

# Untersuchung der Dynamik von Lipid Droplets in lebenden humanen Zellen

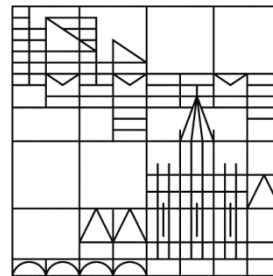
Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Jüngst, Christian

an der

Universität  
Konstanz



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion

Fachbereich Chemie

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

1. Referent: Prof. Dr. Andreas Zumbusch

2. Referent: Prof. Dr. Christof Hauck

Vorsitzende der Prüfungskommission: Prof. Dr. Karin Hauser







Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation entstanden im Zeitraum von Oktober 2008 bis März 2013 im Fachbereich Chemie der Universität Konstanz in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Zumbusch.

Mein großer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Andreas Zumbusch, der mir über die gesamte Zeit meiner Promotion immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mir die nötige Freiheit gab, mir ein eigenständiges Promotionsthema erarbeiten zu können. Herrn Prof. Dr. Christof Hauck danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Außerdem danke ich Frau Prof. Dr. Karin Hauser für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes. Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Sepp Dieter Kohlwein von der Universität Graz sowie seiner ganzen Arbeitsgruppe bedanken, allen voran bei Dr. Heimo Wolinski. Ihnen habe ich es zu verdanken, dass ich durch eine erfolgreiche Kooperation in ersten Kontakt mit der Lipid Droplet-Thematik gekommen bin. Besonders bedanken will ich mich für die Ermöglichung zweier kurzer Forschungsaufenthalte in Graz, die für mich sehr lehrreich waren und die in einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre stattfanden.

Ich danke der Graduiertenschule Chemical Biology der Universität Konstanz für die Aufnahme in ihren Kreis und die Gewährung eines großzügigen Promotionsstipendiums. Ich danke den Mitgliedern meines Promotionskomitees, Herrn Prof. Dr. Christof Hauck und Herrn Dr. Dominik Wöll für deren Betreuung und die anregenden regelmäßigen Diskussionen.

Ich danke allen Studenten, die ich während meiner Promotion betreuen durfte. Besonders hervorheben will ich diejenigen Mitarbeiterstudenten und Bachelorstudenten, die mir bei der Bearbeitung meines eigenen Themas geholfen haben. Ich danke herzlich Johanna Ude, Jasmin Franz, Mario Hupfeld und Franziska Doll.

Ich danke Friederike Schütze aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Stefan Mecking, Andrea Niederwieser aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Valentin Wittmann sowie Georg Fischer für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei kleineren Nebenprojekten.

Besonders bedanke ich mich bei Martin Winterhalder für die großartige Hilfe bei der CARS-Mikroskopie und im Generellen. Ohne ihn wären viele Messungen nicht möglich gewesen. Romedi Selm danke ich für die Hilfe bei der Nutzung der Faserlaser und Matthias Klein für die Hilfe bei der Synthese der Fluoreszenzfarbstoffe.

Ich danke meinen Kollegen für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die schöne Zeit der letzten Jahre, insbesondere gilt dies für Matze, Martin, Christelle, Maren, Beate und Franzi.

Zuletzt danke ich meiner Familie sowie Andrea für die jahrelange Unterstützung.



---

## Begutachtete Publikationen

- Fischer, G. M., Jüngst, C., Isomaki-Krondahl, M., Gauss, D., Moller, H. M., Daltrozzo, E., and Zumbusch, A. (2010) Asymmetric PPCys: strongly fluorescing NIR labels. *Chem Commun (Camb)*, **46**, 5289-5291
- Jüngst, C., Winterhalder, M. J., and Zumbusch, A. (2011) Fast and long term lipid droplet tracking with CARS microscopy. *J Biophotonics*, **4**, 435-441
  - Teile dieser Publikation sind Bestandteil der Kapitel 3.2.1 und 3.2.2
- Jüngst, C., Selm, R., Winterhalder, M.J. and Zumbusch, A. (2012) CARS Microscopy. in *Comprehensive Biophysics* (Egelman, H. ed.), Academic Press, Oxford, 165-179
- Schütze, F., Stempfle, B., Jüngst, C., Woll, D., Zumbusch, A., and Mecking, S. (2012) Fluorescent conjugated block copolymer nanoparticles by controlled mixing. *Chem Commun*, **48**, 2104-2106
  - Teile dieser Publikation sind Bestandteil des Kapitels 3.3.1
- Paar, M., Jüngst, C., Steiner, N. A., Magnes, C., Sinner, F., Kolb, D., Lass, A., Zimmermann, R., Zumbusch, A., Kohlwein, S. D., and Wolinski, H. (2012) Remodeling Of lipid droplets during lipolysis and growth in adipocytes. *J Biol Chem*, **287**, 11164-11173
  - Teile dieser Publikation sind Bestandteil des Kapitels 3.2.4
- Robotta, M., Hintze, C., Schildknecht, S., Zijlstra, N., Jüngst, C., Karreman, C., Huber, M., Leist, M., Subramaniam, V., and Drescher, M. (2012) Locally Resolved Membrane Binding Affinity of the N-Terminus of alpha-Synuclein. *Biochemistry*, **51** (19), 3960-3962
- Niederwieser, A., Späte, A. K., Nguyen, L. D., Jüngst, C., Reutter, W., and Wittmann, V. (2013) Two-color glycan labeling of live cells by a combination of Diels-Alder and click chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* **52**, 4265-4268
- Jüngst, C., Klein, M., and Zumbusch, A. (2013) Long-term Live Cell Microscopy Studies of Lipid Droplet Fusion Dynamics in Adipocytes. *J Lipid Res*, **54** (12), 3419-3429
  - Teile dieser Publikation sind Bestandteil der Kapitel 3.2.4, 3.2.5 und 3.4



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>13</b>
2.1	Globale Relevanz von Stoffwechselkrankheiten .....	13
2.2	Lipid Droplets .....	16
2.2.1	Morphologie und zelluläre Funktionen von LDs.....	16
2.2.2	LD-assoziierte Proteine .....	22
2.2.2.1	Die Perilipin-Familie .....	23
2.2.2.2	Die CIDE-Familie .....	24
2.2.3	Lipogenese .....	25
2.2.3.1	Fettsäuresynthese .....	25
2.2.3.2	Triglyceridsynthese .....	25
2.2.3.3	Entstehung von Lipid Droplets .....	25
2.2.4	Transport von Lipid Droplets .....	28
2.2.5	Wachstum von Lipid Droplets.....	30
2.2.6	Adipogene Differenzierung.....	32
2.2.7	Lipolyse .....	33
2.3	Visualisierung von Lipid Droplets.....	36
2.3.1	Invasive Visualisierungsmethoden für Lipid Droplets .....	36
2.3.2	CARS-Mikroskopie als nichtinvasive Visualisierungsmethode .....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>45</b>
3.1	Farbstoffinduzierte Artefakte .....	45
3.2	Untersuchung der Dynamik von LDs in humanen Zellen .....	54
3.2.1	Induktion der LD-Biogenese durch Fettsäurezugabe .....	54
3.2.2	Analyse der intrazellulären LD-Mobilität in zweidimensionaler Zellkultur .....	60
3.2.3	Analyse der intrazellulären LD-Mobilität in dreidimensionaler Zellkultur .....	66
3.2.4	LD-Wachstum während der Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen .....	70
3.2.5	Biophysikalische Berechnung einer hypothetischen Lipidtransfer-Pore.....	85
3.2.6	Adipogene Differenzierung in einer dreidimensionalen Zellkultur .....	99
3.2.7	Lipolyse von LDs.....	100

---

3.3	Mikrofluidische Untersuchung der Differenzierungseffizienz von humanen mesenchymalen Stammzellen.....	107
3.3.1	Untersuchung des Mischverhaltens von THF und Wasser in einem mikrofluidischen Chip mittels CARS-Mikroskopie.....	108
3.3.2	Quantitative Bestimmung der adipogenen Differenzierung von ADSCs.....	112
3.4	Bestimmung der Viskosität in LDs .....	114
<b>4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>129</b>
<b>5</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>131</b>
5.1	Zellkultur .....	131
5.1.1	HeLa S3-Zellen.....	131
5.1.2	Humane mesenchymale Stammzellen .....	132
5.2	3-dimensionale Zellkultur mit Hilfe der Hanging-Drop-Methode .....	133
5.3	Mikroskopie .....	135
5.3.1	Fluoreszenzmikroskopie .....	135
5.3.2	FLIM-Mikroskopie .....	137
5.3.3	CARS-Mikroskopie.....	137
5.4	Auswertung der mikroskopischen Daten .....	138
5.5	Synthese.....	139
5.5.1	Synthese von 4,4-difluoro-2.3,5.6-bis-tetramethylene-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene: LD 540 .....	139
5.5.2	Synthese von 1-phenyl-4,4-difluoro-2.3,5.6-bis-tetramethylene-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene: LD540-C <sub>0</sub> .....	140
5.5.3	Synthese von 1-(hexyloxy)phenyl-4,4-difluoro-2.3,5.6-bis-tetramethylene-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene: LD540-C <sub>6</sub> .....	140
5.5.4	Synthese von 1-(dodecyloxy)phenyl-4,4-difluoro-2.3,5.6-bis-tetramethylene-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene: LD540-C <sub>12</sub> .....	141
5.5.5	Synthese von 1-(dodecyloxy)phenyl-4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene: BODIPY-C <sub>12</sub> .....	142
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>145</b>

# 1 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich in erster Linie mit dynamischen Prozessen von intrazellulären Lipidspeichervesikeln. Dabei wurden verschiedene zelluläre Vorgänge untersucht, angefangen von der Beobachtung der Neusynthese (Lipogenese) und dem Abbau (Lipolyse) dieser Organellen über deren Transport mit Hilfe des intrazellulären Aktin- bzw. Tubulinnetzwerkes bis hin zur Verfolgung des komplexen Vorgangs der adipogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen.

Durch die dabei erzielten Ergebnisse konnte ein Beitrag zum besseren Verständnis des zellulären Fettstoffwechsels geleistet werden, insbesondere zur Frage, auf welche Weise die intrazelluläre Einlagerung von lebenswichtigem Fett geregelt wird. So konnte gezeigt werden, dass sich die im Cytosol vorhandenen Fettspeichervesikel während der adipogenen Differenzierung permanent vergrößern. In diesem Zusammenhang konnte eine offene und kontrovers diskutierte Fragestellung eindeutig dahingehend beantwortet werden, dass diese Volumenzunahme weder durch eine schnelle Fusion von kleineren Speichervesikeln noch durch kontinuierliche Einlagerung von neu synthetisiertem Fett in jeden einzelnen dieser Vesikel zustande kommt. Vielmehr geschieht dies durch einen lange andauernden Prozess, bei welchem große Lipidmengen von einem kleineren Vesikel in einen größeren Vesikel übertragen werden.

Der komplexe Ablauf eines solchen Lipidtransfers konnte im Verlauf dieser Arbeit durch den Einsatz moderner mikroskopischer Methoden visualisiert und quantifiziert werden. Die neben der klassischen konfokalen Fluoreszenzmikroskopie verwendete CARS-Mikroskopie ermöglicht es, Lipide innerhalb von Zellen ohne den Einsatz von Farbstoffen zu visualisieren. Dadurch war es möglich, hochauflösende vierdimensionale Messungen durchzuführen, mit welchen die Änderung der Vesikelgröße über nahezu die komplette Differenzierungszeit verfolgt werden konnte.

Der Einsatz der CARS-Mikroskopie war in diesem Fall insbesondere daher von Vorteil, da in einem weiteren Teil dieser Arbeit phototoxische Auswirkungen des lipidspezifischen Fluoreszenzfarbstoffes LD540 aufgezeigt wurden. Dieser Farbstoff zeichnet sich beim Anfärben von Lipidspeichervesikeln vor allem durch seine Färbefeffizienz sowie seine hohe Photostabilität aus. Bei Verwendung dieses Farbstoffes kommt es allerdings durch Bestrahlung mit dem notwendigen Anregungslicht unter bestimmten Bedingungen zu teils drastischen Nebenwirkungen bis hin zum Absterben der zu beobachtenden Zellen. Besonders bedeutsam an den Auswirkungen dieser Phototoxizität ist der Umstand, dass durch diesen Effekt zwei induzierte Artefakte beobachtet werden konnten, welche eine große Gefahr der fehlerhaften Interpretation von gemessenen Daten in sich bergen. Zum einen konnte eine laserinduzierte Fusion von Lipidspeichervesikeln beobachtet werden

und zum anderen kam es bei Verwendung des Farbstoffes zu einer Herabsetzung der Mobilität eben dieser Vesikel.

Für ein tieferes Verständnis der beschriebenen Ergebnisse war es außerdem notwendig, sich mit der Untersuchung der Viskosität innerhalb der Lipidspeichervesikel auseinander zu setzen. Durch Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes, der eine Abhängigkeit seiner Fluoreszenzlebenszeit von der ihm umgebenden Viskosität aufweist, war es möglich, diesen wichtigen biophysikalischen Parameter in verschiedenen Zellarten und Differenzierungsstadien zu bestimmen, was dazu beiträgt, entscheidende Prozesse im Fettstoffwechsel, wie beispielsweise die zuvor erwähnte vesikuläre Fusion, besser zu verstehen.

In Abbildung 1-1 sind noch einmal die wichtigsten Resultate dieser Dissertation zusammenfassend und schematisch dargestellt.

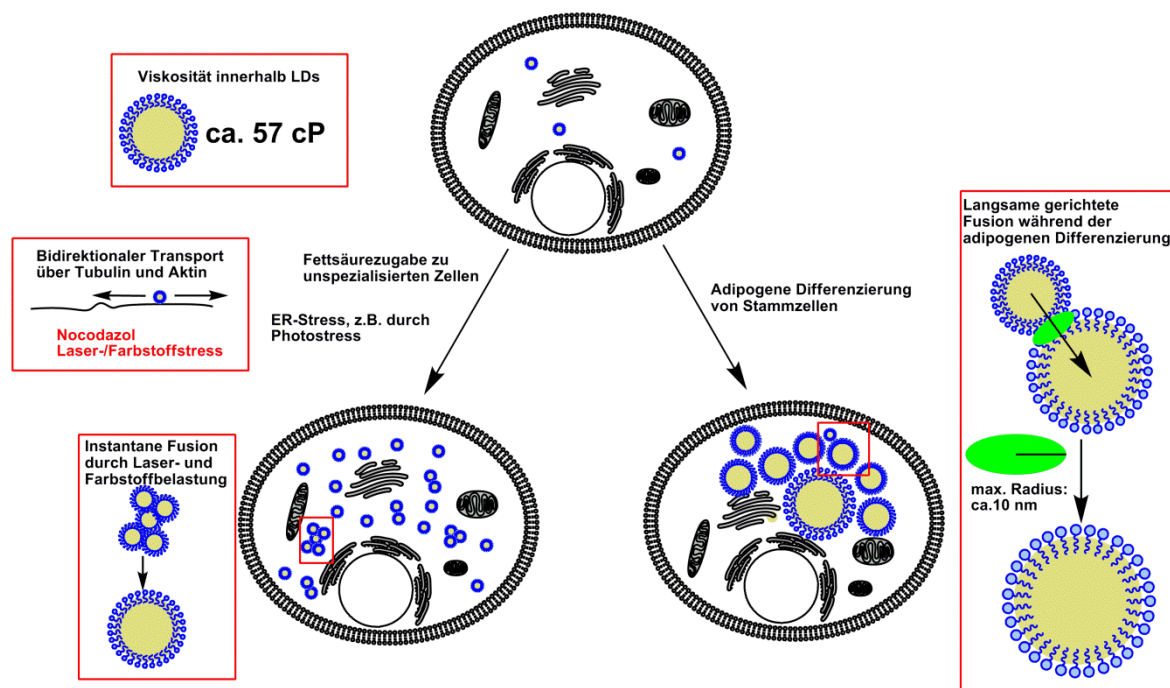


Abbildung 1-1 Zusammenfassung der wichtigsten erzielten Resultate. Das Transportverhalten von Lipidspeichervesikeln in lebenden Zellen wurde untersucht. Außerdem wurde die Neusynthese solcher Vesikel durch Fettsäurezugabe oder Photostress induziert und quantifiziert. Ein weiterer Schwerpunkt war die Untersuchung von Fusionsprozessen zwischen den Vesikeln, welche entweder künstlich induziert werden können, aber auch selbstständig während der adipogenen Differenzierung von Stammzellen stattfinden. Außerdem konnte die Viskosität innerhalb der Lipidspeichervesikel gemessen und in verschiedenen Zellarten miteinander verglichen werden.

## 2 Einleitung

### 2.1 Globale Relevanz von Stoffwechselkrankheiten<sup>1</sup>

Das ganze Leben wird angetrieben durch einen stetigen „Fluss an metabolischer Energie“ [1, 2], welcher die vielfältigsten biologischen Prozesse antreibt. Eine der größten zellulären Herausforderungen besteht dabei darin, mit einem stark wechselnden Bedarf an Energie zu Recht zu kommen. Dieser Umstand impliziert, dass stets eine gewisse Menge an Energie als Reserve für auftretende Nahrungsengpässe gespeichert werden muss. Daher werden immer dann große Mengen Energie in Form von Lipiden eingelagert, wenn Nahrung im Überschuss vorhanden ist. Dabei spielen die hier untersuchten Lipidspeichervesikel als intrazelluläre Depots eine wesentliche Schlüsselrolle.

Die biologische Bedeutung dieser auch als Lipid Droplet (LD) bekannten Organelle liegt außerdem darin begründet, dass LD-Fehlfunktionen oder der generelle Überschuss an Fettgewebe eine ganze Reihe von schwerwiegenden Krankheiten hervorrufen bzw. beeinflussen können. Der indische Physiker Sushruta war im sechsten Jahrhundert vor unserer Zeitrechnung vermutlich der erste, der einen Zusammenhang zwischen Fettsucht und den daraus abgeleiteten Folgeerkrankungen postulierte [3]. Dennoch wurde in vergangenen Zivilisationen ein Überschuss an körperlichem Fettgewebe zumeist als Zeichen des Wohlstandes und der Gesundheit gesehen [3], was auch durch die idealisierte Darstellung von Frauenkörpern durch den Maler Rubens bezeugt wurde. Mittlerweile hat sich diese Einstellung in den heutigen Industrieländern jedoch gravierend gewandelt. In den sogenannten Entwicklungsländern wird hingegen aufgrund der dort herrschenden Armut und dem Nahrungsmangel Übergewicht zum Teil immer noch als Zeichen des Wohlstands angesehen.

In den letzten Jahren hat sich die medizinische Forschung verstärkt mit den LDs auseinandergesetzt, um deren Beteiligung an Stoffwechselkrankheiten wie Fettsucht, Fettleber, Arteriosklerose und Diabetes zu klären [4, 5]. Also eben solchen Krankheiten, denen man inzwischen schon fast pandemische Ausmaße zusprechen muss [6]. Hervorgerufen werden solche Krankheiten insbesondere durch Fehlernährung, die durch das Überangebot an Nahrungsmitteln in den Industrienationen immer mehr verstärkt wird. Laut Auskunft der Weltgesundheitsbehörde hat sich die Menge der an Fettsucht leidenden Personen seit dem Jahr 1980 verdoppelt. Im Jahre 2008 litten bereits 1,5 Milliarden Erwachsene über 20 Jahren an Übergewicht (siehe Abbildung 2-1).

---

<sup>1</sup> Die Zahlenwerte zu den metabolischen Fettstoffwechselkrankheiten sowie das abgebildete Schaubild 2-1 wurden von der Internetseite der Weltgesundheitsbehörde [www.who.int](http://www.who.int) im April 2012 entnommen

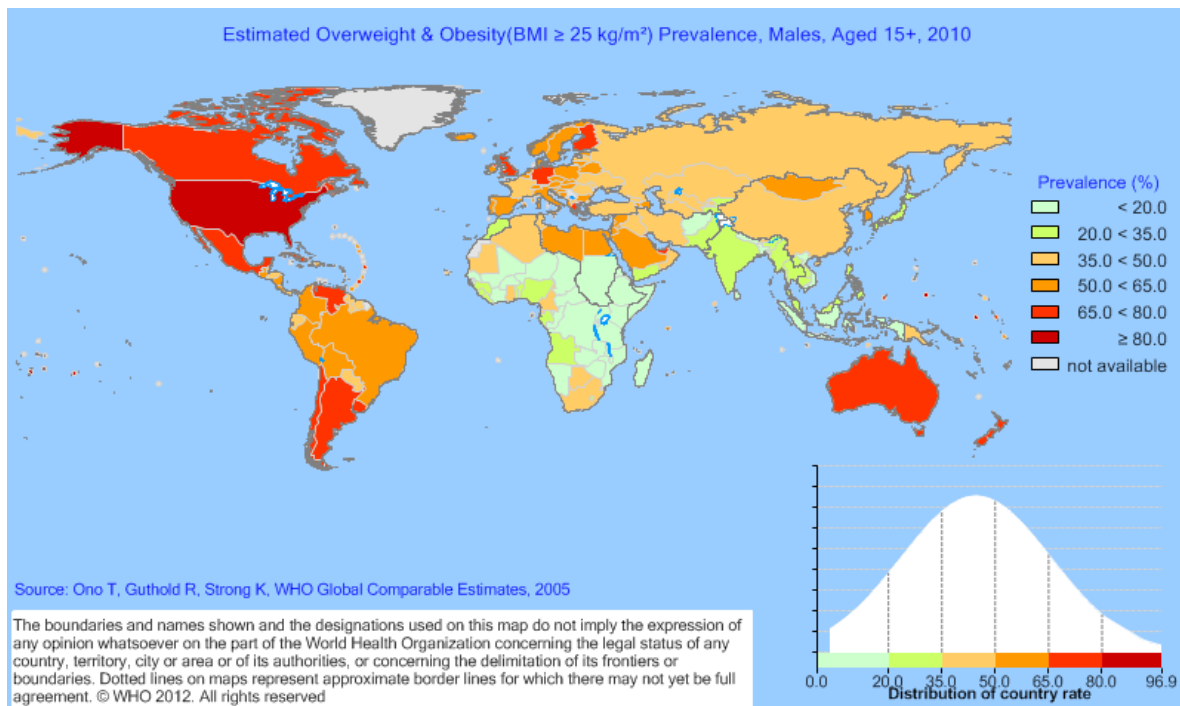


Abbildung 2-1 Globale Verteilung der an Übergewicht und Fettleibigkeit leidenden männlichen Personen ab einem Alter von 15 Jahren im Jahr 2010.

Erschreckenderweise leiden inzwischen aber auch bereits 43 Millionen Kinder unter fünf Jahren an einem dramatisch erhöhten Körpergewicht.

Mittlerweile leben ungefähr 65 % der Weltbevölkerung in Ländern, in welchen mehr Menschen an Übergewicht oder Fettsucht sterben als an Untergewicht. Mindestens 2,8 Millionen Todesfälle pro Jahr sind auf diese Ursachen zurückzuführen. Dazu kommen noch die Todesfälle, die in indirekter Weise als Folge einer solchen Fehlernährung zu Stande kommen, sei es durch Diabetes, schwerwiegende Herzerkrankungen oder bestimmte Krebsleiden. So starben alleine im Jahre 2004 3,4 Millionen Menschen an erhöhtem Blutzuckergehalt und aktuell wird die Anzahl der an der Volkskrankheit Diabetes Erkrankten mit 346 Millionen angegeben, 90 % von diesen an Typ 2 Diabetes.

Inzwischen wird vorausgesagt, dass sich die Zahl der Todesfälle, die durch Stoffwechselerkrankungen verursacht werden, zwischen 2005 und 2030 noch einmal verdoppeln wird. Schon jetzt liegen Krankheiten, die direkt oder indirekt durch einen Überschuss an Fett entstehen, an fünfter Stelle der globalen Todesursachen. Diese Zahlen sind vor allem daher erschreckend, da viele dieser Krankheiten wirklich schlicht auf Fehlernährung und Mangelbewegung zurückzuführen sind und sich deshalb auf einfache Weise vermeiden ließen. Nur ein sehr geringer Teil ist auf erblich bedingte Fehlfunktionen zurückzuführen.

Dass solche Krankheiten nicht nur durch den generellen Metabolismus verursacht werden, sondern teilweise auch in einem direkten Zusammenhang mit den hier

untersuchten LDs stehen, konnte mittlerweile schon an vielen Beispielen nachgewiesen werden [7, 8]. So wurde z.B. gezeigt, dass sich durch vermehrte LD-Synthese und daraus folgender vermehrter LD-Fusion die Insulinsensitivität von Zellen verringerte [9], ein Effekt, welcher auch durch die Supprimierung von PAT-Proteinen hervorgerufen werden kann [10].

Des Weiteren werden Lipidspeicherkrankheiten wie das Chanarin-Dorfman-Syndrom sowie die Lipodystrophie direkt mit LDs in Verbindung gebracht [11]. Erstere Erkrankung führt dazu, dass sich Triglyceride in nicht-adipozytärem Gewebe anreichern [12], wohingegen die zweite Krankheit mit dem Verlust von Fettgewebe einhergeht. Neben diesen metabolischen Erkrankungen werden LDs aber auch noch zusätzlich mit einer indirekten Funktion in diversen Krankheitsverläufen in Verbindung gebracht. So konnten Interaktionen mit bestimmten pathogenen Mikroorganismen nachgewiesen werden, z. B. eine Interaktion mit dem Hepatitis C Virus [13-16], bei welcher das Virus die LDs als Energiequelle zu seiner Vervielfältigung ausnutzt. Auch das Bakterium *Chlamydia trachomatis* scheint die Lipidspeicher zum eigenen Wachstum auszunutzen und triggert dafür die Akkumulation von LDs [11, 17]. In Immunzellen wie Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen konnten als Antwort auf den Befall mit mikrobiellen Erregern sehr viele LDs detektiert werden, ausgelöst durch inflammatorische Signale [18]. Generell können Entzündungsreaktionen, seien sie nun durch Infektionen, Allergien oder Krebs ausgelöst, zu einer starkem LD-Anreicherung in Leukozyten führen [19].

Aus den zuvor genannten Gründen und den vielen biologisch bedeutsamen Prozessen, bei welchen LDs eine entscheidende oder auch nur eine untergeordnete Rolle spielen, ergibt sich eine große Motivation, sich näher mit diesem zellulären Vesikel auseinanderzusetzen. Schließlich handelt es sich dabei nicht nur um einen einfachen Tropfen Fett, welcher sich aufgrund der Thermodynamik von selbst vom Cytosol abgrenzen würde, sondern vielmehr um ein hochkomplexes und mit großem Aufwand reguliertes Organell [20].

## 2.2 Lipid Droplets

### 2.2.1 Morphologie und zelluläre Funktionen von LDs

Um eventuell auftretende Missverständnisse von vornerein aus dem Weg zu räumen, sollte man sich zunächst einmal mit der Nomenklatur [21] des in dieser Arbeit vornehmlich untersuchten Organells auseinandersetzen. In dieser Arbeit wird ausschließlich der Begriff LD (Lipid Droplet) verwendet, wenngleich in der Literatur unglücklicherweise zahlreiche andere Bezeichnungen verwendet wurden oder immer noch verwendet werden, welche jedoch alle dasselbe Organell beschreiben. So gibt es unter anderem noch die Begriffe „Lipid bodies“ [22], „Oil bodies“ oder „Adiposom“ [23]. Da jedoch 66 % [21] der seit 1996 zu dem Thema veröffentlichten Artikel den Begriff Lipid Droplets verwendet haben und zudem die Literatursuche bei diesem Begriff weniger falsche Treffer zu Tage fördert als z.B. „lipid bodies“, ist man im Allgemeinen dazu übergegangen, möglichst nur noch von Lipid Droplets zu sprechen.

Lipid Droplets repräsentieren als eigenständiges Organell den Hauptspeicherort für Lipide in Zellen und Geweben. Die Wichtigkeit dieser Speicherfunktion lässt sich an folgendem Beispiel veranschaulichen [24]: Ein durchschnittlicher, nicht an Fettsucht leidender Mensch, speichert lediglich 2.500 kJ an metabolischer Energie in Form von Glykogen. Demgegenüber werden mehr als 500.000 kJ in Form von Triglyceriden im Fettgewebe abgespeichert, eine Energiemenge, welche für die Absolvierung von ungefähr 30 Marathonläufen ausreichen würde. Trotz ihrer immensen Bedeutung als Energielieferant fungieren LDs aber nicht nur als reines Fett-Depot („great balls of fat“ [25, 26]), welches einzig dazu da ist, überschüssige Fettsäuren einzulagern, welche zuvor in neutrale Lipide überführt wurden. Vielmehr werden ihnen immer mehr weiterführende Funktionen zugeschrieben. So interagieren sie mit anderen Organellen innerhalb der Zelle oder spielen eine große Rolle bei der Membransynthese, der viralen Replikation sowie der Proteindegradation [24]. Des Weiteren ist die Vorstellung, dass ein solches Speichervesikel ausschließlich mit Lipiden gefüllt ist, eine Fehlinterpretation, eine Erkenntnis, welche sich spätestens durch die Entdeckung von Perilipin [27] in der Wissenschaftsgemeinschaft etablierte. So sind LDs neben dem zuvor erwähnten Perilipin mit einer ganzen Proteinmaschinerie versehen, wodurch sich erst die multifunktionalen Fähigkeiten des Organells erklären lassen [28].

Der grundsätzliche Aufbau eines LDs besteht aus einem inneren Kern, welcher mit neutralen Lipiden, vornehmlich mit Triglyceriden und Cholesterylestern gefüllt ist [29], sowie einer diesen Kern umgebenden nach außen abschließenden Hemimembran aus Phospholipiden, welche wiederum eine Vielzahl an assoziierten Proteinen beinhaltet [21, 30] (siehe Abbildung 2-2).

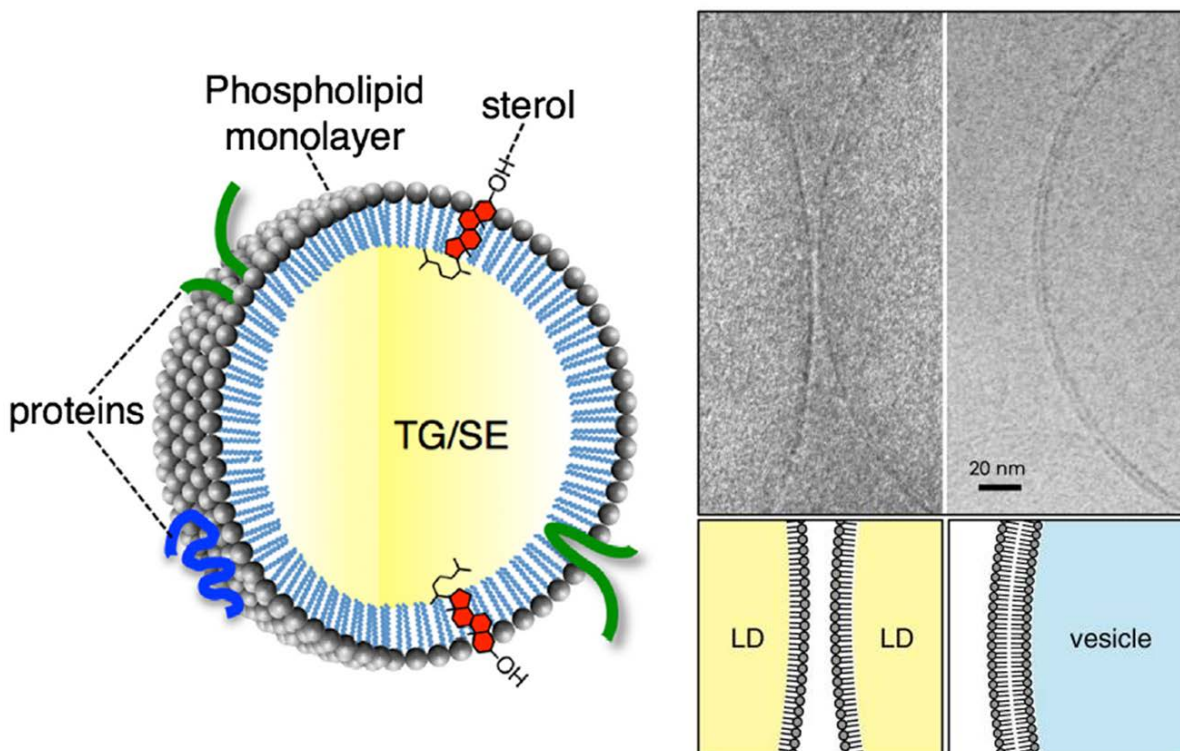


Abbildung 2-2 Links: schematischer Überblick der LD-Struktur (entnommen aus [31]; mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlages). Rechts: Visualisierung der Einzel- bzw. Doppelmembran von LDs bzw. anderen vesikulären Organellen durch Kryoelektronenmikroskopie (entnommen aus [11]; mit freundlicher Genehmigung von "Springer Science and Business Media").

Durch diese Hemimembran unterscheiden sich LDs von anderen zellulären Organellen, welche über eine Phospholipiddoppelschicht verfügen. So sind alle anderen Vesikel aufgrund ihrer Doppelmembran in der Lage, zwei wässrige Bereiche der Zelle voneinander abzugrenzen, wohingegen LDs eine Grenzschicht zwischen dem wässrigen Cytosol und dem eigenen hoch hydrophoben Lipiddepot herstellen müssen.

Demzufolge handelt es sich im Falle der im Cytosol vorhandenen LDs eigentlich um eine Emulsion, also eine Mischung aus zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten [2]. Derartige Emulsionen sind zwar eigentlich nur metastabil, können aber durch den Einsatz von Tensiden stabilisiert werden. Diese stabilisierende Wirkung, bei welcher die Oberflächenspannung minimiert werden muss, wird von den Phospholipiden an der LD-Oberfläche übernommen. Die auf diese Weise herabgesetzte Oberflächenspannung erzeugt in Abhängigkeit von der LD-Größe einen Druck im Inneren des LDs, welcher auch als Laplace-Druck bezeichnet wird. Die gerade genannten Zusammenhänge zwischen Oberflächenspannung und LD-Stabilität sind noch einmal in Abbildung 2-3 veranschaulicht. Hier ist zudem noch ein weiterer wichtiger Aspekt der in der LD-Membran vorhandenen Oberflächenmoleküle zu finden [2]. So weisen die beteiligten Moleküle eine bevorzugte Eigenkrümmung auf, welche sich aus der Differenz zwischen der Fläche der hydrophilen Kopfgruppe und der Fläche des lipophilen Schwanzes ergibt.

Würde die LD-Oberfläche zu einem Großteil aus Molekülen mit einer negativen Krümmung bestehen, könnte die Stabilität nicht wirklich aufrecht gehalten werden, da dann die Ausbildung von umgekehrten Mizellen bevorzugt wäre. Andererseits könnte eine geringere Menge an derartigen Molekülen etwaige Fusionsprozesse zwischen LDs begünstigen, da an der Fusionskontaktstelle eine negative Krümmung erforderlich ist.

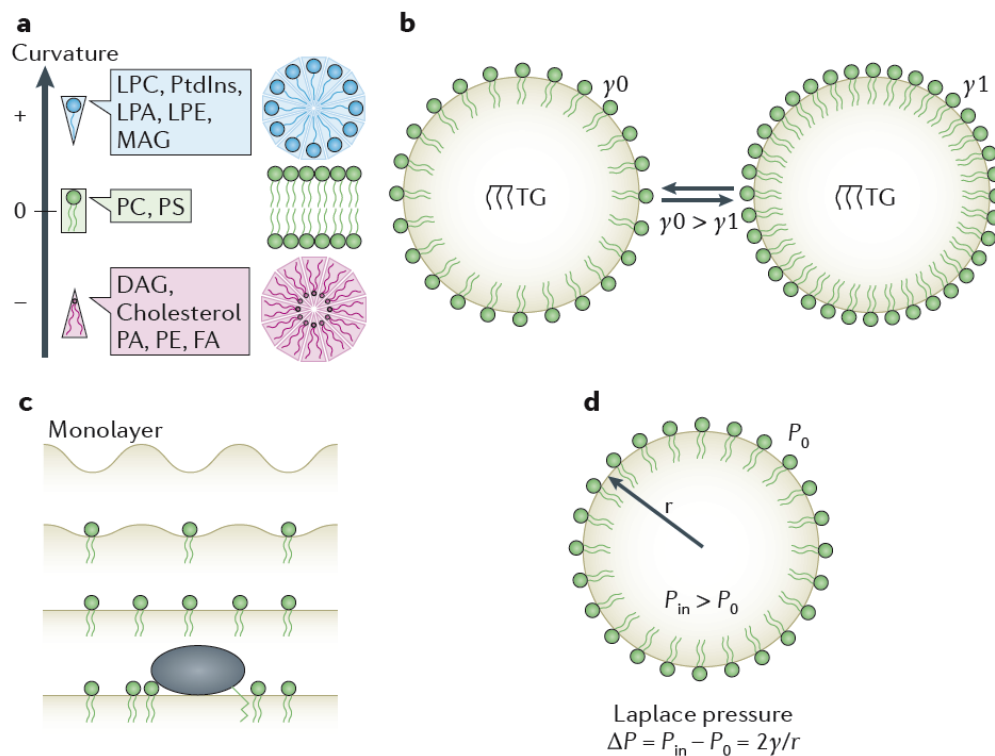


Abbildung 2-3 (a) An der LD-Oberfläche beteiligte Moleküle weisen eine Eigenkrümmung auf, welche einen Einfluss auf die LD-Struktur haben kann. (b) Die Oberflächenenergie nimmt mit steigender Phospholipiddichte ab. (c) Auch die Elastizität der Membran nimmt mit steigender Phospholipiddichte ab. (d) Innerhalb der LDs wird ein Laplace-Druck aufgebaut, der von der Oberflächenenergie sowie der Größe des LDs abhängt (entnommen aus [2]; mit freundlicher Genehmigung der Macmillan Publishers Ltd., <http://www.nature.com/nrm/journal/v14/n12/full/nrm3699.html>).

Die tatsächliche Zusammensetzung der Phospholipideinzelschicht variiert stark von Organismus zu Organismus, jedoch sind meistens Phosphatidylcholin (PC; bis zu 60 %) und Phosphatidylethanolamin (PE; bis zu 24 %) die beteiligten Hauptkomponenten [32, 33]. Aus diesem Grund erstaunt es nicht, dass bei einer intrazellulären Anreicherung von LDs das geschwindigkeitsbeschränkende Enzym der PC-Synthese, die CTP:Phosphocholin Cytidyltransferase (CCT) an der Oberfläche der LDs rekrutiert und aktiviert wird, um den gesteigerten Membranbedarf abzudecken [34, 35]. Andererseits kann die CDP-Cholin Diacylglycerin Phosphocholin Transferase (CPT), bei welcher es sich um das Enzym der eigentlichen PC-Synthese handelt, nicht direkt mit LDs colokalisiert werden [33, 36]. Vielmehr befindet sich dieses Enzym im ER und somit kann eine gesteigerte CCT-Aktivität alleine nicht zusätzliche Phospholipide generieren, um die LD-Oberfläche bei Bedarf zu

vergrößern [33]. Wird die PC-Synthese in irgendeiner Weise von innen oder von außen gestört, kommt es hingegen eher zur Bildung von großen LDs an Stelle von vielen kleinen LDs, da große LDs für das gleiche Volumen verhältnismäßig weniger Oberfläche benötigen. Außerdem verhindert PC das Verschmelzen von LDs, wohingegen ein anderes Phospholipid, die Phosphatidsäure (PA), aufgrund ihrer negativen Eigenkrümmung die SNARE-abhängige sowie SNARE-unabhängige Membranfusion begünstigt und vermehrt in Zellen aufgefunden wird, denen es an PC fehlt [37]. Aus diesem Grund scheint es möglich zu sein, die Größe von LDs durch Herunterregulierung von PC bzw. Heraufregulierung von PA kontrolliert steigern zu können [34].

Dass die LDs zum größten Teil mit Triglyceriden und Sterylestern gefüllt sind, konnte erstmals anhand eines mutierten Hefestammes gezeigt werden, bei welchem sowohl die Diacylglycerin- als auch die Steryl-Acyltransferase ausgeschaltet wurde, was dazu führte, dass dieser Stamm über gar keine LDs mehr verfügt [34, 38, 39]. Verwendung finden die innerhalb des Kerns gespeicherten Lipide in erster Linie als Energieträger bei Nahrungsmangel, wobei sie über die  $\beta$ -Oxidation abgebaut werden. Inzwischen wird vermutet, dass sich die Triglyceride (TGs) und Sterylester (SEs) innerhalb des LDs so anordnen, dass ein Kern aus TGs von einer Schicht aus SEs [40] umgeben wird, was die Lipolyse insofern beeinflussen würde, als dass zuerst die SEs hydrolysiert werden müssten, bevor es zu einem Abbau der TGs kommen kann [41]. Eine solche geordnete Verteilung der Lipidkomponenten konnte zumindest bereits an LDs in Hefezellen nachgewiesen werden [42].

Die Abspeicherung der Lipide in die Depots der LDs dient allerdings nicht nur dem Zweck, bei Bedarf Energie über die  $\beta$ -Oxidation gewinnen zu können, sondern ist gleichzeitig auch noch überlebensnotwendig für die ganze Zelle, da ein Überschuss an freien Fettsäuren eine toxische Wirkung haben kann [43, 44] Diese ist auch als Lipotoxizität bekannt. Insofern sind Fettsäuren einerseits zwar als effiziente Energiequelle unverzichtbar, andererseits aber bei Nichtkompensierung letal („Janus like“ [20]).

Konträr zu der alten Meinung, dass LDs ausschließlich in Fettspeicherzellen, den sogenannten Adipozyten eine Rolle spielen, wurde inzwischen gezeigt, dass nahezu jede Zellart zur Bildung dieser Organelle in der Lage ist, um auf einen extrazellulären Überschuss von Fettsäuren auf adäquate Weise reagieren zu können. Bei Bedarf kann die Zelle dann durch Abbau der LDs wieder auf diesen Lipid-Pool zurückgreifen [45]. Mittlerweile wurden LDs daher in nahezu jedem bekannten Organismus nachgewiesen. So konnten LDs sowohl in Bakterien [46], in Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) [47], in Fadenwürmern (*Caenorhabditis elegans*) [48] und auch in Hefezellen (*S. Cerevisiae*) detektiert werden, wobei sich letzterer Organismus aufgrund seiner einfachen Handhabung in der LD-Forschung sehr bewährt hat [40, 49, 50]. Auch in höheren

eukaryotischen Zellen finden sich LDs und in den meisten Fällen kann deren Bildung durch Zugabe von Fettsäuren stimuliert werden [24]. Insofern scheint es sich bei LDs um ein universelles Element [21] in eukaryotischen sowie prokaryotischen Zellen zu handeln, welches einen eminenten Beitrag zum generellen Metabolismus aller Organismen leistet. Allerdings unterscheidet sich der gespeicherte Inhalt der LDs je nach Zellart, so dass verschiedene gewebespezifische Funktionen erfüllt werden können [51]. Der größte Unterschied zwischen LDs in unterschiedlichen Zellarten besteht jedoch nicht in ihrem Inhalt, sondern vielmehr in ihrer Morphologie. So kann ein einzelner LD in einem ausdifferenzierten Adipozyten durchaus eine Größe von  $100\ \mu\text{m}$  oder mehr [24, 34] einnehmen. Ein solches gewaltiges Organell, welches in seiner Größe die Gesamtgröße anderer Zelllinien um ein Vielfaches übertreffen kann, füllt einen Großteil des Gesamtvolumens eines Adipozyten aus. Mikroskopische Bilder von vollständig ausdifferenzierten Adipozyten erwecken daher fast den Eindruck, als bestünden solche Zellen nur noch aus einem gigantischen LD sowie einem an den Zellrand gedrückten Zellkern. Für alle anderen Kompartimente scheint nahezu kein Platz mehr im Cytoplasma vorhanden zu sein. Dies wiederum beeinflusst auch das Erscheinungsbild solcher unilokularen LDs dahingehend, dass sie in ihrer Kontur nicht mehr sphärisch sondern vielmehr polyhedral erscheinen [41], da ihre Form durch die Zellperipherie beeinflusst wird (siehe Abbildung 2-4).

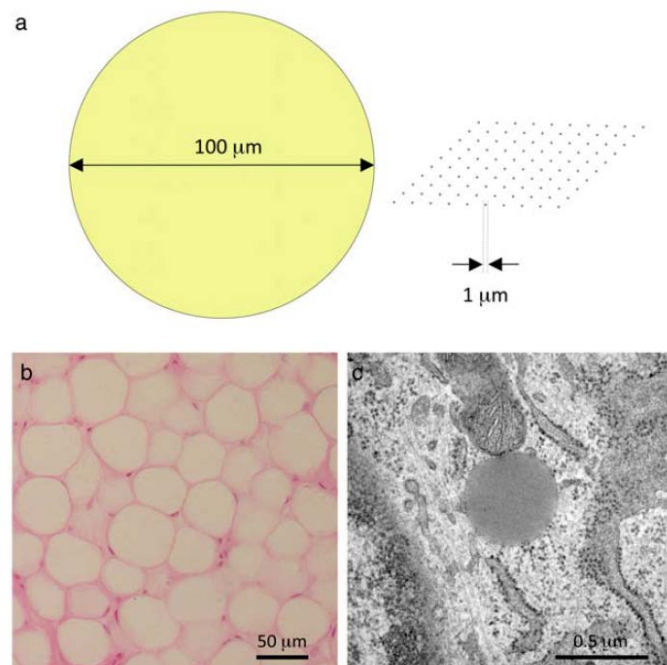


Abbildung 2-4 (a) Vergleich der Größenverhältnisse zwischen einem typischen unilokularen LD in einem Adipozyten (links) und 100 kleineren LDs aus einer nicht spezialisierten Zellart (b) Durchlichtbild von aus einer Maus entnommenem Fettgewebe (c) Elektronenmikroskopie eines 3Y1 Fibroblasten aus einer Ratte, die mit Oleinsäure gefüttert wurde (entnommen aus [41]; mit freundlicher Genehmigung der Oxford University Press).

Diese direkte räumliche Nähe zu der Plasmamembran der Zelle ermöglicht zudem einen sehr effizienten Transport zwischen den LDs und den Caveolae, welche in großen Mengen in der Membran von Adipozyten vorhanden sind [41, 52]. Dabei handelt es sich um sackförmige Einbuchtungen der Plasmamembran, welchen eine große Rolle in verschiedenen zellulären Phänomenen wie Endozytose, Lipidtransport und Signaltransduktionsprozessen zugeschrieben wird [41]. In Adipozyten scheinen sie zudem Orte der Triglyceridsynthese zu sein [53], von denen die erzeugten Lipide an die LDs weitergegeben werden können.

Im Gegensatz zu den LDs in Adipozyten, welche als Prototypen dieses Organells [41] angesehen werden, existieren wie bereits erwähnt auch in nahezu allen anderen Zellarten bestimmte Formen dieser Speicherorganellen, welche sich insofern von den großen unilokularen LDs in Adipozyten unterscheiden, als dass sie üblicherweise einen Durchmesser von nur ca. 1  $\mu\text{m}$  aufweisen und selten größer als 10  $\mu\text{m}$  werden [41]. Außerdem besitzen sie eine sphärische Form, da sie nicht durch direkten Kontakt mit der äußeren Zellmembran in ihrer Struktur beeinflusst werden [41]. In Hefezellen konnten sogar noch viel kleinere LDs mit einer Größe von weniger als 0,4  $\mu\text{m}$  nachgewiesen werden [54].

Sowohl Größe als auch Anzahl der intrazellulären LDs kann sich durch bestimmte Stimuli innerhalb einer einzelnen Zelle teils drastisch verändern, wobei die Bildung sehr großer LDs die effizienteste Methode darstellt, um große Mengen an Fett einzulagern, während andererseits viele kleine LDs eine bessere Möglichkeit des Fettabbaus aufgrund der für Lipasen erreichbaren größeren Oberfläche bieten. So verfügen Leberzellen normalerweise nur über sehr wenige kleine LDs, das Volumen kann aber durch hepatische Steatose um mehrere Größenordnungen ansteigen [34, 55, 56]. Sämtliche LDs besitzen häufig einen direkten Kontakt zu verschiedenen anderen Zellkompartimenten [57], vor allem zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) [58]. Neben diesem Kompartiment, welchem eine große Funktion in der Lipogenese zugeschrieben wird, gibt es auch direkten Kontakt zu Mitochondrien [59] und Peroxisomen [6], um den Export von Fettsäuren in diese Kompartimente zur anschließenden  $\beta$ -Oxidation zur Energiegewinnung zu ermöglichen [41]. Dieser direkte Kontakt wiederum ist eher für die nicht spezialisierten Zellarten besonders ausgeprägt, nicht aber für die gereiften Adipozyten, erklärbar dadurch, dass die durch LDs in Adipozyten freigesetzten Fettsäuren nicht durch den Adipozyten selbst zur Energiegewinnung konsumiert werden, sondern vielmehr aus dem Adipozyten heraus geschleust werden, um sie anderen Geweben zukommen zu lassen [41]. Schließlich wurde auch des Öfteren ein Kontakt mit Phagosomen beobachtet [60].

Alle diese Interaktionen mit anderen Organellen scheinen einen direkten Austausch von Lipiden zu ermöglichen. Da ein solcher Austausch aber nicht effizient genug erscheint,

wenn man ihn sich alleine durch die direkte Nachbarschaft erklärt, wird davon ausgegangen, dass bestimmte Lipidtransferproteine daran beteiligt sein müssen [41, 61, 62].

## 2.2.2 LD-assozierte Proteine

Auch wenn es sich bei LDs um eigenständige Organellen handelt, deren Struktur unabhängig von Proteinen aufrechterhalten werden kann, so wird doch für deren Bildung, Modifikation und Abbau eine ganze Proteinmaschinerie benötigt. Demzufolge verwundert es nicht, dass inzwischen eine Vielzahl von Proteinen beschrieben wurde [28], welche sich in der Hemimembran der LDs oder sogar im Inneren der LDs befinden und für die Speicherung bzw. Freisetzung von Lipiden verantwortlich sind.

Dabei sollte man bedenken, dass in der LD-Membran vorkommende Proteine strukturell anders aufgebaut sein müssen als klassische Membranproteine, welche die komplette Membran durchziehen und zu diesem Zweck zwei hydrophile Enden besitzen. Da die LD-Oberfläche aber einen hydrophilen von einem lipophilen Bereich trennt, müssen die Membranproteine andersartig sein. So könnte es sich z.B. um amphipathische Moleküle handeln oder die Verknüpfung mit der LD-Oberfläche geschieht über eine haripin-Struktur bzw. über einen Lipidanker [2].

Neben Proteinen, welche man direkt mit dem Lipidstoffwechsel assoziieren würde, wurden auch andere Proteine gefunden, welche man zunächst nicht mit LDs in Verbindung bringen würde. So wurden z.B. Histone in LDs von *Drosophila*-Embryos nachgewiesen [63-66]. Außerdem wurde festgestellt, dass das Protein  $\alpha$ -Synuclein in direktem Kontakt zu LDs steht. Dabei handelt es sich um ein Protein, welches mit der Parkinson-Krankheit verknüpft ist und dessen Selbstaggregation durch die LD-Bindung verhindert wird [67]. Außerdem wurden auch Enzyme des Lipidstoffwechsels, nämlich HSL, ATGL sowie DGAT2, direkt an der LD-Oberfläche gefunden [25, 68], wenngleich diese im Gegensatz zu den Perilipinen nicht exklusiv dort auftreten.

Die Analyse, ob ein Protein wirklich mit LDs verknüpft ist, gestaltet sich jedoch als sehr schwierig, da bei der Aufreinigung von LDs durch Ultrazentrifugation [69] immer auch Reste von anderen Organellen wie dem ER mitisoliert werden und so die Zugehörigkeit nicht eindeutig nachgewiesen werden kann. Allerdings wurde jüngst ein neuartiges vielversprechendes Verfahren vorgestellt, welches mit Hilfe von sogenannter Proteinkorrelation LD-assozierte Proteine als solche erkennen kann [70].

Auch die Markierung der entsprechenden Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen oder GFP-Konstrukten ist nicht immer eindeutig, weil aufgrund des beschränkten Auflösungsvermögens nicht immer klar ist, ob das Protein wirklich mit den LDs assoziiert

ist oder sich nur in unmittelbarer Nähe zu diesen befindet. Im Folgenden sollen die wichtigsten LD-assoziierten Proteine und deren Funktionen beschrieben werden, wobei inzwischen mehrere hundert Gene identifiziert wurden, welche in der LD-Biologie involviert sind [71, 72].

### **2.2.2.1 Die Perilipin-Familie**

Zu den wichtigsten Proteinen, die mit LDs assoziiert sind, zählen die Proteine der Perilipin-Familie [73, 74], die auch als PAT-Familie (Perilipin, ADRP, TIP47) [25, 75] bezeichnet wird. Diese Proteine weisen eine hohe Sequenzhomologie auf und besitzen eine konservierte N-terminale Region, welche als PAT-Domäne bezeichnet wird. Es wird geschätzt, dass ca. 15 % der Oberfläche von LDs durch Proteine dieser Familie besetzt sind [25, 76] und es konnte mithilfe von FRAP-Studien gezeigt werden, dass die Proteine frei in der LD-Membran diffundieren können [77].

Perilipin ist dabei das erste in Säugerzellen nachgewiesene Protein, welches über eine LD-Spezifität verfügt [11, 27] und gehört zu den am meisten untersuchten LD-Proteinen überhaupt [78, 79]. Zu finden ist diese Proteinklasse in der Membran der LDs und ermöglicht so die Interaktion zwischen den gespeicherten Lipiden und dem Cytosol [80]. Zusätzlich konnte mittlerweile gezeigt werden, dass Perilipin auch am ER vorkommen kann [81].

Insgesamt sind drei Isoformen von Perilipin bekannt (A, B und C), welche durch alternatives Splicen gebildet werden können [11]. Funktionell scheint Perilipin dafür verantwortlich zu sein, die Lipid-Depots im Normalzustand der Zelle gegenüber cytosolischen Lipasen abzuschirmen [11]. Andererseits ermöglicht Perilipin aber auch den Kontakt der Hormonsensitiven Lipase (HSL), sobald die Zelle Energie benötigt und dazu die Lipolyse über  $\beta$ -adrenerge Stimulation aktiviert [11, 82]. Außerdem bindet Perilipin A an ein weiteres LD-assoziiertes Protein, nämlich CGI-58 (Comparative Gene Identification-58) [83, 84], welches wiederum ein Koaktivator für die cytosolische Lipase ATGL (Adipose Triglyceride Lipase) [11, 12] ist (siehe Abbildung 2-10).

Interessanterweise verfügen Adipozyten über einen großen Haupt-LD, der arm an Perilipinmolekülen ist, sowie mehrere kleinere perilipinreiche LDs [11]. Dies könnte darauf hinweisen, dass schon zu Beginn der adipogenen Differenzierung ein einzelner LD dazu auserkoren ist, am Ende der Differenzierung als einziger unilokularer LD übrig zu bleiben, während alle anderen dazu dienen, Lipide einzulagern, um diese später dem Haupt-LD zuzuführen. Wird während der Differenzierung die Lipolyse stimuliert, erfolgt diese jedoch vornehmlich bei den kleineren LDs [85].

Das zweite Protein aus der Perilipin-Familie, das ADRP (Adipocyte differentiation-related protein) konnte erstmalig in ausdifferenzierten Adipozyten nachgewiesen werden. Inzwischen ist bekannt, dass der mRNA-Level dieses Proteins während der adipogenen Differenzierung um das 50–100-fache ansteigen kann. Nach der erfolgreichen Ausdifferenzierung wird ADRP jedoch wieder herunterreguliert und von Perilipin verdrängt [11, 86, 87]. Wie Perilipin scheint es die gespeicherten Lipide vor Lipolyse zu schützen [88], weshalb es in einer Perilipin-Knockout-Maus an Stelle von Perilipin auf den LDs verbleibt [89]. Eine weitere wichtige Funktion scheint in der Verteilung des Triglyceridgehalts zwischen den LDs und der Membran zu liegen [90].

Das dritte Protein, TIP47 (tail interacting protein of 47 kDa), wurde an der Oberfläche [91, 92] von LDs aber auch in deren Kern [93] gefunden. Insbesondere eine Fütterung der Zellen mit Oleinsäure führt innerhalb von Minuten zu einem erhöhten Auftreten von TIP47 an der LD-Membran [92]. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Herunterregulierung von TIP47 zu einer erhöhten Expression von ADRP führt, was auf eine kompensatorische Wirkung von ADRP hinweist [92]. Insgesamt scheint daher auch TIP47 einen direkten Einfluss auf die Einlagerung von Lipiden in LDs sowie auf das Wachstum von LDs zu haben.

### **2.2.2.2 Die CIDE-Familie**

Neben den Proteinen der PAT-Familie scheinen vor allem die Mitglieder der CIDE-Proteine (Cell death-inducing DFF45-like effector) eine wichtige metabolische Rolle [94-101] zu spielen, allen voran CIDEC, auch bekannt als FSP27 (Fat-specific Protein of 27 kDa). Mäuse mit einem Defizit an CIDE-Proteinen weisen einen abgemagerten Phänotyp auf, verbunden mit einer Resistenz gegen induzierte Fettsucht, einer erhöhten Insulinsensitivität sowie einer grundsätzlich erhöhten metabolischen Rate [94, 102]. CIDEA und CIDEC werden in humanen weißen Adipozyten exprimiert und deren Expressionsrate korreliert mit der Entwicklung einer Insulinsensitivität in an Fettsucht leidenden Patienten [103, 104] sowie mit dem BMI der Patienten [96]. Unabhängig von ihrer Varianz im Vorkommen in verschiedenen Zellarten, weisen alle CIDE-Proteine eine Gemeinsamkeit auf. Ein Defizit an einem dieser Proteine führt zu einem gemeinsamen Phänotyp: Der Akkumulation von vielen kleinen LDs in den entsprechenden Zellen [102].

Demzufolge scheint es so zu sein, dass diese Proteine an der Kontrolle der LD-Größe beteiligt sind, weswegen es nicht verwundert, dass sie auf der Oberfläche der LDs sowie dem ER lokalisiert sind [101]. Wie später in dieser Arbeit gezeigt wird, scheint Fsp27 hauptverantwortlich für die Fusion von LDs während der adipogenen Differenzierung zu sein. Die Größenkontrolle der LDs durch Fsp27 und CIDEA wird noch verstärkt durch ihre Aktivität bei der Lipolyse-Kontrolle [102]. So resultiert ein Mangel an den beiden Proteinen in einer verstärkten Lipolyse [105], wohingegen die Überexpression zu einer

abgeschwächten Lipolyse führt [106]. Der genaue Mechanismus, der zu dieser Lipolyse-Kontrolle führt, ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

### **2.2.3 Lipogenese**

Lebenswichtige Lipide werden in den LDs in erster Linie in Form von Triacylglyceriden gespeichert. Bevor TGs eingelagert werden können, müssen diese aber erst einmal enzymatisch aufgebaut werden. Dies geschieht durch Umwandlung von Fettsäuren, die entweder als solche bereits vorliegen oder ebenfalls von der Zelle aufgebaut werden müssen.

#### **2.2.3.1 Fettsäuresynthese**

Der komplexe Ablauf der Fettsäuresynthese wird im Cytosol der Zellen von der multifunktionalen Fettsäure-Synthase [107] katalysiert, wobei in sieben Einzelreaktionen aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA hauptsächlich Palmitinsäure erzeugt wird. Der erste Schritt besteht dabei in der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, was von einem anderen Protein, der Acetyl-CoA-Carboxylase katalysiert wird. Alle anderen Schritte finden an dem Fettsäure-Synthase-Komplex selbst statt. Durch iterative Abfolge der Einzelschritte verlängert sich dabei die erzeugte Fettsäure immer weiter, bis sie von dem Enzymkomplex schließlich freigesetzt werden kann.

#### **2.2.3.2 Triglyceridsynthese**

Die Erzeugung von Triglyceriden aus den einzelnen Fettsäuren geht von dem Ausgangsprodukt Glycerin-3-Phosphat aus, welches wiederum durch die Glycerokinase aus Glycerin gewonnen wird. Durch die Glycerinphosphat-Acyltransferase wird dann Acyl-CoA auf das Glycerin-3-Phosphat übertragen. Dabei entsteht Lysophosphatidsäure. Darauf folgt die erneute Übertragung eines weiteren Acyl-CoAs mit Hilfe der Lysophosphatidat-Acyl-Transferase. Dabei entsteht Phosphatidsäure. Der Phosphatrest von diesem Produkt wird dann durch die Phosphatase abgespalten und es entsteht ein Diacylglycerin. Schließlich führt die Übertragung eines dritten Acyl-CoAs durch die Diacylglycerol-Acyl-Transferase zum gewünschten Triglycerid.

#### **2.2.3.3 Entstehung von Lipid Droplets**

Wie zuvor beschrieben, werden freie Fettsäuren enzymatisch in Triglyceride umgeformt, welche anschließend in LDs eingelagert werden müssen. Aus diesem Grund lässt sich in nahezu allen verfügbaren Zelllinien auf einfache Weise die vermehrte intrazelluläre Anhäufung von LDs dergestalt erzwingen, dass man durch Zugabe von freien Fettsäuren im Medium die Zelle vor das Problem stellt, mit dem Fettüberschuss, welcher bei Nichtkompensierung eine toxische Wirkung auf die Zelle ausübt („Lipotoxizität“), fertig zu

werden. Der genaue Mechanismus der LD-Bildung ist jedoch bisher noch nicht vollständig geklärt. Die heute am meisten akzeptierte Hypothese der Neusynthese geht davon aus, dass sich diese an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) abspielt [58, 80, 108-110], bzw. vielmehr zwischen den beiden Membranblättern der Phospholipiddoppelschicht des ERs, was der Hydrophobizität von den Lipiden entgegenkommen würde (siehe Abbildung 2-5).

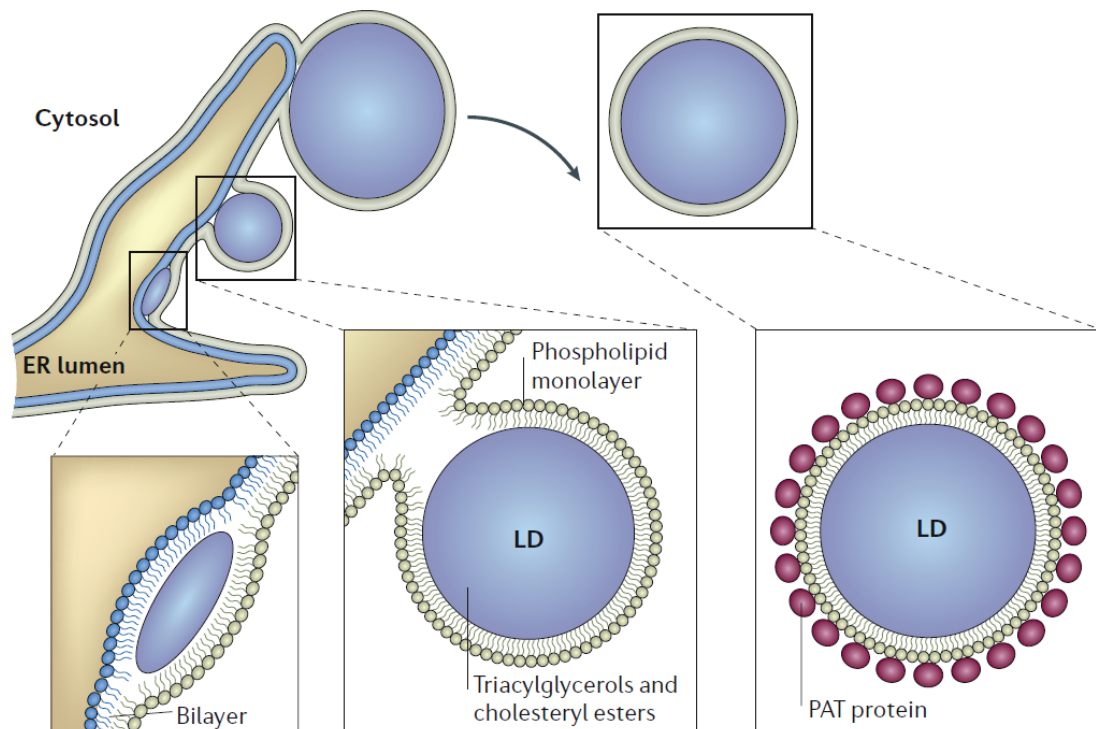


Abbildung 2-5 Die Neusynthese von LDs findet vermutlich zwischen den Membranblättern des endoplasmatischen Retikulums statt, wodurch der hydrophobe Inhalt der LDs schon zu Beginn der LD-Generierung vom wässrigen Cytosol abgegrenzt werden kann (entnommen aus [21]; mit freundlicher Genehmigung der Macmillan Publishers Ltd., <http://www.nature.com/nrm/journal/v14/n12/full/nrm3699.html>)

Gestützt wird das Modell, welches von der Entstehung der LDs am ER ausgeht, von der Tatsache, dass in ultramikroskopischen Untersuchungen die LDs nahezu immer assoziiert mit ER-Membranen zu finden sind [111, 112] und die Synthese der meisten Triglyceride und Sterylester im ER stattfindet. Zumindest befinden sich zwei wichtige Enzyme, welche die letzten Schritte dieser Synthese katalysieren, in der Membran des ERs, namentlich die Diacylglycerin-Acyl-CoA-Acytransferase (DGAT) sowie die Cholesterol-Acyl-CoA-Acyltransferase (ACAT) [11, 21, 113-115]. Durch die kontinuierliche Einlagerung von veresterten Lipiden zwischen der Doppelmembran des ERs und einen anschließenden Abschnürungsvorgang („budding model“) [11] könnte man sich dann die Entstehung von komplett unabhängigen Organellen mit einer resultierenden Phospholipidmonoschicht erklären. Ein weiteres denkbare Modell neben dem „budding model“ ist das „hatching

model“ [11, 21, 116], bei welchem ein eigenständiges Organell nicht durch Einstülpung und Abschnürung entsteht, sondern vielmehr durch einen Mechanismus des Herausschneidens aus der ER-Membran. Da dabei aber für kurze Zeit die Integrität der ER-Membran zerstört wäre [117] und zudem mit diesem Modell nicht schlüssig erklärt werden kann, warum die LDs dann nur im Cytosol, nicht aber im Lumen des ERs zu finden sind [117], ist diese Hypothese wohl eher fragwürdig.

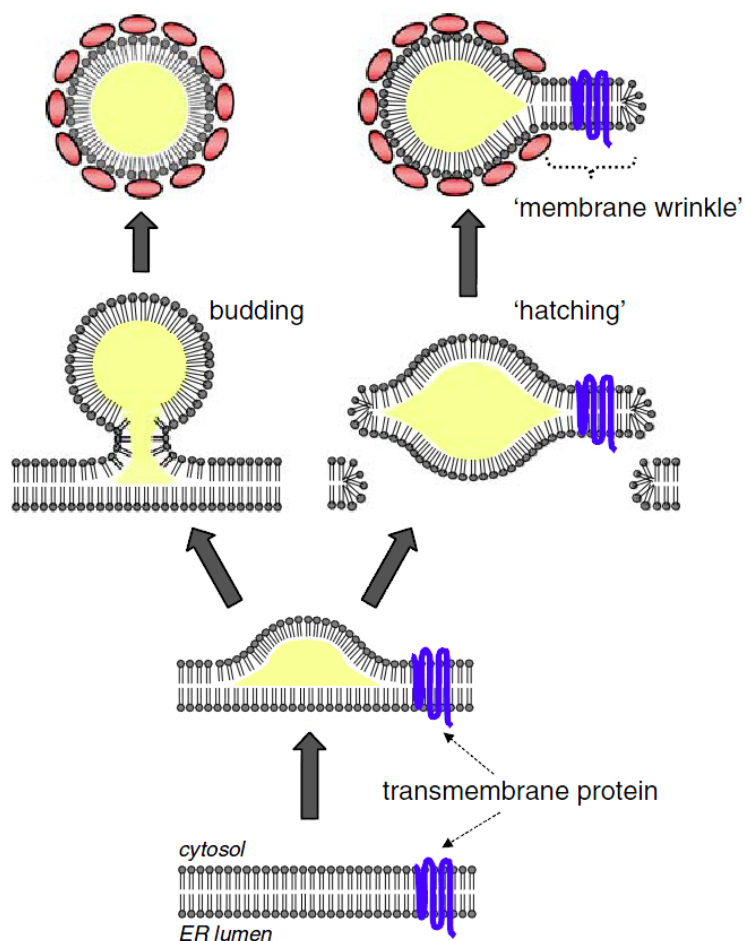


Abbildung 2-6 Bei dem „budding“- sowie dem „hatch“-Modell handelt es sich um die beiden prominentesten Hypothesen, wie LDs nach der Bildung am ER zu eigenständigen Organellen reifen könnten (entnommen aus [11]; mit freundlicher Genehmigung von „Springer Science and Business Media“).

Beide Modelle sind noch einmal in Abbildung 2-6 veranschaulicht, wobei mittlerweile in Frage gestellt wird, ob eine solche Separierung vom ER, wie sie in diesen beiden Modellen postuliert wird, wirklich existiert oder ob nicht vielmehr eine ständige Verknüpfung mit dem ER vorhanden ist [118]. Nachweisen ließ sich zumindest bisher keines der beiden Modelle, was auch damit zusammen hängt, dass biophysikalische Vorhersagen davon ausgehen, dass entstehende LDs eine Ausgangsgröße von 12 nm oder sogar weniger haben können, was eine direkte Visualisierung der LD-Entstehung ausschließt [108, 119, 120]. So ist es erst ab einem bestimmten Reifungsgrad möglich, die neu synthetisierten

LDs optisch aufzulösen, was mit dem Beugungslimit normaler optischer Mikroskope zusammen hängt.

## 2.2.4 Transport von Lipid Droplets

Gezielter Transport ist eine essentielle Notwendigkeit für eine Vielzahl von zellulären Vorgängen, sei es für Signaltransduktionsprozesse oder metabolische Prozesse [121]. Die meisten kleineren Substanzen können nahezu ungehindert innerhalb einer Zelle diffundieren und sich auf diese Weise im gesamten Cytoplasma verteilen, um ihren endgültigen Bestimmungsort zu finden. Dazu sind sehr große Moleküle sowie Organellen jedoch nicht in der Lage, weswegen sie aktiv transportiert werden müssen. Dieser Transport wird von den spezialisierten Motorproteinen Kinesin und Dynein bewerkstelligt [122, 123], welche eine Bindung mit ihrer zu transportierenden Fracht eingehen, um diese dann über das Cytoskelettgerüst der Zelle an ihren vorbestimmten Zielort zu bewegen [124-128]. In manchen Fällen werden die Transportproteine aber auch von Fremdkörpern „gekidnappt“ [121, 129]. So nutzen z.B. manche Viruspartikel diesen Transportweg aus, um zur Replikation den Zellkern zu erreichen [130]. Bei den beiden Motorproteinen Dynein und Kinesin handelt es sich jeweils um Dimere mit zwei Kopfgruppen, wobei immer eine Kopfgruppe mit dem Mikrotubulistrang in Kontakt steht [131]. Dadurch wird ein aktiver Transport über mehrere hundert Einzelschritte ohne Ablösung vom Mikrotubulistrang ermöglicht, wobei ATP verbraucht wird [131]. Kinesine transportieren dabei die Fracht in den meisten Fällen zum Plus-Ende der Mikrotubuli, während Dyneine eine Bewegung zum Minus-Ende ermöglichen [132]. Der Transport über die Aktinfilamente der Zelle wird von einer weiteren Familie der Motorproteine ermöglicht, den so genannten Myosinen.

Neben Mitochondrien [133], Endosomen [134] und Phagosomen [135] scheinen auch LDs auf diese Weise durch die Zelle transportiert zu werden. Zumindest konnte Dynein an der LD-Oberfläche nachgewiesen werden [72, 123, 136], wobei noch unklar ist, wie es zu der Bindung an LDs kommt. Es ist zwar bekannt, dass die Rekrutierung von Dynein über die ERK2 (Extracellular-Signal-regulated Kinase 2)-abhängige Phosphorylierung geschieht [72, 137], ein genauer Bindungspartner ist jedoch noch nicht identifiziert [72].

Allerdings ist es keineswegs der Fall, dass die zu transportierende Fracht kontinuierlich in Bewegung ist. Vielmehr ist ein ständiger Wechsel zwischen rein diffusivem Verhalten und wirklichem aktiven Transport zu registrieren. So kann bei LDs oft beobachtet werden, wie sie sich wie bei einem zufälligen Tanzmuster [72] in einem sehr begrenzten Raum des Cytoplasmas diffusiv bewegen, bis sie plötzlich in einer schnellen gerichteten Bewegung aktiv transportiert werden. Dabei werden Spitzengeschwindigkeiten von mehreren hundert Nanometern pro Sekunde erreicht [72]. Eine umstrittene Frage ist, wie diese

gerichtete Bewegung gesteuert wird. Prinzipiell können die LDs auf einem Mikrotubulistrang nämlich bidirektional bewegt werden, je nach Art des Motorproteins, welches in Kontakt mit dem LD steht. Um nun eine gezielte Richtung einzuschlagen, müssen die beiden Proteinklassen in irgendeiner Form gesteuert werden. Wenn es zu keiner derartigen Regulation kommt, würde es zu einem regelrechten Tauziehen der beiden Motoren kommen, was dann eher eine zufällige Richtungsentscheidung implizieren würde. Die Kraft eines einzelnen Motorproteins konnte in dem Zusammenhang über ein Einzelmolekülexperiment mit einem Wert von 5-7 pN bestimmt werden [131]. Da man aber oft Geschwindigkeiten beobachten konnte, welche weit höher liegen, als es sich mit der mit der Kraft eines einzelnen Motorproteins erklären lässt, wurde vermutet, dass gleich mehrere Motorproteine gleichzeitig an einem LD anheften, um diesen mit ihrer akkumulierten Kraft zu bewegen [131]. Mit Hilfe einer optischen Pinzette wurden daher in einem weiteren Experiment die genauen Kräfte *in vivo* gemessen, wobei sich eine bimodale Verteilung ergab, mit Schwerpunkten um die beiden Werte von 2,6 pN und 5,2 pN [131, 132]. Es wird postuliert, dass diese beiden Kräfte den Transport eines LDs über ein einzelnes Motorproteine bzw. über mehrere Motorproteine darstellen [131] (siehe Abbildung 2-7).

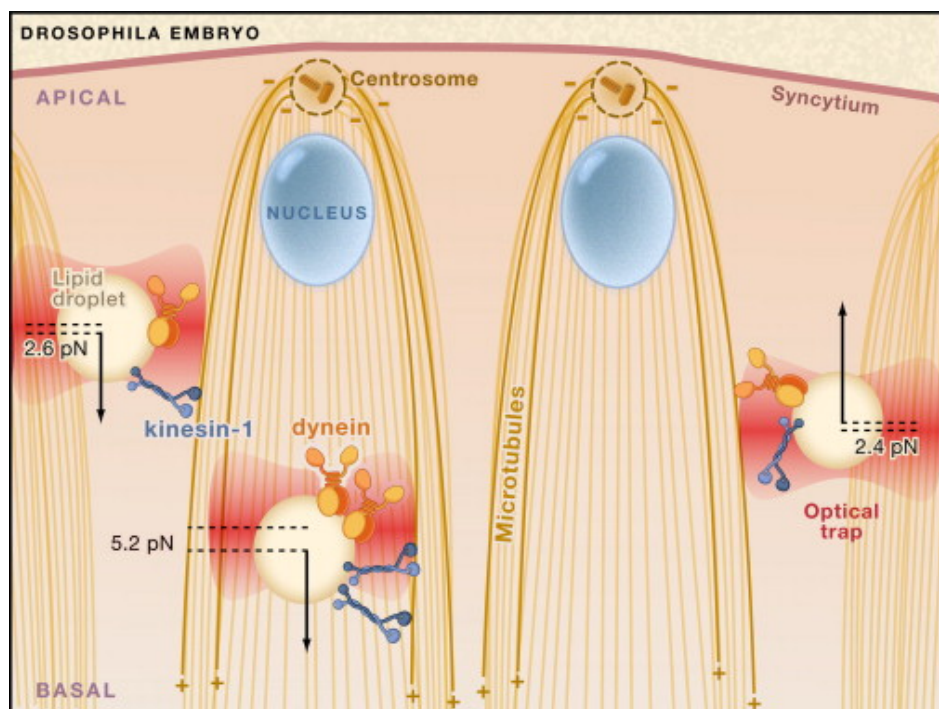


Abbildung 2-7. LDs werden über das Mikrotubuligerüst der Zelle transportiert. Dabei dienen die Kinesine und Dyneine als Motorproteine. Die Kraft, die dabei auf die LDs ausgeübt wird, konnte mit Hilfe einer optischen Pinzette bestimmt werden (entnommen aus [131]; mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlages).

Dies hat jedoch scheinbar keinen Einfluss auf Geschwindigkeit und Richtung des Transports, vielmehr bewegen sich die LDs mit nur einem Motorprotein sogar

durchschnittlich über eine etwas längere Strecke und mit einer 5 % höheren Geschwindigkeit als die LDs, welche mit zwei Motorproteinen verknüpft sind [131, 132].

Zum gerichteten Transport wird zur Zeit postuliert, dass weitere Proteine als so genannte „Koordinatoren“ [72, 138] dienen und einen der beiden Motoren ausschalten, um so die Richtung vorzugeben. Ein eindrucksvolles Beispiel einer derartigen regulatorischen Kraft konnte bereits in Fruchtfliegenembryos nachgewiesen werden [139]. So konnte gezeigt werden, dass das Protein LSD-2 (Lipid Storage Droplet 2) während der Embryogenese eine Änderung seines Phosphorylierungszustandes eingeht, welche mit der Richtung des LD-Transportes korreliert. Es wird postuliert, dass dies durch die Bindung an den vermeintlichen Koordinator klar hervorgerufen wird. Diese Bindung führt dann zu einer transienten Expression des Proteins Halo, welches in die Phosphorylierung von LSD-2 eingreift und so einen gerichteten Transport zum Plus-Pol bewirkt [72, 139].

Zum Transport von LDs ist noch zu erwähnen, dass im Gegensatz zu den großen unilokularen LDs in ausdifferenzierten Adipozyten nur die kleinen in nicht spezialisierten Zellarten vorkommenden LDs eine hohe Mobilität aufweisen. Allerdings ist fraglich, ob der gerichtete Transport wirklich direkt über eine aktive Verbindung zwischen den LDs und den Mikrotubuli-Filamenten stattfindet oder ob es sich vielmehr um eine indirekte Interaktion über das mit den LDs assoziierte ER handelt.

## 2.2.5 Wachstum von Lipid Droplets

LDs können sich unter bestimmten Umständen drastisch vergrößern. So konnte z.B. gezeigt werden, dass sich durch Zugabe von Oleinsäure zu *Drosophila* S2 Zellen der Durchmesser der darin enthaltenen LDs um nahezu das Dreifache vergrößern kann, und zwar innerhalb von wenigen Stunden [35].

Ein physiologisch sehr relevanter Prozess, bei welchem ein Wachstum der LDs beobachtet werden kann, ist die adipogene Differenzierung von Stammzellen zu Adipozyten, den spezialisierten Fettspeicherzellen des Körpers. Die Tatsache, dass LDs sich in ihrer Größe verändern können, ist zwar schon lange bekannt, ungelöst war jedoch bisher, auf welche Weise diese Größenvariation abläuft. Die Hypothesen, welche zu dieser Fragestellung existieren, waren und sind sowohl divergent als auch disparat.

Eine Theorie besteht z.B. darin, dass sich das Volumen eines LDs durch die Fusion mit einem oder mehreren anderen LDs vergrößert und dass daran SNARE-Proteine beteiligt sind [9, 136, 140], vergleichbar mit der bekannten Fusionsfähigkeit von anderen zellulären Vesikeln. Dieses Modell erscheint plausibel, wird doch bei den bereits bekannten Vesikelfusionsprozessen davon ausgegangen, dass eine solche Fusion über den Umweg eines sogenannten Hemifusionszustandes [57, 140, 141] stattfindet, bei welchem

zunächst nur jeweils eine einzelne Membran der beiden beteiligten Vesikel beteiligt ist. Dies würde der Struktur von LDs, welche schließlich von vornerein nur über eine einzelne Membran verfügt, entgegenkommen und daher wären ähnliche Mechanismen durchaus vorstellbar. Ein solcher Fusionsprozess, von welchem angenommen wurde, dass er sehr schnell abläuft, würde allerdings mit dem Problem einhergehen, dass plötzlich ein großer Überschuss an Phospholipiden vorhanden wäre.

Im Gegensatz zu einer Fusion wässriger Vesikel ist nämlich das Lipidgesamt volumen fest vorgegeben als die Summe des Lipidgehalts von beiden an einer Fusion beteiligten LDs [11]. Ein Austausch mit dem Cytosol wie bei Vesikeln mit wässrigem Inhalt ist nicht möglich. Veranschaulichen lässt sich dies an einem kurzen Rechenbeispiel [11]: Für ein LD der Größe von einem Mikrometer benötigt man insgesamt 125 LDs der Größe von 200 nm, um das benötigte Volumen an Lipiden zu erhalten. Gleichzeitig braucht man aber nur 25 solcher LDs, um die dafür benötigte Membran herzustellen. Insofern würde bei einer derartigen Fusion ein großer Überschuss von Phospholipiden entstehen, welcher der Gesamtmembranmenge von 100 der kleineren LDs entspricht. Dieser Überschuss an Phospholipiden sowie an Proteinen, welche in der Membran vorhanden waren, müsste dann in irgendeiner Weise kompensiert, also abgebaut werden, was einen relativ großen Energiebedarf erfordern würde. Zwar existieren auch Proteine, die sowohl in LD-assoziiierter Form als auch frei im Cytoplasma vorkommen (z.B. TIP47) [11] und somit auf die Reduktion der Membranfläche flexibel reagieren können, aber es gibt wiederum andere Proteine wie z.B. ADRP, die ausschließlich in der LD-Membran funktionell vorhanden sein können.

Eine zweite Hypothese des LD-Wachstums ist der kontinuierliche Einbau von Lipiden in bereits existierende LDs. Dies könnte z.B. dadurch erklärt werden, dass der Kontakt zwischen den LDs und dem ER die ganze Zeit aufrecht gehalten wird [11] und es niemals zu einer Abschnürung der LDs kommt. Demzufolge könnte man die LDs aber nicht mehr als unabhängiges Organell bezeichnen.

Denkbar wäre natürlich auch, dass ein solcher Austausch von Lipiden zwischen dem ER und den LDs ohne permanenten Kontakt stattfindet, sei es durch ständig repetierende Fusions- und Abspaltungsprozesse (vergleichbar mit den Fusion/Fission-Zyklen der Mitochondrien) oder durch einen Transportprozess zwischen den beiden beteiligten Organellen, welcher über Transportproteine wie Caveolae bewältigt wird [142].

Der letzte denkbare Prozess wäre, dass die Lipide direkt am entsprechenden LD eingebaut werden und nicht über den Umweg des ERs. Alle diese Möglichkeiten sind noch einmal in Abbildung 2-8 zusammengefasst.

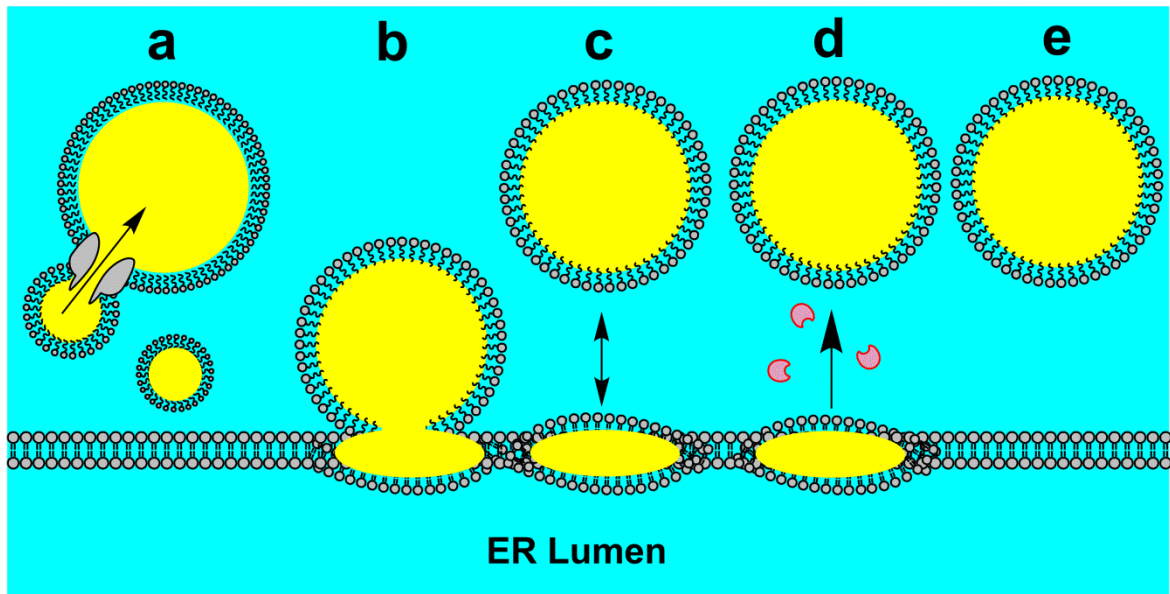


Abbildung 2-8 Denkbare Prozesse, wie es zu einer Vergrößerung von einzelnen LDs kommen kann. (in Anlehnung an [11]). (a) Die LDs wachsen durch Fusion mit anderen LDs; (b) es besteht ein ständiger Kontakt zum ER, von welchem neue Lipide in die LDs transportiert werden; (c) LDs fusionieren immer wieder mit dem ER, nehmen Lipide auf und lösen sich wieder ab; (d) im ER synthetisierte Lipide werden ohne direkten Kontakt zu den LDs transportiert; (e) die Neusynthese von Lipiden geschieht direkt am oder im LD.

## 2.2.6 Adipogene Differenzierung

Bei der Adipogenese werden Stammzellen in spezialisierte Fettspeicherzellen, die sogenannten Adipozyten, umgewandelt. Dieser Prozess läuft in zwei Stufen ab. Zuerst kommt es dabei zu einer Umformung der Stammzellen in adipogene Vorläuferzellen, auch Präadipozyten genannt [143]. In einem zweiten Schritt erfolgt dann die terminale Differenzierung zu Adipozyten.

Ein Großteil des menschlichen Fettgewebes wird aus solchen ausdifferenzierten Adipozyten gebildet, der Rest besteht aus Fibroblasten, fibroblastischen Präadipozyten, Endothelzellen sowie Nerven- und Immunzellen [143, 144]. Fettgewebe wiederum ist unterteilt in weißes und braunes Fettgewebe. Das weiße Fettgewebe ist das klassische Fettdepot, wobei sich die darin enthaltenen weißen Adipozyten durch einen einzigen unilokularen LD auszeichnen. Braunes Fettgewebe hingegen dient mehr der Wärmeerzeugung und enthält sehr viele Mitochondrien, wodurch auch die braune Färbung erzeugt wird [145]. Die in braunen Adipozyten enthaltenen LDs sind zudem kleiner und zahlreicher als die LDs in weißen Adipozyten [24].

Beide Adipozytenarten entstehen aus den sogenannten mesenchymalen Stammzellen (MSCs) [143, 146]. Bei diesen Zellen handelt es sich um Gewebestammzellen, die auch noch im erwachsenen Organismus vorkommen. Daher werden sie im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen auch als adulte Stammzellen bezeichnet. Von den

embryonalen Stammzellen unterscheiden sie sich vor allem darin, dass sie nicht mehr über eine Totipotenz verfügen, sich also nicht mehr in sämtliche Zelltypen differenzieren lassen. Vielmehr sind sie Vorläufer bestimmter Zelltypen (Multipotenz). Dafür zeichnen sie sich durch ihre hohe Proliferationsfähigkeit sowie ihre ethische Unbedenklichkeit aus und können *in vitro* in verschiedene Zelltypen differenziert werden. Neben den Adipozyten gibt es auch noch die Differenzierungsmöglichkeiten zu Chondrozyten (Knorpelzellen) und Osteoblasten (knochenbildende Zellen) (siehe Abbildung 2-9).

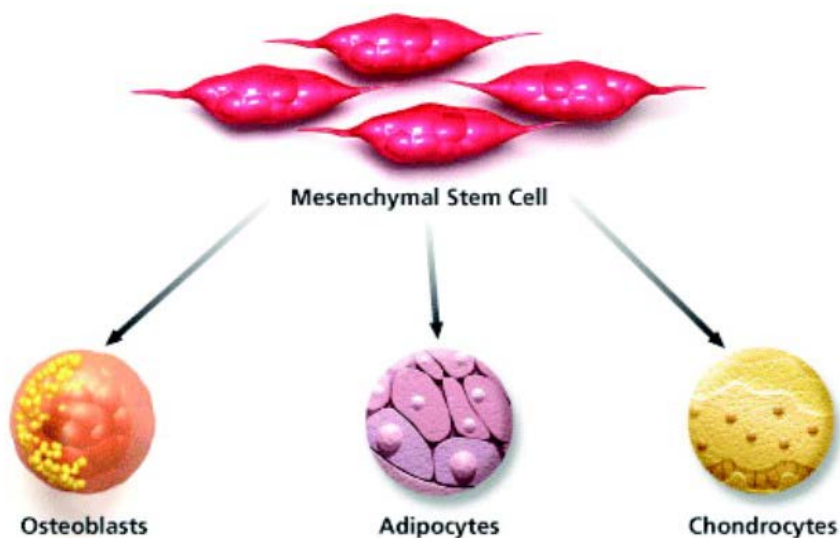


Abbildung 2-9 Differenzierungsmöglichkeiten von mesenchymalen Stammzellen; entnommen von der Internetseite <http://www.sigmaaldrich.com> im Februar 2013

Die Gewinnung solcher mesenchymaler Stammzellen erscheint zur Bekämpfung verschiedener Krankheiten oder zur Erzeugung neuen Gewebes vielversprechend. Neben der aufwändigen Gewinnung aus dem Knochenmark wurde das Fettgewebe als üppige und leicht zugängliche Quelle für derartige Stammzellen aufgetan [3]. Erstmals isoliert wurden diese Zellen von Young et al [3, 147] und inzwischen finden diese Zellen als sogenannte ADSCs (Adipose-derived Stem Cells) vielfältige Anwendungen in der regenerativen Medizin [3, 148-152].

### 2.2.7 Lipolyse

Als Nahrung aufgenommenes Fett wird wie zuvor beschrieben in Triglyceride umgewandelt und innerhalb der LDs abgespeichert. Damit dient es als Hauptenergiespeicher aller Organismen. Ist Bedarf an Energie vorhanden, muss die Zelle demzufolge das gespeicherte Fett aus den LDs abbauen, um es dem Metabolismus zur Energiegewinnung zur Verfügung stellen zu können [153]. Dazu werden die gespeicherten Triglyceride durch die Proteine Adipose-Triglycerid-Lipase (ATGL), hormonsensitive Lipase

(HSL) und Monoacylglycerin Lipase (MGL) sequentiell hydrolysiert [24, 154] (siehe Abbildung 2-10) und dadurch in freie Fettsäuren umgewandelt. Dies ist wichtig, weil TGs nicht als solche die zelluläre Membran passieren können [154], freie Fettsäuren hingegen können aus der Zelle hinaus geschleust werden.

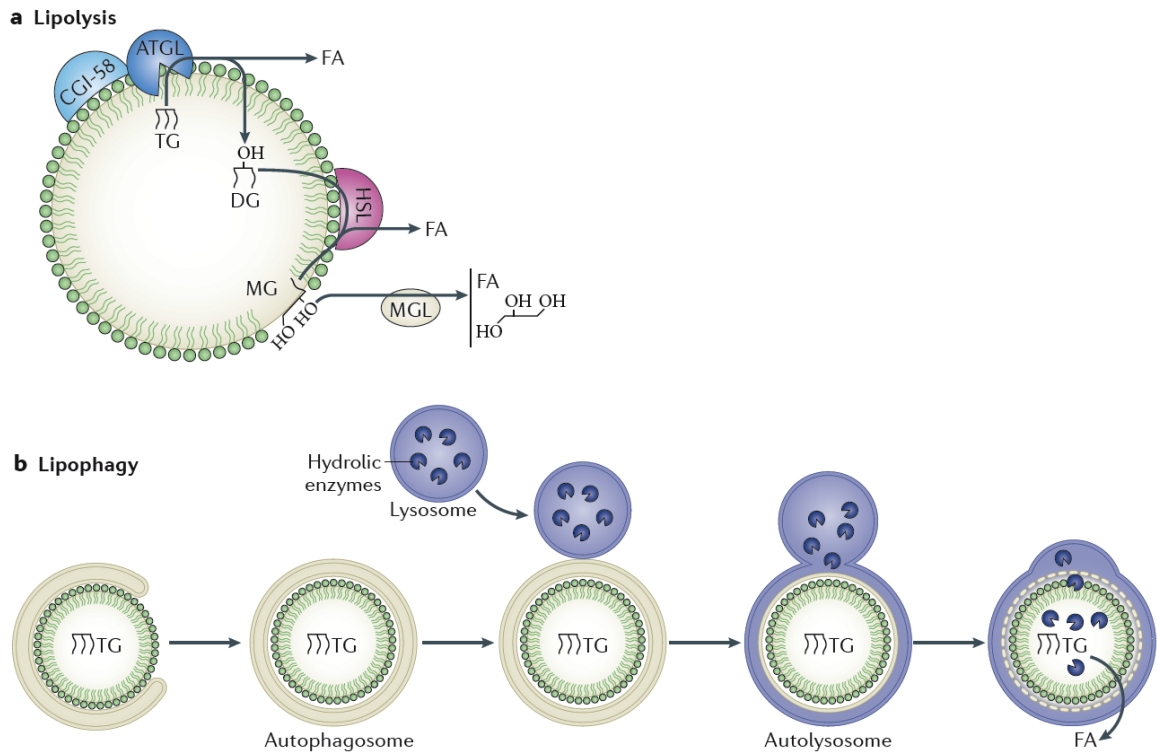


Abbildung 2-10 Fettsäuren können auf zwei Wegen freigesetzt werden: (a) Sequentielle Lipolyse von Triglyceriden zu Fettsäuren und Glycerin. (b) Autophagie von kompletten LDs (entnommen aus [2]; mit freundlicher Genehmigung der Macmillan Publishers Ltd., <http://www.nature.com/nrm/journal/v14/n12/full/nrm3699.html>).

Eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Lipolyse in Adipozyten spielt das Protein Perilipin [41]. In seiner natürlichen ruhenden Form inhibiert Perilipin sowohl ATGL als auch HSL. Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung wird Perilipin jedoch durch Proteinkinase A - abhängige Phosphorylierung aktiviert, was wiederum zu einer Aktivierung der zuvor blockierten Lipasen führt [41].

Während der Lipolyse schrumpft das Volumen der LDs drastisch, wobei auch hier noch ungeklärt ist und daher kontrovers diskutiert wird, was mit dem daraus resultierenden Überschuss an Proteinen und Phospholipiden geschieht, ob diese z.B. vom ER resorbiert oder ins Cytosol freigesetzt werden [24]. Die freigesetzten Fettsäuren können dann verschiedenen Zwecken zugeführt werden. Sie können z.B. zur  $\beta$ -Oxidation und damit zur Energiegewinnung verwendet werden. Dies könnte durch die vorhandene direkte Verknüpfung mit den Mitochondrien erleichtert werden, in welchen die  $\beta$ -Oxidation

---

stattfindet. In Muskelgewebe konnte bereits gezeigt werden, dass der gezielte Transport der Fettsäuren zu den Mitochondrien über Perilipin 5 (PLIN5) ermöglicht wird [155, 156].

Bevor es zur eigentlichen  $\beta$ -Oxidation kommt, bei welcher in einem zyklischen Ablauf jeweils ein Molekül Acetyl-CoA, ein Molekül NADH und ein Molekül  $FADH_2$  gewonnen werden kann, müssen die freigesetzten Fettsäuren jedoch erst einmal aktiviert werden. Dabei wird die Fettsäure auf Coenzym A übertragen, wodurch Acyl-CoA entsteht. Dieses Acyl-CoA kann dann durch das Enzym Carnitin-Acyltransferase I in die mitochondriale Matrix transportiert werden, wo es abgebaut wird.

Des Weiteren können die Fettsäuren direkt als Bausteine zur Membransynthese eingesetzt werden. Außerdem dienen sie als Kofaktoren für Signaltransduktionsprozesse oder werden aus der Zelle exportiert [24].

Neben dem Abbau der Triglyceride innerhalb einzelner LDs gibt es auch noch die Möglichkeit, einen kompletten LD direkt zu metabolisieren, um an die darin enthaltene Energie zu gelangen. Dies geschieht über den Mechanismus der Autophagie. Wie bei der klassischen Lipolyse wird dieser Weg durch Nährstoffmangel und hormonelle Signalkaskaden ausgelöst, was dazu führt, dass ein LD von der Doppelmembran eines Liposoms umschlossen wird. Das daraus resultierende Autophagosom baut den LD über enthaltene liposomale Lipasen ab (siehe Abbildung 2-10). Eine solche Autophagie von LDs wurde erstmalig in Hepatozyten gezeigt, in welchen das Expressionslevel an ATGLs und HSLs relativ gering ist [157]. Da dem Mechanismus der Autophagie inzwischen eine große Rolle bezüglich des LD-Metabolismus zugeschrieben wird [157-165], wurde dieser Mechanismus sogar mit einer eigenen Bezeichnung versehen, der sogenannten Lipophagie [166].

## 2.3 Visualisierung von Lipid Droplets

Will man die zellulären Vorgänge, welche mit LDs verknüpft sind, genauer verstehen, sind Methoden erwünscht, mit welchen sich diese Organellen mit möglichst geringem äußeren Einfluss visualisieren lassen. Dies kann entweder durch invasive Methoden erreicht werden, bei welchen durch Zugabe eines Farbstoffes die LDs angefärbt werden, oder durch nicht-invasive Methoden, bei welchen die Probe ohne äußere Zusätze beobachtet werden kann.

### 2.3.1 Invasive Visualisierungsmethoden für Lipid Droplets

Um die genauen Funktionen und Mechanismen von LDs aufklären zu können, bieten sich vor allem mikroskopische Methoden an, bei denen die LDs durch Anfärbung mit fluoreszierenden Farbstoffen wie BODIPY 493/503 oder nicht fluoreszierenden Farbstoffen wie Oil Red O [167] sehr einfach visualisiert werden können [168]. Fluoreszenz entsteht dadurch, dass fluoreszierende Substanzen, die auch als Fluorophore bezeichnet werden, in der Lage sind, aufgenommene Energie in Form von messbarer Strahlung abzugeben. Dies lässt sich am besten anhand des so genannten Jablonski-Diagramms erklären (siehe Abbildung 2-11).

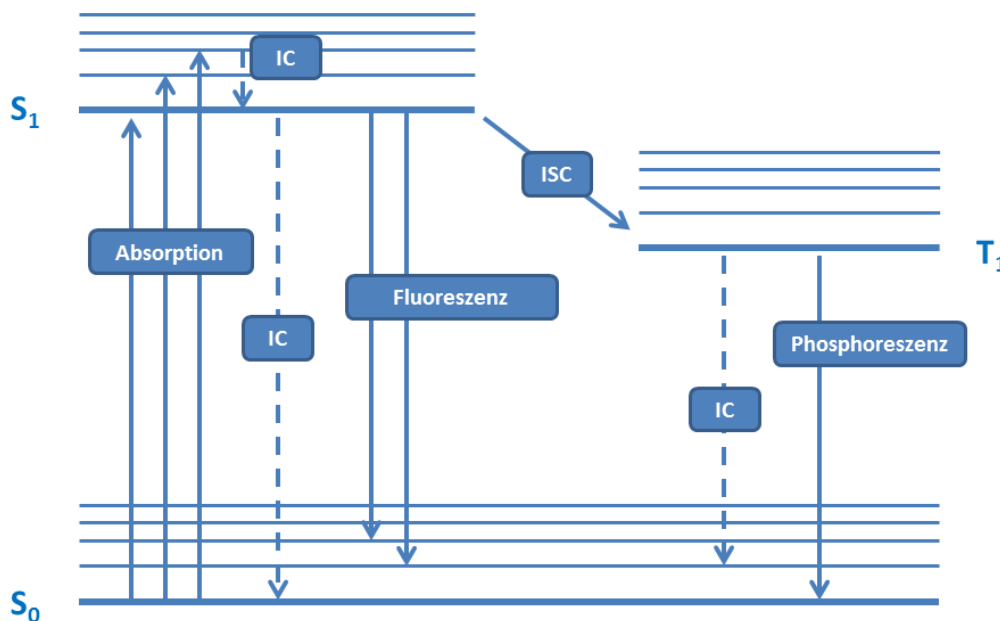


Abbildung 2-11 Schematische Darstellung des Jablonski-Diagramms.

Durch Absorption einer von außen einwirkenden elektronischen Anregungsenergie werden die Moleküle von einem energetischen Grundzustand ( $S_0$ ) in einen elektronisch angeregten Zustand ( $S_1$ ) versetzt. Dieser Prozess findet in einer Größenordnung von etwa  $10^{-15}$  s statt. Das für jedes Molekül charakteristische Absorptionsspektrum bzw. Emissionsspektrum ergibt sich daraus, dass die beiden elektronischen Zustände aufgrund von vibronischen Zuständen energetisch weiter aufgespalten werden, wobei deren Besetzungswahrscheinlichkeiten durch die Franck-Condon-Faktoren beeinflusst werden. Da die Fluoreszenz nahezu ausschließlich aus dem Grundzustand von  $S_1$  erfolgt, ist das Aussehen der Emissionsspektren unabhängig von der eigentlichen Anregungswellenlänge. Außerdem besitzen Absorptions- und Emissionsspektren eine ausgeprägte Spiegelsymmetrie, da die vibronischen Zustände im  $S_0$ - und  $S_1$ -Zustand sehr ähnlich sind.

Wurde das Molekül durch die Absorption in einen höheren vibronischen Zustand von  $S_1$  versetzt, kommt es innerhalb einer Zeitskala von  $10^{-12}$  s zu einer schnellen strahlungslosen Relaxation (Internal Conversion, IC) in den Grundzustand von  $S_1$ . Von dort benötigt die Rückkehr in den Grundzustand vom  $S_0$ -Zustand über Fluoreszenz ca.  $10^{-9}$  s. Dieser Prozess findet im längerwelligeren Bereich als die eigentliche Absorption statt, weil immer ein gewisser energetischer Verlust auftritt. Diese energetische Verschiebung wird nach seinem Entdecker als Stokes-Shift bezeichnet.

Neben der Fluoreszenz kann das Molekül zur Energieabgabe auch in den Triplettzustand übergehen, was als Inter System Crossing (ISC) bezeichnet wird. Dieser Übergang dauert ca.  $10^{-6}$  s, ist allerdings aufgrund der Auswahlregeln für elektronische Übergänge eigentlich spinverboten. Kommt es von diesem Zustand zu einer Emission eines Photons, spricht man von Phosphoreszenz.

Zur Berechnung vieler Prozesse, welche bei der Fluoreszenz auftreten, sind in erster Linie die Fluoreszenzquantenausbeute sowie die Fluoreszenzlebenszeit entscheidend. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist dabei das Verhältnis zwischen emittierten und absorbierten Photonen. Die Quantenausbeute gibt also an, wieviel der absorbierten Energie in Form von Fluoreszenz abgegeben wird:

$$\phi_F = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}}$$

Hierbei ist:  $\phi_F$ : Fluoreszenzquantenausbeute

$k_F$ : radiative Zerfallsrate

$k_{nr}$ : strahlungslose Zerfallsrate

Die Fluoreszenzlebenszeit hingegen gibt die Dauer an, die ein Molekül durchschnittlich im angeregten Zustand verbleibt und ergibt sich aus dem Kehrwert der Zerfallsraten:

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + k_{nr}}$$

Hierbei ist:  $\tau_F$ : Fluoreszenzlebenszeit

Will man nun die Fluoreszenz zur Visualisierung von LDs verwenden, so bietet der Einsatz von lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen dafür eine einfache und gleichzeitig effiziente Möglichkeit. Eine Alternative zur direkten Farbstoffzugabe besteht in der Verwendung von Fettsäuren, die mit einem Farbstoff verknüpft sind und die in dieser Form verfüttert werden können.

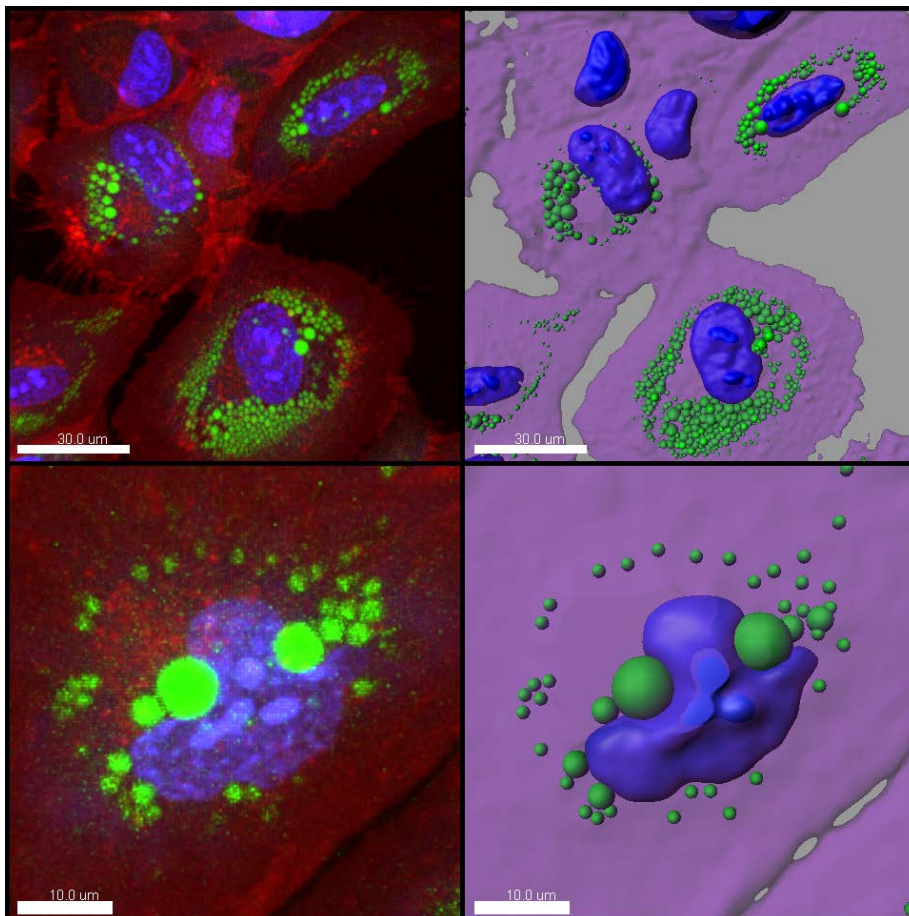


Abbildung 2-12 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mesenchymalen Stammzellen, die sich in der adipogenen Differenzierung befinden. Grün: LD-Färbung mit BODIPY 493/503; Rot: Färbung der Zellmembran mit Cell mask Deep Red; Blau: Färbung des Zellkerns mit Syto 82. Scale bar: Oben: 30 µm, unten: 10 µm.

Ein erheblicher Vorteil der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur LD-Untersuchung besteht darin, dass es in der klassischen Fluoreszenzmikroskopie sehr einfach ist, gleich mehrere verschiedene intrazelluläre Kompartimente anzufärben, um diese simultan zu visualisieren und dadurch Zusammenhänge zwischen diesen einzelnen Kompartimenten aufzuklären. So ist in Abbildung 2-12 z.B. neben den LDs auch noch der Zellkern sowie die Zellmembran der beobachteten Zellen angefärbt, was einen schnellen Überblick über die gesamte Zellstruktur ermöglicht.

Neben der direkten LD-Färbung durch Zugabe von fluoreszierenden Substanzen können auch LD-assoziierte-Proteine mit dem Grün fluoreszierenden Protein (GFP) oder dessen Derivaten markiert werden, wobei deren Expression einen Einfluss auf das natürliche Verhalten der LDs ausüben kann.

Neben den eminenten Vorteilen von Fluoreszenzfarbstoffen, die vor allem in ihrer einfachen Handhabung und ihrer Spezifität bestehen, ist der Einsatz solcher Farbstoffe aber auch mit einigen Nachteilen verbunden. So kommt es durch die Einfärbung unweigerlich zu einem Eingriff in die natürliche biologische Struktur, bei welchem sich schwer abschätzen lässt, inwiefern dieser Eingriff natürliche Vorgänge verfälscht. In einem späteren Kapitel dieser Arbeit (siehe Kapitel 3.1) wird eine solche Verfälschung genauer beschrieben, bei welcher es durch den Farbstoff und die parallele Laserbestrahlung zu induzierten Artefakten kommen kann. Außerdem wird der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen dadurch limitiert, dass es mit der Zeit zu einem unvermeidlichen Ausbleichen der Farbstoffe kommt.

Will man einen bestimmten Zeitpunkt eines Vorganges, an dem LDs beteiligt sind, genauer analysieren, kann man die Zellen vor der Mikroskopie fixieren. Dies wiederum führt zu der Problematik, dass die im Kern der LDs gespeicherten Lipide durch die Aldehydbehandlung nicht fixiert werden, so dass es nicht einfach ist, die natürliche Form der LDs zu konservieren [11]. Aus diesem Grund erscheinen LDs bei histologischen Schnitten und anschließender HE-Färbung als quasi nicht vorhandene Struktur, da die Lipidester durch organische Lösungsmittel während der Dehydrierung entfernt werden [31], wohingegen das umgebende proteinreiche Cytoplasma fixiert wird. Dadurch wird die Struktur der LDs wie ein Negativabdruck zurück gelassen [11].

Neben der Anfärbung mit Farbstoffen hat sich auch die Elektronenmikroskopie als hilfreiche Methode zur Untersuchung von LDs etabliert, wobei sich die Probenpräparation als relativ problematisch erweist und die gleichen Fixierungsartefakte auftauchen, die zuvor schon beschrieben wurden. Der große Vorteil der Elektronenmikroskopie ist allerdings, dass sich dabei auch sehr kleine Strukturen und damit auch sehr kleine LDs (<100 nm) darstellen lassen, während bei der klassischen Mikroskopie aufgrund des

Auflösungsvermögens die LDs größer als ca. 200-300 nm sein müssen, um sie voneinander abgrenzen zu können.

### **2.3.2 CARS-Mikroskopie als nichtinvasive Visualisierungsmethode**

Da der Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie mit einer Reihe von Problemen verbunden ist, war schon immer die Motivation groß, Methoden zu entwickeln, die nicht auf den intrinsischen Einsatz von Farbstoffen angewiesen sind. Gleichzeitig sollten derartige Methoden aber auch den gleichen experimentellen Nutzen haben und dabei mindestens die gleichen oder im günstigsten Fall sogar bessere Resultate ermöglichen. Das zuvor angesprochene Bleichen der für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzten Farbstoffe setzt der Methodik nämlich insofern ein Limit, als dass man nicht eine unbegrenzte Zahl an Bildern hintereinander aufnehmen kann. Die absolute Anzahl an Photonen, die von einem einzelnen Chromophor ausgesendet werden kann, ist nämlich nicht unbegrenzt, so dass bestimmte Experimente, wie das Analysieren von zellulären Vorgängen mit Echtzeitauflösung sowie Langzeitexperimente über mehrere Tage, schwer durchzuführen sind. Markierungsfreie Methoden spielen aus diesem Grund eine immer wichtigere Rolle in der modernen biologischen Grundlagenforschung.

Die einfachste Methode der nichtinvasiven Visualisierung besteht in der Verwendung von klassischer Durchlichtmikroskopie. So können LDs ab einer Größe von ca. einem Mikrometer ohne große Schwierigkeiten im Durchlicht erkannt werden. Um gleichzeitig aber einen direkten Nachweis zu haben, dass es sich bei der beobachteten Struktur wirklich um einen LD und nicht um eine andere Organelle handelt, kann man als weitere nichtinvasive Methode mikroskopische Techniken verwenden, welche sich die Schwingungsfrequenzen der Lipide zu Nutzen machen.

Als Beispiele solcher Techniken wäre zum Einen die klassische Raman-Mikroskopie zu nennen und zum Anderen relativ neue Techniken wie die SRS-Mikroskopie sowie die in dieser Arbeit hauptsächlich zum Einsatz kommende sogenannte kohärente Anti-Stokes Raman-Streuung-Mikroskopie (CARS). Diese beiden Methoden sind jedoch mit sowohl hohen technischen als auch finanziellen Anforderungen verknüpft und daher noch nicht als Standardwerkzeug verfügbar. Vor allem die CARS-Mikroskopie hat sich dennoch als äußerst nützlich für die Visualisierung von Lipiden generell und LDs im Besonderen erwiesen [169].

Der prinzipielle Mechanismus der CARS-Mikroskopie besteht darin, dass man die charakteristischen vibronischen Zustände von Molekülen über einen Vierwellen-Mischprozess abfragt (siehe Abbildung 2-13).

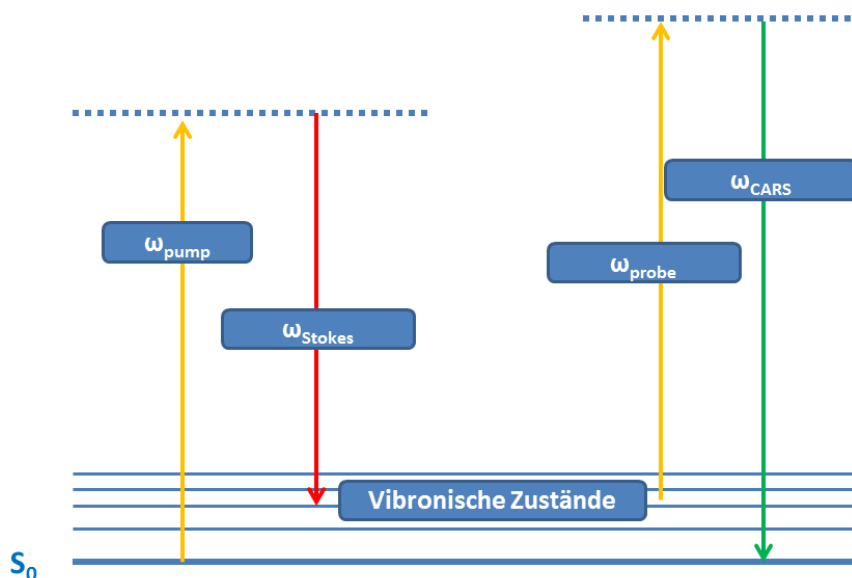


Abbildung 2-13 CARS-Schema.

Typischerweise kommen dabei zwei Laser mit den Frequenzen  $\omega_p$  und  $\omega_s$  simultan zum Einsatz, um die Probe zu bestrahlen. Treffen die Laserstrahlen räumlich und zeitlich überlappt auf die Probe und entspricht deren Frequenzdifferenz  $\omega_p - \omega_s$  der Frequenz eines vibronischen Überganges der Probenmoleküle, so wird ein so genanntes Anti-Stokes Signal generiert, wobei  $\omega_{AS} = 2 * \omega_p - \omega_s$  gilt. Zusätzlich zu dem Vorteil der Vermeidung der Farbstofffärbung, bietet diese Technik weitere Vorteile.

So ist das zu detektierende Signal zu höheren Energien im Vergleich zur Anregungswellenlänge verschoben, was es ermöglicht, das Signal besser von einem fluoreszierenden Hintergrundsignal abzugrenzen. Des Weiteren ermöglicht die CARS-Mikroskopie aufgrund ihrer Nichtlinearität eine dreidimensionale Bildgebung ohne den Einsatz weiterer optischer Elemente.

In Abbildung 2-14 sind zwei Beispiele von Proben gezeigt, welche ein starkes CARS-Signal aufweisen. Zum einen handelt es sich dabei um ein Stück Gewebetuch und zum anderen um eine Fettschicht, welche auf einem Deckglas ausgestrichen wurde.

Das hohe CARS-Signal der Fettschicht lässt sich dadurch erklären, dass Lipide ein hohes Signal der antisymmetrischen aliphatischen CH-Streckschwingung bei einer Wellenzahl von  $2845 \text{ cm}^{-1}$  aufweisen.

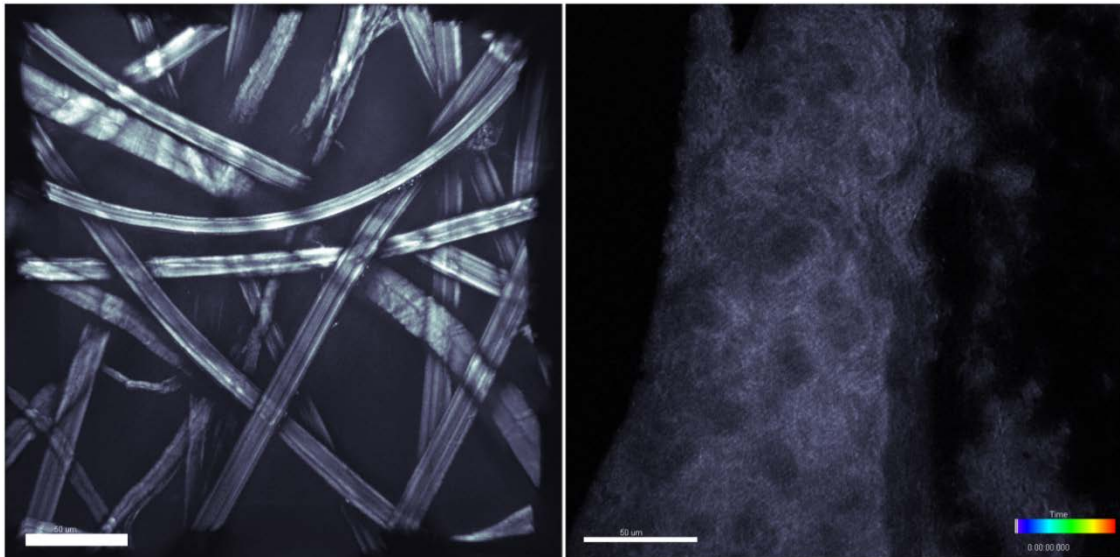


Abbildung 2-14 Exemplarische Anwendungsmöglichkeiten der CARS-Mikroskopie an nicht-biologischen Proben. Links: Visualisierung der Struktur eines Gewebetuches; Rechts: Visualisierung einer auf einem Deckglas aufgestrichenen Fettschicht.

In Abbildung 2-15 ist zudem dargestellt, wie man das Signal der Fettschicht in einer quantitativen Art verfolgen kann. In diesem Fall führt die Zugabe eines fettlöslichen Detergenz dazu, dass die Fettschicht zeitabhängig degradiert wird. Da es sich bei der CARS-Mikroskopie um einen nichtlinearen Prozess handelt, ist eine direkte Quantifizierung des Signals jedoch nicht möglich. Es lassen sich also nicht auf direktem Weg Konzentrationen aus dem gemessenen Signal ableiten. Um dies zu erreichen müssen zuvor Kalibrationsmessungen durchgeführt werden. In einem späteren Kapitel wird beschrieben, wie auf diese Weise z.B. THF-Konzentrationen in Wasser bestimmt werden konnten (siehe Kapitel 3.3.1).

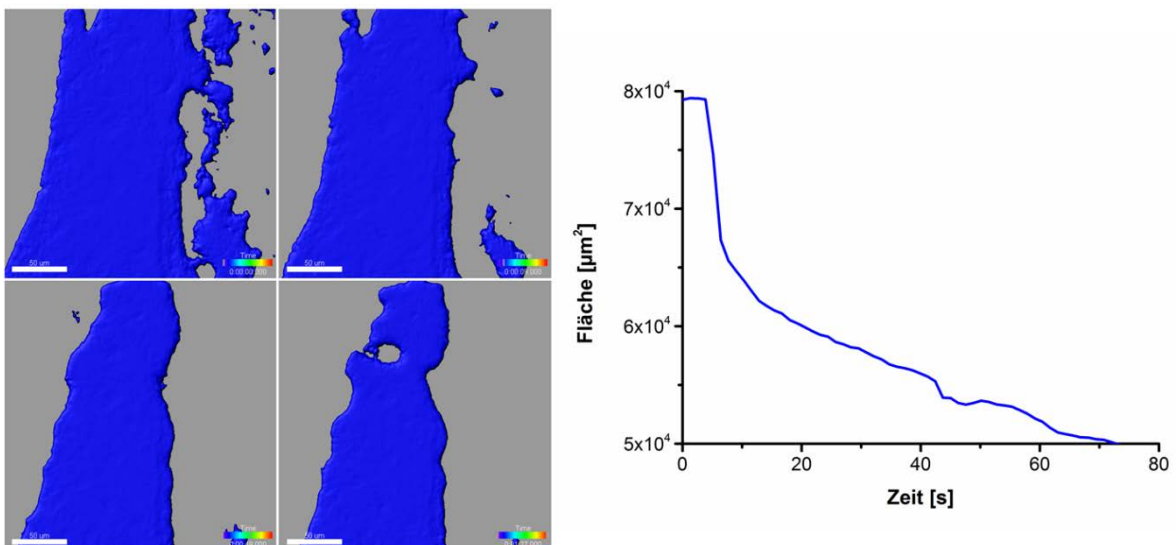


Abbildung 2-15 Quantitative Auswertung der Fettlösekraft eines Detergenz mit Hilfe der CARS-Mikroskopie.

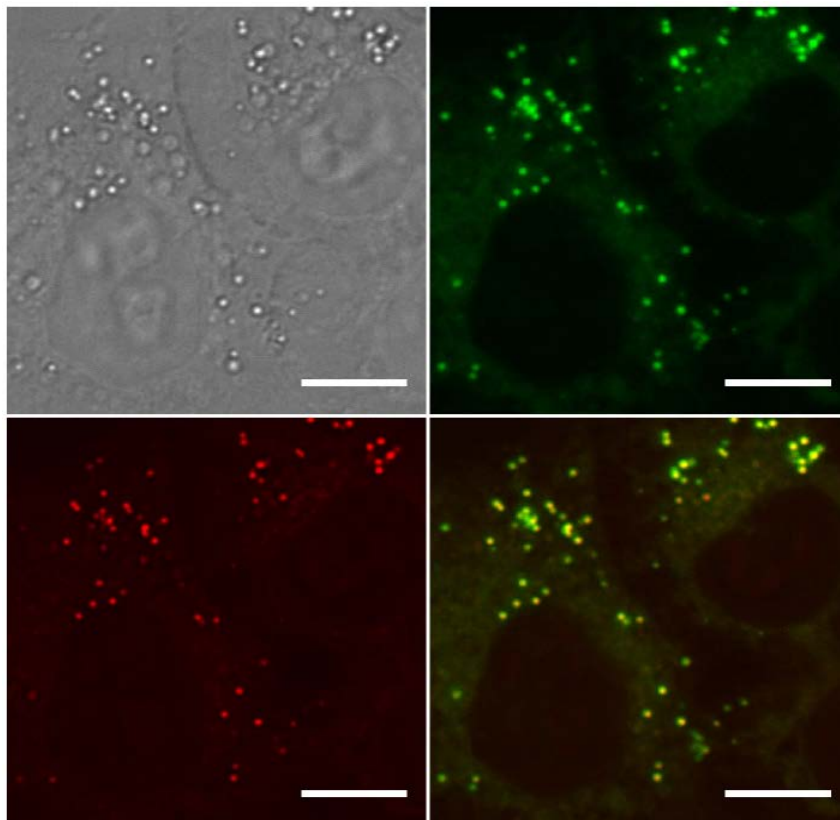


Abbildung 2-16 Visualisierung von LDs in HeLa-Zellen. Oben Links: Durchlichtaufnahme; Oben Rechts: BODIPY 493/503-Färbung; Unten Links: CARS-Aufnahme; Unten Rechts: Komplette Kolokalisation bei der Überlagerung von der CARS- und der Fluoreszenzaufnahme. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$  (Diese Abbildung wurde bereits publiziert [170]; mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co KGaA).

Da auch LDs zu einem großen Teil aus Lipiden bestehen, sollte auch deren Abbildung mittels CARS-Mikroskopie möglich sein. In der Tat können Bilder von LDs erzeugt werden, die zumindest gleichwertig sind wie entsprechende Fluoreszenzbilder, bei welchen die LDs zuvor mit einem Farbstoff angefärbt wurden. Dies wird anschaulich in Abbildung 2-16 demonstriert, in welcher eine CARS-Aufnahme einer HeLa-Zelle zu sehen ist, welche mit vielen LDs im Cytoplasma angereichert ist. Die molekulare Selektivität kann dabei demonstriert werden, indem man die Wellenzahl von  $2845\text{ cm}^{-1}$  auf z.B.  $2780\text{ cm}^{-1}$  verschiebt, wodurch sich das generierte Signal drastisch verringert.

Gleichzeitig wurde die Zelle mit dem am häufigsten verwendeten lipidspezifischen Farbstoff BODIPY 493/503 angefärbt. Die Überlagerung der beiden Bilder zeigt eine exakte Überlappung, so dass davon ausgegangen werden kann, dass man die gleichen Strukturen mit beiden Techniken visualisieren kann. Dabei soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass LDs, welche kleiner als ca. 200 nm sind, generell nur schwer zu erkennen sind und sich aufgrund des Beugungslimits nicht voneinander abgrenzen lassen. Dies ist insbesondere deshalb von besonderer Bedeutung, da bei neu generierten LDs von einer Ausgangsgröße von gerade mal 25 nm ausgegangen wird [11, 171].

Auch in anderen Organismen können LDs auf diese Weise visualisiert werden. So sind in Abbildung 2-17 LDs zu sehen, wie sie in einem lebenden *C. Elegans*-Wurm sowie in Hefezellen vorkommen. Außerdem ist hier zu sehen, dass man mit einer sehr hohen Anregungsleistung sogar in der Lage ist, die Zellmembran von *E. coli*-Bakterien zu detektieren, was sicherlich nah an die Grenzen der Sensitivität der CARS-Mikroskopie heran geht.

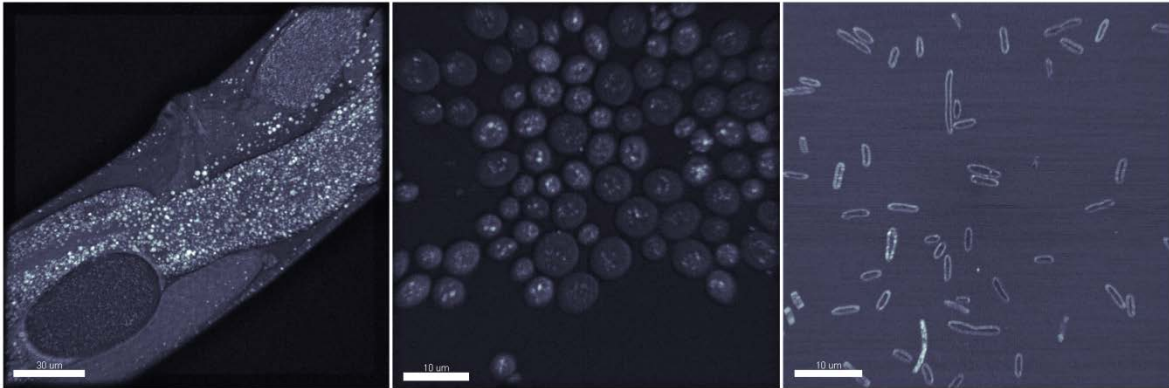


Abbildung 2-17 Exemplarische Anwendungsmöglichkeiten der CARS-Mikroskopie an verschiedenen Organismen. Links: LD- Verteilung in *C. Elegans* (Scale bar: 30 µm); Mitte: LD-Verteilung in Hefezellen (Scale bar: 10 µm); Rechts: Visualisierung der Zellmembran von *E. Coli* (Scale bar: 10 µm).

Aufgrund der hier gezeigten beispielhaften Messungen verwundert es nicht, dass es schon eine Vielzahl an Publikationen gibt, welche sich der CARS-Mikroskopie zur Untersuchung von LDs bedienen [172-176].

Neben dem offensichtlichsten Vorteil, der darin liegt, dass man auf jedwede Art von Farbstoff verzichten kann, wodurch man keinerlei Fremdsubstanz zu den zu untersuchenden Proben hinzufügen muss und man kein Problem mit dem Ausbleichen der Fluorophore bekommt, lassen sich auf diese Weise auch eine Reihe von Artefakten vermeiden, auf welche später in dieser Arbeit eingegangen werden soll (siehe Kapitel 3.1).

Insofern bietet die CARS-Mikroskopie den Vorteil, die angesprochenen Nachteile von invasiven Visualisierungsmethoden zu umgehen und bietet gleichzeitig die Möglichkeit, Proben sowohl über sehr lange Zeit als auch über kürzere Zeit mit hoher zeitlicher Auflösung beobachten zu können, was die Analyse von wichtigen dynamischen Prozessen ermöglicht. Als Beispiel wäre hier die Untersuchung von Transportprozessen von LDs zu nennen, auf die später eingegangen werden soll (siehe Kapitel 3.2.2) und für deren Untersuchung eine hohe zeitliche Auflösung unumgänglich ist. Zum Anderen spielen dynamische Prozesse wie z.B. die adipogene Differenzierung (siehe Kapitel 3.2.4) eine große Rolle. Da die adipogene Differenzierung sehr langsam abläuft wäre es daher von Vorteil, den Prozess über mehrere Stunden oder gar Tage visualisieren zu können.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Farbstoffinduzierte Artefakte

Vor den eigentlichen Ergebnissen zur Lipogenese, LD-Bewegung, LD-Reifung und Lipolyse, soll zunächst auf Probleme bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen näher eingegangen werden, die in Zusammenarbeit mit Johanna Ude während ihrer Bachelorarbeit untersucht wurden [177].

So kann es unter bestimmten Bedingungen durch den Einsatz von Fluorophoren zu induzierten Artefakten kommen, welche die Interpretation der Experimente verfälschen können. Trotzdem hat die Entwicklung und Etablierung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche selektiv LDs anfärben können, wesentlich zu einem besseren Verständnis der Dynamik und Funktion dieser Organellen beigetragen. Vor allem in jüngster Zeit sind eine Reihe von neuartigen Farbstoffen entwickelt worden, die sich neben den bereits seit langem etablierten Markern durch höhere Photostabilität und effizienteres Anfärben auszeichnen. Zu nennen wäre in diesem Zusammenhang z.B. LipidGreen [178], Monodansylpentan [179], SF44 [180] sowie LD540 [181]. Gerade der letztgenannte Farbstoff hat sich als sehr geeignet für die Lebendzellmikroskopie sowie für die Untersuchung an fixierten Zellen erwiesen. Insbesondere seine sehr hohe Photostabilität und die Möglichkeit, parallel das am meisten verwendete fluoreszierende Protein GFP nutzen zu können, machen ihn zu einem interessanten Vertreter seiner Art.

Die Tatsache, dass der Einsatz solcher Farbstoffe auch durchaus Nachteile mit sich bringt, ist aber schon seit längerer Zeit bekannt. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass BODIPY 493/503, einer der am meisten verwendeten LD-Farbstoffe, unter bestimmten Bedingungen auch im roten Bereich fluoreszieren kann, was eine Abtrennung von parallel eingesetzten Farbstoffen erschwert [182]. Ein weiteres bereits aufgezeigtes Problem bei der Verwendung von lipidspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen ist die künstliche Fusion von LDs, was bisher aber nur als Effekt gezeigt werden konnte, welcher auf die Verwendung von Lösungsmitteln wie Ethanol oder Isopropanol [183] zurückzuführen ist. So müssen die Fluoreszenzfarbstoffe vor Zugabe zu den Zellen in diesen Lösungsmitteln gelöst werden und der daraus resultierende teilweise sehr hohe Anteil an Lösungsmitteln im Kulturmedium hat einen starken negativen Effekt auf die zellulären Strukturen. Des Weiteren können Fluoreszenzfarbstoffe einen toxischen Effekt aufweisen, entweder in direkter Art aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften oder indirekt aufgrund ihres photophysikalischen Verhaltens, wenn sie mit Licht bestrahlt werden; man spricht in diesem Fall auch von Phototoxizität oder von Photosensitivität. Letzteres Phänomen ist von immer größerem Interesse für die medizinische Forschung [184] und spielt vor allem

bei der Zugabe von chemischen Stoffen in z.B. Hautcremes eine Rolle, weil dadurch Entzündungsreaktionen unter Lichtbestrahlung hervorgerufen werden können.

Für Fluoreszenzfarbstoffe ist dieses Phänomen bisher eher selten beschrieben worden, es konnte jedoch gezeigt werden, dass intravenös verabreichtes Fluoreszein eine solche Reaktion auslösen kann [185]. Außerdem wurde gezeigt, dass Zellen gezielt durch Lichtbestrahlung getötet werden können, wenn sie zuvor mit dem Farbstoff Merocyanin 540 behandelt wurden [186]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun eine neue Art einer solchen Photosensitivität demonstriert werden, welche auf der Verwendung des lipidspezifischen Farbstoffes LD540 in Kombination mit Laserbestrahlung basiert.

Wie gesagt zeichnet sich LD540 vor allem durch seine Färbefizienz und seine Photostabilität aus und ist zudem synthetisch leicht zugänglich [181]. Daher konnte dieser Farbstoff erfolgreich nach einer Vorschrift von Spandl *et al.* dargestellt werden (siehe Kapitel 5.5.1) und kam bei mehreren Messungen dieser Dissertation erfolgreich zum Einsatz. In Abbildung 3-1 ist das Absorptions- sowie das Fluoreszenzspektrum von LD540 zu sehen. Der Farbstoff besitzt ein Absorptionsmaximum bei 540 nm, woraus sich auch seine Namensgebung ableiten lässt, sowie ein Emissionsmaximum bei ungefähr 560 nm.

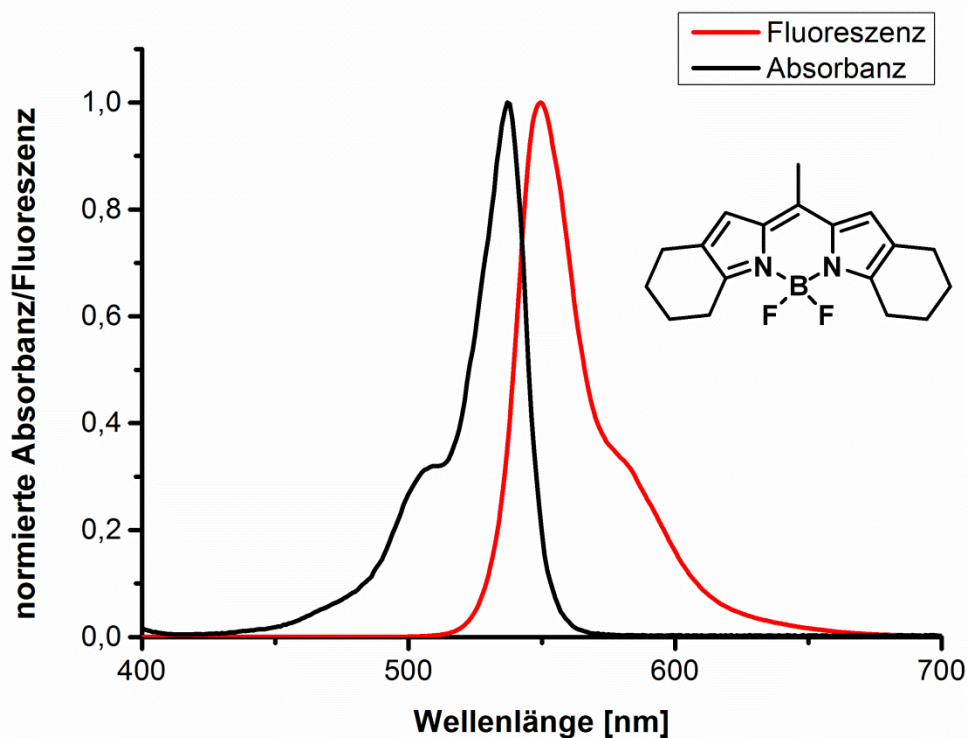


Abbildung 3-1 Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des LD-spezifischen Farbstoffes LD540.

Die Verwendung dieses Farbstoffes zur Untersuchung der LD-Dynamik hat zwei Artefakte zur Folge. Zum einen wurde beobachtet, dass man eine instantane Fusion nahe beieinander liegender LDs durch die Laserbestrahlung provozieren kann und zum anderen führt eine solche Bestrahlung zu einer deutlichen Herabsetzung der Mobilität der LDs bis zur völligen Immobilisierung. Zu erwähnen ist dabei, dass sowohl die Konzentration des eingesetzten Farbstoffes als auch die verwendete Laserintensität sich dabei durchaus noch in einem normalen Rahmen bewegen und im direkten Vergleich zur Literaturvorgabe [181] nicht etwa übertrieben hoch gewählt wurden. Beide Artefakte kann man als überaus bedeutsam erachten, da beide Parameter von großem Interesse sind und vermutlich bereits zu einigen Fehlinterpretationen geführt haben. Wie in einem anderen Kapitel dieser Arbeit beschrieben, spielt nämlich die Bewegung von LDs (siehe Kapitel 3.2.2) sowie die natürliche Fusion von LDs (siehe Kapitel 3.2.4) eine entscheidende Rolle in Fettstoffwechselprozessen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, vergrößert sich z.B. das Volumen einzelner LDs durch die Fusion mit anderen LDs um das Zehnfache oder mehr. Ein Prozess, der vermutlich von vielen Faktoren und einer Vielzahl von Proteinen gesteuert wird und sich auf sehr langen Zeitskalen bis hin zu mehreren Stunden abspielt. Im Gegensatz dazu geschieht eine künstliche, durch Laserbestrahlung induzierte Fusion innerhalb von Sekunden und wirkt wie ein spontanes Ereignis, bei welchem sich die Membranen von benachbarten LDs miteinander vereinen (siehe Abbildung 3-2).

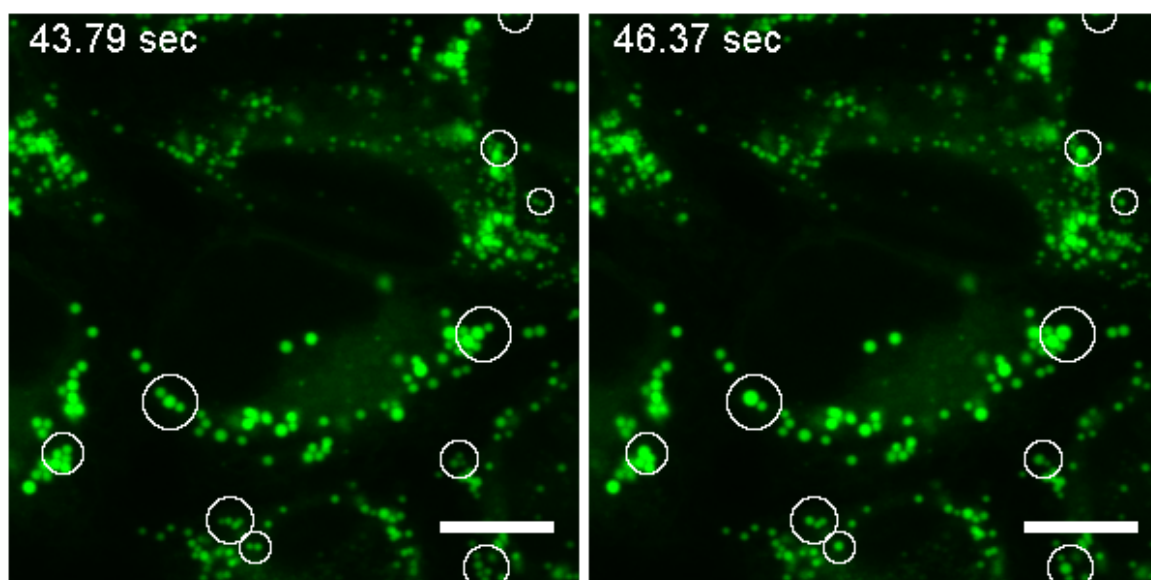


Abbildung 3-2 Konfokale Fluoreszenzaufnahmen, welche laserinduzierte Fusionen von LDs im Sekundenbereich aufzeigen. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

Betrachtet man diese Fusionsvorgänge etwas genauer, so fällt zunächst auf, dass in allen Fällen erst einmal eine gewisse Zeit verstreicht, bevor die ersten Fusionen einsetzen. Diese Vorperiode ist, wie überhaupt das Auftreten von Fusionen, in direktem Maße abhängig von der verwendeten Laserintensität und der eingesetzten Farbstoffmenge. Erstaunlicherweise setzen nach dieser Vorperiode aber nahezu alle Fusionen zu einem

ähnlichen Zeitpunkt ein, in dem hier gezeigten Beispiel nach ca. 30-40 s (siehe Abbildung 3-3). Im weiteren Verlauf der Bestrahlung fusionieren dann immer mehr LDs untereinander, bis schließlich nahezu alle dicht nebeneinander liegenden LDs sich vereinigt haben.

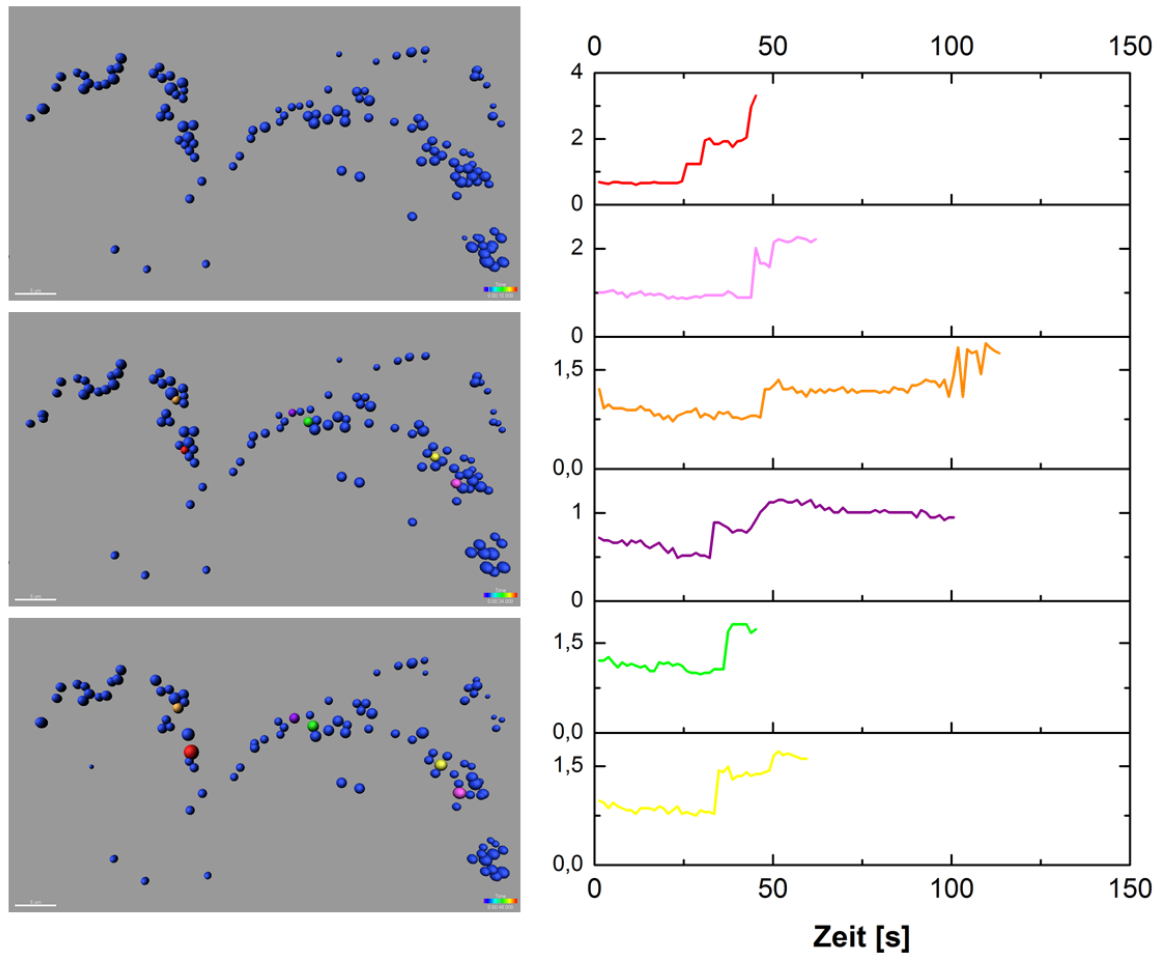


Abbildung 3-3 Quantitative Auswertung von einzelnen laserinduzierten Fusionsereignissen. Diese starten erst nach 30-40 Sekunden. Rechts ist die zeitabhängige Volumenänderung einzelner LDs in  $\mu\text{m}^3$  aufgetragen.

In sämtlichen Fällen laufen die Fusionsprozesse innerhalb zwei aufeinanderfolgender Aufnahmen komplett ab, der dabei zugrundeliegende Mechanismus benötigt daher nicht mehr als ca. 1,3 s, was der Bildaufnahmezeit der Messung entspricht. Derartig schnelle homotypische Fusionsprozesse wurden zwar schon zuvor beschrieben, aber bisher nur als Effekt von verschiedenen chemischen Substanzen [187] oder niedrigen pH-Werten [188], jedoch noch nie zuvor in einer solchen photosensitiven Art, bei welcher eine Kombination aus hoher Farbstoffkonzentration und Laserintensität benötigt wird.

Neben solchen Fusionsprozessen besteht das zweite laserinduzierte Artefakt in der Herabsetzung der intrazellulären Mobilität von LDs. Dies kann so weit führen, dass die LDs

komplett immobilisiert sind und keine Bewegung, weder eine aktive noch eine inaktive Mobilität, aufweisen.

In Abbildung 3-4 ist anhand eines ausgewählten Beispiels zu sehen, wie sich die maximal messbare Geschwindigkeit der LDs sowie die Ausbreitungslänge aufgrund der Bestrahlung verringern. So ändert sich die mittlere maximale Geschwindigkeit aller gemessenen Trajektorien in diesem Beispiel von ca.  $0,25 \mu\text{m/s}$  bei  $10 \mu\text{W}$  auf weniger als  $0,1 \mu\text{m/s}$  bei  $103 \mu\text{W}$ . Noch auffälliger ist die Änderung der absoluten Maximalgeschwindigkeit aller Trajektorien, welche von  $2,6 \mu\text{m/s}$  auf  $0,75 \mu\text{m/s}$  abfällt. Ähnliche Änderungen sind auch bei der Ausbreitungsverschiebung festzustellen.

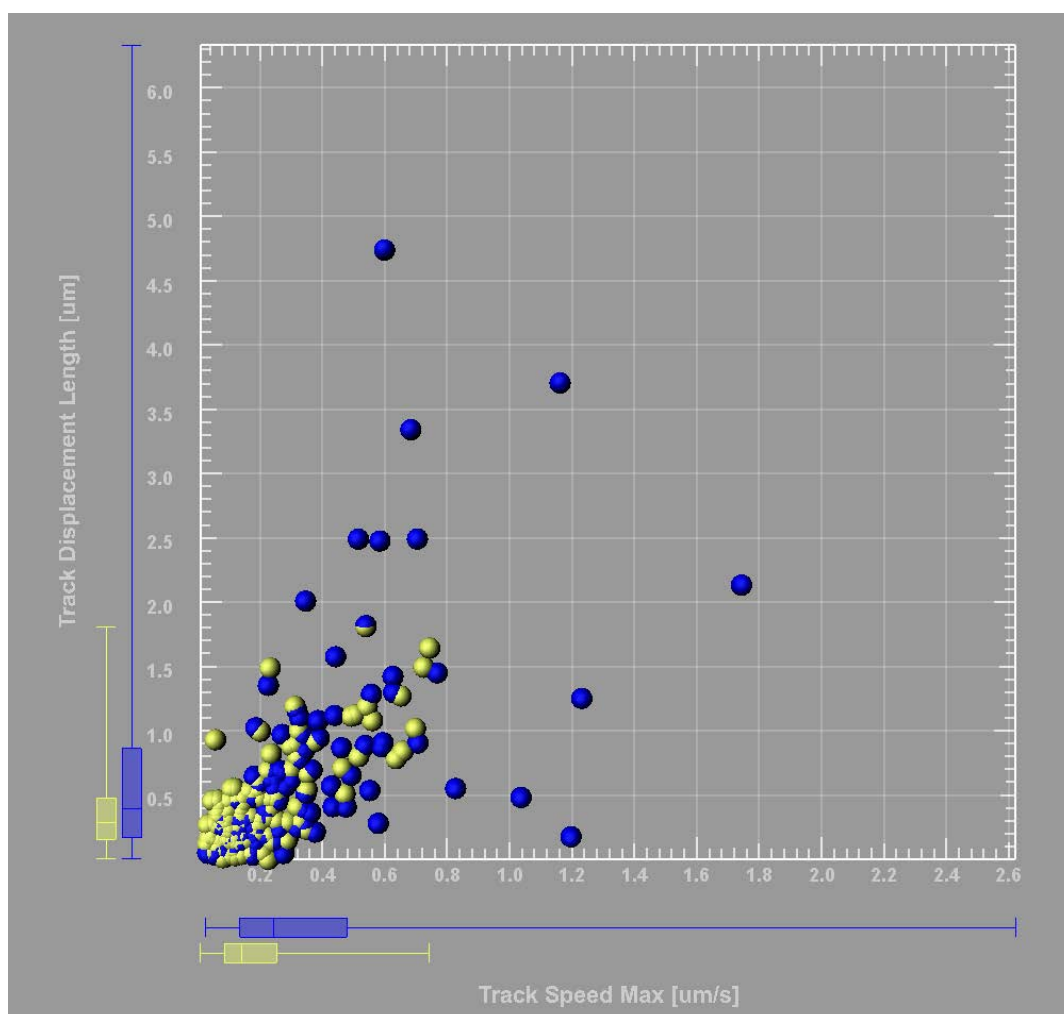


Abbildung 3-4 Verringerung der LD-Mobilität durch Laserbestrahlung und hohe Farbstoffkonzentration. Blau:  $10 \mu\text{W}$ ; Gelb:  $103 \mu\text{W}$ .

Auch in diesem Fall lässt sich eine Korrelation der Stärke des Effektes und der eingesetzten Laserintensität bzw. Farbstoffkonzentration registrieren (siehe Abbildung 3-5). Während bei einer Farbstoffkonzentration von  $0,5 \mu\text{g/ml}$  und einer Laserintensität von  $10 \mu\text{W}$  noch kein negativer Effekt aufzutreten scheint, ändert sich dies bereits

dramatisch bei gleicher Laserbelastung, aber fünffach höherer Farbstoffkonzentration. Unter den Maximalkonditionen, die verwendet wurden und welche einer Farbstoffkonzentration von  $2,5 \mu\text{g/ml}$  und einer Laserintensität von  $213 \mu\text{W}$  entsprechen, kommt es bereits nach ca. 20 Sekunden zu einer vollständigen Immobilisierung aller detektierten LDs.

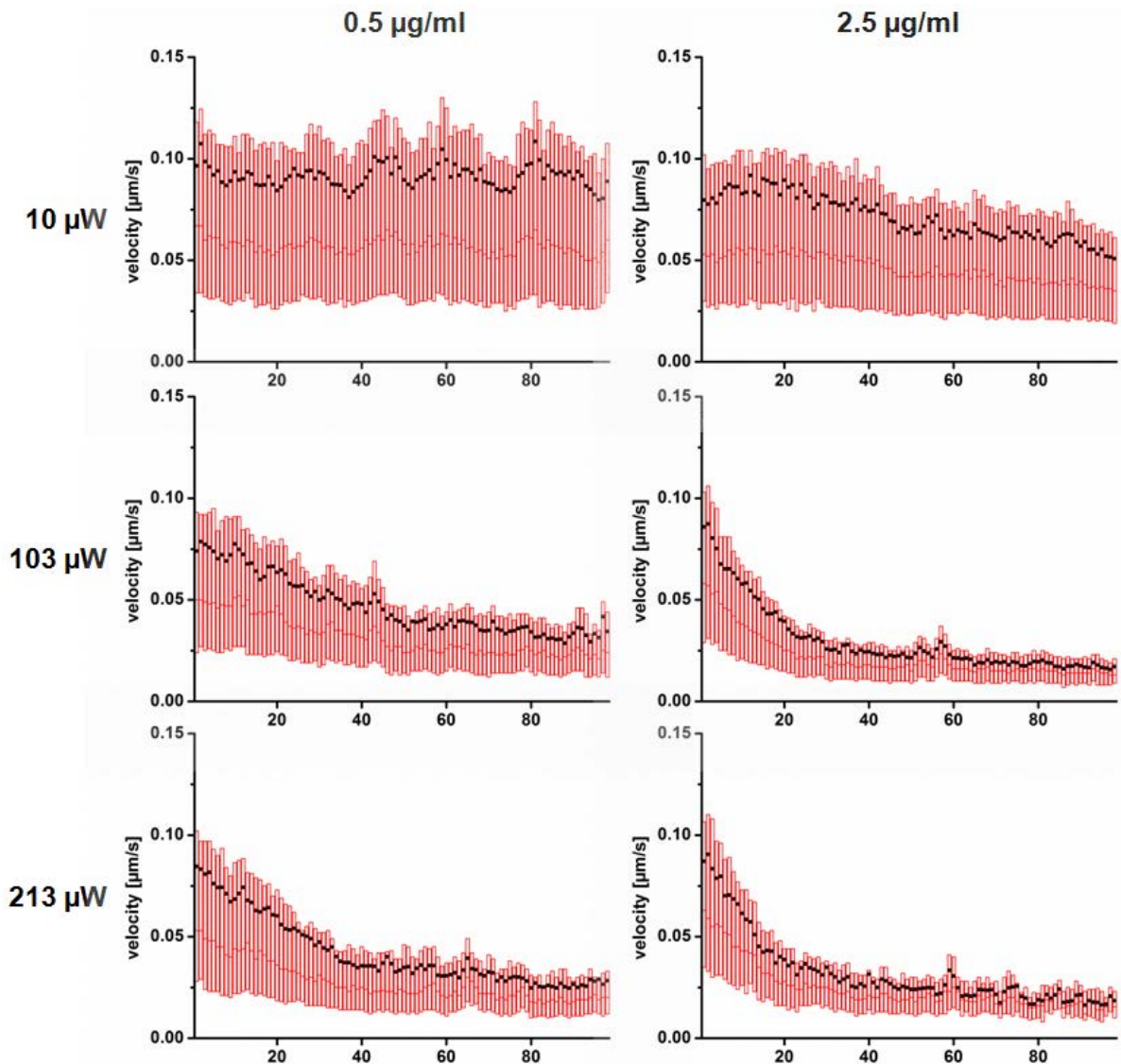


Abbildung 3-5 Verteilung der messbaren Geschwindigkeiten von LDs über die gesamte Messperiode in Abhängigkeit der eingesetzten Farbstoffkonzentration und der Laserintensität. Auf der x-Achse ist die Zeit in Sekunden aufgetragen.

Um zu klären, wodurch die beiden hier beschriebenen Artefakte, die laserinduzierte Fusion von LDs sowie die Herabsetzung der LD-Mobilität, tatsächlich verursacht werden, wurden verschiedene Messungen durchgeführt. So bestand eine Vermutung darin, dass die Artefakte durch ein Aufheizen der LDs induziert werden könnten, hervorgerufen durch Absorption des Laserlichtes durch den in großen Mengen in den LDs akkumulierten Farbstoff. Um diese Vermutung zu belegen, wurden die LDs mit einem

viskositätsabhängigen Farbstoff (BODIPY-C<sub>12</sub>; siehe Kapitel 3.4) angefärbt und die Viskosität in den LDs mittels FLIM-Mikroskopie bei unterschiedlichen Laserleistungen gemessen. Die Verwendung dieses Farbstoffes erschien besonders vielversprechend, weil es sich dabei wie bei LD540 um ein BODIPY-Derivat handelt und daher ähnliche Effekte auslösen könnte. Durch die durchgeführten FLIM-Messungen konnte jedoch keinerlei Änderung der Lebenszeit in Abhängigkeit der Bestrahlungsintensität registriert werden. Mit Hilfe dieser Messungen konnte demzufolge nicht nachgewiesen werden, dass es sich bei den Beobachtungen um einen Heizeffekt handelt. Andererseits kann man dies auch nicht als Negativbeweis heranziehen, da nicht auszuschließen ist, dass der BODIPY-C<sub>12</sub>-Farbstoff derartige Effekte im Gegensatz zu LD540 gar nicht erst auslöst, weil er über eine wesentlich geringere Färbefizienz verfügt und zudem wesentlich photolabiler ist. So konnte weder eine laserinduzierte Fusion noch eine Herabsetzung der Mobilität durch alleinigen Einsatz von BODIPY-C<sub>12</sub> beobachtet werden. Vielmehr bleicht der Farbstoff bei hohen Anregungsintensitäten sehr rasch aus. Aus diesem Grund wurde auch der LD540-Farbstoff analog des BODIPY-C<sub>12</sub> mit verschiedenen rotierenden Seitenketten synthetisiert (siehe Kapitel 5.5). Aus nicht geklärten Gründen zeigten die auf diese Weise hergestellten LD540-Derivate jedoch keine Viskositätsabhängigkeit.

Eine weitere Hypothese bestand darin, dass die Artefakte durch massive Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezien (ROS) ausgelöst werden. Um dies nachzuweisen, wurden die LDs mit LD540 angefärbt und die Zellen zusätzlich mit einem kommerziellen ROS-Kit inkubiert. Bei diesen Messungen konnte auch wirklich ein entsprechendes Signal detektiert werden, welches durch die Laserbestrahlung induziert zu sein scheint und im entsprechenden Detektionskanal auftaucht. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es sich auch bei diesem Signal um ein Artefakt handelt, da es auch bei einer Negativkontrolle ohne ROS-Kit (siehe Abbildung 3-6) und zudem ohne die kurzwellige Anregungswellenlänge auftaucht, die für die Anregung des ROS-Kits eigentlich erforderlich ist. Bisher konnte jedoch noch nicht geklärt werden, worum es sich bei diesem Signal handelt, welches kurzwelliger als das eigentliche LD540-Signal und auch kurzwelliger als das Anregungslicht von 514 nm ist.

Eine weitere Auffälligkeit besteht darin, dass das messbare Signal zunächst zunimmt, um dann gleich wieder abzunehmen (siehe Abbildung 3-7). Denkbar wäre, dass es laserinduziert zur Entstehung von einer neuen fluoreszierenden Spezies kommt, bei welcher es sich entweder um eine von der Zelle gebildete autofluoreszierende Substanz handelt oder um eine abgewandelte Form von LD540, welche durch die Laserbestrahlung erzeugt wird. Diese neue Substanz oder veränderte Form von LD540 könnte bei Entstehung ein messbares Signal liefern, welches durch Ausbleichen direkt wieder verschwindet. Beide Theorien würden aber nicht erklären, warum es sich bei dem detektierten Signal um ein Anti-Stokes-Signal handelt.

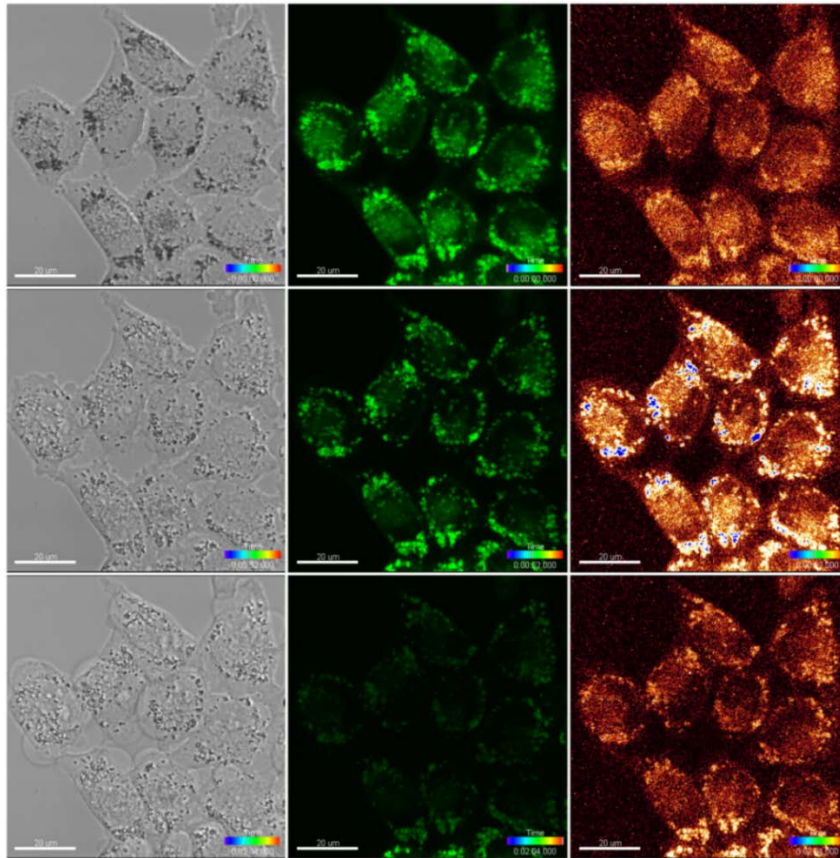


Abbildung 3-6 Auftauchen eines Anti-Stokes-Signals beim Einsatz einer hohen LD540-Konzentration und einer hohen Laserleistung. Links: Durchlichtbilder; Mitte: LD540-Signal; Rechts: Detektiertes Anti-Stokes-Signal. Scale bar: 20 µm.

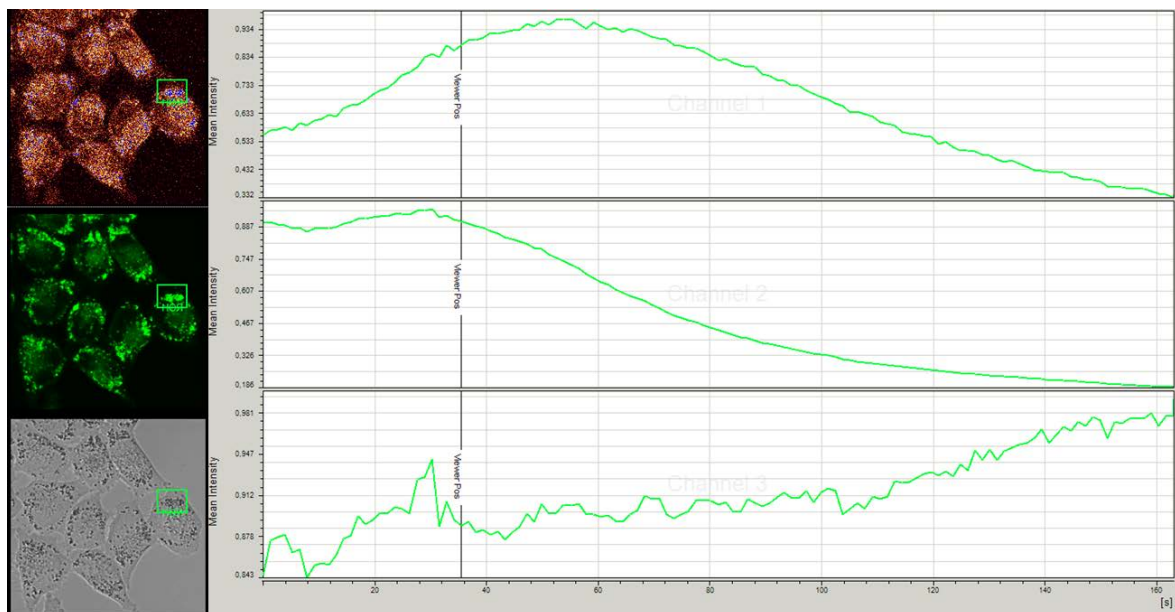


Abbildung 3-7 Das gemessene Anti-Stokes-Signal (oben) nimmt zunächst zu und dann wieder ab.

Eine weitere Überlegung war, dass der Farbstoff LD540 zu einer großen Triplettopulation führen könnte, welcher für die Entstehung der Artefakte verantwortlich sein könnte. Aus

diesem Grund wurden FCS-Messungen des Farbstoffes in sowohl Ethanol als auch in PBS-Puffer durchgeführt. In beiden Fällen konnte jedoch kein auffallend großer Triplettanteil gemessen werden (siehe Abbildung 3-8). Dieser wäre ansonsten als klare Schulter in der frühen Phase der FCS-Kurve zu erkennen.

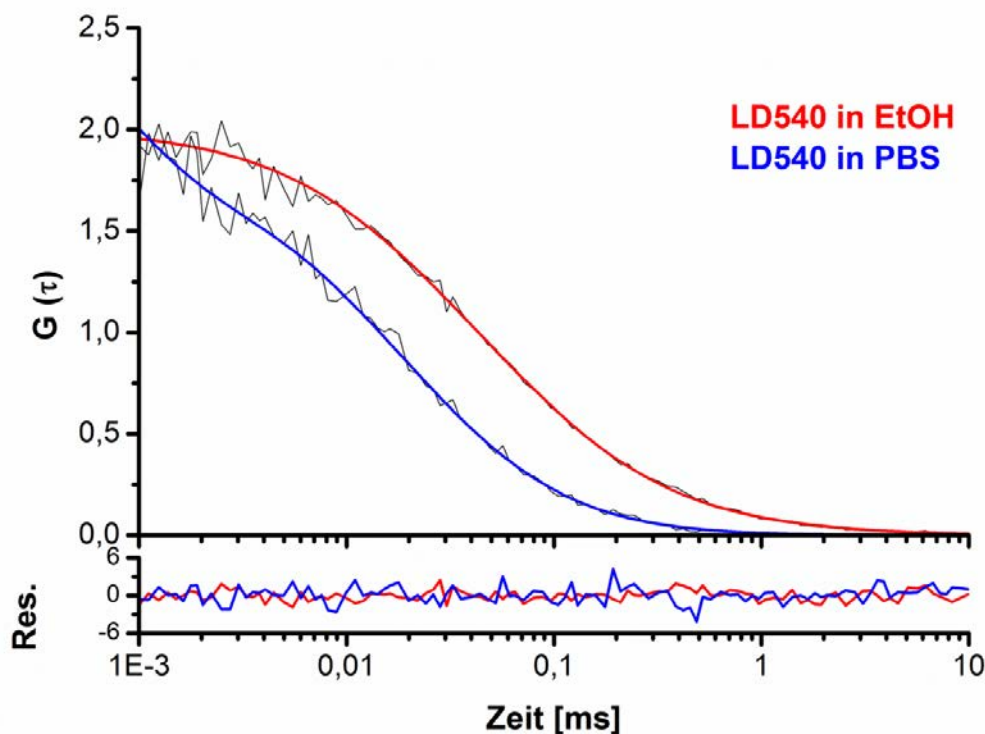


Abbildung 3-8 FCS-Kurven von LD540 in purem Ethanol und in PBS-Puffer.

Zur Vermeidung der beiden beobachteten Artefakte, welche bei der Verwendung von speziellen lipophilen Fluoreszenzfarbstoffen auftreten können, wurden die meisten Messungen in dieser Arbeit mit Hilfe der CARS-Mikroskopie durchgeführt, insbesondere die Experimente, bei welchen es um die Mobilität bzw. das Fusionsverhalten von LDs ging. Es war zwar durchaus möglich, vermutlich unverfälschte Resultate durch geeignete Wahl der Farbstoffkonzentration und der Anregungsleistung mittels Fluoreszenzmikroskopie zu erhalten, trotzdem schien die CARS-Mikroskopie hierbei doch einige Vorteile zu bieten. Andere Messungen, wie z.B. stationäre Aufnahmen von LDs oder die Lipolyse, konnten hingegen erfolgreich mittels Färbung mit LD540 durchgeführt werden.

## 3.2 Untersuchung der Dynamik von LDs in humanen Zellen

### 3.2.1 Induktion der LD-Biogenese durch Fettsäurezugabe

Die Zugabe von Fettsäuren zu dem Wachstumsmedium von kultivierbaren Zellen führt im Allgemeinen dazu, dass die Zellen diese Fettsäuren internalisieren, um sie nach erfolgreicher Umwandlung in Form von Triglyceriden einzulagern, was in einer Anreicherung an intrazellulären LDs resultiert. Diese Anreicherung lässt sich wiederum mikroskopisch verfolgen, in dem man ein zu analysierendes Beobachtungsfenster über mehrere Stunden in bestimmten Intervallen immer wieder abrastert, um am Ende der Messung die gewonnenen Daten quantitativ auszuwerten. Durch den Einsatz der CARS-Mikroskopie kann man dabei die Probe ohne invasiven Einfluss visualisieren. Zur Bestimmung, in welchem Maße sich LDs innerhalb einer Zellpopulation akkumulieren können, wurden HeLa-S3-Zellen mit 600  $\mu\text{M}$  komplexierter Oleinsäure gefüttert und im direkten Anschluss über 24 Stunden beobachtet (siehe Abbildung 3-9).

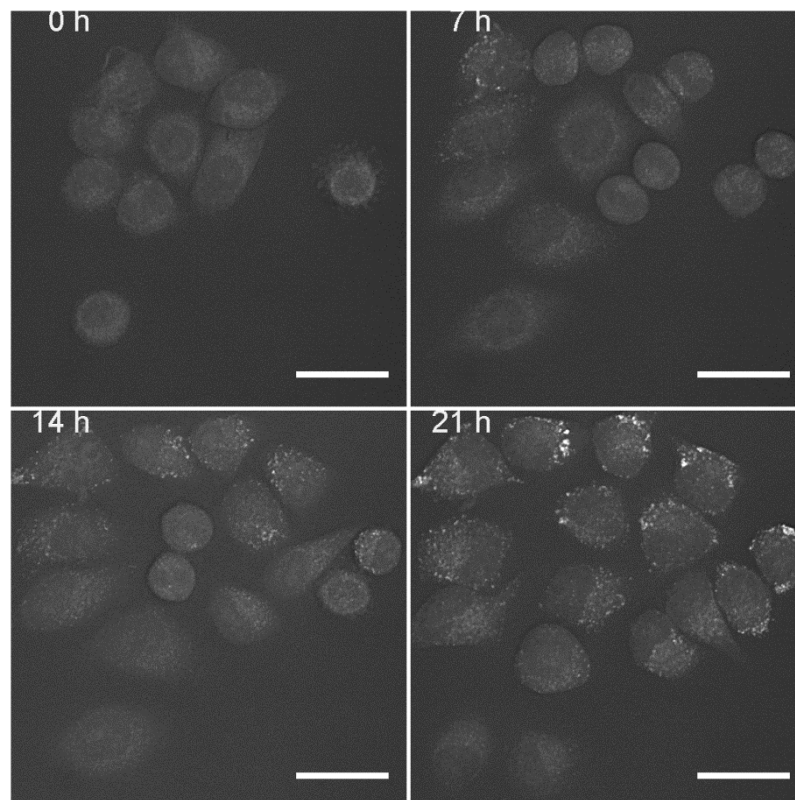


Abbildung 3-9 CARS-Mikroskopie zur Verfolgung der intrazellulären LD-Anreicherung, die durch Zugabe von 600  $\mu\text{M}$  Oleinsäure zu HeLa-S3-Zellen induziert wurde. Scale bar: 30  $\mu\text{m}$  (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [170]; mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co KGaA).

Die vorherige Komplexierung mit BSA ist dabei zwingend notwendig, um der Fettsäure ihre ansonsten toxische Wirkung zu nehmen. Wie an den mikroskopischen Bildern erkennbar ist, kommt es erwartungsgemäß während der Beobachtungsdauer zu einer deutlichen Zunahme der LDs in einer nahezu exponentiellen Form (siehe Abbildung 3-10). Wie einleitend erwähnt (siehe Kapitel 2.3.1 und Kapitel 2.3.2), soll hier noch einmal betont werden, dass es sich hierbei nur um die Anzahl der detektierbaren LDs handelt. Diese Detektionsgrenze ist sowohl bei der CARS-Mikroskopie als auch bei der Fluoreszenzmikroskopie größenlimitiert. Sehr kleine LDs würde man folglich nicht detektieren können.

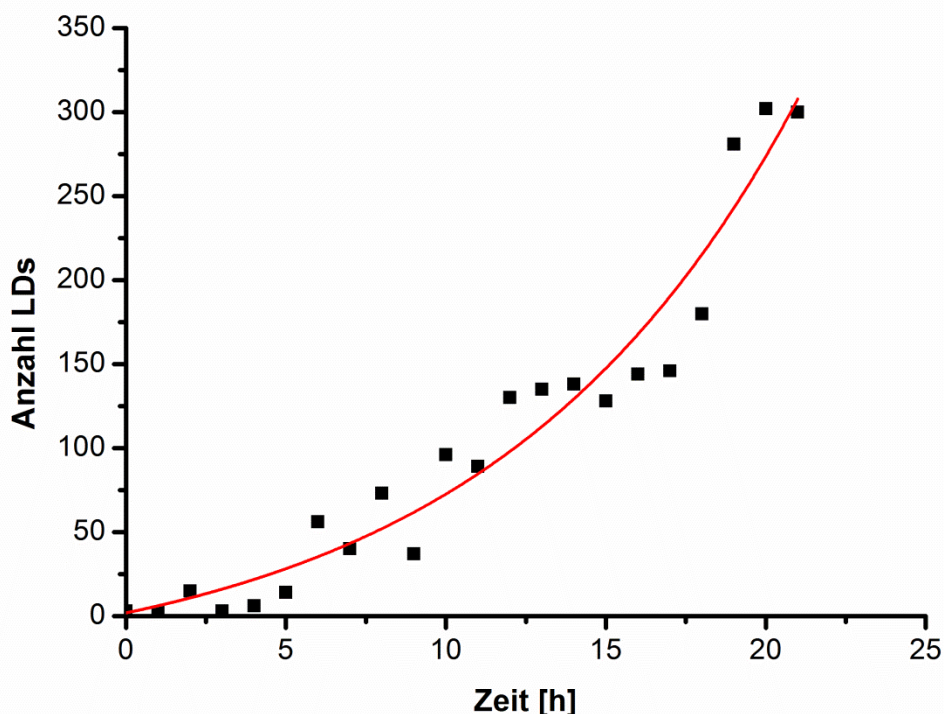


Abbildung 3-10 Zunahme der LD-Anzahl in der beobachteten Zellpopulation von HeLa S3-Zellen im Verlauf der Messdauer, ausgelöst durch Zugabe von  $600 \mu\text{M}$  Oleinsäure. Zur besseren Übersicht wurden die Werte mit einer exponentiellen Funktion angenähert (rot).

Zu Beginn der Aufnahmeperiode hat es den Anschein, als wären in der gesamten Zellpopulation so gut wie gar keine LDs vorhanden, während am Ende der Beobachtungszeit mehr als 300 LDs detektiert wurden, welche sich wiederum auf eine Gesamtzellzahl von 16 Zellen verteilen. Eine solche massive Anreicherung der Anzahl intrazellulärer LDs ist aber durchaus zu erwarten. So konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Menge an LDs in Hefezellen nach Erreichung der stationären Phase um ca. 300 % steigert [189].

Eine weitere wichtige Beobachtung des durchgeführten Langzeitexperimentes ist die Tatsache, dass es während der Aufnahmedauer zu mehreren Zellteilungen kommt, ein Umstand, welcher als Indiz herangezogen werden kann, dass die Vitalität der Zellen durch die nicht unerhebliche Belastung durch das Anregungslicht scheinbar nicht beeinträchtigt wird. Dies ist insbesondere daher erwähnenswert, da die Akkumulation von LDs eben auch durch zellulären Stress induziert werden kann.

Dies kann z.B. auch als Nebenwirkung der CARS-Mikroskopie hervorgerufen werden, wenn die Zellen durch zu hohe Laserbestrahlung derart belastet werden, dass sie mit LD-Erzeugung darauf reagieren, vermutlich verursacht durch lichtinduzierten ER-Stress. ER-Stress ist nämlich ein bekannter Faktor, welcher die LD-Anreicherung stimulieren kann [190-193].

In einem weiteren durchgeführten Experiment mit HeLa-S3-Zellen konnte daher auch beobachtet werden, wie eine zu hoch gewählte Laserbelastung zu einem enormen LD-Zuwachs in der belichteten Region der Probe führt, wohingegen der umgebende Bereich in keiner Weise davon betroffen zu sein scheint (Abbildung 3-11).

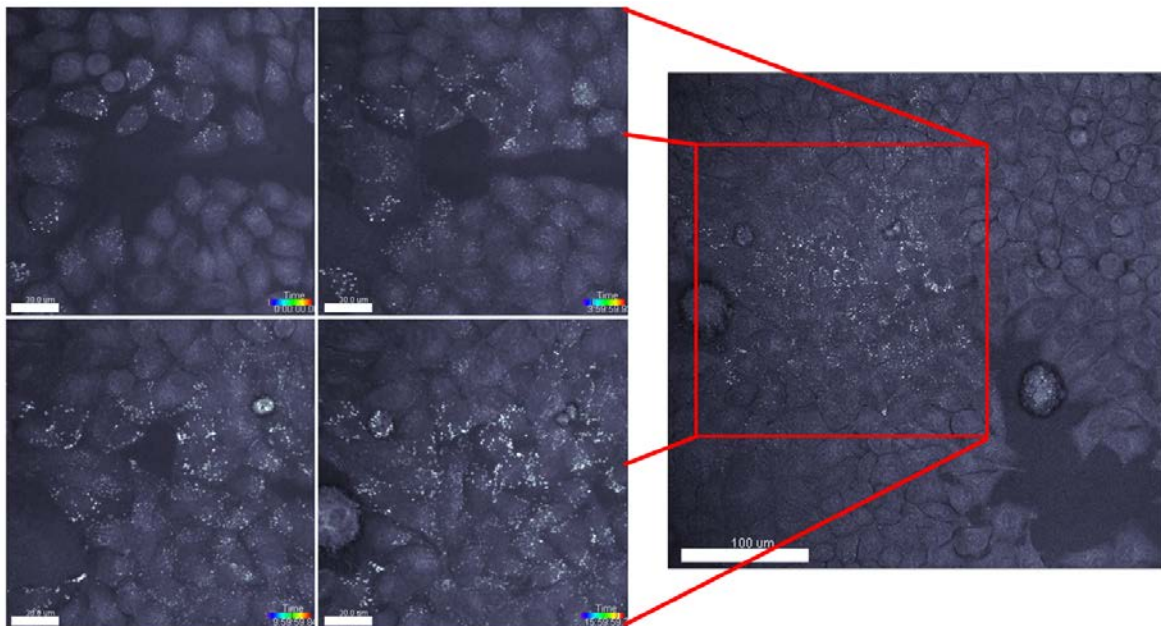


Abbildung 3-11 Laserstress induziert in der beleuchteten Region selektiv eine LD-Akkumulation, während es in der Umgebung zu keiner LD-Anreicherung kommt. Links: Startpunkt, nach 4 h, nach 10 h und nach 16 h; Scale bar: 30 µm. Rechts: Übersichtsbild über die geschädigten Zellen und deren Umgebung am Ende der Messung; Scale bar: 100 µm.

Insgesamt wurden in diesem Fall zu Beginn der Beobachtungsdauer ca. 500 LDs in allen Zellen im Beobachtungsfeld detektiert, während am Ende mehr als 2000 intrazelluläre LDs aufzufinden sind. Des Weiteren fällt auf, dass die Zellen, welche dem Lichtstress ausgesetzt sind, neben der starken Akkumulation von LDs keinerlei andere

Nebenwirkungen aufweisen. Vielmehr hat man von der Zellmorphologie her den Eindruck, vollkommen vitale Zellen zu beobachten. Erst durch das abschließende Vergrößern des Beobachtungsfeldes und dem näheren Betrachten der umgebenden, nicht gestressten Zellen, wird die regionale LD-Akkumulation offenbart. Außerdem wird dann ersichtlich, dass sich die bestrahlten Zellen während der Beobachtungszeit im Gegensatz zu der vorherigen Messung nicht geteilt haben. Die Zelldichte im Beobachtungsfenster nimmt zwar zu, dies liegt aber eher daran, dass die außerhalb der Bestrahlungszone liegenden Zellen sich weiter vermehren und so die gesamte Zellschicht verdichten.

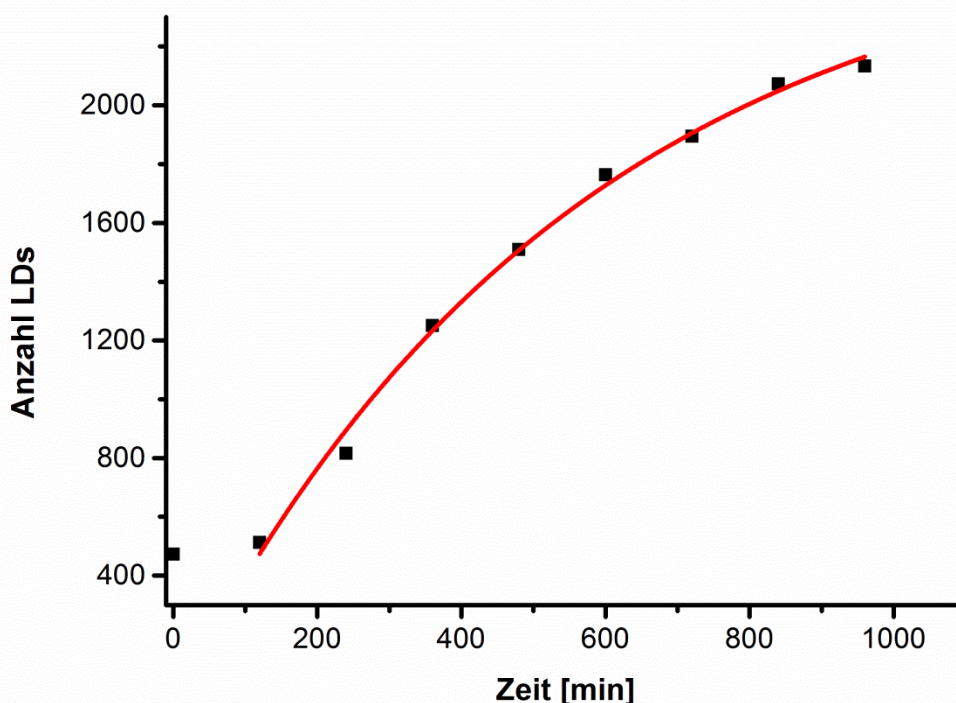


Abbildung 3-12 Messung der laserinduzierten LD-Zunahme in einer Zellpopulation in Abhängigkeit von der Zeit. Zur besseren Übersicht wurden die Werte mit einer exponentiellen Funktion angenähert (rot).

Im Prinzip kann also das zu untersuchende Phänomen, die LD-Akkumulation, auch durch die Messmethode selbst beeinflusst werden, weswegen die Anregungsintensität möglichst gering gehalten werden sollte. Es bleibt dennoch festzuhalten, dass sich die durch Oleinsäure getriggerte Akkumulation von LDs in lebenden Zellen mittels CARS in einem Langzeitexperiment verfolgen lässt, so lange man die Laserleistung möglichst niedrig hält.

In einem weiteren Experiment sollte dann die genaue Anzahl der LDs pro Zelle ermittelt werden und ob sich diese durch die Konzentration der im Medium vorhandenen

Fettsäure beeinflussen lässt. Dazu wurden die HeLa-S3-Zellen mit zwei verschiedenen komplexierten Fettsäuren (Oleinsäure sowie Linolsäure) in verschiedenen Konzentrationen bis hin zu 1,8 mM inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurde die Anzahl an LDs für mehrere Zellen ausgezählt und die erhaltenen Werte gemittelt (siehe Abbildung 3-13). Weil es sich dabei nicht um Langzeitexperimente, sondern vielmehr um stationäre Aufnahmen handelte, wurden die LDs in diesem Fall allerdings der Einfachheit halber mit dem lipidspezifischen Farbstoff LD540 angefärbt.

Bei der quantitativen Auswertung der LD-Anzahl fällt insbesondere der Umstand auf, dass es anscheinend einen Maximalzahl an detektierbaren LDs gibt, welche in den einzelnen Zellen gebildet werden können und dass dieser Wert bei ca. 100 LDs im Falle der Linolsäure und bei ca. 110 LDs im Falle der Oleinsäure liegt. Es kann natürlich hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass sich auch die Anzahl der nicht detektierbaren LDs unterscheidet. Vielleicht werden im Fall der Linolsäure einfach mehr kleine LDs gebildet als im Fall der Oleinsäure.

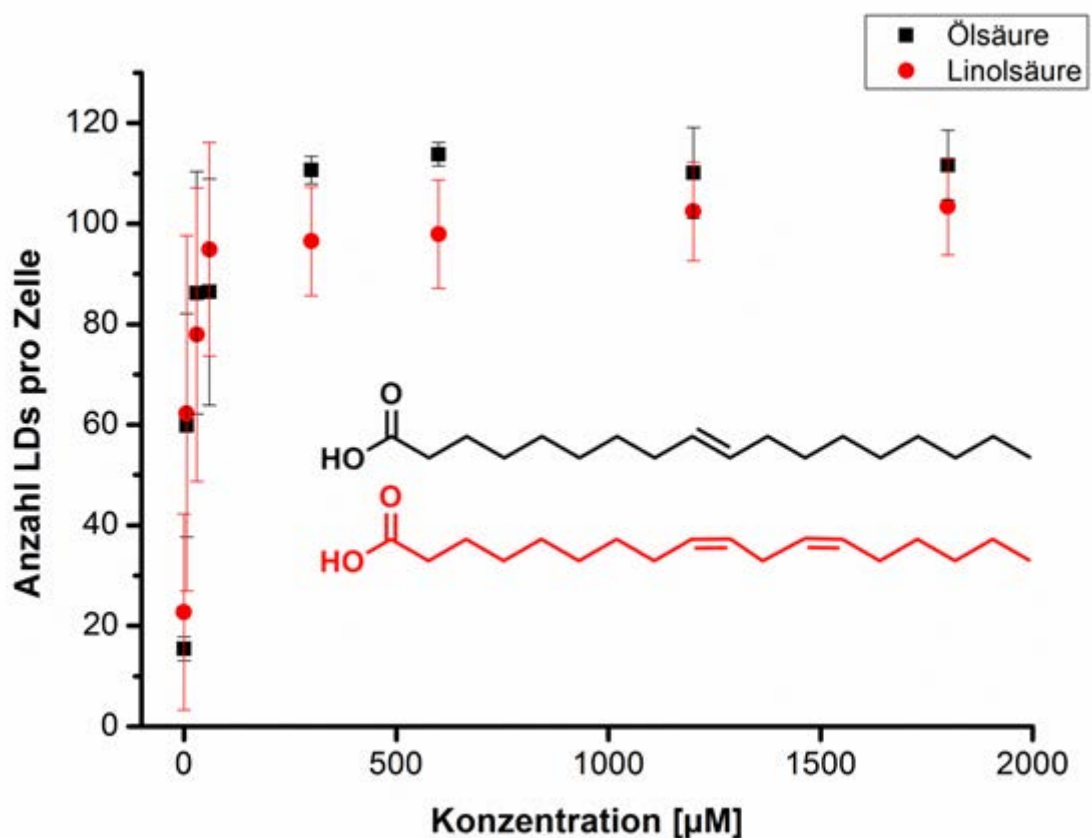


Abbildung 3-13 Durchschnittliche Anzahl der intrazellulär detektierbaren LDs in einzelnen HeLa-S3-Zellen in Abhängigkeit der gefütterten Fettsäuremenge und Fettsäureart.

Es fällt zudem auf, dass diese maximale Anzahl an detektierbaren LDs schon bei relativ geringen Konzentrationen an zugegebener Fettsäure erreicht wird. Unabhängig von der Fettsäure wird diese Anzahl bereits ab einer Fettsäurekonzentration von ca. 100  $\mu\text{M}$  erreicht. Danach steigt die Anzahl an LDs nicht mehr entscheidend an.

Eine mögliche Erklärung für diesen Grenzwert könnte darin liegen, dass die Zelle nur über eine limitierende Menge an Phospholipiden verfügt und dass diese wichtigen Membranbausteine nicht ausreichen, um eine noch größere Menge an LDs generieren zu können. Zwar könnte diese Limitierung durch Generierung von großen LDs kompensiert werden, dazu scheinen die HeLa-S3-Zellen im Gegensatz zu anderen Zellen (siehe Kapitel 3.2.4) aber nicht in der Lage zu sein. So ist es bei diesen induzierten LDs in HeLa S3-Zellen so, dass es zu keiner nennenswerten Größenvariation der LDs kommt. Vielmehr erscheinen alle LDs gleich groß und besitzen einen Durchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$ .

Neben der Vielzahl an cytosolischen LDs konnten erstaunlicherweise auch sehr oft 1-3 LDs detektiert werden, welche scheinbar im Zellkern lokalisiert sind, was durch 3D-Rendering bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 3-14). Das Vorkommen derartiger LDs wurde mittlerweile auch von zwei anderen Forschungsgruppen gezeigt [194, 195].

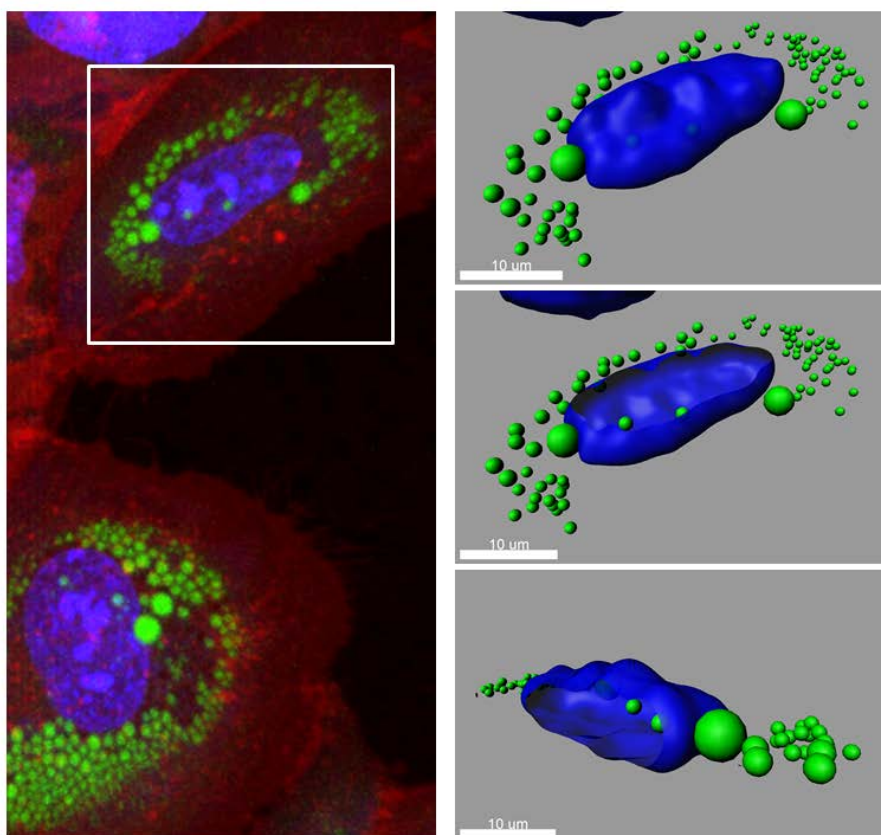


Abbildung 3-14 LDs können auch im Zellkern auftreten. Hier gezeigt bei mesenchymalen Stammzellen, welche sich in der adipogenen Differenzierung befinden.

### **3.2.2 Analyse der intrazellulären LD-Mobilität in zweidimensionaler Zellkultur**

Neben der allgemeinen Fähigkeit von LDs, Lipide in ihrem Inneren abzuspeichern, ist es von eminenter Bedeutung, diese Depots den verschiedenen Regionen des Körpers zur Verfügung stellen zu können. Auch innerhalb der Zelle spielt dies eine große Rolle, da je nach Situation an unterschiedlichen Stellen der Zelle Bedarf an Lipiden bestehen kann, sei es für die Neusynthese von Membranen oder als genereller Energiebedarf. Um dies zu erreichen, sind die LDs nicht als fixe, starre Organellen angelegt. Vielmehr unterliegen sie, wie auch die meisten anderen intrazellulären Organellen, einer stetigen Mobilität und werden kontinuierlich über das Aktin- bzw. Mikrotubuligerüst der Zelle transportiert, sei es nun direkt als eigenständiges Organell oder stets in Assoziation mit dem ER. Die Notwendigkeit eines solchen aktiven Transports liegt darin begründet, dass der intrazelluläre Raum zu dicht gepackt ist, als dass reine Diffusionsprozesse effizient genug wären, um solche makromolekularen Komponenten innerhalb der Zelle verteilen zu können. Demzufolge ist die Zelle darauf angewiesen, aktiv für einen effizienteren Transport der Organellen zu sorgen, wofür molekulare Motorproteine, namentlich Dyneine und Kinesine eingesetzt werden.

Zu einem besseren Verständnis der eigentlichen aktiven Transportvorgänge ist eine hohe zeitliche Auflösung unabdingbar. Eine Notwendigkeit, welche gleichzeitig die Anwendbarkeit von externen fluoreszierenden Farbstoffen einschränkt, da diese wie bereits erwähnt über die Zeit ein unvermeidliches Bleichverhalten aufweisen. Aus diesem Grund und weil der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen zu einer Herabsetzung der LD-Mobilität führen kann (siehe Kapitel 3.1), ist auch hier der Einsatz der CARS-Mikroskopie von Vorteil.

Für die Messungen wurden erneut HeLa S3-Zellen verwendet. In diesem Fall wurden die Zellen jedoch nicht zusätzlich mit Oleinsäure gefüttert, da eine erhöhte Akkumulation an intrazellulären LDs in diesem Fall nicht erforderlich war. Vielmehr würde eine zu hohe Anzahl an nah beieinander liegenden LDs die genaue Analyse eher behindern. Aus diesem Grund wurden die Zellen ohne weitere Behandlung in Mikroskopieschalen mit Glasboden eingesät und nach zwei- bis dreitägiger Wachstumsphase mikroskopiert. Ein einfaches Experiment zum Nachweis, dass es sich bei den beobachtbaren intrazellulären Bewegungsvorgängen der LDs wirklich um einen aktiven Transport entlang des Tubulinnetzwerkes der Zelle handelt, besteht darin, die Polymerisation der Tubulinstränge zu inhibieren. Dies konnte durch Zugabe von Nocodazol zum Kulturmedium erreicht werden. Ein Vergleich der Mobilität der LDs mit und ohne Nocodazol zeigt dabei eindeutig, dass es durch Einschränkung des Tubulinnetzwerkes in der Tat zu einer starken Verringerung der LD-Dynamik kommt (siehe Abbildung 3-15).

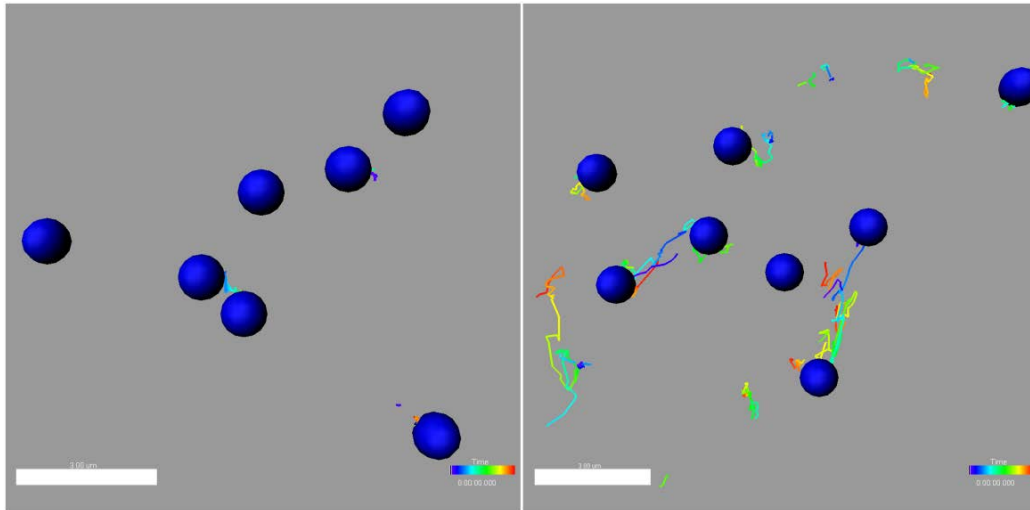


Abbildung 3-15 Herabsetzung der LD-Mobilität durch 45minütige Nocodazolinkubation ( $50 \mu\text{M}$ ). Rechts: Kontrolle; Links: nach Nocodazol-Zugabe. Scale bar:  $3 \mu\text{m}$ .

In Zahlenwerten manifestiert sich diese Bewegungseinschränkung darin, dass sowohl die messbare Maximalgeschwindigkeit als auch die Verschiebungslänge der Trajektorien stark herabgesetzt wird (siehe Abbildung 3-16).

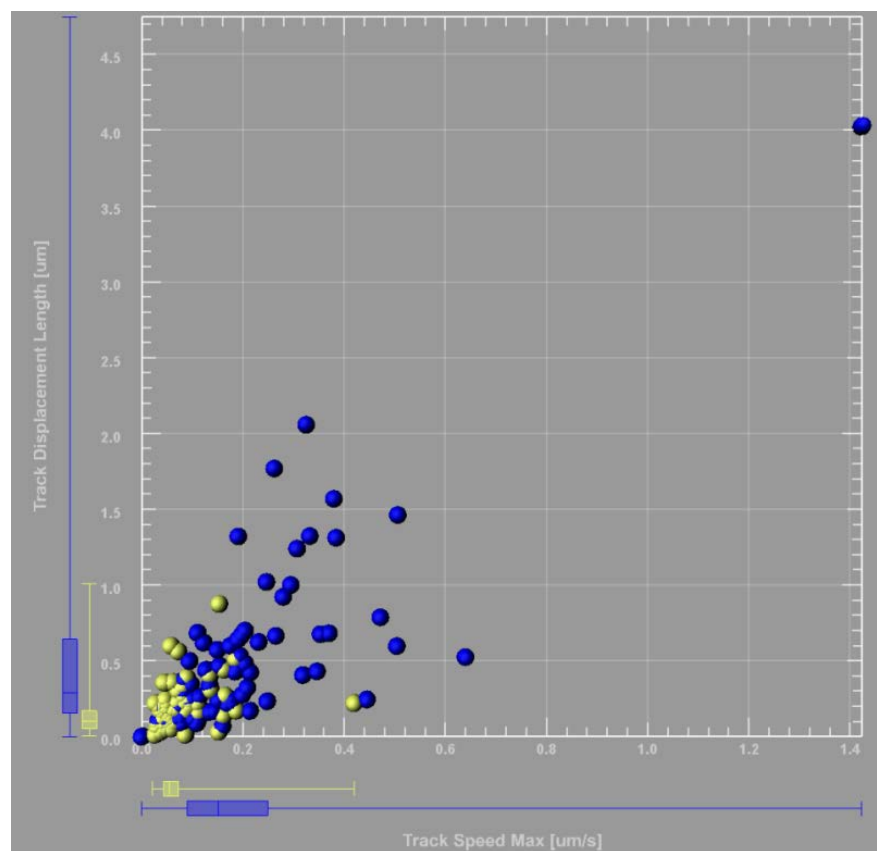


Abbildung 3-16 Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit sowie der Verschiebungslänge von LDs in HeLa S3-Zellen, die entweder mit Nocodazol behandelt wurden (gelb) oder unbehandelt waren (blau).

So konnten in der Kontrolle Geschwindigkeiten bis hin zu  $1,4 \mu\text{m/s}$  gemessen werden, wohingegen in den Zellen, die mit Nocodazol inkubiert wurden, die messbare Maximalgeschwindigkeit lediglich  $0,4 \mu\text{s/s}$  betrug. Auch die maximale Verschiebungslänge verringerte sich von mehr als  $4 \mu\text{m}$  auf knapp  $1 \mu\text{m}$ . Insbesondere diese Maximalwerte sind in den beiden Proben sehr unterschiedlich, während die Mittelwerte dieser beiden Parameter gar nicht so weit auseinander liegen, was damit zusammenhängt, dass es auch in der Kontrolle immer eine große Zahl an LDs gibt, welche während der Messzeit keine aktive Bewegung aufweisen, da sie zu dieser Zeit schlicht keine Interaktion mit dem Tubulinnetzwerk eingegangen sind.

Wie bereits erwähnt ist zur genauen Bewegungsanalyse eine hohe zeitliche Auflösung erforderlich, um eine wirkliche Aussage über die Mobilität von LDs treffen zu können. Dies liegt darin begründet, dass man eben keinen kontinuierlichen aktiven Transport dieser Organellen erwarten kann, sondern dass die LDs vielmehr die meiste Zeit passiv durch das Cytoplasma diffundieren und nur gelegentlich wirklich aktiv über das Tubulingerüst transportiert werden. Nach einem solchen Transport kann sich das entsprechende LD dann wieder von dem Tubulinstrang ablösen und somit erneut ein rein diffusives Verhalten aufweisen. Bei einer geringen zeitlichen Auflösung könnte man ein solch alternierendes Bewegungsverhalten unter Umständen übersehen. Des Weiteren kann es bei dem aktiven Transport zu abrupten Richtungswechseln kommen, da die Tubulinstränge eine Krümmung aufweisen können oder es zu einem Wechsel von einem Tubulinstrang zu einem anderen kommt. Es kann sogar so weit kommen, dass sich das LD auf einem einzelnen Tubulinstrang mehrmals hin- und herbewegt. Ein solches bidirektionales Bewegungsmuster kann sogar sehr oft beobachtet werden und es wird postuliert, dass dies durch konkurrierende Wechselwirkungen mit den beteiligten Motorproteinen hervorgerufen wird. Man könnte in diesem Zusammenhang auch von einem molekularen Tauziehen sprechen, wobei dieser Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt ist und auch teilweise in Frage gestellt wird [129, 196].

Aus den zuvor erwähnten Gründen kann es also zu einem heterogenen Verhalten einer einzelnen gemessenen Trajektorie kommen, welches umso besser analysiert werden kann, je höher die zeitliche Auflösung ist. Aus diesem Grund wurde eine Bildaufnahmerate von 20 Hz gewählt. Die genaue Bestimmung der aktiven Transportvorgänge erfolgte dann über die Analyse der gemessenen Trajektorien, also den Spuren der zurückgelegten Strecken einzelner LDs. Die so gewonnenen einzelnen Trajektorien wurden dann aber nicht einfach direkt zur Geschwindigkeitsbestimmung verwendet, sondern aus oben genannten Gründen zunächst segmentiert, also in Bereiche mit aktiver und passiver Bewegung unterteilt.

Diese Segmentierung konnte durch ein von Ralf Bausinger in unserer Arbeitsgruppe geschriebenes Programm in automatisierter Form durchgeführt werden. An dieser Stelle sollte aber zumindest erwähnt werden, dass in einer neueren Publikation eindrucksvoll gezeigt werden konnte, dass eine solche Segmentierung, welche trotz der teilweisen Automatisierung sehr zeitaufwändig ist, mit Hilfe der FPP-Methode (First-passage-probability) umgangen werden kann [121]. Die Zuhilfenahme dieses Ansatzes ermöglichte dabei eine vergleichbar quantitative Analyse der Bewegung von LDs.

Die hier durchgeführte Bewegungsanalyse beruht jedoch auf der Zerlegung der Trajektorien in Einzelsegmente, von welchen dann das sogenannte mittlere Verschiebungsquadrat (MSD) berechnet wurde [197-199]. Dabei wird das Ausbreitungsmuster der LDs mathematisch analysiert, also in welcher räumlichen Beziehung der aktuelle lokalisierte Aufenthaltsort eines LDs zu einem zuvor bestimmten Aufenthaltsort steht. Setzt man nun dieses Verschiebungsquadrat in Relation zu der verstrichenen Zeit, die nötig war, um die jeweilige Verschiebung zu erreichen, erhält man je nach Bewegungsart eine unterschiedliche mathematische Abhängigkeit (siehe Abbildung 3-17). Bei einem rein diffusiven Verhalten kommt es dabei z.B. zu einer linearen Abhängigkeit, während es bei einem aktiven Transportvorgang zu einem quadratischen Anstieg kommt.

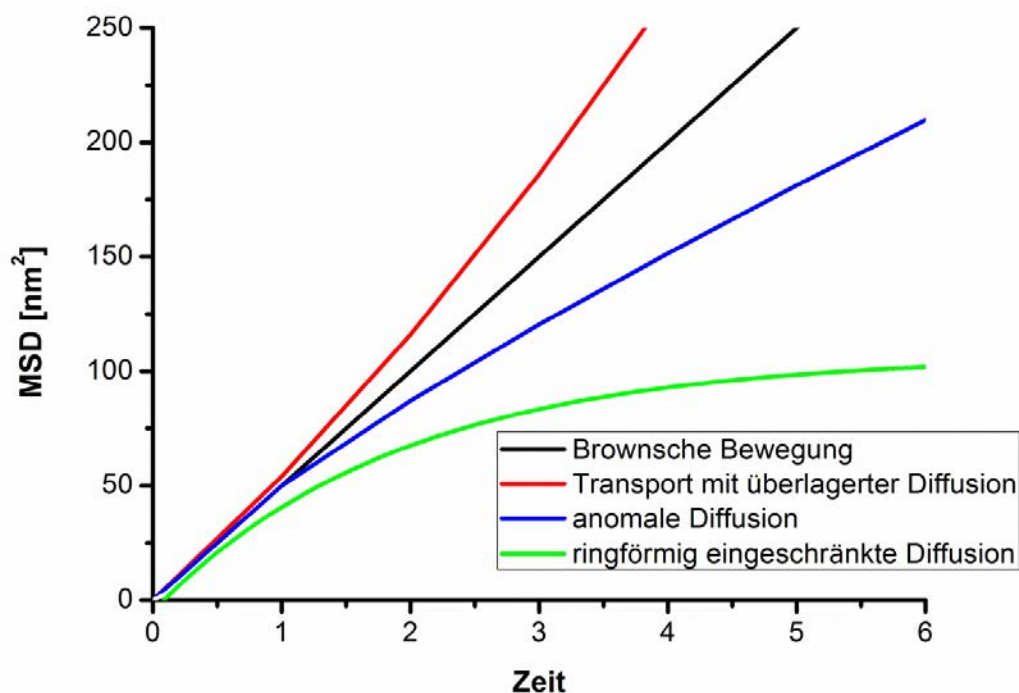


Abbildung 3-17 Verläufe des mittleren Verschiebungsquadrates (MSDs) für verschiedene Bewegungsformen.

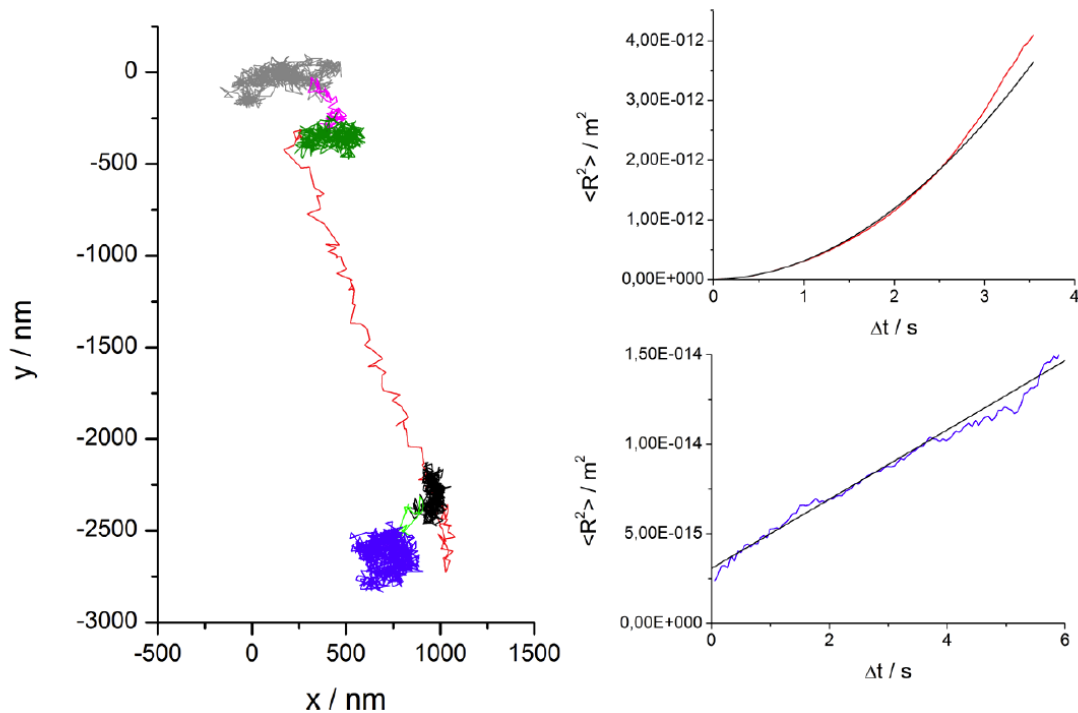


Abbildung 3-18 Eine beispielhafte Trajektorie einer LD-Bewegung mit verschiedenen segmentierten Bewegungsprofilen. Die aktiven Geschwindigkeiten liegen hier bei 49 nm/s, 86 nm/s und 531 nm/s (Diese Abbildung wurde bereits publiziert [170]; mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co KGaA).

In Abbildung 3-18 ist eine beispielhafte Trajektorie aufgezeigt, an welcher sich das angesprochene heterogene Bewegungsverhalten von LDs veranschaulichen lässt. So sieht man in der gezeigten Trajektorie eindrücklich, dass es zu einem ständigen Wechsel zwischen diffusiver und aktiver Bewegung sowie zu starken Richtungsänderungen kommt. Zudem fällt auf, dass die größte aktive Bewegung, welche rot markiert ist, zwar die größte Wegstrecke zurück legt, gleichzeitig aber nur über relativ wenige Zeitpunkte stattfindet. Demgegenüber stehen verhältnismäßig lange Diffusionsperioden, bei welchen nur eine sehr geringe räumliche Ausbreitung zu sehen ist. Außerdem sieht man, dass es zu einem Richtungswechsel bei der längsten aktiven Bewegung (in rot) kommt und dass das LD dabei scheinbar auf demselben Tubulinstrang wieder zurück transportiert wird.

In Abbildung 3-19 sind schließlich die ermittelten Geschwindigkeiten aller Segmente der gemessenen Trajektorien dargestellt. Wie bereits in der Box-Plot-Darstellung aus Abbildung 3-16, bei welcher nur eine einzelne Messung ausgewertet wurde, ist auch bei den aufsummierten Werten zu sehen, dass sich der Großteil der gemessenen Geschwindigkeiten in einem Bereich von ca. 50-250 nm/s mit einem arithmetischen Mittel von 149,7 nm/s bewegt. Auch andere Studien, welche sich mit dem Transport von LDs in lebenden Zellen beschäftigten [25] [72] [181, 200], kommen zu vergleichbaren Resultaten.

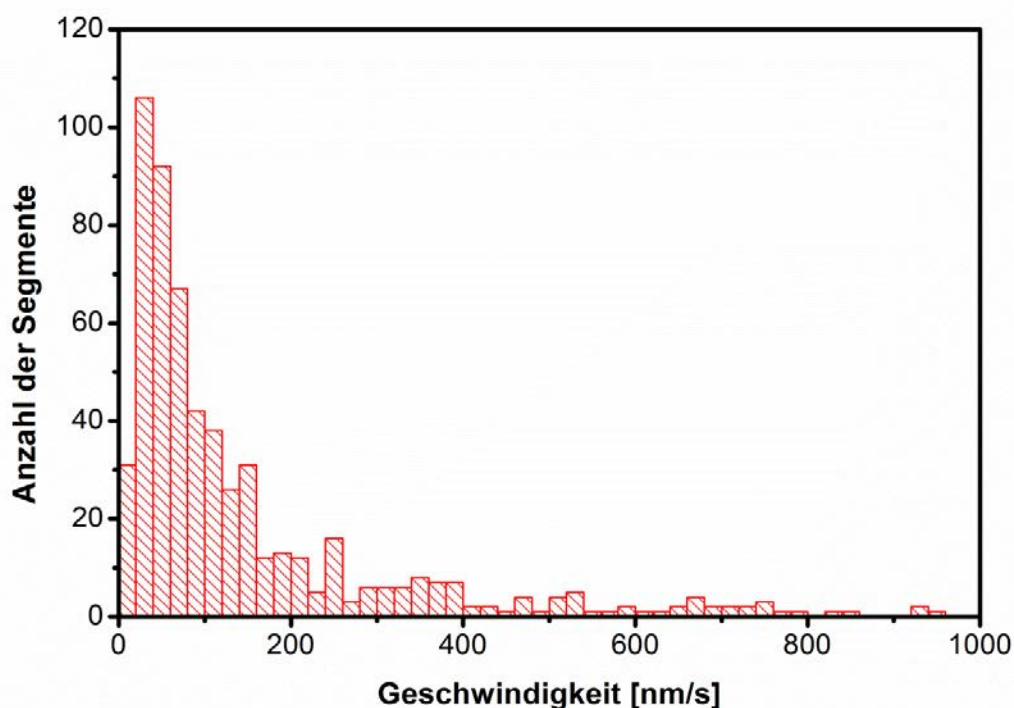


Abbildung 3-19 Verteilung der Geschwindigkeiten von allen gemessenen aktiven Transportvorgängen von LDs in HeLa S3-Zellen (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [170]; mit freundlicher Genehmigung vom Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co KGaA).

Obwohl insgesamt mehr als 1000 Segmente analysiert wurden, von welchen wiederum 583 Segmente eine aktive Bewegung darstellten, gibt es nur eine relativ geringe Anzahl an Segmenten, welche eine sehr viel größere Geschwindigkeit bis zu ca.  $1 \mu\text{m/s}$  besitzen. Dies steht in starkem Kontrast zu dem aktiven Transport von z.B. Endosomen, bei welchem Geschwindigkeiten bis hin zu  $2,5 \mu\text{m/s}$  gefunden wurden [201]. Dies könnte damit zusammenhängen, dass LDs sehr formstabil sind, wohingegen Endosomen sich durch Deformationen während dem Transport flexibel an das dichte Cytoskelett-Gerüst anpassen können. Zumindest konnten in unserer Arbeitsgruppe Formveränderungen von Endosomen während aktiven Transportprozessen häufig beobachtet werden, bei welchen einzelne Endosomen in die Länge gezogen werden.

Erwähnt werden sollte jedoch abschließend auch noch, dass neben der CARS-Mikroskopie auch andere markierungsfreie Techniken zur Verfolgung der LD-Dynamik eingesetzt werden können und auch in anderen Arbeiten bereits eingesetzt wurden. So wurde das Transportverhalten von LDs bereits mit Hilfe der DIC-Mikroskopie untersucht [200], wobei hier natürlich der direkte Nachweis fehlt, dass es sich auch wirklich um LDs handelt. Auch die Verwendung der THG-Mikroskopie kam bereits zum Einsatz [202], wobei auch hier die molekulare Selektivität nicht gegeben ist. Erste Arbeiten, die LD Dynamik mit CARS zu verfolgen gibt es zwar auch schon, wurden bisher aber nur mit relativ geringer

Zeitauflösung gezeigt [203]. Ein eindrucksvolles Beispiel für den Einsatz einer markierungsfreien Technik zur Bewegungsanalyse ist zudem die Beobachtung der LD-Dynamik mit Hilfe der SRS-Mikroskopie in Fruchtfliegenembryos [204].

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse sind im Rahmen einer Publikation bereits veröffentlicht worden [170].

### **3.2.3 Analyse der intrazellulären LD-Mobilität in dreidimensionaler Zellkultur**

Die Kultivierung von Zellen und deren mikroskopische Untersuchung gehört inzwischen zu den Standardmethoden der Biologie und ist sehr etabliert. Meistens werden dabei die adhärenen Eigenschaften von Kulturflaschen bzw. Mikroskopieschälchen ausgenutzt, um die Zellen daran anheften zu lassen. Dabei kommt es zu einer Bindung zwischen der Oberfläche und den Zellen, welche so stark ist, dass die Zellen bei eventuellen Waschschrritten und dem regelmäßig stattfindenden Mediumaustausch nicht weggespült werden. Andererseits ist es den Zellen aber noch möglich, auf der Oberfläche zu migrieren. Diese Kultivierungsart ist wohl die am häufigsten verwendete Methode und kann bei nahezu allen Zellarten angewendet werden, mit Ausnahme von solchen Zellen, die nicht adhären sind und daher in Suspension gehalten werden müssen.

Obwohl diese zweidimensionale Kultivierung eine Reihe von Vorteilen mit sich bringt, sollte man dabei doch bedenken, dass es sich hierbei um ein Modell handelt, das in dieser Art sicher nicht *in vivo* vorkommt. Vielmehr wachsen Zellen in einem menschlichen Körper oder einem sonstigen Organismus in einer dreidimensionalen Struktur, das heißt, die Interaktionsfläche zwischen einzelnen Zellen ist wesentlich größer und die Zellen weisen zudem eher eine sphärische Struktur auf. Im Gegensatz dazu werden die Zellen auf einer zweidimensionalen Oberfläche dazu gezwungen, sich in extremer Weise auf dem Boden auszubreiten. Neben ihrer unnatürlichen Form müssen die Zellen auf einer zweidimensionalen Oberfläche zudem auch noch mit einer extrem herabgesetzten Elastizität zu Recht kommen [205]. So ist die natürliche Zellumgebung rund 100.000fach elastischer als sie in üblichen Zellkulturbedingungen erreicht werden kann<sup>2</sup>. Diese herabgesetzte Elastizität lässt sich umgehen, indem man spezielle Oberflächen verwendet, welche exakt der natürlichen Elastizität in natürlicher Zellumgebung entsprechen. Ein anderer Ansatz, welcher zudem auch den anderen genannten Nachteil, die nicht natürliche Form der Zellen, umgeht, besteht in dem Einsatz von dreidimensionalen Zellkulturen. Bei dieser Methodik kreierte man gewebeähnliche Strukturen, indem man die Zellen in einer dreidimensionalen Struktur wachsen lässt. Dies

---

<sup>2</sup> Produktinfo der Firma Ibidi zu ihrem Produkt  $\mu$ -Dish, ESS (Elastically Supported Surface), entnommen von [www.ibidi.de](http://www.ibidi.de) im September 2012

kann dadurch erreicht werden, dass man eine künstliche Matrix erschafft, in welcher die Zellen proliferieren können. Etabliert hat sich in diesem Zusammenhang besonders der Einsatz von sogenannten Hydrogelen. Dabei wird die Zellsuspension mit dem Hydrogel vermischt und dann in einer künstlichen Gussform auspolymerisiert, so dass sich die Zellen in sämtliche Ebenen ausbreiten können. Um die Proliferation und Migration der Zellen dabei nicht einzuschränken, kann man ein solches Hydrogel dergestalt erzeugen, dass die Zellen in der Lage sind, dieses teilweise zu verdauen und sich so einen Weg durch das Gel zu bahnen.

Eine weitere, immer häufiger eingesetzte Methode ist die so genannte Hanging-Drop-Methode, welche über den Vorteil verfügt, dass sie ganz ohne invasive Zusätze auskommt. Die dreidimensionale gewebebildende Struktur wird dabei allein durch die Gravitationskraft erzeugt und zwar dadurch, dass man die Zellsuspension als hängenden Tropfen kultiviert. Dadurch sammeln sich die Zellen am Boden des Tropfens und strukturieren sich aufgrund der dort vorhandenen Krümmung selbstständig zu einer spheroidalen Struktur (siehe Abbildung 3-20).

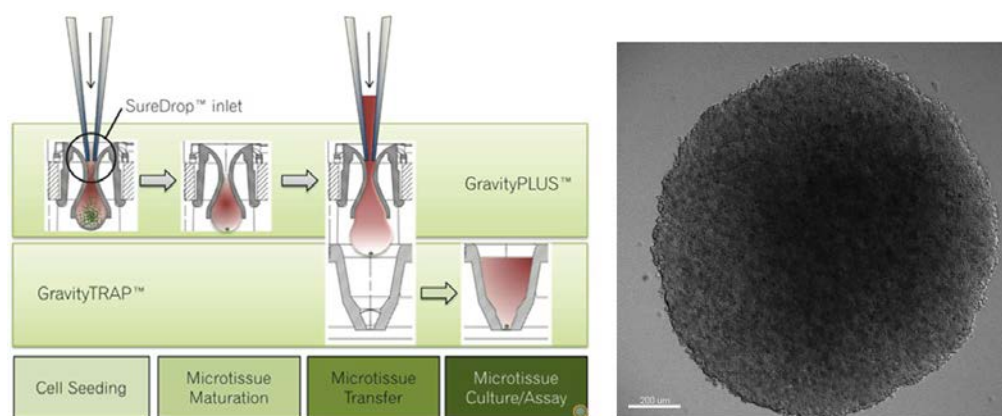


Abbildung 3-20 Prinzip der Hanging-Drop-Methode<sup>3</sup> und selbst generierter Spheroïd aus HeLa S3-Zellen (Scalebar: 200 µm).

Eine interessante Fragestellung wäre nun, ob sich das intrazelluläre Transportverhalten in einer solchen dreidimensionalen Kultur von dem im vorherigen Kapitel untersuchten Verhalten in normaler adhärenter Kultur unterscheidet. Abgesehen davon, dass sich dabei LDs natürlich deutlich mehr entlang der z-Achse bewegen sollten, wäre es auch denkbar, dass sich andere Geschwindigkeitsprofile ergeben, da die Bewegung vielleicht nicht mehr so stark durch die Zellmembran beeinflusst wird.

So stehen die meisten LDs in zweidimensionaler Zellkultur vermutlich so gut wie permanent in direktem Kontakt mit der Zellmembran, weil die Zelle sich sehr flach auf der

<sup>3</sup> Schema entnommen von <http://www.insphero.com> im November 2012

Oberfläche ausbreitet. In dreidimensionaler Zellkultur befänden sich hingegen sehr viel mehr LDs in der Mitte der Zelle und somit nicht mehr in direkter Nähe zur Zellmembran. Auch das Cytoskelett könnte in dreidimensionaler Kultur einen anderen Einfluss auf die Beweglichkeit der LDs haben als in adhärenter Kultur.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden mit Hilfe der Hanging-Drop-Methode große spheroidale Strukturen aus HeLa S3-Zellen erzeugt. Nach wenigen Tagen wurden diese dann geerntet und in ein Mikroskopierschälchen mit Glasboden überführt. Darin wurden die Zellen dann noch einmal für mehrere Stunden oder über Nacht inkubiert, um eine partielle Anheftung des gesamten Spheroids an die Oberfläche zu erreichen, da die unterste Zellschicht des Spheroids zu adhären beginnt. Dies war von Vorteil, da sich ansonsten der Spheroid während der Messung auch als Ganzes bewegen kann, was die anschließende Bewegungsanalyse der LDs erschwert. Anschließend wurden CARS-Messungen an dem Spheroiden durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass auch in diesem Fall bereits eine ausreichend große Menge an LDs in den einzelnen Zellen vorhanden war (siehe Abbildung 3-21), so dass auch hier eine Inkubation mit Oleinsäure nicht erforderlich war.

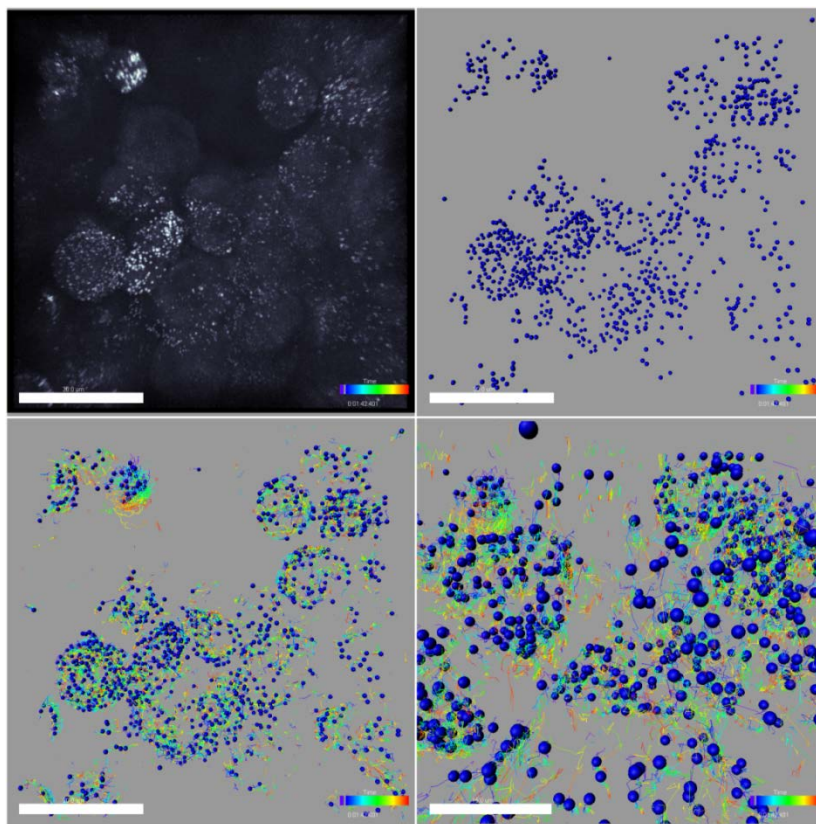


Abbildung 3-21 Visualisierung und dreidimensionale Bewegungsanalyse von LDs in einem HeLa-Spheroid mit Hilfe der CARS-Mikroskopie. Scale bar 30  $\mu\text{m}$ . Rechts unten: Vergrößerte und gedrehte Ansicht, Scale bar: 15  $\mu\text{m}$ .

Aufgrund der Streuung des Laserlichts wegen der Größe des Gebildes und der Vielzahl der Zellen war es jedoch nur möglich, die untersten zwei bis drei Zellschichten abzubilden. An diesen Zellen konnten dann aber wie im vorherigen Kapitel Trajektorien der LDs aufgenommen werden, wobei hierbei die zeitliche Auflösung etwas eingeschränkt war, weil zusätzlich z-stacks aufgenommen werden mussten, um eine dreidimensionale Analyse zu ermöglichen.

Wie schon bei der Analyse der zweidimensionalen Transportvorgänge wurde auch in diesem Fall die LD-Mobilität hinsichtlich der maximalen Geschwindigkeit sowie der Verschiebungslänge analysiert. Dabei konnte jedoch kein nennenswerter Unterschied zum Bewegungsverhalten in zweidimensionaler Zellkultur festgestellt werden (siehe Abbildung 3-22).

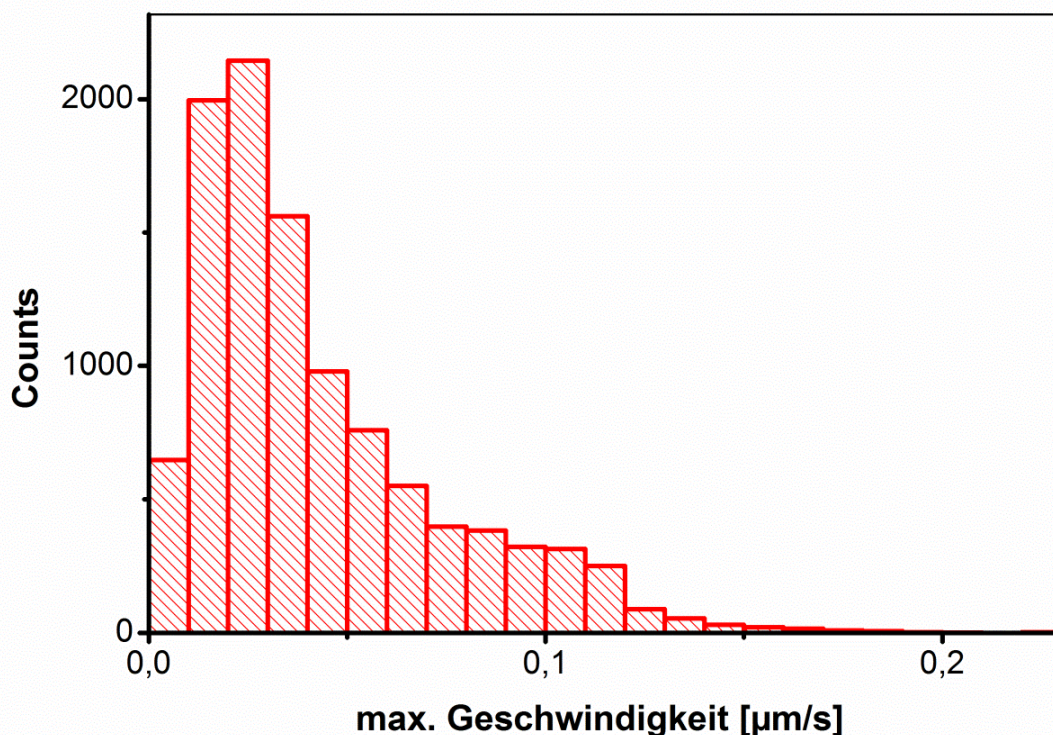


Abbildung 3-22 Verteilung der maximalen Geschwindigkeiten von LDs in einer dreidimensionalen Zellkultur.

### **3.2.4 LD-Wachstum während der Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen**

In den vorherigen Kapiteln wurde die Dynamik der LDs an der gängigen HeLa S3-Zelllinie untersucht. Messungen mit dieser Zelllinie gestalten sich aufgrund ihrer Robustheit und Pflegeleichtigkeit als einfach, sind dafür aber nur als sehr rudimentäres Zellmodell anzusehen. Die Lipogenese sowie das allgemeine intrazelluläre Transportverhalten von LDs ließ sich zwar sehr gut an dieser Zelllinie verfolgen und entspricht sicher auch dem Verhalten in anderen Zellarten. Andere wichtige Fragestellungen in der Lipidforschung konnten aber nicht an diesem einfachen Modell untersucht werden. So ist z.B. die zelluläre Lipidspeicherfähigkeit von großem Interesse. Wie zuvor gezeigt, reagieren HeLa-Zellen zwar auch auf eine übermäßige Lipidzugabe mit der Erzeugung einer größeren Anzahl von LDs (siehe Kapitel 3.2.1), dies geschieht allerdings eher zur Kompensation der sonst toxischen Fettsäuren und nicht zum wirklichen Speichern der Lipide. Es gibt jedoch auch spezialisierte Zellen im Körper, welche fähig sind, große Fettmengen zu speichern, um sie bei Bedarf wieder an den Körper abgeben zu können. Eine solche Zelllinie wäre demnach zur Untersuchung der zellulären Lipidspeicherfähigkeit besser geeignet. Zu diesem Zweck bieten sich Adipozyten an, also Vertreter jener Zellart, welche maßgeblich am Aufbau des Fettgewebes beteiligt ist. Da Adipozyten zwar aus dem Fettgewebe isoliert werden können, sich aber nicht so leicht kultivieren lassen, kann man zur Untersuchung von Adipozyten auf mesenchymale Stammzellen zurückgreifen, die man dann wiederum in die adipogene Richtung ausdifferenzieren kann. Bei einer solchen Differenzierung kommt es zur Umwandlung der Stammzellen in Adipozyten und zu einer damit einhergehenden massiven Anreicherung von intrazellulärem Fett.

Um ein besseres Verständnis für diesen Umwandlungsprozess zu erhalten, ist es von besonderer Bedeutung, diesen wichtigen zellbiologischen Vorgang in seiner kompletten Zeitdauer unter dem Mikroskop verfolgen zu können. Betrachtet man nämlich den Phänotypen der verwendeten mesenchymalen Stammzellen, so fällt sofort auf, dass sich dieser im Laufe der adipogenen Differenzierung drastisch ändert (siehe Abbildung 3-23). Vor Beginn der Differenzierung sind im Cytoplasma der Stammzellen zwar auch schon einige wenige LDs vorhanden, dabei handelt es sich allerdings nur um sehr kleine LDs, vergleichbar solchen, wie sie auch in den meisten anderen Zellarten beobachtet und wie sie auch durch Fettsäurezugabe zumeist angereichert werden können (siehe Kapitel 3.2.1). Im Gegensatz zu einer reinen Akkumulation von vielen kleinen LDs kommt es im Laufe der adipogenen Differenzierung jedoch zu einer Kombination aus Vermehrung und gleichzeitiger Vergrößerung der vorhandenen LDs [206], bis die Zelle schließlich komplett von sehr großen LDs gefüllt ist. Wartet man die komplette Differenzierung ab, besitzt die Zelle sogar nur noch einen einzigen unilokularen LD, die Anzahl der LDs nimmt also zum Ende der Differenzierung wieder ab.

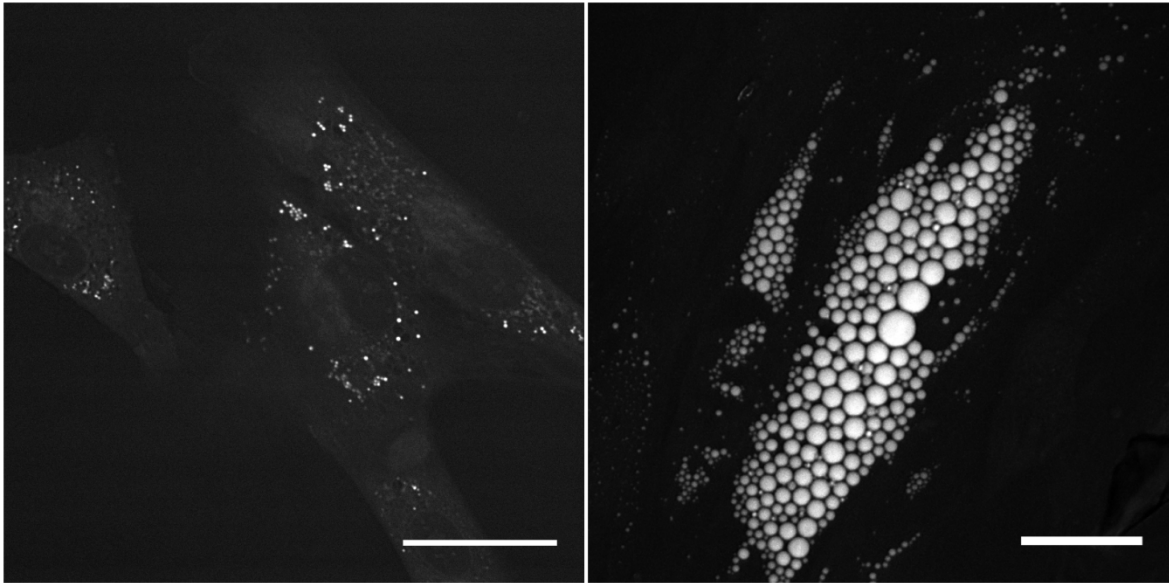


Abbildung 3-23 Visualisierung der LDs in mesenchymalen Stammzellen mittels CARS-Mikroskopie. Links: undifferenzierte Stammzellen mit nur sehr wenigen kleinen LDs. Rechts: In der adipogenen Differenzierung befindliche Stammzellen mit sehr vielen LDs unterschiedlicher Größe, wobei ein Größengradient vom Rand der Zellen zum Zellkern beobachtet werden kann. Scale bar: 30  $\mu\text{m}$  (Die rechte Abbildung wurde bereits publiziert [207]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Eine weitere Auffälligkeit bei der Betrachtung des fortgeschrittenen Stadiums der Differenzierung besteht darin, dass es während dem Reifungsprozess scheinbar zu einem Größengradienten der LDs innerhalb der Zelle kommt, wobei die kleineren LDs eher am äußeren Rand der Zelle aufzufinden sind, wohingegen die größeren LDs häufiger in der Nähe des Zellkerns lokalisiert sind. Dies könnte rein strukturelle Gründe haben, so dass sich die großen LDs einfach deshalb in der Mitte treffen, weil die Zelle dort aufgrund des Zellkerns etwas dicker ist als an der Zellperipherie. Es könnte aber auch so sein, dass die Zelle die älteren, mehr gereiften LDs in ihrer Mitte sammelt, während die kleineren, neu entstehenden LDs eher am Rande der Zelle gebildet werden [118].

In Abbildung 3-24 ist noch einmal die in der adipogenen Differenzierung schon weit fortgeschrittene Zelle aus Abbildung 3-23 zu sehen, wobei in diesem Fall die LDs mit einem Farbkode eingefärbt sind, um den auftretenden Größengradienten besser zu veranschaulichen. So repräsentieren die unterschiedlichen Farben verschiedene Volumina der LDs. Des Weiteren wurden in dieser Abbildung sämtliche detektierten LDs nach ihrer Größe sortiert und gegen deren mittlere Signalintensität aufgetragen, um einen besseren Überblick darüber zu schaffen, wie stark die Größenverteilung der LDs variiert und in welcher Häufigkeit große bzw. kleine LDs in der Zelle vorkommen. Außerdem demonstriert diese Auftragung eine direkte Abhängigkeit des CARS-Signals von der Größe der LDs.

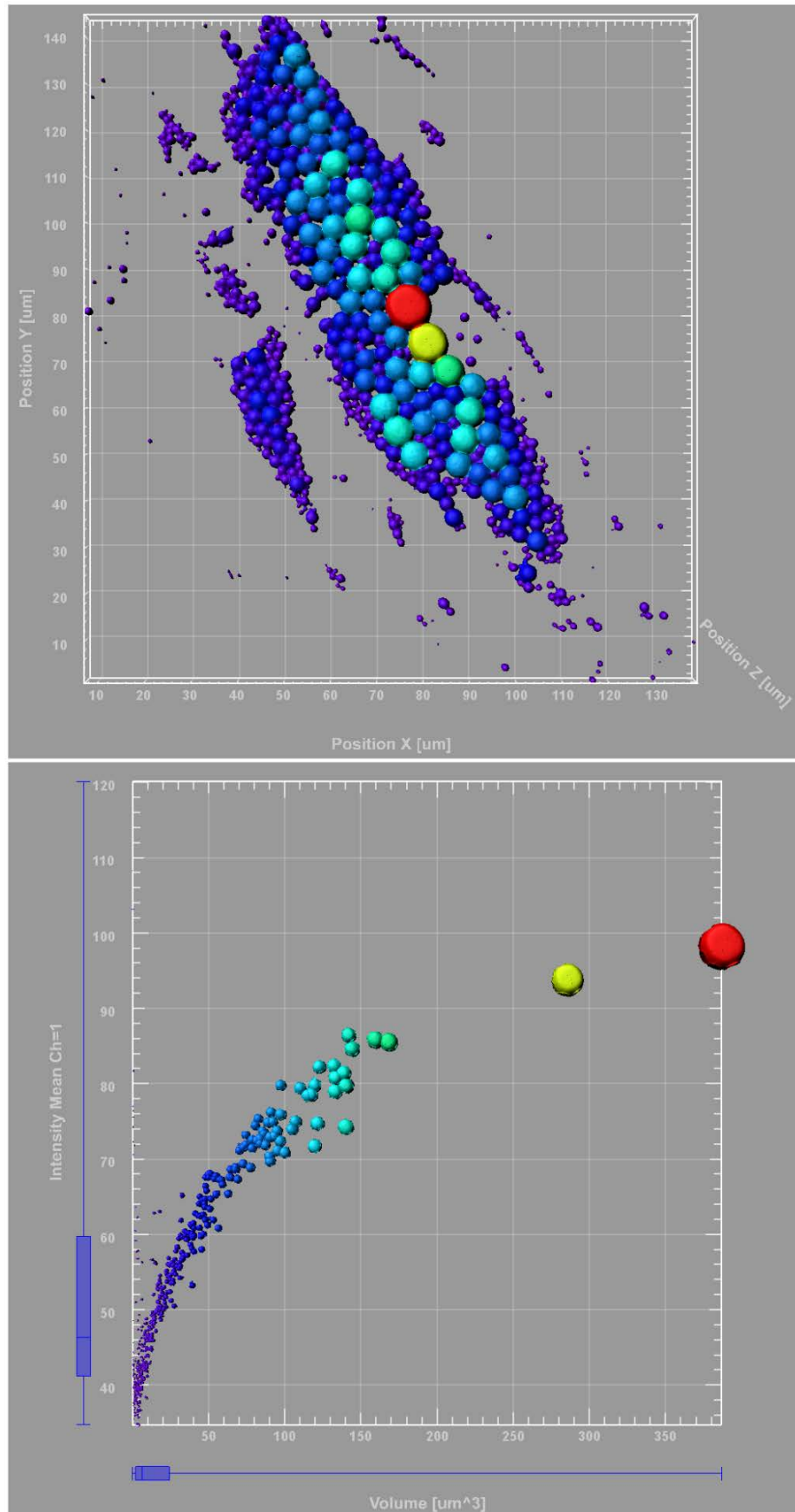


Abbildung 3-24 Oben: Mesenchymale Stammzelle, welche sich in der adipogenen Differenzierung befindet und bei welcher die Einzelvolumina der LDs farbkodiert sind. Unten: Sortierung derselben LDs nach Größe und Auftragung gegen die messbare mittlere Signalintensität.

Diese Intensitätsabhängigkeit lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die z-Auflösung der mikroskopischen Aufnahmen relativ gering ist und das fokale Volumen durch größere Strukturen besser ausgefüllt wird als durch kleinere Objekte. Eine andere Erklärung wäre, dass es während dem Wachstum der LDs zu einer Veränderung des Protein/Lipid-Verhältnisses kommt, bei welcher die effektive Lipidkonzentration zunimmt. Durch Bestimmung der Viskosität innerhalb der LDs (siehe Kapitel 3.4) lässt sich diese Vermutung jedoch weitgehend ausschließen.

Entscheidender ist hier jedoch zunächst die Frage, wie es überhaupt zu einer derartigen Größenvariation der LDs kommt. Diese Fragestellung beschäftigt schon längere Zeit die an dieser Thematik arbeitenden Arbeitsgruppen und die dazu aufgestellten Hypothesen lassen sich wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 2.2.5) grob in drei Mutmaßungen unterteilen, die hier noch einmal kurz zusammengefasst werden sollen. So wurde vermutet, dass sich die Volumenzunahme der einzelnen LDs durch stetigen Einbau von neuen Lipiden in jeden einzelnen LD erklären lässt, was zur Folge hätte, dass die Größe eines LDs in direktem Zusammenhang mit seinem Alter steht [11]. Eine andere prominente These lautete, dass sich die LDs durch untereinander ablaufende instantane Fusionsprozesse vergrößern [9], ein Vorgang, welcher bereits sehr häufig beobachtet werden konnte und welcher auf glaubhafte Weise erklären konnte, auf welche Weise die Anzahl der LDs sich verringerte, während sich das Volumen der LDs gleichzeitig vergrößerte. Allerdings können derartige schnelle Fusionsprozesse bekanntermaßen auch durch den Einsatz von Lösungsmitteln [187] oder wie zuvor gezeigt durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen ausgelöst werden (siehe Kapitel 3.1). Die dritte und letzte Hypothese ging ebenso davon aus, dass ein solcher Lipidtransfer zwischen benachbarten LDs stattfindet, sich dieser aber auf eher längeren Zeitskalen abspielt.

Die Kernfrage lautet also, wie es zu einer solchen drastischen Größenänderung einzelner LDs kommen kann, welche nur in den spezialisierten Zellen bei der adipogenen Differenzierung, nicht aber bei der zuvor beschriebenen LD-Induktion in HeLa S3-Zellen (siehe Kapitel 3.2.1) vorkommt. Da es zur Beantwortung dieser Frage nicht ausreicht, sich die stationären mikroskopischen Aufnahmen zu Beginn und Ende der Differenzierung anzusehen, sollte die adipogene Differenzierung in ihrer gesamten Dauer verfolgt werden. Dazu sollte ein *in vitro*-System etabliert werden, bei welchem man die Entwicklung einzelner Zellen über mehrere Stunden bis hin zu mehreren Tage verfolgen kann. Um dieses künstliche System so wenig wie möglich zu beeinflussen, bietet sich auch in diesem Fall die Anwendung der CARS-Mikroskopie an. In diesem Fall kam dabei ausschließlich ein CARS-Aufbau zum Einsatz, welcher neben dem kommerziellen konfokalen Mikroskop aus neuartigen Faserlasern besteht, welche den großen Vorteil bieten, dass sie zum Einen einfach in der Bedienung sind und zum Anderen über eine große Stabilität verfügen.

Als zu untersuchendes Testsystem wurden menschliche mesenchymale Zellen gewählt, welche als Abfallprodukt aus Fettabsaugungen gewonnen wurden (Adipose derived stem cells, ADSCs).

Für die Ermöglichung der Mikroskopie wurden die Zellen in kleinen Petrischalen eingesät, welche über einen Glasboden mit Deckglasstärke verfügen und zudem mit kleinen Inserts ausgestattet sind, so dass es möglich ist, eine sehr kleine Anzahl an Zellen bei gleichzeitiger Verwendung von einer sehr großen Menge an Kulturmedium auszusäen, wodurch die ansonsten unvermeidliche Notwendigkeit, das Medium regelmäßig wechseln zu müssen, entfällt (siehe Abbildung 3-25).

Durch den Einsatz einer Lebendzellinkubationskammer, welche auf das konfokale Mikroskop aufgesetzt werden kann, war es dann schließlich möglich, den adipogenen Differenzierungsprozess über mehrere Stunden und sogar über mehrere Tage an einer ausgewählten Stelle zu verfolgen, ohne dass vor oder während der Messung in die Probe invasiv eingegriffen werden musste.



Abbildung 3-25 Die mesenchymalen Stammzellen wurden in ein Insert eingesät, welches zuvor in eine Petrischale mit Glasboden platziert wurde (Bild: [www.ibidi.de](http://www.ibidi.de)). Die Petrischale wurde dann auf das Mikroskop gelegt, wobei die Zellen während der Langzeitmessung von einer Heizkammer (Bild: [www.tokaihit.com](http://www.tokaihit.com)) kontinuierlich bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten wurden.

Die aufschlussreichsten Ergebnisse konnten dabei erzielt werden, wenn man die Langzeitmessungen zu einem Zeitpunkt startet, bei welchem die Zellen bereits einige Tage im Differenzierungsmedium inkubiert waren. Durch diese Vorinkubationsphase, die in den meisten Fällen vier Tage betrug, ist bereits eine gewisse Menge an kleineren LDs in jeder Zelle vorhanden, deren Entwicklung über die Zeit verfolgt werden kann. Auf diese Weise konnte erstmalig in einem CARS-3D-Langzeitlebendzellexperiment visualisiert werden, wie sich der intrazelluläre Lipidgehalt während der adipogenen Differenzierung verändert. Dabei kommt es zu einer massiven Zunahme der Anzahl an detektierbaren LDs (siehe Abbildung 3-26).

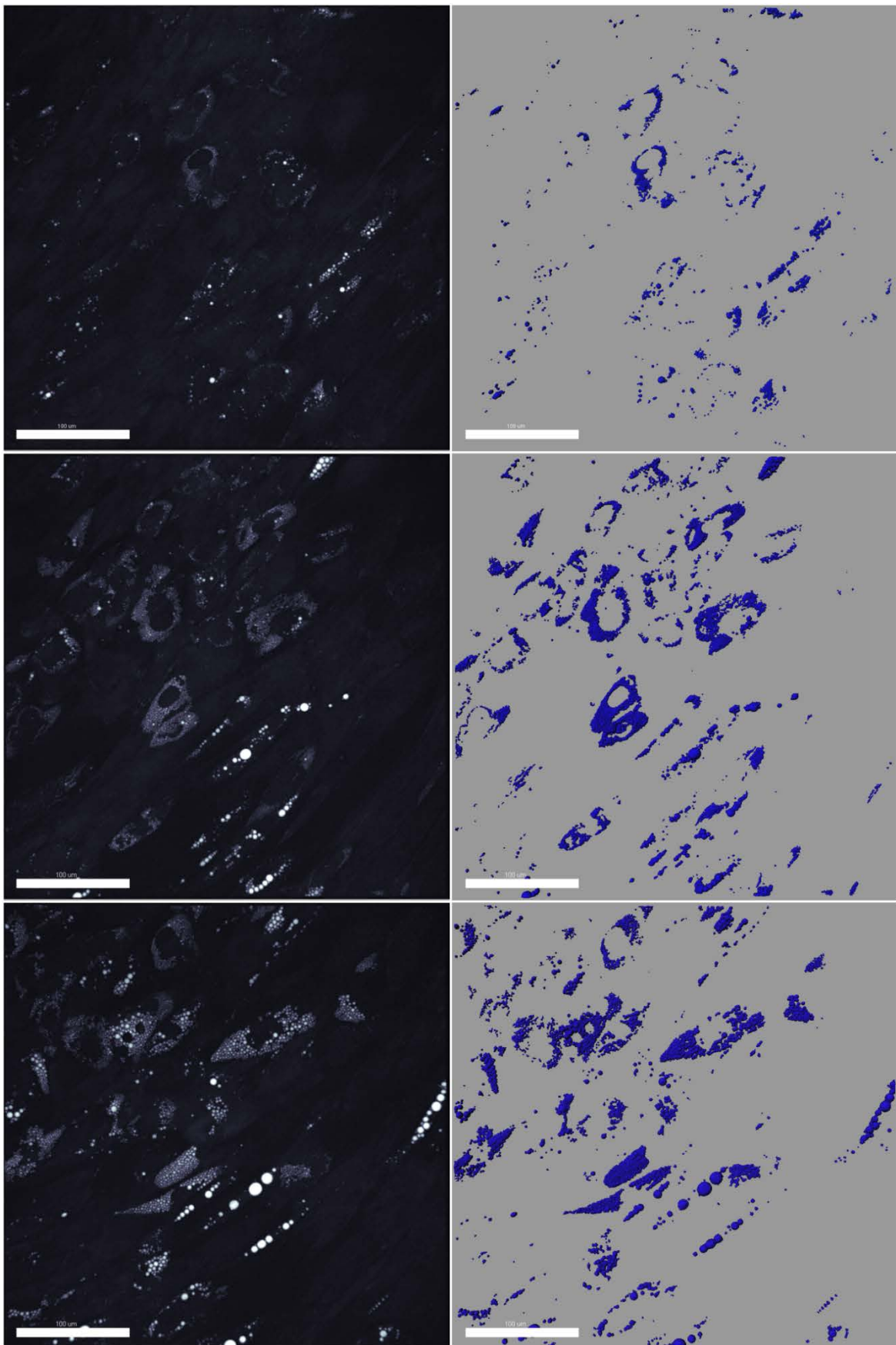


Abbildung 3-26 Visualisierung der Zunahme der Gesamtlipidmenge in ADSCs während der adipogenen Differenzierung mittels CARS-Mikroskopie. Oben: Start der Messung; Mitte: Nach 50 Stunden; Unten: Nach 96 Stunden. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

Auch die Tatsache, dass die gemessene Gesamtvolumenzunahme nicht nur durch Akkumulation vieler kleiner LDs erreicht wird, sondern vor allem durch massive Vergrößerung einzelner LDs, kann aus den mikroskopischen Bildern abgelesen werden. So fallen bei Betrachtung der einzelnen Zeitpunkte mehrere große LDs auf, deren Volumen um ein Vielfaches höher ist als das Volumen der kleineren LDs. Durch diese Kombination aus Zunahme an LD-Zahl und LD-Größe konnte in der hier dargestellten Messung, welche sich über 96 Stunden erstreckte und bei welcher alle 30 Minuten eine dreidimensionale Aufnahme gemacht wurde, durch Volumen-Rendering bestimmt werden, dass sich das detektierbare Gesamtvolumen sämtlicher LDs um das nahezu Fünffache angereichert hat, und zwar von 10 auf 50 Pikoliter (siehe Abbildung 3-27).

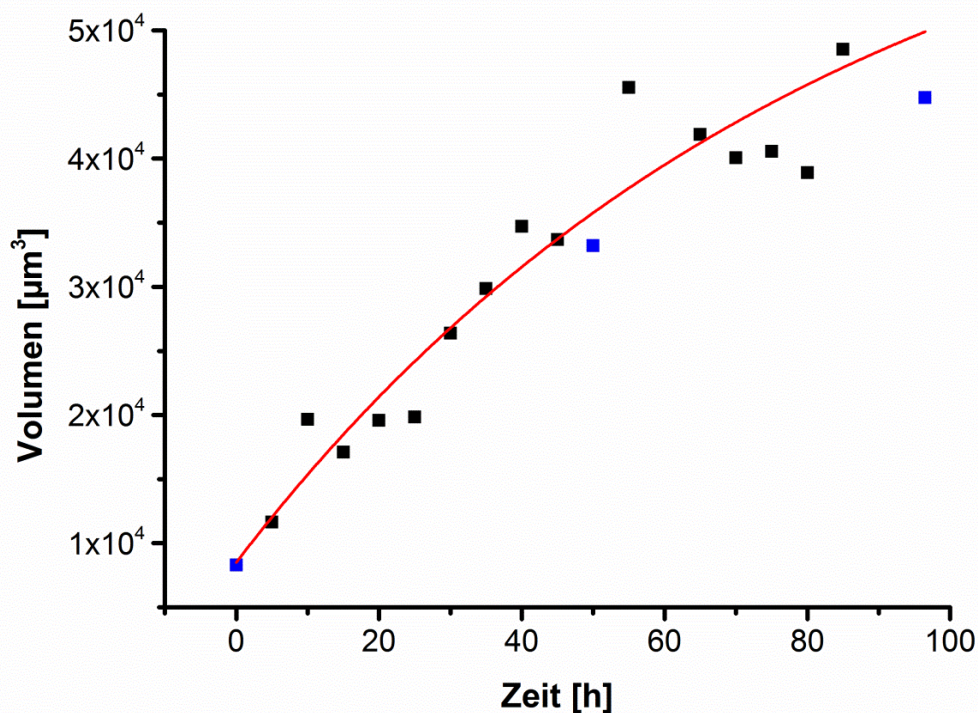


Abbildung 3-27 Quantitative Auswertung der Gesamtlipidzunahme in der Zellpopulation. Dargestellt ist dabei nur eine Auswahl an Datenpunkten, gemessen wurde alle 30 Minuten. Blau markiert sind die Zeitpunkte, welche auch in Abbildung 3-26 dargestellt sind. Zur besseren Übersicht wurden die Werte mit einer exponentiellen Funktion angenähert (rot).

Zur genaueren Analyse wurde ein Ausschnitt dieser Messung genauer analysiert. Dazu wurden die Volumina aller detektierbaren LDs zu jedem Zeitpunkt vermessen und als Box-Plox-Diagramm aufgetragen (siehe Abbildung 3-28). Betrachtet man den zeitlichen Verlauf dieses Diagramms, so ist festzuhalten, dass sich der Mittelwert der LD-Volumina so gut wie gar nicht verändert, da zu jedem Zeitpunkt eine Vielzahl an sehr kleinen LDs vorhanden ist. Im Gegensatz dazu kommt es aber zu einer drastischen Änderung der maximalen Volumengröße einzelner LDs.

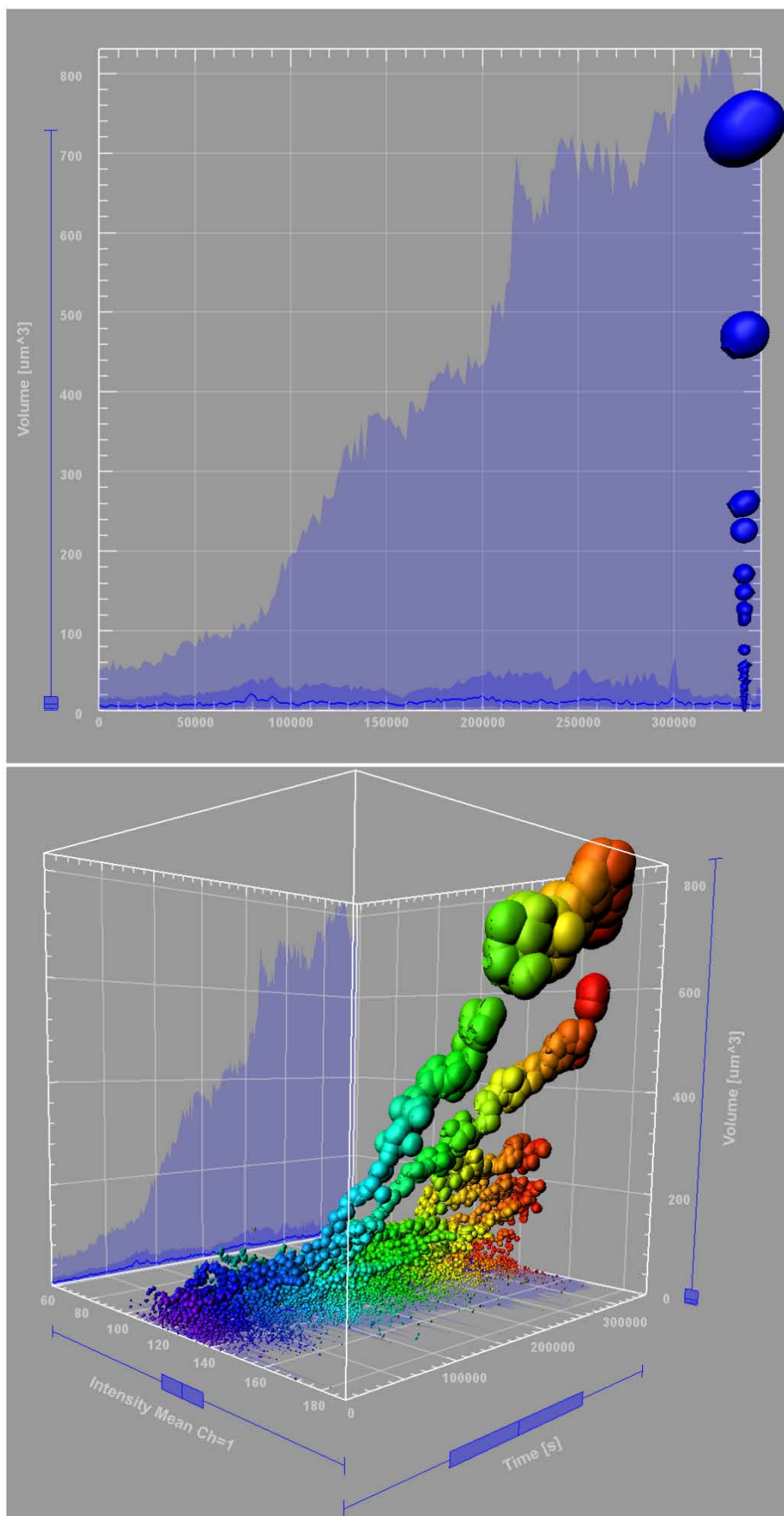


Abbildung 3-28 Box-Plot-Darstellung der Entstehung von einzelnen sehr großen LDs bei gleichzeitiger Präsenz sehr vieler kleiner LDs während der adipogenen Differenzierung, welche mit Hilfe der CARS-Mikroskopie verfolgt wurde.

Besonders ein einzelner LD hebt sich dabei von allen anderen ab und erreicht während der Messung ein Gesamtvolumen von mehr als 800 fL. Auf diesen speziellen LD soll im weiteren Verlauf noch näher eingegangen werden.

Dadurch, dass der Lipideinbau über lange Zeit kontinuierlich verfolgt wurde, konnte schließlich auch die bisher kontrovers diskutierte Frage, wie es zu einer solchen Vergrößerung einzelner LDs während der adipogenen Differenzierung kommt, eindeutig beantwortet werden. Aufbauend auf den zuvor vorgestellten drei Hypothesen konnte mit Hilfe der Langzeitexperimente gezeigt werden, dass die dritte Vermutung, der langsame Lipidtransfer zwischen räumlich assoziierten LDs, dem natürlichen Prozess der adipogenen Differenzierung entspricht und dass ein solcher Fusionsprozess sich sogar über mehrere Stunden hinziehen kann. Zur beispielhaften Demonstration derartiger Fusionsvorgänge ist in Abbildung 3-29 ein vergrößerter Ausschnitt des Langzeitexperimentes aus Abbildung 3-26 zu sehen. Zur Vereinfachung der Darstellung und zur anschließenden Quantifizierung der eintretenden Fusionsprozesse wurden auch hier die Volumina der detektierten LDs gerendert und jeder der beteiligten LDs mit einer eigenen Farbe kodiert. Bei dem rot eingefärbten LD handelt es sich um den LD, welcher auch schon in Abbildung 3-28 wegen seiner Größe herausstach. Zudem wurde die komplette Bewegung dieses Haupt-LDs über die Zeit verfolgt und als Trajektorie dargestellt. Dabei hat es zwar auf den ersten Blick den Anschein, dass sich der LD sehr viel und aktiv bewegt, dies ist jedoch ein Trugschluss, wird die scheinbare Bewegung doch fast ausschließlich durch die Bewegung der ganzen Zelle verursacht und nicht durch vermeintliche aktive Transportvorgänge innerhalb der Zelle. Tatsächlich ist es so, dass adipozytäre LDs nicht mehr mit dem Tubulinnetzwerk, sondern vielmehr mit intermediären Filamenten verknüpft zu sein scheinen [41]. So wurde z.B. in differenzierenden 3T3-L1 Präadipozyten ein korbartiges Geflecht aus Vimentin-Filamenten nachgewiesen [41, 208]. Die Störung dieser Filamente verhindert sogar die LD-Bildung. Eine weitere Auffälligkeit, die sich an diesem Beispiel veranschaulichen lässt, ist die Tatsache, dass der Lipidtransport immer ausschließlich von einem kleineren LD, im Folgenden Donor genannt, zu einem größeren LD, im Folgenden Akzeptor genannt, erfolgt. Bei genauerer Analyse der permanent ablaufenden Fusionsvorgänge fiel zudem auf, dass die LDs keineswegs in ihrer Donor- bzw. Akzeptoreigenschaft festgelegt sind, sondern vielmehr ständig zwischen diesen beiden Zuständen alternierend wechseln können. So kann ein Akzeptor den Lipidgehalt eines kleinen Donors komplett aufsaugen, bei Kontakt mit einem noch größeren LD dann aber selber zum Donor werden (siehe Abbildung 3-34). Auch die simultane Funktion als Donor und als Akzeptor konnte beobachtet werden sowie die Fähigkeit, sich als Akzeptor gleichzeitig von mehreren Donoren den Lipidgehalt einzuverleiben. Zumeist sticht aber in jeder Zelle ein LD heraus, welcher ausschließlich als Akzeptor auftritt und nach und nach den Inhalt aller anderen LDs in sich aufnimmt, wie in dem vorliegenden Beispiel der rot eingefärbte LD.

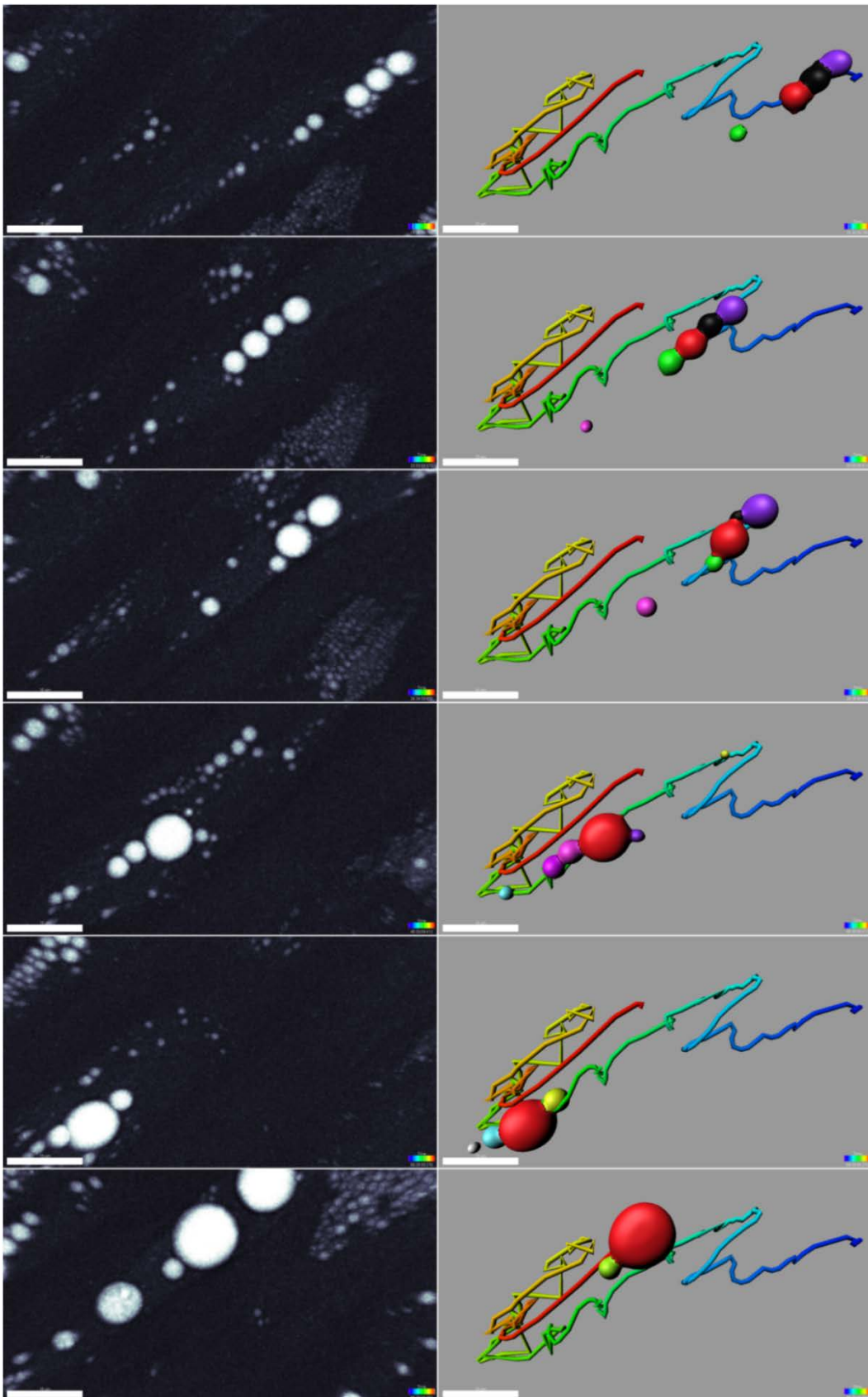


Abbildung 3-29 Beispiel eines Reifungsprozesses eines dominierenden Akzeptors-LDs (rot), welcher während der Messperiode von 96 Stunden mit insgesamt neun Donor-LDs fusioniert. Scale bar: 15  $\mu\text{m}$  (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Dieser LD wird vermutlich auch zu dem am Ende der Differenzierung verbleibenden unilokularen LD und wird im Weiteren als dominierender Akzeptor bezeichnet. Dabei könnte es sich zudem um den schon angesprochenen Haupt-LD handeln, der sich aufgrund seines verminderten Perilipingehaltes von den kleineren LDs unterscheidet. Man könnte auch sagen, dass eine Vielzahl von LDs dazu auserkoren ist, eine große Menge an Lipiden zu sammeln, um diese an den Haupt-LD zur finalen Abspeicherung weiter zu geben. So konnten in dem hier gezeigten Beispiel im Verlauf der gesamten Beobachtungsdauer von 96 Stunden insgesamt neun LD-Donoren beobachtet werden, welche nachweislich ihren Lipidinhalt an den dominierenden LD-Akzeptor weitergaben. Auffällig dabei ist, dass die Kontaktfläche zwischen den an einer Fusion beteiligten LDs anscheinend nicht sehr groß sein muss. Man ist von den reinen Mikroskopiebildern gar nicht in der Lage, diese Kontaktfläche wirklich aufzulösen. Da es aber an dieser Kontaktfläche zu einem aktiven Lipidaustausch kommt, scheint es an dieser Stelle zu einer lange anhaltenden Modifizierung der beiden beteiligten Phospholipidmonoschichten zu kommen. Denkbar wäre in dem Zusammenhang, dass mit Hilfe von bestimmten Proteinen ein einzelner großer Austauschkanal gebildet wird (siehe Kapitel 3.2.5). Eine andere Möglichkeit wäre, dass es zu einer massiven Anreicherung eines bestimmten Proteins kommt, bei welchem es sich um ein Lipidtransferprotein handeln müsste.

Die dabei erreichte Volumenzunahme eines dominierenden Akzeptors ist trotz der langen Differenzierungsperiode durchaus beachtlich. So konnte in dem hier gezeigten Beispiel eine nahezu 10fache Volumenzunahme des dominierenden Akzeptors gemessen werden (siehe Abbildung 3-30). So lag das Volumen des LDs zu Beginn der Messung noch bei knapp unter 100 fL. Dieser Wert steigerte sich dann jedoch bis zum Ende der Beobachtungszeit auf ca. 850 fL. Dabei sollte man bedenken, dass wir uns auch am Ende der Beobachtungszeit eigentlich immer noch eher im Anfangsstadium der adipogenen Differenzierung befinden und dass sich demnach das Volumen noch weitaus mehr vergrößern würde, bis am Ende nach ca. zwei Wochen nur noch ein unilokularer LD übrig bleibt. Der allgemeine Verlauf der gemessenen Volumenzunahme erscheint im Ganzen betrachtet mehr oder weniger gleichmäßig, mit einigen größeren Anstiegen, die mit Zeitpunkten korrelieren, in welchen es zu mehreren Fusionsprozessen mit kleineren LDs kam. Nur selten kam es bei der Messung zu Perioden, in welchen gar keine Fusionen auftraten und die Volumenzunahme daher stagnierte.

Besonders auffallend bei dem Lipidtransfer der neun Donoren zu dem dominierenden Akzeptor ist, dass die meisten Donoren einen verblüffend ähnlichen maximalen Volumenwert durch Fusion mit anderen noch kleineren LDs erreichen, bis sie selber von dem dominierenden Akzeptor aufgenommen werden (siehe Abbildung 3-31).

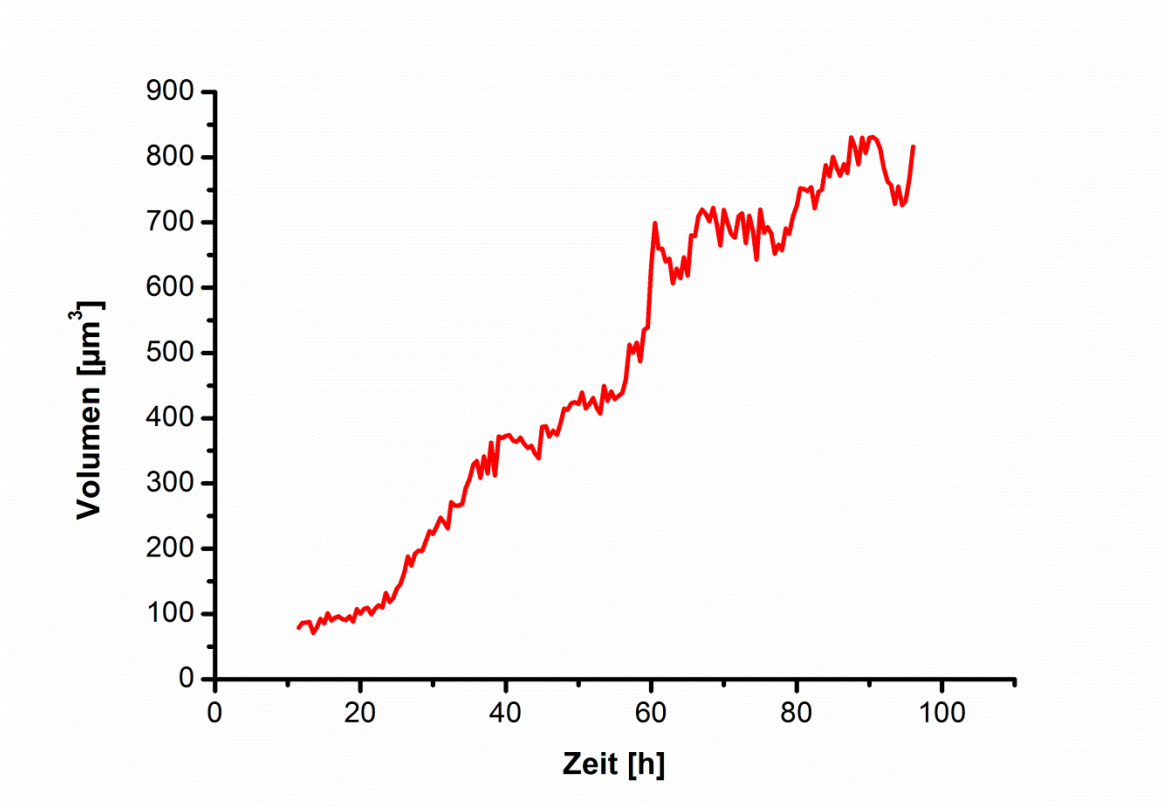


Abbildung 3-30 Volumenzunahme des dominierenden Akzeptors aus Abbildung 3-29 während der Messdauer von 96 Stunden.

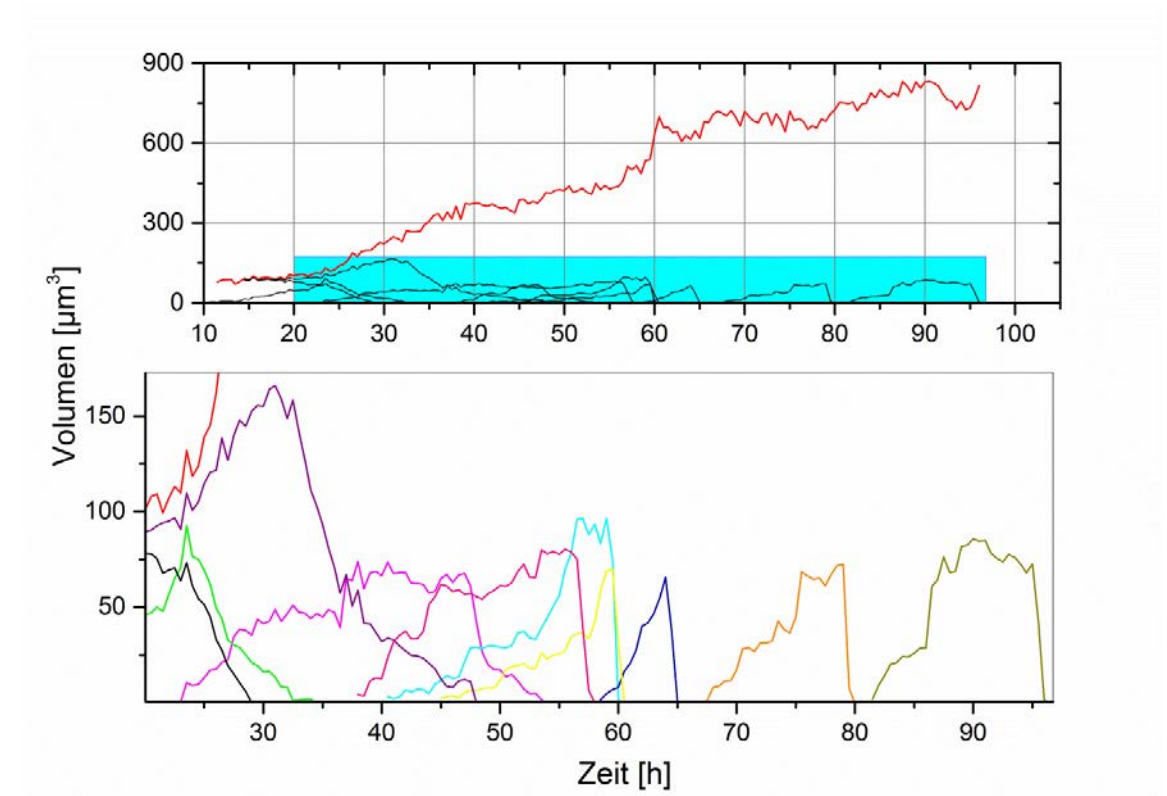


Abbildung 3-31 Volumenänderungen aller beteiligten Donoren und Akzeptoren des analysierten Beispiels (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Dieser Maximalwert liegt bei allen LDs bis auf eine Ausnahme zwischen 80 und 100  $\mu\text{m}^3$ . Die einzige Ausnahme erreicht ein Volumen von ca. 160  $\mu\text{m}^3$ , bevor es zu einer Fusion mit dem dominierenden Akzeptor kommt. Ob dieser häufige Maximalwert von knapp unter 100  $\mu\text{m}^3$  auf bestimmte Eigenschaften der LDs zurückzuführen ist, welche die bevorzugte Größe der LDs auf diesen Grenzwert festlegen oder schlicht auf einem Zufall beruht, ließ sich jedoch nicht genau bestimmen. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang z.B., dass es gewisse Toleranzgrenzen der Krümmung der LDs gibt, welche durch die Zusammensetzung der Membran vorgegeben ist und die es einigen LDs nicht erlaubt, eine gewisse Größe zu überschreiten, während andere aufgrund einer anderen Membranzusammensetzung dazu befähigt sind. Tatsächlich konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass sich die Zusammensetzung der LD-Oberfläche im Verlauf der adipogenen Differenzierung ändern kann [210].

Eine weitere Auffälligkeit besteht darin, dass die in einem früheren Stadium der Differenzierung ablaufenden Fusionen scheinbar einen anderen Verlauf aufweisen als die später ablaufenden Prozesse. Während die Volumenzunahme der ersten Fusionsprozesse einen nichtlinearen und sehr langsamen zeitlichen Verlauf aufweist, scheinen die späteren Fusionen eher einem linearen, wesentlich schnelleren Trend zu folgen. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die späteren Fusionen zu einem Zeitpunkt ablaufen, bei dem der dominierende Akzeptor schon ein sehr großes Volumen besitzt. Aufgrund der physikalischen Gesetze, auf denen die Fusion beruht und auf die später noch eingegangen wird, ist dadurch die Fusion deutlich erleichtert und findet wesentlich schneller statt. Aus diesem Grund sind für die später ablaufenden Fusionsprozesse auch nur noch sehr wenige Messpunkte vorhanden.

Misst man das summierte Gesamtvolumen, welches von allen neun Donoren während der Aufnahmeperiode zur Verfügung gestellt wird und vergleicht diesen Wert mit der Gesamtvolumenzunahme des dominierenden Akzeptors, so kommt man in beiden Fällen auf einen Wert zwischen 700 und 800  $\mu\text{m}^3$  (siehe Abbildung 3-32). Demzufolge scheint die Volumenzunahme in der Tat nur auf solchen Fusionsprozessen zu beruhen. Eine zusätzliche kontinuierliche Einlagerung von Lipiden scheint nicht aufzutreten, zumal die Gesamtvolumenzunahme des Akzeptors sogar etwas kleiner ausfällt als die summierte Volumenabgabe aller Donoren. Bedenkt man die Genauigkeit, mit der man einzelne LD-Volumina bestimmen kann und berücksichtigt man, dass man aufgrund der Detektionseffizienz der CARS-Mikroskopie sicherlich nicht die aller kleinsten LDs auflösen kann, so ist diese gute Übereinstimmung der beiden Volumina doch sehr erstaunlich.

Wie bereits einleitend erwähnt, stellt sich bei solchen Fusionsprozessen zwangsläufig die Frage, was mit dem entstehenden Überschuss an Membranbestandteilen geschieht [211]. Erwartungsgemäß kommt es hierbei nämlich zu einer starken Variation zwischen der zur

Verfügung gestellten Oberfläche aller Donoren und dem Oberflächenbedarf des Akzeptors. So stellen die neun Donoren eine Gesamtoberfläche von mehr als 900  $\mu\text{m}^2$  zur Verfügung, wohingegen der Akzeptor nur ca. 350  $\mu\text{m}^2$  an zusätzlicher Oberfläche beansprucht, um die erforderliche Volumenvergrößerung zu erreichen (siehe Abbildung 3-32).

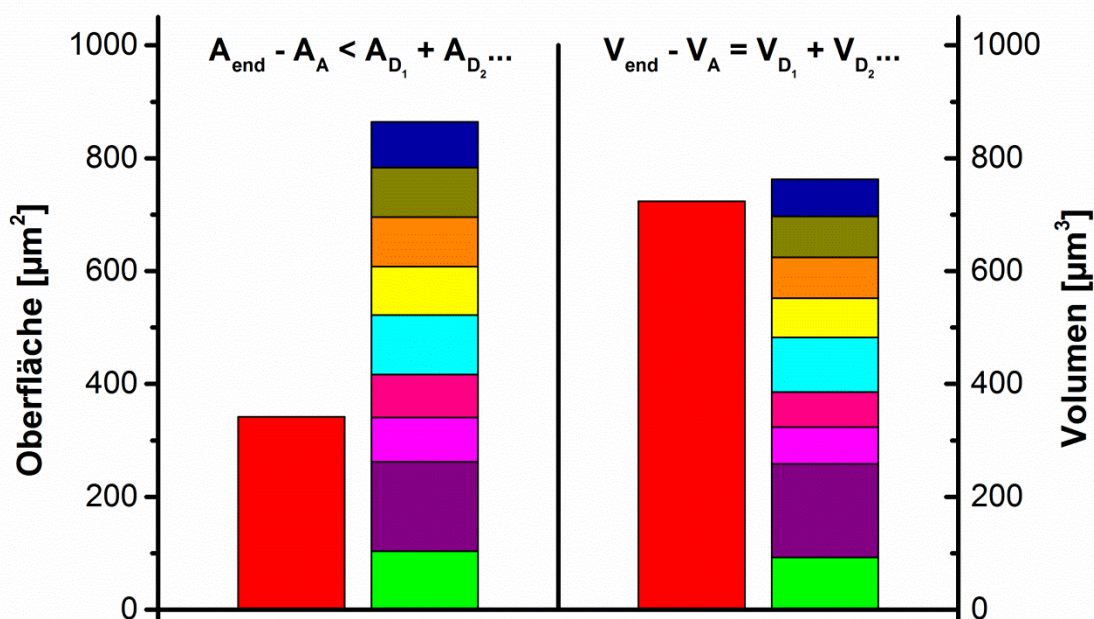


Abbildung 3-32 Vergleich des Volumen- (rechts) bzw. Oberflächenzuwachses (links) des dominierenden Akzeptors (rot) und der Gesamtmenge an Volumen bzw. Oberfläche, die von den neun Donoren zur Verfügung gestellt wird (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.)

Eine derartige Verkleinerung der Gesamtoberfläche bei gleichbleibendem Volumen macht dieses System auch so einzigartig, wenn man diesen Vorgang mit anderen bekannten Fusionsprozessen in der Zelle vergleicht (siehe Abbildung 3-33) [211]. Alle anderen Fusionen kommen zwischen Systemen vor, welche zwei wässrige Phasen mit Hilfe einer Doppelmembran voneinander abgrenzen. Fusionieren zwei solche Phasen miteinander, geschieht dies auf einer relativ schnellen Zeitskala und am Ende ist es bei solchen Prozessen eher so, dass es zu einer Volumenvergrößerung bei gleichbleibender Gesamtoberfläche kommt. Dies wird durch eine komplette Verschmelzung der beteiligten Oberflächen erreicht, woraufhin das Volumen durch Austausch mit der ebenfalls wässrigen Umgebung ausgeglichen werden kann. Es muss dabei also keine Oberfläche abgebaut werden. Die Fusion von zwei LDs hingegen ist eher als ein nach außen abgeschlossenes System zu sehen. Eine instantane Verschmelzung der beteiligten Membranen würde in diesem Fall dazu führen, dass plötzlich ein großer

Oberflächenüberschuss vorhanden wäre. Da hierbei kein Austausch des lipophilen Inhalts mit der wässrigen Umgebung stattfinden kann, ist es nicht möglich, die Dichte des Inhaltes durch Volumenstrom von außen auszugleichen. Dies wiederum hätte sicherlich weitreichende Folgen. So würde die Membran wie bei einem vorherrschenden osmotischen Druck ihre Integrität verlieren und müsste sich deshalb nach innen ein- bzw. in die Umgebung ausstülpen.

Da dies für die Zelle vermutlich nicht erstrebenswert ist, muss sie versuchen, einem solchen Vorgang dadurch entgegenzuwirken, dass sie eine direkte Verschmelzung der beiden Oberflächen inhibiert, z.B. indem sie die Fusionseffizienz durch eine geregelte Oberflächenanpassung entsprechend verringert.

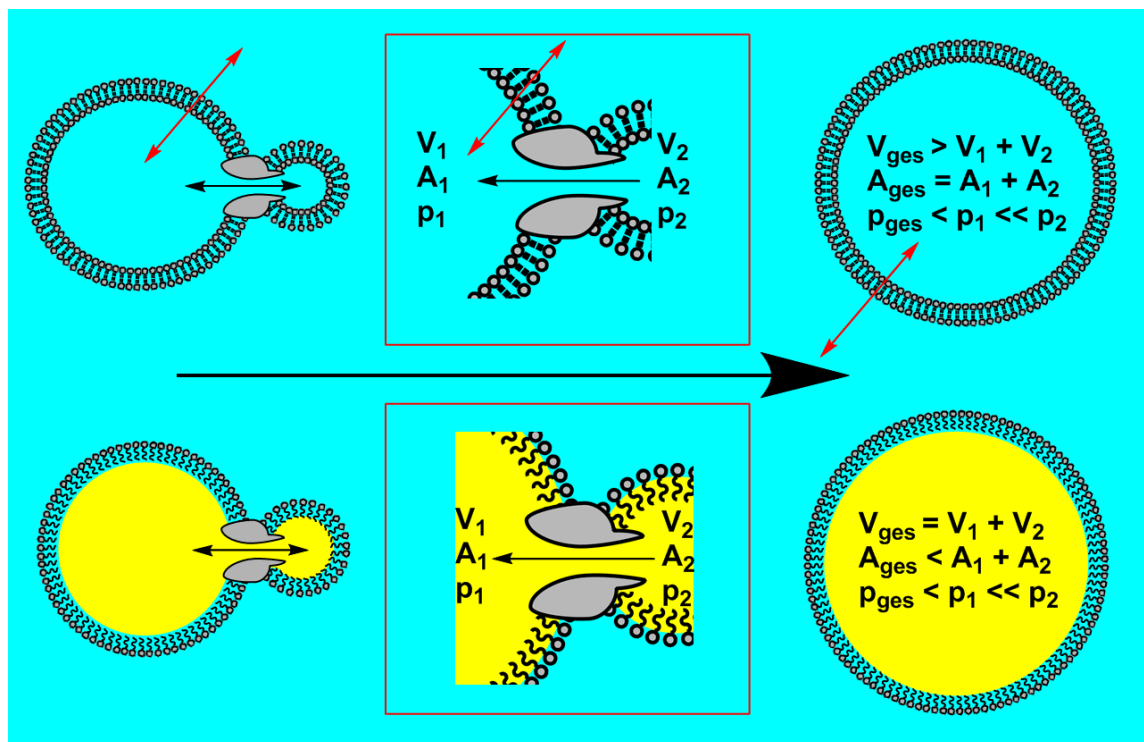


Abbildung 3-33 Vergleich von Fusionsvorgängen zwischen wässrigen Organellen, bei denen ein Austausch mit der ebenfalls wässrigen Umgebung möglich ist und LDs, bei welchen kein Austausch möglich ist, da das Gesamtsystem gegenüber dem Cytoplasma abgeschlossen ist (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Aus diesem Grund muss bei der Fusion von LDs insgesamt Oberfläche abgebaut werden. Der dabei erzeugte Anteil an Phospholipiden und Membranproteinen kann dann entweder auch in dem LD eingelagert oder ins Cytoplasma abgegeben werden, wo er zur Neusynthese von LDs dienen könnte. Zweiteres erscheint durchaus sinnvoll, ist doch nur eine begrenzte Menge an Phospholipiden in der Zelle vorhanden. So ist es für einen sich entwickelnden Adipozyten durchaus erstrebenswert, die Lagereffizienz für Lipide durch die Generierung von großen LDs zu maximieren, auch wenn dies mit einer Verringerung

der Oberfläche einhergeht, was zwar die Lipolyseeffizienz herabsetzt, dafür aber Membranbausteine für die Neusynthese von LDs zur Verfügung stellt. Nur auf diese Weise können die einzelnen Zellen vermutlich mit der immensen Menge an zu speichernden Lipiden zu Recht kommen, ohne dass ihnen die für die LD-Synthese erforderlichen Phospholipide ausgehen. Betrachten wir in diesem Zusammenhang noch einmal die unspezialisierten HeLa-Zellen, welche scheinbar nicht in der Lage sind, kleinere LDs zu größeren LDs zusammenzuschließen. Hier kommt es demzufolge bei Fütterung zu einer reinen Akkumulation von LDs gleicher Größe (siehe Kapitel 3.2.1), bis eine kritische Menge erreicht ist, ab welcher sich die Anzahl der LDs nicht mehr erhöht, möglicherweise, weil kein Material mehr für die Membranbildung verfügbar ist. Allerdings sollte man hier erwähnen, dass die benötigte Phospholipidmenge leicht überschätzt werden kann. Vergleicht man nämlich das Verhältnis von eingelagerten Triglyceriden zu benötigten Phospholipidmolekülen, so kommt man bei einem LD mit dem Radius von 200 nm auf einen Wert von nur ca. 2 Mol% Phosphatidylcholin und bei einem Radius von 1  $\mu\text{m}$  sind es sogar nur noch ca. 0,5 Mol% [33]. Insofern braucht man eigentlich nur eine geringe Menge an Phospholipiden zum Speichern einer großen Menge an Lipiden, trotzdem ist es natürlich von Vorteil, möglichst große LDs zu erzeugen, da dann noch weniger Membranbausteine benötigt werden.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse sind im Rahmen einer Publikation bereits veröffentlicht worden [207].

### **3.2.5 Biophysikalische Berechnung einer hypothetischen Lipidtransfer-Pore**

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, findet der bei der Fusion von LDs ablaufende Lipidtransfer immer von einem kleineren zu einem größeren LD statt. Dieses charakteristische Fusionsverhalten, welches vermutlich über eine zwischen den beiden beteiligten LDs gebildete Fusionspore ermöglicht wird, legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei in erster Linie um einen rein physikalischen Prozess handelt, der sich durch die unterschiedlichen Druckverhältnisse in verschieden großen LDs erklären lässt. Diese Druckdifferenz ist dann die treibende Kraft für den gerichteten Transport des Lipidmaterials in den größeren Akzeptor.

Zur physikalischen Berechnung der unterschiedlichen Druckverhältnisse und des dadurch ausgelösten gerichteten Volumentransport vom Donor zum Akzeptor muss man sich zunächst mit der Grenzflächen- bzw. Oberflächenspannung  $\gamma$  beschäftigen, einem Parameter, mit dem sich eine jüngst erschienene theoretische Arbeit intensiv befasst hat [212].

In LDs hilft diese Grenzflächenspannung dabei, die Kontaktfläche zwischen dem hydrophoben Kern und der Umgebung zu minimieren. Nach Laplace kann die Druckdifferenz zwischen dem Inneren eines LDs und der cytosolischen Umgebung beschrieben werden als [213]:

$$\Delta p = p_{In} - p_{Out} = \frac{2\gamma}{r}$$

Hierbei ist:

- $p_{In}$ : Druck im Inneren des LDs
- $p_{Out}$ : Druck außerhalb des LDs
- $\gamma$ : Grenzflächenspannung
- $r$ : Radius des LDs

Kommt es nun durch die Erzeugung einer Fusionspore zu einem direkten Kontakt zweier benachbarter LDs, kann man die zwischen den beiden LDs herrschende Druckdifferenz kalkulieren, wobei man den äußeren Druck aufgrund derselben zellulären Umgebung in beiden Fällen gleich setzen kann.

$$\Delta p = p_{In1} - p_{In2} = 2 \left( \frac{\gamma_1}{r_1} - \frac{\gamma_2}{r_2} \right)$$

Der tatsächliche Wert der Grenzflächenspannung von LDs und anderen zellulären Organellen hängt stark von den physikalischen und biochemischen Eigenschaften wie z.B. der Dichte und Zusammensetzung der nach außen abgrenzenden Membran und der darin liegenden Proteine ab und wird deshalb in diesem Fall Oberflächenspannung genannt. Da die Eigenschaften der beiden beteiligten Membranen aber als vergleichbar angesehen werden können, kann man auch diesen Parameter gleich setzen [213].

$$\Delta p = p_{In1} - p_{In2} = 2\gamma \left( \frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right)$$

Insofern hängt die Rate des Lipidnettotransportes in hohem Maße von der internen Druckdifferenz der beiden beteiligten LDs ab, welche sich während eines einzelnen Fusionsprozesses immer weiter verstärken sollte, da sich die Differenz der beiden LD-Radien immer mehr vergrößert.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang eine einzelne Fusion aus dem vorherigen Kapitel noch einmal etwas genauer (siehe Abbildung 3-34), so kann man zunächst einmal festhalten, dass die Volumenmenge, welche von einem Donor abgegeben wird, wirklich dem Wert des Volumenzuwachses des Akzeptors in derselben Zeit entspricht. In der Abbildung kann man zudem die zuvor angesprochene Fähigkeit von LDs, zwischen

Akzeptor und Donor wechseln zu können, erkennen. So gibt zunächst der grüne Donor seinen Lipidgehalt an den roten Akzeptor ab, während gleichzeitig der schwarze Donor sein Volumen an den lilafarbenen Akzeptor weitergibt. Nach Abschluss dieser beiden Fusionen wird dann der lilafarbene Akzeptor zum Donor und fusioniert mit dem roten LD, bei welchem es sich wie bereits erwähnt um den dominierenden Akzeptor dieser beispielhaften Messung handelt.

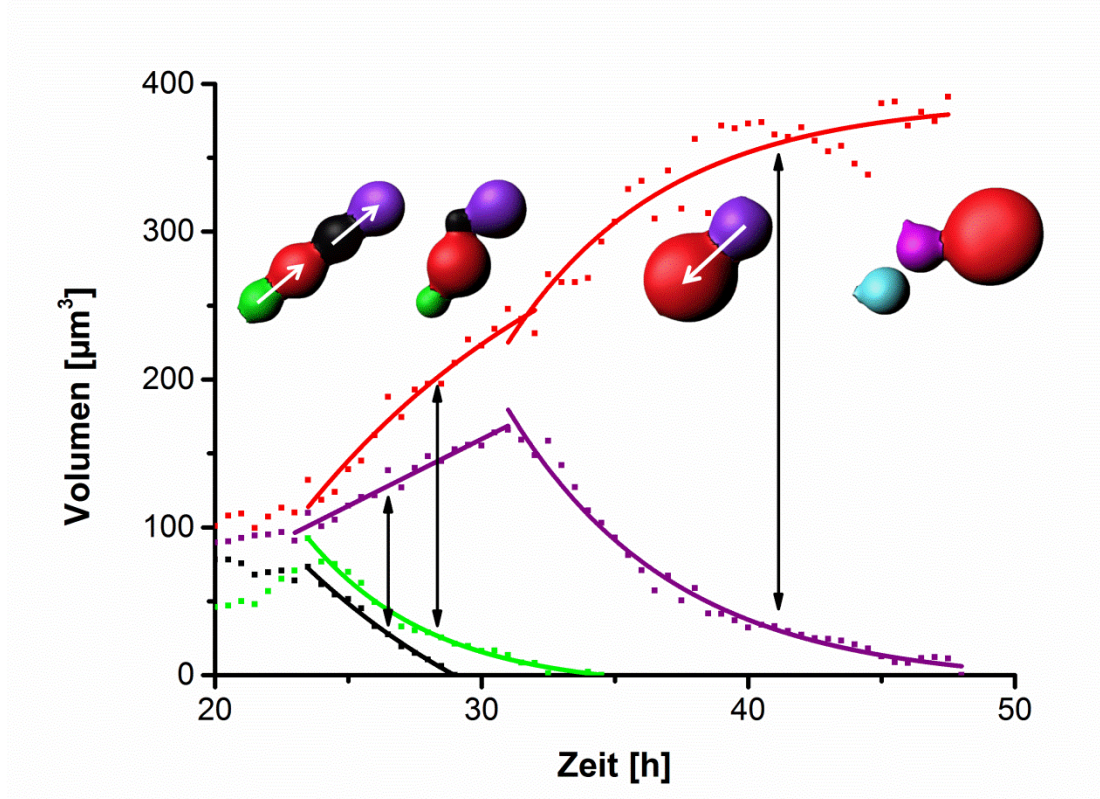


Abbildung 3-34 Volumenänderungen zu Beginn der beispielhaften Messung. Ein LD (lila) wechselt dabei von Akzeptor zu Donor (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Allerdings sieht man an diesem Beispiel auch, dass sich die Fusion nicht wie erwartet aufgrund der stetig steigenden Druckdifferenz immer mehr beschleunigt, sondern vielmehr verlangsamt. Demzufolge scheint die Fusionsgeschwindigkeit neben dem rein physikalischen Parameter des inneren Druckes auch noch von weiteren biologischen Parametern abzuhängen. So sollte insbesondere die Größe des hypothetischen Austauschkanals bzw. die Anzahl der vorhandenen Lipidtransferproteine einen großen Einfluss auf die Transferrate besitzen. Letzteres wäre als alternative Erklärung zu einem großen einzelnen Kanal anzusehen [213]. Beide Parameter, sowohl die Größe des Kanals, als auch die Anzahl an potentiellen Lipidtransferproteinen, könnten sich ähnlich der Druckverhältnisse im Laufe der Zeit ändern und dadurch die Verlangsamung der Lipidtransferrate bewirken.

Die vorhandenen Druckunterschiede geben insofern erst einmal nur die Richtung vom kleineren in den größeren LD an, nicht aber die genaue Höhe des Lipidnettotransportes. Dies korreliert mit den gemachten Beobachtungen und erklärt, warum sich in den meisten Fällen schon nach relativ kurzer Zeit in jeder einzelnen Zelle ein dominierender Akzeptor andeutet, welcher am Ende des langen Differenzierungsprozesses mit großer Wahrscheinlichkeit zu dem übrigbleibenden unilokularen LD werden wird. Ob aber schon zu Beginn der adipogenen Differenzierung ein bestimmter LD dazu auserkoren ist und ob sich dieser in seinen Eigenschaften von anderen LDs unterscheidet, ist noch nicht geklärt. Es könnte auch einfach sein, dass durch Zufall ein LD in der ersten Differenzierungszeit mehr Fusionen eingeht als andere LDs, wodurch er durch seinen Größenvorsprung im Folgenden immer als Akzeptor auftritt, weil er schlicht auf keinen größeren LD innerhalb der Zelle trifft.

Zur Veranschaulichung der weiteren physikalischen Grundlagen einer solchen LD-Fusion soll noch einmal das Beispiel aus Abbildung 3-34 herangezogen werden und zwar diejenige Fusion, bei welcher der lilafarbene Donor von dem roten dominierenden Akzeptor aufgenommen wird. Mit der Annahme, dass die Oberflächenspannung beider LDs bei einem solchen Prozess identisch ist und zudem konstant bleibt, kann man die jeweiligen Drücke in den LDs sowie die Druckdifferenz, die zwischen den beiden herrscht, für jeden Zeitpunkt der Messung berechnen (siehe Abbildung 3-35).

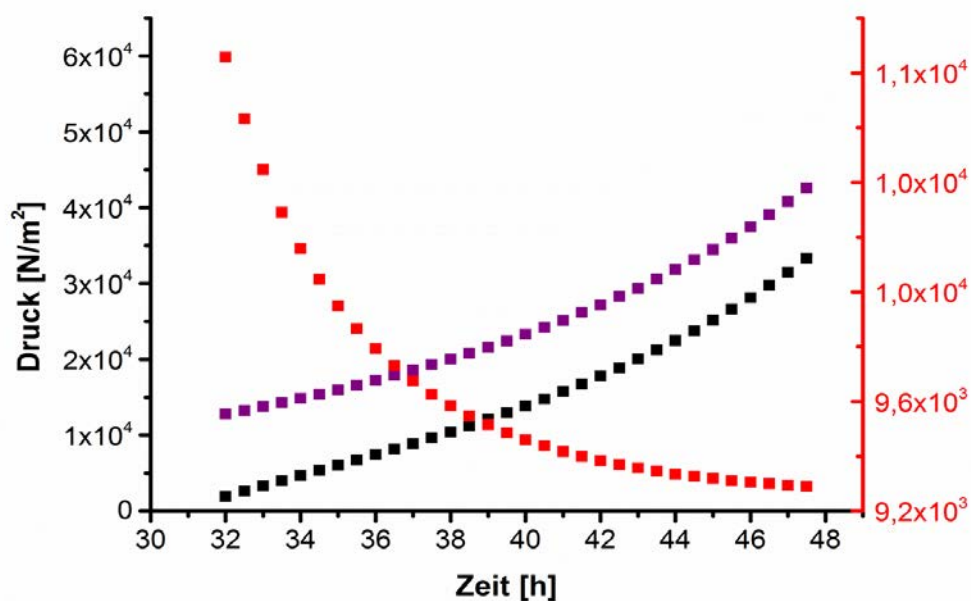


Abbildung 3-35 Veränderung des Druckes der beiden an der Fusion beteiligten LDs. In rot ist der Akzeptor, in lila der Donor und in schwarz die Druckdifferenz aufgetragen.

Dafür wurden die gemessenen Daten der Volumenänderung zunächst mit einer exponentiellen Funktion gefittet und dieser Fit zur weiteren Simulation verwendet. Zur Berechnung der verschiedenen Drücke wurde dann der Wert der Oberflächenspannung mit 20,8 mN/m angenommen, ein Wert, wie er sowohl theoretisch [212] als auch experimentell [212, 214, 215] annähernd bestimmt worden ist. Hier soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass sich dieser Parameter unter Umständen während der adipogenen Differenzierung ändert. So konnte in differenzierteren Zellen eine etwas modifizierte Oberflächenspannung der LDs nachgewiesen werden [210]. Wie zu erwarten ist, nimmt der Druck im kleiner werdenden Donor kontinuierlich zu, während der Druck im Inneren des Akzeptors exponentiell abnimmt.

Thermodynamisch getrieben wird der bei der Fusion ablaufende Lipidtransport vom kleineren LD in den größeren LD dadurch, dass das System bestrebt ist, die Kraft zu minimieren, welche auf das Gesamtsystem ausgeübt wird. Betrachtet man diese Kraft als das Produkt von Druck und Oberfläche, so kommt es während dem gesamten Fusionsprozess zu einer kontinuierlichen Verringerung dieses Parameters (siehe Abbildung 3-36). Das Minimum und damit der thermodynamisch angestrebte Zustand wird erreicht, sobald von den beiden beteiligten LDs nur noch der Akzeptor übrigbleibt, die Fusion also abgeschlossen ist.

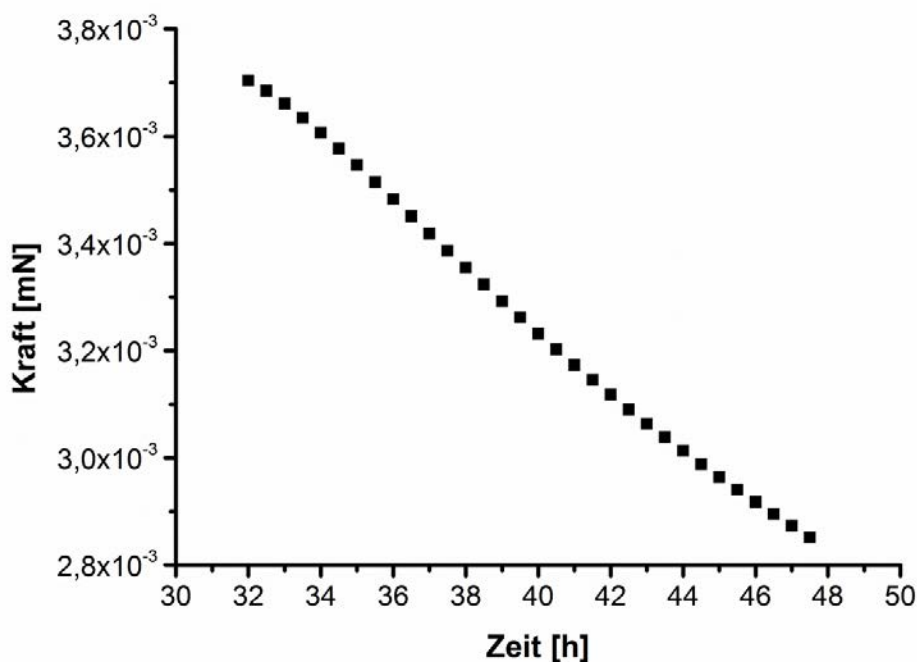


Abbildung 3-36 Kontinuierliche Verringerung der auf das System ausgeübten Kraft des Fusionsbeispiels zwischen rotem Akzeptor und lilafarbenem Donor aus Abb. 3-34. Diese Verringerung liefert die thermodynamische Erklärung für die Fusion zweier LDs.

Geht man nun davon aus, dass der Lipidtransport in erster Linie durch die vorherrschende Druckdifferenz und den Porenradius bestimmt wird, so kann dieser Volumentransport mit Hilfe des Gesetzes von Hagen-Poiseuille beschrieben werden. Dieses von Jean Louis Marie Poiseuille aufgestellte Gesetz beschreibt den Volumenstrom einer Flüssigkeit, welche aufgrund eines Druckunterschiedes in Form einer laminaren Strömung durch eine Kapillare fließt:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi * r^4 * \Delta p}{8 * \eta * l}$$

Hierbei ist: *dV/dt*: zeitliche Volumenänderung (Lipidtransferrate)  
*r*: Radius des hypothetischen Lipidaustauschkanals  
*Δp*: Druckdifferenz zwischen Donor und Akzeptor  
*η*: Viskosität innerhalb der LDs  
*l*: Länge des hypothetischen Austauschkanals

Auch wenn eine solche Kapillare bei einem Transportvorgang über eine biologische Membran nur eine sehr geringe Länge aufweist, so ist doch die generelle Anwendbarkeit dieses Gesetzes auf derartige Fragestellungen bereits nachgewiesen worden. So konnte z.B. mit Hilfe von Simulationen gezeigt werden, dass sich der Volumenstrom von Wassermolekülen über membrangebundene Aquaporine auf diese Weise beschreiben lässt [216].

Interessanterweise konnte jüngst zudem gezeigt werden, dass bestimmte Aquaporine auch in Adipozyten vorkommen, um den Glycerintransport über die Membran zu ermöglichen [217]. Dabei wurden diese Aquaporine auch innerhalb der LDs gefunden [217]. Die Existenz solcher Proteine mit einem etwas größeren Durchmesser, welcher auch den Transport von Triglyzeriden und Sterylestern ermöglicht würde, scheint durchaus realistisch zu sein.

Da man die Volumenänderung durch die Messung ermittelt hat und man die Druckdifferenz aus der Änderung der beiden Einzelradien ableiten kann, ist es möglich, den Porenradius zu jedem Zeitpunkt der Messung zu berechnen. Dazu muss lediglich die vorherige Formel nach dem Porenradius aufgelöst werden:

$$r = \sqrt[4]{\frac{dV}{dt} \frac{8 * \eta * l}{\pi * \Delta p}}$$

Setzt man nun die gemessene Volumenänderung sowie die zu diesem Zeitpunkt herrschende Druckdifferenz ein und geht davon aus, dass die Länge der Pore *l* durch die

Dicke der beiden Einzelmembranen gegeben ist, welche man mit ungefähr 10 nm annehmen kann, so fehlt zur Berechnung nur noch die Viskosität innerhalb der LDs.

Dieser Wert ließ sich durch Einsatz eines viskositätsabhängigen Fluoreszenzfarbstoffes mit einem ungefähren Wert von 57 cP bestimmen (siehe Kapitel 3.4). Eine vergleichbare Viskosität von 34 cP konnte inzwischen auch von einer anderen Gruppe mit Hilfe von FCS-Messungen in LDs von CHO-Zellen bei Raumtemperatur nachgewiesen werden [218].

Durch Einsatz aller Werte ergibt sich schließlich für das gewählte Beispiel des Lipidtransfers vom lilafarbenen Donor zum roten Akzeptor ein anfänglicher maximaler Porenradius von ca. 9 nm, der im Laufe der Zeit auf knapp unter 2 nm abfällt (siehe Abbildung 3-37). Der Austauschquerschnitt würde dabei von ca. 250 nm<sup>2</sup> auf weniger als 12 nm<sup>2</sup> fallen.

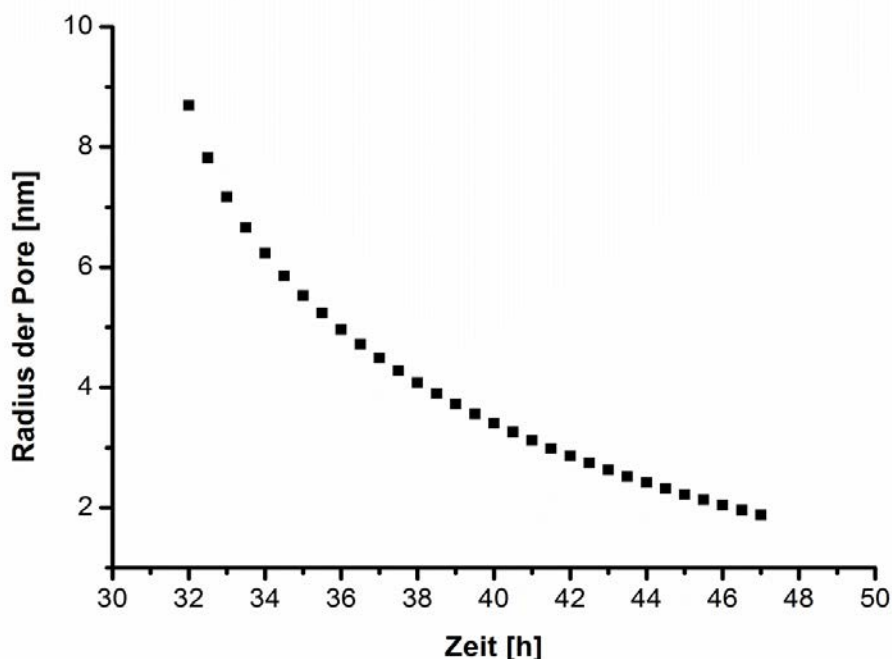


Abbildung 3-37 Berechnung der zeitabhängigen Porengröße eines hypothetischen Lipidaustauschkanals mit Hilfe des Gesetzes von Hagen-Poiseuille.

Interessanterweise konnte in einer anderen Arbeit bereits gezeigt werden, dass Fusionsporen zwischen exozytotischen Vesikeln und der Plasmamembran eine direkte Abhängigkeit von der Krümmung der Vesikel und damit zu deren Durchmesser besitzen [219]. Auch der SNARE-Komplex zwischen zwei Liposomen scheint von der Vesikelgröße abhängig zu sein [220].

Es ist naheliegend, dass bei der Fusion zweier LDs in erster Linie der kleinere der beiden Vesikel der limitierende Faktor für die Porengröße darstellen sollte, was auch dem gezeigten Verlauf in Abbildung 3-37 entsprechen würde. Um diese vermutete Abhängigkeit noch weiter zu bestätigen und quantitativ zu bestimmen, wurden die Lipidtransferraten aller insgesamt ausgewerteten 44 Fusionen aus 17 verschiedenen Zellen in Abhängigkeit der Durchmesser der beiden jeweils beteiligten LDs aufgetragen (siehe Abbildung 3-38).

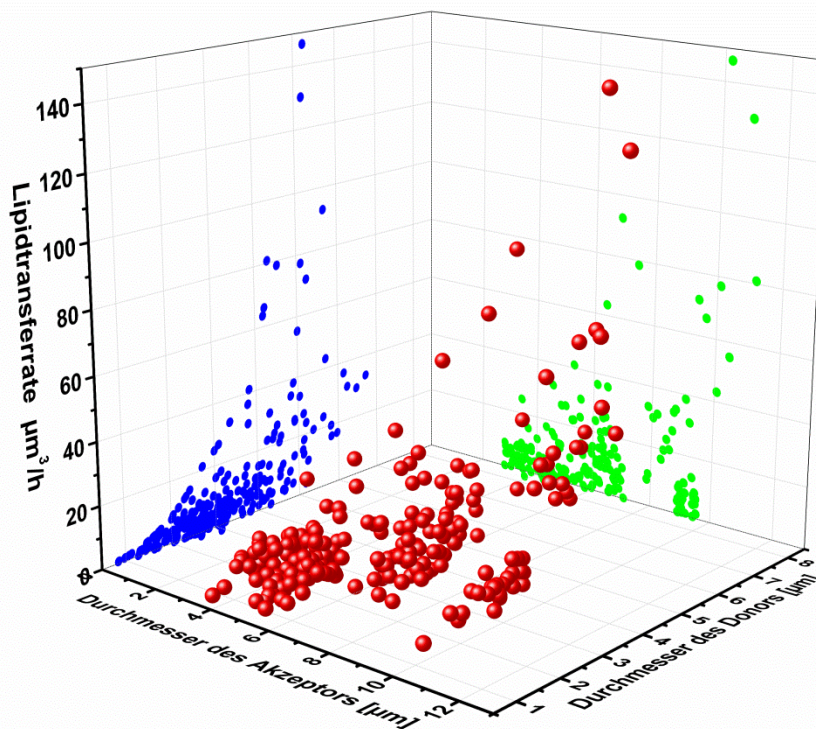


Abbildung 3-38 Abhängigkeit der gemessenen Lipidtransferrate von den Durchmessern der jeweils beteiligten LDs (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Dabei wird bestätigt, dass die Transferrate wirklich nicht nur direkt von der Größe des Akzeptors und damit von der Druckdifferenz zwischen den beiden Vesikeln abhängt, sondern gleichzeitig auch von der Größe des Donors.

Dementsprechend findet man die maximale Transferrate nicht bei der größten Differenz zwischen Donor- und Akzeptordurchmesser, was der höchsten Druckdifferenz entsprechen würde, sondern vielmehr bei der Kombination aus größtmöglichem Akzeptor und größtmöglichem Donor. Die Verteilung der Transferraten schwankt dabei bei kleinen Vesikeldurchmessern zunächst um einen Wert von ca.  $10 \mu\text{m}^3/\text{h}$ , steigt bei größeren

Durchmessern aber rasch an und erreicht dabei eine Transferrate von mehr als  $140 \mu\text{m}^3/\text{h}$ .

Rechnet man nun noch die einzelnen Lipidtransferraten in die entsprechenden Porendurchmesser um und trägt diese gegen die beiden Einzeldurchmesser auf (siehe Abbildung 3-39), so wird in der Tat bestätigt, dass eine direkte Abhängigkeit zwischen dem Porendurchmesser und dem Durchmesser des Donors existiert.

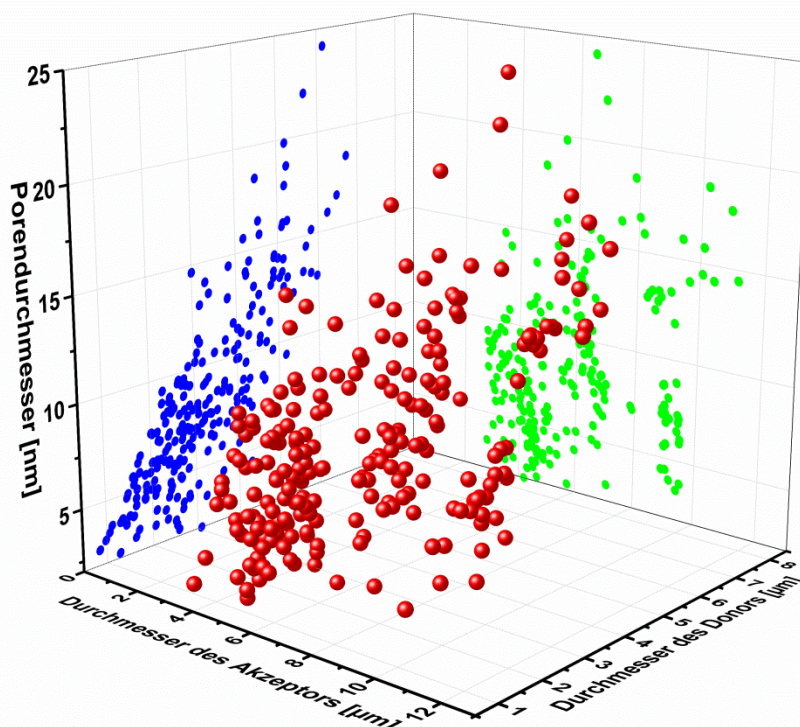


Abbildung 3-39 Abhängigkeit des kalkulierten Porendurchmessers von den Durchmessern der beteiligten LDs (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Die maximale Fusionsgeschwindigkeit wird also vor allem durch die Größe des Donors und die daraus resultierende Porengröße bestimmt. Die Druckdifferenz zwischen Donor und Akzeptor scheint hierbei hingegen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die generelle Dimension des berechneten Porendurchmessers liegt zwischen ca. 2 nm und 20 nm und erscheint damit in biologischer Sicht durchaus plausibel und realistisch, auch wenn die Größe z.B. den Durchmesser der bereits bekannten mitochondrialen Permeabilitäts-pore (PTP) [221] übertrifft. Dabei handelt es sich um einen großen Proteinkomplex, der eine Pore mit einem Durchmesser von 3 nm erzeugen kann, durch welchen Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 1500 Da hindurch geschleust werden können.

Allerdings muss man auch berücksichtigen dass die Anwendung des Gesetzes von Hagen-Poiseuille dadurch limitiert wird, dass die herrschende Druckdifferenz zwar theoretisch bewirkt, dass der Inhalt des kleineren LDs bestrebt ist, in den größeren LD zu fließen, das Gesamtsystem aber wie bereits erwähnt nicht wirklich variabel ist, da der Akzeptor seine Gesamtgröße nicht einfach ändern kann, um das ihm zufließende Volumen aufzunehmen. Es handelt sich vielmehr um ein nach außen komplett abgeschlossenes Gesamtsystem. Um dieser Einschränkung entgegen zu wirken, muss die Oberfläche des Akzeptors durch Einbau von Membranbausteinen vergrößert werden, wohingegen gleichzeitig die Oberfläche des Donors abgebaut werden muss. Da nach erfolgter Fusion deutlich weniger Oberfläche benötigt wird als zuvor, kommt es dabei insgesamt zu einem Nettoabbau an Oberflächenmolekülen, welche dann zur weiteren Verwendung in der Zelle dienen könnten. Da dieser Abbau bzw. Aufbau von Membranbestandteilen von der Zelle während der Fusion bewerkstelligt werden muss, ist der gemessene Nettotransport unter Umständen niedriger als der durch die Druckdifferenz theoretisch mögliche Volumenaustausch. Insofern könnte auch die Pore etwas größer sein als zuvor berechnet. Außerdem könnte dies bedeuten, dass die Porengröße während der Fusion eigentlich konstant bleibt und die mit der Zeit immer langsamer ablaufende Fusion durch die Tatsache verursacht wird, dass mit kleiner werdendem Donor immer mehr Oberfläche abgebaut werden muss, um das gleiche Volumen an den Akzeptor abgeben zu können.

Zur Frage, wie ein solcher Auf- und Abbau von Membranbestandteilen, welcher sowohl bei der hier gezeigten Fusion als auch der lipolytischen Degradation von LDs eine große Rolle spielt, bewerkstelligt wird, gibt es mehrere Theorien [33]. Eine Möglichkeit wäre, dass dies durch bestimmte Transportproteine ermöglicht wird, welche einzelne Phospholipide aufnehmen und zu einem anderen Bestimmungsort bewegen können. Für den Transport von Phosphatidylcholin wurde dies bereits an mehreren Proteinen *in vitro* und *in vivo* gezeigt [33, 222]. Vor allem Mitglieder der STARD-Familie [223, 224] sowie Proteine der PITP- und SEC 14-Familie scheinen dazu in der Lage zu sein, wobei die genauen Ausgangs- und Zielpunkte des Transports noch unklar sind [33, 222]. Eine andere Möglichkeit besteht in dem Transport über Kontaktpunkte, die zwischen der LD-Membran und dem ER über das Protein Seipin erzeugt werden [33, 225]. Es wird allerdings auch immer wieder postuliert, dass die Membranen des ERs ohnehin immer direkt mit den LD-Membranen verbunden sind, was einen schnellen Austausch ermöglichen würde [33, 226].

Die in diesem und dem vorherigen Kapitel beschriebene Entdeckung, dass LDs ihr Volumen während der adipogenen Differenzierung über Fusionen mit kleineren LDs vergrößern können, war zu Beginn dieser Dissertation eine bisher noch nicht gezeigte Eigenschaft der LDs. Simultan zu den hier gezeigten und inzwischen veröffentlichten Ergebnissen [207, 209] sind jedoch auch einige andere Arbeiten [213, 227-230]

erschienen, welche sich mit demselben Phänomen auseinandersetzen und im Prinzip zu denselben Resultaten gelangen. Insbesondere konnten verschiedene Proteine identifiziert werden, die einen maßgeblichen Anteil an den hier vorgestellten Fusionsprozessen leisten, vornehmlich die Proteine der CIDE-Familie und unter diesen vor allem Fsp27 (Fat-specific Protein of 27 kDa), welchem bereits früher eine entscheidende Rolle beim Wachstum von LDs zugeschrieben wurde [231-234]. So wurde in den älteren sowie in den jüngeren Arbeiten unter anderem gezeigt, dass Adipozyten, welche nicht über Fsp27 verfügen, nicht mehr nur über einen einzelnen unilokularen LD verfügen, sondern vielmehr über sehr viele kleinere LDs [232, 235]. Umgekehrt führt die kontrollierte Expression dieses Proteins zu einer Vergrößerung der vorhandenen LDs bei gleichzeitiger Reduzierung von deren Anzahl [233, 234]. Dass Fsp27 maßgeblich an der Fusion von LDs beteiligt ist, konnte dadurch gezeigt werden, dass Fsp27 in hohem Maße innerhalb von ca. fünf Minuten an der Kontaktstelle zwischen zwei LDs hochreguliert wird, wenn diese im Begriff sind, sich durch eine Fusion zusammenzuschließen [213]. Dies wird dadurch erleichtert, dass Fsp27 in der kompletten LD-Membran vorhanden ist und bei Bedarf sehr schnell über die LD-Oberfläche diffundieren kann, was durch GFP-Modifizierung nachgewiesen werden konnte [213]. Außerdem konnte mit Hilfe von FRAP-Experimenten gezeigt werden, dass tatsächlich ein direkter Lipidaustausch zwischen den beteiligten LDs stattfindet und zwar ausschließlich in Wildtyp-Adipozyten sowie in Zellen, in welchen Fsp27 überexprimiert wurde, nicht aber in Adipozyten, in welchen Fsp27 herunterreguliert wurde [213].

Die bidirektionale Lipidtransferrate wurde in dieser Publikation mit einem Wert von ca. 432 fl/h über FRAP-Messungen bestimmt. Dazu wurde einer der beteiligten LDs komplett ausgebleicht und die Regenerierung des Signals bei gleichzeitiger Verringerung des Signals in dem nicht ausgebleichten LD verfolgt [213, 236]. Mit Hilfe von Langzeitexperimenten wurde zudem der Nettotransport bestimmt, welcher eine mittlere Volumenänderung von 4,8 fl/h aufweist und nur stattfindet, wenn das Verhältnis zwischen Durchmesser von Akzeptor und Donor mindestens 1,2 beträgt [213]. Die Tatsache, dass der Lipidtransfer sowohl in lebenden wie auch in fixierten Zellen beobachtet werden konnte [213], spricht sehr dafür, dass durch Fsp27 wirklich ein Kanal zwischen den beiden LDs ausgebildet wird und der Transfer nicht etwa über Membranpumpen geschieht, welche eine Fixierung vermutlich nicht überstehen würden. Hauptverantwortlich für die Aktivität des Proteins Fsp27 scheinen dessen Aminosäuren 182-190 zu sein, während der N-terminale Bereich (Aminosäure 1-135) keine Rolle spielt [213]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Lipidaustausch in ausdifferenzierten Adipozyten 40fach höher ist als in Präadipozyten [213], bei welchen Fsp27 überexprimiert wird. Dies führt zu der Vermutung, dass weitere Adipozyten-spezifische Proteine vorhanden sein müssen, die das LD-Wachstum in Adipozyten beeinflussen [213].

Die aktuelle Hypothese der an dieser Arbeit beteiligten Arbeitsgruppe besteht darin, dass Fsp27 vermutlich gar nicht selber die hypothetische Pore generiert, sondern vielmehr nur eine stabilisierende Funktion um den hypothetischen Kanal übernimmt, um dann andere Proteine zu rekrutieren, welche dann die eigentliche Pore erzeugen (siehe Abbildung 3-40) [102].

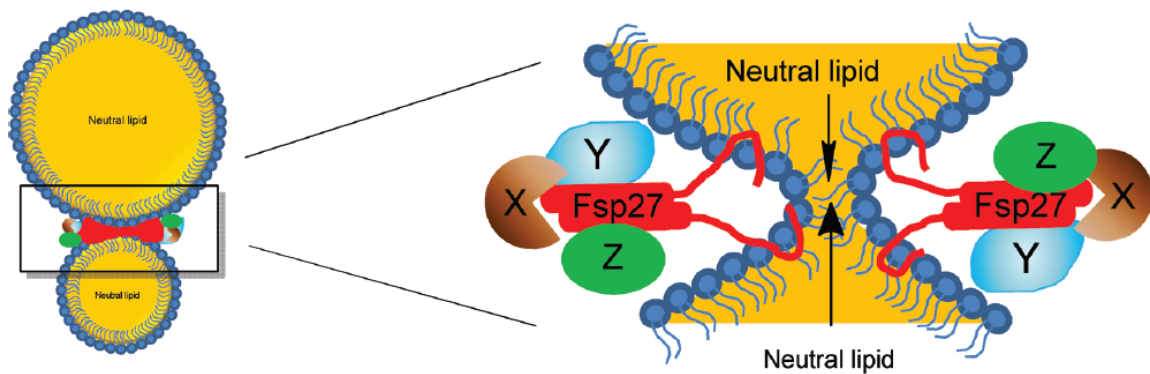


Abbildung 3-40 Modell für die Beteiligung von Fsp27 an dem Fusionsprozess. Dabei hat Fsp27 eine stabilisierende Funktion, während andere, noch unbekannte Proteine, für die eigentliche Erzeugung des Transferkanals verantwortlich sind (entnommen aus [102]; mit freundlicher Genehmigung von „Wolters Kluwer Health“).

Eine solche stabilisierende Funktion wurde auch bei verschiedenen anderen Prozessen bereits gezeigt, bei welchen zwei Membranen eine Kontaktstelle zwischen sich ausbilden (Membrane contact site), die den Abstand der beiden Membranen auf unter 30 nm verringert und so den Austausch von verschiedenen Stoffen ermöglicht [237]. In dem Zusammenhang wurde neben dem Austausch von Calcium auch ein Lipidaustausch zwischen verschiedenen Organellen bereits beschrieben [237]. Die dabei auftretende Stabilisierung durch einen Verankerungskomplex ist deshalb so wichtig, weil es ansonsten zu dem bereits angesprochenen Kollaps der Membran kommen könnte, weil sich die beiden Membranen ohne Stabilisierung einfach vereinigen könnten, um in einer instantanen Weise einen größeren LD zu bilden, für welchen aber wie gesagt nicht genügend Volumen zum kompletten Füllen vorhanden wäre. Ein stabilisierender Ring aus Fsp27 müsste demnach die direkte Oberflächenverschmelzung verhindern, um eine mehr geregelte Modifizierung der Gesamtoberfläche zu ermöglichen.

Tatsächlich konnten in einem weiteren FRAP-Experiment gezeigt werden, dass offensichtlich kein Kontinuum zwischen den beiden Oberflächen existiert. Dazu wurde ein GFP-markiertes Membranprotein in der Oberfläche des Akzeptors ausgebleicht [213]. Das Ausbleiben der Regeneration dieses Signals spricht dafür, dass die Oberflächen nicht in Verbindung stehen.

Das in Abbildung 3-40 dargestellte Schema zur Beteiligung von Fsp27 an der Fusion von LDs konnte inzwischen dahingehend ergänzt werden, als dass von zwei unabhängigen Gruppen nachgewiesen werden konnte, dass auch Perilipin 1 an diesem Mechanismus beteiligt ist [228, 229]. Das dadurch erweiterte Modell (siehe Abbildung 3-41) geht davon aus, dass Fsp27 an der Membrankontaktstelle in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen kann, und zwar in einer inaktiven Form oder in einer aktiven Form [229].

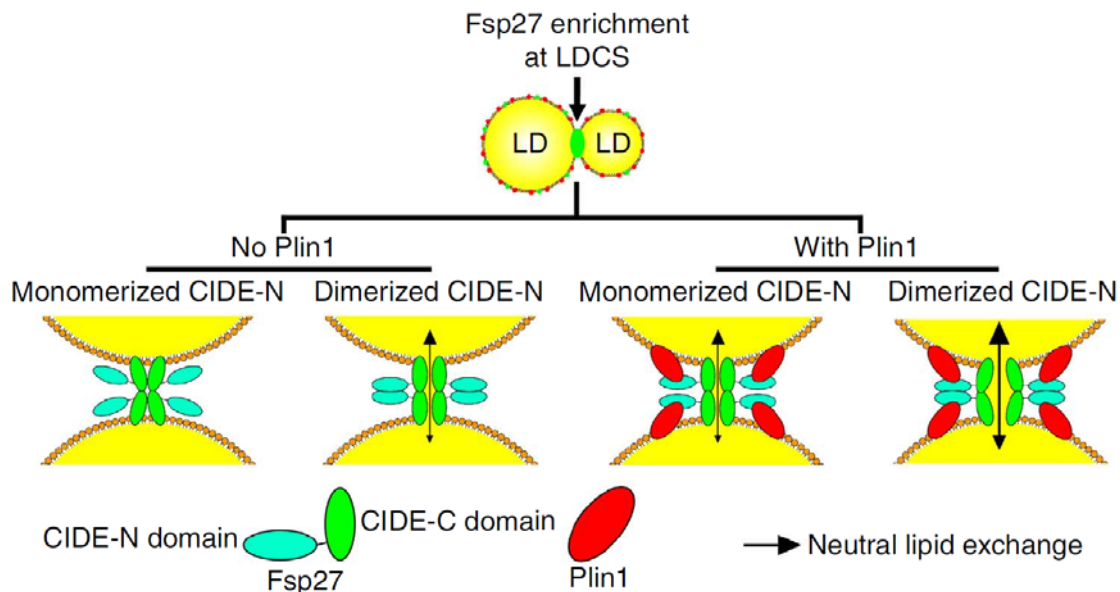


Abbildung 3-41 Ergänztes Modell der LD-Fusion, bei welcher neben Fsp27 auch Perilipin 1 beteiligt ist (entnommen aus [229]; mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group, <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/>).

Die aktive Form besteht dabei aus einem Homodimer zweier Fsp27-Moleküle und ermöglicht den Lipidaustausch und den Nettolipidtransfer zwischen den beteiligten LDs [229]. Perilipin 1 wiederum interagiert mit der CIDE-N-Domäne von Fsp27 und ändert dadurch die Konformation von Fsp27 dergestalt, dass die Stabilität der dimeren Form gestärkt wird [229]. Dadurch wird dann der Nettolipidtransport durch eine hypothetische Aufweitung der Pore verstärkt. Auch dies könnte erklären, warum es bei dem beobachteten Fusionsverhalten mit der Zeit zu einer Verlangsamung der Transferrate kommt, da mit dem Schrumpfen des Donors eine immer geringere Menge an den beteiligten Membranproteinen zur Verfügung steht, um diesen vermutlich sehr komplexen Mechanismus aufrecht zu halten.

Neben Fsp27 wurde mittlerweile auch nachgewiesen, dass Atlantin-GTPasen bei der Regulation der LD-Größe eine Rolle spielen. So konnte in *C. Elegans*, in *Drosophila melanogaster* sowie in COS7-Zellen gezeigt werden, dass das Herunterregulieren von Atlantin eine Verkleinerung der LDs und das Hochregulieren des Proteins eine Vergrößerung der LDs bewirkt [238]. Dies ist insbesondere daher interessant, da dieses

Protein bereits für seine Beteiligung an der homotypischen Fusion von ER-Membranen bekannt war [239-241] und die Membran der LDs vermutlich aus der ER-Membran gebildet wird. Obwohl es nicht so aussieht, als ob Atlastin dabei direkt an der LD-Oberfläche lokalisieren würde [238], scheint die durch Atlastin beeinflusste Fusion von ER-Membranen indirekt auch die Fusion von LDs zu beeinflussen.

Bei allen zuvor aufgestellten Überlegungen sollte man allerdings auch nicht außer Acht lassen, dass es theoretisch auch zu einem Austausch von Lipiden zwischen LDs ohne eine direkte Ausbildung von Kanälen kommen könnte, handelt es sich doch bei dem zu transportierenden Material vornehmlich um lipophile Substanzen, für welche die Membran eine mehr oder weniger hohe Permeabilität aufweist. Allerdings müsste es dann auch zu Fsp27-unabhängigen Transport kommen, wenn zwei LDs räumlich sehr nah beieinander liegen.

Ein weiterer Punkt, welcher gegen einen solchen permeabilitätsabhängigen Transport spricht, ist, dass auch relativ große Fettmoleküle und eine relativ große Menge an Proteinen übertragen werden muss. Aus diesem Grund erscheint die Existenz eines großen Lipidtransferkanals oder mehrerer kleiner Kanäle am plausibelsten, falls es nicht zu indirektem Transport über das ER kommt, welches nach einer gängigen Hypothese immer in direktem Kontakt mit den LDs steht.

Die hier beschriebenen Ergebnisse beweisen, dass die Volumenzunahme einzelner LDs mit dem langsamen direkten Lipidtransfer zwischen mehreren LDs zusammenhängt. Insofern kann die Hypothese bestätigt werden, dass eine langsame Fusion zwischen LDs stattfindet. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen zudem eindrücklich, dass die Gesamtvolumenzunahme des Akzeptors der Summe der Einzelvolumina aller Donoren entspricht. Dies heißt aber nicht, dass die Fusion wirklich der ausschließliche Mechanismus zur Volumenzunahme von LDs darstellt. In einem anderen Modellsystem als der adipogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen oder unter anderen Bedingungen könnte es vielmehr auch zu anderen Mechanismen kommen.

In einer aktuellen Publikation von Wifling et al. [1] konnte zumindest mittlerweile ein weiterer Mechanismus gezeigt werden. So konnten in dieser Publikation zwei unterschiedliche Populationen an LDs innerhalb einer Zelle nachgewiesen werden. Eine der beiden Populationen bleibt in ihrer Größe konstant, während die andere Population eine Volumenzunahme aufweist. Es ließ sich hierbei nachweisen, dass im Fall der zweiten LD-Population ein wichtiges Enzym der TG-Synthese, die Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase 4 (GPAT4) vom ER zu den LDs relokalisiert wird, wenn die Zellen mit einem Überschuss an Oleinsäure gefüttert werden. Dies ermöglicht dann ein LD-Wachstum ohne ein beobachtbares Fusionsverhalten.

### 3.2.6 Adipogene Differenzierung in einer dreidimensionalen Zellkultur

Zusätzlich zu der genauen Untersuchung der Fusionsprozesse während der adipogenen Differenzierung sollte analog zu den dreidimensionalen Transportprozessen in HeLa S3-Zellen (siehe Kapitel 3.2.3) auch ein spheroidales System mit den ADSCs erzeugt werden, um an diesem die adipogene Reifung zu verfolgen.

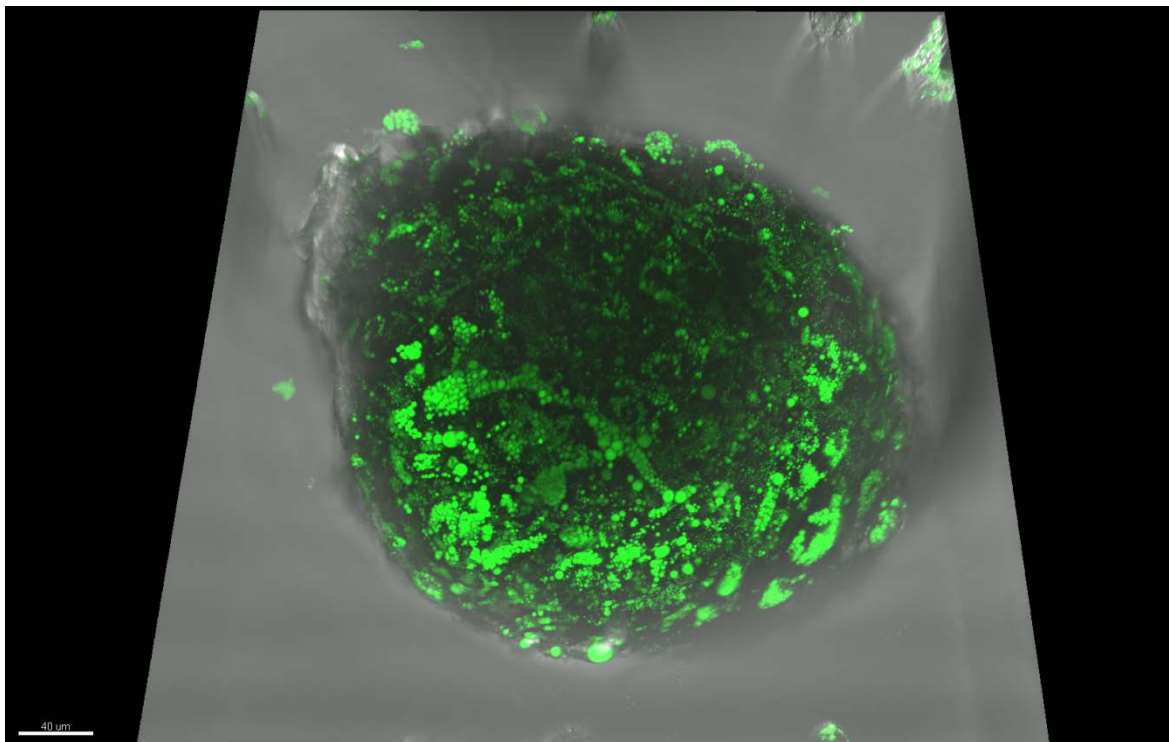


Abbildung 3-42 Konfokale Fluoreszenzaufnahme eines Spheroids aus ADSCs nach zweitägiger Inkubation im Differenzierungsmedium. LDs sind mit LD540 gefärbt. Scale bar: 40  $\mu\text{m}$ .

Die grundsätzliche Erzeugung der Stammzellspheroide erwies sich als ebenso zugänglich wie die Bildung der Spheroide aus HeLa S3-Zellen. Nachdem die Spheroide erfolgreich gezüchtet waren, wurden sie geerntet und mit dem adipogenen Differenzierungsmedium behandelt, wobei die Spheroide in den Auffangbehältern des Hanging-Drop-Systems verblieben, weil der dort vorhandene nicht adhären Boden die Stabilität des Spheroids garantiert. Ansonsten würde sich der Spheroid aufgrund der bevorzugten Haftung der Zellen an die Oberfläche im Laufe der Zeit ausbreiten, bis sämtliche Zellen Kontakt mit dem Boden aufweisen. Bereits nach zwei Inkubationstagen konnte eine beträchtliche Anzahl und Größe an LDs in dem Spheroid detektiert werden.

Wie bereits bekannt, geschieht die adipogene Reifung in einem solchen natürlicheren dreidimensionalen Gewebe wesentlich schneller als in einer 2D-Zellkultur [242-245].

In Abbildung 3-42 ist ein Beispiel eines derartigen aus mesenchymalen Stammzellen erzeugten Spheroids dargestellt, bei welchem die LDs mit dem selektiven Fluoreszenzfarbstoff LD540 angefärbt wurden.

Aufgrund der gewaltigen Menge an LDs in dem Gebilde und der daraus resultierenden Streuung des Anregungslichtes war es jedoch wiederum nicht möglich, mittels Mikroskopie besonders tief in diesen einzudringen. Vielmehr ließen sich nur die außen liegenden Lagen von zwei bis drei Zellschichten visualisieren, sei es nun mit CARS-Mikroskopie oder mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

Die Anwendung eines Light-sheet-Aufbaus zur Erhöhung der Eindringtiefe wäre daher möglicherweise vielversprechender [246]. Aus diesem Grund war es auch nicht möglich, die Fusionsprozesse von LDs in einem solchen Spheroid zu verfolgen, um die scheinbare schnellere Differenzierungsdynamik aufzulösen.

### **3.2.7 Lipolyse von LDs**

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, verfügt der menschliche Organismus in Form der Adipozyten über hochspezialisierte Fettspeicherzellen, welche große Mengen an Lipiden zur späteren Verwendung akkumulieren können. In diesem Kapitel soll nun auf die Dynamik eingegangen werden, bei welcher die gespeicherten Lipide wieder abgebaut werden.

Auch in diesem Fall waren Langzeitmessungen das geeignete Untersuchungssystem, da auch hierbei die stationären Bilder zu Beginn und Ende der Lipolyse nicht ausreichen, um wirklich quantitativ bestimmen zu können, wie sich die LDs während der Lipolyse genau verhalten. Es ist zwar offensichtlich, dass sich bei diesem Prozess die Gesamtmenge des gespeicherten Fettes und damit auch Anzahl und Größe der LDs verringern, aber auch hierzu gab es zwei widersprüchliche Erklärungsweisen. So könnte man zum einen denken, dass es als Umkehrschluss der zuvor gezeigten Fusion zu einer Fragmentierung der vorhandenen großen LDs kommt, bei welcher sich mehrere kleinere LDs aus einem großen LD abschnüren. Zum anderen könnte es aber auch zu einer kontinuierlichen Verringerung des Volumens einzelner LDs kommen. Erstere Hypothese wurde durch die Beobachtung untermauert, dass es bei der induzierten Lipolyse zu einem vermehrten Auftreten von sehr kleinen LDs im gesamten Cytoplasma kommt [247, 248], was leicht als Fragmentierungseffekt interpretiert werden kann. Des Weiteren wäre eine solche Fragmentierung in lauter kleine LDs von Vorteil für die abbauenden Lipasen, da diese mehr Angriffsfläche zur Verfügung hätten. Eine solche Fragmentierung würde aber auch wiederum bedeuten, dass die Zelle die dabei entstehende Oberflächenvergrößerung

durch Synthese von Membranbausteinen erst einmal bewerkstelligen muss, wofür wiederum Energie aufgewandt werden müsste.

Als zu untersuchendes Modellsystem wurden auch in diesem Fall ADSCs verwendet, wobei diese sich schon in einem fortgeschrittenen Differenzierungsstadium befinden müssen, damit es überhaupt zu einer Lipidfreisetzung kommen kann. Da hierbei keine LD-Bewegung oder LD-Fusion zu beobachten war, wurden die LDs in diesem Fall nicht mit CARS-Mikroskopie visualisiert, sondern wiederum mit dem lipidspezifischen Farbstoff LD540. Zur Untersuchung der Lipolyse konnte dabei eine Farbstoffkonzentration sowie eine Laserintensität gefunden werden, die zu keiner offensichtlichen Beeinflussung der Messergebnisse führte. Da die Lipolyse wesentlich schneller abläuft als die zuvor beschriebene Fusion und Reifung von LDs, wurden die ADSCs zwar auch in diesem Fall in Petrischalen mit Glasboden, aber ohne die zuvor verwendeten Inserts kultiviert. Dies war zusätzlich von Vorteil, da es ansonsten bei Verwendung von LD540 zu einer starken ungewünschten Anfärbung des Inserts kommt, worunter die eigentlich gewollte LD-Färbung leidet, da ein Großteil der eingesetzten Menge direkt an das Insert bindet und sich nicht mehr in den LDs anreichern kann. Nach der Anfärbung und dem Waschen wurden die Zellen mit Forskolin (siehe Abbildung 3-43) versetzt, einer pflanzlichen Substanz aus dem Harfenstrauch *Plectranthus barbatus*, welche die Lipolyse stimuliert und daher auch in großem Maße als Nahrungsergänzungsmittel verkauft wird.

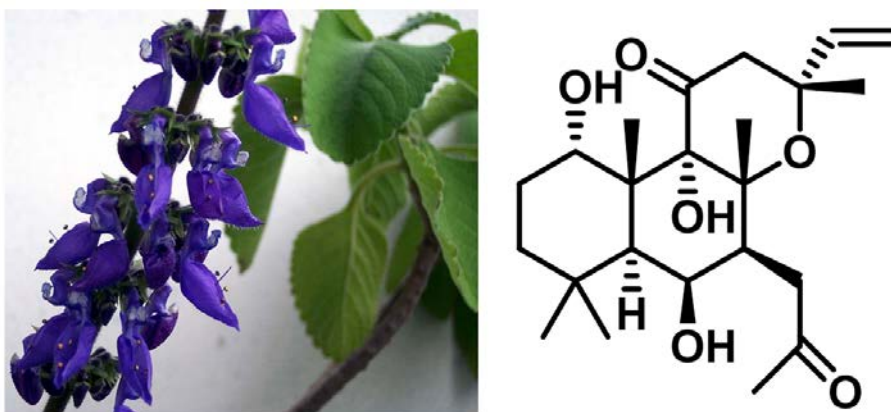


Abbildung 3-43 Forskolin wird aus dem Harfenstrauch (links) gewonnen und als Nahrungsergänzungsmittel zur Gewichtsreduktion verkauft.<sup>4</sup>

Forskolin bindet als unspezifischer Stimulator Adenylylcyclasen in mikromolarer Konzentration (siehe Abbildung 3-44), was die enzymatische Umwandlung von ATP zu cAMP katalysiert und dadurch in Signaltransduktionsprozesse von verschiedenen Rezeptoren eingreift.

<sup>4</sup> Die gezeigte Aufnahme des Harfenstrauches wurde im Februar 2013 von der Internetseite <http://www.treklen.com/gallery/photo300590.htm> entnommen.

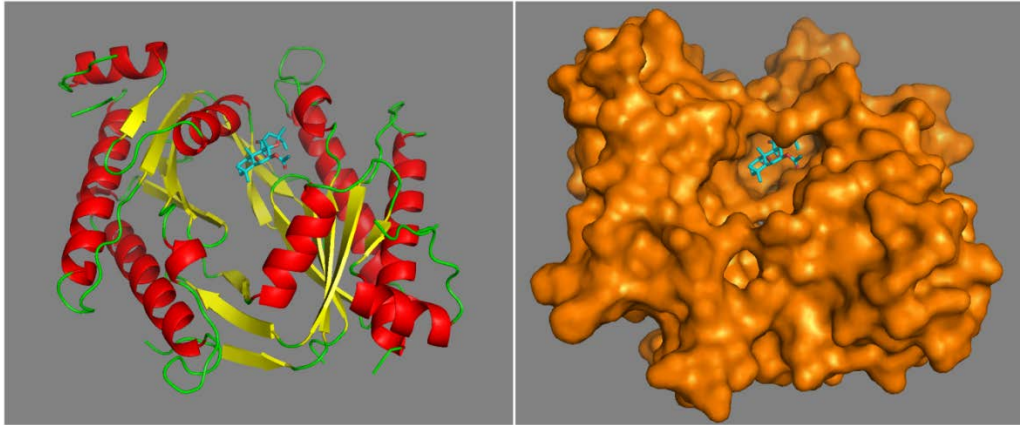


Abbildung 3-44 Forskolin (cyan) bindet in der Bindungstasche einer Adenylyl cyclase (PDB: 1AB8).

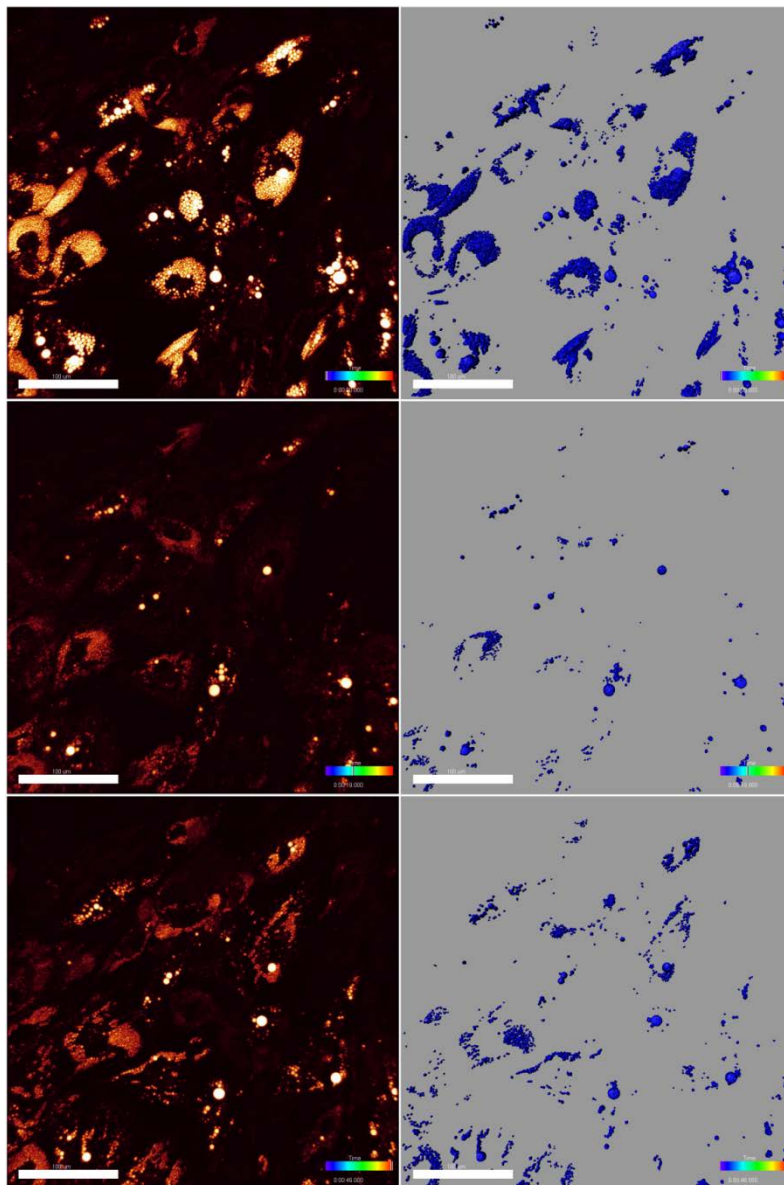


Abbildung 3-45 Volumenänderung des Lipidgehaltes einer Zellpopulation durch Forskolinzugabe ( $10 \mu\text{M}$ ). LDs sind mit LD540 gefärbt. Oben: Start. Mitte: Nach 8,5 h. Unten: Nach 23 h. Scale bar:  $100 \mu\text{m}$ .

Direkt nach der Forskolinzugabe wurden die Zellen in der Lebendzellinkubationskammer auf das Mikroskop gelegt, um die Reaktion der Zellen auf die Stimulation zu beobachten. Erwartungsgemäß kommt es dabei zu einer drastischen Abnahme der LD-Menge und LD-Größe (siehe Abbildung 3-45).

Interessanterweise ist bei dieser Größenreduktion aber niemals eine Fragmentierung zu beobachten, bei welcher kleinere LDs in der Nähe von kleiner werdenden großen LDs auftauchen.

Vielmehr werden scheinbar alle LDs langsam und kontinuierlich abgebaut, wobei kleinere LDs wegen dem größeren Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis effizienter abgebaut werden sollten. Eine weitere wichtige Beobachtung ist, dass sich nach einer gewissen Zeitspanne die Lipidmenge wieder erhöht und dass erneut sehr viele neue kleine LDs entstehen (siehe Abbildung 3-46).

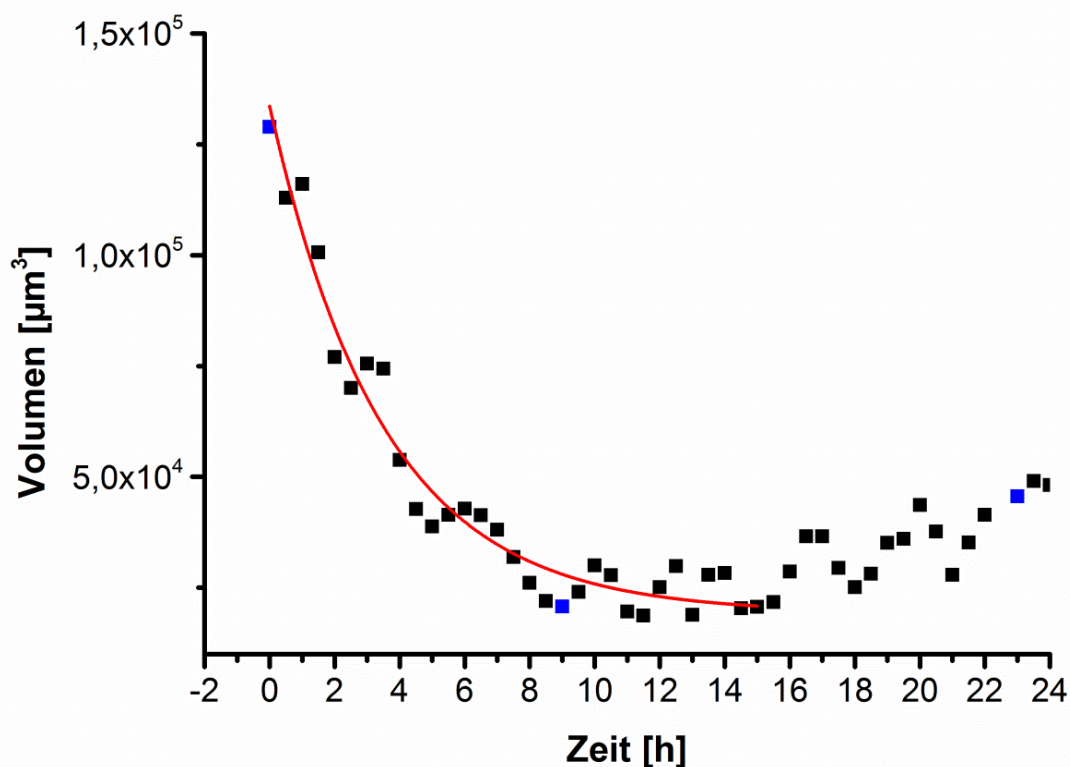


Abbildung 3-46 Quantitative Bestimmung der Änderung des insgesamt in der Zellpopulation messbaren Lipidvolumens, stimuliert durch Forskolinzugabe. Blau: Zeitpunkte, welche auch in Abbildung 3-45 zu sehen sind. Zur besseren Übersicht wurden die Werte mit einer exponentiellen Funktion angenähert (rot).

So zeigt die quantitative Analyse der Gesamtlipidmenge über die Zeit, dass sich diese zunächst drastisch verringert, bis ein Minimalwert nach ca. zwölf Stunden erreicht ist. Dabei verringert sich das gemessene Gesamtvolumen der beobachteten Zellpopulation

von ungefähr 130 pL auf ca. 25 pL. Im Anschluss an diese Lipiddegradation kommt es zu einer kurzen stationären Phase und ab ungefähr der vierzehnten Stunde zu einem erneuten Anstieg der Gesamtlipidmenge, wobei viele kleine LDs neusynthetisiert werden (siehe Abbildung 3-47).

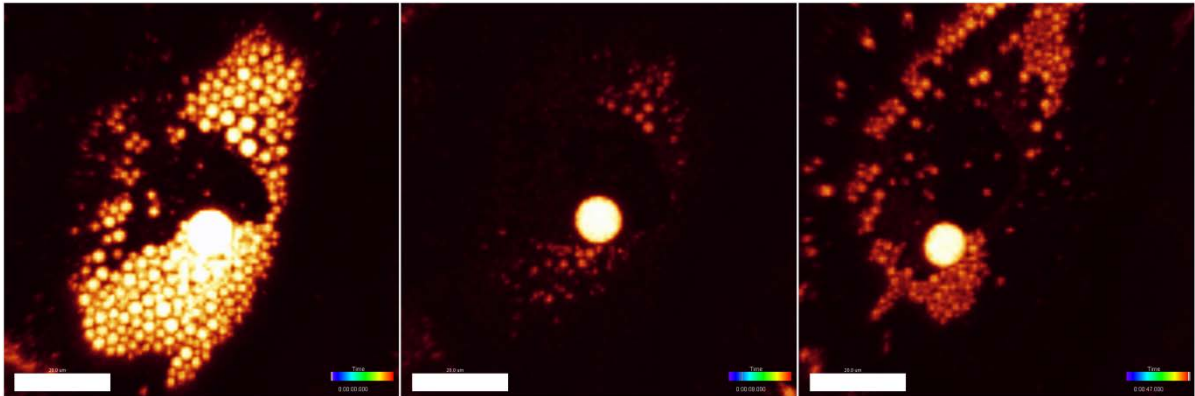


Abbildung 3-47 Durch stimulierte Lipolyse kommt es zunächst zu einer Verkleinerung aller in der Zelle vorhandenen LDs. Nach einiger Zeit ist ein Minimum erreicht und ein Großteil der kleinen LDs komplett abgebaut. Dann beginnt die Zelle mit der Neusynthese von LDs. Links: Start der Forskolininkubation. Mitte: 4,5 h nach Forskolinzugabe. Rechts: 23,5 h nach Forskolinzugabe. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$

Diese Neusynthese könnte zum einen daran liegen, dass die Wirkung des Forskolins nach dieser Zeit bereits erschöpft ist oder aber daran, dass die Zellen auf die Unmengen an zuvor freigesetzten Lipiden in ihrer Umgebung reagieren müssen.

Um dies zu vermeiden, ist zwar eine gewisse Menge an fettfreiem BSA als zusätzliches Additiv hinzugegeben worden (2 % im Nährmedium) [207], welches die frei gewordenen Fettsäuren komplexiert und somit unschädlich macht, dennoch reichert sich die Menge an freien Fettsäuren im Kulturmedium sicher derart an, dass sie in toxischen Mengen vorliegen, so dass die Zellen genötigt sind, diese erneut aufzunehmen, um sie in neu synthetisierte LDs einzulagern.

Vermutlich korreliert diese Beobachtung auch mit der Hypothese, dass es bei der Lipolyse von LDs zu einer Fragmentierung kommt [247, 248], wurde doch bei diesen scheinbaren Fragmentierungsbeobachtungen auf die Zugabe von fettfreiem BSA zur Komplexierung der freiwerdenden Fettsäuren verzichtet.

Daher ist es also sehr wahrscheinlich, dass in diesen Fällen der Abbau der LDs bei gleichzeitiger Neubildung von LDs beobachtet wurde. Durch die dadurch sichtbare Verkleinerung der großen LDs und dem simultanem Auftreten großer Mengen von kleinen LDs kann man durchaus zu dem Eindruck kommen, die großen LDs würden in kleinere LDs zerfallen.

Durch die hier durchgeführten Experimente konnte jedoch gezeigt und damit Ergebnisse einer Kooperationsgruppe aus Graz bestätigt werden [207], dass es ausschließlich zu einer kontinuierlichen Verkleinerung der LDs kommt, so lange das freiwerdende Fett durch BSA komplexiert oder anderweitig abgeführt werden kann. Die Anwendung von Forskolin als Nahrungsergänzungsmittel zur Gewichtsreduktion erscheint daher jedoch auch eher fraglich, da die abgebauten Fettsäuren theoretisch direkt wieder eingebaut werden könnten, wenn sie nicht anderweitig verbraucht oder aus dem Körper ausgeschleust werden.

Betrachtet man sich die Degradation einzelner LDs genauer, kann man die durch Forskolin stimulierte enzymale Abbaurate relativ genau bestimmen. In Abbildung 3-48 ist noch einmal ein vergrößerter Ausschnitt der auch zuvor gezeigten Messung zu sehen. Auch hier ist wieder eindrücklich erkennbar, wie sich die einzelnen LDs kontinuierlich verkleinern, wobei die kleineren LDs komplett verschwinden, während die größeren LDs nur teilweise abgebaut werden können.

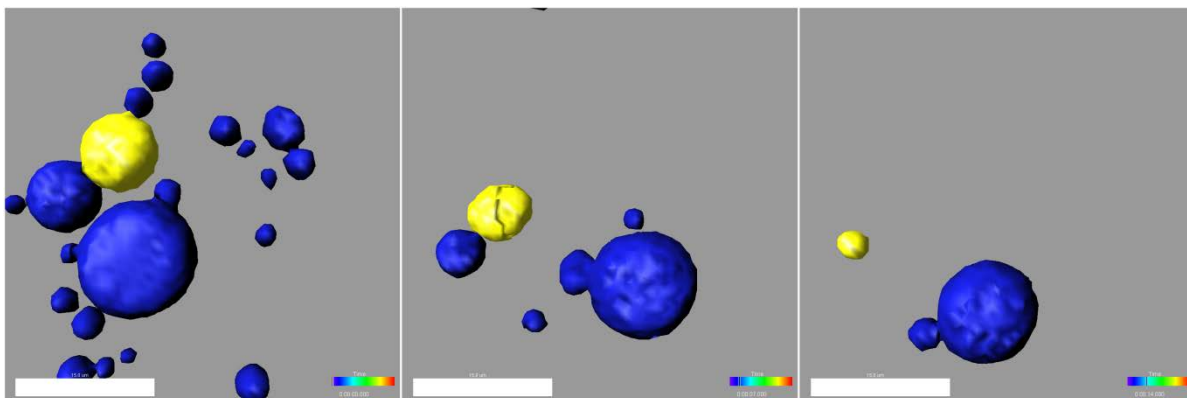


Abbildung 3-48 Rendering der Volumenänderung einzelner LDs innerhalb einer Zelle nach Forskolinzugabe. Links: Startpunkt. Mitte: Nach 3,5 h. Rechts: Nach 7 h. Scale bar: 15 µm.

Der Abbau eines einzelnen LDs geschieht dabei in einer exponentiellen Weise, wie man z.B. an der Auftragung des gerenderten Volumens des in Abbildung 3-48 gelb markierten LDs gegen die Zeit erkennen kann (siehe Abbildung 3-49). Genauer lässt sich dies quantifizieren, indem man die Abbauverläufe von mehreren LDs zunächst einzeln auswertet, um daraus ein gemeinsames Degradationsverhalten zu erhalten. Dazu wurde die Volumenabnahme der einzelnen LDs so übereinander gelegt, dass eine einzelne Abbaukurve mathematisch bestimmt werden konnte (siehe Abbildung 3-50). Hierbei fällt auf, dass die Abbaurrate mit kleiner werdendem Vesikel abnimmt, was der Theorie widerspricht, dass das größer werdende Oberfläche/Volumen-Verhältnis eine höhere Lipolyseeffizienz ermöglicht. Vielmehr bieten größere LDs wohl einfach eine größere Angriffsfläche für die Lipasen und werden daher schneller abgebaut als kleine Vesikel.

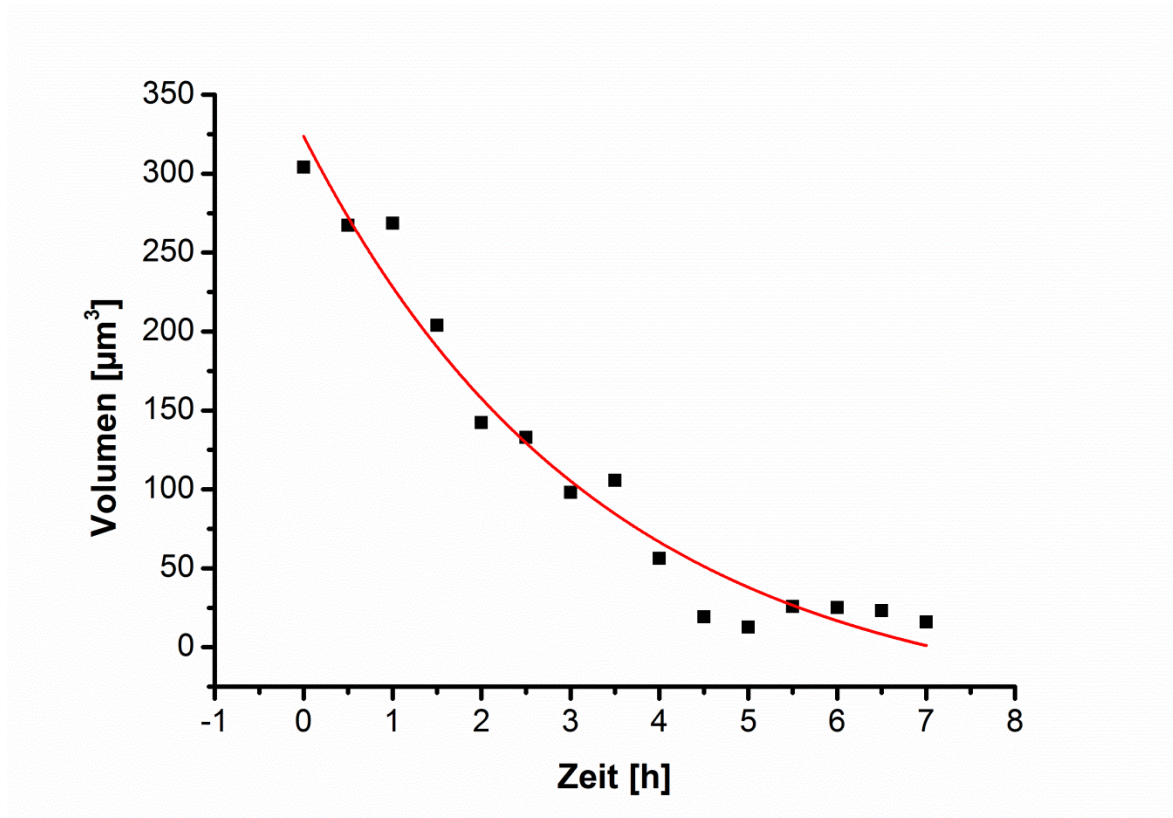


Abbildung 3-49 Exponentielle Abnahme des Volumens von dem gelb markierten LD aus Abbildung 3-48.

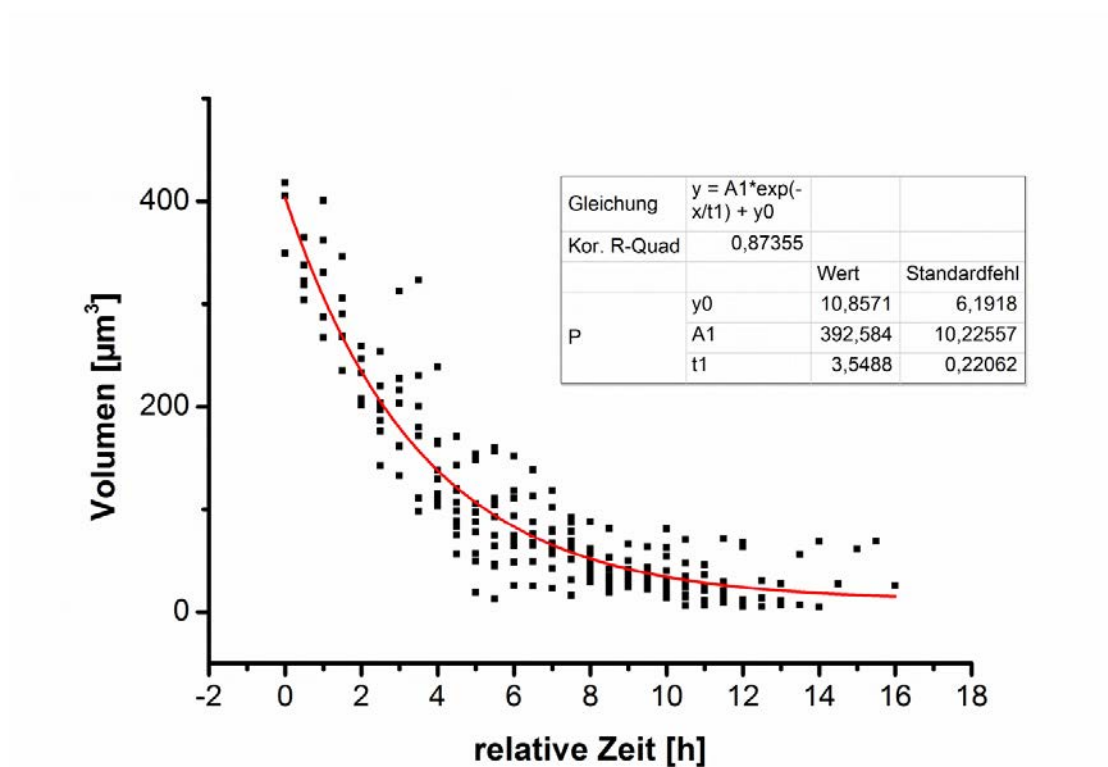


Abbildung 3-50 Exponentielle Abnahme des Lipidvolumens einzelner LDs, generiert aus 13 unabhängigen LDs.

### **3.3 Mikrofluidische Untersuchung der Differenzierungseffizienz von humanen mesenchymalen Stammzellen<sup>5</sup>**

Wie bereits erwähnt, sind primäre mesenchymale Stammzellen in der Lage, sich unter bestimmten Kultivierungsbedingungen in Osteoblasten, Chondrozyten sowie in Adipozyten auszudifferenzieren zu lassen. Diese Differenzierungsfähigkeit macht die mesenchymalen Stammzellen für den klinischen Gebrauch sehr interessant, da ein solches Differenzierungspotential es erlaubt, künstliches Gewebe zu konstruieren [249], welches nach chirurgischen Eingriffen das entfernte Gewebe ersetzen könnte (regenerative Medizin) [250]. Gewebe aus ausdifferenzierten Adipozyten könnte also z.B. in Form von künstlich ausgebildetem Fettgewebe in der rekonstruktiven Chirurgie als „Füllmaterial“ Verwendung finden. Ein solches Tissue-Engineering, also die Entwicklung biologischer Ersatzgewebe, kommt bereits in den unterschiedlichsten medizinischen Projekten zum Einsatz. So konnten bereits künstliche Herzklappen präklinisch untersucht werden [251] und künstliches Haut- und Knorpelgewebe findet bereits klinische Anwendungen [252]. Ein großes Problem dabei stellen allerdings immunologische Abstoßungsreaktionen dar, weshalb der Einsatz von adulten Stammzellen vielversprechend erscheint. Alternativ könnte man natürlich auch erwägen, primäre Adipozyten zu isolieren, um diese direkt wieder als Gewebeersatz verwenden zu können. Allerdings ist die Kultivierung und Vermehrung von primären Adipozyten sehr schwierig.

Bevor die aus mesenchymalen Stammzellen generierten künstlichen Gewebe ihren Einsatz in der klinischen rekonstruktiven Chirurgie finden können, ist es jedoch zuvor zwingend erforderlich, den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei den in dem generierten Gewebe vorhandenen Zellen wirklich in erster Linie um ausdifferenzierte Adipozyten handelt und nicht etwa noch eine große Anzahl an undifferenzierten Stammzellen oder anderen Fremdzellen wie Fibroblasten vorhanden ist. Bisher konnte eine solche quantitative Verifizierung ausschließlich durch den Einsatz von invasiven Methoden wie der histochemischen Färbung oder der Durchflusszytometrie (FACS) bewerkstelligt werden [253]. Dadurch hat man mit dem Nachteil zu leben, dass man einen relativ großen Teil der erzeugten Zellen bereits zur Quantifizierung benötigt und diesen Zellanteil anschließend verwerfen muss, so dass dieser nicht mehr zur eigentlichen Gewebekonstruktion verwendet werden kann. Mit der Raman-Spektroskopie sowie der CARS-Mikroskopie wäre man hingegen in der Lage, in kurzer Zeit eine sehr große Zellzahl in Hinblick auf den Differenzierungsgrad zu untersuchen und eben diese Zellen weiter benutzen zu können, um künstliche Gewebe aufzubauen.

---

<sup>5</sup> Die Ergebnisse dieses Abschnittes entstanden im Zusammenhang des von der Baden-Württemberg Stiftung geförderten Verbundprojektes „Anfärbefreie, chemisch selektive Mikroskopie für schnelles Zellscreening“

Der in dieser Arbeit erprobte Ansatz zur Quantifizierung der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen beruht auf einer mikrofluidischen CARS-Applikation, bei welcher die Zellsuspension nach einem gewissen Differenzierungszeitraum durch eine Flusszelle geschleust werden soll, um dann mittels CARS-Mikroskopie an jeder einzelnen Zelle den Differenzierungsgrad zu detektieren. Erste Experimente, bei denen die CARS-Mikroskopie mit mikrofluidischen Kanälen verknüpft sind, wurden bereits durchgeführt und dienen unter anderem der Analyse von Adipozyten [254] sowie von Hefezellen [255]. Um zunächst einmal ein Gefühl für die Anwendbarkeit solcher mikrofluidischen Flusszellen zu gewinnen, wurden erste vereinfachte Experimente durchgeführt, bevor mit den eigentlichen Messungen an den ausdifferenzierten Stammzellen begonnen wurde.

### **3.3.1 Untersuchung des Mischverhaltens von THF und Wasser in einem mikrofluidischen Chip mittels CARS-Mikroskopie**

Mikrofluidische Zellen finden neben einer Reihe von biologischen Anwendungen [256-259] auch viele Einsatzgebiete in der Chemie, bieten sie doch eine Möglichkeit, Reaktionen auf sehr kleinem Raum mit sehr geringen Mengen an Reaktanden durchzuführen. Auch zur Partikelsynthese können solche Kanäle verwendet werden [260-263]. In solchen Fällen befindet sich beispielsweise ein Polymer in einem Lösungsmittel und wird durch den Kanal gepumpt. Durch zwei angrenzende Kanäle wird zusätzlich Wasser gepumpt, so dass es zu einem laminaren Strom der Polymerlösung in umgebendem Wasser kommt. Nach und nach vermischen sich dann die wässrige und die organische Phase und das Polymer, welches unlöslich in Wasser ist, beginnt auszufallen. Dass es zu einem solchen Mischverhalten kommt, ist offensichtlich, eine interessante Frage ist allerdings, wie schnell ein solcher Mischprozess abläuft und welche Distanz zurückgelegt werden muss, bis sich die wässrige und die organische Phase komplett durchmischt haben. Um dies zu untersuchen, wurde ein System gewählt, bei welchem sich ein laminarer Fluss aus reinem THF mit Wasser vermischen soll.

Die quantitative Konzentrationsbestimmung wird dabei dadurch ermöglicht, dass das THF ein deutliches CARS-Signal bei der CH-Schwingung aufweist, während das Wasser lediglich einen nichtresonanten Hintergrund liefert. Zur eigentlichen Messung wurde ein kommerziell erhältlicher mikrofluidischer Chip (Focussed flow droplet generator, Micronit) auf dem Mikroskop platziert, wofür zunächst ein eigens entworfener Halter von der wissenschaftlichen Werkstatt der Universität Konstanz produziert werden musste. Mit Hilfe zweier Spritzenpumpen wurde dann sowohl das THF als auch das Wasser in die Kanäle gepumpt. Danach war es möglich, das Mischverhalten näher zu betrachten und es fiel dabei auf, dass zur vollständigen Durchmischung eine unerwartet große Distanz zurückgelegt werden muss.

Zur quantitativen Auswertung dieses Mischverhaltens wurden mehrere Bilder entlang des Kanals aufgenommen und nach der Messung aneinander gehängt. Das dadurch erzielte Gesamtbild zeigt, wie sich der laminare THF-Fluss über mehrere Millimeter hinzieht, wobei das CARS-Signal im laminaren Strom immer weiter abnimmt (siehe Abbildung 3-51).



Abbildung 3-51 Visualisierung des Mischverhaltens von THF und Wasser in einem mikrofluidischen Chip mit Hilfe der CARS-Mikroskopie. Scale bar: 300  $\mu\text{m}$ .

Als nächstes sollte dann versucht werden, das durch das Mischverhalten der beiden Flüssigkeiten erzeugte Konzentrationsgefälle des THFs quantitativ zu bestimmen. Es ist also interessant zu wissen, wie viel Prozent THF sich abhängig von dem Startpunkt noch in der Mitte des laminaren Flusses befindet bzw. in welchem Maße es sich bereits mit dem umgebenden Wasser durchmischt hat. Eine direkte Bestimmung der Konzentration über das gemessene CARS-Signal ist jedoch nicht einfach möglich, da es sich bei CARS wie gesagt um einen nichtlinearen Prozess handelt (siehe Kapitel 2.3.2).

Um aus dem CARS-Signal dennoch einen THF-Konzentrationswert ablesen zu können, wurden daher zunächst Kalibrationsmessungen durchgeführt. Dazu wurden vorgemischte Lösungen mit definierten THF-Konzentrationen in Wasser durch den THF-Kanal geschickt. An dem Punkt, an welchem die beiden Kanäle aufeinandertreffen, wurden dann z-Stacks aufgenommen, um die Signalstärke dieser Konzentrationen aufzunehmen (siehe Abbildung 3-52). Dabei wurden jedoch nicht die reinen Intensitätswerte der vorgemischten THF-Lösungen als Messwerte genommen, sondern vielmehr die Quotienten aus maximalem Signal und dem Wert des nichtresonanten Signals des aus Glas gefertigten mikrofluidischen Chips. Dadurch wurde der Fehler minimiert, der durch systemabhängige Schwankungen entstehen könnte.

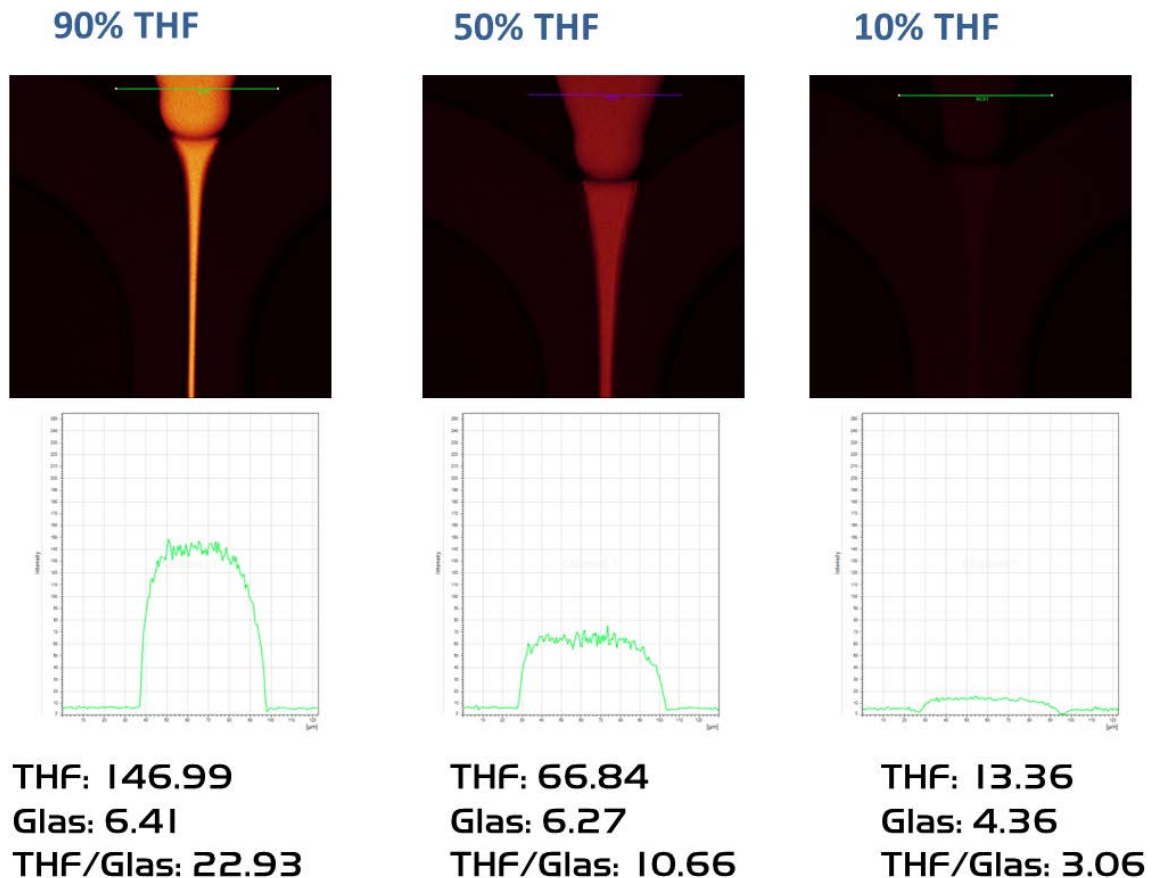


Abbildung 3-52 Messungen von vorgemischten THF/Wasser-Gemischen im mikrofluidischen Kanal zur Erzeugung einer Kalibrationskurve.

Auf diese Weise konnte eine Kalibrationskurve (siehe Abbildung 3-53) erstellt werden, mit deren Hilfe es möglich ist, das Mischverhalten von THF in Wasser quantitativ auszuwerten. Die gemessene Intensität des CARS-Signals nimmt dabei abhängig von der tatsächlichen THF-Konzentration in einer exponentiellen Form zu (siehe Abbildung 3-53).

Diese Kalibrationskurve konnte dann wiederum verwendet werden, um das Konzentrationsgefälle des THF-Gehaltes in dem laminaren Strom bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten auszuwerten (siehe Abbildung 3-54). So nimmt die THF-Konzentration bis zu einer Distanz von 6 mm kontinuierlich in einer exponentiellen Weise ab, wobei der Mischprozess umso schneller abläuft, je langsamer die Pumpgeschwindigkeit eingestellt ist, mit welcher das THF in den Kanal gepumpt wird. Nach den 6 mm erreicht die THF-Konzentration einen Wert von ungefähr 20 % und ist damit fast vollständig mit dem umgebenden Wasser vermischt.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse sind im Rahmen einer Publikation bereits veröffentlicht worden [264].

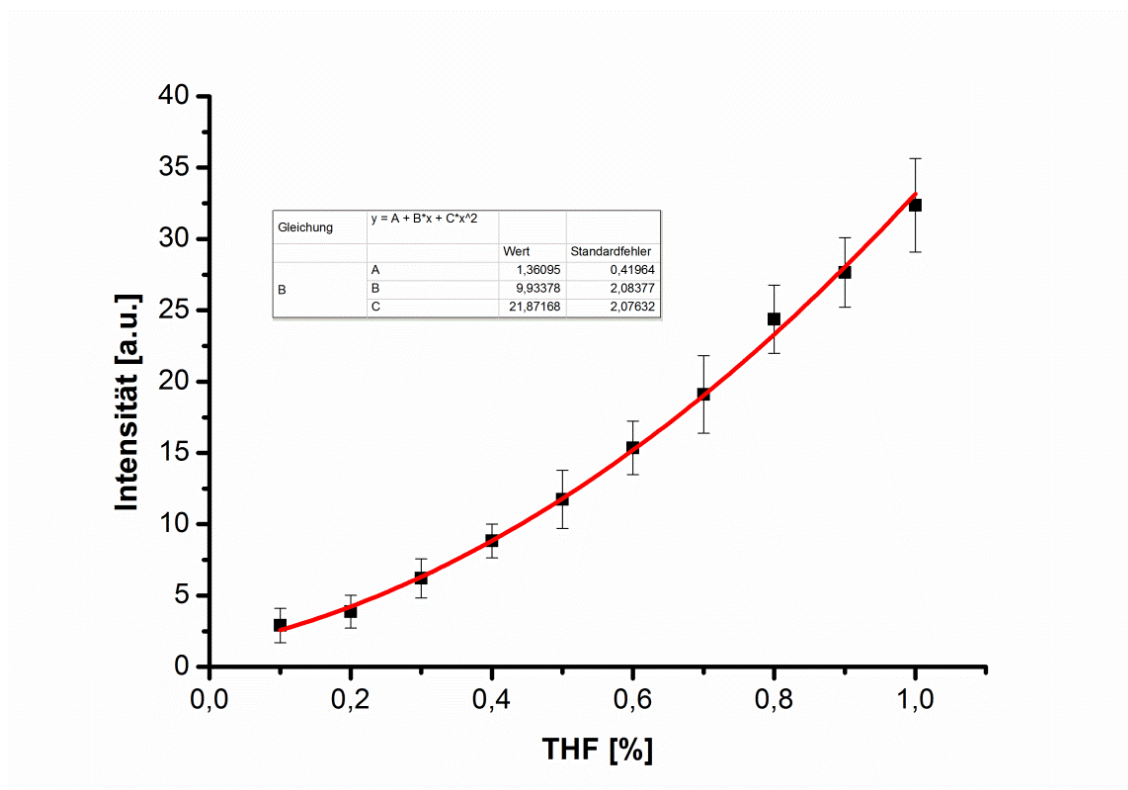


Abbildung 3-53 Kalibrationskurve zur Quantifizierung der THF-Konzentration in Abhängigkeit der CARS-Intensität.

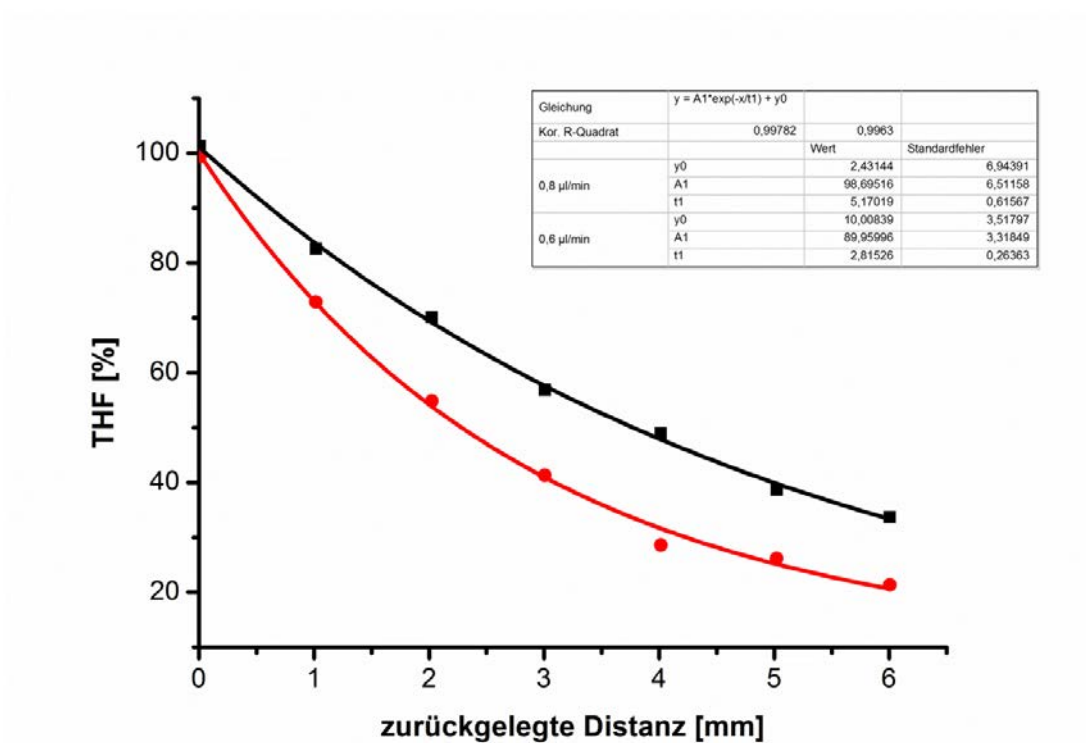


Abbildung 3-54 Quantitative Bestimmung der THF-Konzentration in Abhängigkeit von der zurückgelegten Strecke bei unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [264]; mit freundlicher Genehmigung der Royal Society of Chemistry).

### 3.3.2 Quantitative Bestimmung der adipogenen Differenzierung von ADSCs

Nach diesen ersten mikrofluidischen Vorversuchen sollte anschließend versucht werden, die eigentlich Fragestellung zu lösen, bei der es darum ging, bei einer vorgegebenen Zellpopulation an mesenchymalen Stammzellen den Anteil der Zellen zu bestimmen, welche in ihrer adipogenen Differenzierung bereits fortgeschritten sind, was sich durch ein starkes CARS-Signal bemerkbar machen sollte. Diese Messungen wurden zusammen mit Patrick Roser während seiner Bachelorarbeit durchgeführt, welche von Rabia Görgülü betreut wurde [265].

Dabei wurden die zu untersuchenden mesenchymalen Stammzellen zwei Wochen lang in dem entsprechenden Differenzierungsmedium kultiviert und im Anschluss daran geerntet. Die dabei gewonnene Zellsuspension wurde dann noch durch Zentrifugation aufkonzentriert und in einer Spritze aufgezogen. Mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Spritzenpumpe wurde die Suspension dann durch einen mikrofluidischen Kanal (Thin bottom flow cell, Micronit) geschickt, welcher auf dem konfokalen Mikroskop platziert war. Durch kontinuierliche Aufnahmen war es so möglich, den Fluss einzelner Zellen durch den Kanal zu verfolgen, wobei je nach Differenzierungsgrad unterschiedlich starke CARS-Signale detektiert wurden. Rein visuell ließen sich die Signale dabei in drei Kategorien aufteilen (siehe Abbildung 3-55).

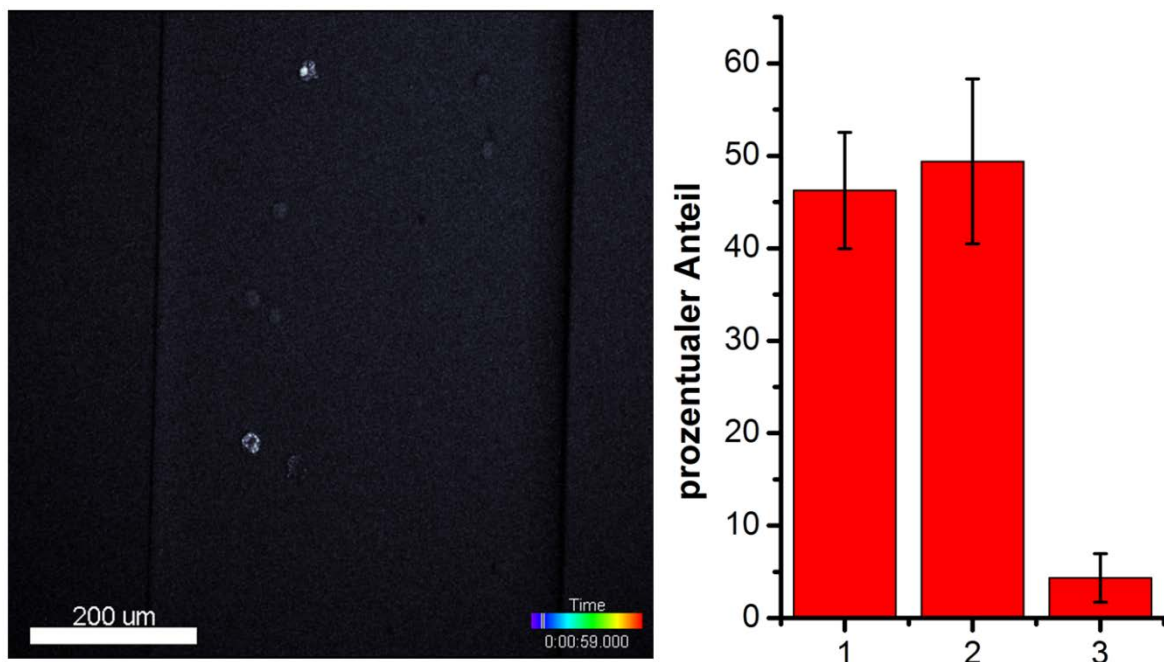


Abbildung 3-55 Links: Visualisierung der durch einen mikrofluidischen Kanal gepumpten gemischten Zellpopulation. Rechts: Quantifizierung des Fortschrittes der adipogenen Differenzierung innerhalb der verwendeten Zellpopulation. 1: Zellen mit starkem Signal. 2: scheinbar undifferenzierte Zellen. 3: nicht eindeutig zuzuordnende Zellen.

Dabei handelte es sich um Zellen, die aufgrund ihres starken Signals mit großer Wahrscheinlichkeit schon weit in ihrer Differenzierung fortgeschritten sind, um Zellen, die kein Signal aufweisen und somit noch undifferenziert sind sowie um Zellen, die nicht eindeutig zugeordnet werden können, da sie sich z.B. nicht in der richtigen Fokusebene befinden.

Das manuelle Auszählen dieser verschiedenen Populationen ergab, dass im Durchschnitt ungefähr 45 % der mesenchymalen Stammzellen nach zweiwöchiger Inkubationsphase in adipogenem Differenzierungsmedium eine große Lipidmenge enthielten, während ca. 50 % der Zellen scheinbar noch undifferenziert sind (siehe Abbildung 3-55). Lediglich 5 % der Zellen ließen sich nicht eindeutig zuordnen, was als durchaus vielversprechend für die Anwendbarkeit dieser Methodik zu werten ist.

Das vorgestellte System, welches in der Kombination von CARS-Mikroskopie und der Mikrofluidik besteht, könnte daher einen wichtigen Beitrag leisten, um große Mengen an Zellen in einer kurzen Zeit auf einen bestimmten Parameter zu untersuchen, wobei dies nicht auf das aufgeführte Beispiel beschränkt ist. So könnte man z.B. auch aus einem Patienten entnommene Zellen auf bestimmte Krankheiten untersuchen, um eine schnelle Diagnostik zu ermöglichen. So besitzen z.B. auch zirkulierende Tumorzellen aus Prostatakrebspatienten ein sehr hohes CH-Signal, welches sich klar von normalen gesunden Zellen abgrenzen lässt und welches bereits mittels CARS-Mikroskopie zur Identifizierung herangezogen wurde [266].

### 3.4 Bestimmung der Viskosität in LDs

Da es sich bei LDs um Vesikel handelt, welche größtenteils mit Lipiden gefüllt sind, kann man davon ausgehen, dass sich die Viskosität innerhalb dieser Organellen deutlich von der Viskosität des umgebenden wässrigen Cytoplasmas unterscheidet. Die genaue Bestimmung dieses Parameters könnte wichtige Hilfestellungen bei der Beantwortung mehrerer offener Fragen leisten. So könnte dieser Wert z.B. beim Verständnis der biophysikalischen Grundlagen helfen, auf welchen die zuvor beschriebenen Fusionsvorgänge von LDs (siehe Kapitel 3.2.5) beruhen. Außerdem wäre es von Interesse zu erkunden, ob es eine Heterogenität innerhalb der LD-Population einer einzelnen Zelle gibt oder ob sämtliche LDs die gleiche Viskosität aufweisen.

Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang, dass es eine Korrelation zwischen der Größe von LDs und deren Viskosität geben könnte oder aber auch, dass es unabhängig von der Größe mehrere Subpopulationen unterschiedlicher Viskosität gibt. Eine weitere Fragestellung wäre, ob die LD-Viskosität zwischen verschiedenen Zellarten variiert, also ob sich z.B. die Viskosität in LDs in HeLa S3-Zellen, welche durch Zugabe von Fettsäuren stressbedingt induziert wurden (siehe Kapitel 3.2.1) von der Viskosität von LDs in ausdifferenzierten Adipozyten (siehe Kapitel 0) unterscheidet.

Denkbar wäre auch, dass es bei dem adipogenen Differenzierungsprozess zu einer kontinuierlichen Veränderung der LD-Viskosität kommt, also dass es einen Reifungsprozess während der Differenzierung gibt.

Eine weitere Fragestellung wäre, ob sich die Viskosität durch bestimmte Parameter, z.B. durch externe Eingriffe verändern lässt. Wie in einem früheren Kapitel beschrieben (siehe Kapitel 3.1), kann man durch Färbung der LDs mit einem bestimmten Farbstoff und anschließende Laserbestrahlung eine unnatürliche Fusion dieser Organellen provozieren. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die LDs durch die Bestrahlung des Farbstoffes derart aufgeheizt werden, dass es zu einer regelrechten Verschmelzung der LDs kommt. Eine solche Temperaturerhöhung wäre dann direkt mit einer Änderung der Viskosität verbunden und ließe sich daher indirekt messen, wenn sich die Viskosität messen ließe.

Um die Viskosität in lebenden Zellen zu bestimmen, könnte man die LDs beispielsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff anfärben, um dann das Fluoreszenzsignal in einem einzelnen LD partiell auszubleichen und die Regeneration des Signals zu verfolgen. Solche FRAP-Experimente würden das Bestimmen des Diffusionskoeffizienten des Farbstoffmoleküls in dem entsprechenden LD ermöglichen.

Dieser ermittelte Diffusionskoeffizient kann dann dazu verwendet werden, die Viskosität in dem LD mathematisch zu bestimmen. Diese Methode würde demzufolge die

Bestimmung der Viskosität in LDs ermöglichen, ist allerdings nicht geeignet, einen schnellen Überblick über die Viskositäten von vielen LDs in einer größeren Zellpopulation zu bestimmen. Außerdem müssen die LDs dazu bereits eine gewisse Größe aufweisen, damit man sie überhaupt partiell bleichen kann.

Aus diesem Grund sollte eine andere Methode gefunden werden, mit deren Hilfe man einen direkteren Zugriff auf die Viskositätswerte von vielen LDs zur gleichen Zeit haben kann. Eine Technik, um eine direkte Viskositätsmessung zu erreichen, wird durch den Einsatz der FLIM-Mikroskopie ermöglicht. So gibt es spezielle Fluoreszenzfarbstoffe, welche in ihrer molekularen Struktur eine rotierende Gruppe aufweisen [267-269], welche dafür verantwortlich ist, dass die Fluoreszenzlebenszeit dieser Farbstoffe stark von der umgebenden Viskosität abhängt.

Dies lässt sich damit begründen, dass die Fluoreszenzquantenausbeute nach der Förster-Hoffmann Gleichung direkt von der Viskosität  $\eta$  abhängig ist [270]:

$$\Phi_f = z\eta^\alpha$$

Hierbei ist:  $\Phi_f$ : Fluoreszenzquantenausbeute  
 $z$  und  $\alpha$ : Konstanten  
 $\eta$ : Viskosität

Des Weiteren gelten folgende Gleichungen: für  $\Phi_f$  und  $\tau_f$  in Abhängigkeit der radiativen Zerfallsrate  $k_r$  sowie der strahlungslosen Zerfallsrate  $k_{nr}$ :

$$\Phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

Hierbei ist:  $k_r$ : radiative Zerfallsrate  
 $k_{nr}$ : nicht radiative Zerfallsrate  
 $\tau_f$ : Fluoreszenzlebenszeit

Durch Umformen folgt daraus:

$$\tau_f = z k_r^{-1} \eta^\alpha$$

Das Logarithmieren dieser Gleichung führt dann schließlich zu einer Gleichung, aus welcher sich die Fluoreszenzlebenszeit als Funktion von der Viskosität darstellen lässt:

$$\log \tau_f = \alpha \log \eta + \log \frac{z}{k_r}$$

Besonders eine Publikation erschien vielversprechend, was die Anwendbarkeit des darin vorgestellten Fluoreszenzfarbstoffes hinsichtlich seiner viskositätsabhängigen Eigenschaften angeht, handelte es sich bei dem darin verwendeten molekularen Rotor doch ebenso wie bei LD540 und dem klassischen BODIPY 493/503 um ein BODIPY-Derivat [270]. Da alle BODIPY-Derivate geeignet scheinen, selektiv LDs anfärben zu können und zudem in eben dieser Publikation und weiteren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe bereits Strukturen in lebenden Zellen gezeigt wurden, bei denen es sich vermutlich um LDs handelt [271], schien es lohnenswert, sich auf diesen Farbstoff zu konzentrieren. Aus diesem Grund wurde der so genannte BODIPY-C<sub>12</sub>-Farbstoff nach einer Vorschrift von Levitt *et al.* dargestellt [270]<sup>6</sup>. In Abbildung 3-56 sind die Spektren sowie die Struktur dieses Fluoreszenzfarbstoffes dargestellt.

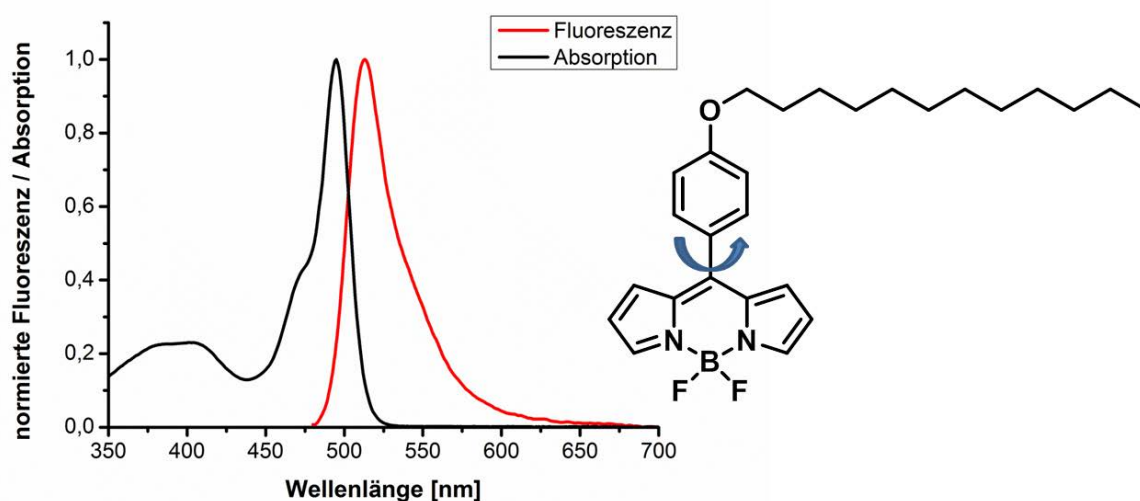


Abbildung 3-56 Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des molekularen Rotorfarbstoffes BODIPY-C<sub>12</sub>.

Wie man an den Spektren sehen kann, liegt das Absorptionsmaximum von BODIPY-C<sub>12</sub> bei ca. 490 nm und entspricht damit dem gängigen BODIPY 493/503. Nachdem der Farbstoff erfolgreich synthetisiert worden war, wurden zunächst seine spektralen Eigenschaften und seine Fähigkeiten in Bezug der Viskositätsbestimmung ermittelt. Dazu wurde der Farbstoff zunächst in Glycerin-Methanol-Gemischen unterschiedlicher Viskosität gelöst. Die Mischungsverhältnisse gingen dabei von reinem Methanol bis hin zu einer Mischung

<sup>6</sup> Ich will an dieser Stelle Matthias Klein herzlich für die Hilfe bei der Synthese des Fluoreszenzfarbstoffes danken.

von 80 Volumenprozent Glycerin in Methanol. Schon das einfache Bestrahlen mit einer Fluoreszenzlampe zeigt dabei, dass die Fluoreszenzintensität von BODIPY-C<sub>12</sub> wirklich stark von der umgebenden Viskosität abhängt (siehe Abbildung 3-57), wohingegen das normalerweise zur LD-Färbung verwendete BODIPY 493/503 keinerlei Effekt hinsichtlich der ihn umgebenden Viskosität aufweist.



Abbildung 3-57 Vergleich der Fluoreszenzintensität von dem molekularen Rotor BODIPY-C<sub>12</sub> (rechts) und von BODIPY 493/503 (links) bei verschiedenen Viskositäten, wobei die Viskosität von links nach rechts ansteigt.

Um die Viskositätsabhängigkeit des molekularen Rotors zu quantifizieren, wurden außerdem Fluoreszenzspektren in diesen vorgemischten Lösungen unterschiedlicher Viskosität gemessen (siehe Abbildung 3-58). Auch hierbei wird die Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von BODIPY-C<sub>12</sub> bestätigt.

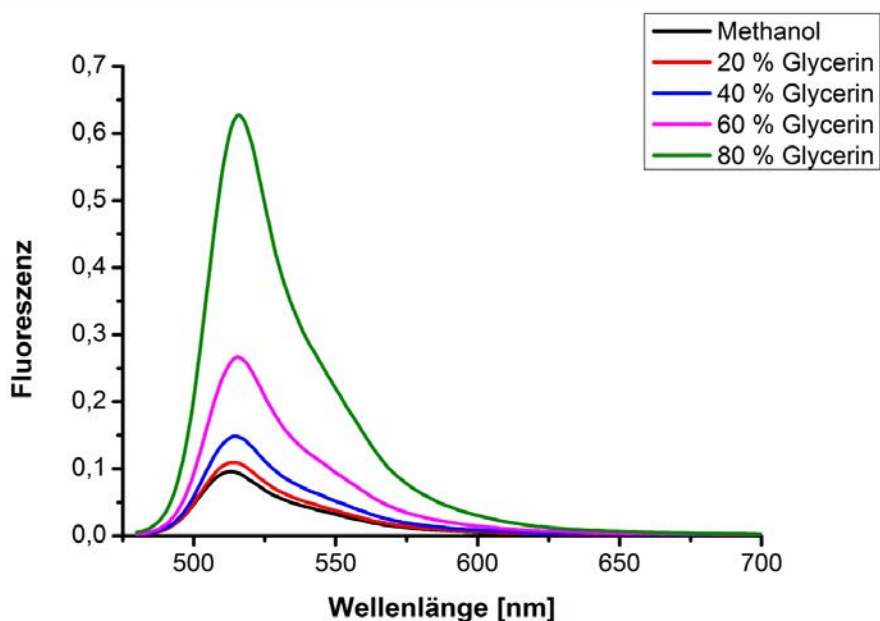


Abbildung 3-58 Fluoreszenzspektren des molekularen Rotors BODIPY-C<sub>12</sub> in unterschiedlichen Methanol/Glycerin-Gemischen.

Trägt man die normierte maximale Fluoreszenz aus diesen Messungen gegen den Glyceringehalt auf, so ergibt sich eine quadratische Abhängigkeit (siehe Abbildung 3-59).

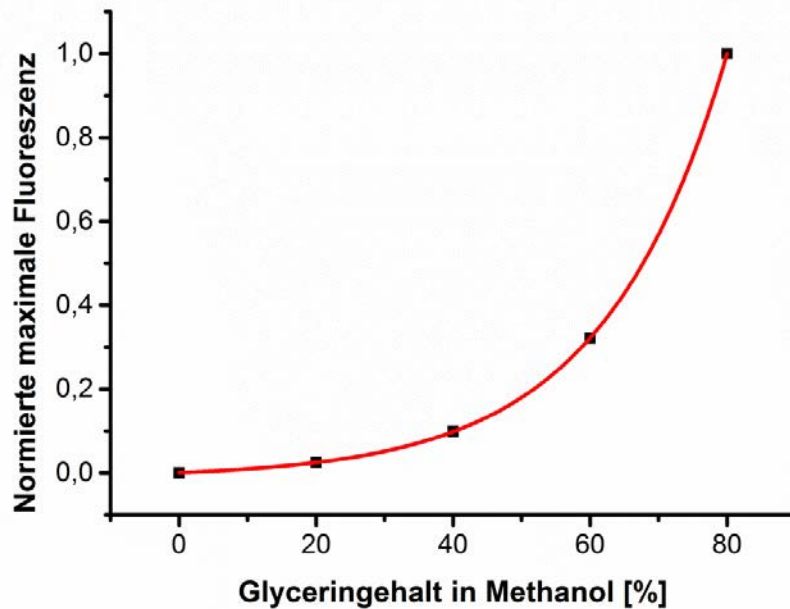


Abbildung 3-59 Normierte maximale Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit des Glyceringehaltes. Zur besseren Übersicht wurden die Werte mit einer exponentiellen Funktion angenähert (rot).

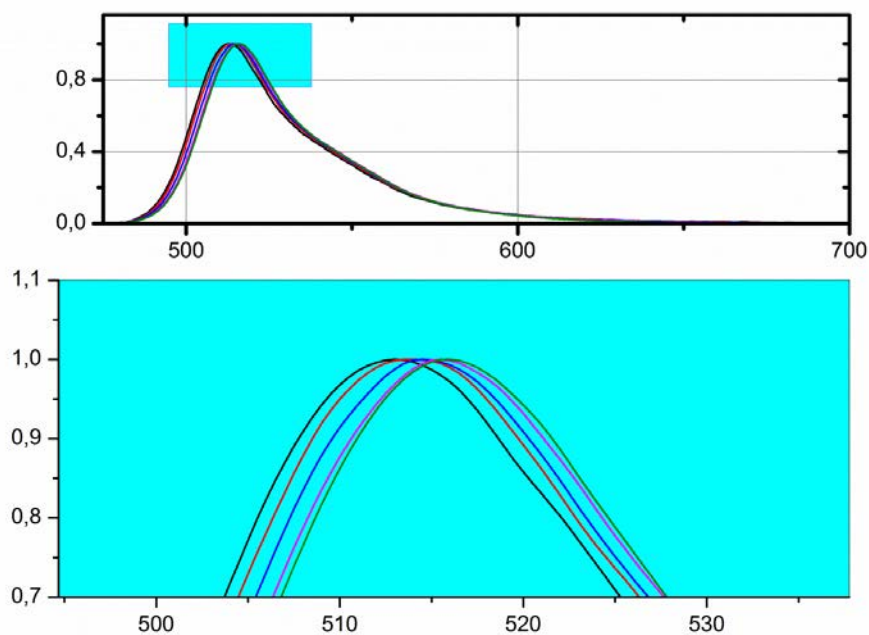


Abbildung 3-60 Verschiebung der Wellenlänge der maximalen Fluoreszenz bei unterschiedlichen Viskositäten.

Neben dieser starken Intensitätsabhängigkeit von BODIPY-C<sub>12</sub> in Bezug auf die umgebende Viskosität kommt es auch zu einer geringen Verschiebung des Fluoreszenzmaximums (siehe Abbildung 3-60).

Nach diesen ersten spektralen Voruntersuchungen wurden die eigentlichen Lebenszeitmessungen durchgeführt. Zu Beginn wurden dafür Lösungen bekannter Viskosität vermessen, um daraus Kalibrierkurven für die eigentlichen Messungen erstellen zu können. Dazu wurden zunächst erneut die Glycerin/Methanol-Mischungen verwendet und mit dem Rotor angefärbt. Von diesen Mischungen wurde dann jeweils ein Tropfen auf ein Deckglas pipettiert und Lebenszeitmessungen durchgeführt (siehe Abbildung 3-61).

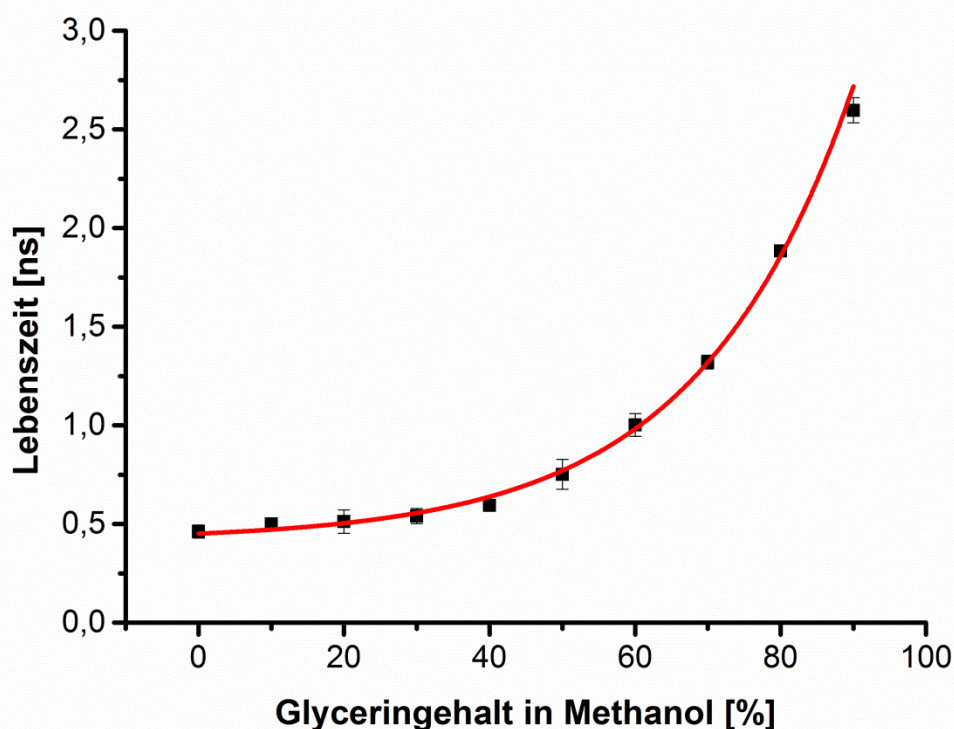


Abbildung 3-61 Gemessene Lebenszeit von BODIPY-C<sub>12</sub> in Abhängigkeit des Glyceringehaltes. Zur besseren Übersicht wurden die Werte mit einer exponentiellen Funktion angenähert (rot).

Als zweite Referenzmessung wurden die Lebenszeiten von BODIPY-C<sub>12</sub> in reinem Glyceryltrioleat bei verschiedenen Temperaturen gemessen (siehe Abbildung 3-62), also jenem Triglycerid, welches hauptsächlich bei der Induktion der LD-Synthese durch Zugabe von Oleinsäure gebildet werden sollte (siehe Kapitel 3.2.1).

Dabei konnten Messungen von Raumtemperatur bis hin zu 160 °C durchgeführt und eine exponentielle Abhängigkeit der Lebenszeit von der Temperatur beobachtet werden.

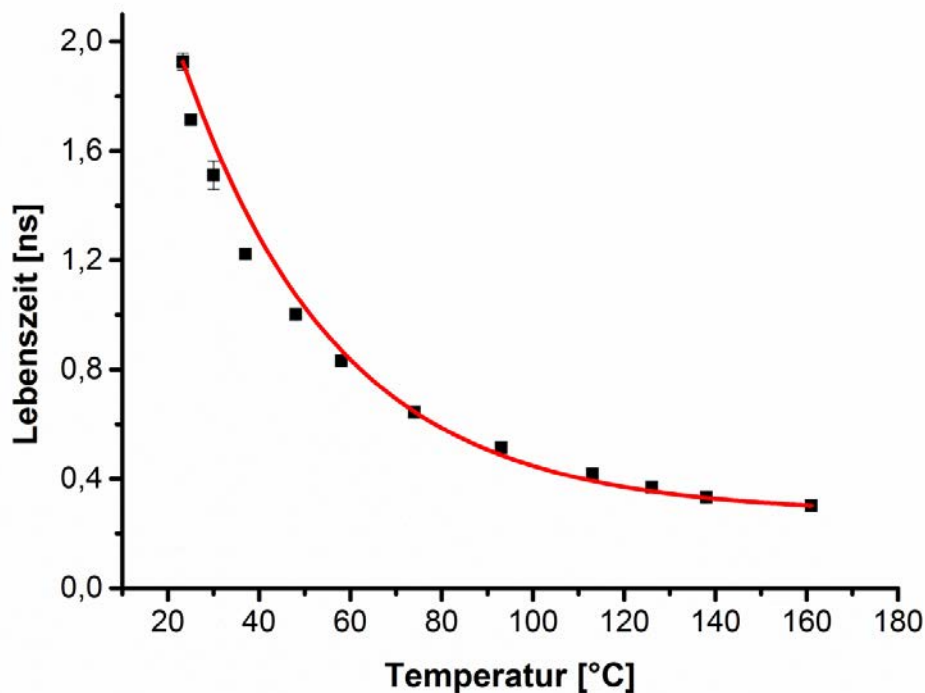


Abbildung 3-62 Bestimmung der Lebenszeit vom BODIPY-C<sub>12</sub> in reinem Glyceryltrioleat bei verschiedenen Temperaturen. Zur besseren Übersicht wurden die Werte mit einer exponentiellen Funktion angenähert (rot) (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Diese Temperaturabhängigkeit entsteht dadurch, dass die Fluoreszenzlebenszeit proportional zu Viskosität ist, zu welcher wiederum die Temperatur in einer exponentiellen Proportionalität steht:

$$\tau \propto \eta$$

$$\eta \propto \exp(-T)$$

Daraus lässt sich die exponentielle Abhängigkeit der Fluoreszenzlebenszeit von der Temperatur ableiten:

$$\tau \propto \exp(-T)$$

Trägt man die durch diese beiden Referenzmessungen erhaltenen Werte logarithmisch gegen die für die einzelnen Werte bekannten Viskositäten [270, 272] auf, ergibt sich wie in der physikalischen Herleitung gefordert eine lineare Abhängigkeit zwischen diesen beiden Parametern (siehe Abbildung 3-63).

Durch Regression dieser Werte kann man dann aus gemessenen Lebenszeiten die entsprechende Viskosität von anderen Lösungen oder wie angestrebt von dem Inhalt von LDs ableiten.

Allerdings kommt es zwischen den beiden Kalibrationsmessungen zu deutlichen Abweichungen (siehe Abbildung 3-63). Die gefundene Abhängigkeit der Glycerin-Methanol-Mischungen stimmt zwar sehr gut mit den Literaturwerten überein [270], die temperaturabhängigen Messungen des reinen Triglycerides weichen im Vergleich dazu jedoch stark ab. Dies lässt sich damit erklären, dass die Lebenszeiten des molekularen Rotors neben der Viskosität vermutlich auch noch von der Polarität des umgebenden Lösungsmittels abhängig sind.

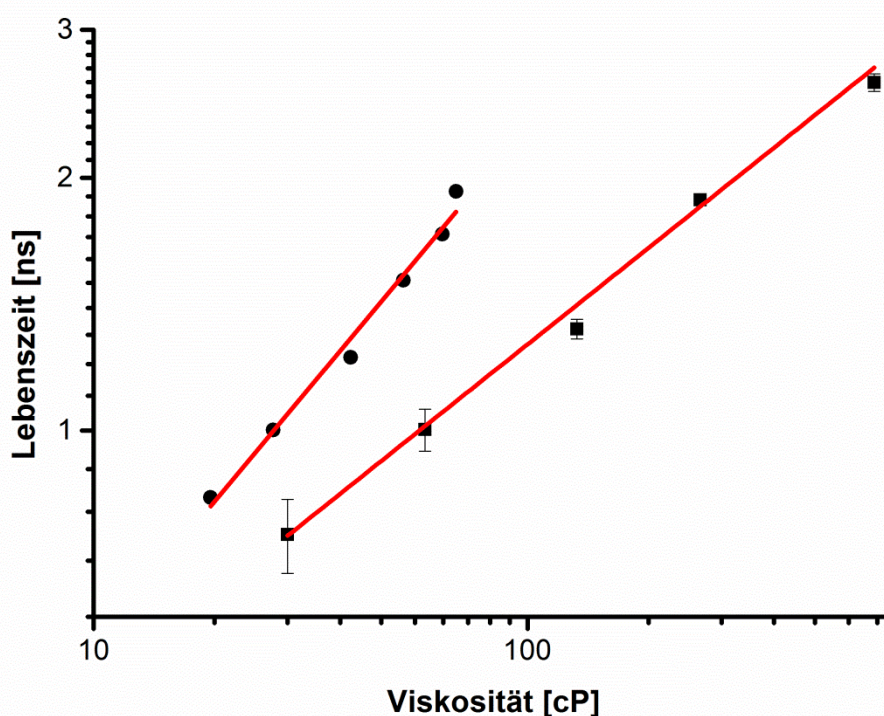


Abbildung 3-63 Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten von BODIPY- $C_{12}$  von der Viskosität des umgebenden Mediums (Punkte: Messungen in Glyceryltrioleat bei verschiedenen Temperaturen; Quadrate: Messungen in Glycerin/Methanol-Mischungen) (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Weil eine der ursprünglichen Intentionen darin bestand, eventuell auftretende laserinduzierte Temperaturänderungen innerhalb von LDs zu quantifizieren, wurden in einem weiteren Schritt noch andere Messsysteme untersucht, bei welchen sich die vorliegende Viskosität bei Temperaturerhöhung deutlich ändern sollte. Dazu wurde zunächst eine Polymerlösung genommen, welche bei Raumtemperatur sehr fest ist. Daher sollte BODIPY- $C_{12}$  eine sehr hohe Lebenszeit aufweisen. In der Tat liegt die gemessene Lebenszeit bei ca. 5,9 ns und entspricht damit auch ungefähr der normalen Lebenszeit von gängigen BODIPY-Derivaten. Durch Temperaturerhöhung auf bis zu 190 °C erniedrigt sich die Lebenszeit dann aber auf ca. 5,3 ns (siehe Abbildung 3-64). Der

Kurvenverlauf weist dabei die größte Steigung zwischen 140-160 °C auf, was gut mit dem Glasübergang dieses Systems übereinstimmt.

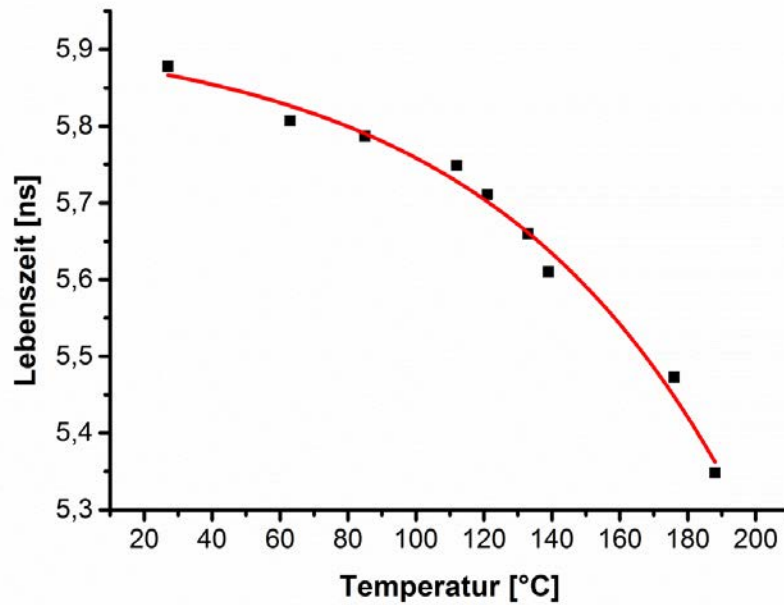


Abbildung 3-64 Messung des Glasüberganges von Polymerpartikeln, die mit dem molekularem Rotor BODIPY-C<sub>12</sub> gefärbt sind. Zur besseren Übersicht wurden die Werte mit einer exponentiellen Funktion angenähert (rot).

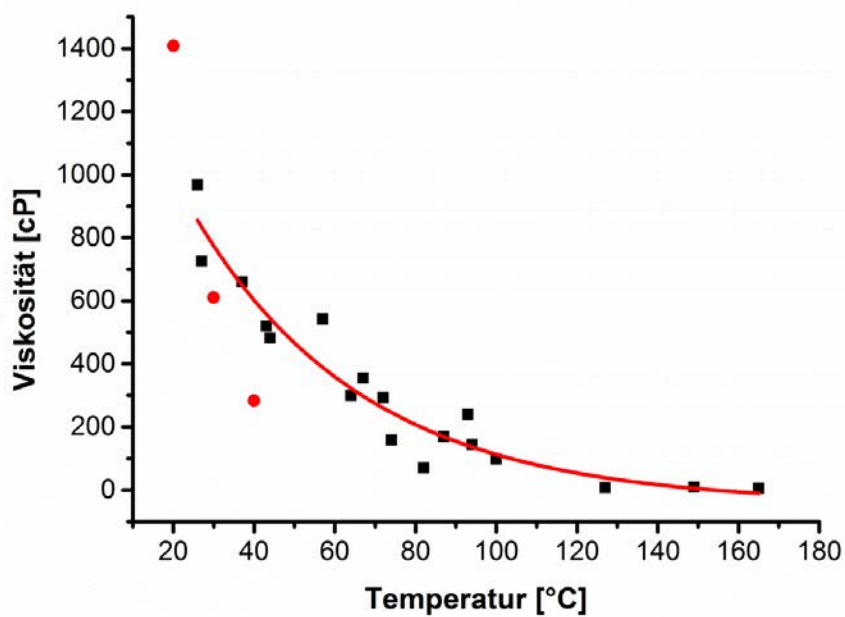
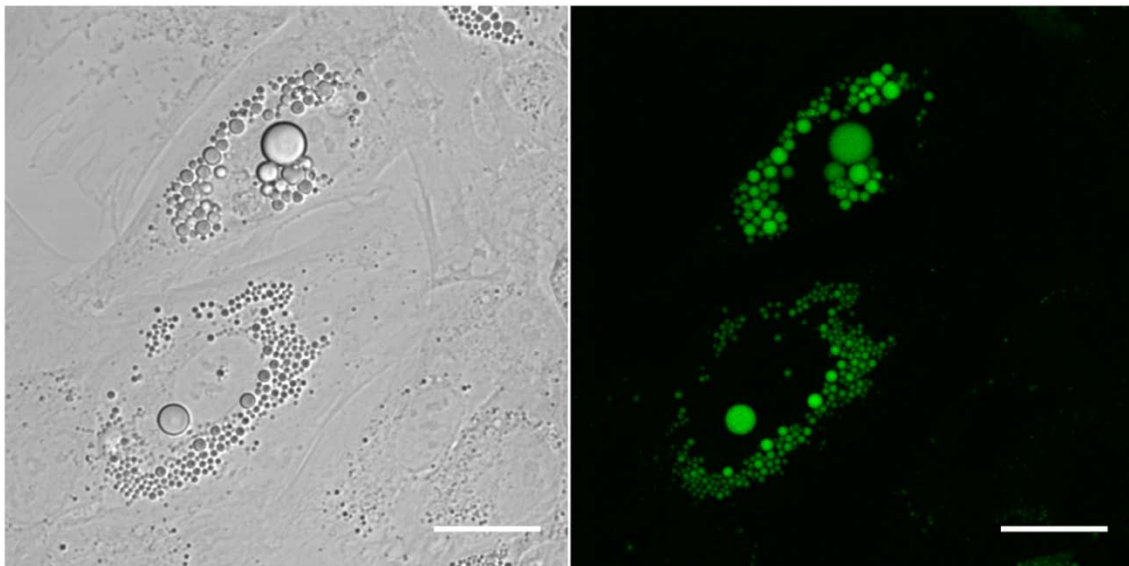


Abbildung 3-65 Messung der Viskositätswerte von reinem Glycerin bei verschiedenen Temperaturen mit Hilfe von BODIPY-C<sub>12</sub>. Rot: Literaturwerte. Zur besseren Übersicht wurden die Werte mit einer exponentiellen Funktion angenähert (rot).

Außerdem wurden temperaturabhängige Messungen in reinem Glycerin durchgeführt. Auch hier konnten Messungen zwischen Raumtemperatur und mehr als 160 °C durchgeführt werden. Zur Umrechnung der gemessenen Lebenszeiten in Viskositäten wurden bei diesem System die Kalibrationsmessungen mit den Glycerin-Methanol-Mischungen verwendet. Dabei zeigt sich, dass die gefundenen Werte gut mit Literaturwerten korrelieren (siehe Abbildung 3-65).

Nach diesen Vorexperimenten, welche die generelle Anwendbarkeit des Farbstoffes für Viskositätsmessungen bestätigten, sollte dann die Viskosität in lebenden Zellen gemessen werden. Dazu wurden die Zellen mit der empfohlenen Farbstoffmenge [271] inkubiert und nach einer halben Stunde gewaschen. Dann wurden zunächst einfache konfokale Aufnahmen gemacht, um zu verifizieren, dass der Farbstoff auch wirklich zur selektiven Anfärbung von LDs geeignet ist und nicht etwa andere Zellkompartimente unspezifisch anfärbt. Erwartungsgemäß akkumuliert sich der hydrophobe Farbstoff vorzugsweise in den LDs, wie in Abbildung 3-66 zu sehen ist. Es kommt dabei wie gewünscht zu einer Anfärbung der LDs bei einem gleichzeitig schwachen Hintergrundsignal.



*Abbildung 3-66 Konfokale Fluoreszenzaufnahme differenzierender Stammzellen zum Nachweis, dass der molekulare Rotor zur selektiven Anfärbung von LDs geeignet ist. Scale bar: 20 µm (Diese Abbildung wurde bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).*

Nach diesem Selektivitätsnachweis sollten dann die eigentlichen FLIM-Messungen durchgeführt werden, um die genaue Viskosität in LDs zu bestimmen. Um mögliche Artefakte auszuschließen und zu beweisen, dass die gemessene Lebenszeit wirklich auf einen entsprechenden Viskositätswert zurückzuführen ist und es sich nicht etwa um einen anderen biophysikalischen Effekt (pH-Wert, Reduktions- oder Oxidationsmittel etc.) handelt, welcher die Lebenszeit von sämtlichen BODIPY-Derivaten beeinflusst, wurden

zunächst FLIM-Messungen mit dem klassischen BODIPY 493/503 durchgeführt. Erwartungsgemäß wurde dabei eine homogene Lebenszeit in allen LDs gefunden, wobei die gemessene Lebenszeit ausschließlich mehr als 5 ns beträgt (siehe Abbildung 3-67), was der natürlichen Lebenszeit von purem BODIPY 493/503 entspricht. Insofern scheint die Lebenszeit nicht durch die Umgebung im LD beeinflusst zu werden. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass auch die Lebenszeit von BODIPY-C<sub>12</sub> im LD nur von der Viskosität, nicht aber von anderen biophysikalischen Parametern beeinflusst wird.



Abbildung 3-67 FLIM-Aufnahme von LDs in differenzierenden mesenchymalen Stammzellen, angefärbt mit BODIPY 493/503 bei einer Laserleistung von 6  $\mu$ W.

Die ersten FLIM-Messungen mit BODIPY-C<sub>12</sub> zur Bestimmung der Viskosität in LDs von lebenden Zellen wurden wiederum an HeLa-Zellen durchgeführt, wobei zuvor die Bildung der LDs durch Zugabe von Oleinsäure stimuliert worden war (siehe Kapitel 3.2.1). Dabei ergab sich innerhalb der klar erkennbaren LDs eine durchschnittliche Lebenszeit des Farbstoffes von ca. 1,6 ns (siehe Abbildung 3-68).

Da die zu messenden LDs hauptsächlich aus Triglyceriden bestehen, wurden zur Umrechnung der Lebenszeit in Viskositätswerte die Kalibrierwerte des Glyceryltrioleat verwendet und nicht die Werte der Glycerin-Methanol-Mischungen. Dabei ergibt sich eine Viskosität von ca. 57 cP.

Vergleicht man diesen Wert mit den zuvor gemessenen Werten von reinem Glyceryltrioleat bei verschiedenen Temperaturen, so fällt auf, dass es zu einer relativ guten Übereinstimmung kommt. So hat das pure Glyceryltrioleat, welches der

Hauptbestandteil in den induzierten LDs sein sollte, eine Viskosität von knapp 40 cP bei 37 °C. Die etwas erhöhte Viskosität in den LDs könnte z.B. durch deren Proteingehalt hervorgerufen werden, da cytosolische LDs schließlich nur einen Lipidgehalt von 78% [273] aufweisen.

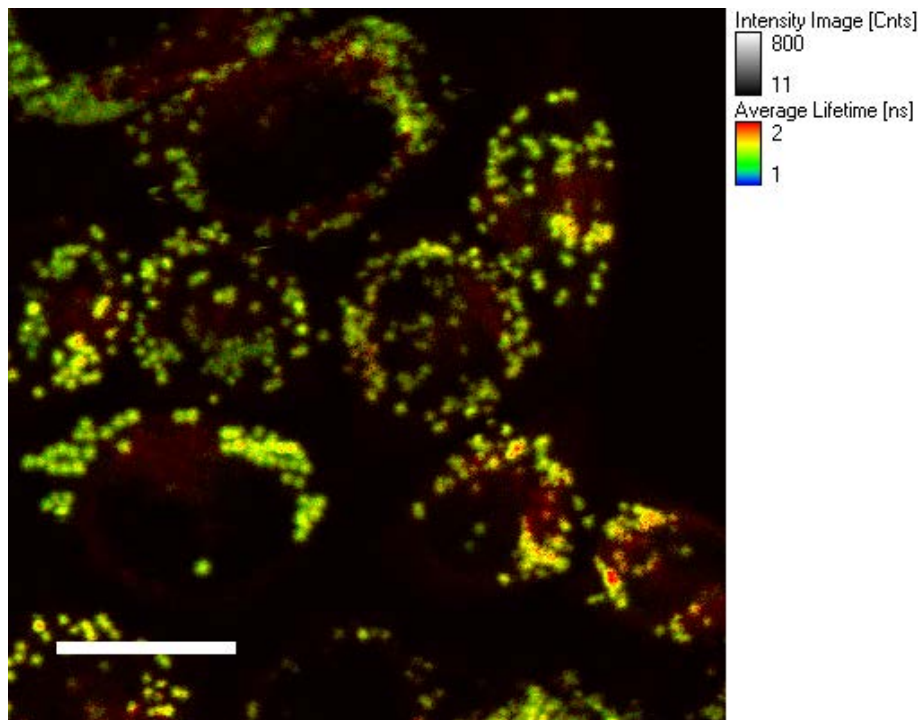


Abbildung 3-68 FLIM-Aufnahme von mit Oleinsäure gefütterten HeLa-Zellen bei einer Temperatur von 37 °C und einer Laserleistung von 10 µW. Die LDs weisen eine Lebenszeit von ca. 1,6 ns auf. Scale bar: 20 µm. (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Als nächstes sollten dann FLIM-Messungen an LDs in mesenchymalen Stammzellen, welche sich in der adipogenen Differenzierung befinden, durchgeführt werden. Dabei fiel sofort auf, dass es scheinbar zwei verschiedene Zellpopulationen gibt (siehe Abbildung 3-69). So verfügt eine Population bereits über mehrere große LDs, ist also in der Differenzierung bereits fortgeschritten. In diesen großen LDs ergab sich eine mittlere Fluoreszenzlebensdauer von ca. 1,6 ns, was nach den zuvor durchgeführten Messungen einer Viskosität von ca. 57 cP und damit auch der Viskosität in den durch Oleinsäure-Zugabe induzierten LDs in HeLa- Zellen entspricht.

Neben diesen Zellen, die LDs mit einer solchen Viskosität besitzen, gibt es jedoch auch eine Vielzahl an Zellen, in welchen noch keine großen LDs detektiert werden können. In diesen Zellen konnte dafür eine große Anzahl an organellenähnlichen Strukturen detektiert werden, deren Lebenszeit deutlich über 2 ns liegt. Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass es sich auch bei diesen Strukturen um LDs handelt und dass sich die Viskosität innerhalb von LDs während der adipogenen Differenzierung ändert.

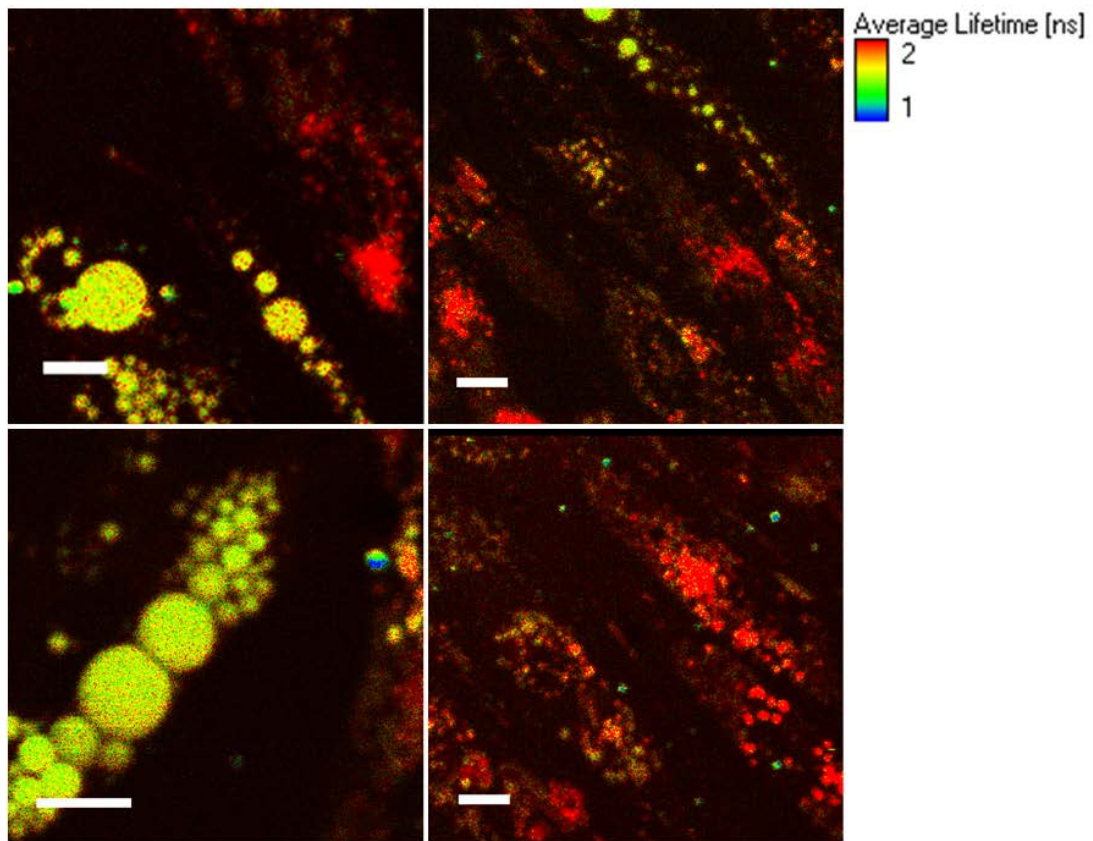


Abbildung 3-69 Messung der Viskosität innerhalb von intrazellulären LDs mit Hilfe der FLIM-Mikroskopie und Einsatz des molekularen Rotors BODIPY-C<sub>12</sub>. Die eigentlichen LDs (gelbgrün) weisen eine Lebenszeit von ca. 1,6 ns auf. Daneben existiert noch eine weitere organellenähnliche Struktur, welche in Zellen mit wenigen LDs detektiert wird und die eine Lebenszeit von mehr als 2 ns besitzt. Dabei handelt es sich allerdings nicht um LDs, sondern vielmehr um ein Autofluoreszenzsignal, welches auch ohne den Einsatz eines Farbstoffes detektiert werden kann. Laserleistung: 10  $\mu$ W. Scale bar: 10  $\mu$ m (Diese Abbildung wurde bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Durch eine entsprechende Negativkontrolle ohne Farbstoff konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei dem detektierten Fluoreszenzsignal der Strukturen mit der längeren Lebenszeit um ein Autofluoreszenzsignal handelt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Strukturen auch nicht um LDs handelt, sondern vielmehr um andere Organellen, welche räumlich klar von den LDs abgegrenzt sind (siehe Abbildung 3-70).

Diese Autofluoreszenz konnte auch bereits in einer anderen Arbeit gezeigt werden, welche sich mit FLIM-Messungen an adipogen differenzierenden Zellen durch Mehrphotonenanregung beschäftigte [274]. Auch hier konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl an autofluoreszierenden Organellen in den Zellen aufzufinden war, welche noch nicht besonders weit in der Differenzierung fortgeschritten waren. Im Gegensatz dazu besaßen Zellen mit vielen großen LDs fast keine autofluoreszierenden Spezies.

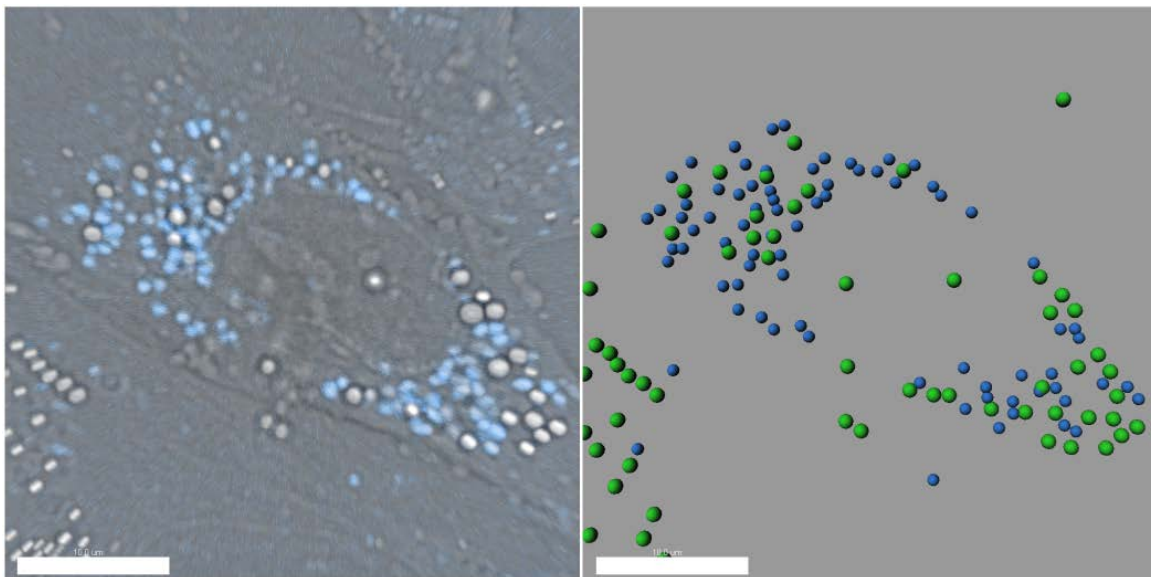


Abbildung 3-70 Detektion der autofluoreszierenden Strukturen (blau) innerhalb der Zellen. Diese besitzen eine organellenähnliche Struktur und tauchen neben den eigentlichen LDs (grün) auf. Scale bar: 10 µm (Diese Abbildung wurde bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Um einen weiteren Nachweis zu haben, dass es sich bei der gemessenen Lebenszeit innerhalb der LDs wirklich um einen direkten Viskositätseffekt handelt, wurde die Lebenszeit erneut bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Dazu wurden die lebenden Zellen sowohl bei der natürlichen Körpertemperatur von 37 °C gemessen als auch bei einer Raumtemperatur von 22 °C (siehe Abbildung 3-71).

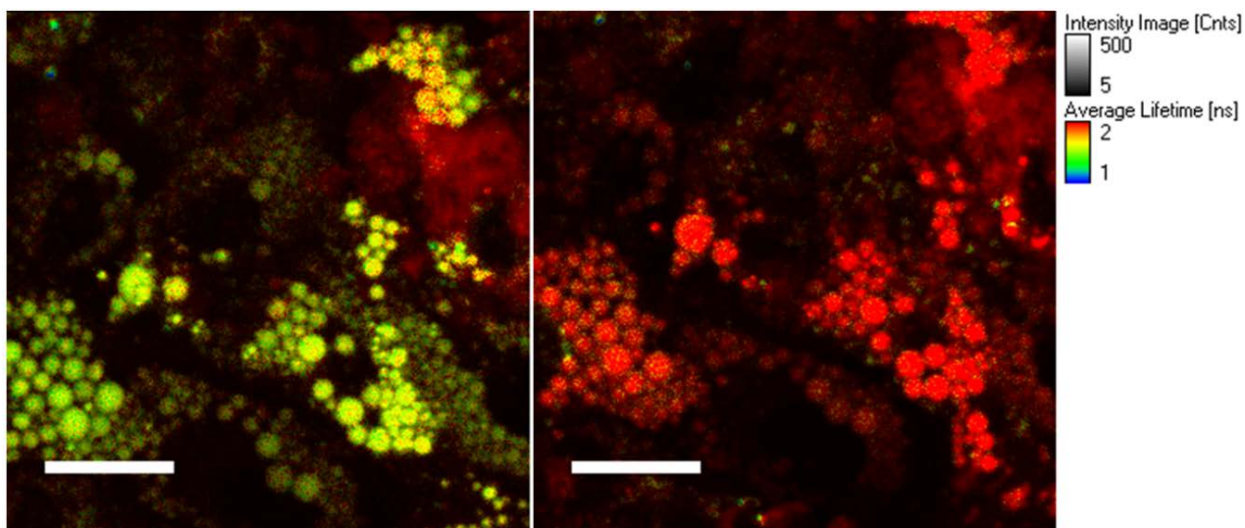


Abbildung 3-71 Lebenszeitänderung von BODIPY-C<sub>12</sub> in LDs von differenzierenden mesenchymalen Stammzellen aufgrund von einer Temperaturänderung. Links: 37 °C; Rechts: 22 °C. Laserleistung: 10 µW. Scale bar: 20 µm (Diese Abbildung wurde bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Bei den Messungen bei Raumtemperatur wurde darauf geachtet, diese möglichst schnell durchzuführen, um die Zellen durch die niedrige Temperatur nicht allzu sehr zu stressen. Um einen dadurch ausgelösten zellulären Effekt auszuschließen, wurden die Messungen zur Kontrolle auf zwei mögliche Vorgehensweisen durchgeführt, einmal erst bei 22 °C und dann bei 37 °C und einmal entsprechend andersherum. Dabei ergab sich bei beiden Vorgehensweisen, dass sich die Viskosität von ca. 97 cP (2,2 ns) bei Raumtemperatur auf ca. 57 cP (1,6 ns) bei 37 °C verringerte (siehe Abbildung 3-72).

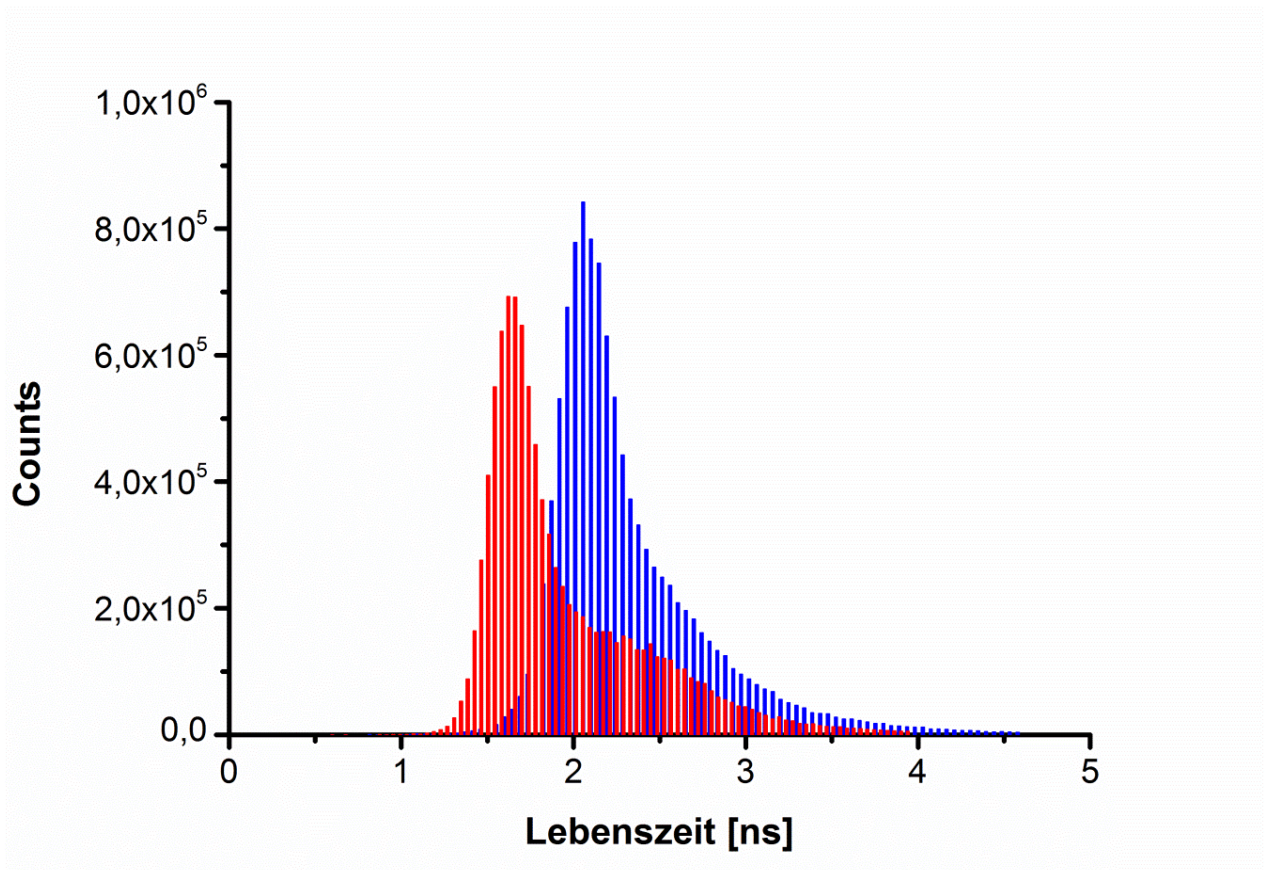


Abbildung 3-72 Lebenszeit ändert sich von 1,6 ns bei 37 °C auf mehr als 2 ns bei 22 °C (Diese Abbildung wurde in abgewandelter Form bereits publiziert [209]; mit freundlicher Genehmigung der American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.).

Es scheint demnach so zu sein, dass man den BODIPY-C<sub>12</sub>-Farbstoff neben der direkten Messung der Viskosität in LDs auch zur Bestimmung der intrazellulären Temperatur verwenden könnte, was sich z.B. bei der Untersuchung von zellulärem Hitzestress als nützlich erweisen könnte. So könnte BODIPY-C<sub>12</sub> auch als Alternative zu anderen molekularen Temperatursensoren [275] Verwendung finden.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse sind im Rahmen einer Publikation bereits veröffentlicht worden [209].

## 4 Ausblick

Im Verlaufe dieser Dissertation war es möglich, eine ganze Reihe von Fragen bezüglich dem Verhalten und der Dynamik von LDs zu klären. Andererseits entstanden auch wiederum neue Fragen aus den dabei erzielten Resultaten, so dass sich eine Reihe von potentiellen Folgeexperimenten ergeben.

So ist z.B. der tatsächliche Mechanismus der natürlichen Fusion von LDs während der adipogenen Differenzierung immer noch nicht eindeutig geklärt. Zwar konnte wie erwähnt von anderen Gruppen bereits nachgewiesen werden, dass das Protein Fsp27 maßgeblich für den Fusionsprozess verantwortlich ist, aber nicht, auf welche Weise das Protein dies bewerkstelligt. Wird durch die stabilisierende Wirkung des Fsp27 die Generierung eines großen Lipidaustauschkanal ermöglicht oder handelt es sich bei der Austauschfläche vielmehr um sehr viele kleine Poren, gebildet aus vielen Kanalproteinen? Um diese entscheidende Frage zu klären, würden sich meiner Meinung nach gleich zwei mögliche experimentelle Ansätze gut eignen. Zum einen sollte man versuchen, die genaue molekulare Struktur von Fsp27 mittels Röntgenstrukturanalyse aufzuklären und zwar in seiner inaktiven wie aktiven Form. Erste Kristallisationserfolge konnten mittlerweile von anderen Gruppen bereits demonstriert werden [229, 276, 277].

Zum Anderen wäre es vielversprechend, wenn man die mit der CARS-Mikroskopie erzielten Langzeitexperimente noch mit einer hochauflösenden Mikroskopiertechnik wie der Elektronenmikroskopie kombinieren könnte, um eine Visualisierung des Fusionsprozesses im Nanometerbereich zu erreichen. Wünschenswert wäre es, wenn man ein solches Experiment in der Art einer korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM) durchführt. Man würde dabei mit den CARS-Langzeitexperimenten anfangen, mit deren Hilfe man in der Lage ist, einen bereits ablaufenden Fusionsvorgang zu registrieren. Bevor diese Fusion aber vollständig abgelaufen ist, müsste man die Messung stoppen und die Zellen fixieren, um sie in diesem Zustand festzuhalten. Im Folgenden müsste man sich dann dieselbe Stelle noch einmal unter dem Elektronenmikroskop anschauen. Auf diese Weise müsste es möglich sein, den hypothetischen Kanal zwischen den beteiligten LDs zu visualisieren bzw. nachzuweisen, dass ein solcher eben nicht existiert.

Interessanterweise wurden bereits in einer 2009 erschienenen Publikation Gefrierbruch-Elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt, an welchen die Autoren gleich mehrere Anhaltspunkte für das LD-Wachstum über Fusion fanden [278]. So schienen mehrere LDs über viele geschichtete Lipideinzelschichten zu verfügen, was eine zwiebelartige Morphologie erzeugt. In manchen Bildern hat es sogar den Anschein, als wären kleine LDs in ihrer kompletten Struktur in einem viel größeren LD lokalisiert. Außerdem wurde

vereinzelt eine scheinbare Kontinuität zwischen den Membranen benachbarter LDs beobachtet, was ein Indiz für ein bevorstehendes Fusionsereignis wäre. Durch Kombination der CARS- mit der Elektronenmikroskopie könnte man aber sicherlich eindeutiger Ergebnisse erzielen, weil man zunächst einen ablaufenden Fusionsprozess eindeutig als solchen identifizieren kann, bevor man sich mit der Elektronenmikroskopie die entsprechende Stelle im Detail anschauen würde.

Auch die durchgeführten Viskositätsmessungen lassen sich noch erweitern, indem man z.B. die verwendeten HeLa S3-Zellen mit verschiedenen Fettsäuren füttert, um dann deren Einfluss auf die Viskosität innerhalb der LDs zu vergleichen. Auch wäre es z.B. möglich, sich die Viskosität in LDs in weißen bzw. braunen Adipozyten anzuschauen. Bei diesen wäre es denkbar, dass sich große Viskositätsunterschiede ergeben, weil sie vermutlich über stark unterschiedliche Protein/Lipid-Verhältnisse verfügen. Des Weiteren könnte man die Viskositäten zusätzlich in LDs von weiteren Organismen untersuchen, z.B. in Hefezellen oder in *C. Elegans*.

## 5 Methoden

### 5.1 Zellkultur

#### 5.1.1 HeLa S3-Zellen

Bei der HeLa S3-Zelllinie handelt es sich vermutlich um die am meisten untersuchte und verwendete Zellart überhaupt und ist wohl in fast jedem zellbiologischen Labor zu finden. Die Zellen sind besonders robust und vermehren sich ziemlich schnell, was die Kultivierung erleichtert. Generell wurden die Zellen in DMEM-Medium (Invitrogen), supplementiert mit einem Penicilin/Streptomycin-Mix sowie fötalem Kälberserum, bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank (Binder) kultiviert, und zwar in einer adhärennten Zellkultur, wofür sie in verschiedenen großen Zellkulturflaschen (Corning) ausgesät wurden. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS-Puffer (Invitrogen) gewaschen und dann mit einer Trypsinlösung (TrypLE™ Express, Invitrogen) versetzt. Nach ca. fünfminütiger Inkubation haben sich die Zellen durch diese Behandlung von der Oberfläche abgelöst und konnten mit DMEM-Medium wieder aufgenommen werden. Die dadurch gewonnene Zellsuspension wurde dann in verdünnter Form erneut in frische Zellkulturflaschen ausgesät. Dieser Vorgang wurde immer dann durchgeführt, wenn die Zellen eine gewisse Konfluenz aufwiesen, in den meisten Fällen wurden die Zellen entweder alle zwei Tage 1:5 oder alle drei Tage 1:10 gesplittet. Zur Erzeugung eines gewissen Vorrates wurden die Zellen regelmäßig in großem Maße hochkultiviert und im Anschluss daran eingefroren. Dazu wurden die Zellen nach Erreichung fast vollständiger Konfluenz trypsiniert. Die gewonnene Zellsuspension wurde dann bei 210 g fünf Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in einem speziellen Einfriermedium (Synt-a-Freeze, Invitrogen) aufgenommen und zwar mit einer Konzentration von 1 Mio. Zellen pro ml. Zum Zählen der Zellen wurde dabei eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Je 1 ml dieser Lösung wurde dann in Cryoröhrchen (Corning) überführt und in einer Einfrierhilfe platziert. Dieses Gefäß erlaubt eine schonende langsame Abkühlung in einem -80 °C-Gefrierschrank, bei welcher sich die Temperatur nur um ein Grad pro Minute verringert. Nach einer Nacht im -80 °C-Schrank wurden die Cryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Je nach Mikroskopieart wurden die Zellen in unterschiedlichen Probenkammern kultiviert. Für die CARS-Mikroskopie ist es zur Vermeidung eines großen Hintergrundsignals sehr wichtig, dass der Boden des Gefäßes, auf welchem die Zellen wachsen, aus Glas ist. Je nach Experiment kann man z.B. Gefäße verwenden, welche die Größe eines Objektträger besitzen und in acht einzelne Kammern aufgeteilt sind (Lab-Tek™). Diese Reaktionsgefäße

sind nützlich, wenn man viele verschiedene Bedingungen an einer gleich aufgezogenen Zellpopulation testen will. Eine andere Möglichkeit bieten Petrischalen, die einen Durchmesser von 35 mm besitzen und mit einem Glasboden versehen sind (Ibidi). Will man statt der CARS-Mikroskopie normale fluoreszenzmikroskopische Messungen durchführen, kann man auch Gefäße mit einem Plastikboden verwenden, wobei der Plastikboden optisch rein sein muss und Deckglasstärke aufweisen muss. Auch hier wurden sowohl 8er wells (Ibidi) als auch Petrischalen (Ibidi) verwendet.

Drei Tage vor den eigentlichen mikroskopischen Experimenten wurden die HeLa S3 Zellen in den Kulturschalen ausgesät, und zwar 5.000 Zellen bei Verwendung eines 8er wells oder 100.000 Zellen bei Verwendung einer Petrischale. Am Tag des Experiments wurden die Zellen dann direkt mit Hilfe der CARS-Mikroskopie visualisiert oder mit entsprechenden Farbstoffen angefärbt, um konfokale Fluoreszenzaufnahmen durchzuführen.

Für die Langzeitbeobachtungen vom LD-Aufbau mit Hilfe der CARS-Mikroskopie wurden 100.000 HeLa S3-Zellen in einer Petrischale mit Glasboden eingesät. Nach einer Nacht Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium durch frisches Medium mit oder ohne Zusatz von 600 µM Oleinsäure, welches mit BSA komplexiert ist (Sigma), ersetzt. Im Anschluss daran wurde die CARS-Messung gestartet.

### **5.1.2 Humane mesenchymale Stammzellen**

Die allgemeine Kultivierung der humanen mesenchymalen Stammzellen, die aus Fettabaugungen gewonnen wurden (Adipose-derived stem cells, ADSCs, Invitrogen), erfolgte analog zu den HeLa S3-Zellen. Allerdings wurde als Kulturmedium Complete MesenPRO RS™ verwendet (Invitrogen), welches immer frisch aus 50 ml MesenPRO RS™ Basal Medium (Invitrogen) und 1 ml MesenPRO RS™ Growth Supplement (Invitrogen) sowie 0,5 ml L-Glutamin (200 mM, Invitrogen) hergestellt wurde. Dieses Medium muss innerhalb von zwei Wochen verbraucht werden. Zum Auftauen der Zellen wurde ein Cryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37 °C innerhalb von zwei Minuten aufgetaut. Die Zelllösung wurde dann in ein 15 ml Röhrchen überführt und mit einem Milliliter warmen Medium tropfenweise versetzt. Dann wurden die Zellen in einer Dichte von 5.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Zu beachten ist dabei, dass die Zellen bei der Kultivierung nicht vollständig konfluent werden dürfen, da sie ansonsten ihre Differenzierungsfähigkeit verlieren. Außerdem dürfen die Zellen nur 4-5 mal gesplittet werden, weil sie sonst ebenfalls ihre Fähigkeit zum Differenzieren verlieren. Zum Ablösen der Zellen beim Splitten wurden die Zellen zweimal mit PBS (2 ml PBS ohne Calcium und Magnesium pro 10 cm<sup>2</sup> Kulturfläche, Invitrogen) gewaschen und dann für 7 Minuten mit TrypLE™ Express

versetzt. Nachdem die Zellen sich abgelöst hatten, wurden sie mit frischem Medium aufgenommen, bei 210 g für 5 Minuten abzentrifugiert und neu ausgesät. Zum Einfrieren der Zellen wurde analog zu den HeLa-Zellen verfahren. Zur Differenzierung der Stammzellen in die adipogene Richtung wurden die Zellen so lange kultiviert, bis sie eine komplette Konfluenz aufwiesen. Dann wurden die Zellen mit Complete Adipogenic Differentiation Medium versetzt, welches aus 9 ml StemPro Adipocyte Differentiation Basal Medium (Invitrogen), 1 ml StemPro Adipogenesis Supplement (Invitrogen) sowie 5 µl Gentamicin (10 mg/ml, Invitrogen) besteht. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt und nach ca. zwei Wochen war die Differenzierung abgeschlossen.

Die Stammzellen wurden für die mikroskopischen Untersuchungen ausschließlich in Petrischalen mit Glasboden ausgesät.

Für die Langzeit-Messungen zur Beobachtung der adipogenen Differenzierung wurden die Zellen in einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml eingesät, wobei zuvor ein Insert (Ibidi) eingesetzt wurde, welches über vier kleine Areale einer Fläche von je 2 mm x 1,5 mm verfügt, welche das Wachstum der Zellen auf einen sehr kleinen Bereich von jeweils 0,03 cm<sup>2</sup> minimiert. Dies hat den Vorteil, dass man weniger Zellen benötigt, um in relativ kurzer Zeit die komplette Konfluenz zu erreichen, die erforderlich ist, bevor man die adipogene Differenzierung induzieren kann. Außerdem ermöglicht die geringe Zellzahl bei gleichzeitiger großer Menge an Kulturmedium die Langzeitmikroskopie der Zellen, ohne dass das Medium alle paar Tage gewechselt werden müsste. Nach Erreichen der Konfluenz, was zumeist bereits nach einer Übernacht-Inkubation abgeschlossen war, wurde das verwendete Kulturmedium gegen das Differenzierungsmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 3-5 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach Ablauf dieser ersten Differenzierungsphase wurden die Zellen auf dem Mikroskop platziert und die Langzeitmessung gestartet.

Für die Beobachtung der Lipolyse wurden die Zellen nach ca. einwöchiger Inkubation in adipogenem Differenzierungsmedium gewaschen und mit frischem Medium versetzt, welches 10 µM Forskolin und 2 % BSA enthielt.

## **5.2 3-dimensionale Zellkultur mit Hilfe der Hanging-Drop-Methode**

Sowohl mit den HeLa S3-Zellen als auch mit den ADSCs wurden dreidimensionale Spheroide kultiviert, um ein Zellmodell verwenden zu können, welches eher der natürlichen Strukturen solcher Zellen entspricht.

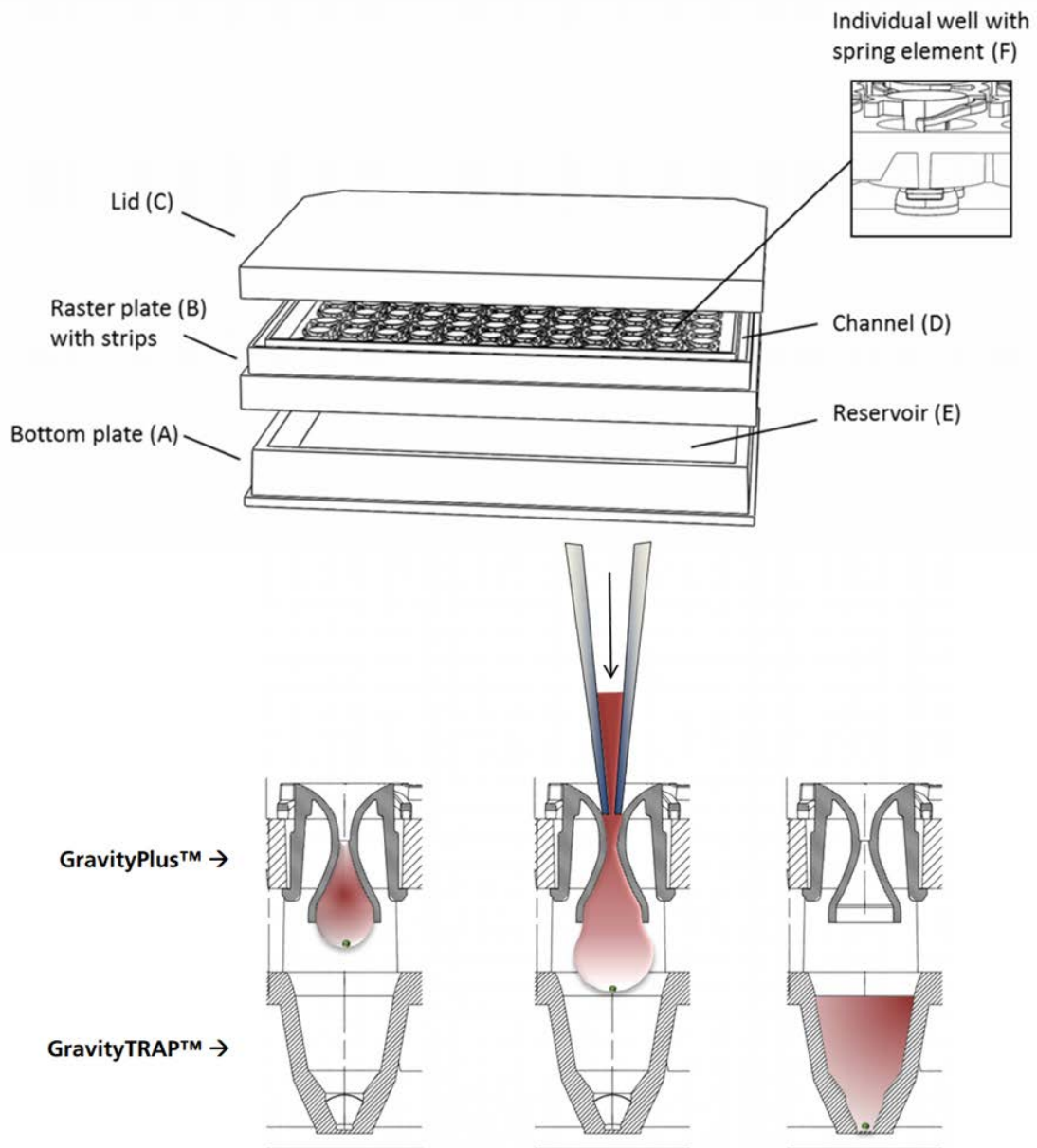


Abbildung 5-1 Schematische Darstellung der Hanging-Drop-Methode, entnommen aus dem Manual der Firma Insphero <http://www.insphero.com>

Dabei kam ein Hanging-Drop-Modell zum Einsatz, welches die Zellen dazu triggert, sich aufgrund der natürlichen Schwerkraft zu Spheroïden zusammen zu setzen. Das verwendete GravityPLUS™-System (Abbildung 5-1, Insphero) besteht aus einer Platte im 96well Format (B), in welcher die einzelnen Zelltropfen hergestellt werden können, einer Abdeckung (C) sowie einer Bodenplatte (A) mit einem Flüssigkeits-Reservoir (E), um die Verdunstung der Tropfen zu minimieren.

Zur Erzeugung der hängenden Tropfen wurde zunächst Stück Gewebestoff in das Reservoir gelegt und mit 15 ml 0,5fachem PBS benetzt. Dann wurde eine Zellsuspension hergestellt und eine Zellzahl zwischen 500 und 10.000 Zellen wurde als 40 µl-Tropfen in das System eingeführt. Dabei muss die Pipette gerade gehalten werden und die Lösung

darf nur sehr langsam hinein pipettiert werden. Zur weiteren Kompensierung einer eventuell auftretenden Verdunstung wurden dann noch 2 ml Wasser in den Kanal (D) pipettiert. Das ganze System wurde dann in den Inkubator gestellt. Nach ca. 4 Tagen wurden die gebildeten Spheroide schließlich geerntet. Dazu wurde die Hauptplatte (B) von der Bodenplatte (A) entfernt und auf ein zweites System, das sogenannte GravityTRAP™, transferiert. Durch langsame Zugabe von 70 µl Medium zu den einzelnen Tropfen fallen diese herunter und landen in den dafür vorgesehenen Behältern.

Die dadurch gewonnenen Spheroide wurden im Falle der ADSCs dann durch Zugabe von Differenzierungsmedium in die adipogene Richtung differenziert, was sehr viel schneller abläuft als in zweidimensionaler Kultur. So waren bereits nach zwei Tagen die Zellen sehr weit fortgeschritten. Zur Mikroskopie wurden dann die differenzierten ADSC-Spheroide sowie die HeLa S3-Spheroide in 8er wells oder in Petrischalen überführt.

## **5.3 Mikroskopie**

### **5.3.1 Fluoreszenzmikroskopie**

Die konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden an einem Leica TCS SP5 Mikroskop durchgeführt, in welchem sowohl ein Argon- als auch ein HeNe-Laser integriert ist. Des Weiteren verfügt dieses Mikroskop über zwei interne Detektoren, bei welchen die Detektionswellenlängen individuell eingestellt werden können sowie über vier zusätzliche externe Detektoren, bei welchen man gewünschte Detektionsfilter selber einbringen kann. Einer dieser externen Detektoren wurde verwendet, um mit Hilfe des HeNe-Lasers zusätzliche Durchlichtbilder aufnehmen zu können. Um optimale Bedingungen für die Zellen zu schaffen und um die durchgeführten Langzeitmessungen überhaupt zu ermöglichen wurde das konfokale Mikroskop mit einer „Life cell imaging chamber“ (Stage Top Incubator, Tokai Hit, Japan) ausgestattet, so dass die Zellen permanent bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten werden konnten.

#### **Färbung mit BODIPY 493/503**

Um LDs mit BODIPY 493/503 (Invitrogen) selektiv anzufärben, wurde der Farbstoff in Ethanol gelöst und mit einer finalen Konzentration von 1 µg/ml auf lebende oder fixierte Zellen gegeben. Nach 15minütiger Inkubationszeit wurden die Zellen dreimalig mit PBS-Puffer gewaschen. Am Mikroskop wurden die Zellen mit einer Wellenlänge von 496 nm angeregt und detektiert wurde zwischen 520-600 nm.

### **Färbung mit LD540**

Der selbst synthetisierte Farbstoff wurde in Ethanol mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml gelöst. Von dieser Lösung wurden 10 µl mit 2 ml des entsprechenden Kulturmediums gemischt und auf die Zellen gegeben, was eine finale Konzentration von 2,5 µg/ml ergibt. Zur Untersuchung der induzierten Artefakte kamen auch niedrigere Konzentrationen zum Einsatz. Dabei wurde aber darauf geachtet, dass immer die gleiche finale Ethanolkonzentration im Medium vorhanden war. Nach zehnmütiger Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Am Mikroskop wurden die Zellen mit einer Wellenlänge von 514 nm angeregt und detektiert wurde zwischen 530-600 nm.

### **Färbung mit dem molekularen Rotor BODIPY-C<sub>12</sub>**

Um LDs mit dem viskositätsabhängigen Farbstoff BODIPY-C<sub>12</sub> zu färben, wurde eine Stammlösung des selbst synthetisierten Farbstoffes mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Methanol hergestellt. Zur Färbung wurden 10 µl dieser Lösung mit 2 ml des entsprechenden Kulturmediums gemischt und diese Lösung auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann 30 Minuten lang inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Zur Visualisierung der LDs wurden die Zellen am konfokalen Mikroskop mit einer Wellenlänge von 496 nm angeregt und detektiert wurde zwischen 520-600 nm.

### **Färbung mit CellMask™ Deep red**

Zur Anfärbung der Zellmembran wurde der Farbstoff CellMask™ Deep Red (Invitrogen) verwendet. Dazu wurde der Farbstoff (5 mg/ml in DMSO) 1:1000 in Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach dreißigminütiger Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Am Mikroskop wurden die Zellen mit einer Wellenlänge von 633 nm angeregt und detektiert wurde zwischen 650-800 nm.

### **Färbung mit Syto 82**

Zur selektiven Anfärbung des Zellkerns wurde der Farbstoff SYTO 82 Orange (Invitrogen) verwendet. Dazu wurde der Farbstoff (5 mM) 1:1000 in Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach dreißigminütiger Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Am Mikroskop wurden die Zellen mit einer Wellenlänge von 514 nm angeregt und detektiert wurde zwischen 550-600 nm.

### 5.3.2 FLIM-Mikroskopie

Zur Bestimmung der Viskosität wurde die Fluoreszenzlebenszeit des BODIPY-C<sub>12</sub>-Farbstoffes gemessen. Dabei kam ein mikroskopischer Aufbau zum Einsatz, welcher auf einem kommerziellen optischen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) basiert. Als Laserquelle wurde ein Diodenlaser (LDH-D-C-470b, PicoQuant) mit einer gepulsten Wellenlänge von 470 nm verwendet. Die Repititionsrate betrug 10 MHz und die Leistung ca. 10  $\mu$ W. Zur Anregung wurde ein Wasserobjektiv mit einer 63fachen Vergrößerung und einer NA von 1,3 verwendet (LCI Plan-Neofluar, Zeiss). Das Fluoreszenzsignal wurde dann durch das gleiche Objektiv wieder eingesammelt. Nach einem Pinhole wurde das Fluoreszenzlicht noch durch den Einsatz eines 488-LP-Filters aufgereinigt und mit Hilfe eines Strahlteilers auf zwei APDs (SPCM-AQR-14, Perkin-Elmer) aufgeteilt. Die Bestimmung der Lebenszeiten wurde mit Hilfe eines TCSPC-Systems (Hydraharp 400, PicoQuant) durchgeführt und mit der Symphotime-Software (PicoQuant) ausgewertet.

Zur Messung der Lebenszeiten in Reinsubstanzen wurde ein Tropfen der zu messenden Lösung auf ein Deckglas pipettiert und das Signal 10  $\mu$ m über der Deckglasoberfläche detektiert. Zur Messung der Lebenszeiten bei hohen Temperaturen wurden die Lösungen auf ein ITO-Deckglas pipettiert, welches durch eine Eigenbaukonstruktion auf dem Mikroskop kontrolliert auf mehr als 150 °C erhitzt werden kann. Diese Heizeinrichtung wurde an der Universität Konstanz von Moritz Baier entworfen und konstruiert.

Zur Bestimmung der Viskosität in LDs wurden die Petrischalen mit den Zellen auf dem Mikroskop mit dem kommerziellen Heiztisch bei 37 °C gehalten oder bei Raumtemperatur gemessen.

### 5.3.3 CARS-Mikroskopie

#### Schnelles Tracken und Langzeitbeobachtung von LDs in HeLa-Zellen

Zur Visualisierung von LDs in HeLa-S3 Zellen wurde ein selbstgebauter CARS-Aufbau verwendet, welcher von Martin Winterhalder während seiner Promotion etabliert werden konnte. Dieser Aufbau basiert auf einem kommerziellen Mikroskop (TCS SP5, Leica) in Kombination mit einem Nd:YVO<sub>4</sub> Laser (HighQ Laser, Österreich), welcher mit einer Leistung von 4 W, einer Pulsdauer von 7 ps, einer Repititionsrate von 76 MHz und einer Wellenlänge von 532 nm einen optischen parametrischen Oszillator (APE, Deutschland) pumpt. Zur Visualisierung der Lipide wurde der Pumpstrahl mit einer festen Wellenlänge von 1064 nm vom Nd:YVO<sub>4</sub> Laser verwendet und der Stokesstrahl des OPOs auf eine Wellenlänge von 817 nm eingestellt, was es ermöglichte, die gewünschte Resonanz der CH-Streckschwingung bei einer Wellenzahl von 2845  $\text{cm}^{-1}$  zu detektieren. Die Pulsenergie der beiden Strahlen in der konfokalen Ebene war ungefähr 1 nJ.

Für die zeitlich hoch aufgelösten Experimente zum Verfolgen des LD-Transports wurde ein Wasserimmersionsobjektiv mit 63facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,2 verwendet, welches zudem auf den NIR-Bereich optimiert ist. Es handelt sich dabei um ein von der Firma Leica zur Verfügung gestellter Prototyp. Im Gegensatz dazu wurde für die Langzeitbeobachtung des Fettaufbaus ein Luftobjektiv mit 40facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 0,85 verwendet, um die Problematik der Verdunstung des Wassers über längere Zeit zu umgehen. Das generierte Signal wurde in Transmissions-Geometrie über einen Luftkondenser mit einer numerischen Apertur von 0,55 eingesammelt und mit entsprechenden Filtern von eventuell vorhandenem Hintergrundsignal abgegrenzt (641/75 und 775/SP, Semrock).

### **Langzeitbeobachtung der adipogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen**

Die Verfolgung der adipogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen erfolgte mit einem weiteren in der Arbeitsgruppe aufgebauten CARS-Setup, welcher wiederum auf dem konfokalen Leica TCS SP5 Mikroskop basiert. Als Laserquellen kam in diesem Falle jedoch eine neue Generation von Faserlasern zum Einsatz. Diese Faserlaser haben den Vorteil, dass sie wesentlich stabiler über mehrere Tage laufen können, während man gleichzeitig aber Abstriche bei der Leistung hinnehmen muss, ein Problem, welches bei dieser Art Probe jedoch kaum ins Gewicht fällt, da das Signal der großen LDs ohnehin sehr stark ist. Zudem hätte eine höhere Laserleistung in einem so langen Experiment sicherlich einen negativen Effekt auf die Zellen. Verwendet wurde eine Er:Fiber Laserquelle (FemtoFiber pro, Toptica) mit einer Repetitionsrate von 40 MHz. Alle Experimente wurden bei einer Wellenzahl von  $2845\text{ cm}^{-1}$  durchgeführt, wofür der Stokesstrahl mit einer Wellenlänge von 998 nm mit einer Leistung von 6,5 mW eingestellt wurde, während der Pumplaser eine Wellenlänge von 777 nm und eine Leistung von 62 mW lieferte. Zum Einsatz kam außerdem ein 40faches Luftobjektiv (Leica) mit einer numerischen Apertur von 0,85. Das generierte CARS-Signal wurde in Transmissionsgeometrie aufgenommen, wobei es von einem Luftkondenser (Leica) mit einer numerischen Apertur von 0,55 eingesammelt und durch entsprechende Filter (641/75 und 680/SP, Semrock, Vereinigte Staaten) vom Hintergrundsignal abgetrennt wurde.

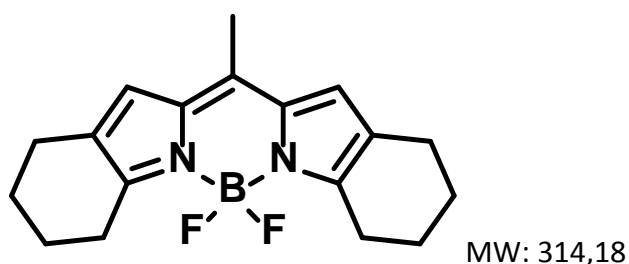
## **5.4 Auswertung der mikroskopischen Daten**

Zur Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Daten wie auch der CARS-Daten kam neben der frei verfügbaren ImageJ-Software vor allem die kommerziell erhältliche Software Imaris (Bitplane) zum Einsatz. Mit dieser leistungsfähigen Software war es

möglich, die LDs in den Zellen automatisch zu identifizieren, deren Bewegung zu verfolgen sowie deren Volumen zu rendern. Auf diese Weise konnte das Transportverhalten der LDs sowie die Volumenzunahme der LDs über gerichtete Fusionsprozesse quantitativ ausgewertet werden.

## 5.5 Synthese<sup>7</sup>

### 5.5.1 Synthese von 4,4-difluoro-2.3,5.6-bis-tetramethylene-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene: LD 540<sup>8</sup>



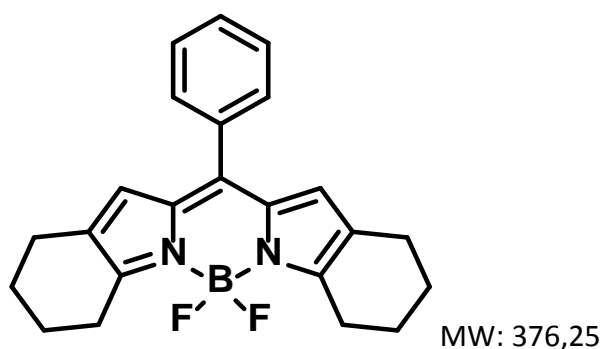
Für die Untersuchung der Farbstoffinduzierten Photosensitivität sowie weiteren allgemeinen mikroskopischen Messungen an LDs wurde ein zur Zeit sehr prominenter neuartiger Farbstoff nachsynthetisiert, welcher kurz als LD540 bezeichnet wird und bei welchem es sich um ein BODIPY-Derivat handelt. Dieser Name wurde gewählt, um auf seine Eigenschaft als LD-Farbstoff sowie auf sein Absorptionsmaximum bei 540 nm hinzuweisen. Prinzipiell wurde die Synthese wie in der Literatur beschrieben durchgeführt [181], jedoch mit einigen geringfügigen Änderungen. 500 mg Tetrahydroindol (4,13 mmol) wurden unter Stickstoffatmosphäre in einem 100 ml-Zweihalskolben in 3 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Durch Zugabe von 1 ml frisch destilliertem Acetylchlorid (14 mmol) färbte sich die zuvor dunkelbraune Lösung dunkelrot. Nach einstündigem Erhitzen auf 42 °C und dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der dunkelrote Feststoff noch zweimal mit je 10 ml trockenem Hexan trituiert und abschließend noch einmal im Vakuum eingeengt. Dieses Zwischenprodukt wurde in 50 ml Dichlormethan gelöst und mit 1,25 ml Triethylamin und 1,2 ml BF<sub>3</sub>-Etherat versetzt, worauf sich die Lösung dunkelgrün verfärbte. Diese Lösung wurde dann weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Wasser gewaschen und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde abschließend entfernt und das erhaltene Produkt mittels Silikagel-Säulenchromatographie und einem Dichlormethan/Petrolether-Laufmittel im Verhältnis 1:1 aufgereinigt. Als Ausbeute wurden 180 mg (0,57 mmol, 27 %

<sup>7</sup> Alle Synthesen wurden in Zusammenarbeit mit Matthias Klein durchgeführt.

<sup>8</sup> Bei der Synthese von LD540 war Johanna Ude während ihrer Bachelorarbeit maßgeblich beteiligt.

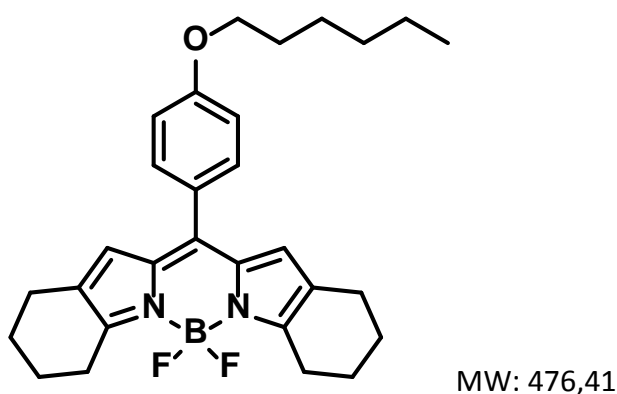
Ausbeute) eines kristallinen dunkelroten Feststoffes erhalten. Das Produkt wurde aliquotiert und bei  $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zum Einsatz als Farbstoff zum Anfärben von LDs in lebenden oder fixierten Zellen wurde eine Stammlösung des Farbstoffes in Ethanol mit einer Konzentration von  $0,5\text{ mg/ml}$  hergestellt, welche eine orange-leuchtende Farbe aufweist und in UV-Licht stark fluoresziert.

### 5.5.2 Synthese von 1-phenyl-4,4-difluoro-2.3,5.6-bis-tetramethylene-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene: LD540-C<sub>0</sub>



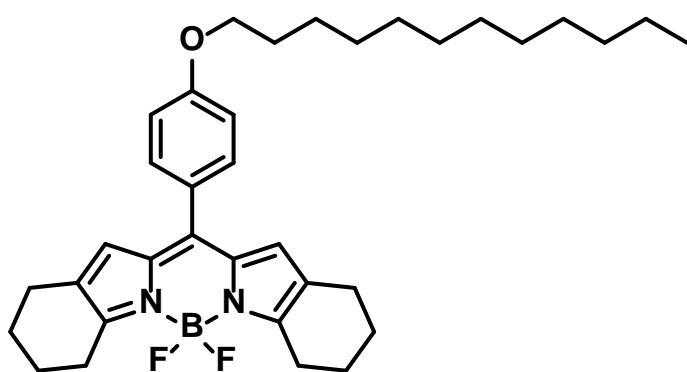
Die Synthese dieses LD540-Derivates erfolgte analog der LD540 Synthese. Es wurden dabei  $500\text{ mg}$  Tetrahydroindol ( $4,13\text{ mmol}$ ) und  $1,97\text{ g}$  Benzoylchlorid ( $14\text{ mmol}$ ) eingesetzt. Das gewonnene dunkelrote Zwischenprodukt wurde in  $50\text{ ml}$  Dichlormethan gelöst und mit  $1,25\text{ ml}$  Triethylamin und  $1,2\text{ ml}$   $\text{BF}_3$ -Etherat versetzt. Nach  $70\text{ Minuten}$  wurde das Endprodukt aufgereinigt und es konnten  $60\text{ mg}$  ( $0,16\text{ mmol}$ ,  $7\%$  Ausbeute) gewonnen werden.

### 5.5.3 Synthese von 1-(hexyloxy)phenyl-4,4-difluoro-2.3,5.6-bis-tetramethylene-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene: LD540-C<sub>6</sub>



Die Synthese dieses LD540-Derivates erfolgte analog der LD540 Synthese. Es wurden dabei 500 mg Tetrahydroindol (4,13 mmol) und 3,37 g 4-(Hexyloxy)benzoylchlorid (14 mmol) eingesetzt. Das gewonnene dunkelrote Zwischenprodukt wurde in 50 ml Dichlormethan gelöst und mit 1,25 ml Triethylamin und 1,2 ml  $\text{BF}_3$ -Etherat versetzt. Nach 70 Minuten wurde das Endprodukt aufgereinigt und es konnten 170 mg (0,36 mmol, 17 % Ausbeute) gewonnen werden.

#### 5.5.4 Synthese von 1-(dodecyloxy)phenyl-4,4-difluoro-2.3,5.6-bis-tetramethylene-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene: LD540-C<sub>12</sub>



MW: 560,57

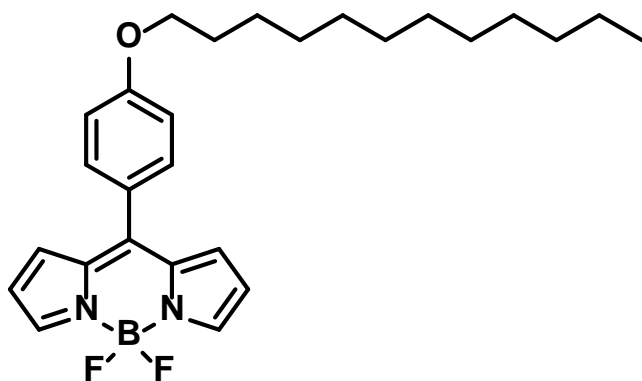
Die Darstellung dieses LD540-Derivats sowie des folgenden BODIPY-Derivats erfolgte in zwei Schritten analog zu zwei beschriebenen Vorgehensweisen [270, 279].

So wurden 750 mg Tetrahydroindol (6,2 mmol) und 1,25 mg 4-Dodecyloxybenzaldehyd (4,3 mmol) in 30 ml Dichlormethan gelöst und unter Stickstoff entgast. Zu der Mischung wurden 80 mg  $\text{InCl}_3$  (0,35 mmol) hinzugefügt und die Mischung wurde für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 g pulverisiertem NaOH gestoppt, durch Kieselgur gefiltert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das entstandene Zwischenprodukt konnte als Öl mit einer Masse von 2,75 g gewonnen werden.

Die 2,75 g (5,36 mmol) des Zwischenproduktes wurden in 63 ml Toluol gelöst und mit 705 mg DDQ (3,1 mmol) versetzt. Die Mischung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, wobei eine starke Fluoreszenz auftrat. Darauf wurden 3,0 ml Triethylamin (21,5 mmol) und 2,8 ml  $\text{BF}_3$ -Etherat (21,9 mmol) hinzu gegeben und die Mischung eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Überstand wurde dann von dem dunkelgrünen Präzipitat abdekantiert. Der Rückstand wurde noch mehrmals mit Toluol gewaschen und die vereinigten Toluollösungen wurden mit Wasser gewaschen und mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Abschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer

eingengt und das Produkt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan) aufgereinigt. Es konnten 1,01 g (1,8 mmol, 34 % Aubeute) des Endproduktes gewonnen werden.

### 5.5.5 Synthese von 1-(dodecyloxy)phenyl-4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene: BODIPY-C<sub>12</sub>



MW: 452,39

Zur Darstellung dieses BODIPY-Derivats wurde eine Mischung aus 17,3 ml Pyrrol (250 mmol) und 0,726 g 4-Dodecyloxybenzaldehyd (2,5 mmol) für 10 Minuten unter Stickstoffatmosphäre entgast. 55,5 mg  $\text{InCl}_3$  (0,25 mmol) wurden hinzugefügt und die Mischung bei Raumtemperatur 1,5 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 mg pulverisiertem NaOH (7,5 mmol) gequencht und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung durch Kieselgur gefiltert. Der Überschuss an Pyrrol wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das daraus resultierende Öl (1,43 g) wurde ohne weitere Aufreinigung weiter verwendet.

Von dem zuvor hergestellten 5-(4-dodecyloxyphenyl)dipyrrromethan wurden 500 mg (1,23 mmol) in Toluol gelöst und mit 280 mg DDQ (1,23 mmol) versetzt. Die Mischung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, wobei eine starke Fluoreszenz auftrat. Darauf wurden 1,2 ml Triethylamin (8,61 mmol) und 1,1 ml  $\text{BF}_3$ -Etherat (8,61 mmol) hinzu gegeben und die Mischung eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Überstand wurde dann von dem dunkelgrünen Präzipitat abdekantiert. Der Rückstand wurde noch mehrmals mit Toluol gewaschen und die vereinigten Toluollösungen wurden mit Wasser gewaschen und mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Abschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Es konnten 200 mg (0,44 mmol, 36 % Ausbeute) des Endproduktes gewonnen werden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ACAT	Cholesteryl Acyl-CoA Acyltransferase
ADRP	Adipocyte differentiation-related protein
ADSCs	Adipose-derived stem cells
ATGL	Adipose triglyceride lipase
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body mass index
BSA	Bovine serum albumine
ca.	Circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CARS	kohärente Anti-Stokes Raman Streuung
CCT	CTP-Phosphocholine Cytidyltransferase
CGI-58	Comparative gene identification-58
CIDE	Cell death-inducing DFF45-like effector
cP	Centipoise
CPT	CDP-Cholin Diacylglycerin Phosphocholin Transferase
DGAT	Diacylglycerin Acyl-CoA Acyltransferase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK2	Extracellular-signal-regulated Kinase 2
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADH2	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy
fL	Femtoliter
FLIM	Fluorescence lifetime imaging
FPP	First-passage-probability
FRAP	Fluorescence recovery after Photobleaching
Fsp27	Fat-sepcific protein of 27 kDa
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HSL	Hormonsensitive Lipase
Hz	Hertz
kDa	Kilo-Dalton
kJ	Kilo-Joule
LD	Lipid Droplet
LSD-2	Lipid storage Droplet 2
MGL	Monoacylglycerin Lipase
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
MSD	Mean Square Displacement
µg	Mikrogramm

$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{W}$	Mikrowatt
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
PA	Phosphatidsäure
PAT	Perilipin, ADRP und TIP47
PC	Phosphotidylcholin
PE	Phosphotidylethanolamin
pL	Pikoliter
pN	Pikonewton
PTP	mitochondriale Permeabilitätspore
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
s	Sekunde
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
TG	Triacylglycerid
THF	Tetrahydrofuran
TIP47	Tail Interacting Protein of 47 of 47 kDa

## 7 Literaturverzeichnis

1. Wilfling, F., et al., *Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets*. Dev Cell, 2013.
2. Thiam, A.R., R.V. Farese, Jr., and T.C. Walther, *The biophysics and cell biology of lipid droplets*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(12): p. 775-86.
3. Ferris, W.F. and N.J. Crowther, *Once fat was fat and that was that: our changing perspectives on adipose tissue*. Cardiovasc J Afr, 2011. **22**(3): p. 147-54.
4. Krahmer, N., R.V. Farese, Jr., and T.C. Walther, *Balancing the fat: lipid droplets and human disease*. EMBO Mol Med, 2013.
5. De Pergola, G. and F. Silvestris, *Obesity as a Major Risk Factor for Cancer*. J Obes, 2013. **2013**: p. 291546.
6. Kohlwein, S.D., M. Veenhuis, and I.J. van der Klei, *Lipid droplets and peroxisomes: key players in cellular lipid homeostasis or a matter of fat--store 'em up or burn 'em down*. Genetics, 2013. **193**(1): p. 1-50.
7. Greenberg, A.S., et al., *The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2102-10.
8. Boren, J., et al., *Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship*. J Intern Med, 2013.
9. Bostrom, P., et al., *SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(11): p. 1286-93.
10. Bell, M., et al., *Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance*. Diabetes, 2008. **57**(8): p. 2037-2045.
11. Fujimoto, T., et al., *Lipid droplets: a classic organelle with new outfits*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(2): p. 263-79.
12. Lass, A., et al., *Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome*. Cell Metab, 2006. **3**(5): p. 309-19.
13. Ogawa, K., et al., *Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus*. Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences, 2009. **85**(7): p. 217-228.
14. Miyanari, Y., et al., *The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production (vol 9, pg 1089, 2007)*. Nature Cell Biology, 2007. **9**(10): p. 1216-1216.
15. Fukasawa, M., *Cellular lipid droplets and hepatitis C virus life cycle*. Biol Pharm Bull, 2010. **33**(3): p. 355-9.
16. Roingeard, P. and M. Depla, *The birth and life of lipid droplets: learning from the hepatitis C virus*. Biol Cell, 2011. **103**(5): p. 223-31.
17. Kumar, Y., J. Cocchiario, and R.H. Valdivia, *The obligate intracellular pathogen Chlamydia trachomatis targets host lipid droplets*. Curr Biol, 2006. **16**(16): p. 1646-51.
18. Melo, R.C., et al., *Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques*. J Histochem Cytochem, 2011. **59**(5): p. 540-56.
19. Bozza, P.T. and J.P. Viola, *Lipid droplets in inflammation and cancer*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. **82**(4-6): p. 243-50.
20. Ruggles, K.V., A. Turkish, and S.L. Sturley, *Making, Baking, and Breaking: The Synthesis, Storage, and Hydrolysis of Neutral Lipids*. Annu Rev Nutr, 2013.
21. Martin, S. and R.G. Parton, *Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 373-8.
22. Murphy, D.J., *The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms*. Progress in Lipid Research, 2001. **40**(5): p. 325-438.
23. Liu, P., et al., *Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic*. J Biol Chem, 2004. **279**(5): p. 3787-92.
24. Walther, T.C. and R.V. Farese Jr, *Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism*. Annu Rev Biochem, 2012.
25. Digel, M., R. Ehehalt, and J. Fullekrug, *Lipid droplets lighting up: insights from live microscopy*. FEBS Lett, 2010. **584**(11): p. 2168-75.

26. Beckman, M., *Cell biology. Great balls of fat*. Science, 2006. **311**(5765): p. 1232-4.
27. Greenberg, A.S., et al., *Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11341-6.
28. Yang, L., et al., *The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans*. J Lipid Res, 2012.
29. Tauchi-Sato, K., et al., *The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition*. J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 44507-12.
30. Martin, S. and R.G. Parton, *Caveolin, cholesterol, and lipid bodies*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(2): p. 163-74.
31. Ohsaki, Y., M. Suzuki, and T. Fujimoto, *Open Questions in Lipid Droplet Biology*. Chem Biol, 2013.
32. Bartz, R., et al., *Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic*. Journal of Lipid Research, 2007. **48**(4): p. 837-847.
33. Penno, A., G. Hackenbroich, and C. Thiele, *Phospholipids and lipid droplets*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(3): p. 589-94.
34. Yang, H., et al., *Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors*. Curr Opin Cell Biol, 2012.
35. Krahmer, N., et al., *Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase*. Cell Metab, 2011. **14**(4): p. 504-15.
36. Moessinger, C., et al., *Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine*. J Biol Chem, 2011. **286**(24): p. 21330-9.
37. Fei, W.H., et al., *A Role for Phosphatidic Acid in the Formation of "Supersized" Lipid Droplets*. Plos Genetics, 2011. **7**(7).
38. Oelkers, P., et al., *The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 8877-81.
39. Sandager, L., et al., *Storage lipid synthesis is non-essential in yeast*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(8): p. 6478-6482.
40. Athenstaedt, K. and G. Daum, *Lipid storage: Yeast we can!* European Journal of Lipid Science and Technology, 2011. **113**(10): p. 1188-1197.
41. Suzuki, M., et al., *Lipid droplets: size matters*. J Electron Microsc (Tokyo), 2011. **60 Suppl 1**: p. S101-16.
42. Czabany, T., et al., *Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17065-74.
43. Schaffer, J.E., *Lipotoxicity: when tissues overeat*. Curr Opin Lipidol, 2003. **14**(3): p. 281-7.
44. Listenberger, L.L., et al., *Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3077-82.
45. Imanishi, Y., V. Gerke, and K. Palczewski, *Retinosomes: new insights into intracellular managing of hydrophobic substances in lipid bodies*. J Cell Biol, 2004. **166**(4): p. 447-53.
46. Alvarez, H.M. and A. Steinbuchel, *Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. **60**(4): p. 367-76.
47. Kuhnlein, R.P., *The contribution of the Drosophila model to lipid droplet research*. Progress in Lipid Research, 2011. **50**(4): p. 348-356.
48. Zhang, S.O., et al., *Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in C. elegans*. BMC Cell Biol, 2010. **11**: p. 96.
49. Wolinski, H., K. Bredies, and S.D. Kohlwein, *Quantitative imaging of lipid metabolism in yeast: from 4D analysis to high content screens of mutant libraries*. Methods Cell Biol, 2012. **108**: p. 345-65.
50. Radulovic, M., et al., *The emergence of lipid droplets in yeast: current status and experimental approaches*. Curr Genet, 2013.
51. Gibbons, G.F., K. Islam, and R.J. Pease, *Mobilisation of triacylglycerol stores*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1483**(1): p. 37-57.
52. Pilch, P.F., et al., *Cellular spelunking: exploring adipocyte caveolae*. J Lipid Res, 2007. **48**(10): p. 2103-11.

53. Ost, A., et al., *Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 5-8.
54. Zweytick, D., K. Athenstaedt, and G. Daum, *Intracellular lipid particles of eukaryotic cells*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1469**(2): p. 101-20.
55. Cohen, J.C., J.D. Horton, and H.H. Hobbs, *Human fatty liver disease: old questions and new insights*. Science, 2011. **332**(6037): p. 1519-23.
56. Matsusue, K., et al., *Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27*. Cell Metab, 2008. **7**(4): p. 302-11.
57. Murphy, S., S. Martin, and R.G. Parton, *Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2009. **1791**(6): p. 441-447.
58. Jacquier, N., et al., *Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 14): p. 2424-37.
59. Pu, J., et al., *Interactomic study on interaction between lipid droplets and mitochondria*. Protein Cell, 2011. **2**(6): p. 487-96.
60. van Manen, H.J., et al., *Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(29): p. 10159-64.
61. Levine, T. and C. Loewen, *Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(4): p. 371-8.
62. Lev, S., *Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 739-50.
63. Cermelli, S., et al., *The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot*. Curr Biol, 2006. **16**(18): p. 1783-95.
64. Marzluff, W.F. and D.C. Tatomer, *Histones: sequestered by jabba in Fatty storehouse*. Curr Biol, 2012. **22**(22): p. R951-3.
65. Jones, B., *Organelle dynamics: A histone anchor on lipid droplets*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(12): p. 752-3.
66. Li, Z., et al., *Lipid droplets control the maternal histone supply of Drosophila embryos*. Curr Biol, 2012. **22**(22): p. 2104-13.
67. Cole, N.B., et al., *Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6344-52.
68. Brasaemle, D.L., et al., *Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46835-42.
69. Brasaemle, D.L. and N.E. Wolins, *Isolation of lipid droplets from cells by density gradient centrifugation*. Curr Protoc Cell Biol, 2006. **Chapter 3**: p. Unit 3 15.
70. Krahmer, N., et al., *Protein Correlation Profiles Identify Lipid Droplet Proteins with High Confidence*. Molecular & Cellular Proteomics, 2013.
71. Guo, Y., et al., *Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 657-61.
72. Welte, M.A., *Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 5): p. 991-6.
73. Kimmel, A.R., et al., *Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins*. Journal of Lipid Research, 2010. **51**(3): p. 468-471.
74. Heid, H., et al., *Lipid Droplets, Perilipins and Cytokeratins - Unravelling Liaisons in Epithelium-Derived Cells*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63061.
75. Yamaguchi, T., *PAT family: lipid droplet-associated proteins that regulate the fat storage and lipolysis*. Seikagaku, 2007. **79**(2): p. 162-166.
76. Londos, C., et al., *Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(1): p. 51-8.
77. Wang, H., et al., *Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins*. J Biol Chem, 2009. **284**(46): p. 32116-25.
78. Wolins, N.E., D.L. Brasaemle, and P.E. Bickel, *A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins*. Febs Letters, 2006. **580**(23): p. 5484-5491.

79. Brasaemle, D.L., *Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis.* J Lipid Res, 2007. **48**(12): p. 2547-59.
80. Brasaemle, D.L. and N.E. Wolins, *Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion.* J Biol Chem, 2012. **287**(4): p. 2273-9.
81. Skinner, J.R., et al., *Perilipin 1 moves between the fat droplet and the endoplasmic reticulum.* Adipocyte, 2013. **2**(2): p. 80-86.
82. Sztalryd, C., et al., *Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation.* J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1093-103.
83. Yamaguchi, T., et al., *CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome.* J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30490-7.
84. Zierler, K.A., et al., *Functional cardiac lipolysis in mice critically depends on comparative gene identification-58.* J Biol Chem, 2013. **288**(14): p. 9892-904.
85. Moore, H.P., et al., *Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase.* J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 43109-20.
86. Jiang, H.P., S.E. Harris, and G. Serrero, *Molecular cloning of a differentiation-related mRNA in the adipogenic cell line 1246.* Cell Growth Differ, 1992. **3**(1): p. 21-30.
87. Brasaemle, D.L., et al., *Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein.* J Lipid Res, 1997. **38**(11): p. 2249-63.
88. Listenberger, L.L., et al., *Adipocyte differentiation-related protein reduces lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover.* FASEB Journal, 2007. **21**(5): p. A235-A235.
89. Tansey, J.T., et al., *Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6494-9.
90. Chang, B.H., et al., *Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein.* Molecular and Cellular Biology, 2006. **26**(3): p. 1063-76.
91. Wolins, N.E., B. Rubin, and D.L. Brasaemle, *TIP47 associates with lipid droplets.* J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5101-8.
92. Bulankina, A.V., et al., *TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets.* J Cell Biol, 2009. **185**(4): p. 641-55.
93. Buers, I., et al., *TIP47, a lipid cargo protein involved in macrophage triglyceride metabolism.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(5): p. 767-73.
94. Gong, J., Z. Sun, and P. Li, *CIDE proteins and metabolic disorders.* Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(2): p. 121-6.
95. Traini, M. and W. Jessup, *Lipid droplets and adipose metabolism: a novel role for FSP27/CIDEA.* Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(2): p. 147-9.
96. Hall, A.M., et al., *Hepatic expression of cell death-inducing DFFA-like effector C in obese subjects is reduced by marked weight loss.* Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(2): p. 417-9.
97. Jinno, Y., et al., *Cide-a and Cide-c are induced in the progression of hepatic steatosis and inhibited by eicosapentaenoic acid.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. **83**(2): p. 75-81.
98. Zhao, D., et al., *The CIDE genes might serve as novel targets for therapeutic intervention of obesity.* Med Hypotheses, 2007. **69**(2): p. 461-2.
99. Li, J.Z. and P. Li, *Cide proteins and the development of obesity.* Novartis Found Symp, 2007. **286**: p. 155-9; discussion 159-63, 196-203.
100. Lin, S.C. and P. Li, *CIDEA, a novel link between brown adipose tissue and obesity.* Trends Mol Med, 2004. **10**(9): p. 434-9.
101. Yonezawa, T., et al., *Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism.* Mol Biosyst, 2011. **7**(1): p. 91-100.
102. Xu, L., L. Zhou, and P. Li, *CIDE Proteins and Lipid Metabolism.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(5): p. 1094-8.

103. Nordstrom, E.A., et al., *A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-alpha)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity*. *Diabetes*, 2005. **54**(6): p. 1726-34.
104. Puri, V., et al., *Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(22): p. 7833-8.
105. Zhou, Z., et al., *Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity*. *Nat Genet*, 2003. **35**(1): p. 49-56.
106. Ranjit, S., et al., *Regulation of fat specific protein 27 by isoproterenol and TNF-alpha to control lipolysis in murine adipocytes*. *J Lipid Res*, 2011. **52**(2): p. 221-36.
107. Smith, S., *The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes*. *FASEB J*, 1994. **8**(15): p. 1248-59.
108. Salo, V.T., Y. Ohsaki, and E. Ikonen, *Lipid droplet biogenesis: when the endoplasmic reticulum starts to fatten up*. *Curr Opin Lipidol*, 2011. **22**(6): p. 505-6.
109. Beller, M., et al., *Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(11): p. 2176-82.
110. Robenek, H., et al., *Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 20): p. 4215-24.
111. Blanchette-Mackie, E.J., et al., *Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes*. *J Lipid Res*, 1995. **36**(6): p. 1211-26.
112. Cushman, S.W., *Structure-function relationships in the adipose cell. I. Ultrastructure of the isolated adipose cell*. *J Cell Biol*, 1970. **46**(2): p. 326-41.
113. Chang, T.Y., et al., *Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **297**(1): p. E1-9.
114. Smith, S.J., et al., *Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat*. *Nat Genet*, 2000. **25**(1): p. 87-90.
115. Stone, S.J., M.C. Levin, and R.V. Farese, Jr., *Membrane topology and identification of key functional amino acid residues of murine acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase-2*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(52): p. 40273-82.
116. Ploegh, H.L., *A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 435-8.
117. Deggerich, A., *TIP47, ein intrazelluläres Apolipoprotein und/oder ein Sortierungsfaktor für Mannose-6-Phosphat Rezeptoren*. 2009, Köln.
118. Goodman, J.M., *The gregarious lipid droplet*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(42): p. 28005-28009.
119. Zanghellini, J., F. Wodlei, and H.H. von Grunberg, *Phospholipid demixing and the birth of a lipid droplet*. *Journal of Theoretical Biology*, 2010. **264**(3): p. 952-961.
120. Saka, H.A. and R.H. Valdivia, *Emerging Roles for Lipid Droplets in Immunity and Host-Pathogen Interactions*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012.
121. Kenwright, D.A., et al., *First-passage-probability analysis of active transport in live cells*. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2012. **86**(3 Pt 1): p. 031910.
122. Barak, P., et al., *Quantitative optical trapping on single organelles in cell extract*. *Nat Methods*, 2013. **10**(1): p. 68-70.
123. Gross, S.P., et al., *Dynein-mediated cargo transport in vivo. A switch controls travel distance*. *J Cell Biol*, 2000. **148**(5): p. 945-56.
124. Vale, R.D., *The molecular motor toolbox for intracellular transport*. *Cell*, 2003. **112**(4): p. 467-80.
125. Hayden, J.H., *Microtubule-associated organelle and vesicle transport in fibroblasts*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1988. **10**(1-2): p. 255-62.
126. Hunt, S.D. and D.J. Stephens, *The role of motor proteins in endosomal sorting*. *Biochem Soc Trans*, 2011. **39**(5): p. 1179-84.
127. Bryantseva, S.A. and O.N. Zhapparova, *Bidirectional transport of organelles: unity and struggle of opposing motors*. *Cell Biol Int*, 2012. **36**(1): p. 1-6.
128. van den Berg, R. and C.C. Hoogenraad, *Molecular motors in cargo trafficking and synapse assembly*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **970**: p. 173-96.
129. Leidel, C., et al., *Measuring molecular motor forces in vivo: implications for tug-of-war models of bidirectional transport*. *Biophys J*, 2012. **103**(3): p. 492-500.
130. Smith, G.A., S.P. Gross, and L.W. Enquist, *Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(6): p. 3466-70.

131. St Johnston, D., *Counting motors by force*. Cell, 2008. **135**(6): p. 1000-1.
132. Shubeita, G.T., et al., *Consequences of motor copy number on the intracellular transport of kinesin-1-driven lipid droplets*. Cell, 2008. **135**(6): p. 1098-107.
133. Chada, S.R. and P.J. Hollenbeck, *Mitochondrial movement and positioning in axons: the role of growth factor signaling*. J Exp Biol, 2003. **206**(Pt 12): p. 1985-92.
134. Murray, J.W., E. Bananis, and A.W. Wolkoff, *Reconstitution of ATP-dependent movement of endocytic vesicles along microtubules in vitro: an oscillatory bidirectional process*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(2): p. 419-33.
135. Blocker, A., et al., *Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules*. J Cell Biol, 1997. **137**(1): p. 113-29.
136. Bostrom, P., et al., *Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(9): p. 1945-51.
137. Andersson, L., et al., *PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 11): p. 2246-57.
138. Gross, S.P., et al., *Coordination of opposite-polarity microtubule motors*. J Cell Biol, 2002. **156**(4): p. 715-24.
139. Welte, M.A., et al., *Regulation of lipid-droplet transport by the perilipin homolog LSD2*. Curr Biol, 2005. **15**(14): p. 1266-75.
140. Olofsson, S.O., et al., *Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 448-58.
141. Chernomordik, L.V. and M.M. Kozlov, *Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps*. Cell, 2005. **123**(3): p. 375-82.
142. Uittenbogaard, A., et al., *Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4925-31.
143. Cristancho, A.G. and M.A. Lazar, *Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(11): p. 722-34.
144. Cinti, S., *The adipose organ*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. **73**(1): p. 9-15.
145. Frontini, A. and S. Cinti, *Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ*. Cell Metab, 2010. **11**(4): p. 253-6.
146. Gesta, S., Y.H. Tseng, and C.R. Kahn, *Developmental origin of fat: tracking obesity to its source*. Cell, 2007. **131**(2): p. 242-56.
147. Young, C., et al., *A porcine model for adipose tissue-derived endothelial cell transplantation*. Cell Transplant, 1992. **1**(4): p. 293-8.
148. Lee, J.A., et al., *Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells*. Ann Plast Surg, 2003. **50**(6): p. 610-7.
149. Hong, S.J., D.O. Traktuev, and K.L. March, *Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(1): p. 86-91.
150. Madonna, R. and R. De Caterina, *Adipose tissue: a new source for cardiovascular repair*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2010. **11**(2): p. 71-80.
151. Cherubino, M. and K.G. Marra, *Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction*. Regen Med, 2009. **4**(1): p. 109-17.
152. de Villiers, J.A., N. Houreld, and H. Abrahamse, *Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: implications for regenerative medicine*. Stem Cell Rev, 2009. **5**(3): p. 256-65.
153. Masuda, Y., et al., *ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells*. J Lipid Res, 2006. **47**(1): p. 87-98.
154. Zechner, R., et al., *FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling*. Cell Metab, 2012. **15**(3): p. 279-91.
155. Khor, V.K., W.J. Shen, and F.B. Kraemer, *Lipid droplet metabolism*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2013. **16**(6): p. 632-7.
156. Bosma, M., et al., *The lipid droplet coat protein perilipin 5 also localizes to muscle mitochondria*. Histochem Cell Biol, 2012. **137**(2): p. 205-16.
157. Singh, R., et al., *Autophagy regulates lipid metabolism*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1131-5.

158. Mathew, R. and E. White, *Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night*. *Curr Opin Genet Dev*, 2011. **21**(1): p. 113-9.
159. Wu, J.J., et al., *Metabolism meets autophagy*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(24): p. 4780-1.
160. Singh, R., *Autophagy and regulation of lipid metabolism*. *Results Probl Cell Differ*, 2010. **52**: p. 35-46.
161. Rabinowitz, J.D. and E. White, *Autophagy and metabolism*. *Science*, 2010. **330**(6009): p. 1344-8.
162. Kovan, J., et al., *Potential role of autophagy in modulation of lipid metabolism*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **298**(1): p. E1-7.
163. Zechner, R. and F. Madeo, *CELL BIOLOGY Another way to get rid of fat*. *Nature*, 2009. **458**(7242): p. 1118-1119.
164. Meijer, A.J., *Autophagy research: Lessons from metabolism*. *Autophagy*, 2009. **5**(1).
165. Dong, H. and M.J. Czaja, *Regulation of lipid droplets by autophagy*. *Trends Endocrinol Metab*, 2011. **22**(6): p. 234-40.
166. Singh, R. and A.M. Cuervo, *Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism*. *Int J Cell Biol*, 2012. **2012**: p. 282041.
167. Mehlem, A., et al., *Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease*. *Nat Protoc*, 2013. **8**(6): p. 1149-1154.
168. Suzuki, M., Y. Shinohara, and T. Fujimoto, *Histochemical detection of lipid droplets in cultured cells*. *Methods Mol Biol*, 2013. **931**: p. 483-91.
169. Evans, C.L. and X.S. Xie, *Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: chemical imaging for biology and medicine*. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2008. **1**: p. 883-909.
170. Jungst, C., M.J. Winterhalder, and A. Zumbusch, *Fast and long term lipid droplet tracking with CARS microscopy*. *J Biophotonics*, 2011. **4**(6): p. 435-41.
171. Cheng, J., et al., *Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets*. *Histochem Cell Biol*, 2009. **132**(3): p. 281-91.
172. Di Napoli, C., et al., *Chemically-specific dual/differential CARS micro-spectroscopy of saturated and unsaturated lipid droplets*. *J Biophotonics*, 2012.
173. Rinia, H.A., et al., *Quantitative Label-Free Imaging of Lipid Composition and Packing of Individual Cellular Lipid Droplets Using Multiplex CARS Microscopy*. *Biophysical Journal*, 2008. **95**(10): p. 4908-4914.
174. Burger, K.N.J., et al., *Label-free cellular imaging of lipid composition of individual lipid droplets using multiplex CARS microscopy*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2008. **154**: p. S5-S5.
175. Bonn, M., et al., *Imaging of chemical and physical state of individual cellular lipid droplets using multiplex CARS microscopy*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2009. **40**(7): p. 763-769.
176. Zumbusch, A., W. Langbein, and P. Borri, *Nonlinear vibrational microscopy applied to lipid biology*. *Prog Lipid Res*, 2013.
177. Ude, J., *Mikroskopische Untersuchungen von Transport- und Fusionsprozessen von LDs in lebenden humanen Zellen*, in *Fachbereich Chemie*. 2011, Konstanz.
178. Lee, J.H., et al., *Synthesis of a new fluorescent small molecule probe and its use for in vivo lipid imaging*. *Chemical Communications*, 2011. **47**(26): p. 7500-7502.
179. Yang, H.J., et al., *Monodansylpentane as a blue-fluorescent lipid-droplet marker for multi-color live-cell imaging*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e32693.
180. Kim, E., S. Lee, and S.B. Park, *A Seoul-Fluor-based bioprobe for lipid droplets and its application in image-based high throughput screening*. *Chem Commun (Camb)*, 2012. **48**(17): p. 2331-3.
181. Spandl, J., et al., *Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540*. *Traffic*, 2009. **10**(11): p. 1579-84.
182. Ohsaki, Y., et al., *A pitfall in using BODIPY dyes to label lipid droplets for fluorescence microscopy*. *Histochem Cell Biol*, 2010. **133**(4): p. 477-80.
183. Fukumoto, S. and T. Fujimoto, *Deformation of lipid droplets in fixed samples*. *Histochem Cell Biol*, 2002. **118**(5): p. 423-8.
184. Drucker, A.M. and C.F. Rosen, *Drug-induced photosensitivity: culprit drugs, management and prevention*. *Drug Saf*, 2011. **34**(10): p. 821-37.

185. Lentner, A. and U. Bohler, *Photosensitivity reaction to intravenously administered fluorescein*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 1995. **11**(4): p. 178-9.
186. Sieber, F. and M. Sieberblum, *Dye-Mediated Photosensitization of Murine Neuroblastoma-Cells*. *Cancer Research*, 1986. **46**(4): p. 2072-2076.
187. Murphy, S., S. Martin, and R.G. Parton, *Quantitative analysis of lipid droplet fusion: inefficient steady state fusion but rapid stimulation by chemical fusogens*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15030.
188. Duzgunes, N., et al., *Proton-induced fusion of oleic acid-phosphatidylethanolamine liposomes*. *Biochemistry*, 1985. **24**(13): p. 3091-8.
189. Fei, W., et al., *Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast*. *J Cell Biol*, 2008. **180**(3): p. 473-82.
190. Zhang, X. and K. Zhang, *Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Lipid Droplet Formation and Type II Diabetes*. *Biochem Res Int*, 2012. **2012**: p. 247275.
191. Lee, J.S., et al., *Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation*. *Am J Transl Res*, 2012. **4**(1): p. 102-13.
192. Hapala, I., E. Marza, and T. Ferreira, *Is fat so bad? Modulation of endoplasmic reticulum stress by lipid droplet formation*. *Biol Cell*, 2011. **103**(6): p. 271-85.
193. Zha, B.S. and H. Zhou, *ER Stress and Lipid Metabolism in Adipocytes*. *Biochem Res Int*, 2012. **2012**: p. 312943.
194. Layerenza, J.P., et al., *Nuclear lipid droplets: a novel nuclear domain*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1831**(2): p. 327-40.
195. Uzbekov, R. and P. Roingard, *Nuclear lipid droplets identified by electron microscopy of serial sections*. *BMC Res Notes*, 2013. **6**: p. 386.
196. Kunwar, A., et al., *Mechanical stochastic tug-of-war models cannot explain bidirectional lipid-droplet transport*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011.
197. Jeon, J.H., et al., *In vivo anomalous diffusion and weak ergodicity breaking of lipid granules*. *Phys Rev Lett*, 2011. **106**(4): p. 048103.
198. Arcizet, D., et al., *Temporal analysis of active and passive transport in living cells*. *Phys Rev Lett*, 2008. **101**(24): p. 248103.
199. Harrison, A.W., et al., *Modes of correlated angular motion in live cells across three distinct time scales*. *Phys Biol*, 2013. **10**(3): p. 036002.
200. Lyn, R.K., et al., *Dynamics of lipid droplets induced by the hepatitis C virus core protein*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **399**(4): p. 518-24.
201. Matteoni, R. and T.E. Kreis, *Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules*. *J Cell Biol*, 1987. **105**(3): p. 1253-65.
202. Debarre, D., et al., *Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy*. *Nat Methods*, 2006. **3**(1): p. 47-53.
203. Nan, X., E.O. Potma, and X.S. Xie, *Nonperturbative chemical imaging of organelle transport in living cells with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy*. *Biophys J*, 2006. **91**(2): p. 728-35.
204. Dou, W., et al., *Label-free imaging of lipid-droplet intracellular motion in early Drosophila embryos using femtosecond-stimulated Raman loss microscopy*. *Biophys J*, 2012. **102**(7): p. 1666-75.
205. Discher, D.E., P. Janmey, and Y.L. Wang, *Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate*. *Science*, 2005. **310**(5751): p. 1139-43.
206. Rizzatti, V., et al., *Lipid droplets characterization in adipocyte differentiated 3T3-L1 cells: size and optical density distribution*. *Eur J Histochem*, 2013. **57**(3): p. e24.
207. Paar, M., et al., *Remodeling Of lipid droplets during lipolysis and growth in adipocytes*. *J Biol Chem*, 2012.
208. Franke, W.W., M. Hergt, and C. Grund, *Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules*. *Cell*, 1987. **49**(1): p. 131-41.
209. Jungst, C., M. Klein, and A. Zumbusch, *Long-term live cell microscopy studies of lipid droplet fusion dynamics in adipocytes*. *J Lipid Res*, 2013. **54**(12): p. 3419-29.
210. Arisawa, K., et al., *Changes in the phospholipid fatty acid composition of the lipid droplet during the differentiation of 3T3-L1 adipocytes*. *J Biochem*, 2013.
211. Ohsaki, Y., et al., *Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1791**(6): p. 399-407.

212. Ollila, O.H., et al., *Interfacial tension and surface pressure of high density lipoprotein, low density lipoprotein, and related lipid droplets*. Biophys J, 2012. **103**(6): p. 1236-44.
213. Gong, J., et al., *Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites*. J Cell Biol, 2011. **195**(6): p. 953-63.
214. Ledford, A.S., et al., *Structural and dynamic interfacial properties of the lipoprotein initiating domain of apolipoprotein B*. J Lipid Res, 2009. **50**(1): p. 108-15.
215. Mitsche, M.A., L. Wang, and D.M. Small, *Adsorption of egg phosphatidylcholine to an air/water and triolein/water bubble interface: use of the 2-dimensional phase rule to estimate the surface composition of a phospholipid/triolein/water surface as a function of surface pressure*. J Phys Chem B, 2010. **114**(9): p. 3276-84.
216. Su, J. and H. Guo, *Effect of nanochannel dimension on the transport of water molecules*. J Phys Chem B, 2012. **116**(20): p. 5925-32.
217. Laforenza, U., M.F. Scaffino, and G. Gastaldi, *Aquaporin-10 represents an alternative pathway for glycerol efflux from human adipocytes*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54474.
218. Ghosh, S., et al., *Dynamics in Cytoplasm, Nucleus and Lipid Droplet of a Live CHO Cell: Time-Resolved Confocal Microscopy*. Langmuir, 2013.
219. Jorgacevski, J., et al., *Fusion pore stability of peptidergic vesicles*. Mol Membr Biol, 2010. **27**(2-3): p. 65-80.
220. Cho, W.J., A. Jeremic, and B.P. Jena, *Size of supramolecular SNARE complex: membrane-directed self-assembly*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(29): p. 10156-7.
221. Vianello, A., et al., *The mitochondrial permeability transition pore (PTP) - an example of multiple molecular exaptation?* Biochim Biophys Acta, 2012. **1817**(11): p. 2072-86.
222. Holthuis, J.C. and T.P. Levine, *Lipid traffic: floppy drives and a superhighway*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(3): p. 209-20.
223. Olayioye, M.A., et al., *StarD10, a START domain protein overexpressed in breast cancer, functions as a phospholipid transfer protein*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 27436-42.
224. Horibata, Y. and H. Sugimoto, *StarD7 mediates the intracellular trafficking of phosphatidylcholine to mitochondria*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7358-65.
225. Szymanski, K.M., et al., *The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20890-5.
226. Ohsaki, Y., et al., *Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 14): p. 2415-22.
227. Jambunathan, S., et al., *FSP27 Promotes Lipid Droplet Clustering and Then Fusion to Regulate Triglyceride Accumulation*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28614.
228. Grahm, T.H., et al., *FSP27 and PLIN1 interaction promotes the formation of large lipid droplets in human adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2013.
229. Sun, Z., et al., *Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1594.
230. Barneda, D., et al., *Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "browning" of white adipose tissues*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(5): p. 924-33.
231. Puri, V. and M.P. Czech, *Lipid droplets: FSP27 knockout enhances their sizzle*. J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2693-6.
232. Nishino, N., et al., *FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets*. J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2808-21.
233. Keller, P., et al., *Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol*. J Biol Chem, 2008. **283**(21): p. 14355-65.
234. Puri, V., et al., *Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(47): p. 34213-34218.
235. Toh, S.Y., et al., *Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of fsp27 deficient mice*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2890.

236. Somwar, R., C.T. Roberts, Jr., and O. Varlamov, *Live-cell imaging demonstrates rapid cargo exchange between lipid droplets in adipocytes*. FEBS Lett, 2011. **585**(12): p. 1946-50.
237. Helle, S.C., et al., *Organization and Function of Membrane Contact Sites*. Biochim Biophys Acta, 2013.
238. Klemm, R.W., et al., *A Conserved Role for Atlastin GTPases in Regulating Lipid Droplet Size*. Cell Rep, 2013.
239. Goyal, U. and C. Blackstone, *Untangling the web: Mechanisms underlying ER network formation*. Biochim Biophys Acta, 2013.
240. Orso, G., et al., *Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin*. Nature, 2009. **460**(7258): p. 978-83.
241. Moss, T.J., A. Daga, and J.A. McNew, *Fusing a lasting relationship between ER tubules*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(7): p. 416-23.
242. Miyagawa, Y., H. Okita, and N. Kiyokawa, *Induction of adipogenic differentiation in three-dimensional culture model on a novel microfabricated scaffold*. Methods Mol Biol, 2013. **952**: p. 275-86.
243. Cheng, N.C., S. Wang, and T.H. Young, *The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities*. Biomaterials, 2012. **33**(6): p. 1748-58.
244. Saleh, F.A., M. Whyte, and P.G. Genever, *Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cell activity in a three-dimensional in vitro model*. Eur Cell Mater, 2011. **22**: p. 242-57; discussion 257.
245. Jing, Y. and Y. Jian-Xiong, *3-D spheroid culture of bone marrow mesenchymal stem cell of rhesus monkey with improved multi-differentiation potential to epithelial progenitors and neuron in vitro*. Clin Experiment Ophthalmol, 2011. **39**(8): p. 808-19.
246. Lorenzo, C., et al., *Live cell division dynamics monitoring in 3D large spheroid tumor models using light sheet microscopy*. Cell Div, 2011. **6**: p. 22.
247. Ducharme, N.A. and P.E. Bickel, *Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 942-9.
248. Marcinkiewicz, A., et al., *The phosphorylation of serine 492 of perilipin A directs lipid droplet fragmentation and dispersion*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(17): p. 11901-11909.
249. Gonzalesz-Cruz, R.D. and E.M. Darling, *Adipose-derived stem cell fate is predicted by cellular mechanical properties*. Adipocyte, 2013. **2**(2): p. 87-91.
250. Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, *Adipose-derived stem cells for regenerative medicine*. Circ Res, 2007. **100**(9): p. 1249-60.
251. Dohmen, P.M., et al., *A tissue engineered heart valve implanted in a juvenile sheep model*. Med Sci Monit, 2003. **9**(4): p. BR97-BR104.
252. Walgenbach, K.J., et al., *Tissue engineering in plastic reconstructive surgery*. Anat Rec, 2001. **263**(4): p. 372-8.
253. Lo Surdo, J.L., B.A. Millis, and S.R. Bauer, *Automated microscopy as a quantitative method to measure differences in adipogenic differentiation in preparations of human mesenchymal stromal cells*. Cytotherapy, 2013.
254. Wang, H.W., et al., *Microfluidic CARS cytometry*. Opt Express, 2008. **16**(8): p. 5782-9.
255. Camp, C.H., et al., *Label-free flow cytometry using multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering (MCARS) for the analysis of biological specimens*. Optics Letters, 2011. **36**(12): p. 2309-2311.
256. Yun, H., K. Kim, and W.G. Lee, *Cell manipulation in microfluidics*. Biofabrication, 2013. **5**(2): p. 022001.
257. Swain, J.E., et al., *Thinking big by thinking small: application of microfluidic technology to improve ART*. Lab Chip, 2013.
258. Jayamohan, H., H.J. Sant, and B.K. Gale, *Applications of microfluidics for molecular diagnostics*. Methods Mol Biol, 2013. **949**: p. 305-34.
259. Zhang, Q. and R.H. Austin, *Applications of Microfluidics in Stem Cell Biology*. Bionanoscience, 2012. **2**(4): p. 277-286.

- 
260. Carroll, N.J., et al., *Microfluidic Synthesis of Monodisperse Nanoporous Oxide Particles and Control of Hierarchical Pore Structure*. ACS Appl Mater Interfaces, 2013.
  261. Ke, T., et al., *Microfluidic synthesis of monodisperse Cu nanoparticles in aqueous solution*. J Nanosci Nanotechnol, 2011. **11**(6): p. 5154-8.
  262. Abate, A.R., et al., *Synthesis of monodisperse microparticles from non-Newtonian polymer solutions with microfluidic devices*. Adv Mater, 2011. **23**(15): p. 1757-60.
  263. Lazarus, L.L., et al., *Flow-focused synthesis of monodisperse gold nanoparticles using ionic liquids on a microfluidic platform*. Lab Chip, 2010. **10**(24): p. 3377-9.
  264. Schutze, F., et al., *Fluorescent conjugated block copolymer nanoparticles by controlled mixing*. Chem Commun (Camb), 2012.
  265. Roser, P., *CARS-Mikroskopie von Lipid Droplets*, in *Fachbereich Chemie*. 2012, Konstanz.
  266. Mitra, R., et al., *Detection of Lipid-Rich Prostate Circulating Tumour Cells with Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy*. BMC Cancer, 2012. **12**(1): p. 540.
  267. Peng, X., et al., *Fluorescence ratiometry and fluorescence lifetime imaging: using a single molecular sensor for dual mode imaging of cellular viscosity*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(17): p. 6626-35.
  268. Kuimova, M.K., et al., *Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(21): p. 6672-3.
  269. Wang, L., et al., *Activatable rotor for quantifying lysosomal viscosity in living cells*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(8): p. 2903-6.
  270. Levitt, J.A., et al., *Membrane-Bound Molecular Rotors Measure Viscosity in Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging*. Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(27): p. 11634-11642.
  271. Suhling, K., et al., *Fluorescence lifetime imaging of molecular rotors in living cells*. J Vis Exp, 2012(60).
  272. Valeri, D. and J.A. Meirelles, *Viscosities of Fatty Acids, Triglycerides, and Their Binary Mixtures*. JAOCS, 1997. **74**(10).
  273. Layerenza, J.P., et al., *Nuclear lipid droplets: A novel nuclear domain*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1831**(2): p. 327-340.
  274. Konig, K., A. Uchugonova, and E. Gorjup, *Multiphoton fluorescence lifetime imaging of 3D-stem cell spheroids during differentiation*. Microsc Res Tech, 2011. **74**(1): p. 9-17.
  275. Cauzzi, D., et al., *Temperature-dependent fluorescence of Cu<sub>5</sub> metal clusters: a molecular thermometer*. Angew Chem Int Ed Engl, 2012. **51**(38): p. 9662-5.
  276. Wang, X., et al., *Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the CIDE-N domain of Fsp27*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2012. **68**(Pt 12): p. 1529-33.
  277. Lee, S.M., T.H. Jang, and H.H. Park, *Molecular basis for homo-dimerization of the CIDE domain revealed by the crystal structure of the CIDE-N domain of FSP27*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **439**(4): p. 564-569.
  278. Robenek, H. and N.J. Severs, *Lipid droplet growth by fusion: insights from freeze-fracture imaging*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2009. **13**(11-12): p. 4657-4661.
  279. van Hameren, R., et al., *Self-assembly of corrole trimers in solution and at the solid-liquid interface*. Journal of Materials Chemistry, 2009. **19**(1): p. 66-69.