

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNGEN ZUR LYSOSOMENGRÖßE
IN CHS- UND FAN-DEFIZIENTEN ZELLEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MARIE-CATHERINE FREDERIKSEN

aus Braunschweig

Kiel 2009

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Adam

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Paul Saftig

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2009

gez.: Prof. Dr. med. Reiner Siebert
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Intrazellulärer Vesikelverkehr	1
1.2 Endozytose	1
1.2.1 Formen der Endozytose	1
1.3 Exozytose	2
1.3.1 Konstitutive Exozytose	2
1.3.2 Regulierte Exozytose	2
1.4 Membranfusion und Sekretion	4
1.5 Lysosomen	5
1.5.1 Konventionelle Lysosomen und sekretorische Lysosomen	5
1.6 Immunologische Synapse	6
1.7 Defekte im vesikulären Transport	7
1.8 Das Chediak-Higashi-Syndrom	8
1.8.1 Charakterisierung des Chediak-Higashi-Syndroms	8
1.8.2 Erkrankungsformen	10
1.8.3 Diagnostik des CHS	11
1.8.4 Therapie des CHS	11
1.9 Albinismussyndrome	12
1.10 Charakterisierung des LYST-Proteins	13
1.11 Charakterisierung des FAN-Proteins	14
1.12 Die Proteinkinase C	15
1.13 RACK-1	17
1.14 Fragestellung	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Verbrauchsmaterial	19
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	19
2.1.4 Zelllinien	20
2.2 Methoden	20

Inhalt

2.2.1 Zellkultur	20
2.2.2 Passagieren der Zellen mit Trypsin-EDTA	21
2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	21
2.2.4 Aussäen von Fibroblasten auf mikroskopische Deckgläschen	22
2.2.5 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren	22
2.2.6 Fluoreszenzfärbung	23
2.2.7 Synchronisation der Zellen	23
2.2.8 Langzeitlagerung der Zellen	24
2.2.9 Analyse von Bildern mit dem Programm ImageJ	24
2.2.10 Bearbeitung der Laserscanneraufnahmen	25
2.2.11 Die einfaktorielle Varianzanalyse	26
3. Ergebnisse	27
3.1 Die Lysosomen von FAN-defizienten Fibroblasten sind sowohl in synchronisierten als auch in unsynchronisierten Zellen signifikant größer als die Lysosomen von Wildtyp-Fibroblasten	27
3.2 Die Behandlung von Fibroblasten der Zelllinien MCHSF2, C57-CF2, FAN ko und wt mit Inhibitoren der Proteinkinase C und der Thiolprotease Calpain hat keine erkennbaren Änderungen der Lysosomengröße zur Folge	30
3.3 Untersuchungen von fremdangefertigten Aufnahmen der Zelllinien MCHSF2, C57-CF2, FAN ko und wt bestätigen das Vorliegen eines Größenunterschiedes zwischen den Lysosomen von FAN-defizienten Fibroblasten und FAN-kompetenten Fibroblasten und LYST-defizienten und LYST-kompetenten Fibroblasten	36
3.4 Untersuchungen des Einflusses von Inhibitoren der Proteinkinase C und der Thiolprotease Calpain auf die Lysosomengröße anhand von fremdangefertigten Aufnahmen weisen keine signifikanten Änderungen der Lysosomengröße nach	40
3.5 Die Anzahl der Lysosomen in den Zellen der Zelllinie MCHSF2 ist signifikant reduziert im Vergleich zur Zelllinie C57-CF2, für die Anzahl der Lysosomen der Zelllinie FAN ko lässt sich diese Aussage im Vergleich zur Zelllinie wt nicht treffen	44

4. Diskussion	46
4.1 Ein Defekt im FAN-Gen hat die Bildung von vergrößerten Lysosomen zur Folge	46
4.2 Behandlung der Zelllinien MCHSF2, C57-CF2, FAN ko und wt mit Inhibitoren der PKC und der Thiolprotease Calpain zeigt keinen darstellbaren Effekt auf die Größe der Lysosomen	47
4.3 Die Anzahl der Lysosomen ist in FAN-defizienten Zellen nicht signifikant vermindert	48
5. Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis	51
Danksagung	57
Lebenslauf	58
Anhang I: Durchschnittliche Lysosomengröße pro Zelle in pixel ² , normiert auf eine Stacksize von 100µm x 100µm	59
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen	65
Anhang II: Durchschnittliche Lysosomengröße pro Zelle in pixel ² , Rohdaten und Umrechnung auf 100µm x 100µm	88

1. Einleitung

1.1 Intrazellulärer Vesikelverkehr

Euzyten besitzen intrazelluläre membranumschlossene Reaktionsräume, die sogenannten „Kompartimente“, welche es der Zelle ermöglichen, gegenläufige Stoffwechselwege zur gleichen Zeit ablaufen zu lassen. Eukaryote Zellen können miteinander kommunizieren, ebenso wie die einzelnen Zellen mit der sie umgebenden Umwelt und die verschiedenen Kompartimente einer eukaryoten Zelle untereinander. Dies geschieht über eine Vielzahl komplexer Kommunikationswege, bei denen Vesikel eine wichtige Rolle spielen (1). Die beiden gegenläufigen Wege, welche die Kommunikation über den vesikulären Transport von Proteinen und anderen Molekülen vermitteln, werden als „Endozytose“ und „Exozytose“ bezeichnet. Die Plasmamembran stellt den Anfangspunkt des endozytotischen Weges und zugleich den Endpunkt des biosynthetisch-sekretorischen (exozytotischen) Weges dar. Durch den Austausch von Vesikeln steht die Plasmamembran über das Endoplasmatische Retikulum (ER) mit der Kernmembran in Verbindung. Die Fusion von Vesikeln mit intrazellulären Membranen oder der Plasmamembran ist für lebenswichtige Funktionen der Zellen essentiell, wie z.B. Membranbiogenese, synaptische Funktionen und Zellsekretion (2).

1.2 Endozytose

Endozytose ist definiert als die Aufnahme extrazellulärer Substanz, sowie die Internalisierung von Plasmamembran in eine Zelle. Zusätzlich zu ihrer Rolle im Vesikelverkehr kann Endozytose die Antwort einer Zelle auf einen externen Stimulus vermindern, indem gezielt Rezeptor-Liganden-Komplexe internalisiert werden. Dieser Prozess ist bekannt als Herunterregulation („down-regulation“) von Rezeptoren (3).

1.2.1 Formen der Endozytose

„Pinozytose“ oder „Flüssige-Phase-Endozytose“ von löslichen Molekülen ist Teil jeder endozytotischen Aufnahme und führt zu einer konzentrationsabhängigen, linearen Akkumulation des endozytierten, ungebundenen Materials. Im Gegensatz dazu folgt die rezeptorvermittelte Endozytose („receptor mediated endocytosis“, RME) von Liganden, welche spezifisch an ihren jeweiligen Rezeptor in der Plasmamembran binden, einem

Einleitung

Sättigungsverhalten (3). Aufgrund des Reifungsgrades der Vesikel und ihrer Aufgaben entlang des endozytotischen Weges bezeichnet man die Vesikel als primäre endozytotische Vesikel, frühe Endosomen, späte Endosomen und Lysosomen (3, 4).

1.3 Exozytose

Exozytose ist ein universeller zellulärer Prozess, der in einfachen Organismen, wie z.B. der Hefe, abläuft und auch in komplexen multizellulären Organismen, z.B. in allen Säugetieren, prominent vertreten ist. Verschiedene Vorgänge, wie z. B. Neurotransmission, Verdauung, Immunantwort und die Freisetzung von Hormonen, beruhen auf der Exozytose. Der exozytotische Weg beinhaltet den Transport vesikulärer Produkte vom Inneren der Zelle bis zu ihrem äußersten Punkt, der Plasmamembran. Die Vesikel müssen mit der Plasmamembran fusionieren, um ihren Inhalt freisetzen zu können (5). Proteine und andere Moleküle, wie z.B. Lipide, werden intrazellulär an spezifische Zielorte transportiert, abhängig davon in welche spezifische Vesikelpopulation sie sortiert sind, in welche Richtung sich diese Vesikel durch die Zelle bewegen und mit welcher Ziellmembran sie schließlich fusionieren. Neu synthetisierte Proteine gelangen von den Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) in dessen Lumen. Von dort werden die Moleküle zum Golgi-Komplex transportiert und weiter prozessiert. Innerhalb des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) werden sie sortiert, in spezifische post-Golgi-Vesikel verpackt und gelangen zu ihrem Bestimmungsort, z.B. zu Lysosomen, zu Endosomen oder an die Plasmamembran. Exozytose kann konstitutiv, also kontinuierlich, oder streng reguliert ablaufen (2).

1.3.1 Konstitutive Exozytose

Zur konstitutiven Exozytose zählt die Fusion von Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerkes mit der Plasmamembran, ein essentieller Vorgang für den Erhalt der Plasmamembran durch den Einbau von neu synthetisierten Proteinen und Lipiden. Die konstitutive Exozytose kommt in allen Zelltypen vor (2).

1.3.2 Regulierte Exozytose

Im Gegensatz zur konstitutiven Exozytose ist eine spezialisiertere Form der Exozytose, bekannt als „regulierte Exozytose“, auf einige bestimmte Zelltypen beschränkt. Die regulierte

Einleitung

Exozytose von sekretorischen Vesikeln findet erst nach Erhalt eines spezifischen Stimulus statt. Ein Beispiel hierfür stellt die Exozytose von Vesikeln in Nervenzellen dar (2). In der Mehrzahl der Fälle, so z.B. in Nervenzellen, wird die regulierte Exozytose durch einen lokalen, transienten Anstieg des Calciumgehaltes stimuliert (2, 6). Exozytose kann die völlige Verschmelzung eines Vesikels mit der Plasmamembran beinhalten, oder sie kann in Form des "kiss-and-run"-Mechanismus ablaufen, wie es häufig in spezialisierten Zellen, z.B. in neuronalen und neuroendokrinen Zellen, der Fall ist. Kiss-and-run-Exozytose beinhaltet die Bildung einer transienten „Fusionspore“ (siehe 1.4 Membranfusion), welche die Freisetzung einer begrenzten Menge des Vesikelinhaltes erlaubt, bevor die Pore sich wieder schließt und das Vesikel von der Plasmamembran dissoziiert (2).

Es gibt verschiedene Formen der regulierten Exozytose. In Neuronen z. B. interagiert jedes Vesikel einzeln mit der Plasmamembran. Pankreatische Azinuszellen, muköse Azinuszellen der Glandula nasalis, Amylase-produzierende Azinuszellen der Glandula parotis und zu einem geringen Teil von ca. 5% die β -Zellen des Pankreas nutzen die „zusammengesetzte Exozytose“ („compound exocytosis“), genauer die sequentielle zusammengesetzte Exozytose. Bei der sequentiellen zusammengesetzten Exozytose fusionieren zunächst plasmamembrannahe Vesikel mit der Plasmamembran, woraufhin tieferliegende Vesikel mit solchen Vesikeln fusionieren, die bereits mit der Plasmamembran Kontakt haben. Dies ist möglich durch die schnelle Umhüllung der fusionierten Vesikel mit filamentösem Aktin (f-Aktin), welches die Vesikel und die Fusionspore stabilisiert und offen hält. Bei der multivesikulären zusammengesetzten Exozytose fusionieren die einzelnen Vesikel miteinander, bevor sie anschließend als Komplex mit der Plasmamembran interagieren. Diese Form der Exozytose nutzen besonders Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und neutrophilen Granulozyten (6). Der Vorteil der zusammengesetzten Exozytose besteht darin, dass die Effizienz der Ausschüttung des Vesikelinhaltes deutlich steigt. Durch die zusammengesetzte Exozytose haben wesentlich mehr Vesikel die Möglichkeit, ihren Inhalt zu entleeren, als wenn nur diejenigen Vesikel mit unmittelbarem Membrankontakt dazu in der Lage wären (s. Abb. 1.1)(6).

Einleitung

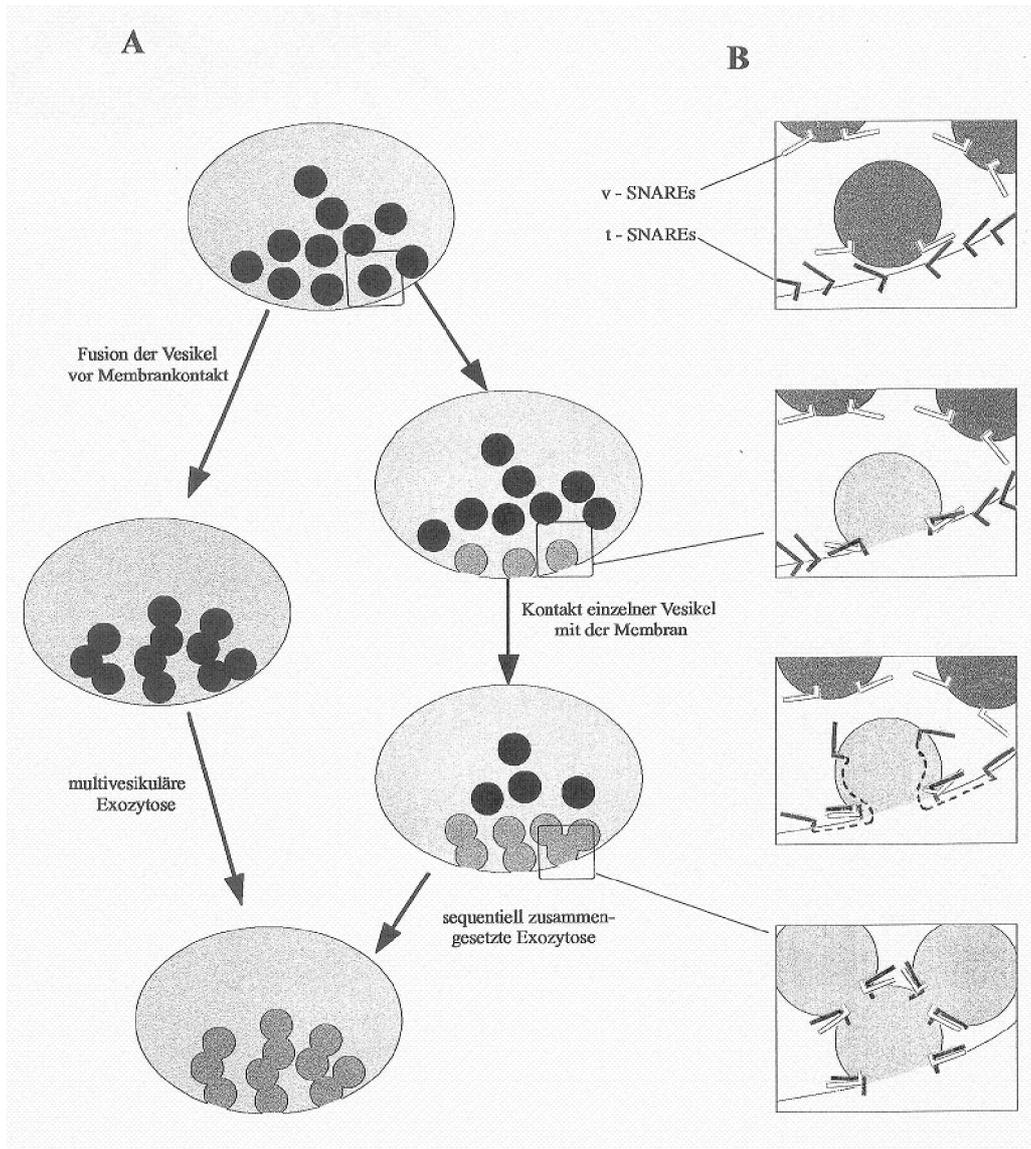


Abb. 1.1 (A) Formen der zusammengesetzten Exozytose. Schema der multivesikulären Exozytose und der sequentiellen zusammengesetzten Exozytose. (B) Theorie der v- und t-SNARE Bewegung bei der Vesikelfusion der zusammengesetzten Exozytose. v-SNAREs (weiß) bilden während der Vesikelfusion einen trans-Komplex mit t-SNAREs (schwarz). Ungebundene t-SNAREs breiten sich auf der Membran des fusionierten Vesikels aus und erreichen so die v-SNAREs von weiteren Vesikeln, wodurch die Fusion mit weiteren Vesikeln möglich wird (nach Pickett und Edwardsdon, 2006) (6).

1.4 Membranfusion

Damit die Vesikel ihren Inhalt freisetzen können, muss die Vesikelmembran mit der angrenzenden Membran, z.B. der Plasmamembran, fusionieren. Alle intrazellulären Membranfusionsereignisse in eukaryotischen Zellen beinhalten die Interaktion von sogenannten „SNARE“ (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor („NSF“) attachment

Einleitung

protein receptors)-Proteinen verschiedener Membranen (2). Die SNARE-Proteine Syntaxin-1 und SNAP-25 (soluble NSF attachment protein) sind mit der Plasmamembran assoziiert, sie bilden sogenannte „t-SNAREs“ (target-SNAREs), wohingegen das SNARE-Protein VAMP (vesicle-associated membrane protein) auf der Vesikelmembran lokalisiert ist und als „v-SNARE“ (vesikelassoziiert) bezeichnet wird (7). Zu Beginn der Membranfusion docken zunächst Vesikel an der Basis von sogenannten „Fusionsporen“, auch genannt „Porosomen“, an, indem sie sich mit ihren vesikelassoziierten v-SNAREs an porosomassoziierte t-SNAREs anlagern. Dies führt zur Destabilisierung der Lipidlayer im t-/v-SNARE-Kanalkomplex und hat die Vermischung der Lipide und somit die Membranfusion zur Folge. Die Porosomenöffnung dilatiert daraufhin. Die sekretorischen Vesikel schwellen an und erzeugen intravesikulären Druck, was die partielle oder totale Ausschüttung des Inhaltes veranlasst (5, 7). Nach der Sekretion schließt sich die Pore. Die ATPase NSF wird von dem Adapterprotein „ α/β SNAP“ zum SNARE Komplex rekrutiert. NSF fördert die Auflösung des SNARE Komplexes und nutzt dies zugleich zur ATP-(Adenosintriphosphat) Hydrolyse, wodurch das Recycling der SNAREs und weitere Runden der Fusion und Sekretion möglich werden (2).

1.5 Lysosomen

Lysosomen sind in allen Säugerzellen vorhandene, membranumschlossene Organellen, welche Hydrolasen und Lipasen für die Verdauung von Proteinen und Membranbestandteilen enthalten. Sie stellen den Endpunkt des endozytotischen Weges dar. In vielen Zellen des Immunsystems enthalten Lysosomen ebenfalls sekretorische Proteine, die in regulierter Exozytose in Antwort auf einen externen Stimulus freigesetzt werden können.

Melanozyten verwenden lysosomenähnliche Organellen, um Melanin für die Pigmentierung zu sezernieren. Lysosomen bewegen sich innerhalb der Zelle gerichtet entlang von Mikrotubuli mittels Kinesin und Dynein. Ohne einen Stimulus zur Sekretion sammeln sie sich um das Mikrotubuliorganisationszentrum (MTOC) an (8).

1.5.1 Konventionelle Lysosomen und sekretorische Lysosomen

Spezialisierte sekretorische Zellen nutzen sekretorische Granula für die Speicherung und die Exozytose ihrer Produkte und besitzen zusätzlich ein separates Kompartiment, das konventionelle Lysosom. Im Gegensatz dazu haben viele hämatopoetische Zellen und Melanozyten die Funktionen Sekretion und Lyse in einem Kompartiment vereint, dem

Einleitung

„sekretorischen Lysosom“, auch „lytisches Granulum“ genannt. Sekretorische Lysosomen beinhalten viele lysosomale Proteine. Die Organellen ermöglichen durch ihren sauren pH-Wert von 5,1 - 5,4 die Funktionsfähigkeit der degradativen Proteine. Es wird vermutet, dass sekretorische Lysosomen und konventionelle Lysosomen aus einer gemeinsamen Biogenese hervorgehen (9). Sekretorische Lysosomen unterscheiden sich von konventionellen Lysosomen durch ihre Fähigkeit, mit der Plasmamembran in regulierter Weise zu fusionieren. Daraus schließt man, dass eine spezialisierte Signal- und Transportmaschinerie für diese Form der Fusion und Sekretion vorhanden sein muss (8, 9). Die Organellen werden zu verschiedenen Zwecken von den Zellen genutzt. So liegen z.B. die Moleküle des Fas-Liganden, eines membranständigen Hauptmediators von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK), welcher die Apoptose von Zielzellen vermittelt, nach ihrer Synthese zunächst intrazellulär in sekretorischen Lysosomen vor. Diese begeben sich erst auf einen externen Stimulus hin zur Plasmamembran bzw. zur „immunologischen Synapse“ (siehe 1.6 Immunologische Synapse), wo sie in regulierter Weise fusionieren (10).

1.6 Immunologische Synapse

In spezialisierten sekretorischen Zellen des Immunsystems wird die Mobilisierung und Sekretion des Inhaltes der sekretorischen Lysosomen über einen externen Stimulus vermittelt und bewirkt die Bildung einer sogenannten „immunologischen Synapse“. Eine immunologische Synapse ist eine Neuordnung von Zelloberflächenproteinen, die einen Ring aus Adhäsionsproteinen und eine zentrale Domäne aus Signalproteinen bilden. Innerhalb der zentralen Domäne befindet sich eine sekretorische Domäne, in welcher gezielt die Ausschüttung des Inhaltes der sekretorischen Lysosomen stattfindet (8).

In zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) bewegt sich das MTOC von der perinukleären Region innerhalb der Zelle zu der Kontaktseite mit der Zielzelle, wobei das Mikrotubuli-Netzwerk sich gegen die Zielzelle ausrichtet („polarisiert“) (9). Viele andere Organellen polarisieren gemeinsam mit dem MTOC, einschließlich des Golgi-Apparates und der Mitochondrien. Sekretorische Lysosomen bewegen sich entlang der Mikrotubuli auf das MTOC zu, wo sie sich ansammeln, mit der Plasmamembran fusionieren und ihren lytischen Inhalt innerhalb der immunologischen Synapse freisetzen. Freigesetztes Material, einschließlich unvollständig verdauter Membranreste der Lysosomen, kann manchmal in den Spalten zwischen CTL und Zielzelle im Elektronenmikroskop beobachtet werden (8, 9).

1.7 Defekte im vesikulären Transport

Einige autosomal vererbte, genetisch bedingte Krankheiten, wie z.B. das Chediak-Higashi-Syndrom, das Hermansky-Pudlak-Syndrom, das Griscelli-Syndrom und das Elejalde-Syndrom, bewirken einen Defekt in Zellen des Immunsystems und in Melanozyten (s Abb. 1.2). Es treten Störungen im Vesikelverkehr der Zellen auf. So kann z.B. die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran und somit die Ausschüttung des Vesikelinhaltes gestört sein (9, 11). Bemerkenswerterweise zeigen Patienten mit Krankheiten, die Immundefizienz und Albinismus beinhalten, sowie die zugehörigen Maus-Modelle, keine primären neurologischen Defekte. Die konstitutive und die regulierte Exozytose sind vermutlich weitgehend intakt, oder aber Defekte in diesen Stoffwechselwegen können kompensiert werden (8). Neurologische Defekte können als Spätfolge auftreten (12).

Humane Erkrankung	Humanes Gen	Mausmutation	Protein	Proteinfunktion	Phenotyp der Mausmutanten und Defekte sekretorischer Lysosomen
Chediak-Higashi-Syndrom (CHS)	CHS1 (E)	beige	LYST/Beige	Lysosomaler Verkehr	Partieller Albinismus, Immundefizienz, Blutungsneigung, neurologische Defekte, vergrößerte Lysosomen welche eine gestörte Membranfusion aufweisen.
Hermansky-Pudlak-Syndrom 1 (HPS1)	HPS1 (E)	pale ear	HPS1	unbekannt	Defiziente Plättchenlagerung, oculocutaner Albinismus.
Hermansky-Pudlak-Syndrom 2 (HPS2)	ADT β 3A (HPS2) (E)	pearl	AP-3, β 3A-Untereinheit	Lysosomaler Verkehr	Defiziente Plättchenlagerung, oculocutaner Albinismus, fehlerhafte Sortierung lysosomaler Proteine.
	ADT δ (NE)	mocha	AP-3, δ -Untereinheit	Lysosomaler Verkehr	Defiziente Plättchenlagerung, oculocutaner Albinismus, neurologische Dysfunktionen, fehlerhafte Sortierung lysosomaler Proteine.

Einleitung

Hermansky-Pudlak-Syndrom 3 (HPS3)	HPS3 (E)	cocoa	HPS3p	unbekannt	Defiziente Plättchenlagerung, oculocutaner Albinismus.
Hermansky-Pudlak-Syndrom 4 (HPS4)	HPS4 (E)	light ear	HPS4p	unbekannt	Defiziente Plättchenlagerung, oculocutaner Albinismus.
Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS)	-(NE) RABGGTA (NE)	pallid gunmetal	Pallidin Rab-Geranyl-Geranyl-Transferase	t-SNARE Regulierung Membran-assoziationen	Defiziente Plättchenlagerung, oculocutaner Albinismus. Defiziente Plättchenlagerung, oculocutaner Albinismus, verminderte Sekretion von Melanosomen und lytischen Granula.
Griscelli-Syndrom	RAB27A MyoVA	ashen	Rab27a	Bewegung von Melanosomen und lytischen Granula	Hypopigmentation der Haut, Immundefizienz, fehlende Sekretion von Melanosomen und lytischen Granula.
		dilute	Myosin Va	Melanosomenbewegung	Hypopigmentation der Haut, neurologische Defekte, fehlende Sekretion von Melanosomen.
		leaden	Melanophilin	Melanosomenbewegung	Hypopigmentation der Haut, fehlende Sekretion von Melanosomen.

Abb. 1.2 Übersicht über Erkrankungen, welche im besonderen die Funktionsweisen der Zellen mit sekretorischen Lysosomen beeinträchtigen und die zugehörigen Maus-Modelle. (E): erkrankt; (NE): nicht erkrankt (nach Clark und Griffiths, 2004) (9).

1.8 Das Chediak-Higashi-Syndrom

1.8.1 Charakterisierung des Chediak-Higashi-Syndroms

Das Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) ist eine sehr seltene autosomal rezessive Erkrankung. Genaue Angaben zur Inzidenz liegen nicht vor. Die Erkrankung wurde erstmals 1943 von dem kubanischen Kinderarzt Beguez-Cesar beschrieben, weitere ausführliche Berichte folgten

Einleitung

von Steinbrinck 1948, von Chediak 1952 und von Higashi 1954 (12). Seit der Beschreibung 1952 durch Chediak, wurde weltweit von nur etwa 200 beobachteten Fällen berichtet (13).

Das CHS ist eine Multisystemerkrankung, die sich durch schwere immunologische Defekte, partiellen Albinismus, Blutungsneigung, einem lymphoproliferativen Syndrom und neurologischen Störungen äußert (12, 14). Es betrifft neben dem Menschen weitere Spezies, wie z.B. Mäuse, Ratten, Rinder, Katzen, Nerze und Killerwale (15). Dem CHS liegen Mutationen im so genannten LYST („lysosomal traffic regulator“-Gen (siehe 1.10 Charakterisierung des LYST-Proteins) auf dem menschlichen Chromosom 1q42-43 zugrunde, dessen zytosolisches Genprodukt, das LYST-Protein, eine wichtige Rolle im lysosomalen Vesikeltransport spielt und ubiquitär exprimiert wird (12, 16). Hierbei handelt es sich um ein großes Protein von 3801 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 429153 Dalton (17). Das LYST-Protein von Mensch und Maus ist zu 81% identisch (15, 18) und zu 88% homolog (15). Die für das CHS beschriebenen Mutationen im Bereich des LYST-Gens resultieren in einem vorzeitigen Stopp-Codon, welches ein trunkiertes LYST-Protein mit verminderter oder fehlender Funktion zur Folge hat (15). Das LYST-Protein scheint in bislang unbekannter Weise an der Regulierung des Transports und an der Fusion von Lysosomen beteiligt zu sein, da eine verminderte Aktivität dieses Proteins beim CHS die Entstehung von sogenannten „Riesengranula“ zur Folge hat. Außerdem sind die Lysosomen in LYST-defizienten Zellen in ihrer Anzahl reduziert (14, 19) und sammeln sich perinukleär (11, 20). Diese abnorm vergrößerten Granula werden in Leukozyten, Melanozyten, Fibroblasten, endothelialen Zellen, Neuronen und Schwann-Zellen gefunden (21). Eine Störung der Funktion von Lysosomen und lysosomenähnlichen Organellen, wie z.B. Melanosomen oder elektronendichten Granula von Thrombozyten, beeinträchtigt die Exozytose. Aufgrund einer gestörten Funktion von T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten kommt es zu bedeutenden zellulären Immundefekten, da zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen die spezifische zelluläre Immunabwehr normalerweise durch gerichtete Sekretion des Inhaltes von sekretorischen Lysosomen vermitteln (12).

Bei antiviralen Immunantworten, insbesondere bei Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus, kann es bei fehlender perforinvermittelter Zytotoxizität zu einer unkontrollierten Aktivierung und Vermehrung von zytotoxischen T-Lymphozyten mit der Folge massiver Zytokinfreisetzung und nachfolgender Makrophagenaktivierung kommen. Es entsteht das Bild einer Hämophagozytose, welche bei CHS-Patienten als „akzelerierte Phase“ gefürchtet ist.

Einleitung

Diese polyklonale, lymphohistiozytäre Proliferation geht mit hohem Fieber, Panzytopenie, Milz-, Leber-, Lymphknoten- und ZNS-Infiltraten einher. Die akzelerierte Phase verläuft ohne Knochenmarktransplantation häufig letal (12, 14).

Makrophagen und Granulozyten von CHS-Patienten zeigen eine verminderte Chemotaxis. Von der gesunden Zelle aufgenommene („phagozytierte“) Bakterien liegen in membranumschlossenen Kompartimenten, den sogenannten „Phagosomen“, intrazellulär vor und werden durch Fusion mit Lysosomen der Lyse zugeführt. Dieser Vorgang ist bei CHS-Patienten deutlich verzögert, weshalb phagozytierte Bakterien intrazellulär länger persistieren können. Es besteht eine Neigung zu chronischen bakteriellen Infekten (12).

1.8.2 Erkrankungsformen

Die klassische infantile Form der Erkrankung macht 85-90% aller CHS-Fälle aus. Bei dieser Form liegt kein funktionsfähiges LYST-Protein vor. Ernste Immundefekte mit rezidivierenden bakteriellen Defekten der Haut und der Atemwege, Leukopenie, Anämie und Hepatosplenomegalie stehen symptomatisch im Vordergrund. Zusätzlich treten Hypopigmentierung von Augen, Haut und Haaren auf, sowie eine verlängerte Blutungszeit mit Petechien und Schleimhautblutungen (12, 14, 21).

Die adulte Form betrifft 10-15% der Fälle und tritt im Jugend- und frühen Erwachsenenalter auf. Die Funktion des LYST-Proteins ist hier partiell erhalten, es entwickeln sich seltener schwere bakterielle Infektionen. Ein lymphoproliferatives Syndrom tritt nicht auf, allerdings ist ein partieller Albinismus häufig. Bei dieser Form des CHS stehen neurologische Spätkomplikationen im Vordergrund. Die Patienten zeigen im Verlauf der Krankheit eine progressive Neuropathie (12).

Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation liegt insofern vor, als dass die Restaktivität des LYST-Proteins Manifestationsalter und Schwere der Erkrankung bestimmt (12, 14). Nach langjährigem Verlauf der Erkrankung entstehen neurologische und psychiatrische Manifestationen, selten auch ohne die typischen Symptome des CHS wie Hypopigmentierung oder rezidivierende Infekte (12). Es kann zu Polyneuropathie, zerebellärer Ataxie, demenziellem Syndrom, Ruhetremor und Parkinson-Syndrom mit L-Dopa-Responsivität kommen. Diagnostisch sind hier Riesengranula in Purkinje-Zellen des Kleinhirns und den Vorderhornzellen des Rückenmarks zu finden und übergroße melaninhaltige Granula in den Zellen der Substantia nigra. Weitere neurologische Komplikationen umfassen eine Schädigung der Pyramidenbahnen, dystone Störungen, eine demenzielle Entwicklung,

Einleitung

epileptische Anfälle und Hirnnervenausfälle, überwiegend in Form einer Fazialisparese. Eine Beteiligung des autonomen Nervensystems wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Der unspezifische Nervenzelluntergang vermutlich durch gestörte intraaxonale Transportvorgänge hervorgerufen (12).

1.8.3 Diagnostik des CHS

Die Krankheit wird häufig im Alter von ca. 5 Jahren diagnostiziert (20), viele der Patienten fallen durch ihr silber-graues Haar auf (13, 21). Zur Diagnostik gehört die eingehende Familienanamnese mit Berücksichtigung einer möglichen Konsanguinität der Eltern (13, 14). Diagnostisch wegweisend ist der Blut- und Knochenmarkausstrich mit eosinophilen, peroxidasepositiven Riesengranula in Leukozyten. Beweisend für das Vorliegen der Erkrankung ist die Mutationsanalyse des LYST-Gens. Bei neurologischer Mitbeteiligung sind eine neurologische Untersuchung und eine psychiatrische Exploration nötig. Eine neuropsychologische Testung ist nötig zur Diagnostik einer demenziellen Entwicklung (12). Unter Umständen manifestiert sich das CHS ähnlich einer akuten Leukämie und kann als solche zunächst verkannt werden. Wichtiges Kriterium zur Unterscheidung zwischen den beiden Erkrankungen stellen die vergrößerten Lysosomen der Lymphozyten im Blut- oder Knochenmarkausstrich dar (21).

Differentialdiagnostisch muss das CHS vor allem von anderen Albinismussyndromen mit multisystemischer Beteiligung, wie z.B. dem Hermansky-Pudlak-Syndrom, dem Griscelli-Syndrom und dem Elejalde-Syndrom unterschieden werden (12, 22). Auch Thrombozytopenien und angeborene oder erworbene Immunschwächesyndrome müssen differentialdiagnostisch bedacht werden. Beim adulten CHS mit neurologischen Komplikationen müssen erbliche Parkinson-Syndrome, neurometabolische Systemerkrankungen, hereditäre Ataxien und hereditäre Neuropathien in Betracht gezogen werden (12).

1.8.4 Therapie des CHS

Bei der infantilen Form des CHS ist eine allogene Knochenmarktransplantation die Therapie der Wahl, mit Hilfe derer die immunologischen und hämatologischen Defekte geheilt und die akzelerierte Phase verhindert werden können (12, 14). Ohne Knochenmarktransplantation beträgt die mittlere Überlebensdauer nach Eintreten der akzelerierten Phase ungefähr drei

Einleitung

Jahre (21). Die Entwicklung neurologischer Störungen im weiteren Verlauf der Erkrankung kann durch Knochenmarktransplantation nicht beeinflusst werden. Zusätzlich können granulozytenstimulierende Faktoren („granulocyte-colony stimulating factor“, G-CSF) zur Verbesserung der Leukozytenfunktion gegeben werden. Ist die akzelerierte Phase bereits eingetreten, kann eine transiente Remission durch die kombinierte Gabe von Etoposid, Kortikosteroiden und intrathekal appliziertem Methotrexat erzielt werden. Nachfolgende Rezidive sprechen zunehmend schlechter auf diese zytostatische Therapie an. Axonale Polyneuropathie kann sich nach Kortikosteroid-Therapie verbessern, wohingegen das Parkinson-Syndrom im Rahmen des CHS meist auf die Gabe von L-Dopamin anspricht (12). In der stabilen Phase kann außerdem Vitamin C gegeben werden, welches die bakterizide Aktivität der neutrophilen Granulozyten normalisieren soll (13).

1.9 Albinismussyndrome

Das seltene Hermansky-Pudlak-Syndrom wird autosomal rezessiv vererbt und zeichnet sich durch einen okulokutanen Albinismus und eine vermehrte Blutungsneigung aus. Es sind sieben Mutationen bekannt, die dem Hermansky-Pudlak-Phänotyp zugeordnet werden (HPS1-7). Je nach Ort der Genmutation können die Lysosomen morphologisch unauffällig oder deutlich vergrößert sein. Bei der Unterform HPS2 können Immundefizienz und neuronale Störungen beobachtet werden (8) (siehe 1.7 Defekte im vesikulären Transport).

Das autosomal rezessiv vererbte Griscelli-Syndrom weist okulokutanen Albinismus und silbrig-graues Haar auf. Es liegt eine lysosomale Transportstörung vor, wobei die Morphologie der Lysosomen allerdings normal erscheint. Es besteht eine Neigung zu rezidivierenden Infekten, die sich zu akzelerierten Phasen mit Lymphohistiozytose, Hepatosplenomegalie und Panzytopenie entwickeln können. Die Genmutation liegt im Myosin Va-Gen auf Chromosom 15q21 vor (23).

Das Elejalde-Syndrom wird ebenfalls autosomal rezessiv vererbt und beinhaltet partiellen Albinismus und schwere neurologische Störungen bereits in den ersten Lebensjahren, was zu einer schweren Entwicklungsverzögerung und epileptischen Anfällen führt. Die immunologische Funktion scheint nicht beeinträchtigt zu sein. Es finden sich vesikelartige Einschlüsse in Fibroblasten, Knochenmarkszellen und Lymphozyten der Betroffenen, jedoch anders anmutend als bei CHS-Patienten (22).

1.10 Charakterisierung des LYST-Proteins

Die genaue Funktion des LYST-Gens ist bislang nicht bekannt. Sein zytosolisches Proteinprodukt ist am lysosomalen Transport und an der Fusion von Vesikeln beteiligt. Das LYST-Gen ist in allen Spezies hochkonserviert und wird niedrig ubiquitär exprimiert. Mäuse, bei denen das LYST-Gen einen Defekt aufweist, zeigen eine veränderte, beige Fellfärbung. Die „beige“-Maus entspricht dem CHS-Patienten, ihre Zellen weisen ebenfalls Riesenslysosomen auf (14, 15), die perinukleär lokalisiert sind und keinerlei Membranassoziationen zeigen (11, 20). Im Gegensatz zu gesunden Zellen enthalten beige-Zellen ein kleineres mRNA-Transkript von 12 kb oder 5,8 kb (15).

Der Aufbau des LYST-Proteins (CHS/beige-Proteins) deutet stark auf eine Rolle im intrazellulären Vesikelverkehr hin. Der Amino-Terminus des Proteins enthält einen α -helikalen Bereich bestehend aus 20-21 ARM/HEAT Wiederholungen, auch „repeats“ genannt, und einer Perilipin-Domäne. ARM (Armadillo)-Motive vermitteln Membran-Assoziationen (14, 24). HEAT (Huntington-elongation-A subunit-TOR)-Motive werden in Proteinen gefunden, die am Vesikelverkehr beteiligt sind (17) und Perilipin ist vermutlich an Lipid-Assoziationen beteiligt (25). Eine PH-Domäne (Pleckstrin Homologie- Domäne) verbindet die Perilipindomäne mit der benachbarten „BEACH“ (beige and CHS)-Domäne (17). Die BEACH-Domäne ist innerhalb der Eukaryota hoch konserviert (17). Sie enthält ca. 300 Aminosäuren und interagiert mit der PH-Domäne, welche häufig in Proteinen zu finden ist, die intrazelluläre Signale vermitteln oder Komponenten des Zytoskeletts darstellen (26). Die BEACH-Domäne wird in vielen „WD-repeat“ Proteinen gefunden, z.B. den LYST-Proteinen CHS/beige und FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation, s. 1.11 Charakterisierung des FAN-Proteins), LvsA, LvsB und LBA (27, 28, 29), welche u.a. Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, und welche bei der Regulierung des Vesikelverkehrs eine Rolle spielen (30). Am C-Terminus von LYST befinden sich 7 WD-repeat-Motive. Die zugrundeliegende gemeinsame Funktion aller WD-repeat Proteine besteht in der Koordination der Assoziation von Multiproteinkomplexen (31) (s. Abb. 1.3). LYST fungiert möglicherweise als Adapter-Protein, welches eine Verknüpfung für Proteine schafft, die intrazelluläre Membranfusionen vermitteln (11).

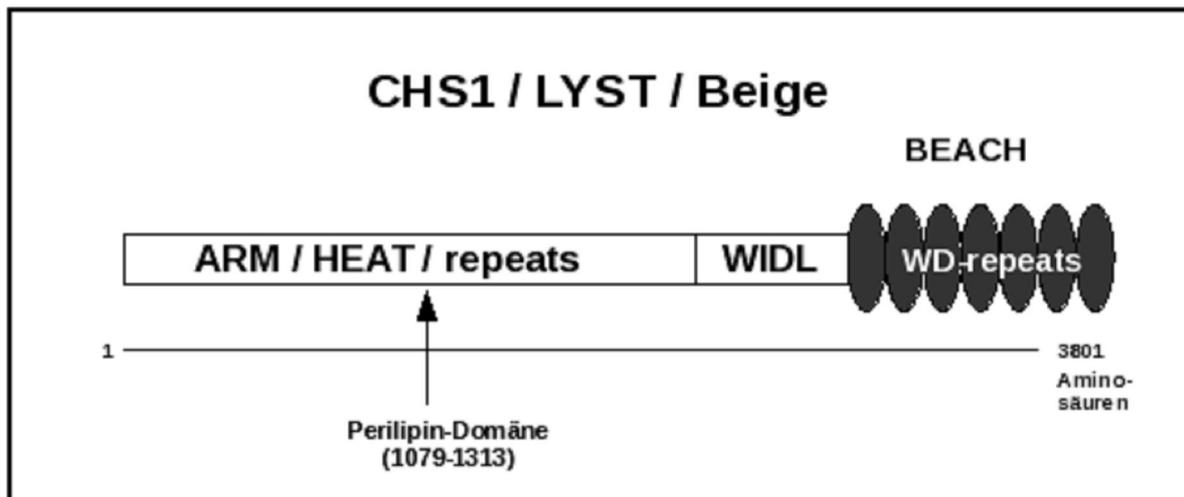


Abb. 1.3 Das CHS/LYST/beige Gen kodiert ein Protein von 3801 Aminosäuren. Die Aminosäuren weisen vier definierte Domänen auf. Der Amino-Terminus enthält bis zu 20 ARM/HEAT-repeat Domänen und eine Perilipin-Domäne innerhalb der ARM/HEAT-repeats. Eine PH-Domäne verbindet die ARM/HEAT-repeats mit der BEACH-Domäne, welche sich mit einer konservierten Sequenz bestehend aus Tryptophan, Isoleucin, Aspartat und Leucin (WIDL) anschließt. Der Carboxyl-Terminus schließt mit sieben WD-repeats ab (nach Kaplan, De Domenico und McVey Ward, 2008) (14).

1.11 Charakterisierung des FAN-Proteins

FAN ist ein Mitglied der WD-repeat Proteinfamilie, und ist vor kurzem in Zusammenhang mit dem Vesikelverkehr der Zelle gebracht worden. Ihm kommt z.B. eine bedeutende Rolle bei der Reparatur der kutanen Barriere zu, ein Vorgang, bei welchem Transport und Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran essentiell sind (30). Das FAN-Gen besteht aus mindestens neun Exons, die ca. 2,7 kb umfassen. Als genauen Locus für das humane FAN-Gen wurde die Chromosomenregion 8q12-q13 bestimmt (30). FAN wird in Nieren-, Gehirn- und Skelettmuskelzellen (32) an der Plasmamembran exprimiert (27, 32) und in Kardiomyozyten am Sarkolemm (32). Die C-terminalen WD-repeats von FAN interagieren mit der neutralen Sphingomyelinase-aktivierenden Domäne („NSD“) des Rezeptors „TNF-R55“ des Zytokins Tumor Nekrose Faktor („TNF“), was die Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase („nSMase“) induziert (27, 33) (s. Abb. 1.4). Die neutrale Sphingomyelinase produziert Ceramid durch Hydrolyse von membranständigem Sphingomyelin. Ceramid ist ein wichtiger second messenger in vielfältigen Prozessen, wie z.B. der Apoptose, dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Antwort einer Zelle

Einleitung

auf Stress (34, 35). N-terminal trunkiertes FAN, welches nur die WD-repeats enthält, inhibiert die Aktivierung der nSMase in dominant negativer Weise (33), was darauf hinweist, dass sich vermutlich eine für die Aktivierung wichtige Effektor-Domäne im N-Terminus befindet (27). Diese Effektor-Domäne von FAN beinhaltet eine Region von signifikanter Ähnlichkeit zur BEACH-Domäne von beige und CHS (27).

FAN-defiziente Zellen zeigten keine Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase nach Behandlung mit TNF, was belegt, dass FAN einen limitierenden Faktor für die Aktivierung der nSMase darstellt. FAN-defiziente Mäuse zeigten bei Verletzung der kutanen Barriere eine gestörte Kinetik des Reparaturmechanismus, was auf die physiologische Beteiligung von FAN bei diesem Mechanismus hinweist (30). Die beiden WD-repeat Proteine CHS/beige und FAN weisen eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit auf, welche möglicherweise auf eine ähnliche Funktion im Stoffwechsel der Zellen hinweist (17).

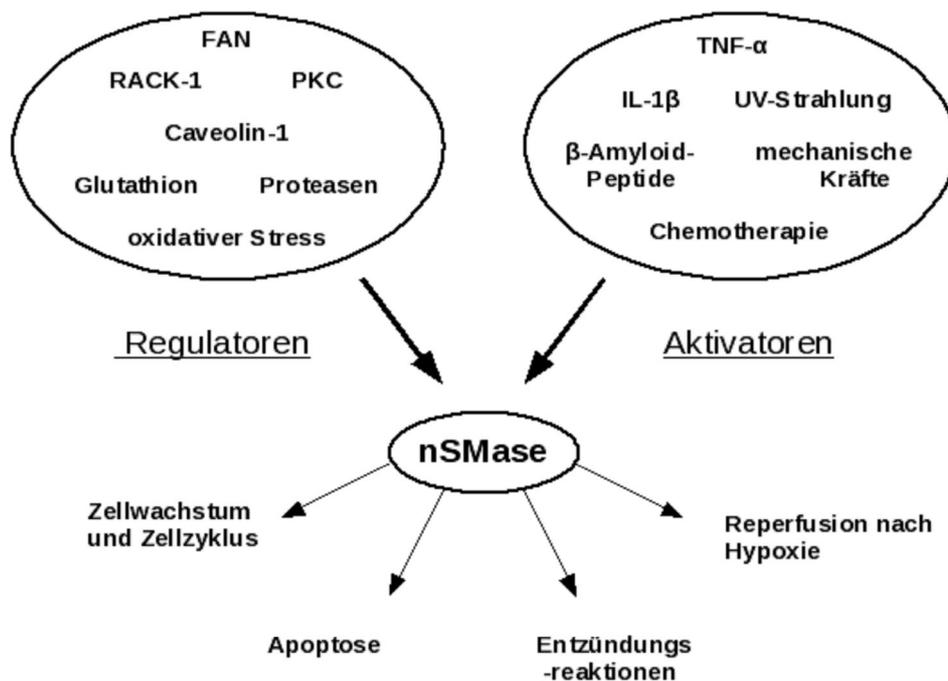


Abb. 1.4 Schematische Übersicht der Regulatoren und Aktivatoren der neutralen Sphingomyelinase und Funktionswege der aktivierten neutralen Sphingomyelinase nach bestehender Studienlage (nach Clarke und Hannun, 2006) (34).

1.12 Die Proteinkinase C

Die Proteinkinase C („PKC“) scheint ein zentrales Protein bei der Kontrolle des Vesikelverkehrs von u.a. mit Rezeptoren, Transportern, Kanälen und

Einleitung

Plasmamembranproteinen beladenen Vesikeln zu sein (36, 37). Die Enzymfamilie der Protein Kinase C besteht aus einer Gruppe von 11 Isoformen von Serin-Threonin spezifischen Kinasen. Den Enzymen kommen wichtige Rollen bei der Regulierung von Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose, Sekretion, Neurotransmission und Signalübertragung zu. Alle PKC Isoenzyme enthalten N-terminal eine regulatorische Domäne und C-terminal eine katalytische Domäne. Die Familie der PKC ist in drei Subfamilien unterteilt, beruhend auf Aminosäuresequenz und Kofaktoren der jeweiligen Proteinkinase.

Die klassischen oder konventionellen PKCs („cPKCs“) benötigen Calcium, Diacylglycerol („DAG“) und ein anionisches Phospholipid, meist Phosphatidylserin („PS“), zur Aktivierung. Zu dieser Subfamilie gehören die Isoformen PKC α , PKC β I und PKC β II und PKC γ , welche jeweils zwei cysteinreiche Domänen, C1 und C2, enthalten. Die C1-Domäne bindet Phospholipid und DAG bzw. Phorbolster, die C2-Domäne bindet Calcium.

Die neuen PKCs („nPKCs“) benötigen DAG, nicht jedoch Calcium zu ihrer Aktivierung, und besitzen eine C1-Domäne ohne funktionelle C2-Domäne. Zu diesen Isoformen zählen PKC δ , PKC ϵ , PKC η und PKC θ . Diese beiden Subfamilien können aufgrund ihrer C1-Domäne in vitro durch den Phorbolster PMA (12-Myristat-13-Acetat) aktiviert werden, welcher die Wirkweise von DAG imitiert.

Die atypischen PKCs („aPKCs“) bilden die dritte Subfamilie. Sie enthalten eine trunkierte C1-Domäne, welche nicht in der Lage ist, DAG bzw. Phorbolster zu binden. Die aPKCs werden daher, unabhängig von DAG und Calcium, durch Phospholipide und Fettsäuren aktiviert. Zu dieser Subfamilie gehören die PKC ζ und die PKC $\lambda/1$ (36).

Mit der Aktivierung der PKC erfolgt eine Konformationsänderung und das zytosolische Enzym transloziert an die Plasmamembran. Diese Membranrekrutierung wird durch Ankerproteine, so genannte „RACKs“ (siehe 1.13 RACK) vermittelt, welche die aktivierte PKC an der Membran stabilisieren und sie vor einer verfrühten proteolytischen Spaltung durch die Thiolprotease Calpain schützen. Die Aktivität der PKC kann durch spezifische Inhibitoren, wie z.B. GÖ 6976 und Chelerythrin gehemmt werden. Die Aktivität der Protease Calpain kann durch spezifische Inhibitoren, wie z.B. Calpastatin, Calpeptin und E-64d gehemmt werden.

Es werden fortlaufend neue Erkenntnisse über die Aufgaben der PKC im Stoffwechsel der Zelle gewonnen. Die PKC stellt z.B. einen wichtigen Regulator der Endozytose dar. Auch beim Verkehr von verschiedenen Recyclingmolekülen scheint der PKC eine entscheidende regulatorische Rolle zuzukommen. Die genauen Mechanismen sind noch unklar, doch die PKC scheint an der Kontrolle des Vesikelverkehrs in bedeutender Weise beteiligt zu sein

(36). So könnte die PKC möglicherweise von Gendefekten im LYST- und im FAN-Gen betroffen sein, wodurch sich morphologische und funktionelle Konsequenzen für die Zelle ergeben könnten.

1.13 RACK-1

Sogenannte „RACK“-Proteine (receptor for activated C-kinase) bilden eine Gruppe von zytosolischen Proteinen, die an aktivierte Isoformen der Proteinkinase C binden. RACK-1 ist ein 36 kDA schweres Protein, welches Homologie zu der β -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen aufweist. Ähnlich wie FAN besitzt RACK-1 7 WD-repeat-Domänen, welche sich zu mehrblättrigen Propellerstrukturen falten, was eine Vielzahl an Protein-Interaktionsmöglichkeiten suggeriert. RACK-1 ist ein Adapterprotein, welches an der Rekrutierung von Molekülen an membran-assoziierte Komplexe und dadurch möglicherweise deren Regulierung beteiligt ist. RACK-1 erleichtert die Translokation der PKC-Isoform PKC β zu den zellulären Membranen und schützt diese an der Membran gleichzeitig vor vorzeitigem Abbau durch die Thiolprotease Calpain. Tcherkasowa et al. (2002) haben mittels Hefe interaction trap system gezeigt, dass RACK-1 ebenfalls ein Interaktionspartner von FAN ist. Konfokale Laserscanner-Mikroskopie Studien lassen vermuten, dass überexprimierte FAN- und RACK-1-Proteine zusammen mit TNF-R55 an der Plasmamembran kolokalisieren und die größte Effizienz bei der Aktivierung der nSMase aufweisen. RACK-1 kommt somit wahrscheinlich eine regulatorische Funktion bei der Aktivierung der nSMase zu und es erweist sich als eine neu entdeckte Komponente im Signalweg von TNF-R55 (27, 38).

1.14 Fragestellung

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob eine Defizienz des FAN-Gens ähnliche Auswirkungen auf den Vesikelverkehr hat, wie ein defektes LYST-Gen. Da die Proteine FAN und LYST sich strukturell sehr ähnlich sind, sollte das Verhalten der FAN-defizienten und – kompetenten, und der LYST-defizienten und- kompetenten Zellen auf Gemeinsamkeiten untersucht werden. FAN-defiziente Zellen sollten bezüglich der Größe und der Anzahl ihrer Lysosomen untersucht werden und mit FAN-kompetenten Zellen verglichen werden, ebenso wie LYST-kompetente Zellen mit LYST-defizienten Zellen.

Durch Einsetzen eines Inhibitors der Proteinkinase C in FAN- und LYST-kompetenten Zellen, sowie eines Inhibitors der Thiolprotease Calpain, und somit Protektion der PKC vor

Einleitung

Abbau durch Calpain, in FAN- und LYST-defizienten Zellen, sollte der Einfluss der Proteinkinase C auf die Lysosomengröße untersucht werden. Daraus sollten Rückschlüsse auf die Bedeutung der Proteinkinase C im Vesikelverkehr, bzw. bei der Regulierung der Lysosomengröße gezogen werden. Die Versuche in dieser Arbeit beziehen sich unter anderem auf die Forschung von Tanabe et al. (1999), welche im Zusammenhang mit dem Chediak-Higashi-Syndrom in Studien haben zeigen können, dass die Proteinkinase C in LYST-defizienten Zellen eine gestörte Aktivierungskinetik aufweist. Ihnen zufolge ist die Rekrutierung der Proteinkinase C vom Zytosol an die Plasmamembran, und somit ihre Aktivierung, gestört, welches möglicherweise durch eine verfrühte oder übermäßige Spaltung durch die Thiolprotease Calpain geschieht. Sie führten die Bildung von Riesenlysosomen auf die gestörte Aktivität der Proteinkinase C zurück und demonstrierten, dass sich unter Gabe des Calpain-Inhibitors E-64d die Aktivität der Proteinkinase C in LYST-defizienten Zellen normalisierte und die Bildung von Riesenlysosomen unterbunden werden konnte. Im Gegenzug konnte in LYST-kompetenten Zellen nach Gabe eines Proteinkinase-Inhibitors die Bildung von Riesenlysosomen beobachtet werden (39).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA	Zellkulturbrutschrank
Heraeus, Hanau	Bench Lamin Air® HB 2448 K Megafuge 1.0
IKA®-Labortechnik, Staufen	Schütteltisch KS250 Basic
Menzel-Gläser, Braunschweig	Objektträger
LO Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf	Neubauer Improved Zählkammer
Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena	konfokales Laserscanning Mikroskop 510 MikroskopID03

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Solingen), Nunc (Wiesbaden), Sarstedt (Nümbrecht) und Schütt Labortechnik (Göttingen) bezogen.

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle Grundchemikalien wurden in Analysequalität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) bezogen. Spezielle Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen wie folgt:

Material und Methoden

Biochrom AG, Berlin	fötale Kälberserum (FCS) Trypsin/EDTA L-Glutamin
Cell Concepts GmbH, Umkirch	Dulbecco's PBS (w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺)
Invitrogen GmbH, Karlsruhe	Lyso Tracker Red® (DND-99)
PAA Laboratories GmbH, Cölbe	DMEM Kulturmedium (High glucose 4,5 g/l without L-glutamine)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen	PFA

2.1.4 Zelllinien

In dieser Arbeit wurde mit murinen Fibroblasten gearbeitet. Die FAN-defizienten (FAN ko)- und dazugehörigen Wildtyp (wt)-Zelllinien sind immortalisierte Embryonalfibroblasten (EF), welche von Dirk Kreder im Rahmen seiner Doktorarbeit am Institut für Immunologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hergestellt wurden (Kreder et al., 1999 (30); Kreder et al., 1998 (40)).

Die Arbeitsgruppe Jerry Kaplan am Institut für Pathologie, Universität Utah, USA, stellte freundlicherweise murine Fibroblasten aus Wildtypmäusen (C57-CF2) und beige-defizienten Mäusen (MCHSF2) (Perou und Kaplan, 1993 (41)) zur Verfügung.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 98% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Die murinen Fibroblasten wurden in Zellkulturflaschen in dem Kulturmedium DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) kultiviert, welches mit 10% v/v fötalem Kälberserum (FKS), 2mM Glutamin und je 50 µg/ml Penicillin und Streptomycin supplementiert wurde.

2.2.2 Passagieren der Zellen mit Trypsin-EDTA

Zum Passagieren der Zellen wurde das alte Nährmedium abgenommen und ein Teil davon in ein 20 ml fassendes Zentrifugenröhrchen gegeben. In die Zellkulturflasche wurden 7 ml PBS-Lösung (phosphatgepufferte Salzlösung, ohne Calcium und Magnesium) gegeben. Die PBS-Lösung wurde zum Entfernen alter Zellbestandteile über die Haftungsoberfläche der Zellkulturflasche geschwenkt und anschließend abgenommen. Ebenfalls sollte das Kulturmedium durch das Waschen in PBS vollständig entfernt werden, um die Wirkung des nachfolgend zugesetzten Trypsins nicht zu beeinträchtigen. Anschließend wurden 6 ml einer auf 37° C vorgewärmten Suspension aus PBS (pH 7,4), EDTA (Ethylendiamintetraacetat) (0,02%) und Trypsin (0,05%) in die Zellkulturflasche gefüllt, welche für 3-5 Minuten im Brutschrank verwahrt wurde. Trypsin löst die Adhäsionen der Zellen mit der Haftungsoberfläche der Flasche, was zur Folge hat, dass sich die Zellen von der Unterlage lösen und abgerundet in der Trypsinierungslösung schwimmen. Um eventuell noch lose anhaftende Zellen zu lösen, wurden die Seiten der Zellkulturflasche beklopft und mittels einer Pipette wurde die Trypsinierungslösung einige Male über die Haftfläche laufen gelassen. Bei zu langer Einwirkzeit kann die Lebensfähigkeit der Zellen irreversibel geschädigt werden. Daher wurde die Trypsinierungslösung mit den gelösten Zellen abgenommen und in das Zentrifugenröhrchen zu den 20 ml des alten Nährmediums gegeben. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen/s zentrifugiert, wodurch sich die Zellen auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens sammelten. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 5 ml neuem Nährmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:10 in frischem Nährmedium ausgesät. Erfolgte das nächste Passagieren erst im Abstand von drei Tagen, wurden die Zellen im Verhältnis 1:20 ausgesät. Die Menge des eingesetzten Mediums betrug 0,2 bis 0,5 ml pro cm² Wachstumsfläche.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine ethanolgereinigte Neubauer Zählkammer, auch genannt Hämocytometer, verwendet. 15 µl der Zellresuspension nach Zentrifugation wurden mit 15 µl Trypanblau vermischt. Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff, der von lebenden Zellen kaum aufgenommen wird. Tote Zellen hingegen färben sich durchgängig blau. 15 µl des Gemischs aus Trypanblau und Zellsuspension wurden in die Zählkammer gefüllt, wobei Kapillarkräfte die Suspension selbstständig in den Zwischenraum zwischen Deckglas und

Kammer saugen. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass die Kammer weder überfüllt noch unterfüllt wurde, da Oberflächenspannungen das Volumen der Zählkammer verändern können.

Die Zellen in vier großen Quadraten wurden unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung gezählt und gemittelt.

2.2.4 Aussäen von Fibroblasten auf mikroskopische Deckgläschen

Mikroskopische Deckgläschen mit einem Durchmesser von 18 mm wurden mit 70% igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Je nach Versuchsaufbau wurde eine bestimmte Anzahl von Deckgläschen in eine Zellkulturschale mit 12 Kavitäten gegeben. Um einen Haftboden für die adhärenen Fibroblasten zu bilden, wurde je 1 ml Poly-L-Lysin [2 µg/ml] für 30 Minuten auf die Deckgläschen gegeben. Die Deckgläschen wurden nach der Beschichtung mit Poly-L-Lysin zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Pro Kavität wurde nun auf jedes Deckgläschen die Zellzahl von 4×10^4 Zellen pro 2 ml Nährmedium ausgesät, da diese Zelldichte erfahrungsgemäß günstigste Bedingungen für das Wachstum der murinen Fibroblasten gewährleistet. Die Zellen wurden über Nacht bei 37° C inkubiert und anschließend in den Versuchen verwendet.

2.2.5 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Die Zellen wurden in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen mit dem PKC-Inhibitor GÖ 6976 und mit dem Calpain-Inhibitor Calpastatin behandelt. Der PKC-Inhibitor GÖ 6976 lag in der Konzentration 2,5 mM in DMSO (Dimethylsulfoxid) vor und wurde in einer Endkonzentration von 2,5 µM in Nährmedium eingesetzt. Der Calpain-Inhibitor Calpastatin lag in der Konzentration 500 µM in H₂O vor und wurde in der Gebrauchskonzentration von 10 µM in Medium eingesetzt. Die Zelllinien MCHSF2 und C57-CF2 wurden in je einer Zellkulturschale mit 12 Kavitäten auf Deckgläschen ausgesät. Pro Zelllinie wurde den Zellen in vier Kavitäten der PKC-Inhibitor GÖ 6976 in der Gebrauchskonzentration von 2,5 µM in Nährmedium zugesetzt, in weiteren vier Kavitäten wurde der Calpain-Inhibitor Calpastatin in der Gebrauchskonzentration 10 µM in Nährmedium zugesetzt und in den restlichen Kavitäten wurden die Zellen gänzlich unbehandelt belassen. Die Hälfte der Kavitäten wurde nach Zugabe der Inhibitoren zwei Stunden lang inkubiert, in den weiteren Kavitäten wurden die Inhibitoren darüber hinaus über Nacht in dem Nährmedium mit den Inhibitoren belassen.

Nach Beendigung der jeweiligen Einwirkzeit wurde den Kavitäten der Fluoreszenzfarbstoff Lyso Tracker Red® (Invitrogen) zugesetzt (siehe 2.2.6 Fluoreszenzfärbung), um spezifisch saure Kompartimente, insbesondere Lysosomen, anzufärben, welchen in dieser Arbeit die größte Bedeutung zukommt. Die Deckgläschen wurden anschließend auf Objektträger gebracht und fixiert (s. 2.2.6), um mit einem Laserscanning Mikroskop Aufnahmen der Zellen und der angefärbten Zellkompartimente anzufertigen. Der gleichen Behandlung wurden die Zellen der Zelllinien FAN ko und wt unterzogen. Auf gleiche Weise wurden die Fibroblasten in Zellkulturschalen mit 12 Kavitäten ausgesät und teilweise mit Inhibitoren behandelt. Anschließend wurde eine Fluoreszenzfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lyso Tracker Red® angefertigt und Aufnahmen der Zellen gewonnen.

2.2.6 Fluoreszenzfärbung

In dieser Arbeit sollten im besonderen Lysosomen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lyso Tracker® Red (Invitrogen) behandelt, durch welchen sich saure Kompartimente der Zellen darstellen lassen und die Lysosomen der näheren Betrachtung zugänglich gemacht werden. Der Fluoreszenzfarbstoff lag in Konzentration von 1 mM in Medium vor und wurde in der Endkonzentration 0,1 μ M in Nährmedium den Zellen zugesetzt. Nach Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs wurden die Zellen eine Stunde im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in 4% PFA (Paraformaldehyd) in PBS (pH 7,4) auf dem Schütteltisch fixiert. Das PFA wurde dann durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt.

Um die so behandelten Zellen unter dem Laserscanning Mikroskop betrachten zu können, wurden die Deckgläschen auf Objektträger in einem Tropfen MobiGlow Mounting (Glyzerolpuffer 2mM Azid) oder wahlweise Nagellack aufgetragen und versiegelt. Von jeder Zelllinie wurden mehrere Bilder zur Dokumentation angefertigt.

2.2.7 Synchronisation der Zellen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Synchronisation. So können Zellen z.B. durch Abkühlung, Schütteln von mitotischen Zellen, einen Colcemid-Block oder Isoleucinmangel in die gleiche Zellzyklusphase gebracht werden. In dieser Arbeit wurden die Zellen durch Serumentzug synchronisiert. In eine Kulturschale mit 12 Kavitäten wurden die Zelllinien

FAN ko und wt ausgesät. Die Hälfte der Zellen wurde in einem normalen Nährmedium bestehend aus DMEM mit 10 % v/v FCS kultiviert, die andere Hälfte wurde zur Synchronisation in einem „Hungermedium“ mit nur 5 % v/v FCS gehalten. Anschließend wurden die sauren Kompartimente beider Zelllinien mittels Fluoreszenzfärbung angefärbt, die Deckgläschen auf Objektträger aufgebracht und durch das Laserscanning Mikroskop betrachtet und aufgenommen.

2.2.8 Langzeitlagerung der Zellen

Frisch trypsinierte Zellen, welche zweimal mit Medium gewaschen und zentrifugiert wurden, wurden in Suspension in ein Einfriermedium bestehend aus DMSO und FKS im Verhältnis 1:10 gebracht. Anschließend wurde in spezielle Kryogefäße je 1 ml Suspension gefüllt und die Kryogefäße in Flüssigstickstoff bei -196°C gelagert.

2.2.9 Analyse von Bildern mit dem Programm ImageJ

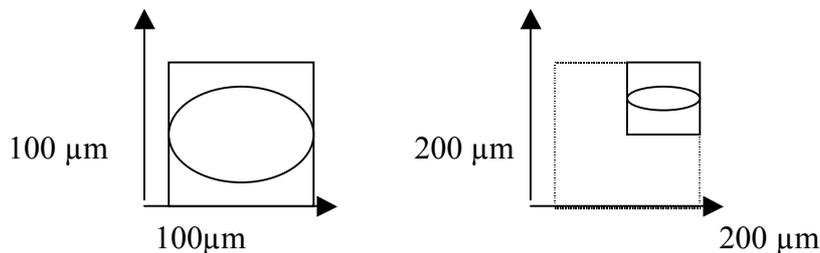
Bei Betrachtung der Fibroblasten durch das Laserscanning Mikroskop wurden digitale Bilder angefertigt, welche mittels des ImageJ-Programms analysiert wurden. Das ImageJ-Programm ist ein öffentlich zugängliches Analyseprogramm für Bilder, welches von Wayne Rasband und dem Research Service Zweig des National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA, entwickelt wurde. Informationen zu ImageJ und das Programm selbst sind auf der offiziellen Internetseite des Programms <http://rsb.info.nih.gov/ij/> erhältlich.

Das Programm bietet verschiedene Möglichkeiten, mit digitalen Bildern zu arbeiten. So können Strukturen innerhalb der Bilder z.B. in Bezug auf deren Größe und Helligkeit vermessen werden, um mit ihnen zu arbeiten. Es können Flächen innerhalb der Bilder mit vorgegebenen Geraden, Rechtecken oder Ovalen erfasst, oder freihändig umschrieben werden. Nach Eingrenzung der gewünschten Fläche, wird die Lokalisation und die Dimension vom Programm angezeigt. In dieser Arbeit wurde das ImageJ-Programm verwendet, um die Aufnahmen der Fibroblasten objektiv zu analysieren. In den Zellen enthaltene, mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbte Lysosomen wurden einzeln bezüglich ihrer Größe, bzw. Fläche umschrieben und vermessen. Die Messdaten wurden vom Programm gespeichert und bildeten die Grundlage der späteren Auswertungen.

2.2.10 Bearbeitung der Laserscanneraufnahmen

Die auf den Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden mit Hilfe des Laserscanning Mikroskops betrachtet. Anschließend wurden, aufgrund des dichten Wachstums der Zellen, Ausschnitte des jeweiligen Deckgläschens gewählt, welche einzelne Zellen oder eine kleine Auswahl an Zellen zeigten, um Bilder von diesen anzufertigen.

Das Laserscanning Mikroskop wählte für die endgültige Aufnahme die Vergrößerung des Ausschnitts des Deckgläschens, die sogenannte „Stacksize“, selbst, d.h. automatisch. Dadurch ergaben sich Unterschiede in den Stacksizes zwischen den Bildern der ersten Bildreihen. Für einen Vergleich der Messwerte musste daher eine Umrechnung der Werte erfolgen. Für spätere Messungen wurde die Stacksize des Laserscanning Mikroskops manuell auf einen fixen Wert eingestellt. Im Falle der in dieser Arbeit aufgeführten Bilder bewegte sich die Stacksize in Bereichen von $37,8 \mu\text{m}^2$ bis $325,8 \mu\text{m}^2$. Für die Umrechnung wurde eine Stacksize von $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ willkürlich als 100 % festgelegt. Die originalen Messwerte wurden je nach Stacksize mit vergrößernden oder verkleinernden Faktoren umgerechnet, wie an nachfolgendem Beispiel demonstriert:



Die gemessene Größe der Lysosomen eines Bildes, aufgenommen z.B. mit der Stacksize $162,9 \mu\text{m}^2$, musste entsprechend der Stacksize mit dem vergrößernden Faktor $1,629 \times 1,629$ multipliziert werden, um mit Lysosomen von Bildern vergleichbar sein zu können, die mit einer Stacksize von $100 \mu\text{m}^2$ aufgenommen worden waren. Je größer die Stacksize, desto größer der Bildausschnitt und desto kleiner die Strukturen in diesem. Die Werte der vermessenen Lysosomen tragen die Einheit [pixel²] und sind somit als relativ anzusehen.

2.2.11 Die einfaktorielle Varianzanalyse

Die in den verschiedenen Versuchen ermittelten Lysosomengrößen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse auf signifikante Unterschiede untersucht. Die einfaktorielle Varianzanalyse ist in gewisser Weise dem t-Test gleich, jedoch können mehr als zwei Gruppen gleichzeitig verglichen werden. In Computerprogrammen wird die Varianzanalyse häufig als „ANOVA“, analysis of variance, bezeichnet. Im Allgemeinen lautet die Fragestellung, wie sich eine oder mehrere unabhängige Variablen auf eine oder mehrere abhängige Variablen auswirken. Man unterscheidet vier Formen der Varianzanalyse:

- Einfaktorielle univariate Varianzanalyse
- Mehrfaktorielle univariate Varianzanalyse
- Einfaktorielle multivariate Varianzanalyse
- Mehrfaktorielle multivariate Varianzanalyse

Bei einer einfaktoriellen Varianzanalyse wird der Einfluss einer unabhängigen Variable (in dieser Arbeit z.B. der Einfluss des FAN ko-Gens) mit n verschiedenen Ausprägungen auf eine abhängige Variable (z.B. die Lysosomengröße) untersucht, welche die Messwerte liefert.

Hierfür müssen, ebenso wie die Grundgesamtheit, die Fehlerkomponenten (Gesamt-, „Treatment“- und Fehlervarianz) normalverteilt sein, was z.B. durch gleiche Behandlung der zu untersuchenden Zellen zu gewährleisten versucht wurde. Die Fehlervarianzen müssen zwischen den Gruppen, bzw. den Faktorstufen homogen sein. Die Messwerte müssen unabhängig voneinander sein. Die Nullhypothese einer einfaktoriellen Varianzanalyse lautet, es besteht kein Unterschied zwischen den Gruppen. Die Alternativhypothese besagt, dass ein Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Eine genauere Auflösung, zwischen wie vielen und zwischen welchen Mittelwerten ein Unterschied besteht, wird von der ANOVA nicht geliefert. Mit Hilfe eines F-Tests wird die Signifikanz geprüft. Mit einem F-Test kann die Nullhypothese geprüft werden, dass zwei Varianzen gleich sind, indem der Quotient aus ihnen gebildet wird. Ob ein signifikanter Unterschied besteht, wird durch den P-Wert ausgedrückt. Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 (α -Fehler von 5 %) muss der P-Wert kleiner als 0,05 sein, um die Alternativhypothese zu bestätigen. Je kleiner der P-Wert, desto größer ist die Signifikanz der Aussage und desto deutlicher ist der Unterschied zwischen den Gruppen (42, 43, 44).

3. Ergebnisse

3.1 Die Lysosomen von FAN-defizienten Fibroblasten sind sowohl in synchronisierten als auch in unsynchronisierten Zellen signifikant größer als die Lysosomen von Wildtyp-Fibroblasten

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob sich die Lysosomen von FAN-defizienten und FAN-kompetenten Zellen in ihrer Größe voneinander unterscheiden. Um Unterschiede im Zellzyklus zwischen den Zelllinien FAN ko und wt gering zu halten, wurden die Zellen mittels eines Hungermediums synchronisiert in der Absicht, sie in die gleiche Phase des Zellzyklus zu bringen. Es wurde angestrebt, die Zellen exakt gleich zu behandeln. Die Wachstumsbedingungen der Zellen sollten sich so wenig wie möglich unterscheiden, um eine optimale Vergleichbarkeit der Messwerte zu erreichen. Unterschiede in der Lysosomengröße sollten leichter auf die genetische Grundlage zurückgeführt werden können, als auf Unterschiede in der Behandlung der Zellen.

Von der Zelllinie FAN ko wurden 10 Aufnahmen angefertigt, in welchen insgesamt 460 Lysosomen vermessen wurden. Von diesen zeigten 5 Aufnahmen Zellen, welche in normalem Nährmedium gewachsen waren und 5 Aufnahmen Zellen, welche in Hungermedium gewachsen waren. Die Stacksize der Aufnahmen betrug für alle Zellen dieses Versuchs $0,921\mu\text{m} \times 0,921\mu\text{m}$. Die im folgenden genannten Werte dieses und der folgenden Versuche sind zum Zweck der Vergleichbarkeit bereits auf eine Stacksize von $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ umgerechnet und in Anhang I aufgeführt. Die Originalwerte, sowie die Umrechnungsfaktoren entsprechend den Stacksizes, sind in Anhang II aufgeführt. Eine Auswahl von repräsentativen Aufnahmen der in dieser Arbeit untersuchten Zellen mit fluoreszenzgefärbten Lysosomen findet sich in Anhang I. Die synchronisierten Zellen der Zelllinie FAN ko wiesen eine durchschnittliche Lysosomengröße von $54,18 \text{ pixel}^2$ pro Zelle auf (s. Tab. 3.1, siehe Anhang I).

Ebenfalls wurden 10 Aufnahmen der Zelllinie wt untersucht, davon wie bei der Zelllinie FAN ko 5 Aufnahmen von Zellen in normalem Nährmedium und 5 Aufnahmen von Zellen in Hungermedium. Hierbei wurden insgesamt 507 Lysosomen vermessen. Die synchronisierten Zellen der Zelllinie wt wiesen eine durchschnittliche Lysosomengröße von $16,94 \text{ pixel}^2$ pro Zelle auf (s. Tab. 3.1).

Es wird deutlich, dass die Größe der Lysosomen beider Zelllinien sich erkennbar voneinander unterscheidet. Eine Varianzanalyse, welche die Werte der vermessenen Lysosomen beider

Ergebnisse

Zelllinien verglichen, ergab einen P-Wert von $5,9587 \times 10^{-6}$. Dieser P-Wert belegt deutlich einen signifikanten Unterschied in der Lysosomengröße bei einem Signifikanzniveau von 0,05. Die Lysosomen der synchronisierten FAN-defizienten Zellen sind somit statistisch klar vergrößert gegenüber denen der synchronisierten FAN-kompetenten Zellen. Auch die unsynchronisierten Zellen beider Zelllinien wiesen im Vergleich einen deutlichen Größenunterschied der Lysosomen auf, welcher durch einen P-Wert von $2,9388 \times 10^{-6}$ bestätigt wurde (s. Tab 3.1).

Für die Gesamtheit der vermessenen Lysosomen aus sowohl synchronisierten, als auch unsynchronisierten Zellen der Zelllinie FAN ko, betrug die Größe der Lysosomen im Durchschnitt $61,58 \text{ pixel}^2$ pro Zelle. Die durchschnittliche Lysosomengröße aus der Gesamtheit der synchronisierten und unsynchronisierten Zellen der Zelllinie wt betrug pro Zelle $17,26 \text{ pixel}^2$ (s. Tab. 3.1). Bei Betrachtung nicht nur der synchronisierten Zellen der beiden Zelllinien, sondern der Gesamtheit der Zellen, war ebenfalls deutlich ein Größenunterschied zwischen den Lysosomen erkennbar. Eine Varianzanalyse bestätigte das Vorliegen eines Unterschiedes in der Lysosomengröße zwischen der Gesamtheit beider Zelllinien mit einem P-Wert von $4,1868 \times 10^{-10}$. Abbildung 3.1 zeigt eine Übersicht der Lysosomengrößen der synchronisierten und unsynchronisierten Zellen sowie der Gesamtheit beider Zelllinien im Mittel für die vermessenen Zellen.

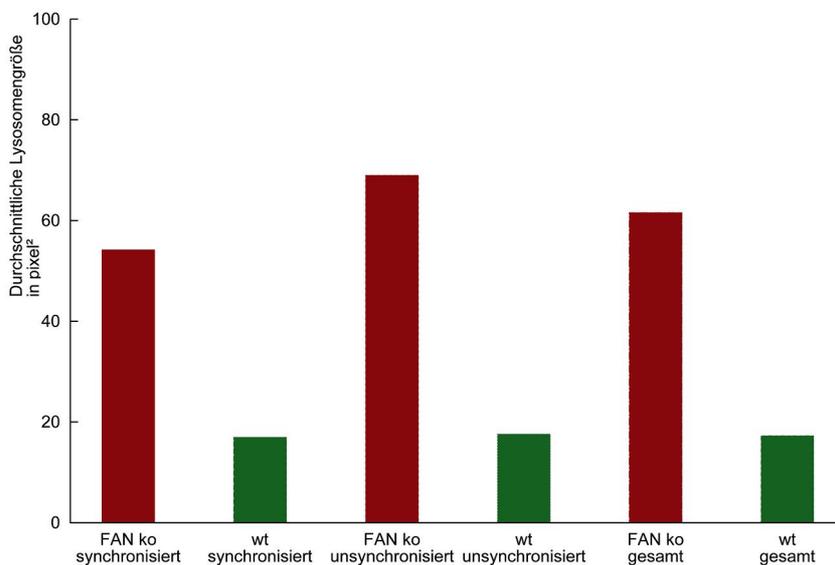


Abb 3.1 Lysosomengrößen im Mittel pro Zelllinie. Die Zelllinien FAN ko und wt liegen jeweils in synchronisierendem DMEM mit 5 % v/v FCS und normalem Nährmedium DMEM mit 10 % v/v FCS vor.

Ergebnisse

Mit identischem Versuchsaufbau wurde dieser Versuch wiederholt, um die Reproduzierbarkeit eines so deutlichen Ergebnisses zu überprüfen. Auch bei dem wiederholten Versuch zeigte sich, dass die Lysosomen der FAN-defizienten Fibroblasten im Vergleich zu den Lysosomen der FAN-kompetenten Fibroblasten signifikant vergrößert waren (Abb 3.2). Die Lysosomen der synchronisierten FAN ko Zellen maßen im Durchschnitt 54,82 pixel² pro Zelle, die Lysosomen der wt Zellen 24,39 pixel² (s. Tab. 3.2). Eine Varianzanalyse belegte einen Unterschied mit einem P-Wert von 0,0001. Es besteht somit zwischen den Messwerten der beiden Zelllinien ein signifikanter Unterschied. Die Lysosomen der unsynchronisierten Zellen der Zelllinie FAN ko maßen 65,67 pixel² im Durchschnitt pro Zelle, die unsynchronisierten Zellen der Zelllinie wt 15,73 pixel² (P-Wert: $2,1171 \times 10^{-7}$). Für die Gesamtheit der Zellen der Zelllinie FAN ko ergab sich eine durchschnittliche Lysosomengröße von 60,25 pixel² pro Zelle bei 318 vermessenen Lysosomen, die insgesamt 496 vermessenen Lysosomen der Gesamtheit der Zellen der Zelllinie wt betragen im Durchschnitt pro Zelle 20,06 pixel² ($P 6,931 \times 10^{-10}$, Tab. 3.2).

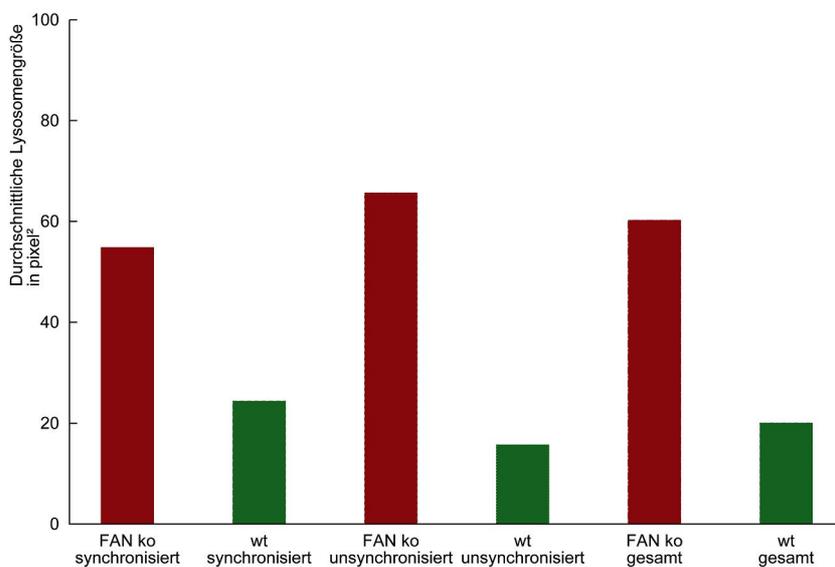


Abb 3.2 Lysosomengrößen im Mittel pro Zelllinie. Die Zelllinien FAN ko und wt liegen jeweils in synchronisierendem DMEM mit 5 % v/v FCS und normalem Nährmedium DMEM mit 10 % v/v FCS vor.

Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied in der Lysosomengröße zwischen FAN-kompetenten und FAN-defizienten Zellen.

3.2 Die Behandlung von Fibroblasten der Zelllinien MCHSF2, C57-CF2, FAN ko und wt mit Inhibitoren der Proteinkinase C und der Thiolprotease Calpain hat keine erkennbaren Änderungen der Lysosomengröße zur Folge

In diesem Versuch sollte der Einfluss der Proteinkinase C auf die Lysosomengröße untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden LYST- und FAN-kompetente Zellen mit einem Inhibitor der PKC, GÖ 6976, behandelt. Es sollte überprüft werden, ob eine Hemmung der PKC zur Bildung von vergrößerten Lysosomen führt. Im Umkehrschluss sollte durch Behandlung von FAN- und LYST-defizienten Zellen mit einem Inhibitor der Protease Calpain, Calpastatin, überprüft werden, ob die Protektion der PKC vor frühzeitigem Abbau durch Calpain zur Normalisierung der Größe von Riesenlysosomen führt. Mit Einwirkzeiten von zwei Stunden und über Nacht sollte untersucht werden, ob sich eine Veränderung in der Lysosomengröße erst nach längerer Einwirkzeit zeigt oder sogar progressiv verhält. Es sollte ebenfalls untersucht werden, ob eine Hemmung der PKC mit GÖ 6976 in FAN- und LYST-defizienten Zellen zu einer noch deutlicheren Vergrößerung der Lysosomen führt und somit der Einfluss der PKC auf die Größenbildung der Lysosomen gezeigt werden kann. Der Inhibitor der Thiolprotease Calpain wurde auch FAN- und LYST-kompetenten Zellen zugesetzt um zu untersuchen, ob eine verstärkte Protektion der PKC zur Bildung von nachweisbar verkleinerten Lysosomen führt.

Von der Zelllinie MCHSF2 wurden 5 Aufnahmen von unbehandelten Zellen angefertigt und 16 Aufnahmen von Zellen, welche mit den Inhibitoren GÖ 6976 und Calpastatin bei Einwirkzeiten von zwei Stunden oder über Nacht behandelt wurden (Versuchsaufbau s.2.2.5). Jene Zellen, welche über Nacht mit GÖ 6976 behandelt wurden, zeigten keine Vitalität mehr. Von ihnen wurden keine Aufnahmen angefertigt.

Insgesamt wurden von der Zelllinie MCHSF2 287 Lysosomen vermessen. Bei Anfertigung dieser Bildreihen lagen zunächst von Aufnahme zu Aufnahme unterschiedliche Stacksizes zugrunde, wodurch die Messergebnisse entsprechend umgerechnet werden mussten (siehe Anhang II). Um die Lysosomen von Bildern vermessen zu können, die eine Stacksize von $230,3 \mu\text{m}^2$ oder größer besaßen, war es nötig, die Aufnahmen mittels des ImageJ Programms stark zu vergrößern. Dabei wurde deutlich, dass die Auflösung solcher Bilder bei starker Vergrößerung Mängel aufwies, was die Qualität der Messung beeinträchtigte. Auch hatte die Umrechnung der Originalwerte mit stark vergrößernden Faktoren häufig Ergebniswerte zur Folge, die deutlich und ohne erkennbaren Grund aus der Reihe der übrigen Werte herausstraten. Die Werte der Bilder mit einer Stacksize von $230,3 \mu\text{m}^2$ oder größer, somit

Ergebnisse

einem Umrechnungsfaktor von 2,303 x 2,303 oder größer, wurden deshalb in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Abb 3.3 zeigt die Mittelwerte der durchschnittlichen Lysosomengröße der Zellen der Zelllinie MCHSF2 unbehandelt und nach Behandlung mit Inhibitoren. Die Größe der Lysosomen der unbehandelten Zellen der Zelllinie MCHSF2 betrug im Durchschnitt 212,22 pixel² pro Zelle (s. Tab. 3.3). Die Lysosomen der Zellen, welche zwei Stunden mit GÖ 6976 behandelt wurden, maßen im Durchschnitt 440,46 pixel² pro Zelle. Dieser Wert ist allerdings auf einige herausragend große Lysosomen zurückzuführen und spiegelt nicht die durchschnittliche Größe der Mehrheit der Lysosomen wider. Die durchgeführte Varianzanalyse erkannte zwischen den Messwerten der unbehandelten Zellen und der zwei Stunden mit GÖ 6976 behandelten Zellen keinen signifikanten Unterschied (P-Wert: 0,1488). Ebenso konnte kein Unterschied in der Lysosomengröße der unbehandelten Zellen der Zelllinie MCHSF2 zu den Zellen, welche zwei Stunden mit Calpastatin behandelt wurden gesehen werden (P-Wert: 0,7680). Diese maßen im Durchschnitt 187,85 pixel² pro Zelle. Die Größe der Lysosomen der Zellen, welche über Nacht mit Calpastatin behandelt worden waren, betrug 334,27 pixel² im Durchschnitt pro Zelle. Ein P-Wert von 0,3935 zeigte jedoch, dass dieser vermeintliche Größenunterschied zwischen den Lysosomen der unbehandelten Zellen und der über Nacht mit Calpastatin behandelten Zellen nicht signifikant ist.

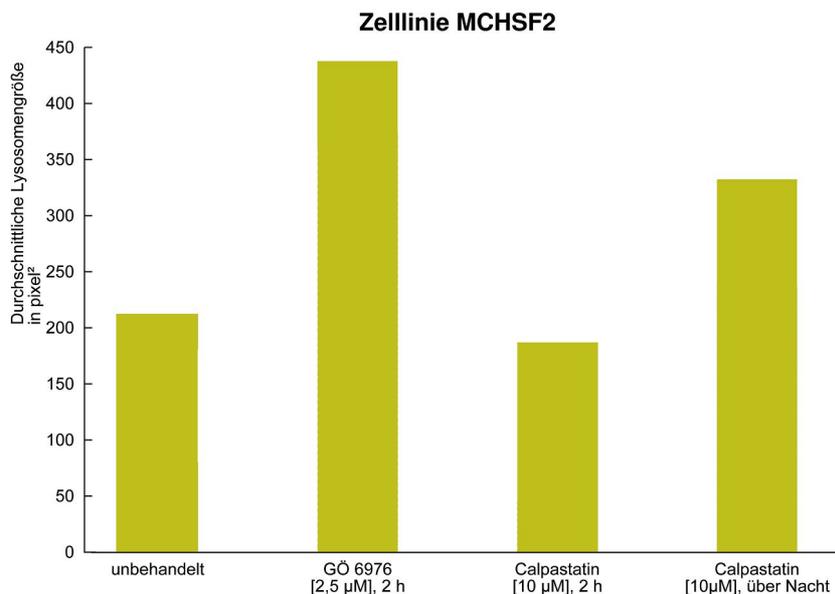


Abb. 3.3 Lysosomengrößen im Mittel für die unbehandelten Zellen der Zelllinie MCHSF2, die zweistündig mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelten Zellen, die zweistündig mit Calpastatin [10 µM] behandelten Zellen und die über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelten Zellen.

Ergebnisse

Es kann somit die Aussage getroffen werden, dass kein signifikanter Unterschied in der Lysosomengröße der unbehandelten Zellen der Zelllinie MCHSF2 zu den mit Inhibitoren behandelten Zellen derselben Zelllinie besteht.

Von der Zelllinie C57-CF2 wurden insgesamt 32 Aufnahmen untersucht und 831 Lysosomen vermessen. Es wurden 8 Aufnahmen von unbehandelten Zellen untersucht, 6 Aufnahmen von Zellen, welche zwei Stunden mit GÖ 6976 behandelt wurden, 6 Aufnahmen von Zellen, welche über Nacht mit GÖ 6976 behandelt wurden, 6 Aufnahmen von Zellen, welche zwei Stunden mit Calpastatin behandelt wurden und 6 Aufnahmen von Zellen, welche über Nacht mit Calpastatin behandelt wurden (s. Tab. 3.4). Die Lysosomen der unbehandelten Zellen maßen im Durchschnitt pro Zelle 44,86 pixel², die Lysosomen der Zellen, welche zwei Stunden mit GÖ 6976 behandelt wurden maßen im Durchschnitt 39,48 pixel². Eine Varianzanalyse zeigt, dass zwischen den Messwerten kein statistisch signifikanter Unterschied besteht (P-Wert: 0,5112). Die Lysosomengröße der Zellen, welche über Nacht mit GÖ 6976 behandelt wurden betrug durchschnittlich 31,2 pixel². Es lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen (P-Wert: 0,0789). Die Lysosomen der zweistündlich mit Calpastatin behandelten Zellen maßen im Durchschnitt 39,43 pixel². Es besteht auch hier kein signifikanter Unterschied zur Lysosomengröße der unbehandelten Zellen (P-Wert: 0,478). Die Lysosomengröße der über Nacht mit Calpastatin behandelten Zellen beträgt im Durchschnitt pro Zelle 30,59 pixel². Eine Varianzanalyse zeigt keinen signifikanten Unterschied zu den Lysosomen der unbehandelten Zellen (P-Wert: 0,2656). Eine signifikante Änderung der Lysosomengröße nach Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren GÖ 6976 und Calpastatin kann nicht beobachtet werden (s. Abb. 3.4).

Ergebnisse

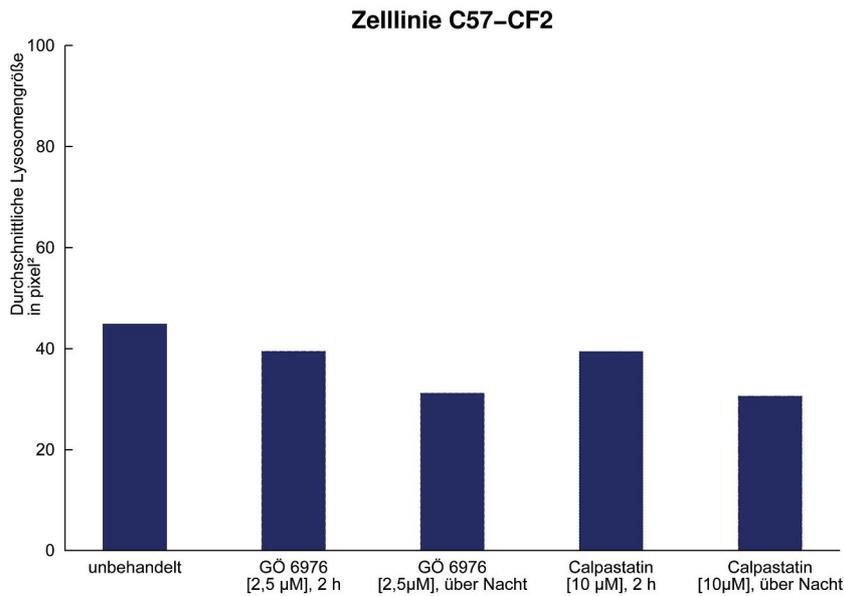


Abb. 3.4 Lysosomengrößen im Mittel für die unbehandelten Zellen der Zelllinie C57-CF2, die zweistündig mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelten Zellen, die über Nacht mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelten Zellen, die zweistündig mit Calpastatin [10 µM] behandelten Zellen und die über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelten Zellen.

Eine zusätzlich durchgeführte einfaktorielle Varianzanalyse, welche die umgerechneten Messwerte der Lysosomengröße der Zelllinien MCHSF2 und C57-CF2 im Durchschnitt pro Zelle verglich, wies einen P-Wert von $1,3436 \times 10^{-8}$ auf und bestätigte somit, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Lysosomengrößen der beiden Zelllinien bei einem Signifikanzniveau von 0,05 besteht. In LYST-defizienten MCHSF2-Zellen liegen eindeutig Riesenslysosomen vor, welche sich in ihrer Größe deutlich von den Lysosomen der LYST-kompetenten C57-CF2-Zellen unterscheiden.

Von der Zelllinie FAN ko wurden insgesamt 24 Aufnahmen analysiert, wobei 1229 Lysosomen vermessen wurden. Es wurden 6 Aufnahmen von unbehandelten Zellen der Zelllinie FAN ko untersucht, 5 weitere Aufnahmen zeigten Zellen, welche zweistündig mit GÖ 6976 behandelt wurden und ebenso viele Aufnahmen wurden von Zellen analysiert, welche über Nacht mit GÖ 6976 behandelt wurden. Es wurden 4 Aufnahmen von Zellen untersucht, welche zwei Stunden mit Calpastatin behandelt wurden, und ebenfalls 4 Aufnahmen von Zellen, welche über Nacht mit Calpastatin behandelt wurden. Die unbehandelten Zellen der Zelllinie FAN ko wiesen eine durchschnittliche Lysosomengröße von 36,97 pixel² auf (Tab. 3.5). Die Lysosomen der Zellen, welche zwei Stunden mit GÖ 6976 behandelt wurden, besaßen eine durchschnittliche Größe von 25,49 pixel² pro Zelle. Eine Varianzanalyse bestätigte jedoch nicht das Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes.

Ergebnisse

Mit einem P-Wert von 0,1045 gilt es als gesichert, dass die Messwerte sich nicht aussagekräftig voneinander unterscheiden. Es kann ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten Lysosomen der Zelllinie FAN ko und Lysosomen von Zellen, welche über Nacht mit GÖ 6976, zwei Stunden mit Calpastatin und über Nacht mit Calpastatin behandelt wurden beobachtet werden (Mittelwert der Lysosomengröße bei Behandlung der Zellen mit GÖ 6976 über Nacht: 28,46 pixel², P-Wert der Varianzanalyse im Vergleich mit unbehandelten Zellen: 0,2234; Mittelwert bei zweistündiger Behandlung mit Calpastatin: 27,95 pixel², P-Wert: 0,2538; Mittelwert bei Behandlung mit Calpastatin über Nacht: 29,18 pixel², P-Wert: 0,3344, s. Tab. 3.5, Abb 3.5).

Der Zusatz von GÖ 6976 und Calpastatin hat weder nach zweistündiger Behandlung, noch nach Behandlung über Nacht eine signifikante Auswirkung auf die Lysosomengröße der Zellen der Zelllinie FAN ko.

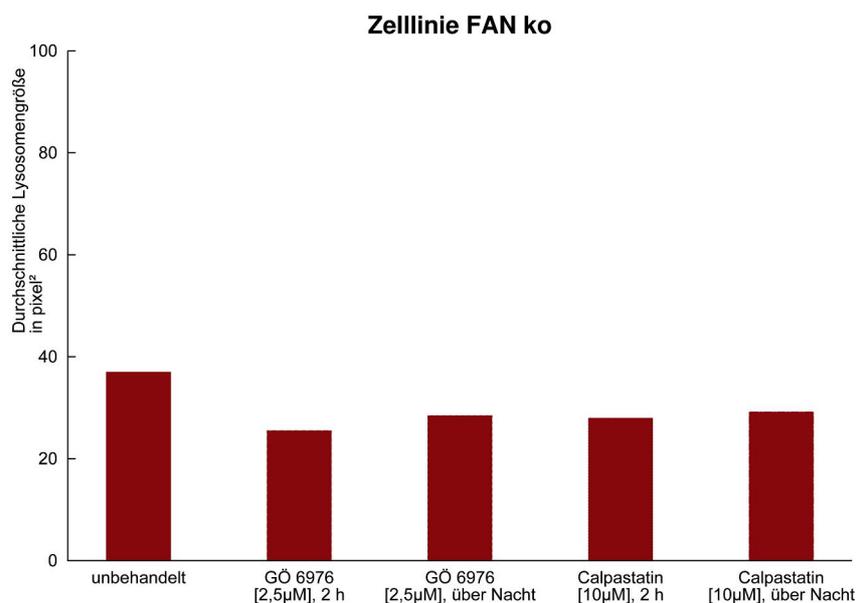


Abb. 3.5 Lysosomengrößen im Mittel für die unbehandelten Zellen der Zelllinie FAN ko, die zweistündig mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelten Zellen, die über Nacht mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelten Zellen, die zweistündig mit Calpastatin [10 µM] behandelten Zellen und die über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelten Zellen.

Von der Zelllinie wt wurden 22 Aufnahmen untersucht, bei welchen 1813 Lysosomen vermessen werden konnten.

Es konnten 8 Aufnahmen von unbehandelten Zellen untersucht werden, und es wurden 4 Aufnahmen von Zellen untersucht, welche zweistündig mit GÖ 6976 behandelt wurden. Die Zellen, welche über Nacht mit GÖ 6976 behandelt wurden, waren nicht mehr vital. Zusätzlich

Ergebnisse

zeigten 5 Aufnahmen Zellen, welche zwei Stunden mit Calpastatin behandelt wurden, ebenso viele Aufnahmen zeigten Zellen, welche über Nacht mit Calpastatin behandelt wurden. Die Lysosomengröße der unbehandelten Zellen der Zelllinie wt betrug im Durchschnitt 30,11 pixel² pro Zelle. Die Größe der Lysosomen der Zellen, welche zwei Stunden mit GÖ 6976 behandelt wurden, betrug durchschnittlich 32,6 pixel² pro Zelle (Tab. 3.6). Ein Unterschied in der Lysosomengröße ließ sich durch eine Varianzanalyse nicht feststellen (P-Wert 0,5744). Ein Unterschied in der Lysosomengröße konnte auch zwischen unbehandelten Zellen und Zellen, welche zweistündig mit Calpastatin behandelt wurden, nicht festgestellt werden (Mittelwert der Lysosomengröße der zweistündig mit Calpastatin behandelten Zellen: 23,24 pixel², P-Wert: 0,1271). Auch zu den über Nacht mit Calpastatin behandelten Zellen stellte sich kein Unterschied dar (Mittelwert der Lysosomengröße der über Nacht mit Calpastatin behandelten Zellen: 33,42 pixel², P-Wert: 0,5149, s. Tab. 3.6, Abb. 3.6).

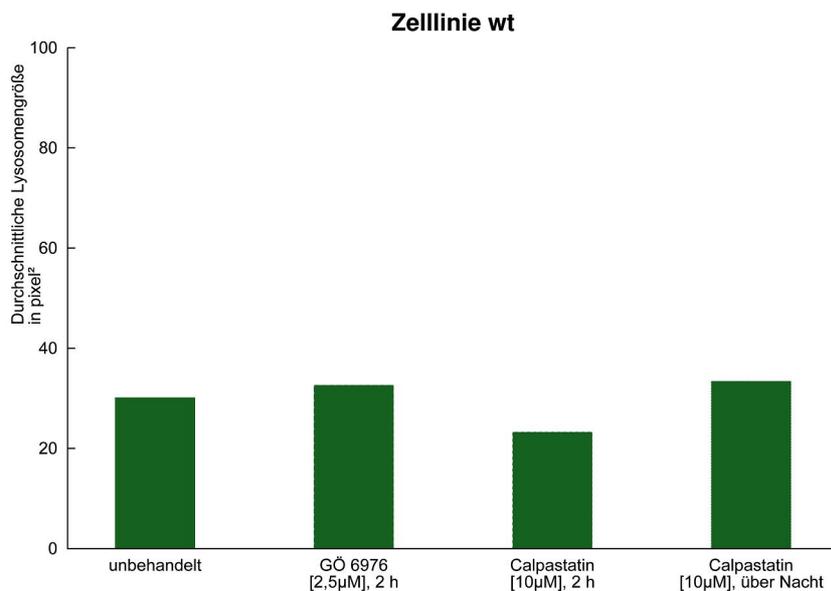


Abb. 3.6 Lysosomengrößen im Mittel für die unbehandelten Zellen der Zelllinie wt, die zweistündig mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelten Zellen, die zweistündig mit Calpastatin [10 µM] behandelten Zellen und die über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelten Zellen.

In den Zelllinien MCHSF2, C57-CF2, FAN ko und wt konnte insgesamt kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Lysosomengröße der unbehandelten Zellen einer Zelllinie zu den mit Inhibitoren behandelten Zellen derselben Zelllinie gemessen werden. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass die Proteinkinase C keinen hier darstellbaren Einfluss auf die Größe der Lysosomen besitzt, was im Fall der LYST-defizienten bzw. -kompetenten Zellen im Widerspruch zu publizierten Daten steht.

3.3 Untersuchungen von fremdangefertigten Aufnahmen der Zelllinien MCHSF2, C57-CF2, FAN ko und wt bestätigen das Vorliegen eines Größenunterschiedes zwischen den Lysosomen von FAN-defizienten Fibroblasten und FAN-kompetenten Fibroblasten und LYST-defizienten und LYST-kompetenten Fibroblasten

Um eine größere Menge von Daten bezüglich der Größe und Anzahl der Lysosomen der Zelllinien MCHSF2, C57-CF2, FAN ko und wt vergleichen zu können, wurden zusätzlich Aufnahmen genutzt, welche durch die Arbeit der Forschungsgruppe D. Adam entstanden waren. Digitale Bildaufnahmen von LYST-defizienten und –kompetenten Fibroblasten und FAN-defizienten und –kompetenten Fibroblasten der Zelllinien MCHSF2, C57-CF2, FAN ko und wt wurden mir freundlicherweise zu Untersuchungszwecken zur Verfügung gestellt. Teile der Auswertungen dieser Bilder flossen in die Publikation der Forschungsergebnisse der Forschungsgruppe D. Adam ein (45). Es wurden die Aufnahmen von vier zusätzlichen Versuchen vermessen und ausgewertet.

Die Aufnahmen des ersten Versuchs, in welchem die Zelllinien FAN ko und wt unbehandelt vorlagen, wurden vergleichend untersucht. Die Zelllinie FAN ko wurde von 22 Aufnahmen repräsentiert, in welchen 877 Lysosomen vermessen wurden. Die Zelllinie wt wurde von 12 Aufnahmen repräsentiert, in welchen 342 Lysosomen untersucht wurden. Die Lysosomengröße in Zellen der Zelllinie FAN ko betrug durchschnittlich 124,57 pixel² pro Zelle, die Lysosomengröße in Zellen der Zelllinie wt betrug durchschnittlich 77,41 pixel² pro Zelle (Tab. 3.7, Abb. 3.7). Die Lysosomen der Zelllinie FAN ko erwiesen sich somit als signifikant vergrößert gegenüber denen der Zelllinie wt (P-Wert 0,0343).

Ergebnisse

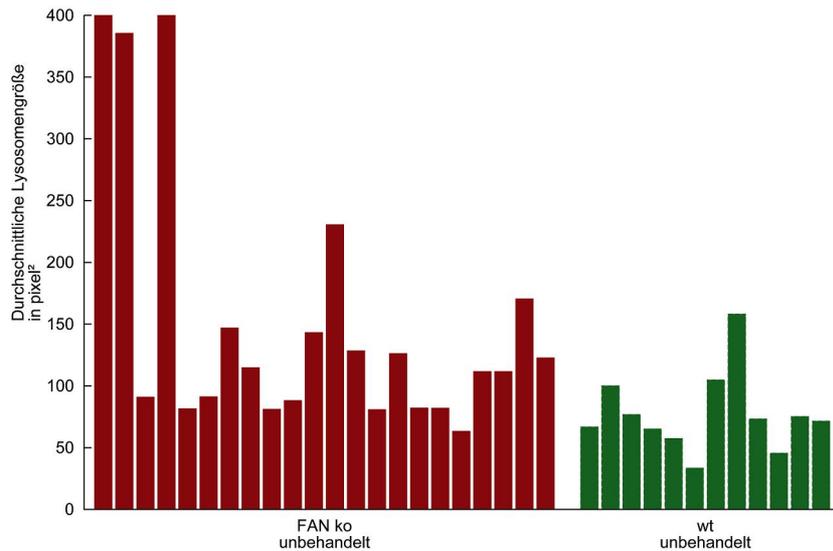


Abb. 3.7 Lysosomengrößen im Mittel pro Zelllinie. Die Zelllinien FAN ko und wt liegen unbehandelt vor.

Der zweite betrachtete Versuch lieferte 9 Aufnahmen der unbehandelten Zelllinie FAN ko und 9 Aufnahmen der ebenfalls unbehandelten Zelllinie wt. Es wurden 1043 Lysosomen der Zelllinie FAN ko vermessen und 899 Lysosomen der Zelllinie wt. Die Lysosomen der Zelllinie FAN ko maßen $164,7 \text{ pixel}^2$ im Durchschnitt pro Zelle und die Lysosomen der Zelllinie wt $64,03 \text{ pixel}^2$ (P-Wert: $4,3111 \times 10^{-5}$, s. Tab. 3.8, Abb. 3.8).

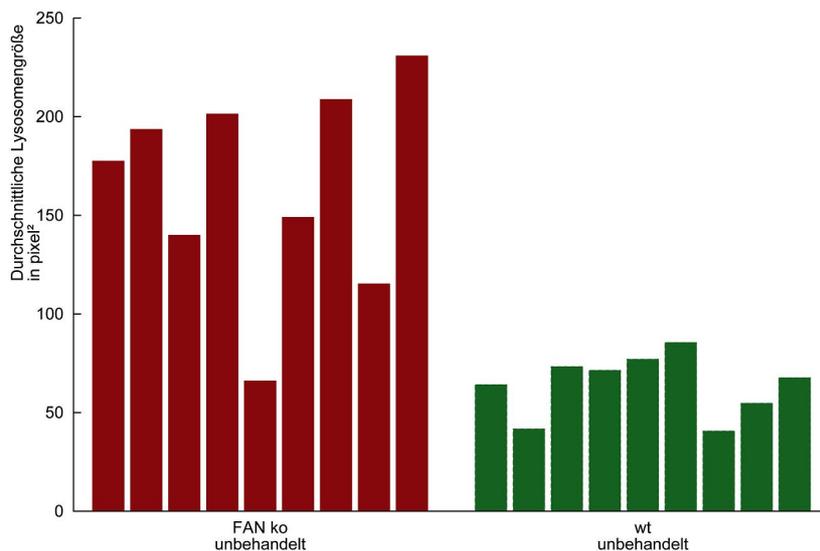


Abb. 3.8 Lysosomengrößen im Mittel pro Zelllinie. Die Zelllinien FAN ko und wt liegen unbehandelt vor.

Die Ergebnisse dieser beiden Versuche unterstützen das Ergebnis der eigenen Versuche. Die Lysosomen der FAN-defizienten Zellen sind deutlich größer als die Lysosomen der FAN-

Ergebnisse

kompetenten Zellen. Die Vermutung wird somit bekräftigt, dass ein genetischer Defekt des FAN-Gens in FAN-defizienten Zellen für eine Störung des Vesikelverkehrs verantwortlich ist, was die Entstehung von vergrößerten Lysosomen zur Folge hat.

In zwei weiteren Versuchen wurden die Lysosomen der Zelllinien MCHSF2 und C57-CF2 vermessen und auf Unterschiede in Größe und Anzahl untersucht. Im ersten Versuch, der die Zelllinien MCHSF2 und C57-CF2 zeigt, lagen die Zellen beider Zelllinien jeweils unbehandelt, in 1 μM Calpeptin in Nährmedium und in 10 μM Calpeptin in Nährmedium vor. Die Inkubationszeit betrug jeweils zwei Stunden (s. Tab. 3.11 und 3.12). Im zweiten Versuch lag die Zelllinie C57-CF2 unbehandelt und über Nacht in GÖ 6976 [1 μM] inkubiert vor (s. Tab. 3.13). Die Zelllinie MCHSF2 lag unbehandelt und über Nacht in jeweils Calpastatin [10 μM] und Calpeptin [1 μM] und E-64d [1 $\mu\text{g/ml}$] inkubiert vor (s. Tab. 3.14). Calpastatin, Calpeptin und E-64d sind Inhibitoren der Thiolprotease Calpain. In allen Zelllinien wurde zunächst die Gesamtheit der Lysosomen in unbehandelten und behandelten Zellen vermessen, anschließend wurde die Lysosomengröße auf Unterschiede zwischen den Zelllinien untersucht (s. Tab. 3.9 und 3.10). Die Untersuchung des Einflusses der genannten Inhibitoren der Proteinkinase C und der Thiolprotease Calpain ist in Punkt 3.4 dargestellt (3.4 Untersuchungen des Einflusses von Inhibitoren der Proteinkinase C und der Thiolprotease Calpain auf die Lysosomengröße anhand von fremdangefertigten Aufnahmen weisen keine signifikanten Änderungen der Lysosomengröße nach). Es wurden insgesamt 939 Lysosomen der Zelllinie MCHSF2 und 844 Lysosomen der Zelllinie C57-CF2 vermessen. Die durchschnittliche Größe der Lysosomen der Zelllinie MCHSF2 in zwei unabhängigen Versuchen betrug 149,94 pixel^2 und 169,54 pixel^2 pro Zelle (s. Tab. 3.9, Tab. 3.10). Die Lysosomen der Zelllinie C57-CF2 besaßen pro Zelle durchschnittlich eine Größe von 49,24 pixel^2 und 24,53 pixel^2 . Es besteht ein deutlicher Größenunterschied zwischen den Lysosomen beider Zelllinien (P-Wert: 0,0018; P-Wert: $3,5876 \times 10^{-6}$; s. Abb. 3.9, Abb. 3.10), wie bereits dargestellt in den eigenen Versuchen.

Ergebnisse

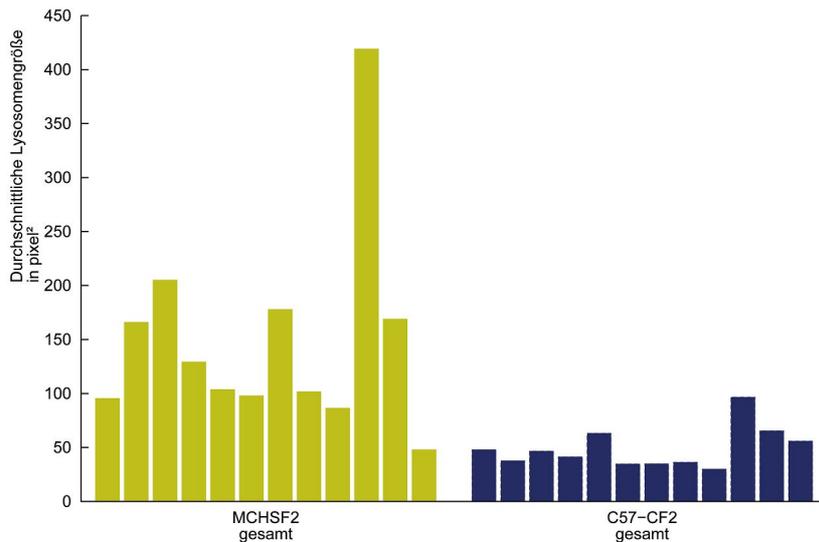


Abb 3.9 Lysosomengrößen im Mittel pro Zelllinie. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte für die Gesamtheit der Zellen der Zelllinien MCHSF2 und C57-CF2.

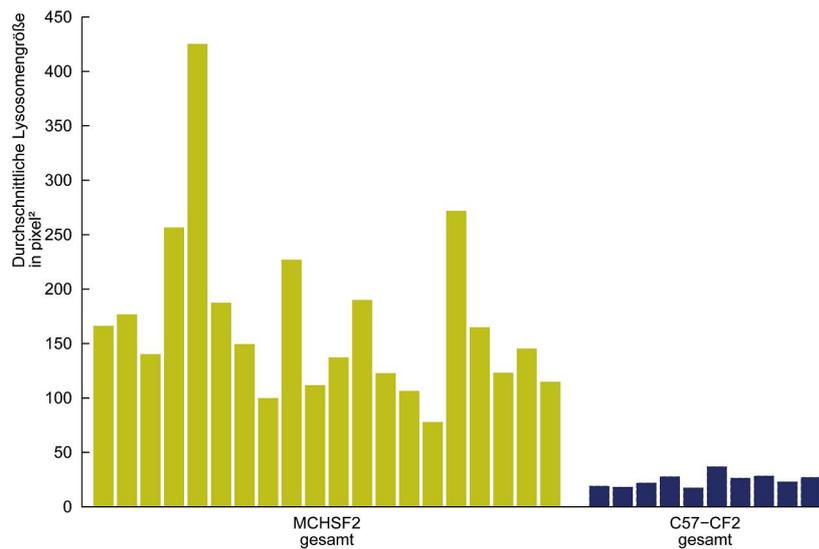


Abb. 3.10 Lysosomengrößen im Mittel pro Zelllinie. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte für die Gesamtheit der Zellen der Zelllinien MCHSF2 und C57-CF2.

Es liegen Riesenlysosomen in den LYST-defizienten Zellen als Auswirkung des Gendefektes auf den Vesikelverkehr der Zelle vor.

3.4 Untersuchungen des Einflusses von Inhibitoren der Proteinkinase C und der Thiolprotease Calpain auf die Lysosomengröße anhand von fremdangefertigten Aufnahmen weisen keine signifikanten Änderungen der Lysosomengröße nach

Zur Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren der Proteinkinase C und der Thiolprotease Calpain auf die Lysosomengröße wurden die Messwerte der beiden zuletzt genannten Versuche der Zelllinien MCHSF2 und C57-CF2 verwendet, bei welchen die Zelllinien mit den Calpain-Inhibitoren Calpastatin [10 μM], Calpeptin [1 μM] und E-64d [1 $\mu\text{g/ml}$] und dem PKC-Inhibitor GÖ 6976 [1 μM] behandelt worden waren (siehe 3.3).

Im ersten untersuchten Versuch der Zelllinien MCHSF2 und C57-CF2 wurden von jeder Zelllinie 4 Aufnahmen von unbehandelten Zellen ausgewertet, 4 Aufnahmen von Zellen, welche zwei Stunden in Calpeptin [1 μM] kultiviert worden waren und 4 Aufnahmen von Zellen, welche zwei Stunden in Calpeptin [10 μM] kultiviert worden waren. Hierbei sollte der Einfluss der PKC auf die Lysosomengröße durch Hemmung der Protease Calpain durch den Inhibitor Calpeptin untersucht werden. Die unbehandelten Zellen der Zelllinie C57-CF2 maßen im Durchschnitt pro Zelle 43,41 pixel², die Zellen, welche in Calpeptin [1 μM] kultiviert worden waren, maßen 42,3 pixel² im Durchschnitt pro Zelle (Tab. 3.11). Ein relevanter Größenunterschied konnte mit einer Varianzanalyse nicht nachgewiesen werden (P-Wert: 0,8855). Die Größe der Lysosomen der Zellen, welche in Calpeptin [10 μM] kultiviert worden waren, betrug 62,02 pixel² im Durchschnitt pro Zelle. Eine Varianzanalyse wies jedoch auch hier keinen Unterschied zu den unbehandelten Zellen auf (P-Wert: 0,2314; Abb 3.11).

Ergebnisse

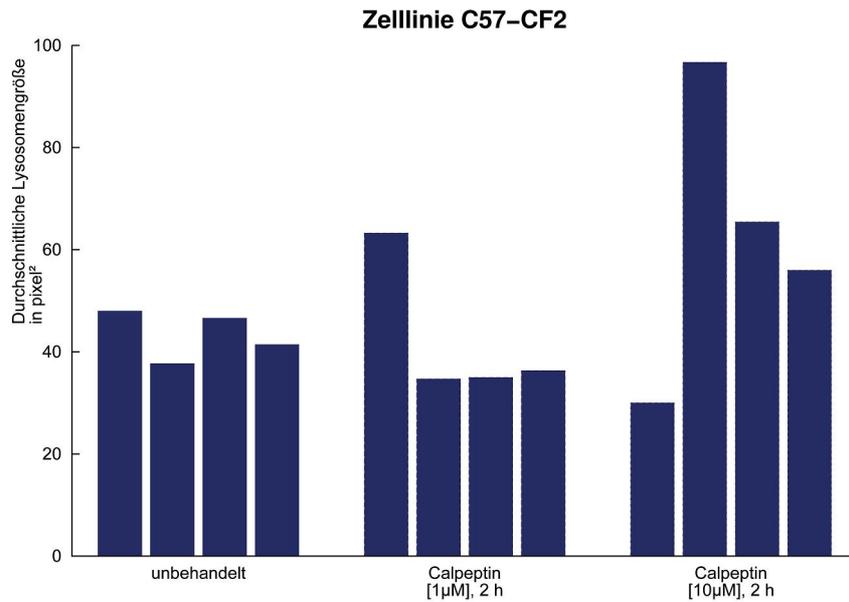


Abb. 3.11 Lysosomengrößen im Mittel für die unbehandelten Zellen der Zelllinie C57-CF2, die zweistündig mit Calpeptin [1 µM] behandelten Zellen und die zweistündig mit Calpeptin [10 µM] behandelten Zellen.

Die Lysosomen der unbehandelten Zellen der Zelllinie MCHSF2 maßen im Durchschnitt 148,92 pixel² pro Zelle. Die Größe der Lysosomen der mit Calpeptin [1 µM] behandelten Zellen betrug 120,28 pixel², die Lysosomen der mit Calpeptin [10 µM] behandelten Zellen 180,62 pixel² im Durchschnitt pro Zelle (Tab. 3.12). Es konnte kein Unterschied zwischen den Messwerten der unbehandelten Zellen zu den Messwerten der mit Calpeptin [1 µM] behandelten Zellen gesehen werden (P-Wert: 0,3834), ebenso wenig wie zu den Messwerten der mit Calpeptin [10 µM] behandelten Zellen (P-Wert: 0,7271; Abb. 3.12). Bei Hemmung der Protease Calpain lässt sich bei keiner der beiden Zelllinien eine objektiv erfassbare Änderung der Lysosomengröße darstellen.

Ergebnisse

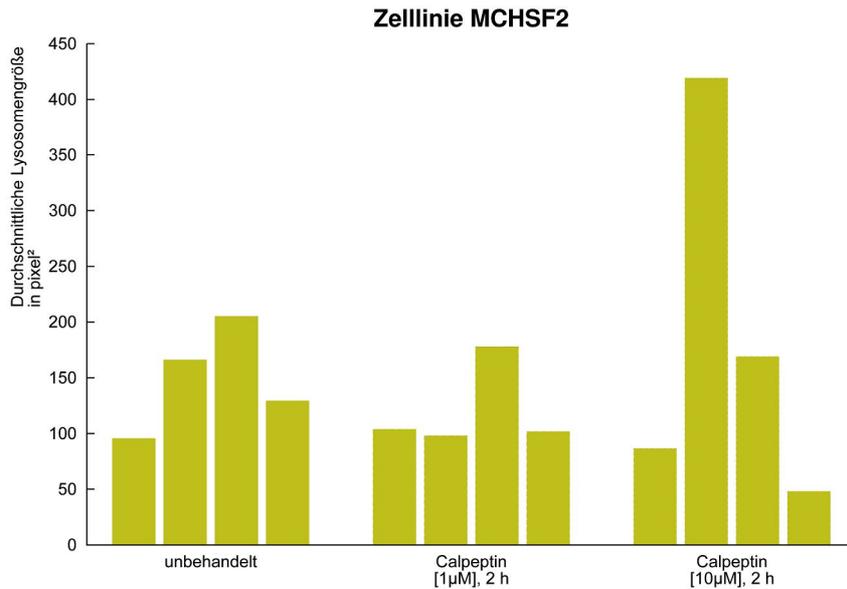


Abb. 3.12 Lysosomengrößen im Mittel für die unbehandelten Zellen der Zelllinie MCHSF2, die zweistündig mit Calpeptin [1 µM] behandelten Zellen und die zweistündig mit Calpeptin [10 µM] behandelten Zellen.

Im zweiten analysierten Versuch der Zelllinien MCHSF2 und C57-CF2 lagen alle Zellen in synchronisierendem Hungermedium vor. Es wurden 5 Aufnahmen von unbehandelten Zellen der Zelllinie C57-CF2 untersucht und 5 Aufnahmen von Zellen der Zelllinie C57-CF2, welche über Nacht mit dem PKC-Inhibitor GÖ 6976 behandelt worden waren. Ebenfalls wurden 5 Aufnahmen von unbehandelten Zellen der Zelllinie MCHSF2 analysiert und weiterhin je 5 Aufnahmen von Zellen, welche über Nacht mit den Calpain-Inhibitoren Calpastatin, Calpeptin und E-64d behandelt worden waren. Die unbehandelten Zellen der Zelllinie C57-CF2 wiesen eine durchschnittliche Lysosomengröße von 20,78 pixel² pro Zelle auf. Die Lysosomen der über Nacht mit GÖ 6976 behandelten Zellen maßen durchschnittlich 28,27 pixel² (Tab. 3.13, Abb. 3.13). Hier lässt sich ein geringer signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten der unbehandelten und behandelten Zellen feststellen (P-Wert: 0,0363). Dies ist die einzige Messung, bei welcher ein Unterschied zwischen den unbehandelten Zellen einer Zelllinie und den mit einem Inhibitor behandelten Zellen derselben Zelllinie gesehen werden kann. Die Hemmung der PKC resultiert hier in einer dezerten Vergrößerung der Lysosomen von LYST-kompetenten Zellen.

Ergebnisse

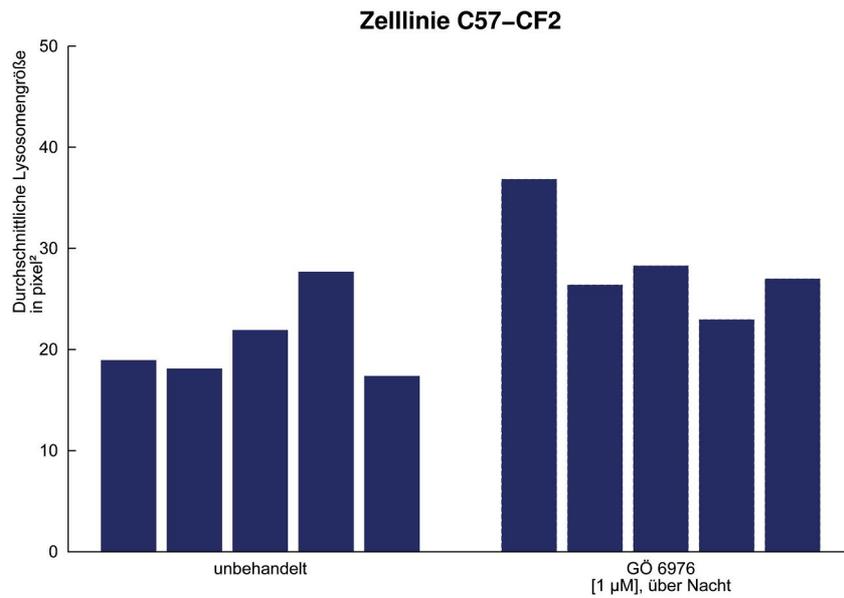


Abb. 3.13 Lysosomengrößen im Mittel für die unbehandelten Zellen der Zelllinie C57-CF2 und die über Nacht mit GÖ 6976 [1 µM] behandelten Zellen.

Die Größe der Lysosomen der unbehandelten Zellen der Zelllinie MCHSF2 betrug 232,83 pixel² im Durchschnitt pro Zelle. Die Lysosomen der Zellen, welche über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt wurden, maßen durchschnittlich 154,89 pixel² pro Zelle, wobei ein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Zellen nicht festgestellt werden konnte (P-Wert: 0,2085). Die Größe der Lysosomen der Zellen, welche über Nacht mit Calpeptin [1 µM] behandelt wurden, betrug 126,65 pixel² im Durchschnitt pro Zelle. Ein Unterschied zu den Messwerten der unbehandelten Zellen konnte nicht nachgewiesen werden (P-Wert: 0,899). Ebenso wenig konnte ein Unterschied zwischen den Messwerten der über Nacht mit E 64 d [1 µg/dl] behandelten Zellen zu den unbehandelten Zellen beobachtet werden (P-Wert: 0,2761), wobei die Lysosomen der mit E-64d behandelten Zellen im Durchschnitt 163,79 pixel² pro Zelle maßen (Tab. 3.14, Abb. 3.14).

Ergebnisse

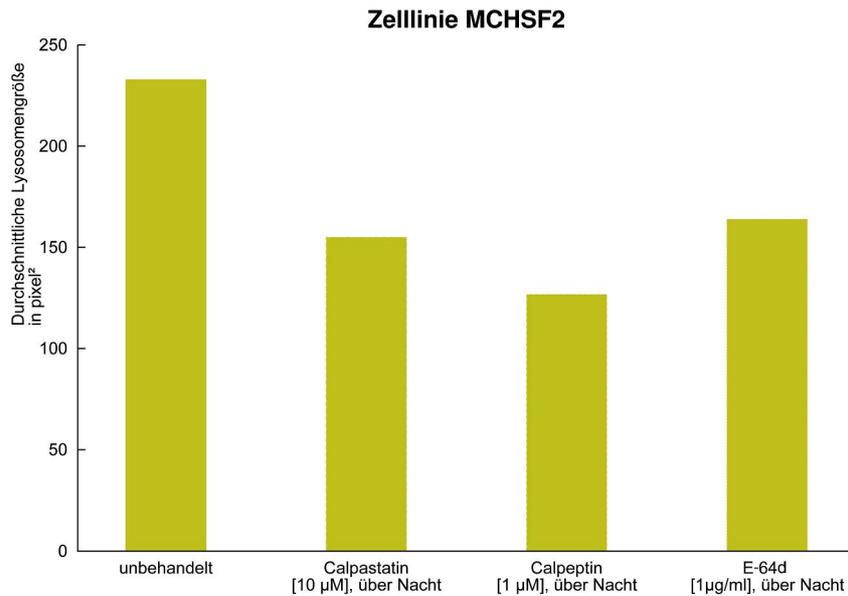


Abb 3.14 Lysosomengrößen im Mittel für die unbehandelten Zellen der Zelllinie MCHSF2, die über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelten Zellen, die über Nacht mit Calpeptin [1 µM] behandelten Zellen und die über Nacht mit E-64d [1 µg/ml] behandelten Zellen.

Es wird deutlich, dass die Hemmung der Thiolprotease Calpain keine signifikante Größenänderung der Lysosomen in LYST-defizienten Zellen und LYST-kompetenten Zellen nach sich zieht. Es wurde hier zum ersten Mal eine dezent signifikante Vergrößerung der Lysosomen bei Zellen beobachtet, welche mit dem Inhibitor der PKC GÖ 6976 behandelt wurden. Es handelt sich allerdings um eine Einzelbeobachtung. Dieses Ergebnis konnte bei keinem der anderen analysierten Versuchen beobachtet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei der überwiegenden Mehrheit der Versuche ein Einfluss der Inhibitoren der PKC und der Thiolprotease Calpain auf die Lysosomengröße nicht beobachtet werden kann. Die Lysosomengröße verhält sich bis auf eine Ausnahme unabhängig von den zugegebenen Substanzen.

3.5 Die Anzahl der Lysosomen in den Zellen der Zelllinie MCHSF2 ist signifikant reduziert im Vergleich zur Zelllinie C57-CF2, für die Anzahl der Lysosomen der Zelllinie FAN ko lässt sich diese Aussage im Vergleich zur Zelllinie wt nicht treffen

In der Literatur sind für LYST-defiziente Zellen riesige, aber wenige, Lysosomen beschrieben worden, daher sollte hier überprüft werden, ob auch in FAN-defizienten Zellen eine verminderte Anzahl von Lysosomen nachgewiesen werden kann. Die Lysosomen in den Zellen der Zelllinien MCHSF2, C57-CF2, FAN ko und wt wurden gezählt und auf

Ergebnisse

signifikante Unterschiede bezüglich ihrer Anzahl untersucht. In den Zellen der Zelllinie MCHSF2 wurden durchgängig weniger Lysosomen im Durchschnitt pro Zelle gezählt, als in den Zellen der Zelllinie C57-CF2 (s. Tab. 3.15). Die Lysosomen der LYST-defizienten Zellen sind somit sowohl deutlich vergrößert gegenüber denen, der LYST-kompetenten Zellen, als auch in ihrer Anzahl deutlich reduziert. Dies stimmt mit Beobachtungen in der Literatur überein, in welcher in ihrer Anzahl verminderte Riesenlysosomen in LYST-defizienten Zellen beschrieben werden (11, 19). Die Vermutung liegt nahe, dass spezielle Vorgänge des Vesikelverkehrs in LYST-defizienten Zellen gestört sind, welche zur Bildung von wenigen Riesenlysosomen führen. In FAN-defizienten Zellen konnte dieser Unterschied bezüglich der Anzahl der Lysosomen nicht durchgehend beobachtet werden. In zwei von fünf analysierten Versuchsansätzen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Lysosomen im Durchschnitt pro Zelle in FAN ko Zellen vermindert gegenüber wt Zellen war (P-Wert: $5,9074 \times 10^{-5}$; P-Wert: 0,0119). In einem weiteren Versuchsansatz unterschied sich die durchschnittliche Lysosomenanzahl kaum. Es wurden 46 Lysosomen im Durchschnitt pro Zelle für die Zelllinie FAN ko gezählt und 50,7 Lysosomen im Durchschnitt pro Zelle für die Zelllinie wt (P-Wert: 0,5733). In zwei weiteren Versuchsansätzen überwog die Anzahl der gezählten Lysosomen im Durchschnitt pro Zelle auf Seiten der Zelllinie FAN ko, es ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Lysosomenanzahl zwischen beiden Zelllinien feststellen (P-Wert: 0,1647; P-Wert: 0,3866, Tab. 3.16).

Es lässt sich somit nicht sagen, dass in FAN-defizienten Zellen die Anzahl der Lysosomen pro Zelle einheitlich signifikant vermindert wäre, wie es in LYST-defizienten Zellen der Fall ist. Man geht davon aus, dass die Riesenlysosomen der LYST-defizienten Zellen durch übermäßige Fusion einzelner Lysosomen entstehen. Die Annahme liegt somit nah, dass die Riesenlysosomen aufgrund ihres Fusionsverhaltens in ihrer Anzahl deutlich reduziert sind. Es ist vorstellbar, dass die Lysosomen der FAN-defizienten Zellen weniger häufig untereinander fusionieren, was dazu führt dass sie zum einen weniger groß als die Riesenlysosomen der LYST-defizienten Zellen sind und auch in ihrer Anzahl nicht so deutlich vermindert.

4. Diskussion

4.1 Ein Defekt im FAN-Gen hat die Bildung von vergrößerten Lysosomen zur Folge

Bei früherer Betrachtung von Bildaufnahmen erschienen die Lysosomen der FAN-defizienten Zellen häufig, aber nicht durchgängig, als subjektiv vergrößert gegenüber den Lysosomen der FAN-kompetenten Zellen. Die für LYST-defiziente Zellen typischen Riesenslysosomen konnten nicht beobachtet werden. Für eine genaue Erfassung vorliegender Größenunterschiede war es wichtig, die digitalen Aufnahmen der Zellen mittels des ImageJ Programms zu analysieren und Unterschiede objektiv zu ermitteln.

Als wichtigstes Ergebnis dieser Arbeit zeigte sich, dass sowohl in den hier durchgeführten Versuchen, als auch in den retrospektiv betrachteten Versuchen die Lysosomen der FAN-defizienten Zelllinie FAN ko statistisch signifikant vergrößert im Vergleich zu den Lysosomen der gesunden, FAN-kompetenten Zelllinie wt waren. In vier unabhängigen Versuchen konnte der Größenunterschied der Lysosomen als statistisch signifikant bestätigt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass FAN in bislang unbekannter Weise an Signalwegen beteiligt ist, welche die Lysosomengröße regulieren. Allerdings wird die Lysosomengröße durch einen Defekt im FAN-Gen weit weniger stark beeinflusst, als durch einen Defekt im LYST-Gen. Eine Studie von Kreder et al. (30) zeigte, dass FAN-defiziente Zellen nicht die erwartete Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase nach Behandlung mit TNF aufwiesen. FAN stellt somit einen limitierenden Faktor für die Aktivierung der nSMase dar. Ebenso konnte bei Mäusen nach Verletzung der kutanen Barriere eine gestörte Kinetik des Reparaturmechanismus nachgewiesen werden (30). Dieser Mechanismus beruht essentiell auf dem Transport und der Fusion von Vesikeln, was die Vermutung nahe legt, dass bei Vorliegen eines defekten FAN-Gens der Vesikelverkehr gestört ist, möglicherweise im besonderen in Hinblick auf Transport und Fusion der Vesikel. Bei Vorliegen eines defekten FAN-Gens kommt es aber zu weniger ausgeprägten Störungen im Stoffwechsel der Zelle, als bei Vorliegen eines defekten LYST-Gens. Dies stellt sich funktionell, ebenso wie im Ausmaß der Vergrößerung der Lysosomen dar. FAN reguliert möglicherweise Signalwege, welche sich nur teilweise mit denen des LYST-Proteins überschneiden, oder aber vom LYST-Protein oder anderen Mitgliedern der WD-repeat Proteinfamilie kompensiert werden können. Es wäre denkbar, dass FAN über seine Funktion als Regulator der nSMase Einfluss auf den Vesikelverkehr und die Größe der Lysosomen nehmen könnte. Die Signalwege, welche zur

Bildung von vergrößerten Lysosomen in LYST- wie in FAN-defizienten Zellen führen, sind jedoch bislang kaum untersucht.

4.2 Behandlung der Zelllinien MCHSF2, C57-CF2, FAN ko und wt mit Inhibitoren der PKC und der Thiolprotease Calpain zeigt keinen darstellbaren Effekt auf die Größe der Lysosomen

Die Forschungsgruppe Tanabe et al. (1999) hat in Forschungsarbeit bezüglich des Chediak-Higashi-Syndroms in LYST-defizienten Zellen eine gestörte Translokation der Proteinkinase C vom Zytosol an die Plasmamembran, und somit eine gestörte membranassoziierte Aktivität der Proteinkinase C festgestellt. Aus ihren Versuchen schlossen Tanabe et al., dass die gestörte Aktivität der Proteinkinase C für die Bildung der Riesenlysosomen und die Defekte der NK verantwortlich ist (39). Im Widerspruch zu diesen Daten zeigten die Zelllinien MCHSF2, C57-CF2, FAN ko und wt weder nach Zugabe des Inhibitors der Proteinkinase C, GÖ 6976, noch nach Zugabe der Inhibitoren der Protease Calpain, Calpastatin, Calpeptin und E-64d, eine eindeutig darstellbare Änderung in der Größe ihrer Lysosomen. Es konnte nicht beobachtet werden, dass eine Einwirkzeit über Nacht einen größeren Effekt auf die Lysosomengröße hatte, als eine Einwirkzeit von zwei Stunden. Daraus lässt sich folgern, dass die Proteinkinase C zumindest in den hier untersuchten FAN- und LYST-defizienten Zelllinien nicht in schwerwiegender Weise in ihrer Aktivität gestört ist, und dass sie nicht in kritischer Weise an der Bildung vergrößerter Lysosomen in FAN-defizienten Zellen, bzw. Riesenlysosomen in LYST-defizienten Zellen beteiligt ist.

Die Forschungsgruppe D. Adam zeigte durch weitere Arbeiten, dass die Proteinkinase C in LYST-defizienten wie in LYST-kompetenten Zellen auf normale Weise nach Zugabe eines adäquaten Stimulus (z.B. in Form des Phorbolesters PMA) zusammen mit dem Ankerprotein RACK1 vom Zytosol an die Membran rekrutiert und somit aktiviert werden konnte. Es konnten keine Hinweise auf eine gestörte Kinetik, Aktivität oder verfrühte Spaltung durch Calpain gefunden werden (45). Auch in FAN-defizienten Zellen konnte eine gestörte Rekrutierung der PKC an die Plasmamembran und eine verminderte Aktivität der PKC nicht nachgewiesen werden (45).

4.3 Die Anzahl der Lysosomen ist in FAN-defizienten Zellen nicht signifikant vermindert

Die Anzahl der Lysosomen der LYST-defizienten Zellen konnte als deutlich und einheitlich vermindert festgestellt werden. In Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen Morphologie der LYST-defizienten Zellen (19) konnten hier Riesenslysosomen beobachtet werden.

Die Anzahl der Lysosomen in FAN-defizienten Zellen wurde hier erstmals untersucht und mit der Anzahl der Lysosomen in Wildtypzellen verglichen. Hier konnte kein eindeutiges Verhalten beobachtet werden. In zwei Versuchen wurde ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Lysosomen zwischen den Zelllinien FAN ko und wt gesehen, mit verminderter Lysosomenanzahl auf Seiten der FAN ko Zellen. In einem weiteren Versuch wurde kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Lysosomen beider Zelllinien beobachtet, und in zwei weiteren Versuchen wurden mehr Lysosomen in den FAN ko Zellen gezählt, als in den wt Zellen. Die Vermutung, dass ein Defekt im FAN-Gen, ähnlich eines Defektes im LYST-Gen, zu einer verminderten Anzahl an Lysosomen führt, lässt sich nicht bestätigen.

Tchernev et al. (2002) stellten die Vermutung auf, dass die Verminderung der Anzahl der Lysosomen in LYST-defizienten Zellen auf der Tatsache beruht, dass LYST möglicherweise eine Rolle bei der Fusion der Vesikel spielt und ein Defekt im LYST-Gen sich in einer Ansammlung weniger, vergrößerter Lysosomen äußert, welche nicht mit der Plasmamembran fusionieren können und eventuell als Folge dessen miteinander fusionieren (11). Diese Vermutung wird bekräftigt durch eine Studie von Stinchcombe et al. (2000), in welcher gezeigt wird, dass die Riesenslysosomen in reifenden LYST-defizienten CTL von CHS-Patienten vermutlich durch Fusion von sekretorischen Lysosomen entstehen (19). Eine spätere Studie von Stinchcombe et al. (2001) zeigte, dass die Biogenese der sekretorischen Lysosomen in gesunden CTL und in CTL von CHS-Patienten identisch ist was ihre Proteinzusammensetzung und zunächst auch ihre Größe betrifft. Es konnte kein Hinweis auf eine fehlerhafte Sortierung oder eine gestörte Navigation entlang des endozytotischen Transportweges gefunden werden. Daraus schlossen Stinchcombe et al., dass ein Defekt des Vesikelverkehrs im exozytotischen Transportweg liegen muss, der „abwärts“ (downstream) der Vesikelbildung statt findet (46).

FAN-defiziente Zellen zeigen keine einheitlich verminderte Anzahl an Lysosomen. Der Defekt im FAN-Gen hat möglicherweise einen geringeren Einfluss auf die Fusionsfähigkeit der Vesikel, als ein defektes LYST-Gen, oder er kann von einem funktionierenden LYST

Diskussion

oder einem anderen WD-repeat Protein kompensiert werden. Diese Vermutung wird nicht nur durch das Ausbleiben einer signifikanten Änderung der Lysosomenanzahl begründet, sondern auch durch die geringer ausgeprägte Größenänderung der Vesikel im Vergleich zu Lysosomen der LYST-defizienten Zellen. Auch scheint die Funktionsfähigkeit der Vesikel der FAN-defizienten Zellen weniger beeinträchtigt.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob bis dahin nicht beschriebene Veränderungen in der Lysosomengröße bei FAN-defizienten Zellen nachweisbar sind. Es sollte der Einfluss des FAN-Gens auf die Größe und Anzahl der Lysosomen untersucht werden und mögliche Überschneidungen der Funktionen der Proteine LYST und FAN dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurden FAN-defiziente und LYST-defiziente murine Fibroblasten kultiviert, von welchen digitale Bildaufnahmen gefertigt wurden, anhand derer die Größe und die Anzahl der Lysosomen vermessen wurde. Auf gleiche Weise wurden zum Vergleich zwei gesunde, FAN- und LYST-kompetente Zelllinien auf die Größe und Anzahl ihrer Lysosomen untersucht.

Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Defekt im FAN-Gen vergrößerte Lysosomen zur Folge hat, welche aber nicht merklich in ihrer Anzahl verändert sind. Dies beweist das Vorliegen einer Störung der Regulierung der Vesikelgröße in FAN-defizienten Zellen, wenn auch weniger ausgeprägt, als bei einem Defekt im LYST-Gen. Morphologisch erscheinen die LYST-defizienten Zellen als gravierender von dem Gendefekt betroffen. Die Lysosomen in LYST-defizienten Zellen erscheinen stark vergrößert und sind in ihrer Anzahl deutlich reduziert. Die Lysosomen in FAN-defizienten Zellen sind weniger stark, aber dennoch statistisch signifikant vergrößert. Die Proteine LYST und FAN sind beide an der Regulierung der Lysosomengröße beteiligt. Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer verminderten Aktivität der Proteinkinase C auf die Größe der Lysosomen in FAN- und LYST-kompetenten Zellen durch Zugabe eines Proteinkinase C-spezifischen Inhibitors überprüft. Eine Auswirkung einer verminderten Aktivität der Proteinkinase C wurde weder bei FAN-, noch bei LYST-kompetenten Zellen beobachtet. Die Größe der Lysosomen änderte sich nicht signifikant. In FAN- und LYST-defizienten Zellen wurden hingegen Inhibitoren eingesetzt, welche spezifisch die Thiolprotease Calpain hemmen, und somit die Proteinkinase C vor Abbau durch Calpain schützen. Hierbei wurde der Einfluss einer in ihrer Aktivität protektierten Proteinkinase C auf die Größe der Lysosomen untersucht. Eine Änderung in der Lysosomengröße in FAN- und LYST-defizienten Zellen bei Inhibition der Protease Calpain konnte nicht beobachtet werden. Somit wird geschlussfolgert, dass die Proteinkinase C nicht in kritischer Weise an der Entstehung von vergrößerten Lysosomen beteiligt ist.

Literaturverzeichnis

- 1) Dacks JB, Doolittle WF (2004).
Molecular and phylogenetic characterization of syntaxin genes from parasitic protozoa.
Mol. Biochem. Parasitol. 136: 123-136.
- 2) Salaün C, Declan JJ, Chamberlain LH (2004).
Lipid rafts and the Regulation of Exocytosis.
Traffic 5: 255-264.
- 3) Holstein SHE (2002).
Clathrin and Plant Endocytosis.
Traffic 3: 614-620.
- 4) Piper RC, Luzio JP (2001).
Late Endosomes: Sorting and Partitioning in Multivesicular Bodies.
Traffic 2: 612-621.
- 5) Jeftinija S (2006).
The story of cell secretion: events leading to the discovery of the 'porosome' – the
universal secretory machinery in cells.
J. Cell. Mol. Med. 10 (2): 273-279.
- 6) Pickett JA, Edwardson JM (2006).
Compound Exocytosis: Mechanisms and Functional Significance.
Traffic 7: 109-116.
- 7) Leabu M (2006).
Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms.
J. Cell. Mol. Med. 10 (2): 423-427.
- 8) Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM (2004).
Linking Albinism and Immunity: The Secrets of Secretory Lysosomes.
Science 305: 55-59.
- 9) Clark R, Griffiths GM (2003).
Lytic granules, secretory lysosomes and disease.
Curr. Opin. Immunol. 15: 516-521.
- 10) Taner SB, Önfelt B, Pirinen NJ, McCann FE, Magee AI, Davis DM (2004).
Control of Immune Responses by Trafficking Cell Surface Proteins, Vesicles and
Lipid Rafts to and from the Immunological Synapse.
Traffic 5: 651-661.
- 11) Tchernev VT, Mansfield TA, Giot L, Kumar AM, Nandabalan K, Li Y, Mishra VS,
Detter JC, Rothberg JM, Wallace MR, Southwick FS, Kingsmore SF (2002).
The Chediak-Higashi Protein Interacts with SNARE Complex and Signal
Transduction Proteins.
Mol. Med. 8 (1): 56-64

- 12) Wolf J, Jacobi C, Breer H, Grau A (2006).
Das Chediak-Higashi-Syndrom.
Der Nervenarzt 77: 148-157.
- 13) Kanjanapongkul S (2006).
Chediak-Higashi Syndrome: Report of a case with Uncommon Presentation and
Review Literature.
J. Med. Assoc. Thai 89 (4): 541-544.
- 14) Kaplan J, De Domenico I, McVey Ward D (2008).
Chediak-Higashi syndrome.
Curr. Opin. Hematol. 15: 22-29.
- 15) Ward DM, Griffiths GM, Stinchcombe J, Kaplan J (2000).
Analysis of the Lysosomal Storage Disease Chediak-Higashi Syndrome.
Traffic 1: 816-822.
- 16) Perou CM, Leslie JD, Green W, Li L, Ward DM, Kaplan J (1997).
The Beige/Chediak-Higashi syndrome gene encodes a widely expressed cytosolic
protein.
J. Biol. Chem. 272: 29790-29794.
- 17) Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, Holmgren L, Bork P, Misumi DJ, McGrail SH,
Dussault BJ, Perou CM, Boissy RE, Duyk GM, Spritz RA, Moore KJ (1996).
Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi
syndrome.
Nat. Genet. 14: 307-311.
- 18) Barbosa MD, Barrat FJ, Tchernev VT, Nguyen QA, Mishra VS, Colman SD, Pastural
E, Dufourq-Lagelouse R, Fischer A, Holcombe RF, Wallace MR, Brandt SJ, de Saint
Basile G, Kingsmore SF (1997).
Identification of mutations in two major mRNA isoforms of the Chediak-Higashi
syndrome gene in human and mouse.
Hum. Mol. Genet. 6: 1091-1098.
- 19) Stinchcombe JC, Page LJ, Griffiths GM (2000).
Secretory Lysosome Biogenesis in Cytotoxic T Lymphocytes from Normal and
Chediak Higashi Syndrome Patients.
Traffic 1: 435-444.
- 20) Barbosa MD, Nguyen QA, Tchernev VT, Ashley JA, Detter JC, Blaydes SM, Brandt
SJ, Chotai D, Hodgman C, Solari RC, Lovett M, Kingsmore SF (1996).
Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes.
Nature 382: 262-265.
- 21) Chennagiri P, Lakshmi D, Davanam SM, Lingappa A (2006).
Chediak-Higashi Syndrome Masquerading As Acute Leukemia: The Significance of
Lymphocyte Inclusions.
J. Clinic. Oncolog. 06: 3505- 3507.

Literatur

- 22) Ivanovich J, Mallory S, Storer T, Ciske D, Hing A (2001).
12-Year-Old Male With Elejalde Syndrome (Neuroectodermal Melanolyosomal Disease).
Americ. J. Med. Genet. 98: 313-316.
- 23) Pastural E, Barrat F, Dufourcq-Lagelouse R, Certain S, Sanal O, Jabado N, Seger R, Griscelli C, Fischer A, De Saint Basile G (1997).
Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in myosin-Va gene.
Nat. Genet. 16: 289-292.
- 24) Pfeifer M, Berg S, Reynolds AB (1994).
A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles.
Cell 76: 789-791.
- 25) Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR (1999).
Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells.
Semin. Cell. Dev. Biol. 10: 51-58.
- 26) Jogl G, Shen Y, Gebauer D, Li J, Wiegmann K, Kashkar H, Kronke M, Tong L (2002).
Crystal structure of the BEACH domain reveals an unusual fold and extensive association with a novel PH domain.
EMBO J. 21: 4785-4795.
- 27) Tcherkasowa AE, Adam-Klages S, Kruse ML, Wiegmann K, Mathieu S, Kolanus W, Krönke M, Adam D (2002).
Interaction with Factor Associated with Neutral Sphingomyelinase Activation, a WD Motif-Containing Protein, Identifies Receptor for Activated C-Kinase1 as a Novel Component of the Signaling Pathways of the p55 TNF Receptor.
J. Immunol. 169: 5161-5170.
- 28) Harris E, Wang N, Wu W, Weatherford A, DeLozanne A, Cardelli J (2002).
Dictyostelium LvsB Mutants Model the Lysosomal Defects Associated with Chediak-Higashi Syndrome.
Mol. Biol. Cell 13: 656-669.
- 29) Kwak E, Gerald N, Larochelle DA, Vithalani KK, Niswonger ML, Maready M, DeLozanne A (1999).
LvsA, a Protein Related to the Mouse Beige Protein, Is Required for Cytokinesis in Dictyostelium.
Mol. Biol. Cell 10: 4429-4439.
- 30) Kreder D, Krut O, Adam-Klages S, Wiegmann K, Scherer G, Plitz T, Jensen JM, Proksch E, Steinmann J, Pfeffer K, Krönke M (1999).
Impaired neutral sphingomyelinase activation and cutaneous barrier repair in FAN-deficient mice.
EMBO J. 18 (9): 2472-2479.

Literatur

- 31) Li D, Roberts R (2001).
WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases.
Cell. Mol. Life Sci. 58: 2085-2097.
- 32) O'Brien NW, Gellings NM, Guo M, Barlow SB, Glembotski CC, Sabbadini RA (2003).
Factor Associated with Neutral Sphingomyelinase Activation and Its Role in Cardiac Cell Death.
Circ. Res. 92: 589-591.
- 33) Adam-Klages S, Adam D, Wiegmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J, Krönke M (1996).
FAN, a Novel WD-repeat Protein, Couples the p55 TNF-Receptor to Neutral Sphingomyelinase.
Cell 86: 937-947.
- 34) Clarke CJ, Hannun YA (2006).
Neutral sphingomyelinases and nSMase2: Bridging the gaps.
Biochim. Biophys. Acta 1758: 1893-1901.
- 35) Clarke CJ, Snook CF, Tani M, Matmati N, Marchesini N, Hannun YA (2006).
The Extended Family of Neutral Sphingomyelinases.
Biochemistry 45(38): 11247-11256.
- 36) Alvi F, Idkowiak-Baldys J, Baldys A, Raymond JR, Hannun YA (2007).
Regulation of membrane trafficking and endocytosis by protein kinase C: emerging role of the pericentron, a novel protein kinase C-dependent subset of recycling endosomes.
Cell. Mol. Life Sci. 64: 263-270.
- 37) Teicher BA (2006).
Protein Kinase C as a Therapeutic Target.
Clin. Cancer Res. 12 (18): 5336-5345.
- 38) Schechtman D, Mochly-Rosen D (2001).
Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction.
Oncogene 20: 6339-6347.
- 39) Tanabe F, Cui SH, Ito M (1999).
Abnormal down-regulation of PKC is responsible for giant granule formation in fibroblasts from CHS (beige) mice – a thiol proteinase inhibitor, E-64-d, prevents giant granule formation in beige fibroblasts.
J. Leukocyte Biol. 67: 749-755.
- 40) Kreder D (1998).
Untersuchung der in vivo Funktion des TNF-R55 assoziierten Proteins FAN.
Dissertation. Universität Stuttgart.

Literatur

- 41) Perou CM, Kaplan J (1993).
Complementation analysis of Chediak Higashi syndrome: the same gene may be responsible for the defect in all patients and species.
Somat. Cell. Mol. Genet. 19 : 459-468.
- 42) Fahrmeir L, Hamerle A, Tutz G (1996).
Multivariate statistische Verfahren.
Walter de Gruyter, Berlin, 2. Auflage.
- 43) Hartung J, Elpelt B (2007).
Multivariate Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik.
Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München, 7. Auflage.
- 44) Backhaus K, Erichson B, Plinke W, Weiber R (2006).
Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung.
Springer, Heidelberg, 11. Auflage.
- 45) Möhlig H, Mathieu S, Thon L, Frederiksen MC, Ward DM, Kaplan J, Schütze S, Kabelitz D, Adam D (2007).
The WD repeat protein FAN regulates lysosome size independent from abnormal downregulation/membrane recruitment of protein kinase C.
Exp. Cell Res. 313: 2703-2718.
- 46) Stinchcombe JC, Griffiths GM (2001).
Normal and abnormal secretion by haemopoietic cells.
Immunology 103: 10-16.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit ist bereits publiziert:

Möhlig H, Mathieu S, Thon L, Frederiksen MC, Ward DM, Kaplan J, Schütze S, Kabelitz D, Adam D (2007).

The WD repeat protein FAN regulates lysosome size independent from abnormal downregulation/membrane recruitment of protein kinase C.

Exp. Cell Res. 313: 2703-2718.

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. D. Kabelitz möchte ich danken, dass er mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte. Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Professor Dr. rer. nat. D. Adam aussprechen für seine engagierte Unterstützung und die vielen anregenden Gespräche und Hilfestellungen, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglichten und entscheidend bereicherten. Herrn Dipl.-Biochem. L. Marischen und Herrn Dr. rer. nat. M. Lettau danke ich für die großzügige und unablässige Hilfe und die gute Zusammenarbeit, Frau Dr. rer. nat. H. Möhlig für die umfassende Betreuung und Motivation, Herrn J. A. Heiden für die tatkräftige Unterstützung und Aufheiterung und Frau A. Hecht für zahlreiche Korrekturlesungen.

Lebenslauf

Marie-Catherine Frederiksen
Von-der-Tann Straße 18
24114 Kiel
Tel: 0170-6923314
E-Mail: marys_party@hotmail.com

Geburtsdatum: 02.06.1982
Geburtsort: Braunschweig
Nationalität: Französisch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1988-1992	Grundschule Hondelage, Braunschweig
1992-1994	Orientierungsstufe Volkmarode, Braunschweig
1994-2001	Gymnasium Neue Oberschule Braunschweig
2001	Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Fremdsprachen

1992-2001	Englisch
1994-2001	Französisch
1998-2001	Schwedisch

Hochschulstudium

10/2001 – 11/2008	Studium der Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
April 2004	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juni 2005	Beginn der Promotion „Untersuchungen zur Lysosomengröße in CHS- und FAN-defizienten Zellen“

Praktisches Jahr

08/2007 – 12/2007	Allgemein- und Unfallchirurgie, Kreiskrankenhaus Rendsburg
12/2007 – 04/2008	Innere Medizin, Universitätsklinikum Kiel
04/2008 – 07/2008	Allgemeinmedizin, Gemeinschaftspraxis Dres. Leisner, Klinker, Groke

Sonstiges

01/1999 bis 06/1999	Besuch der 11. Klasse am Ullvigymnasiet in Köping, Schweden
03/2005	Famulatur Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Braunschweig
08/2005	Famulatur in der Traumatologie, Orthopädie und plastischen Chirurgie am Universitätsklinikum Charles Nicolle in Rouen, Frankreich
03/2006	Famulatur Praxis Ortwin Meinicke, Facharzt für Innere Medizin, Kiel
08/2006	Famulatur Praxis Dres. Rötterink, Fachärzte für Allgemeine Medizin, Hannover

Anhang I

Anhang I: Durchschnittliche Lysosomengröße pro Zelle in pixel², normiert auf eine Stacksize von 100µm x 100µm

Zelllinien	FAN ko synchronisiert	wt synchronisiert	FAN ko unsynchronisiert	wt unsynchronisiert	FAN ko gesamt	wt gesamt
Zelle 1	46,5319565	17,172639	79,0984733	16,8409768	46,5319565	17,172639
Zelle 2	58,9527495	17,2472843	68,4564417	14,2436629	58,9527495	17,2472843
Zelle 3	51,9691813	15,1555219	76,5045523	19,9760756	51,9691813	15,1555219
Zelle 4	65,3281289	16,7765105	54,7429294	20,6156493	65,3281289	16,7765105
Zelle 5	48,1308908	18,3508458	66,1068141	16,2226091	48,1308908	18,3508458
Zelle 6					79,0984733	16,8409768
Zelle 7					68,4564417	14,2436629
Zelle 8					76,5045523	19,9760756
Zelle 9					54,7429294	20,6156493
Zelle 10					66,1068141	16,2226091
Mittelwert	54,1825814	16,9405603	68,9818422	17,5797947	61,5822118	17,2601775

Tab. 3.1

Zelllinien	FAN ko synchronisiert	wt synchronisiert	FAN ko unsynchronisiert	wt unsynchronisiert	FAN ko gesamt	wt gesamt
Zelle 1	61,9572191	30,8250779	73,9666152	14,0833453	61,9572191	30,8250779
Zelle 2	59,1317284	25,0901205	69,8238062	15,7603178	59,1317284	25,0901205
Zelle 3	53,3764132	22,3070418	63,1752932	16,4915015	53,3764132	22,3070418
Zelle 4	40,1760867	19,509543	65,3730856	16,9054431	40,1760867	19,509543
Zelle 5	59,4616941	24,2376383	56,0322557	15,3955742	59,4616941	24,2376383
Zelle 6					73,9666152	14,0833453
Zelle 7					69,8238062	15,7603178
Zelle 8					63,1752932	16,4915015
Zelle 9					65,3730856	16,9054431
Zelle 10					56,0322557	15,3955742
Mittelwert	54,8206283	24,3938843	65,6742112	15,7272364	60,2474197	20,0605603

Tab. 3.2

Zelllinie MCHSF2	Zellen unbehandelt	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt
Zelle 1	189,576151	404,769689	140,794139	245,991648
Zelle 2	136,190665	226,934784	225,522863	179,808433
Zelle 3	479,27432	303,032268	223,048582	464,223276
Zelle 4	148,623751	827,115	162,04419	721,50342
Zelle 5	107,439261			59,842776
Mittelwert	212,22083	440,462935	187,852444	334,273911

Tab. 3.3

Anhang I

Zelllinie C57-CF2	Zellen unbehandelt	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt	Zellen über Nacht mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt
Zelle 1	36,706	36,31	24,826	57,18	25,444
Zelle 2	37,374	34,006	22,31	28,006	31,82
Zelle 3	39,461	64,173	37,673	39,832	29,006
Zelle 4	45,006	26,256	24,852	38,653	32,206
Zelle 5	65,136	35,888	39,958	40,45	31,006
Zelle 6	19,544	40,225	37,577	32,477	34,08
Zelle 7	68,406				
Zelle 8	47,256				
Mittelwert	44,8611	39,4763	31,1993	39,433	30,5937

Tab. 3.4

Zelllinie FAN ko	Zellen unbehandelt	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt	Zellen über Nacht mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt
Zelle 1	47,749608	27,5131781	26,07605	32,7201193	36,0108033
Zelle 2	51,3545901	26,3718884	24,9787962	29,8592039	21,3667999
Zelle 3	44,6559345	23,0408644	32,5505977	23,2022385	26,843436
Zelle 4	22,1406722	24,6768179	25,9810382	26,0234249	32,4925
Zelle 5	17,5883119	25,8643365	32,7187789		
Zelle 6	38,305458				
Mittelwert	36,9657625	25,4934171	28,4610522	27,9512467	29,1783848

Tab. 3.5

Zelllinie wt	Zellen unbehandelt	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt
Zelle 1	20,5131956	34,6865172	29,3075748	22,4400015
Zelle 2	24,4055416	35,0076764	20,8981038	47,3537249
Zelle 3	23,3340912	30,7755418	24,3582221	35,2757514
Zelle 4	38,1212996	29,9309437	26,4188424	28,1346048
Zelle 5	44,2955786		15,1952896	33,871607
Zelle 6	34,2531559			
Zelle 7	26,1138814			
Zelle 8	29,8618322			
Mittelwert	30,112322	32,6001698	23,2356065	33,4151379

Tab. 3.6

Anhang I

Zelllinien	FAN ko unbehandelt	wt unbehandelt
Zelle 1	122,042	66,8590806
Zelle 2	385,4791	100,137401
Zelle 3	90,990607	76,818792
Zelle 4	82,134	65,2033353
Zelle 5	81,5067185	57,5400672
Zelle 6	91,2261488	33,5697744
Zelle 7	146,982165	104,842211
Zelle 8	114,81695	158,156842
Zelle 9	81,142273	73,371697
Zelle 10	88,156755	45,6155712
Zelle 11	143,267512	75,2608079
Zelle 12	230,572376	71,5172091
Zelle 13	128,438419	
Zelle 14	80,8990526	
Zelle 15	126,275346	
Zelle 16	82,0664256	
Zelle 17	81,981072	
Zelle 18	63,3122195	
Zelle 19	111,756641	
Zelle 20	111,669204	
Zelle 21	170,50026	
Zelle 22	122,735322	
Mittelwert	124,567075	77,4077324

Tab. 3.7

Zelllinien	FAN ko unbehandelt	wt unbehandelt
Zelle 1	177,484329	64,1593872
Zelle 2	193,558581	41,7041466
Zelle 3	139,944994	73,3247446
Zelle 4	201,393268	71,4542089
Zelle 5	66,0419782	76,9953936
Zelle 6	149,055493	85,5294394
Zelle 7	208,753977	40,6717563
Zelle 8	115,267333	54,7358095
Zelle 9	230,819613	67,7053386
Mittelwert	164,702174	64,0311361

Tab. 3.8

Anhang I

Zelllinien	MCHSF2 gesamt	C57-CF2 gesamt
Zelle 1	95,442624	47,9758992
Zelle 2	165,982568	37,6942542
Zelle 3	205,081114	46,5680766
Zelle 4	129,184617	41,3965025
Zelle 5	103,68	63,2292969
Zelle 6	97,8880847	34,6922352
Zelle 7	177,879128	34,973799
Zelle 8	101,688977	36,3047288
Zelle 9	86,468134	30,0018391
Zelle 10	419,093472	96,6940001
Zelle 11	168,958431	65,4249536
Zelle 12	47,9766748	55,9414691
Mittelwert	149,943652	49,2414212

Tab. 3.9

Zelllinie	MCHSF2 gesamt	C57-CF2 gesamt
Zelle 1	166,106794	18,9157743
Zelle 2	176,603776	18,0811052
Zelle 3	140,050527	21,8931002
Zelle 4	256,357092	27,6687732
Zelle 5	425,045931	17,362645
Zelle 6	187,244111	36,8179006
Zelle 7	149,200502	26,3650268
Zelle 8	99,6445668	28,2599972
Zelle 9	226,873931	22,9406778
Zelle 10	111,504672	26,9774568
Zelle 11	137,023155	
Zelle 12	189,72352	
Zelle 13	122,592031	
Zelle 14	106,275267	
Zelle 15	77,6454364	
Zelle 16	271,655966	
Zelle 17	164,658846	
Zelle 18	122,882129	
Zelle 19	145,139973	
Zelle 20	114,594814	
Mittelwert	169,54	24,53

Tab. 3.10

Anhang I

Zelllinie C57-CF2	Zellen unbehandelt	Zellen in Calpeptin [1 μM]	Zellen in Calpeptin [10 μM]
Zelle 1	47,9758992	63,2292969	30,0018391
Zelle 2	37,6942542	34,6922352	96,6940001
Zelle 3	46,5680766	34,973799	65,4249536
Zelle 4	41,3965025	36,3047288	55,9414691
Mittelwert	43,4086831	42,300015	62,0155655

Tab. 3.11

Zelllinie MCHSF2	Zellen unbehandelt	Zellen in Calpeptin [1 μM]	Zellen in Calpeptin [10 μM]
Zelle 1	95,442624	103,68	86,468134
Zelle 2	165,982568	97,8880847	419,093472
Zelle 3	205,081114	177,879128	168,958431
Zelle 4	129,184617	101,688977	47,9766748
Mittelwert	148,922731	120,284047	180,624178

Tab. 3.12

Zelllinie C57-CF2	Zellen unbehandelt	Zellen über Nacht in GÖ 6976 [2,5 μM]
Zelle 1	18,9157743	36,8179006
Zelle 2	18,0811052	26,3650268
Zelle 3	21,8931002	28,2599972
Zelle 4	27,6687732	22,9406778
Zelle 5	17,362645	26,9774568
Mittelwert	20,7842796	28,2722118

Tab. 3.13

Zelllinie MCHSF2	Zellen unbehandelt	Zellen über Nacht in Calpastatin [10 μM]	Zellen über Nacht in Calpeptin [1 μM]	Zellen über Nacht in E 64 d [1 μM]
Zelle 1	166,106794	187,244111	137,023155	271,655966
Zelle 2	176,603776	149,200502	189,72352	164,658846
Zelle 3	140,050527	99,6445668	122,592031	122,882129
Zelle 4	256,357092	226,873931	106,275267	145,139973
Zelle 5	425,045931	111,504672	77,6454364	114,594814
Mittelwert	232,832824	154,893557	126,651882	163,786346

Tab. 3.14

Anhang I

	V1		V2		V3	
	MCHSF2	C57-CF2	MCHSF2	C57-CF2	MCHSF2	C57-CF2
Anzahl der Lysosomen im Durchschnitt pro Zelle	13,67	25,97	11,53	18,47	38,3	56,7
P-Wert der ANOVA	0,0001		0,0064		0,1084	

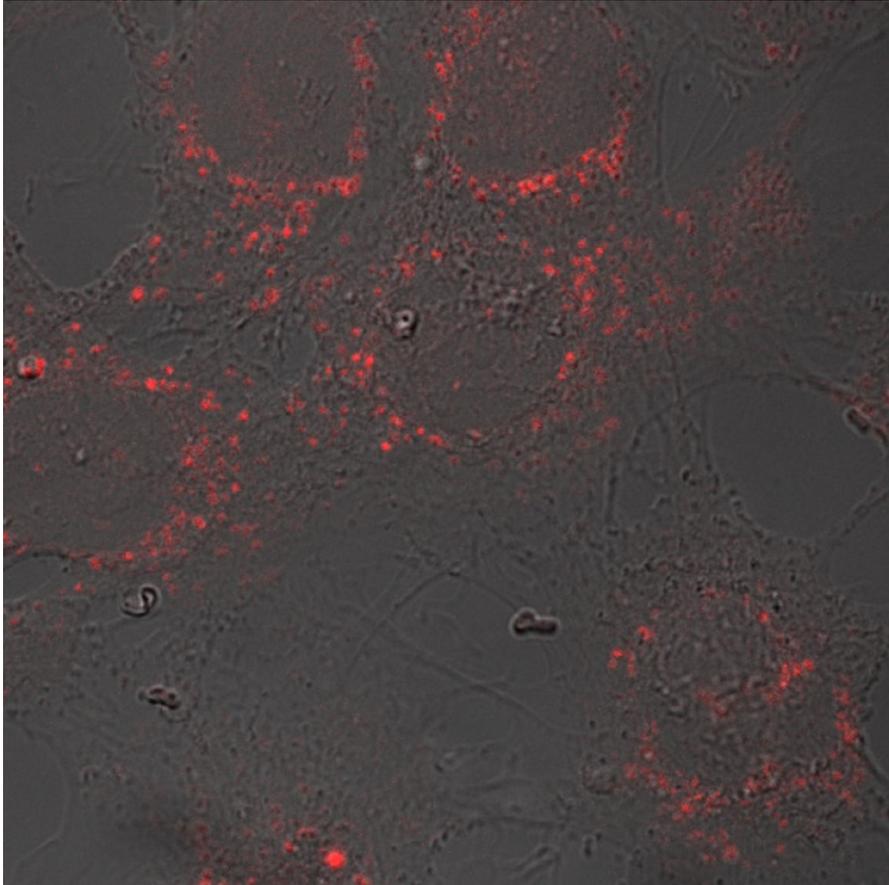
Tab. 3.15

	V1		V2		V3		V4		V5	
	FAN ko	wt	FAN ko	wt	FAN ko	wt	FAN ko	wt	FAN ko	wt
Anzahl der Lysosomen im Durchschnitt pro Zelle	46	50,7	31,8	49,6	43,89	67,15	39,86	31,09	69,15	80,23
P-Wert der ANOVA	0,5733		0,0119		5,9074 x 10 ⁻⁵		0,1647		0,3866	

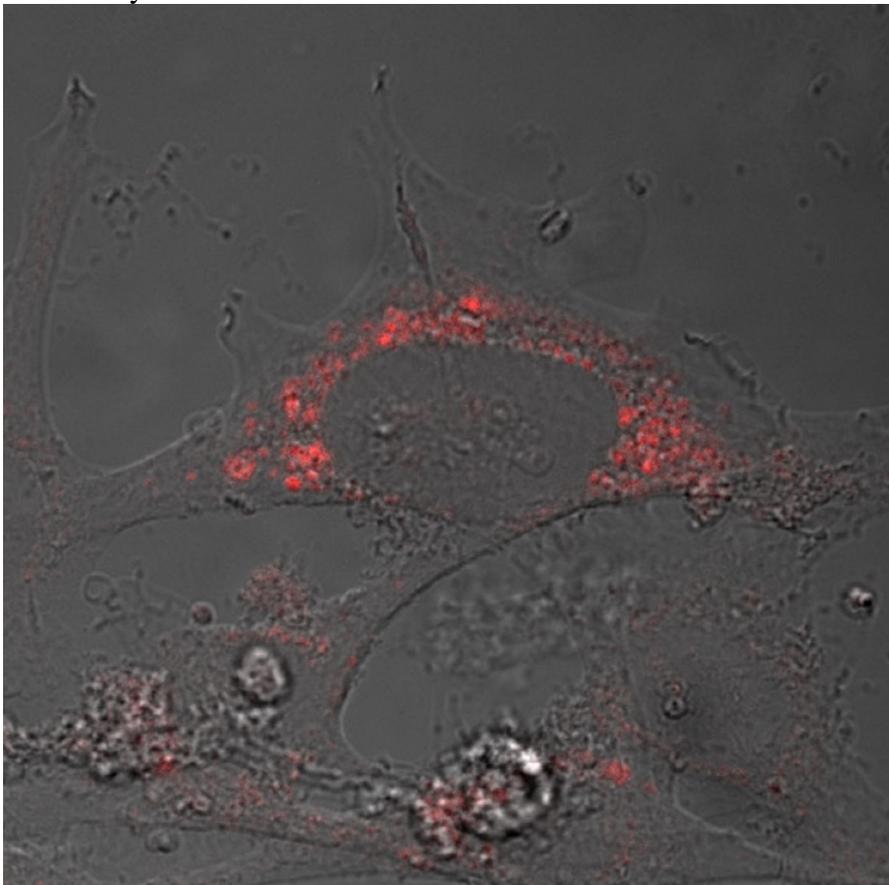
Tab. 3.16

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.1 Zelllinien FAN ko und wt



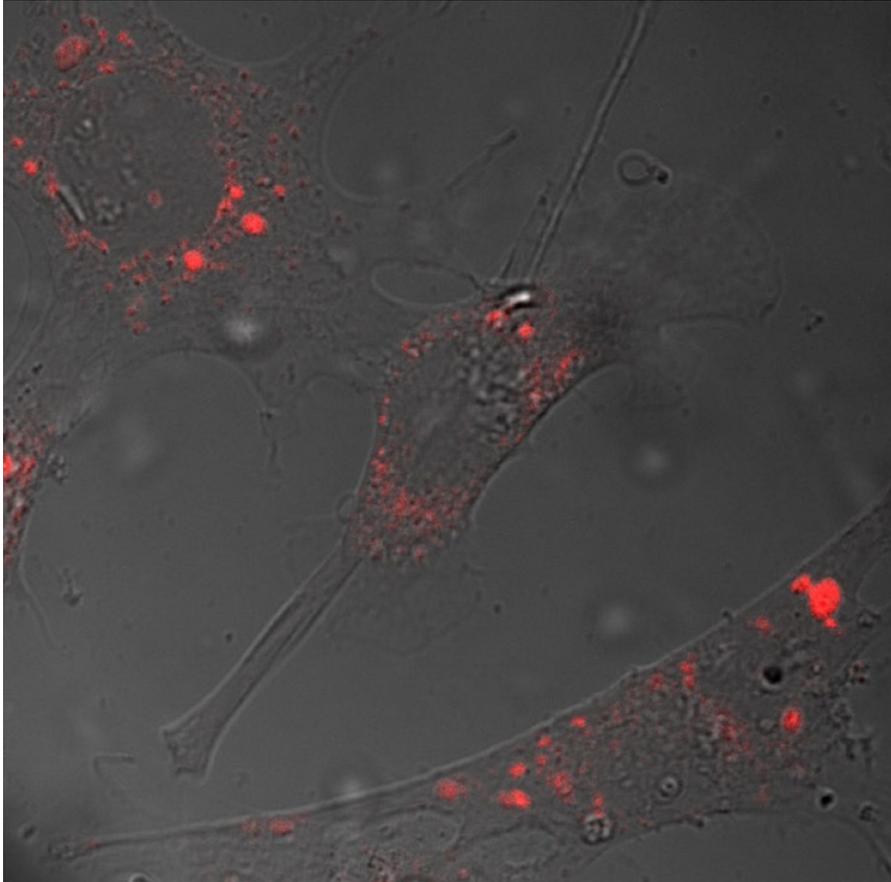
FAN ko synchronisiert



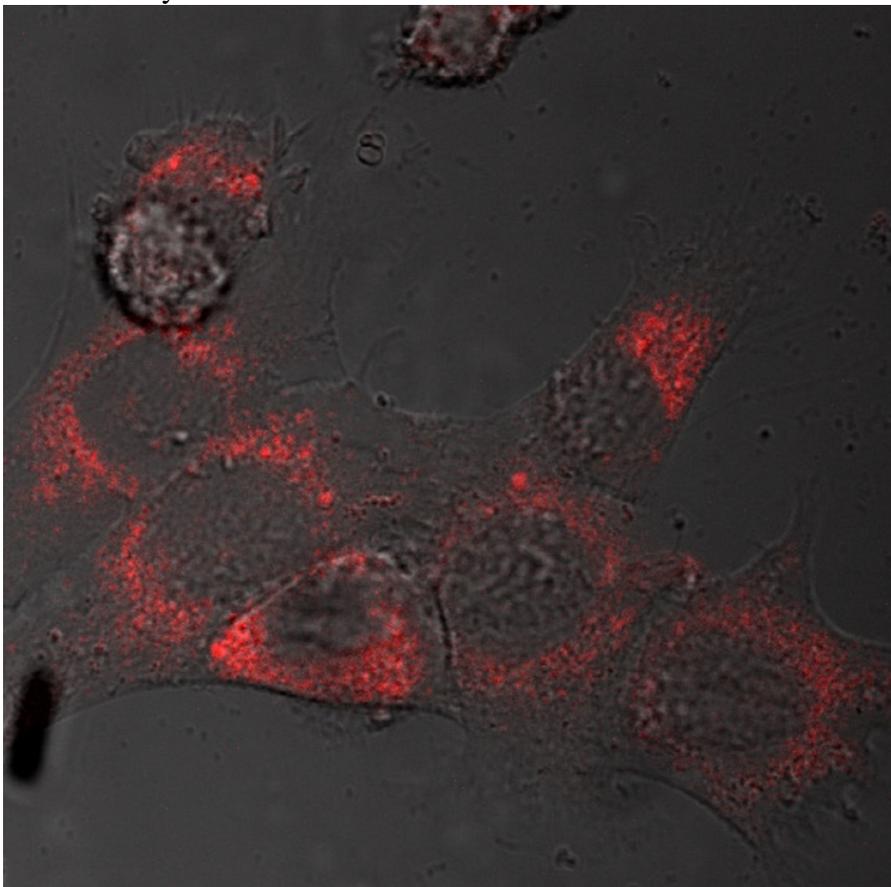
wt synchronisiert

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.1 Zelllinien FAN ko und wt



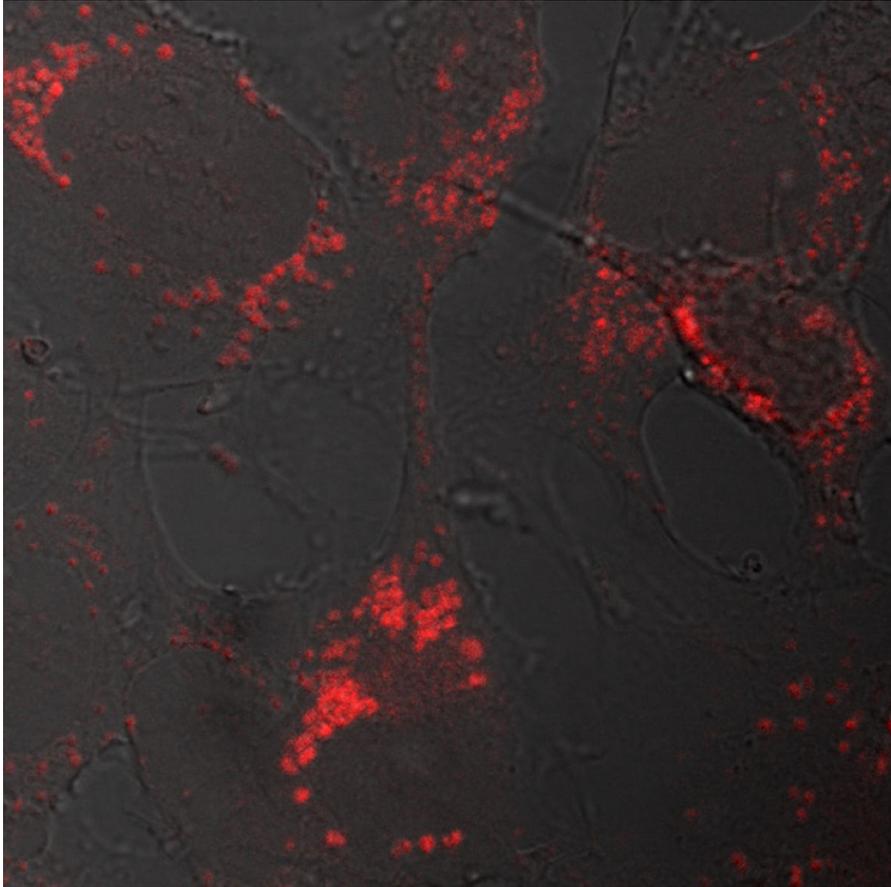
FAN ko unsynchronisiert



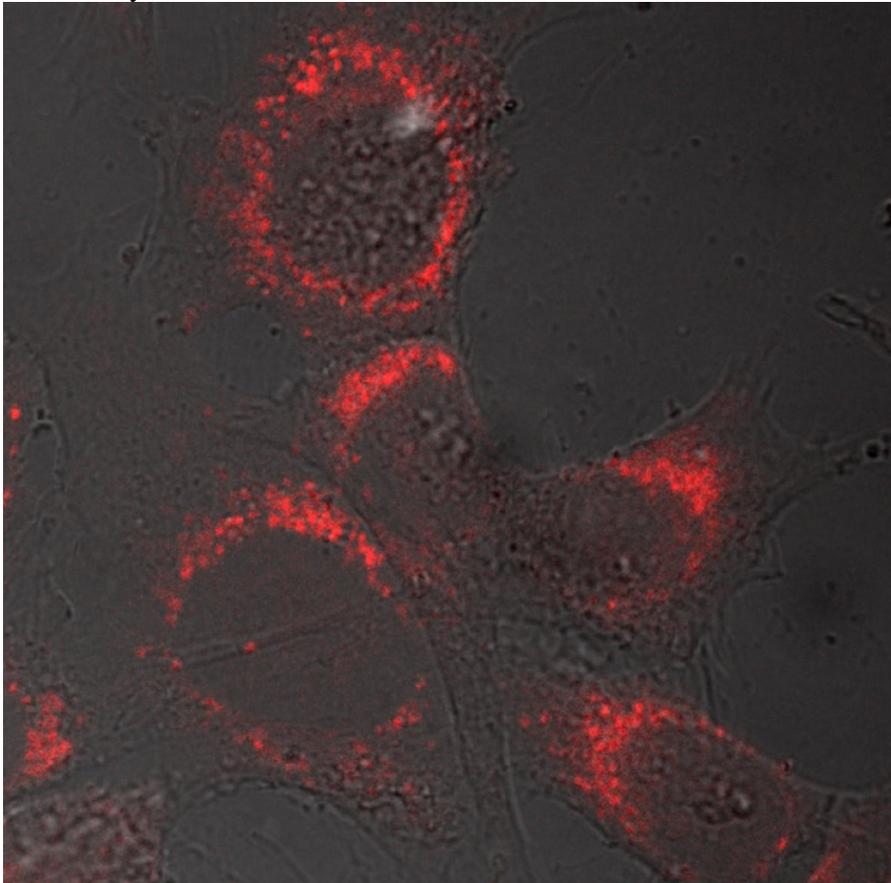
wt unsynchronisiert

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.2 Zelllinien FAN ko und wt



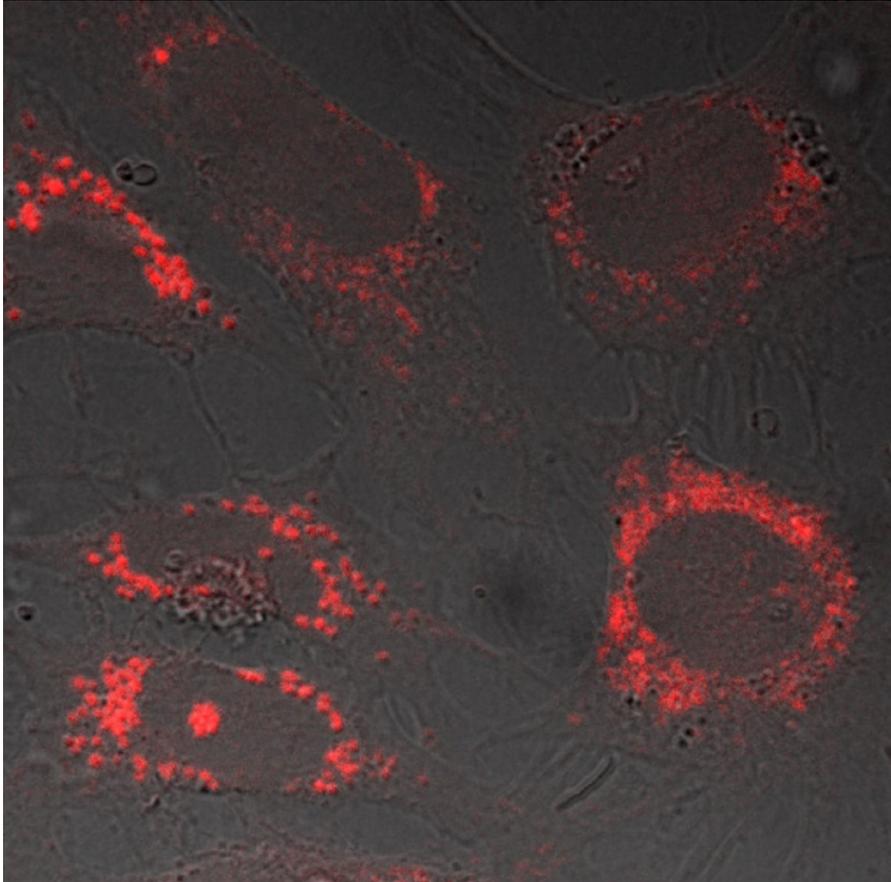
FAN ko synchronisiert



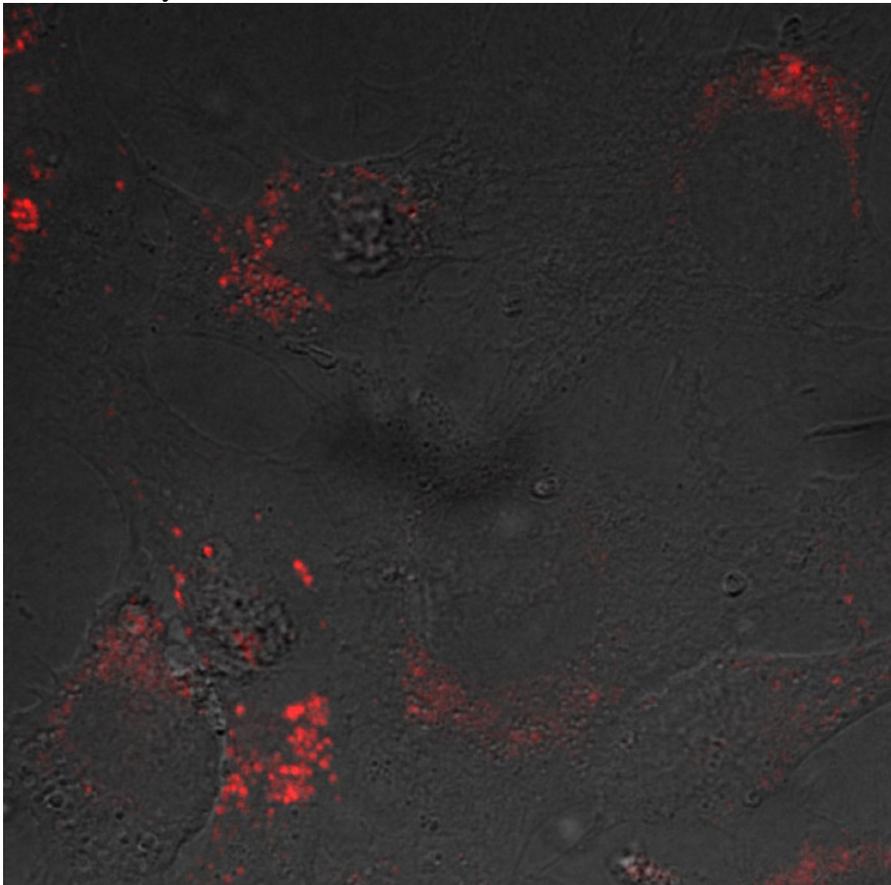
wt synchronisiert

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.2 Zelllinien FAN ko und wt



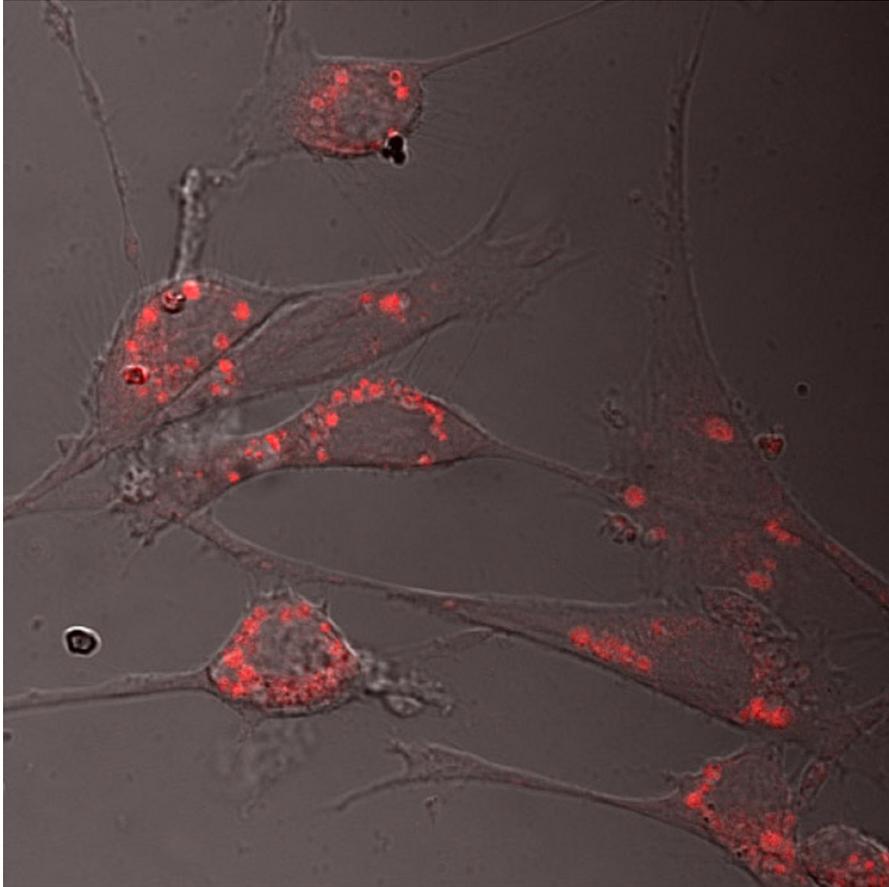
FAN ko unsynchronisiert



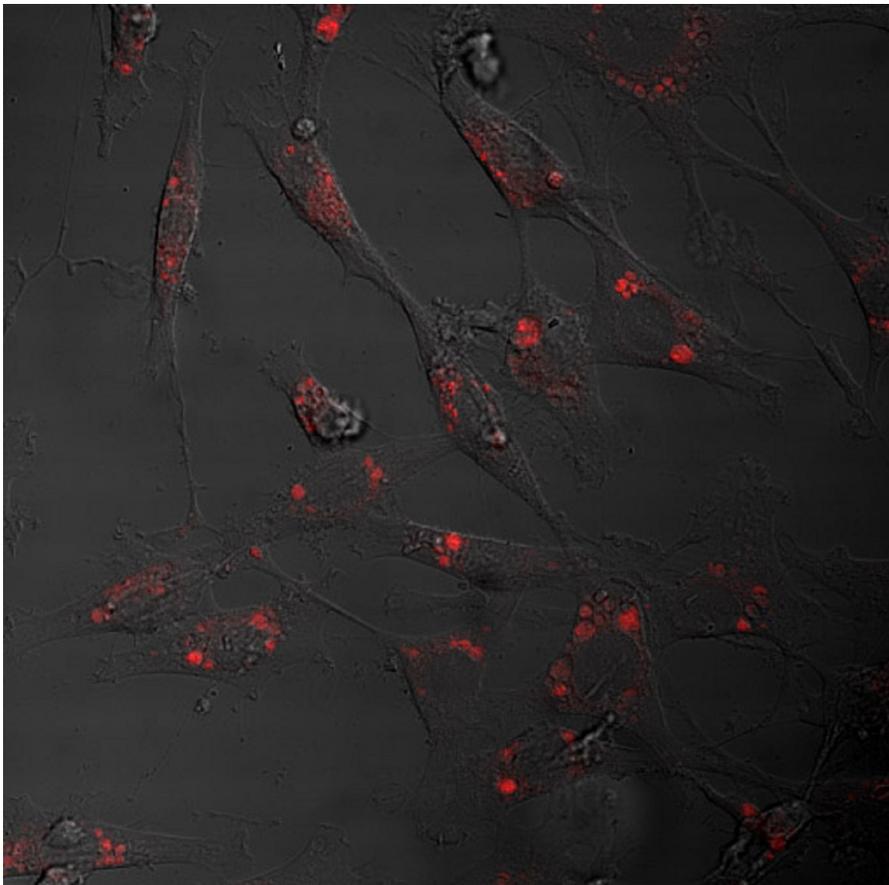
wt unsynchronisiert

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.3 Zelllinie MCHSF2



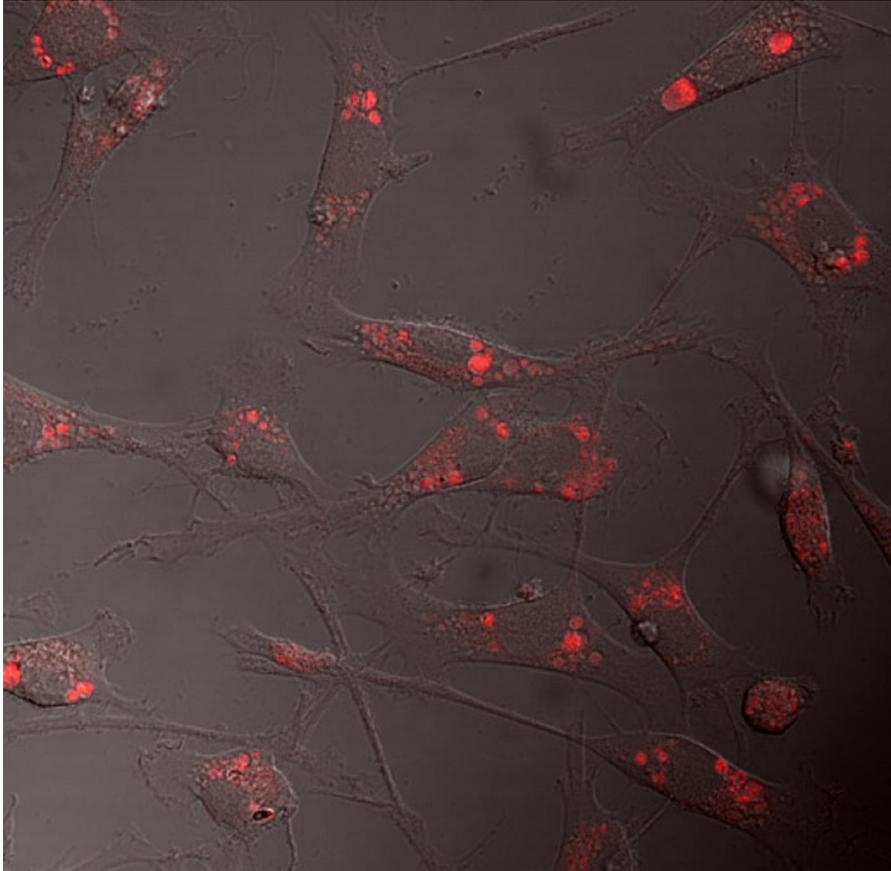
MCHSF2 unbehandelt



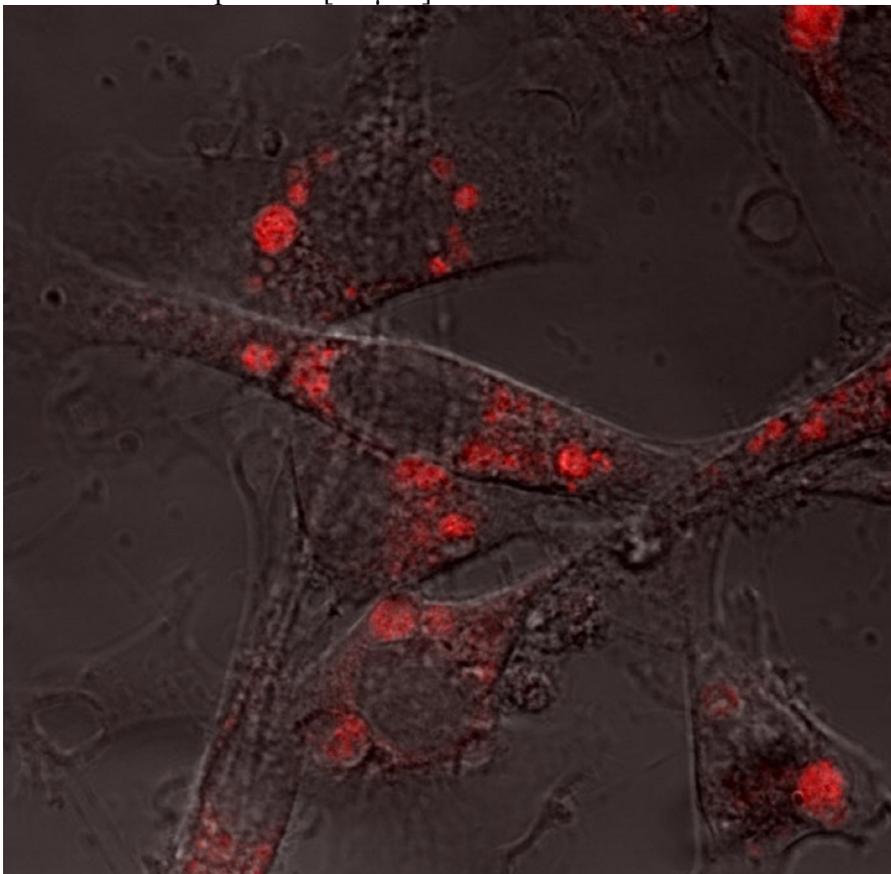
MCHSF2 in GÖ 6976 [2,5 μ M] 2 h

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.3



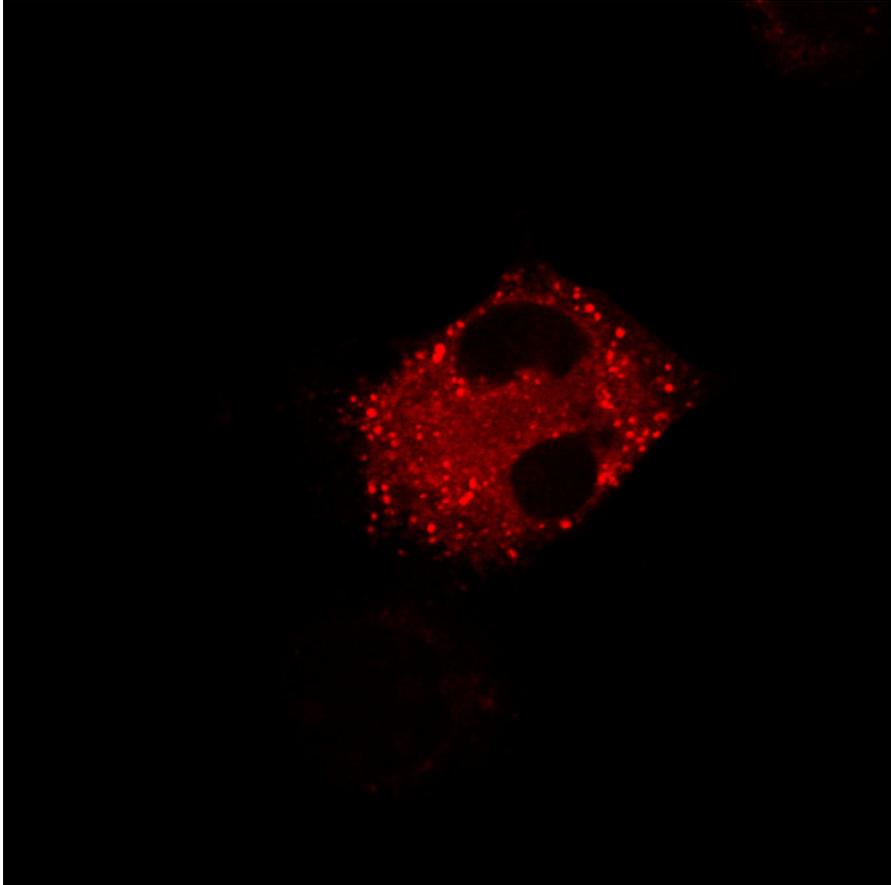
MCHSF2 in Calpastatin [10 μ M] 2 h



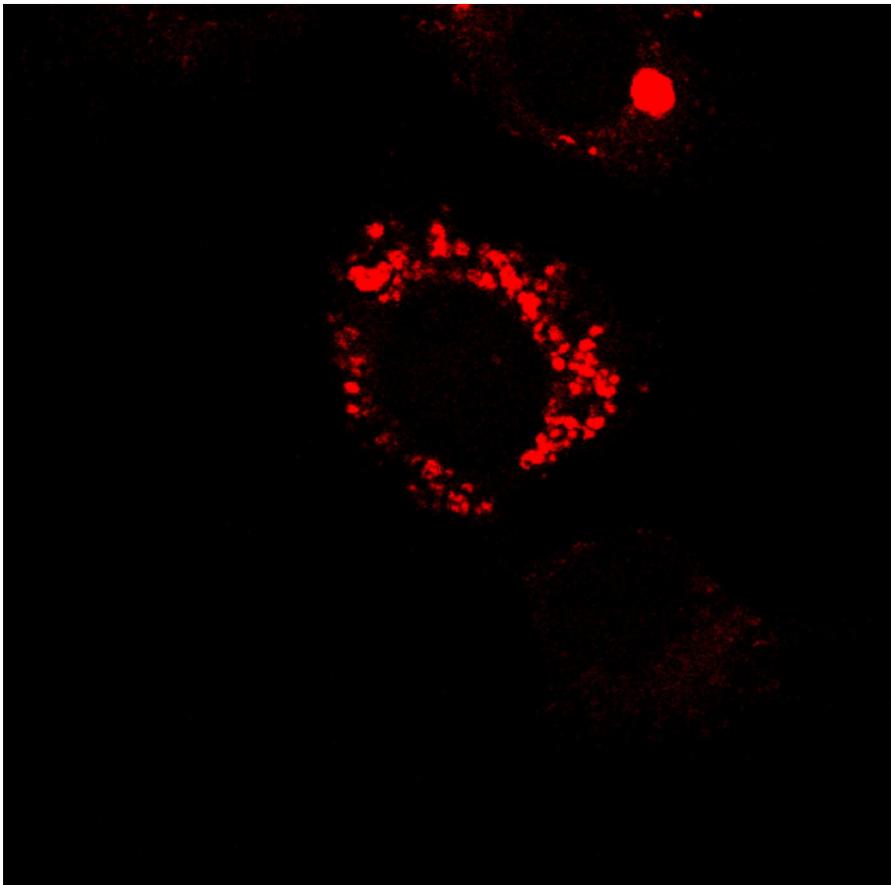
MCHSF2 in Calpastatin [10 μ M] über Nacht

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.4 Zelllinie C57-CF2



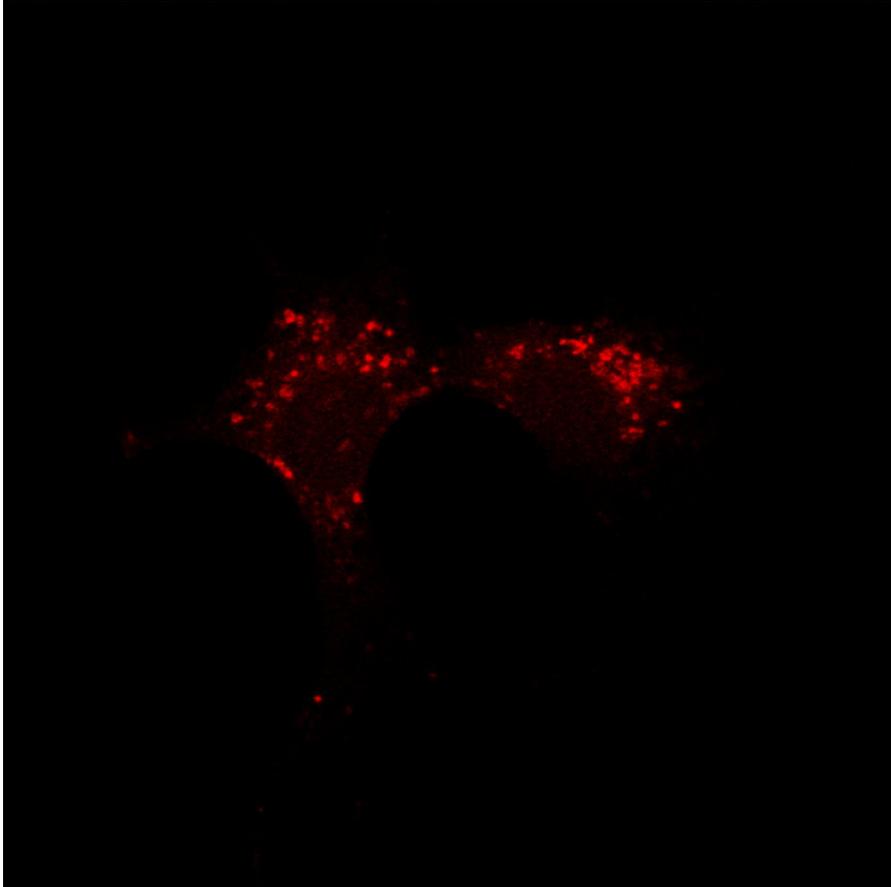
C57-CF2 unbehandelt



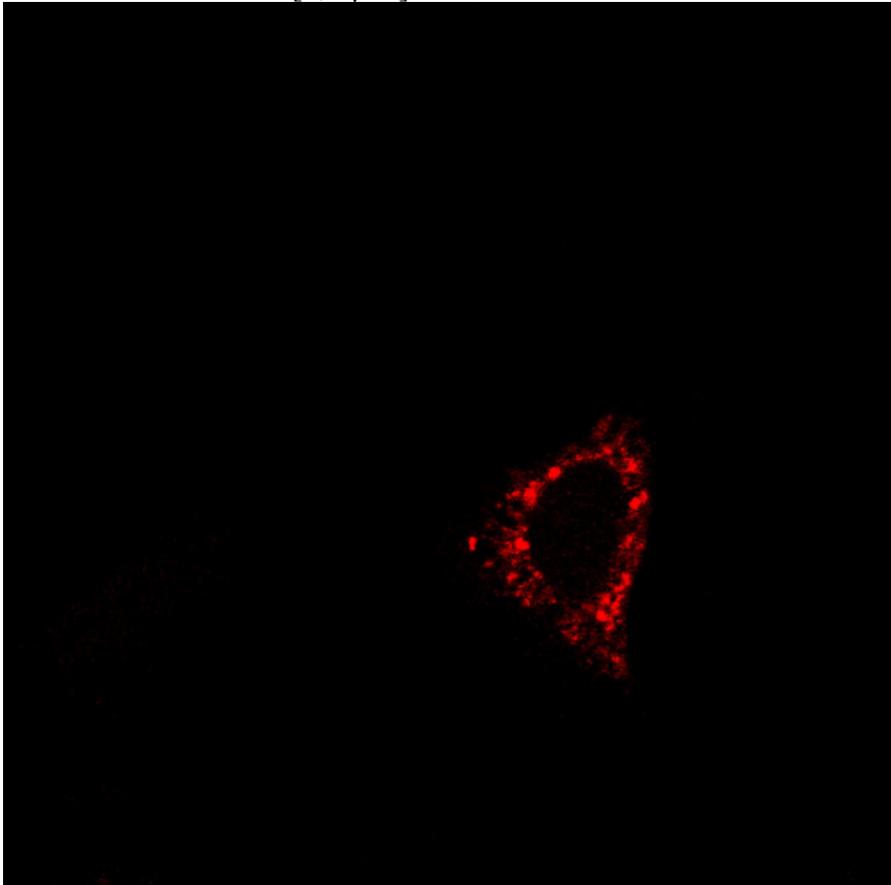
C57-CF2 in GÖ 6976 [2,5μM] 2 h

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.4 Zelllinie C57-CF2



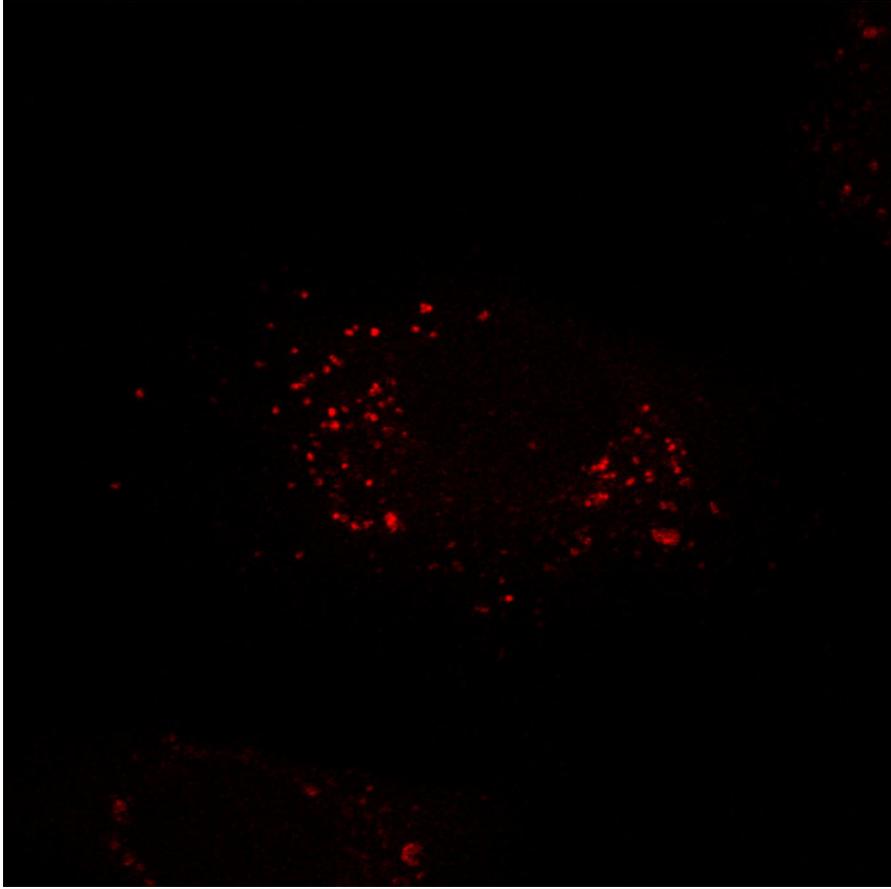
C57-CF2 in GÖ 6976 [2,5 μ M] über Nacht



C57-CF2 in Calpastatin [10 μ M] 2 h

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

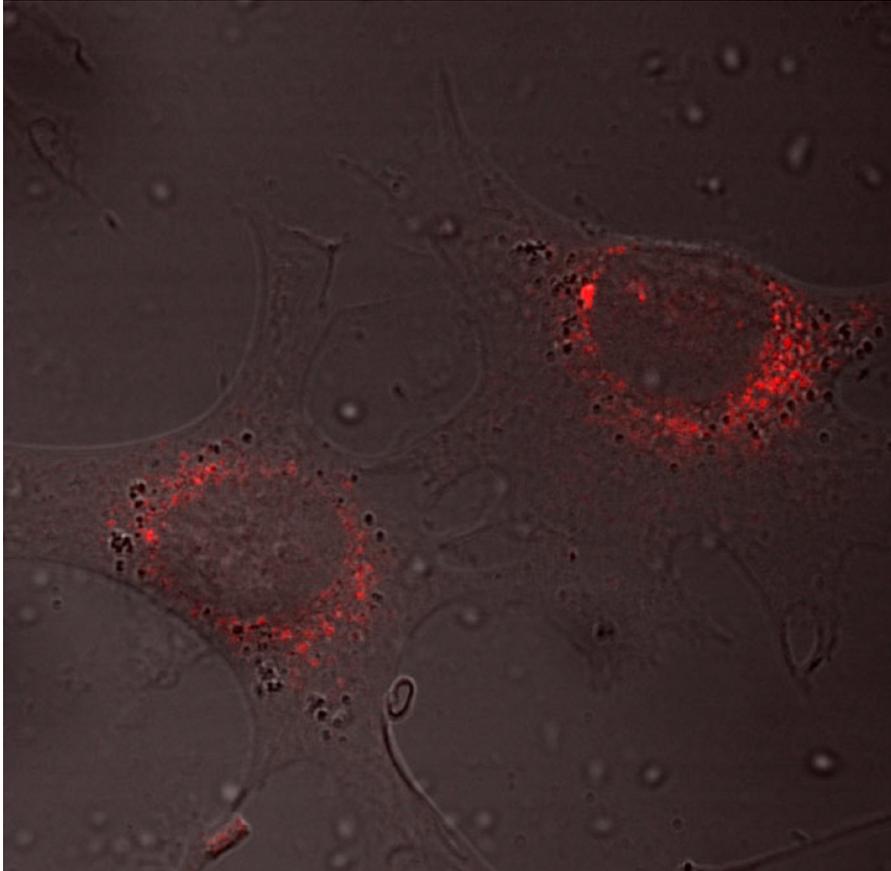
zu Abb. 3.4 Zelllinie wt



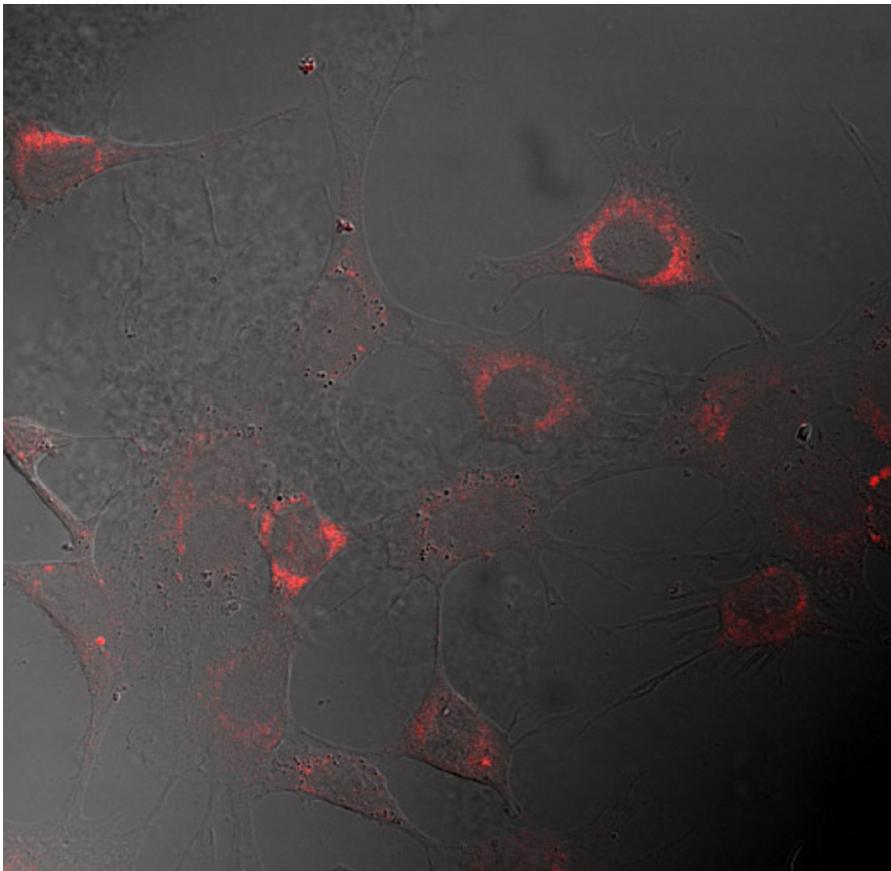
C57-CF2 in Calpastatin [10 μ M] über Nacht

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.5 Zelllinie FAN ko



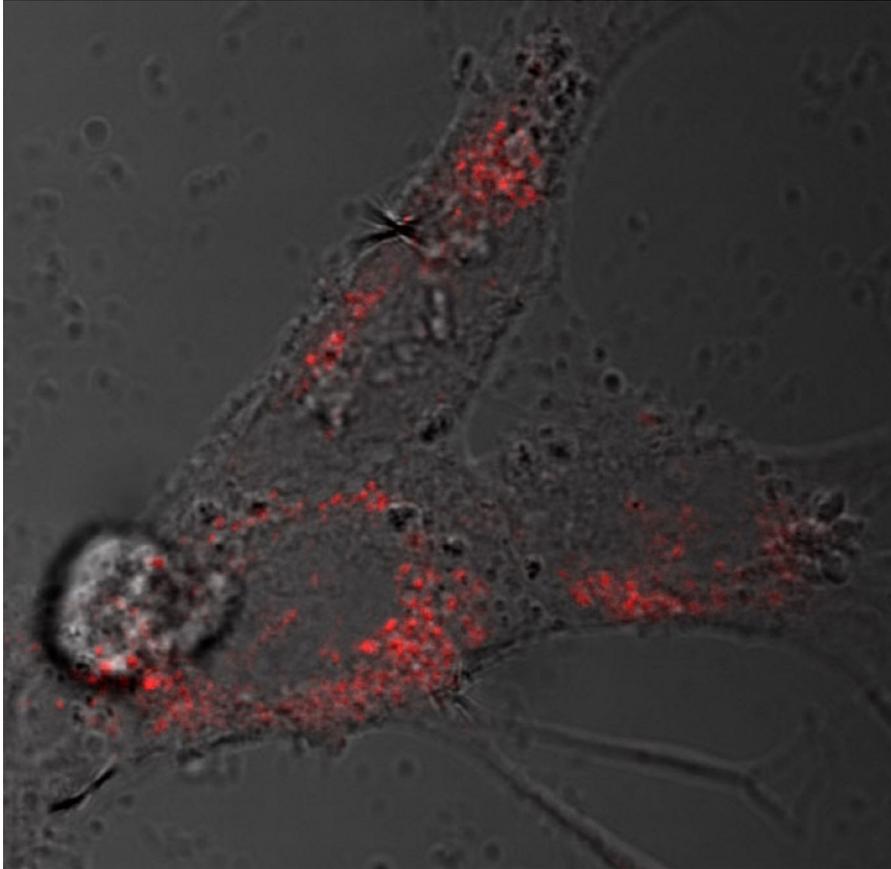
FAN ko unbehandelt



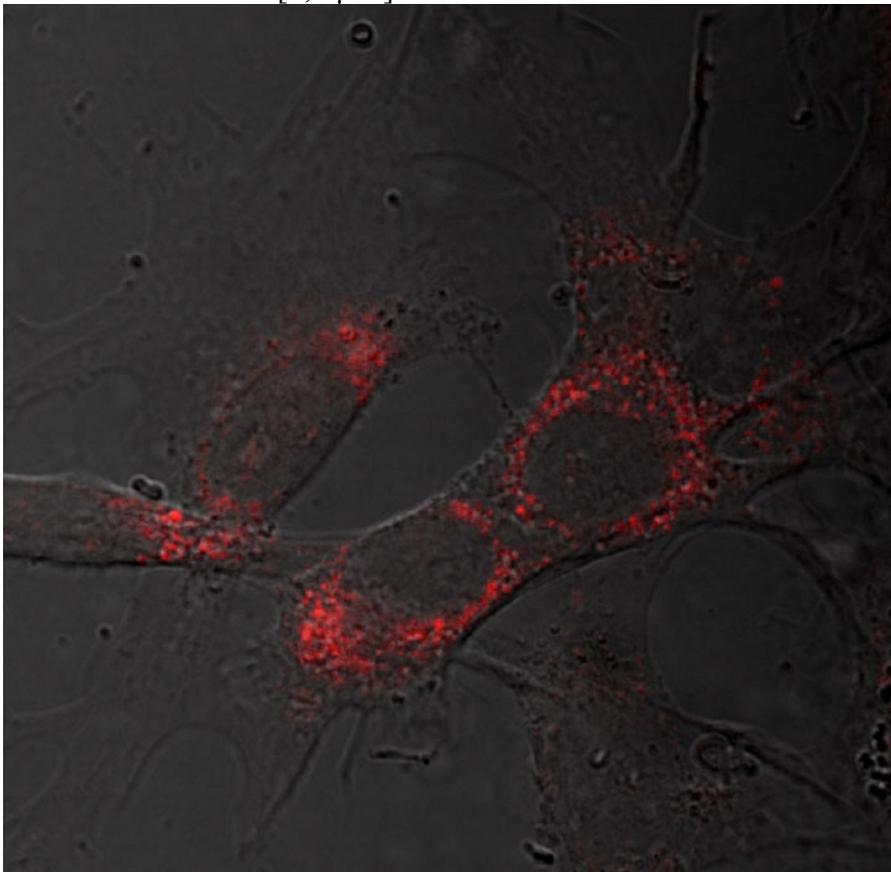
FAN ko in GÖ 6976 [2,5 μM] 2 h

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.5 Zelllinie FAN ko



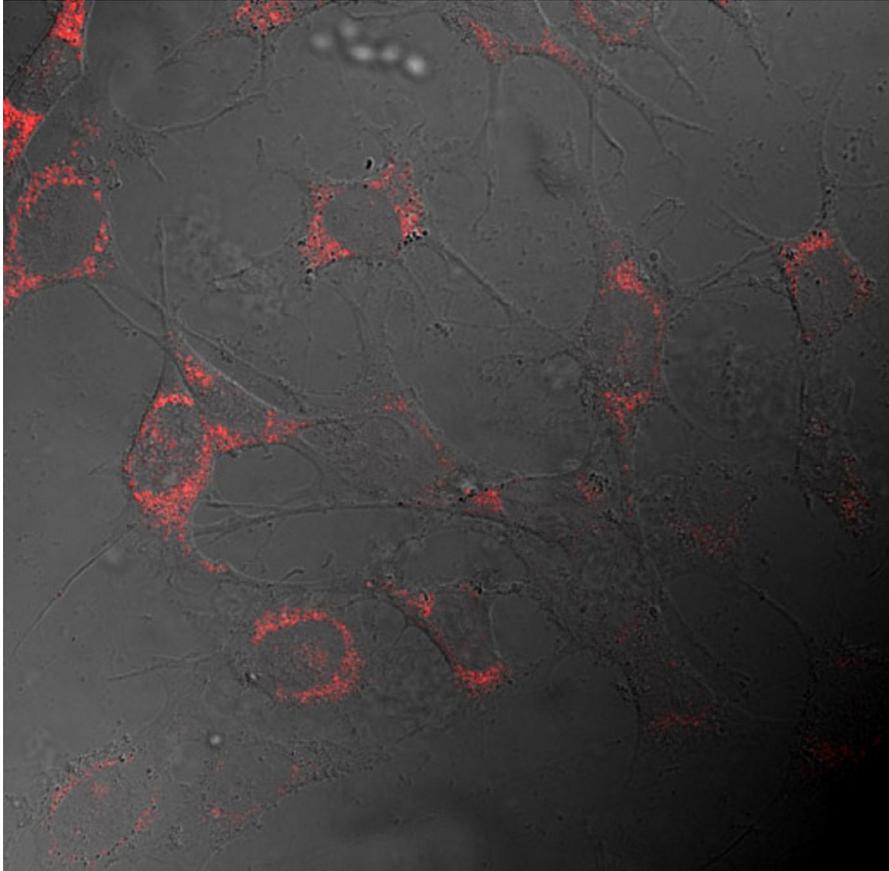
FAN ko in GÖ 6967 [2,5 μ M] über Nacht



FAN ko in Calpastatin [10 μ M] 2 h

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

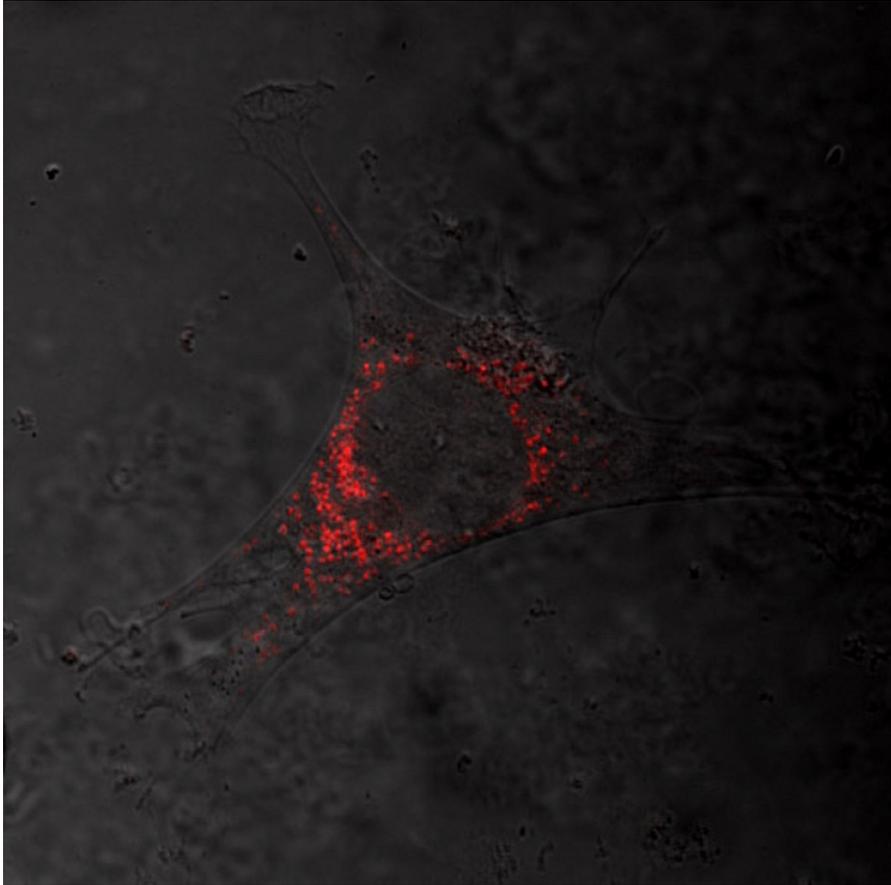
zu Abb. 3.5 Zelllinie FAN ko



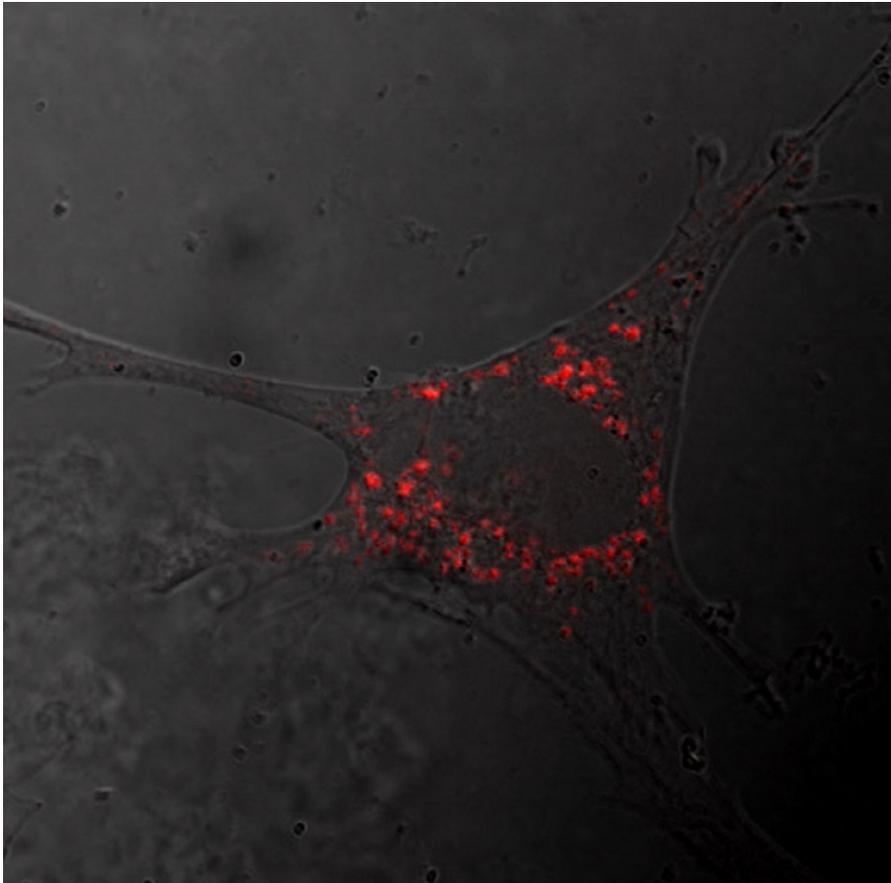
FAN ko in Calpastatin [10 μ M] über Nacht

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.6 Zelllinie wt



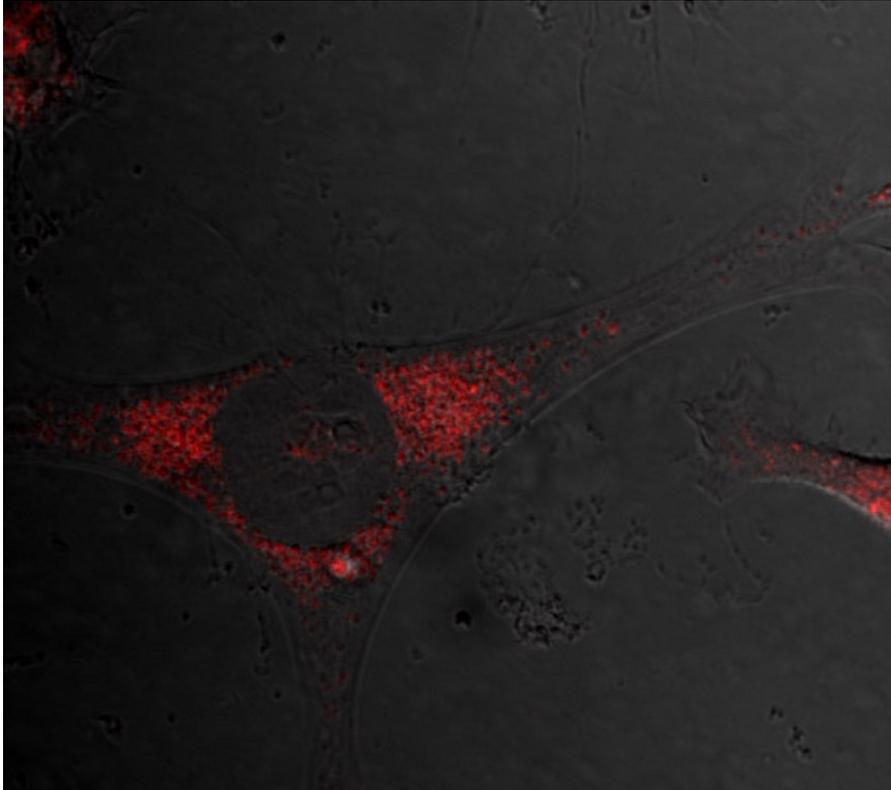
wt unbehandelt



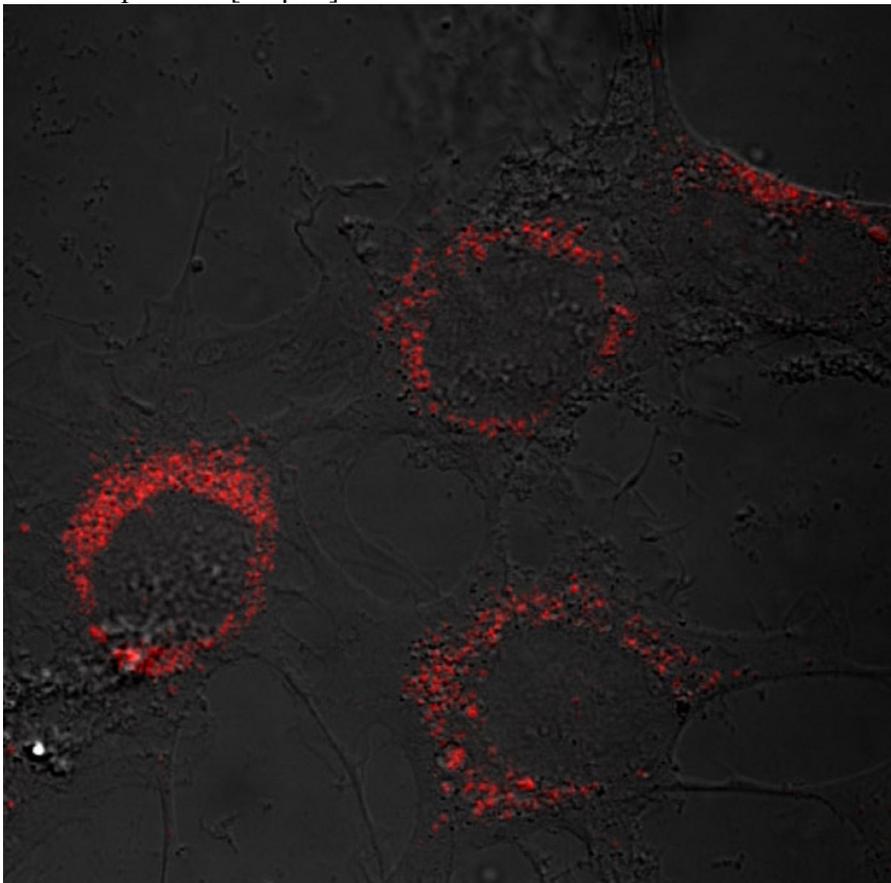
wt in GÖ 6976 [2,5 μ M] 2 h

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.6 Zelllinie wt



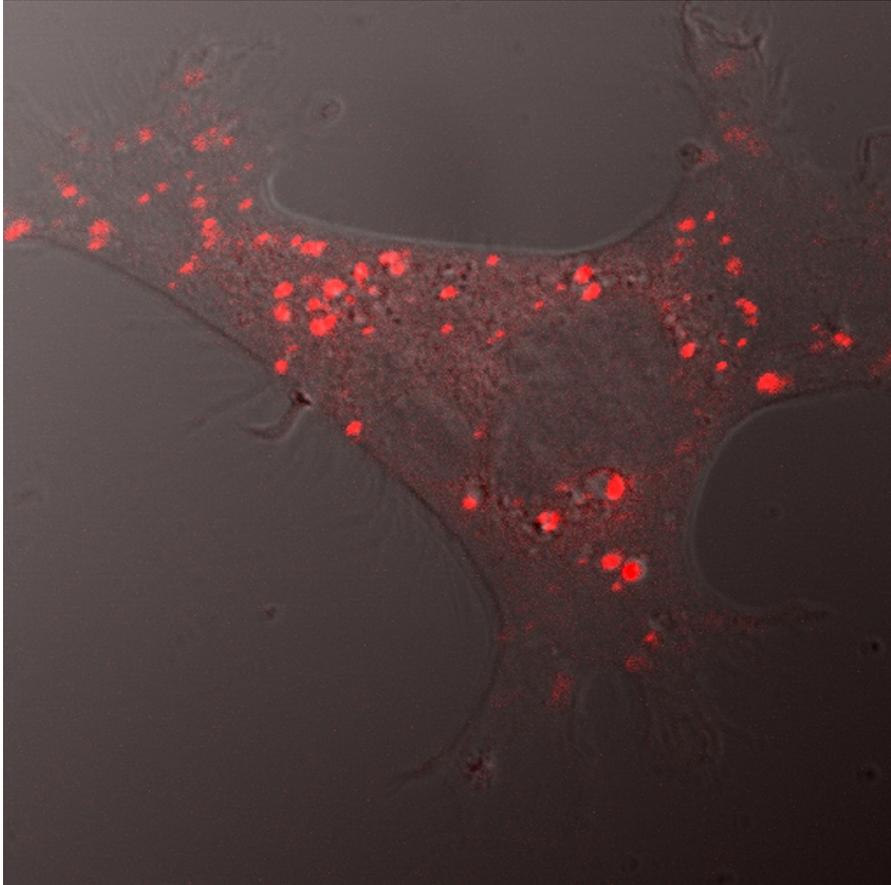
wt in Calpastatin [10 μ M] 2 h



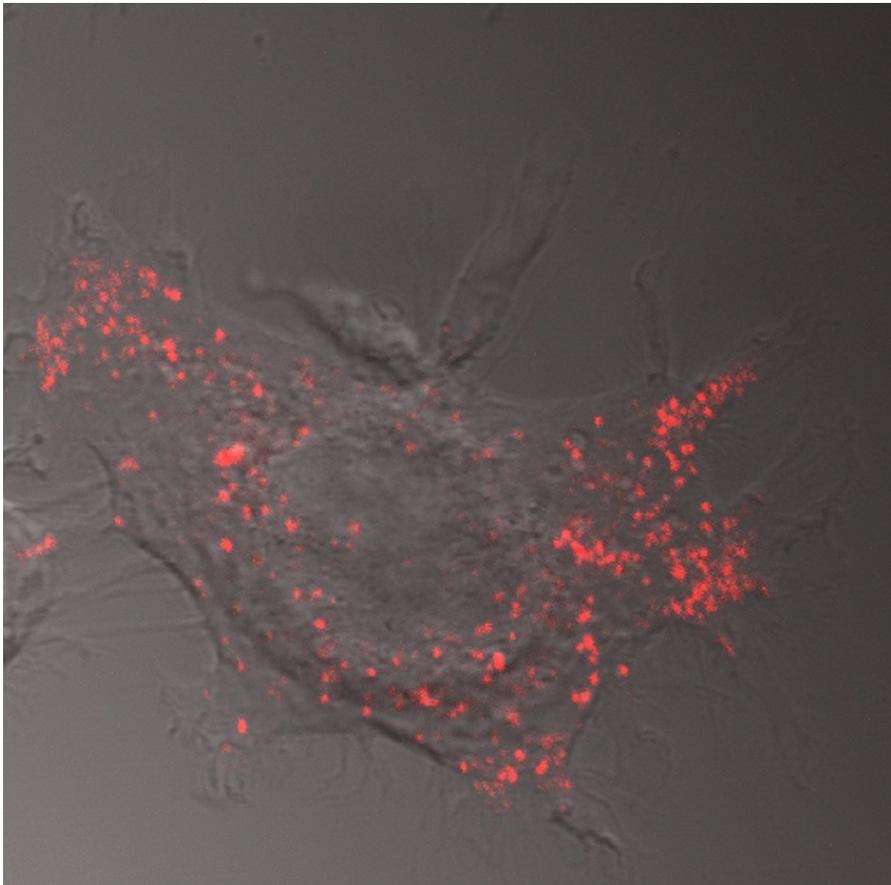
wt in Calpastatin [10 μ M] über Nacht

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.7 Zelllinien FAN ko und wt



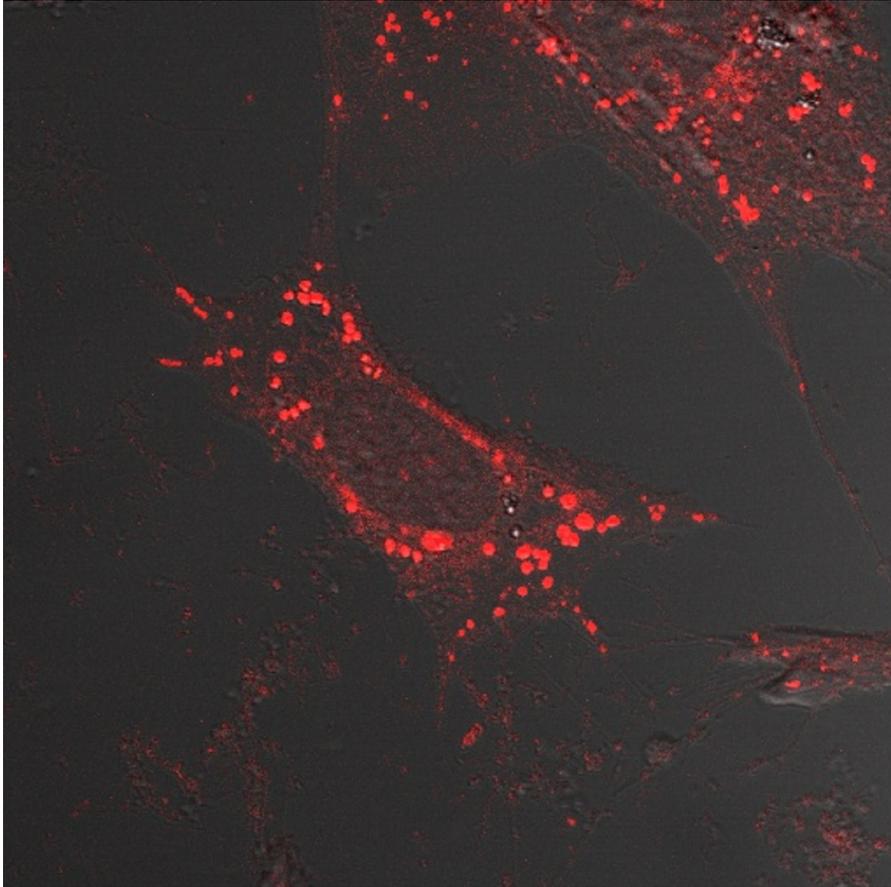
FAN ko unbehandelt



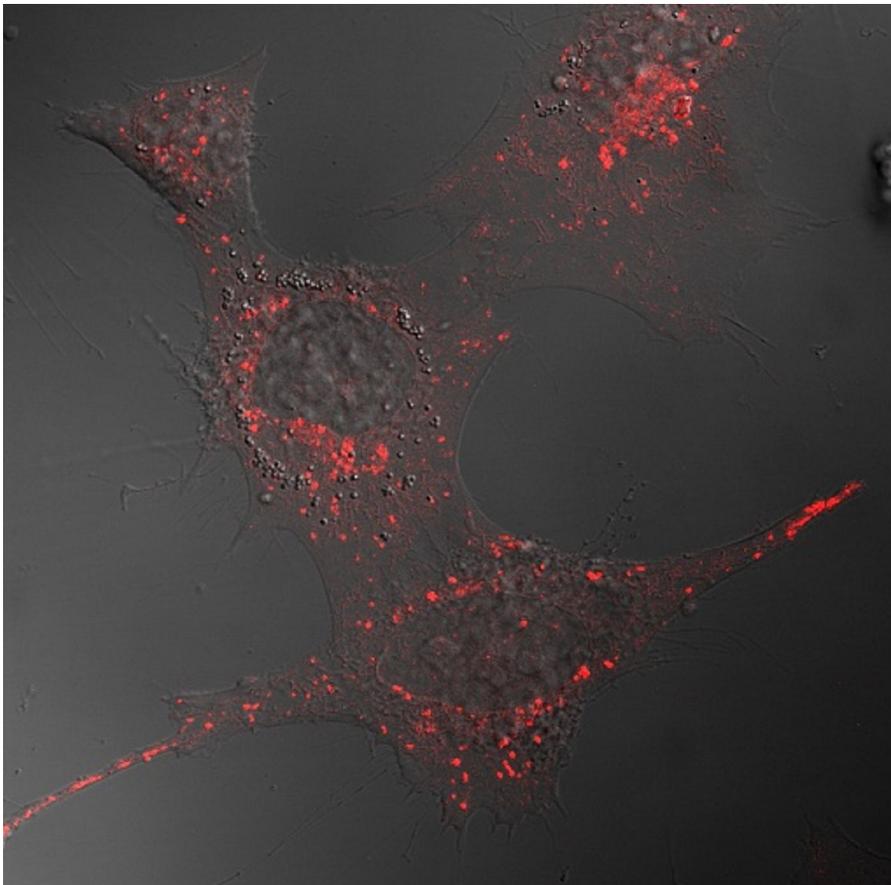
wt unbehandelt

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.8 Zelllinien FAN ko und wt



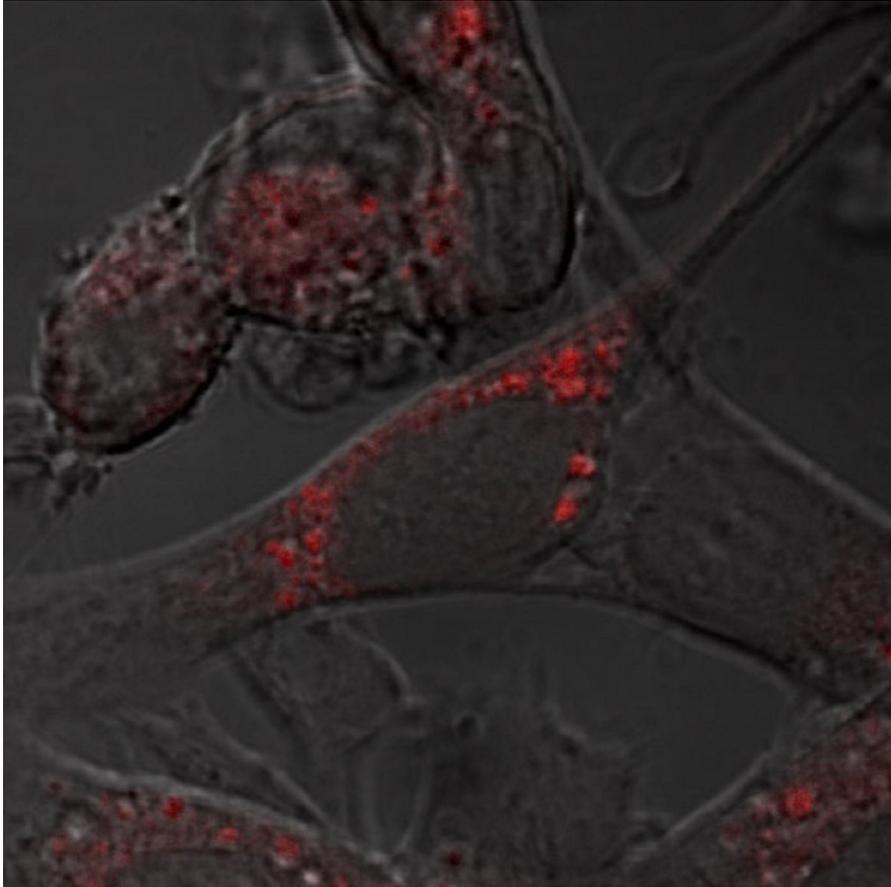
FAN ko unbehandelt



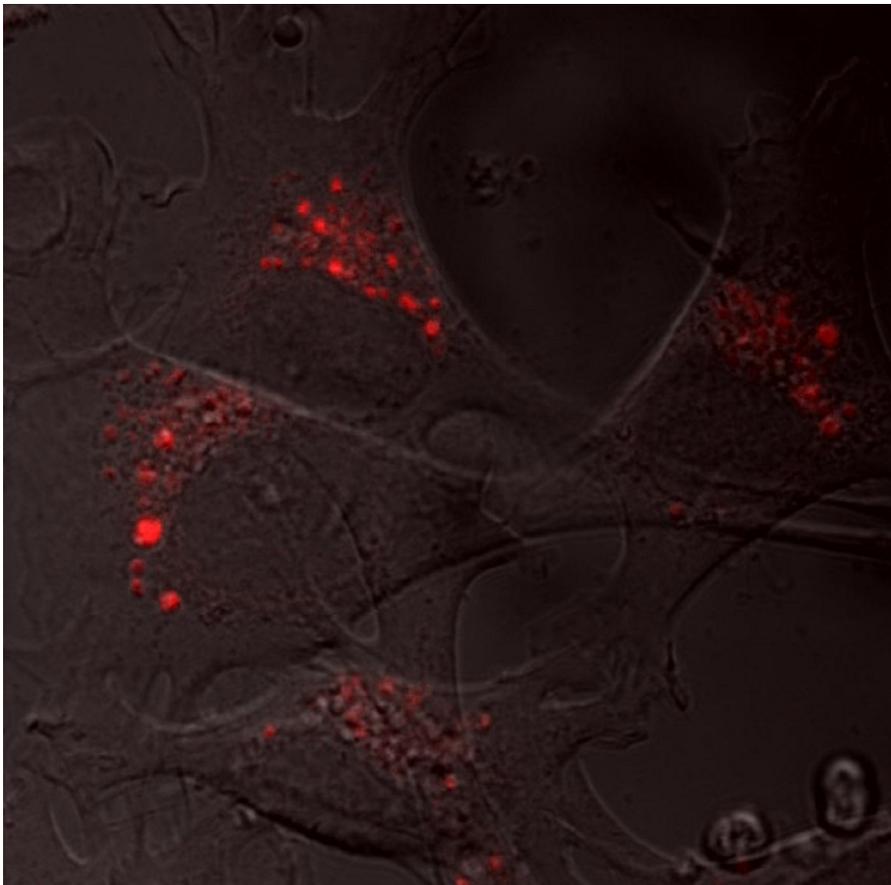
wt unbehandelt

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.11 Zelllinie C57-CF2



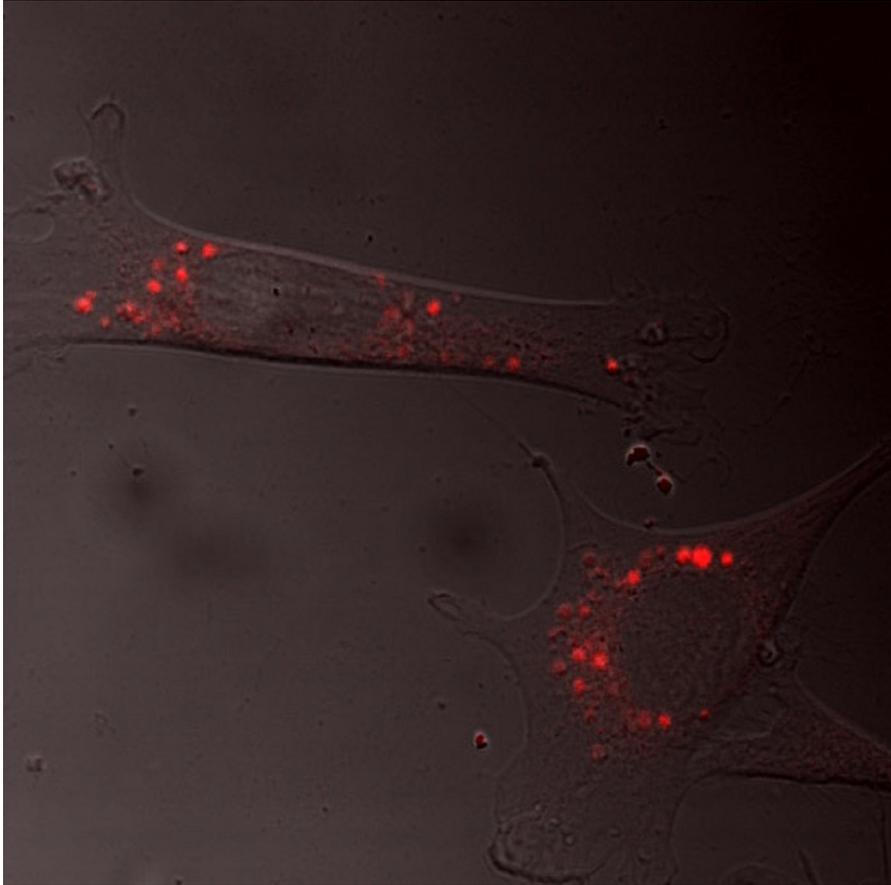
C57-CF2 unbehandelt



C57-CF2 in Calpeptin [1 μM] 2 h

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

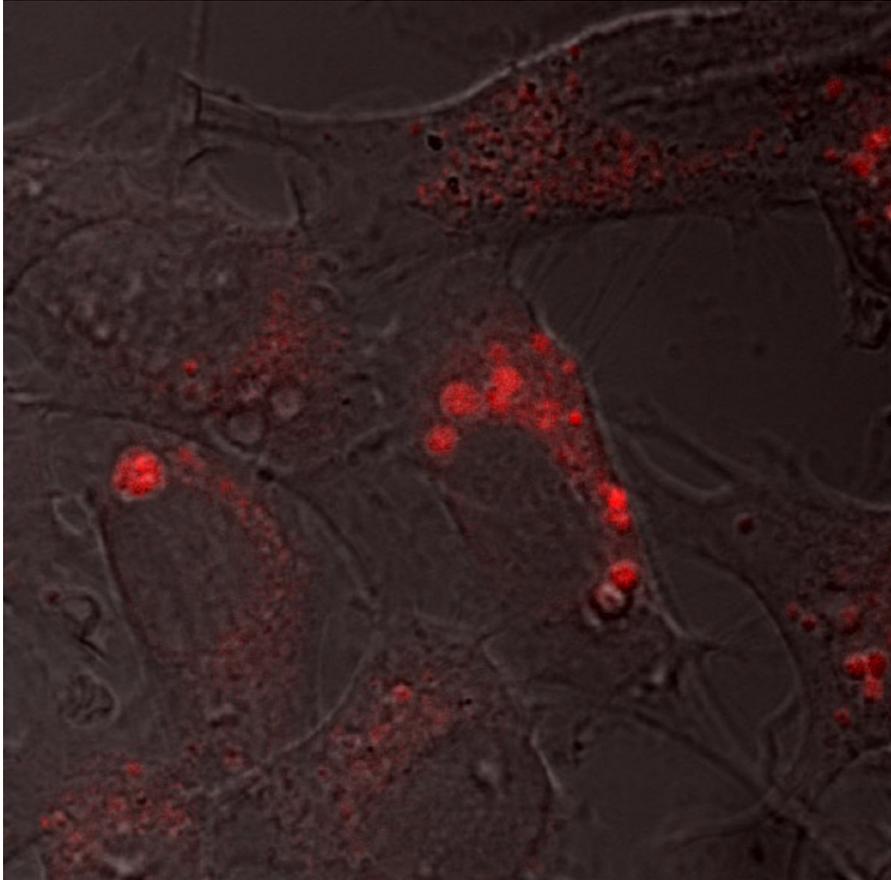
zu Abb 3.11 Zelllinie C57-CF2



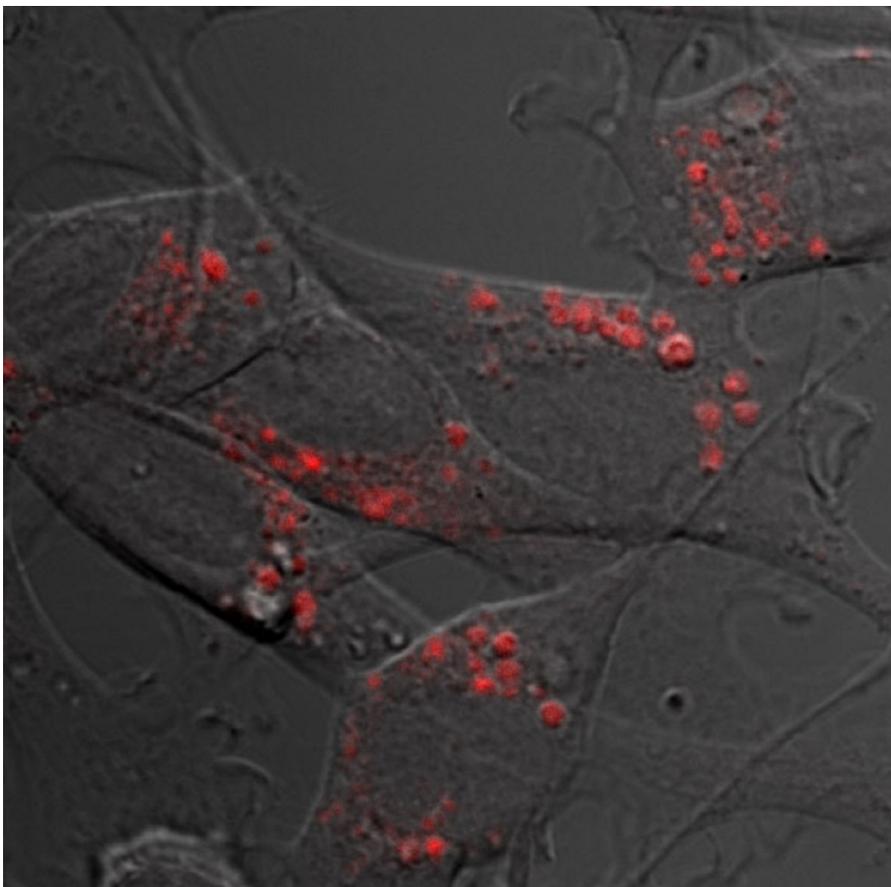
C57-CF2 in Calpeptin [10 μ M] 2 h

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.12 Zelllinie MCHSF2



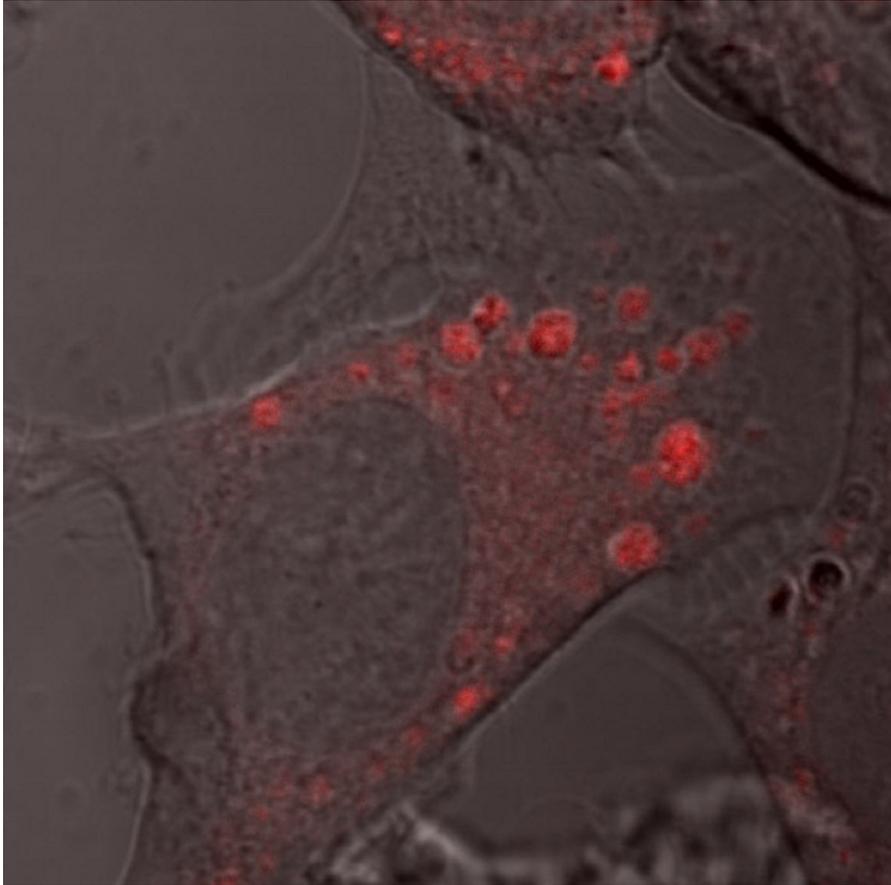
MCHSF2 unbehandelt



MCHSF2 in Calpeptin [1 μ M] 2 h

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

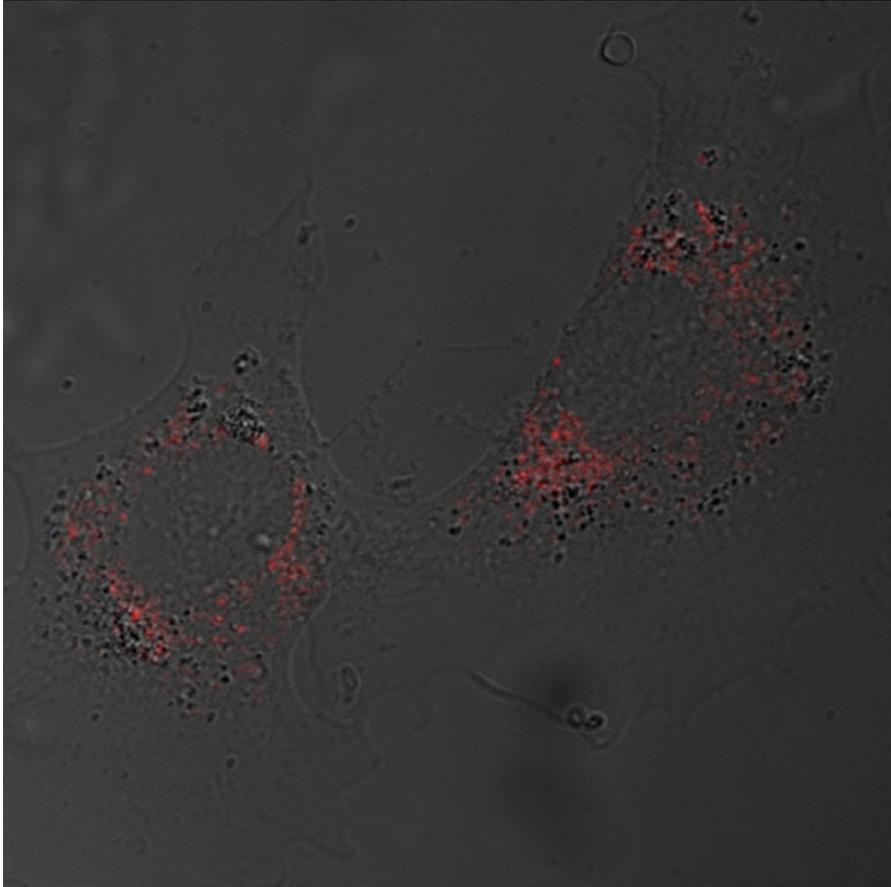
zu Abb. 3.12 Zelllinie MCHSF2



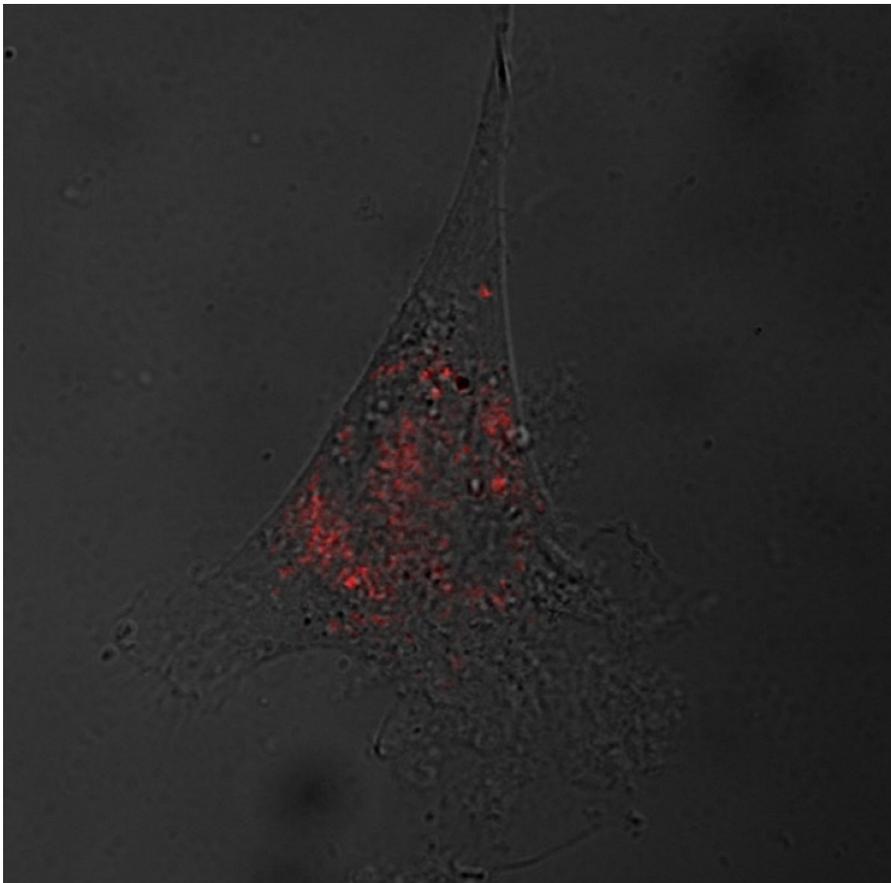
MCHSF2 in Calpeptin [10 μ M] 2 h

Anhang I
Fluoreszenzaufnahmen der Lysosomen

zu Abb. 3.13 Zelllinie C57-CF2



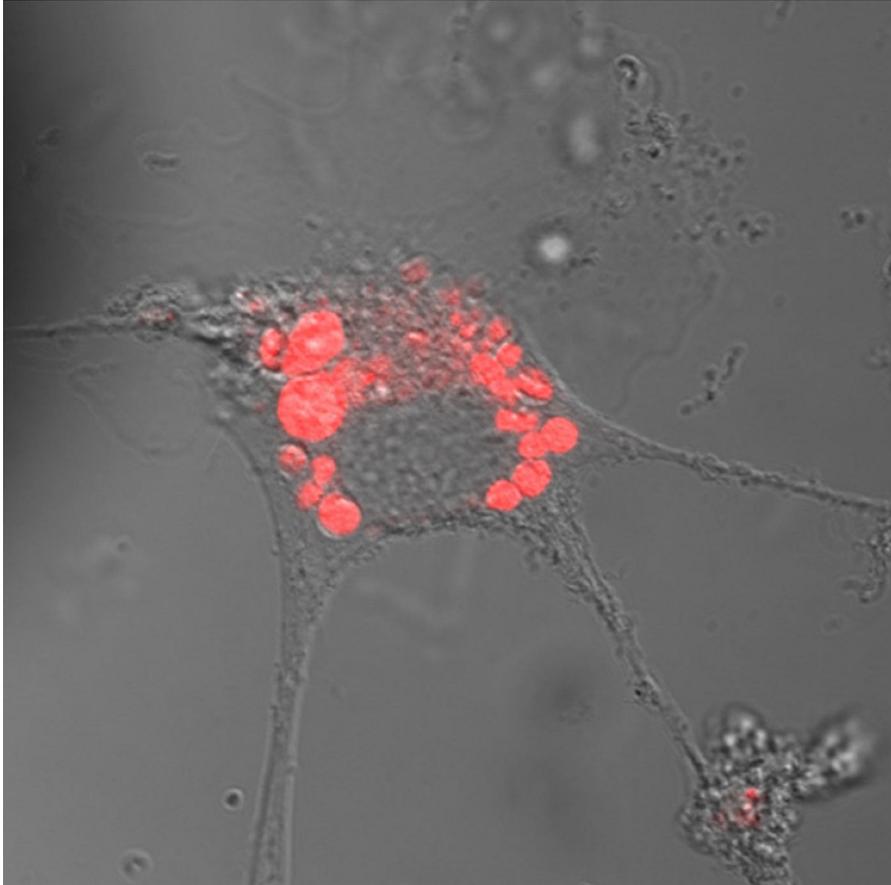
C57-CF2 unbehandelt



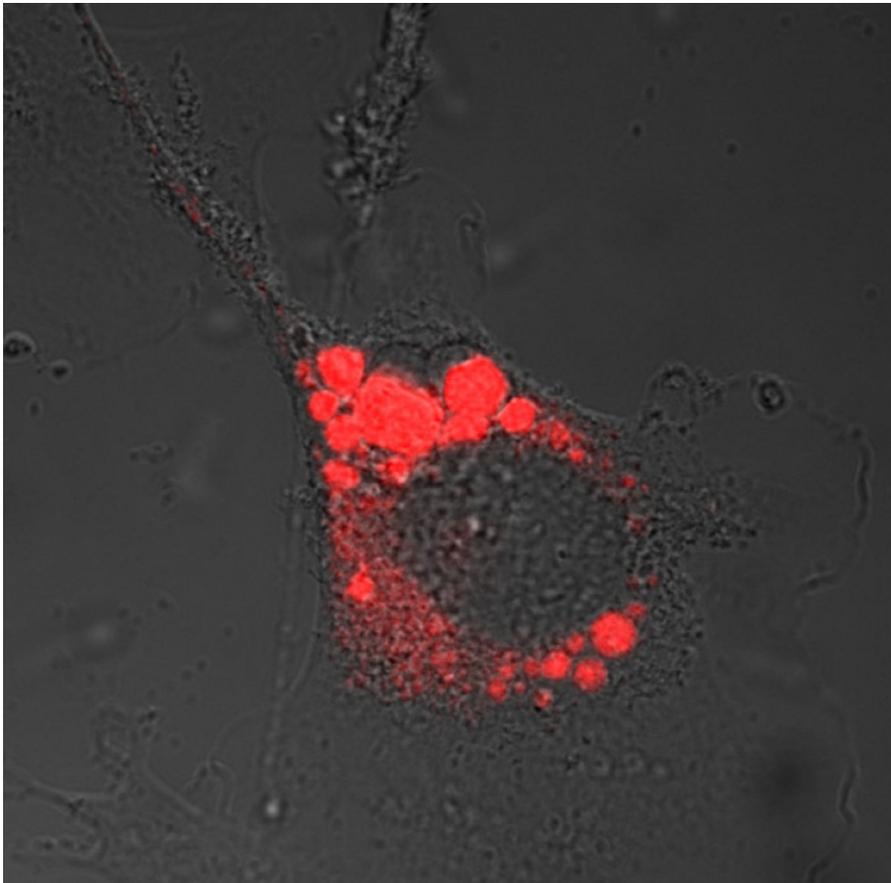
C57-CF2 in GÖ 6976 [1 μM] über Nacht

Anhang I
Fluoreszenzfärbung der Lysosomen

zu Abb. 3.14 Zelllinie MCHSF2



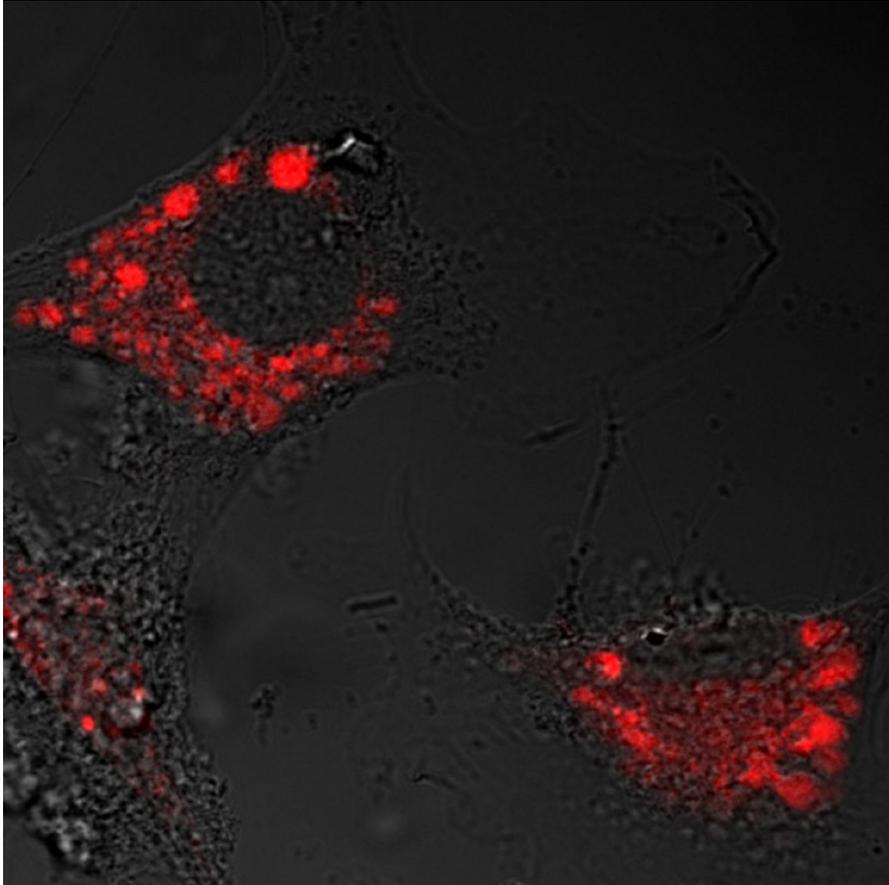
MCHSF2 unbehandelt



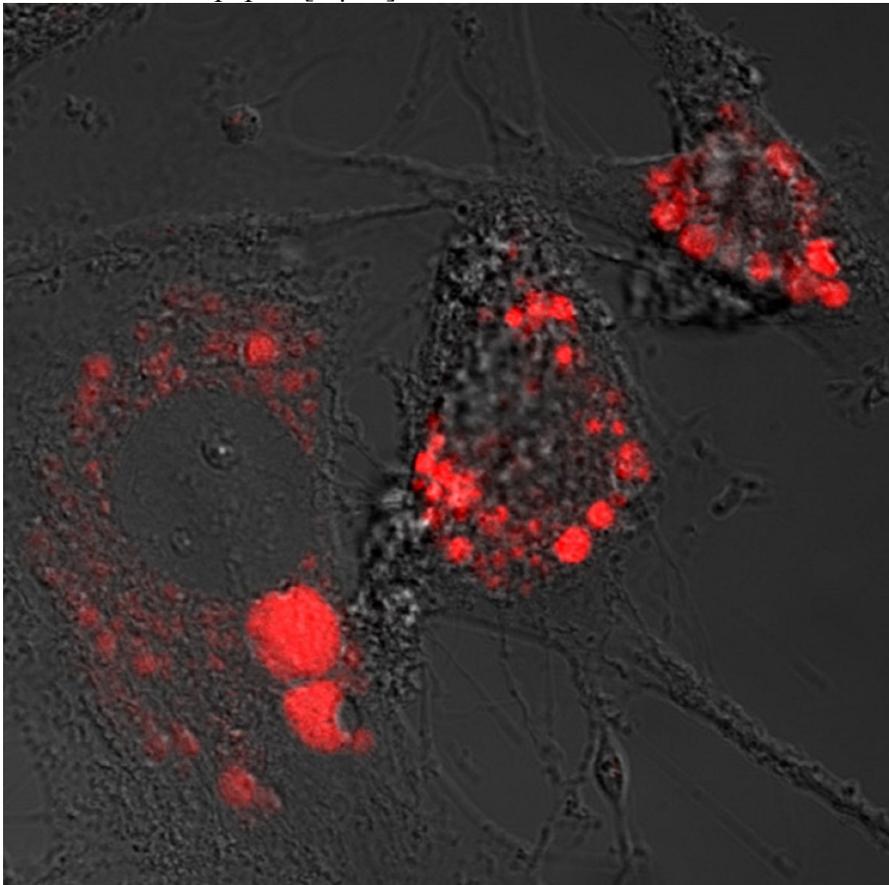
MCHSF2 in Calpastatin [10 μ M] über Nacht

Anhang I
Fluoreszenzfärbung der Lysosomen

Zu Abb. 3.14 Zelllinie MCHSF2



MCHSF2 in Calpeptin [1 μ M] über Nacht



MCHSF2 in E-64d [1 μ g/ml] über Nacht

Anhang II

Anhang II: Durchschnittliche Lysosomengröße pro Zelle in pixel², Rohdaten und Umrechnung auf 100µm x 100µm

Werte zu Tab. 3.1 Zelllinien FAN ko und wt	FAN ko synchronisiert Rohwerte	Umrechnungsfaktor	FAN ko synchronisiert umgerechnet	wt synchronisiert Rohwerte	Umrechnungsfaktor	wt synchronisiert umgerechnet
Zelle 1	54,857	0,921x 0,921	46,5319565	20,245	0,921x 0,921	17,172639
Zelle 2	69,5	0,921x 0,921	58,9527495	20,333	0,921x 0,921	17,2472843
Zelle 3	61,267	0,921x 0,921	51,9691813	17,867	0,921x 0,921	15,1555219
Zelle 4	77,016	0,921x 0,921	65,3281289	19,778	0,921x 0,921	16,7765105
Zelle 5	56,742	0,921x 0,921	48,1308908	21,634	0,921x 0,921	18,3508458

zu Tab. 3.1

Werte zu Tab. 3.1 Zelllinien FAN ko und wt	FAN ko unsynchronisiert Rohwerte	Umrechnungsfaktor	FAN ko unsynchronisiert umgerechnet	wt unsynchronisiert Rohwerte	Umrechnungsfaktor	wt unsynchronisiert umgerechnet
Zelle 1	93,25	0,921x 0,921	79,0984733	19,854	0,921x 0,921	16,8409768
Zelle 2	80,704	0,921x 0,921	68,4564417	16,792	0,921x 0,921	14,2436629
Zelle 3	90,192	0,921x 0,921	76,5045523	23,55	0,921x 0,921	19,9760756
Zelle 4	64,537	0,921x 0,921	54,7429294	24,304	0,921x 0,921	20,6156493
Zelle 5	77,934	0,921x 0,921	66,1068141	19,125	0,921x 0,921	16,2226091

zu Tab. 3.1

Werte zu Tab. 3.2 Zelllinien FAN ko und wt	FAN ko synchronisiert Rohwerte	Umrechnungsfaktor	FAN ko synchronisiert umgerechnet	wt synchronisiert Rohwerte	Umrechnungsfaktor	wt synchronisiert umgerechnet
Zelle 1	73,042	0,921x 0,921	61,9572191	36,34	0,921x 0,921	30,8250779
Zelle 2	69,711	0,921x 0,921	59,1317284	29,579	0,921x 0,921	25,0901205
Zelle 3	62,926	0,921x 0,921	53,3764132	26,298	0,921x 0,921	22,3070418
Zelle 4	47,364	0,921x 0,921	40,1760867	23	0,921x 0,921	19,509543
Zelle 5	70,1	0,921x 0,921	59,4616941	28,574	0,921x 0,921	24,2376383

zu Tab. 3.2

Werte zu Tab. 3.2 Zelllinien FAN ko und wt	FAN ko unsynchronisiert Rohwerte	Umrechnungsfaktor	FAN ko unsynchronisiert umgerechnet	wt unsynchronisiert Rohwerte	Umrechnungsfaktor	wt unsynchronisiert umgerechnet
Zelle 1	87,2	0,921x 0,921	73,9666152	16,603	0,921x 0,921	14,0833453
Zelle 2	82,316	0,921x 0,921	69,8238062	18,58	0,921x 0,921	15,7603178
Zelle 3	74,478	0,921x 0,921	63,1752932	19,442	0,921x 0,921	16,4915015
Zelle 4	77,069	0,921x 0,921	65,3730856	19,93	0,921x 0,921	16,9054431
Zelle 5	66,057	0,921x 0,921	56,0322557	18,15	0,921x 0,921	15,3955742

zu Tab. 3.2

Anhang II

Werte zu Tab. 3.3 Zelllinie MCHSF2	Zellen unbehandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen unbehandelt umgerechnet	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	608,857	0,558x 0,558	189,576151	912,556	0,666x 0,666	404,769689
Zelle 2	93,174	1,209x 1,209	136,190665	171	1,152x 1,152	226,934784
Zelle 3	361,143	1,152x 1,152	479,27432	1018,5	0,552x 0,539	303,032268
Zelle 4	264,926	0,749x 0,749	148,623751	1250	0,823x 0,804	827,115
Zelle 5	48,786	1,484x 1,484	107,439261			

zu Tab. 3.3

Werte zu Tab. 3.3 Zelllinie MCHSF2	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt umgerechnet	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	109,3	1,144x 1,126	140,794139	666,579	0,612x 0,603	245,991648
Zelle 2	400,417	0,756x 0,745	225,522863	193,3	0,972x 0,957	179,808433
Zelle 3	301,6	0,867x 0,853	223,048582	624,8	0,869x 0,855	464,223276
Zelle 4	366,45	0,67x 0,66	162,04419	979	0,865x 0,852	721,50342
Zelle 5				81,2	0,865x 0,852	59,842776

zu Tab. 3.3

Werte zu Tab. 3.4 Zelllinie C57-CF2	Zellen unbehandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen unbehandelt umgerechnet	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	34,7	1,003x 1,003	36,706	34,304	1,003x 1,003	36,31
Zelle 2	35,368	1,003x 1,003	37,374	32	1,003x 1,003	34,006
Zelle 3	37,455	1,003x 1,003	39,461	62,167	1,003x 1,003	64,173
Zelle 4	43	1,003x 1,003	45,006	24,25	1,003x 1,003	26,256
Zelle 5	63,13	1,003x 1,003	65,136	33,882	1,003x 1,003	35,888
Zelle 6	17,538	1,003x 1,003	19,544	38,219	1,003x 1,003	40,225
Zelle 7	66,4	1,003x 1,003	68,406		1,003x 1,003	
Zelle 8	45,25	1,003x 1,003	47,256		1,003x 1,003	

zu Tab. 3.4

Anhang II

Werte zu Tab. 3.4 Zelllinie C57-CF2	Zellen über Nacht mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen über Nacht mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt umgerechnet	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	22,818	1,003x 1,003	24,826	55,174	1,003x 1,003	57,18
Zelle 2	20,304	1,003x 1,003	22,31	26	1,003x 1,003	28,006
Zelle 3	35,667	1,003x 1,003	37,673	37,826	1,003x 1,003	39,832
Zelle 4	22,846	1,003x 1,003	24,852	36,647	1,003x 1,003	38,653
Zelle 5	37,952	1,003x 1,003	39,958	38,444	1,003x 1,003	40,45
Zelle 6	35,571	1,003x 1,003	37,577	30,471	1,003x 1,003	32,477

zu Tab. 3.4

Werte zu Tab. 3.4 Zelllinie C57-CF2	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	23,438	1,003x 1,003	25,444
Zelle 2	29,814	1,003x 1,003	31,82
Zelle 3	27	1,003x 1,003	29,006
Zelle 4	30,2	1,003x 1,003	32,206
Zelle 5	29	1,003x 1,003	31,006
Zelle 6	32,074	1,003x 1,003	34,08

zu Tab. 3.4

Anhang II

Werte zu Tab. 3.5 Zelllinie FAN ko	Zellen unbehandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen unbehandelt umgerechnet	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	63,6	0,873x 0,86	47,749608	71,579	0,625x 0,615	27,5131781
Zelle 2	45,536	1,07x 1,054	51,3545901	60,545	0,665x 0,655	26,3718884
Zelle 3	27,45	1,285x 1,266	44,6559345	27,313	0,926x 0,911	23,0408644
Zelle 4	28,887	0,882x 0,869	22,1406722	27,431	0,956x 0,941	24,6768179
Zelle 5	66,577	0,518x 0,51	17,5883119	33,062	0,891x 0,878	25,8643365
Zelle 6	18,865	1,436x 1,414	38,305458			

zu Tab. 3.5

Werte zu Tab. 3.5 Zelllinie FAN ko	Zellen über Nacht mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen über Nacht mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt umgerechnet	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	67,73	0,625x 0,616	26,07605	43,381	0,875x 0,862	32,7201193
Zelle 2	26,825	0,972x 0,958	24,9787962	38,78	0,884x 0,871	29,8592039
Zelle 3	44,014	0,867x 0,853	32,5505977	30,762	0,875x 0,862	23,2022385
Zelle 4	41,422	0,798x 0,786	25,9810382	28,446	0,964x 0,949	26,0234249
Zelle 5	68,429	0,697x 0,686	32,7187789			

zu Tab. 3.5

Werte zu Tab. 3.5 Zelllinie FAN ko	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	39,404	0,963x 0,949	36,0108033
Zelle 2	10,588	0,833x 0,82	21,3667999
Zelle 3	48,432	0,75x 0,739	26,843436
Zelle 4	82	0,634x 0,625	32,4925

zu Tab. 3.5

Anhang II

Werte zu Tab. 3.6 Zelllinie wt	Zellen unbehandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen unbehandelt umgerechnet	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	15,729	1,142x 1,142	20,5131956	26,137	1,152x 1,152	34,6865172
Zelle 2	27,387	0,955x 0,944	24,4055416	26,379	1,152x 1,152	35,0076764
Zelle 3	15,575	1,224x 1,224	23,3340912	23,19	1,152x 1,152	30,7755418
Zelle 4	16,179	1,537x 1,533	38,1212996	34,164	0,936x 0,936	29,9309437
Zelle 5	32,414	1,171x 1,167	44,2955786			
Zelle 6	19,062	1,343x 1,338	34,2531559			
Zelle 7	31,639	0,91x 0,907	26,1138814			
Zelle 8	19,687	1,398x 1,085	29,8618322			

zu Tab. 3.6

Werte zu Tab. 3.6 Zelllinie wt	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit Calpastatin [10 µM] behandelt umgerechnet	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	18,267	1,337x 1,2	29,3075748	16,909	1,152x 1,152	22,4400015
Zelle 2	22,253	1,023x 0,918	20,8981038	35,682	1,152x 1,152	47,3537249
Zelle 3	18,489	1,212x 1,087	24,3582221	26,581	1,152x 1,152	35,2757514
Zelle 4	10,025	1,552x 1,698	26,4188424	21,1	1,152x 1,152	28,1346048
Zelle 5	18,226	0,873x 0,955	15,1952896	13,972	1,557x 1,557	33,871607

zu Tab. 3.6

Anhang II

Werte zu Tab. 3.7 Zelllinien FAN ko und wt	FAN ko Rohwerte	Umrechnungsfaktor	FAN ko umgerechnet	wt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	wt umgerechnet
Zelle 1	87,205	1,183x 1,183	122,042	149,833	0,668x 0,668	66,8590806
Zelle 2	435,333	0,941x 0,941	385,4791	76,381	1,145x 1,145	100,137401
Zelle 3	413,667	0,469x 0,469	90,990607	109,652	0,837x 0,837	76,818792
Zelle 4	375	0,468x 0,468	82,134	97,208	0,819x 0,819	65,2033353
Zelle 5	297,982	0,523x 0,523	81,5067185	184,8	0,558x 0,558	57,5400672
Zelle 6	200,222	0,675x 0,675	91,2261488	77,771	0,657x 0,657	33,5697744
Zelle 7	328,407	0,669x 0,669	146,982165	119,16	0,938x 0,938	104,842211
Zelle 8	436,286	0,513x 0,513	114,81695	241,056	0,81x 0,81	158,156842
Zelle 9	269,217	0,549x 0,549	81,142273	169,98	0,657x 0,657	73,371697
Zelle 10	198,75	0,666x 0,666	88,156755	244,425	0,432x 0,432	45,6155712
Zelle 11	107,955	1,152x 1,152	143,267512	343,619	0,468x 0,468	75,2608079
Zelle 12	173,741	1,152x 1,152	230,572376	417,263	0,414x 0,414	71,5172091
Zelle 13	426,138	0,549x 0,549	128,438419			
Zelle 14	385,667	0,458x 0,458	80,8990526			
Zelle 15	649,294	0,441x 0,441	126,275346			
Zelle 16	574,357	0,378x 0,378	82,0664256			
Zelle 17	136	0,549x 0,549	81,981072			
Zelle 18	139,13	0,477x 0,477	63,3122195			
Zelle 19	273,698	0,639x 0,639	111,756641			
Zelle 20	347,35	0,567x 0,567	111,669204			
Zelle 21	313,049	0,738x 0,738	170,50026			
Zelle 22	318,263	0,621x 0,621	122,735322			

zu Tab. 3.7

Werte zu Tab. 3.8 Zelllinien FAN ko und wt	FAN ko Rohwerte	Umrechnungsfaktor	FAN ko umgerechnet	wt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	wt umgerechnet
Zelle 1	115,058	1,242x 1,242	177,484329	68,049	0,971x 0,971	64,1593872
Zelle 2	168,746	1,071x 1,071	193,558581	59,958	0,834x 0,834	41,7041466
Zelle 3	158,718	0,939x 0,939	139,944994	77,77	0,971x 0,971	73,3247446
Zelle 4	81,913	1,568x 1,568	201,393268	41,893	1,306x 1,306	71,4542089
Zelle 5	92,274	0,846x 0,846	66,0419782	29,015	1,629x 1,629	76,9953936
Zelle 6	88,607	1,297x 1,297	149,055493	37,561	1,509x 1,509	85,5294394
Zelle 7	78,667	1,629x 1,629	208,753977	30,647	1,152x 1,152	40,6717563
Zelle 8	148,173	0,882x 0,882	115,267333	45,567	1,096x 1,096	54,7358095
Zelle 9	86,345	1,635x 1,635	230,819613	56,364	1,096x 1,096	67,7053386

zu Tab. 3.8

Anhang II

Werte zu Tab. 3.11 Zelllinie C57-CF2	Zellen unbehandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen unbehandelt umgerechnet	Zellen 2 h mit Calpeptin [1 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit Calpeptin [1 µM]] behandelt umgerechnet
Zelle 1	154,083	0,558x 0,558	47,9758992	161,867	0,625x 0,625	63,2292969
Zelle 2	103,667	0,603x 0,603	37,6942542	60,7	0,756x 0,756	34,6922352
Zelle 3	77,333	0,776x 0,776	46,5680766	159	0,469x 0,469	34,973799
Zelle 4	108,741	0,617x 0,617	41,3965025	142,923	0,504x 0,504	36,3047288

zu Tab. 3.11

Werte zu Tab. 3.11 Zelllinie C57-CF2	Zellen 2 h mit Calpeptin [10 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit Calpeptin [10 µM]] behandelt umgerechnet
Zelle 1	87,667	0,585x 0,585	30,0018391
Zelle 2	274,048	0,594x 0,594	96,6940001
Zelle 3	65,556	0,999x 0,999	65,4249536
Zelle 4	124,619	0,67x 0,67	55,9414691

zu Tab. 3.11

Werte zu Tab. 3.12 Zelllinie MCHSF2	Zellen unbehandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen unbehandelt umgerechnet	Zellen 2 h mit Calpeptin [1 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit Calpeptin [1 µM]] behandelt umgerechnet
Zelle 1	204	0,684x 0,684	95,442624	200	0,72x 0,72	103,68
Zelle 2	819,667	0,45x 0,45	165,982568	452,714	0,465x 0,465	97,8880847
Zelle 3	488,4	0,648x 0,648	205,081114	518	0,586x 0,586	177,879128
Zelle 4	396,222	0,571x 0,571	129,184617	120,667	0,918x 0,918	101,688977

zu Tab. 3.12

Werte zu Tab. 3.12 Zelllinie MCHSF2	Zellen 2 h mit Calpeptin [10 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen 2 h mit Calpeptin [10 µM]] behandelt umgerechnet
Zelle 1	306,667	0,531x 0,531	86,468134
Zelle 2	1272	0,574x 0,574	419,093472
Zelle 3	477,25	0,595x 0,595	168,958431
Zelle 4	143,111	0,579x 0,579	47,9766748

zu Tab. 3.12

Anhang II

Werte zu Tab. 3.13 Zelllinie C57-CF2	Zellen unbehandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen unbehandelt umgerechnet	Zellen über Nacht mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen über Nacht mit GÖ 6976 [2,5 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	22,3	0,921x 0,921	18,9157743	43,405	0,921x 0,921	36,8179006
Zelle 2	21,316	0,921x 0,921	18,0811052	31,082	0,921x 0,921	26,3650268
Zelle 3	25,81	0,921x 0,921	21,8931002	33,316	0,921x 0,921	28,2599972
Zelle 4	32,619	0,921x 0,921	27,6687732	27,045	0,921x 0,921	22,9406778
Zelle 5	20,469	0,921x 0,921	17,362645	31,804	0,921x 0,921	26,9774568

zu Tab. 3.13

Werte zu Tab. 3.14 Zelllinie MCHSF2	Zellen unbehandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen unbehandelt umgerechnet	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen über Nacht mit Calpastatin [10 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	195,825	0,921x 0,921	166,106794	220,744	0,921x 0,921	187,244111
Zelle 2	208,2	0,921x 0,921	176,603776	175,894	0,921x 0,921	149,200502
Zelle 3	165,107	0,921x 0,921	140,050527	117,472	0,921x 0,921	99,6445668
Zelle 4	302,222	0,921x 0,921	256,357092	267,464	0,921x 0,921	226,873931
Zelle 5	501,091	0,921x 0,921	425,045931	131,454	0,921x 0,921	111,504672

zu Tab. 3.14

Werte zu Tab. 3.14 Zelllinie MCHSF2	Zellen über Nacht mit Calpeptin [1 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen über Nacht mit Calpeptin [1 µM] behandelt umgerechnet	Zellen über Nacht mit E 64 d [1 µM] behandelt Rohwerte	Umrechnungsfaktor	Zellen über Nacht mit E 64 d [1 µM] behandelt umgerechnet
Zelle 1	161,538	0,921x 0,921	137,023155	320,258	0,921x 0,921	271,655966
Zelle 2	223,667	0,921x 0,921	189,72352	194,118	0,921x 0,921	164,658846
Zelle 3	144,525	0,921x 0,921	122,592031	144,867	0,921x 0,921	122,882129
Zelle 4	125,289	0,921x 0,921	106,275267	171,107	0,921x 0,921	145,139973
Zelle 5	91,537	0,921x 0,921	77,6454364	135,097	0,921x 0,921	114,594814

zu Tab. 3.14