen. Die statistische Signifikanz des Unterschieds der Mittelwerte wurde mit dem zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben bestimmt ($*$: $p \leq 0,05$; $***$: $p \leq 0,001$ und *n. s.* = nicht signifikant).

3.2.2 $\Delta D_n/(-\Delta f_n)$ -Verhältnisse während der Proteinadsorption und die Berechnung des Schermoduls

Die mit der QCM-D ermittelten Dissipations- (ΔD_n) und Frequenzänderungen ($-\Delta f_n$) geben Auskunft über die Adsorptionskinetik der Proteine auf den unterschiedlichen Oberflächen (Abbildung 3.16). Hierdurch können Aussagen über die viskoelastischen Eigenschaften des adsorbierten Proteinfilms und des Hydrogels getroffen werden. Nach der initialen Anlagerungsphase der Proteine bildet sich ein lineares Verhältnis der adsorbierten Proteinmenge (Frequenzänderung) zu deren viskoelastischen Eigenschaften (Dissipationsänderung) aus.

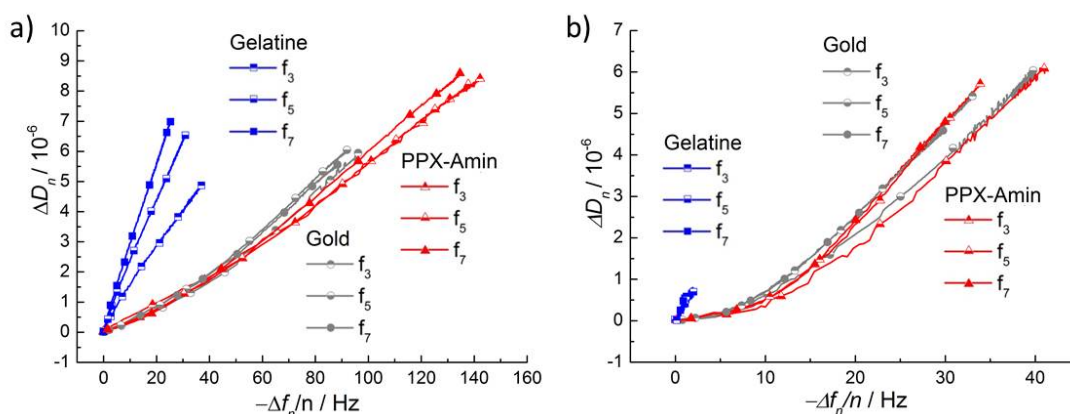


Abbildung 3.16: Verhalten der Dissipations- zur Frequenzänderung während der Adsorption von Fibrinogen. ΔD_n - zu $(-\Delta f_n)$ -Verhältnisse während des Adsorptionsprozesses von Fibrinogen (a) und HSA (b) auf Gelatine-basiertem Hydrogel (Quadrat, blaue Musterung), auf Gold (Kreise, graue Musterung) und auf Amin-Modifizierung (Dreiecke, rote Musterung). Zur besseren Übersicht sind nur die Werte der dritten, fünften und siebten Oberschwingung (f_3 , f_5 , f_7) aufgetragen. (Abbildung verändert nach Schönwälder et al. (2014)).

Das Verhältnis von $\Delta D_5/(-\Delta f_5)$ aller Proben wurde beispielhaft für den fünften Oberton berechnet und ist in Tabelle 3.2 aufgelistet. Die Steigung für die nachfolgende Berechnung des Schermoduls sind aus den linearen Bereichen der Graphen entnommen (Abbildung 3.16). Das proportionale Verhalten erlaubt die Bestimmung des Schermoduls (G_f) des adsorbierten Proteinfilms nach Gleichung 2.3 (basierend auf Du und Johannsmann (2004)).

Tabelle 3.2: Verhältnis der Dissipations- zur Frequenzänderung des 5. Obertones ($\Delta D_5/(-\Delta f_5)$) und das daraus berechnete Schermodul des adsorbierten Proteinfilms auf unterschiedlichen Oberflächen (bestimmt mit Gleichung 2.3, $n \geq 5$).

Protein	Substrat	$\Delta D_5/(-\Delta f_5)$ [10^{-6} s]	G_f [kPa]
HSA	Gold (n = 5)	$0,172 \pm 0,009$	$51,2 \pm 2,6$
	PPX-Amin (n = 13)	$0,168 \pm 0,03$	$53,8 \pm 9,0$
	Gelatinehydrogel (n = 6)	$0,37 \pm 0,12$	$25,9 \pm 8,3$
Fibrinogen	Gold (n = 5)	$0,065 \pm 0,007$	$137,0 \pm 15,0$
	PPX-Amin (n = 7)	$0,062 \pm 0,001$	$143,1 \pm 2,2$
	Gelatinehydrogel (n = 13)	$0,2 \pm 0,048$	$46,4 \pm 10,9$

Die Ergebnisse von $\Delta D_n/(-\Delta f_n)$ zeigen, dass sich die adsorbierten Proteinfilme auf Gold und der PPX-Amin-modifizierten Oberfläche kaum voneinander unterscheiden (Abbildung 3.17 a). Jedoch zeigen die Werte des adsorbierten Proteinfilms auf dem Gelatinehydrogel signifikante Unterschiede zu den nicht quellenden Oberflächen Gold und PPX-Amin. Die Analyse der Schermodule verdeutlicht, dass die Anordnung der adsorbierten Proteine auf Gold bzw. auf der Amin-modifizierten Oberfläche wesentlich dichter ist als auf dem Gelatinehydrogel (Abbildung 3.17 b).

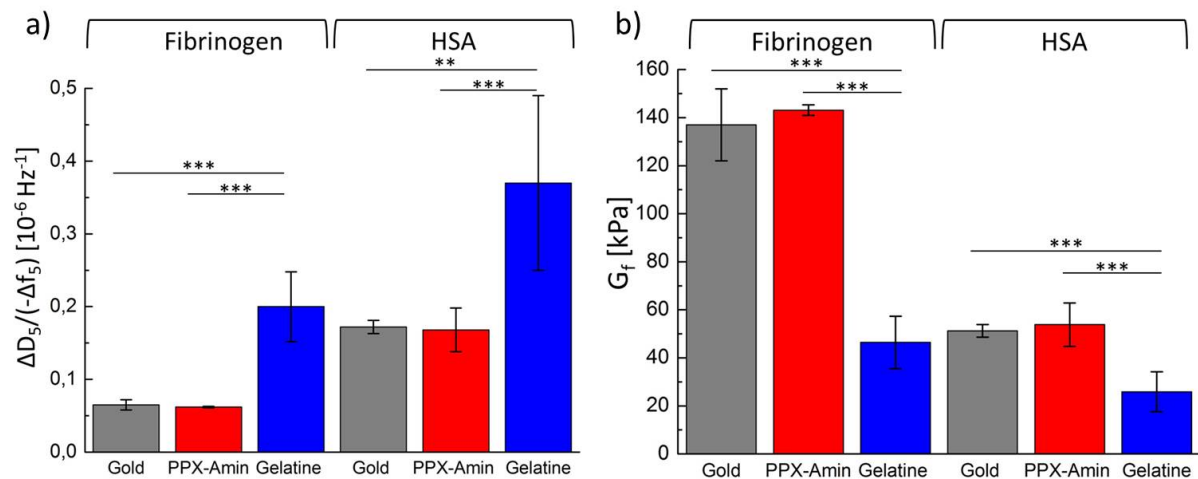


Abbildung 3.17: $\Delta D_n/(-\Delta f_n)$ -Verhältnisse und Schermodule der adsorbierten humanen Proteine auf dem Gelatinehydrogel sowie der Gold- und PPX-Amin-modifizierten Oberfläche des fünften Obertons (25 MHz). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der $\Delta D_n/(-\Delta f_n)$ -Verhältnisse (a) für Fibrinogen auf Gold $n=5$, PPX-Amin $n=7$ und Gelatinehydrogel $n=13$ und HSA auf Gold $n=5$, PPX-Amin $n=13$ und Gelatinehydrogel $n=6$. Das Schermodul der adsorbierten Proteinmasse wurde für den 5. Oberton mittels der Gleichung 2.3 berechnet (b). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte für Fibrinogen auf Gold $n=5$, PPX-Amin $n=7$ und Gelatinehydrogel $n=13$ und HSA auf Gold $n=5$, PPX-Amin $n=13$ und Gelatinehydrogel $n=6$. Die Fehlerbalken repräsentieren die zugehörigen Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben (**: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). (Abbildung verändert nach Schönwälder et al. (2014)).

3.2.3 Charakterisierung der Adsorptionskinetik mittels exponentiellem Fitting

Das unterschiedliche Verhalten von $\Delta D_n/(-\Delta f_n)$ während der Adsorption von Fibrinogen auf dem Gelatinehydrogel im Vergleich zur Amin-Modifizierung bzw. Gold stützt die Hypothese, dass das Fibrinogen nicht nur auf der Oberfläche des Hydrogels adsorbiert wird, sondern auch in dieses migriert. Dies führt zu veränderten viskoelastischen Eigenschaften der Hydrogel-Fibrinogen-Mischung, welche durch die unterschiedlichen Steigungen der Oberschwingungen sichtbar werden (Abbildung 3.16 a). Um diesen Effekt zu prüfen, wurde eine kinetische Analyse der QCM-D-Daten durchgeführt. Für das kinetische Verhalten von Fibrinogen während der Adsorption auf dem Hydrogel konnten zwei Phasen definiert werden. Auf den inerten Substraten Gold und der Amin-Modifizierung hingegen war nur die erste Phase der Anlagerung erkennbar (Abbildung 3.18).

Unter der Annahme identischer Zeitkonstanten für die initiale Proteinanlagerung an die Oberfläche ($t_1 = 150$ s; bestimmt durch exponentielles Fitting der aufgenommenen $-\Delta f$ -Kurve von Gold, $t_1 = 134$ s mit $A1 = 81,65$ bzw. von PPX-Amin, $t_1 = 149$ s mit $A1 = 84,40$, bei 1 mg/ml Fibrinogen; Abbildung 3.18), kann die gemessene $-\Delta f$ -Kurve der Fibrinogenadsorption auf dem Gelatinehydrogel durch einen exponentiellen Fit beschrieben werden. Unter Annahme eines Zwei-Schritt-Prozesses mit einer Zeitkonstante von $t_1 = 150$ s (Proteinansammlung auf der Oberfläche) und $t_2 = 3300$ s (Proteindiffusion in das Hydrogel), führen die berechneten präexponentiellen Faktoren $A1 = 126,5$ und $A2 = 33,2$ zu einem 4:1-Verhältnis von adsorbiertem zu diffundiertem Fibrinogen auf bzw. in das Hydrogel (Gleichung 3.1).

$$y = A1 \cdot \exp(-x/t_1) + A2 \cdot \exp(-x/t_2) + y_0 \quad (3.1)$$

Die Adsorption erreicht auf den glatten, nicht-quellenden Oberflächen (Gold und PPX-Amin) schnell ein Gleichgewicht. Auf dem Gelatinehydrogel hingegen diffundiert das Fibrinogen nach dem initialen Anlagerungsprozess langsam in die Matrix. Dabei nimmt der Anteil an diffundiertem Fibrinogen bis zur Sättigung der Matrix beständig zu, während die Menge an der Oberfläche nahezu konstant bleibt.

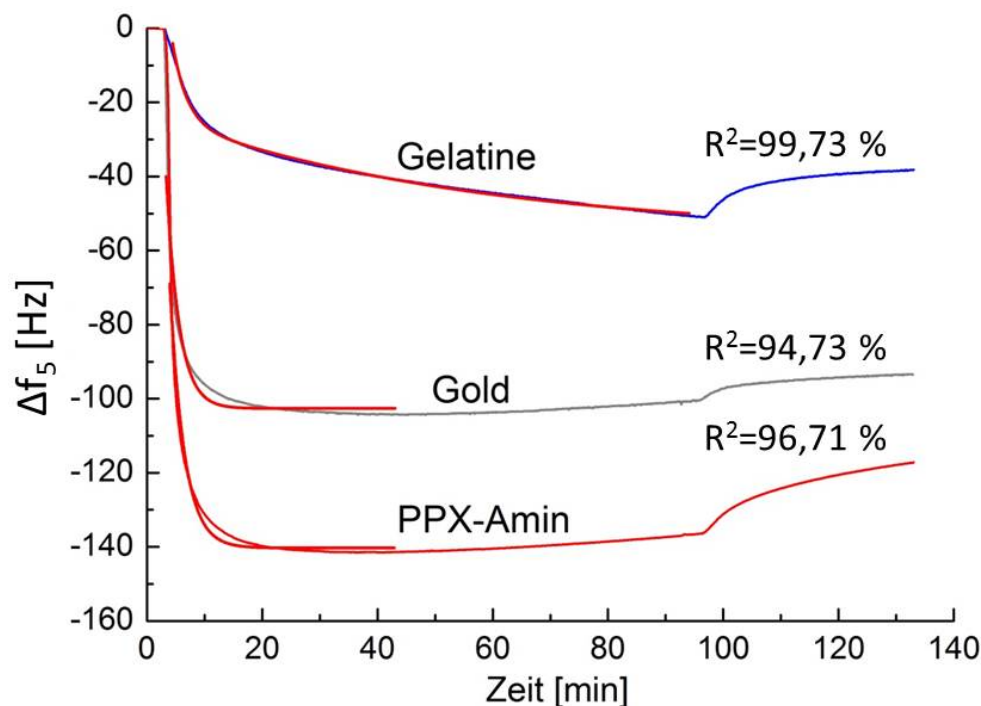


Abbildung 3.18: Exponentielle Annäherung der $(-\Delta f_5)$ -Verhältnisse während der Fibrinogenadsorption auf Gelatine-basiertem Hydrogel, Gold und Amin-Modifizierung. (Abbildung verändert nach Schönwälder et al. (2014)).

3.3 Charakterisierung der mit Proteinen beladenen Gelatinefilme

3.3.1 Analyse der Adsorption von HSA und humanem Fibrinogen

Zur Untersuchung der Aminosäure-Zusammensetzung wurden die QCM-D-Sensoren nach der Proteinadsorption der humanen Plasmaproteine mit dem ToF-SIMS analysiert. Die Probentiefe des statischen Sekundärionenmassenspektrums beträgt 2 - 5 nm bei einem Detektionslimit von 10^{11} - 10^{17} Atome/cm² (Navarro und Planell, 2012). Unter Primär-Ionenbeschuss zerfallen die Proteine, was zu charakteristischen Fragmenten der Aminosäureseitenketten führt (Vickerman und Briggs, 2013). Die Signalintensitäten der gemessenen Aminosäurefragmente ergeben einen multivarianten Datensatz (detaillierte Peakliste in Tabelle 3.3), welcher durch eine Hauptkomponentenanalyse in ihrer Dimensionalität und Komplexität reduziert wurde.

Tabelle 3.3: Analyisierte Signale der Sekundärionenspektren (positive Polarität). PC1/PC2 = Hauptkomponentenladungen der Hauptkomponenten 1 und 2.

Masse	PC1	PC2	Zuordnung	Aminosäure (Code)	Gelatinezusammensetzung [Mol-%]
30.04	-0.46	-0.21	CH_4N	Glycin (Gly, G)	32,61
43.03	0.16	-0.23	CH_3N_2	Arginin (Arg, R)	4,85
44.05	-0.13	-0.31	C_2H_6N	Alanin (Ala, A)	11,14
44.98	0.01	-0.03	CHS	Cystein (Cys, C)	0
60.05	-0.01	-0.01	C_2H_6NO	Serin (Ser, S)	3,65
61.01	0.02	-0.09	C_2H_5S	Methionin (Met, M)	0,55
68.05	-0.33	-0.08	C_4H_6N	Prolin (Pro, P)	13,06
69.03	-0.07	-0.05	C_4H_5O	Threonin (Thr, T)	1,71
70.03	-0.10	0.03	C_3H_4NO	Asparagin (Asn, N)	0
70.07	-0.44	-0.06	C_4H_8N	Prolin (Pro, P)	s.o.
71.01	0.00	0.02	$C_3H_3O_2$	Serin (Ser, S)	s.o.
72.08	0.03	-0.07	$C_4H_{10}N$	Valin (Val, V)	2,19
73.07	0.24	-0.43	$C_2H_7N_3$	Arginin (Arg, R)	s.o.
74.06	0.07	-0.04	C_3H_8NO	Threonin (Thr, T)	s.o.
81.04	0.01	-0.07	$C_4H_5N_2$	Histidin (His, H)	0,60
82.06	-0.17	-0.04	$C_4H_6N_2$	Histidin (His, H)	s.o.
83.05	-0.02	-0.01	C_5H_7O	Valin (Val, V)	s.o.
84.05	-0.14	-0.05	C_4H_6NO	Glutaminsäure (Glu, E)	7,13
84.09	-0.46	0.09	$C_5H_{10}N$	Lysin (Lys, K)	2,63
86.10	0.02	-0.41	$C_5H_{12}N$	Leucin (Leu, L)*	2,36
87.05	0.10	0.26	$C_3H_7N_2O$	Asparagin (Asn, N)	s.o.
88.04	-0.02	0.04	$C_3H_6NO_2$	Asparaginsäure (Asp, D)	4,67
98.02	-0.04	0.09	$C_4H_4NO_2$	Asparagin (Asn, N)	s.o.
100.09	0.11	-0.36	$C_4H_{10}N_3$	Arginin (Arg, R)	s.o.
101.1	0.07	-0.14	$C_4H_{11}N_3$	Arginin (Arg, R)	s.o.
102.06	-0.09	0.04	$C_4H_8NO_2$	Glutaminsäure (Glu, E)	s.o.
107.05	0.06	0.03	C_7H_7O	Tyrosin (Tyr, Y)	0,31
110.08	0.04	-0.27	$C_5H_8N_3$	Histidin (His, H)	s.o.
120.08	-0.07	-0.22	$C_8H_{10}N$	Phenylalanin (Phe, F)	1,44

Tabelle 3.3: Analyisierte Signale der Sekundärionenspektren (positive Polarität).
PC1/PC2 = Hauptkomponentenladungen der Hauptkomponenten 1 und 2. (Fortsetzung)

Masse	PC1	PC2	Zuordnung	Aminosäure (Code)	Gelatinezusammensetzung [Mol-%]
127.10	-0.12	-0.12	$C_5H_{11}N_4$	Arginin (Arg, R)	s.o.
130.07	0.16	0.16	C_9H_8N	Tryptophan (Trp, W)	0
131.05	-0.01	-0.03	C_9H_7O	Phenylalanin (Phe, F)	s.o.
132.05	-0.00	-0.00	C_9H_8O	Phenylalanin (Phe, F)	s.o.
136.09	0.13	-0.14	$C_8H_{10}NO$	Tyrosin (Tyr, Y)	s.o.
170.07	0.04	0.04	$C_{11}H_8NO$	Tryptophan (Trp, W)	s.o.

Mit der Hauptkomponentenanalyse ist es möglich zwischen reinen Gelatinefilmen und mit Fibrinogen bzw. HSA beladenen Gelatinefilmen zu unterscheiden. Studien von Tyler et al. (2011) und Muramoto et al. (2011) untersuchten ähnliche Proteinadsorbate. Für die Hauptkomponentenanalyse der SI-Massenspektren der adsorbierten Proteine (Abbildung 3.19 und Tabelle 3.3) wurden Peaks in positiver Polarität, basierend auf Datensätzen nach Lhoest et al. (2001) und Wagner und Castner (2001), ausgewählt. Die aus der Hauptkomponentenanalyse der charakteristischen Aminosäurefragmente hervorgehenden Cluster (95% Konfidenzintervall) überlappen nicht und ermöglichen eine Differenzierung der untersuchten Proben (Abbildung 3.19 a). PC1 erfasst 83 % der Varianz und zeigt eine gute Differenzierung zwischen reiner Gelatine (Kreise, PC1) und den Gelatinefilmen, welche mit HSA (Quadrate, PC1) bzw. Fibrinogen (Dreiecke, PC1) in Kontakt kamen. PC2 mit 12 % Varianz separiert die mit HSA behandelten Proben. Wie aus den zugehörigen Diagrammen (Abbildung 3.19 b und Anhang C) anhand der negativen Werte dieser Hauptkomponente entnommen werden kann, hat Arginin (43 und 73 m/z) eine stark positive Hauptkomponentenladung in PC1. Glycin (30 m/z), Prolin (68 und 70 m/z) und Lysin (83 m/z) haben stark negative Hauptkomponentenladungen. Dies steht in Übereinstimmung mit den gemessenen Hauptkomponentenwerten von Gelatine in PC1. Diese Ergebnisse sind in guter Konformität mit der Aminosäurezusammensetzung von Gelatine (Tabelle 3.3 und Anhang C Eastoe (1955)), da diese reich an Glycin und Prolin ist. Die Aminosäurezusammensetzung von Fibrinogen und HSA sind ebenfalls im Anhang C tabellarisch aufgelistet (Gasteiger et al., 2003).

Integrationsintervalle wurden von den Peakformen im hochauflösenden Spektrum direkt definiert. Die adsorbierten Mengen an Fibrinogen und HSA auf dem Gelatinehydrogel sind nach den Ergebnissen der QCM-D-Untersuchung im Vergleich zur Goldoberfläche sehr gering (44 % Fibrinogen, 3 % HSA). Des Weiteren wird durch den Passivierungseffekt der Gelatineschicht die HSA-Adsorption um mehr als eine Größenordnung, von ca. 5 mg/m² Trockenmasse Wagner et al. (2003) auf 0,4 mg/m² nasse Proteinmasse, bestimmt durch QCM-D, reduziert. Dennoch ist die Kombination aus Sekundärionenmassenspektrometrie und einer anschließenden Hauptkomponentenanalyse in der Lage zwischen diesen drei proteinbasierten Oberflächen zu unterscheiden und kann in Interaktion mit einem substratgebundenen Gelatinefilm zur Untersuchung von Proteinen eingesetzt werden.

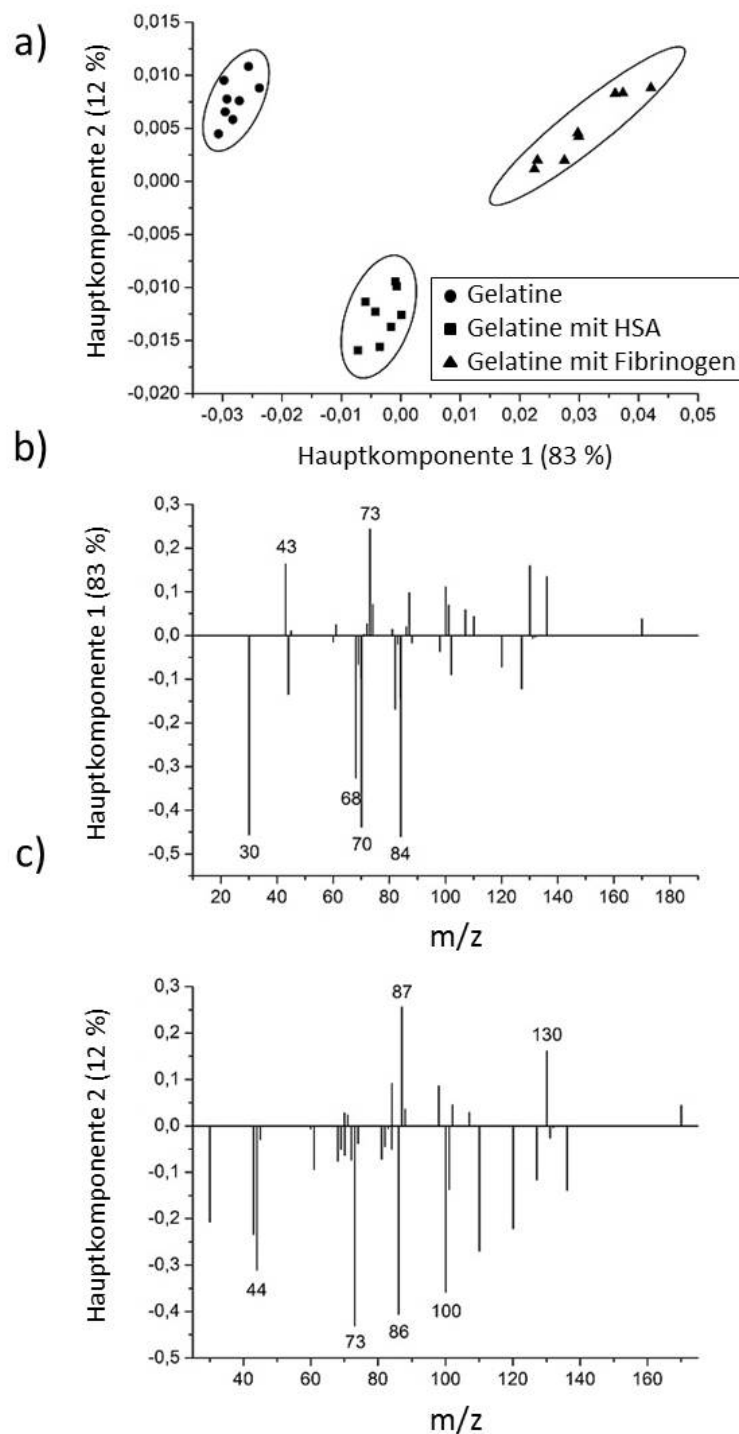


Abbildung 3.19: Auswertung der Hauptkomponentenanalyse zur Differenzierung zwischen unterschiedlichen Proteingemischen. Differenzierung zwischen Gelatine und Gelatine beladen mit HSA bzw. Fibrinogen. Hauptkomponentenwerte von PC1 (83% Varianz) und PC2 (12% Varianz) von drei unabhängigen Experimenten ($n = 24$), zusammen mit 95% Konfidenzintervall (a), Hauptkomponentenladungen der PC1 (b), Hauptkomponentenladungen der PC2 (c). (Abbildung verändert nach Schönwälder et al. (2014)).

3.3.2 Identifizierung der adsorbierten bakteriellen Proteine

Die auf Titan, Gold, Amin-Modifizierung und Gelatine adsorbierten Proteine wurden durch MS- und MS/MS-Analyse identifiziert. Für diese Untersuchungen wurde zusätzlich Titan, ein gängiges und vielseitig genutztes Implantatmaterial, als Referenzoberfläche hinzugezogen (Bauer et al., 2013). Der berechnete *Score* ist eine Größe, um die Proteine nach der Wahrscheinlichkeit ihrer korrekten Identifizierung zu sortieren. In diese Messgröße sind die Ergebnisse der MS- und MS/MS-Messungen mit eingeflossen. Die verdauten Gelatinepeptide beeinflussten die Auswertung nicht, da in speziellen Datenbanken, in welchen nur bakterielle Peptidfragmente von *P. aeruginosa* enthalten sind, nach Übereinstimmungen gesucht wurde. Die Sensitivität der Methode ist hoch genug, um von geringen adsorbierten bakteriellen Proteinmengen die Proteinspektren aufzunehmen und auszuwerten. Mit einem *Score* > 3 wurden 18 Proteine auf Titan, 21 Proteine auf Gold, 18 Proteine auf PPX-Amin und 20 Proteine auf dem Gelatinehydrogel verifiziert (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Adsorbierte bakterielle Proteine auf Titan, Gold, PPX-Amin und Gelatinehydrogel. (n = 3; sortiert nach absteigendem *Score*)

Titan		Gold		PPX-Amin		Gelatine	
Protein	<i>Score</i>	Protein	<i>Score</i>	Protein	<i>Score</i>	Protein	<i>Score</i>
PA2424	9,70	PA2424	14,25	PA2424	8,10	PA0690	8,71
PA2462	8,75	PA2462	14,13	PA2462	8,01	PA2424	7,93
PA2402	8,32	PA0041	7,87	PA2402	7,78	PA2302	7,14
PA0690	5,22	PA2402	6,89	PA0690	7,10	PA2462	6,57
PA0041	5,05	PA2732	6,17	PA0041	5,95	PA2402	5,98
PA0413	4,90	PA0575	6,05	PA2732	5,61	PA2688	5,68
PA4686	4,40	PA0413	5,18	PA4282	4,70	PA4710	5,02
PA1759	3,99	PA0690	4,85	PA3327	4,21	PA3068	4,98
PA2744	3,89	PA1779	4,84	PA2944	4,20	PA0077	4,57
PA2138	3,81	PA0788	4,68	PA3068	3,89	PA4686	4,44
PA1527	3,47	PA3297	4,27	PA4112	3,63	PA1137	3,82
PA4003	3,47	PA3728	4,18	PA1527	3,38	PA3950	3,65
PA1587	3,39	PA2022	3,97	PA2302	3,30	PA0041	3,53
PA3487	3,38	PA4282	3,81	PA4625	3,30	PA3271	3,48
PA0870	3,30	PA1527	3,77	PA3763	3,13	PA1596	3,40
PA3068	3,20	PA1794	3,68	PA2399	3,06	PA5266	3,40
PA2583	3,13	PA1843	3,68	PA4226	3,05	PA4140	3,32
PA2732	3,13	PA4625	3,65	PA2744	3,05	PA0008	3,11
		PA4554	3,31			PA1812	3,03
		PA4285	3,15			PA3063	3,03
		PA3875	3,02				

Die adsorbierten Proteine wurden unter Zuhilfenahme der *Pseudomonas*-Genom-Datenbank hinsichtlich ihrer Eigenschaften untersucht (Winsor et al., 2016). Es besteht keine Korrelation zwischen der Größe der identifizierten Proteine und dem berechneten *Score*. Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Mittelwerte des Molekulargewichts, der Länge oder der Hydrophobizität der adsorbierten Proteine auf den unterschiedlichen Oberflächen gefunden werden. Lediglich der Mittelwert des isoelektrischen Punkts der

Proteine, welche auf dem Hydrogel adsorbierten ($\text{pH } 6,10 \pm 1,66$), ist signifikant größer als der von den adsorbierten Proteinen auf der Amin-Modifizierung ($\text{pH } 5,25 \pm 0,51$). Dies resultiert aus der geringen Streuung der Mittelwerte der isoelektrischen Punkte der Proteine auf dem PPX-Amin. Häufig gefundene Proteine und deren Funktion sind in Tabelle 3.5 aufgelistet. Durch die Identifizierung der Proteine können Rückschlüsse auf deren Identität und Funktion getroffen werden.

Tabelle 3.5: Zuordnung und Funktion der adsorbierten bakteriellen Proteine (Winsor et al., 2016).

Protein	Name	Funktion und Lokalisierung	Titan	Gold	PPX-Amin	GHG
PA0041		<i>probable hemagglutinin; extracellular</i>	x	x	x	x
PA0690	pdtA	<i>conserved hypothetical protein; extracellular</i>	x	x	x	x
PA1527		<i>conserved hypothetical protein; cytoplasmic</i>	x	x	x	
PA2402		<i>probable non-ribosomal peptide synthetase; cytoplasmic</i>	x	x	x	x
PA2424	pvdL	<i>peptide synthase</i>	x	x		x
PA2462		<i>hypothetical protein; outer membran</i>	x	x	x	x
PA2732		<i>hypothetical protein</i>	x	x	x	
PA3068	gdhB	<i>NAD-dependent glutamate dehydrogenase; cytoplasmic</i>	x		x	x

3.4 Herstellung und Charakterisierung der Janus-Partikel

Im zweiten Teil dieser Arbeit steht die Herstellung eines partikulären Wirkstofffreisetzungssystems zur inhalativen Behandlung von schweren Lungenentzündungen mit einhergehender, starker Schleimbildung im Vordergrund. Deren chemische und biologische Charakterisierung erfolgte anschließend in Interaktionsstudien mit Pilzen, Bakterien, humanen Zellen und einem *in vivo*-Infektionsmodell.

3.4.1 Morphologische Charakterisierung der Partikel

Mit einem Wirkstoffanteil der eingelagerten Medikamente (Aztreonam (AZT), Acetylcystein (ACC), Ibuprofen (IBU) und Itraconazol (ICZ)) von 20 Gew.-% und einem Polymeranteil in der Lösung von 4 % (w/v) war es möglich, Partikel mit ähnlicher Größe unter annähernd gleicher Spannung herzustellen. Um eine mögliche inhalative Gabe der Partikel aufgrund ihrer morphologischen Erscheinung zu gewährleisten, wurden mittels EHD *co-jetting* Janus-Partikel mit einem Durchmesser von ca. 1 μm hergestellt. Die Partikel wurden mit unterschiedlichen bildgebenden Verfahren untersucht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der aus unterschiedlichen Polymeren bestehenden und mit variierenden Wirkstoffen beladenen Partikel ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

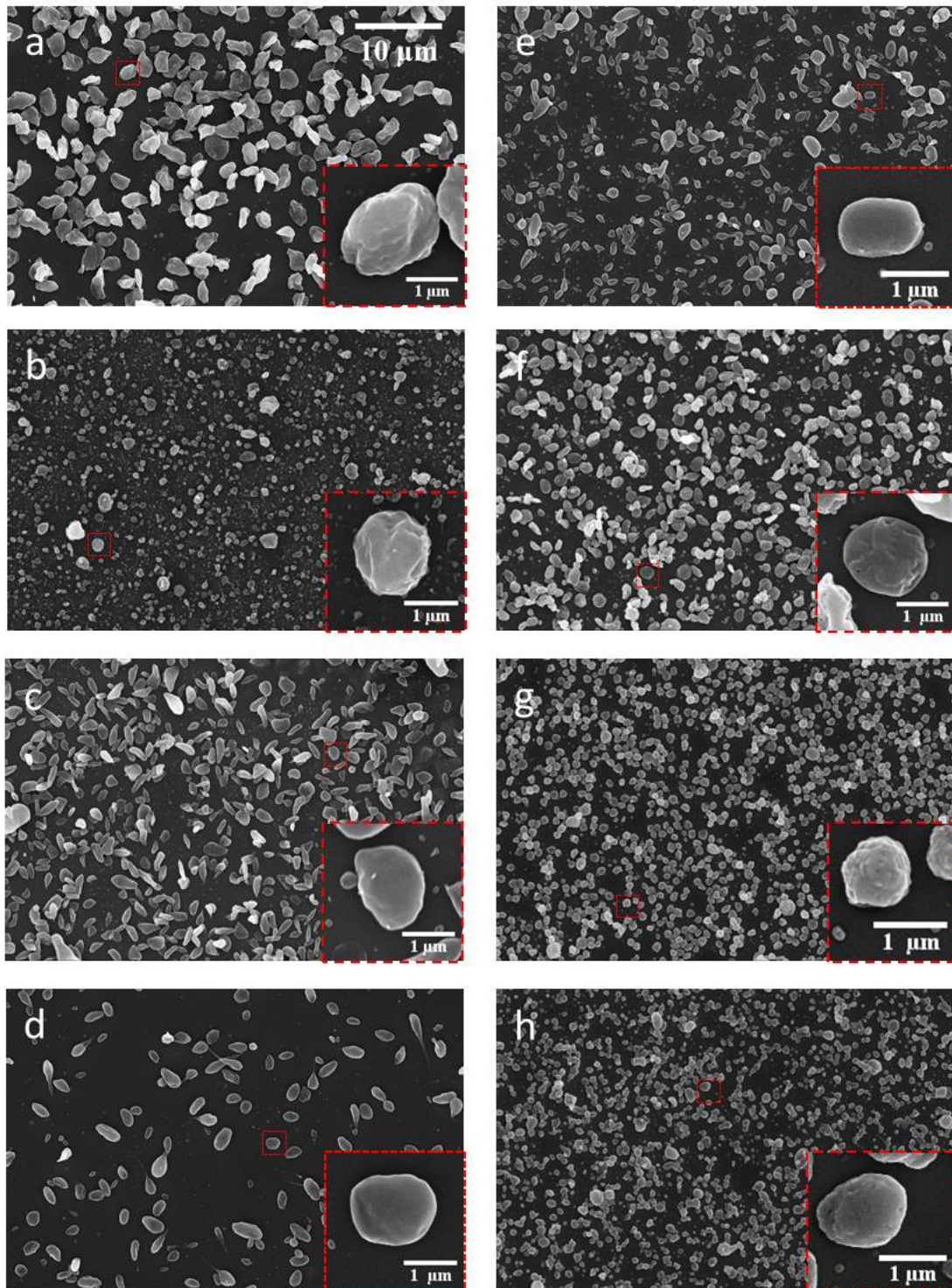


Abbildung 3.20: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Janus-Partikel, hergestellt aus verschiedenen Polymeren und beladen mit unterschiedlichen Wirkstoffen. Für (a)-(f) wurde PLGA 85-15, für (g) PLGA 5004A und für (h) PLGA 5002A eingesetzt. Unbeladene Partikel (a), AZT-beladene Partikel (b), ICZ-beladene Partikel (c), IBU-beladene Partikel (d), AZT-ACC-beladene Partikel (e), ACC-beladene Partikel (f)-(h). In jedes Kompartiment der aus zwei Kompartimenten bestehenden Partikel wurde ein Wirkstoff eingelagert. Der Maßbalken in (a) gilt für alle Abbildungen.

Die Größe und die Morphologie der Partikel wurde mittels der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und anschließender Auswertung durch die Software ImageJ bestimmt. Für die Auswertung wurde ein standardisiertes Vorgehen entwickelt (Abschnitt 2.2.7.2). Ein Beispiel für die morphologische Auswertung ist in Abbildung 3.21 dargestellt. In (a) ist das verwendete elektronenmikroskopische Bild, in (b) das daraus resultierende binäre Bild und in (c) die zugehörige Maske abgebildet. Wird die Maske auf das Ausgangsbild gelegt (Abbildung 3.21 d) wird die präzise Erfassung der Partikel deutlich. In (e) ist die Verteilung der Länge, in (f) die Verteilung der Breite und in (g) die Verteilung der *roundness* angegeben, mit dem zugehörigen Mittelwert und der Standardabweichung. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse für alle Proben ist in Tabelle 3.6 aufgelistet. Die Partikel haben alle ungefähr die gewünschte Länge von ± 1 nm. Eine Verteilung der *roundness* von 0,63-0,83 ist das Ergebnis von überwiegend runden Partikeln. Bei einem *roundness*-Wert von eins liegt ein perfekt sphärischer Partikel vor.

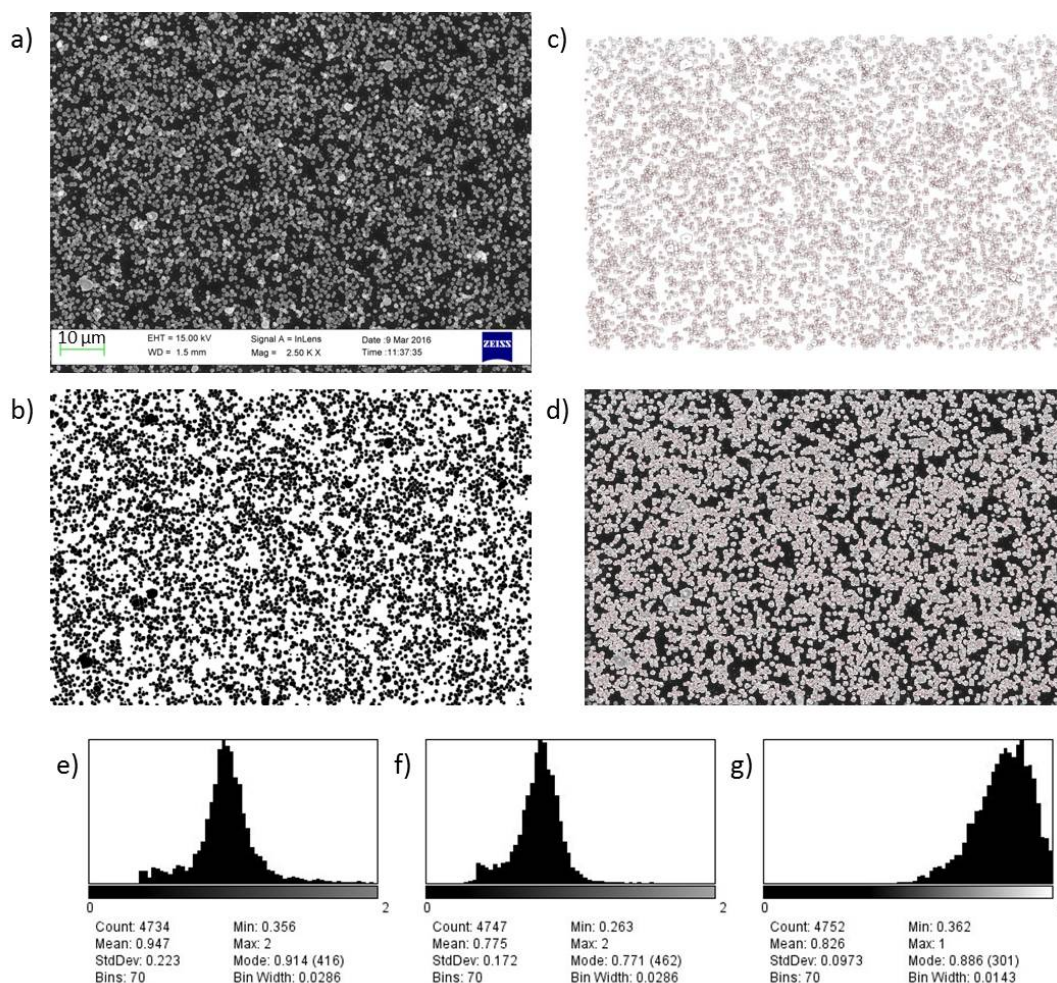
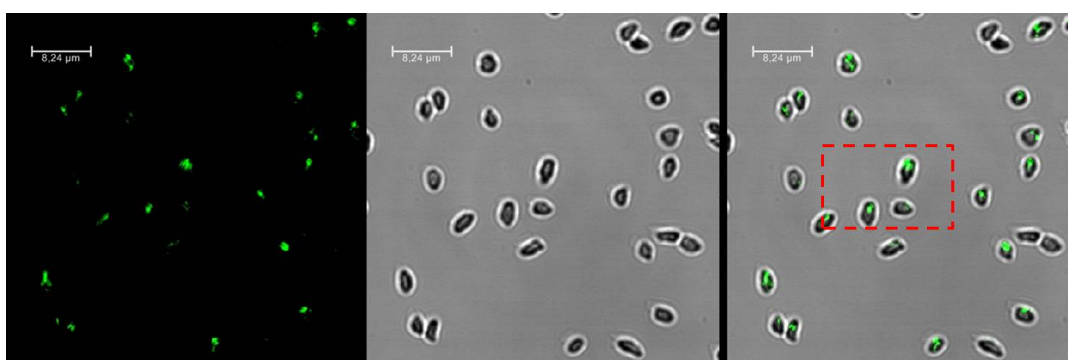


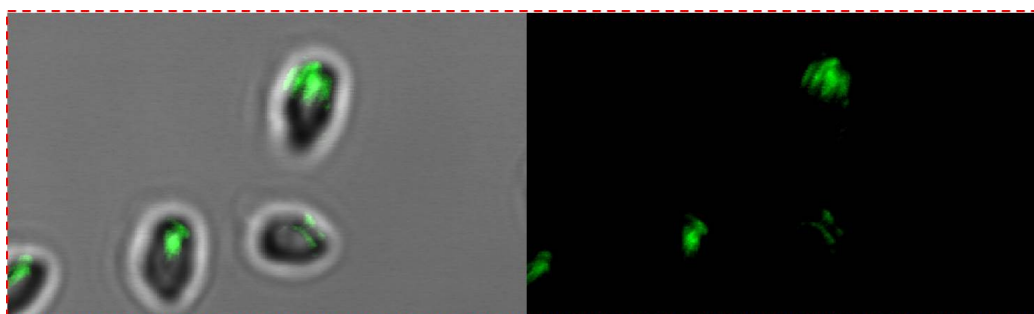
Abbildung 3.21: Auswertung der Partikelgröße, -form und deren Verteilung mit ImageJ. Dargestellt ist die Auswertung von PLGA 5004A-basierten Partikeln mit 20 Gew.-% ACC-Beladung. Das verwendete elektronenmikroskopische Bild ist in (a), das daraus erzeugte Binärbild in (b), die zugehörige Maske in (c) und die Maske über dem Ausgangsbild in (d) abgebildet. Zudem ist die Verteilung der Partikellänge in (e), Partikelbreite in (f) und „roundness“ in (g) mit den zugehörigen statistischen Parametern dargestellt.

Tabelle 3.6: Morphologische Auswertung der Janus-Partikel mittels ImageJ

PLGA	Wirkstoffbeladung	Anzahl der Partikel	Länge [μm]	Breite [μm]	<i>roundness</i>
85-15	unbeladen	1082	$1,39 \pm 0,47$	$1,34 \pm 0,42$	$0,69 \pm 0,14$
	ACC 20 Gew.-%	2864	$1,22 \pm 0,43$	$0,91 \pm 0,32$	$0,75 \pm 0,14$
	AZT 20 Gew.-%	4685	$0,64 \pm 0,27$	$0,52 \pm 0,21$	$0,82 \pm 0,10$
	AZT/ACC 20 Gew.-%	2328	$1,05 \pm 0,40$	$0,69 \pm 0,28$	$0,65 \pm 0,15$
	IBU 20 Gew.-%	714	$1,24 \pm 0,51$	$0,99 \pm 0,39$	$0,64 \pm 0,15$
	ICZ 20 Gew.-%	3375	$1,12 \pm 0,45$	$0,77 \pm 0,36$	$0,63 \pm 0,17$
5004A	ACC 20 Gew.-%	4752	$0,95 \pm 0,22$	$0,78 \pm 0,17$	$0,83 \pm 0,10$
5002A	ACC 20 Gew.-%	5929	$0,76 \pm 0,29$	$0,60 \pm 0,21$	$0,80 \pm 0,11$



(a) Janus-Partikel beladen mit einem Fluoreszenzfarbstoff in einem der beiden Kompartimente (Maßstab 8,24 μm). Dargestellt ist eine Fluoreszenzaufnahme, die zugehörige Durchlichtaufnahme sowie beide übereinander gelegt.



(b) Vergrößerung des markierten Ausschnitts aus (a).

Abbildung 3.22: Kompartimentierung der Janus-Partikel untersucht mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. IBU-beladene Janus-Partikel mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff in einem der beiden Kompartimente.

Weiterhin wurde die Kompartimentierung der Partikel mit dem konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop untersucht (Abbildung 3.22). Aufgrund der nicht eindeutig erkennbaren Kompartimentierung in Abbildung 3.22 wurden Partikel mit eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffen in beiden Kompartimenten mittels eines hochauflösenden Mikroskops (SIM) untersucht (Abbildung 3.23).

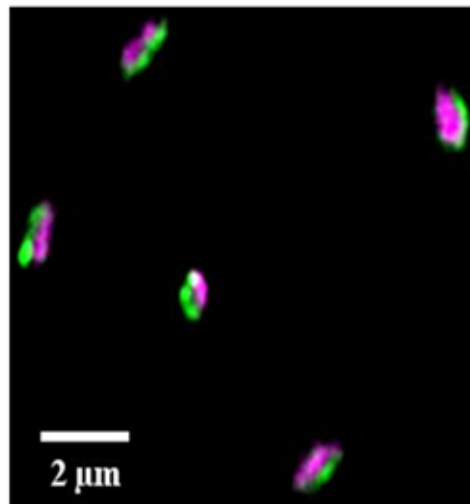


Abbildung 3.23: Kompartimentierung der Janus-Partikel untersucht mit einem hochauflösenden Mikroskop. Partikel mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen in beiden Kompartimenten. Aufnahme durchgeführt von Kai Weißenbruch, Zoologisches Institut; KIT-Campus Süd.

In jedem dieser Partikel sind zwei getrennte Kompartimente deutlich zu erkennen. Diese Aufnahme zeigt auch, dass die Fluoreszenzfarbstoffe nicht in andere Kompartimente migrieren. Davon kann bei den Wirkstoffen aufgrund ihrer Molekülgrößen auch ausgegangen werden.

3.4.2 Wirkstofffreisetzung aus den Partikeln

Die Freisetzungsraten der Wirkstoffe aus den Partikeln wurde mittels Dialyse und anschließender HPLC überprüft. Die Freisetzung von ICZ konnte aufgrund seiner großen Wasserunlöslichkeit unter physiologischen Bedingungen nicht gemessen werden. Für die Wirkstoffe AZT, ACC und IBU wurde eine Drei-Punkt-Kalibration angefertigt. Eine Steigung von $76,6 \pm 1,4$ wurde für AZT, eine Steigung von $16,6 \pm 0,3$ für ACC und eine Steigung von $81,4 \pm 1,4$ für IBU ermittelt (je $n = 20$). Über die Steigung kann die Konzentration der während der Freisetzungsraten gemessenen Proben berechnet werden. Die Freisetzungsraten von Partikeln bestehend aus PLGA 85-15 wurden über 96 h zu bestimmten Zeitpunkten aufgenommen (Abbildung 3.24). Die Freisetzungsraten von ACC-beladenen Partikeln betrug $60,34 \% \pm 3,70 \%$ ($n = 8$) und für IBU-beladene Partikel $78,05 \% \pm 3,72 \%$ ($n = 8$). Die Freisetzungsraten von AZT-beladenen Partikeln war $77,04 \% \pm 6,90 \%$ ($n = 8$) und für ACC-AZT-beladenen Partikeln betrug sie $61,78 \% \pm 5,15 \%$ ($n = 3$) und $72,52 \% \pm 3,48 \%$ ($n = 3$). Eine Beeinflussung der Freisetzungsraten aufgrund der unterschiedlichen Medikamente in den separaten Partikelkompartimenten wurde nicht beobachtet (Partikelzusammensetzung Tabelle 2.14).

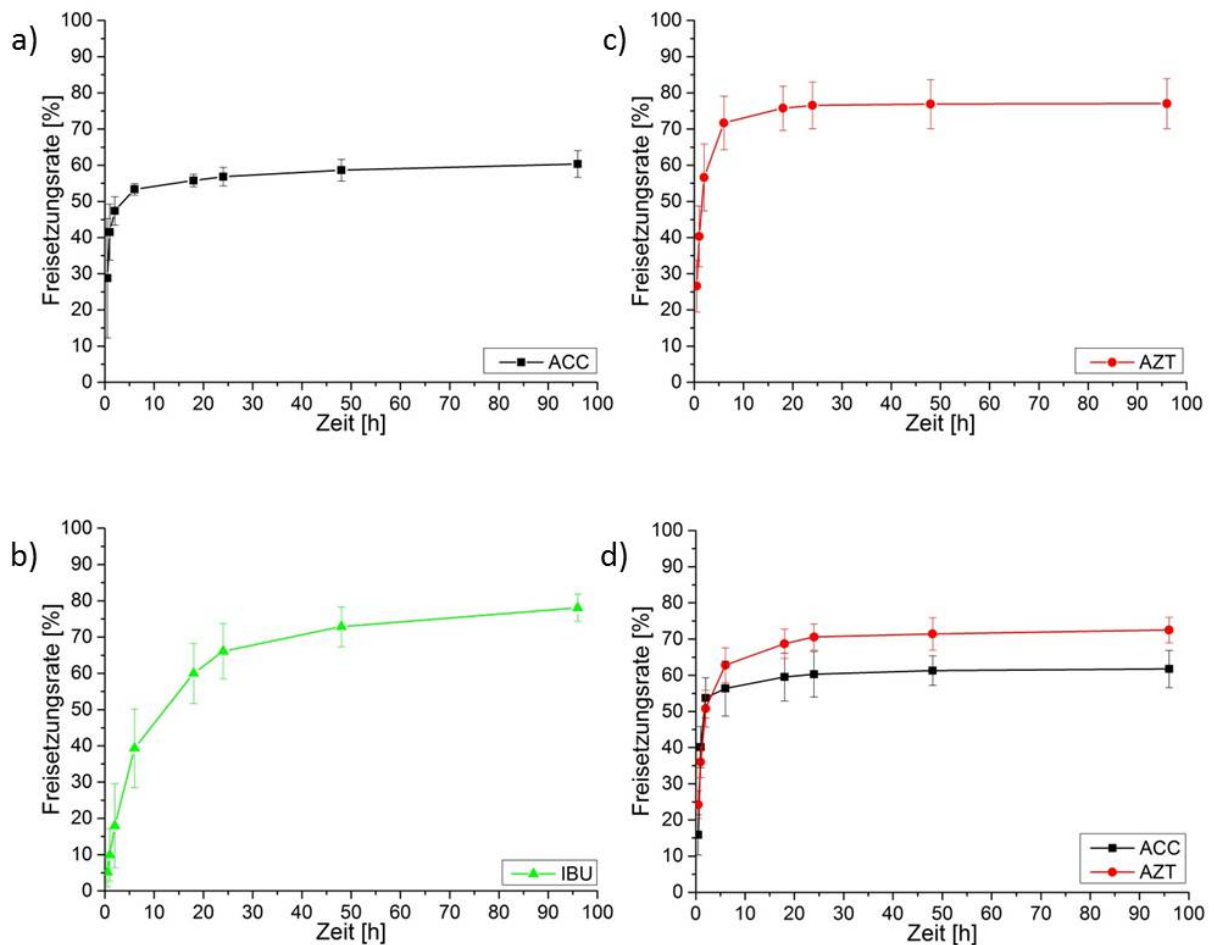


Abbildung 3.24: Freisetzungsraten der eingelagerten Wirkstoffe, in % über 96 h bezogen auf die Gesamtmenge an eingelagertem Wirkstoff. ACC-beladene Partikel (a), IBU-beladene Partikel (b), AZT-beladene Partikel (c) und ACC-AZT-beladene Partikel (d). Alle Partikel bestanden aus PLGA 85-15.

Die Freisetzung von ACC aus den Partikeln, die durch die Verwendung von unterschiedlichen Polymeren funktionalisiert wurden, ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Des Weiteren wurde eine Kontrolle, welche nur den Wirkstoff ACC enthielt, mitgeführt. Nach 96 h wurden für die Partikel aus PLGA 85-15 60,0%, für die Partikel aus PLGA 5004A 60,3% und für die Partikel aus PLGA 5002A 90,9% ACC kumulativ in der umgebenden Lösung gemessen. Die Freisetzungsrate von ACC aus den Partikeln, die aus PLGA 5002A aufgebaut sind, ist nach 96 h noch nicht im Gleichgewicht. In der Kontrollprobe wurden 93,8% des eingesetzten ACCs nachgewiesen.

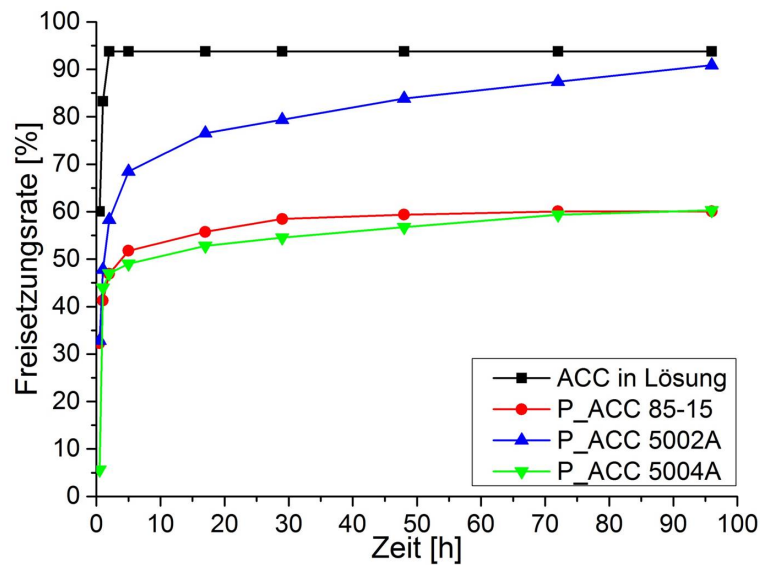


Abbildung 3.25: Freisetzungsrate von ACC über 96 h aus Partikeln aufgebaut aus unterschiedlichen Polymeren. Freisetzungsrate der ACC-beladenen Partikel aus PLGA 85-15 (rote Punkte), PLGA 5004A (grüne Dreiecke) und PLGA 5002A (blaue Dreiecke). Die Partikelbeladung von 20 Gew.-% war bei allen Partikeln identisch. Die Kontrolle mit reinem ACC ist mit schwarzen Quadraten markiert.

3.5 Biologische Charakterisierung der wirkstoffbeladenen Partikel *in vitro*

3.5.1 Antimikrobielle Wirkung

Es wurde die antimikrobielle Wirkung des eingelagerten Antibiotikums (AZT) bzw. des eingelagerten Antimykotikums (ICZ) gegenüber dem opportunistischen Humanpathogen *P. aeruginosa* bzw. *A. nidulans* mithilfe eines Hemmhoftests ermittelt. Dazu wurden Partikel mit unterschiedlicher Beladung und Konzentration eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Partikel ohne Beladung, welche in jedem Experiment mitgeführt wurden. Die Quantifizierung erfolgte über die Bestimmung der Hemmhofgröße (Abbildung 3.26). Unbeladene Partikel hatten jedoch keine hemmende Wirkung auf das Bakterien- oder Pilzwachstum. Die Ergebnisse der Hemmhofversuche in Interaktion mit *P. aeruginosa*-Wildtyp und unterschiedlichen klinischen Isolaten sind in Abbildung 3.27 und Tabelle 3.7 zusammengefasst.

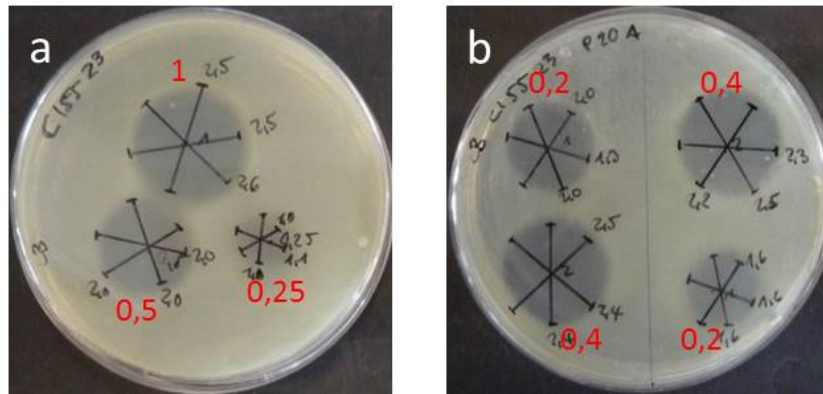


Abbildung 3.26: Antimikrobielle Wirkung von AZT-beladenen Janus-Partikel gegen CI5523. Beispielhafte Auswertung der Hemmhöfe von CI5523 mit AZT in Lösung (1, 0,5 und 0,25 mg/ml) (a) und AZT-beladenen Partikeln (1 und 2 mg/ml) in (b). Angaben im Bild (rot) entsprechen der Gesamtmenge an AZT in mg/ml. Die Versuche wurden pro Stamm mindestens in fünf unabhängigen Versuchen wiederholt. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für einen oft größeren Hemmhof der Partikelproben, trotz der geringeren AZT-Beladung im Vergleich zum Wirkstoff in Lösung. (CI = klinisches Isolat aus dem Bronchialsekret eines CF-Patienten)

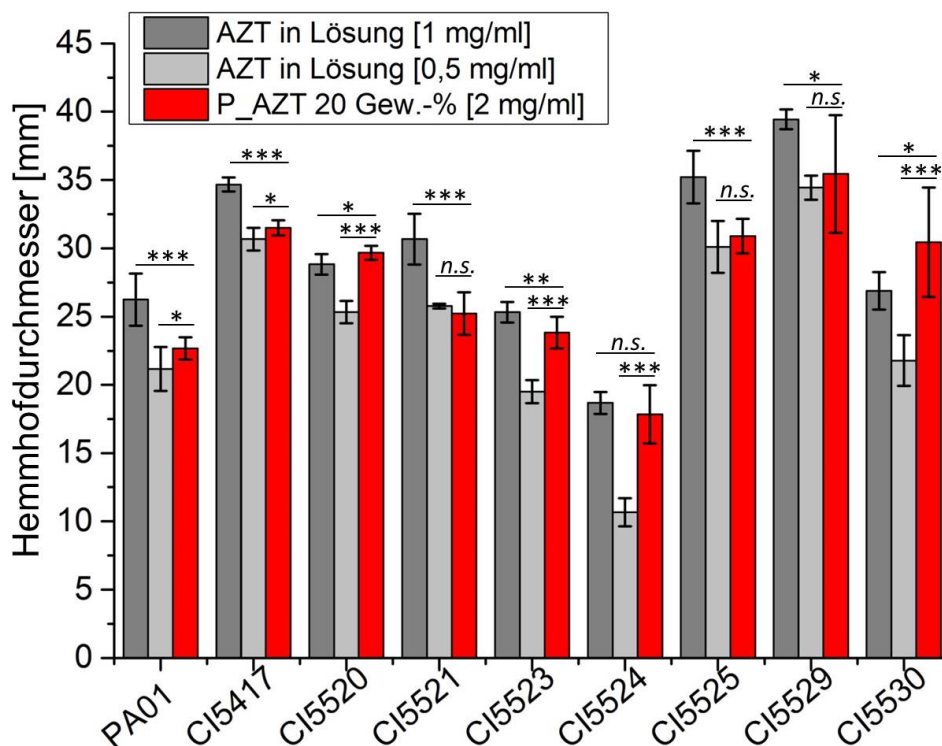


Abbildung 3.27: Antimikrobielle Wirkung von AZT-beladenen Partikeln gegen den *P. aeruginosa*-Wildtyp und unterschiedlichen klinischen Isolaten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte für 1 mg/ml AZT (dunkel grau), 0,5 mg/ml (hell grau) und 2 mg/ml Partikel mit 20 Gew.-% AZT (rot). Die Fehlerbalken repräsentieren die zugehörigen Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$ und n. s. = nicht signifikant; $n = 5$ unabhängige Versuche pro Stamm).

Tabelle 3.7: Ergebnisse der Hemmhofauswertung in Interaktion mit Bakterien

Stamm	1 mg/ml AZT [mm]	0,5 mg/ml AZT [mm]	P AZT (2 mg/ml) [mm]
PA01	26,25 ± 1,91	21,17 ± 1,6	22,67 ± 0,82
CI5520	28,83 ± 0,75	25,33 ± 0,82	29,67 ± 0,52
CI5521	30,67 ± 1,87	25,78 ± 0,17	25,22 ± 1,56
CI5523	25,33 ± 0,75	19,50 ± 0,84	23,83 ± 1,17
CI5524	18,67 ± 0,82	10,67 ± 1,03	17,83 ± 2,14
CI5525	35,22 ± 1,92	30,11 ± 1,90	30,89 ± 1,27
CI5529	39,44 ± 0,73	34,44 ± 0,88	35,44 ± 4,30
CI5530	26,89 ± 1,36	21,78 ± 1,86	30,44 ± 4,00
CI5417	34,67 ± 0,52	30,67 ± 0,82	31,50 ± 0,55

Auf Basis der Hemmhofdurchmesser von AZT-beladene Partikeln (20 Gew.-% AZT; Konzentration 2 mg/ml; AZT-Gesamtmenge: 0,4 mg/ml, Tabelle 3.7) im Vergleich zu AZT in Lösung (AZT-Gesamtmenge: 0,5 mg/ml, Tabelle 3.7) ist es möglich, die relative Inhibition zu berechnen (Abbildung 3.28). Es wurde nicht berücksichtigt, dass sich 20 % weniger Wirkstoff in der Partikelprobe befand. Die AZT-beladenen Partikel zeigen überwiegend eine effektivere Inhibition des Bakterienwachstums als eine 20 % höhere Menge an AZT in Lösung. Die 100 % markieren die durch AZT in Lösung erreichten Hemmhofdurchmesser, die Balken stehen für die Hemmhofdurchmesser, welche durch die mit 20 % weniger AZT-beladenen Partikel erreicht wurden (Abbildung 3.28).

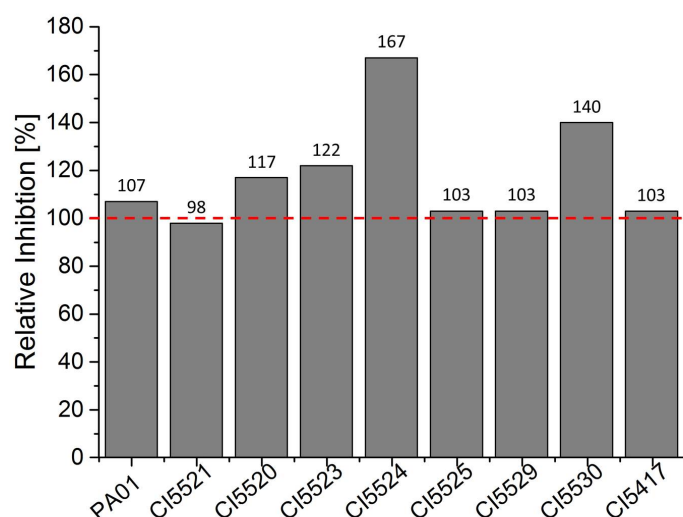


Abbildung 3.28: Relative Inhibition von Bakterien durch AZT-beladene Partikel im Vergleich zu AZT in Lösung. Die Gesamtbeladung der Partikel mit AZT betrug 0,4 mg/ml im Vergleich zu 0,5 mg/ml AZT in Lösung. Diese 20 % weniger AZT in den Partikeln wurde in der Berechnung nicht berücksichtigt. Basis für die Ermittlung der relativen Inhibition sind die Werte der Hemmhofdurchmesser in Tabelle 3.7.

Die antimykotische Wirkung des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Antimykotikums ICZ wurde in Interaktion mit zwei *A. nidulans*-Stämmen untersucht. ICZ ist nur sehr geringfügig in Wasser löslich, sodass es zuerst in DMSO (5 g/l) und anschließend in sterilem VE-H₂O verdünnt wurde. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Partikel für dieses Experiment, ebenso wie ICZ in Lösung, zuerst in DMSO und anschließend in Wasser suspendiert. Das Wachstum der Pilze wurde durch die Freisetzung des ICZs aus den Partikeln gehemmt, sodass sich Hemmhöfe von 17,2 mm ± 1,7 mm auf FGSCA4 und 17,7 mm ± 1,8 mm auf TNO2A3 bildeten (Abbildung 3.28). Unbeladene Partikel hatten keinen Einfluss auf das Pilzwachstum. 200 µg/ml ICZ hatten eine bessere Wirkung in Lösung (21,5 mm ± 1,6 mm auf FGSCA4 und 21,2 mm ± 2,7 mm auf TNO2A3) im Vergleich zu den mit derselben Menge an ICZ beladenen Partikeln. Für beide eingesetzten Pilzstämme (FGSCA4 und TNO2A3) wurden ähnliche Hemmhofdurchmesser in Interaktion mit ICZ in Lösung bzw. den ICZ-beladenen Partikeln gemessen (Abbildung 3.28). Wurde ICZ in Wasser suspendiert und direkt für die Hemmhofversuche eingesetzt, trat im Gegensatz zu den ICZ-beladenen Partikeln kein Hemmhof auf. Dieses Ergebnis zeigt, dass es durch die Partikel möglich ist, einen quasi wasserunlöslichen Stoff in eine für den Patienten applizierbare, ungiftige Form zu bringen.

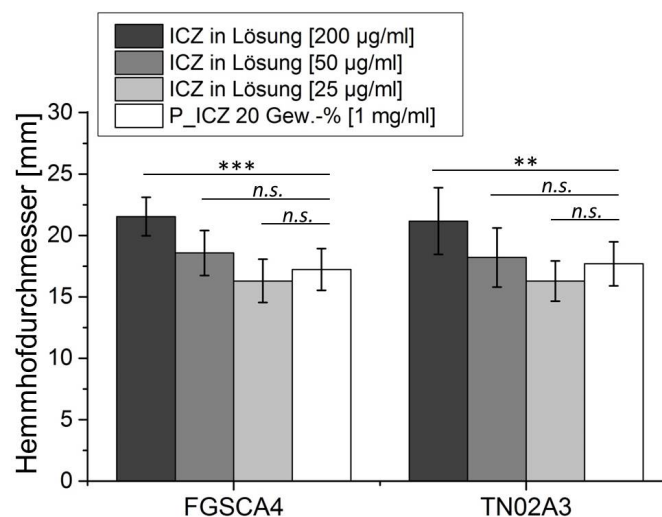


Abbildung 3.29: Hemmhöfe der ICZ-beladenen Partikel in Interaktion mit *A. nidulans*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte für 200 µg/ml ICZ (dunkelgrau), 50 µg/ml ICZ (mittelgrau), 25 µg/ml ICZ (hellgrau) und 1 mg/ml Partikel mit 20 Gew.% ICZ (weiß). Die Fehlerbalken repräsentieren die zugehörigen Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben (**: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$ und *n. s.* = nicht signifikant; $n = 9$).

3.5.2 Aufbau und Charakterisierung von 3D-Testsystemen der Atemwegsschleimhaut

Die Atemwegsschleimhaut dient als Barriere für Partikel, Bakterien und Viren. Sie besteht aus einem mehrreihigen, kinozilientragenden Säulenepithel, das auch Flimmerepithel genannt wird. Ziel in diesem Teil der Arbeit war es, 3D-Testsysteme aufzubauen, diese in Interaktion mit den wirkstoffbeladenen Partikeln zu untersuchen und die unterschiedlichen

Partikelfunktionen zu charakterisieren. Die häufigsten Zelltypen im tracheobronchialen Epithel sind die Becherzellen, Flimmerzellen und Basalzellen. Die Basalzellen sind die Vorläuferzellen und über die Basalmembran in das darunter liegende Bindegewebe verankert. Sie können zu Flimmer- oder Becherzellen differenzieren, die ebenfalls auf der Basalmembran aufsitzen. Zur Charakterisierung der in dieser Arbeit generierten 3D-Testsysteme der Atemwegsschleimhaut (Schweinlin et al., 2016) wurden wichtige zellspezifische Marker histologisch angefärbt (Abbildung 3.30). Die HE-Färbung dient als Übersichtsfärbung (a), mit Vimentin lassen sich Bestandteile des Zytoskelettes von Fibroblasten anfärben (b), mit Cytokeratin 5/6 werden Basalzellen (c) und mit Cytokeratin 18 differenzierte Epithelzellen angefärbt (d). MUC5AC (e) und MUC5B (f) dienen zum Nachweis der wichtigsten Mucine im Epithel der leitenden Atemwege.

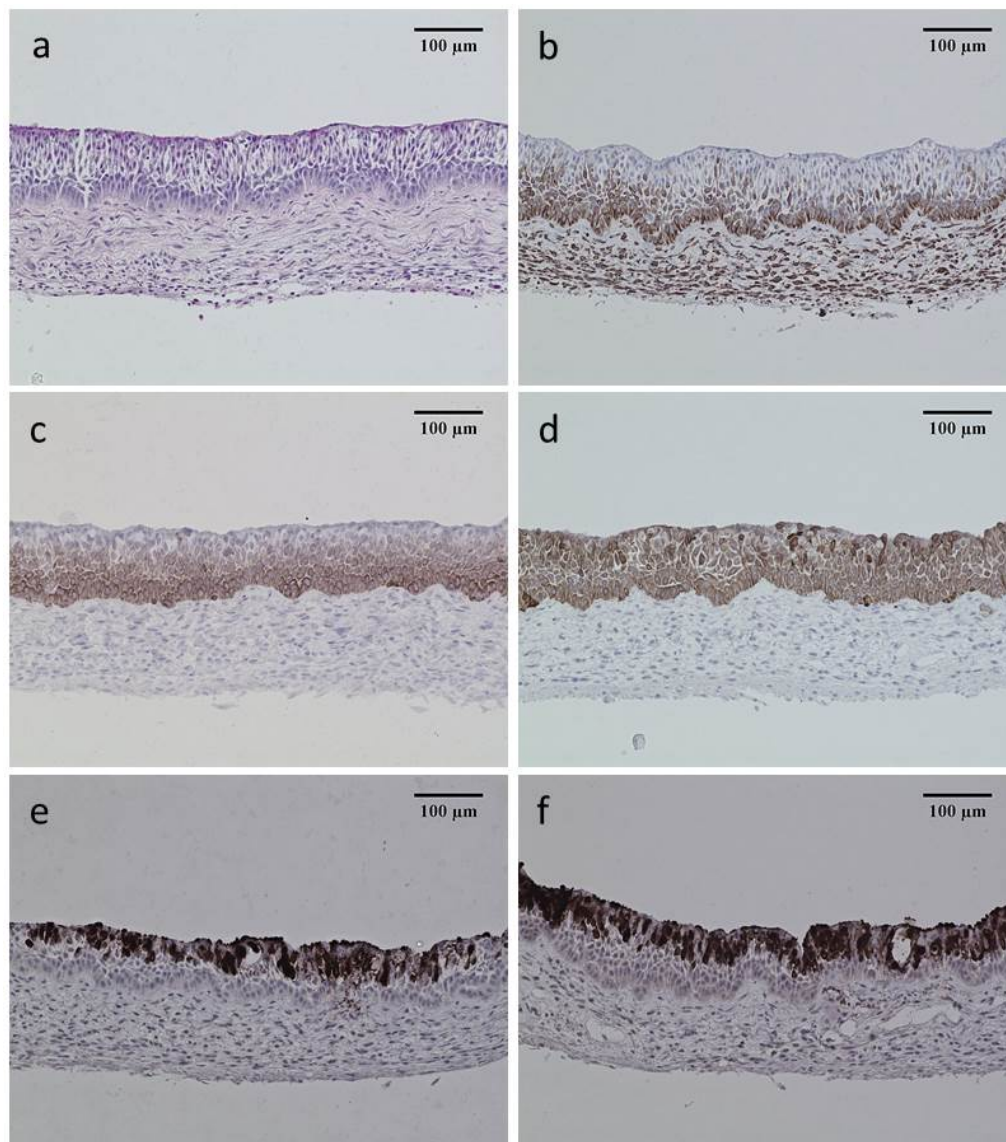


Abbildung 3.30: Histologische Charakterisierung des 3D-*in vitro*-Testsystems der Atemwegsschleimhaut. HE-Färbung (a), Vimentin-Färbung (b), Cytokeratin 5/6-Färbung (c), Cytokeratin 18-Färbung (d), MUC5AC-Färbung (e) und MUC5B-Färbung (f).

3.5.3 Interaktion der Janus-Partikel mit humanen Zellen in der 2D-Kultur

In den ersten Versuchen wurde die Nachweisbarkeit und Interaktion der in dieser Arbeit erzeugten Janus-Partikel in 2D-Zellkulturen unter Verwendung von humanen tracheobronchialen Fibroblasten, humanen tracheobronchialen Epithelzellen (hTEC) oder einer Atemwegsepithelzelllinie (Calu-3) analysiert. Hierfür wurden die Partikel in zellspezifischem Medium suspendiert und für 2-4 h apikal mit den Zellen inkubiert. Nach der Inkubation und den folgenden Wasch-, Fixier- und Färbeschritten zeigte sich zum Einen, dass die Partikel auch nach der Fixierung der Zellen mit PFA mittels Fluoreszenzmikroskop nachweisbar sind und zum Anderen, dass die Partikel sich vorzugsweise an die Zellen und nicht an die Glasoberfläche des Objektträgers anlagern (Abbildung 3.31). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Menge der angelagerten Partikel zwischen den 2h- und den 4h-Proben festgestellt werden. Eine Konzentration von 1 mg/ml erwies sich als geeignet.

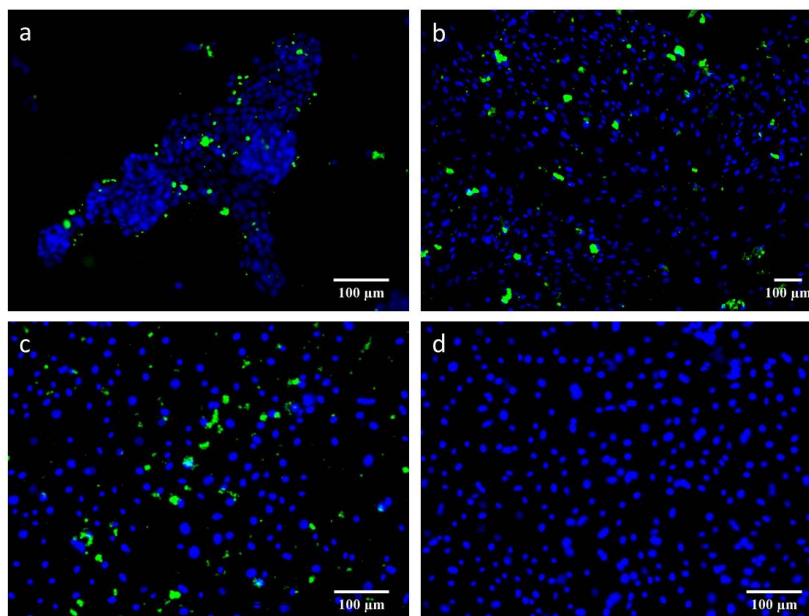


Abbildung 3.31: Nachweis der Partikel nach der Inkubation mit humanen Zellen in 2D. Janus-Partikel (1 mg/ml) wurden für 4 h mit einer Atemwegsepithelzelllinie (Calu-3) (a), tracheobronchiale Fibroblasten (b) oder tracheobronchiale Epithelzellen (c) inkubiert. (d) zeigt eine Kontrolle mit tracheobronchialen Epithelzellen ohne Partikel. Die Zellkerne sind mit blauer und die Partikel mit grüner Fluoreszenz dargestellt.

3.5.4 Interaktion der Partikel mit den 3D-Testmodellen

Das Ziel bei der Erzeugung der 3D-Testmodelle war es, die Struktur sowie die notwendigen Zelltypen der humanen Atemwegsschleimhaut so ähnlich wie möglich zu gestalten. Dies ermöglicht es, die Interaktion der Partikel mit den auf der Modelloberfläche der 3D-hTEC-Modelle befindlichen Kinozilien bzw. dem Schleim auf der Modelloberfläche der Calu-3-Modelle so realistisch wie möglich zu untersuchen.

Die Interaktion mit den Kinozilien konnte mittels histologischer Untersuchungen (Abbildung 3.32 a) sowie mittels einer Hochgeschwindigkeitskamera (HGK) analysiert werden (Abschnitt 3.5.4.2). Hierfür wurden Aufnahmen der 3D-Modelle nach der 4-stündigen Inkubation mit den Partikeln mittels HGK durchgeführt und anschließend die Modelle für die histologische Auswertung fixiert und in Paraffin eingebettet. Als Positivkontrolle und zur Veranschaulichung der *in vitro*-/*in vivo*-Korrelation dient mit Anti-Vimentin gefärbtes humanes Bronchusgewebe (Abbildung 3.32 b).

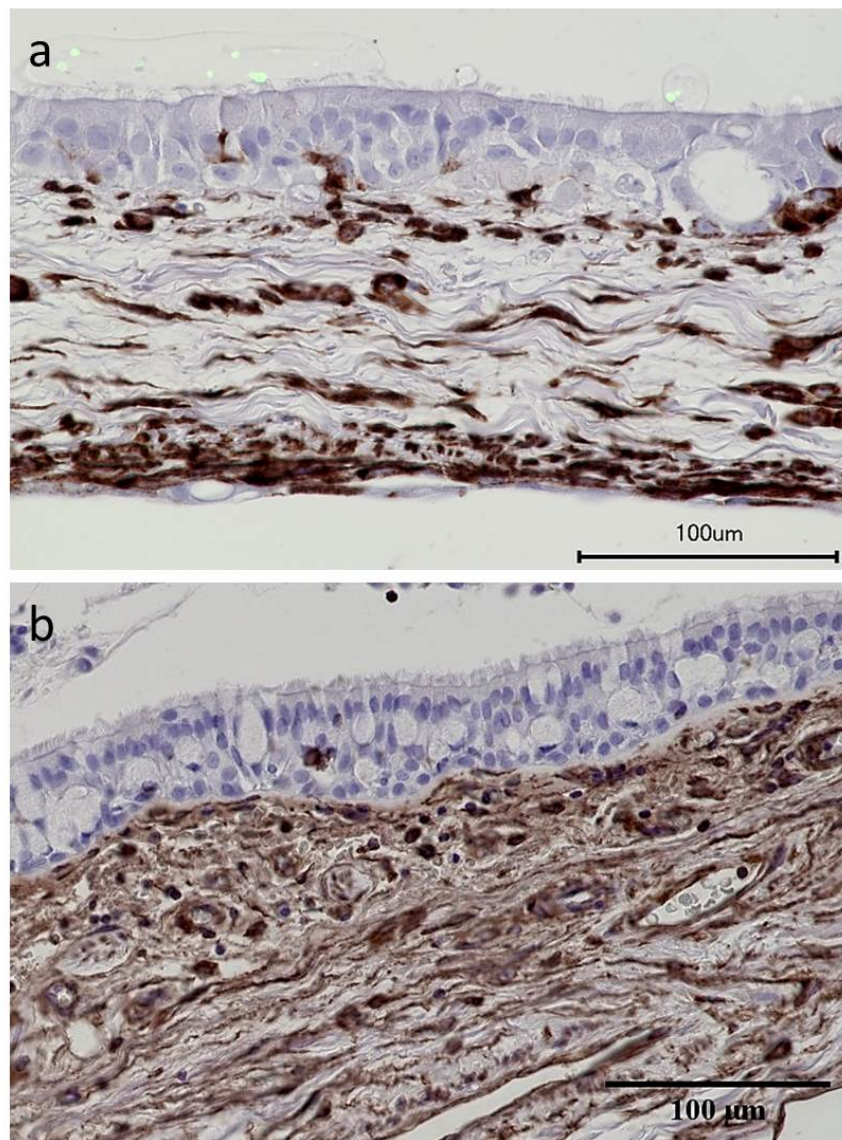


Abbildung 3.32: Interaktion von unbeladenen Partikeln mit den Kinozilien des 3D-*in vitro*-Testsystems der Atemwegsschleimhaut. Das hTEC-Modell wurde mit unbeladenen Partikeln (1 mg/ml) für 4 h inkubiert und die Fibroblasten mit einem Antikörper gegen Vimentin markiert. Eine Durchlicht- und eine Fluoreszenzaufnahme wurden übereinander gelegt. Die Partikel zeigen grüne Fluoreszenz und die Fibroblasten in der Kollagenmatrix sind braun angefärbt (a). Humanes Bronchusgewebe, ebenfalls Anti-Vimentin gefärbt, dient als Positivkontrolle (b).

Die homogene Verteilung der Partikel auf einem Calu-3-Modell wurde mittels Rasterelektronenmikroskop überprüft 3.33. In (a) ist eine REM-Aufnahme der Modelloberfläche ohne Partikel, in (b) Partikel und in (c) und (d) Partikel auf der Modelloberfläche abgebildet. In (e) ist eine HE-Färbung eines Calu-3-Modells zu sehen und die dazugehörige Fluoreszenzaufnahme in (f).

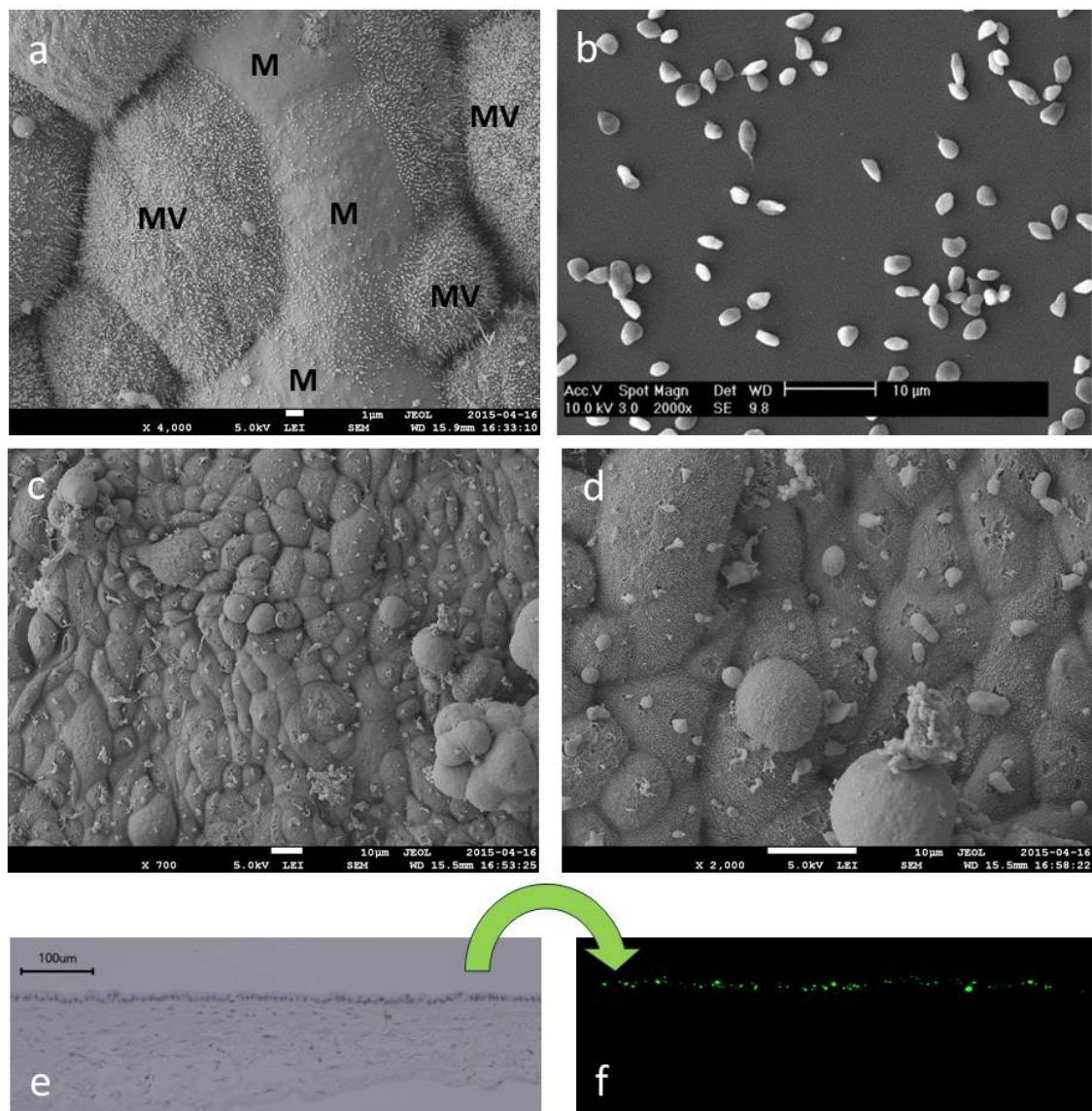


Abbildung 3.33: Homogene Partikelverteilung auf einem Calu-3-Modell. REM-Aufnahmen der Modelloberfläche ohne Partikel (a, Maßstab 1 µm; M = Mucus und MV = Mikrovilli), der Partikel (b, Maßstab 10 µm) und der Partikel auf der Modelloberfläche (c, Maßstab 10 µm) und (d, Maßstab 5 µm) nach 4-stündiger Inkubation. Eine HE-Färbung eines Calu-3 Modells ist in (e) abgebildet (Maßstab 100 µm) und die dazugehörige Fluoreszenzaufnahme in (f).

Nach einer Inkubationszeit von 4 h diffundieren die Partikel nicht in das 3D-Modell und werden auch nicht von den Zellen aufgenommen. Ähnliche Beobachtungen wurden

bei histologischen und ultrastrukturellen Untersuchungen gemacht. Eine Anti- β -Tubulin-Immunfluoreszenzfärbung an humanem Bronchusgewebe (Positivkontrolle) ist in Abbildung 3.34 (a) zu sehen. In (b) ist ein Calu-3-Modell und in (c) ist ein h-TEC Modell mit identischer Färbung abgebildet. Die Partikel (grüne Fluoreszenz) sind nur an der Modelloberfläche lokalisiert und stehen in (c) mit den Kinozilien des Flimmerepithels in Kontakt.

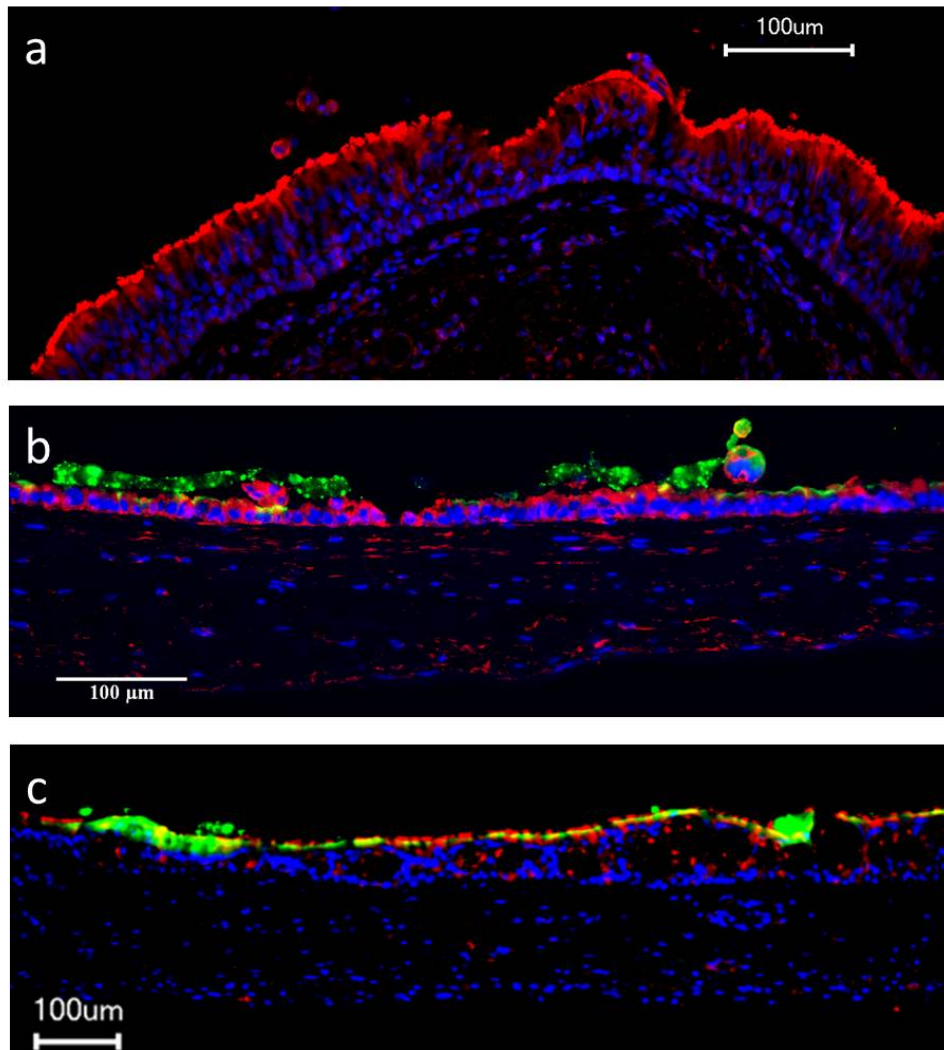


Abbildung 3.34: Lokalisation der Partikel auf den 3D-Modellen bzw. humanem Bronchusgewebe. Anti- β -Tubulin-Immunfluoreszenzfärbung von (a) humanem Bronchusgewebe, (b) Calu-3-Modell mit Partikeln und (c) hTEC-Modell mit Partikeln. β -Tubulin ist mit roter Fluoreszenz, Zellkerne sind mit blauer und Partikel sind in grüner Fluoreszenz dargestellt.

Um die Wirkung von AZT-beladenen Partikeln in einer Schleimmatrix zu untersuchen, wurden die AZT-beladenen Partikel (2 mg/ml) für 4 h auf Calu-3-Modellen inkubiert und anschließend mit der auf dem Modell befindlichen Schleimmatrix abgenommen. Je 10 μ l dieses Partikel-Schleim-Gemisches wurde pro Hemmhof für die antimikrobiellen Untersuchungen in Interaktion mit *P. aeruginosa*-Wildtyp eingesetzt (Abbildung 3.35). AZT in Lösung (0,5 mg/ml und 0,35 mg/ml) resultiert in einen 20,0 mm \pm 1,3 mm und 14,5 mm \pm 1,5 mm großen

Hemmhof. Apikal abgenommene Partikel nach 4-stündiger Inkubation auf den 3D-Modellen erreichen einen Hemmhof von $19,0 \text{ mm} \pm 1,8 \text{ mm}$. Als Kontrolle eingesetzte AZT-beladene Partikel (2 mg/ml ; entspricht einer AZT-Konzentration von $0,4 \text{ mg/ml}$) bewirken die Bildung eines Hemmhofes von $20,0 \text{ mm} \pm 2,7 \text{ mm}$. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das von den Zellmodellen nach der Inkubation apikal abgenommene Partikel-Schleimgemisch eine effektive anti-bakterielle Wirkung gegen *P. aeruginosa* hat. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Hemmhofdurchmessern von AZT-beladenen Partikeln mit und ohne Schleimmatrix sowie zu den Hemmhöfen von AZT in Lösung. Des Weiteren veranschaulicht dieses Ergebnis, dass das aus den Partikeln freigesetzte AZT durch die Schleimmatrix diffundiert.

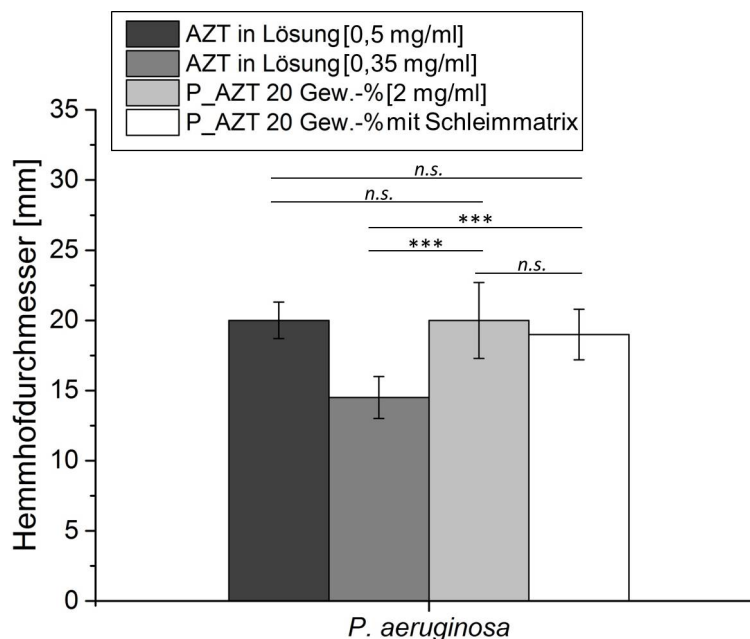


Abbildung 3.35: Hemmhofdurchmesser der mit AZT-beladenen Partikel in Kombination mit Schleim der 3D-Modelle. Dargestellt sind die Hemmhofdurchmesser für $0,5 \text{ mg/ml}$ AZT in Lösung (dunkelgrau), $0,35 \text{ mg/ml}$ AZT in Lösung (mittelgrau), 2 mg/ml Partikel mit $20 \text{ Gew.}\%$ AZT (P_AZT, hellgrau) und Partikel mit $20 \text{ Gew.}\%$ AZT (P_AZT) mit Schleimmatrix nach der Inkubation (weiß). Die Balken repräsentieren die jeweiligen Mittelwerte, die Fehlerbalken die zugehörigen Standardabweichungen (** *: $p \leq 0,001$ und *n. s.* = nicht signifikant; $n = 9$).

Um die schleimlösende Wirkung der mit ACC beladenen Partikel zu testen, wurde das Calu-3 Modell mit ACC-beladenen Partikeln inkubiert. Diese Zelllinie bildet überdurchschnittlich viel Schleim und ist daher für diese Untersuchung sehr gut geeignet. Mucinmoleküle sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. ACC schneidet diese Bindungen und verflüssigt so den Schleim Ratner et al. (2004). Als Positivkontrolle wurden die Mucinmoleküle von humanem Bronchusgewebe mit dem MUC5AC-Antikörpern markiert (Abbildung 3.36 a). Ein Kontrollmodell ohne Partikel ist in (b), ein Modell mit unbeladenen Partikeln ist in (c) und ein Modell mit ACC-beladenen Partikeln ist in (d) abgebildet. Die schleimlösende Wirkung der mit ACC beladenen Partikel ist in (d) deutlich an der geringeren Menge braun gefärbter Mucinen auf der Modelloberfläche zu sehen. An Stellen, an denen keine Partikel bzw. nur wenige Partikel sind, ist deutlich mehr Schleim vorhanden.

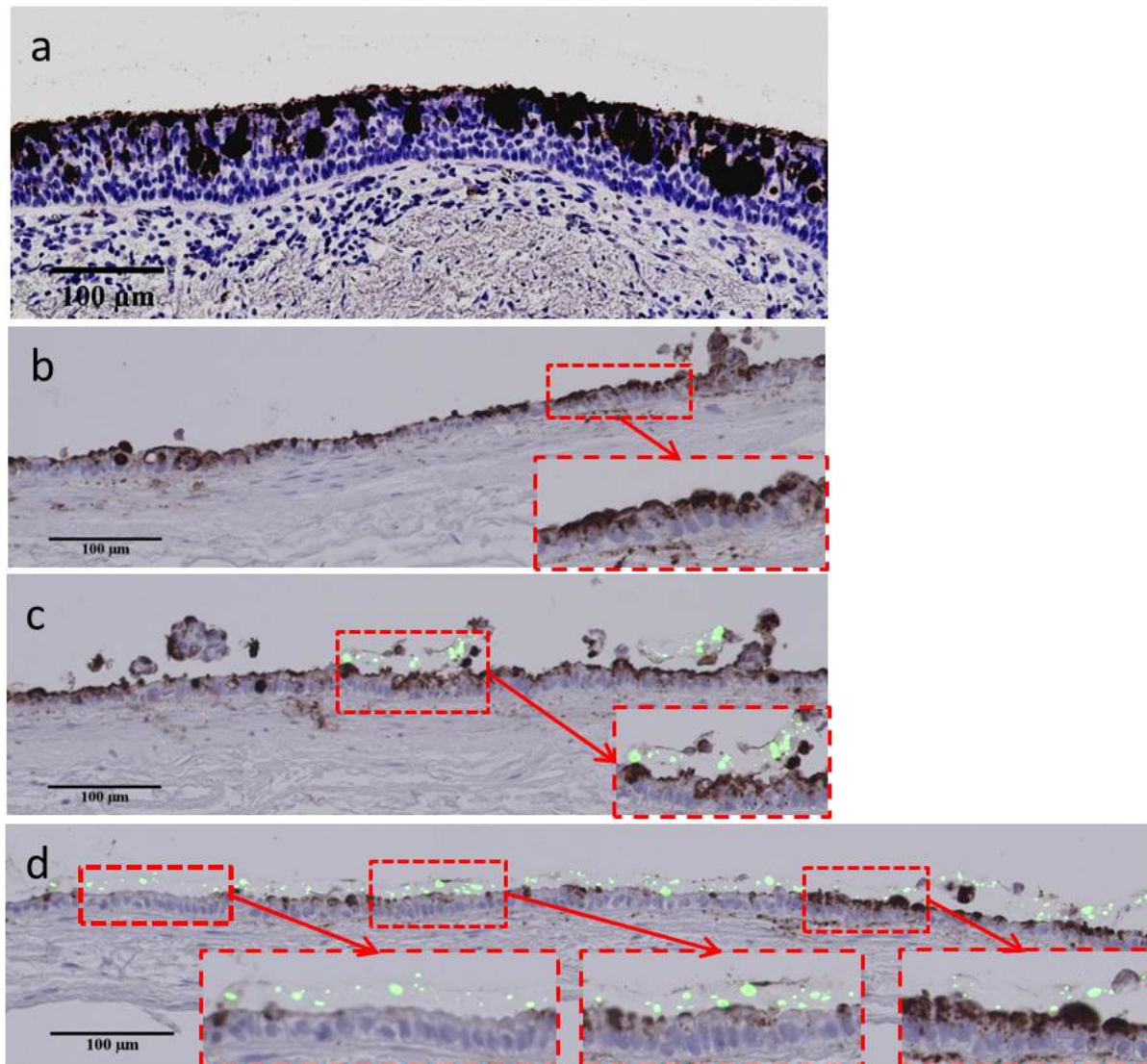


Abbildung 3.36: Untersuchung der schleimlösenden Eigenschaft von ACC-beladenen Partikeln an einem Calu-3-Modell. MUC5AC-Färbung von humanem Bronchusgewebe als Positivkontrolle (a), Calu-3-Modell ohne Partikel (b), Calu-3-Modell mit unbeladenen Partikeln in (c) und Calu-3-Modell mit ACC-beladenen Partikeln in (d). Die roten Ausschnitte markieren vergrößerte Bereiche. Der Mukus ist braun angefärbt.

Die schleimlösende Eigenschaft der mit ACC beladenen Partikel wurde ebenso in Interaktion mit humanem Bronchusgewebe getestet (Abbildung 3.37). Hierzu wurden die Proben nach 4-stündiger Inkubation mit den Partikeln fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Alcianblau gefärbt. In (a) ist die Kontrolle, in (b) die Interaktion von unbeladenen Partikeln (Vergrößerung in (d)) und in (e) die Interaktion von ACC-beladenen Partikeln mit dem Schleim von humanem Bronchusgewebe dargestellt. An den Stellen, an denen die mit ACC beladenen Partikel den Schleim nicht berührten, wurde der Schleim auch nicht gelöst, was in der Vergrößerung in (e) sichtbar ist. Stehen die Partikel hingegen in räumlichen Kontakt mit dem Schleim, so wird dieser sichtlich gelöst, was in der Vergrößerung in (f) deutlich zu sehen ist. Die Zilien sind in (f) vom zähflüssigen Schleim befreit.

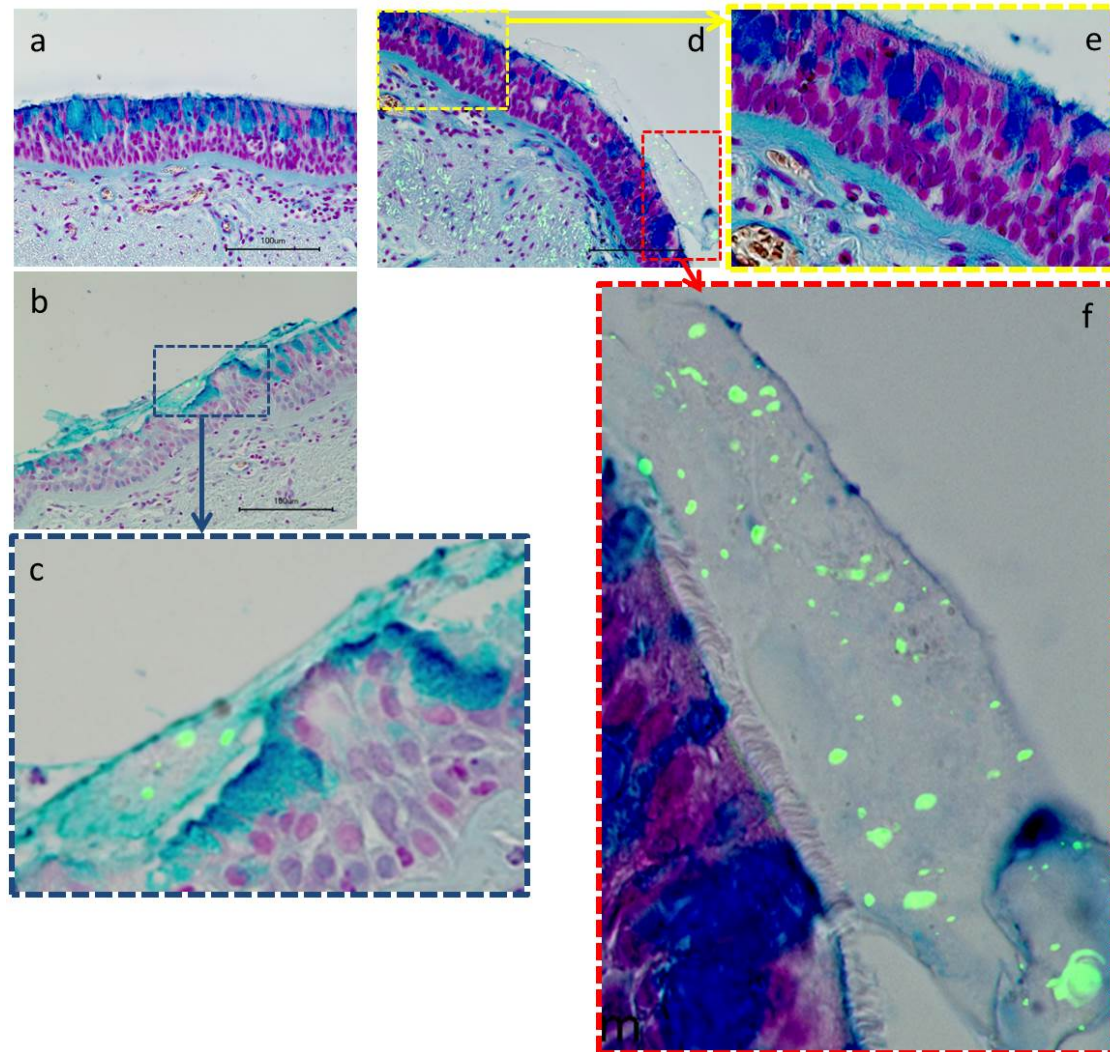


Abbildung 3.37: Untersuchung der schleimlösenden Eigenschaft von ACC-beladenen Partikeln an humanem Bronchusgewebe. Humanes Bronchusgewebe ohne Partikel diente als Kontrolle (a). Unbeladene Partikel auf humanem Bronchusgewebe in (b), Vergrößerung in (c), ACC-beladene Partikel in (d). Vergrößerung einer Stelle mit ungelöstem Schleim auf der Oberfläche des Bronchusgewebes in (e) und mit gelöstem Schleim in (f). Der Schleim ist durch die Alcianblau-Färbung blau gekennzeichnet.

3.5.4.1 Ultrastrukturanalyse mittels TEM und REM

Zur detaillierten Charakterisierung der hTEC-Modelle wurde eine ultrastrukturelle Analyse mittels TEM und REM durchgeführt. Hierbei standen die Kinozilien im Vordergrund, da diese in direktem Kontakt mit den Partikeln stehen. Des Weiteren sind sie eine wichtige Voraussetzung für ein funktionierendes 3D-Testmodell. In den Atemwegen spielen Kinozilien eine wichtige Rolle bei der Entfernung von Krankheitserregern und Fremdkörpern. Viele der gezüchteten 3D-Modelle bildeten Kinozilien aus (Abbildung 3.38). In (a) ist fast die komplette Modelloberfläche mit Kinozilien besetzt (Vergrößerungen in b und c). (d) zeigt einen längs angeschnittenen Basalkörper einer Zilie. Der Kinozilienquerschnitt ist in (e) und eine Vergrößerung in (f) abgebildet. Die Kinozilien sind alle in eine Richtung ausgerichtet.

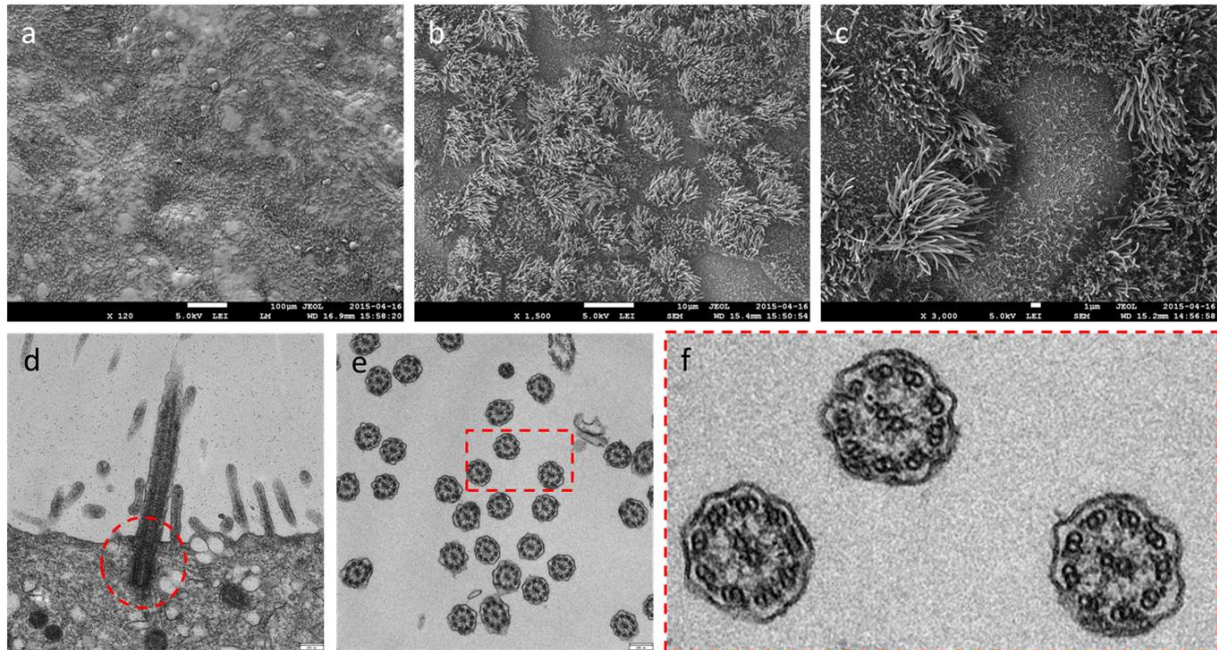
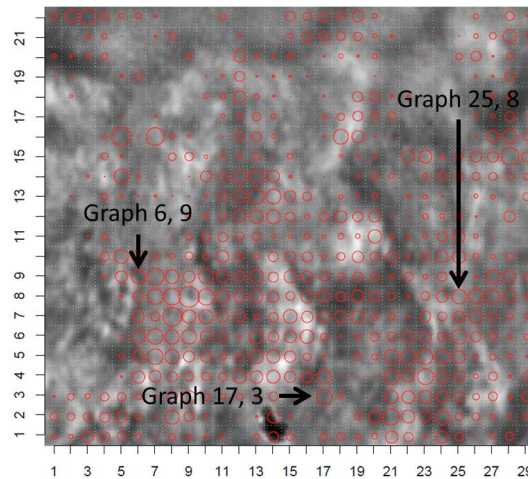


Abbildung 3.38: Ultrastrukturelle Untersuchung der Zilien. REM-Aufnahmen der Zilien auf der hTEC-Modelloberfläche in unterschiedlichen Vergrößerungen (a-c). TEM-Aufnahme eines längs geschnittenen Basalkörpers (d) und Kinozilienquerschnitt (e) mit Vergrößerung in (f).

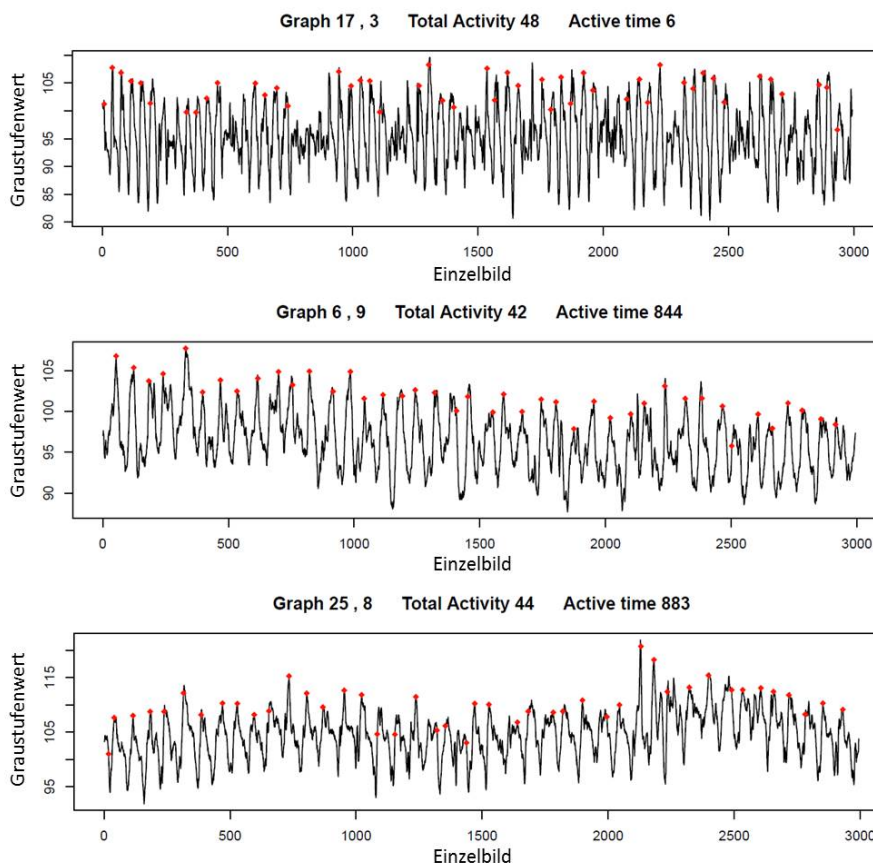
3.5.4.2 Untersuchung des Zilienschlags und des Partikeltransports

Die Schlagfrequenz der Kinozilien in der Trachea beträgt bei Körpertemperatur 15-20 Hz (von Mutius et al., 2013; Lüllmann-Rauch, 2009). Um einen Einblick in die Zilienaktivität und die Interaktion der Zilien mit den Partikeln auf der Zelloberfläche zu erhalten, wurden die differenzierten 3D-hTEC-Modelle mit einer HGK aufgenommen. Die Auswertung der Aufnahmen wurde von Juan Pablo Prada Salcedo am Biozentrum der Universität Würzburg auf Basis der Software ImageJ durchgeführt. Über den Parameter *total activity* werden die Bereiche mit der größten Bewegung identifiziert und mit großen Kreisen in der Übersicht markiert. Bei weniger Aktivität werden kleinere Kreise in das Bild eingefügt. Die Bewegung des Zilienschlages wird über die Farbänderung der Pixel in den Graustufenbildern der aufgenommenen Videos detektiert. Der Wert Null entspricht schwarz und 255 entspricht weiß. Durch die Berechnung der *speed of movement*, d. h. der durchschnittlichen Amplitude des Farbwechsels über die Zeit, ist es möglich, einen Schlag zu ermitteln. Ein Video ist 3,42 bzw. 10,0 s lang. Die Frequenz in Hertz ergibt sich aus der Anzahl von Schlagzyklen geteilt durch die Aufnahmezeit. Durch eine geeignete Wahl der *noise parameter* kann die Schlagerkennung aus den Hochpunkten der Graustufenkurve optimiert werden. Es war möglich, die Aufnahmen trotz mäßiger Qualität und leichter Unschärfe auszuwerten. Die Analyse ergab für die Zilien von humanem Bronchusgewebe eine Schlagfrequenz von ca. 8,6 Hz (ca. 86 Schlagzyklen in Graph 17,3 pro 10,0 s) (Abbildung 3.39). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Schlagfrequenz nicht einheitlich war. Es gab Bereiche auf der Zelloberfläche mit größerer und kleinerer Schlagfrequenz. Die Schlagfrequenz der hTEC-Modelle ist im Vergleich zu der von humanem Bronchusgewebe, mit ca. 3-4,5 Hz

(10-15 Schlagzyklen pro 3,42 s), geringer, jedoch ist ein metachroner Schlag der Kinozilien über große Bereiche der Modelle zu erkennen (Abbildung 3.40 und 3.41). Der angewandte Algorithmus markiert die Hochpunkte fast fehlerfrei.

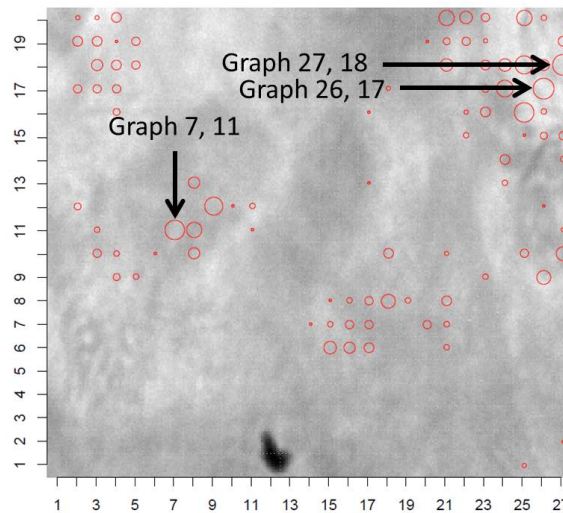


(a) Übersicht mit markierter Einzelauswertung.

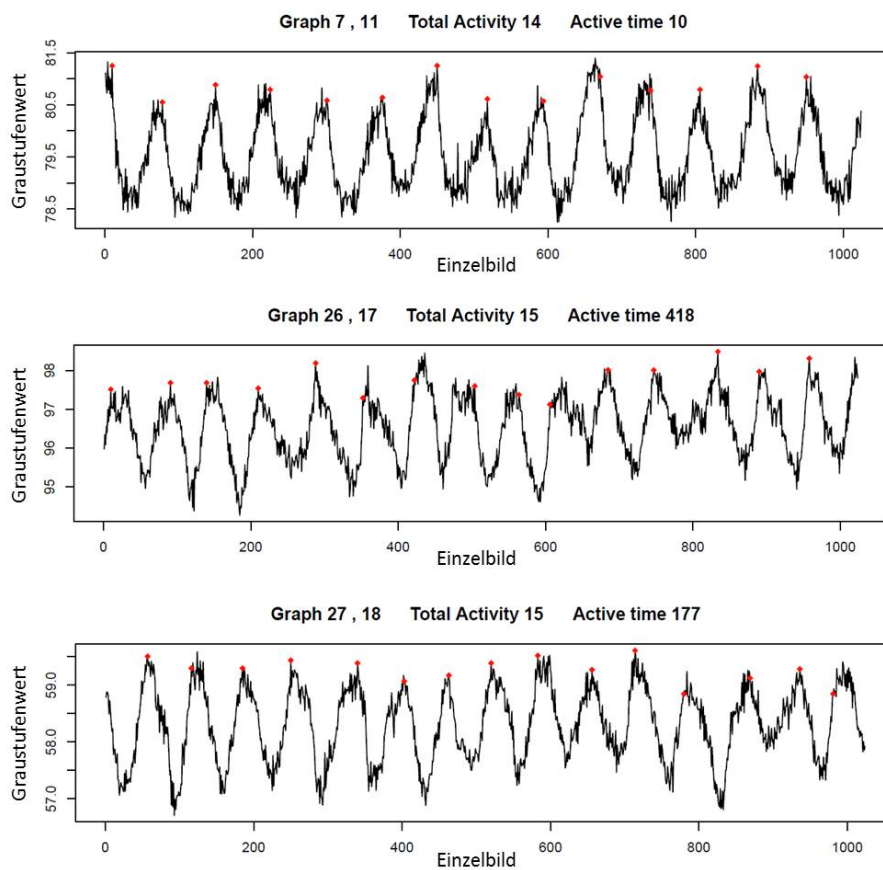


(b) Einzelauswertung

Abbildung 3.39: Schlagfrequenz der Zilien von humanem Bronchusgewebe. Auswertung zur Verfügung gestellt von Juan Pablo Prada Salcedo, Biozentrum des Universitätsklinikums Würzburg.

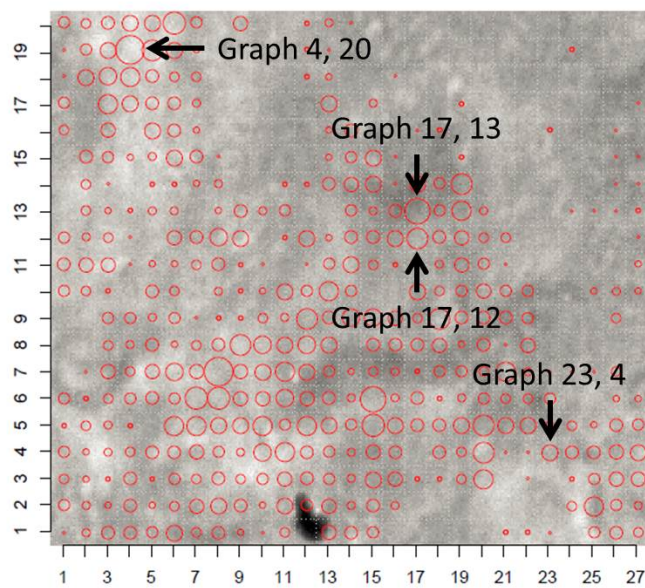


(a) Übersicht mit markierter Einzelauswertung.

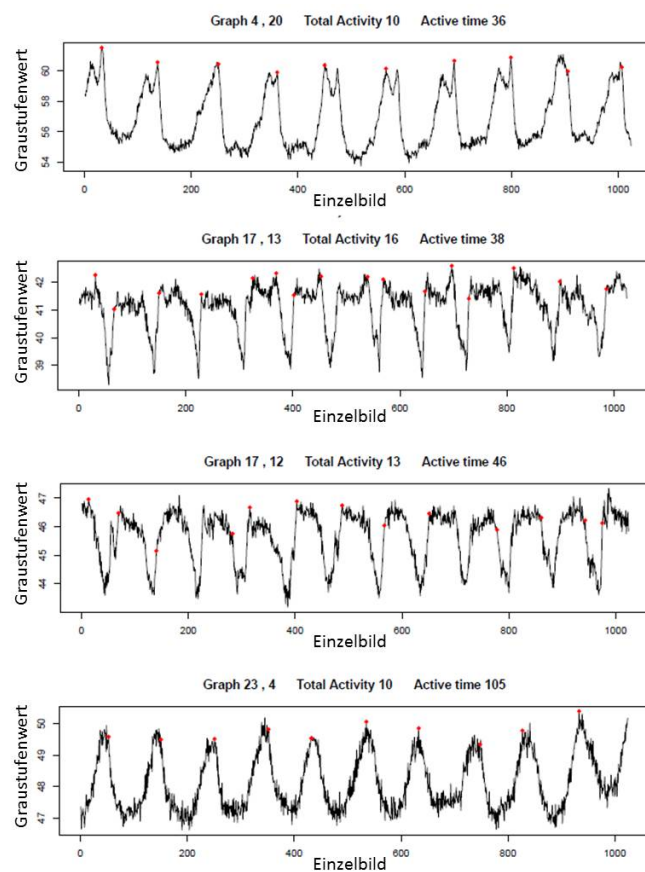


(b) Einzelauswertung

Abbildung 3.40: Schlagfrequenz der Zilien eines 3D-Modells der Atemwegsschleimhaut. Auswertung zur Verfügung gestellt von Juan Pablo Prada Salcedo, Biozentrum des Universitätsklinikums Würzburg.



(a) Übersicht mit markierter Einzelauswertung.



(b) Einzelauswertung

Abbildung 3.41: Schlagfrequenz der Zilien eines 3D-Modells der Atemwegsschleimhaut. Auswertung zur Verfügung gestellt von Juan Pablo Prada Salcedo, Biozentrum des Universitätsklinikums Würzburg.

Durch die Beobachtung einzelner Partikel bzw. kleiner Partikelagglomerate über die Zeit kann der Partikeltransport charakterisiert werden (Abbildung 3.42). Der mukoziliäre Abtransport des Schleims rachenwärts beträgt 2 mm/min in den distalen Bronchien und nimmt auf 13 mm/min in der Trachea zu (Lüllmann-Rauch, 2009). Der beobachtete Partikeltransport auf den flimmerepitheltragenden 3D-Modellen kann anhand der Aufnahmen nach 0,02 s, 1,74 s und 3,33 s berechnet werden und betrug ca. 0,6 mm/min (32,7 μm in 3,33 s; Abbildung 3.42). Die roten Pfeile markieren das Partikel, die grün-gestrichelten Linien sind zur Orientierung eingezeichnet und begrenzen den zurückgelegten Weg des Partikels.

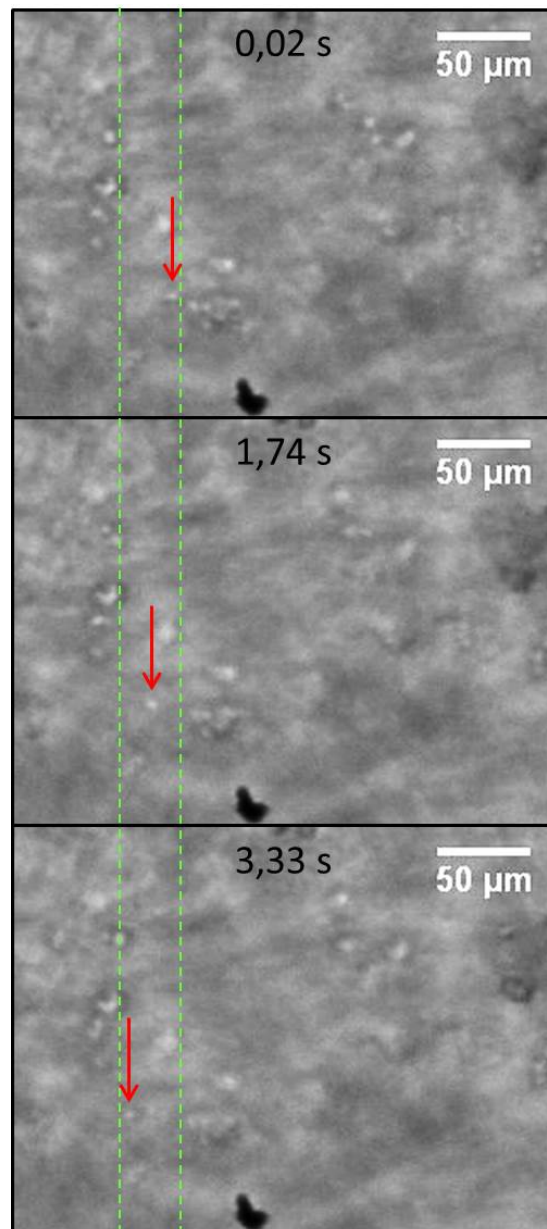


Abbildung 3.42: Partikeltransport auf einem zilentragenden 3D-Modell der Atemwegschleimhaut. Die roten Pfeile markieren das Partikel. Es sind die Einzelbilder nach 0,02 s (7. Bild), 1,74 s (520. Bild) und 3,33 s (998. Bild) dargestellt. Die grün-gestrichelten Linien sind zur Orientierung eingezeichnet und begrenzen den zurückgelegten Weg des Partikels.

3.5.4.3 Apoptose- und Entzündungsmarker

Eine mögliche toxische Eigenschaft der Partikel wurde durch ELISA-Untersuchungen von Apoptose- (lösliche, Caspase-gespaltene Fragmente des Intermediärfilament-Proteins Cytokeratin-18) und Entzündungsmarkern (IL-6) je vor und nach der Inkubation mit Partikeln im basalen Überstand der 3D-Modelle analysiert. Die Partikel lösen nach 4 h Inkubation keine nachweisbare Apoptose in den 3D-Zellmodellen aus, was durch den M30 ELISA bestätigt wurde. Die gemessenen IL-6 Entzündungswerte liegen in einem normalen Bereich (Tabelle 3.8) und stehen in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Oehme (2015) an humanen Bronchialepithelzellen. Die Partikel hatten keinen signifikanten Einfluss auf den Entzündungsmarker IL-6 (Abbildung 3.43).

Tabelle 3.8: IL-6-Konzentration im basalen Nährmedium der Kontrollmodelle sowie vor und nach der Partikelinkubation

	hTEC-Modelle [pg/ml]	Calu-3-Modelle [pg/ml]
Kontrollmodelle vor der Inkubation	649,5 ± 208,3	401,5 ± 172,3
Kontrollmodelle nach der Inkubation	497,9 ± 92,6	525,0 ± 163,6
Modelle vor der Partikelinkubation	525,9 ± 75,6	414,2 ± 134,9
Modelle nach der Partikelinkubation	478,6 ± 171,7	441,8 ± 117,1

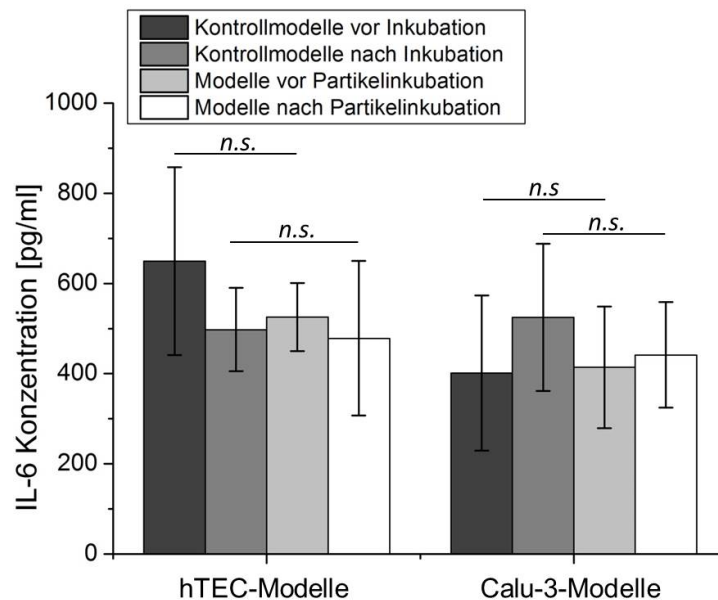


Abbildung 3.43: IL-6-Konzentrationen im basalen Überstand der 3D-Modelle vor und nach der Partikelinkubation. Kontrollmodelle vor der Inkubation (dunkelgrau), Kontrollmodelle nach der Inkubation (mittelgrau), Modelle vor Partikelinkubation (hellgrau) und Modelle nach Partikelinkubation (weiß). Da dieselben Kulturen vor und nach der Inkubation gemessen wurden, wurde ein gepaarter T-Test durchgeführt. Die Balken repräsentieren die jeweiligen Mittelwerte, die Fehlerbalken die zugehörigen Standardabweichungen (*n. s.* = nicht signifikant; $n = 6$).

3.5.4.4 Transport der 3D-Modelle

Die 3D-Modelle wurden zu Testzwecken über eine Strecke von 5 km transportiert und bei 4°C bzw. RT gelagert. Die bei RT gelagerten Modelle wiesen in der histologischen Auswertung nach dem Transport keine Unterschiede zu nicht transportierten 3D-Modellen auf. Die bei 4°C gelagerten Modelle hingegen starben ab.

3.5.4.5 Nachweis der metabolischen Aktivität der Zellen in den 3D-Modellen

Mittels Tetrazoliumsalz (MTT) wurde die metabolische Aktivität der Zellen in den 3D-Modellen nachgewiesen. Das MTT wurde hierbei von metabolisch aktiven Zellen von einem gelblichen zu einem purpurnen Stoff umgewandelt (Abbildung 3.44). Mit Ausnahme der Transportmodelle, welche bei 4°C gelagert wurden, wiesen alle 3D-Modelle diese Aktivität auf.

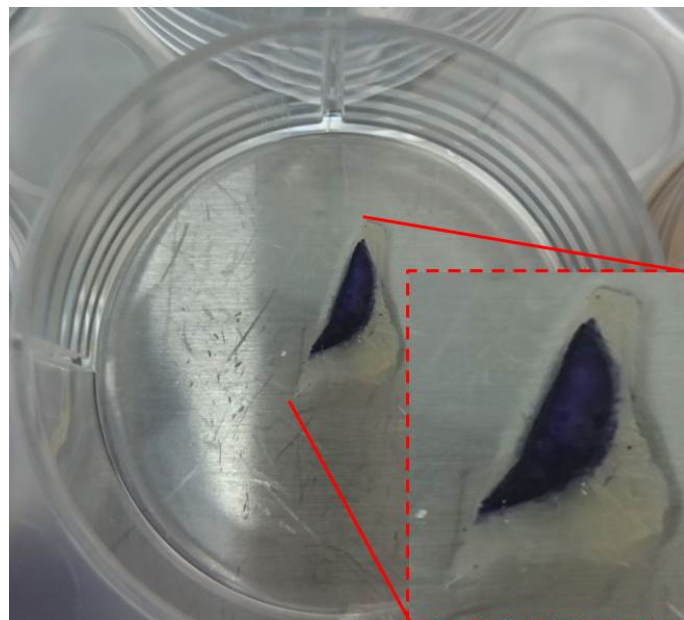


Abbildung 3.44: Nachweis der metabolischen Aktivität eines 3D-Modells der Atemwegschleimhaut mittels MTT. Stoffwechselaktive Zellen reduzieren das gelbe Tetrazoliumsalz zu einem purpurnen Formazan. Der ungefärbte Teil des Gewebes war zwischen den Zellkronenringen eingespannt und ist nicht mit Zellen besiedelt.

3.5.4.6 Bestimmung der Anzahl an Epithelzellen auf den 3D-Modellen

Die Bestimmung der Anzahl an Epithelzellen auf der Modelloberfläche diente als Vorversuch, um die Modelle im Hinblick auf die mögliche Nutzung als Infektionsmodelle besser zu charakterisieren. Um diese mit Erregern wie etwa Bakterien oder Pilzen zu infizieren, ist es essentiell, die Anzahl an Epithelzellen einschätzen zu können, welche für die Berechnung der *multiplicity of infection* (MOI) nötig ist. Hierzu wurden die Epithelzellen der 3D-hTEC-Modelle apikal mit Trypsin abgelöst, über die Trypanblau-Färbung mit der

Neubauer-Zählkammer gezählt und mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) charakterisiert. Die FACS-Analyse zeigte, dass vor allem Epithelzellen (91,8 % bzw. 90,4 %) von der Oberfläche und nicht die Fibroblasten aus der Matrix gelöst wurden. Dies unterstützt die histologische Auswertung der 3D-Modelle (Abbildung 3.45). Das entwickelte Protokoll zeigte in großen Bereichen der Modelloberfläche eine erfolgreiche Ablösung der Epithelzellen (a und b, grüner Pfeil), an anderen Stellen hatte die Trypsinierung keine Auswirkungen auf die Epithelschicht (b, roter Pfeil). Um eine gleichmäßige Ablösung zu erhalten, muss das Protokoll „*Detachment of epithelial cells from a 3D human airway mucosa model*“ in Anhang B noch optimiert werden.

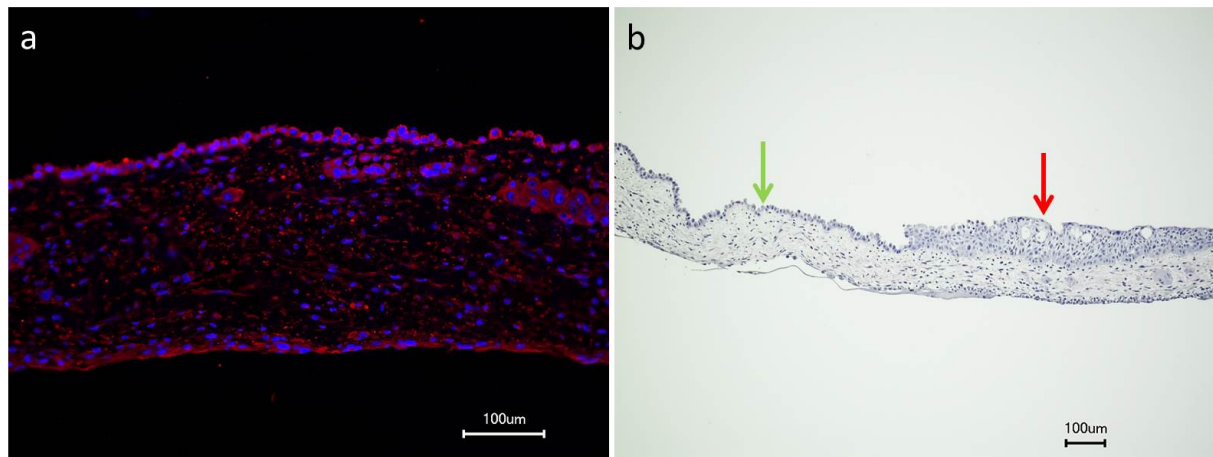
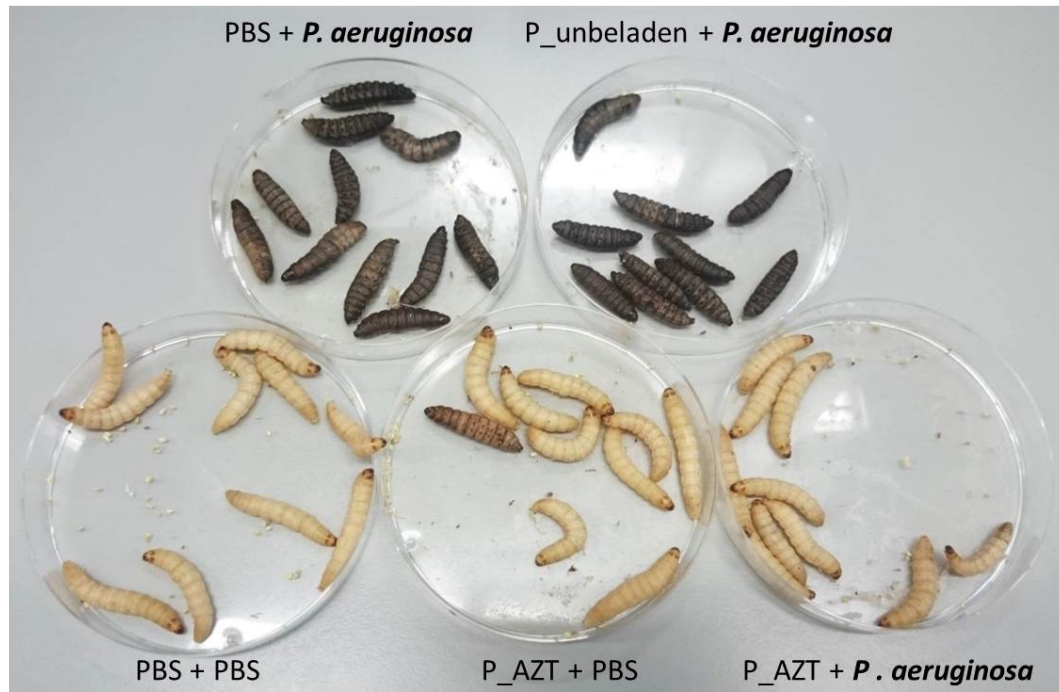


Abbildung 3.45: Bestimmung der Anzahl von Epithelzellen auf den differenzierten 3D-hTEC-Modellen. Dargestellt ist eine Anti- β -Tubulin-Immunfluoreszenzfärbung (a). Die Basalzellen bzw. die Fibroblasten wurden nicht von der Oberfläche bzw. aus der Kollagenmatrix gelöst. In (b) ist eine HE-Färbung abgebildet. Der grüne Pfeil markiert eine erfolgreiche Ablösung der Epithelzellen. Der rote Pfeil markiert eine dicke Epithelschicht auf der Modelloberfläche.

3.6 Charakterisierung der Antibiotikum-beladenen Partikel *in vivo*

Um die Verträglichkeit der Partikel im lebenden Organismus zu analysieren und um deren Wirkung auf *P. aeruginosa* unter *in vivo* Bedingungen zu testen, wurde ein Insekten-Infektionsmodell gewählt. Hierzu wurden unbeladene und mit Antibiotikum beladene Partikel (1 mg/ml) sowie *P. aeruginosa*-Wildtyp (PA01) in *G. mellonella* injiziert. Abbildung 3.46 zeigt unterschiedlich beimpfte Gruppen von *G. mellonella* in totem und lebendem Zustand. Diese wurden zu bestimmten Zeiten ausgezählt und mittels der Kaplan-Meier-Methode ausgewertet.



Abbildungung 3.46: *G. mellonella* nach *P. aeruginosa*-Infektion und Kontrollgruppen nach 48 h. Die Larven wurden in unterschiedliche Versuchsgruppen aufgeteilt. Das Bild zeigt die Versuchsgruppen beimpft mit PBS und *P. aeruginosa* (PA01) (oben links), mit unbeladenen Partikeln und *P. aeruginosa* (oben rechts) sowie die PBS-Kontrolle (unten links), beimpft mit AZT-beladenen Partikeln und PBS (unten Mitte) und AZT-beladene Partikel und *P. aeruginosa* (unten rechts). Lebendige, agile Larven sind hell gefärbt und tote, unbewegliche Larven sind dunkel gefärbt.

Die Auswertung der drei unabhängigen Versuche erfolgte über die Bestimmung der Färbung und Beweglichkeit der Larven und wurde mit der Kaplan-Meier-Methode durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, spezifische Überlebensraten und Überlebenszeiten zu berechnen (Ziegler et al., 2007). Die Gesamtzahl der Versuchstiere, der eingesetzten Partikel- und Antibiotikum-Lösungen sowie die zugehörigen Überlebensraten sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Überlebende *Galleria mellonella* nach 48 h Inkubation.

Injektion 1 [10 µl; ventral]	Injektion 2 [10 µl; dorsal]	Anzahl Larven	Überlebende <i>G. mellonella</i> nach 48 h
PBS	PBS	60	91,7 %
Partikel unbeladen	PBS	40	85,0 %
Partikel mit 20 Gew.-% AZT	PBS	60	93,3 %
AZT 0,5 mg/ml	PBS	40	95,0 %
PBS	<i>P. aeruginosa</i>	60	0 %
Partikel unbeladen	<i>P. aeruginosa</i>	40	0 %
Partikel mit 20 Gew.-% AZT	<i>P. aeruginosa</i>	60	90,0 %
Partikel mit 10 Gew.-% AZT	<i>P. aeruginosa</i>	60	73,3 %
AZT 0,5 mg/ml	<i>P. aeruginosa</i>	40	82,5 %
AZT 0,1 mg/ml	<i>P. aeruginosa</i>	40	57,5 %

In Abbildung 3.47 sind die Gruppen, welche mit *P. aeruginosa* (10 Bakterien/10 μl) beimpft wurden, und in Abbildung 3.48 die Kontrollgruppen dargestellt. Die AZT-beladenen Partikel (P_AZT mit 20 Gew.-% AZT in 1 mg/ml) zeigten trotz 60 % weniger Wirkstoff und einer Freisetzungsrate von ca. 77 % (nach 96 h) eine deutlich bessere Wirkung als die 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AZT in Lösung. Gleiches gilt für die AZT-beladenen Partikel mit 10 Gew.-% AZT. Diese enthalten 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AZT und haben eine deutlich bessere Wirkung als die 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AZT in Lösung. In den Kontrollgruppen mit PBS bzw. unbeladenen Partikeln, welche mit Bakterien beimpft wurden, sind nach 48 h alle Larven tot. Bei den Negativkontrollen überleben in den Gruppen, welche mit Antibiotikum beimpft wurden, deutlich mehr Larven.

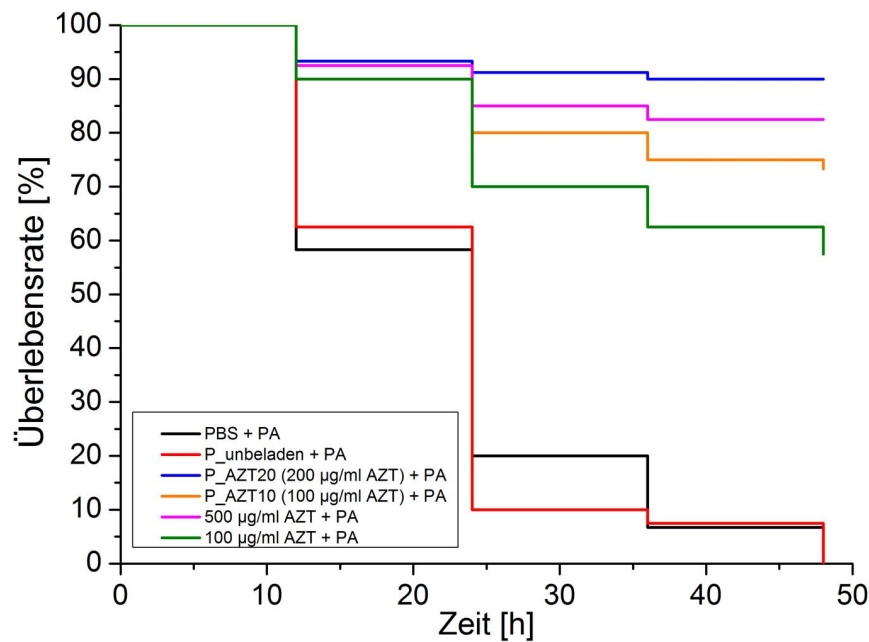


Abbildung 3.47: Überlebensrate von *G. mellonella* nach Infektion und Partikelgabe. Alle Larven wurden mit *P. aeruginosa* beimpft. Zusätzlich wurden die Larven mit PBS (schwarz), unbeladenen Partikeln (rot), Partikeln mit 20 Gew.-% AZT (blau), Partikeln mit 10 Gew.-% AZT (gelb), 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AZT in Lösung (magenta) und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AZT in Lösung (grün) beimpft. Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen.

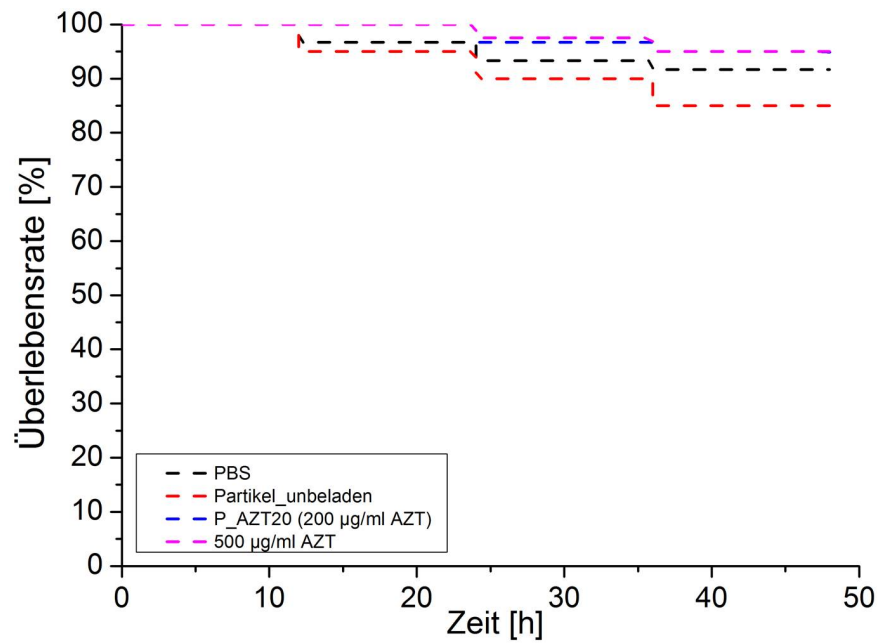


Abbildung 3.48: Überprüfung der Partikelverträglichkeit in *G. mellonella* nach 48 h. Alle Larven wurden mit PBS beimpft. Zusätzlich wurden die Larven mit PBS (schwarz gestrichelt), unbeladenen Partikeln (rot gestrichelt), Partikeln mit 20 Gew.-% AZT (blau gestrichelt) und 500 µg/ml AZT in Lösung (magenta gestrichelt) beimpft. Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen.

Kapitel 4

Diskussion und Ausblick

4.1 Einführung

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate liefern neue Erkenntnisse für den Einsatz von biologisch abbaubaren Materialien in der Biomedizin. Es konnte gezeigt werden, dass Gelatine und PLGA großes Potenzial im Bereich der degradierbaren Biomaterialien aufweisen. Basierend auf einer substratunabhängigen PPX-Amin-Modifizierung war es möglich, stabile, Gelatine-basierte Filme in variabler Schichtdicke (Nano- bzw. Mikrometermaßstab) auf unterschiedliche Oberflächen kovalent aufzubringen. Dies ermöglichte die Durchführung einer Reihe chemischer, biologischer und physikalischer Charakterisierungen. In trockenem Zustand wiesen die Gelatinefilme unabhängig von ihrer Schichtdicke eine geringe Rauheit auf. Im Vergleich zu den Referenzoberflächen lagerte sich eine geringere Proteinmenge mit niedrigerem Schermodul auf den Gelatinehydrogelen an. Ein Teil der auf dem Hydrogel adsorbierten Proteine migrierte in die Poren des gequollenen Gels und veränderte dessen viskoelastische Eigenschaften. PLGA-basierte Partikel wurden mit zwei Kompartimenten und unterschiedlicher Wirkstoffbeladung hergestellt. Eingelagerte Wirkstoffe wurden unter physiologischen Bedingungen aus den Partikeln freigesetzt. Die Verwendung von PLGA mit kürzerer Kettenlänge war ausschlaggebend für eine erhöhte Freisetzungsrates der eingelagerten Wirkstoffe. Das freigesetzte AZT bzw. ICZ zeigte antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien bzw. Pilze *in vitro*. Histologische Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das aus den Partikeln freigesetzte ACC die Zähigkeit des Schleims auf den 3D-Modellen reduziert. Die Partikel zeigten eine hohe Bioverträglichkeit, da diese keine entzündlichen oder apoptotischen Zustände in Interaktion mit humanen Zellen auslösten. AZT-beladene Partikel erzielten aufgrund der verzögerten Freisetzung eine erheblich bessere antimikrobielle Wirkung in einem *in vivo*-Infektionsmodell als die gleiche Menge an AZT in Lösung. In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Gelatine-basierten Filme und im Anschluss die partikulären Wirkstofffreisetzungssysteme diskutiert und im Hinblick auf ihre Eignung bewertet.

4.2 Etablierung von stabilen Gelatine-basierten Filmen in unterschiedlichen Schichtdicken

Die Entwicklung einer neuen Methode zur Herstellung von stabilen, Gelatine-basierten Filmen mit unterschiedlicher Schichtdicke bildet die Basis für deren chemische, biologische und physikalische Charakterisierung. Durch die eingestellte Viskosität der Gelatinelösung und unterschiedliche Programmabläufe des Rotationsbeschichtungsprozesses ist es möglich, Gelatinefilme mit unterschiedlicher Schichtdicke reproduzierbar auf die zuvor PPX-Amin-modifizierten Oberflächen aufzubringen. Die Schichtdicke der Gelatinefilme kann vom Nano- bis zum Mikrometerbereich variiert werden. Beim Beschichtungsprozess bestimmen die Viskosität der Gelatinelösung und die Wahl der Beschleunigung in Kombination mit der gewählten Drehzahl die Schichtdicke. Um die Schichtdicke von 15-350 nm stufenlos zu variieren, muss lediglich der Gelatinegehalt im Bereich zwischen 1-10 Gew.-% verändert werden. Der zweistufige Programmablauf bei der Beschichtung bleibt identisch. Hierbei wird im ersten Schritt bei geringer Drehzahl die Gelatinelösung auf der Oberfläche verteilt und im darauffolgenden zweiten Schritt mit einer hohen Drehzahl (12 000 rpm) die Schichtdicke des Gelatinefilms reduziert. Um Schichtdicken über 350 nm herzustellen, bleibt die Viskosität der Gelatinelösung unverändert bei 10 Gew.-%, es wird alleinig der Programmablauf im Beschichtungsprozess angepasst. Für eine Erhöhung der Schichtdicke wird hierfür der zweite Schritt bei geringerer Drehzahl durchgeführt. Für Schichtdicken ab ca. 1 000 nm wird 10 Gew.-%-Gelatinelösung eingesetzt, welche durch einen einstufigen Prozess bei geringer Drehzahl langsam auf der Oberfläche verteilt wird. Die Schichtdicke wird maßgeblich durch die Änderung der Drehzahl eingestellt. Bei 1 500 rpm wird eine Schichtdicke von 1 700 nm erzielt. Mit der hier beschriebenen Methode ist es möglich, eine gewünschte Schichtdicke herzustellen, indem in einem iterativen Prozess die exakten Versuchsparameter ermittelt werden. Im Vergleich zur Tauchbeschichtung eignet sich die Rotationsbeschichtung besonders für Proben, welche mit gleichmäßigen, dünnen Filmen von viskosen Materialien beschichtet werden sollen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Rückseite der QCM-D-Kristalle nicht beschichtet wird, da ansonsten die Elektroden nicht mehr einsatzfähig sind. Des Weiteren sind Gelatinebeschichtungen mittels lösemittelbasierter Beschichtungsverfahren oder eine Beschichtung unter Hitze einwirkung nicht möglich, da bei beiden Ansätzen die Gelatine denaturiert (Lang, 2013).

Um das Abschwimmen der Gelatinehydrogele von der Oberfläche zu verhindern, wurden die Oberflächen mit PPX-Amin beschichtet (Chen et al., 2008). Diese Beschichtung, welche mittels CVD auf unterschiedliche Substratoberflächen aufgedampft werden kann, stellt freie Amin-Gruppen als Bindungsstellen zur Verfügung und wirkt als Vermittlerschicht zwischen dem Substrat und dem Gelatinefilm. Die Anwesenheit der Amin-Gruppen wurde mit dem ToF-SIMS bestätigt. Während des Quervernetzungsprozesses des Gelatinefilms bindet der Quervernetzer LDI sowohl die freien Amin-Gruppen der Gelatinefibrillen untereinander als auch die freien Amin-Gruppen der Gelatinefibrillen an die Amin-Gruppen der Oberflächenmodifizierung. Diese Quervernetzung stabilisiert das Gelatinenetzwerk in sich und bindet es kovalent an die Substratoberfläche. Aufgrund der substratunabhängigen Amin-Modifizierung können mit der hier entwickelten Methode Gelatinefilme in unterschiedlicher Schichtdicke kovalent auf ein beliebiges Substrat aufgebracht werden. Neben

den erwünschten Harnstoffverbindungen können aufgrund einer möglichen Hydrolyse des Diisocyanats oligomere Vernetzungen und Seitenketten gebildet werden. Diese tragen nicht zur Quervernetzung der Amin-Gruppen und somit nicht zu einer Stabilisierung des Gelatinefilms bei (Ghaffar et al., 2011). Aufgrund der Quervernetzung unter Argonatmosphäre wurde die Hydrolyse des Diisocyanats weitestgehend unterbunden. Dies konnte durch die Stabilität und die beständige Schichtdicke der quervernetzten Gelatinefilme auch nach den Waschschritten bei 37°C mit starker Bewegung (100 rpm) nachgewiesen werden. Mittels Dünnstegnetzchen oder PDMS-Stempel wurde eine strukturierte Amin-Modifizierung auf das Substrat aufgebracht. Die Beschichtung dieser Oberflächen mit Gelatine und die anschließende Quervernetzung mit LDI erzeugten einen stabilen Gelatinefilm ausschließlich auf den mit PPX-Amin modifizierten Bereichen, welcher mittels Rasterelektronen- und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert wurde. Durch die flexible Gestaltung der Schichtdicke sind die resultierenden Gelatinefilme vielseitig einsetzbar und konnten mit unterschiedlichen Mess- und Analysetechniken chemisch und physikalisch charakterisiert werden.

4.3 Chemische und physikalische Eigenschaften von Gelatine-basierten Filmen

Die Gelatine-basierten Filme wurden im Hinblick auf ihre Quervernetzung, Schichtdicke, Rauheit, Elastizität, Oberflächenspannung und chemische Zusammensetzung charakterisiert. Die Schichtdicken der Amin-Modifizierung und des trockenen Gelatinefilms wurden ellipsometrisch bestimmt und bestätigen die Reproduzierbarkeit der entwickelten Herstellungsmethode. Bei mehr als 100 Proben betrug die Abweichung der Schichtdicke des Gelatinefilms maximal ± 1 nm. Mit dem AFM wurde die Oberflächentopographie der mit den Dünnstegnetzchen modifizierten Oberflächen nanometergenau untersucht. Beim Aufdampfen des amintragenden Polymers konnte dieses an den vom Dünnstegnetzchen abgedeckten Stellen nicht vollständig vom Substrat ferngehalten werden und es bildeten sich fließende Übergänge. Durch einen gezielten Materialabtrag bis auf das Substrat war es möglich, die Gesamtschichtdicke des Gelatinefilms inklusive der Amin-Modifizierung zu bestimmen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Schichtdicken von mitgeführten unstrukturierten Referenzoberflächen, welche mit dem Ellipsometer untersucht wurden, überein. Durch beide Methoden konnte die exakte und reproduzierbare Herstellung der Amin-Modifizierung sowie des Gelatinefilms bestätigt werden. Mit dem AFM wurde ebenso die Rauheit der Gelatinefilme untersucht, welche unabhängig von der Schichtdicke maximal ± 1 nm betrug. Im Höhenprofil der Gelatinefilme im Mikrometerbereich ist neben dem Materialabtrag auch ein Aufschieben der quervernetzten Gelatine sichtbar. Dieses Aufschieben an den Rändern verdeutlicht ebenfalls die erhöhte Viskosität und Stabilität des Gelatinefilms aufgrund der Quervernetzung. Das mit dem AFM im gequollenen Zustand bei unterschiedlichen Temperaturen gemessene reduzierte Elastizitätsmodul (E_r) bestätigte eine erfolgreiche Quervernetzung des Hydrogelfilms in sich und mit der Oberfläche. Die erzielten Ergebnisse sind mit denen von LDI quervernetzter Gelatine im Bulkmaterial vergleichbar (Pierce et al., 2012). Bei zunehmender Erwärmung sinkt das reduzierte Elastizitätsmodul, was auf eine Destabilisierung der tripelhelikalen Strukturen der Gelatine zurückgeführt werden kann.

Nicht quervernetzte Gelatine löst sich bei einer Temperatur von 37 °C in Wasser. In diesem Fall würde die Spitze des *Cantilevers* direkt auf dem Substrat aufsitzen, wodurch keine Elastizität messbar gewesen wäre. Vergleichbare Gelatinehydrogele ohne zusätzliche Quervernetzung erreichen bei Raumtemperatur ein geringeres Elastizitätsmodul (Czerner et al., 2015; Karimi et al., 2015). Automatisierte, statische Kontaktwinkelmessungen lieferten reproduzierbare Ergebnisse mit sehr geringer Standardabweichung. Aus der Amin-Modifizierung resultiert eine signifikante Erhöhung des Kontaktwinkels im Vergleich zum Substrat (Gold bzw. Silizium). Eine anschließende Beschichtung der Amin-Modifizierung mit Gelatine setzt den Kontaktwinkel wiederum signifikant herab. Der Kontaktwinkel der mit Gelatine beschichteten Oberflächen ist signifikant geringer als der von Gold. Silizium hat den geringsten Kontaktwinkel. Diese Ergebnisse zeigen die erfolgreiche Modifikation der Oberflächen. Die Korrelation mit polaren bzw. unpolaren Funktionen in den Polymerketten ist deutlich sichtbar. Wird eine unpolare Oberflächenmodifizierung wie etwa PPX-Amin auf einem Silizium-Wafer aufgebracht, wirkt sich dies hydrophobierend aus. Hingegen haben polare Oberflächenmodifizierungen wie der Gelatinefilm auf PPX-Amin einen hydrophilierenden Effekt. Diese Abhängigkeit des Kontaktwinkels zu polaren bzw. unpolaren Funktionen in den Polymerketten von Gelatine wurde auch von Tedesco et al. (2016) und Giol et al. (2015) beobachtet. Mit dem Rasterelektronenmikroskop konnte der durch Materialabtrag modifizierte Gelatinefilm abgebildet werden. Eine Elementaranalyse mittels EDX bestätigt die Anwesenheit von Gelatine an unversehrten Stellen des Films durch den Nachweis von Kohlenstoff. Die Bereiche, an welchen der Film mittels einer Pinzette abgetragen wurde sowie die Amin-modifizierte Referenzoberfläche weisen hingegen diese Kohlenstoffbande nicht in dieser Ausprägung auf. Die Stabilität des quervernetzten, gewaschenen Gelatinefilms auf der Substratoberfläche wurde ergänzend durch die Amidbanden I-III sowie die O-H- und N-H-Bande in dem mittels IRRAS gemessenen Spektrum bestätigt (Naumann, 2001). Sie sind identisch mit dem Spektrum des ungewaschenen quervernetzten Gelatinefilms. Diese Banden sind hingegen in den Spektren des gewaschenen, nicht quervernetzten Gelatinefilms sowie der Amin-Modifizierung nicht vorhanden. Des Weiteren kann durch die Abwesenheit der Isocyanat-Bande eine vollständige Reaktion des Quervernetzers abgeleitet werden. Das unter submersen Bedingungen bei 37 °C stabile Gelatinehydrogel konnte nun hinsichtlich seiner Eigenschaften in Interaktion mit Proteinen mittels Quarzkristallmikrowaage untersucht werden.

4.4 Beurteilung der Protein-Hydrogel-Interaktion

Die quervernetzte Gelatine ist im hydratisierten Zustand ein weiches, mit Poren durchsetztes, aufgequollenes Material auf dem QCM-D-Sensor (Schönwälder et al., 2014). Die Schichtdicke des gequollenen Hydrogels muss kleiner sein als die Eindringtiefe der Scherschwingung des Sensorkristalls um die Proteinadsorption auf diesem viskoelastischen Material messen zu können (Rodahl et al., 1996; Voinova et al., 1999). Die in der vorliegenden Arbeit etablierten Gelatinefilme (15 nm Schichtdicke in trockenem Zustand) ermöglichten nach einer anfänglichen Quellungsphase und nach Erreichen einer stabilen Basislinie eine störungsfreie Messung der Protein-Hydrogel-Interaktion. Mit den aufgenommenen Resonanzfrequenz-

und Dissipationsänderungen konnten Aussagen über die adsorbierte Proteinmasse und deren viskoelastische Eigenschaften getroffen werden.

4.4.1 Die Adsorption von humanen Plasmaproteinen

Es wurde die Adsorption von HSA und humanem Fibrinogen auf Gold, PPX-Amin und Gelatinehydrogel untersucht. Der Vergleich der adsorbierten Mengen an HSA auf den untersuchten Oberflächen verdeutlicht, dass die Werte auf Gold und PPX-Amin etwa gleich groß ($12,0 \text{ mg/m}^2$ und $11,4 \text{ mg/m}^2$), auf dem Gelatinehydrogel hingegen signifikant geringer ($0,4 \text{ mg/m}^2$) sind: $35,8 \text{ mg/m}^2$ Fibrinogen adsorbiert auf PPX-Amin, etwa die Hälfte dieser Menge wurde auf Gold gemessen. Auf dem Gelatinehydrogel adsorbierte wiederum eine signifikant kleinere Menge ($7,9 \text{ mg/m}^2$). Die gemessenen Frequenz- und Dissipationsänderungen von adsorbiertem Fibrinogen auf Gold sind in guter Übereinstimmung mit den Messergebnissen von Hemmersam et al. (2005), welche unter vergleichbaren Bedingungen erfasst wurden. Die ermittelten Mengen an adsorbierten Fibrinogen und HSA auf den Gelatinehydrogelen entsprechen in etwa den von (Sharma et al., 2002) publizierten Werten auf PEG-modifizierten Oberflächen ($0,5 - 1,0 \text{ mg/m}^2$ für HSA und $1,0 - 2,0 \text{ mg/m}^2$ für Fibrinogen). Allerdings sind sie sehr viel höher als auf speziell optimierten, PEG-basierten, proteinabweisenden Oberflächen ($< 0,01 \text{ mg/m}^2$ für HSA und $\sim 0,01 - 0,03 \text{ mg/m}^2$ für Fibrinogen), wie von Schmidt et al. (2009) und Kenausis et al. (2000) publiziert. Allgemein zeigen diese Ergebnisse, dass die adsorbierte Menge an HSA bzw. Fibrinogen auf dem Gelatinehydrogel viel geringer ist als auf Gold oder PPX-Amin. Dieser Effekt kann unter anderem mit den hydrophilen bzw. lipophilen Eigenschaften der Oberflächen erklärt werden. Die erhaltenen Proteinmassen zeigen eine direkte Korrelation zu den gemessenen Kontaktwinkeln (Chen et al., 2016). Je lipophiler die Oberfläche, desto höher war die Proteinanlagerung. Des Weiteren konnte mittels der Frequenz- und Dissipationsänderungen aus den QCM-D-Daten das Schermodul der adsorbierten Proteinfilm berechnet werden. Diese viskoelastische Eigenschaft gibt Auskunft über die Anordnung der adsorbierten Proteine und deren Stabilität (Du und Johannsmann, 2004). Die Ergebnisse zeigen ähnliche Werte der Schermodule und somit ähnlich angeordnete Proteinfilm auf den glatten, nicht quellbaren Oberflächen Gold und PPX-Amin, jedoch einen signifikant unterschiedlichen Aufbau des adsorbierten Proteinfilms auf dem Gelatinehydrogel. Im Allgemeinen stehen die Schermodule in guter Übereinstimmung mit den von Voinova et al. (1999) publizierten Schermodulen der viskoelastischen, polymerbasierten Materialien. Das um ein Vielfaches geringere Schermodul der auf dem Gelatinehydrogel adsorbierten Proteine (größeres $\Delta D_n / \Delta f_n$ -Verhältnis) und die geringere adsorbierte Proteinmasse deuten darauf hin, dass das adsorbierte Fibrinogen mit der Gelatine interagiert und dass es sich weniger dicht und ungeordnet auf der Oberfläche anlagert im Vergleich zu PPX-Amin oder Gold. Eine weniger dicht angeordnete Proteinschicht zeigt eine geringere Wechselwirkung der Proteine mit dem Gelatine-basierten Hydrogel im Vergleich zu den anderen Oberflächen und könnte tendenziell zu einem geringeren Abstoßungsrisiko, einer besseren Biokompatibilität und Hämokompatibilität des Implantats führen (Schmidt et al., 2009). Jedoch müssen eine Reihe weiterer Parameter hinzugezogen werden, um mögliche Konsequenzen in Abhängigkeit der jeweiligen *in vivo*-Situation zu prognostizieren. Um die Proteinadsorption näher zu

charakterisieren, wurde die Adsorptionskinetik mathematisch bestimmt. Es wurden zuerst die nicht-quellenden Oberflächen analysiert. Hierzu wurde die Δf -Kurve der Fibrinogenanlagerung auf Gold und PPX-Amin mit einer exponentiellen Funktion angenähert. Unter diesen Annahmen konnte eine konzentrationsabhängige Zeitkonstante von 150s für die Anlagerung des Fibrinogens bestimmt werden. Im Fall des Gelatinehydrogels folgte auf diese Anlagerung ein zweiter, deutlich langsamerer Vorgang, welcher durch einen Massenanstieg auf der Kristalloberfläche erkennbar war. Diese Beobachtung bestätigt die vermutete Hypothese, dass Fibrinogen langsam in die Poren des Gelatinehydrogels migriert und dadurch diesen zweiten Frequenzabfall von 20% verursacht. Diese These wird zusätzlich durch die Ergebnisse von Gachon et al. (1986) unterstützt. Sie zeigen, wie unterschiedliche humane Proteine abhängig von der Porengröße in und durch Hydrogele migrieren. Die Größe und die Ausrichtung der Poren tragen maßgeblich zum Einwachsen von Zellen bei (Arora et al., 2015).

Durch Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS) konnten die mit HSA bzw. Fibrinogen in Kontakt gekommenen Gelatinefilme sensitiv analysiert werden. Mittels anschließender Hauptkomponentenanalyse war es möglich, zwischen den untersuchten proteinbasierten Proben eindeutig zu differenzieren. Studien von Muramoto et al. (2011) und Tyler et al. (2011) beschäftigten sich mit ähnlichen Proteinendatensätzen. Bei der Auswertung gilt zu beachten, dass CH_4N^+ -Fragmente auch aus anderen Aminosäuren entstehen könnten und dass Leucin und Isoleucin das gleiche SIMS-Fragment ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}$) liefern. Arginin, Alanin und Leucin zeigen stark negative Hauptkomponentenladungen in Hauptkomponente 2 (PC2). Während HSA tatsächlich mehr Isoleucin und Leucin beinhaltet als Fibrinogen und Gelatine, ist der Grund für die Dominanz von Arginin und Alanin in PC2 weniger offensichtlich (Gasteiger et al., 2003; Eastoe, 1955). Bis heute sind diese Effekte noch nicht vollständig verstanden. Sie könnten auf die räumliche Anordnung der detektierten Aminosäuren zurückgeführt werden, welche die Sputter-Ausbeute während der Messung beeinflussen, was auch durch die Primärionenquelle beeinflusst werden kann, oder andere Effekte der Proteinstruktur, welche die Ionisierungswahrscheinlichkeit verändern (Leggett und Vickerman, 1991). Gelatine ist reich an Prolin, Glycin und Lysin und hat aufgrund dessen eine negative Hauptkomponentenladung bei gleichzeitig negativem Hauptkomponentenwert (Eastoe, 1955). Diese wird durch die Anwesenheit von adsorbiertem HSA bzw. Fibrinogen in den positiven Bereich verlagert. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung von HSA und Fibrinogen können diese beiden Proben separaten Clustern zugeordnet werden (Gasteiger et al., 2003). Dieser Ansatz ermöglicht es, die Adsorption von unterschiedlichen Proteinen auf proteinbasierten Oberflächen markierungsfrei zu untersuchen. Darüber hinaus bietet der vorgestellte Untersuchungsansatz neue Perspektiven für das schnelle und effiziente Screening von unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen. Trotz zum Teil sehr geringer adsorbierter Mengen an HSA bzw. Fibrinogen war es möglich, aufgrund von kleinen Änderungen in der Aminosäurezusammensetzung zwischen den Proben zu unterscheiden.

4.4.2 Die Adsorption von bakteriellen Proteinen

Die Adsorption von bakteriellen Proteinen wurde mittels QCM-D auf Titan, Gold, PPX-Amin und Gelatinehydrogel untersucht. Für diese Untersuchungen wurde zusätzlich Titan,

ein gängiges und vielseitig genutztes Implantatmaterial, als Referenzoberfläche hinzugezogen (Bauer et al., 2013). Die größte Menge an bakteriellen Proteinen adsorbierte auf der lipophilen Amin-Modifizierung ($16,0 \text{ mg/m}^2$). Auf Titan bzw. Gold adsorbierten ungefähr ein Drittel dieser Masse ($4,8 \text{ mg/m}^2$ und $4,3 \text{ mg/m}^2$) und auf dem Gelatinehydrogel ca. ein Sechstel ($2,8 \text{ mg/m}^2$).

Auf allen untersuchten Oberflächen adsorbierte eine deutlich größere Menge Plasmaproteine als bakterielle Proteine. Jedoch gab es eine Ausnahme. Die Masse an HSA auf dem Gelatinehydrogel war deutlich geringer als die der bakteriellen Proteine. Dies könnte mit der kleinen Molekülgröße von HSA im Vergleich zu einem Großteil der bakteriellen Proteinen begründet werden. Die nach den QCM-D-Messungen auf den Sensoren tryptisch verdauten bakteriellen Proteine wurden mittels MALDI-ToF massenspektrometrisch untersucht. Die in dieser Arbeit beschriebene Methode erwies sich als sehr robust. Die verdauten Peptide der Schweinegelatine beeinflussten die Auswertung nicht. Es wurden ähnliche Proteinzusammensetzungen auf allen mittels MALDI-ToF/MS- und MS/MS-Auswertung untersuchten Oberflächen verifiziert. Viele der identifizierten Proteine sind in den Eisenhaushalt von *P. aeruginosa* involviert. Des Weiteren fiel auf, dass fünf der auf jeder Oberfläche identifizierten Proteine eine große molekulare Masse aufwiesen (300 - 600 kDa). Durch die Korrelation der molekularen Masse mit dem berechneten *Score* konnte eine höhere Wahrscheinlichkeit der Identifizierung aufgrund der Proteingröße ausgeschlossen werden. Mit den erhaltenen Daten ist keine statistisch signifikante Aussage möglich, jedoch sind Tendenzen zu erkennen. Auf dem Gelatinehydrogel adsorbieren tendenziell kürzere, hydrophilere Proteine mit kleinerer Molekülgröße und höherem isoelektrischen Punkt. Insgesamt wurden 131 Proteine auf dem Gelatinehydrogel, 80 auf Gold, 78 auf Titan und 52 auf PPX-Amin verifiziert. Dies zeigt eine größere Vielfalt der adsorbierten Proteine auf bzw. in dem Gelatinehydrogel, obwohl, im Vergleich zu den anderen Oberflächen, mit der QCM-D die geringste adsorbierte bakterielle Proteinmasse auf dem Hydrogel gemessen wurde. Bisher unveröffentlichte Untersuchungen von Siegfried Hohmann (Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT) zeigten ähnliche Ergebnisse für die Proteinadsorption aus *P. aeruginosa*-Überstand unter vergleichbaren Bedingungen, was ein Indiz für die Reproduzierbarkeit der Analyse ist (persönliche Kommunikation). Dieser Ansatz zur Untersuchung adsorbierter Proteine steht noch ganz am Anfang. Da die Funktionen der einzelnen Proteine bisher nicht alle erfasst sind, ist es schwierig eine konkrete Aussage über die Oberflächeneigenschaften zu treffen. Attila et al. (2008) zeigten, dass eine Störung des Hämolyisin-Gens PA2462, welches auf allen Oberflächen verifizierte wurde, die hämolytische Aktivität von *P. aeruginosa*, die Zytotoxizität sowie die Virulenz reduzierte. Des Weiteren wurde PA2462 in Biofilmen identifiziert (Purschke, 2012). Um Aussagen treffen zu können, wie sich eine initiale Proteinanlagerung auf den Biofilm auswirkt bzw. die Bildung eines Biofilms unterstützt, müssen noch ergänzende Experimente durchgeführt werden. Durch den in dieser Arbeit beschriebenen Ansatz kann gezielt auf einzelne Proteine, wie etwa PA2462, eingegangen werden. Barros et al. (2015) zeigten, dass die Zugabe von Gelatine zu natürlichen Stentmaterialien wie Alginate oder Gellangummi die bakterielle Adhäsion reduziert, jedoch die chemischen und physikalischen Eigenschaften nicht negativ beeinflusst. Für ein besseres Einwachsen eines Titanimplantats wäre es denkbar, dieses mit einem Gelatinefilm zu beschichten, welcher innerhalb einer festgelegten Zeit degradiert und von umliegenden Zellen ersetzt wird.

4.5 Bewertung von Gelatine als Implantatmaterial bzw. als Implantatbeschichtung

Spezifische Oberflächencharakteristika wie die Rauheit, die Proteininteraktion oder die Materialbeschaffenheit (Mikrotextur) bestimmen die Gewebeantwort im Körper, beeinflussen entscheidend das Wachstums- und Adhäsionsverhalten von Zellen und folglich auch die Integration eines Implantates in das umgebende Gewebe (Recum et al., 1996). Gelatine ist ein natürliches Biopolymer und hat aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu körpereigenem Kollagen eine hohe Biokompatibilität (Kuo et al., 2016; Ullm et al., 2014; Van Vlierberghe et al., 2011). Es ist als ein denaturiertes Ausgangsmaterial weniger immunogen als Kollagen und wird daher vom Körper nicht als fremd erkannt (Lendlein, 2013). Gelatine verfügt natürlicherweise über spezifische Bindungsstellen für Zellen, die RGD-Sequenzen. Sie vermitteln zu einem großen Teil die Zelladhäsion (Ng et al., 2012; Ratner und Bryant, 2004; Ruoslahti und Pierschbacher, 1987).

Die detaillierte Charakterisierung der nanoskopischen Gelatinefilme (synthetisiert in DMF) zeigt, dass trotz unterschiedlicher Synthese die nanoskopischen Filme ein geeignetes Modell für die makroskopischen Gelatinefilme (synthetisiert in Wasser; Dr. Tim Gebauer, Kooperationspartner am Helmholtz-Zentrum Geesthacht; Institut für Biomaterialforschung) darstellen. Die gemessenen reduzierten Elastizitätsmodule liegen in einem ähnlichen Bereich und lassen einen direkten Vergleich zu (Pierce et al., 2012). Die für die Zelladhäsion und Integration des Implantates wichtige Adsorption von Plasmaproteinen wurde mittels QCM-D auf den nanometerdünnen Gelatinefilmen ermittelt. Die auf den Hydrogelen gemessene Proteinadsorption erwies sich im Vergleich zu den anderen untersuchten Oberflächen als gering. Ein weniger dicht angelagerter Proteinfilm zeigt eine geringe Wechselwirkung der Proteine mit dem Gelatinehydrogel (Schmidt et al., 2009) und könnte zu einem geringeren Abstoßungsrisiko und auch zu einer besseren Biokompatibilität des Implantats führen. Jedoch müssen noch weitere Auswirkungen und Parameter berücksichtigt werden, um mögliche Folgen für das Verhalten *in vivo* vorhersagen zu können. Im Allgemeinen sind die durch QCM-D bestimmten Schermodule der adsorbierten Plasmaprotein in guter Übereinstimmung mit den von Voinova et al. (1999) publizierten Schermodulen von Plasmaproteinen auf viskoelastischen, polymeren Materialien. Die geringere adsorbierte Menge bakterieller Proteine auf dem Gelatinehydrogel im Vergleich zu Titan kann zu einer geringeren Adhäsion von Bakterien auf dem Gelatinehydrogel führen. Diese These wird von den Ergebnissen von (Barros et al., 2015) gestützt.

In Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf konnte gezeigt werden, dass Hydrogelschichten im μm -Schichtdickenbereich mit identischem Quervernetzungsgrad zu den nanometerdünnen Gelatinefilmen eine hohe Stabilität und Biokompatibilität aufweisen und die nötige Zelladhäsion vermitteln. In Interaktion mit humanen Zellen erwiesen sich die mikrometerdicken Gelatinefilme als stabil und hatten keinen negativen Einfluss auf die Zellen (unveröffentlichte Ergebnisse von Dr. Sandra Ullm, Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf). Ähnlich hergestellte, makroskopische Hydrogelfilme vom Helmholtz-Zentrum Geesthacht hatten ebenfalls keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum von Mausfibroblasten bzw. humanen Zellen (Pierce et al., 2012). *In vivo*-Versuche des Kooperationspartners vom Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf zeigten, dass sich ähnlich

hergestellte zentimetergroße Hydrogele nach subkutaner Implantation in Mäusen gut in das umliegende Gewebe integrieren, keine fibröse Kapsel um das Hydrogel ausgebildet wird und keine entzündliche Reaktion auftritt. Die Studie zeigt, dass sich die Hydrogele zum zeitlichen Ersatz und zur funktionellen Regeneration von beschädigtem Weichgewebe eignen (Ullm et al., 2014).

Zusammenfassend zeigt Gelatine großes Potenzial als Oberflächenmodifikation von Implantatmaterialien bzw. als Implantatmaterial in der Regenerativen Medizin. Es wäre denkbar, verschiedene metallische oder polymere Implantate gezielt mit Gelatine zu beschichten, um mögliche negative Eigenschaften bezüglich der Biokompatibilität und des Einwachsens des Implantats zu kompensieren.

4.6 Etablierung eines partikulären Wirkstofftransportsystems für die inhalative Applikation

Partikel, die aus mehreren, komplett voneinander getrennten Kompartimenten aufgebaut sind, zeigen großes Potenzial als Träger von unterschiedlichen Wirkstoffen für vielfältige Anwendungen (Rahmani et al., 2015; Lahann, 2011). Diese Systeme können aus verschiedenen, biologisch abbaubaren Biopolymeren hergestellt und durch ihre chemische Zusammensetzung funktionalisiert werden (Holmkvist et al., 2016). Mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Herstellungsprotokoll ist es möglich, partikuläre Wirkstoffträgersysteme mit zwei Kompartimenten, in welchen unterschiedliche Wirkstoffe eingelagert werden können, zu synthetisieren. Die Basis für die Herstellung dieser kompartimentierten Partikel mittels EHD *co-jetting* (Lahann et al., 2006) bildet ein fein aufeinander abgestimmtes System aus unterschiedlichen Lösemitteln, Polymeren und Wirkstoffen. Durch zahlreiche Einzeltestreihen mit unterschiedlichen Lösemitteln konnte solch ein System mit drei biologisch abbaubaren Co-Polymeren der PLA (mit unterschiedlicher Kettenlänge) und vier Wirkstoffklassen, welche auf die Behandlung von Pneumonien abgestimmt sind, etabliert werden. Darunter befanden sich ein Antibiotikum (Aztreonam), ein Antimykotikum (Itraconazol), ein Mukolytikum (Acetylcystein) und ein Antiphlogistikum (Ibuprofen). Das entwickelte Protokoll dient als Grundlage und kann für die Herstellung von partikulären Systemen mit anderen Wirkstoffen und Polymeren modifiziert werden. Jedoch muss beachtet werden, dass diese Herstellungsmethode sensitiv von der umgebenden Luftfeuchtigkeit und Temperatur abhängig ist. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sind gleichbleibende Bedingungen im Labor unabdingbar. Die verwendeten Lösungsmittel verdampfen zu einem großen Teil während des Herstellungsprozesses. Um eventuelle toxische Reaktionen aufgrund von Lösemittelresten in den Partikeln auszuschließen, müssen diese durch eine anschließende Trocknung unter Vakuum beseitigt werden. Es ist erforderlich, die Partikel nach der Vakuumtrocknung trocken und nicht in Lösung von den Edeltellern abzunehmen, damit der eingelagerte Wirkstoff nicht bereits vor der Anwendung aus den Partikeln diffundiert. Eine anschließende Gammasterilisation hat keinen Einfluss auf die Morphologie der Partikel und die Aktivität der eingelagerten Wirkstoffe bzw. Fluoreszenzfarbstoffe. Dies zeigten

elektronen- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen vor und nach der Sterilisation. In Hemmhofuntersuchungen von AZT war ebenfalls kein Unterschied in der Aktivität vor und nach der Gammasterilisation festzustellen. Eine Sterilisation durch Autoklavieren oder mit UV-Licht ist ungeeignet, da die Partikel durch große Hitze morphologisch verändert werden (zusammenschmelzen) und der Wirkstoff unter Anwesenheit von Wasserdampf entweichen würde sowie der Fluoreszenzfarbstoff unter UV-Licht-Einwirkung seine Aktivität verliert.

4.7 Chemische und physikalische Eigenschaften von PLGA-basierten Partikeln

Auf Basis der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Partikel mittels der Software ImageJ hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften charakterisiert. Die erhaltenen Parameter „Länge“, „Breite“ und „*roundness*“ sowie deren Verteilung zeigen, dass die Partikel trotz unterschiedlicher Wirkstoffe und Polymere vergleichbare morphologische Eigenschaften aufweisen. Dies ist eine essentielle Voraussetzung für die Herstellung von Partikeln, welche aus mehreren Kompartimenten mit unterschiedlichen Polymeren und Wirkstoffen aufgebaut werden sollen. Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Vorgehen zur Auswertung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist auf andere partikuläre Systeme übertragbar und macht es möglich, eine große Anzahl von Partikeln detailliert und automatisiert zu erfassen. Der *roundness*-Parameter gibt Auskunft über die Geometrie der Partikel. Mit einem *roundness*-Wert von 0,63-0,83 zeigen die Ergebnisse, dass die Partikel alle, unabhängig vom eingesetzten Polymer und/oder Wirkstoff, eine ähnlich runde Morphologie aufweisen. Hierbei wird die grafisch ermittelte Fläche des Partikels mit der aus der größeren Halbachse (Länge) der angenäherten Ellipse berechneten Kreisfläche verglichen. Die Kompartimentierung der Partikel konnte durch Aufnahmen mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop alleine nicht eindeutig nachgewiesen werden. Der Grund hierfür ist die geringe Partikelgröße und das schnelle Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe. Aufnahmen mit dem hochauflösenden Mikroskop (*structured illumination microscope*) zeigen hingegen eindeutig, dass die synthetisierten Partikel aus zwei Kompartimenten bestehen. Die Tatsache, dass die Fluoreszenzfarbstoffe in ihren separaten Kompartimenten bleiben, stützt die These, dass die Wirkstoffe aufgrund ihrer wesentlich größeren Molekülgröße ebenfalls nicht in andere Kompartimente migrieren.

Aufgrund der begrenzten Löslichkeit der einzelnen Wirkstoffe in dem etablierten Lösungsmittelsystem betrug die erreichte Wirkstoffbeladung der Partikel maximal 20 Gew.-%. Die unter physiologischen Bedingungen ermittelten Freisetzungsraten belegen die verzögerte Wirkstofffreisetzung aus den Partikeln (Depotfunktion). Unterschiedliche Polymere haben aufgrund ihrer Kettenlänge eine Auswirkung auf das Abbauverhalten und die Diffusion der eingelagerten Wirkstoffe. Die Freisetzungsraten von AZT und IBU sind sich sehr ähnlich in der freigesetzten Menge nach 96 h, jedoch wird IBU zu Beginn langsamer freigesetzt als AZT. Die Freisetzungsraten der mit ACC und AZT kombiniert beladenen Partikel sind mit denen der einzeln beladenen Partikel vergleichbar. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass sich ACC und AZT in der Freisetzung nicht beeinflussen. Die Freisetzungsraten von ACC aus Partikeln, bestehend aus Polymeren unterschiedlicher Kettenlänge, zeigen eine

deutliche Abhängigkeit der Freisetzung zur Kettenlänge. Zwischen Partikeln aufgebaut aus PLGA 85-15 (50-75 kDa) und PLGA 5004A (40 kDa) konnte in der ACC-Freisetzung kein Unterschied festgestellt werden (ca. 60 % nach 96 h). Das Ergebnis der Freisetzungsrates von ACC aus Partikeln aufgebaut aus dem kurzkettigen PLGA 5002A (17 kDa) zeigte eine um 30 % erhöhte Freisetzung. Im Vergleich zu ACC in Lösung besteht nach 96 h lediglich ein Unterschied von ca. 3 %, was verdeutlicht, dass Partikel aufgebaut aus dem kurzen Polymer fast den kompletten Wirkstoff freisetzen und somit für die Funktionalisierung der Partikel geeignet sind. Dass für ACC in Lösung nur 94 % nachgewiesen wurden, kann unter anderem an kleinen wiederkehrenden Verlusten in den großen Volumina der Reaktionsgefäße während der Dialyse (45 ml) liegen (Gefäßwechsel bei jedem Messpunkt). Des Weiteren könnte ein kleiner Teil des ACCs noch an der Dialysemembran gebunden sein. Um diese Fehler zu minimieren, sollten kleinere Dialyseschläuche in kleineren Volumina eingesetzt werden.

4.8 Beurteilung der Interaktion von wirkstoffbeladenen Partikeln mit Bakterien und Pilzen *in vitro*

Unbeladene Partikel hatten in allen Versuchen keinen inhibitorischen Einfluss auf das Wachstum von Bakterien und Pilzen und zeigten keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Die Hemmhofversuche belegen, dass AZT-beladene Partikel trotz einer 20 % geringeren Wirkstoffbeladung und einer Freisetzungsrates von circa 75 % nach 48 h im Vergleich zu AZT in Lösung eine signifikant bessere Wirksamkeit gegenüber dem *P. aeruginosa*-Wildtyp aufweisen. Dieser Effekt kann mit der Depotfunktion und der kontinuierlichen Abgabe des AZTs aus den Partikeln begründet werden (Varma und Sadasivan, 2014; Ornelas-Megiatto et al., 2012). Diese Beobachtung bestätigte sich auch gegenüber fünf von acht klinischen Isolaten von *P. aeruginosa*. Die mit AZT-beladenen Partikel (Gesamtmenge von AZT 0,4 mg) zeigten im Vergleich zu AZT in Lösung (Gesamtmenge von AZT 0,5 mg) einen signifikant größeren Hemmhof. Des Weiteren verdeutlichen die Ergebnisse eine gute Verfügbarkeit des Wirkstoffes aus den Partikeln sowie eine bessere Wirkung gegen klinische Isolate, welche oft eine höhere Toleranz gegenüber Antibiotika aufweisen, im Vergleich zu AZT in Lösung.

Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von ICZ wurde der Wirkstoff zu Beginn in DMSO gelöst und anschließend mit Wasser verdünnt (D'Auria et al., 1994). Diese Lösungen wurden für die Hemmhofversuche in Interaktion mit Pilzen eingesetzt. Die ICZ-beladenen Partikel wurden aufgrund der Vergleichbarkeit der Ergebnisse identisch behandelt. Es zeigte sich eine geringfügig bessere Wirkung des ICZ in Lösung im Vergleich zu den ICZ-beladenen Partikeln. Wurde ICZ direkt in Wasser suspendiert und ohne eine vorherige Lösung in DMSO auf die Pilzsporen gegeben, löste der Wirkstoff keine Wachstumsinhibition der Pilze aus. Hingegen zeigten die ausschließlich in Wasser suspendierten ICZ-beladenen Partikel eine gute Wirksamkeit gegen das Pilzwachstum. Durch das Einlagern von ICZ in die Partikel wird ICZ, ein quasi wasserunlöslicher Wirkstoff, in eine für den Patienten zugängliche und wirksame Applikationsform gebracht. Eine mögliche Erklärung ist, dass dieser Effekt auf der Ausbildung von Hydrathüllen basiert, wenn ICZ aus dem Partikel freigesetzt wird (Blokzijl

und Engberts, 1993). Hierbei wird der Wirkstoff von Abbauprodukten der Polymilchsäure umschlossen und in seiner Wasserlöslichkeit verbessert. Des Weiteren könnten geringe Lösemittelreste in den Partikeln ICZ in einen wasserlöslichen Zustand versetzen. Diese Lösemittelreste hatten jedoch keine Auswirkung auf das Bakterien- bzw. Pilzwachstum. Ein Diffundieren der Partikel in den Agar kann aufgrund ihrer Größe ausgeschlossen werden (Voshaar, 2005).

4.9 Beurteilung der Interaktion von wirkstoffbeladenen Partikeln und humanen Zellen *in vitro*

Die Möglichkeiten zur Untersuchung der menschlichen Lunge *in vivo* bzw. *in vitro* sind begrenzt. Aufgrund der hohen Relevanz von Lungenerkrankungen sind Testsysteme von großer Bedeutung. Ein reproduzierbares 3D-Modell der menschlichen Lunge zeigt großes Potenzial zur Untersuchung von Mechanismen und Eigenschaften des Organs. Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten 3D-Modelle basieren auf einer mit Zellen besiedelten SIS-Matrix in einer Zellkrone (Schweinlin et al., 2016). Ausdifferenzierte 3D-Modelle zeigten eine eindeutige Teilung epithelialer und mesenchymaler Komponenten und die epithelialen Zellen exprimierten zelltypische Marker. Beim histologischen Vergleich der humanen Atemwegschleimhaut und des 3D-Gewebemodells ist eine große *in vitro/in vivo*-Korrelation festzustellen. Untersuchungen des basalen Überstandes der 3D-Modelle vor und nach der Partikelinkubation zeigten, dass die Partikel keine entzündlichen bzw. apoptotischen Zustände in den 3D-Modellen auslösen. Die gemessenen IL-6-Werte stehen in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Oehme (2015) an humanen Bronchialepithelzellen. Unter Verwendung des M30 ELISAs ermittelte apoptotische Werte liegen unterhalb der Nachweisgrenze und bestätigen die Vitalität der Zellen. In Durchlichtaufnahmen von mit Partikeln inkubierten 3D-Modellen sind die Partikel umschließende Blasen erkennbar, welche auf Abbauprodukte der PLGA zurück geführt werden können. Die Esterbindungen dieses Polymers werden bereits bei 37 °C und physiologischem pH-Wert (7,4) hydrolytisch gespalten. Dieser Abbau wird während der Färbung der Präparate durch den zum Teil niedrigen pH-Wert und die eingesetzten Lösungen wie Alkohole und Fixierlösungen zusätzlich gefördert (Yoo et al., 2005). PLGA wird in Milch- und Gluconsäure gespalten, wobei die Milchsäure eine ölige Flüssigkeit ist und der Grund für die Blasenbildung sein kann (Freudig, 2006).

AZT-beladene Partikel, welche für 4 h unter submersen Bedingungen auf einer Mukus-reichen Oberfläche eines 3D-Modells inkubiert wurden, zeigten in anschließenden Hemmhofversuchen eine unveränderte Wirkung gegen Bakterien. Hierdurch wird die These gestützt, dass die Partikel das AZT in das umgebende Medium abgeben und dieses in den Mukus migriert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Hemmhofgröße der AZT-beladenen Partikel mit oder ohne Schleimmatrix. Beim Vergleich der Hemmhofgrößen von partikulär gebundenem AZT und AZT in Lösung konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die effektive Wirksamkeit von AZT-beladenen Partikeln in Anwesenheit einer Schleimmatrix. Die Freisetzungsraten,

welche ebenfalls in einem wässrigen Umfeld gemessen wurden, belegen die kontinuierliche Freisetzung der Wirkstoffe aus den Partikeln unter physiologischen Bedingungen und kann auf die Interaktion mit den 3D-Modellen übertragen werden. Fluoreszenzaufnahmen zeigen, dass die Partikel nicht von den Zellen aufgenommen werden und auch nicht in das 3D-Modell migrieren. Die Schleimlösung von humanen Mucinen auf den 3D-Modellen konnte qualitativ mittels histologischer Methoden bestätigt werden. Stehen die Partikel in räumlichem Kontakt zu den Mucinen, werden diese von dem freigesetzten Mukolytikum gelöst. Unbeladene Partikel setzen sich im Schleim fest und verändern diesen nicht.

Die Ausbildung von Zilien auf den 3D-Modellen machte es möglich, deren Interaktion mit den Partikeln näher zu beleuchten. TEM-Aufnahmen der flimmerepitheltragenden 3D-Modelle bestätigen die Anwesenheit der Zilien und deren 9+2-Aufbau sowie deren Ausrichtung. Mittels einer Hochgeschwindigkeitskamera konnte die Schlagfrequenz der Zilien von humanem Bronchusgewebe und der 3D-Modelle aufgenommen und verglichen werden. Das humane Bronchusgewebe zeigte eine höhere Schlagfrequenz im Vergleich zu den 3D-Modellen, diese war jedoch immer noch niedriger als in der Literatur angegeben (von Mutius et al., 2013; Lüllmann-Rauch, 2009). Der Grund für die herabgesetzte Aktivität der Zilien ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die verstrichene Zeit zwischen der Entnahme und der Untersuchung sowie das Auskühlen des Biopsates bei einer Lagerung von 4°C. Die Auswertung der Aufnahmen mit der Hochgeschwindigkeitskamera zeigen eine Synchronisierung des Zilienschlages über weite Teile der 3D-Modelle. Über diese metachron schlagenden Bereiche konnte der Partikeltransport beobachtet werden. Dieser ist im Vergleich zur natürlichen Geschwindigkeit der mukoziliären Reinigung um ein Vielfaches geringer, jedoch ist er vorhanden (Konietzko et al., 1995).

Ein großer Vorteil der eingesetzten 3D-Modelle ist der mögliche Transport zu Laboratorien, in welchen mit humanpathogenen Bakterien oder Pilzen gearbeitet werden darf. Hierzu wurden erfolgreich Transportversuche über 24 h durchgeführt und eine SOP ausgearbeitet (Anhang B; „*Transportation of 3D models*“). Es zeigte sich, dass die Lagerung bei RT keinen Einfluss auf das 3D-Atemwegsschleimhautmodell hat, hingegen hatte eine Lagerung bei 4°C das Absterben der Zellen zur Folge. Diese Erkenntnis wurde durch MTT-Tests und die histologische Auswertung bestätigt. In weiteren Untersuchungen wurde versucht, die Anzahl an Epithelzellen auf den 3D-Modellen zu bestimmen. Aufgrund der starken Verankerung der Epithelzellen auf der Modelloberfläche war dies jedoch nicht exakt möglich. Die Behandlung mit Trypsin sowie die mechanische Beanspruchung der Modelloberfläche durch mehrfaches, turbulentes Pipettieren der Lösung resultierte nur teilweise in einer Ablösung der Epithelzellen. Dennoch wurde das Vorgehen in einem Protokoll (Anhang: B; „*Detachment of epithelial cells from a 3D human airway mucosa model*“) festgehalten, welches als Basis für weitere Versuche dienen kann. Die Anzahl an Epithelzellen ist ein entscheidender Parameter für die Verwendung der 3D-Modelle in Infektionsstudien. Kann die Zahl bestimmt werden, so ist es möglich, die Anzahl der zur Infektion benötigten Erreger zu berechnen, die MOI (*multiplicity of infection*). Braian et al. (2015) infizierten humane 3D-Lungengewebemodelle über die Infektion von Makrophagen mit Tuberkuloseerregern (MOI von 10) im Verhältnis zu 10^5 Epithelzellen.

4.10 Charakterisierung der Interaktion von wirkstoffbeladenen Partikeln mit einem *in vivo*-Infektionsmodell

Mit der Großen Wachsmotte *G. mellonella* war es möglich, die antimikrobielle Wirkung der mit Antibiotika beladenen Partikel in einem *in vivo*-Infektionsmodell zu untersuchen. Es zeigte sich, dass *G. mellonella* ein sehr sensitives und reproduzierbares Infektionsmodell ist (Urrialde et al., 2016; Danis-Wlodarczyk et al., 2016; Purves et al., 2010). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Partikel keine schädliche Wirkung auf die Larven haben. AZT-beladene Partikel töten die injizierten *P. aeruginosa*-Bakterien um 27,5 % besser als AZT in Lösung (bei 0,1 mg/ml AZT). Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Larven, welche mit den AZT-beladenen Partikeln und den Bakterien beimpft wurden, ist deutlich höher. Diese Wirkungssteigerung beruht zu einem großen Teil auf der kontinuierlichen Freisetzung des AZTs aus den Partikeln (Depoteffekt) (Varma und Sadasivan, 2014; Ornelas-Megiatio et al., 2012). Des Weiteren wird deutlich, dass AZT in Lösung bzw. Partikel mit AZT-Beladung die Larven bei der Bekämpfung von eventuell durch die PBS-Injektion eingebrachte Erreger unterstützen. In den Positivproben waren nach 48 h alle Larven tot.

Die in die Wachsmotten injizierte Dosis an AZT beträgt umgerechnet auf einen Menschen mit 80 kg Körpergewicht 320 mg AZT in Lösung bzw. 128 mg AZT in den Partikeln. Dieses Ergebnis zeigt, dass aufgrund der effektiveren Wirkung die Menge an AZT um das Zweieinhalbfache reduziert werden könnte. Im Vergleich dazu inhalieren CF-Patienten, welche Cayston® einnehmen, 225 mg AZT pro Tag (3×75 mg) (Belavic, 2011). Dieses Beispiel verdeutlicht, dass sich die in dem Partikel befindliche Menge an AZT in einem realistischen Bereich bewegt. Jedoch wäre es von Vorteil, die AZT-Konzentration in den Partikeln zu erhöhen (z. B. auf 40 Gew.-%), um die zu inhalierende Menge an Partikel auf ca. 100 mg pro Inhalation zu reduzieren.

4.11 Bewertung der PLGA-basierten Partikel als Wirkstoffträger für die inhalative Applikation

Bakterielle und fungale Lungeninfekte in Kombination mit starker Schleimbildung stellen eine oft schwer zu behandelnde Situation dar. Gerade bei Patienten mit Vorerkrankungen wie CF oder primärer ziliärer Dyskinesie wird aufgrund der eingeschränkten Reinigungsfunktion der Lunge und des viskosen Bronchialsekrets das mikrobielle Wachstum stark gefordert (Bjarnsholt et al., 2011; Dueesberg, 2015; Boisvert et al., 2016). Die Patienten nehmen häufig verschiedene Medikamente durch Inhalation ein, was zum Teil sehr zeitaufwändig und mit vielen Nebenwirkungen verbunden ist (Flamme, 2014). Partikuläre Wirkstofftransportsysteme sind die Basis für eine Vereinfachung der inhalativen Applikationsform mit der Aussicht auf eine effizientere Wirkung der eingelagerten Medikamente. Die Einlagerung von unterschiedlichen Wirkstoffen in komplett voneinander getrennten Kompartimenten eröffnet die Möglichkeit, ein funktionalisiertes partikuläres Wirkstoffträgersystem auf die

Bedürfnisse des Patienten anzupassen. In dieser Arbeit wurden Partikel mit zwei Kompartimenten hergestellt, in welche einer bzw. eine Kombination aus zwei der vier untersuchten Wirkstoffe eingelagert wurde. Für die Herstellung eines Partikels mit drei Kompartimenten muss lediglich der verwendete Versuchsaufbau minimal geändert werden. Die eingesetzten Konzentrationen und der Herstellungsprozess bleiben identisch. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse stützen die Idee für eine inhalative Gabe von funktionalisierten Partikeln mit drei Kompartimenten und unterschiedlichen Wirkstoffen (Abbildung 4.1). Der in der Lunge mit Bakterien bzw. Pilzen infizierte Patient (I) inhaliert die Partikel über einen herkömmlichen Sprühvernebler. So gelangen die Partikel unkompliziert, schmerzfrei, schnell und effizient in die Lunge und landen auf dem zähflüssigen und festsitzenden Schleim (II). Zuerst wird das im Partikel eingelagerte Mukolytikum (A) freigesetzt, welches den Schleim lokal löst und es ermöglicht, dass die Partikel weiter in den Schleim eindringen können und die im Schleim sitzenden Bakterien und Pilze freilegt. Zeitverzögert werden ein Antibiotikum (B) und ein Antimykotikum (C) freigesetzt, welche die umliegende Bakterien und Pilze effektiv abtöten (III). Im Idealfall wird nach der Behandlung ein infektionsfreies Gewebe mit natürlicher ziliärer Reinigungsfunktion erhalten (IV). Diese neue Applikationsform - speziell für Mukoviszidose-Patienten - wurde am 8. August 2016 beim Deutschen Patent- und Markenamt (DPMA) eingereicht.

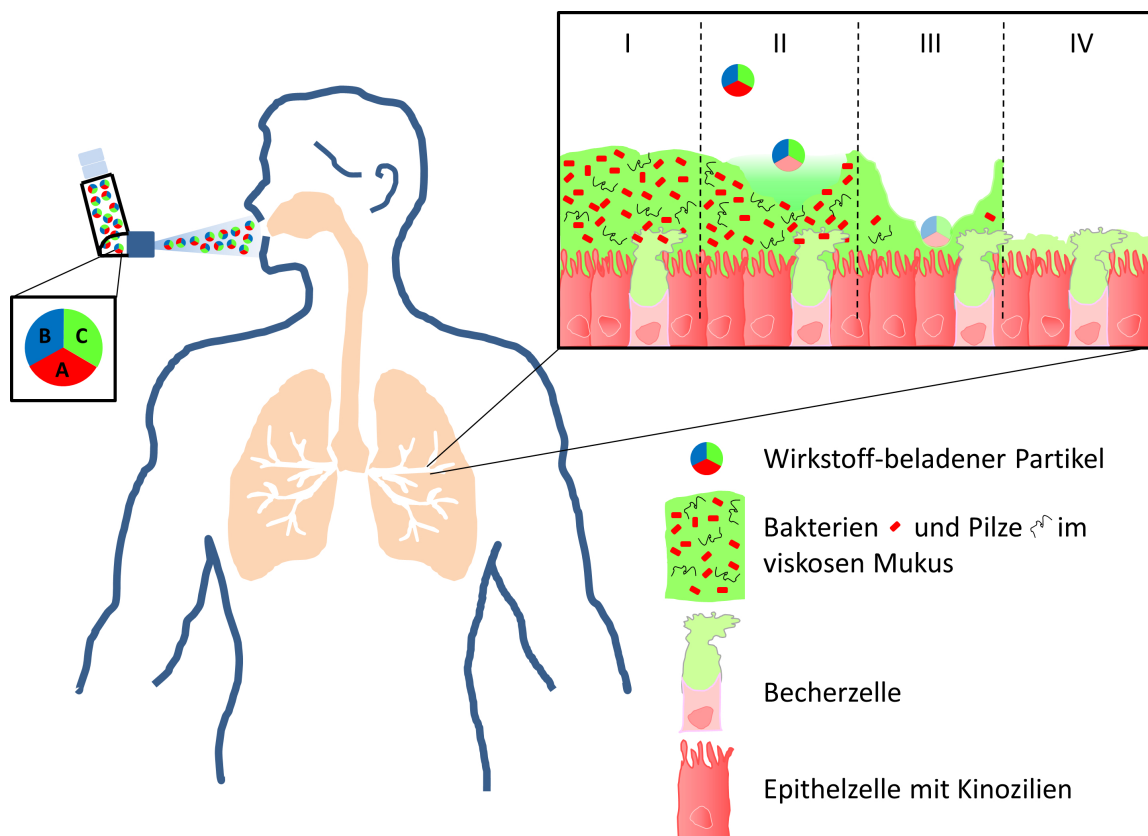


Abbildung 4.1: Schema einer inhalativen Gabe von Partikeln mit drei Kompartimenten. Partikel beladen mit Mukolytikum (A), Antibiotikum (B) und Antimykotikum (C). Festsitzender Schleim mit Bakterien und Pilzen (I). Das aus dem Partikel freigesetzte Mukolytikum löst den Schleim (II). Das verzögert freigelassene Antibiotikum und Antimykotikum bekämpft die Bakterien und Pilze (III). Infektionsfreies Gewebe mit natürlicher ziliärer Reinigungsfunktion (IV).

Das von den Partikeln freigesetzte Mukolytikum löst den humanen Schleim auf den 3D-Modellen bzw. auf dem humanen Bronchusgewebe (II). Des Weiteren halten die Partikel den Wirkstoffspiegel über eine längere Zeit konstant und erreichen dadurch eine hohe Abtötungsrate der Erreger (III). Sie lösen sich nach einer chemisch im Trägermaterial festgelegten Zeit auf bzw. werden von den Zilien abtransportiert (IV). Diese Funktionen der Partikel konnten in der vorliegenden Arbeit zu einem großen Teil einzeln erfolgreich überprüft werden.

Das Gewebe eines Patienten mit Lungeninfektion ist häufig entzündet und daher im Vergleich zu gesundem Gewebe durchlässiger für kleine Partikel. Partikel, die eine Länge kleiner $0,5\ \mu\text{m}$ aufweisen, gelangen daher häufig über das entzündete Lungengewebe in den Blutkreislauf und zirkulieren systemisch im Körper (Kastury et al., 2017; Barth, 2013). Diese Partikel stehen einer wirksamen Behandlung in der Lunge nicht mehr zur Verfügung. Durch die Verwendung von Partikeln mit einer durchschnittlichen Größe von ca. $1\ \mu\text{m}$ wird dieser Übergang in den Blutkreislauf minimiert und eine höhere Wirkstoffdosis am Wirkort erreicht. Mit der angestrebten Größe von $1\ \mu\text{m}$ gelangen die Partikel mittels inhalativer Applikation bis in die Bronchiolen, jedoch nicht zu tief in die Lunge (Alveolen), um das Migrieren der Partikel in den Blutkreislauf zu unterbinden. Aufgrund der Diffusion der eingelagerten Wirkstoffe, ist ein Erreichen der Alveolen denkbar.

Gestützt durch die in dieser Arbeit erzielten Resultate und das oben beschriebene Design der Partikel mit drei Kompartimenten ergeben sich eine Reihe von Vorteilen. Die Medikamente werden gezielt, einfach, schmerzfrei und schnell an den gewünschten Wirkort transportiert. Durch die Funktionalisierung des Partikelsystems und die gesteuerte Freisetzung ist eine enorme Steigerung der Wirkeffizienz und Wirkdauer der einzelnen Medikamente über eine Erhöhung der lokalen Medikamentendosis zu erwarten. Das konnte auch für ein wasserunlösliches Medikament (ICZ) gezeigt werden. Es bestätigte sich eine Langzeitwirkung der Medikamente aufgrund der Depotfunktion in den Partikeln und daraus kann auf eine Reduzierung der Anzahl von Medikamenteneinnahmen sowie auf eine effektivere Linderung der Symptome geschlossen werden. Es sind weniger Nebenwirkungen für den Patienten zu erwarten, da keine systemische Gabe der Wirkstoffe erfolgt und alle eingesetzten Wirkstoffe von der FDA als unbedenklich eingestuft und zugelassen sind. Es ist ebenfalls zu erwarten, dass die Resistenzbildung vorhandener Bakterien und Pilze verringert wird, da, wie bei den *in vivo*-Infektionsmodellen gezeigt, eine effektivere Abtötung der Erreger stattfindet. Die Partikel sind ohne Rückstände biologisch abbaubar und verbleiben nur für eine begrenzte Zeit in der Lunge. Es sind verschiedenste auf den Patienten abgestimmte Wirkstoffkombinationen möglich.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit etablierten, auf PLGA basierenden, partikulären Systeme enormes Potenzial für den Einsatz als multifunktionales, individuell anpassbares, inhalatives Therapeutikum für den gezielten Wirkstofftransport in die Lunge. Die auf den Partikeln basierende Erhöhung der Wirkeffizienz von schon in der Praxis angewandten Wirkstoffen verdeutlicht die hervorragende Eignung der Partikel für die vorgestellte Anwendung.

4.12 Ausblick

Mit dieser Arbeit ist es gelungen, stabile, Gelatine-basierte Filme in unterschiedlichen Schichtdicken zu entwickeln und diese hinsichtlich der Proteinadsorption von humanen und bakteriellen Proteinen zu untersuchen. Erweiterte Analysen des Adsorptionsverhaltens von verschiedenen Proteinen und die Auswirkung von unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen (Quervernetzungsgrad, Porengröße und eingelagerte Stoffe) auf die Proteinadsorption könnten Aufschluss geben über eine gezielte Beeinflussung der Anlagerung bestimmter Proteine, gesteuert durch die Oberflächenmorphologie bzw. -zusammensetzung. Die Identifizierung adsorbierter, bakterieller Proteine mit der in dieser Arbeit beschriebenen Software zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Jedoch würde eine Automatisierung in Teilen der Software die Auswertung erheblich beschleunigen. Des Weiteren sollten statistische Aspekte wie etwa die Proteingröße und die vorhandenen Schnittstellen des Enzyms mit in die Auswertung einfließen. Die markierungsfreie Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen mit proteinbasierten Oberflächen sowie die Veränderung der adsorbierten Proteine im zeitlichen Verlauf (Vroman-Effekt) stellen ein breites Untersuchungsfeld dar. Die Herangehensweise mittels ToF-SIMS bietet neue Perspektiven für die Gestaltung sowie das einfache und effiziente Screening von unterschiedlichen Arten von Hydrogelen hinsichtlich ihrer Protein-Hydrogel-Wechselwirkung. Das ebenfalls in dieser Arbeit untersuchte Migrationsverhalten von Proteinen in das Gelatinehydrogel bildet die Basis für ergänzende Experimente. Die Ermittlung der Porengröße und die Herstellung von Gelatinefilmen mit unterschiedlichen Quervernetzungsgraden wären erforderlich, um das Verhalten in Interaktion mit Proteinen und Zellen besser zu charakterisieren und somit auch das Einwachsen des Implantats *in vivo* zu optimieren. Die Adsorption von Plasmaproteinen und bakteriellen Proteinen spielt einerseits für das Einwachsen im Gewebe, andererseits für die Adhäsion von Bakterien und die Ausbildung eines Biofilms eine wichtige Rolle. Diese Parameter gilt es gezielt und proaktiv zu beeinflussen. Eine chemische Modifizierung des Gelatinehydrogels mit antibakteriellen bzw. antifungalen Eigenschaften könnte Infektionen entgegenwirken. Hierbei könnte die Gelatine als eine Art Wirkstoffträger mit verzögerter Freisetzung eingesetzt werden. Das in dieser Arbeit etablierte Herstellungsprotokoll der Gelatinefilme sowie die zur Analyse und Charakterisierung genutzten Methoden bilden die Basis für die Herstellung neuer Netzwerke unter Verwendung weiterer Biopolymere.

Die in dieser Arbeit entwickelten, PLGA-basierten partikulären Wirkstoffträgersysteme zeigen enormes Potenzial für den gezielten Transport von Medikamenten in die Lunge. Die Partikel wurden in der vorliegenden Arbeit unter submersen Bedingungen auf die 3D-Modelle appliziert. Eine Verbesserung analog zu der angestrebten physiologischen Applikation wäre das Aufbringen der Partikel auf die 3D-Modelle mittels eines Aerosolgenerators (etwa mit einem Gerät von VITROCELL[®] SYSTEMS; Waldkirch, D). Der Vorgang kann durch eine QCM-Waage kontrolliert werden und spiegelt die *in vivo*-Situation des „Aufatmens“ besser wider. Anschließend könnte die Interaktion der mit einer speziellen Markierung versehenen Partikel (Sonzini et al., 2015) mit Kinozilien-tragenden Zellen unter Verwendung des TEMs auf mikrostruktureller Ebene charakterisiert werden. Durch eine individuelle Auswahl der Wirkstoffe können die Partikel auf die Bedürfnisse von Patienten angepasst werden. Aktuell wird bei vielen CF-Patienten mit *Pseudomonas*-Infektion ein Inhalativum bestehend aus drei Antibiotika eingesetzt: Tobramycin, Colistin und Meropenem (Herrmann et al., 2015).

Diese könnten, eingelagert in je eines der drei Kompartimente des Partikels, aufgrund der kontinuierlichen Freisetzung ebenfalls eine Wirkungssteigerung erzielen. Aufgrund der oft verminderten Virulenz von Laborstämmen sollten diese Versuche mit klinischen Isolaten von *Pseudomonas* aus CF-Lungen untersucht werden. Des Weiteren wäre die Untersuchung der antimikrobiellen sowie einer möglichen Biofilm destabilisierenden Wirkung von AZT-ACC-beladenen Partikel in Interaktion mit etablierten Biofilmen von *P. aeruginosa* von großem Interesse sowie die Untersuchung der Wirkung von ICZ-beladenen Partikeln an mit Pilzen (*A. fumigatus*) infizierten Wachsmotten (*G. mellonella*). *Galleria* wird bereits hierfür als ein erfolgreiches fungales Infektionsmodell eingesetzt (Maurer et al., 2015; Delarze et al., 2015; Fallon et al., 2011). Dieser Ansatz könnte auf eine Co-Infektion von Bakterien und Pilzen ausgeweitet werden, um der *in vivo*-Situation noch ein Stück näher zu kommen und die Wirkung von AZT-ICZ-beladenen Partikeln zu untersuchen. Hierfür sollten ebenfalls Bakterien- und Sporensuspensionen von Patientenisolaten verwendet werden. Wang et al. (2016) zeigten, dass Ambroxol, ein schleimlösendes und schmerzstillendes Arzneimittel, in Kombination mit Ciprofloxacin, einem Antibiotikum, bei inhalativer Gabe eine Wirkungssteigerung erzielt. Es wäre interessant zu untersuchen, ob Ambroxol auch in ein Kompartiment der Partikel eingelagert werden kann, wie es aus den Partikeln freigesetzt wird und ob es dabei seine Wirkung behält. Aufgrund der Löslichkeit der Wirkstoffe in den verwendeten Lösemitteln wurden bisher maximal 20 Gew.-% eines jeden Wirkstoffes in ein einzelnes Kompartiment eingelagert. Hier könnten weitere Versuche Aufschluss geben, ob es möglich ist, eine größere Menge an Wirkstoff einzulagern und wie sich das auf dessen Freisetzungsrates auswirkt. Die Herstellung und Testung von Partikeln mit drei Kompartimenten und drei eingelagerten Wirkstoffen ist einer der nächsten Meilensteine auf dem langen Weg zur klinischen Anwendung.

Literaturverzeichnis

- [Aalexopo 2011] AALEXOPO: *Biofilm formation - Forming Clusters Begins the Microfilm*. online. Mai 2011. – URL <http://jonlieffmd.com/blog/biofilm-geo-politics>. – Stand: 21.08.2016
- [Abke 2003] ABKE, J.: *Verbesserung der Biokompatibilität metallischer Implantate durch kovalente Anbindung einer quervernetzten Kollagenschicht*, Universität Regensburg, Dissertation, 2003
- [Agrawal et al. 1995] AGRAWAL, C. M. ; BEST, J. ; HECKMAN, J. D. ; BOYAN, B. D.: Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture non-unions. In: *Biomaterials* 16 (1995), Nov, Nr. 16, S. 1255–60. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8589196>. – ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking)
- [Ahmad et al. 2015] AHMAD, S. ; JOSEPH, L. ; HAGEN, F. ; MEIS, J. F. ; KHAN, Z.: Concomitant occurrence of itraconazole-resistant and -susceptible strains of *Aspergillus fumigatus* in routine cultures. In: *J Antimicrob Chemother* 70 (2015), Feb, Nr. 2, S. 412–5. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25326091>. – ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking)
- [Ainsworth und Sussman 1966] AINSWORTH, G. C. ; SUSSMAN, A. S.: *The Fungi: An Advanced Treatise*. New York, NY.: Academic Press, 1966
- [An et al. 2015] AN, J. ; JIA, P. ; ZHANG, Y. ; GONG, X. ; HAN, X. ; HE, Y.: Application of biodegradable plates for treating pediatric mandibular fractures. In: *J Craniomaxillofac Surg* 43 (2015), May, Nr. 4, S. 515–20. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25841310>. – ISSN 1878-4119 (Electronic) 1010-5182 (Linking)
- [Arora et al. 2015] ARORA, A. ; KOTHARI, A. ; KATTI, D. S.: Pore orientation mediated control of mechanical behavior of scaffolds and its application in cartilage-mimetic scaffold design. In: *J Mech Behav Biomed Mater* 51 (2015), Nov, S. 169–83. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26256472>. – ISSN 1878-0180 (Electronic) 1878-0180 (Linking)
- [Astete und Sabliov 2006] ASTETE, C. E. ; SABLIOV, C. M.: Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. In: *J Biomater Sci Polym Ed* 17 (2006), Nr. 3, S. 247–89. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16689015>. – ISSN 0920-5063 (Print) 0920-5063 (Linking)
- [Attila et al. 2008] ATTLILA, C. ; UEDA, A. ; CIRILLO, S. L. ; CIRILLO, J. D. ; CHEN, W. ; WOOD, T. K.: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence factors and poplar tree response in the rhizosphere. In: *Microb Biotechnol* 1 (2008), Jan, Nr. 1, S. 17–29. –

- URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21261818>. – ISSN 1751-7915 (Electronic) 1751-7915 (Linking)
- [Ayre et al. 2014] AYRE, A. P. ; PAWAR, H. A. ; KHUTLE, N. M. ; LALITHA, K. G.: Polymeric nanoparticles in drug delivery systems critical review and concepts. In: *Int J Pharm Technol* 5 (2014), Nr. 4, S. 2809–2823
- [Babel 1996] BABEL, W.: *Gelatine - ein vielseitiges Biopolymer*. Chemie in unserer Zeit, 1996
- [Barros et al. 2015] BARROS, A. A. ; RITA, A. ; DUARTE, C. ; PIRES, R. A. ; SAMPAIO-MARQUES, B. ; LUDOVICO, P. ; LIMA, E. ; MANO, J. F. ; REIS, R. L.: Bioresorbable ureteral stents from natural origin polymers. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 103 (2015), Apr, Nr. 3, S. 608–17. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24965000>. – ISSN 1552-4981 (Electronic) 1552-4973 (Linking)
- [Barth 2013] BARTH, M.: *Ablagerung von Feinpartikeln im menschlichen Atemtrakt*. online. 2013. – URL <http://www4.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/18796/ablagerung.png>. – Stand: 17.09.2016
- [Basich et al. 1981] BASICH, J. E. ; GRAVES, T. S. ; BAZ, M. N. ; SCANLON, G. ; HOFFMANN, R. G. ; PATTERSON, R. ; FINK, J. N.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis in corticosteroid-dependent asthmatics. In: *J Allergy Clin Immunol* 68 (1981), Aug, Nr. 2, S. 98–102. – ISSN 0091-6749 (Print) 0091-6749
- [Bauer et al. 2013] BAUER, S. ; SCHMUKI, P. ; MARK, K. von der ; PARK, J.: Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. In: *Prog. Mater. Sci.* 58 (2013), Nr. 3, S. 261–326
- [Bücken 2006] BÜCKEN, A.: *Optimierung der "Whole-Embryo-Culture" von 9,5 Tage alten Rattenembryonen durch Austestung verschiedener Pufferlösungen sowie durch Einführung eines kontinuierlichen Begasungsverfahrens (Rotator-System)*, Freie Universität Berlin, Dissertation, 2006
- [Beck-Sague und Jarvis 1993] BECK-SAGUE, C. ; JARVIS, W. R.: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. In: *J Infect Dis* 167 (1993), May, Nr. 5, S. 1247–51. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8486965>. – ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899 (Linking)
- [Beier 2009] BEIER, W.: *Biologisch abbaubare Kunststoffe*. August 2009. – URL <https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/3834.pdf>. – Stand: 13.08.2016
- [Belavic 2011] BELAVIC, J. M.: Aztreonam for inhalation (Cayston) for cystic fibrosis. In: *Nurse Pract* 36 (2011), Jun, Nr. 6, S. 8–9. – ISSN 0361-1817
- [Benninga 1990] BENNINGA, H.: *A History of Lactic Acid Making*. Springer, New York, 1990

- [Berditsch et al. 2015] BERDITSCH, M. ; JAGER, T. ; STREMPPEL, N. ; SCHWARTZ, T. ; OVERHAGE, J. ; ULRICH, A. S.: Synergistic effect of membrane-active peptides polymyxin B and gramicidin S on multidrug-resistant strains and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 59 (2015), Nr. 9, S. 5288–96. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26077259>
- [Bielecki et al. 2008] BIELECKI, P. ; GLIK, J. ; KAWECKI, M. ; SANTOS, V. A. Martins dos: Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. In: *Biotechnol Lett* 30 (2008), May, Nr. 5, S. 777–90. – ISSN 0141-5492
- [Bjarnsholt et al. 2009] BJARNSHOLT, T. ; JENSEN, P. O. ; FIANDACA, M. J. ; PEDERSEN, J. ; HANSEN, C. R. ; ANDERSEN, C. B. ; PRESSLER, T. ; GIVSKOV, M. ; HOIBY, N.: *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. In: *Pediatr Pulmonol* 44 (2009), Jun, Nr. 6, S. 547–58. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19418571>. – ISSN 1099-0496 (Electronic) 1099-0496 (Linking)
- [Bjarnsholt et al. 2011] BJARNSHOLT, T. ; MOSER, C. ; JENSEN, P. O. ; HOIBY, N.: *Biofilm Infection*. Springer Science+Business Media, 2011
- [Blokzijl und Engberts 1993] BLOKZIJL, W. ; ENGBERTS, J. B. F. N.: Hydrophobe Effekte - Ansichten und Tatsachen. In: *Angewandte Chemie* 105 (1993), S. 1610–1648
- [Boisvert et al. 2016] BOISVERT, A. A. ; CHENG, M. P. ; SHEPPARD, D. C. ; NGUYEN, D.: Microbial Biofilms in Pulmonary and Critical Care Diseases. In: *Ann Am Thorac Soc* (2016), Jun 27. – ISSN 2325-6621
- [Boucher et al. 1996] BOUCHER, J. C. ; MARTINEZ-SALAZAR, J. ; SCHURR, M. J. ; MUDD, M. H. ; YU, H. ; DERETIC, V.: Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. In: *J Bacteriol* 178 (1996), Jan, Nr. 2, S. 511–23. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550474>. – ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking)
- [Braian et al. 2015] BRAIAN, C. ; SVENSSON, M. ; BRIGHENTI, S. ; LERM, M. ; PARASA, V. R.: A 3D Human Lung Tissue Model for Functional Studies on Mycobacterium tuberculosis Infection. In: *J Vis Exp.* (2015), 2015/10/05/, Nr. 104, S. e53084. – URL <http://www.jove.com/video/53084>. – ISSN 1940-087X
- [Bucher et al. 2016] BUCHER, V. ; KUBON, M. ; STETT, A.: *Funktionalisierung von Oberflächen*. online. April 2016. – URL <https://www.vde.com/de/fg/dgbmt/arbeitsgebiete/projekte/intelligente-implantate/flu/seiten/funktionale-oberflaechen.aspx>. – Stand: 10.08.2016
- [Buss und Rauh 2013] BUSS, O. ; RAUH, O.: Bakterielle Herstellung von biologisch abbaubaren Kunststoffen. In: *GDCh - Fachgruppe Biochemie* 42 (2013)
- [Chadwick et al. 1990] CHADWICK, J. S. ; CALDWELL, S. S. ; CHADWICK, P.: Adherence patterns and virulence for *Galleria mellonella* larvae of isolates of *Serratia marcescens*. In: *J Invertebr Pathol* 55 (1990), Jan, Nr. 1, S. 133–4. – ISSN 0022-2011 (Print) 0022-2011

- [Chen et al. 2008] CHEN, H. Y. ; MCCLELLAND, A. A. ; CHEN, Z. ; LAHANN, J.: Solventless adhesive bonding using reactive polymer coatings. In: *Anal Chem* 80 (2008), Nr. 11, S. 4119–24. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18457409>
- [Chen et al. 2016] CHEN, S. H. ; CHANG, Y. ; ISHIHARA, K.: Reduced blood cell adhesion on polypropylene substrates by a simple surface zwitterionization. In: *Langmuir* (2016), Nov 1. – ISSN 0743-7463
- [Chiba et al. 2016] CHIBA, S. ; ANADA, T. ; SUZUKI, K. ; SAITO, K. ; SHIWAKU, Y. ; MIYATAKE, N. ; BABA, K. ; IMAIZUMI, H. ; HOSAKA, M. ; ITOI, E. ; SUZUKI, O.: Effect of resorption rate and osteoconductivity of biodegradable calcium phosphate materials on the acquisition of natural bone strength in the repaired bone. In: *J Biomed Mater Res A* (2016), Jul 8. – ISSN 1549-3296
- [Chitrangi et al. 2016] CHITRANGI, S. ; NAIR, P. ; KHANNA, A.: 3D engineered In vitro hepatospheroids for studying drug toxicity and metabolism. In: *Toxicol In Vitro* (2016), Oct 26. – ISSN 0887-2333
- [Cosse et al. 2016] COSSE, A. ; KONIG, C. ; LAMPRECHT, A. ; WAGNER, K. G.: Hot Melt Extrusion for Sustained Protein Release: Matrix Erosion and In Vitro Release of PLGA-Based Implants. In: *AAPS PharmSciTech* (2016), May 18. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27193002>. – ISSN 1530-9932 (Electronic) 1530-9932 (Linking)
- [Costerton et al. 1995] COSTERTON, J. W. ; LEWANDOWSKI, Z. ; CALDWELL, D. E. ; KORBER, D. R. ; LAPPIN-SCOTT, H. M.: Microbial biofilms. In: *Annu Rev Microbiol* 49 (1995), S. 711–45. – ISSN 0066-4227 (Print) 0066-4227
- [Cowan et al. 2004] COWAN, C. M. ; SHI, Y. Y. ; AALAMI, O. O. ; CHOU, Y. F. ; MARI, C. ; THOMAS, R. ; QUARTO, N. ; CONTAG, C. H. ; WU, B. ; LONGAKER, M. T.: Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. In: *Nat Biotechnol* 22 (2004), May, Nr. 5, S. 560–7. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077117>. – ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking)
- [Czerner et al. 2015] CZERNER, M. ; FELLAY, L. S. ; SUAREZ, M. P. ; FRONTINI, P. M. ; FASCE, L. A.: Determination of Elastic Modulus of Gelatin Gels by Indentation Experiments. In: *Procedia Materials Science* 8 (2015), 2015/01/01, S. 287–296. – URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211812815000760>. – ISSN 2211-8128
- [Danis-Wlodarczyk et al. 2016] DANIS-WLODARCZYK, K. ; VANDENHEUVEL, D. ; JANG, H. B. ; BRIERS, Y. ; OLSZAK, T. ; ARABSKI, M. ; WASIK, S. ; DRABIK, M. ; HIGGINS, G. ; TYRRELL, J. ; HARVEY, B. J. ; NOBEN, J. P. ; LAVIGNE, R. ; DRULIS-KAWA, Z.: A proposed integrated approach for the preclinical evaluation of phage therapy in Pseudomonas infections. In: *Sci Rep* 6 (2016), S. 28115. – ISSN 2045-2322
- [D’Auria et al. 1994] D’AURIA, F.D. ; SIMONETTI, N. ; STRIPPOLI, V.: Increased itraconazole antifungal activity by agar diffusion test. In: *Journal of Microbiological*

- Methods* 20 (1994), Nr. 1, S. 47–54. – URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167701294900639>. – ISSN 0167-7012
- [De Marie 2000] DE MARIE, S.: New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections. In: *Haematologica* 85 (2000), Jan, Nr. 1, S. 88–93. – ISSN 0390-6078 (Print) 0390-6078
- [Delarze et al. 2015] DELARZE, E. ; ISCHER, F. ; SANGLARD, D. ; COSTE, A. T.: Adaptation of a *Gaussia princeps* Luciferase reporter system in *Candida albicans* for in vivo detection in the *Galleria mellonella* infection model. In: *Virulence* 6 (2015), Nr. 7, S. 684–93. – ISSN 2150-5594
- [Denning 1998] DENNING, D. W.: Invasive aspergillosis. In: *Clin Infect Dis* 26 (1998), Apr, Nr. 4, S. 781–803; quiz 804–5. – ISSN 1058-4838 (Print) 1058-4838
- [Dhiman et al. 2005] DHIMAN, H. K. ; RAY, A. R. ; PANDA, A. K.: Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. In: *Biomaterials* 26 (2005), Mar, Nr. 9, S. 979–86. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15369686>. – ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking)
- [DIN EN ISO NORM 2009] DIN EN ISO NORM: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität - DIN EN ISO 10993-5:2009-10 / Beuth Verlag. Oktober 2009. – Norm. DIN NORM
- [Doring et al. 2004] DORING, G. ; HOIBY, N. ; CONSENSUS STUDY, Group: Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. In: *J Cyst Fibros* 3 (2004), Jun, Nr. 2, S. 67–91. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15463891>. – ISSN 1569-1993 (Print) 1569-1993 (Linking)
- [Doser 2015] DOSER, M. ; MEDIZINTECHNIK E.V., Institut für Textil-und Verfahrenstechnik Verein zur Förderung der Biotechnologie und (Hrsg.): *Bewertung der Biokompatibilität von Medizinprodukten - Workshop: Innovatives Medizinprodukt - was nun ?* 2015
- [Du und Johannsmann 2004] DU, B. ; JOHANNSMANN, D.: Operation of the quartz crystal microbalance in liquids: derivation of the elastic compliance of a film from the ratio of bandwidth shift and frequency shift. In: *Langmuir* 20 (2004), Mar 30, Nr. 7, S. 2809–12. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15835157>. – ISSN 0743-7463 (Print) 0743-7463 (Linking)
- [Duesberg 2015] DUEESBERG, U.: *Was ist Mukoviszidose?* online. August 2015. – URL <https://muko.info/mukoviszidose/ueber-mukoviszidose/grundlagen/was-ist-mukoviszidose.html>. – Stand: 03.09.2016
- [Dufour und Leung 2010] DUFOUR, D. ; LEUNG, C. M.: Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. In: *Endodontic Topics* 22 (2010), Nr. 1, S. 2–16. – URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>. – ISSN 1601-1546
- [Dutta et al. 2008] DUTTA, A. K. ; NAYAK, A. ; BELFORT, G.: Viscoelastic properties of adsorbed and cross-linked polypeptide and protein layers at a solid-liquid interface. In: *J. Colloid Interface Sci.* 324 (2008), Nr. 1-2, S. 55–60

- [Eastoe 1955] EASTOE, J. E.: The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. In: *Biochem J* 61 (1955), Dec, Nr. 4, S. 589–600. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13276342>. – ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking)
- [Elzoghby et al. 2012] ELZOGHBY, A. O. ; SAMY, W. M. ; ELGINDY, N. A.: Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. In: *J Control Release* 161 (2012), Jul 10, Nr. 1, S. 38–49. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22564368>. – ISSN 1873-4995 (Electronic) 0168-3659 (Linking)
- [Ewig 2015] EWIG, S.: Geschichte der ambulant erworbenen Pneumonie. In: EWIG, Santiago (Hrsg.): *Pneumonie*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2015, S. 1–9. – URL http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45996-6_2-1. – ISBN 978-3-662-45996-6
- [Fallon et al. 2011] FALLON, J. P. ; TROY, N. ; KAVANAGH, K.: Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. In: *Virulence* 2 (2011), Sep-Oct, Nr. 5, S. 413–21. – ISSN 2150-5594
- [Fazli et al. 2014] FAZLI, M. ; ALMBLAD, H. ; RYBTKE, M. L. ; GIVSKOV, M. ; EBERL, L. ; TOLKER-NIELSEN, T.: Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. In: *Environ Microbiol* 16 (2014), Jul, Nr. 7, S. 1961–81. – ISSN 1462-2912
- [Fecher et al. 2016] FECHER, D. ; HOFMANN, E. ; BUCK, A. ; BUNDSCHUH, R. ; NIETZER, S. ; DANDEKAR, G. ; WALLEES, T. ; WALLEES, H. ; LUCKERATH, K. ; STEINKE, M.: Human Organotypic Lung Tumor Models: Suitable For Preclinical 18F-FDG PET-Imaging. In: *PLoS One* 11 (2016), Nr. 8, S. e0160282. – ISSN 1932-6203
- [File 2004] FILE, Jr.: *Streptococcus pneumoniae* and community-acquired pneumonia: a cause for concern. In: *Am J Med* 117 Suppl 3A (2004), Aug 2, S. 39S–50S. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15360096>. – ISSN 0002-9343 (Print) 0002-9343 (Linking)
- [Flamme 2014] FLAMME, M.: *Colistin*. online. November 2014. – URL <http://www.onmeda.de/Wirkstoffe/Colistin/nebenwirkungen-medikament-10.html>. – Stand: 30.08.2016
- [Flemming und Wingender 2010] FLEMMING, Hans-Curt ; WINGENDER, Jost: The biofilm matrix. In: *Nat Rev Micro* 8 (2010), 09//print, Nr. 9, S. 623–633. – URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>. – ISSN 1740-1526
- [Frederiksen et al. 2006] FREDERIKSEN, B. ; PRESSLER, T. ; HANSEN, A. ; KOCH, C. ; HOIBY, N.: Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. In: *Acta Paediatr* 95 (2006), Sep, Nr. 9, S. 1070–4. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16938752>. – ISSN 0803-5253 (Print) 0803-5253 (Linking)
- [Freudig 2006] FREUDIG, D.: *Lexikon der Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2006

- [Fridkin und Jarvis 1996] FRIDKIN, S. K. ; JARVIS, W. R.: Epidemiology of nosocomial fungal infections. In: *Clin Microbiol Rev* 9 (1996), Oct, Nr. 4, S. 499–511. – ISSN 0893-8512 (Print) 0893-8512
- [Froeling et al. 2010] FROELING, F. E. ; MARSHALL, J. F. ; KOCHER, H. M.: Pancreatic cancer organotypic cultures. In: *J Biotechnol* 148 (2010), Jul 1, Nr. 1, S. 16–23. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083148>. – ISSN 1873-4863 (Electronic) 0168-1656 (Linking)
- [Gachon et al. 1986] GACHON, A. M. ; BILBAULT, T. ; DASTUGUE, B.: Protein migration through hydrogels: a tool for measuring porosity–application to hydrogels used as contact lenses. In: *Analytical biochemistry* 157 (1986), 1986/09//, Nr. 2, S. 249–255. – URL <http://europepmc.org/abstract/MED/3777427>[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90622-6](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(86)90622-6). – ISSN 0003-2697
- [Garber et al. 2011] GARBER, J. ; BARBEE, R. W. ; BIELITZKI, J. T. ; CLAYTON, L. A. ; DONOVAN, J. C. ; LIPMAN, N. S. ; LOCKE, P. A. ; TURNER, P. V. ; WOOD, G. A. ; WÜRBEL, H.: Guide for the care and use of laboratory animals. In: *The National Academies Press* 8 (2011)
- [Gasteiger et al. 2003] GASTEIGER, E. ; GATTIKER, A. ; HOOGLAND, C. ; IVANYI, I. ; APPEL, R. D. ; BAIROCH, A.: ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), Jul 1, Nr. 13, S. 3784–8. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824418>. – www.expasy.org. – ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking)
- [Ghaffar et al. 2011] GHAFFAR, A. ; VERSCHUREN, P. G. ; GEENEVASEN, J. A. ; HANDELS, T. ; BERARD, J. ; PLUM, B. ; DIAS, A. A. ; SCHOENMAKERS, P. J. ; WAL, S. van der: Fast in vitro hydrolytic degradation of polyester urethane acrylate biomaterials: structure elucidation, separation and quantification of degradation products. In: *J Chromatogr A* 1218 (2011), Jan 21, Nr. 3, S. 449–58. – ISSN 0021-9673
- [Giol et al. 2015] GIOL, E. D. ; SCHAUBROECK, D. ; KERSEMANS, K. ; DE VOS, F. ; VAN VLIERBERGHE, S. ; DUBRUEL, P.: Bio-inspired surface modification of PET for cardiovascular applications: Case study of gelatin. In: *Colloids Surf B Biointerfaces* 134 (2015), Oct 1, S. 113–21. – ISSN 0927-7765
- [Graf-Hausner 2014] GRAF-HAUSNER, U.: *Tissue Engineering für die Wirkstoffentwicklung*. online. Juli 2014. – URL http://www.awa.zh.ch/dam/volkswirtschaftsdirektion/awa/standortfoerderung/deutsch/veranstaltungen/2014/unternehmensforum_2014/Handouts/03_Fachvortrag_Graf-Hauser_03072014.pdf.spooler.download.1405343668846.pdf/03_Fachvortrag_Graf-Hauser_03072014.pdf. – Stand: 13.08.2016
- [Graham et al. 2006] GRAHAM, Daniel J. ; WAGNER, Matthew S. ; CASTNER, David G.: Information from complexity: Challenges of TOF-SIMS data interpretation - Proceedings of the Fifteenth International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS). In: *Applied Surface Science* 252 (2006), Nr. 19, S. 6860 – 6868. – URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433206004612>. – ISSN 0169-4332

- [Greenberger et al. 1993] GREENBERGER, P. A. ; MILLER, T. P. ; ROBERTS, M. ; SMITH, L. L.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with and without evidence of bronchiectasis. In: *Ann Allergy* 70 (1993), Apr, Nr. 4, S. 333–8. – ISSN 0003-4738 (Print) 0003-4738
- [Gröner 2013] GRÖNER, A.: *Lungenentzündung - Prognose*. online. 2013. – URL <http://www.lungenaerzte-im-netz.de/krankheiten/lungenentzuendung/prognose/>. – Stand: 02.09.2016
- [Groeber et al. 2016] GROEBER, F. ; ENGELHARDT, L. ; LANGE, J. ; KURDYN, S. ; SCHMID, F. F. ; RUCKER, C. ; MIELKE, S. ; WALLES, H. ; HANSMANN, J.: A first vascularized skin equivalent for as an alternative to animal experimentation. In: *Altex* (2016), May 15. – ISSN 1868-596x
- [Groll und Ritter 2005] GROLL, A. H. ; RITTER, J.: Diagnose und Therapie von Pilzinfektionen und der Pneumozystis-Pneumonie bei Kindern und Jugendlichen mit neoplastischen Erkrankungen. In: *Klin Pädiatr* 217 (2005), Nr. S37-S66
- [Guillamet et al. 2016] GUILLAMET, C. V. ; VAZQUEZ, R. ; NOE, J. ; MICEK, S. T. ; KOLLEF, M. H.: A cohort study of bacteremic pneumonia: The importance of antibiotic resistance and appropriate initial therapy? In: *Medicine (Baltimore)* 95 (2016), Aug, Nr. 35, S. e4708. – ISSN 0025-7974
- [Gurcan et al. 2010] GURCAN, S. ; TIKVESLI, M. ; ERYILDIZ, C. ; EVCI, C. ; ENER, B.: [Antifungal susceptibilities of *Aspergillus* spp. strains isolated from invasive aspergillosis cases]. In: *Mikrobiyol Bul* 44 (2010), Apr, Nr. 2, S. 273–8. – ISSN 0374-9096 (Print) 0374-9096
- [Habash und Reid 1999] HABASH, M. ; REID, G.: Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. In: *J Clin Pharmacol* 39 (1999), Sep, Nr. 9, S. 887–98. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471979>. – ISSN 0091-2700 (Print) 0091-2700 (Linking)
- [Hall-Stoodley et al. 2004] HALL-STOODLEY, L. ; COSTERTON, J. W. ; STOODLEY, P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. In: *Nat Rev Microbiol* 2 (2004), Februar, Nr. 2, S. 95–108. – ISSN 1740-1526 (Print) 1740-1526
- [Hament et al. 1999] HAMENT, J. M. ; KIMPEN, J. L. ; FLEER, A. ; WOLFS, T. F.: Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. In: *FEMS Immunol Med Microbiol* 26 (1999), Dec, Nr. 3-4, S. 189–95. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10575129>. – ISSN 0928-8244 (Print) 0928-8244 (Linking)
- [Hamouda et al. 2016] HAMOUDA, S. ; CHRAIET, K. ; KHALSI, F. ; BEL HADJ, I. ; BRINI, I. ; SMAOUI, H. ; BARSAOUI, S. ; SAMOUD, A. ; BEN BECHER, S. ; BEN JABALLAH, N. ; KECHRID, A. ; TINSA, F. ; BOUSSETTA, K.: Community-acquired pleuropneumonia in children: Bacteriological and therapeutic challenges. In: *Tunis Med* 94 (2016), Apr, Nr. 4, S. 290–297. – ISSN 0041-4131 (Print) 0041-4131

- [Hancock und Speert 2000] HANCOCK, R. E. ; SPEERT, D. P.: Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. In: *Drug Resist Updat* 3 (2000), August, Nr. 4, S. 247–255. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498392>. – ISSN 1532-2084 (Electronic) 1368-7646 (Linking)
- [Hansen und Skov 2015] HANSEN, C. ; SKOV, M.: Evidence for the efficacy of aztreonam for inhalation solution in the management of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. In: *Ther Adv Respir Dis* 9 (2015), Feb, Nr. 1, S. 16–21. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25471692>. – ISSN 1753-4666 (Electronic) 1753-4658 (Linking)
- [Hasan et al. 2015] HASAN, A. ; PAUL, A. ; MEMIC, A. ; KHADEMHOSEINI, A.: A multilayered microfluidic blood vessel-like structure. In: *Biomed Microdevices* 17 (2015), Oct, Nr. 5, S. 88. – ISSN 1387-2176
- [Hasenberg 2008] HASENBERG, M.: *Entwicklung eines Modellsystems zur Untersuchung spezifischer T-Zell Reaktionen gegen Aspergillus fumigatus*, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Dissertation, 2008
- [Hawksworth 2001] HAWKSWORTH, D. L.: The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. In: *Mycol. Res.* 105 (2001), April, Nr. 12, S. 1422–1432
- [Heijerman 2005] HEIJERMAN, H.: Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. In: *J Cyst Fibros* 4 Suppl 2 (2005), Aug, S. 3–5. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970469>. – ISSN 1569-1993 (Print) 1569-1993 (Linking)
- [Hemmersam et al. 2005] HEMMERSAM, A. G. ; FOSS, M. ; CHEVALLIER, J. ; BENSENBACHER, F.: Adsorption of fibrinogen on tantalum oxide, titanium oxide and gold studied by the QCM-D technique. In: *Colloids Surf B Biointerfaces* 43 (2005), Jul 10, Nr. 3-4, S. 208–15. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15978785>. – ISSN 0927-7765 (Print) 0927-7765 (Linking)
- [Hench und Polak 2002] HENCH, L. L. ; POLAK, J. M.: Third-generation biomedical materials. In: *Science* 295 (2002), Feb 8, Nr. 5557, S. 1014–+. – URL <GotoISI>://WOS:000173793000045. – ISSN 0036-8075
- [Herbrecht et al. 2002] HERBRECHT, R. ; DENNING, D. W. ; PATTERSON, T. F. ; BENNETT, J. E. ; GREENE, R. E. ; OESTMANN, J. W. ; KERN, W. V. ; MARR, K. A. ; RIBAUD, P. ; LORTHOLARY, O. ; SYLVESTER, R. ; RUBIN, R. H. ; WINGARD, J. R. ; STARK, P. ; DURAND, C. ; CAILLOT, D. ; THIEL, E. ; CHANDRASEKAR, P. H. ; HODGES, M. R. ; SCHLAMM, H. T. ; TROKE, P. F. ; PAUW, B. de: Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. In: *N Engl J Med* 347 (2002), Aug 8, Nr. 6, S. 408–15. – ISSN 0028-4793
- [Herrmann et al. 2015] HERRMANN, G. ; FREITAG, E. ; DEPPISCH, C. ; HEYDER, S. ; GRAEPLER-MAINKA, U. ; RIETHMÜLLER, J.: Inhalative meropenem-tobramycin-colistin combination improves lung function in chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization. In: *Journal of Cystic Fibrosis* 14 (2015), 2015/06/01, S. S86. – URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569199315302903>. – ISSN 1569-1993

- [Höffken 2009] HÖFFKEN, G.: Schwere, ambulant erworbene Pneumonie. In: *Intensivmed.* 46 (2009), S. 474–479
- [Höffken et al. 2009] HÖFFKEN, G. ; LORENZ, J. ; KERN, W. ; WELTE, T. ; BAUER, T. ; DALHOFF, K. ; DIETRICH, E. ; EWIG, S. ; GASTMEIER, P. ; GRABEIN, B. ; HALLE, E. ; KOLDITZ, M. ; MARRE, R. ; SITTE, H. ; PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT FÜR, Chemotherapie ; PNEUMOLOGIE UND, Beatmungsmedizin Deutschen Gesellschaft für ; KOMPETENZNETZWERK, Capnetz Deutschen Gesellschaft für Infektiologie und vom: [Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany]. In: *Pneumologie* 63 (2009), Nr. 10, S. e1–68. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19821215>
- [Hippenstiel et al. 2007] HIPPENSTIEL, S. ; WITZENRATH, M. ; OPITZ, B. ; SCHUTTE, H. ; ROSSEAU, S. ; SUTTORP, N.: New aspects of the pathophysiology of pneumonia. In: *Internist (Berl)* 48 (2007), May, Nr. 5, S. 459–60, 462–4, 466–7. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429589>. – ISSN 0020-9554 (Print) 0020-9554 (Linking)
- [Holmkvist et al. 2016] HOLMKVIST, Alexander D. ; FRIBERG, Annika ; NILSSON, Ulf J. ; SCHOUENBORG, Jens: Hydrophobic ion pairing of a minocycline/Ca²⁺/AOT complex for preparation of drug-loaded PLGA nanoparticles with improved sustained release. In: *International Journal of Pharmaceutics* 499 (2016), Nr. 12, S. 351 – 357. – URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517316300114>. – ISSN 0378-5173
- [Hufnagel und Gomes 1976] HUFNAGEL, C. A. ; GOMES, M. N.: Late follow-up of ball-valve prostheses in the descending thoracic aorta. In: *J Thorac Cardiovasc Surg* 72 (1976), Dec, Nr. 6, S. 900–9. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/994540>. – ISSN 0022-5223 (Print) 0022-5223 (Linking)
- [Ino et al. 2013] INO, J. M. ; SJU, E. ; OLLIVIER, V. ; YIM, E. K. ; LETOURNEUR, D. ; LE VISAGE, C.: Evaluation of hemocompatibility and endothelialization of hybrid poly(vinyl alcohol) (PVA)/gelatin polymer films. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 101 (2013), Nov, Nr. 8, S. 1549–59. – ISSN 1552-4973
- [Inoue et al. 2013] INOUE, M. ; SASAKI, M. ; KATADA, Y. ; FUJII, K. ; MANABE, I. ; NAGAI, R. ; TAGUCHI, T.: Poly-(L-lactic acid) and citric acid-crosslinked gelatin composite matrices as a drug-eluting stent coating material with endothelialization, antithrombogenic, and drug release properties. In: *J Biomed Mater Res A* 101 (2013), Jul, Nr. 7, S. 2049–57. – ISSN 1549-3296
- [Jander et al. 2000] JANDER, G. ; RAHME, L. G. ; AUSUBEL, F. M.: Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. In: *J Bacteriol* 182 (2000), Jul, Nr. 13, S. 3843–5. – ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193
- [Jeanes et al. 2011] JEANES, A. I. ; MAYA-MENDOZA, A. ; STREULI, C. H.: Cellular microenvironment influences the ability of mammary epithelia to undergo cell cycle. In:

- PLoS One* 6 (2011), Nr. 3, S. e18144. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479230>. – ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking)
- [Jeu et al. 2003] JEU, L. ; PIACENTI, F. J. ; LYAKHOVETSKIY, A. G. ; FUNG, H. B.: Voriconazole. In: *Clin Ther* 25 (2003), May, Nr. 5, S. 1321–81. – ISSN 0149-2918 (Print) 0149-2918
- [Kaiser 2009] KAISER, T.: *Zellkulturtest für den täglichen Gebrauch*. online. April 2009. – URL http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=933534. – Stand: 14.08.2016
- [Kaplan und Meier 1958] KAPLAN, E. L. ; MEIER, P.: Nonparametric-Estimation from Incomplete Observations. In: *Journal of the American Statistical Association* 53 (1958), Nr. 282, S. 457–481. – URL <GotoISI>://WOS:A1958WX09300012. – ISSN 0162-1459
- [Karimi et al. 2015] KARIMI, A. ; NAVIDBAKHS, M. ; YOUSEFI, H. ; ALIZADEH, M.: An experimental study on the elastic modulus of gelatin hydrogels using different stress-strain definitions. In: *Journal of Thermoplastic Composite* (2015)
- [Kastury et al. 2017] KASTURY, F. ; SMITH, E. ; JUHASZ, A. L.: A critical review of approaches and limitations of inhalation bioavailability and bioaccessibility of metal(loid)s from ambient particulate matter or dust. In: *Sci Total Environ* 574 (2017), Jan 1, S. 1054–1074. – ISSN 0048-9697
- [Kataoka et al. 2002] KATAOKA, K. ; MUTA, T. ; YAMAZAKI, S. ; TAKESHIGE, K.: Activation of macrophages by linear (1right-arrow3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Sep 27, Nr. 39, S. 36825–31. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12140296>. – ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking)
- [Kattner und Hoffmann 2002] KATTNER, J. ; HOFFMANN, H. ; CHALMERS, J. M. (Hrsg.) ; GRIFFITHS, P. R. (Hrsg.): *External Reflection Spectroscopy of Thin Films on Dielectric Substrates*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2002
- [Kenausis et al. 2000] KENAUSIS, G. L. ; VOROS, J. ; ELBERT, D. L. ; HUANG, N. P. ; HOFER, R. ; RUIZ-TAYLOR, L. ; TEXTOR, M. ; HUBBELL, J. A. ; SPENCER, N. D.: Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: Attachment mechanism and effects of polymer architecture on resistance to protein adsorption. In: *Journal of Physical Chemistry B* 104 (2000), Apr 13, Nr. 14, S. 3298–3309. – URL <GotoISI>://WOS:000086599700039. – ISSN 1089-5647
- [Kerem et al. 1989] KEREM, B. ; ROMMENS, J. M. ; BUCHANAN, J. A. ; MARKIEWICZ, D. ; COX, T. K. ; CHAKRAVARTI, A. ; BUCHWALD, M. ; TSUI, L. C.: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. In: *Science* 245 (1989), Sep 8, Nr. 4922, S. 1073–80. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2570460>. – ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking)
- [Kerr und Snelling 2009] KERR, K. G. ; SNELLING, A. M.: *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. In: *J Hosp Infect* 73 (2009), Dec, Nr. 4, S. 338–44. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19699552>. – ISSN 1532-2939 (Electronic) 0195-6701 (Linking)

- [Kerstan et al. 2010] KERSTAN, A. ; LADNORG, T. ; GRUNWALD, C. ; VOPEL, T. ; ZACHER, D. ; HERRMANN, C. ; WOLL, C.: Human guanylate-binding protein 1 as a model system investigated by several surface techniques. In: *Biointerphases* 5 (2010), Nr. 4, S. 131–8. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219034>
- [Khan et al. 2016] KHAN, H. ; SHUKLA, R. N. ; BAJPAI, A. K.: Genipin-modified gelatin nanocarriers as swelling controlled drug delivery system for in vitro release of cytarabine. In: *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 61 (2016), Apr 1, S. 457–65. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26838872>. – ISSN 1873-0191 (Electronic) 0928-4931 (Linking)
- [Kühnel 2014] KÜHNEL, W.: *Taschenatlas Histologie*. Bd. 13. Thieme, Stuttgart, 2014
- [Kirschhöfer et al. 2013] KIRSCHHÖFER, F. ; RIEDER, A. ; PRECHTL, C. ; KÜHL, B. ; SABLJO, K. ; WÖLL, C. ; OBST, U. ; BRENNER-WEISS, G.: Quartz crystal microbalance with dissipation coupled to on-chip MALDI-ToF mass spectrometry (QCM-D-MALDI) as a tool for characterising proteinaceous conditioning films on functionalised surfaces. In: *Anal. Chim. Acta*. 802 (2013), S. 95–102
- [Kleberger 1961] KLEBERGER, E.: *Fick, Adolf*. In: *Neue Deutsche Biographie (NDB)*. Duncker & Humblot, Berlin, 1961
- [zu Knyphausen 2011] KNYPHAUSEN, A. zu: *Herzschrittmacher treibt seit 50 Jahren Deutsche an*. online. 10 2011. – URL <http://www.welt.de/gesundheit/article13642299/Herzschrittmacher-treibt-seit-50-Jahren-Deutsche-an.html>. – Stand: 23.08.2016
- [Konietzko et al. 1995] KONIETZKO, N. ; WENDEL, H. ; WIESNER, B.: *Erkrankungen der Lunge*. Walter de Gruyter, 1995
- [Krasnick et al. 1995] KRASNICK, J. ; PATTERSON, R. ; ROBERTS, M.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis presenting with cough variant asthma and identifiable source of *Aspergillus fumigatus*. In: *Ann Allergy Asthma Immunol* 75 (1995), Oct, Nr. 4, S. 344–6. – ISSN 1081-1206 (Print) 1081-1206
- [Krüll 2010] KRÜLL, M.: *Infektionskrankheiten - Lungenentzündung (Pneumonie)*. online. 2010. – URL <http://www.pneumologie-berlin.de/schwerpunkte/infektionskrankheiten/lungenentzuendungen>. – Stand:29.08.2016
- [Kubon 2015] KUBON, M.: *Biokompatibilität und Biomaterialien - Fremdkörperreaktion*. online. März 2015. – URL <https://www.vde.com/de/fg/DGBMT/Arbeitsgebiete/Projekte/intelligente-implantate/bub/Seiten/fremdkoerperreaktion.aspx>. – Stand: 10.08.2016
- [Kubon und Stett 2016] KUBON, M. ; STETT, A.: *Biokompatibilität und Biomaterialien - Überblick*. online. April 2016. – URL <https://www.vde.com/DE/FG/DGBMT/ARBEITSGEBIETE/PROJEKTE/INTELLIGENTE-IMPLANTATE/BUB/Seiten/bub.aspx>. – Stand: 10.08.2016

- [Kulkarni et al. 1966] KULKARNI, R. K. ; PANI, K. C. ; NEUMAN, C. C. ; LEONARD, F. F.: Polylactic acid for surgical implants. In: *Archives of Surgery* 93 (1966), Nr. 5, S. 839–843. – URL <http://dx.doi.org/10.1001/archsurg.1966.01330050143023>. – ISSN 0004-0010
- [Kuo et al. 2016] KUO, Z. K. ; LAI, P. L. ; TOH, E. K. ; WENG, C. H. ; TSENG, H. W. ; CHANG, P. Z. ; CHEN, C. C. ; CHENG, C. M.: Osteogenic differentiation of preosteoblasts on a hemostatic gelatin sponge. In: *Sci Rep* 6 (2016), S. 32884. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27616161>. – ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking)
- [Lahann 2011] LAHANN, J.: Recent progress in nano-biotechnology: compartmentalized micro- and nanoparticles via electrohydrodynamic co-jetting. In: *Small* 7 (2011), Nr. 9, S. 1149–56. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21480519>
- [Lahann et al. 2006] LAHANN, J. ; MARTIN, D. ; ROH, K.H.: *Multi-phasic nanoparticles*. Sep. 14 2006. – URL <http://www.google.com/patents/US20060201390>. – US Patent App. 11/272,194
- [Lang 2013] LANG, G.: Biochemie. In: *Histotechnik*. Springer, 2013, S. 9–33. – ISBN 3709111897
- [Lange 2004] LANGE, U.: *Elfenbein und Holz - die Werkstoffe der Gelenk-Pioniere - Modul: Physiotherapie in der Rheumatologie*. online. 10 2004. – URL http://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/skelett_und_weichteilkrankheiten/article/329428/elfenbein-holz-werkstoffe-gelenk-pioniere.html. – Stand: 23.08.2016
- [Latge 1999] LATGE, J. P.: Aspergillus fumigatus and aspergillosis. In: *Clin Microbiol Rev* 12 (1999), Apr, Nr. 2, S. 310–50. – ISSN 0893-8512 (Print) 0893-8512
- [Lauschke et al. 2016] LAUSCHKE, V. M. ; HENDRIKS, D. F. ; BELL, C. C. ; ANDERSSON, T. B. ; INGELMAN-SUNDBERG, M.: Novel 3D Culture Systems for Studies of Human Liver Function and Assessments of the Hepatotoxicity of Drugs and Drug Candidates. In: *Chem Res Toxicol* (2016), Sep 23. – ISSN 0893-228x
- [Lebeaux und Ghigo 2014] LEBEAUX, D. ; GHIGO, J. M.: Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. 78 (2014), Sep, Nr. 3, S. 510–43. – ISSN 1092-2172 (Print)
- [Leggett und Vickerman 1991] LEGGETT, G. J. ; VICKERMAN, J. C.: Chapter 4. Static secondary ion mass spectrometry (SSIMS) - an emerging surface mass spectrometry. In: *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem* 88 (1991), S. 77–133
- [Lemaitre und Hoffmann 2007] LEMAITRE, B. ; HOFFMANN, J.: The host defense of *Drosophila melanogaster*. In: *Annu Rev Immunol* 25 (2007), S. 697–743. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201680>. – ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking)

- [Lendlein 2013] LENDLEIN, A.: *Polymerbasierte Biomaterialien*. online. 2013. – URL <http://www.b-crt.de/forschung/forschungsfelder/polymerbasierte-biomaterialien/>. – Stand: 03.08.2016
- [Lhoest et al. 2001] LHOEST, J. B. ; WAGNER, M. S. ; TIDWELL, C. D. ; CASTNER, D. G.: Characterization of adsorbed protein films by time of flight secondary ion mass spectrometry. In: *J Biomed Mater Res* 57 (2001), Dec 5, Nr. 3, S. 432–40. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11523038>. – ISSN 0021-9304 (Print) 0021-9304 (Linking)
- [Li et al. 2015] LI, S. X. ; SONG, Y. J. ; ZHANG, L. L. ; SHI, J. P. ; MA, Z. L. ; GUO, H. ; DONG, H. Y. ; LI, Y. M. ; ZHANG, H.: An in vitro and in vivo study on the synergistic effect and mechanism of itraconazole or voriconazole alone and in combination with tetrandrine against *Aspergillus fumigatus*. In: *J Med Microbiol* 64 (2015), Sep, Nr. 9, S. 1008–20. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26296880>. – ISSN 1473-5644 (Electronic) 0022-2615 (Linking)
- [Lih et al. 2016] LIH, E. ; PARK, K. W. ; CHUN, S. Y. ; KIM, H. ; KWON, T. G. ; JOUNG, Y. K. ; HAN, D. K.: Biomimetic Porous PLGA Scaffolds Incorporating Decellularized Extracellular Matrix for Kidney Tissue Regeneration. In: *ACS Appl Mater Interfaces* 8 (2016), Aug 24, Nr. 33, S. 21145–54. – ISSN 1944-8244
- [Lüllmann-Rauch 2009] LÜLLMANN-RAUCH, R.: *Taschenlehrbuch - Histologie*. Bd. 3. Georg Thieme Verlag, 2009
- [Lopez und Murray 1998] LOPEZ, A. D. ; MURRAY, C. C.: The global burden of disease, 1990-2020. In: *Nat Med* 4 (1998), Nov, Nr. 11, S. 1241–3. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809543>. – ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking)
- [Lorente et al. 2007] LORENTE, L. ; BLOT, S. ; RELLO, J.: Evidence on measures for the prevention of ventilator-associated pneumonia. In: *Eur Respir J* 30 (2007), Dec, Nr. 6, S. 1193–207. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055704>. – ISSN 0903-1936 (Print) 0903-1936 (Linking)
- [Lorenz 2013] LORENZ, D.: *Die Bedeutung des Nalp3-Inflammasoms im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie*, Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, Dissertation, 2013
- [Luther 2007] LUTHER, K.: *Interaktionen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* mit Wirtszellen*, Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation, 2007
- [Ma et al. 2016] MA, Y. ; LI, J. ; YAO, Y. ; WEI, D. ; WANG, R. ; WU, Q.: A controlled double-duration inducible gene expression system for cartilage tissue engineering. In: *Sci Rep* 6 (2016), S. 26617. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27222430>. – ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking)
- [Madigan et al. 2009] MADIGAN, M. T. ; MARTINKO, J. M. ; DUNLAP, P. V. ; CLARK, D. P.: *Brock biology of microorganisms*. 12th. San Francisco, CA : Pearson/Benjamin Cummings, 2009. – URL [Tableofcontentonlyhttp://www.loc.gov/](http://www.loc.gov/tableofcontentonly)

- catdir/toc/ecip085/2007048239.html. – ISBN 0132324601 (hardcover student ed.) 9780132324601 (student ed.)
- [Majety et al. 2015] MAJETY, M. ; PRADEL, L. P. ; GIES, M. ; RIES, C. H.: Fibroblasts Influence Survival and Therapeutic Response in a 3D Co-Culture Model. In: *PLoS One* 10 (2015), Nr. 6, S. e0127948. – ISSN 1932-6203
- [Makadia und Siegel 2011] MAKADIA, H. K. ; SIEGEL, S. J.: Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. In: *Polymers (Basel)* 3 (2011), Sep 1, Nr. 3, S. 1377–1397. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577513>. – ISSN 2073-4360 (Print) 2073-4360 (Linking)
- [Manju et al. 2011] MANJU, S. ; MURALEEDHARAN, C. V. ; RAJEEV, A. ; JAYAKRISHNAN, A. ; JOSEPH, R.: Evaluation of alginate dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel as a biodegradable sealant for polyester vascular graft. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 98 (2011), Jul, Nr. 1, S. 139–49. – ISSN 1552-4973
- [Marrie et al. 2000] MARRIE, T. J. ; LAU, C. Y. ; WHEELER, S. L. ; WONG, C. J. ; VANDERVOORT, M. K. ; FEAGAN, B. G.: A controlled trial of a critical pathway for treatment of community-acquired pneumonia. CAPITAL Study Investigators. Community-Acquired Pneumonia Intervention Trial Assessing Levofloxacin. In: *JAMA* 283 (2000), Feb 9, Nr. 6, S. 749–55. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10683053>. – ISSN 0098-7484 (Print) 0098-7484 (Linking)
- [Maurer et al. 2015] MAURER, E. ; BROWNE, N. ; SURLIS, C. ; JUKIC, E. ; MOSER, P. ; KAVANAGH, K. ; LASS-FLORL, C. ; BINDER, U.: Galleria mellonella as a host model to study Aspergillus terreus virulence and amphotericin B resistance. In: *Virulence* 6 (2015), Nr. 6, S. 591–8. – ISSN 2150-5594
- [Meffert 2014] MEFFERT, R. H.: *3D Zellkulturmodelle*. online. Mai 2014. – URL <http://www.chirurgie2.ukw.de/de/forschung/experimentelle-forschung/tissue-engineering/3d-zellkulturmodelle.html>. – Stand: 13.08.2016
- [Merkle et al. 2015] MERKLE, V. M. ; MARTIN, D. ; HUTCHINSON, M. ; TRAN, P. L. ; BEHRENS, A. ; HOSSAINY, S. ; SHERIFF, J. ; BLUESTEIN, D. ; WU, X. ; SLEPIAN, M. J.: Hemocompatibility of Poly(vinyl alcohol)-Gelatin Core-Shell Electrospun Nanofibers: A Scaffold for Modulating Platelet Deposition and Activation. In: *ACS Appl Mater Interfaces* 7 (2015), Apr 22, Nr. 15, S. 8302–12. – ISSN 1944-8244
- [Mezger 2012] MEZGER, T. G.: *Das Rheologie Handbuch: Für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern*. Bd. 4. Vincentz Network, Hannover, Germany, 2012
- [Mühlenfeld 1999] MÜHLENFELD, K.: *Untersuchungen zur Biotransformation und Toxizität mit der Hepatomzelllinie Hep G2 im Vergleich zu Primärkulturen der Wistar ratte*, Humboldt-Universität Berlin, Dissertation, 1999
- [Micek et al. 2015] MICEK, S. T. ; WUNDERINK, R. G. ; KOLLEF, M. H. ; CHEN, C. ; RELLO, J. ; CHASTRE, J. ; ANTONELLI, M. ; WELTE, T. ; CLAIR, B. ; OSTERMANN, H. ; CALBO, E. ; TORRES, A. ; MENICETTI, F. ; SCHRAMM, G. E. ; MENON, V.: An international multicenter retrospective study of Pseudomonas aeruginosa nosocomial

- pneumonia: impact of multidrug resistance. In: *Crit Care* 19 (2015), Nr. 1. – ISSN 1364-8535 (Print)
- [Mironov et al. 2016] MIRONOV, A. V. ; GRIGORYEV, A. M. ; KROTOVA, L. I. ; SKALETSKY, N. N. ; POPOV, V. K. ; SEVASTIANOV, V. I.: 3D Printing of PLGA Scaffolds for Tissue Engineering. In: *J Biomed Mater Res A* (2016), Aug 20. – ISSN 1549-3296
- [Moreau-Marquis et al. 2015] MOREAU-MARQUIS, S. ; COUTERMARSH, B. ; STANTON, B. A.: Combination of hypothiocyanite and lactoferrin (ALX-109) enhances the ability of tobramycin and aztreonam to eliminate *Pseudomonas aeruginosa* biofilms growing on cystic fibrosis airway epithelial cells. In: *J Antimicrob Chemother* 70 (2015), Jan, Nr. 1, S. 160–6. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25213272>. – ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking)
- [Moreau-Marquis et al. 2009] MOREAU-MARQUIS, S. ; O'TOOLE, G. A. ; STANTON, B. A.: Tobramycin and FDA-approved iron chelators eliminate *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis cells. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 41 (2009), Sep, Nr. 3, S. 305–13. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168700>. – ISSN 1535-4989 (Electronic) 1044-1549 (Linking)
- [Muller et al. 2001] MULLER, F. M. ; KURZAI, O. ; HACKER, J. ; FROSCHE, M. ; MUHLSCHLEGEL, F.: Effect of the growth medium on the in vitro antifungal activity of micafungin (FK-463) against clinical isolates of *Candida dubliniensis*. In: *J Antimicrob Chemother* 48 (2001), Nov, Nr. 5, S. 713–5. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679561>. – ISSN 0305-7453 (Print) 0305-7453 (Linking)
- [Mullins et al. 1976] MULLINS, J. ; HARVEY, R. ; SEATON, A.: Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). In: *Clin Allergy* 6 (1976), May, Nr. 3, S. 209–17. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/780000>. – ISSN 0009-9090 (Print) 0009-9090 (Linking)
- [Muramoto et al. 2011] MURAMOTO, S. ; GRAHAM, D. J. ; WAGNER, M. S. ; LEE, T. G. ; MOON, D. W. ; CASTNER, D. G.: ToF-SIMS Analysis of Adsorbed Proteins: Principal Component Analysis of the Primary Ion Species Effect on the Protein Fragmentation Patterns. In: *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* 115 (2011), Dec 15, Nr. 49, S. 24247–24255. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22308191>. – ISSN 1932-7447 (Print) 1932-7447 (Linking)
- [Muramoto et al. 2012] MURAMOTO, Shin ; BRISON, Jeremy ; CASTNER, David G.: Exploring the Surface Sensitivity of TOF-Secondary Ion Mass Spectrometry by Measuring the Implantation and Sampling Depths of Bin and C60 Ions in Organic Films. In: *Analytical Chemistry* 84 (2012), 2012/01/03, Nr. 1, S. 365–372. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/ac202713k>. – ISSN 0003-2700
- [Muthig 2006] MUTHIG, M.: *Molekulare Typisierung und Antimykotika-Empfindlichkeit von Candida-Spezies aus Sputum-Isolaten von Mukoviszidose-Patienten*, Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg, Dissertation, 2006

- [von Mutius et al. 2013] MUTIUS, E. von ; GAPPA, M. ; EBER, E. ; U., Frey: *Pädiatrische Pneumologie*. Bd. 3. Springer, 2013
- [Narayan 2009] NARAYAN, R.: *Biomedical Materials*. Springer US, 2009
- [Naumann 2001] NAUMANN, D.: FT-Infrared and FT-RAMAN spectroscopy in biomedical research. In: *Applied Spectroscopy Reviews* 36 (2001), 2001/06/30, Nr. 2-3, S. 239–298. – URL <http://dx.doi.org/10.1081/ASR-100106157>. – ISSN 0570-4928
- [Navarro und Planell 2012] NAVARRO, M. ; PLANELL, J. A.: *Nanotechnology in Regenerative Medicine: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Bd. 811. Springer Science+Business Media, 2012
- [Neubert 1985] NEUBERT, D.: Benefits and limits of model systems in developmental biology and toxicology (in vitro techniques). In: *Prog Clin Biol Res* 163A (1985), S. 91–6. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3969395>. – ISSN 0361-7742 (Print) 0361-7742 (Linking)
- [Ng et al. 2012] NG, S. S. ; SU, K. ; LI, C. ; CHAN-PARK, M. B. ; WANG, D. A. ; CHAN, V.: Biomechanical study of the edge outgrowth phenomenon of encapsulated chondrocytic isogenous groups in the surface layer of hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. In: *Acta Biomater* 8 (2012), Jan, Nr. 1, S. 244–52. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21906699>. – ISSN 1878-7568 (Electronic) 1742-7061 (Linking)
- [Nockemann 1992] NOCKEMANN, P. F.: *Die chirurgische Naht*. Georg Thieme Verlag, 1992
- [Odds et al. 2003] ODDS, F. C. ; BROWN, A. J. ; GOW, N. A.: Antifungal agents: mechanisms of action. In: *Trends Microbiol* 11 (2003), Jun, Nr. 6, S. 272–9. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12823944>. – ISSN 0966-842X (Print) 0966-842X (Linking)
- [Oehme 2015] OEHME, S.: *Einfluss der β_2 -adrenergen Rezeptorstimulation auf die Zytokinfreisetzung in human Bronchialepithelzellen*, Universität Leipzig, Dissertation, 2015
- [Olson et al. 2000] OLSON, H. ; BETTON, G. ; ROBINSON, D. ; THOMAS, K. ; MONRO, A. ; KOLAJA, G. ; LILLY, P. ; SANDERS, J. ; SIPES, G. ; BRACKEN, W. ; DORATO, M. ; VAN DEUN, K. ; SMITH, P. ; BERGER, B. ; HELLER, A.: Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. In: *Regul Toxicol Pharmacol* 32 (2000), Aug, Nr. 1, S. 56–67. – ISSN 0273-2300 (Print) 0273-2300
- [Orive et al. 2009] ORIVE, G. ; ANITUA, E. ; PEDRAZ, J. L. ; EMERICH, D. F.: Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. In: *Nat Rev Neurosci* 10 (2009), Sep, Nr. 9, S. 682–92. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19654582>. – ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking)

- [Ornelas-Megiatto et al. 2012] ORNELAS-MEGIATTO, C. ; SHAH, P. N. ; WICH, P. R. ; COHEN, J. L. ; TAGAEV, J. A. ; SMOLEN, J. A. ; WRIGHT, B. D. ; PANZNER, M. J. ; YOUNGS, W. J. ; FRECHET, J. M. ; CANNON, C. L.: Aerosolized antimicrobial agents based on degradable dextran nanoparticles loaded with silver carbene complexes. In: *Mol Pharm* 9 (2012), Nov 5, Nr. 11, S. 3012–22. – ISSN 1543-8384
- [Overhage et al. 2008] OVERHAGE, J. ; BAINS, M. ; BRAZAS, M. D. ; HANCOCK, R. E.: Hancock Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. In: *J. Bacteriol.* 406 (2008), Nr. 8, S. 959–964
- [Page und Heim 2009] PAGE, M. G. ; HEIM, J.: Prospects for the next anti-*Pseudomonas* drug. In: *Curr Opin Pharmacol* 9 (2009), Oct, Nr. 5, S. 558–65. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19748829>. – ISSN 1471-4973 (Electronic) 1471-4892 (Linking)
- [Pierce et al. 2012] PIERCE, B. F. ; PITTERMANN, E. ; MA, N. ; GEBAUER, T. ; NEFFE, A. T. ; HOLSCHER, M. ; JUNG, F. ; LENDLEIN, A.: Viability of human mesenchymal stem cells seeded on crosslinked entropy-elastic gelatin-based hydrogels. In: *Macromol Biosci* 12 (2012), Mar, Nr. 3, S. 312–21. – ISSN 1616-5187
- [Pletz et al. 2010] PLETZ, M. W. ; BURKHARDT, O. ; WELTE, T.: Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia: linezolid or vancomycin? - Comparison of pharmacology and clinical efficacy. In: *Eur J Med Res* 15 (2010), Nr. 12, S. 507–13. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163725>
- [Pletz et al. 2011] PLETZ, M. W. ; ROHDE, G. ; SCHÜTTE, H. ; BALS, R. ; BAUM, H. von ; T., Welte: Epidemiologie und Erreger bei ambulant erworbener Pneumonie (CAP). In: *Deutsche medizinische Wochenschrift* 136 (2011), April, Nr. 15, S. 775–780
- [Prass et al. 2003] PRASS, K. ; MEISEL, C. ; HOFlich, C. ; BRAUN, J. ; HALLE, E. ; WOLF, T. ; RUSCHER, K. ; VICTOROV, I. V. ; PRILLER, J. ; DIRNAGL, U. ; VOLK, H. D. ; MEISEL, A.: Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. In: *J Exp Med* 198 (2003), Sep 1, Nr. 5, S. 725–36. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12939340>. – ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking)
- [Price et al. 1996] PRICE, J. S. ; TENCER, A. F. ; ARM, D. M. ; BOHACH, G. A.: Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. In: *J Biomed Mater Res* 30 (1996), Mar, Nr. 3, S. 281–6. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8698690>. – ISSN 0021-9304 (Print) 0021-9304 (Linking)
- [proto-col world 2014] PROTO-COL WORLD: *What is collagen?* online. 30. Juli 2014. – URL <http://www.proto-col.com/blog/2014/07/collagen/>. – Stand: 26.07.2016
- [Pugin 2007] PUGIN, J.: Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. In: *Novartis Found Symp* 280 (2007), S. 21–7; discussion 27–36, 160–4. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17380786>. – ISSN 1528-2511 (Print) 1528-2511 (Linking)

- [Purschke 2012] PURSCHKE, F. G.: *Phänotypische und molekularbiologische Untersuchungen der Interaktionen in gemischten Biofilmen*, Universität Stuttgart, Dissertation, 2012
- [Purves et al. 2010] PURVES, J. ; COCKAYNE, A. ; MOODY, P. C. ; MORRISSEY, J. A.: Comparison of the regulation, metabolic functions, and roles in virulence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologues gapA and gapB in *Staphylococcus aureus*. In: *Infect Immun* 78 (2010), Dec, Nr. 12, S. 5223–32. – ISSN 0019-9567
- [Rahmani et al. 2015] RAHMANI, S. ; VILLA, C. H. ; DISHMAN, A. F. ; GRABOWSKI, M. E. ; PAN, D. C. ; DURMAZ, H. ; MISRA, A. C. ; COLON-MELENDZ, L. ; SOLOMON, M. J. ; MUZYKANTOV, V. R. ; LAHANN, J.: Long-circulating Janus nanoparticles made by electrohydrodynamic co-jetting for systemic drug delivery applications. In: *J Drug Target* 23 (2015), Nr. 7-8, S. 750–8. – ISSN 1026-7158
- [Rajan und Saiman 2002] RAJAN, S. ; SAIMAN, L.: Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. In: *Semin Respir Infect* 17 (2002), Mar, Nr. 1, S. 47–56. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891518>. – ISSN 0882-0546 (Print) 0882-0546 (Linking)
- [Ratner 1993] RATNER, B. D.: New ideas in biomaterials science—a path to engineered biomaterials. In: *J Biomed Mater Res* 27 (1993), Jul, Nr. 7, S. 837–50. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8360211>. – ISSN 0021-9304 (Print) 0021-9304 (Linking)
- [Ratner und Bryant 2004] RATNER, B. D. ; BRYANT, S. J.: Biomaterials: where we have been and where we are going. In: *Annu Rev Biomed Eng* 6 (2004), S. 41–75. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15255762>. – ISSN 1523-9829 (Print) 1523-9829 (Linking)
- [Ratner et al. 2004] RATNER, B. D. ; HOFFMAN, A. S. ; SCHÖN, F. J. ; LEMONS, J. E.: *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2. Elsevier Academic Press, 2004. – URL ISBN:978-0-12-374626-9
- [Recum et al. 1996] RECUM, A. F. ; SHANNON, C. E. ; CANNON, C. E. ; LONG, K. J. ; KOOTEN, T. G. ; MEYLE, J.: Surface roughness, porosity, and texture as modifiers of cellular adhesion. In: *Tissue Eng* 2 (1996), Winter, Nr. 4, S. 241–53. – ISSN 1076-3279 (Print) 1076-3279
- [Rehm 2008] REHM, B. H. A.: *Pseudomonas. Model orgorgan, Pathogen, Cell Factory*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008
- [Reichard et al. 1995] REICHARD, U. ; MONOD, M. ; RUCHEL, R.: Molecular cloning and sequencing of the gene encoding an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. In: *FEMS Microbiol Lett* 130 (1995), Jul 15, Nr. 1, S. 69–74. – ISSN 0378-1097 (Print) 0378-1097
- [Retsch-Bogart et al. 2009] RETSCH-BOGART, G. Z. ; QUITTNER, A. L. ; GIBSON, R. L. ; OERMANN, C. M. ; MCCOY, K. S. ; MONTGOMERY, A. B. ; COOPER, P. J.:

- Efficacy and safety of inhaled aztreonam lysine for airway pseudomonas in cystic fibrosis. In: *Chest* 135 (2009), May, Nr. 5, S. 1223–32. – ISSN 0012-3692
- [Riordan et al. 1989] RIORDAN, J. R. ; ROMMENS, J. M. ; KEREM, B. ; ALON, N. ; ROZMAHEL, R. ; GRZELCZAK, Z. ; ZIELENSKI, J. ; LOK, S. ; PLAVSIC, N. ; CHOU, J. L. ; AL. et: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. In: *Science* 245 (1989), Sep 8, Nr. 4922, S. 1066–73. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2475911>. – ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking)
- [Roche Pharma 2015] ROCHE PHARMA: *Mukoviszidose*. online. 2015. – URL <http://www.bewaehrte-originale.de/muko/erkrankung.html?sid=b6c0c788a02b845dff64f8704ede80c2>. – Stand: 03.08.2016
- [Rodahl et al. 1996] RODAHL, M. ; HOOK, F. ; KASEMO, B.: QCM Operation in Liquids: An Explanation of Measured Variations in Frequency and Q Factor with Liquid Conductivity. In: *Anal Chem* 68 (1996), Jul 1, Nr. 13, S. 2219–27. – ISSN 0003-2700 (Print) 0003-2700
- [Roh et al. 2005] ROH, K. H. ; MARTIN, D. C. ; LAHANN, J.: Biphasic Janus particles with nanoscale anisotropy. In: *Nat Mater* 4 (2005), Oct, Nr. 10, S. 759–63. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16184172>. – ISSN 1476-1122 (Print) 1476-1122 (Linking)
- [Roller 2015] ROLLER, B. L.: *Biosynthese von Kollagenen und Kollagen-Erkrankungen*. online. Juni 2015. – URL <https://prezi.com/imtgyutxi49/biosynthese-von-kollagenen-und-kollagen-erkrankungen/>. – Stand: 26.07.2016
- [Ruoslahti und Pierschbacher 1987] RUOSLAHTI, E ; PIERSCHBACHER, MD: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. In: *Science* 238 (1987), Nr. 4826, S. 491–497. – URL <http://science.sciencemag.org/content/238/4826/491>. – ISSN 0036-8075
- [Samson 1999] SAMSON, R. A.: The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. In: *Contrib Microbiol* 2 (1999), S. 5–20. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523263>. – ISSN 1420-9519 (Print) 1420-9519 (Linking)
- [Schmidt et al. 2009] SCHMIDT, David R. ; WALDECK, Heather ; KAO, Weiyuan J.: Protein Adsorption to Biomaterials. In: PULEO, A. D. (Hrsg.) ; BIZIOS, Rena (Hrsg.): *Biological Interactions on Materials Surfaces: Understanding and Controlling Protein, Cell, and Tissue Responses*. New York, NY : Springer US, 2009, S. 1–18. – URL http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-98161-1_1. – ISBN 978-0-387-98161-1
- [Schmidt 1999] SCHMIDT, R.: *Werkstoffverhalten in biologischen Systemen: Grundlagen, Anwendungen, Schädigungsmechanismen, Werkstoffprüfung*. Bd. 2. Springer, 1999
- [Schönwälder et al. 2014] SCHÖNWÄLDER, S. M. ; BALLY, F. ; HEINKE, L. ; AZUCENA, C. ; BULUT, O. D. ; HEISLER, S. ; KIRSCHHÖFER, F. ; GEBAUER, T. P. ; NEFFE, A. T. ; LENDLEIN, A. ; BRENNER-WEISS, G. ; LAHANN, J. ; WELLE, A. ; OVERHAGE, J. ; WOLL, C.: Interaction of human plasma proteins with thin gelatin-based hydrogel

- films: a QCM-D and ToF-SIMS study. In: *Biomacromolecules* 15 (2014), Jul 14, Nr. 7, S. 2398–406. – URL <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bm500750v>. – ISSN 1526-4602 (Electronic) 1525-7797 (Linking)
- [Schwarz 2013] SCHWARZ, C.: Arzneimitteltherapie der zystischen Fibrose (Mukoviszidose). In: *Arzneimitteltherapie* 31 (2013), Nr. 4, S. 80–88. – URL <https://www.aerztekammer-bw.de/10aerzte/20fortbildung/20praxis/88arzneimitteltherapie/1304.pdf>
- [Schweinlin et al. 2016] SCHWEINLIN, M. ; ROSSI, A. ; LODES, N. ; LOTZ, C. ; HACKENBERG, S. ; STEINKE, M. ; WALLES, H. ; GROEBER, F.: Human barrier models for the in vitro assessment of drug delivery. In: *Drug Deliv Transl Res* (2016), Aug 22. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27549106>. – ISSN 2190-3948 (Electronic) 2190-393X (Linking)
- [Scott 1983] SCOTT, M.: 32,000 years of sutures. In: *Natnews* 20 (1983), May, Nr. 5, S. 15–7. – ISSN 0027-6049 (Print) 0027-6049
- [Sharma et al. 2002] SHARMA, Sadhana ; POPAT, Ketul C. ; DESAI, Tejal A.: Controlling Nonspecific Protein Interactions in Silicon Biomicrosystems with Nanostructured Poly(ethylene glycol) Films. In: *Langmuir* 18 (2002), 2002/11/01, Nr. 23, S. 8728–8731. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/la026097f>. – ISSN 0743-7463
- [Shoulders und Raines 2009] SHOULDERS, M. D. ; RAINES, R. T.: Collagen structure and stability. In: *Annu Rev Biochem* 78 (2009), S. 929–58. – ISSN 0066-4154 (Print)
- [Silva-Bermudez und Rodil 2013] SILVA-BERMUDEZ, P. ; RODIL, S. E.: An overview of protein adsorption on metal oxide coatings for biomedical implants. In: *Surface and Coatings Technology* 233 (2013), 10, S. 147–158. – URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0257897213003721>. – ISSN 0257-8972
- [Singh et al. 2000] SINGH, P. K. ; SCHAEFER, A. L. ; PARSEK, M. R. ; MONINGER, T. O. ; WELSH, M. J. ; GREENBERG, E. P.: Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. In: *Nature* 407 (2000), Oct 12, Nr. 6805, S. 762–4. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11048725>. – ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking)
- [Smeets und Kolk 2016] SMEETS, R. ; KOLK, A.: *Osteokonduktive und -induktive Knochenersatzmaterialien*. online. März 2016. – URL http://www.zmk-aktuell.de/fachgebiete/implantologie/story/osteokonduktive-und--induktive-knochenersatzmaterialien__271.html. – Stand: 03.08.2016
- [Snyder 1977] SNYDER, C. C.: On the history of the suture. In: *Bull Hist Dent* 25 (1977), Oct, Nr. 2, S. 79–84. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/346101>. – ISSN 0007-5132 (Print) 0007-5132 (Linking)
- [Society 1995] SOCIETY, American T.: Hospital-Acquired Pneumonia in Adults: Diagnosis, Assessment of Severity, Initial Antimicrobial Therapy, and Preventive Strategies. A Consensus Statement. In: *Am J Respir Crit Care Med* 153 (1995), S. 1712– 1725

- [Soetaert und Vandamme 2010] SOETAERT, W. ; VANDAMME, E. J.: *Industrial Biotechnology - Sustainable Growth and Economic Success*. Wiley-VCH, Weinheim, 2010 (ISBN 978-3-527-31442-3)
- [Sonzini et al. 2015] SONZINI, S. ; JONES, S. T. ; WALSH, Z. ; SCHERMAN, O. A.: Simple fluorinated moiety insertion on Abeta 16-23 peptide for stain-free TEM imaging. In: *Analyst* 140 (2015), Apr 21, Nr. 8, S. 2735–40. – ISSN 0003-2654
- [Spielmann 1997] SPIELMANN, H. ; MARQUARDT, H. (Hrsg.) ; SCHÄFER, S.G (Hrsg.): *Lehrbuch der Toxikologie - In vitro-Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, 1997
- [Steven Schmitt 2010] STEVEN SCHMITT, S.: *Community-Acquired Pneumonia*. online. 08 2010. – URL <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/infectious-disease/community-acquired-pneumonia/#bib15>. – Stand: 10.10.2016
- [Stover et al. 2000] STOVER, C. K. ; PHAM, X. Q. ; ERWIN, A. L. ; MIZOGUCHI, S. D. ; WARRENER, P. ; HICKEY, M. J. ; BRINKMAN, F. S. ; HUFNAGLE, W. O. ; KOWALIK, D. J. ; LAGROU, M. ; GARBER, R. L. ; GOLTRY, L. ; TOLENTINO, E. ; WESTBROCK-WADMAN, S. ; YUAN, Y. ; BRODY, L. L. ; COULTER, S. N. ; FOLGER, K. R. ; KAS, A. ; LARBIG, K. ; LIM, R. ; SMITH, K. ; SPENCER, D. ; WONG, G. K. ; WU, Z. ; PAULSEN, I. T. ; REIZER, J. ; SAIER, M. H. ; HANCOCK, R. E. ; LORY, S. ; OLSON, M. V.: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. In: *Nature* 406 (2000), Nr. 6799, S. 959–64. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984043>
- [Su und Wang 2015] SU, K. ; WANG, C.: Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. In: *Biotechnol Lett* 37 (2015), Nov, Nr. 11, S. 2139–45. – ISSN 0141-5492
- [Syguda et al. 2012] SYGUDA, A. ; KERSTAN, A. ; LADNORG, T. ; STUBEN, F. ; WOLL, C. ; HERRMANN, C.: Immobilization of biotinylated hGBP1 in a defined orientation on surfaces is crucial for uniform interaction with analyte proteins and catalytic activity. In: *Langmuir* 28 (2012), Nr. 15, S. 6411–8. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22458356>
- [Tang et al. 2012] TANG, G. ; ZHANG, H. ; ZHAO, Y. ; ZHANG, Y. ; LI, X. ; YUAN, X.: Preparation of PLGA scaffolds with graded pores by using a gelatin-microsphere template as porogen. In: *J Biomater Sci Polym Ed* 23 (2012), Nr. 17, S. 2241–57. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22137329>. – ISSN 1568-5624 (Electronic) 0920-5063 (Linking)
- [Tedesco et al. 2016] TEDESCO, M. P. ; MONACO-LOURENCO, C. A. ; CARVALHO, R. A.: Gelatin/hydroxypropyl methylcellulose matrices - Polymer interactions approach for oral disintegrating films. In: *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 69 (2016), Dec 1, S. 668–74. – ISSN 0928-4931
- [Tiddens et al. 2015] TIDDENS, H. A. ; DE BOECK, K. ; CLANCY, J. P. ; FAYON, M. ; H, G. M. A. ; BRESNIK, M. ; DERCHAK, A. ; LEWIS, S. A. ; OERMANN, C. M. ; INVESTIGATORS, Alpine s.: Open label study of inhaled aztreonam for *Pseudomonas*

- eradication in children with cystic fibrosis: The ALPINE study. In: *J Cyst Fibros* 14 (2015), Jan, Nr. 1, S. 111–9. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25091537>. – ISSN 1873-5010 (Electronic) 1569-1993 (Linking)
- [Tronci et al. 2010] TRONCI, G. ; NEFFE, A. T. ; PIERCE, B. F. ; LENDLEIN, A.: An entropy-elastic gelatin-based hydrogel system. In: *Journal of Materials Chemistry* 20 (2010), Nr. 40, S. 8875–8884. – URL <GotoISI>://WOS:000282518200014. – ISSN 0959-9428
- [Tyler et al. 2011] TYLER, B. J. ; BRUENING, C. ; RANGARANJAN, S. ; ARLINGHAUS, H. F.: TOF-SIMS imaging of adsorbed proteins on topographically complex surfaces with Bi(3) (+) primary ions. In: *Biointerphases* 6 (2011), Sep, Nr. 3, S. 135. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21974684>. – ISSN 1559-4106 (Electronic) 1559-4106 (Linking)
- [Ullm et al. 2014] ULLM, S. ; KRUGER, A. ; TONDERA, C. ; GEBAUER, T. P. ; NEFFE, A. T. ; LENDLEIN, A. ; JUNG, F. ; PIETZSCH, J.: Biocompatibility and inflammatory response in vitro and in vivo to gelatin-based biomaterials with tailorable elastic properties. In: *Biomaterials* 35 (2014), Dec, Nr. 37, S. 9755–66. – ISSN 0142-9612
- [Urbanowicz et al. 2016] URBANOWICZ, T. ; ZABICKI, B. ; BASZYNSKA-WACHOWIAK, H. ; STRABURZYNSKA-MIGAJ, E. ; JUSZKAT, R. ; GRAJEK, S. ; JEMIELITY, M.: Invasive aspergillosis successfully treated by combined antifungal therapy and immunosuppressive monotherapy two months following heart transplantation. In: *Kardiochirurgia Torakochirurgia Pol* 13 (2016), Jun, Nr. 2, S. 164–8. – ISSN 1731-5530 (Print) 1731-5530
- [Urbschat 2014] URBSCHAT, H.: *Die Schwachstelle ist immer der Mensch!* online. 06 2014. – URL https://www.linkorthopaedics.com/fileadmin/media/02_fuer_den_arzt/06_Direct_LINK/pdf_directLINK/DirectLINK_20_01-14_dt_web.pdf. – Stand: 23.08.2016
- [Urrialde et al. 2016] URRIALDE, V. ; PRIETO, D. ; PLA, J. ; ALONSO-MONGE, R.: The *Candida albicans* Pho4 Transcription Factor Mediates Susceptibility to Stress and Influences Fitness in a Mouse Commensalism Model. In: *Front Microbiol* 7 (2016), S. 1062. – ISSN 1664-302x
- [Van Vlierberghe et al. 2011] VAN VLIERBERGHE, S. ; DUBRUEL, P. ; SCHACHT, E.: Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. In: *Biomacromolecules* 12 (2011), May 9, Nr. 5, S. 1387–408. – ISSN 1525-7797
- [Varma und Sadasivan 2014] VARMA, S. ; SADASIVAN, C.: A long acting biodegradable controlled delivery of chitosan microspheres loaded with tetanus toxoide as model antigen. In: *Biomed Pharmacother* 68 (2014), Mar, Nr. 2, S. 225–30. – ISSN 0753-3322
- [Vickerman und Briggs 2013] VICKERMAN, J. C. ; BRIGGS, D.: *ToF-SIMS: Surface analysis by mass spectrometry*. Bd. 2. IM Publications LLP, 07 2013
- [Voinova et al. 1999] VOINOVA, M. V. ; RODAHL, M. ; JONSON, M. ; KASEMO, B.: Viscoelastic acoustic response of layered polymer films at fluid-solid interfaces: Continuum mechanics approach. In: *Phys. Scr.* 59 (1999), S. 391–396

- [Vorsatz 2008] VORSATZ, W.: *Radiolexikon Nähen*. online. April 2008. – URL http://www.deutschlandfunk.de/radiolexikon-naehen.709.de.html?dram:article_id=88297. – Stand: 02.10.2016
- [Vorsmann et al. 2013] VORSMANN, H. ; GROEBER, F. ; WALLES, H. ; BUSCH, S. ; BEISSERT, S. ; WALCZAK, H. ; KULMS, D.: Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing. In: *Cell Death Dis* 4 (2013), S. e719
- [Voshaar 2005] VOSHAAR, T.: *Therapie mit Aerosolen*. UNI-MED Bremen, 2005
- [Vázquez-Espinosa et al. 2015] VÁZQUEZ-ESPINOSA, E. ; GIRÁN, Rmá ; GÁMEZ-PUNTER, R. M. ; GARCÍA-CASTILLO, E. ; VALENZUELA, C. ; CISNEROS, C. ; ZAMORA, E. ; GARCÍA-PÁREZ, F. J. ; ANCOCHEA, J.: Long-term safety and efficacy of tobramycin in the management of cystic fibrosis. In: *Ther Clin Risk Manag* 11 (2015), S. 407–15. – ISSN 1176-6336 (Print)
- [Wagner und Castner 2001] WAGNER, M. S. ; CASTNER, D. G.: Characterization of Adsorbed Protein Films by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry with Principal Component Analysis. In: *Langmuir* 17 (2001), Nr. 15, S. 4649–4660. – URL <http://dx.doi.org/10.1021/la001209t>
- [Wagner et al. 2003] WAGNER, M. S. ; SHEN, M. ; HORBETT, T. A. ; CASTNER, D. G.: Quantitative analysis of binary adsorbed protein films by time of flight secondary ion mass spectrometry. In: *J Biomed Mater Res A* 64 (2003), Jan 1, Nr. 1, S. 1–11. – ISSN 1549-3296 (Print) 1549-3296
- [Wagner und Iglewski 2008] WAGNER, V. E. ; IGLEWSKI, B. H.: P. aeruginosa Biofilms in CF Infection. In: *Clin Rev Allergy Immunol* 35 (2008), Dec, Nr. 3, S. 124–34. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509765>. – ISSN 1080-0549 (Print) 1080-0549 (Linking)
- [Wang et al. 2012] WANG, H. ; BOERMAN, O. C. ; SARIIBRAHIMOGLU, K. ; LI, Y. ; JANSEN, J. A. ; LEEUWENBURGH, S. C.: Comparison of micro- vs. nanostructured colloidal gelatin gels for sustained delivery of osteogenic proteins: Bone morphogenetic protein-2 and alkaline phosphatase. In: *Biomaterials* 33 (2012), Nov, Nr. 33, S. 8695–703. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922022>. – ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking)
- [Wang et al. 2013] WANG, H. ; ZOU, Q. ; BOERMAN, O. C. ; NIJHUIS, A. W. ; JANSEN, J. A. ; LI, Y. ; LEEUWENBURGH, S. C.: Combined delivery of BMP-2 and bFGF from nanostructured colloidal gelatin gels and its effect on bone regeneration in vivo. In: *J Control Release* 166 (2013), Mar 10, Nr. 2, S. 172–81. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266450>. – ISSN 1873-4995 (Electronic) 0168-3659 (Linking)
- [Wang et al. 2016] WANG, W. ; YU, J. ; HE, Y. ; WANG, Z. ; LI, F.: Ambroxol inhibits mucoid conversion of Pseudomonas aeruginosa and contributes to the bactericidal activity of ciprofloxacin against mucoid P. aeruginosa biofilms. In: *APMIS* 124 (2016), Jul, Nr. 7,

- S. 611–8. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27102839>. – ISSN 1600-0463 (Electronic) 0903-4641 (Linking)
- [Wanka 2013] WANKA, J.: *Regenerative Medizin - Selbstheilungskraft des Körpers verstehen und nutzen*. online. 2013. – Stand: 21.08.2016
- [Weber und Sobbczak 2016] WEBER, W.-M. ; SOBBCZAK, K.: *Erforschung innovativer Therapien für Mukoviszidose*. online. 2016. – URL <https://www.uni-muenster.de/Biologie.Zoophysiologie/electrophys/aon.html>. – Stand: 08.08.2016
- [Weiß und Edelmann 2009] WEISS, F. ; EDELMANN, F.: *Pilzinfektionen*. online. 2009. – URL <http://www.jameda.de/krankheiten-lexikon/pilzinfektionen/>. – Stand: 29.08.2016
- [Wiesmüller et al. 2013] WIESMÜLLER, G. A. ; HEINZOW, B. ; HERR, C.: *Gesundheitsrisiko Schimmelpilz im Innenraum*. ecomed MEDIZIN, 2013
- [Williams 2003] WILLIAMS, D.: Revisiting the definition of biocompatibility. In: *Med Device Technol* 14 (2003), Oct, Nr. 8, S. 10–3. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14603712>. – ISSN 1048-6690 (Print) 1048-6690 (Linking)
- [Williams 2008] WILLIAMS, D. F.: On the mechanisms of biocompatibility. In: *Biomaterials* 29 (2008), Jul, Nr. 20, S. 2941–53. – ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612
- [Williams 2009] WILLIAMS, D. F.: On the nature of biomaterials. In: *Biomaterials* 30 (2009), Oct, Nr. 30, S. 5897–909. – ISSN 0142-9612
- [Williams und European Society for Biomaterials 1987] WILLIAMS, D. F. ; EUROPEAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS: *Definitions in biomaterials : proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986*. Amsterdam ; New York : Elsevier, 1987 (Progress in biomedical engineering). – ISBN 0444428585
- [Williams 1999] WILLIAMS, D.F.: *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool University Press, 1999. – URL <https://books.google.de/books?id=Hv45B7P5N3gC>. – ISBN 9780853237341
- [Williams et al. 2007] WILLIAMS, H. D. ; ZLOSNIK, J. E. ; RYALL, B.: Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Adv Microb Physiol* 52 (2007), S. 1–71. – ISSN 0065-2911 (Print) 0065-2911
- [Winsor et al. 2016] WINSOR, G. L. ; GRIFFITHS, E. J. ; LO, R. ; DHILLON, B. K. ; SHAY, J. A. ; BRINKMAN, F. S.: Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. In: *Nucleic Acids Res* 44 (2016), Jan 4, Nr. D1, S. D646–53. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26578582>. – ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking)
- [Wintermantel und Ha 2009] WINTERMANTEL, E. ; HA, S. W. ; SPRINGER (Hrsg.): *Medizintechnik Life Science Engineering*. 5. Auflage. ISBN 978-3-540-93936-8. 2009

- [World Health Organization 2004] WORLD HEALTH ORGANIZATION: *Health statistics and information systems - Revised Global Burden of Disease (GBD) 2002 estimates: Incidence*. online. 2004. – URL http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_regional_2002_revised/en/. – Stand: 29.08.2016
- [Yamakawa et al. 1997] YAMAKAWA, I. ; ISHIDA, M. ; KATO, T. ; ANDO, H. ; ASAKAWA, N.: Release behavior of poly(lactic acid-co-glycolic acid) implants containing phosphorothioate oligodeoxynucleotide. In: *Biol Pharm Bull* 20 (1997), Apr, Nr. 4, S. 455–9. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9145231>. – ISSN 0918-6158 (Print) 0918-6158 (Linking)
- [Yoo et al. 2005] YOO, J. Y. ; KIM, J. M. ; SEO, K. S. ; JEONG, Y. K. ; LEE, H. B. ; KHANG, G.: Characterization of degradation behavior for PLGA in various pH condition by simple liquid chromatography method. In: *Biomed Mater Eng* 15 (2005), Nr. 4, S. 279–88. – ISSN 0959-2989 (Print) 0959-2989
- [Yu et al. 2012] YU, Q. ; GRIFFIN, E. F. ; MOREAU-MARQUIS, S. ; SCHWARTZMAN, J. D. ; STANTON, B. A. ; O'TOOLE, G. A.: In vitro evaluation of tobramycin and aztreonam versus *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived human airway epithelial cells. In: *J Antimicrob Chemother* 67 (2012), Nov, Nr. 11, S. 2673–81. – URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22843834>. – ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking)
- [Zhang et al. 2016] ZHANG, J. ; WANG, J. ; ZHANG, H. ; LIN, J. ; GE, Z. ; ZOU, X.: Macroporous interpenetrating network of polyethylene glycol (PEG) and gelatin for cartilage regeneration. In: *Biomed Mater* 11 (2016), Nr. 3, S. 035014. – ISSN 1748-6041
- [Zhao et al. 2015] ZHAO, X. ; IRVINE, S. A. ; AGRAWAL, A. ; CAO, Y. ; LIM, P. Q. ; TAN, S. Y. ; VENKATRAMAN, S. S.: 3D patterned substrates for bioartificial blood vessels - The effect of hydrogels on aligned cells on a biomaterial surface. In: *Acta Biomater* 26 (2015), Oct, S. 159–68. – ISSN 1742-7061
- [Ziegler et al. 2007] ZIEGLER, A. ; LANGE, S. ; BENDER, R.: Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode - Artikel Nr.15 der Statistik-Serie in der DMW. In: *Dtsch Med Wochenschr* 132 (2007), S. e36–e38

Anhang

Anhang A

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen

A.1 Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

Schönwälder, S. M.; Bally, F.; Heinke, L.; Azucena, C.; Bulut, Ö. D.; Heißler, S.; Kirschhöfer, F.; Gebauer, T. P.; Neffe, A. T.; Lendlein, A.; Brenner-Weiß, G.; Lahann, J.; Welle, A.; Overhage, J.; Wöll, C. (2014). *Interaction of human plasma proteins with thin gelatin-based hydrogel films: a QCM-D and ToF-SIMS study*. *Biomacromolecules*. 15(7):2398-406. doi: 10.1021/bm500750v. Epub 2014 Jul 2.

A.2 Eingereichtes Patent

Multisphärische Partikel zur Therapie von Lungenerkrankungen.

Patentschrift am 08.08.2016 beim Deutschen Patent- und Markenamt (DPMA) eingereicht. Erfindungsmeldung KIT intern: EM15046; Schutzrechtsanmeldung: 1020016114615.3

A.3 Innovationswettbewerb

9. Platz beim 4. KIT-Innovationswettbewerb - Neuland 2016 (28 Teilnehmer)

IP0416: Kompartimentierte, biologisch abbaubare Mikropartikel mit Wirkstoffdepotfunktion zur kontrollierten Freisetzung unterschiedlicher Therapeutika in der Lunge.

A.4 In Vorbereitung befindliche Publikationen

Die Herstellung von PLGA-basierten Wirkstoffträgersystemen und deren physikalische, chemische und biologische Charakterisierung in *Nature Communications* (Kooperationsprojekt des Universitätsklinikums Würzburg und des Karlsruher Instituts für Technologie).

Die Untersuchung der bakteriellen Proteinadsorption mit anschließender MALDI-ToF und MS-MS-Analytik in Zusammenarbeit mit Siegfried Hohmann (IFG - KIT).

A.5 Abstracts auf Konferenzen

World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany 21.-23.10.2015

S. Schönwälder, J. Overhage, J. Lahann, H. Walles, M. Steinke

Interaction of therapeutic particles with a 3D *in vitro* test system of the human airway mucosa

A.6 Vorträge

Portfolio Workshop - Technologie und Medizin - Berlin November 2013
Seminar-Vortrag Würzburg März 2014
Portfolio Workshop - Technologie und Medizin - Teltow November 2014
BIF Seminar-Vortrag Karlsruhe April 2015
Portfolio Workshop - Technologie und Medizin - Teltow November 2015

A.7 Poster

EAB Begehung, KIT Campus Nord, 14.06.2013
S. Schönwälder, F. Bally, F. Kirschhöfer, T. Gebauer, A. Neffe, A. Lendlein, G. Brenner-Weiß, J. Lahann, C. Wöll, J. Overhage
Protein adsorption on thin gelatin-based hydrogel films

FEBS Workshop Biological Surfaces and Interfaces, Sant Feliu de Guixols (Spain), 30.06. - 05.07.2013
S. Schönwälder, F. Bally, F. Kirschhöfer, T. Gebauer, A. Neffe, J. Overhage, J. Lahann, C. Wöll
Protein adsorption on thin gelatin-based hydrogel films

9. ThGOT Thementage Grenz- und Oberflächentechnik gemeinsam mit dem 9. Thüringer Biomaterial-Kolloquium vom 03. - 05.09.2013 im Bio-Seehotel Zeulenroda

1. Posterpreis
S. Schönwälder, F. Bally, F. Kirschhöfer, T. Gebauer, A. Neffe, A. Lendlein, J. Lahann, J. Overhage, C. Wöll
Proteinadsorption auf dünnen Gelatine-basierten Hydrogelfilmen


Polymers for Advanced Technologies (PAT) 2013, Freie Universität Berlin, 29.09. - 02.10.2013
S. Schönwälder, F. Bally, F. Kirschhöfer, T. Gebauer, A. Neffe, A. Lendlein, G. Brenner-Weiß, J. Lahann, C. Wöll, J. Overhage
Protein adsorption on thin gelatin-based hydrogel films

World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany 21. - 23.10.2015
S. Schönwälder, J. Overhage, J. Lahann, H. Walles, M. Steinke
Interaction of therapeutic particles with a 3D *in vitro* test system of the human airway mucosa

DECHEMA: 3D Cell Culture 2016: How close to *in vivo* can we get? Models, applications & translation; Konzerthaus Freiburg, Germany, 19. - 21.04.2016
S. Schönwälder, J. Overhage, J. Lahann, H. Walles, M. Steinke
Interaction of therapeutic particles with a 3D *in vitro* test system of the human airway mucosa

Anhang B

Standardprotokolle

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem</p> <p>Immunhistologie</p>
--	--

Seite 1 von 3

1. Materialien

- Glasküvetten mit Deckel und Trägerkorb
- Pasteurpipetten
- Deckgläser
- Reaktionsgefäße
- Feuchtekammer
- Pipettenspitzen

2. Geräte

- Wärmeschrank (60°C)
- Eppendorf-Pipetten

3. Lösungen

- Primärantikörper
- Isotyp-Kontrolle
- PBS-Waschpuffer mit 0,5% Tween-20
- Antigendemaskierungs-Puffer: entsprechend des Primärantikörpers
- 3% H₂O₂ (immer frisch ansetzen und dunkel aufbewahren)
- Antikörper-Verdünnungslösung (DCS Innovative Diagnostik-Systeme #ALI20R500)
- Hämalan
- ab- bzw. aufsteigende Alkoholreihe, Roticlear (entspricht Xylol)
- organisches Eindeckmittel
- ggf. Blocklösung:
 - (A) 1% FISH Skin(0,1 g), 0,3% Triton-X 100 (30 µl), 1%BSA (0,1g) in PBS (9970 µl)
 - (B) 0,5% BSA in PBS

Detektionssystem:

DCS Super Vision 2 HRP-Polymer-Kit (DCS Innovative Diagnostik-Systeme PD000KIT):

DCS Polymer-Enhancer (Link): sekundäre Anti-Maus IgG und Anti-Kaninchen IgG**DCS HRP-Polymer-Reagenz (Label):** mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Polymer gegen Maus- und Kaninchen-AK

Substrat-Chromogen: DAB - Konzentrat (3,3'-Diaminobenzidin) und DAB Substratpuffer

(AEC+ Substratchromogen (3-Amino-9-Ethylkarbazol) oder) **Alle Chromogene sind licht- und stark temperaturempfindlich und sollten nur so kurz wie möglich auf Zimmertemperatur gebracht werden!**

4. Durchführung

Paraffinschnitte müssen entparaffiniert und eine Demaskierung der Epitope durchgeführt werden.

Bei Fixierung mit PFA (auch Kryoschnitte) erfolgt in der Regel eine Antigendemaskierung.

Werden Zellen auf Chamber Slides oder Cytospots gefärbt, kann nach entsprechender Fixierung (z. B. Ethanol:Aceton 1:1) und dem Überführen in Waschpuffer sofort mit dem Schritt „Überschichten mit dem Antikörper“ begonnen werden.


Vorbereitung der Schnitte:

- Paraffinschnitte im Beschriftungsfeld mit Kürzel für zu färbenden Antikörper (AK) versehen
- Isotypkontrolle nicht vergessen und ggf. Nativ-Gewebeschnitt als Positivkontrolle!
- schlecht haftende Schnitte ü.N. bei 38°C im Wärmeschrank lagern
- in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und für 1 h in den Wärmeschrank (60°C) stellen (Paraffin sollte geschmolzen sein!)
- direkt in Roticlear I überführen

Beachten: Ab hier dürfen die Schnitte nicht mehr trockenfallen!

Erstellt von: Amrehn / Steinke

Gültig ab: 21.11.2013

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem</p> <p>Immunhistologie</p>
--	--

Seite 2 von 3

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/Bemerkung
10	Roticlear I	absteigende Reihe: Entparaffinieren, Rehydratisieren
10	Roticlear II	
3 x auf und ab tauchen	Ethanol 96% vergällt	
3 x auf und ab tauchen	Ethanol 70% vergällt	
3 x auf und ab tauchen	Ethanol 50% vergällt	
	VE-Wasser	Schwenken

Demaskierung der Epitope A (hitzeinduzierte Epitopmaskierung):

- Demaskierung der Schnitte in entsprechendem 1x Puffer (90-100°C vorgewärmt im Dampfgerar/Schnellkochtopf, 20 min/10 min)
- in VE Wasser überführen und mit Fettstift umranden, danach in Waschpuffer geben

Demaskierung der Epitope B (enzymatische Demaskierung mit Enzymen wie Pepsin, Proteinase K...):

- Schnitte mit Fettstift bzw. Diamantstift umranden
- Enzym auftauen und 50-100 µl auf den Schnitt pipettieren
Inkubation bei RT (oder 37°C) 12 min
- Waschen mit Waschpuffer 5 min

IHC-Vorbereitung

- Herstellung der AK-Verdünnung mit Antikörper-Verdünnungslösung:
- Negativkontrolle: mit IgX, Proteinkonzentration auf gleiche Konzentration wie die des Primärantikörpers einstellen (IgX)
- Ist die AK-Konzentration unbekannt, erfolgt die Negativkontrolle nur mit der AK-Verdünnungslösung

Blockieren der zelleigenen Peroxidase (optional, wichtig für Zellen, die endogene Peroxidasen besitzen, z.B. Zellen aus dem Blut/Knochenmark):


- Schnitte mit 3% H₂O₂ in VE-H₂O(50-100 µl pro Schnitt/Kammer/Spot) behandeln
10 min
- Waschen mit Waschpuffer 5 min

Bei Bedarf Schnitte mit Blocklösung zur Hintergrundreduzierung behandeln 30 min

Überschichten mit 50-100 µl primären Antikörper bzw. IgG-Kontrolle in entsprechender Verdünnung

- Inkubation abhängig vom Primärantikörper, Richtwerte: 60 min bei RT oder 4N bei 4°C
- AK-Lösung bzw. IgG-Kontrolle abtropfen
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min

!!! Ab hier im Dunkeln weiterarbeiten

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem</p> <p>Immunhistologie</p>
--	--

Seite 3 von 3


- Überschichten der Zellen mit 1-2 Tropfen **Polymer-Enhancer** 10 min
- Inkubation bei RT je 5 min
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- Überschichten der Zellen mit 1-2 Tropfen **HRP-Polymer** 20 min
- Inkubation bei RT je 5 min
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- Überschichten der Zellen mit DAB Lösung (Lösung ist 1 Woche bei 4°C haltbar)
- Inkubation: **(Sichtkontrolle!! Zwischen 30 sec bis 10 min!! I.d.R. 5 min)**
- in Waschpuffer überführen
- Gegenfärbung mit Hämalun 30-45 sec
- Bläuen in Leitungswasser 60-90 sec
- Überführen in VE Wasser

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/Bemerkung
2x kurz eintauchen	Ethanol 70% vergällt	aufsteigende Reihe: Rehydratisieren
2	Ethanol 96% vergällt	
2	2-Propanol I	
3	Roticlear I	
3	Roticlear II	

- Eindecken in organischem Eindeckmittel **oder** lufttrocknen lassen und danach in Roticlear eintauchen und mit organischem Eindeckmittel eindecken
- Eindecken mit organischem Eindeckmittel **nur** unter dem Abzug!
- Schnitte ü.N. unter dem Abzug trocknen lassen und am nächsten Tag wegräumen!

5. Bemerkungen

- DAB ansetzen (unbedingt Handschuhe tragen, kein Hautkontakt!): 1ml DAB Substratpuffer + 1 Tropfen DAB-Konzentrat
- AK-Verdünnungslösungen sind 4 Wochen bei 4°C haltbar
- Die nötige Vorbehandlung und die einzusetzenden Antikörperkonzentrationen sind in der AK-Liste aufgeführt.
- Gegebenenfalls ist eine zusätzliche Permeabilisierung der Schnitte nötig
- Die Arbeitsschritte können in Abhängigkeit vom Primärantikörper variieren

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Immunfluoreszenz mit Fluorochrom</p> <p>Immunfluoreszenz</p>
---	--

Seite 1 von 2

1. Materialien

- Glasküvetten mit Deckel, mit Alufolie umwickelt
- Deckgläser
- Reaktionsgefäße
- Feuchtekammer
- Pipettenspitzen

2. Geräte

- Wärmeschrank (60°C)
- Eppendorf-Pipetten
- Schüttler

3. Lösungen

- Primärantikörper
- Sekundärantikörper
- Normalserum zum Blocken
- Isotyp-Kontrolle
- Waschpuffer PBS/TBS + Tween-20 (0,5%)
- Roticlear (entspricht Xylol) und absteigende Alkoholreihe zum Entparaffinieren bzw. Entwässern
- Antigendemaskierungs-Puffer: entsprechend des Primärantikörpers
- zur Vorbereitung der Chamber Slides und Cytospots: 0,2% Triton-X100 in PBS
- ggf. Blocklösung: 1% FISH Skin(0,1g), 0,3% Triton-X 100 (30 µl), 1%BSA (0,1 g) in PBS (9970 µl)
- Antikörper-Verdünnungslösung (DCS Innovative Diagnostik-Systeme #ALI20R500)
- MOVIOL DABCO mit 0,1% DAPI oder Fluoromount G

4. Durchführung

Paraffinschnitte müssen entparaffiniert und je nach Antikörper eine Demaskierung der Epitope durchgeführt werden.

Werden Zellen auf Chamber Slides oder Cytospots gefärbt, muss mit 0,2% Triton-X100 in PBS 5 min. vorbehandelt werden.

Gefrierschnitte werden je nach Fixierung weiter behandelt.

Vorbereitung der Schnitte:


- Paraffinschnitte im Beschriftungsfeld mit Kürzel für zu färbenden Antikörper (AK) versehen
- Isotypkontrolle nicht vergessen und ggf. Nativ-Gewebeschnitt als Positivkontrolle!
- schlecht haftende Schnitte ü.N. bei 38°C im Wärmeschrank lagern
- in Trägerkorb mit Metallhenkel einordnen und für 1 h in den Wärmeschrank (60°C) stellen (Paraffin muss vollständig geschmolzen sein!)
- direkt in Roticlear I überführen

Beachten: Ab hier darf der Schnitt nicht mehr trockenfallen!

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel/Bemerkung
10	Roticlear I	absteigende Reihe: Entparaffinieren, Rehydratisieren
10	Roticlear II	
3x auf- und abtauchen	Ethanol 96%	
3x auf- und abtauchen	Ethanol 70%	
3x auf- und abtauchen	Ethanol 50%	
	VE-Wasser	Schwenken
		Überführung in Waschpuffer

Erstellt von: Amrehn/Steinke

Gültig ab: 16.09.13

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>Immunfluoreszenz mit Fluorochrom</p> <p>Immunfluoreszenz</p>
---	--

Seite 2 von 2

Demaskierung der Epitope (hitzeinduzierte Epitopmaskierung):

- Demaskierung der Schnitte in entsprechendem 1x Puffer (100°C vorgewärmt im Dampfgarer für 20 min)
- Schnitte sofort in Waschpuffer überführen und mit Fettstift umranden

Demaskierung der Epitope (enzymatische Demaskierung):

- Schnitte mit Diamantstift umranden
- Enzymlösung auf den Schnitt pipettieren, Inkubation (s. entsprechendes Datenblatt)
- Waschen mit Waschpuffer 5 min

Vorbehandlung der Chamber Slides und Cytospots bei intrazellulären Antigenen

- 0,2% Triton-X100 in PBS 5 min
- Waschen mit Waschpuffer 5 min

IF-Färbung

- 5% Normalserum (aus derselben Spezies wie der Sekundärantikörper) in AK-Verdünnungslösung verdünnen zum Blocken 20 min
- Primärantikörper (z.B. mouse AB1 und/oder rabbit AB1)
- Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit vom Primärantikörper
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- Sekundärantikörper mit Fluorochrom in AK-Verdünnungslösung verdünnen (z.B. donkey anti-mouse-Cy5 und/oder donkey anti-rabbit-Cy2)
- Inkubation bei RT (im Dunkeln) 60 min
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min

Beispielprotokoll für eine Doppelfärbung, bei der beide Primärantikörper aus derselben Spezies (mouse) stammen

- 5% Normalserum (aus derselben Spezies wie der Sekundärantikörper) in AK-Verdünnungslösung verdünnen zum Blocken 20 min
- Inkubation mit dem ersten Primärantikörper (mouse AB1)
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- Inkubation mit dem ersten Sekundärantikörper (z.B. donkey anti-mouse-Cy5)
- Inkubation bei RT (im Dunkeln) 60 min
- 3x Waschen mit Waschpuffer je 5 min
- **5% Normalserum (mouse) in AK-Verdünnungslösung** **20 min**
- **Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (mouse AB2)**
- **3x Waschen mit Waschpuffer** **je 5 min**
- **Inkubation mit dem zweiten Sekundärantikörper (z.B. donkey anti-mouse-Cy2)**
- **Inkubation bei RT (im Dunkeln)** **60 min**
- **3x Waschen mit Waschpuffer** **je 5 min**
- eindecken mit MOVIO DABCO mit 0,1% DAPI, Fluoromount G + DAPI je nach Fluorochrom
- ün trocknen lassen, dunkel lagern!

5. Bemerkungen

Vor der erstmaligen Durchführung von Mehrfachfärbungen: Ablauf bitte mit Christa besprechen!

Erstellt von: Amrehn/Steinke

Gültig ab: 16.09.13

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>M30 ELISA</p> <p>Zellkultur: Apoptosebestimmung</p>
---	---

Seite 1 von 2

1. Materialien

- Glasflasche (500 mL)
- Pipettenspitzen
- 10 mL Einwegpipette
- 1,5 mL Reaktionsgefäße

2. Geräte

- ELISA-Reader: TECAN infinite M200
- Eppendorfpipetten
- Pipetboy
- Schüttler
- ggf. Mehrkanalpipette
- ggf. Multistep Pipette

3. Chemikalien und Lösungen

- ggf. NP-40 (Applichem, A1694,0250)
- M30 CytoDeath ELISA Kit (Peviva, 10900); enthält: Standards Zero, Low, Medium und High; HRP Conjugate und Dilution Buffer, TMB Substrate, Stop Solution, Waschpuffertablette, Mikrotiterplatte und Sealing Tape

4. Durchführung

- Es können entweder Lysate oder Überstände gemessen werden. Lysate stellen eine Endpunkt-Messung dar; mit Überständen können auch Zeitverläufe nachverfolgt werden.
- Herstellung der Proben aus Lysaten:
 - Zellen in den zu untersuchenden Konditionen kultivieren
 - Für die Lyse 5% NP-40 zum Medium geben (Medium also nicht vorher abnehmen!)
Bsp: in ein well einer 96er Platte mit 200 µL Medium über den Zellen 10 µL NP-40 geben
 - vorsichtig auf- und abpipettieren (Schaumbildung vermeiden!)
 - 5'@RT auf einem Schüttler inkubieren
- Reagenzien vorbereiten:
 - HRP Conjugate muss mit Dilution Buffer (grün) verdünnt werden: 9,2 mL des Dilution Buffer zum HRP Conjugate (0,4 mL) zugeben (**Einmalig pro Kit!**)
 - Waschpuffer muss angesetzt werden: Tablette in 500 mL VE-Wasser lösen
- 25 µL der M30 CytoDeath Standards oder Proben pro well pipettieren (Duplikate empfohlen, außerdem die Proben nicht nur unverdünnt verwenden, sondern beim ersten Mal auch in verschiedenen Verdünnungen, damit man am Schluss wirklich auswertbare ODs dabei hat)
- Zugabe von 75 µL der verdünnten HRP Conjugate-Lösung zu jedem well
Die Zugabe von Standards, Proben und HRP Conjugate müssen aufeinanderfolgend, ohne Unterbrechung, innerhalb von 20min durchgeführt werden.
- Mikrotiterplatte mit Sealing Tape (oder einem Deckel) abdecken
- 4h auf dem Schüttler inkubieren (Mikrotiterplatten-Schüttler: 600 U/min)
- Mikrotiterplatte 5x mit 250 µL Waschpuffer pro well waschen (Mehrkanalpipette + Küvette empfohlen); Kreuzkontamination zwischen den wells vermeiden
- Zugabe von 200 µL TMB Substrate pro well
- Inkubation im Dunkeln für 20+/-1 min

Erstellt von: Stratmann

Gültig ab: 26.06.2013

 <p>Universitätsklinikum Würzburg</p> <p>Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin</p>	<p>M30 ELISA</p> <p>Zellkultur: Apoptosebestimmung</p>
---	--

Seite 2 von 2

- Zugabe von 50 µL Stop Solution pro well; durch schwenken vollständig mischen
- Mikrotiterplatte vor dem Ablesen 5 min ruhen lassen.
- Absorption bei 450 nm innerhalb von 30 min messen

5. Auswertung

- Die ODs der 4 Standards entsprechen 0, 250, 1000 und 3000 U/L. Er wird als sigmoide Kurve mit x-Achse: Konzentration (U/L) und y-Achse: Absorption bei 450 nm dargestellt.
- Nur Konzentrationen zwischen 250 und 3000 U/L sind auswertbar.
- Die sigmoide Auswertung des Standards und die Berechnung der Konzentration gemessener Proben kann mit OriginPro (über das Rechenzentrum kostenlos verfügbar) durchgeführt werden:
 - Neue Datei in OriginPro öffnen
 - In Spalte A(X) die Konzentrationen der Standardlösungen eintragen, in Spalte B(Y) die OD-Werte; ggf. Langnamen und Einheiten in den entsprechenden Reihen angeben
 - Alle Werte markieren und unter Analyse -> Anpassen -> Sigmoidaler Fit -> Dialog öffnen... wählen
 - Unter Einstellungen Funktion „SLogistic1“ wählen
 - Unter Einstellungen -> Y/Y suchen „X von Y finden“ wählen; Anzahl der X-Spalten 1.
 - „Fit“ klicken und die Anzeige mit „Ja“ bestätigen
 - Es werden mehrere Tabs im Fenster geöffnet. Unter FitSigmoidal1 findet man die gezeichnete Kurve (kann mit Doppelklick vergrößert werden)
 - Unter FitSigmoidalFindXfromY1 können nun in die linke Spalte A1(Y) gemessene OD-Werte kopiert werden. Automatisch rechnet das Programm die Y-Werte = Konzentrationen aus und gibt sie in der rechten Spalte A2(X) an, sofern sie innerhalb des Standards liegen.
 - Konzentrationen ggf. mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren
 - Da OriginPro Excel-kompatibel ist, können die errechneten Konzentrationen nach Belieben in eine Excel-Datei übertragen werden.

6. Bemerkungen

- Der M30 ELISA ist ein Apoptose-spezifischer und Epithelzell-spezifischer Test. Nur Epithelzellen exprimieren CK18; und nur bei Apoptose (im Gegensatz zB zu Nekrose) werden die Caspasen aktiv, die das M30-Epitop in CK18 freilegen.
- Alle Reagenzien des Kits können in den normalen Ausguss entsorgt werden.
- Lysate bzw. Überstände können bei -80°C gelagert werden. Ab dem 3. Mal auftauen muss allerdings mit der Abnahme des Signals gerechnet werden.
- Lysate bzw. Überstände müssen verdünnt werden, wenn ihre Konzentration über 3000 U/L, also oberhalb des Standards, liegen. Standard Zero oder Medium sind *grundsätzlich* zur Verdünnung geeignet; Medien sollten aber auf ihre Eignung getestet werden.
- Mehrere Kits können nicht kombiniert werden, wenn sich die Lot-Nummern einzelner Komponenten von Kit zu Kit unterscheiden, da nur bestimmte Lots der Reagenzien miteinander kompatibel sind.
- Es können zusätzliche Standardverdünnungen verwendet werden. Diese müssen selbst angesetzt werden (aus den fertig angesetzten im Kit).
- Optional kann auch mit Excel ausgewertet werden.

Erstellt von: Stratmann

Gültig ab: 26.06.2013



Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Research Use Only

Protocol: ELISA Ready-Set-Go!

The following protocol is a general guideline for the Ready-SET-Go! Sets

Materials Provided

- Please refer to the Certificate of Analysis (C of A) for components

Other Materials Needed

- Buffers*
 - Wash Buffer: 1x PBS, 0.05% Tween-20 (or eBioscience ELISA Wash Buffer Powder, Cat. No. 00-0400)
 - Stop Solution: 1M H₃PO₄ (recommended) or 2N H₂SO₄
- Pipettes
- Refrigerator
- Frost-free -20°C freezer
- 96-well plate (Corning Costar 9018 or NUNC Maxisorp®)
NOTE: The use of ELISA plates which are not high affinity protein binding plates will result in suboptimal performance, e.g., low signal or inconsistent data. Do not use tissue culture plates or low protein absorption plates. Use only the Corning Costar 9018 or NUNC Maxisorp (Cat. No. 44-2404) 96-well plates
- 96-well ELISA plate reader (microplate spectrophotometer)
- ELISA plate washer (highly recommended)

NOTE: To ensure optimal results from this ELISA Ready-SET-Go! Set, please only use the components included in the set. Exchanging of components is not recommended as a change in signal may occur.

Time Requirements

- 1 overnight incubation
- 4½-hour incubations
- 1 hour washing and analyzing samples

Experimental Procedure

1. Coat Corning Costar 9018 (or Nunc Maxisorp®) ELISA plate with 100 µL/well of capture antibody in 1X Coating Buffer (dilute as noted on C of A, which is included with the reagent set). Seal the plate and incubate overnight at 2-8°C.
2. Aspirate wells and wash 3 times with >250 µL/well Wash Buffer*. Allowing time for soaking (~ 1 minute) during each wash step increases the effectiveness of the washes. Blot plate on absorbent paper to remove any residual buffer.
3. Dilute 1 part 5X ELISA/ELISPOT Diluent with 4 parts DI water.* Block wells with 200 µL/well of 1X ELISA/ELISPOT Diluent. Incubate at room temperature for 1 hour.
4. Optional: Aspirate and wash at least once with Wash Buffer.
5. Using DI water, reconstitute lyophilized standards as noted on the C of A. Allow to sit for 15 minutes with gentle agitation prior to diluting further

© Affymetrix, Inc. All rights reserved
Tel: +1.888.999.1371 or +1.858.642.2058 • Fax: +1.858.642.2046
ebioscience.affymetrix.com • info@ebioscience.com



Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Research Use Only

6. Using 1X ELISA/ELISPOT Diluent*, dilute the reconstituted standard as noted on the C of A to prepare the top standard concentration. Add 100 μ L/well of top standard concentration to the appropriate wells. Perform 2-fold serial dilutions of the top standards to make the standard curve for a total of 8 points. Add 100 μ L/well of your samples to the appropriate wells. Include at least two wells with 100 μ L/well of 1X ELISA/ELISPOT Diluent only to serve as plate blanks. Seal the plate and incubate at room temperature for 2 hours (or overnight at 2-8°C for maximal sensitivity).
7. Aspirate/wash as in step 2. Repeat for a total of 3-5 washes**.
8. Add 100 μ L/well of detection antibody diluted in 1X ELISA/ELISPOT Diluent * (dilute as noted on C of A). Seal the plate and incubate at room temperature for 1 hour.
9. Aspirate/wash as in step 2. Repeat for a total of 3-5 washes**.
10. Add 100 μ L/well of Avidin-HRP* diluted in 1X ELISA/ELISPOT Diluent (dilute as noted on C of A). Seal the plate and incubate at room temperature for 30 minutes.
11. Aspirate and wash as in step 2. In this wash step, soak wells in Wash Buffer* for 1 to 2 minutes prior to aspiration. Repeat for a total of 5-7 washes**.
12. Add 100 μ L/well of 1X TMB Solution to each well. Incubate plate at room temperature for 15 minutes.
13. Add 50 μ L of Stop Solution to each well.
14. Read plate at 450 nm. If wavelength subtraction is available, subtract the values of 570 nm from those of 450 nm and analyze data.

NOTES:

* **Be certain that no sodium azide is present in the solutions used in this assay, as this inhibits HRP enzyme activity.**

****The number of washes in the protocol was adapted to an automatic plate washer. This can be decreased when using other methods but should be tested empirically. Allowing time for soaking (~ 1 minute) during each wash step increases the effectiveness of the washes.**



Page 1 of 1

1. Sterile materials

- Glass pipettes
- Single-use pipettes
- 15 ml falcon tube

2. Equipment

- Safety cabinet
- Pipet boy
- Water bath at 37°C
- Centrifuge
- Incubator (37°C, 5% CO₂)
- Aspiration device

3. Chemicals, media, buffer and solutions

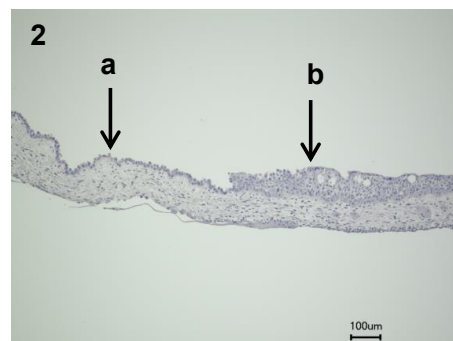
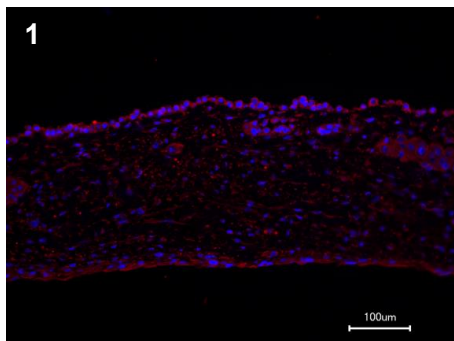
- PBS⁻ buffer (catalogue #D8537, Sigma)
- 1xTrypsin
- Fetal calf serum (FCS)
- Airway Epithelial Cell Growth Medium (AECG, catalogue #PB-MH-350-0099, Pelobiotech)
 - add supplements without antibiotics
- Paraformaldehyd (PFA) 4 %

4. Protocol

- Wash the 3D models from the apical side with PBS⁻ (aspirate carefully)
- Add 500 µL 1x trypsin and incubate for 5 minutes at 37 °C
- Take the model out of the incubator, pipette the 500 µL cell-trypsin-solution harsh up and down and transfer it in a 15 mL falcon tube with 0.5 mL FCS (to stop the digest)
- Again add 500 µL 1x trypsin and incubate for 5 minutes at 37 °C (Repeat this step 5 to 6 times in total)
- Centrifuge the 15 mL falcon tube at 1200 rpm for 5 minutes
- Aspirate the liquid and add cell culture media to the cell pellet (approximately 5 mL; depending on the expected cell number)
- Count the cells via trypan blue staining
- [FACS analysis could be done to distinguish between different cell types (fibroblast / epithelial cells)]
- PFA fixation and paraffin embedding of the remaining 3D model → histological analysis

5. Annotations

- Picture 1 shows a successful detachment of the hTECs (only basal cells remained on the apical side)
- Picture 2 shows areas with successful (a) and not successful (b) detachment of the epithelial cells



Written by: Sina Schönwälder

valid from: 29.10.2015



Page 1 of 1

1. Sterile materials

- 6-Well-plate
- Forceps
- Single-use pipettes
- Small conical glass flask

2. Equipment

- Safety cabinet
- Pipet boy
- Water bath at 37°C
- Parafilm
- Plastic bag, tape, parcel and stuffing

3. Chemicals, media, buffer and solutions

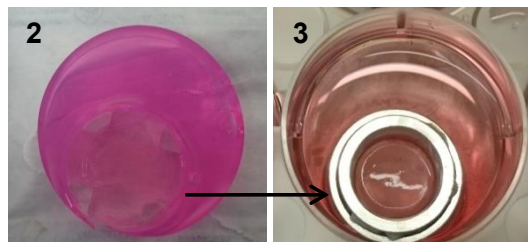
- The appropriate cell culture media used in the 3D culture, for example 50/50 ratio of:
 - Airway Epithelial Cell Growth Medium (AECG, catalogue #PB-MH-350-0099, Pelobiotech)
 - add supplements without antibiotics (**first read the protocol**)
 - Fibroblast culture medium: DMEM (catalogue #61965-026, Gibco by Lifetechnologies) with 10% FCS (catalogue #10270106, internal reservation #2033247S2, Gibco by Lifetechnologies)
- Low Melt Agarose (Biozym 840101)

4. Protocol

- Add 4 % Low Melt Agarose to a 50/50 mix of cell culture media (**without supplements and FCS**) in a small conical glass flask and heat it up in the microwave till it is totally dissolved
- Seal the flask with aluminium foil and let it cool down in the water bath at 37 °C
- Heat also mixed cell culture media with double concentration of supplements and FCS in the water bath to 37 °C
- Put the cell crowns in a new 6-Well-plate
- Use a single-use pipette to quickly blend the dissolved agarose solution with the culture medium containing the double concentrated supplements (*results in a 2 % agarose solution with the correct amount of supplements and FCS*)
- Hold the 6-Well plate skewed and **immediately** fill half of the well with the agarose cell culture media mix (approximately 3-4 mL); avoid air bubbles!
- Seal the plate with parafilm and let it sit at room temperature till it is solid (picture 1)
- Put the plate in a plastic bag, seal it with tape, afterwards lay it in the parcel and stuff it with shock absorbing material. Transportation should be performed at room temperature.
- For reincubation: Use steril forceps to take the models slowly out of the agarose (picture 2 shows the left agarose gel), carefully place it in a new 6-Well plate with warm cell culture media (picture 3) and put it in the incubator.

5. Annotations

- Prepare the models minimum 1 hour before transportation



Written by: Sina Schönwälder

valid from: 29.10.2015

Anhang C

Aminosäurezusammensetzung der untersuchten Proteine

Aminosäure	Zusammensetzung HSA [Mol-%] (Gasteiger et al., 2003)	Zusammensetzung humanes Fibrinogen [Mol-%] (Gasteiger et al., 2003)	Zusammensetzung Gelatine [Mol-%] (Eastoe, 1955)
Ala (A)	10,34	4,86	11,14
Arg (R)	4,43	5,19	4,85
Asn (N)	2,79	5,58	0,0
Asp (D)	5,91	6,19	4,67
Cys (C)	5,75	1,99	0,0
Gln (Q)	3,28	4,42	n.d.
Glu (E)	10,18	6,63	7,13
Gly (G)	2,13	9,56	32,61
His (H)	2,63	2,21	0,60
Ile (I)	1,48	3,76	0,96
Leu (L)	10,51	6,57	2,36
Lys (K)	9,85	6,24	2,63
Met (M)	1,15	2,32	0,55
Phe (F)	5,75	3,37	1,44
Pro (P)	3,94	4,36	13,06
Ser (S)	4,60	9,45	3,65
Thr (T)	4,76	6,19	1,71
Trp (W)	0,33	2,43	0,0
Tyr (Y)	3,12	3,81	0,31
Val (V)	7,06	4,86	2,19
Pyl (O)	0,0	0,0	0,0
Hyp	0,0	0,0	9,55
Hyl	0,0	0,0	0,60

Anhang D

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an...

Prof. Dr. Heike Walles für das Möglichmachen dieses interessanten Kooperationsprojektes zwischen dem Universitätsklinikum Würzburg (UKW) und dem Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Vielen Dank, dass Du mich als Promotionsstudentin in Würzburg aufgenommen und mich erstklassig und kompetent betreut hast. Danke für die große Unterstützung und Dein entgegengebrachtes Vertrauen. Ich habe sehr viel von Dir gelernt und werde vor allem die herzliche und motivierte Arbeitsweise mit auf meinen weiteren Lebensweg nehmen.

Prof. Dr. Thomas Dandekar für die Betreuung meiner Arbeit als Zweitgutachter und die kompetenten und lebendigen Besprechungen und Diskussionen, bei denen immer tolle Ideen entstanden sind und die Zeit wie im Flug verging. Vielen Dank für die sehr gute Betreuung und die Tipps bei Fragen bezüglich des Patents.

Prof. Dr. Jörg Lahann für den Input von chemischer Seite. Danke, dass ich in Ihren Laboren lernen durfte, wie man Janus-Partikel herstellt und funktionalisiert. Vielen Dank für die Unterstützung.

Prof. Dr. Ursula Obst, dass Sie es mir ermöglicht haben, in ihren Laboren meine mikrobiologischen Untersuchungen durchzuführen.

Prof. Dr. Georg Krohne (Biozentrum der Universität Würzburg) für die große Hilfe bei der TEM und REM-Untersuchung der 3D-Modelle, sowie die fachliche und freundliche Kompetenz bei der Auswertung der Aufnahmen.

Prof. Dr. med. Thorsten Walles (Universitätsklinikum Würzburg Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie) für die Bereitstellung von Biopsiematerial für die Zellisolierung.

Dr. Maria Steinke für die lehrreichen und interessanten Monate in Würzburg und die Motivation, wenn es auch mal nicht so rund lief im Labor. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung, dass Du mir stets mit kompetentem Rat zur Seite standest, mir aber dennoch großen Freiraum zur Bearbeitung meiner Aufgaben gelassen hast. Danke für die superschnelle und ausgezeichnete Korrektur so mancher Texte. Du bist einfach cool.

Dr. Leonie Barner für die kompetente und herzliche Betreuung und Unterstützung bei chemischen Fragen und beim Schreiben unserer Publikation. Danke, dass Du stets ein offenes Ohr für mich hattest und immer für mich da warst.

Dr. Alexander Welle für die freundlichen und motivierenden Besprechungen, die große Unterstützung beim Schreiben unserer gemeinsamen Publikation und das Korrekturlesen vieler Texte. Vielen Dank für die Messungen am ToF-SIMS.

Dr. Andreas Dötsch für die guten und lehrreichen Diskussionen meiner Ergebnisse und das Korrekturlesen dieser Arbeit von mikrobiologischer Seite.

Dr. Jörg Overhage für meine Einstellung am IFG auf Basis meiner Initiativbewerbung, die herzliche Aufnahme in die Forschungsgruppe und das entgegengebrachte Vertrauen.

Dr. Janine Strehmel für die Motivation und große Unterstützung in der Endphase dieser Arbeit, die schöne Zeit im Großraumbüro und die gemeinsamen Aktivitäten außerhalb des Laboralltags.

Siegfried Hohmann für die Programmierung und Bereitstellung der tollen Tools zur Auswertung der MALDI-Daten. Danke, dass Du jederzeit für meine Fragen ein offenes Ohr hattest und mich bei der Auswertung unterstützt hast.

alle Kollegen des Instituts für Funktionelle Grenzflächen (IFG) und weiteren Instituten des KITs für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft vor allem bei der Handhabung zahlreicher Geräte. Mein herzlicher Dank geht an **Frank Kirschhöfer** für die Hilfe von analytischer Seite besonders mit dem MALDI und der HPLC. Ein Dank geht an **Peter Krolla-Sidenstein** und **Dr. Carlos Azucena** für die Hilfe am AFM. **Stefan Heissler** möchte ich für die Unterstützung am IRRAS danken. Ein Dank an **Dr. Frank Friedrich** und **Daniel Quevedo** für die Unterstützung und Einweisung am Elektronenmikroskop. Ein großes Dankeschön auch an **Dr. Meike König** und **Dr. Florence Bally** für die Hilfe und Einweisung am Ellipsometer und am CVD-Gerät, sowie das Korrekturlesen zahlreicher Texte. **Dr. Pavel Nikolov** und **Dr. Amit Sitt** möchte ich für die Unterstützung am konfokalen Mikroskop danken. Ein großer Dank an **Dr. Lars Heinke** für die Hilfe bei der Berechnung des Schermoduls mit den *fancy* Formeln.

Heike Oberwinkler und **Katharina Seidensticker** für die wertvolle Hilfe im Zellkulturlabor und der Histologie. Danke, dass Ihr mir alles im Labor und Lehrstuhl in Würzburg gezeigt habt und bei Fragen stets für mich da wart. Herzlichen Dank auch für zahlreiche Vorversuche, welche zur Etablierung von Standardprotokollen führten. Mit Euch zu Arbeiten hat einfach super viel Spaß gemacht und ich werde Euch vermissen.

Alan Palus für die Hilfe bei der Etablierung der Aufnahmen mit der Hochgeschwindigkeitskamera. Danke, dass Du mir alles über den Versuchsaufbau und die Software erklärt hast.

Juan Pablo Prada Salcedo für die Auswertung der Aufnahmen mit der Hochgeschwindigkeitskamera.

alle Kollegen des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin (TERM) für die herzliche und motivierte Arbeitsatmosphäre. Es hat riesig Spaß gemacht, mit Euch zusammen zu arbeiten und ich werde die interessantesten Versuche und die tolle Zeit in Würzburg nie vergessen.

Mama und Papa, Diana und Dominik, Oma Schönwälder, ich danke Euch von Herzen, dass Ihr immer für mich da seid, an mich glaubt und mich unterstützt habt. Ich konnte mich während meines Studiums und der Doktorarbeit immer auf euch verlassen. Ich bin froh, dass wir einen so großen Familienzusammenhalt haben, gerade in der Zeit, in der uns Familienmitglieder verlassen haben.

Michael Tansella für deine ruhige und geduldige Unterstützung vor allem, wenn es um Computerfragen ging. Herzlichen Dank für die motivierenden und aufbauenden Worte und dass Du es seit 13 Jahren mit mir aushältst.

Anhang E

Eidesstattliche Erklärung

Schönwälder, Sina Maria Siglinde
Lorcherstraße 80
73525 Schwäbisch Gmünd

Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „Development and characterization of gelatin-based hydrogels and PLGA-based Janus particles“ is the result of my own work.

I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, den 29.11.2016

signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Entwicklung und Charakterisierung von Gelatine-basierten Hydrogelen und PLGA-basierten Janus-Partikeln“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 29.11.2016

Unterschrift