



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fakultät Life Sciences

**Quantitative mikroskopische Charakterisierung von *lipid droplets* in  
chronisch HCV-infizierten Leberkrebszellen nach Stimulation mit Fettsäuren**

---

**Bachelorarbeit**  
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von  
**Pavel Truschow**  
2001678

Hamburg  
23. April 2015

<b>1. Gutachter:</b>	<b>Prof. Dr.</b>	<b>Jörg Andrä</b>	<b>(HAW Hamburg)</b>
<b>2. Gutachterin:</b>	<b>Dr.</b>	<b>Eva Herker</b>	<b>(Heinrich-Pette-Institut)</b>

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde im Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für experimentelle Virologie in der Arbeitsgruppe "HCV Replikation" durchgeführt.

## Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Ich bin damit einverstanden, dass diese Arbeit in der Bibliothek der Fakultät Life Sciences der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg ausgelegt sowie auf elektronischem Weg z.B. im Internet Interessenten zugänglich gemacht wird.

Hamburg, den 23. April 2015

---

(Pavel Truschow)

## Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	VII
1. Einleitung und Theorie.....	1
1.1. Das Hepatitis C-Virus.....	1
1.2. Die Leber(-Zelle) als Organ(-ismus).....	3
1.3. Funktion von <i>lipid droplets</i> .....	4
1.4. Fettsäuren.....	4
1.4.1. Gesättigte Fettsäuren.....	5
1.4.2. Ungesättigte Fettsäuren.....	6
1.5. Fluoreszenzmikroskopie und Bildverarbeitung .....	8
1.6. Zielsetzung .....	12
2. Geräte und Chemikalien.....	13
2.1. Geräte.....	13
2.2. Bakterienstämme.....	13
2.3. Zelllinien.....	14
2.4. Chemikalien .....	14
2.5. Fettsäuren.....	14
2.6. Medien .....	14
2.7. Puffer .....	15
2.8. Antikörper und weitere Enzyme .....	15
2.9. Färbereagenzien.....	15
2.10. Reagenzsysteme, Kits .....	15
2.11. Software.....	15
3. Methoden .....	16
3.1. Zellkultur .....	16
3.2. Bakterienkultur.....	16
3.3. Herstellen von viraler RNA und Viren.....	16
3.3.1. Extraktion von Plasmiden aus <i>E. coli</i> im Maxi-Maßstab .....	16
3.3.2. DNA-Verdau, -Aufreinigung und <i>in vitro</i> -Transkription.....	16
3.3.3. Transfektion durch Elektroporation.....	18
3.3.4. Virusproduktion und –ernte .....	18
3.4. Infektion und Selektion.....	18
3.5. Behandlung mit Fettsäuren .....	19

3.6. Fluoreszenzmikroskopie .....	19
3.7. Bildanalyse und Datengewinn .....	20
4. Ergebnisse .....	21
4.1. Dekonvolution von Fluoreszenz-Aufnahmen zur verbesserten 3D-Darstellung von <i>lipid droplets</i> .....	21
4.2. Elongationsfaktor der Aufnahmen .....	22
4.3. Immunofluoreszenz-Färbung HCV infizierter <i>Huh7.5</i> -Zellen zur Infektionskontrolle ...	24
4.4. Mikroskopische Analyse und 3D Darstellung von <i>lipid droplets</i> in HCV-infizierten Zellen nach Fettsäure-Behandlung .....	25
4.5. Quantitative Analyse der <i>lipid droplets</i> in HCV-infizierten Zellen nach Fettsäure-Behandlung .....	28
5. Diskussion .....	31
5.1. Dekonvolution und Elongationsfaktor .....	31
5.2. Mikroskopie von HCV-infizierten Fettsäure-behandelten <i>Huh7.5</i> -Zellen .....	32
5.3. Einzel- und Gesamtvolumen und Anzahl der <i>lipid droplets</i> in HCV-infizierten Zellen nach Behandlung mit verschiedene Fettsäuren .....	33
6. Ausblick .....	36
7. Literaturverzeichnis .....	38
8. Anhang .....	i
8.1. Quellcode des Programms für Auswertung von csv-Dateien .....	i
8.2. Quellcode für NIS Elements zum Konvertieren von *.nd2-Dateien ins *.ics/*.ids-Format für AutoQuant X2 und Bereitstellen von MIPs .....	iii
8.3. Quellcode für Angleichen von Dateinamen mit Windows-Kommandozeilenoperator (*.bat) .....	iii
8.4. Einstellungen für Imaris 7.6.4 zur Detektion von <i>lipid droplets</i> (*.xml) .....	iii

## Abkürzungsverzeichnis

(E)GFP	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
*	<i>Student's T-Test</i> Wahrscheinlichkeit $P \leq 0,05$ (5%)
**	<i>Student's T-Test</i> Wahrscheinlichkeit $P \leq 0,01$ (1%)
***	<i>Student's T-Test</i> Wahrscheinlichkeit $P \leq 0,001$ (0,1%)
****	<i>Student's T-Test</i> Wahrscheinlichkeit $P \leq 0,0001$ (0,01%)
°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
AA	Arachidonsäure ( <i>arachidonic acid</i> )
ALA	α-Linolensäure ( <i>alpha linolenic acid</i> )
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsd	Blasticidin
bspw.	beispielsweise
CI	Konfidenz-/Vertrauensintervall ( <i>confidence intervall</i> )
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DHA	Docosahexaensäure ( <i>-acid</i> )
DIC	Differentialinterferenzkontrast ( <i>-contrast</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
EPA	Eicosapentaensäure ( <i>-acid</i> )
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
<i>g</i>	$9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$
g, mg, µg, ng, etc.	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm usw.
GLA	γ-Linolensäure ( <i>gamma linolenic acid</i> )
h	Stunde, <i>hour</i>
HCV	Hepatitis C-Virus
IC	<i>iterative constrained</i>
Jc1	Hepatitis C Virus-Stamm (J6C3/JFH1 Chimäre)
JFH1	<i>japanese fulminant hepatitis-1</i> , Hepatitis C-Virus
L, mL, µL, etc.	Liter, Milliliter, Mikroliter usw.
LD	<i>lipid droplets</i> , Fetttröpfchen
M, mM	molar, millimolar
min	Minute
MLE	<i>maximum likelihood estimation</i>
mm, µm, nm	Milli-, Mikro-, Nanometer ( $1\cdot 10^{-3} \text{ m}$ , $1\cdot 10^{-6} \text{ m}$ , $1\cdot 10^{-9} \text{ m}$ )
PFA	Paraformaldehyd
pxl	Pixel
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm, Upm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Verlaufs einer Hepatitis C-Infektion. Aufgezeigt: Das Eindringen in die Wirts-/Leberzelle (1), das Freisetzen von HCV-RNA (2), die Translation am endoplasmatischen Retikulum (ER) der Wirtszelle (3) mit Struktur- und Nichtstrukturproteinen, die RNA-Replikation im <i>membranous web</i> (4), das Zusammensetzen des Virus mit Beteiligung der <i>lipid droplets</i> (5) sowie das Reifen des Virus während der Exocytose (6) und das Ausschleusen der lipoviralen Partikeln aus der Zelle (7) (Herker and Ott, 2011). .....	1
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des HCV-Genoms anhand von JFH1 mit resultierenden Proteinen und deren Funktion (Lindenbach and Rice, 2005).....	2
Abbildung 1-3: Schemen von HCV-Konstrukten mit unterschiedlichen klonierten Markern (Webster et al., 2013).....	3
Abbildung 1-4: gesättigte Fettsäuren (Quelle <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/">www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/</a> ). .....	6
Abbildung 1-5: ungesättigte Fettsäuren (Quelle: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/">www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/</a> ). .....	7
Abbildung 1-6: Spektrum von Alexa Fluor 488. Anregung mit blauem Laser ( $\lambda=488$ nm) (gestrichelt), Emissionsmaximum bei $\lambda=520$ nm (Fläche).....	9
Abbildung 1-7: Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskops (Aescht et al., 2010).....	10
Abbildung 1-8: Vergleich von PSF nach o.g. Verfahren. PSF mit sphärischer Aberration (A-C) und ohne (D) dargestellt. xz-Projektion nach der ersten Schätzung der PSF des <i>Blind</i> -Algorithmus (A). xz-Projektion der PSF nach weiteren Iterationsschritten mit dem <i>Blind</i> -Algorithmus (B). Theoretisch errechnete PSF mit <i>non-Blind</i> -Algorithmus (C). Theoretisch errechnete PSF ohne sphärische Aberration (D) (aus Holmes et al., 2006). .....	11
Abbildung 1-9: Darstellung der Verschiebung des Strahlengangs durch Medien unterschiedlicher Brechungsindizes (A). Darstellung resultierend aus der sphärischen Aberration und das echte Objekt (B). Elongation von sphärischen Objekten entlang der optischen Achse (C) (Visser and Oud, 1994). .....	12
Abbildung 4-1: MIP ( <i>maximum intensity projection</i> ) einer Test-Aufnahme von <i>Huh7.5</i> -Zellen in einem IBIDI mit einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop (nicht konfokal), 60x 1,49 NA Öl-Objektiv. Die Original-Aufnahme wurde jeweils mit 75 Iterationen im <i>Blind</i> - bzw. <i>non-Blind</i> -Algorithmus berechnet. Die Bilder zeigen jeweils denselben Ausschnitt, bzw. die Vergrößerung. Maßstabsbalken und die Größe der Quadrate der 3D-Darstellung sind auf 10 $\mu\text{m}$ eingestellt.....	21
Abbildung 4-2: Langzeitinfizierte <i>Huh7.5</i> -Zellen nach Stimulation mit Albumin (A-D) bzw. Arachidonsäure (E-G), Aufnahmen gerendert in Imaris für Volumendarstellung. <i>Lipid droplets</i> vor Entfaltung mit Elongation in z-Achse (A), <i>lipid droplets</i> vor Entfaltung unter Beachtung des Elongationsfaktors von 2,5 in z-Achse (B), <i>lipid droplets</i> aus A und B im Vergleich (C), <i>lipid droplets</i> nach Entfaltung (D), <i>lipid droplets</i> nach Entfaltung mit Elongation in z-Achse (E), <i>lipid droplets</i> nach Entfaltung unter Beachtung des Elongationsfaktors von 2,5 in z-Achse (F), <i>lipid droplets</i> aus E und F im Vergleich (G). .....	23

- Abbildung 4-3: Langzeitinfizierte *Huh7.5*-Zellen nach Stimulation mit Albumin (A), ALA (B), Arachidonsäure (C) und Ölsäure (D). Darstellung der *lipid droplets* nach Entfaltung, ohne Elongationsfaktor (gelb) und nach Anwenden des Elongationsfaktors von 2,5 (rot)..... 24
- Abbildung 4-4: Infektionskontrolle mit Myristinsäure behandelte, infizierte *Huh7.5*-Zellen 30 Tage nach Infektion. Die DIC-Aufnahmen wurden in ImageJ mit FFT-Bandpass optimiert, Zellkern und HCV  $\alpha$ -Core wurden über das *pure denoise* Plug-In (EPFL, *École Polytechnique Fédérale de Lausanne*) mit 10 Iterationen geglättet. Zusammengesetztes Bild zeigt Zellkern in blau, Immunfluoreszenzmarker des HCV Core in rot und die Zellmembran in Graustufen. Maßstabsbalken wurde auf je 10  $\mu\text{m}$  eingestellt. .... 25
- Abbildung 4-5: Exemplarische Originalaufnahmen repräsentativ ausgewählter HCV-infizierter *Huh7.5*-Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Fettsäuren. 3D-Darstellung entfalteter *lipid droplets* unter Berücksichtigung des Elongationsfaktors. Graustufenbilder nicht entfalteter Zellen, mit ImageJ und *pure denoise* Plug-In (EPFL, *École Polytechnique Fédérale de Lausanne*) mit 10 Iterationen geglättet. Im zusammengesetzten Bild sind Zellkern in blau, *lipid droplets* in rot und die Zelle in Graustufen dargestellt. Die Größe der Quadrate der 3D-Darstellungen und Maßstabsbalken sind auf 10  $\mu\text{m}$  eingestellt worden. .... 27
- Abbildung 4-6: Verteilung einzelner Volumina stimulierter *lipid droplets*. Mindestvolumen 0,092  $\mu\text{m}^3$ . Ein Punkt stellt ein *lipid droplet* dar. Fehlerbalken sind als Konfidenzintervall (95% CI) um den geometrischen Mittelwert dargestellt (Geometrischer Mittelwert  $\pm$  95% CI,  $n > 427$ ,  $*P \leq 0,05$ ,  $**P \leq 0,01$ ,  $***P \leq 0,001$ ,  $****P \leq 0,0001$ ). .... 28
- Abbildung 4-7: Verteilung der Gesamtvolumina. Ein Punkt stellt das kumulierte Volumen der *lipid droplets* einer Zelle dar (Geometrischer Mittelwert  $\pm$  95% CI,  $n=10$ ). .... 29
- Abbildung 4-8: Anzahl der *lipid droplets* pro Zelle und Stimulanz (Geometrischer Mittelwert  $\pm$  95% CI,  $n=10$ ). .... 30

## Zusammenfassung

Die Infektion mit dem Hepatitis C-Virus (HCV), einem einsträngigen RNA-Virus und Vertreter der *Flaviviridae*, kann bei chronischen Verläufen die Ausbildung von Leberzirrhosen, Fibrosen, Steatosen (Fettleber) oder Leberkrebs zur Folge haben. Hepatitis C-Viren sind zur Vermehrung auf den zellulären Lipidstoffwechsel angewiesen. Das Assemblieren neuer Viren geschieht beispielsweise an zellulären *lipid droplets* (LD, Speicherorganellen für neutrale Lipide). Der Lipidmetabolismus einer Zelle kann durch die Behandlung mit verschiedenen Fettsäuren aber auch durch HCV-Infektion beeinflusst werden.

Ziel dieser Arbeit war die quantitative Untersuchung der Größe und Verteilung von *lipid droplets* in chronisch HCV-infizierten Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Fettsäuren mittels Konfokal-Mikroskopie.

Eine 24-stündige Behandlung chronisch HCV-infizierter *Huh7.5*-Zellen mit gesättigten, einfach- und mehrfachungesättigten Fettsäuren hat gezeigt, dass das Gesamtvolumen der *lipid droplets* dieser Zellen durch die Behandlung meist leicht erhöht wird. Die Anzahl der *lipid droplets* pro Zelle variierte stark und lässt keinen Trend zwischen den Behandlungen erkennen. Die Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen hinsichtlich der einzelnen durchschnittlichen LD-Volumina fallen insgesamt gering aus, einige Fettsäuren können die Volumen der einzelnen *lipid droplets* in Zellen jedoch im Mittel signifikant erhöhen.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit war, die Bildverarbeitung für die volumetrische Auswertung der Daten zu optimieren. Es hat sich gezeigt, dass die Dekonvolution als Bildverarbeitungsschritt für die nachfolgende Darstellung und Quantifizierung in 3D eine positive Wirkung aufweist. Der hier verwendete *Blind-Algorithmus* ermöglichte die aufgenommenen Signale der *lipid droplets* gleichmäßig darzustellen und schärfer abzugrenzen, was die Segmentierung wesentlich vereinfacht hat.



## 1. Einleitung und Theorie

### 1.1. Das Hepatitis C-Virus

Weltweit sind derzeit 130-150 Millionen Menschen, ca. 3% der gesamten Weltbevölkerung, chronisch mit dem Hepatitis C-Virus (HCV) infiziert (WHO, 2014). Das Hepatitis C-Virus, ein Vertreter der *Flaviviridae*, ist bei chronischem Infektionsverlauf ursächlich für verschiedene Lebererkrankungen. Hierzu zählen Leberzirrhose, Fibrose, Steatose (Fettleber) und Leberkarzinome (Leberkrebs). Etwa 500.000 Infizierte sterben jährlich aufgrund einer chronischen HCV-Infektion. Auch wenn eine Infektion behandelbar ist, ein Impfstoff ist derzeit nicht vorhanden.

Eine Infektion mit dem Virus erfolgt fast ausschließlich über Blut. Das Virus gelangt in die Zelle durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose (Abbildung 1-1). Angrenzende Zellen können ebenfalls infiziert werden (*Spreading*). Die Mechanismen sind hierbei die Infektionsübertragung zwischen den Zellen, bspw. durch Exosomen, über Zell-Zell-Kontakte oder das Ausschleusen der Viruspartikel in den Zellzwischenraum (Ramakrishnaiah et al., 2013; Liu and He, 2013). Das Virus wirkt dabei nicht lytisch auf die infizierten Zellen.

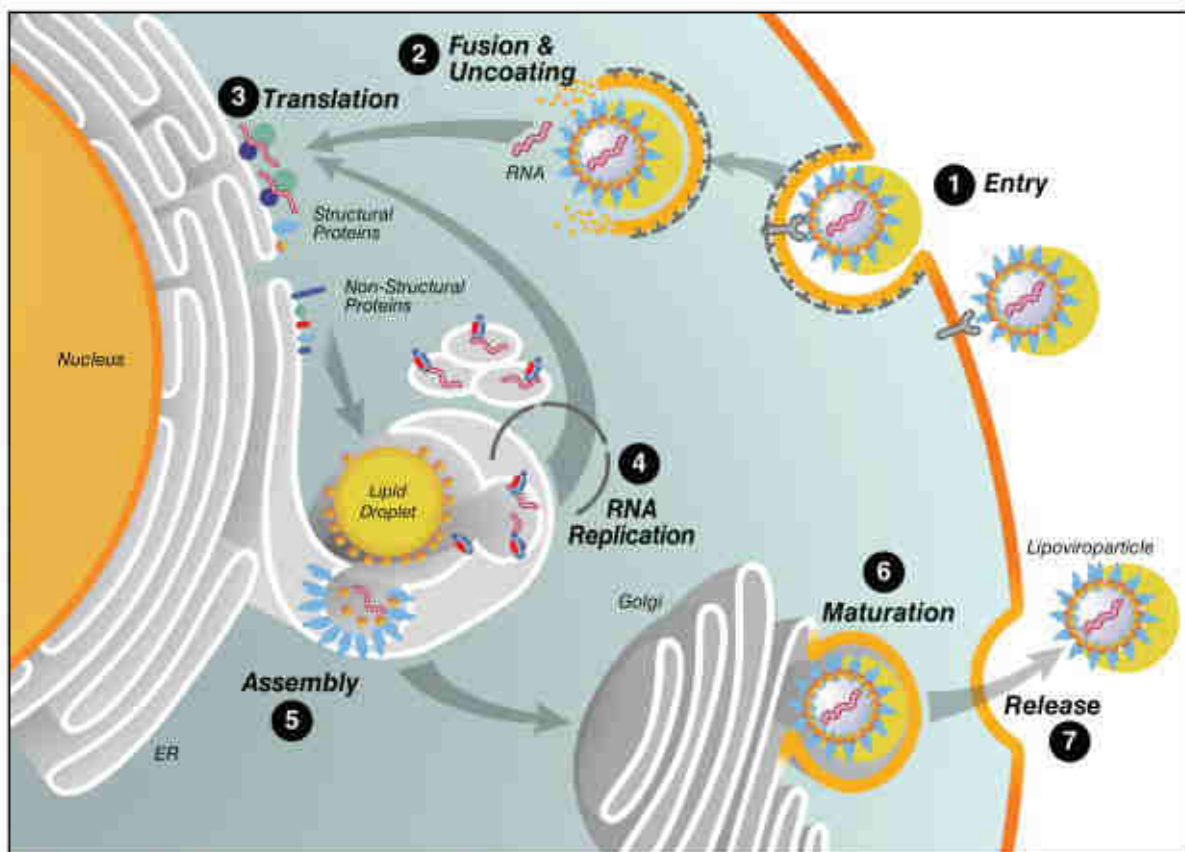
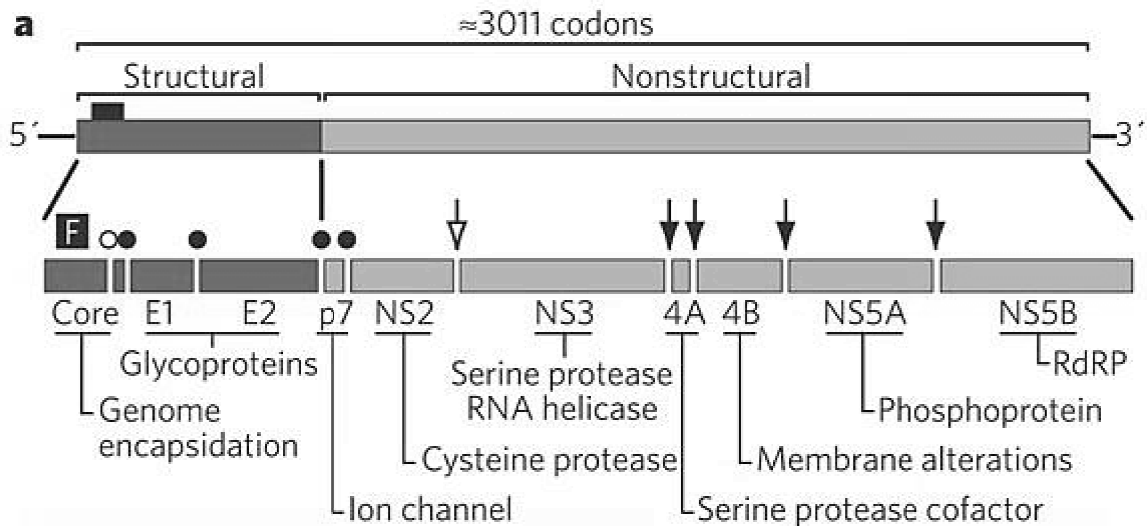


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Verlaufs einer Hepatitis C-Infektion. Aufgezeigt: Das Eindringen in die Wirts-/Leberzelle (1), das Freisetzen von HCV-RNA (2), die Translation am endoplasmatischen Retikulum (ER) der Wirtszelle (3) mit Struktur- und Nichtstrukturproteinen, die RNA-Replikation im *membranous web* (4), das Zusammensetzen des Virus mit Beteiligung der *lipid droplets* (5) sowie das Reifen des Virus während der Exocytose (6) und das Ausschleusen der lipoviralen Partikeln aus der Zelle (7) (Herker and Ott, 2011).

Das Hepatitis C-Virus ist ein behülltes ss(+)RNA-Virus (positiv, einzelsträngig) und besitzt ein Genom aus etwa 9.600 bp, welches ein etwa 3.000 Aminosäuren langes Polyprotein kodiert. Dieses Polyprotein wird ko- und posttranslational zu zehn Proteinen prozessiert. Die Proteine lassen sich in Struktur- und nichtstrukturelle Proteine einordnen. So zählen Core, E1 und E2 zu den Strukturproteinen, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B zu den nichtstrukturellen Proteinen (vgl. Abbildung 1-2).



**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des HCV-Genoms anhand von JFH1 mit resultierenden Proteinen und deren Funktion (Lindenbach and Rice, 2005).**

Wie andere Vertreter der *Flaviviridae* benötigt auch das HCV den zellulären Lipidstoffwechsel zur Vermehrung. Zum Beispiel wird das Virus unter Beteiligung von *lipid droplets* am endoplasmatischen Retikulum (ER) assembliert (Miyahari et al., 2007; Herker and Ott, 2011).

Das gängige *in vitro* Infektionsmodell ist abgeleitet von dem Hepatitis C-Virus Stamm eines japanischen Patienten mit fulminanter Hepatitis, dem JFH1-Virus (*japanese fulminant hepatitis-1*). JFH1 und hieraus entstandene Chimären können in Zellkultur-Bedingungen untersucht werden (Lindenbach et al., 2005; Pietschmann et al., 2006). Die Infektions- und Replikationswege, Interaktionen und das Ausschleusen des Virus können *in vitro* nachvollzogen werden. Die Replikationseffizienz in der Zellkultur wurde durch Adaptationen optimiert und bis auf das 1000-fache gesteigert (Bartenschlager and Sparacio, 2007; Pietschmann et al., 2008).

Durch die Integration von Reporterproteinen in das virale Genom können infizierte und nicht infizierte Zellen voneinander unterschieden werden. Es hat sich gezeigt, dass das Virus in seinem Verhalten kaum beeinflusst wird, wenn der Reporter zwischen NS5A und NS5B eingebaut ist. Als Reporter können beispielsweise verschiedene Fluoreszenzmarker (GFP, mKO2, RFP und andere) und/oder Antibiotika-Resistenzen (Blasticidin, Neomycin und ähnliche) dienen (Abbildung 1-3) (Webster et al., 2013).

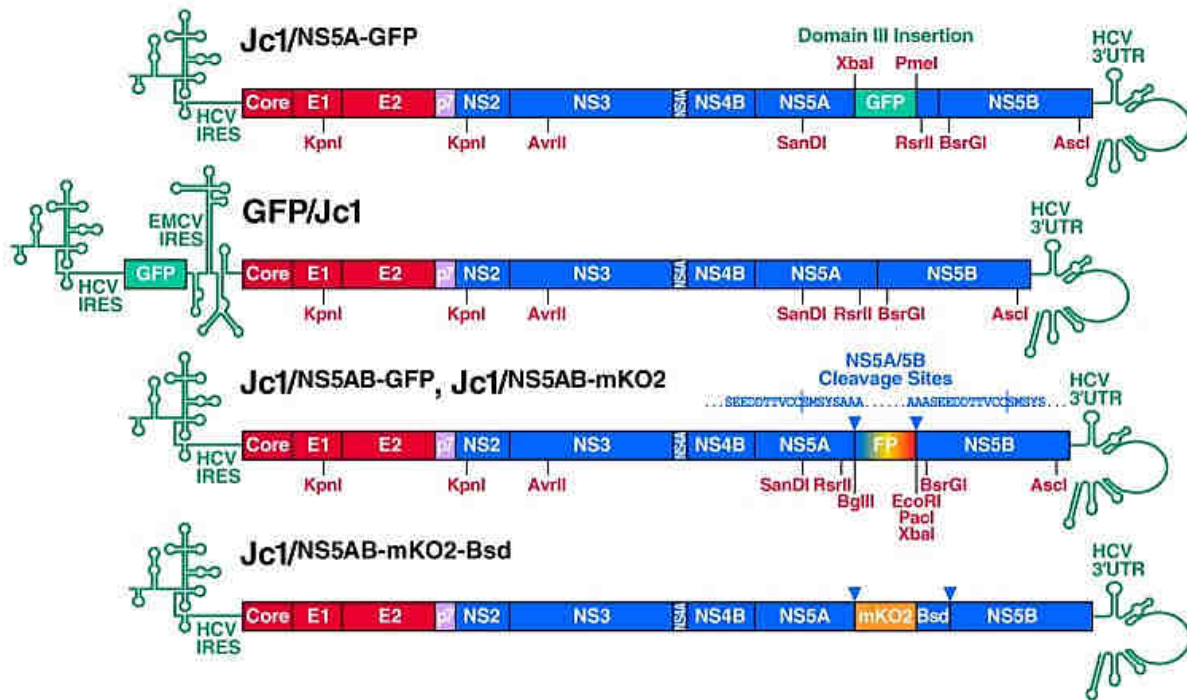


Abbildung 1-3: Schemen von HCV-Konstrukten mit unterschiedlichen klonierten Markern (Webster et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde ein an das  $Jc1/^{NS5AB-mKO2-Bsd}$  angelehntes Konstrukt,  $Jc1/^{NS5AB-Bsd}$  verwendet. Dieses Konstrukt enthält kein Fluoreszenzprotein, jedoch eine Blasticidinresistenz (Bsd) zur Selektion infizierter Zellen.

## 1.2. Die Leber(-Zelle) als Organ(-ismus)

Die Leber ist die größte Drüse im menschlichen Körper und fungiert als zentrales Organ des Verdauungssystems. Sie ist für verschiedene Sekrete ursächlich. Hier werden beispielsweise Gallensekrete zum Verdau von Fetten sekretiert. Auch als Zwischenspeicher für energiereiche Verbindungen und als Ort der Gluconeogenese ist sie unentbehrlich (Clauss and Clauss, 2009). Weiter ist sie zentral für den Wärmehaushalt eines Körpers verantwortlich. Durch die hohe Anzahl an stofflichen Umsätzen besitzt das venöse, aus der Leber abfließende Blut etwa eine Temperatur von 41,3 °C, je nach zu verdauenden Lebensmitteln (Flindt, 2006).

HCV infiziert (fast) ausschließlich humane Leberzellen. Für Experimente unter definierten Bedingungen wurden stabile Leberkrebszelllinien isoliert, die eine hohe Permissivität gegenüber bestimmten Hepatitis C-Virenstämmen besitzen (Bartenschlager and Pietschmann, 2005). Hieraus wurde u.a. die *Huh7.5*-Zelllinie entwickelt, die durch Mutationen und Veränderungen des Genoms leicht zu infizieren ist und eine hohe Replikation sowie Sekretion von Viren aufweist (Zhong et al., 2005).

### 1.3. Funktion von *lipid droplets*

Die in tierischen Zellen vorkommenden *lipid droplets* sind u.a. Speicherorganellen für Triglyceride und Cholesterolester. Sie werden von einem Phospholipid-Monolayer abgeschlossen. Die Lipide orientieren sich hierbei mit dem lipophilen Schwanz zum Inneren der *droplets* und mit dem hydrophilen Kopf zum Cytosol. Im Inneren bestehen sie überwiegend aus Triglyceriden und Cholesterolestern. An der Oberfläche der *lipid droplets* können unterschiedliche Proteine gebunden sein, die z.B. den Auf- und Abbau der *lipid droplets* regulieren und Interaktionen mit anderen Organellen modulieren.

Die Größe der *lipid droplets* ist sehr unterschiedlich und hängt sowohl vom metabolischen Zustand der Zelle als auch vom Zelltyp ab. Von größeren *lipid droplets* können vor der Lipolyse kleinere abgeschnürt werden. Auch der umgekehrte Weg, die Verschmelzung von *lipid droplets* ist möglich. Dies wird durch *lipid droplet* assoziierte Proteine wie FSP27 und PLIN1 initiiert. Derzeit wird davon ausgegangen, dass die Bildung der *droplets* in der ER-Membran stattfindet. ER-ständige Diacylglycerolacyltransferasen (DGAT) katalysieren den letzten Schritt der Synthese von Triglyceriden, was zum Akkumulieren von Triglyceriden zwischen den beiden Blättern der ER-Membran führt, bis sich ein Tropfen gebildet hat, der anschließend abgeschnürt wird. Die so entstandenen *lipid droplets* können weitere Triglyceride aufnehmen und wieder abgeben, das System ist somit nicht statisch (Arrese et al., 2014). Der *Turnover* von *lipid droplets* in Zelllinien wurde mit 24 h beschrieben – wird die Neusynthese von Triglyceriden verhindert, verschwinden während dieser Zeit alle *lipid droplets* in der Zelle (Harris et al., 2011).

Für die HCV-Replikation sind die zellulären *lipid droplets* essentiell (Miyazari et al., 2007). Die viralen Proteine initiieren an *droplet* assoziierten ER-Membranen die RNA-Replikation sowie das Assemblieren neuer Viren. Hierzu wird das HCV Core-Protein von der Diacylglycerolacyltransferase 1 (DGAT1) zusammen mit NS5A vom ER an die *lipid droplets* dirigiert (Herker et al., 2010; Camus et al., 2013). Zusätzlich aktiviert das Core-Protein SREBP-1C, welches die Lipidbiosynthese anregt. Dies hat zur Folge, dass *lipid droplets* angereichert werden (Arrese et al., 2014). Daneben ist NS5A mit dem *Tail-Interacting Protein 47* (TIP47) am ER und den *lipid droplets* kolokalisiert. Es wird angenommen, dass diese stabile Verbindung für die erfolgreiche Vermehrung des HCV in Zellen unerlässlich ist (Vogt et al., 2013).

### 1.4. Fettsäuren

Fettsäuren besitzen einen charakteristischen Aufbau. Auf der einen Seite eines Fettsäuremoleküls ist eine hydrophile Carboxylgruppe (R-COOH) vorhanden. Den Rest des Moleküls bildet eine hydrophobe Kohlenstoffkette mit Wasserstoffatomen. Am Ende der Kette befindet sich eine Methylgruppe.

Fettsäuren werden über den gastrointestinalen Trakt aufgenommen. Fettreiche Nahrung

wird durch die Gallensäure emulgiert und die Lipide durch Lipasen in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Fettsäuren im Blut sind an Albumin gebunden. Hier können bis zu sieben Fettsäuren an einem Albumin-Molekül gebunden sein. Erst hiernach kann dieser Komplex in Leberzellen aufgenommen werden.

In Leberzellen können die aufgenommenen Fettsäuren als Triglyceride in *lipid droplets* gespeichert werden. Über die  $\beta$ -Oxidation in der mitochondrialen Matrix können langkettige Fettsäuren ( $C_n > 12$ ) als Acetyl-CoA in den Citratzyklus eintreten. Sehr langkettige Fettsäuren ( $C_n > 22$ ) werden in Peroxisomen metabolisiert. Weiter sind Fettsäuren als Phospholipide zusammen mit Cholesterin elementare Bestandteile der Zellmembranen aller Lebewesen. Einige Fettsäuren können auch regulatorische Funktionen auf das zelluläre Genom ausüben (Alberts, 1995; Rustan and Drevon, 2001). Außerdem können sie ebenfalls antimikrobielle Eigenschaften besitzen (Kabara et al., 1972).

Gesättigte und ungesättigte Fettsäuren zeigen entgegengesetztes, antagonistisches Verhalten als Signalmoleküle: Gesättigte Fettsäuren üben meist negative Wirkungen auf die Zellen aus (bspw. Stress am endoplasmatischen Retikulum, Apoptose, Steatose), ungesättigte hingegen zeigen solche Effekte nicht. Sie aktivieren meist als positiv geltende Mechanismen: entzündungshemmend, supprimieren die Neubildung von Fetten (*de novo* Lipogenese), beugen Lipotoxizität vor, unterstützen oder fördern die Regeneration der Leber und weitere. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass freie Fettsäuren starke Signalmoleküle sind, die Stoffwechselprozesse, die mit dem Lipidstoffwechsel verbunden sind, regulieren (Papackova and Cahova, 2015).

### 1.4.1. Gesättigte Fettsäuren

Die Kohlenstoffketten von Fettsäuren sind linear und ohne oder mit einer oder mehreren Doppelbindungen ausgestattet. Fettsäuren gänzlich ohne Doppelbindungen werden als gesättigte Fettsäuren bezeichnet. Die Summenformel solcher lässt sich als  $C_nH_{2n+1}COOH$  beschreiben. Die am häufigsten vorkommenden gesättigten Fettsäuren sind Laurin- (12:0), Myristin- (14:0), Palmitin- (16:0) und Stearinsäure (18:0) (Abbildung 1-4). Sie nehmen verschiedene Funktionen im Organismus ein.

Laurinsäure kommt in Triglyceriden, Muttermilch, Kokosöl und Lorbeergewächsen vor und besitzt starke inhibierende Wirkung auf gramnegative Mikroorganismen (Kabara et al., 1972). In humanen Zellen bewirkt diese Fettsäure die Bildung von Cholesterin und hat einen positiven Effekt auf HDL Cholesterin.

Myristinsäure ist in pflanzlichen und tierischen Fetten enthalten. Sie stellt einen hohen Anteil in der Muskatnussbutter dar. Sie spielt, wie Laurinsäure, eine große Rolle in der Herstellung von Seifen.

Palmitin- und Stearinsäure können Stress in Zellen (am endoplasmatischen Retikulum) und den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen.

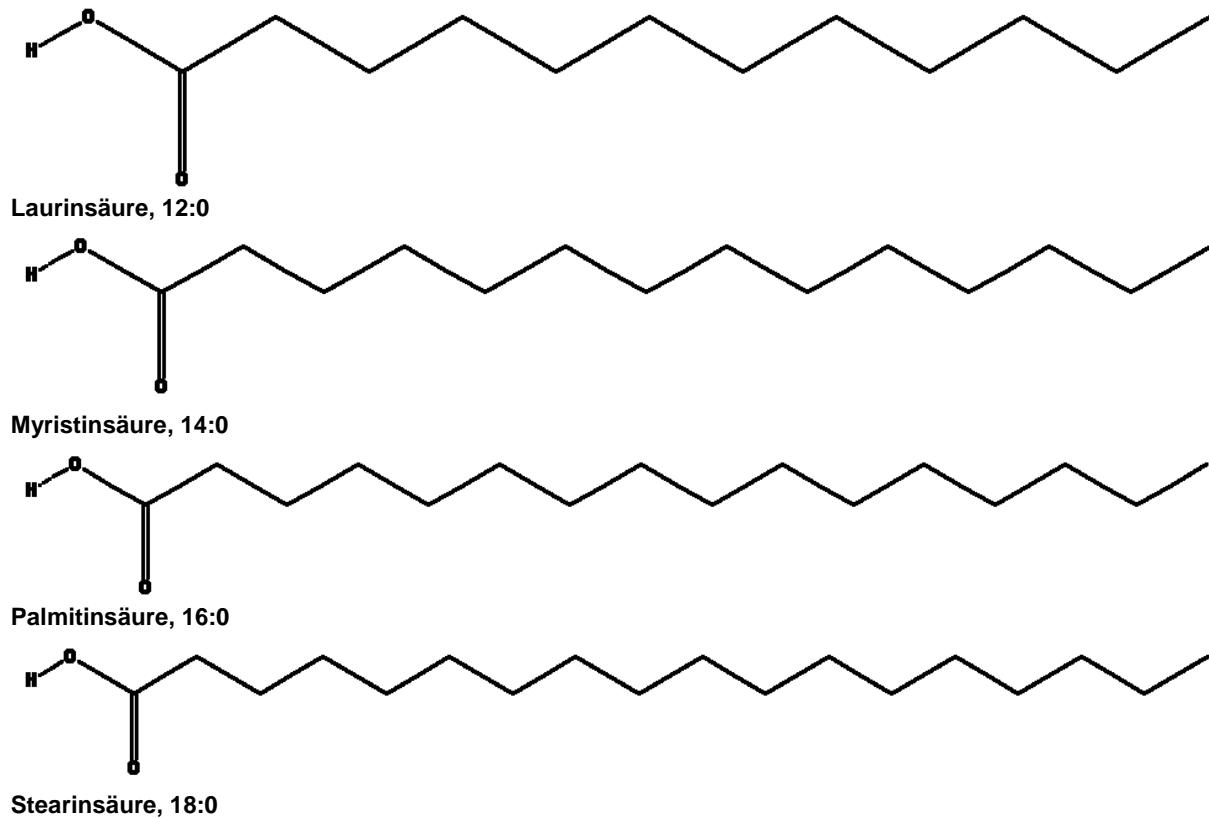


Abbildung 1-4: gesättigte Fettsäuren (Quelle [www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/)).

Gesättigte Fettsäuren können Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLR), insbesondere TLR2 und TLR4, stimulieren. Die Gruppe der TLR gehört zum angeborenen Immunsystem. Sie befinden sich auf der Membranoberfläche von Zellen. Als Gegenspieler werden ungesättigte Fettsäuren angesehen, sie können somit die Immunantwort abschwächen (Papackova and Cahova, 2015).

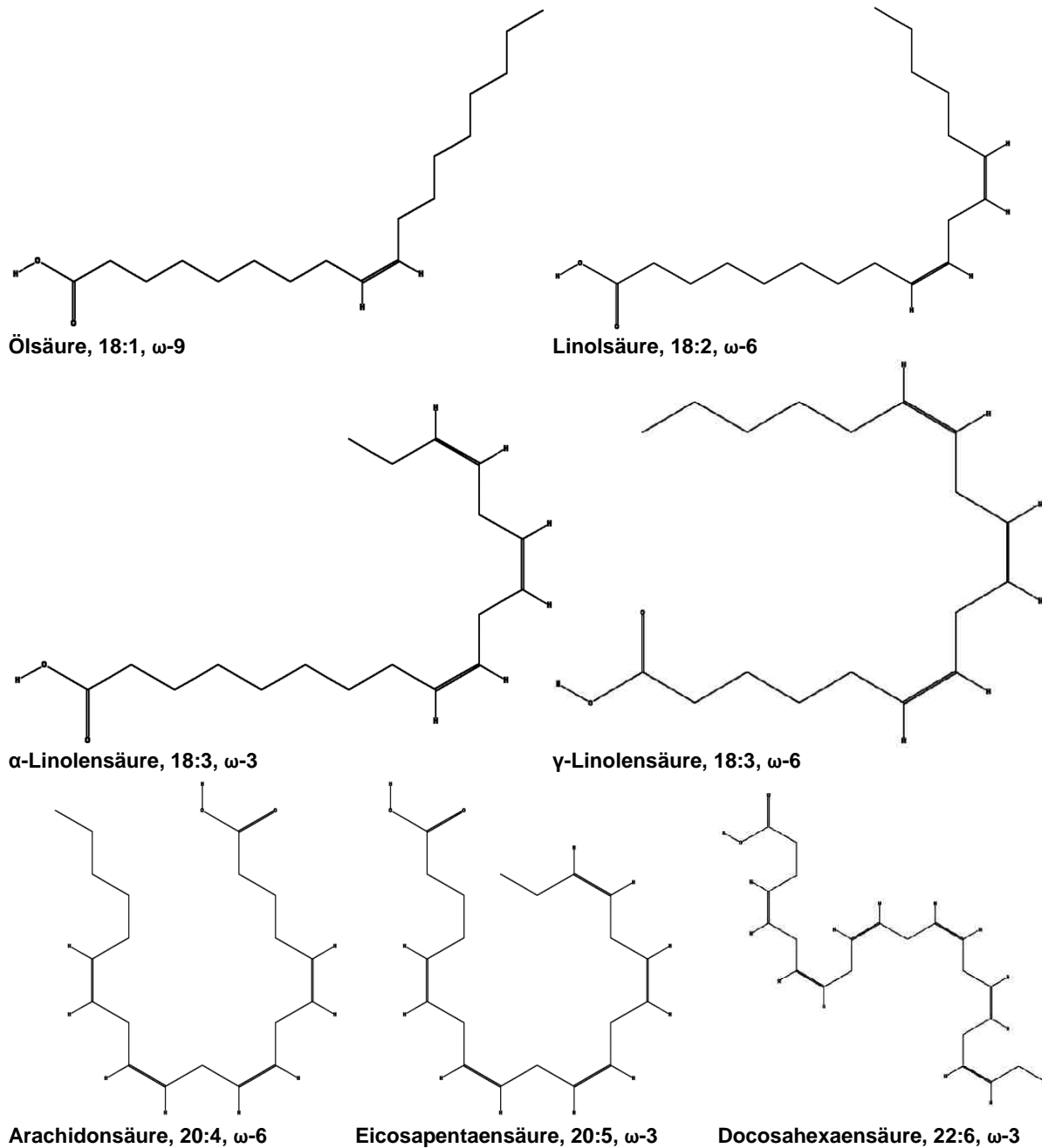
### 1.4.2. Ungesättigte Fettsäuren

Die meisten ungesättigten Fettsäuren sind für den menschlichen Organismus essenziell, da sie nicht vom Körper gebildet werden können. Sie müssen somit über die Nahrung oder Nahrungsergänzungsmittel zugeführt werden.

Einfach ungesättigte Fettsäuren besitzen grundsätzlich nur eine Doppelbindung zwischen zwei benachbarten Kohlenstoffatomen. Die Bezeichnung einfach ungesättigter Fettsäuren ist unterschiedlich. Die Summenformel lässt sich jedoch immer als  $C_nH_{2n-1}COOH$  angeben. Die am häufigsten untersuchte einfach ungesättigte Fettsäure ist Ölsäure (18:1), die zu den  $\omega$ -9-Fettsäuren gehört (Abbildung 1-5). Wie die gesättigten kommen die ungesättigten Fettsäuren in unterschiedlichen Bereichen vor. Sind ungesättigte Fettsäuren ein Bestandteil der Membranphospholipide, erhöht sich durch den durch die Doppelbindung eingebrachten Knick die Fluidität.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs, *poly unsaturated fatty acids*) haben mehrere Doppelbindungen in ihren Kohlenstoffketten. Die am besten für den menschlichen Körper

untersuchten mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind Linolsäure (18:2),  $\alpha$ -Linolensäure (ALA) (18:3) und  $\gamma$ -Linolensäure (GLA) (18:3), Arachidonsäure (ALA) (20:4), Eicosapentaensäure (EPA) (20:5) und Docosahexaensäure (DHA) (22:6) (Abbildung 1-5). Neben der IUPAC- wird ebenfalls die Fettsäure-Nomenklatur verwendet. Hieraus sind Bezeichnungen wie  $\omega$ -3 und  $\omega$ -6 geläufig. Dabei wird vom ersten C-Atom gezählt, der Methylgruppe  $-\text{CH}_3$ . Die Nummer bezeichnet damit das C-Atom, an dem die erste Doppelbindung beginnt. Bei einer  $\omega$ -3 Fettsäure (ALA, EPA, DHA) ist somit die erste Doppelbindung zwischen dem dritten und vierten C-Atom.



Die vorhandenen Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren können Radikale abfangen und somit neutralisieren. Meist ist dieser Prozess nicht erwünscht, da dadurch die

Membranstabilität lebender Zellen negativ beeinflusst wird, was im ungünstigsten Fall zum Zelltod führen kann (Haller et al., 2013).

Die Ölsäure kommt beinahe in allen tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen in Form von Triglyceriden vor. Wird Ölsäure zu Zellen in der Zellkultur hinzugegeben, nehmen *lipid droplets* an Volumen zu (Miyanari et al., 2007; Guo et al., 2008; Peyrou et al., 2013). Daneben kann sie auch regulatorisch auf Transkriptionsfaktoren wirken, wie beispielsweise durch Binden an Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$ ). Docosahexaensäure (DHA) hat einen Einfluss auf das *sterol-regulatory element binding protein 1* (SREBP1), welches zu den Transkriptionsfaktoren zählt und bei *de novo* Lipogenese aktiv ist. DHA wirkt hierbei inhibierend auf das nukleare SREBP1. Weiter kann DHA das NRF2 Protein (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*) stabilisieren und die Expression des Proteins fördern. NRF2 ist während oxidativen Stresses aktiv (Papackova and Cahova, 2015). Neben diesen Funktionen könnte DHA in der Krebstherapie angewendet werden. Die Fettsäure akkumuliert in Krebszellen und löst dort die Apoptose aus, wie Zellkulturmodelle gezeigt haben (Gleissman et al., 2010).

Eicosapentaensäure (EPA) übt einen ähnlichen Einfluss auf NRF2 wie DHA aus. Selbst sehr geringe Mengen von EPA können in Zellen robuste Antworten auf verschiedene Einflüsse, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren, aktivieren (Papackova and Cahova, 2015).

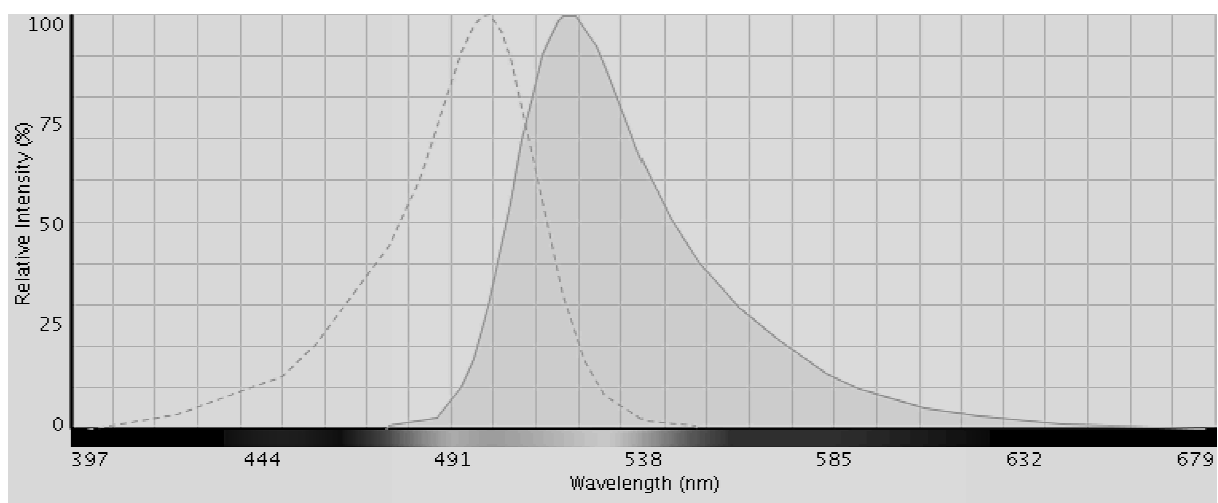
### **1.5. Fluoreszenzmikroskopie und Bildverarbeitung**

Die Fluoreszenzmikroskopie ist ein Verfahren der Lichtmikroskopie und unterliegt entsprechend denselben physikalischen Grenzen.

Die konventionelle (Hellfeld-) Lichtmikroskopie erlaubt keine Darstellung von Phasen-, sondern lediglich Amplitudenkontrast-Objekten. Durch die Entwicklung der Phasenkontrastmikroskopie wurde die Möglichkeit geschaffen, kontrastarme Objekte wie tierische Zellen abbilden zu können. Das Verfahren beruht auf den Unterschieden der Geschwindigkeit des sich in verschiedenen Medien (Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices) ausbreitenden Lichtes. Der Aufbau eines solchen Mikroskops besteht aus einem Grundschema eines gewöhnlichen Mikroskops sowie einer Ringblende im Kondensor und einem Phasenring im Objektiv. Die Ringblende lässt das einfallende Licht in einem bestimmten Winkel auf das Präparat durch. Die Lichtstrahlen, die nicht gebeugt wurden, passieren am anderen Ende des Objektes ungehindert den Phasenring. Werden jedoch Strahlen gebeugt, so findet eine Laufzeit-Verzögerung statt. Das nun eintreffende Licht am Phasenring hat eine um  $\frac{1}{4}$  Lambda verschobene Phase. Der Phasenring verschiebt diese um weitere  $\frac{1}{4}$  Lambda, was zu Kontrastgebung führt (Köhler and Loos, 1941). Es kann jedoch auch hier nur die gesamte Zelle dargestellt werden. Prozesse auf molekularer Ebene lassen sich hierdurch nicht untersuchen.



Für die Untersuchung molekularer Prozesse in Zellen können Fluorophore eingesetzt werden. Diese können spezifisch an bestimmte Zellkompartimente (beispielsweise *lipid droplets*, Zellkern bzw. DNA-reiche Regionen) oder über Antikörper an bestimmte Strukturen/Proteine gebunden und so verfolgt werden. Die Unterscheidung zum gesamten zu untersuchenden Objekt wird u.a. durch das Anregen der Fluorophoren mit Licht einer bestimmten Wellenlänge gewährleistet. Das Anregen verursacht ein Heben von Elektronen auf ein höheres elektromagnetisches Niveau. Durch das Zurückfallen auf das normale Niveau wird Energie in Form von Lichtemission und Wärme freigesetzt. Dadurch, dass die eingetragene Energie auch als Wärme abgegeben wird, kann die resultierende Energie nicht dieselbe sein. Dieser Effekt (*Stokes' Shift*) bedingt eine Verschiebung des emittierenden Lichtes in Richtung des roten Bereiches, die Wellenlänge wird in diesem Fall größer (Abbildung 1-6).



**Abbildung 1-6: Spektrum von Alexa Fluor 488. Anregung mit blauem Laser ( $\lambda=488$  nm) (gestrichelt), Emissionsmaximum bei  $\lambda=520$  nm (Fläche).**

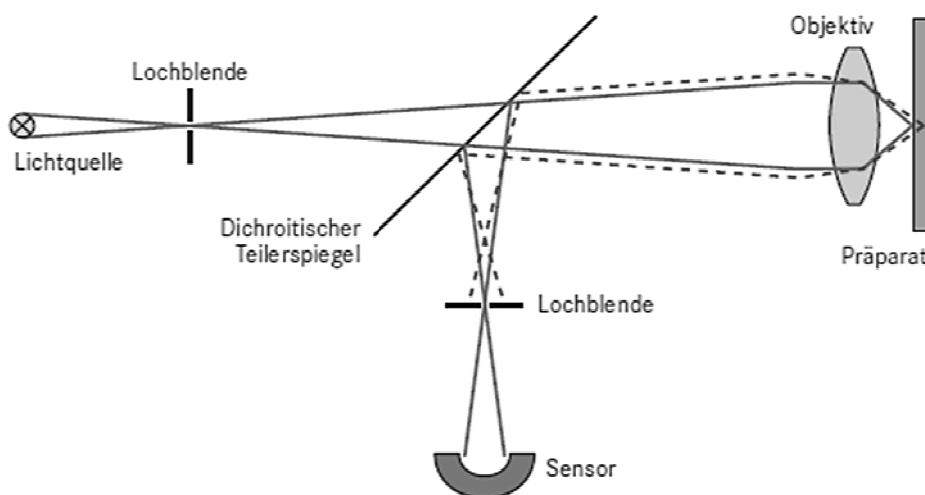
Durch diese spezifische Anregung und Emission können verschiedene Bereiche gleichzeitig mit verschiedenen Fluorophoren eingefärbt werden.

Die Detektion von Fluoreszenzsignalen kann durch verschiedene Techniken realisiert werden. Am häufigsten benutzt wird die Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskopie. Hierbei werden Fluorophore durch gefiltertes Licht einer Quecksilberlampe angeregt und das emittierende Licht durch einen zweiten Filter (Bandpass oder Hochpass) über eine angeschlossene Kamera erfasst. Das Anregungslicht wird von dem emittierten Licht mittels eines sog. dichroitischen Spiegels getrennt. Es werden hierbei alle Signale, die in dem bestimmten Filterbereich vorhanden sind, aufgezeichnet. Es ist somit nicht möglich, eine einzige Ebene darzustellen.

Optische Schnitte können über ein konfokales Mikroskop aufgenommen werden. Hierbei werden die Fluorophore über einen gebündelten Laserstrahl bestimmter Wellenlänge angeregt. Das reflektierte und emittierte Wellenlängenspektrum wird durch einen Filter

geleitet und wie bei Weitfeldmikroskopie aufgetrennt. Dem Detektor ist eine Lochblende vorgeschoben, diese Blende lässt nur die Strahlen einer Ebene durch (Abbildung 1-7). Hierdurch ist es möglich genauere 3D-Aufnahmen von Objekten anzufertigen, da sich die erfassten Signale auf einen kleineren z-Bereich beschränken. Volumina können so genauer dargestellt werden (Hibbs et al., 2006). Eine Volumen-Aufnahme entsteht durch das Verschieben der Fokusebene. Wurde ein Ausschnitt aufgezeichnet, wird das Objekt (je nach Aufbau automatisch oder manuell) um eine bestimmte Schrittweite vom Objektiv weg oder zum Objektiv hin versetzt. Die Schichtdicke einer 2D-Aufnahme wird anschließend für jede Schicht auf die Schrittweite pro Schicht eingestellt. Somit können auch einzelne zweidimensionale Aufnahmen als Volumen dargestellt werden.

Die Auflösung beider Mikroskope ist jeweils von der Wellenlänge des eingesetzten Lichtes abhängig (Abbe, 1873). Die Auflösungsgrenze ist dabei so definiert, dass zwei benachbarte Signale dann unterscheidbar, also aufgelöst, sind, wenn sich das Minimum des zweiten Signals höchstens mit dem Maximum des ersten Signals überlagert (Aescht et al., 2010).

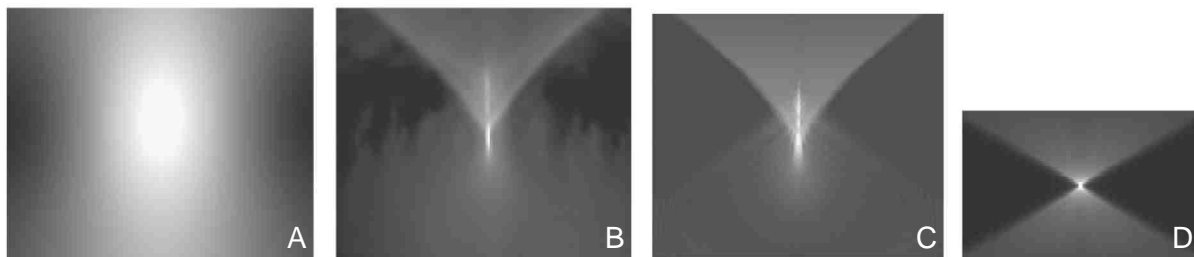


**Abbildung 1-7: Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskops (Aescht et al., 2010).**

Aufgrund eingesetzter Optiken erfährt eine Aufnahme eine gewisse Stauchung (kissen- oder tonnenförmig), vergleichbar mit einem Blatt Papier, das an den Ecken aufgehoben wird. Diese Stauchung (Konvolution) lässt sich mathematisch beschreiben und somit zurückrechnen (Entfaltung, Dekonvolution). Die Parameter sind hierbei die unterschiedlichen Refraktionsindizes (Wasser, Immersionsöl, Einbettungsmedium, Luft), die eingesetzten Optiken und die Wellenlänge des Lichtes. Aus diesen Parametern gepaart mit Informationen über die Bildgröße (Pixel, Voxel) lässt sich eine Punktspreizfunktion (*point spread function*, PSF) berechnen. Dadurch können Signale für ein bestimmtes Bild zurückgerechnet und somit realitätsgetreuer dargestellt werden. Eine PSF kann am genutzten Aufbau ebenfalls aufgenommen werden. Hierzu können kugelförmige Objekte mit Fluorophoren bestückt unterhalb der Auflösungsgrenze aufgenommen werden. Anhand

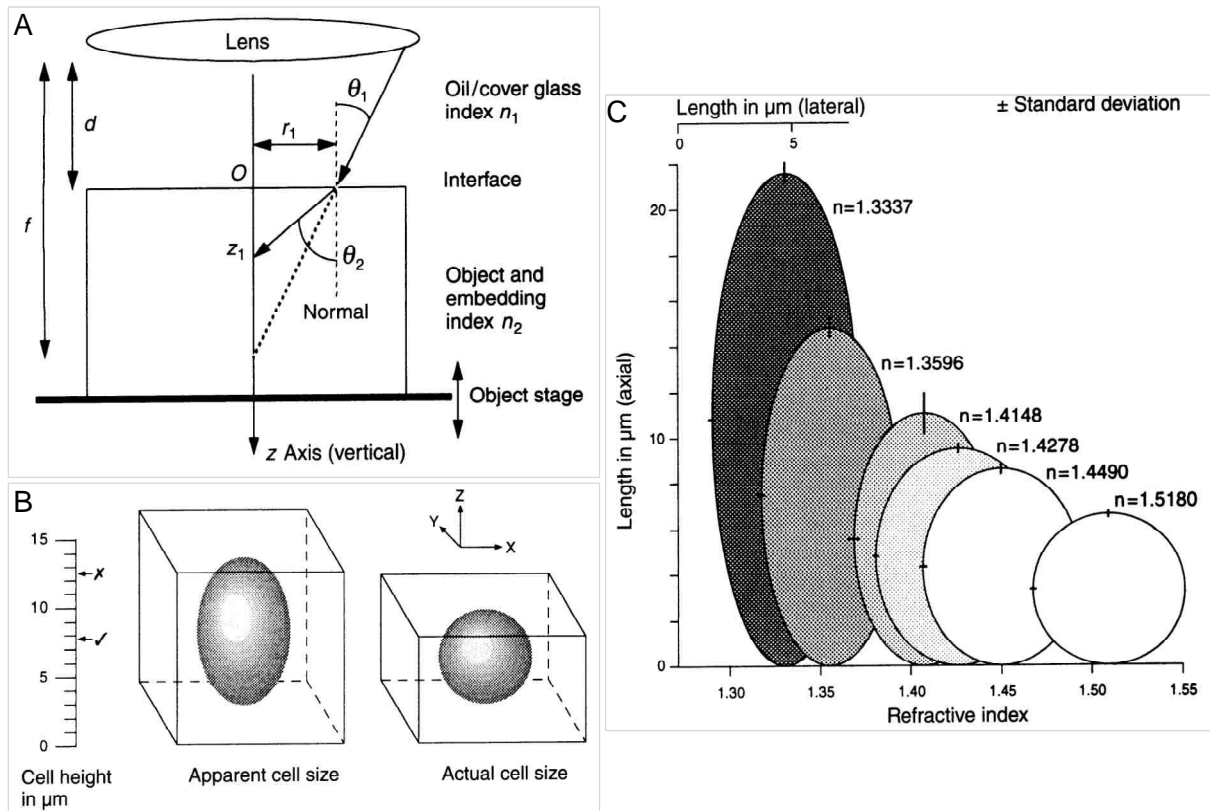
bekannter Größe des Objektes kann die aufgenommene PSF in diversen Programmen und Algorithmen als Ausgangspunkt für die Entfaltung eingesetzt werden. Durch das mathematische Entfalten können Bereiche schärfer abgegrenzt dargestellt werden.

Für die Dekonvolution werden meist ähnliche etablierte Algorithmen genutzt. Algorithmen für die Entfaltung dreidimensionaler Aufnahmen in Software basieren meist auf MLE- (*maximum likelihood estimation*) und IC-Algorithmen (*iterative constrained*). Der MLE-Algorithmus stellt dabei eine Schätzung echter Signale, die von Fluorophoren ausgehen, in Abhängigkeit von der Hintergrundstrahlung in Aufnahmen dar. Die MLE erfolgt dabei beschränkt iterativ (IC). Die Randbedingungen können dabei sein, dass beispielsweise ab einer ausbleibenden Veränderung in der dritten Nachkommastelle die Iterationsschritte nicht weiter fortgeführt werden. Sowohl *Blind*-, als auch *non-Blind*-Algorithmen basieren auf den beiden Verfahren MLE und IC (Holmes et al., 2006). Der Unterschied zwischen *Blind*- und *non-Blind*-Algorithmen besteht im Bereitstellen der PSF. So greift der *non-Blind*-Algorithmus auf eine theoretische PSF zu, errechnet aus den o.g. Parametern, während sich der *Blind*-Algorithmus iterativ der theoretischen PSF annähert. Jedes Signal wird also mehrfach berechnet, bis ein Abbruch eintritt. Je größer die Anzahl der Iterationen, desto genauer wird das Ergebnis. Ein Vergleich beider Algorithmen ist in Abbildung 1-8 dargestellt.



**Abbildung 1-8: Vergleich von PSF nach o.g. Verfahren. PSF mit sphärischer Aberration (A-C) und ohne (D) dargestellt. xz-Projektion nach der ersten Schätzung der PSF des *Blind*-Algorithmus (A). xz-Projektion der PSF nach weiteren Iterationsschritten mit dem *Blind*-Algorithmus (B). Theoretisch errechnete PSF mit *non-Blind*-Algorithmus (C). Theoretisch errechnete PSF ohne sphärische Aberration (D) (aus Holmes et al., 2006).**

Die Optiken und unterschiedlichen Refraktionsindizes der Medien haben ebenfalls einen Einfluss auf die Auflösung in der z-Achse. Je größer der Unterschied zwischen Immersionsmedium und Einbettungsmedium ist, desto größer ist die axiale Elongation (sphärische Aberration). Hierbei tritt das emittierte Licht der Fluorophore von einem Medium mit einem geringeren Brechungsindex in das Immersionsmedium mit einem höheren Brechungsindex. Die Lichtstrahlen werden somit zur optischen Achse hin gebündelt, wobei sich die Abbildungsebene verschiebt. Das Volumen wird gestreckt (Abbildung 1-9) (Visser and Oud, 1994; Kuchling, 2007).



**Abbildung 1-9:** Darstellung der Verschiebung des Strahlengangs durch Medien unterschiedlicher Brechungsindizes (A). Darstellung resultierend aus der sphärischen Aberration und das echte Objekt (B). Elongation von sphärischen Objekten entlang der optischen Achse (C) (Visser and Oud, 1994).

Obwohl man abschätzen kann, wie stark ein Signal unterhalb der Auflösungsgrenze der verwendeten Apparatur elongiert wird, empfiehlt sich eine Bestimmung unter den experimentellen Bedingungen durchzuführen. Die reale Elongation kann dadurch festgestellt und für andere Experimente verwendet werden.

## 1.6. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit, angelehnt an die Ergebnisse von Klages (2013), bestand darin, die Verteilung und das Volumen der *lipid droplets* in chronisch mit Hepatitis C infizierten *Huh7.5*-Zellen nach Behandlung mit Fettsäuren zu untersuchen. Dabei sollte das Augenmerk auf Einzel- und Gesamtvolumina und die Anzahl der *lipid droplets* in den Zellen gelegt werden.

Des Weiteren sollte der Einsatz der Software AutoQuant X2 für die Dekonvolution für die Darstellung und Vorbereitung von Mikroskopie-Aufnahmen zur weiteren Prozessierung in BitPlane Imaris untersucht werden.

## 2. Geräte und Chemikalien

### 2.1. Geräte

Hersteller	Gerät
5 Prime, Hamburg	2-mL-Phase-Lock-Gel Reaktionsgefäße
Applied Biosystems	GeneAmp PCR System 9700
BioRad	GenePulser Xcell™ Total System #165-2660
BioRad	S1000™ Thermal Cycler
BioRad	Wasserbad WBT-Serie
ELMI	Shaker DRS-12
Eppendorf	A-4-81
Eppendorf	FA-45-24-11
Eppendorf	Innova 43
Eppendorf	Research plus 0,1-2,5 µL
Eppendorf	Research plus 0,5-10 µL
Eppendorf	Research plus 100-1000 µL
Eppendorf	Research plus 10-100 µL
Eppendorf	Thermomixer comfort
Eppendorf	Zentrifuge 5424
Eppendorf	Zentrifuge 5424 R
Eppendorf	Zentrifuge 5810 R
IKA	RH basic 2 IKAMAG
Integra	Pipetboy2 acu
Nikon	C2 <sup>+</sup> Confocal Microscope
P-D	Wasserbad WB20
PeqLab	NanoDrop ND1000
Sarstedt	1,5- und 2-mL-Mikroreaktionsgefäße
Sarstedt	12-Well-Platten
Sarstedt	6-Well-Platten
Sarstedt, Nümbrecht	15 mL und 50 mL Reaktionsgefäße
Sarstedt, Nümbrecht	T175-Zellkulturflaschen
Sarstedt, Nümbrecht	T75-Zellkulturflaschen
Scientific Industries	Vortex-Genie 2
Thermo Scientific	GENESYS™ 10 Bio
Thermo Scientific	Herasafe KS 12
Thermo Scientific	Multifuge 3 S-R
Thermo Scientific	NanoDrop 1000
Thermo Scientific	Sorvall Heraeus 75006449 R
Thermo Scientific	Sorvall RC 5C Plus
Thermo Scientific	Sorvall SLA-3000
VWR, Darmstadt	4-mm-Elektroporationsküvetten
VWR, Darmstadt	Deckgläser, Ø 12 mm
VWR, Darmstadt	Objektträger
VWR, Darmstadt	Reagenzgläser

### 2.2. Bakterienstämme

Name	Beschreibung	Herkunft / Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA -argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i>	Life Technologies

### 2.3. Zelllinien

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft / Referenz</b>
<i>Huh7.5</i>	Humane Hepatoma-Zelllinie	C.M. Rice, Rockefeller University

### 2.4. Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Herkunft / Referenz</b>
Acrylamid (30%)	AppliChem Biochemica, Darmstadt
ATP	AppliChem Biochemica, Darmstadt
Blasticidin S	AppliChem Biochemica, Darmstadt
Essigsäure (100%)	AppliChem Biochemica, Darmstadt
Ethanol	AppliChem Biochemica, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG
<i>Fish skin gelatine</i>	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Glycin	AppliChem Biochemica, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co.KG
Mowiol	Sigma Life Science
Tris	AppliChem Biochemica, Darmstadt
Triton-X100	AppliChem Biochemica, Darmstadt

### 2.5. Fettsäuren

<b>Name</b>	<b>Herkunft / Referenz</b>
Arachidonsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Docosahexaensäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Eicosapentaensäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Laurinsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Linolsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Myristinsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ölsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Palmitinsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Stearinsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
$\alpha$ -Linolensäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
$\gamma$ -Linolensäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen

### 2.6. Medien

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , standardisiertes Nährmedium (Life Technologies)
LB-Medium	10 g/L Bacto-Trypton; 5 g/L Bacto-Hefeextrakt; 8 g/L NaCl // 1 g/L Glukose pH 7.2; 100 mg/L Ampicillin bzw. Kanamycin vor Gebrauch
Medium Zellkultur	DMEM + 5% FCS + 5% GlutaMAX (b. Bed. + 5% PenStrep)
Mowiol	2,4 g Mowiol; 6 g Glycerin; 0,13 TRIS/HCL pH 8,5; 18 mL ddH <sub>2</sub> O
Opti-MEM I	Reduced Serum Medium
Trypsin	1x Trypsin; 0,05% EDTA (Life Technologies)

## 2.7. Puffer

Name	Zusammensetzung
<i>Blocking Solution</i>	1% Fischhaut-Gelatine; 5% BSA; 0,15% Glycin in 50 mM TRIS-Puffer (pH=6,8)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS+Glycin	0,15 g Glycin in 100 mL PBS
TAE-Puffer (50x)	242 g TRIS; 57,1 mL 100% Essigsäure; 5 mM EDTA pH 8.0; ad dH <sub>2</sub> O 1000 mL

## 2.8. Antikörper und weitere Enzyme

Name und Beschreibung	Verdünnung	Herkunft / Referenz
HCV Core Monoklonaler Antikörper ( <i>mouse</i> ), detektiert Core-Protein des HCV (Klon C7-50)	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Alexa Fluor 555 anti- <i>mouse</i> IgG (H+L)	1:1.500	Life Technologies
Restriktionsenzym Mlu1		New England Biolabs
<i>Mung-Bean-Nuclease</i>		New England Biolabs

## 2.9. Färbereagenzien

Name	Verdünnung	Herkunft / Referenz
Hoechst 33258 (DNA-Interkalator)	1:5.000	Sigma Life Science
LD540 ( <i>lipid droplet dye</i> )	1:10.000	C. Thiele, Universität Bonn
PageRULER	-	Thermo Scientific
DNA Ladder	-	Life Technologies

## 2.10. Reagenzsysteme, Kits

Name	Herkunft / Referenz
MEGAscript T7	Invitrogen, Life Technologies
MaxiPrep	Macherey-Nagel

## 2.11. Software

AutoQuant X2.2.2 AutoDeblur Gold CWF

Bitplane Imaris x64 7.6.4

GraphPad Prism 6.05

ImageJ v1.48

NIS-Elements Ar 4.30

NIS-Elements Viewer 4.20

R-project 3.1.0

### **3. Methoden**

#### **3.1. Zellkultur**

In dieser Arbeit wurden *Huh7.5*-Zellen verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einem feuchten Milieu im Brutschrank. Die Zellen wurden in DMEM (DMEM, 10% FCS, 1x GlutaMax, 1x PenStrep) gehalten. Nach Erreichen einer Konfluenz von >80% wurden diese in neue Flaschen umgesetzt. Hierzu wurde das verbrauchte Medium entnommen und mit etwas PBS zum Waschen beaufschlagt. Das PBS wurde wieder entfernt und die Zellen mit Trypsin einige Minuten behandelt, bis sie sich vom Boden ablösten. Durch Auf- und Abpipettieren wurden sie vereinzelt und das Trypsin durch Zugabe von DMEM (FCS wirkt inhibierend auf Trypsin) neutralisiert. Der Gesamtsuspension wurde ein Teil entnommen und in eine neue Flasche pipettiert.

#### **3.2. Bakterienkultur**

Die verwendeten Bakterien *E. coli* DH5α wurden in LB-Medium über Nacht angezogen. Zuvor wurde ein Inokulum vorbereitet, indem jeweilige Bakterien über einen Tag in Reagenzgläsern angezogen wurden.

Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80 °C als Glycerin-Stock.

#### **3.3. Herstellen von viraler RNA und Viren**

##### **3.3.1. Extraktion von Plasmiden aus *E. coli* im Maxi-Maßstab**

Die Isolierung von HCV-codierenden Plasmiden erfolgte nach Protokoll des NucleoBond Xtra Maxi-Kits.

Die Zellen wurden über Nacht in einer Batch-Kultur angezogen (*E. coli* DH5α), anschließend zentrifugiert und das Pellet in RES-Puffer (mit RNase A) resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Falcon-Tube (50 mL) überführt und mit LYS-Puffer versetzt 5 min inkubiert. Anschließend wurde mit NEU-Puffer durch Invertieren neutralisiert, bis keine Blaufärbung vorhanden war. Der Filter wurde während der Lyse-Dauer mit EQU-Puffer equilibriert. Der Inhalt des Falcons wurde auf den Filter überführt und mit EQU nochmals gewaschen. Nach dem Waschen mit EQU wurde der Filter verworfen und Proteine und andere Zellbestandteile mit dem WASH-Puffer von der Säule gewaschen. Die Plasmide wurden anschließend mit ELU-Puffer von der Säule eluiert und aufgefangen. Das Fällern der DNA geschah mit Isopropanol bei 5000 g und 4 °C für etwa 5 min. Die DNA wurde nun in 70% Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in TE-Puffer suspendiert.

##### **3.3.2. DNA-Verdau, -Aufreinigung und *in vitro*-Transkription**

Die aus *E. coli* gewonnene Plasmid-DNA wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym Mlu1 verdaut. Hierzu wurden 16 µg DNA (1 µg/µL) mit 5 µL NEBuffer3, 1 µL Mlu1 und 36 µL RNase-freies Wasser bei 37 °C über Nacht linearisiert. Die Linearisierung wurde durch Agarosegelelektrophorese (1% Agarose in 1x TAE) überprüft. Das beladene Gel wurde bei



110 Volt etwa 30 min angeschlossen und anschließend in einer UV-Kammer aufgenommen.

Nach erfolgreichem Verdau wurden die DNA-Fragmente mittels Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt. Hierzu wurden die verdauten Plasmide mit 50 µL RNase-freiem Wasser versetzt und in ein *Phase-Lock-Gel* Tube (5 Prime) überführt. Hierzu wurden 100 µL Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol im Verhältnis 25:24:1 vol/vol/vol pipettiert, kurz gemischt und bei Raumtemperatur 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µL Chloroform hinzugegeben und nochmals 5 min zentrifugiert. Dem Aufreinigungsschritt folgte eine Ethanol-Fällung. Die wässrige Phase oberhalb des Gels wurde abgenommen und in ein neues Tube überführt. Hierzu wurden 10 µL 3 M Natriumacetat und 250 µL 99,5% EtOH hinzugefügt und für 20 min bei -20 °C gelagert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Tube 20 min mit 12000 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µL 70% EtOH gewaschen und nochmals für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Es wurden 43 µL RNase-freies Wasser hinzugegeben. Die Lagerung der resuspendierten, aufgereinigten, linearisierten DNA erfolgte bei -80 °C.

Aufgrund des Einsatzes von Mlu1 mussten die Überhänge der DNA-Fragmente mit *Mung Bean nuclease* abgedaut werden. Hierfür wurde der resuspendierten DNA 5 µL 10x *Mung Bean nuclease* Puffer, und 2 µL *Mung Bean nuclease* (10 U/µL) hinzugegeben und 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach dem Verdau mit der *Mung Bean nuclease* wurde wieder eine Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol-Aufreinigung durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde in 15 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen und zur Kontrolle ein 1% Agarose-Gel (wie oben beschrieben) angesetzt sowie die Konzentration am NanoDrop bestimmt.

Die linearisierte DNA wurde mit 2 µg für einen doppelten Ansatz mit dem T7 MEGAskript Kit *in vitro* transkribiert. Hierzu wurden je 4 µL ATP, CTP, GTP, UDP, Enzymmix, 10x Reaktionspuffer mit 2 µg DNA zusammengegeben und auf 40 µL mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µL Turbo DNase hinzu pipettiert und nochmals für 15 min bei 37 °C inkubiert.

Hiernach wurde die Lithium-Chlorid-Fällung angeschlossen. Die Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Dem doppelten Ansatz von 40 µL wurden je 60 µL RNase-freies Wasser und LiCl-Fällungsreagenz hinzugegeben. Der Mix wurde 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend 15 min bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 mL 70% EtOH gewaschen. Nach dem Waschen wurde die RNA nochmals 15 min bei 4 °C auf höchster Umdrehungszahl zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Tube kurz anzentrifugiert und das Pellet getrocknet (etwa 5 min).

Das Pellet wurde in 20 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen. Für eine Messung im

NanoDrop wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Diese Verdünnung wurde ebenfalls für ein 1% Agarose-Gel zur Kontrolle der RNA genutzt. Das Gel wurde 15 min bei 170 Volt angeschlossen.

Die transkribierte RNA wurde abschließend in 1,5-mL-Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf) bei -80 °C gelagert.

### **3.3.3. Transfektion durch Elektroporation**

Für die Virusherstellung wurden *Huh7.5*-Zellen mit *in vitro* transkribierter HCV RNA elektroporiert. Die Zellen wurden von der Oberfläche gelöst, in DMEM resuspendiert und in einer Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurden  $4 \cdot 10^6$  Zellen 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde in OptiMEM gewaschen. Die resuspendierten Zellen wurden nochmals zentrifugiert und in 400 µL Cytomix mit 20 µL Glutathion, 12 µL ATP und 10 µg RNA resuspendiert. Die Suspension wurde in eine 4-mm-Elektroporationsküvette gegeben und bei 260 V und 950 µF elektroporiert. Die elektroporierten Zellen wurden in eine T75-Zellkulturflasche überführt und mit 11 mL DMEM beaufschlagt. Ein Medien-Wechsel erfolgte nach etwa 4 h. Die anschließende Inkubation erfolgte wie in 3.1 beschrieben.

### **3.3.4. Virusproduktion und –ernte**

Die Ernte des Virus erfolgte nach 2-3 Tagen Inkubation. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand der elektroporierten Zellen abgenommen, 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand bei 4 °C gelagert. Konfluente Zellkulturflaschen wurden passagiert, die Zellen in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Virusüberstände von Jc1/<sup>NS5AB-Bsd</sup> RNA transfizierten Zellen wurden aufkonzentriert. Der gesammelte Überstand wurde in SteriFlips mikrofiltriert, mit PEG 8000 (Endkonzentration 10%) versetzt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Nach Inkubation wurde das Reaktionsgefäß 60 min bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 0,5-1 mL DMEM resuspendiert.

## **3.4. Infektion und Selektion**

Die Virus-Stocklösung wurde für die Infektion naiver *Huh7.5*-Zellen verwendet. Die Viren wurden auf dünn ausgesäte Zellen gegeben und für einige Tage inkubiert. Dicht gewachsene Zellen wurden wie oben beschrieben in neue Flaschen umgesetzt.

Die Selektion mit Blastocidin erfolgte nach etwa einer Woche nach Infektion. Das Blastocidin wurde mit 10 µg/mL in Zellkulturmedium eingesetzt.

### 3.5. Behandlung mit Fettsäuren

Die Behandlung der Zellen erfolgte für 24 h mit 0,1 mM Fettsäuren, die zuvor im Verhältnis 4:1 mit Albumin komplexiert wurden. Hierfür wurden 4 µL einer Fettsäure-Stammlösung (100 mM) jeweils mit 196 µL einer 0,5 mM Albumin-DMEM-Lösung für 60 min bei 37 °C und 1200 rpm inkubiert. Als Kontrolle wurden eine Albuminkontrolle im doppelten Ansatz und eine Ethanol-DMEM-Kontrolle vorbereitet. Der Albumin-DMEM-Lösung (196 µL) wurden 4 µL 99% Ethanol hinzugegeben. Die Ethanol-Kontrolle wurde mit 4 µL 99% Ethanol und 196 µL DMEM ohne Zusätze pipettiert. Diese Lösungen wurden ebenfalls bei 37 °C und 1200 rpm für 60 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Lösungen kurz anzentrifugiert und 175 µL der Fettsäure-Albuminkomplexe in 3,325 mL DMEM mit Zusätzen gelöst (Endkonzentration 0,1 mM). Für die Cholesterollösung wurden 175 µL Albumin-DMEM und 70 µL Cholesterollösung (5 mM) in 3,255 mL DMEM mit Zusätzen aufgenommen, sodass die Cholesterollösung eine Endkonzentration von 0,1 mM hatte.

Für die Behandlung wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 1 mL komplexierter Fettsäure ersetzt. Die Inkubation erfolgte für weitere 24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.6. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro Well in 6-Well Platten auf Deckgläser ausgesät und behandelt. Nach erforderlicher Inkubationsdauer (vgl. 3.5) wurden die Zellen mit 4 % PFA für 1 h bei Raumtemperatur fixiert. Das Medium wurde nach dem Fixieren verworfen und die Zellen dreimal für 10 min in PBS gewaschen. Die Färbung erfolgte unter Lichtausschluss in einer feuchten Dunkelkammer. Es wurden Hoechst 33258 und LD540 je 1:7.500 in PBS verdünnt und auf die fixierten Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 45 min. Anschließend wurden die Deckgläser mit den Zellen drei mal 10 min in PBS, kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in Mowiol auf Objektträger eingelegt. Die Präparate wurden lichtgeschützt über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt und am Folgetag mikroskopiert.

Für die Infektionskontrolle wurden übrige Deckgläser verwendet. Die Zellen auf den Deckgläsern wurden wie oben fixiert und gewaschen. Das Permeabilisieren erfolgte mit 0,1% Triton-X100 in PBS für 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen 30 min in *Blocking Solution* zum Absättigen freier Bindungen geblockt. Der primäre Antikörper (HCV Core) wurde 1:50 in *Blocking Solution* angesetzt und die Zellen auf dem Tropfen für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf folgten drei Waschschrte mit PBS+Glycin für je 10 min. Der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor 555) wurde 1:1.500 mit Hoechst 33258 1:10.000 in *Blocking Solution* eingesetzt. Die Zellen wurden nochmal 45 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf Tropfen inkubiert. Das Einbetten geschah wie oben

beschrieben.

Die Mikroskopie-Aufnahmen wurden an einem Nikon C2plus Konfokal-Mikroskop angefertigt. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass das Ausbleichen der Farbstoffe über einen Zeitraum von 20-30 min kaum wahrnehmbar war und keine Überbelichtung auftrat. Die Verstärkung der Signale wurde entsprechend eingestellt, sodass keine Hintergrundstrahlung sichtbar war.

Die Aufnahmen erfolgten mit einem 60x-Öl-Objektiv (Apo 60x Oil NA 1.4 WD ∞/0.14 mm). Es wurden DAPI und TRITC (EM 595/50) Filter verwendet um die Signale der jeweiligen Färbungen zu detektieren. Als Scanmodus wurde ein sequenzieller Scan mit doppeltem Durchschnitt ( $2 \times \emptyset$ ) gewählt, es wurde somit zunächst ein Bild einer Wellenlänge aufgenommen und anschließend die nächste Wellenlänge gewählt. Die Aufnahmen wurden mit 1024x1024 bzw. 1024x512 oder 1024x256 pxl erfasst, wobei der Fokus auf einzelne Zellen über eine Vergrößerung des Bildausschnitts 2-5x gewählt wurde. Die Schichtdicke der Aufnahmen wurde mit 150 nm gewählt.

### 3.7. Bildanalyse und Datengewinn

Für das anschließende Volumenrendering wurden die Aufnahmen zunächst in AutoQuant X2 dekonvolviert. Für die Dekonvolution wurde der LD540-Kanal mit 570 nm eingestellt und der *Blind*-Algorithmus mit 75 Iterationen und *background noise level* „high“ durchgeführt. Die resultierenden Dateien wurden in BitPlane Imaris 7.6.4 geladen und hieraus die Volumina der *lipid droplets* unter Ausschluss von Volumina unterhalb von  $0,092 \mu\text{m}^3$  generiert. Das Ausschlussvolumen  $V_A$  wurde mit der Hälfte der Wellenlänge (Radius, minimales radiales Auflösungsvermögen) (Rayleigh-Kriterium, Hecht, 2009) des technischen Aufbaus minus 5% Unsicherheit ermittelt:

$$V_A = \frac{4}{3} \cdot \pi r^3 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left( \frac{\lambda_{\text{LD540,Em}}}{2} \right)^3 - V_A \cdot 0,05 = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left( \frac{0,570 \mu\text{m}}{2} \right)^3 - 0,0048 \mu\text{m}^3 \approx 0,092 \mu\text{m}^3$$

Für den *Threshold* wurde das erste Drittel bis maximal die Hälfte der gesamten Signalspanne ausgelassen. Zuvor wurde die Schichtdicke der Aufnahmen von 150 auf 60 nm reduziert. Diese Manipulation erlaubt es, bedingt durch unterschiedliche Brechungsindizes der Medien entstandene sphärische Aberration, Objekte realitätsgetreuer darzustellen. Der eingesetzte Umrechnungsfaktor von 2,5 ergibt sich aus vorigen Versuchen mit demselben technischen Aufbau (Klabes, 2013).

Die Daten der einzelnen Volumina wurden aus Imaris in csv-Dateien exportiert und mittels R zusammengefasst. Hierfür wurde ein Skript geschrieben, das die einzelnen Dateien einliest, eine Summe der einzelnen Volumina berechnet sowie die Anzahl der *lipid droplets* und diese in eine neue Datei schreibt (8.1).

Für die Analyse wurden je Behandlung fünf repräsentative Zellen pro Fettsäure ausgewählt und über GraphPad Prism dargestellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Dekonvolution von Fluoreszenz-Aufnahmen zur verbesserten 3D-Darstellung von *lipid droplets*

Für die Fluoreszenz-Aufnahmen wurden Jc1<sup>NS5AB-Bsd</sup> infizierte *Huh7.5*-Zellen mit LD540 (*lipid droplets*, rot) und Hoechst (Zellkern, blau) im Verhältnis 1:10.000 gefärbt und auf einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Beispielzelle zeigt deutlich den Unterschied zwischen der ursprünglichen und der dekonvolvierten Aufnahme. Der vergrößerte Abschnitt zeigt ebenfalls deutlich den Unterschied zwischen unbearbeiteter und bearbeiteter Aufnahme. Auch die unterschiedlichen Algorithmen zeigen hier eine Auswirkung auf die Darstellung (Abbildung 4-1).

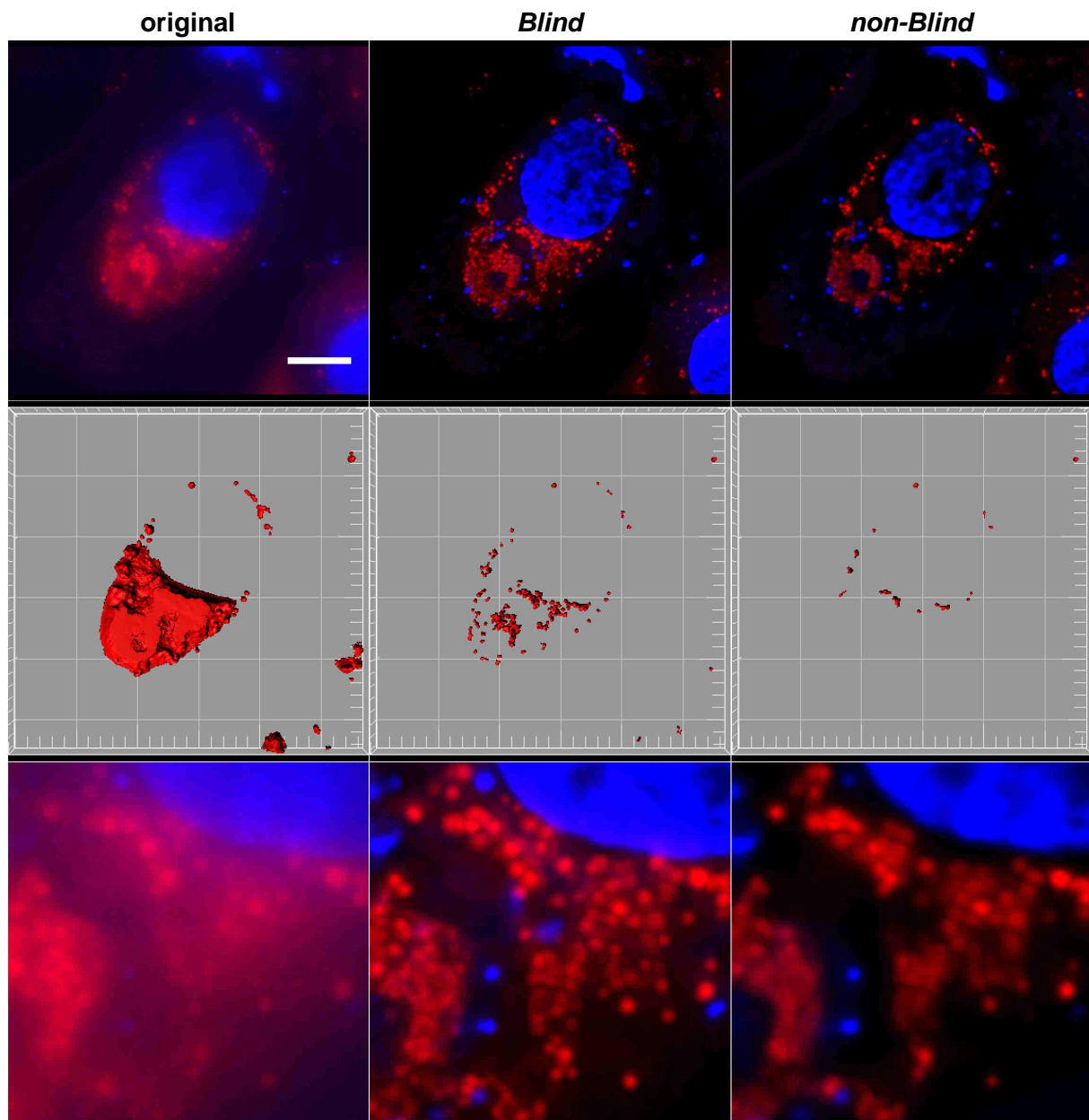


Abbildung 4-1: MIP (*maximum intensity projection*) einer Test-Aufnahme von *Huh7.5*-Zellen in einem IBIDI mit einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop (nicht konfokal), 60x 1,49 NA Öl-Objektiv. Die Original-Aufnahme wurde jeweils mit 75 Iterationen im *Blind*- bzw. *non-Blind*-Algorithmus berechnet. Die Bilder zeigen jeweils denselben Ausschnitt, bzw. die Vergrößerung. Maßstabsbalken und die Größe der Quadrate der 3D-Darstellung sind auf 10  $\mu\text{m}$  eingestellt.

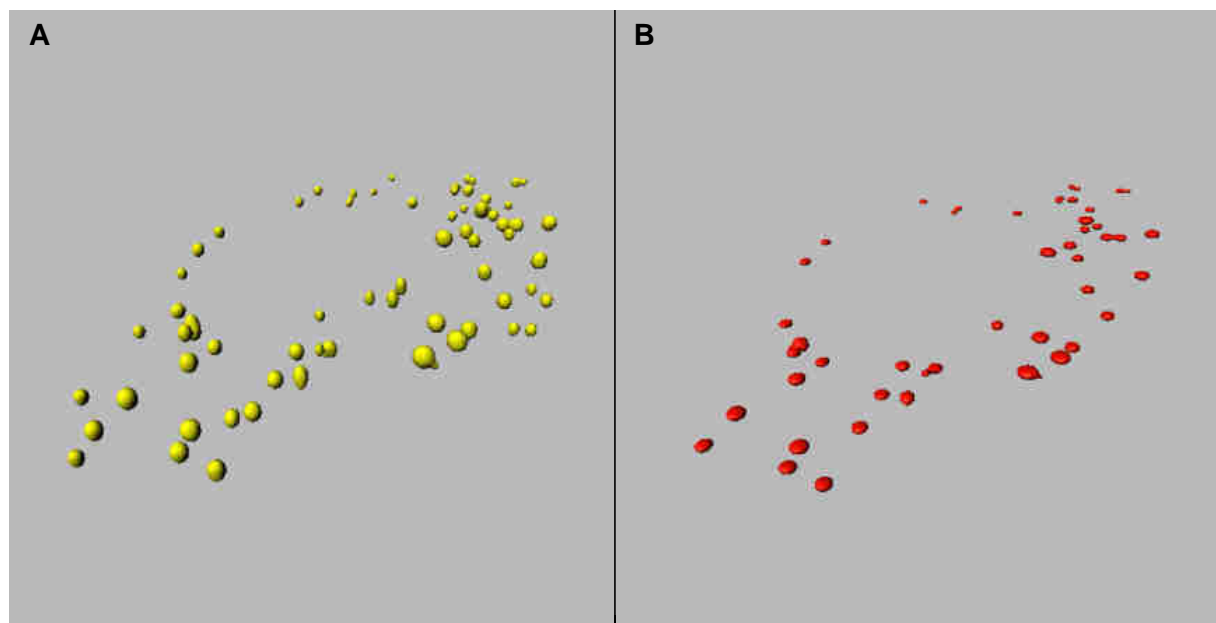
Für die 3D-Darstellung wurde zunächst die Schrittweite in z-Richtung auf 0,06  $\mu\text{m}$  pro Ebene eingestellt. Das Original zeigt deutlich, dass nur äußerst wenige einzelne *lipid droplets* erkennbar sind. Das größte Volumen wird durch die unklaren Signale viel zu groß dargestellt. Der *Blind-Algorithmus* zeigt deutlich voneinander abgegrenzte einzelne *lipid droplets*. Hier ist in der Vergrößerung und in der 3D-Darstellung eindeutig ein Unterschied erkennbar. Die Volumina der einzelnen *droplets* lassen sich somit eindeutig darstellen. Der *non-Blind-Algorithmus* zeigt hier einige verwaschene Tröpfchen. Sie sind schwieriger unterscheidbar, im Gegensatz zum *Blind-Algorithmus*.

Zuvor nicht oder kaum sichtbare und unterscheidbare *lipid droplets* konnten nach Dekonvolution erkennbar dargestellt werden.

### 4.2. Elongationsfaktor der Aufnahmen

Einige Aufnahmen weisen auch vor der Entfaltung trennbare einzelne *lipid droplets* auf (Abbildung 4-2, A und B). Der Elongationsfaktor von 2,5 wurde zuvor in anderen Versuchen ermittelt (Klabes, 2013). Unter Berücksichtigung des Elongationsfaktors werden manche *droplets* flacher dargestellt. Die entfalteten Aufnahmen können verborgene oder schwache *lipid droplets* der Rohdaten wieder hervorheben, sodass sie für den Darstellungsalgorithmus von Imaris ausreichend intensiv werden (vgl. Abbildung 4-2, C und D). Weiter ist zu beobachten, dass *lipid droplets* für die Darstellung in BitPlane Imaris nach Dekonvolution deutlich schärfer trennbar werden. Es werden wesentlich weniger verschmolzene *droplets* angezeigt.

Wird der Elongationsfaktor auf entfaltete Aufnahmen angewendet, lässt sich eine Verminderung in der Anzahl der *droplets* feststellen, da das Volumen ebenfalls vermindert wird (Abbildung 4-2, E-G). Die einzelnen Tröpfchen tauchen in der Darstellung nicht mehr auf und fließen somit nicht in die Auswertung mit ein.



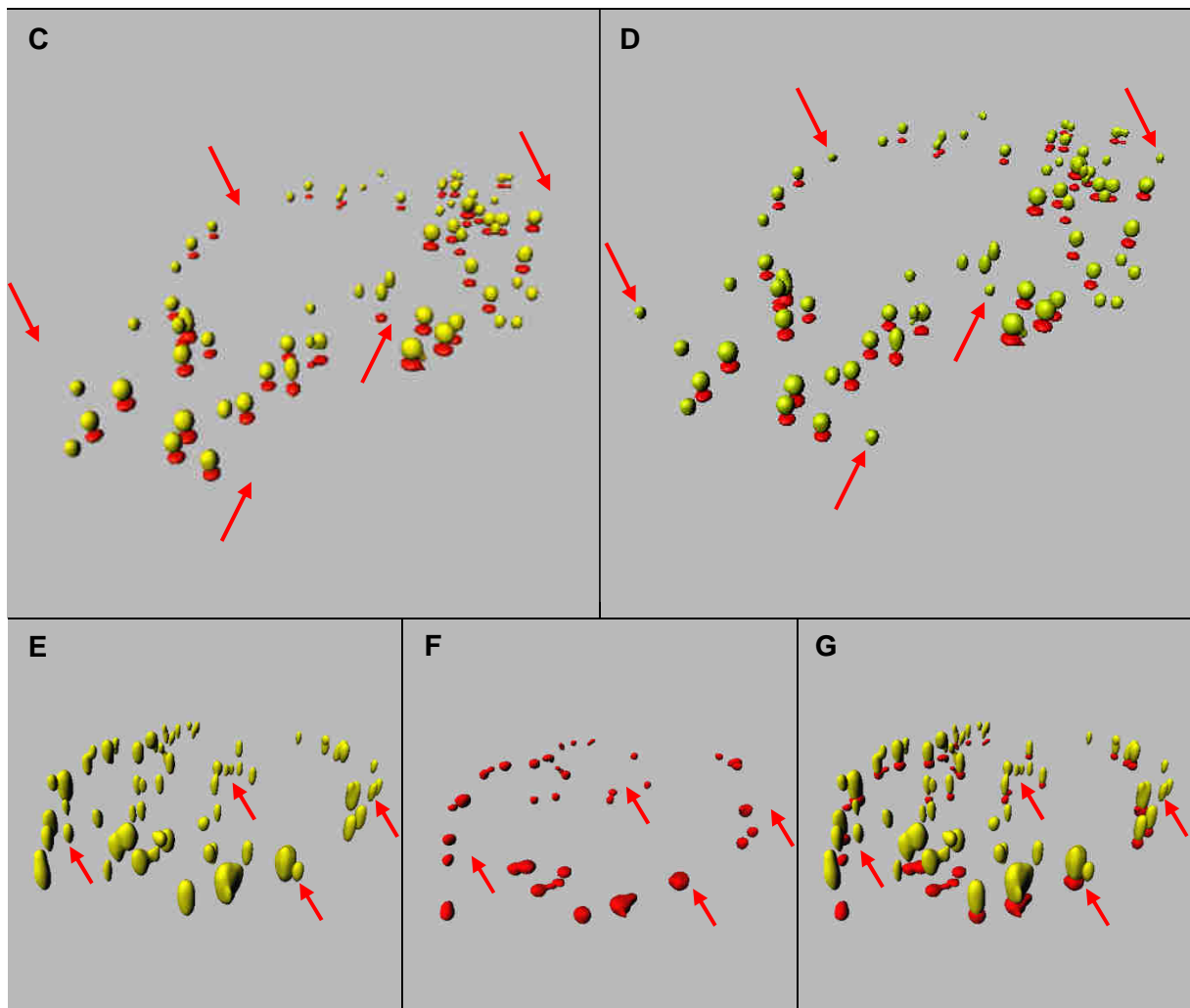


Abbildung 4-2: Langzeitinfizierte *Huh7.5*-Zellen nach Stimulation mit Albumin (A-D) bzw. Arachidonsäure (E-G), Aufnahmen gerendert in Imaris für Volumendarstellung. *Lipid droplets* vor Entfaltung mit Elongation in z-Achse (A), *lipid droplets* vor Entfaltung unter Beachtung des Elongationsfaktors von 2,5 in z-Achse (B), *lipid droplets* aus A und B im Vergleich (C), *lipid droplets* nach Entfaltung (D), *lipid droplets* nach Entfaltung mit Elongation in z-Achse (E), *lipid droplets* nach Entfaltung unter Beachtung des Elongationsfaktors von 2,5 in z-Achse (F), *lipid droplets* aus E und F im Vergleich (G).

In Abbildung 4-3 sind einzelne Zellen nach Behandlung und Dekonvolution dargestellt. Hier zeigt sich der Unterschied einzelner Aufnahmen. Dort, wo bei einigen Zellen die *lipid droplets* beinahe kugelförmig dargestellt werden (Abbildung 4-3, A und B), können sie in anderen Zellen eine in z-Achse verzerrte Form annehmen (Abbildung 4-3, C) oder gar vollständig verschmolzen dargestellt werden (Abbildung 4-3, D).

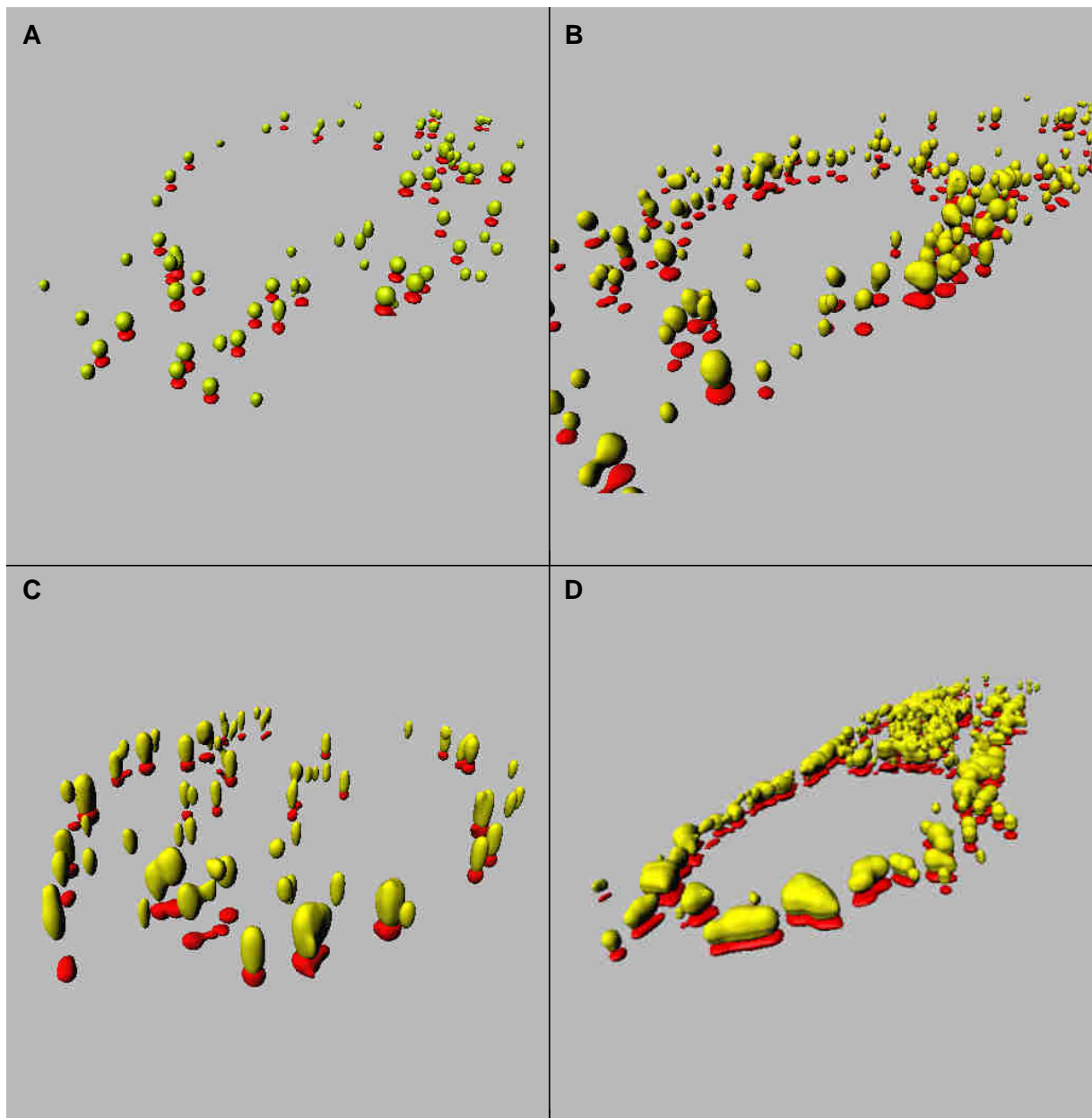


Abbildung 4-3: Langzeitinfizierte *Huh7.5*-Zellen nach Stimulation mit Albumin (A), ALA (B), Arachidonsäure (C) und Ölsäure (D). Darstellung der *lipid droplets* nach Entfaltung, ohne Elongationsfaktor (gelb) und nach Anwenden des Elongationsfaktors von 2,5 (rot).

#### 4.3. Immunofluoreszenz-Färbung HCV infizierter *Huh7.5*-Zellen zur Infektionskontrolle

Die Infektionskontrolle wurde mit  $Jc1^{NS5AB-Bsd}$  infizierten und mit Blasticidin selektionierten *Huh7.5*-Zellen (30 Tage nach Infektion) durchgeführt. Diese diente dazu, eine erfolgreiche Selektion und damit eine 100%ige Infektionsrate zu bestätigen. Dazu wurde die Expression des viralen Core-Proteins in diesen Zellen untersucht. Die für den Nachweis ausgewählte, mit Myristinsäure behandelte Probe zeigt in den Aufnahmen der Infektionskontrolle ein deutliches Vorhandensein des Core-Proteins in repräsentativ ausgewählten *Huh7.5*-Zellen. Zudem ist deutlich zu erkennen, dass das Core-Protein um runde Strukturen, den *lipid droplets*, lokalisiert.



Es lässt sich aus diesem Experiment schließen, dass die selektionierten Zellen mit HCV infiziert waren und somit für die Analysen der Fettsäurebehandlung verwendet werden können.

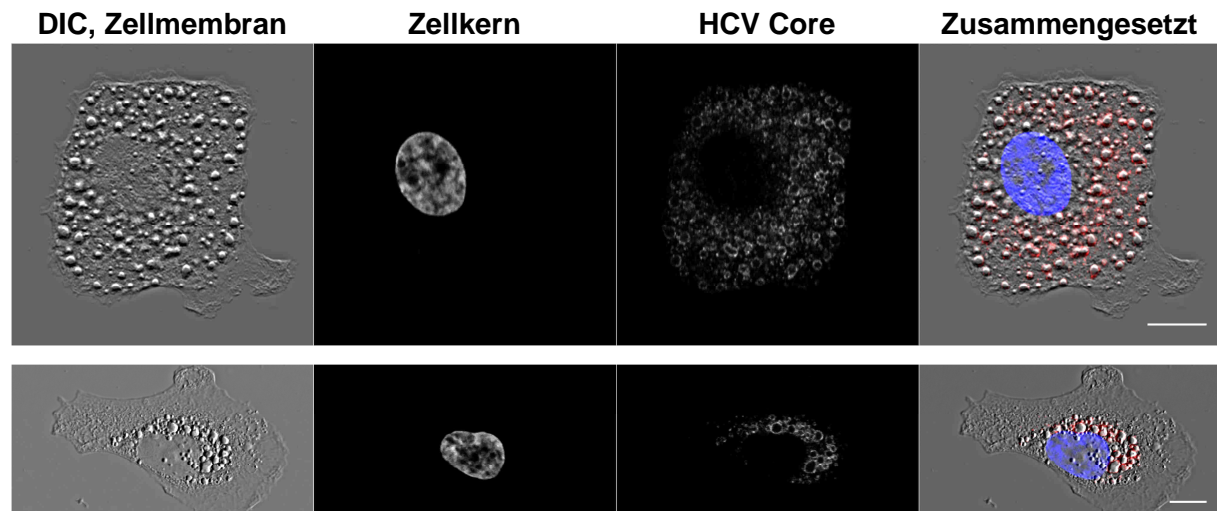
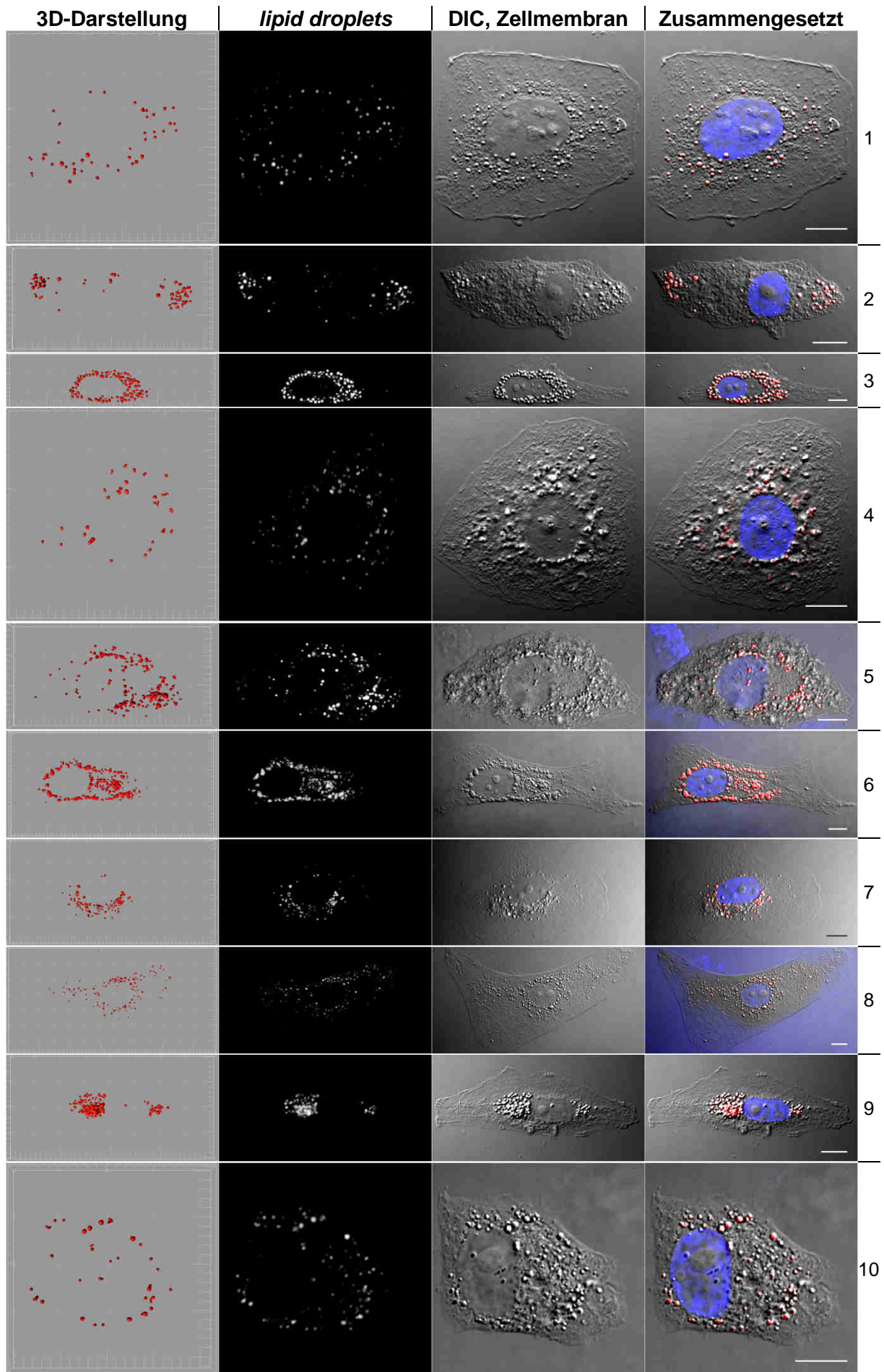


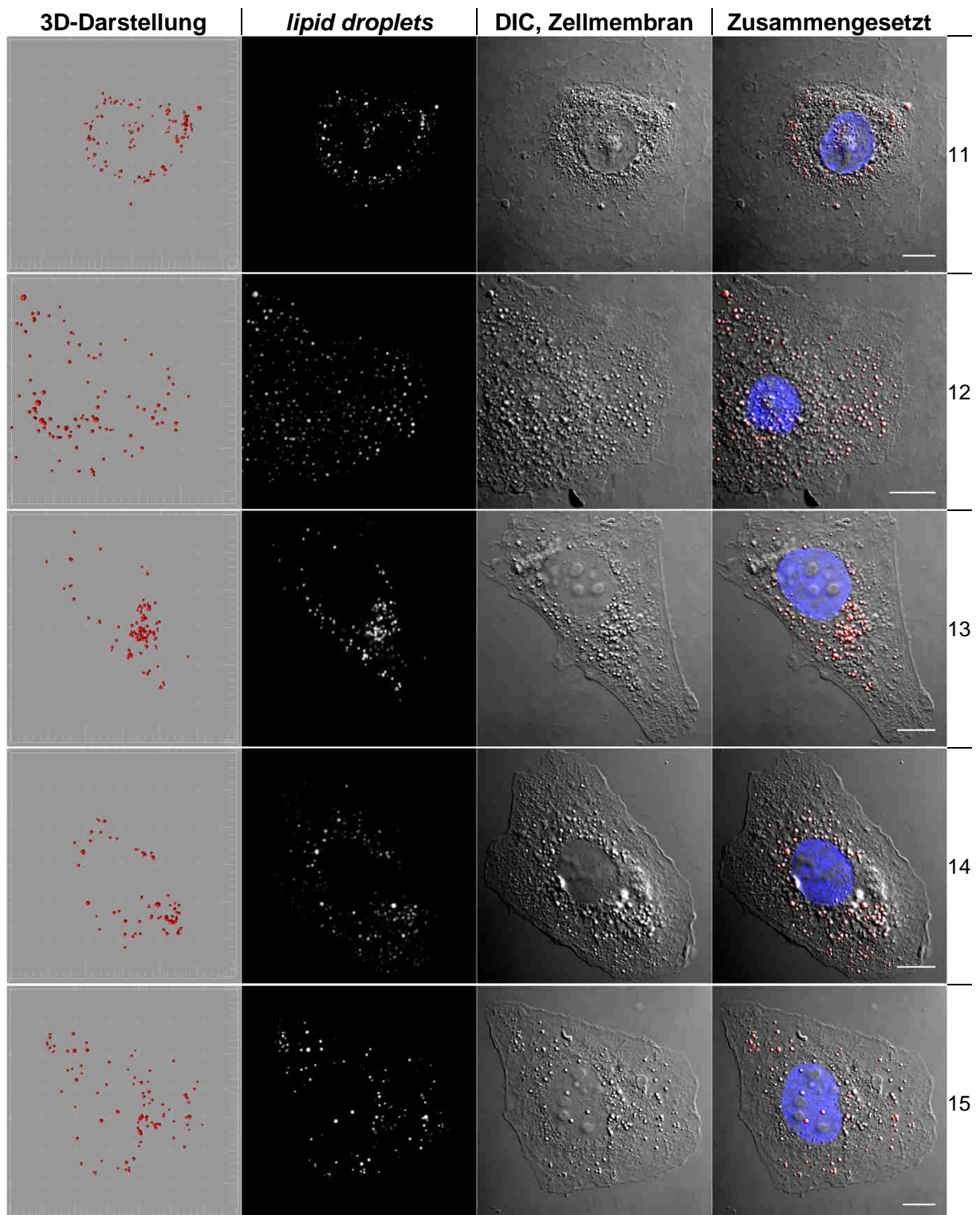
Abbildung 4-4: Infektionskontrolle mit Myristinsäure behandelte, infizierte *Huh7.5*-Zellen 30 Tage nach Infektion. Die DIC-Aufnahmen wurden in ImageJ mit FFT-Bandpass optimiert, Zellkern und HCV  $\alpha$ -Core wurden über das *pure denoise* Plug-In (EPFL, *École Polytechnique Fédérale de Lausanne*) mit 10 Iterationen geglättet. Zusammengesetztes Bild zeigt Zellkern in blau, Immunofluoreszenzmarker des HCV Core in rot und die Zellmembran in Graustufen. Maßstabsbalken wurde auf je 10  $\mu$ m eingestellt.

#### 4.4. Mikroskopische Analyse und 3D Darstellung von *lipid droplets* in HCV-infizierten Zellen nach Fettsäure-Behandlung

Dargestellt sind einzelne HCV-infizierte *Huh7.5*-Zellen mit der dazugehörigen 3D-Darstellung der *lipid droplets*. Die Zellen wurden zuvor mit dem Jc1<sup>NS5AB-Bsd</sup> Hepatitis C-Virus infiziert, eine Woche nach Infektion mit Blasticidin (10  $\mu$ g/mL) selektioniert und unter Selektionsdruck 23 bzw. 29 Tage inkubiert. An Tag 23 bzw. 29 erfolgte die Behandlung mit der jeweiligen Fettsäure bzw. Kontrollmedium für 24 h. Während der Inkubation mit Fettsäuren wurde auf Blasticidin als Selektionsmarker aufgrund erhöhter Toxizität nach dem Aussäen der Zellen verzichtet. Nach Inkubation wurden die Zellen fixiert und mit LD540 (1:7.500) (*lipid droplets*, rot) und Hoechst 33258 (1:7.500) (Zellkern, blau) 45 min unter Lichtausschluss gefärbt. Anschließend wurden die Präparate konfokalmikroskopisch analysiert und die *lipid droplets* mit Hilfe der Imaris Software in 3D dargestellt.

Die in Abbildung 4-5 gezeigten Zellen stellen beispielhaft die Auswahl der in die Analyse eingeflossenen Zellen dar. Es ist gut erkennbar, dass die *lipid droplets* meist in der Nähe des Zellkerns lokalisiert sind. Die Größe der Zellen variierte stark. Morphologisch sehen einige Zellen nach HCV-Infektion und Fettsäurebehandlung gestresst aus. Teilweise gab es Schwierigkeiten einzelne Zellen aufzunehmen, da häufig verschmolzene, mehrkernige Zellen vorlagen, die nicht mehr definiert trennbar waren. Insgesamt konnten aber von jeder Probe mindestens fünf morphologisch gesunde Zellen aufgenommen und im Folgenden quantitativ analysiert werden.





1. Albumin; 2. Laurinsäure; 3. Myristinsäure; 4. Palmitinsäure; 5. Stearinsäure; 6. Ölsäure; 7. Linolsäure; 8.  $\alpha$ -Linolensäure; 9.  $\gamma$ -Linolensäure; 10. Arachidonsäure; 11. Eicosapentaensäure; 12. Docosahexaensäure; 13. DMEM; 14. Cholesterol; 15. EtOH

Abbildung 4-5: Exemplarische Originalaufnahmen repräsentativ ausgewählter HCV-infizierter *Huh7.5*-Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Fettsäuren. 3D-Darstellung entfalteter *lipid droplets* unter Berücksichtigung des Elongationsfaktors. Graustufenbilder nicht entfalteter Zellen, mit ImageJ und *pure denoise* Plug-In (EPFL, *École Polytechnique Fédérale de Lausanne*) mit 10 Iterationen geglättet. Im zusammengesetzten Bild sind Zellkern in blau, *lipid droplets* in rot und die Zelle in Graustufen dargestellt. Die Größe der Quadrate der 3D-Darstellungen und Maßstabsbalken sind auf 10  $\mu\text{m}$  eingestellt worden.



#### 4.5. Quantitative Analyse der *lipid droplets* in HCV-infizierten Zellen nach Fettsäure-Behandlung

Die im vorherigen Abschnitt exemplarisch gezeigten Zellen wurden nun quantitativ analysiert. Die Bezugskontrolle sind mit Albumin/DMEM-Ethanol behandelte HCV-infizierte *Huh7.5*-Zellen. Aus zwei unabhängigen Experimenten wurden jeweils fünf Zellen jeder Probe ausgewählt, sodass insgesamt zehn Zellen pro Behandlung ausgewertet wurden. Die Daten sind logarithmisch zur Basis 10 aufgetragen. Die Anordnung entspricht der Reihenfolge von gesättigten, über einfach ungesättigten zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren, jeweils ansteigend in der Anzahl der Kohlenstoffatome und vorhandener Doppelbindungen.

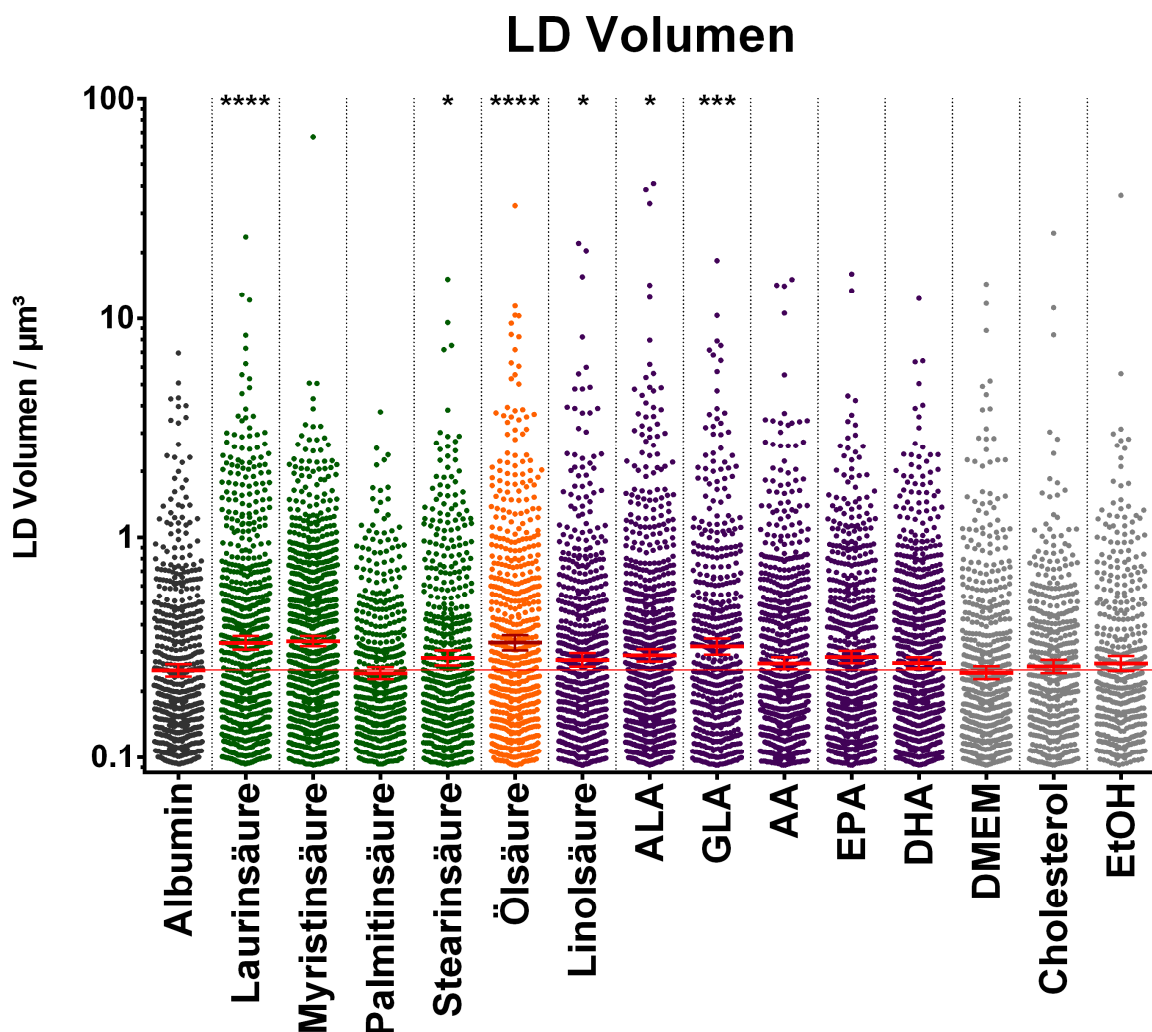


Abbildung 4-6: Verteilung einzelner Volumina stimulierter *lipid droplets*. Mindestvolumen  $0,092 \mu\text{m}^3$ . Ein Punkt stellt ein *lipid droplet* dar. Fehlerbalken sind als Konfidenzintervall (95% CI) um den geometrischen Mittelwert dargestellt (Geometrischer Mittelwert  $\pm$  95% CI,  $n > 427$ , \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\*\*\* $P \leq 0,0001$ ).

Im Volumen einzelner *lipid droplets* stechen Laurin-, Öl- und  $\gamma$ -Linolensäure heraus (Abbildung 4-6). Die mittlere Größe der *droplets* dieser Proben ist deutlich erhöht. Mit Stearin-, Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure behandelte Zellen weisen etwas erhöhte mittlere Volumina einzelner *lipid droplets* auf.

Andere Proben unterscheiden sich nicht signifikant in ihrem mittleren Volumen. Die vier Proben ohne Fettsäuren weisen vergleichbar große Volumina auf.

Das Gesamtvolumen der *lipid droplets* der zehn Zellen schwankt und streut teilweise unterschiedlich stark (Abbildung 4-7). Bei gesättigten Fettsäuren ist kein besonderer Trend bezüglich der Länge der Kohlenstoffkette ersichtlich. Die Ölsäure-Behandlung verursacht eine Erhöhung des Gesamtvolumens der *lipid droplets* einer Zelle. Bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren lässt sich ein Trend zu höherem *lipid droplet*-Gesamtvolumen in der Zelle erkennen. Die Verteilung der mittleren Gesamtvolumina entspricht der Verteilung der Einzelvolumina. Der Unterschied des Gesamtvolumens der jeweiligen Kontroll-Probe ist gering.

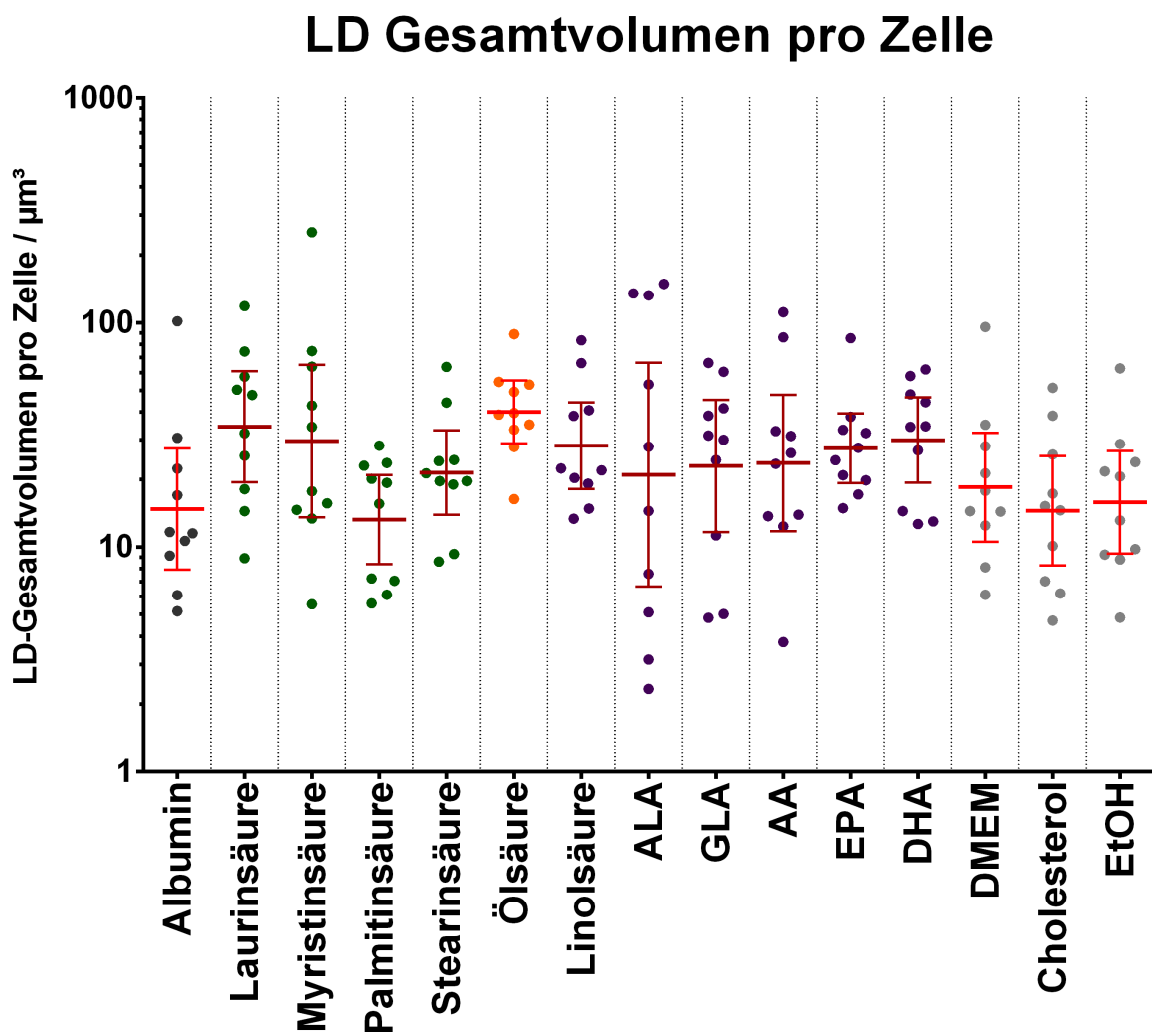


Abbildung 4-7: Verteilung der Gesamtvolumina. Ein Punkt stellt das kumulierte Volumen der *lipid droplets* einer Zelle dar (Geometrischer Mittelwert  $\pm$  95% CI, n=10).

Die Anzahl der *lipid droplets* in der Zelle streut teilweise sehr stark und zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Proben (Abbildung 4-8). Es ist kein Trend erkennbar, der die Anzahl beeinflusst. Die Anzahl der *lipid droplets* bei gesättigten Fettsäuren (Laurin- bis Stearinsäure) korreliert mit der Gesamtvolumen- und Einzelvolumen-Verteilung.

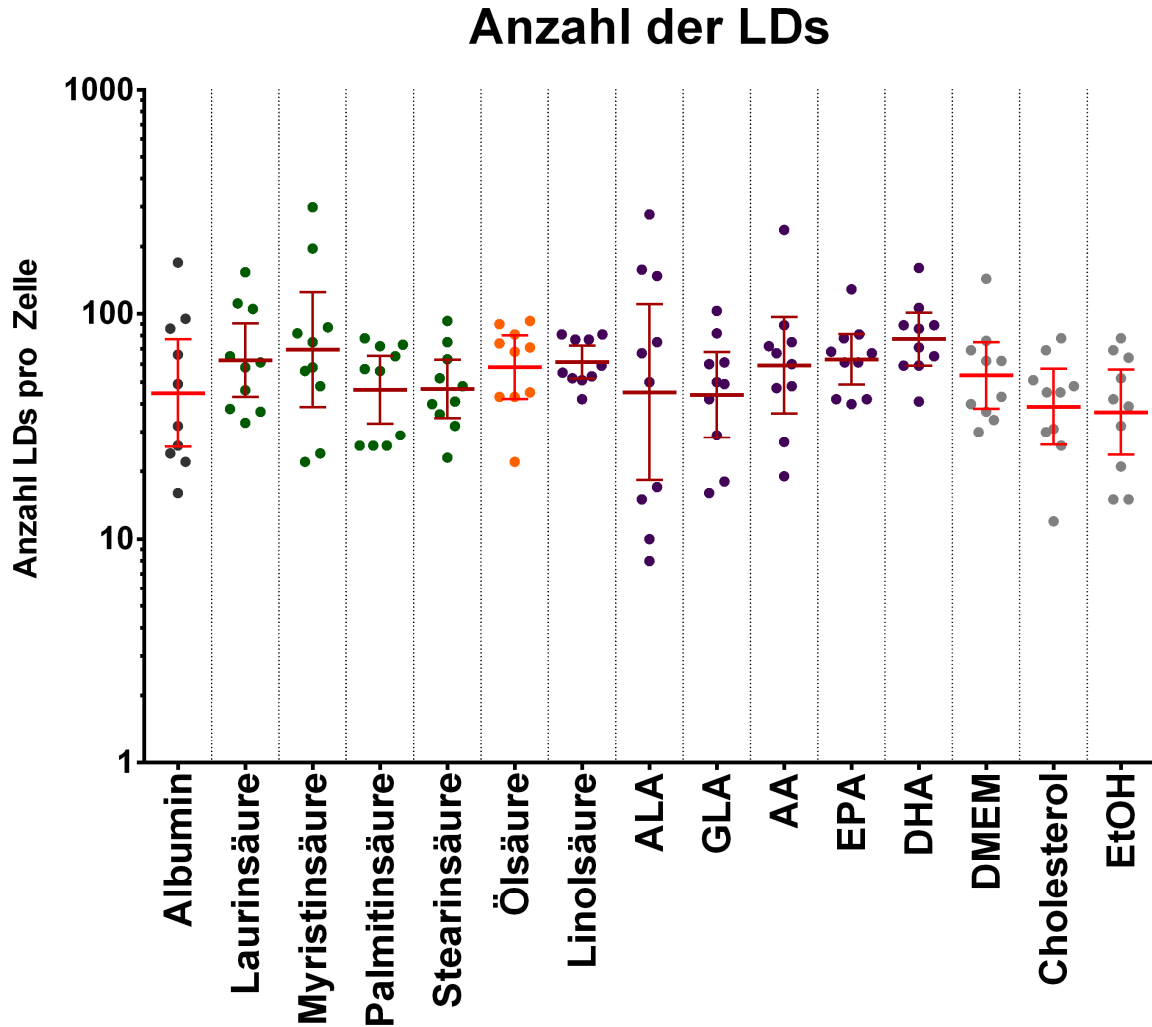


Abbildung 4-8: Anzahl der *lipid droplets* pro Zelle und Stimulanz (Geometrischer Mittelwert  $\pm$  95% CI, n=10).

## 5. Diskussion

### 5.1. Dekonvolution und Elongationsfaktor

Für die unterschiedlichen Algorithmen der Dekonvolution wurden zunächst einige *Huh7.5*-Zellen mittels eines Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops aufgenommen. In diesen Vorversuchen wurden einige Einstellungen getestet, da die Unterschiede in konfokalen Aufnahmen nicht sofort eindeutig feststellbar sind und sich nicht korrekte Einstellungen besser erkennen lassen. Als beste Einstellung hat sich der *Blind*-Algorithmus mit 75 Iterationen gezeigt. Hier konnten die Voreinstellungen für die verschiedenen Aufnahmen gewählt, übernommen und somit in einem Batch-Durchlauf durchgeführt werden.

Aufnahmen von *lipid droplets* in einem konfokalen Mikroskop zeigen eine deutlich genauere Darstellung, aber auch diese können durch die Dekonvolution weiter verbessert werden. Es kann eine signifikante Verbesserung der Trennung einzelner nahe beieinander liegender *lipid droplets* erreicht werden. Das Anwenden der Dekonvolutionsalgorithmen hat ebenfalls zur Folge, dass die Aufnahmen geglättet werden. Die Übergänge zwischen einzelnen Pixel eines *lipid droplets* werden weicher in der Darstellung. Somit wird der Kontrast zwischen *lipid droplet* und Hintergrundrauschen erhöht. Die *lipid droplets* werden schärfer abgegrenzt und dargestellt. Das ermöglicht eine realitätsnahe Analyse der Volumina. Der Einsatz eines lokalen *Threshold* kann auch schwach gefärbte *lipid droplets* hervorheben. Diese Option wird in Imaris nicht ausreichend angeboten. Hier können somit sehr schwach gefärbte *lipid droplets* nicht absolut sicher und genau erfasst werden.

Die Wahl des *non-Blind*-Algorithmus könnte eine weitere Verbesserung in der Abgrenzung der *droplets* bringen, jedoch ist der Aufwand dadurch wesentlich erhöht. Verglichen mit dem *Blind*-Algorithmus ist die Dauer der Einstellungen und Berechnungen der Aufnahmen stark erhöht (etwa 25 min pro Zell-Aufnahme beim *non-Blind*-Algorithmus, im Vergleich zu 10-15 min beim *Blind*-Algorithmus). Nicht korrekte Einstellungen führen außerdem beim *non-Blind*-Algorithmus zu verwaschenen und ungenauen Ergebnissen. Eine falsche Einstellung kann sogar dazu führen, dass die gesamte Darstellung absolut unkenntlich gemacht wird.

In einem experimentellen Aufbau dieser Größenordnung (etwa sieben Aufnahmen pro Probe und Zeitpunkt, also rund 210 einzelne Zellen) mit unterschiedlichen Vergrößerungen und Abmessungen der Aufnahmen stellt der *Blind*-Algorithmus mit 75 Iterationen das beste Ergebnis und Verhältnis zwischen Effizienz und Genauigkeit dar.

Die theoretische Annahme einer Verbesserung der Verzerrung in z-Richtung durch die Dekonvolution konnte nicht bestätigt werden. Die entfalteten Aufnahmen waren ähnlich stark elongiert wie die Rohaufnahmen. Hier musste der Elongationsfaktor, ermittelt aus vorangegangenen Experimenten, eingesetzt werden. Da der Elongationsfaktor vom technischen Aufbau eines Mikroskops abhängig ist (Visser and Oud, 1994), musste keine erneute Bestimmung durchgeführt werden. Es wurde der zuvor ermittelte Faktor von 2,5 verwendet (Klabes, 2013).

Das Anwenden des Faktors zeigt in einigen Aufnahmen ein Abflachen der *lipid droplets*. Bei den meisten Aufnahmen erfolgt jedoch nach Anwenden des Faktors eine Stauchung der Volumina. Die, vor allem kleineren, Volumina werden somit realitätsgetreuer als kugelförmige Struktur dargestellt. Dies lässt erkennen, dass der Elongationsfaktor korrekt ermittelt wurde und hierbei angewandt werden kann. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, muss der Faktor bei allen Aufnahmen angewandt werden.

Eine naturgetreue Abbildung der Roh-Volumina könnte durch den Einsatz eines Wasserobjektivs erreicht werden. Aufgrund geringerer Brechungsindex-Unterschiede zwischen Wasser (RI=1,333) und Mowiol (RI=1,380) wird die Elongation stark reduziert und fast vollständig eliminiert. Die *lipid droplets* können somit beinahe nativ dargestellt werden. Leider war es nicht möglich, für das verwendete Mikroskop während der Arbeit ein geeignetes Wasserobjektiv zu benutzen. Der Vergleich der Daten früherer Aufnahmen (Klabes, 2013) mit den Daten in dieser Arbeit nach der Dekonvolution und Anwenden des ermittelten Elongationsfaktors zeigte keinen signifikanten Unterschied (Daten nicht angezeigt). Dies lässt ebenfalls den Schluss zu, die bearbeiteten Volumina können unter Berücksichtigung des Elongationsfaktors nach Dekonvolution eine beinahe naturgetreue Abbildung der mit einem Wasserobjektiv aufgenommenen LD-Volumina darstellen. Die Ergebnisse beider Methoden (Wasser-Objektiv mit Dekonvolution vs. Öl-Objektiv mit Dekonvolution und Elongationsfaktor) sind hinsichtlich der Darstellung und Auswertung der Volumina vergleichbar.

## **5.2. Mikroskopie von HCV-infizierten Fettsäure-behandelten Huh7.5-Zellen**

Die Konfokal-Mikroskopie als Nachweismethode stellt eine besondere Herausforderung an die Präparate und Mikroskopiebedingungen. Eine zu hohe Intensität der Färbung mit Fluoreszenzmarkern kann dazu führen, dass Zellkompartimente nicht ausreichend differenziert werden können. Auch das Detektieren einzelner *lipid droplets* kann hierdurch erschwert werden, da diese verschmolzen dargestellt werden. Auch können andere Zellkompartimente und deren Membranen mit einem Lipid-Farbstoff gefärbt werden, wenn sich dieser zwischen die Phospholipide einlagert. Eine Überfärbung mit einem DNA-Interkalator kann zu einem erhöhten Hintergrund führen. Bei zu niedriger Konzentration des DNA-Interkalators kann ebenfalls ein starker Hintergrund entstehen, da die Detektorspannung weit erhöht werden muss, bis die Zellkerne sichtbar werden.

Aufgrund der langen Infektionsdauer der Zellen (24 bzw. 30 Tage) sind die Zellen teilweise fusioniert. Es bilden sich Zellagglomerate mit mehreren Zellkernen und einer einheitlichen Zellmembran. Die Darstellung einzelner Zellen wird dadurch mit länger andauernder Infektion erschwert. Das Verschmelzen der zellulären Membranen ist auf die viralen Proteine E1 und E2 zurückzuführen (Takikawa et al., 2000). Mehrkernige Zellen können



nicht mehr in die Auswertung herangezogen werden, da diese u.a. morphologisch entartet sind. Nah beieinander liegende Zellen können zwar teilweise getrennt werden, jedoch ist es schwierig, solche Zellen für eine Volumen-Darstellung zu nutzen. Es standen in dieser Arbeit keine Verfahren zur Verfügung, um die Zellen anhand ihrer Zellmembranen zu segmentieren und zu unterscheiden. Durch die fehlende Segmentierung kann anschließend keine eindeutige Zuordnung der *lipid droplets* zu den Zellen erfolgen.

Die Auswahl der Farbstoffe spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Detektion. Die eingesetzten Farbstoffe sollten so weit wie möglich im Spektrum auseinander liegen, wodurch eine falsch-positive Detektion verhindert wird. Es hat sich während der Aufnahmen ebenfalls gezeigt, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren einen Einfluss auf die Bleichung der Fluoreszenz ausüben. Schwierigkeiten bei der Aufnahme wurden bei  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Linolensäure, DHA und AA deutlich. Der Farbstoff der *lipid droplets* blich zu rasch aus, sodass die Volumina nicht mehr korrekt abgebildet werden konnten. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind aufgrund ihrer Doppelbindungen sogenannte Radikalfänger. Bei Belichtung eines Fluorophors entstehen Radikale, die durch die Fettsäuren aufgefangen werden. Dadurch wird die absolute Menge an anregenden Fluorophoren minimiert und das Signal wird insgesamt schwächer. Je länger oder öfter die Exposition andauert, desto schwächer wird das Signal. Eine 3D-Aufnahme kann somit nicht mehr vollständig abgeschlossen werden und das aufgenommene Volumen wird nicht mehr naturgetreu in voller Höhe abgebildet.

### **5.3. Einzel- und Gesamtvolumen und Anzahl der *lipid droplets* in HCV-infizierten Zellen nach Behandlung mit verschiedene Fettsäuren**

Chronisch-infizierte humane Hepatoma Zellen wurden mit Fettsäure-Albumin-Komplexen behandelt und anschließend mikroskopiert. Einige der untersuchten Fettsäuren bewirken eine starke Änderung der Größe der *lipid droplets*.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Kontrollen (Albumin, DMEM, Cholesterol, EtOH) zeigen sehr geringe Unterschiede in der Ausprägung der *lipid droplets* nach Behandlung. Dies zeigt, dass die Verwendung von Albumin und Ethanol keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl und Größe der *lipid droplets* während der Behandlung mit Fettsäure-Albumin-Komplexen besitzt.

Laurin-, Myristin- und Stearinsäure behandelte Zellen zeigen ein erhöhtes mittleres Volumen der *lipid droplets*. Jedoch sind nur mit Laurin- ( $P < 0,0001$ ) und Stearinsäure ( $P < 0,05$ ) behandelte Zellen signifikant unterschiedlich zur Albuminkontrolle. Es liegt nahe, dass die gesättigten Fettsäuren in Form von Triglyceriden in *lipid droplets* als antitoxische Schutzreaktion aufgenommen und dort gespeichert werden, was zum Anwachsen der Volumina in den Zellen führt. Die Behandlung mit Ölsäure führt ebenfalls dazu, dass *lipid droplets* ein signifikant größeres Volumen annehmen ( $P < 0,0001$ ). Dieser Effekt wurde

ebenfalls schon beschrieben (Miyinari et al., 2007; Peyrou et al., 2013).

Bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren zeigen Linol- ( $P < 0,05$ ),  $\alpha$ -Linolen- ( $P < 0,05$ ) und  $\gamma$ -Linolensäure ( $P < 0,001$ ) eine signifikante Veränderung der mittleren Volumina. Arachidon-, Eicosapentaen- und Docosahexaensäure zeigen hingegen keinen signifikanten Unterschied zur Albumin-Kontrolle. Die Volumina liegen hier jedoch ebenfalls im Mittel höher als die Albumin-behandelten Zellen.

Angesichts des Gesamtvolumens der *lipid droplets* von  $35 \mu\text{m}^3$  pro Zelle tragen Laurin- und Myristinsäure als gesättigte Fettsäuren dazu bei, dieses zu erhöhen. Die Anzahl der LDs nach Behandlung mit beiden Fettsäuren wird ebenfalls erhöht. Das Gesamtvolumen und die Anzahl der LDs von Palmitin- und Stearinsäure behandelten Zellen sind niedriger als bei der Albumin-Kontrolle.

Die Behandlung mit Ölsäure führt dazu, dass bei gleichbleibender Anzahl an *lipid droplets* das Gesamtvolumen steigt. Dies korreliert wiederum mit den Daten der Einzelvolumina, wie auch zuvor in der Literatur gezeigt wurde (Miyinari et al., 2007). Linol-,  $\gamma$ -Linolensäure und EPA erhöhen das Gesamtvolumen der LDs bei ähnlich bleibender Anzahl. Insgesamt zeigt sich ein Trend, dass die Anwesenheit von mehrfach ungesättigten Fettsäuren eine Zunahme des Gesamtvolumens in infizierten Zellen bewirkt.

Es ist bekannt, dass das Core-Protein die Akkumulation von *lipid droplets* in infizierten Zellen anregt (Herker and Ott, 2012). 2005 wurde ebenfalls gezeigt, dass gesättigte Fettsäuren einen positiven Effekt auf die Replikation des HCV haben (Kapadia and Chisari, 2005). Möglicherweise, kann die HCV-Replikation in Anwesenheit der beteiligten Fettsäuren eine Auswirkung auf die Akkumulation der LDs haben und somit die Bildung von Steatose in längeren Infektionszyklen begünstigen. 2002 wurde von Anderson und Fritsche festgestellt, dass mehrfach-ungesättigte Fettsäuren sowohl positive als auch negative Effekte auf eine antivirale Antwort haben können. Trotz der inhibierenden Effekte der PUFAs auf den zellulären Lipidstoffwechsel, kann nicht ausgeschlossen werden, dass während einer chronischen HCV-Infektion ebendiese Effekte negative Auswirkungen auf eine antivirale Antwort aufweisen. Eine in 2014 durchgeführte Arbeit konnte dazu feststellen, dass gesättigte Fettsäuren keinen Einfluss auf die virale RNA-Replikation ausüben, jedoch die Virusproduktion teilweise gemindert wird (Melling, 2014; Sarah Hofmann, *not published*).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch, dass die Unterschiede zwischen den eingesetzten Stimuli in HCV-infizierten Zellen weniger deutlich ausgeprägt sind. Im Gegensatz zu einer in 2013 durchgeführten Arbeit (Klabes, 2013) unterscheiden sich die in dieser Arbeit ermittelten mittleren Größen der *lipid droplets* aller Proben deutlich weniger voneinander. Die Daten sind allerdings nur bedingt vergleichbar, da die Arbeit von 2013 auf uninfizierten *Huh7*-Zellen und nicht auf *Huh7.5*-Zellen basiert. Die Zelllinien können sich

teilweise sehr stark voneinander unterschieden. Als Beispiel können hier *Huh7*-, *Huh7*-Lunet- und *Huh7.5*-Zelllinien angeführt werden. *Huh7*-Zellen sind größer als *Huh7.5*-Zellen, wogegen *Huh7*-Lunets eine flachere Morphologie bei ähnlicher Größe wie *Huh7*-Zellen aufweisen und sich somit sehr gut für die Mikroskopie eignen. *Huh7.5*-Zellen lassen sich jedoch besser infizieren, weswegen diese Zelllinie für die vorliegende Studie benutzt wurde. Es lässt sich hieraus dennoch ein Trend ableiten, dass nach längerer HCV-Infektion die Unterschiede der Fettsäuren auf die *lipid droplets* geringer ausfallen.

## 6. Ausblick

Es gibt einige Bereiche, die eine Verbesserung erfahren können und auch andere Verfahren können nachfolgend Anwendung finden.

Eine Verbesserung in der Mikroskopie kann durch ein anderes Einbettungsmedium erreicht werden. Eine Anforderung an das Medium sind ein ähnlicher Brechungsindex wie das Immersionsöl (etwa 1,515). Die geringere Differenz zwischen beiden Medien führt zu geringerer Elongation in z-Richtung während der Aufnahmen. Die aufgenommenen Volumina sind hierdurch naturgetreu abgebildet, die Aufnahmen erfahren keine Manipulation. Eine weitere Anforderung sind inerte Eigenschaften des Mediums. Es darf weder die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe aufnehmen und mit ihnen interagieren, noch darf es eine hohe Eigenfluoreszenz in den eingesetzten Wellenlängen der Anregungslaser besitzen. Eine hohe Eigenfluoreszenz kann die eigentlichen Signale überlagern, sodass diese nicht vernünftig auswertbar werden. Einige Silikonöle (*silicone oil*) könnten hier Anwendung finden. Neben den Ölen wären auch einfache Zuckerlösungen (Saccharose) möglich. Eine Zuckerlösung erlaubt jedoch nicht die längere Aufbewahrung von Proben und somit Aufnahmen zu späteren Zeitpunkten. Konnte bisher eine Probe über längeren Zeitraum fixiert in Mowiol eingebettet mikroskopiert werden, ohne Nachteile in der Darstellung zu befürchten, kann eine Zuckerlösung die Proben stark austrocknen, da Zucker hydrophile Eigenschaften besitzen. Die Aufnahmen können somit nur in sehr kurzen Zeiträumen mikroskopiert werden. Das schränkt den Einsatz ein.

Schwierigkeiten in der Selektion der Signale für eine räumliche Darstellung können durch andere Algorithmen wesentlich verbessert werden. Die in Imaris verwendete Segmentierungsmethode basiert auf dem absolutem *Threshold*. Dieses Verfahren, trotz seiner Schnelligkeit, erreicht bei natürlichen Bildelementen nie eine vollständige Segmentierung. Vergleichbar mit dem menschlichen Sehsinn, kann hingegen das sogenannte adaptive (oder dynamische, bzw. lokale) *Thresholding* eine wesentliche Verbesserung der Segmentierung darstellen. Weniger ausgeleuchtete oder intensive Bereiche können somit deutlich vom Hintergrund und gegeneinander abgegrenzt werden. Diese Segmentierungsmethode ist bereits in einem Plug-In in ImageJ implementiert. Der Vorteil dieses Plug-Ins auf Windows-Betriebssystemen ist die Darstellung in WYSIWYG (*what you see is what you get*). Eine Implementierung des Algorithmus mit der Möglichkeit, über eine Schichtaufnahme (*Stack*) den lokalen *Threshold* anzuwenden, würde es erlauben, genauere Analysen hinsichtlich der Volumina aufzuzeichnen. Eine dreidimensionale Darstellung würde in diesem Fall ebenfalls entfallen. Eine Batch-Analyse vieler Aufnahmen könnte hier ebenfalls eine Zeitersparnis bringen.

Neben der Mikroskopie können ebenfalls andere Nachweisverfahren zur Analyse der Lipide herangezogen werden. Isolierte *lipid droplets* können mittels Massenspektrometrie auf die vorhandenen Triglyceride hin untersucht werden. Der Unterschied zwischen infizierten und uninfizierten Zellen kann aufschlussreich über die Verteilung und regulatorischen Effekte

der Triglyceride bzw. deren freien Fettsäuren sein. Durch die Verwendung markierter freier Fettsäuren (beispielsweise mit Isotopen) zur Stimulation kann die Metabolisierung in der Zelle nachvollzogen werden. Fragestellungen, wie "Wo werden aufgenommene freie Fettsäuren in der Zelle verwendet?", können dadurch geklärt werden. Hier können ebenfalls die Unterschiede zwischen infizierter und nicht infizierter Zellkultur nach Stimulation mit Fettsäuren aufgezeigt werden. Auch weitere Trennungsmethoden, wie HPLC, könnten Anwendung finden. Beide Verfahren könnten verbesserte quantitative und qualitative Ergebnisse liefern. Auch die Untersuchung der Gesamtverteilung der Fettsäuren in der Zelle könnte von Interesse sein.

Inwieweit mehrfach ungesättigte Fettsäuren einen negativen Effekt auf die HCV-Replikation in chronisch-infizierten Zellen ausüben, könnte durch Proteinnachweismethoden wie dem Western Blot oder HCV RNA Quantifikation untersucht werden. Daneben könnte untersucht werden, ob Fettsäuren kovalent oder über schwache Bindungen an HCV-Proteinen auftreten und inwieweit diese Einfluss auf deren Funktionalität ausüben.

Neben der angesprochenen Verbesserung der technischen Verfahren können ebenfalls andere Virus-Stämme eingesetzt werden. Wie oben erwähnt, ist der hier eingesetzte Jc1-Virusstamm eine Chimäre aus dem JFH1-Virus und einem Zellkultur-adaptierten Virus (J6). Sowohl das JFH1-Virus als auch J6 sind Vertreter des Genotyps 2a. Da JFH1 ein nicht auf Zellkultur adaptiertes Virus ist, könnte es ebenfalls zur Untersuchung herangezogen werden. Trotz schlechter Infektionsraten gegenüber dem Jc1-Stamm können *Huh7.5*-Zellen infiziert werden. Derselbe methodische Vorgang dieser Arbeit könnte hier angewendet werden und mögliche Unterschiede zwischen Zellkultur adaptierten und nicht adaptierten Virusstämmen untersucht werden.

Neben dem oben genannten Genotyp 2a wäre es interessant, die *lipid droplets* nach einer Fettsäurestimulation auf mit einem Genotyp 3 infizierten Hepatomazellen zu untersuchen. Viren des Genotyps 3 verursachen eine ausgeprägte Steatose in Patienten. Ein Zellkulturmodell mit robusten Infektionsraten ist jedoch gegenwärtig noch nicht vorhanden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbe, E. (1873) 'Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung', *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, vol. 9, no. 1, pp. 413–418.
- Aescht, E., Mulisch, M. and Romeis, B. (2010) *Mikroskopische Technik*, 18th edn, Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl.
- Alberts, B. (1995) *Molekularbiologie der Zelle*, 3rd edn, Weinheim [u.a.], VCH.
- Anderson, M. and Fritsche, K. L. (2002) '(n-3) Fatty acids and infectious disease resistance', *The Journal of nutrition*, vol. 132, no. 12, pp. 3566–3576.
- Arrese, E. L., Saudale, F. Z. and Soulages, J. L. (2014) 'Lipid Droplets as Signaling Platforms Linking Metabolic and Cellular Functions', *Lipid insights*, vol. 7, pp. 7–16.
- Bartenschlager, R. and Pietschmann, T. (2005) 'Efficient hepatitis C virus cell culture system: what a difference the host cell makes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 28, pp. 9739–9740.
- Bartenschlager, R. and Sparacio, S. (2007) 'Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture', *Virus research*, vol. 127, no. 2, pp. 195–207.
- Camus, G., Herker, E., Modi, A. A., Haas, J. T., Ramage, H. R., Farese, R. V. and Ott, M. (2013) 'Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core', *The Journal of biological chemistry*, vol. 288, no. 14, pp. 9915–9923.
- Clauss, W. and Clauss, C. (2009) *Humanbiologie kompakt*, Heidelberg, Neckar, Spektrum Akademischer Verlag.
- Flindt, R. (2006) *Amazing numbers in biology*, Berlin, Springer-Verlag.
- Gleissman, H., Yang, R., Martinod, K., Lindskog, M., Serhan, C. N., Johnsen, J. I. and Kogner, P. (2010) 'Docosahexaenoic acid metabolome in neural tumors: identification of cytotoxic intermediates', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 24, no. 3, pp. 906–915.
- Guo, Y., Walther, T. C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., Wong, J. S., Vale, R. D., Walter, P. and Farese, R. V. (2008) 'Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization', *Nature*, vol. 453, no. 7195, pp. 657–661.
- Haller, D., Rimbach, G. and Grune, T. (2013) *Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe*, Berlin, Springer.
- Harris, C., Herker, E., Farese, R. V. and Ott, M. (2011) 'Hepatitis C virus core protein decreases lipid droplet turnover: a mechanism for core-induced steatosis', *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 49, pp. 42615–42625.
- Hecht, E. (2009) *Optik*, 5th edn, München, Oldenbourg.
- Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A. R., Farese, R. V. and Ott, M. (2010) 'Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1', *Nature medicine*, vol. 16, no. 11, pp. 1295–1298.

- Herker, E. and Ott, M. (2011) 'Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, vol. 22, no. 6, pp. 241–248.
- Herker, E. and Ott, M. (2012) 'Emerging role of lipid droplets in host/pathogen interactions', *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 4, pp. 2280–2287.
- Hibbs, A. R., MacDonald, G. and Garsha, K. (2006) 'Practical Confocal Microscopy', in Pawley, J. B. (ed) *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, Boston, MA, Springer US, pp. 650–671.
- Holmes, T. J., Biggs, D. and Abu-Tarif, A. (2006) 'Blind Deconvolution', in Pawley, J. B. (ed) *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, Boston, MA, Springer US, pp. 468–487.
- Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J. and Truant, J. P. (1972) 'Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 2, no. 1, pp. 23–28.
- Kapadia, S. B. and Chisari, F. V. (2005) 'Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 7, pp. 2561–2566.
- Klabes, M. (2013) *Quantitative Analyse von lipid droplets nach Fettsäurestimulation und Hepatitis C Virus-Infektion*, Masterarbeit, Hamburg, Universität Hamburg.
- Köhler, A. and Loos, W. (1941) 'Das Phasenkontrastverfahren und seine Anwendungen in der Mikroskopie', *Die Naturwissenschaften*, vol. 29, no. 4, pp. 49–61.
- Kuchling, H. (2007) *Taschenbuch der Physik: Mit zahlreichen Bildern und Tabellen*, 19th edn, München, Fachbuchverl. Leipzig im Carl-Hanser-Verl.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wölk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A. and Rice, C. M. (2005) 'Complete replication of hepatitis C virus in cell culture', *Science (New York, N.Y.)*, vol. 309, no. 5734, pp. 623–626.
- Lindenbach, B. D. and Rice, C. M. (2005) 'Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function', *Nature*, vol. 436, no. 7053, pp. 933–938.
- Liu, Z. and He, J. J. (2013) 'Cell-cell contact-mediated hepatitis C virus (HCV) transfer, productive infection, and replication and their requirement for HCV receptors', *Journal of virology*, vol. 87, no. 15, pp. 8545–8558.
- Melling, M. (2014) *Influences of Fatty Acids on Hepatitis C Virus Replication*, Masterarbeit, Rheinbach, Hochschule Bonn-Rhein-Sieg.
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. and Shimotohno, K. (2007) 'The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production', *Nature cell biology*, vol. 9, no. 9, pp. 1089–1097.
- Papackova, Z. and Cahova, M. (2015) 'Fatty acid signaling: the new function of intracellular lipases', *International journal of molecular sciences*, vol. 16, no. 2, pp. 3831–3855.
- Peyrou, M., Clément, S., Maier, C., Bourgoin, L., Branche, E., Conzelmann, S., Kaddai, V., Foti, M. and Negro, F. (2013) 'PTEN protein phosphatase activity regulates hepatitis C virus secretion through modulation of cholesterol metabolism', *Journal of hepatology*, vol. 59, no. 3, pp. 420–426.

- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.-L. and Bartenschlager, R. (2006) 'Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 19, pp. 7408–7413.
- Pietschmann, T., Steinmann, E. and Ciesek, S. (2008) 'Hepatitis-C-Virus-Zellkulturmodelle. Neue Perspektiven für Forschung und Klinik', *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, vol. 133, no. 30, pp. 1580–1584.
- Ramakrishnaiah, V., Thumann, C., Fofana, I., Habersetzer, F., Pan, Q., de Ruiter, Petra E, Willemsen, R., Demmers, Jeroen A A, Stalin Raj, V., Jenster, G., Kwekkeboom, J., Tilanus, H. W., Haagmans, B. L., Baumert, T. F. and van der Laan, Luc J W (2013) 'Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 32, pp. 13109–13113.
- Rustan, A. C. and Drevon, C. A. (2001) 'Fatty Acids: Structures and Properties', in *Encyclopedia of Life Sciences*, Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.
- Takikawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y. and Miyamura, T. (2000) 'Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins', *Journal of virology*, vol. 74, no. 11, pp. 5066–5074.
- Visser, T. D. and Oud, J. L. (1994) 'Volume measurements in three-dimensional microscopy', *Scanning*, vol. 16, no. 4, pp. 198–200.
- Vogt, D. A., Camus, G., Herker, E., Webster, B. R., Tsou, C.-L., Greene, W. C., Yen, T.-S. B. and Ott, M. (2013) 'Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C Virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein', *PLoS pathogens*, vol. 9, no. 4, pp. e1003302.
- Webster, B., Ott, M. and Greene, W. C. (2013) 'Evasion of superinfection exclusion and elimination of primary viral RNA by an adapted strain of hepatitis C virus', *Journal of virology*, vol. 87, no. 24, pp. 13354–13369.
- WHO (2014) *Hepatitis C* [Online], World Health Organization (Fact sheet N°164). Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/> (Accessed 17 February 2015).
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T. and Chisari, F. V. (2005) 'Robust hepatitis C virus infection in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 26, pp. 9294–9299.



## 8. Anhang

### 8.1. Quellcode des Programms für Auswertung von csv-Dateien

```

require(XLConnect);
require(rJava);

wbname="FA1_new.xls"; wbAname="FA1_Sums.xls";
cntr=1;
wb<-loadWorkbook(wbname, create=T);
wbA<-loadWorkbook(wbAname, create=T);

pfolder <- " ";

setwd(pfolder);
tempdir<-list.dirs(); tempdir=tempdir[-1];
tempdir<-gsub("./", "", tempdir);
##### trim files #####
file_list1<-gsub("./", "", tempdir);
file_list1<-gsub("_Statistics", "_Volume.csv", file_list1); file_list1<-gsub(" ", "_", file_list1);
VolFiles<-file_list1;
VolFiles<-gsub(VolFiles, pattern = c("FA1_JC1_"), replacement = "");
VolFiles<-gsub(VolFiles, pattern = c("_Volume.csv"), replacement = "");

for(dirs in tempdir){
  tempdir1<-paste(pfolder, tempdir[cntr], sep="/");
  setwd(tempdir1); #tempdir1;
  for(f in file_list1){
    if(file.exists(f)){
      ## get data
      tempdata1<-read.csv(file_list1[cntr], header=T, sep=";", dec=".", skip=3);
      nRows <- nrow(tempdata1);
      tempdata1$X<-NULL; tempdata1$ID<-NULL; tempdata1$Time<-NULL;
      tempdata1$Category<-NULL; tempdata1$Unit<-NULL;

      names(tempdata1)[1]<-"Volume";
      sumValue <- sum(as.numeric(sub(",", ".", tempdata1$Volume, fixed = TRUE)));
      NameDataSet <- VolFiles[cntr];
      tempdata1[1,2] <- NameDataSet; names(tempdata1)[2] <- "Data Set:";
      tempdata1[is.na(tempdata1)]<-"";

      tempdata2<- data.frame();
      tempdata2[1,1] <- NameDataSet; names(tempdata2)[1] <- "Data Set:";
      tempdata2[1,2] <- nRows; names(tempdata2)[2] <- "nr of LD:";
      tempdata2[1,3] <- sumValue; names(tempdata2)[3] <- "Sum Volume:";

      setwd(pfolder);

      createSheet(object = wb,name = NameDataSet);
      appendWorksheet(wb, data = tempdata1, sheet = NameDataSet, header=T, endRow=nRows);
      createSheet(object=wbA, name=NameDataSet);
      appendWorksheet(wbA, data=tempdata2, sheet=NameDataSet, header=T);
      createSheet(object = wb,name = NameDataSet);
      writeWorksheet(wb,tempdata1, NameDataSet, header=T, rownames=NULL)
      #appendWorksheet(wb, data = tempdata1, sheet = NameDataSet, header=F);
    }
  }
  cntr=cntr+1;
}
#saveWorkbook(wb);
#saveWorkbook(wbA);
remove(VolFiles, NameDataSet, cntr, f, dirs, nRows, tempdir, tempdir1, tempdata1, tempdata2, sumValue,
file_list1, pfolder);
xlcFreeMemory();
##### #####
##### part 1 done #####
##### #####
##### part 2 starts #####

```

```

#####
m_wbname=paste("Merged_Volume", wbname);
# m_wbAname=paste("Merged_Volume", wbAname);
newwb<-loadWorkbook(m_wbname, create=T);
# newwbA<-loadWorkbook(m_wbAname, create=T);
cntr=1;
sheetsname<-getSheets(wb);
length_dir=length(sheetsname);
s=1
repeat{
  chk1=substr(sheetsname[s],0,5);
  chk2=substr(sheetsname[s+1], 0,5);
  while(chk1==chk2){
    if(cntr==1){
      createSheet(newwb,name= sheetsname[s]);
      tempdata1 <- readWorksheet(object = wb, sheet = sheetsname[s], startRow=2, endRow=,header=F);
    }
    tempdata1<-rbind(tempdata1,readWorksheet(object = wb, sheet = sheetsname[s+cntr], startRow=2,
header=F));
    cntr=cntr+1;
    chk1=substr(sheetsname[s],0,5);
    chk2=substr(sheetsname[s+cntr], 0,5);
  }
  #appendWorksheet(object = newwb, data = tempdata1, sheet = sheetsname[s], header=F);
  writeWorksheet(newwb,tempdata1, sheetsname[s], header=F, rownames=NULL);

  s=s+cntr;
  cntr=1;
  remove(tempdata1);
  xlcFreeMemory(); #free java memory

  if(is.na(chk2)) {break();}
}
writeWorksheet(newwb,tempdata1, sheetsname[s], header=T, rownames=NULL);
# appendWorksheet(object = newwb, data = tempdata1, sheet = sheetsname[s], header=F);

s=1; cntr=1;
repeat{
  chk1=substr(sheetsname[s],0,5);
  chk2=substr(sheetsname[s+1], 0,5);
  while(chk1==chk2){
    if(cntr==1){
      createSheet(newwbA,name= sheetsname[s]);
      tempdata2<-data.frame();
      tempdata2 <- readWorksheet(object= wbA, sheet = sheetsname[s], startRow=2,endRow=3, header=T);
    }
    tempdata2<-rbind(tempdata2,readWorksheet(object = wbA, sheet = sheetsname[s+cntr],
startRow=2,endRow=3, header=T));
    cntr=cntr+1;
    chk1=substr(sheetsname[s],0,5);
    chk2=substr(sheetsname[s+cntr], 0,5);
  }
  appendWorksheet(object = newwbA, data = tempdata2, sheet = sheetsname[s], header=F);

  if(s+cntr>length_dir) { break();}
  s=s+cntr;
  cntr=1;
  remove(tempdata2);
}
appendWorksheet(object = newwbA, data = tempdata2, sheet = sheetsname[s], header=F);
xlcFreeMemory(); #free java memory
# appendWorksheet(object = newwbA, data = tempdata2, sheet = sheetsname[s], header=F);

# getSheets(wb)==getSheets(wbA);
# getSheets(newwb)==getSheets(newwbA);

saveWorkbook(wb);
saveWorkbook(wbA);

```

```

saveWorkbook(newwb);
saveWorkbook(newwbA);

remove(chk1, chk2, cntr, m_wbname, newwb, sheetsname, s, length_dir, m_wbAname, newwbA, wb, wbA,
wbAname, wbname, tempdata1)
##### it's the end #####
xlcfreeMemory();

```

## 8.2. Quellcode für NIS Elements zum Konvertieren von \*.nd2-Dateien ins \*.ics/\*.ids-Format für AutoQuant X2 und Bereitstellen von MIPs

```

//filename=fullpathwithname
//title=onlytitle
char filename[260],snpsht[260],title[260],fileext[5];
int cntr=0; int imgsize=0;

for(cntr=0;cntr<108;cntr=cntr+1){
    Get_Filename(FILE_IMAGE,filename);
    Get_FileTitle(title,filename);
    Get_FileSize(title,imgsize);
    if(imgsize>10){
        fileext=".ics";
        strcat(filename,fileext);
        fileext=".jpg";
        strcat(snpsht,fileext);
        LUTs_Reset();
        TogglePixelSaturationIndication();
        ND_ShowMaxIntProjectionImage(0);//MaxIP
        CreateViewSnapshot();
        ImageSaveAs(snpsht,2,0);
        CloseCurrentDocument(0);//closesnapshot
        CloseCurrentDocument(0);//closeMIPwithout savings
        ActivateDocument(filename);
        fileext=".ics";
        strcat(filename,fileext);
        ImageSaveAs(filename,18,0);
        //Wait(5);//wait5secaftersaving
    }
    CloseCurrentDocument(2);//closedocumentwithout savings
    ImageOpenNext();
    ViewSplitComponents(1);
}

```

## 8.3. Quellcode für Angleichen von Dateinamen mit Windows-Kommandozeilenoperator (\*.bat)

```

@echo off
setlocal enableDelayedExpansion

for %%f in (*) do (
    set "filename=%%~f"

    for %%A in (A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z) do (
        set "filename=!filename:%%A=%%A!"
    )
    ren "%%f" "!filename!" >nul 2>&1
)
endlocal

```

## 8.4. Einstellungen für Imaris 7.6.4 zur Detektion von *lipid droplets* (\*.xml)

```

<creationparameters>
<creationparameter classtypeid="bpSurfacesViewer" name="LD540_PT">
<bpSurfacesCreationParameters mEnableRegionOfInterest="false" mProcessEntireImage="false"
mEnableRegionGrowing="false" mEnableTracking="false" mSourceChannelIndex="1" mEnableSmooth="true"

```

```
mSurfaceGrainSize="0.06" mEnableEliminateBackground="false" mDiameterOfLargestSphere="0.621482"
mEnableAutomaticThreshold="true" mManualThresholdValue="" mActiveThreshold="false"
mEnableAutomaticThresholdB="true" mManualThresholdValueB="" mActiveThresholdB="false"
mRegionGrowingEstimatedDiameter="0.828643" mRegionGrowingBackgroundSubtraction="true">
<bpRegionOfInterestContainer>
<bpRegionOfInterest mMinXYZ="256 256 0" mMaxXYZ="767 767 40" mMinT="0" mMaxT="0" mName="Region of
Interest 1" mActive="true" mSelected="false"/>
</bpRegionOfInterestContainer>
<mRegionGrowingFilter>
<bpStatisticsFilter mLowerThresholdEnable="true" mLowerThresholdManual="false"
mLowerThresholdManualInitToAuto="true" mLowerThresholdManualValue="0" mUpperThresholdEnable="false"
mUpperThresholdManual="false" mUpperThresholdManualInitToAuto="true" mUpperThresholdManualValue="1"
mSelectHigh="true" mManualThreshold="false" mManualThresholdValue="0.000"
mInitManualThresholdToAuto="true">
  <bpStatisticsValueType mName="Quality" mUnit="" mFactors="0"/>
</bpStatisticsFilter>
</mRegionGrowingFilter>
<mSurfacesFilter>
<bpStatisticsFilter mLowerThresholdEnable="true" mLowerThresholdManual="true"
mLowerThresholdManualInitToAuto="false" mLowerThresholdManualValue="0.09195"
mUpperThresholdEnable="false" mUpperThresholdManual="false" mUpperThresholdManualInitToAuto="false"
mUpperThresholdManualValue="1" mSelectHigh="true" mManualThreshold="true"
mManualThresholdValue="0.09195" mInitManualThresholdToAuto="false">
  <bpStatisticsValueType mName="Volume" mUnit="um^3" mFactors="0"/>
</bpStatisticsFilter>
</mSurfacesFilter>
<bpObjectTrackingAlgorithmParameters TrackAlgoName="Autoregressive Motion" mFillGapEnable="false">
<ObjectTrackingAlgorithmLinearAssignment MaxGapSize="3" MaxDistance="20"/>
</bpObjectTrackingAlgorithmParameters>
<mTrackFilter>
<bpStatisticsFilter mLowerThresholdEnable="true" mLowerThresholdManual="true"
mLowerThresholdManualInitToAuto="false" mLowerThresholdManualValue="2.5" mUpperThresholdEnable="false"
mUpperThresholdManual="false" mUpperThresholdManualInitToAuto="true" mUpperThresholdManualValue="1"
mSelectHigh="true" mManualThreshold="true" mManualThresholdValue="2.500"
mInitManualThresholdToAuto="false">
  <bpStatisticsValueType mName="Track Duration" mUnit="" mFactors="0"/>
</bpStatisticsFilter>
</mTrackFilter>
</bpSurfacesCreationParameters>
</creationparameter>
</creationparameters>
```