Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II:
Molekulare Zellbiologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin

des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Guse

Darstellung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels mittels Nanoteilchen *in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von:

Carla Maria Edeling aus Darmstadt

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 2.07.2012
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Ulrike Beisiegel
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **1**

1 Arbeitshypothese und Fragestellung **3**

2 Einleitung **4**

2.1 Lipoproteine und Lipoproteinstoffwechsel 4

2.2 Nanoteilchen 10

2.3 Markierung von Lipoproteinen mit Nanoteilchen 16

3 Material und Methoden **17**

3.1 Material 17

3.2 Methoden 20

3.2.1 Extraktion von Lipoproteinen aus humanem Plasma 20

3.2.2 Lipidextraktion aus Lipoproteinen 21

3.2.3 Herstellung von fluoreszierenden Nanosomen 22

3.2.4 Mauspräparation 22

3.2.5 Varianten der Organkonservierung 22

3.2.6 Varianten der Schnitttechnik 24

3.2.7 Variation von Färbungen, Fixierungen und Eindeckelungsverfahren der Schnitte 25

3.2.8 Immunfluoreszenz 26

3.2.9 Mikroskopie 27

3.2.10 Messung des Cadmiums mittels Atom Absorptions-Spektroskopie 27

4 Ergebnisse **30**

4.1 Entwicklung einer histologischen Methode zur Anwendung von fluoreszierenden Nanoteilchen als Marker für Lipoproteine 30

4.1.1 Perfusion der Maus 32

4.1.2 Organprozessierung 32

4.1.3 Schnitttechniken 35

4.1.4 Färbungen der Schnitte 35

4.1.5 Eindeckelungslösungen 36

4.2 Mikroskopie 39

4.3 Nanosomenlokalisation innerhalb verschiedener Organe.....40
4.3.1 Organdistribution.....40
4.3.2 Genauere Gewebelokalisation mithilfe von Immunfluoreszenz 43
4.4 Quantitative und qualitative Auswertung der Nanosomenaufnahme in verschiedene Organe bei Wildtyp-, ApoEko- und Kontrollmäusen zu unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten.....44
5 Diskussion und Ausblick.....54
6 Zusammenfassung.....60
Literaturverzeichnis.....61
Danksagung.....69

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atom Absorptions-Spektroskopie
ApoA5	Apolipoprotein A5
ApoB	Apolipoprotein B
ApoC	Apolipoprotein C
ApoE	Apolipoprotein E
Apo-Lp	Apolipoprotein
BAT	Brown Adipose Tissue
BSA	Bovine Serum Albumin
CdSe/CdS/ZnS	Cadmiumselenid/Cadmiumsulfid/Zinksulfid
CdTe	Cadmiumtellurid
CE	Cholesterolester
Chol	Cholesterol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HL	Hepatische Lipase
LCAT	Lecithin:Cholesterin-Acyl-Transferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LpL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-Rezeptor-related Protein
min	Minuten
ml	Milliliter (10^{-3} l)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer (10^{-9} m)
PBS	Phosphat buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PL	Phospholipid
PPD	1,4-Phenylendiamin
QD	Quantumdot
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RPM	Revolutions per minute
sek	Sekunden

TG	Triacylglycerid
TRL	Triacylglyzerid-reiche Lipoproteine
UV	Ultraviolett
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
µl	Mikroliter (10^{-6} l)

Sonstige Abkürzungen:

bspw	beispielsweise
bzw	beziehungsweise
ca	circa
engl	englisch
o.g	oben genannt
s.	siehe
s.o.	siehe oben
u.a.	unter anderem
vs	versus
z.B.	zum Beispiel

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

In dieser Arbeit soll die *in vivo* Anwendung fluoreszierender Nanoteilchen als Markierung für den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel anhand eines Mausmodells untersucht werden. Diese neuartige Methode, bei der der hydrophobe Kern von Lipoproteinen mit fluoreszierenden Nanoteilchen markiert wird, hat ihre Anwendung bisher primär in *in vitro* Studien gefunden. Die Prozessierung und folgende Speicherung der Lipoproteine im lebenden Organismus wurde jedoch nur wenig untersucht.

Ziel ist es eine histologische Technik unter Berücksichtigung des maximalen Erhalts der Nanosomenfluoreszenz zu etablieren. Weiterhin sollen Aussagen hinsichtlich der Organverteilung der Nanosomen getroffen werden. Unterschiede in der Nanosomenverteilung zu verschiedenen Perfusionszeitpunkten nach der Injektion und die genaue Lokalisation der Nanosomen innerhalb der Gewebe sollen untersucht werden. Außerdem wurde neben den Wildtypmäusen eine Mauslinie, bei der das Apolipoprotein E ausgeschaltet ist, untersucht, um den Lipoproteinmetabolismus ohne den Einfluss des Apolipoprotein E näher zu verstehen.

Um die aufgenommene Menge an Nanoteilchen in die unterschiedlichen Organe quantitativ zu bestimmen, soll mittels Atom Absorptions-Spektroskopie (AAS) der Cadmiumgehalt der Nanoteilchen gemessen werden.

2 Einleitung

Seit Beginn dieses Jahrtausends gewinnt die Nanotechnologie zunehmend an Bedeutung (Eychmüller, 2000; Wang et al., 2005). Studien über die Produktion von Strukturen im Bereich von unter 100 Milliardstel Metern (1 Nanometer entsprechen 10^{9}m) und deren Anwendung werden als Nanotechnologie bezeichnet. Von besonderem Interesse auf diesem Gebiet sind die Nanoteilchen, die als Quantenpunkte (quantum dots / Qdots / QD) bezeichnet und aus verschiedensten Materialien hergestellt werden. Dazu zählen sowohl organische als auch anorganische Verbindungen wie Edelmetalle, Halbleiter und ferrimagnetische Oxide. In der Biomedizin werden Nanoteilchen als stabile fluoreszierende Markierungen und in der Bildgebung mit superparamagnetischen Eisenoxid-Nanoteilchen, bei *in vitro* und neuerdings auch bei *in vivo* Studien angewendet.

Zum weiteren Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Zustände dieses Stoffwechselweges, sollten im Rahmen dieser Arbeit der Kern von Lipoproteinen mittels Nanoteilchen markiert werden. Die Visualisierung der Lipoproteine sollte *in vivo* an einem Mausmodell erfolgen. Die Arbeit fokussierte sich auf die Markierung triglyzerid-reicher Lipoproteine, da die erhöhte Triglyzeridkonzentration im menschlichen Blut neben erhöhtem LDL und erniedrigtem HDL einen Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose darstellen.

2.1 Lipoproteine und Lipoproteinstoffwechsel

Lipide erfüllen im Körper wichtige biologische Funktionen: Zum einen leisten Nahrungslipide einen Beitrag zum Energiehaushalt, zum anderen sind sie Vorstufen von Hormonen, Hauptbestandteil biologischer Membranen, thermische Isolatoren für Organe und Organismen und dienen dem Körper als Signalmoleküle. Zu den Lipiden zählen die Glyco- und Phospholipide, Triglyceride und das Cholesterol, sowie als eigene Klasse die lipidlöslichen Vitamine A, D, E und K (Kostner et al., 2007).

Da Lipide wasserunlöslich sind, müssen sie im wässrigen Blut entweder an Einzelmoleküle gebunden werden (z.B. Steroidhormone an das sexualhormonbindende Protein, SHBP) oder in Lipoproteinen transportiert werden. Lipoproteine sind mizellare Komplexe, die aus amphiphilen und hydrophoben Lipiden und Proteinen bestehen. Die hydrophoben Bestandteile, wie Cholesterinester (CE) und Triglyceride (TG), befinden sich im Kern des kugelförmigen Lipoproteins. Die Hülle des Lipoproteins, bestehend aus Apolipoproteinen und amphiphilen Lipiden wie Phospholipiden, ist nach außen hin polar und gewährleistet so die Wasserlöslichkeit. Die in die Hülle eingelagerten Apolipoproteine stabilisieren zum einen die Lipoproteine, zum anderen vermitteln sie durch verschiedene Enzym- bzw. Rezeptorinteraktionen die Verstoffwechselung des jeweiligen Lipoproteins.

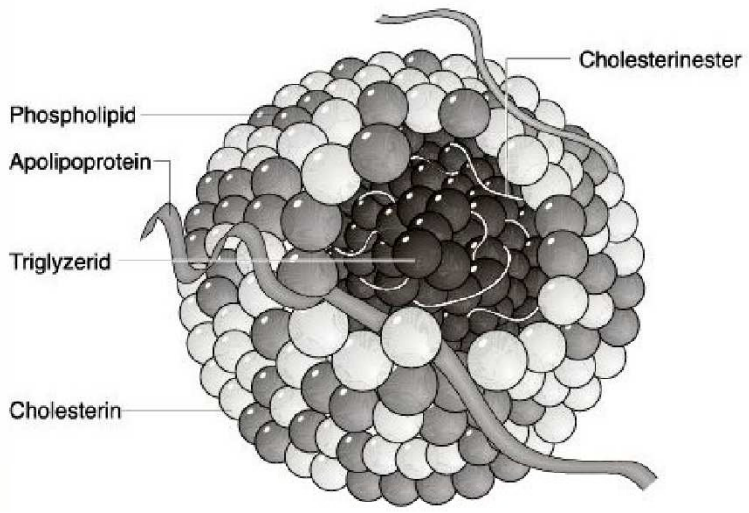


Abbildung 1: Klassischer Aufbau eines Lipoproteins mit Cholesterin, Phospholipiden und Apolipolipoproteinen als Teile der amphiphatischen Oberfläche sowie Triglyzeride und Cholesterinester als hydrophobe Kernbestandteile. Abbildung modifiziert nach (Kostner et al, 2007)

Lipoproteine werden in fünf Klassen unterteilt, die in ihrer Größe und Dichte variieren: Chylomikronen, Very Low Density Lipoproteine (VLDL), Intermediate Density Lipoproteine (IDL), Low Density Lipoproteine (LDL) und die High Density Lipoproteine (HDL). Mithilfe eines Dichtegradienten lassen sich die Lipoproteinklassen mittels Ultrazentrifugation auftrennen (s. Material und Methodenteil). Tabelle 1 zeigt die physikalischen und chemischen Eigenschaften der einzelnen Lipoproteinklassen.

Lipoproteinklasse	Dichte (g/cm^3)	Durchmesser (nm)	Chol (%)	PL (%)	TG (%)	CE (%)
Chylomikronen	0,93	75-1200	2	7	86	3
VLDL	0,93-1,006	30-80	7	18	55	12
IDL	1,006-1,019	25-35	9	19	23	29
LDL	1,019-1,063	18-25	8	22	6	42
HDL	1,063-1,21	5-12	5	5-33	0-5	0-17

Tabelle 1: Chemische Zusammensetzung der Lipoproteinklassen nach (Havel und Kane, 2001).

Die hüllständigen amphiphilen Apolipoproteine der ApoA-Familie, und der ApoC-Familie sowie das ApoE sind als amphiphatische α-Helixstruktur strukturiert (Segrest et al., 1974) und können intravaskulär zwischen verschiedenen Lipoproteinklassen ausgetauscht werden. ApoB100 und ApoB48 sind hingegen mit ihrer β-Faltblattstruktur fest mit den Lipidkomponenten verbunden und können somit nicht zwischen den Lipoproteinen ausgetauscht werden. ApoB48 entsteht durch RNA-Editing aus demselben Gen wie ApoB100 (Anant und Davidson, 2001). Beim Menschen wird das ApoB48 nur im Dünndarm synthetisiert; während in der Leber das ApoB100 vorkommt.

Der Stoffwechsel der Lipoproteine lässt sich in den exogenen und den endogenen Lipidstoffwechsel sowie den reversen Cholesteroltransport gliedern.

Der exogene, postprandiale Weg transportiert die Nahrungslipide vom Darm zu den Geweben, während die körpereigenen Lipide aus der Leber im endogenen Weg zu extrahepatischen Geweben für die weitere Verwertung gelangen.

Postprandial werden Nahrungslipide nach der Resorption in der Dünndarmmukosa zusammen mit ApoB48 und Phospholipiden in TG-reiche Chylomikronen verpackt und in die Lymphe sezerniert. Über den Ductus thoracicus gelangen die Chylomikronen in den Angulus venosus und werden somit in den Blutkreislauf überführt.

Die ebenfalls TG-reichen VLDL werden zusammen mit ApoB100 von der Leber für den endogenen Weg in die Blutbahn sezerniert. Die VLDL und die Chylomikronen

haben nun Kontakt zur endothelständigen Lipoproteinlipase (LpL), die u.a. in Skelettmuskel, Herzmuskel- und Fettgewebe exprimiert wird. Unter Anwesenheit des Kofaktors ApoCII werden die Triglyzeride der VLDL und der Chylomikronen hydrolysiert. Die dabei entstehenden freien Fettsäuren dienen dem Energiegewinn oder sie werden gespeichert. Durch diesen Vorgang werden die Chylomikronen zu den TG-armen Chylomikronenremnants (CR), die VLDL über IDL letztlich zu den TG- armen Low Density Lipoproteins (LDL). Erst durch die Lipolyse sind die so entstehenden CR klein genug, um durch das fenestrierte Endothel der Leber in den Disse-Raum zu gelangen und dort initial an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) zu binden.

Weil der Carboxy-Terminus des ApoB48 am CR fehlt, können diese nicht an den LDL-Rezeptor (LDLR) binden. Erst nach Anreicherung von ApoE aus den HDL und der nach der Hydrolyse auf den Remnants verbleibenden LpL können sie über das LDL-Rezeptor-related Protein (LRP1) und den LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen werden (Martins et al., 2000; Heeren et al., 2002). Die ApoB100-haltigen cholesterolreichen LDL binden hingegen an den LDLR, dessen Defekt zur familiären Hypercholesterinämie führt (Kostner et al., 2007).

Der LDLR wurde von Goldstein und Brown charakterisiert, die für die Aufklärung seiner Regulation und Funktion 1985 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden. Der LDLR ist gleichzeitig Namensgeber für die Lipoproteinrezeptorfamilie, die in vielen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert werden. Neben dem LDLR, dem Megalin, dem VLDL-Rezeptor, dem ApoE-Rezeptor 2 und dem Multiple Epidermal Growth Factor repeat containing protein 7 gilt das LDL-Rezeptor-related-Protein (LRP1) (siehe Abbildung 2) als eines der wichtigsten Vertreter dieser Familie.

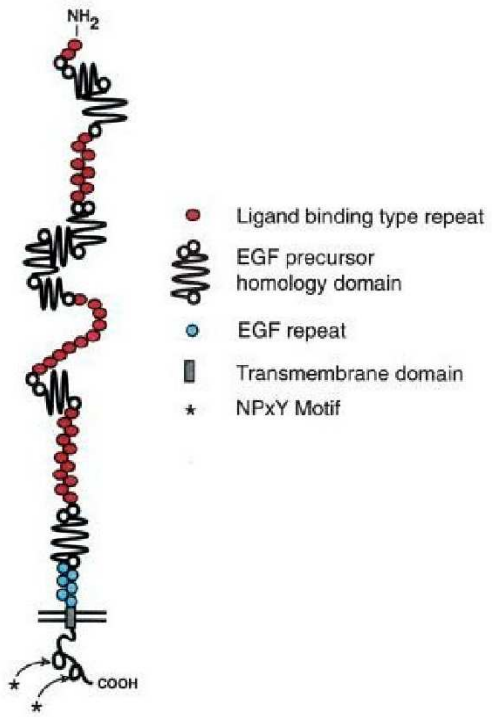


Abbildung 2: Das Low Density Lipoprotein -Rezeptor-related Protein (LRP1) ist mit 600kDa eines der größten Membranproteine. Abbildung nach (May and Herz, 2003).

Das LRP1 übernimmt diverse Funktionen im Körper. Zum einen ist es zusammen mit dem LDL-Rezeptor verantwortlich für die rezeptorvermittelte, insulininduzierbare Endozytose von CR (Beisiegel et al., 1989; Beisiegel et al., 1991; Martins et al., 2000; Laatsch, 2008). Zum anderen greift es so in die embryonale Entwicklung ein, dass LRP1 defiziente Mäuse bereits sehr früh während der Embryogenese versterben (Herz et al., 2001). Weiterhin hat LRP1 mehr als 30 identifizierte Liganden und ist so unter anderem an der Alzheimer-Demenz, der Hirnentwicklung und maßgeblich bei atherosklerotischen Prozessen beteiligt. Da der homozygote Knockout in Mäusen früh zur Letalität führt, ist nur ein gewebespezifischer Knockout im adulten Organismus zu erforschen.

Essentiell für den reversen Cholesterintransport, also dem Transport von Cholesterin aus den peripheren Geweben zur Leber hin, ist das High Density Lipoprotein (HDL). Die Leber ist das einzige Organ, das Cholesterol und Gallensäuren, die aus Cholesterol synthetisiert werden, über die Galle ausscheiden kann. Außerdem besitzt die Leber die Fähigkeit zur Synthese von Steroidhormonen, Lipoproteinen, Gallensäuren und Vitamin D, bei denen Cholesterin den Ausgangspunkt der Synthese darstellt (von Eckardstein et

al., 2001). Somit muss das überschüssige Cholesterin aus den peripheren Zellen zur Leber gelangen. Der Stoffwechsel der für diesen Prozess notwendigen HDL ist sehr komplex. Zunächst entstehen Vorläufer-HDL, welche lipidarm oder –frei sind, die jedoch im weiteren Prozess mit Phospholipiden und Cholesterol beladen werden. Eine Schlüsselrolle nimmt hierbei der ATP-Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) ein (Bodzioch et al., 1999; Rust et al., 1999; Oram et al., 2000). Im weiteren Transport erfolgt die Veresterung des Cholesterols durch die Lecithin:Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT) (Glomset et al., 1968). Das veresterte Cholesterol der HDL wird mithilfe des Cholesterol Ester Transfer Protein (CETP) auf die ApoB100 haltigen Lipoproteine (VLDL, LDL, IDL) übertragen. Die CE werden dann von der Leber aus der Zirkulation entfernt.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit Apolipoprotein E defiziente Mäuse in einigen Experimenten verwendet wurden, soll die Rolle des ApoE im Fettstoffwechsel im Folgenden weiter erläutert werden. Das ApoE ist in den CR, den VLDL und IDL, sowie den HDL zu finden. Dem hauptsächlich hepatisch exprimierten ApoE schreibt man auch Funktionen zu, die unabhängig vom Lipoproteinstoffwechsel sind, bspw. findet sich ein Unterschied in der Adipozytendifferenzierung in ApoE-Knockout Mäusen gegenüber den Wildtypen. Wie bereits erwähnt vermittelt Apo E die CR Aufnahme in die Leber durch Bindung an den LDLR und LRP. Im humanen Plasma findet man mehrere Isoformen des Apolipoprotein E, von denen E2, E3 und E4 die Hauptformen darstellen. Das ApoE2 bindet den LDLR im Vergleich zum ApoE3 kaum. Im lebenden Organismus bedeutet dies eine verlangsamte Aufnahme von CR und VLDL-Remnants in die Leber. Durch die so verursachte Verminderung der Cholesterolaufnahme in die Leber wird der LDLR hoch reguliert und dies führt zusammen mit einer verminderten LDL-Produktion zu einem Absenken der LDL-Konzentration. ApoE2 gilt somit eher als kardioprotektiv. Bei einem kleinen Teil der ApoE 2/2-Träger kommt es aber zu einer Typ III Hyperlipoproteinämie (Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie). Die ApoE4 Homozygotie korreliert mit dem Risiko eine Alzheimer-Demenz zu entwickeln und ist mit einem hohen LDL-Cholesterin assoziiert (Corder et al., 1993).

Störungen des Lipoproteinstoffwechsels haben diverse pathophysiologische Folgen für den Organismus. Die bedeutsamste Störung führt zur Entstehung der Atherosklerose,

deren Folgen für das Herz-Kreislauf-System in den Industrieländern die häufigste Todesursache darstellt.

Um den Lipoproteinstoffwechsel zu untersuchen werden Fluoreszenzmarkierungen eingesetzt, die aus organischen Farbstoffen bestehen und somit durch schnelles Ausbleichen und breite Emissionsspektren in der biologischen Anwendung stark limitiert sind. Die neuartige Methodik der Verwendung von fluoreszierenden Nanoteilchen als Marker für Lipoproteine ist vielversprechend. Durch die hohe Photostabilität ermöglicht sie ein langes und durch das schmale Emissionsspektrum gezieltes Visualisieren des Lipoproteinstoffwechsels, da es nicht durch Autofluoreszenz gestört wird. In Zukunft wäre eine Übertragung dieser Methode auf Teilchen denkbar, deren diagnostische Anwendung eine Früherkennung von atherosklerotischen Plaques ermöglichen würde (Frias et al., 2007).

2.2 Nanoteilchen

Um physiologische und pathophysiologische Prozesse in einem Organismus nachzuverfolgen, finden diverse Markierungssubstanzen, wie radioaktive Isotope, magnetische Substanzen und chemische Elemente mit einer hohen Elektronendichte, ihre Anwendung. Routinemäßigen Einsatz haben diese Markierungen in bildgebenden Verfahren wie der Szintigraphie, der Positronenemissionstomographie (PET), der Magnetresonanztomographie (MRT), der Computertomographie (CT) und dem Röntgen, die im Folgenden zusammenfassend als „Bioimaging“ bezeichnet werden. Ohne sie wäre das Verständnis physiologischer Stoffwechselzusammenhänge und die Diagnostik pathophysiologischer Zustände wesentlich schwieriger.

Zur Visualisierung einzelner Molekülgruppen ist der Einsatz von organischen Farbstoffen, wie Rhodamin oder Fluorescein, weit verbreitet. Diese werden kovalent an Proteine gekoppelt und dienen der mikroskopischen Detektion der Proteine.

Diese „konventionellen“ organischen Markierungen sind gut erforscht und ihre Interaktionen mit dem Organismus weitestgehend bekannt. Sie finden ihre routinemäßige Anwendung bspw. bei Bildgebungsverfahren wie der Fluoreszenzangiographie am Auge. Im Gegensatz zu den im Folgenden näher

beschriebenen Nanoteilchen umfassen sie zumeist keine potentiell toxischen Substanzklassen und sind zumeist von der Leber eliminierbar. In ihrer routinemäßigen Anwendung besitzen sie die Eigenschaft, unter Belichtung schnell auszubleichen und somit nicht dauerhaft detektierbar zu sein. Der Kopplungsprozess der Markierungen an einzelne Proteine muss aufgrund dieser Photosensitivität möglichst ohne Lichtexposition erfolgen und ist somit erschwert. Die organischen Markierungen absorbieren ein relativ schmales Spektrum an Wellenlängen, emittieren jedoch ein breiteres Spektrum. Dies verkompliziert die Detektion im Mikroskop der markierten Substanzen, bspw. lassen sich Hintergrundfluoreszenzen nicht klar von der Fluoreszenz der organischen Farbstoffe abgrenzen.

Physiologische Prozesse können auch mit Nanoteilchen *in vivo* dargestellt werden. Im Rahmen des Bioimaging wird die biologische Spezifität und Funktion einer biologischen Substanz mit den optischen Charakteristika eines Nanoteilchens verbunden (Michalet et al., 2005). Nanoteilchen besitzen fluoreszierende Eigenschaften, die große Vorteile gegenüber den konventionellen organischen Markierungen besitzen. Insbesondere ihre Photostabilität, ihr breites Anregungsspektrum und ihre schmales Emissionspektrum machen sie für das Bioimaging interessant.

Ein Nanoteilchen emittiert stets unabhängig von der Wellenlänge, mit der es angeregt wurde, in einem schmalen Emissionsspektrum. Die anregende Wellenlänge ist beliebig, sofern sie eine höhere Energie als die Emissionswellenlänge hat (s. Abbildung 3). Die Tatsache nur eine definierte Wellenlänge zum Anregen mehrerer Teilchen zu benötigen, die dann verschiedenartig fluoreszieren, erleichtert die Handhabung und spart Kosten. Es können somit mehrere, in verschieden Farben emittierende Teilchen in einem Experiment verwendet und sogar simultan detektiert werden (Bruchez et al., 1998). Ein weiterer Vorteil der optischen Eigenschaften von Nanoteilchen ist, dass sie mittels Filtern von Autofluoreszenzen unterschieden werden können.

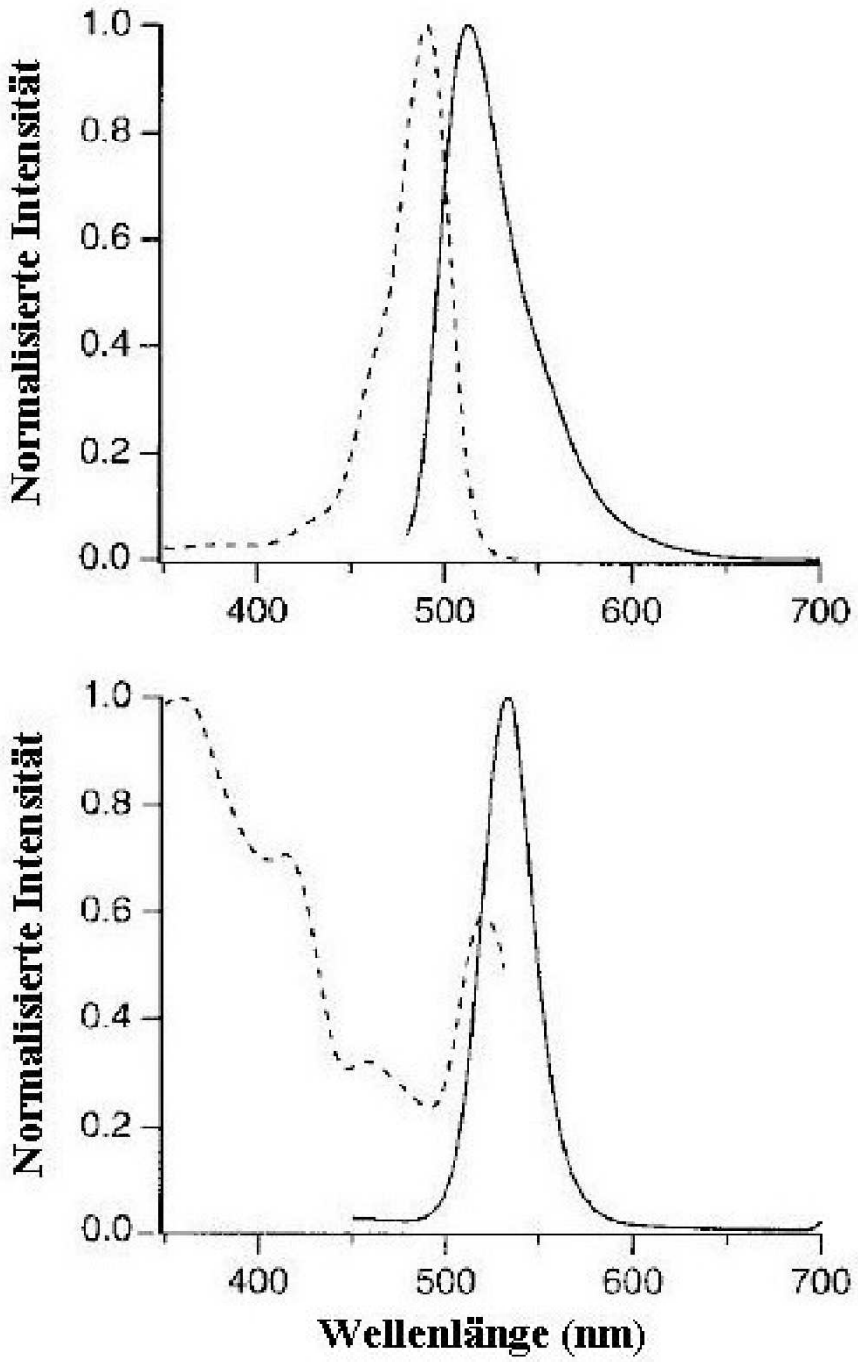


Abbildung 3: Vergleich zwischen den Absorptions- (gestrichelt) und Emissionsspektren (durchgezogene Linie) von Fluorescein als organischer Farbstoff **(oben)** und einem typisch wasserlöslichem Nanokristall **(unten)**. Die Nanoteilchen können in einem breiten Spektrum angeregt werden. Die Absorptionsenergie ist stets höher oder gleich der Emissionswellenlänge. Die organischen Farbstoffe sind nur durch ein schmales Spektrum anregbar und emittieren über ein breiteres Spektrum, nach (Bruchez et al., 1998).

Die Teilchen weisen eine hohe Photostabilität auf. Dies erlaubt im Gegensatz zu organischen Farbstoffen ein Verfolgen der markierten Substanz über einen längeren Zeitraum hinweg. Mit andauernder Belichtung unter dem Mikroskop bleicht die Hintergrundfluoreszenz aus, die Fluoreszenz der Nanoteilchen bleibt aufgrund ihrer

Photostabilität aber erhalten und eine Abbildung der markierten Substanzen ohne störende Hintergrund-Eigenfluoreszenz wird somit ermöglicht.

Nanoteilchen, die aus verschiedenen Materialien hergestellt werden können, sind kugelförmig mit einem Durchmesser von ca. 1-10 nm. QuantumDots sind aus Halbleitermaterialien bestehende Nanokristalle, die aus verschiedenen Elementen zusammengesetzt sind (Bertram und Weller, 2002). Das am besten untersuchte Material ist hierbei Cadmiumselenid (CdSe). Die Größenvariation der Teilchen spielt bei der Einstellung ihrer optischen Eigenschaften eine wichtige Rolle und wird unten näher erläutert. Die ersten Herstellungsversuche lieferten Teilchen mit nachteiligen Eigenschaften, wie z.B. eine unspezifische Bindung der Nanoteilchen. Dubertret et al. gelang es 2002 die ersten bioaktiven Nanopartikel ohne nachteilige Eigenschaften herzustellen, indem die Teilchen in Phospholipidmizellen verkapselt wurden. Eine oberflächliche Modifikation des Nanoteilchens macht es wasserlöslich und verhindert eine Aggregation.

Abbildung 4 zeigt das Energiespektrum eines Nanoteilchens, das zwischen dem eines Moleküls und dem eines Festkörpers liegt (Bertram und Weller, 2002).

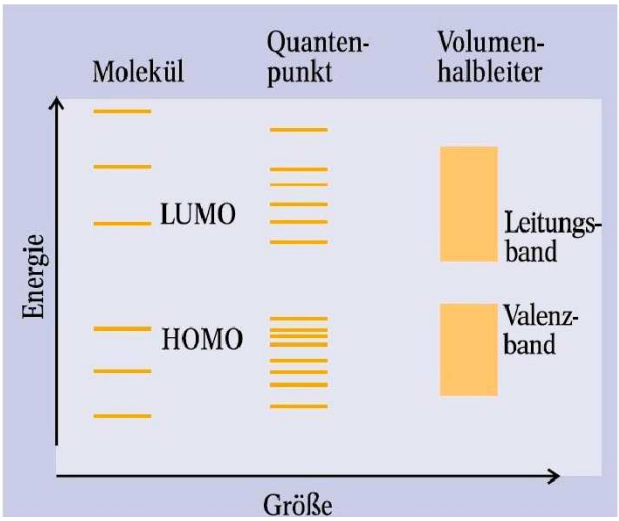


Abbildung 4: Das Energiespektrum eines Nanoteilchens **(Mitte)** liegt zwischen den Spektren von Molekül **(links)** und Festkörper **(rechts)**. (Abkürzungen: HOMO- Highest Occupied Molecular Orbital- das höchste besetzte Orbital eines Moleküls; LUMO- Lowest Unoccupied Molecular Orbital- das niedrigst besetzte Orbital eines Moleküls) (Bertram und Weller, 2002).

Die Fluoreszenzeigenschaften der Nanoteilchen befähigen sie zur Markierung von Proteinen. Bei Anregung der Nanoteilchen durch Absorption eines Lichtquants werden Elektron-Loch-Paare, sogenannte Exitonen, erzeugt indem Elektronen aus dem Valenzband in das Leitungsband übergehen. Durch die Rekombination eines Elektron-Loch-Paars wird Licht emittiert. So lassen sich die Teilchen unter einem Lasermikroskop als fluoreszierende Partikel detektieren. Die elektrischen Eigenschaften der Teilchen und die Emissionswellenlänge sind von der Bandlückengröße abhängig. Zudem ist die Bandlückengröße direkt von der Größe des Nanoteilchens abhängig (Größenquantifizierungseffekt). Die Bandlücke zwischen Valenz- und Leitungsband nimmt mit kleiner werdender Partikelgröße zu. Teilchen, die grün emittieren, sind also kleiner als rot emittierende Teilchen.

Somit sind die optischen Eigenschaften der Teilchen, wie z.B. die Fluoreszenzeigenschaft, durch die Teilchengröße einstellbar (s. Abbildung 5).

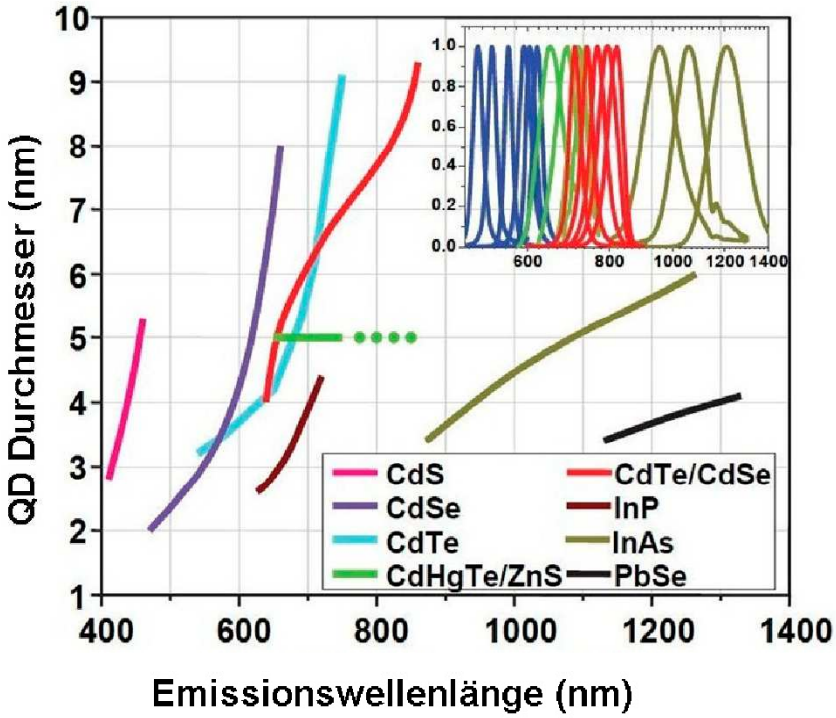


Abbildung 5: Emissionsmaxima und –größen in Nanoteilchen verschiedener Materialien. Abkürzungen: CdS: Cadmiumsulfid; CdSe-Cadmiumselenid; CdTe-Cadmiumtellurid; CdTe/CdSe- Cadmiumtellurid/Cadmiumselenid; CdHgTe/ZnS-Cadmiumsilbertellurid/Zinksulfid; InP-Indiumphophid; InAs-Indiumarsenid; PbSe-Bleiselenid; QD-Quantumdot. Nach (Michalet et al., 2005).

Beispielhafte Anwendung findet die Nanotechnologie in der Markierung von Zellstrukturen wie dem Zytoskelett und verschiedenen Organellen. Diese Markierung kann simultan durch den Einsatz verschieden farbiger Nanoteilchen erfolgen. Im Jahr 2004 beschrieben Kim et al. den Einsatz von Nanoteilchen zur Identifizierung des Wächter-Lymphknotens (Ballou et al., 2003; Kim et al., 2004). Ballou et al. (2003) untersuchten ein nicht-invasives Bildgebungsverfahren im Mausmodell und diskutieren dies als potentiell wertvoll im Rahmen einer Tumordetektion und des Tumorimaging während eines operativen Eingriffs. Trotz der großen Fortschritte, die innerhalb der letzten Jahre im Bereich der Nanotechnologie erzielt wurden, stellt der Einsatz von Nanoteilchen noch keine Routine dar.

Neben der Anwendung von Nanoteilchen als Markierungssubstanz in Biologie und Medizin, rückt ihre toxische Komponente zunehmend in den Fokus der Forschung und der Öffentlichkeit (Schmundt und Verbeet, 2008 / Focus in Nature Nanotechnology). Die klinische Applikation der Partikel wird durch deren Toxizität limitiert. Entweder sind die Schwermetall enthaltenden Teilchen aufgrund ihrer chemischen Komposition als potentiell toxisch zu betrachten, oder ihre Eigenschaften als Teilchen in der nano-Größe bewirken die Toxizität. Z.B. beschreiben Derfus et al. (2003) die akute Hepatotoxizität und die längerfristige Hepato- und Nephrotoxizität von Cadmium.

2.3 Markierung von Lipoproteinen mit Nanoteilchen

Die in dieser Arbeit angewendete Visualisierung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels greift auf Lipidmarkierungen zurück, die fluoreszierende Eigenschaften besitzen. Im Allgemeinen lassen sich Lipoproteine an ihrem Proteinanteil oder an ihrer Lipidphase markieren. Der Proteinanteil der Lipoproteine wird durch kovalente Kopplung des Aminosäure-Rests an die funktionelle Gruppe des Nanoteilchens markiert. Auch organische Markierungen werden über Ester und Amidbindungen an Proteine gekoppelt, können somit jedoch enzymatisch abgebaut und in der Folge renal ausgeschieden werden. Physiologische Prozesse können so nur eingeschränkt verfolgt werden. Die Lipidmarkierung von Lipoproteinen ist mit Nanoteilchen nicht möglich (Bruns et al., 2009)

Die in dieser Arbeit angewendete Markierungsmöglichkeit greift auf die Präparation proteinfreier Lipidemulsionen aus einer physiologischen Lipidmischung zurück, die anschließend mit den fehlenden Apolipoproteine (ApoA, ApoC und ApoE) assoziiert wird (Rensen et al., 2001). In die präparierten rekombinanten Lipoproteine lassen sich hydrophobe wasserunlösliche Moleküle einbringen. Redgrave et al. (1985, 1993) konnten zeigen, dass bei *in vivo* Studien eine Assoziation der Apolipoproteine an die Lipidemulsion nicht notwendig ist, da sich diese nach intravenöser Injektion in den lebenden Organismus initial selbstständig assoziieren. Daher wurden in dieser Arbeit die markierten Lipidemulsionen vor der Injektion in die Maus nicht funktionalisiert.

3 Material und Methoden

Dieses Kapitel gliedert sich in einen Material- und einen Methodenteil. Im Methodenteil werden die einzelnen Schritte der experimentellen Arbeit, d.h. die Lipoproteinextraktion, die Lipidextraktion aus Lipoproteinen und die anschließende Nanosomenpräparation und deren weitere Verwendung im Mausmodell, näher erläutert. Darauffolgend wird auf die Konservierung der Mausorgane, die verschiedenen Schnitttechniken, die daran anschließenden Schnittfixierungen und Eindeckelungsverfahren, sowie die Immunfluoreszenzanwendungen eingegangen.

3.1 Material

Mit folgenden Nanoteilchen wurde gearbeitet:

CdSe/CdS/ ZnS-Kern-Schale-Schale mit Trioctylphosphin/Trioctylphosphoinoxid als Stabilisator von Marija Nikolic.

Chemikalien

Bovine Serum Albumin (BSA) Standard, 2 mg/ml	PierceBiotechn., 23209
CD 31 Purified Rat anti-mouse Antikörper (PECAM 1)	BD-Pharming, 550274
Chloroform	Merck, 1.02445.2500
Cy 2 Antikörper Goat anti Rat	Jackson, 112226003
F4/80 Antikörper Rat anti Mouse	Serotec, MCA497R
Fluoromount-G	SouthernBiotech, 0100-01
Glycin	Carl Roth, 3908.2
Ketaminhydrochlorid (Ketanest)	aniMedica, 6680307

Methanol	Merck, 1.06009.2500
Mowiol	Calbiochem, 475904
Natriumchloridlösung 0,9% (für Narkoselösung)	Braun, 6433A191
Paraformaldehyd (PFA) P6148-500	Sigma-Aldrich,
Rompun 2%	Bayer, 79164440
Sucrose	Merck, G198854702
Tissue-Tek	O.C.T., 6444A191

Lösungen

Für die Blockierungslösung (2% BSA in PBS/Glycin) zur Immunfluoreszenz wurden 1 g BSA zu 0,25 g Glycin ad 50 ml PBS gegeben.

Formalinpuffer (3,7%) erhielt man durch Beimengung von Formalin zu 0,2 M Phosphatpuffer und Aqua deminerale im Verhältnis 1:5:4.

Mowiol/PPD Eindeckelungslösung erhielt man durch Mischung von 1% PPD und Mowiol im Verhältnis 1:9.

Die Narkoselösung 1 bestand aus Ketaminhydrochlorid: 2% Rompun Injektionslösung: Natriumchlorid im Verhältnis 23:10:67.

Die Narkoselösung 2 bestand aus 8 Teilen 2% Rompun Injektionslösung, 12 Teilen Ketanest und 80 Teilen Natriumchlorid.

Phosphate buffered Saline (PBS) bestand aus 400 g Natriumchlorid, 10 g Kaliumchlorid, 10 g Kaliumdihydrogenphosphat und 10 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ad 5 l Aqua dest.

0,2 M Phosphatpuffer mit einem pH von 7,2-7,4 erhielt man durch Zugabe von 2840 Teilen Na_2HPO_4 x $2H_2O$ mit 276 Teilen NaH_2PO_4 x H_2O.

Spritzenfilter

Millex-HV 0,45 µm PVDF 4 mm, Millipore, SLHV004SL

Histologisches Zubehör

Tissue-Tek Cryomold, Sakura Finetek, 62534-25

DakoPen, Dako Deutschland S2002

HistoBond Adhäsionsobjektträger 8037/1

Geräte

Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop – LSM 510 Meta, Zeiss

Inverses-Fluoreszenz-Mikroskop – Axiovert 100, Zeiss

Microm HM 560

Mäuse

Wildtypmäuse (FVB Hintergrund)

ApoE -/- Mäuse (FVB Hintergrund)

3.2 Methoden

Zur in vivo Darstellung des postprandialen Lipoproteinstoffwechsels wurden Lipoproteine aus von einem humanen Spender isolierten Lipiden und Halbleiternanoteilchen hergestellt. Diese sogenannten Nanosomen stellen ein funktionelles Modell für postprandiale Lipoproteine dar. Die Nanosomen wurden intravenös über die Schwanzvene in eine Maus injiziert, die Maus nach einer gewissen Zirkulationszeit narkotisiert und vor der Organentnahme perfundiert. Die Organe (Leber, Milz, braunes Fettgewebe, Muskel, Niere und Herz) wurden unverzüglich gefroren und mittels Cryotom Gefrierschnitte angefertigt. So gewonnene Schnitte wurden anschließend mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mikroskopiert.

3.2.1 Extraktion von Lipoproteinen aus humanem Plasma

Gefrorenes Plasma wurde über Nacht im Kühlraum aufgetaut und mit Zugabe von Kaliumbromid (KBr) auf eine Dichte von 1,006 g/ml gebracht. Nach dem Homogenisieren der Plasma- KBr Mischung wurde die Lösung in bei 38 000 RPM und 4°C über Nacht zentrifugiert.

Am folgenden Tag wurden die flotierten Lipoproteine mithilfe eines Spatels und einer Kanüle vom Rand des Zentrifugengefäßes gelöst und im Kühlraum homogenisiert. Nachfolgend wurde ein Dichtegradient für die Abtrennung der weiteren Lipoproteinsubklassen angesetzt, wobei auf ein vorsichtiges Hinzugeben der Dichtegradienten (1,006; 1,019; 1,063 g/ml) von unten zu achten war. Erneut wurde bei 38 000 RPM und 4°C über Nacht zentrifugiert. Am Folgetag konnten die Lipoproteine mithilfe einer Kanüle abgenommen werden.

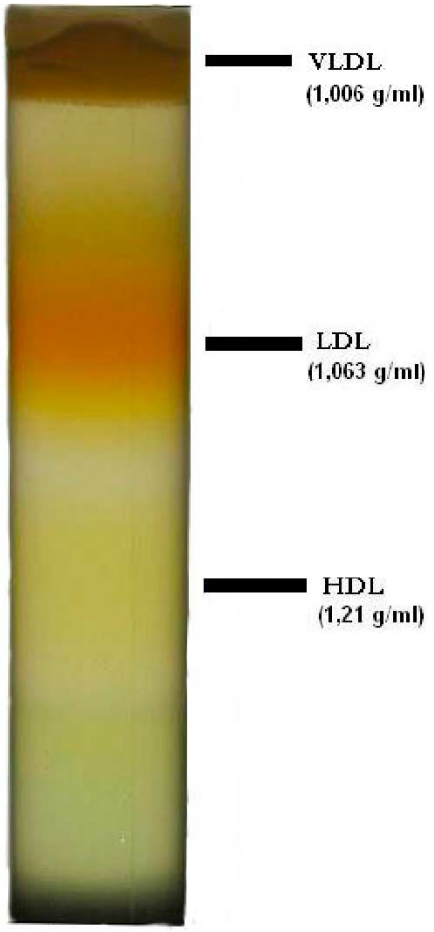


Abbildung 6: Darstellung des Dichtegradienten zur Lipoproteinaufreinigung. Die VLDL mit einer Dichte von maximal 1,006 g/ml befindet sich als oberste festere Phase zwischen 1,006 und 1,019 g/ml, die LDL (maximal 1,063 g/ml) zwischen 1,019 und 1,065 g/ml und die HDL (maximal 1,31 g/ml) als hellgelbe Phase zwischen 1,065 g/ml und einer weißlichen Phase.

3.2.2 Lipidextraktion aus Lipoproteinen

Die erstmals 1957 von Folch et al. beschriebene Methode zur Extraktion von Lipiden wurde im Rahmen dieser Arbeit modifiziert angewendet. Um 40 mg Lipide aus humanen Triglycerid-reichen-Lipoproteinen zu extrahieren, wurden 100 µl Triglycerid-reiche Lipoproteine (50 mg/ml Triglycerid-Konzentration) mit 1 ml Chloroform-Methanol-Lösung (8:5 Chloroform: Methanol Gewichtsanteile) gemischt. Diese Mischungen wurden 10 Minuten lang bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur und 18 000g zentrifugiert, um die Proteine auszufällen. Die Überstände wurden in ein Glasgefäß abgenommen, bei -20°C gelagert und standen dann zur Nanosomenpräparation zur Verfügung.

3.2.3 Herstellung von fluoreszierenden Nanosomen

Gegeben waren 40 mg Lipide in Chloroform/Methanol gelöst. Diese wurden unter einem Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit, um anschließend in ca. einem ml Chloroform aufgenommen zu werden. 90 µl S18-CdSe/CdS/ZnS-Nanoteilchen (Emission bei ca. 595 nm) wurden zum Chloroform und dem Lipid hinzu gegeben. Erneut wurde die Mischung im Stickstoffstrom von Chloroform befreit. Nach Zugabe von 4 ml 65°C heißem PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} wurde dreimal für 3 min und 20 sek sonifiziert, wobei während der Pausen bei eventuell vorhandenen Rückständen am Glas gevortext wurde. Während des Sonifizierens musste eine das anschließende Filtrieren beeinträchtigende Schaumbildung vermieden werden. So entstand eine Liposomensuspension mit ca. 10 mg Liposomen pro ml. Um Aggregatbildungen zu vermeiden, die in der Maus zur Thrombenbildung führen können, wurde die noch warme Suspension sofort im Anschluss durch einen 0,45 µl Filter filtriert. Die Nanosomen wurden für die *in vivo* Versuche stets am selben Tag der Experimente präpariert und direkt vor der Injektion erneut filtriert.

3.2.4 Mauspräparation

200 µl Nanosomen wurden in die Schwanzvene injiziert. Je nach Protokoll wurde 20, 60 oder 180 Minuten gewartet, um dann den Mäusen eine Narkoselösung (1) oder (2) sie intraperitoneal zu injizieren. Sobald die Mäuse keine Reflexe mehr zeigten, wurden sie perfundiert. Hierbei wurde nach Eröffnung des Brustkorbes die linke Herzkammer mit einer Nadel punktiert und über ein Schlauchsystem die Perfusionslösung aus ca. einem m Höhe eingeleitet. Dabei musste die untere Hohlvene aufgrund des Druckes durchtrennt werden. Als Perfusionslösungen wurden PBS mit einer 30%igen Sucroselösung verglichen. Nach Abschluss der Perfusion folgte die Entnahme von: Leber, Milz, Pankreas, Herz, Niere, Knochen (Femur), Muskel (M.quadriceps femoris), Nebenniere, Nebenhoden und braunes Fettgewebe.

3.2.5 Varianten der Organkonservierung

Es wurden verschiedene Arten der Organkonservierungen erprobt.

Gefriertechniken

Nach der Organentnahme wurde ein Teil der Organe in bleistiftdicke Röhrchen aus Aluminiumfolie, die zur Hälfte Tissue-Tek enthielten, platziert. Die gefüllten Röhrchen wurden zunächst in flüssigem Isopropanol (in Stickstoff gekühlt) eingefroren, dann mit Tissue-Tek aufgefüllt und verschlossen. Schließlich wurde alles in Stickstoff tiefgefroren.

Mit einem anderen Teil der Organe wurde wie folgt vorgegangen:

Alle größeren Organe (Niere, Pankreas, Herz, Leber, Milz, Muskel (M.quadriceps femoris), Knochen (Femur), und braunes Fettgewebe) wurden in kleinen verschließbaren Plastikbehältern in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kleineren Organe (Nebenhoden und Nebenniere) wurden in 30%iger Sucroselösung in Glasfläschen zum Absinken über Nacht bei 4°C gegeben. Am folgenden Tag wurden die kleineren Organe mit 1:1 Tissue-Tek zu 30% Sucrose in Glasfläschen für 1 Stunde im Kühlraum geschüttelt. Nach Entnahme der kleineren Organe aus der Tissue-Tek-Sucroselösung wurden diese in einer mit Tissue-Tek gefüllten Plastikblockform (Tissue-Tek® Cryomold®; Sakura Finetek) eingebettet und auf Trockeneis gefroren. Das Absinken der kleineren Organe in Sucrose ermöglichte eine festere Bindung dieser an das Tissue-Tek, was einem ungewollten Herauslösen der Organe aus der Tissue-Tek Hülle entgegenwirkte.

Große und kleine Organe wurden bei -80°C zusammen mit etwas Eis gelagert.

Fixiermethoden der Organe

Zur Stabilisierung des Gewebes wurden unterschiedliche Fixiermethoden erprobt. Paraffineinbettung, Formalinfixierung und Formalinfixierung mit vorheriger Sucroseinkubation standen im Vergleich zueinander. Mit einem Teil der Organe wurde unfixiert weiter verfahren. Bei der Beurteilung der Methoden wurde auf Erhalt der Nanosomenfluoreszenz geachtet.

Ein zweiter Teil der Organe wurde für 4 Tage in Formalin-Puffer fixiert.

Davon wurde ein Teil in 20%iger Sucroselösung über Nacht bei 4°C inkubiert, ein zweiter Teil der Organe wurde ohne Inkubation in Formalin fixiert.

Die Formalin-fixierten Organe wurden ohne Tissue-Tek in Alufolie eingewickelt und in Flüssigstickstoff schockgefroren.

Ein dritter Teil Formalin-fixierter Organe wurde in Paraffin eingeblockt. Hierzu wurde ein vollautomatisiertes Programm zur Paraffin-Einbettung (A) verwendet:

1.	3 h	Formalin-Puffer
2.	2 h	50 % Isopropanol
3.	2 h	70 % Isopropanol
4.	2 h	90 % Isopropanol
5.	2 h	90 % Isopropanol
6	2 h	90 % Isopropanol
7.	3h 30 Min	100 % Isopropanol
8.	3h 30 Min	100 % Isopropanol
9.	3h 30 Min	100 % Isopropanol
10.	4h 45 Min	Paraplast / Isopropanol 1:1
11.	3h 30 Min	Paraplast
12.	3h 30 Min	Paraplast

3.2.6 Varianten der Schnitttechnik

Cryoschnitte

Das Gewebe wurde anfänglich 3-4 Minuten in einer speziellen Halterung in Tissue-Tek auf Schneidetemperatur aufgefroren. Abhängig vom Fettgehalt einzelner Organe wurde jedes Organ mit verschiedenen Messertemperaturen aufgefroren und geschnitten. Leber, Niere und Hoden wurden zwischen 0 und -15°C, Muskel, Pankreas und Nebenniere

zwischen -15 und -30°C, Fettgewebe ab -30°C geschnitten. Je mehr Fett ein Organ enthält, desto niedriger wurde die Messertemperatur gewählt. Die Kammertemperatur wurde konstant auf -21°C gehalten. Die Schnittdicke lag zwischen 7 und 14 µm. Der Winkel des Messers zum Objekt betrug 3-4°. Der Schnitt wurde mithilfe eines beschichteten Glasobjektträgers aufgenommen und vor der weiteren Bearbeitung für mindestens drei Stunden an der Luft getrocknet. Die Schnitte auf dem Glasobjektträger wurden für kurze Zeiträume bei -20°C, für längere Zeiträume bei -80°C, gelagert.

Paraffinschnitte

Die Paraffinblöcke wurden in den Schnellspannrahmen eines Paraffinschneidegerätes eingespannt und nachfolgend geschnitten. Die Schnitte wurden in destilliertem Wasser geglättet und dann auf einen beschichteten Glasobjektträger aufgenommen. Der Glasobjektträger wurde mit dem Schnitt auf einer Wärmebank getrocknet, bevor er gefärbt oder mikroskopiert werden konnte. Die Paraffinschnitte wurden bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.7 Variation von Färbungen, Fixierungen und Eindeckelungsverfahren der Schnitte

Zur morphologisch histologischen Darstellung der Gewebe wurden verschiedene Färbungen an den Schnitten erprobt:

Für die Hämalaunfärbung wurden die Schnitte zunächst in einem Objektträgergestell für 5 Minuten unter destilliertes Wasser gehalten. Danach wurde das Objektträgergestell 5-10 Sekunden in Hämalaun inkubiert und nochmals in destilliertes Wasser getaucht. Abschließend wurden die Objektträger für 10 Minuten vorsichtig unter fließendes Leitungswasser gehalten.

Die mit Hämalaun gefärbten Schnitte wurden mit PBS/Glycin (4:1) eingedeckelt.

Bei einigen Schnitten wurde eine DNA-Färbung mit ca. 5 µM DAPI in PBS durchgeführt., Das DAPI wirkte ca. 3 min ein und wurde dann mit gefiltertem PBS zweimal für 5 min ausgewaschen.

Die Fixiermedien wurden variiert:

Ein Teil der Schnitte wurde nicht fixiert und nur mit gefilterten PBS feucht gehalten.

Ein anderer Teil der Schnitte wurde mit Methanol fixiert. Hierzu wurden die Objektträger auf Eis gelegt und mit gekühltem Methanol ca. 2-3 Minuten bedeckt; anschließend wurde mindestens 3-mal mit gefilterten PBS gespült.

Ein weiterer Teil der Schnitte wurde mit PFA fixiert. Hierzu wurden die Schnitte in 4%igem PFA/PBS für 30 Minuten inkubiert und anschließend 5-mal mit gefilterten PBS gewaschen.

Ein letzter Teil der Schnitte wurde mit PFA und Methanol fixiert, wobei die Verfahren der PFA-Fixierung und der Methanolfixierung kombiniert wurden.

Diverse Eindeckelungsmedien wurden ausprobiert:

Hierzu wurden wenige Tropfen des Eindeckelungsmediums auf den Objektträger platziert und das Deckgläschen langsam vom Rand des Schnittes entlang des Mediums auf den Schnitt gleiten gelassen. Die Schnitte wurden mit Fluoromount, Mowiol, Mowiol/PPD und PBS/Glycin (4:1) eingedeckelt.

3.2.8 Immunfluoreszenz

Indirekte Immunfluoreszenz, eine Methode, die Proteine mit bestimmten Antikörpern anfärbt, sollte Aufschluss über die genaue Lokalisation der Nanosomen innerhalb eines Gewebes geben. Durch Antikörperanwendung (Zwei-Schritt-Methode) sollten Zellkomponenten angefärbt werden und so eventuelle Überlappungen mit Nanosomen unter dem Mikroskop festgestellt werden. Insbesondere wurde Augenmerk auf die

Nanosomenlokalisation in der Leber gelegt. Die Immunfluoreszenz wurde ausschließlich an Cryoschnitten angewendet.

Vor Anwendung der Antikörper wurden die Schnitte mit einem DakoPen umrandet. Dieser bildete eine Barriere um den Schnitt und half somit Antikörper einzusparen und gewährleistete eine uniforme immunhistochemische Färbung. Mit je ca. 1000 µl 2% BSA pro Objektträger wurde der Schnitt für 30 Minuten bei 37°C durch unspezifische Bindung des BSA in PBS/Glycin blockiert. Danach wurde für eine Stunde bei 37°C mit je 50 µl des ersten Antikörpers in Blockierlösung inkubiert, zweimal mit Blockierlösung gewaschen und analog für 45 Minuten mit fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde 5-mal für 5 Minuten mit gefilterten PBS gewaschen.

Als primärer Antikörper zur Darstellung des Endothels diente der Endothelmarker CD31. Als zweiter Antikörper diente der organische Cy2 Farbstoff, der sich spezifisch an den ersten Antikörper bindet und grün fluoresziert.

3.2.9 Mikroskopie

Mikroskopiert wurde an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM510, Zeiss), sowie an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss).

Als Software wurde MacBiophotonics ImageJ, sowie AxioVision Rel. 4.7 verwendet. Bilder wurden mittels einer Digitalkamera aufgenommen. Außerdem wurden am konfokalen Mikroskop mithilfe von LSM Software Z-Stacks erstellt, durch die dreidimmensionale Bilder entstanden.

3.2.10 Messung des Cadmiums mittels Atom Absorptions-Spektroskopie

Um die aufgenommene Menge an Nanoteilchen in die unterschiedlichen Organe quantitativ zu bestimmen, wurde mittels Atom Absorptions-Spektroskopie (AAS) deren Gehalt an Cadmium gemessen. Dazu wurden die Nanoteilchen zunächst chemisch aufgeschlossen. Der natürliche Hintergrund an Cadmium (aufgenommen z.B. über die Nahrung) konnte für jedes Organ separat durch die Vermessung einer nicht injizierten Kontrollmaus bestimmt werden. Um Verunreinigungen durch verwendete Lösungen oder Materialien ausschließen zu können, wurde stets eine Kontrolle ohne Organ ebenfalls sämtlichen Arbeitsschritten unterzogen und in der AAS vermessen.

Zunächst wurden bis zu 200 mg des jeweiligen Organs eingewogen, mit 500 µL HNO_3 (65 %) versetzt und in ein Reagenzglas überführt. Nach Spülen der Gefäßwände mit weiteren 500 µL HNO_3 wurden die Ansätze im Wasserbad auf 60 °C erhitzt. Dann wurden 100 µL H_2O_2 (30 %) zugegeben und es musste die anfängliche Schaumbildung abgewartet werden. Im Anschluss wurde die Temperatur für weitere 30 Minuten auf 80 °C erhöht. Zu diesem Zeitpunkt waren sämtliche Organe vollständig aufgelöst. Die Ansätze wurden zum Auskühlen aus dem Wasserbad entnommen und in verschließbare Gefäße überführt. Nach zweimaligen Spülen des Reagenzglases mit je 800 µL H_2O wurden Ansätze und Spüllösungen vereinigt und mit H_2O auf 3 mL aufgefüllt. Diese Lösungen dienten als Proben für die anschließende Cadmiumbestimmung.

Sämtliche Arbeiten, mit Ausnahme des Einwiegens, erfolgten unter einem Abzug.

Die Cadmiummessung erfolgte mit einem Atom Absorptions-Spektrometer des Typs 2100 Atomic Absorption Spectrophotometer von Perkin Elmer nach dem Verfahren der *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy* (GFAA). Es kam hierbei eine Cd-Hohlkathoden-Lampe (Photron Lamps, P908) zum Einsatz. Die Messung wurde mit den in der zugehörigen Geräte-Software AA Winlab (Perkin Elmer, Version 3.52) für Cadmium empfohlenen Einstellungen des Herstellers durchgeführt.

Sämtliche Proben wurden, mit Ausnahme von Milz- und Leberproben, mit Matrix-Lösung (0.02 M HNO_3 und 1 % Triton-X 100) 1:5 verdünnt. Milzproben wurden 1:10, Leberproben 1:20 verdünnt vermessen. Je 20 µL dieser Verdünnungen wurden vom Pipettierarm des Geräts in die Graphit-Röhre überführt. Nach der Zugabe der Modifikatoren (5 µL $Mg(NO_3)_2$-Lösung [1000 mg/L] und 5 µL $Pd(NO_3)_2$-Lösung [1000 mg/L]), die u.a. die Flüchtigkeit von Cadmium verringern, unterzog das Spektrometer die Probe dem in Tabelle 2 dargestellten Temperaturprogramm. Zur Untergrundkompensation wurde eine Deuterium-Bogenentladungslampe eingesetzt und die so simultan erhaltene Untergrundmessung von der Software mit dem Messwert der Probe verrechnet. Weiterhin führte die Software eine automatische Baseline Offset Correction (BOC) durch. Die Quantifizierung erfolgte anhand von Standardproben bekannter Konzentration. Zur Kontrolle der Sauberkeit von Gerät und Reagenzien wurden vor und während der Probenvermessung Kontrollmessungen reiner

Matrixlösung, lediglich versetzt mit den beiden Modifikatoren, durchgeführt. So konnten auch Verschleppungen von Probe zu Probe ausgeschlossen werden.

Dauer	Temperatur	Argongasstrom	Anmerkung
30 s	110 °C	an	Trocknung der Probe
30 s	130 °C	an	Weitere Trocknung der Probe (Entfernung von Kristallwasser)
45 s	850 °C	an	Pyrolyse
5 s	1650 °C	aus	Atomisierung und Messung der Absorption
5 s	2600 °C	an	Ausbrennen der Graphitröhre

Tabelle 2: Temperaturprogramm des Atom Absorptions-Spektrometers

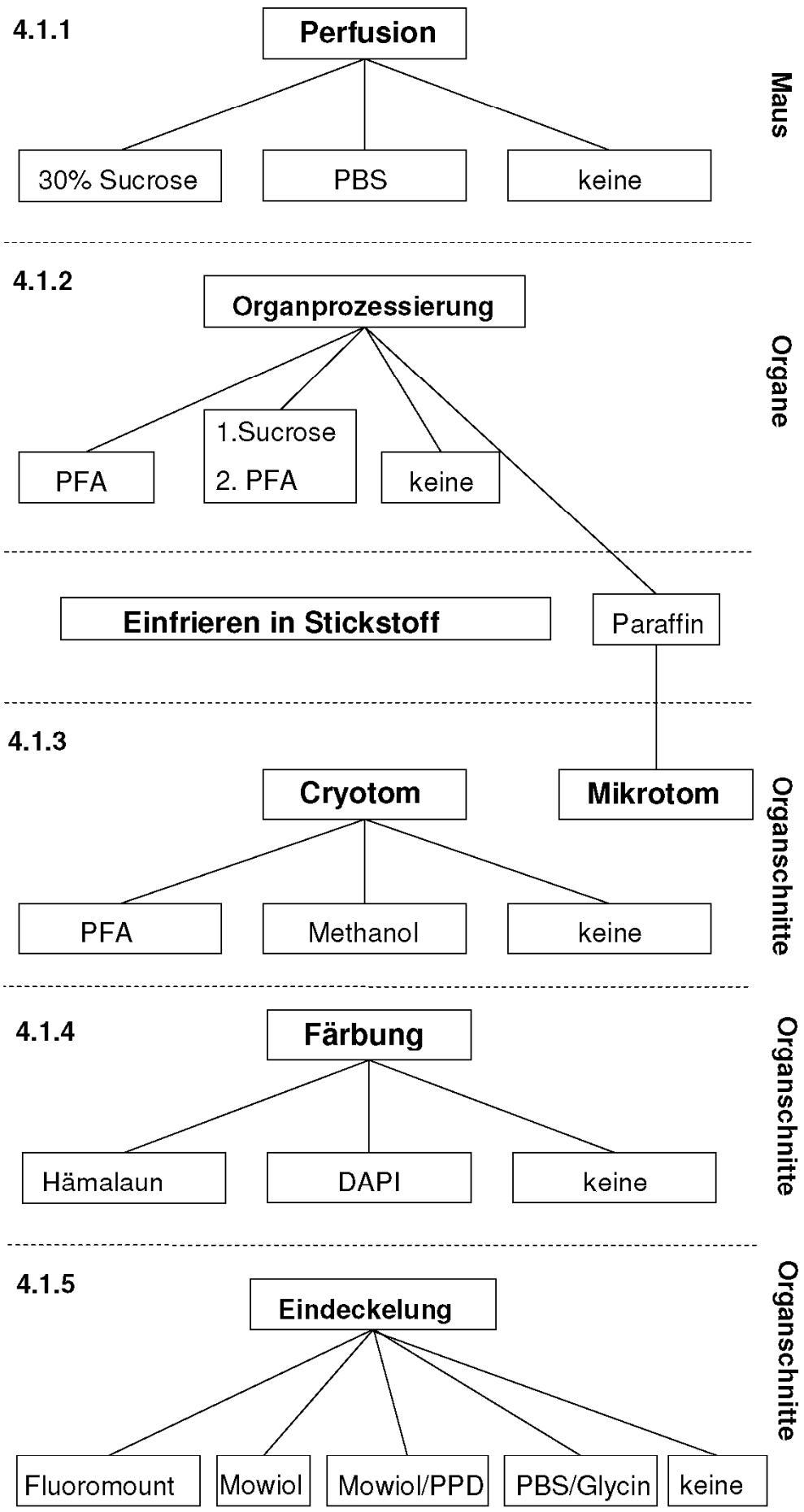
Die Atmoabsorptionspektrometrie wurde an den Organen von vier Mäusen angewendet. Zwei Mäuse stammten aus einer Wildtyplinie, die zwei anderen hatten einen Apolipoprotein E- knockout (ApoE-ko)-Hintergrund. Eine weitere Variabel waren die Zeitpunkte der Perfusion nach Nanosomeninjektion: Eine Maus mit Wildtyphintergrund und eine Maus aus dem ApoE-ko-Hintergrund wurden 20 Minuten (20') nach Nanosomeninjektion perfundiert, das andere genetisch differente Paar wurde 180 Minuten (180') nach Nanosomeninjektion perfundiert.

4 Ergebnisse

Dieses Kapitel ist in vier Abschnitte aufgeteilt. Der erste Teil befasst sich mit der Entwicklung einer geeigneten histologischen Technik für fluoreszierende Nanoteilchen. Der zweite Teil schildert die Vor- und Nachteile der konventionellen und konfokalen Mikroskopie, sowie die durch die Mikroskopie bestätigten Nanosomeneigenschaften. Im dritten Teil werden die Ergebnisse der Nanosomenaufnahme in die Organe und die zytohistologische Betrachtung mittels Immunfluoreszenz aufgeführt. Der letzte Teil beschreibt die durch die Atom Absorptions-Spektroskopie gemessene quantitative Organverteilung der Nanosomen.

4.1 Entwicklung einer histologischen Methode zur Anwendung von fluoreszierenden Nanoteilchen als Marker für Lipoproteine

Die histologische Technik zur *in vivo* Anwendung der Nanoteilchen als Marker für Lipoproteine sollte zu Anfang der Arbeit optimiert werden. Es wurde insbesondere auf den Erhalt der Nanosomenfluoreszenz geachtet. Dem Gewebeerhalt wurde außerdem besondere Wichtigkeit beigemessen. Schnitte von in Paraffin eingebetteten Organen wurden als histologisch besonders gut erhalten erachtet und als Vergleich hinzugezogen. Die folgende Übersicht zeigt die Variation einzelner histologischen Techniken, die zu Anfang dieser Arbeit vorgenommen wurde. Die einzelnen Techniken, die auf Mausebene begannen und über die Organebene zu den Organschnitten führten, werden in den Unterkapiteln näher erläutert.


4.1.1
Perfusion
30% Sucrose
PBS
keine
Maus
4.1.2
Organprozessierung
PFA
1.Sucrose
2. PFA
keine
Organe
Einfrieren in Stickstoff
Paraffin
4.1.3
Cryotom
Mikrotom
PFA
Methanol
keine
Organschnitte
4.1.4
Färbung
Hämalaun
DAPI
keine
Organschnitte
4.1.5
Eindeckelung
Fluoromount
Mowiol
Mowiol/PPD
PBS/Glycin
keine
Organschnitte

4.1.1 Perfusion der Maus

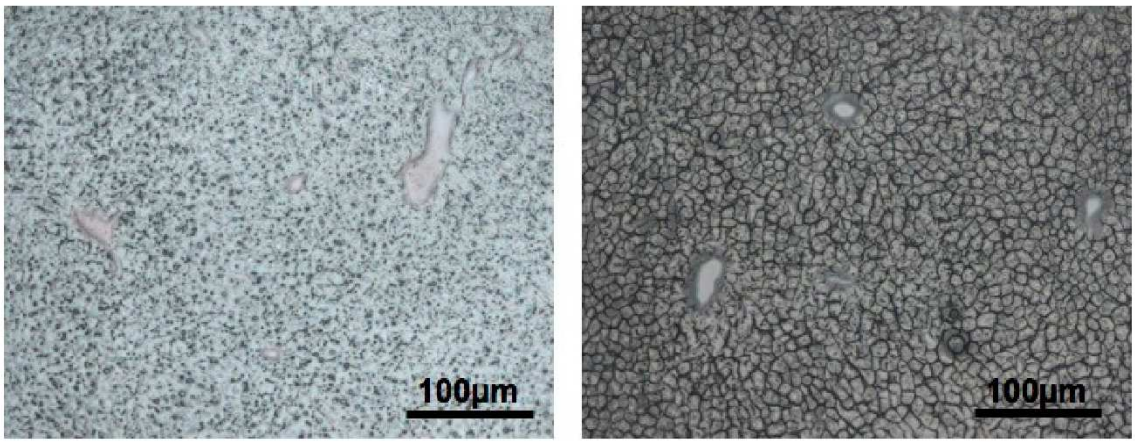


Abbildung 7: 7µm dicker Cryoschnitt einer mit PBS (**links**) und mit Zucker (**rechts**) perfundierten Leber. Das Bild wurde im Transmissionslicht in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt.

Der erste Schritt zur Etablierung einer geeigneten Histologischen Technik war die Variation des Perfusionsmittels. Die Perfusion, also das Durchströmen einer Flüssigkeit durch die Organe der Maus, sollte zu einer verbesserten Organhistologie führen. Als Perfusionsmittel wurden eine 30%ige Sucroselösung, die als Cryoprotektion dienen sollte, und PBS miteinander verglichen. In den Organschnitten der Sucrose verschieden perfundierte Mäuse zeigten sich nur minimale Unterschiede. Beide Medien verbesserten den histologischen Erhalt der Gefäßstrukturen sowie der Lebersinusoide. Die mit Sucrose perfundierten Organe ließen sich schwerer schneiden und die Organschitte waren mikroskopisch betrachtet kontraststärker als die mit PBS perfundierten Organschnitte. PBS hatte jedoch den Vorteil, die Perfusionsanlage nicht zu verkleben und wurde somit bevorzugt.

4.1.2 Organprozessierung

Hinsichtlich der Fixierung der Cryoschnitte wurden verschiedene Abläufe miteinander verglichen. Zum einen wurden die Organe mit verschiedenen Fixiermedien behandelt, zum anderen wurden die Fixiermedien der Schnitte der zunächst unfixierten Organe variiert. Je nachdem ob die Organe im Ganzen direkt nach der Entnahme aus der Maus fixiert wurden, oder erst die Schnitte der unfixierten Organe fixiert wurden, ergaben sich Unterschiede hinsichtlich der Nanosomenfluoreszenz, und der Gewebequalität.

Variation der Organfixierung

Als Fixiermedien für die Organe wurden Cryoschnitte von in Formalin inkubierten Organen, von über Nacht in Sucrose abgesunkene und dann in Formalin fixierten Organe und von in Paraffin eingebetteten Organe miteinander verglichen.

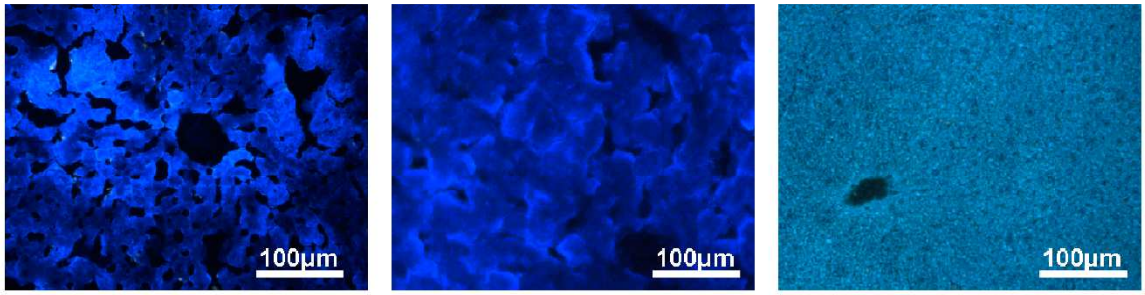


Abbildung 8: Drei Lebern, die direkt nach der Entnahme unterschiedlich fixiert und in 7µm Cryo (links und Mitte), bzw. Paraffin (rechts) geschnitten wurden. **Links**: Ausschließlich in Formalin fixierte Leber. **Mitte**: Über Nacht in Sucrose abgesunkene und dann in Formalin fixierte Leber. **Rechts**: In Paraffin eingebettete Leber. Die Bilder wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt. Die Belichtungszeit war bei allen drei Bildern gleich. Ergebnisse zu den Bildern s. Fließtext.

Bei den Cryoschnitten der in Formalin fixierten Organe, die nicht in Sucrose inkubiert wurden, zeigte sich die Nanosomenfluoreszenz sehr schwach und erst nach längerer UV-Belichtung. Der autofluoreszierende Gewebehintergrund erschien wie „verbrannt“. Die Gewebequalität war nur wenig schlechter verglichen mit den Schnitten der in Formalin fixierten Organe, die zusätzlich in Sucrose abgesunken waren.

Die Cryoschnitte der Formalin fixierten, sucroseinkubierten Organe zeigten praktisch keine Nanosomenfluoreszenz, jedoch war das Gewebe gut erhalten und Gefäße sowie Lebersinusuide gut erkennbar.

Bei den in Paraffin eingebetteten Organen war praktisch keine Nanosomenfluoreszenz mehr erkennbar. Erklärbar war dies durch das Auswaschen von Lipiden bei Anwendung der Paraffineinbettung mit der aufsteigenden Alkoholreihe. Die Gewebequalität blieb wie erwartet sehr gut erhalten.

Der eindrückliche Effekt des ausbleichenden UV-Lichtes auf den Gewebehintergrund und die damit verbundene erhöhte Sichtbarkeit der Nanosomenfluoreszenz ist in Abbildung 9 dargestellt.

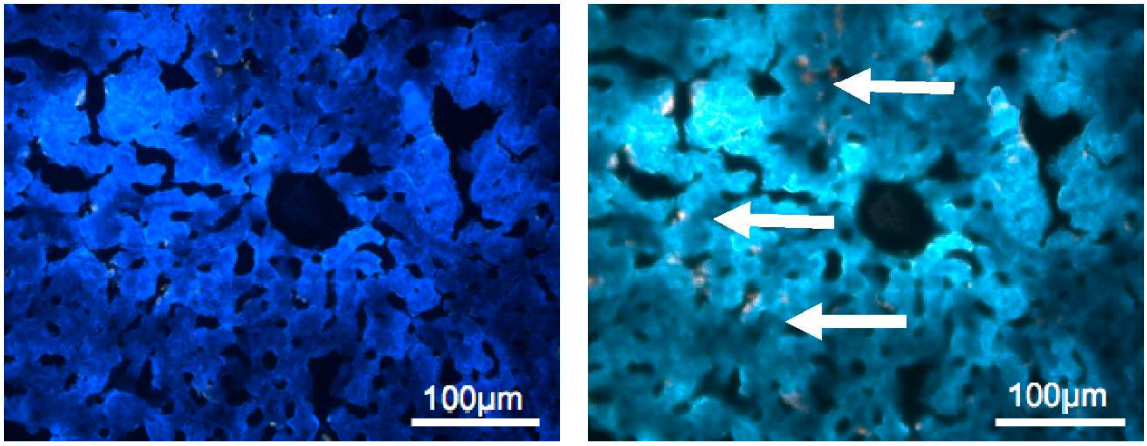


Abbildung 9: 7µm dicker Cryoschnitt einer in Formalin fixierten unperfundierten Leber vor (**links**) und nach längerer Belichtung (**rechts**). Die Pfeile zeigen auf die rötlich fluoreszierenden Nanosomen. Die Bilder wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt.

Variation der Schnittfixierung

Die unterschiedlichen Fixierungen der Cryoschnitte hatten ebenso wie die unterschiedliche Fixierung der Organe verschiedene Auswirkungen auf die Nanosomenfluoreszenz und den Gewebeerhalt. Als Schnittfixierung wurden Methanol, PFA und ein unfixierter Schnitt miteinander verglichen.

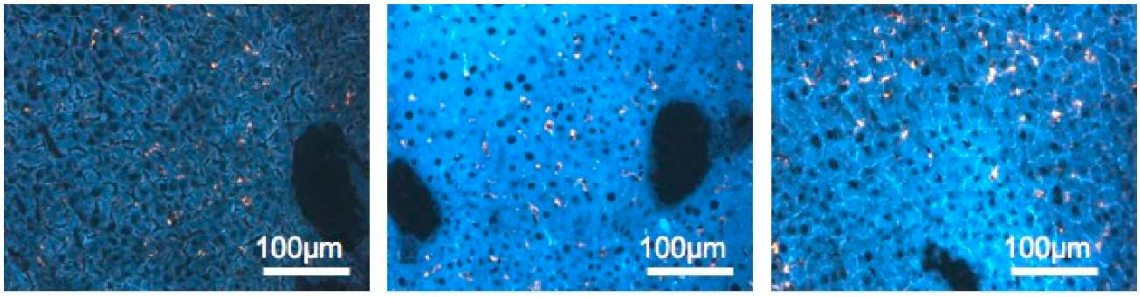


Abbildung 10: 7µm dicke Cryoschnitte der Leber einer mit PBS perfundierten Maus. **Links**: mit Methanol fixiert. **Mitte**: mit PFA fixiert. **Rechts**: mit PBS feucht gehalten und nicht fixiert. Injiziert wurden 200µl einer Nanosomensuspension aus 150µl S18-Teilchen und 40mg VLDL Lipid. Die Bilder wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt. Die Belichtungszeit war bei allen Bildern gleich.

Die mit Methanol fixierten Organschnitte zeigten sowohl sofort als auch nach einigen Tagen einen guten Nanosomenfluoreszenzerhalt.

Bei den mit PFA fixierten Organschnitten fluoreszierten die Nanosomen unmittelbar nach der Fixierung gut, jedoch verschlechterte sich die Fluoreszenz nach einigen Tagen, bis sie nur noch durch starkes Belichten erkennbar war.

Die Schnitte ohne Fixierung wiesen einen sehr guten Erhalt der Nanosomenfluoreszenz auf.

	PFA	Methanol	PBS
Gewebequalität	gut	mäßig	mäßig
Nanofluoreszenz	schlecht	gut	gut

Tabelle 3: Vergleich zwischen verschiedenen Fixiermedien der Organschnitte

4.1.3 Schnitttechniken

Die Cryoschnitttechnik wurde, da durch sie die Nanosomenfluoreszenz nicht beeinträchtigt wurde, der Paraffinschnitttechnik vorgezogen.

4.1.4 Färbungen der Schnitte

Da Hämalaun alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau anfärbt- insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und das raue endoplasmatische Retikulum (rER)- waren die gefärbten Schnitte hinsichtlich der Organspezifität und histologischen Besonderheiten besser beurteilbar. Jedoch verschlechterte sich die Nanosomenfluoreszenz durch die Färbung.

4.1.5 Eindeckelungslösungen

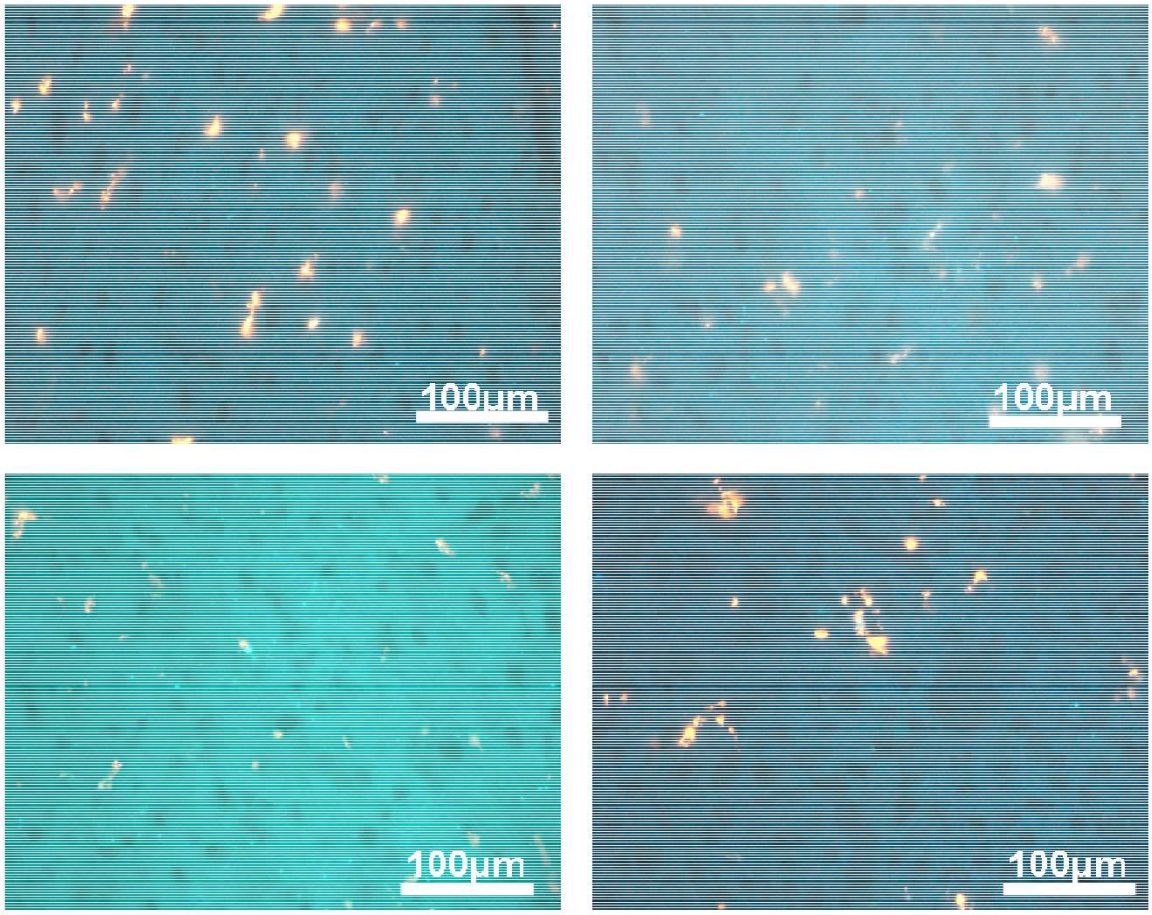


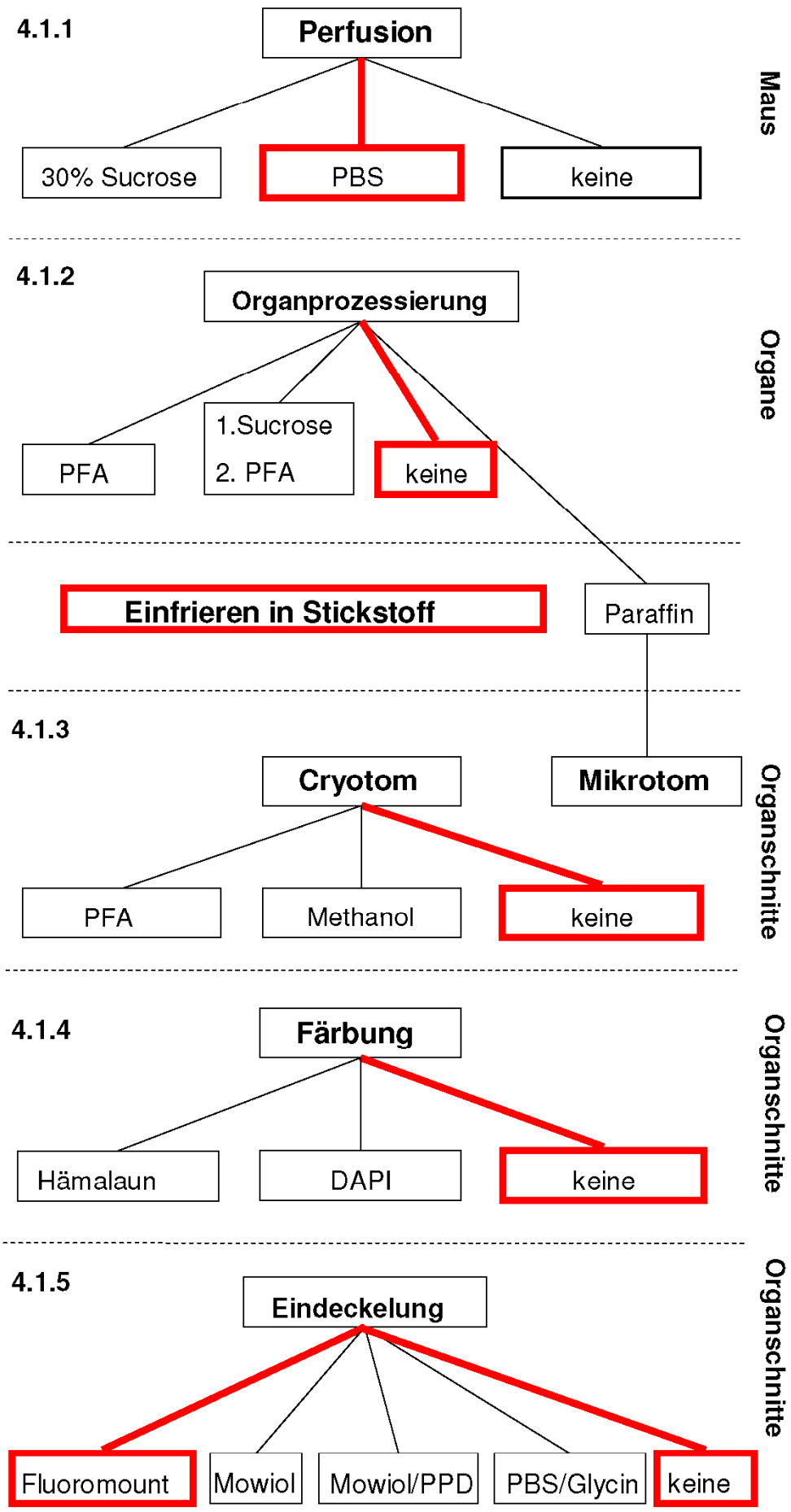
Abbildung 11: 7µm dicke Cryoschnitte von Lebern nach Nanosomeninjektion. Die Eindeckelungsmedien der Schnitte wurden variiert. **Oben links:** Fluoromount, **oben rechts**: Mowiol, **unten links**: Mowiol/PPD, **unten rechts**: PBS/Glycin. Die Nanosomenfluoreszenz wurde, wie im Fließtext beschrieben, je nach verwendetem Eindeckelungsmedium unterschiedlich beeinflusst. Die Bilder wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt.

Die mit Fluoromount und Mowiol eingedeckelten Schnitte beeinflussten anfangs die Nanosomenfluoreszenz hinsichtlich der Intensität und Quantität nicht. Die mit Mowiol/PPD eingedeckelten Schnitte zeigten schon zu Anfang keinen guten Erhalt der Nanosomenfluoreszenz, im Gegenzug wiesen die mit PBS/Glycin (4:1) eingedeckelten Schnitte zu Anfang noch guten Nanosomenfluoreszenzerhalt auf. Nach einigen Tagen fiel jedoch eine Struktur auf den Objektträgern aus, ohne, dass die Fluoreszenz beeinträchtigt war. Fluoromount und PBS/Glycin (4:1) wiesen eine sehr gute, Mowiol sowie Mowiol/PPD eine gute Deckglasfestigkeit auf.

	Fluoromount	Mowiol	Mowiol/PPD	PBS/Glycin
Gewebequalität	zunächst gut	zunächst gut	zunächst gut	immer gut
Nanosomen-fluoreszenz	gut	gut	schlecht	sehr gut
Deckglasfestigkeit	sehr fest	fest	fest	sehr fest

Tabelle 4: Vergleich verschiedener Eindeckelungsmedien

Die nachfolgende Übersicht zeigt die Techniken, die in der Erprobung der histologischen Verfahrensweisen überzeugten und im Laufe der Experimente weiter angewendet wurden. Je mehr der histologische Erhalt der Schnitte der Histologie eines Paraffinschnittes glich und die Nanosomenfluoreszenz maximal erhalten blieb, desto eher wurden die histologischen Techniken als überzeugend anerkannt.


4.1.1
Perfusion
30% Sucrose
PBS
keine
Maus
4.1.2
Organprozessierung
PFA
1.Sucrose
2. PFA
keine
Organe
Einfrieren in Stickstoff
Paraffin
4.1.3
Cryotom
Mikrotom
PFA
Methanol
keine
Organschnitte
4.1.4
Färbung
Hämalaun
DAPI
keine
Organschnitte
4.1.5
Eindeckelung
Fluoromount
Mowiol
Mowiol/PPD
PBS/Glycin
keine
Organschnitte

4.2 Mikroskopie

Durch die Mikroskopie an dem Licht- und Fluoreszenzmikroskop sowie am konfokalen Mikroskop konnten die Nanosomeneigenschaften dargestellt werden. Die Markierung der Lipoproteine erfolgte mithilfe der Nanoteilchen im hydrophoben Kern und nicht, wie bei organischen Farbstoffen üblich, an der amphiphilen Hülle des Lipoproteins. Demnach wurde die Markierung mit Nanoteilchen nicht verstoffwechselt und blieb stabil im Lipoprotein erhalten.

Die Fluoreszenz der mit fluoreszierenden Nanoteilchen markierten Lipoproteine verschlechterte sich selbst nach langer Belichtung nicht. Stattdessen trat die Fluoreszenz der Nanosomen nach längerer Belichtung unter dem Mikroskop sogar noch deutlicher hervor. Durch Bilderserien, die bei Dauerbelichtung aufgenommen wurden, konnte festgestellt werden, dass die Fluoreszenz der Nanosomen im Laufe der Zeit zunimmt.

Die fluoreszierenden Nanosomen konnten mit jeglichen Wellenlängen angeregt werden und emittierten stets in dem gleichen engen Wellenlängenspektrum, das abhängig vom verwendeten Teilchen variierte. Also erschienen die Nanosomen, je nach eingesetztem Nanoteilchen und unabhängig vom Farbfilter, der vor das Lichtmikroskop geschoben wurde, stets in derselben Farbe. Bei Verwendung des UV-Filters schien die Nanosomenfluoreszenz am besten sichtbar zu sein, da sie sich farblich am deutlichsten vom Hintergrund unterscheiden ließ.

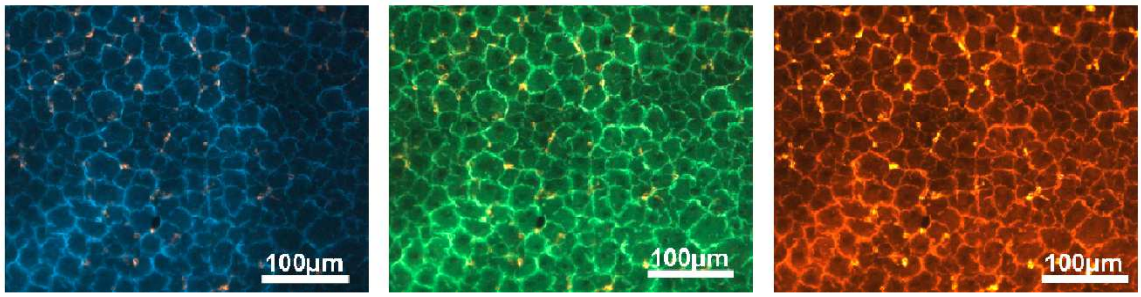


Abbildung 12: 7µm dicke Cryoschnitte einer perfundierten Maus. **Links**: UV Anregung. **Mitte**: blaue Anregung. **Rechts**: grüne Anregung. Die Bilder wurden in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt.

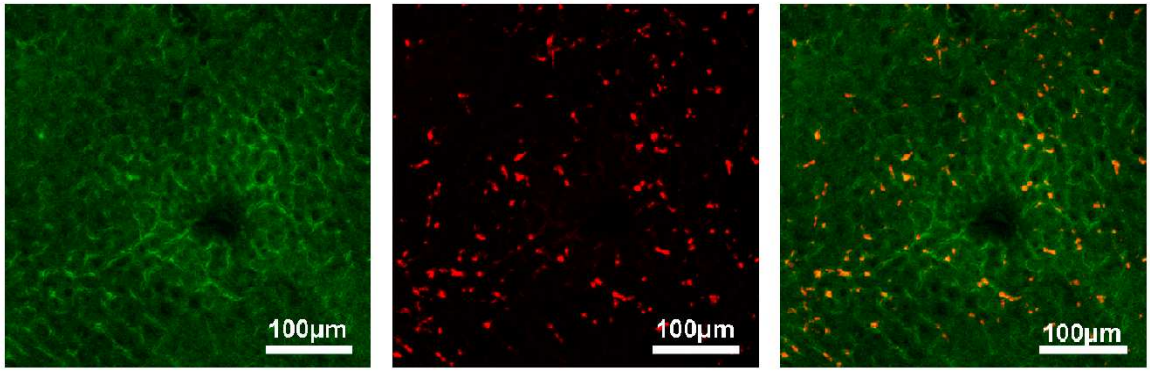


Abbildung 13: Konfokale Bilder (Laser-Scanning-Mikroskop – LSM 510 Meta, Zeiss) von 12µm dicken Cryoschnitten einer Leber. **Links**: grüner Kanal, **Mitte**: Roter Kanal, **rechts**: Mischbild aus dem linken und mittleren Bild.

Mithilfe des konfokalen Mikroskops gelingt es, das Licht, das außerhalb der Brennweite des Objekts liegt, auszublenden. Es werden schärfere Bilder erzeugt als bei einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop, das auch das außerhalb der Brennebene des Objekts liegende unfokussierte Licht abbildet. Das konfokale Mikroskopieren ermöglichte in dieser Versuchsreihe das Erstellen von Kanalbildern, die später übereinander gelegt werden konnten. Wie in Abbildung 13 dargestellt, konnte so genau zwischen Auto- und Hintergrundfluoreszenz (rechtes Bild) und Nanosomenfluoreszenz (Mitte) unterschieden werden.

4.3 Nanosomenlokalisation innerhalb verschiedener Organe

Nach Abschluss der Experimente konnten mithilfe der Mikroskopie Aussagen über die Stärke der Nanosomenfluoreszenz in verschiedenen Organen gemacht werden. Weiterhin konnten mithilfe von Immunfluoreszenz auf die genauere Lokalisation der Nanosomen innerhalb von organspezifischen Geweben geschlossen werden.

4.3.1 Organdistribution

Unabhängig von den verschiedenen genetischen Hintergründe der Mäuse (Wildtypen, ApoE-ko) und den verschiedenen Perfusionszeitpunkte ließen sich jeweils Organe mit eindeutiger, schwacher und keiner Nanosomenfluoreszenz unterscheiden. Um zwischen der recht starken Autofluoreszenz in den Organen einer uninjizierten Maus und der Nanosomenfluoreszenz injizierter Mäuse zu unterscheiden, wurden Organe einer uninjizierten Kontrollmaus entnommen, geschnitten und mikroskopiert.

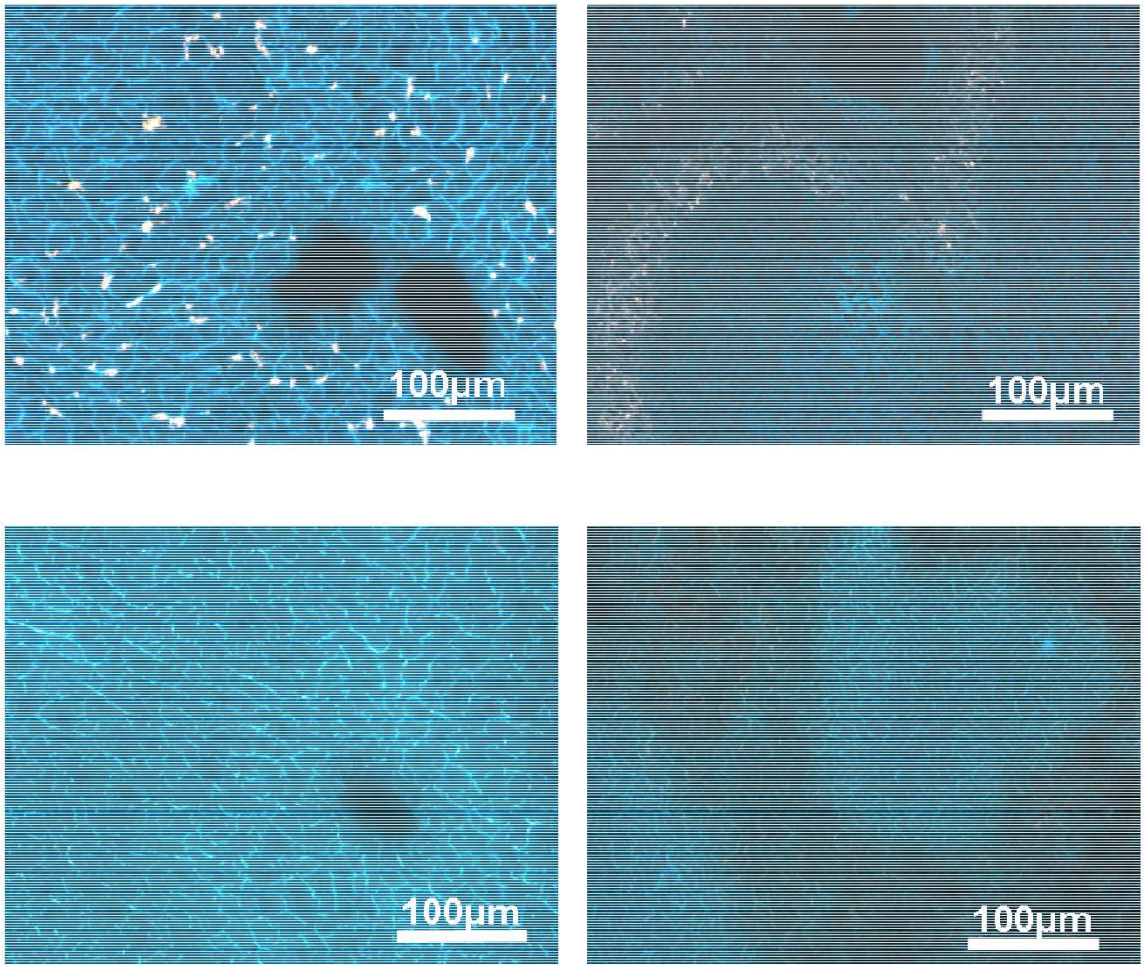


Abbildung 14: Eindeutig und reproduzierbare Nanosomenfluoreszenz wurde **oben links**: in der Leber und **oben rechts**: in der Milz einer Wildtypmaus gefunden. In der Mäuseleber herrschte ein diffuses Verteilungsmuster, in dem die Nanosomen zwischen den Hepatozyten lagen. Die in der Mäusemilz gefundene, feinere Nanosomenfluoreszenz ließ sich parafollikulär lokalisieren. Die dargestellten geschnittenen Organe stammen aus einer 20 Minuten nach Nanosomeninjektion perfundierten Maus. **Unten rechts**: Leber der Kontrollmaus, **unten links**: Milz der Kontrollmaus. Die Bilder wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt.

Zu den Organen mit mikroskopisch eindeutig nachzuweisenden Nanosomenfluoreszenz zählten Leber und Milz. Im braunen Fettgewebe und im Herz fluoreszierten die Nanosomen schwach, während in den restlichen Organen, also in Nebenhoden, Nebenniere, Niere, Skelettmuskel und Pankreas, mikroskopisch keine Nanosomenfluoreszenz erkennbar war. Die durch die Mikroskopie gewonnenen qualitativen Aussagen über die Nanosomen wurden durch Messung des Cadmiumgehalts der Organe in der AAS unter quantitativen Aspekten betrachtet. (Auswertung der AAS: s.u.).

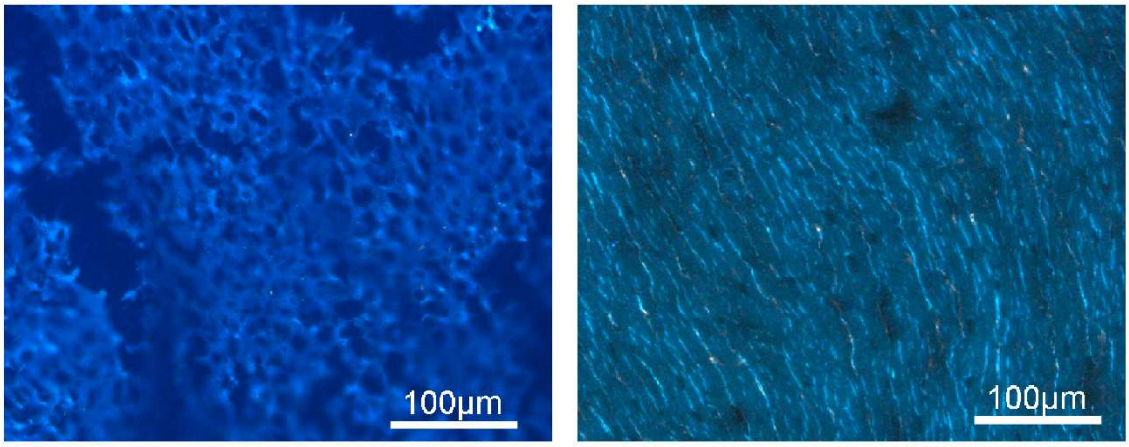


Abbildung 15: Schwache Nanosomenfluoreszenz stellte sich mikroskopisch im braunen Fettgewebe (**links**) und im Herzen (**rechts**) dar. Die Maus wurde 20 Minuten nach Nanosomeninjektion perfundiert. Die Bilder wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt.

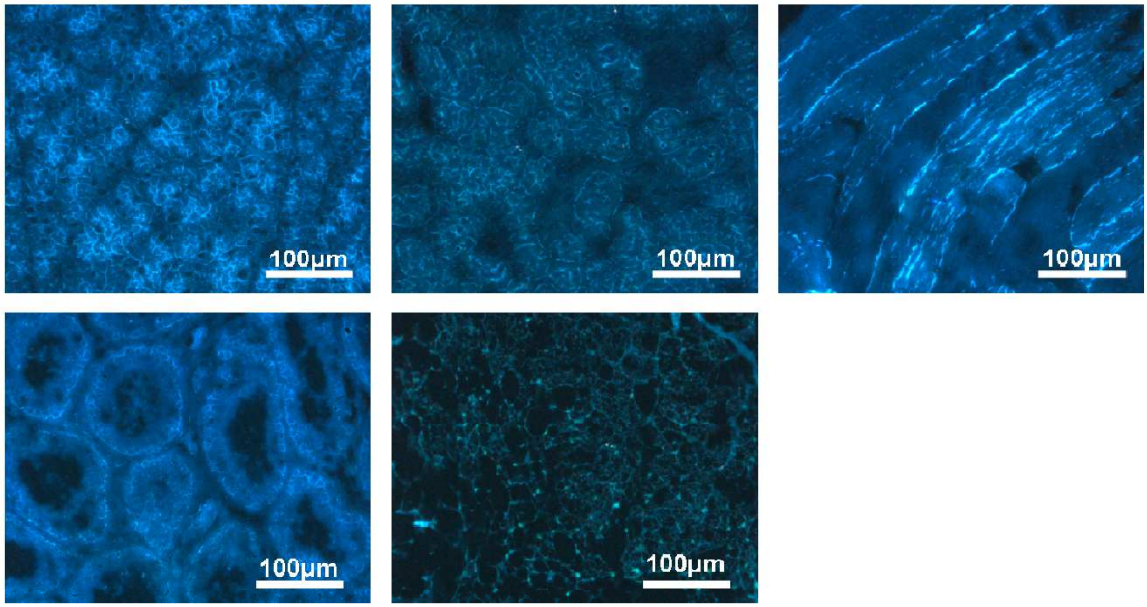


Abbildung 16: In den Organen Pankreas (**oben links**), Niere (**oben Mitte**), Skelettmuskel (**oben rechts**), Nebenhoden (**unten links**) und Nebenniere (**unten rechts**) konnte keine Nanosomenfluoreszenz nachgewiesen werden. Die Maus wurde 20 Minuten nach Nanosomeninjektion perfundiert. Die Bilder wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt.

4.3.2 Genauere Gewebelokalisation mithilfe von Immunfluoreszenz

Erste Vermutungen hinsichtlich der Nanosomenlokalisation innerhalb der Gewebe wurden nach den ersten konfokalen sowie licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen angestellt. Als interessantestes Organ für das weitere Untersuchen der genauen Gewebelokalisation der Nanosomen erschien die Leber, da hier stets die meiste Nanosomenfluoreszenz reproduzierbar war. Da die Nanosomeninjektion in die Schwanzvene der Maus erfolgte, erreichten die Nanosomen die Gewebe über den Blutweg und passierten beim Eintritt in das Organ die Gefäßwand. Demnach konzentrierten sich die Antikörperfärbungen zunächst auf das Endothel.

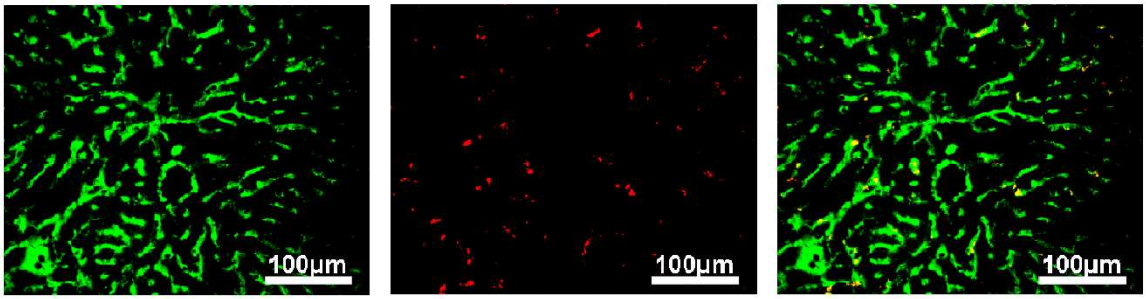


Abbildung 17: Immunfluoreszenz von 7µm dicken Cryoschnitten von mit PBS perfundierten Mäusen. Erster Antikörper: CD31 gegen das Endothel gerichtet, zweiter Antikörper: Cy2. Leber einer Wildtyp-Maus, die 60 Minuten nach Nanosomeninjektion perfundiert wurde. Die Bilder wurden an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop Axiovert100, Zeiss) bei 200facher Vergrößerung erstellt und es wurden mithilfe von ImageJ die Kanäle extrahiert. Das **linke Bild** zeigt einen Ausschnitt des Leberschnittes mit blauem Filter. Die hellgrünen Areale markieren die Antikörperfärbung. Das Bild in der **Mitte** zeigt denselben Ausschnitt, wobei die Nanosomen rot dargestellt sind. Das **rechte Bild** zeigt denselben Ausschnitt, wenn man beide Bilder (**links** und **Mitte**) übereinander legt. Die orangefarbenen Areale entsprechen einer Kolokalisation von Endothelmarker gegen Antigen CD 31 und den Nanosomen. Die Antikörperfärbung ist nicht sichtbar, jedoch sieht man deutlich die gelb-rötlich fluoreszierenden Nanosomen.

In Abbildung 17 ist eine Kolokalisation zwischen dem grün fluoreszierenden Cy2 Farbstoff und dem gelb-rötlich fluoreszierenden Nanosomen zu sehen. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz zeigen, dass die Nanosomen sinusoidal assoziiert sind.

4.4 Quantitative und qualitative Auswertung der Nanosomenaufnahme in verschiedene Organe bei Wildtyp-, ApoEko- und Kontrollmäusen zu unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten

Die Atom Absorptions-Spektroskopie ermöglichte eine Quantifizierung des Cadmiumanteils in den Gewebeschnitten. Diese Methode wurde auf ein Experiment angewendet, welches mit dem Einsatz von 40mg TRL Lipid und 150µl S18-Teilchen unter mikroskopischer Betrachtung der Organschnitte eindeutig einen Hinweis auf vorhandene Nanosomenfluoreszenz lieferte. Außerdem wurden die Organe der zuvor erwähnten Kontrollmaus vermessen.

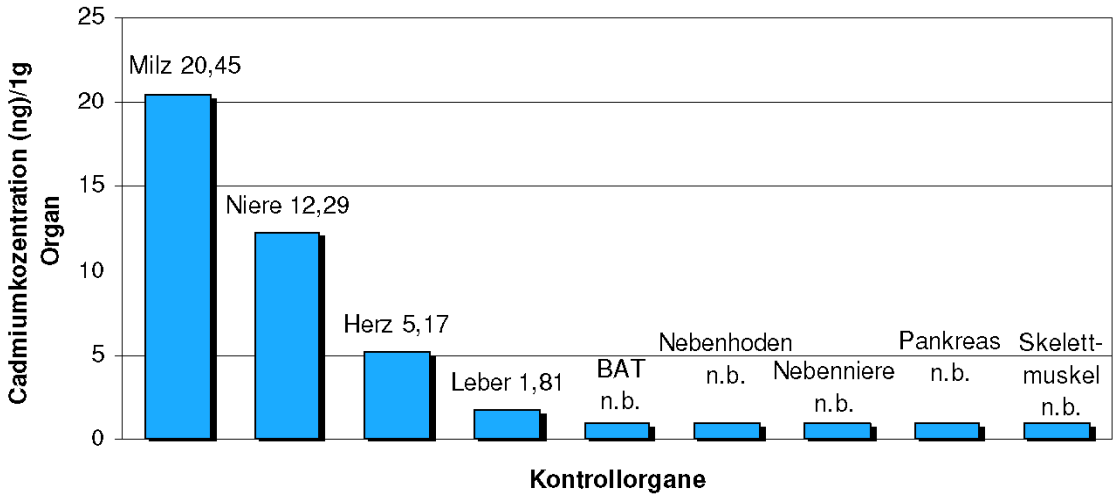


Abbildung 18: Von den Organen der Kontrollmaus enthielt die Milz mit 20,45ng pro 1g Organ die meiste Konzentration an Cadmium. Gefolgt von Niere (12,29ng/g), Herz (5,17ng/g) und Leber (1,81ng/g). Die Organe BAT, Nebenhoden, Nebenniere, Pankreas und Skelettmuskel enthielten eine nicht bestimmbar geringe Konzentration an Cadmium. Abkürzung: n.b.= Nicht bestimmbar; BAT= Brown Adipose Tissue, engl. für braunes Fettgewebe.

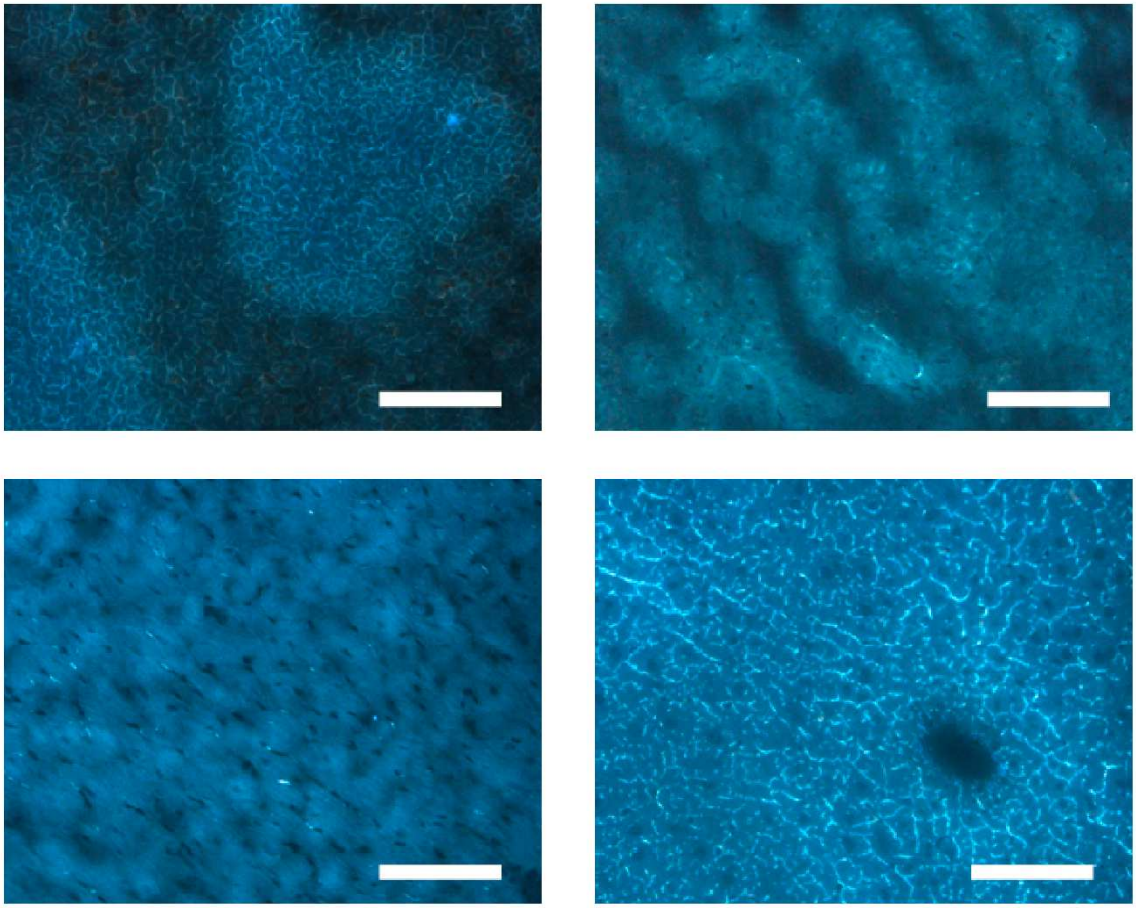
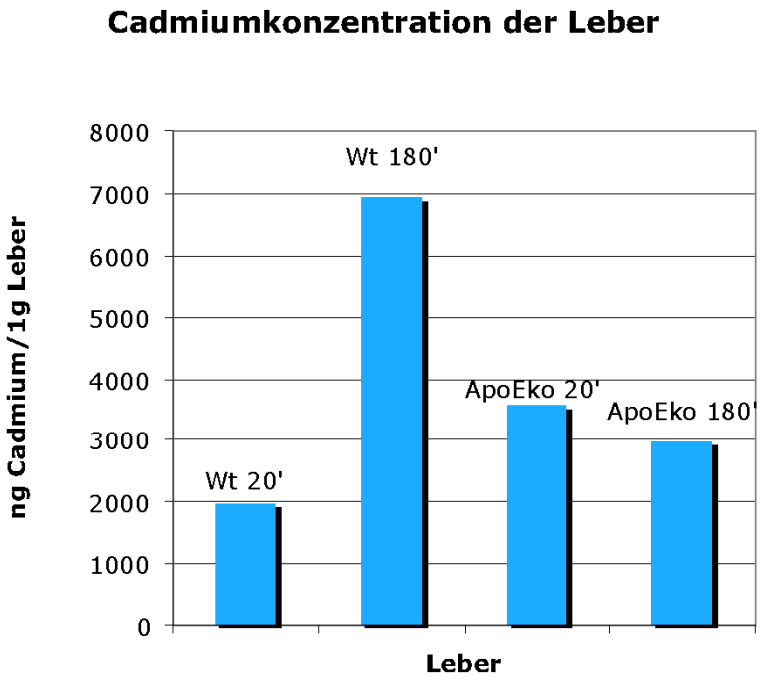


Abbildung 19: zeigt die zugehörigen Cryoschnitte der Organe der Kontrollmaus. **Oben links**: Milz, **oben rechts**: Niere, **unten links:** Herz, **unten rechts:** Leber. Die Bilder wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt. Dem Maßstabbalken entsprechen 100µm.

Die Cadmiumkonzentration der Organe der injizierten Mäuse ist in nachfolgenden Graphen in Bezug auf ein Gramm Organgewicht dargestellt. Der Versuch wurde an vier Mäusen durchgeführt. Variiert wurde der genetische Hintergrund der Mauslinien (Wt vs. ApoE- ko), sowie die Zeitpunkte der Perfusion nach Nanosomeninjektion (20' vs. 180'). Die Reihenfolge der Darstellungen orientiert sich an der qualitativ durch Mikroskopie erlangten Stärke der Nanosomenfluoreszenz. Wie oben beschrieben wurde starke Nanosomenfluoreszenz in Leber und Milz, schwache Fluoreszenz in Herz und BAT, sowie keine Fluoreszenz in den restlichen Organen gefunden.



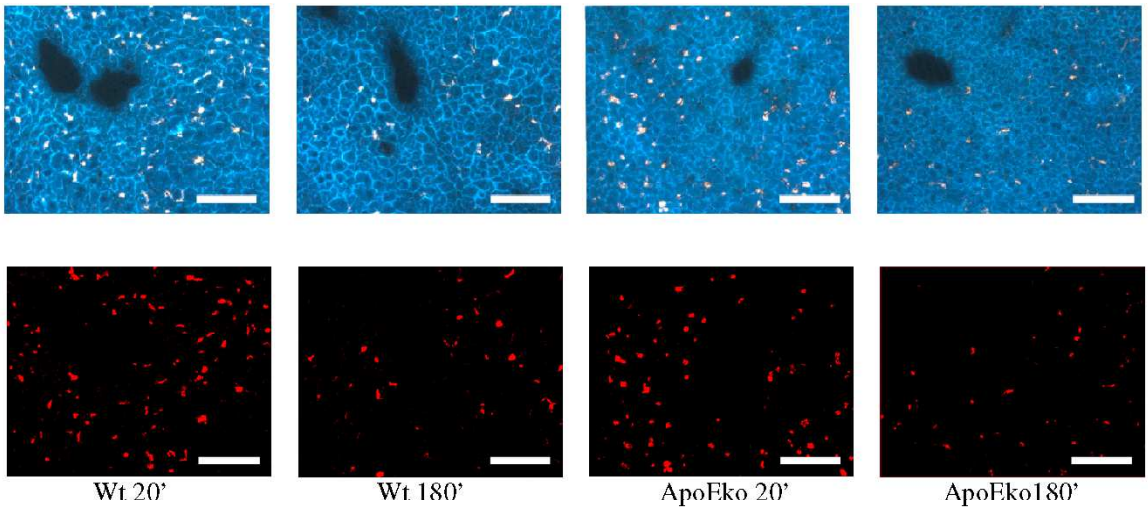


Abbildung 20: Darstellung der quantitativen und qualitativen Cadmiumkonzentration in der Leber. Das **obere Diagramm** zeigt die Cd-Konzentration der injizierten, genetisch differenten Mäuse in Abhängigkeit vom Perfusionszeitpunkt (Perfusion 20 Minuten nach Nanosomeninjektion (20') sowie Perfusion 180 Minuten nach Nanosomeninjektion (180')), die nach AAS- Messung festgestellt wurde. Die **obere Bildreihe** zeigt von **links** nach **rechts** die Cryoschnitte der Lebern der Wt 20', Wt 180', ApoEko 20' und ApoEko 180' Maus. Sie wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt. Die **untere Bildreihe** zeigt die Nanosomenfluoreszenz der obigen Bilder nach Extraktion des roten Kanals. Dem Maßstabbalken entsprechen 100µm. Abkürzungen: Wt= Wildtypmaus; ApoEko= Maus mit Apolipoprotein Knock-out Hintergrund.

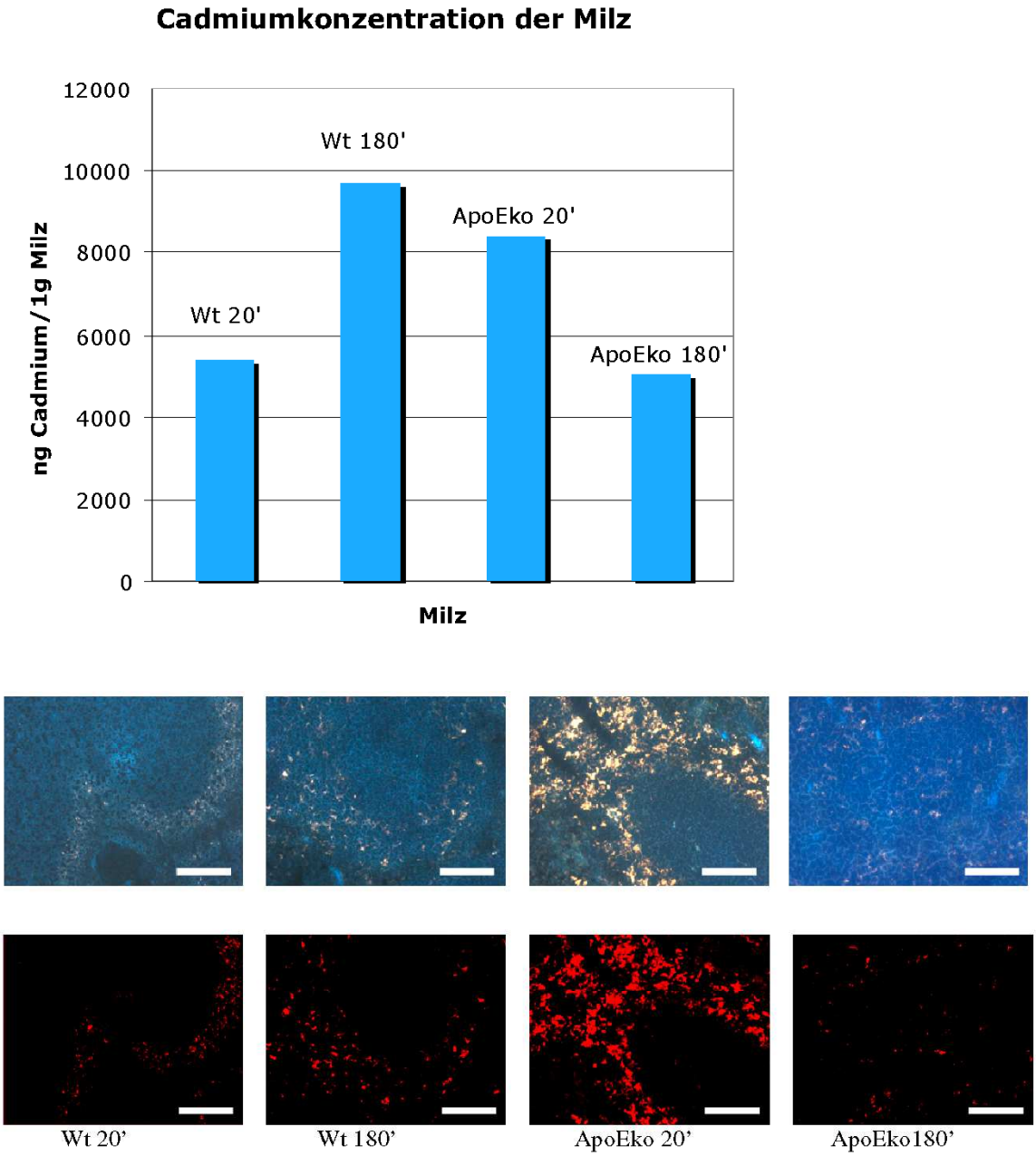
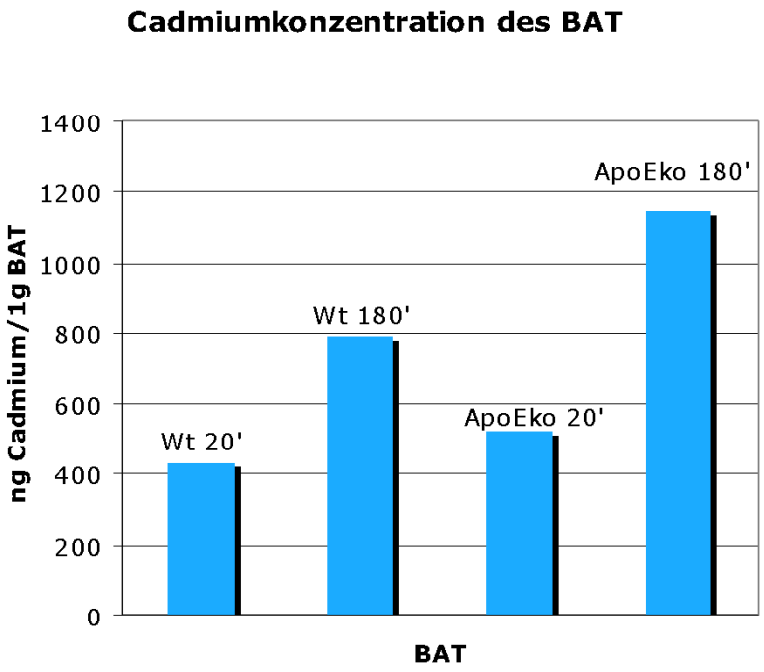


Abbildung 21: Darstellung der quantitativen und qualitativen Cadmiumkonzentration in der Milz. Das **obere Diagramm** zeigt die Cd-Konzentration der injizierten, genetisch differenten Mäuse in Abhängigkeit vom Perfusionszeitpunkt (Perfusion 20 Minuten nach Nanosomeninjektion (20'), sowie Perfusion 180 Minuten nach Nanosomeninjektion (180')), die nach AAS- Messung festgestellt wurde. Die **obere Bildreihe** zeigt von **links** nach **rechts** die Cryoschnitte der Milzen der Wt 20', Wt 180', ApoEko 20' und ApoEko 180' Maus. Sie wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt. Die **untere Bildreihe** zeigt die Nanosomenfluoreszenz der obigen Bilder nach Extraktion des roten Kanals. Dem Maßstabbalken entsprechen 100µm. Abkürzungen: Wt= Wildtypmaus; ApoEko= Maus mit Apolipoprotein Knock-out Hintergrund.



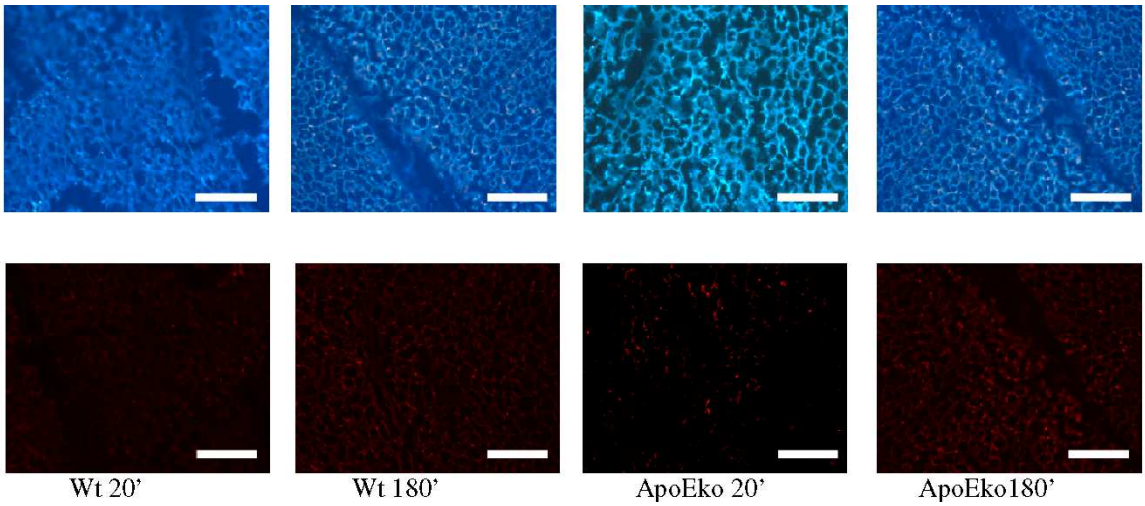
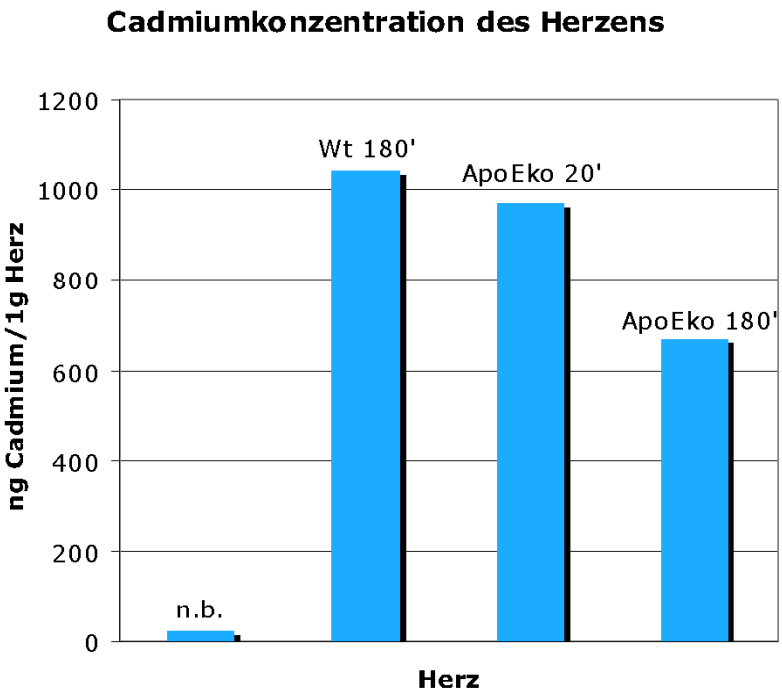


Abbildung 22: Darstellung der quantitativen und qualitativen Cadmiumkonzentration des BAT. Das **obere Diagramm** zeigt die Cd-Konzentration der injizierten, genetisch differenten Mäuse in Abhängigkeit vom Perfusionszeitpunkt (Perfusion 20 Minuten nach Nanosomeninjektion (20'), sowie Perfusion 180 Minuten nach Nanosomeninjektion (180')), die nach AAS- Messung festgestellt wurde. Die **obere Bildreihe** zeigt von **links** nach **rechts** die Cryoschnitte des braunen Fettgewebes der Wt 20', Wt 180', ApoEko 20' und ApoEko 180' Maus. Sie wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt. Die **untere Bildreihe** zeigt die Nanosomenfluoreszenz der obigen Bilder nach Extraktion des roten Kanals. Dem Maßstabbalken entsprechen 100µm. Abkürzungen: Wt= Wildtypmaus; ApoEko= Maus mit Apolipoprotein Knock-out Hintergrund.



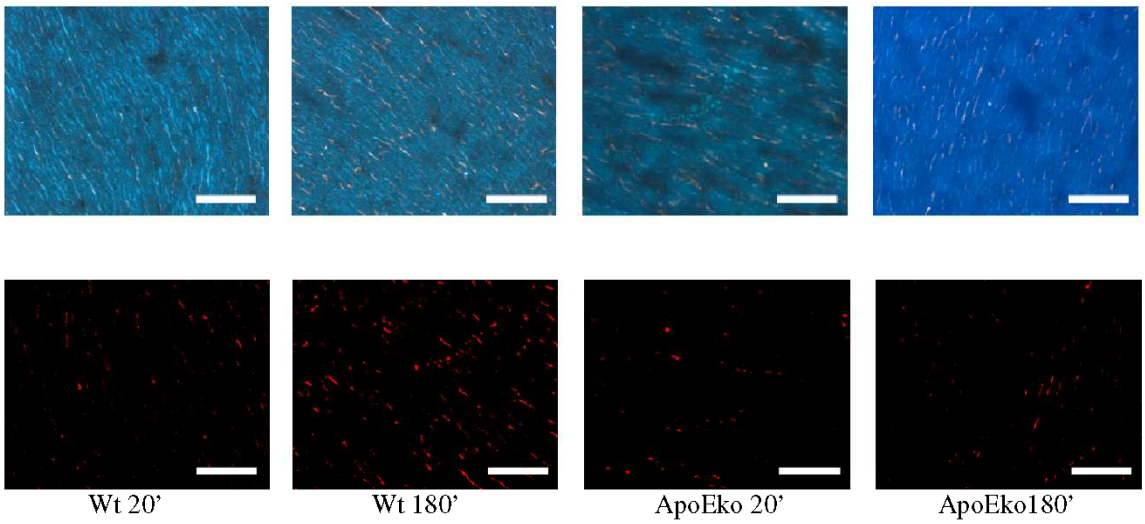


Abbildung 23: Darstellung der quantitativen und qualitativen Cadmiumkonzentration des Herzens. Das **obere Diagramm** zeigt die Cd-Konzentration der injizierten, genetisch differenten Mäuse in Abhängigkeit vom Perfusionszeitpunkt (Die Cadmiumkonzentration der Wt 20' Maus war nicht bestimmbar, Perfusion 180 Minuten nach Nanosomeninjektion (180')), die nach AAS- Messung festgestellt wurde. Die **obere Bildreihe** zeigt von **links** nach **rechts** die Cryoschnitte der Herzen der Wt 20', Wt 180', ApoEko 20' und ApoEko 180' Maus. Sie wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt. Die **untere Bildreihe** zeigt die Nanosomenfluoreszenz der obigen Bilder nach Extraktion des roten Kanals. Dem Maßstabbalken entsprechen 100µm. Abkürzungen: Wt= Wildtypmaus; ApoEko= Maus mit Apolipoprotein Knock-out Hintergrund, n.b.= nicht bestimmbar.

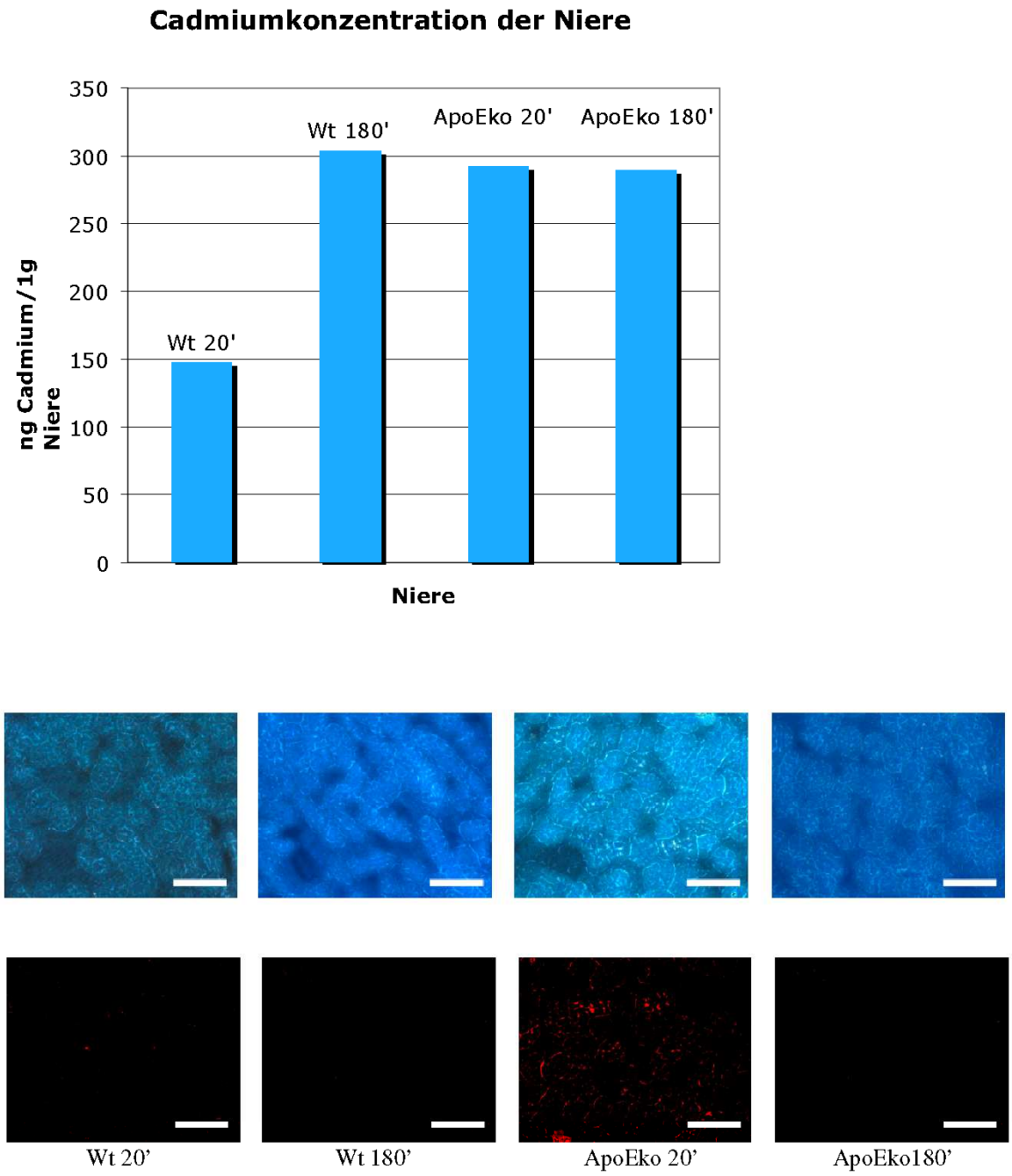
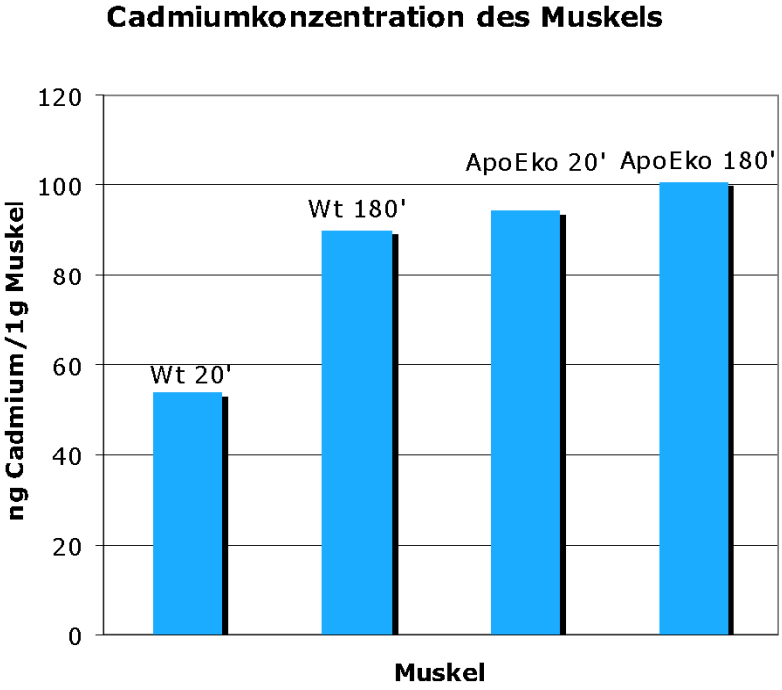


Abbildung 24: Darstellung der quantitativen und qualitativen Cadmiumkonzentration in der Niere. Das **obere Diagramm** zeigt die Cd-Konzentration der injizierten, genetisch differenten Mäuse in Abhängigkeit vom Perfusionszeitpunkt (Perfusion 20 Minuten nach Nanosomeninjektion (20'), sowie Perfusion 180 Minuten nach Nanosomeninjektion (180')), die nach AAS- Messung festgestellt wurde. Die **obere Bildreihe** zeigt von **links** nach **rechts** die Cryoschnitte der Nieren der Wt 20', Wt 180', ApoEko 20' und ApoEko 180' Maus. Sie wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt. Die **untere Bildreihe** zeigt die Nanosomenfluoreszenz der obigen Bilder nach Extraktion des roten Kanals. Dem Maßstabbalken entsprechen 100µm. Abkürzungen: Wt= Wildtypmaus; ApoEko= Maus mit Apolipoprotein Knock-out Hintergrund.



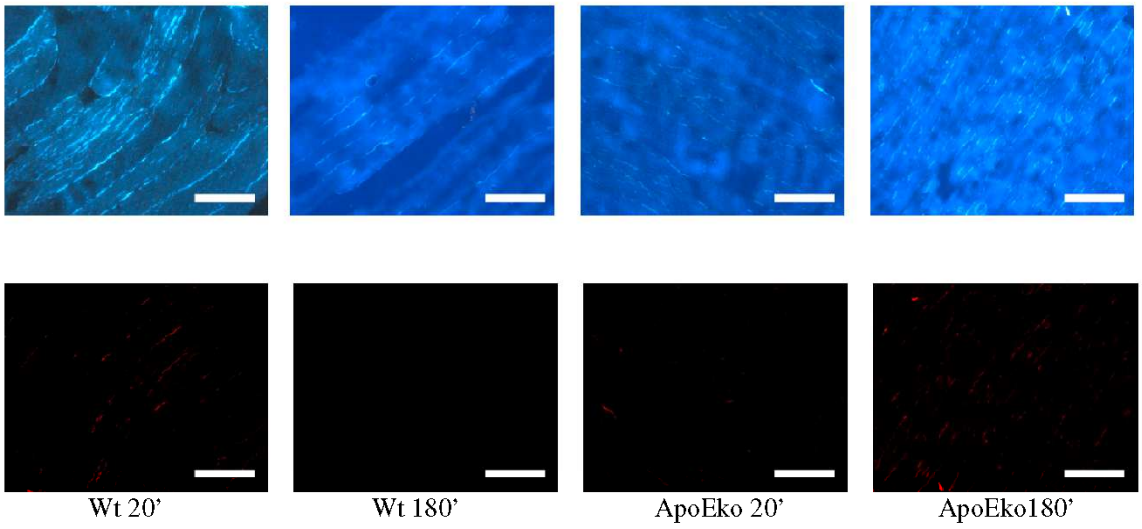


Abbildung 25: Darstellung der quantitativen und qualitativen Cadmiumkonzentration des Muskels. Das **obere Diagramm** zeigt die Cd-Konzentration der injizierten, genetisch differenten Mäuse in Abhängigkeit vom Perfusionszeitpunkt (Perfusion 20 Minuten nach Nanosomeninjektion (20'), sowie Perfusion 180 Minuten nach Nanosomeninjektion (180')), die nach AAS- Messung festgestellt wurde. Die **obere Bildreihe** zeigt von **links** nach **rechts** die Cryoschnitte der Skelettmuskeln der Wt 20', Wt 180', ApoEko 20' und ApoEko 180' Maus. Sie wurden mit UV Filter in 200facher Vergrößerung an einem Licht- und Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100, Zeiss) erstellt. Die **untere Bildreihe** zeigt die Nanosomenfluoreszenz der obigen Bilder nach Extraktion des roten Kanals. Dem Maßstabbalken entsprechen 100µm. Abkürzungen: Wt= Wildtypmaus; ApoEko= Maus mit Apolipoprotein Knock-out Hintergrund.

Abhängig vom genetischen Hintergrund der untersuchten Organe ließen sich bestimmte Trends festmachen: In allen untersuchten Organen war die absolute Cadmiumkonzentration zum Zeitpunkt 20' in den Wildtyporganen niedriger als in den ApoE- ko Organen. Auch zum Zeitpunkt 180' ließ sich in den Wildtyporganen Milz und Muskel weniger Cadmium nachweisen als in den gleichen Organen mit ApoE- ko Hintergrund zum selben Zeitpunkt, während in Leber, Milz, Herz und Muskel der Wildtypmaus zu diesem Zeitpunkt (180') eine im Vergleich höhere Cadmiumkonzentration nachweisbar war.

Die vermessenen Organe lassen sich bezogen auf die Perfusionszeitpunkte auswerten. In den Wildtypmäusen ließ sich in allen Organen mehr Cadmium bei einer Perfusion 180 Minuten nach Nanosomeninjektion, als bei einer Perfusion 20 Minuten nach Injektion nachweisen. Bei Mäusen mit einem ApoE-ko Hintergrund wurde eine Steigerung der Cadmiumkonzentration zwischen diesen Zeitpunkten lediglich im BAT eindeutig nachgewiesen, während bei Milz und Herz ein umgekehrter Trend zu sehen war, d.h., diese Organe enthielten 180 Minuten nach Injektion eindeutig weniger Cadmium als 20 Minuten nach Injektion.

Durch Vermessung einer nicht injizierten Kontrollmaus konnte eine erhöhte Hintergrund-Cadmiumkonzentration ausgeschlossen werden. Die Leber der injizierten Wt 20' Maus enthielt 1097mal mehr ng Cadmium pro g Organgewicht als die nicht injizierte Kontrollmaus. Die Milz der injizierten Wt 20' Maus enthielt 263mal mehr ng Cadmium pro Gramm Organgewicht als die nicht injizierte Kontrollmaus.

Die quantitative Untersuchung der Cadmiumkonzentration korrelierte weitgehend mit den mikroskopischen Bildern.

Durch Auswertung der quantitativen Cadmiumvermessungen konnte festgestellt werden, dass sich in der Milz der injizierten Wildtypmäuse im Mittel (mit 9711 (Wt 20') bzw. 5386 ng/g (Wt 180') Organgewicht) am meisten Cadmium nachweisen ließ. Es folgten Leber (6938 (Wt 20'), bzw. 1987 ng/g (Wt 180') Organgewicht), braunes Fettgewebe (790 (Wt 20'), bzw. 433 (Wt 180') ng/g Organgewicht), Herz (1042 (Wt

20') ng/g Organgewicht), Skelettmuskulatur (65 (Wt 20'), bzw. 54 (Wt 180') ng/g Organgewicht), Nebenniere (65 (Wt 20'), bzw. 27 (Wt 180') ng/g Organgewicht) und Nebenhoden (16 (Wt 20'), bzw. 60 (Wt 180') ng/g Organgewicht) (s. Abbildung 26).

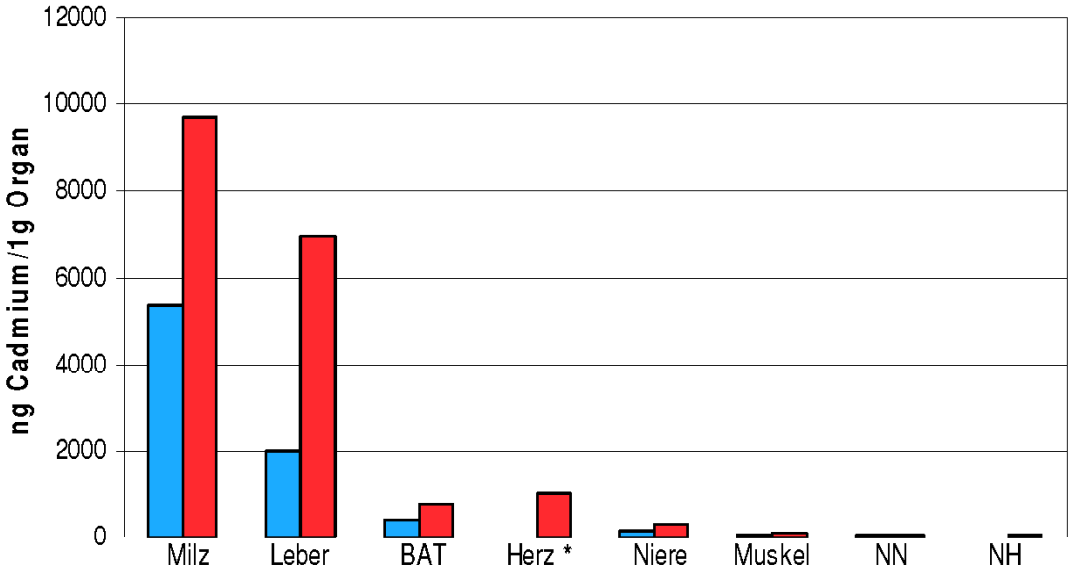


Abbildung 26: Durchschnittliche Absolutmenge an Cadmium in ng pro 1 g Organ. **Blauer Balken**: Wt 20' Maus. Zu beachten ist, dass das Wt 20' Herz (*) nicht bestimmbar war. **Roter Balken**: Organ der Wt 180' Maus, Erklärung: siehe Text. Abkürzung: BAT= braunes Fettgewebe; NN= Nebenniere; NH= Nebenhoden.

5 Diskussion und Ausblick

Diskussion der histologischen Technik

Im Verlauf der Arbeit ist es gelungen, eine geeignete histologische Technik für die *in vivo* Anwendung von fluoreszierenden Nanosomen zu etablieren. Letztlich überzeugte bei der Mauspräparation die Perfusion mit PBS, da hier im Vergleich zur Perfusion mit 30%iger Sucrose ein einfacheres Schneiden ermöglicht und die Perfusionsanlage nicht verklebt wurde. Die entnommenen Organe sollten in Stickstoff schockgefroren werden. Die kleineren Organe sollten nach dem oben beschriebenen Protokoll behandelt werden. Demnach sollten die kleineren Organe in 30%iger Sucroselösung über Nacht absinken. Am folgenden Tag wurden sie mit 1:1 Tissue-Tek zu 30% Sucrose in Glasfläschen für eine Stunde im Kühlraum geschüttelt. Nach Entnahme der kleineren Organe aus der Tissue-Tek-Sucroselösung wurden diese in Tissue-Tek eingebettet und auf Trockeneis gefroren. Das Absinken der kleineren Organe in Sucrose ermöglichte deren festere Bindung an das Tissue-Tek. Somit wurde einem ungewollten Herauslösen der Organe aus der Tissue-Tek Hülle entgegengewirkt. Alle Organe sollten mittels Cryoschnitttechnik geschnitten und die Schnitte dann mit PFA fixiert werden, unter der Voraussetzung, schnell nach dem Fixieren zu mikroskopieren, da im weiteren Verlauf die Nanosomenfluoreszenz mikroskopisch deutlich schlechter zu detektieren war. Wenn keine Fixierung notwendig war, war der unfixierte Schnitt aufgrund der unbeeinträchtigten Nanosomenfluoreszenz zu bevorzugen. Da bei Gebrauch des konfokalen Mikroskops das Eindeckeln bei großen Ölobjektiven obligat war, war Fluoromount aufgrund seiner bevorzugten Deckglasfestigkeit und Nichtbeeinträchtigung der Nanosomenfluoreszenz das Medium der Wahl.

Diskussion des Experimentenvorgangs

Es gelang triglyzeridreiche Mizellen aus humanem Serum zu isolieren. Deren hydrophober Kern wurde erfolgreich mit Nanoteilchen versetzt und so wurden *in vivo* anwendbare Nanosomen synthetisiert. Die Markierung mit Nanoteilchen wurde nicht, wie es bei instabilen organischen Farbstoffen der Fall ist (Gespräch mit Dr. Niemeier, Hamburg), durch enzymatischen Abbau vorzeitig gelöst und über die Niere

ausgeschieden. Die Hydrophobie der Nanoteilchen gewährleistete eine stabile Lokalisation im Kern des Lipoproteins. Nachfolgend konnten durch geeignete Immunhistologie sowie konfokale Mikroskopie der Gewebeschnitte, Rückschlüsse in Bezug auf die Verstoffwechselung der Lipoproteine gezogen werden. Die Organe Leber und Milz enthielten mikroskopisch betrachtet stets fluoreszierende Teilchen. Eine Autofluoreszenz in diesen Organen konnte durch Vergleich mit einer nicht-injizierten Kontrollmaus mikroskopisch ausgeschlossen werden. Da die Leber zuvor schon als zentrales Stoffwechselorgan im Lipoproteinstoffwechsel beschrieben wurde, entspricht die Nanosomenaufnahme in die Leber den Erwartungen. Das diffuse Verteilungsmuster der Leber ließ sich durch Antikörperfärbungen näher untersuchen. Zu frühen Perfusionszeitpunkten (Perfusion 20 Minuten nach Nanosomeninjektion) konnte teilweise eine Kolokalisation zwischen dem Endothel anfärbenden Antikörper CD31 und den Nanosomen ausgemacht werden, sodass eine sinusoidale oder perisinusoidale Lokalisation der Nanosomen angenommen wurde. Im Rahmen der Immunhistologie konnte nicht ausreichend geklärt werden, welche nicht-parenchymalen hepatischen Komponenten die Nanosomen nach fortgeschrittener Verstoffwechselung aufnehmen. Hierbei kann eine Beteiligung der Kupffer-Zellen der Leber, welche als hepatische Makrophagen zur Phagozytose befähigt und dem mononukleären, phagozytierenden System zuzuordnen sind (Kühnel, 2002), in Erwägung gezogen werden. Die Kupffer-Zellen sind Bestandteile der Lebersinuswände bzw. liegen den Endothelzellen auf und lokalisieren sich, ähnlich wie die Nanosomen, außerhalb der Hepatozyten. Geeignet im Rahmen der Immunfluoreszenz wäre hierbei ein primärer Antikörper gegen Antigen F4/80, ein Marker für reife Makrophagen, der in hohem Maße von Kupffer-Zellen exprimiert wird (Dambach et al., 2002).

Eine weitere hepatische Komponente, welche potentiell als aufnehmende Zelle für die Nanosomen in Frage käme, stellen die im Disse-Raum gelegenen Ito-Zellen dar. Sie gelten als Speicherzellen für das fettlösliche Vitamin A in der Leber und gewinnen an Bedeutung aufgrund ihrer antigenpräsentierenden Aktivität, die sich insbesonders gegen lipidhaltige Antigene richtet. Pathophysiologisch spielen die Ito-Zellen bei der Entstehung der Leberzirrhose eine Rolle, indem sie den fibrotischen Umbau des hepatischen Gewebes verursachen.

Eine immunhistologische Untersuchung dieser beiden Zelltypen könnte sich aufgrund ihrer engen morphologischen Verwandtschaft als schwierig erweisen. Zu diskutieren

wäre die Anwendung von Elektronenmikroskopie zur Verifizierung der immunhistologischen Ergebnisse.

In der Milz ließ sich ein perifollikuläres Verteilungsmuster der Nanosomen mikroskopisch ausmachen. Der Follikel stellt als Teil der roten Pulpa das B-Zell-Areal der Milz dar. Um den Follikel liegen die antigenpräsentierenden Zellen, z.B. Makrophagen. Eine weitere immunhistologische Untersuchung dieser Geweberegion wäre denkbar und ließe sich gut mit der Vermutung, dass antigenpräsentierende Zellen die zweite Station der Nanosomenpassage bilden, kombinieren.

Diskussion der Atom Absorptions-Spektroskopie Ergebnisse

Neben der qualitativen Beurteilung der Nanosomenlokalisation im Gewebe mithilfe der Mikroskopie, gelang es im Rahmen der AAS-Untersuchungen quantitative Aussagen über die Organverteilung zu treffen. Die AAS ermöglichte es Unterschiede der Nanosomenkonzentration zwischen den vermessenen Wildtyp- und den ApoE-ko Mausorganen zu verschiedenen Perfusionszeitpunkten nach Nanosomeninjektion fest zu stellen.

So ist die mittels AAS-Messung erhaltene Cadmiumquantität hinsichtlich der unterschiedlichen Perfusionszeitpunkte nach Nanosomeninjektion (20 und 180 Minuten nach Injektion) und Unterschieden in den genetischen Hintergründen der vermessenen Mausorgane zu beurteilen.

Bei den Mäusen, die injiziert wurden, ließ sich bei allen Organen der Wildtypmaus eine starke Abhängigkeit der Cadmiumkonzentration vom Zeitpunkt der Perfusion ausmachen. So ließ sich in alle Wildtyporganen zum Perfusionszeitpunkt 20' weniger Cadmium als zum Zeitpunkt 180' nachweisen. Somit enthielt der Skelettmuskel als das Organ mit dem schwächsten Trend die Wt 180' Maus 1,66mal mehr Cadmium als der Skelettmuskel der Wt 20' Maus. In der Leber wurde dahingehend der stärkste Trend beobachtet. So enthielt die Leber der Wt 180' Maus 3,5mal mehr Cadmium als die Leber der Wt 20' Maus. Anzunehmen ist, dass zu späteren Perfusionszeitpunkten die Nanosomen aus den Blutgefäßen in die jeweiligen Organzellen aufgenommen wurden und aufgrund der

fortgeschrittenen Nanosomenverstoffwechselung ein Ausschwemmen der Nanosomen aus den Gefäßen nicht mehr stattfinden konnte.

Dass die ApoE- ko Mäuse diesem Trend nicht vollständig folgen, könnte durch die Rolle des ApoE im Stoffwechsel der Lipoproteine erklärt werden. Demnach ließ sich in allen untersuchten Organen zum Zeitpunkt 20' in den Wildtypmäusen weniger Cadmium als in den ApoE ko Organen nachweisen. Zum Zeitpunkt 180' ließ sich in den Widtyporganen Milz und Muskel weniger Cadmium nachweisen als in denselben Organen mit ApoE- ko Hintergrund zum gleichen Zeitpunkt, während sich in Leber, Milz, Herz und Muskel der Wildtypmaus zu diesem Zeitpunkt 180' eine im Vergleich höhere Cadmiumkonzentration feststellen ließ. Für die Chylomikronenremnants Aufnahme werden die lipolysierten Remnants im Disse-Raum schnell an die HSPG gebunden, wobei ApoE und LpL als Liganden wirken (Heeren et al., 2002). An ApoE-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich die Plasma-Halbwertszeit der Chylomikronenremnants von wenigen Minuten deutlich verlängert (Ishibashi et al., 1994). In einem zweiten, langsameren Schritt werden die CR zellulär in den Hepatozyten aufgenommen, wobei ApoE, LpL und HL als Liganden agieren (Mulder et al., 1993). Außerdem ist der zweite, langsamere Schritt von LRP1 und LDL- Rezeptor abhängig. Dies kann zu der Vermutung führen, dass ApoE erst im späteren Verlauf der Chylomikronenremnantaufnahme eine Rolle spielt und könnte die oben beschriebenen diffusen Trends der AAS-Messung bei ApoE defizienten Mäusen in den Organen Milz und Herz verständlich machen.

Neben den oben erwähnten Gründen könnten weitere mögliche Erklärungen dieser Trends auch Fehler sein, die im Ablauf an bestimmten Stufen des Experiments entstanden sind. Eine mögliche Quelle wäre eine fehlerhafte Einwaage der Organe. Eine potentielle Fehlerquelle könnte eine fälschlicherweise starke Abweichung der Injektionsmenge von 200μl Nanosomen sein. Da es jedoch nicht möglich war, mehr als 10μl der Nanosomeninjektion paravasal zu injizieren, kann davon ausgegangen werden, dass bei der 200μl umfassenden Nanosomeninjektion eine Abweichung von mehr als 10% ausgeschlossen wird. Bei den oben beschriebenen Trends der Wildtyporgane enthielt die Wt 180' Maus jedoch mindestens 70% mehr Cadmium als die Wt 20' Maus (70% mehr in der Skelettmuskulatur und maximal 250% mehr Cadmium in der Wt 180' Leber als in der Wt 20' Leber), was mit einer Abweichung der Injektionsmenge von

10% nicht zu erklären ist. Weiterhin könnten die injizierten Mäuse bereits vor Injektion über eine gewisse Konzentration an Cadmium verfügt haben. Diese Hintergrundcadmiumkonzentration konnte durch Vermessung einer nicht injizierten Kontrollmaus ausgeschlossen werden. Die Leber der injizierten Wt 20' Maus enthielt 1097mal mehr ng Cadmium pro Gramm Organgewicht als die nicht injizierte Kontrollmaus. Die Milz der injizierten Wt 20' Maus wies 263mal mehr ng Cadmium pro Gramm Organgewicht as die nicht injizierte Kontrollmaus (s. Ergebnisteil) auf.

Außerdem fällt bei der geringen Individuenzahl, die im AAS- Experiment verwendet wurde, eine hohe individuelle Schwankungsbreite stark ins Gewicht.

Die AAS-Ergebnisse der Kontrollmaus, welche das Cadmium hauptsächlich durch die Nahrung aufgenommen haben muss, korrelierten mit der potentiellen Hepato- und Nephrotoxizität des Cadmiums. So enthielt die Milz am meisten Cadmium. Die Nieren, in denen die zweithöchste Menge an Cadmium gemessen wurde, gelten bei chronischer Cadmiumexposition als Akkumulationsorgane. Das klinische Bild aus Nierenschaden und Osteoporose infolge von Cadmiumakkumulation wird als Itai-Itai Krankheit bezeichnet.

Die teilweise fehlende Korrelation zwischen mikroskopisch detektierbarer Nanosomenfluoreszenz und vermessener Cadmiumkonzentration, wie sie bspw. bei der Wt 180' Leber fehlte, könnte am mikrosopischen Ausschnitt des Leberschnitts liegen. Es kann jedoch auch angenommen werden, dass zu einem späteren Perfusionszeitpunkt die Fluoreszenz bereits abgenommen hat, da die Nanoteilchen bereits verstoffwechselt wurden und so eine Degradation stattfand.

Unter Berücksichtigung der mikroskopischen Nanosomendetektierbarkeit und der quantitativen Cadmiumbestimmung kann davon ausgegangen werden, dass ab einer Konzentration von 500ng Cadmium pro 1g Organ Nanosomen im Cryotom-Gewebeschnitt unter einem Fluoreszenzmikroksop detektierbar sind.

Ausblick

Der Einsatz von weiteren genetisch variierenden Mauslinien, wie z.B. der hepatischen LRP1-ko Linie, wäre in der AAS-Messung denkbar. So ließen sich mittels der Cadmiumkonzentration einzelner Organe weitere quantitative Aussagen zu der Rolle einzelner Proteine bei der Lipoproteinaufnahme treffen. Bei den beschriebenen Experimenten wurden neben den oben erwähnten Organen ebenso die Knochen (Femur) herausgenommen. Da diese eine große Rolle im Lipidstoffwechsel (Hussain et al., 1989) spielen, wäre eine mikroskopische Untersuchung, die bisher an der Anfertigung der benötigten Cryoschnitte scheiterte, denkbar.

Ein Einsatz verschieden farbiger Nanosomen würde weitere Aufschlüsse über die Verstoffwechselung der Lipoproteine zulassen. Dies wäre bspw. in der Stoffwechseldynamik von Bedeutung. Durch das Legen eines Katheters in die Schwanzvene einer Maus könnten zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils verschiedenfarbige Nanosomen injiziert und so die Kinetik des Lipoproteinstoffwechsels untersucht werden.

Eine weitere Entwicklung der in dieser Arbeit geschilderten Methodik ist für zukünftige diagnostische Anwendung im Hinblick auf die bisher noch unbeschriebene Früherkennung von atherosklerotischen Plaques denkbar und hätte weitreichende medizinische und pharmazeutische Konsequenzen. Für die Pathogenese der Atherosklerose ist der HDL-Stoffwechsel von besonderem Interesse, da HDL eine vasoprotektive Rolle zukommt, weil es bei dem Rücktransport von Cholesterin aus der Peripherie- insbesondere aus Monozyten/Makrophagen der Gefäßwand zur Leber- antiinflammatorische, zytoprotektive und antikoagulante Eigenschaften besitzt und die Fähigkeit hat, Lipidperoxide aus LDL zu inaktivieren (Kostner et al., 2004). Der Gruppe von Mulder gelang es bereits, HDL mit Nanoteilchen zu markieren und für verschiedene biomedizinische Bildgebungsverfahren einzusetzen (Frias et al., 2007; Mulder et al., 2008). Die Anwendung der mit Nanoteilchen markierten HDL auf ein wie in dieser Arbeit beschriebenes *in vivo* Modell, das sich auf die Entstehung der Atherosklerose bezieht, ist bei dem momentanen Stand der Forschung durchaus möglich.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit gelang es, Nanoteilchen *in vivo* als Markierung für den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel anzuwenden. Die aus Lipiden und Halbleiternanoteilchen hergestellten Nanosomen wurden dazu in die Mausvene injiziert und die Maus nach einer gewissen Zirkulationszeit getötet und perfundiert. Die entnommenen Organe (Leber, Milz, braunes Fettgewebe, Muskel, Niere und Herz) wurden direkt gefroren und mittels Cryotom Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte- insbesondere diejenigen der Leber- enthielten Nanoteilchen, die unter Epifluoreszenz- und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie fluoreszierten. Desweiteren konnte eine histologische Technik etabliert werden, die bei gutem Gewebeerhalt die Nanosomenfluoreszenz maximal erhält. Insbesondere wurde hier Rücksicht auf das Perfusionsmedium, die Organkonservierung, die Schnitttechniken, die Schnittfärbungen, die Organ- und Schnittfixierungen, sowie die Eindeckelungsverfahren der Schnitte genommen.

Es gelang, Aussagen hinsichtlich der Organverteilung der Nanosomen in Wildtypmäusen und ApoE-defizienten Mäusen zu treffen. In Leber und Milz waren demnach stets fluoreszierende Nanosomen zu detektieren. Schwache Nanosomenfluoreszenz war im braunen Fettgewebe und im Herzen feststellbar. Die innergewebliche hepatische Lokalisation der Nansomen konnte durch Antikörperfärbungen auf nicht-parenchymale Zellen eingeschränkt werden. Mithilfe der Cadmium vermessenden Atom Absorptions-Spektroskopie (AAS) konnten Unterschiede hinsichtlich der quantitativen Nanosomenverteilung zu verschiedenen Perfusionszeitpunkten nach Nanosomeninjektion in Wildtypmäusen ausgemacht werden. So ließ sich in allen Wildtyporganen zum Perfusionszeitpunkt 20’ weniger Cadmium als zum Zeitpunkt 180’ nachweisen. Die qualitativen Aussagen aus der Mikroskopie wurden quantitativ ergänzt.

Die Untersuchungen dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass die *in vivo* Anwendung von fluoreszierenden Nanoteilchen als Markierungen ein praktikables zukunftsträchtiges Modell darstellt.

Literaturverzeichnis

(Abdelwahab et al., 2003) Abdelwahab SA, Owada Y, Kitanaka N, Iwasa H, Sakagami H, Kondo H, Localization of brain-type fatty acid-binding protein in Kupffer cells of mice and its transient decrease in response to lipopolysaccharide. *Histochem Cell Biol*, 2003, 119:469-475.

(Anant und Davidson, 2001) Anant S, Davidson NO, Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing. *Curr Opin Lipidol*, 2001, *12,* 159-65.

(Austyn and Gordon, 1981) Austyn JM, Gordon S, F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*, 1981, 11: 805-15.

(Ballou et al., 2003) Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS, Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice. *Bioconjugate Chem*, 2003, 15 (1): 79-86.

(Bertram and Weller, 2002) Bertram D, Weller H, Zwischen Molekül und Festkörper. *Physik Journal*, 2002, 1 (2): 47-52.

(Beigneux et al., 2007) Beigneux AP, Davis BSJ, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, Peale F, Bunting S, Walzem RL, Wong JS, Blaner WS, Ding ZM, Melford K, Wongsiriroj N, Shu X, Sauvage F, Ryan RO, Fong LG, Bensadoun A, Young SG, Glycosylphosphatidylinositol-anchored High-Density Lipoprotein-Binding Protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metabolism*, 2007, 5: 279-91.

(Beisiegel et al., 1989) Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK, The LDL-receptor-related protein, LRP, is an Apolipoprotein E binding protein. *Nature*, 1989, 341: 162-4.

(Beisiegel et al., 1991) Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G, Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci* USA, 1991, 88, 8342-46.

(Bodzioch et al., 1999) Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Özcürümen M, Kaminski W E, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner K J, Schmitz G, The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature Genetics* , 1999, 22, 347-351.

(Bruchez et al., 1998) Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP, Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. 1998, 281: 2013-16.

(Bruns et al., 2009) Bruns OT, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Lauterwasser J, Nikolic MS, Mollwitz B, Merkel M, Bigall NC, Sapra S, Reimer R, Hohenberg H, Weller H, Eychmüller A, Adam G, Beisiegel U, Heeren J, Real-time magnetic resonance imaging and quantification of lipoprotein metabolism in vivo using nanocrystals. NatNanotechnol, 2009, 4 (3):193-201.

(Choi et al., 2007) Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ipe BI, Bawendi MG, Frangioni JV, Renal clearance of quantum dots. Nature Biotechn, 2007, 25 (10):1165-70.

(Corder et al., 1993) Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA, Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science,* 1993, 261, 921-3.

(Dambach et al., 2002) Dambach DM, Watson LM, Gray KR, Durham SK, Laskin DL, Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology*, 2002, 35 (5):1093-1103.

(Derfus et al., 2003) Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN, Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett*, 2004, 4 (1):11-18.

(Durbertret et al., 2002) Durbertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A, In vivo Imaging of Quantum Dots Encapsulated in Phospholipid Micelles. *Science*, 2002, 298 (5599): 1759-1762.

(Eychmüller, 2000) Eychmüller A, Structure and Photophysics of Semiconductor Nanocrystals. *J Phys Chem B*, 2000, 104 (28): 6514-28

(Folch et al., 1956) Folch J, Lees M, Stanley S, A simple Method for the Isolation and Purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 1957, 226 (1):497-509

(Frias et al., 2007) Frias MJ, Lipinski SE, Albelda MT, Modified lipoproteins as contrast agents for imaging of atheriosclerosis. *Contrast Media Mol. Imaging,* 2007, *2*: 16-23.

(Glomset et al., 1968) Glomset JA, The plasma lecithin:cholesterol-acyltransferase reaction. *J of Lipid Res*, 1968, 9:155-167.

(Green, 2004) Green M, Halbleiter-Quantenpunkte als biologische Imaging-Substanzen. *Angew Chem Int,* 2004, 116, 4221-23.

(Havel and Kane, 2001) Havel RJ, Kane JP, Introduction: Structure and Metabolism of plasma lipoproteins. In: Scriver C, Beaudet A, Valle D, Sly W (Hg.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease,* 2.Aufl., Kapitel 114, New York/McGraw, 2001, 2705-2716.

(Heeren et al., 2001) Heeren J, Grewal T, Jackle S, Beisiegel U, Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J Biol Chem*, 276 (45): 42333-8.

(Heeren et al., 2002) Heeren J, Grewal T, Laatsch A, Rottke D, Rinninger F, Enrich C, Beisiegel U, Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J Biol Chem*, 2002, 278 (16): 14370-8.

(Heeren et al., 2003) Heeren J, Grewal T, Laatsch A, Rottke D, Rinninger F, Enrich C, Beisiegel U, Recycling of apoprotein E is associated with cholsesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J Biol Chem*, 278 (16): 14370-8.

(Herz et al., 2001) Herz J, Strickland DK, LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest*, 2001, 108: 779-84.

(Hussain et al., 1989) Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Lindquist PA, Brecht WJ, Innerarity TL, Chylomycron Metabolism- Chylomicron Uptyke by Bone-marrow in different animal Species. J Biol Chem, 1989, 264: 17931-17938.

(Ishibashi et al., 1994) Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS, The two-receptor model of lipoprotein clearance: Tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 4431-35.

(Josephson et al., 2002) Josephson L, Kircher MF, Mahmood U,Tang Y, Weissleder R, Near-infrared fluorescent nanoparticles as combined MR/optical imaging probes. *Bioconjugate Chem.*, 2002, 13 (3): 554–560.

(Kim et al., 2004) Kim S, Lim YT, Soltesz EG, Grand De AM, Lee J, Nakayama A, Parker JA, Mihaljevic T, Laurence RG, Dor DM, Cohn LH, Bawendi MG, Frangioni JV, Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nature Biotechnol*, 2004, 22: 93-7.

(Kostner et al., 2007) Kostner GM, Scharnagel H, Kostner K, März W. Einleitung: Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In: Schwandt P, Parhofer PG (Hg.). *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*, 3. Aufl., Stuttgart/New York, 2007, 1-66.

(Kühnel, 2002) Kühnel W, Verdauungsorgane. In: *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie,* 11. Aufl., Stuttgart/New York, 2002, 318-28.

(Laatsch, 2002) Laatsch A, Überexpression und Funktionsanalyse von LDL-Rezeptor-related Proteinmittels viralem Gentransfer. *Master's thesis,* Universität Hamburg.

(Mahley et al., 1999) Mahley RW, Huang Y, Rall SC, Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): questions, quandaries. *J of Lipid Res*, 1999, 40: 1933-49.

(Martins et al., 2000) Martins IJ, Hone E, Chi C, Seydel U, Martins RN, Redgrave TG, Relative role of LDLr and LRP in the metabolixm of chylomicron remnants in genetically manipulated mice. *J of Lipid Res,* 2000, 41: 205-13.

(May and Herz, 2003) May P, Herz J, LDL receptor related proteins in neurodevelopment. *Traffic*, 2003, 4: 291-301.

(Mednitz et al., 2008) Mednitz IL, Mattoussi H, Clapp AR, Potential clinical applications of quantum dots. *Int J Nanomedicine,* 2008, 3 (2): 151-167.

(Merkel et al., 2005) Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, Laatsch A, Heeren J, Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem*, 2005, 280 (22): 21553-60.

(Michalet et al., 2005) Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S, Quantum dots for live cells, in vivo imaging and diagnostics. *Science*, 2005, 307(5709):538-44.

(Mortensen et al., 2008) Mortensen LJ, Oberdörster G, Pentland AP, DeLouise LA, In Vivo Skin Penetration of Quantum Dot Nanoparticles in the Mureine Model: The Effect of UVR. *Nano Lett*, 2008, 8 (9):2779-87.

(Mulder et al., 2006) Mulder WJM, Koole R, Brandwijk RJ, Storm G, Chin PTK, Strijkers GJ, Donega CdM, Nicolay K, Griffioen AW, Quantum dots with paramagnetic coating as a bimodal molecular imaging probe. Nano Lett, 2006 g (1): 1-6.

(Murray et al., 1993) Murray CB, Norris DJ, Bawendi MG, Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E=S, Se,Te) Semiconductor Nanocrystallites. *J Am Chem Soc,* 1993, 115 (19):8706-15.

(Nabiev et al., 2007) Nabiev I, Mitchell S, Davies A, Williams Y, Kelleher D, Moore R, Gun'ko YK, Byrne S, Rakovich YP, Donegan JF, Sukhanova A, Conroy J, Cottel D, Gaponik N, Rogach A, Volkov Y, Nonfunctionalized Nanocrystals can exploit a cell's active transport machinery delivering them to specific nuclear and cytoplasmic compartments. Nano Lett, 2007, 7 (11): 3452-61.

(Oram et al., 2000) Oram JF, Tangier disease and ABCA1. *Biochimica et Biophsica Acta*, 2000, 1529: 321-30.

(Redgrave et al., 1985) Redgrave TG, Maranhao RC, Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. *Biochimica et Biophsica Acta*, 1985, 835:104-112.

(Redgrave et al., 1993) Redgrave TG, Ly HL, Quintao EC, Ramberg CF, Boston RC, Clearance from plasma of triacylglycerol and cholesteryl ester after intravenous injection of chylomicron-like lipid emulsions in rats and man. *Biochem J*, 1993, 290 (Pt3): 843-847.

(Rensen et al., 2001) Rensen PC, de Vrueh RL, Kuiper J, Bijsterbosch MK, Biessen EA, van Berkel TJ, Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47: 251-276.

(Rust et al., 1999) Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette J C,

Deleuze J F, Brewer H B, Duverger N, Denèfle P, Assmann G, Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature Genetics*, 1999, 22: 352-355.

(Schmundt und Verbeet, 2008) Schmundt H, Verbeet M, Kleine Teilchen, großes Risiko. *Der Spiegel*, 2008, 24: 148-50.

(Schooneveld et al., 2008) Schooneveld MM van, Vucic E, Koole R, Zhou Y, Stocks J, Cormaode DP, Tang YC, Gordon RE, Nicolay K, Meijerink A, Fayad ZA, Mulder WJM, Improved Biocompatibility and Pharmacokinetics of Silica Nanoparticles by Means of a Lipid Coating: A Multimodality Investigation. *Nano Lett*, 2008, 8 (8): 2517-25.

(Segrest et al., 1974) Segrest JP, Jackson RL, Morrisett JD, Gotto AM Jr, A molecular theory of lipid-protein interaction in the plasma lipoproteins. *FEBS Letters,* 1974, 38 (3):247-53.

(Sonoda et al, 2006) Sonoda Y, Sasaki K, Three-dimensional surface structure of macrophages in fetal and adult mouse liver: an immunohistochemical light microscopic study. Cells Tissues Organs, 2006, 184: 166-71.

(Tekle et al., 2008) Tekle C, van Deurs B, Sandvig K, Iversen TG, Cellular trafficking of quantum dot-ligand bioconjugates and their induction of changes in normal routing of unconjugated ligands. Nano lett, 2008, 8 (7): 1858-65.

(Vinas et al., 2003) Vinas O, Betaner R, Sancho-Bru P, Gines P, Berenguer C, Enrich C, Nicolas JM, Ercilla G, Gallart T, Vives J, Arroyo V, Rodes J, Human hepatic stellate cells show features of antigen-resenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. Hepatology, 2003, 38: 919-29.

(von Eckardstein et al., 2001) von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G, High Density Lipoproteins and Arteriosclerois Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21: 13-27.

(Wang et al., 2005) Wang X, Zhuang J, Peng Q, Li Y, A general strategy for nanocrystal synthesis. *Nature*, 2005, 437: 121-24.

Danksagung

Mein Dank gilt *Prof. Ulrike Beisiegel* für die Ermöglichung dieser interessanten Arbeit. Für die in jeder Hinsicht großartige Betreuung und herzliche Unterstützung während des Fortgangs meiner Arbeit danke ich *Dr. Oliver Bruns* sowie allen Mitgliedern des Arbeitskreises im Institut für Molekulare Zellbiologie.

Für die freundliche Zusammenarbeit, welche die interdisziplinäre Bearbeitung dieser Fragestellung ermöglichte, danke ich *Prof. Udo Schumacher* und seinen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den

Carla Edeling