

Aus dem Bereich der Molekularen Zellbiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchungen zur Regulation  
des intrazellulären Calciums  
in Physiologie und Pathophysiologie  
humaner und muriner Erythrozyten**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät der  
**Universität des Saarlandes**

2019

vorgelegt von

*Laura Hertz*

geb. am: 07.06.1988 in Saarburg

Tag des Kolloquiums	29.05.2020
Dekan	Prof. Dr. Michael D. Menger
Berichterstatter	Prof. Dr. Lars Kaestner Prof. Dr. Hermann Eichler Prof. Dr. Martina Muckenthaler
Vorsitzende	Prof. Dr. Barbara Niemeyer-Hoth
Akademische Mitarbeiterin	Dr. Eva Schwarz

„Kalzium, (fachsprachlich:) Calcium, das;  
[engl. calcium, zu lat. Calx (Gen.: calcis), ↑ Kalk]: *(nur in Verbindungen vorkommendes)*  
*silberglänzendes, sehr weiches Leichtmetall* (chemisches Element; Zeichen: Ca).“

aus: Duden – Deutsches Universalwörterbuch. 8. Auflage (2015).  
Bibliographisches Institut GmbH, Berlin.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>4</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>8</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>11</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>12</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>16</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>18</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 Blut.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2 Erythrozyten.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 Membran und Zytoskelett der Erythrozyten.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4 Kationenkanäle in der Erythrozytenmembran .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5 Calcium in Erythrozyten.....</b>	<b>29</b>
<b>1.6 Lysophosphatidsäure Signalweg.....</b>	<b>31</b>
<b>1.7 Hereditäre hämolytische Anämien.....</b>	<b>33</b>
1.7.1 Membranopathien.....	34
1.7.2 Enzymopathien.....	35
<b>1.8 Trogozytose – Interzellulärer Transfer von Zelloberflächenproteinen .....</b>	<b>37</b>
<b>1.9 Teilprojekte und Ziele dieser Arbeit.....</b>	<b>38</b>
<b>2 MATERIAL &amp; METHODEN.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Verwendete Materialien.....</b>	<b>41</b>
2.1.1 Chemikalien.....	41
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	43
2.1.3 Verwendete Software .....	45
2.1.4 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen .....	46
2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe, Antikörper und Zellmarker.....	46
2.1.5.1 Fluo-4 AM.....	47
2.1.5.2 PKH26 und PKH67 .....	48

2.1.5.3 Sulfo-NHS-SS-Biotin .....	49
2.1.5.4 Verwendete Antikörper zur Visualisierung biotinylierter Proteine .....	50
2.1.5.5 Verwendete Antikörper und Farbstoffe zur Charakterisierung von Knochenmarkszellen .....	50
2.1.6 Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	51
<b>2.2 Verwendete Mikroskop Setups.....</b>	<b>52</b>
2.2.1 Video Imaging Setup TILL Photonics .....	52
2.2.2 Video Imaging Setup Zeiss.....	52
2.2.3 Konfokal Mikroskop Leica TCS SP5.....	53
2.2.4 Konfokal Mikroskop Nikon/CSU-W1 .....	53
2.2.5 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie .....	53
<b>2.3 Angewandte Methoden Kapitel hereditäre hämolytische Anämien.....</b>	<b>55</b>
2.3.1 Humane Blutspender.....	55
<b>2.4 Angewandte Methoden Kapitel Lysophosphatidsäure Signalweg .....</b>	<b>58</b>
2.4.1 Blutentnahme an Mensch und Maus .....	58
2.4.2 Aufbereitung der Blutproben.....	59
<b>2.5 Angewandte Methoden Kapitel Charakterisierung der R26-tdRFP-CMV Maus 60</b>	<b>60</b>
2.5.1 <i>In vivo</i> -Biotinylierung .....	60
2.5.2 Kreuzungsschema der R26-tdRFP, CMV-Cre und TRPC6 <sup>-/-</sup> Mauslinien .....	60
2.5.3 Genotypisierung der R26-tdRFP-CMV und R26-tdRFP-CMV-TRPC6 <sup>-/-</sup> Mäuse.....	62
2.5.4 Charakterisierung der R26-tdRFP-CMV Maus .....	64
<b>2.6 Angewandte Methoden Kapitel Transfusion.....</b>	<b>65</b>
2.6.1 Induktion einer Retikulozytose.....	65
2.6.2 Färbung der Erythrozyten mit dem PKH26/PKH67 Mini Kit .....	66
2.6.3 Transfusion der TRPC6 <sup>-/-</sup> Erythrozyten in Wildtyp Mäuse .....	66
<b>2.7 Messungen des intrazellulären Calciums .....</b>	<b>67</b>
<b>2.8 Datenanalyse.....</b>	<b>68</b>
2.8.1 Auswertung in ImageJ.....	68
2.8.2 Auswertung in Arivis Vision 4D.....	69
2.8.3 Statistische Auswertung .....	70
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>72</b>
<b>3.1 Intrazelluläres Calcium in hereditären hämolytischen Anämien .....</b>	<b>72</b>
3.1.1 Patienten-Screening im Rahmen des CoMMITMenT Projekts.....	72
3.1.2 Vorarbeiten zur Analyse des intrazellulären Calciums .....	73

3.1.2.1 Hereditäre Sphärozytose.....	74
3.1.2.2 Hereditäre Xerozytose (Dehydrierte Stomatozytose).....	75
3.1.2.3 Hämolytische Anämien und Enzymopathien.....	76
3.1.2.4 Patienten-basierte Analyse.....	77
3.1.3 Hereditäre Sphärozytose Patienten – Analyse des intrazellulären Calciums in „frischen“ Blutproben .....	78
3.1.4 Patienten mit Gardos- <i>Channelopathie</i> .....	79
3.1.4.1 S314P Mutation.....	79
3.1.4.2 R352H Mutation.....	81
<b>3.2 Untersuchungen zum Lysophosphatidsäure Signalweg.....</b>	<b>83</b>
3.2.1 Aktivierung des TRPC6 Kanals über die PKC $\alpha$ .....	83
3.2.2 Mechanosensitivität des LPA Signalweges .....	85
3.2.3 Analyse der TRPC6 Inhibitoren Larixylacetat und SAR7334 .....	87
<b>3.3 Charakterisierung der <i>R26-tdRFP-CMV</i> Maus.....</b>	<b>89</b>
3.3.1 Vorversuche zur Markierung von Erythrozyten mittels Biotin.....	89
3.3.2 Generierung einer transgenen Maus mit fluoreszenzmarkierten Erythrozyten .....	90
3.3.3 Untersuchung der generellen tdRFP-Expression in verschiedenen Organen.....	90
3.3.4 Untersuchung der tdRFP-Expression in Zellen des Knochenmarks .....	91
3.3.5 Bestimmung der Erythrozytenparameter und Indizes der <i>R26-tdRFP-CMV</i> Mauslinie....	92
3.3.6 Konfokalmikroskopische Analyse der RFP <sup>+/+</sup> Erythrozyten .....	93
3.3.7 Durchflusszytometrische Untersuchungen der RFP-exprimierenden Erythrozyten.....	94
<b>3.4 Transfusion von TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten in Wildtyp Mäuse .....</b>	<b>96</b>
3.4.1 Markierung der TRPC6 <sup>-/-</sup> Erythrozyten mittels PKH26 .....	96
3.4.2 Markierung der TRPC6 <sup>-/-</sup> Erythrozyten durch Expression des tdRFP .....	97
3.4.3 Markierung der TRPC6 <sup>-/-</sup> Erythrozyten durch Expression des tdRFP und Transfusion in splenektomierte Wildtyp Mäuse.....	98
3.4.4 Auswertung der Transfusionsversuche als mausbasierte Statistik .....	99
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
<b>4.1 Intrazelluläres Calcium in hereditären hämolytischen Anämien .....</b>	<b>101</b>
4.1.1 Vergleich der Auswertung von mikroskopischen Daten zum intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Gehalt mittels ImageJ und Arivis Vision 4D .....	102
4.1.2 Intrazelluläres Calcium in Erythrozyten von Patienten mit Hereditärer Sphärozytose ...	103
4.1.3 Intrazelluläres Calcium in Erythrozyten von Patienten mit Hereditärer Xerozytose .....	104
4.1.4 Intrazelluläres Calcium in Erythrozyten von Patienten mit Enzymopathien und uncharakterisierter hämolytischer Anämie .....	105
4.1.5 Intrazelluläres Calcium in Erythrozyten von Patienten mit Gardos- <i>Channelopathie</i> .....	106
4.1.6 Intrazelluläres Calcium in „frischen“ Blutproben und der Einfluss des Transports .....	108

4.1.7	Intrazelluläres Calcium allgemein in Anämien.....	109
<b>4.2</b>	<b>Lysophosphatidsäure Signalweg in murinen und humanen Erythrozyten.....</b>	<b>112</b>
4.2.1	Aktivierung von TRPC6 durch die PKC $\alpha$ .....	112
4.2.2	Mechanosensitivität des LPA Signalweges.....	113
4.2.3	Untersuchung verschiedener TRPC6 Inhibitoren.....	115
4.2.4	Experimentelle Variation.....	115
4.2.5	Hypothese zum Ursprung des TRPC6 in der Erythrozytenmembran.....	117
<b>4.3</b>	<b>Fluoreszenzmarkierung von Erythrozyten.....</b>	<b>119</b>
4.3.1	<i>In vivo</i> -Biotinylierung von Erythrozyten.....	119
4.3.2	Charakterisierung der <i>R26-tdRFP-CMV</i> Maus.....	120
<b>4.4</b>	<b>Transfusionsversuche am Modell der TRPC6<sup>-/-</sup> Maus.....</b>	<b>125</b>
<b>4.5</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>131</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>132</b>
<b>6</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>150</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Illustration humaner „roter Körperchen“ angefertigt von Antoni van Leeuwenhoek.....	20
Abbildung 2: Topografische Scans humaner Erythrozyten in physiologischer Lösung aufgenommen mittels Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie .....	23
Abbildung 3: Interaktion von roten Blutzellen mit einer zentralen Makrophage in der Milz....	25
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Erythrozytenmembran mit Membranproteinen und Anteilen des Zytoskeletts .....	26
Abbildung 5: Zusammenstellung einiger ausgewählter Enzyme in Erythrozyten mit Aktivierungs-benötigter $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.....	29
Abbildung 6: Schematische Darstellung des LPA Signalwegs in Erythrozyten .....	32
Abbildung 7: Pathobiologie der Hereditären Sphärozytose .....	34
Abbildung 8: Übersicht über die Hauptstoffwechselwege in Erythrozyten .....	36
Abbildung 9: Jablonski-Diagramm .....	46
Abbildung 10: Strukturformeln der $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren Fluo-3 und Fluo-4.....	47
Abbildung 11: Fluoreszenzspektren der Membranfarbstoffe PKH26 und PKH67 mit Anregungs- und Emissionsmaxima .....	48
Abbildung 12: Strukturformel der PKH-Farbstoffe mit Einlagerungsmechanismus in die Membran.....	48
Abbildung 13: Strukturformel des Sulfo-NHS-SS-Biotin Moleküls. ....	49
Abbildung 14: Anregungs- und Emissionsspektren der Fluorophore PE und APC-Cy7.....	50
Abbildung 15: Anregungs- und Emissionsspektren der Fluorophore Hoechst 33258 und FITC .....	50
Abbildung 16: Bildliche Darstellung des Prinzips der Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie. ....	54
Abbildung 17: Schematische Zeichnung der Blutgefäße, die zum retrobulbären Venenplexus der Maus führen.....	59
Abbildung 18: Schematische Darstellung der retrobulbären Injektionsmethode.....	60
Abbildung 19: Schematisches Kreuzungsschema zur Generierung der <i>R26-tdRFP-CMV-TRPC6<sup>-/-</sup></i> Maus. ....	61
Abbildung 20: Beispielhafte Auswertung der Fluo-4 Emission und grafische Darstellung als $F/F_0$ mittels ImageJ und IgorPro .....	68
Abbildung 21: Bildliche Zusammenfassung einer Auswertung mittels Arivis Vision 4D.....	70
Abbildung 22: Beispielhafte mikroskopische Aufnahmen von Patienten sowie Kontrollerythrozyten gesunder Spender nach Beladung mit dem $\text{Ca}^{2+}$ -Farbstoff Fluo-4 AM.....	72



Abbildung 23: Vergleich der Auswertung der mikroskopischen Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-4 gefärbten Erythrozyten mittels ImageJ und Arivis Vision 4D.....	73
Abbildung 24: Auswertung der mikroskopischen Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-4 gefärbten Erythrozyten humaner gesunder Blutspender sowie HS Patienten.....	75
Abbildung 25: Auswertung der mikroskopischen Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-4 gefärbten Erythrozyten humaner gesunder Blutspender sowie HX Patienten.....	76
Abbildung 26: Auswertung der mikroskopischen Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-4 gefärbten Erythrozyten humaner gesunder Blutspender sowie Anämie Patienten.....	77
Abbildung 27: Patienten-basierte statistische Auswertung der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration.....	78
Abbildung 28: Auswertung der mikroskopischen Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-4 beladenen Erythrozyten aus frischen Blutproben humaner gesunder Spender sowie Patienten mit Hereditärer Sphärozytose.....	79
Abbildung 29: Mikroskopische und durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration von Kontrollblut sowie Blutproben der <i>Gardos-Channelopathie</i> Patienten I.1 und I.2.....	80
Abbildung 30: Mikroskopische und durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration von Kontrollblut sowie Blutproben der <i>Gardos-Channelopathie</i> Patienten II.4 und III.1.....	81
Abbildung 31: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen $Ca^{2+}$ -Einstroms in humanen Erythrozyten nach Verwedung von Gö6976, FK506 und Cyclosporin A.....	83
Abbildung 32: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen $Ca^{2+}$ -Einstroms in murinen Erythrozyten nach Verwedung von Gö6976 und FK506.....	84
Abbildung 33: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen $Ca^{2+}$ -Einstroms in murinen Erythrozyten nach Verwedung von Cyclosporin A.....	85
Abbildung 34: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen $Ca^{2+}$ -Einstroms in Erythrozyten nach Verwedung von GsMTx-4.....	86
Abbildung 35: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen $Ca^{2+}$ -Einstroms humaner Erythrozyten nach Verwedung von Larixylacetat und SAR7334.....	87
Abbildung 36: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen $Ca^{2+}$ -Einstroms in murinen Erythrozyten nach Verwedung Larixylacetat und SAR7334.....	88
Abbildung 37: Auswertung der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Analyse <i>in vivo</i> -biotinylierter und unbiotinylierter muriner Erythrozyten nach Streptavidin-PE Färbung.....	89
Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der tdRFP-Expression in verschiedenen Organen einer RFP <sup>+/+</sup> Maus und einer Wildtyp Maus.....	91

Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener Knochenmarkszellen einer RFP <sup>+/+</sup> Maus nach Gegenfärbung mit Ter119-FITC und Hoechst 33258 .....	91
Abbildung 40: Zusammenstellung der Erythrozytenparameter und Indizes muriner Blutproben von RFP <sup>+/-</sup> , RFP <sup>+/+</sup> und RFP <sup>-/-</sup> Mäusen.....	92
Abbildung 41: Konfokalmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen der Erythrozyten einer R26-tdRFP-CMV Maus .....	93
Abbildung 42: Durchflusszytometrische Analyse von Wildtyp und R26-tdRFP-CMV Mäusen. ....	94
Abbildung 43: Verschiedene durchflusszytometrische Analysen von Erythrozyten der Mäuse der Linie R26-tdRFP-CMV .....	95
Abbildung 44: Zell-basierte Auswertung der mikroskopischen Analyse des maximalen Ca <sup>2+</sup> -Einstroms nach Stimulation mit LPA in murinen Erythrozyten von TRPC6 <sup>-/-</sup> Mäusen, TRPC6 <sup>-/-</sup> Mäusen nach PKH26 Färbung und Transfusion und Wildtyp-Mäusen. ....	97
Abbildung 45: Zell-basierte Auswertung der mikroskopischen Analyse des maximalen Ca <sup>2+</sup> -Einstroms nach Stimulation mit LPA in murinen Erythrozyten von TRPC6 <sup>-/-</sup> Mäusen, RFP <sup>+/+</sup> -TRPC6 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Transfusion und Wildtyp Mäusen .....	98
Abbildung 46: Zell-basierte Auswertung der mikroskopischen Analyse des maximalen Ca <sup>2+</sup> -Einstroms nach Stimulation mit LPA in murinen Erythrozyten von TRPC6 <sup>-/-</sup> Mäusen, RFP <sup>+/+</sup> -TRPC6 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Transfusion in splenektomierte Wildtyp Mäuse und Wildtyp Mäusen .....	99
Abbildung 47: Maus-basierte Auswertung der mikroskopischen Analyse des normierten maximalen Ca <sup>2+</sup> -Einstroms nach Stimulation mit LPA in Erythrozyten von TRPC6 <sup>-/-</sup> Mäusen, RFP <sup>+/+</sup> -TRPC6 <sup>-/-</sup> und PKH26-TRPC6 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Transfusion und Wildtyp Mäusen .....	100
Abbildung 48: Schematische Darstellung der möglichen zellulären Abläufe in Erythrozyten von Patienten mit Gardos-Channelopathie .....	107
Abbildung 49: Zusammenfassung der möglichen Mechanismen, die zur Pathophysiologie von Anämie Erkrankungen beitragen.....	110
Abbildung 50: Schematische Darstellung der PKC $\alpha$ -vermittelten Aktivierungskaskade von TRPC6. ....	112

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien. ....	41
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien. ....	43
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Software. ....	45
Tabelle 4: Aufbau der verwendeten Fluoreszenz-Filterwürfel. ....	52
Tabelle 5: Auflistung aller analysierter humaner Patienten. ....	55
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer zur Genotypisierung der <i>R26-tdRFP-CMV</i> und <i>R26-tdRFP-CMV-TRPC6<sup>-/-</sup></i> Mäuse mit Sequenzen. ....	62
Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für eine DNA-Probe. ....	63
Tabelle 8: Temperaturprotokoll der DreamTaq PCR. ....	63

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### A

A	Ampere
a. u.	„arbitrary unit“
AM	Acetomethyl
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat

### B

bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin

### C

Cl <sup>-</sup>	Chloridion
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
Ca-CaM	Ca <sup>2+</sup> -Calmodulin Komplex
CD	„cluster of differentiation“
CCD	„charged-coupled device“
CMV	Cytomegalievirus
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CsA	Cyclosporin A

### D

DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribunukleosidtriphosphate

### E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum

<i>et al.</i>	Und andere
<b>F</b>	
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKBP	FK506-Bindungsprotein
for	„forward“
<b>G</b>	
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Gauge
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
G6PD	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GCL	Glutamat-Cystein-Ligase
GSR	Glutathiondisulfid-Reduktase
<b>H</b>	
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HS	Hereditäre Sphärozytose
HX	Hereditäre Xerozytose
Hz	Hertz
<b>I</b>	
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICU	„imaging control unit“
i. p.	Intraperitoneale Injektion
IP <sub>3</sub>	Inositol-3-phosphat
<b>K</b>	
K <sup>+</sup>	Kaliumion
KCC1	Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> Cotransporter 1
Kd	Dissoziationskonstante
KO	Knockout
<b>L</b>	
LED	Leuchtdiode

LPA	Lysophosphatidsäure
<b>M</b>	
M	Molar
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MCH	Mittlerer zellulärer Hämoglobingehalt
MCHC	Mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MEK	Mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase
<b>N</b>	
n	Anzahl der Proben
N-Terminus	Amino-Terminus
Na <sup>+</sup>	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NGS	„Next Generation Sequencing“
NHE1	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> - Austauscher 1
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKCC1	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup> Cotransporter 1
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
ns	Nicht signifikant
<b>P</b>	
p	Signifikanzwert
p-MAPK	Phosphorylierte Mitogenaktivierte Proteinkinase
PBS	Phosphatgepufferte Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin oder Phycoerythrin
pH	Potentia Hyrogenii (negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PI	Phosphatidylinositol
PI <sub>3</sub> K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMCA	Plasmamembran Ca <sup>2+</sup> -ATPase

PS	Phosphatidylserin
PTX	Pertussis-Toxin
<b>R</b>	
RBC	„red blood cell“
rev	„reverse“
RhAG	Rhesus-assoziiertes Glykoprotein
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	„region of interest“
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>S</b>	
SICM	„scanning ion conductance microscopy“
SM	Sphingomyelin
SPF	Spezifisch pathogenfrei
<b>T</b>	
tdRFP	Tandem-Dimer RFP
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TRPC	„transient receptor potential classical“
TRPC6 <sup>-/-</sup>	TRPC6 defizient
<b>V</b>	
V	Volt
VDAC	„voltage dependent anion channel“
<b>W</b>	
WT	Wildtyp
<b>Z</b>	
z. B.	zum Beispiel
<b>Sonstiges</b>	
°C	Grad Celsius
%	Prozent
2,3-DPG	2,3 -Diphosphoglycerat

## ZUSAMMENFASSUNG

Calcium übernimmt in Erythrozyten, wie auch in vielen anderen Zellen, die wichtige Rolle eines sekundären Botenstoffs. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum besseren Verständnis dieser Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie von Erythrozyten beizutragen. Daher wurden im ersten Teilprojekt dieser Arbeit Untersuchungen gemacht zum intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt humaner pathologischer Erythrozyten von Patienten mit seltenen hämolytischen Erkrankungen. Es konnte festgestellt werden, dass Erythrozyten von Patienten mit Hereditärer Sphärozytose, Hereditärer Xerozytose und Gardos-*Channelopathie* signifikant erhöhte Werte an freiem intrazellulärem Calcium im Vergleich zu Erythrozyten gesunder Kontrollblutspendern aufweisen. Für die ebenfalls untersuchten Patienten mit Enzymopathien und uncharakterisierter hämolytischer Anämie wurde keine eindeutige Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gefunden. Zusammen mit weiteren Daten aus der Literatur deuten diese Resultate darauf hin, dass ein erhöhter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in Erythrozyten ursächlich für den verfrühten Abbau der Zellen in hämolytischen Krankheiten ist. Dieser Mechanismus scheint allgemein gültig sein, wobei sich der Signalweg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms für jede Erkrankung unterscheidet. Zur Entwicklung neuer Medikamente, die auf eine Inhibition dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms als bessere Therapiemöglichkeit anämischer Patienten abzielen, bedarf es jedoch weiterer Forschung.

Das zweite Teilprojekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Lysophosphatidsäure Signalweg, der in murinen und humanen Erythrozyten zu einem Einstrom von extrazellulärem Calcium in die Zellen führt. Diese Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts steht in Verbindung mit der Aggregation der Erythrozyten als aktiver Teil der Blutgerinnung. Der Lysophosphatidsäure Signalweg ist daher auch zur Behandlung von Thrombosen von pharmakologischem Interesse. Im Detail zeigen die an humanen und murinen Erythrozyten durchgeführten Untersuchungen zum Signalweg, dass die Aktivität des am Signalweg beteiligten TRPC6 Kanals, neben der  $\text{PKC}\alpha$ , durch einen Komplex aus FKB12 und Calcineurin reguliert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche mechanosensitive Komponente im Signalweg existiert. Ob es sich dabei um den Kanal Piezo1 handelt, muss in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

Auf Basis des Lysophosphatidsäure Signalweges wurde im dritten Teilprojekt die Herkunft des TRPC6 Kanals in der Membran von Erythrozyten untersucht. Für humane Erythrozyten lässt sich der Kanal weder auf Proteom- noch Transkriptomebene detektieren. Auch funktionell kann TRPC6 nur in Erythrozyten, nicht in Retikulozyten nachgewiesen werden. Als Hypothese dieses Projekts wurde untersucht, ob es zu einem Transfer des Kanals von anderen Zellen auf Erythrozyten kommt. Dazu wurden Transfusionsversuche von Erythrozyten aus TRPC6 Knockout Mäusen in Wildtyp Mäuse durchgeführt. Anschließend



wurde zur Beobachtung eines möglichen Proteinaustauschs der Lysophosphatidsäure-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in den transfundierten Erythrozyten untersucht. Als Grundlage hierfür wurden mehrere Ansätze zur Markierung von Erythrozyten vor der Transfusion getestet. Die Methode der *in vivo*-Biotinylierung zeigte sich nicht als geeignet zur mikroskopischen Detektion markierter Erythrozyten nach Transfusion. Eine Markierung der Zellen mittels Membranfarbstoffen als auch eine endogene Markierung der Zellen durch Expression eines Fluoreszenzproteins waren hingegen erfolgreich. Durchgeführte Transfusionsversuche auf Basis beider Methoden zeigten einen Anstieg des Lysophosphatidsäure-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in TRPC6-Knockout Erythrozyten nach Transfusion. Hierdurch kann auf einen Transfer des TRPC6 Kanals in die Membran der Knockout Erythrozyten von Zellen der Wildtyp Maus geschlossen werden. Der Transfer scheint dabei vermehrt oder ausschließlich bei Retikulozyten vorzukommen. Eine Beteiligung der Milz an diesem Transfer wurde ebenfalls untersucht, konnte jedoch nicht belegt werden. Zum Ablauf, Ort und weiterem Verständnis des Proteintransfer müssen zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. Ebenfalls soll die Frage geklärt werden, ob ein Austausch von Proteinen auch bei humanen roten Blutzellen auftritt.

## SUMMARY

### ***Studies on the regulation of intracellular calcium in physiology and pathophysiology of human and murine red blood cells***

Calcium plays an important role as a second messenger, in red blood cells as well as in many other cell types. The aim of this study was to contribute to a further understanding of this role in the physiology and pathophysiology of red blood cells. In the first part of this thesis, pathologic human red blood cells from patients with rare hereditary anemias were analyzed for their intracellular calcium content. The results of this study showed that red blood cells from patients with hereditary spherocytosis, hereditary xerocytosis and Gardos channelopathy have significantly increased levels of free intracellular calcium in comparison to red blood cells from healthy donors. For patients with enzymopathies and uncharacterized hemolytic anemia there was no clear change in the intracellular calcium. Together with data from the literature, these findings indicate that an increased intracellular calcium content might be responsible for the premature elimination of red blood cells from the blood stream. This mechanism seems to have to a general scope with different pathways of calcium entry in different diseases. More research is needed for the development of drugs aiming on the inhibition of this calcium increase.

The second part of this thesis deals with the lysophosphatidic acid signaling pathway, which leads to an uptake of extracellular calcium in human and murine red blood cells. This increase in intracellular calcium is associated with an aggregation of red blood cells as an active part in thrombus formation. The lysophosphatidic acid signaling pathway is therefore also an interesting pharmacological target for the treatment of thrombosis. The results of the experiments on murine and human red blood cells show, that TRPC6, a channel involved in this pathway, is regulated by PKC $\alpha$  and a protein complex consisting of FKB12 and calcineurin. Furthermore, the results hint to the involvement of a mechanosensitive channel in the signaling cascade. To confirm that this channel is Piezo1, further research needs to be done.

Based on the lysophosphatidic acid signaling pathway, the origin of the TRPC6 channel in the membrane of red blood cells was explored in the third part of this thesis. For human red blood cells, it was not yet possible to detect the channel on a proteome- or transcriptome level. Functional evidence is also limited to mature red blood cells and missing in reticulocytes. As a hypothesis of this project, a possible transfer of the channel between red blood cells and other cell types was investigated. For this purpose, transfusion experiments of red blood cells from TRPC6 knockout mice to wildtype mice were performed. Subsequently, the lysophosphatidic acid induced calcium entry was analyzed in the

transfused cells to visualize the potential transfer of the channel. Beforehand, several methods to label red blood cells for transfusion were tested. The method of *in vivo* biotinylation was not suitable for the microscopic detection of the cells after transfusion. Labeling the cells with membrane dyes as well as the endogenous expression of a fluorescent protein were successful. The results from the transfusion experiments based on both labeling methods showed an increase in the lysophosphatidic acid induced calcium signal in TRPC6 knockout cells after transfusion. From these results, it can be concluded that there is a transfer of the channel to the membrane of TRPC6 knockout red blood cells from cells of the wildtype mouse. This transfer seems to occur enhanced or exclusively in reticulocytes. The contribution of the spleen in this process was analyzed but could not be proven. More research is needed to resolve further questions, especially whether a transfer of proteins also occurs in human red blood cells.

## 1 EINLEITUNG

Die erste belegte Entdeckung roter Blutzellen (RBCs, „red blood cells“) machte Jan Swammerdam im Jahr 1658 im Blut eines Frosches, eine erste genauere Beschreibung der Form und Größe von Erythrozyten stammt von Antoni van Leeuwenhoek (Hajdu, 2003; van Leeuwenhoek, 1695). Dieser führte mithilfe selbstgebaute Mikroskope Untersuchungen an seinem eigenen Blut durch und entdeckte dabei „rote Körperchen“. Er beschrieb ihre Form fälschlicherweise als rund, erkannte aber bereits damals, dass Erythrozyten in der Lage sein müssen ihre Form zu verändern, wenn sie sich durch die Kapillaren des Blutkreislaufes bewegen (Mohandas and Gallagher, 2008; van Leeuwenhoek, 1675). Abbildung 1 zeigt eine von ihm angefertigte Darstellung der „roten Körperchen“.



Abbildung 1: Illustration humaner „roter Körperchen“ angefertigt von Antoni van Leeuwenhoek. Abbildung aus (van Leeuwenhoek, 1695).

Eine Beschreibung der weiteren korpuskulären Bestandteile des Blutes, der Leukozyten und Thrombozyten, wurde erst knapp 200 Jahre später publiziert. Zeitgleich entstand Mitte des 19. Jahrhunderts das Feld der Hämatologie als eigenständige Disziplin in der Medizin (Ness and Stengle, 1974). Ein Meilenstein in dieser Entwicklung war ein 1844 von Gabriel Andral veröffentlichtes Essay über das „Blut in Krankheit“. Darin unternimmt er den Versuch, die Komponenten des Blutes mit Normalwerten zu beschreiben und Blutkrankheiten in verschiedene Klassen einzuteilen (Andral, 1844; Ness and Stengle, 1974). Erfolgreich wurde die Differenzierung der Leukozyten jedoch erst nach Entwicklung verschiedener Färbetechniken, die es ermöglichten ein Differentialblutbild zu erstellen. Vorreiter in dieser Methodik war Paul Ehrlich (Ehrlich, 1880; Hajdu, 2003), der durch die Verwendung verschiedener saurer und basischer Farbstoffe einzelne Leukozytenklassen anhand ihrer Morphologie und spezifischen Anfärbung unterscheiden konnte. Eine noch heute in der Hämatologie verwendete Weiterentwicklung dieser Färbetechnik geht zurück auf Arthur Pappenheim (Riedelsheimer and Büchl-Zimmermann, 2015). Das Gebiet der Transfusionsmedizin wie wir es heute kennen fand seinen Ursprung zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Bluttransfusionen wurden zwar bereits 300 Jahre zuvor durchgeführt, doch erst nach der Entdeckung des ABO-Blutgruppensystems durch Karl Landsteiner gelang der Durchbruch (Thiele et al., 2010). Was damals als „*miracle of resurrection*“ bezeichnet wurde

(Lederer, 2008), ist heute Routine geworden. Doch damit verbunden sind noch immer dieselben Probleme: die Bereitstellung von genügend Blutkonserven, die Gewährleistung der Qualität einer Blutspende und die Minimierung der sogenannten „*storage lesions*“ oder Lagerungsschäden der Erythrozyten (Yoshida et al., 2019).

## 1.1 Blut

Menschliches Blut setzt sich zu ca. 55% aus Plasma, dem flüssigen Teil des Blutes und zu ca. 45% aus zellulären Bestandteilen zusammen (Faller and Schünke, 2016). Das Blutplasma wiederum besteht aus Wasser (90%) mit darin gelösten Substanzen, wie anorganischen Elektrolyten, Lipiden und Proteinen. Die Bluteiweiße lassen sich in zwei große Klassen unterteilen, die Albumine und die Globuline, zu deren Hauptaufgaben der Transport von wasserunlöslichen Stoffen, die humorale Immunantwort, die Blutgerinnung und die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks zählen (Silbernagl, 2012). Die korpuskulären Bestandteile bestehen aus drei Arten von Zelltypen: die Leukozyten, die sich ebenfalls in verschiedene Arten unterteilen lassen, die Blutplättchen und die Erythrozyten. Zu den Leukozyten zählen die drei großen Gruppen der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Ihre Aufgabe haben Leukozyten als Teil des Immunsystems, wobei Lymphozyten für eine spezifische Immunantwort verantwortlich sind, Monozyten und Granulozyten hingegen an der unspezifischen Erregerabwehr beteiligt sind (Jelkmann, 2010). Blutplättchen, häufig auch als Thrombozyten bezeichnet, sind kernlos und im eigentlichen Sinne keine Zellen mehr, da sie durch Abschnürung des Zytoplasma aus Vorläuferzellen des Knochenmarks entstehen (Munker, 2007). Verantwortlich sind Blutplättchen für die Hämostase und Koagulation des Blutes. Die dritte Art von Blutzellen, die mit über 99% die größte Zellpopulation bilden, sind die Erythrozyten. In der Hämatologie wird die Anzahl der Blutzellen durch die Erstellung eines kleinen Blutbildes ermittelt. Neben den Zellzahlen der Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten werden hier weitere Parameter bestimmt: Der Hämatokrit, der Aufschluss gibt über das Verhältnis des Volumens der gepackten Blutzellen zum Gesamtvolumen der Blutprobe, und die Hämoglobinkonzentration des Blutes. Aus diesen Werten werden zudem die Erythrozytenindizes berechnet. Dazu zählen das mittlere Zellvolumen (MCV), der mittlere zelluläre Hämoglobingehalt (MCH) und die mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration (MCHC). Das MCV, der ebenfalls gemessen werden kann, ergibt sich aus dem Hämatokrit und der Anzahl an Erythrozyten, der MCH aus dem Hämoglobin und der Anzahl an Erythrozyten, und der MCHC aus dem Quotient von Hämoglobin und Hämatokrit (Halwachs-Baumann, 2011). Zusammen mit dem eingangs erwähnten Differentialblutbild ergibt sich daraus das große Blutbild, das zur Diagnostik von Anämien und anderen Bluterkrankungen genutzt werden kann

## 1.2 Erythrozyten

Der Mensch besitzt pro Mikroliter Blut etwa  $5 \times 10^6$  Erythrozyten. Bei einem durchschnittlichen Blutvolumen von 5 Litern ist der Erythrozyt daher die am weitaus häufigsten vorkommende Zellart im menschlichen Körper (Silbernagl, 2012). Im Vergleich dazu finden sich bei Mäusen sogar bis zu  $14 \times 10^6$  Erythrozyten in einem Mikroliter Blut, hier variiert die Zahl jedoch sehr stark in Abhängigkeit der betrachteten Mauslinie (Burns and De Lannoy, 1966; Santos et al., 2016). Hauptaufgabe der roten Blutzellen aller Säugetiere ist der Gasaustausch zwischen Lunge und Gewebe, zudem tragen sie zur Pufferung des Blut pH-Wertes bei (Silbernagl, 2012). Dabei haben sie eine große Gemeinsamkeit: Im Gegensatz zu den Erythrozyten der anderen Klassen von Wirbeltieren besitzen sie keinen Zellkern (Brewer, 1974). Die normale Form eines Erythrozyten eines gesunden Menschen entspricht unter Ruhebedingungen, bei physiologischer Osmolarität und einem pH-Wert von 7,4 der eines Diskozyten (Lim et al., 2008) (Abbildung 2 A). Diese Form bietet den Zellen ein großes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis und durch die daraus bedingte kurze Diffusionsstrecke, einen effektiveren Gasaustausch (Plotnikov et al., 2006). Zum Transport von Sauerstoff benötigen Erythrozyten das Protein Hämoglobin, das etwa 30% der Masse eines Erythrozyten ausmacht (Jelkmann, 2010). Die durchschnittliche Ausdehnung eines Diskozyten beträgt 7 - 8  $\mu\text{m}$ , womit er wesentlich größer ist als die kleinsten Kapillaren im menschlichen Körper, die nur einen Durchmesser von 1,5  $\mu\text{m}$  besitzen. Die Fähigkeit diese trotzdem passieren zu können verdanken Erythrozyten ihrer hochelastischen Membran und starken Deformierbarkeit (Waugh et al., 1992). Zusätzlich dadurch können Erythrozyten, neben der Diskozytenform, auch andere Morphologien annehmen. Zum Beispiel kommt es unter hypotonischen Bedingungen, bedingt durch die osmotische Aufnahme von Wasser in die Zellen, zur Ausbildung von Stomatozyten oder Kugelzellen (Abbildung 2 B). Und umgekehrt ist es dem Erythrozyten unter hypertonen Bedingungen möglich, die Form eines Echinozyten anzunehmen. Dabei kommt es zur Ausbildung von stachelartigen Membranausstülpungen (Abbildung 2 C). Bis zu einem gewissen Grad sind diese Veränderungen reversibel (Lim et al., 2008). Abbildung 2 zeigt topografische Scans der zuvor genannten Morphologien, die mittels Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie aufgenommen wurden. Die Form des Diskozyten stellt zudem die optimale Form der Zelle *in vivo* im Blutfluss dar, da die Transformation zum Stomatozyten zu einer Behinderung der Passage von Kapillaren führt und die Transformation zum Echinozyten den Fluss in größeren Gefäßen durch Erhöhung der Blutviskosität stört (Dumez et al., 2004).

Häufig finden sich Veränderungen der Erythrozyten-Morphologie bei verschiedenen Bluterkrankungen, besonders Membranopathien. Damit einhergehend zeigen pathologische Erythrozyten auch eine verminderte Deformierbarkeit (Chien, 1987; Tomaiuolo, 2014).

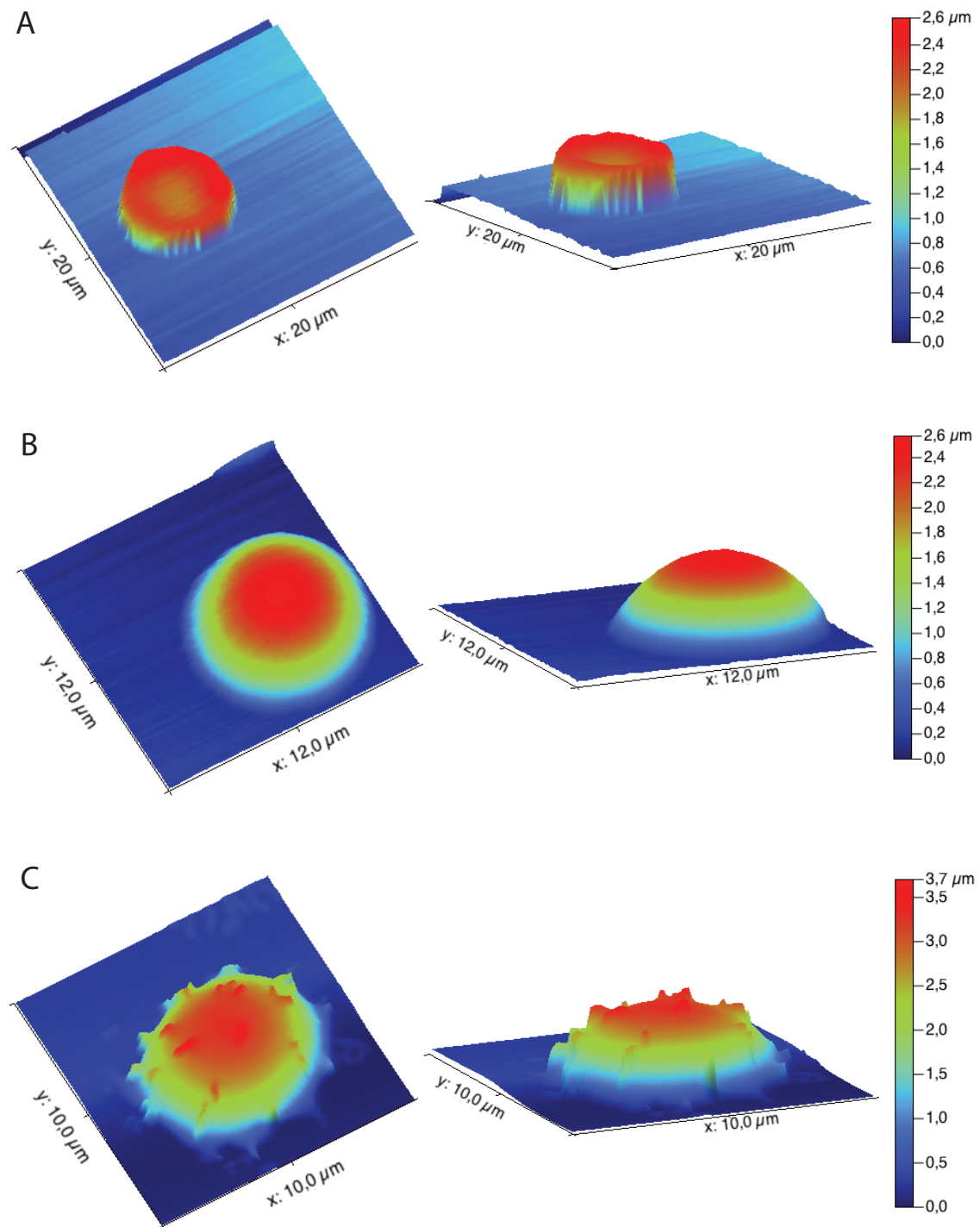


Abbildung 2: Topografische Scans humaner Erythrozyten in physiologischer Lösung aufgenommen mittels Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie. Zu erkennen sind verschiedene Zellmorphologien: Diskozyte (Panel A), Sphärozyte (Panel B), und Echinozyte (Panel C). Eigene Aufnahmen.

Die durchschnittliche Lebenserwartung eines menschlichen Erythrozyten beträgt 120 Tage, für murine Zellen etwa 50 Tage (Jelkmann, 2010; Khandelwal and Saxena, 2006). Pro Tag müssen daher 1 bis 2% neue Erythrozyten produziert werden, was beim Menschen einer Zahl von etwa 150 Millionen Zellen pro Minute entspricht. Die adulte Erythropoese findet bei Mensch und Maus im Knochenmark statt (Cumano and Godin, 2007). Hier entstehen aus den hämatopoetischen Stammzellen durch mehrere Differenzierungs- und

Expansionsschritte unreife Vorläuferzellen, die Retikulozyten (Dzierzak and Philipsen, 2013). Hauptsächlich wird die Erythropoese über das Hormon Erythropoetin reguliert, dass u. a. bei einer Sauerstoffunterversorgung im Gewebe hochreguliert wird (Haase, 2013). Die Erythropoese zeichnet sich durch einen steigenden Hämoglobingehalt der Zellen, bei gleichzeitiger Abnahme des Zellvolumens aus. Ein wichtiger Schritt im Verlauf der Erythropoese ist das Ausstoßen des Zellkerns, was den Differenzierungsschritt vom Erythroblast zum Retikulozyt darstellt. Ebenfalls kommt es zu einem Abbau der weiteren Zellorganellen wie Mitochondrien und ER. Retikulozyten, die noch Reste an RNA besitzen und Proteine translatieren, wandern nach ihrer Bildung im Knochenmark in den Blutstrom ein. Im Laufe weniger Tage reifen sie dort zu adulten Erythrozyten, in denen die Translation vollkommen zum Erliegen gekommen ist (Ney, 2011). Durch das Fehlen der Mitochondrien sind Erythrozyten zur Gewinnung von ATP einzig auf die anaerobe Glykolyse angewiesen, dementsprechend benötigen sie zur Energiegewinnung auch keinen Sauerstoff (Koralkova et al., 2014).

Im physiologischen Gleichgewichtszustand werden am Tag ebenso viele Erythrozyten eliminiert wie neu gebildet. Abgebaut werden die Zellen von Makrophagen hauptsächlich in Milz und Leber (Knutson and Wessling-Resnick, 2008). Die Aussortierung der Erythrozyten ist hier aufgrund der Beschaffenheit des venösen Systems, das aus vielen Sinusoiden besteht, besonders effektiv (Mebius and Kraal, 2005). Vor allem alte Erythrozyten, die an Deformierbarkeit verloren haben und bei dem Versuch die Endothelschlitze der Sinusoide zu durchqueren scheitern, werden aus dem Blutstrom gefiltert. Defekte in der Erythrozytenmembran, wie sie bei verschiedenen Bluterkrankungen vorkommen, haben ebenfalls Einfluss auf die Filtration und können zu einem verfrühten Abbau der Zellen führen (Li et al., 2018). Neben der mechanischen Filtration der Zellen, kommt es hier auch zu einer physikochemischen: Seneszente Erythrozyten werden über verschiedene Zelloberflächenmarker von den Makrophagen erkannt und aus dem Blutstrom entfernt (Lutz and Bogdanova, 2013). Als weitere Erkennungsmerkmale seneszenten Erythrozyten gelten u. a. eine Abnahme der Enzymaktivitäten und des ATP-Gehalts, eine Akkumulierung von Lipid-Peroxidationsprodukten, die Desialylierung von Glykoproteinen auf der Membran und die Aggregation von Bande 3 Protein (Thiagarajan and Prchal, 2016). Eine Darstellung der genaueren, bisher bekannten Interaktionen zwischen Makrophagen und Erythrozyten findet sich in Abbildung 3.



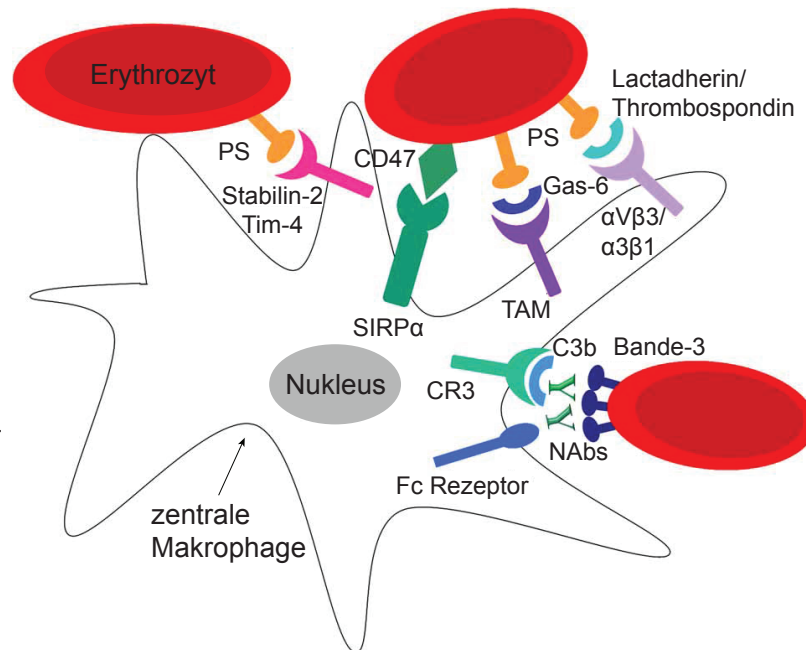


Abbildung 3: Interaktion von roten Blutzellen mit einer zentralen Makrophage in der Milz. Eine Erkennung von exponiertem PS auf der Erythrozytenmembran kann über Lactadherin, Gas-6 und TAM, sowie Stabilin-2 oder Tim-4 erfolgen. CD47 bindet an SIRP $\alpha$  in der Makrophagenmembran. NAbs bindet mit erhöhter Affinität an Bande 3 Protein-Gruppen, wird durch den Fc-Rezeptor und CR3 erkannt und aktiviert die Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose. Abbildung modifiziert nach (de Back et al., 2014).

### 1.3 Membran und Zytoskelett der Erythrozyten

Die Zellmembran der Erythrozyten ist wie jede andere Membran im menschlichen und tierischen Körper eine Lipiddoppelschicht. Aufgebaut ist sie aus Cholesterol und Phospholipiden, wobei letztere eine asymmetrische Verteilung über die Membran zeigen. Von den 4 Hauptkomponenten kommen Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) meist auf der äußeren Seite der Membran vor, wohingegen Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) eher auf der inneren Seite zu finden sind (Verkleij et al., 1973; Zwaal and Schroit, 1997). Zur Aufrechterhaltung dieser Verteilung tragen mehrere  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Enzyme bei, die als Lipidtransporter arbeiten: die Flippase, die Floppase und die Scramblase (Arashiki et al., 2016; Daleke, 2008). Ein Verlust der Asymmetrie, insbesondere die Exposition von PS führt u. a. zu einer raschen Aussortierung der Erythrozyten in der Milz, da PS als Erkennungsmerkmal für Phagozyten dient (Connor et al., 1994; Lauber et al., 2004). Physiologisch findet dieser Vorgang bei seneszenten Erythrozyten statt, wird aber auch in Verbindung gebracht mit dem verfrühten Abbau der Zellen bei hämolytischen Erkrankungen (Arashiki et al., 2016; Lutz and Bogdanova, 2013). Daneben interagiert PS mit Spektrin, einem Protein des Zytoskeletts und übernimmt dadurch eine Rolle in der Stabilität und Deformierbarkeit der Erythrozyten (Manno et al., 2002). In der Erythrozytenmembran finden sich zudem eine Vielzahl verschiedener Proteine, von denen etwa 50 genauer charakterisiert sind (Mohandas and Gallagher, 2008). Ein Großteil dieser Proteine lässt sich

als Blutgruppenantigene definieren. Das Vorkommen dieser Proteine in der Membran zeigt eine große Spannweite, so finden sich von Bande 3 Protein über 1 Millionen Kopien in jeder Zelle, vom Gardos-Kanal hingegen nur wenige einzelne bis etwa 50 pro Zelle (Grygorczyk et al., 1984; Wolff et al., 1988). Bande 3 Protein (*SLC4A1*) macht dementsprechend auch das Hauptmembranprotein der Erythrozyten aus. Funktionell besteht es aus zwei Einheiten: der C-Terminus bildet einen Anionenaustauscher hauptsächlich für Hydrogencarbonat und Chlorid, der N-Terminus dient als Bindungsstelle für verschiedene Enzyme sowie Proteine des Zytoskeletts (Lux, 2016). Weitere strukturell wichtige Membranproteine sind RhAG (Rhesus-assoziiertes Glykoprotein) und Glykophorin C. In Abbildung 4 ist eine schematische Darstellung der strukturellen Verknüpfungen der Membranproteine und des Zytoskeletts abgebildet.

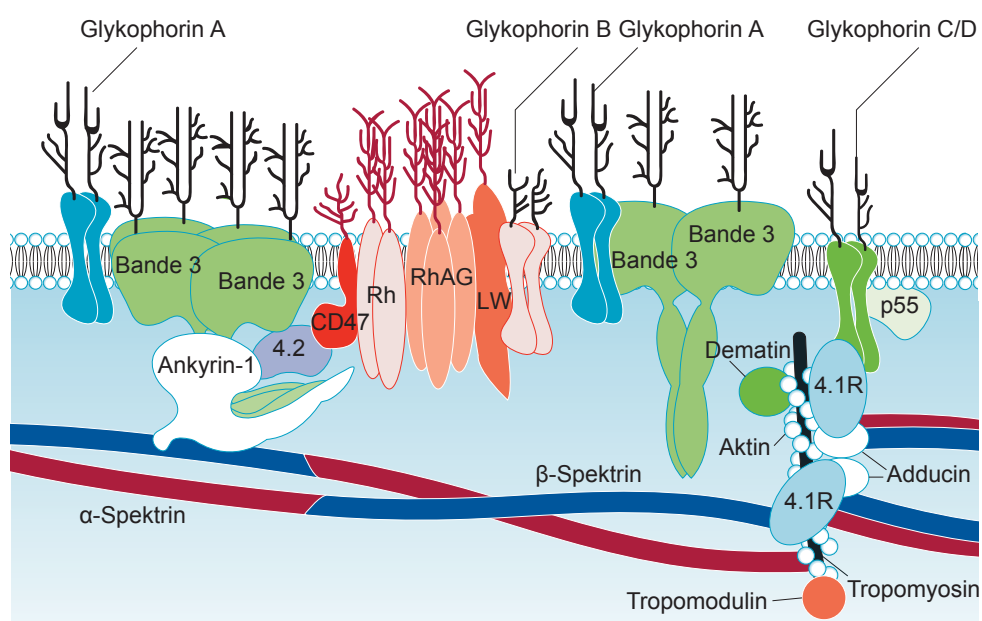


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Erythrozytenmembran mit Membranproteinen und Anteilen des Zytoskeletts. Abgebildet sind die beiden Hauptstrukturen: Der Ankyrin-Komplex (links) und der Actin-Junctional-Komplex (rechts). Der Ankyrin-Komplex besteht aus den Komponenten Bande 3 Protein, Rhesus-assoziiertes Glykoprotein (RhAG), Ankyrin, Protein 4.2 und ist über  $\beta$ -Spektrin mit dem Zytoskelett verbunden. Über eine Selbstassoziation von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektrin kommt es zu einer lateralen Organisation des Zytoskeletts, das zusätzlich über einen Komplex aus Glykophorin C/D (GPC/D), Protein 4.1R und Aktin an die Membran gebunden ist. Abbildung modifiziert nach (Perrotta et al., 2008) mit freundlicher Genehmigung des Verlages Elsevier.

Für die Struktur der Erythrozyten sind dabei zwei Makromolekülkomplexe ausschlaggebend. Bande 3 Protein und RhAG stellen über die vertikale Interaktion mit Ankyrin und Protein 4.2 eine Verbindung zu  $\beta$ -Spektrin her, und bilden so den Ankyrin-Komplex. Eine zweite Verbindung besteht aus Glykophorin C/D, Protein 4.1R und P55, die zusammen mit Aktin und Spektrin einen weiteren Komplex bilden. Ebenfalls wichtig für die laterale Organisation ist die Verbindung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektrin zu einem zweidimensionalen Netzwerk (An and Mohandas, 2008). Mutationen in den verschiedenen Strukturproteinen können zu hämolytischen Anämien wie der Sphärozytose oder der Elliptozytose führen.

## 1.4 Kationenkanäle in der Erythrozytenmembran

### ***Gardos-Kanal***

Der bekannteste Kanal in der Membran von Erythrozyten ist der Gardos-Kanal, dessen funktionelle Eigenschaften bereits in den 1950er Jahren beschrieben wurde (Gardos, 1958). Der Gardos-Kanal ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver  $\text{K}^+$ -Kanal. Über einer intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $2 \mu\text{M}$  kommt es zu einer Aktivierung des Kanals. Diese wird vermittelt durch die Interaktion von Calcium mit Calmodulin, welches an die vier Untereinheiten des Kanals gebunden ist (Maher and Kuchel, 2003; Rapetti-Mauss et al., 2015). Eine Öffnung des Kanals führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle und einem Ausstrom von  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und Wasser aus der Zelle. Damit einhergehend kommt es zu einer Verringerung des Volumens, die Zellen schrumpfen. Dieser Mechanismus ist vermutlich von physiologischer Bedeutung (Dyrda et al., 2010) aber auch an der Pathophysiologie der Sichelzellanämie beteiligt (Brugnara, 2003). Als molekulare Basis des Gardos-Kanals wurde das Gen *KCNN4* identifiziert (Hoffman et al., 2003).

### ***Nicht-selektive spannungsabhängige Kationenkanäle VDAC und Piezo1***

Da Erythrozyten keine intrazellulären Speicher für Calcium besitzen, kann ein Einstrom von Calcium ins Zytoplasma der Zellen ausschließlich über die Membran aus dem Blut erfolgen. Es wurden bisher mehrere  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanäle in der Erythrozytenmembran beschrieben. Dazu zählt ein nicht-selektiver, spannungsabhängiger Kationenkanal (Christophersen and Bennekou, 1991; Kaestner et al., 2000), dessen molekulare Identität bisher noch nicht genau geklärt wurde (Kaestner, 2011). In Frage kommt u. a. der spannungsabhängige Anionenkanal VDAC, der bei sehr negativen und sehr positiven Membranpotentialen ebenfalls permeabel für Kationen ist (Song et al., 1998) und dessen Expression in der Membran von Erythrozyten bereits gezeigt wurde (Bouyer et al., 2011). Als weiterer Kandidat wird der mechanosensitive Ionenkanal Piezo1 gehandelt (Kaestner and Egée, 2018), für den kürzlich auch ein spannungsabhängiger „Gating“-Mechanismus gezeigt werden konnte (Moroni et al., 2018). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es bei dem Passieren von kleinsten Kapillaren zu einem Piezo1-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Erythrozyten kommt (Danielczok et al., 2017) und die damit verbundene Volumenregulation der Zellen vermutlich die physiologische Rolle dieses Kanals in der Erythrozytenmembran widerspiegelt (Faucherre et al., 2014). Mutationen des Kanals führen zum Krankheitsbild der Hereditären Xerozytose, einer seltenen Form der hämolytischen Anämie (Zarychanski et al., 2012).

### **NMDA-Rezeptor**

Ein weiterer spannungsabhängiger nicht-selektiver Kationenkanal, der zusätzlich Liganden-gesteuert ist, ist der N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-R). Seine Expression konnte sowohl in Erythrozyten von Ratten als auch in menschlichen RBCs gezeigt werden (Makhro et al., 2010; 2013). Aktiviert werden kann dieser ionotrope Kanal, neben NMDA, durch Glutamat, Homocystein oder Homocysteinsäure. Glutamat spielt jedoch hauptsächlich in der neuronalen Rezeptoraktivierung eine Rolle, da die Plasmakonzentration zu niedrig ist um eine Aktivierung der Erythrozytenkanäle im Blut zu erzielen (Makhro et al., 2010). Der NMDA-Rezeptor zeigt eine 10-fach höhere Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  als für  $\text{Na}^+$ , weshalb es durch Ligandenbindung zu einem Einstrom von Calcium in die Zelle kommt. Eine erhöhte Expression von NMDA-Rezeptoren wurde in Erythrozyten von Sichelzellanämie Patienten gefunden (Hänggi et al., 2014).

### **Spannungsabhängiger $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal $\text{Ca}_v2.1$**

Ein ebenfalls in der Membran von Erythrozyten beschriebener Kanal ist  $\text{Ca}_v2.1$ . Dieser Kanal ist ein spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal vom Typ P/Q. Hinweise für seine Existenz gibt es sowohl auf molekularer (Western Blot) als auch auf funktioneller Ebene, da ein PMA-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Erythrozyten durch den für  $\text{Ca}_v2.1$  spezifischen Inhibitor  $\omega$ -Agatoxin TK geblockt werden kann (Andrews et al., 2002).

### **Nicht-selektiver $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler Kationenkanal TRPC6**

TRPC6 zählt zur Familie der „*classical/canonical transient receptor potential*“ Kanäle. Diese Familie umfasst sieben eng verwandte, nicht-selektive,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kationenkanäle (Abramowitz and Birnbaumer, 2009). In murinen Erythrozyten wurde die Expression von TRPC2, TRPC3 und TRPC6 beschrieben (Chu et al., 2004; Hirschler-Laszkiwicz et al., 2009), die dort beim Erythropoetin-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom eine Rolle spielen, der für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Erythrozyten wichtig ist. Eine Expression von TRPC6 konnte zudem in humanen Erythroblasten gezeigt werden. Ein molekularer Nachweis in differenzierten humanen Erythrozyten ist bisher nicht erfolgt, jedoch gibt es funktionelle Hinweise darauf, dass TRPC6 zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in humanen Zellen beiträgt (Föller et al., 2008). Nach Aktivierung ist TRPC6 permeabel für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cs}^{2+}$  (Hofmann et al., 1999). Bekannte Aktivatoren sind u. a. Diacylglycerol (DAG) (Estacion et al., 2006) und Hyperforin (Leuner et al., 2007). Daneben scheint sowohl die extra- als auch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration Einfluss auf die Aktivität des Kanals zu haben (Shi et al., 2004). Ebenso spielt die Proteinkinase C (PKC) eine bislang ungeklärte Rolle bei der Regulierung. Es wurde hier sowohl eine negative Regulierung des Kanals durch

Phosphorylierung beschrieben (Estacion et al., 2006), als auch eine Aktivierung von TRPC6 im Zusammenhang mit der Bildung eines Multiproteinkomplexes (Kim and Saffen, 2005).

## 1.5 Calcium in Erythrozyten

Wie in allen anderen Zelltypen, übernimmt Calcium auch in Erythrozyten die Rolle eines wichtigen Signalmoleküls (Bogdanova et al., 2013). Im Unterschied zu anderen Zellen besitzen ausgereifte Erythrozyten jedoch keine intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, da sie ihre Organellen im Laufe ihrer Differenzierung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen ausstoßen. Die freie physiologische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma humaner Erythrozyten wird auf 30 bis 60 nM geschätzt (Tiffert et al., 2003). Im Blutplasma dagegen findet sich Calcium in einer Gesamtkonzentration von etwa 2,6 mM, wovon jedoch nur die Hälfte ungebunden und biologisch aktiv ist (Hallbach, 2006). Dieser hohe Gradient zwischen Zytosol und Plasma wird aufrechterhalten durch die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA), die den einzigen aktiven Transportweg für Calcium bildet (Lew et al., 2003; Schatzmann, 1966). Von den vier existierenden genetischen Varianten dieses Enzyms finden sich die Isoformen PMCA1 und PMCA4 in der Membran von humanen Erythrozyten (Pasini et al., 2006; Strehler and Zacharias, 2001). Reguliert wird die PMCA u. a. durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin (Ca-CaM) Komplex und durch Calpain (Carafoli, 1992). Ca-CaM bindet C-terminal an die PMCA, wodurch es zur Aktivierung der Pumpe kommt. Calpain ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Protease, welche die Ca-CaM Bindestelle am C-Terminus der PMCA entfernt und dadurch deren auto-inhibitorische Funktion aufhebt. Eine „Überladung“ der Erythrozyten mit Calcium führt aufgrund der anhaltenden Aktivierung der PMCA sehr schnell zu einem Mangel an ATP (Bogdanova et al., 2013).

In Erythrozyten gibt es zudem eine Vielzahl  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Enzyme. Eine Zusammenstellung einiger ausgewählter Enzyme mit der zur Aktivierung benötigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration findet sich in Abbildung 5.

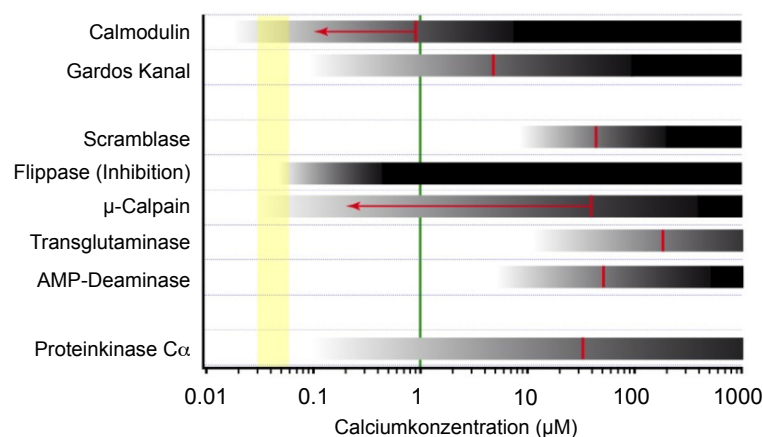


Abbildung 5: Zusammenstellung einiger ausgewählter Enzyme in Erythrozyten mit Aktivierungs-benötigter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Der gelbe Bereich zeigt die basale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Erythrozyten. Die grau/schwarzen Balken markieren das Aktivierungslevel der Proteine. Die Enzymaktivität steigt mit zunehmender

Intensität der Schwarzfärbung, dabei markiert die rote Linie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei halbmaximaler Aktivierung. In grün dargestellt ist zudem der *in vivo*  $K_D$  Wert von Fluo-4, einem häufig genutzten fluoreszenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator. Abbildung modifiziert nach (Bogdanova et al., 2013).

Das zuvor erwähnte zytosolische Protein Calmodulin zählt zur Familie der EF-Hand Proteine, die ihren Namen aufgrund des Aminosäuremotivs haben, über das sie Calcium binden (Piazza et al., 2017). Die Dissoziationskonstante des Proteins für Calcium liegt bei 920 nM (Jarret and Kyte, 1979). Eine Aktivierung des Calmodulins geht einher mit der Translokation des Proteins zur Plasmamembran. Neben der PMCA interagiert der Ca-CaM Komplex noch mit weiteren Proteinen, dazu zählen Elemente des Zytoskeletts, der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher NHE1 und die endotheliale NO-Synthase (Bogdanova et al., 2013). Ein wichtiges Protein des Zytoskeletts ist Bande 4.1R (siehe dazu Kapitel 1.3). Nach Bindung des Ca-CaM Komplexes sinkt die Affinität von Bande 4.1R für seine Interaktionspartner, wodurch sich die Strukturen des Zytoskeletts „lockern“ und instabil werden (Takakuwa, 2001). Ebenfalls löst sich 4.1R vom Membranprotein NHE1, wodurch es zu einer  $\text{PIP}_2$ -vermittelten Aktivierung dieses  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers kommt (Nunomura et al., 2012).

Durch Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird auch die Gruppe der klassischen Proteinkinasen C (PKC) aktiviert. Aus dieser Familie wird einzig die  $\text{PKC}\alpha$  in Erythrozyten exprimiert (Govekar and Zingde, 2001; Harper and Poole, 2010), die ab einer Konzentration von 35  $\mu\text{M}$  Calcium bindet. Nach Aktivierung transloziert das Protein aus dem Zytoplasma zur Plasmamembran (oder in den Zellkern) und phosphoryliert seine Zielproteine (Shoji et al., 1986). Dazu zählen neben der PMCA auch Proteine des Zytoskeletts wie Bande 4.1R (Gauthier et al., 2011) und  $\alpha$ -Adducin (George et al., 2010). Die Phosphorylierung dieser beiden Proteine führt ebenfalls zu einer Auflockerung des Zytoskeletts und Instabilität der Zelle. Für die  $\text{PKC}\alpha$  wurde zudem eine Regulation verschiedener Kanäle beschrieben. Die Kinase vermittelt einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Erythrozyten der mit dem Kanal  $\text{Ca}_v2.1$  assoziiert wurde (Andrews et al., 2002), allerdings führt die Aktivität der PKC nicht zu einer direkten Aktivierung des Kanals (Wagner-Britz et al., 2013). Für TRPC6 wurde sowohl eine Inhibition des Kanals nach Phosphorylierung durch  $\text{PKC}\alpha$  beobachtet (Bousquet et al., 2010), als auch eine Aktivierung (Kim and Saffen, 2005).

Weitere durch  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Proteine in Erythrozyten sind die Scramblase und die Flippase. Die Scramblase ist ein Lipidtransporter in der Membran, der durch sein EF-Hand Motiv auf Calcium reagiert (Zhou et al., 1997). Für die halbmaximale Aktivierung des Proteins ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zwischen 30 und 70  $\mu\text{M}$  nötig (Stout et al., 1998; Woon et al., 1999). Nach Aktivierung der Scramblase kommt es zu einem bidirektionalen, unspezifischen Transport von Lipiden zwischen Innen- und Außenseite der Membran, der zu einem Zusammenbruch der asymmetrischen Verteilung der Lipide führt (Bever and Williamson, 2010). Besonders kommt es dabei zur Exposition von PS auf der Außenseite der Membran, dem Erkennungssignal für Makrophagen. Neben der Aktivierung der Scramblase führt

Calcium zudem zu einer Inhibition der Flippase, einem Lipidtransporter, der PS von der Außenseite zurück zur Innenseite der Membran transportiert und somit für die Aufrechterhaltung der Asymmetrie verantwortlich ist (Arashiki et al., 2016). Ab einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 400 nM ist die Flippase fast vollständig inhibiert.

Eine Volumenregulation des Erythrozyten erfolgt ebenfalls über die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und den dadurch aktivierbaren Gardos-Kanal (siehe Kapitel 1.4).

Die Aktivierung der Protease  $\mu$ -Calpain ist eine weitere Folge eines erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels (Molinari et al., 1994). Diese geht einher mit der Translokation des Enzyms zur Plasmamembran, wo es seine Zielproteine spaltet. Dazu zählen u. a. die PMCA und die Proteine Bande 3, 4.1 oder 4.2 (Mortensen and Novak, 1992). Durch ein Aktivatorprotein wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Protease erhöht, weshalb es bereits bei einer Konzentration von 200 nM zu einer halb maximalen Aktivierung kommt (Salamino et al., 1993).

Über das intrazelluläre Calcium werden in Erythrozyten viele Prozesse reguliert, dazu zählen der Sauerstofftransport, die Rheologie der Erythrozyten, ihre Beteiligung an der Blutgerinnung, aber auch die Elimination seneszenten RBCs aus dem Blutstrom (Bogdanova et al., 2013). Ein permanent erhöhter basaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt hat für den Erythrozyten jedoch weitreichende Folgen. Beobachtet wurde dieses Phänomen bei verschiedenen hämolytischen Erkrankungen wie der Sichelzellanämie (Tiffert et al., 2003), der  $\beta$ -Thalassämie (Bookchin et al., 1988) oder dem Phosphofruktokinase-Mangel (Sabina et al., 2006).

## 1.6 Lysophosphatidsäure Signalweg

Einen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts kann bei Erythrozyten als Reaktion auf Lysophosphatidsäure (LPA) beobachtet werden (Yang et al., 2000). LPA ist ein „*second messenger*“, der u. a. von aktivierten Blutplättchen abgegeben wird und ein wichtiger Faktor bei der Thrombusbildung sowie Wundheilung ist (Eichholtz et al., 1993; Moolenaar, 1995). Extrazellulär interagiert LPA dabei mit einem LPA-Rezeptor in der Plasmamembran.

Die LPA Rezeptoren sind eine Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, von denen 6 Isoformen bekannt sind (Yung et al., 2014). Die Rezeptorfamilie zeigt eine ubiquitäre Expression und ist in verschiedene biologische Prozesse wie der Angiogenese, Neurogenese oder auch der Wundheilung involviert (Ishii et al., 2004). Nach Bindung des spezifischen Agonisten LPA an den Rezeptor erfolgt die intrazelluläre Signalweiterleitung über ein G-Protein. Das gekoppelte G-Protein kann je nach Signalweg ein  $G_{i/o}$ ,  $G_q$ ,  $G_{12/13}$ - oder auch  $G_s$ -Protein sein (Yanagida et al., 2013) In Erythrozyten konnte mittels Immunhistochemie und Western Blot eine Expression der LPA Rezeptor-Isoformen 1, 2 und 4 gezeigt werden. Die Signalweiterleitung erfolgt vermutlich über ein  $G_i$ -Protein, da sich

der LPA-induzierte  $Ca^{2+}$ -Einstrom in Erythrozyten durch den  $G_i$ -Protein Inhibitor Pertussis-Toxin (PTX) vollständig inhibieren lässt (Wang, 2013). Ebenfalls lässt sich der  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch  $\omega$ -Agatoxin TK inhibieren. Dieser Inhibitor ist spezifisch für den  $Ca_v2.1$  Kanal, wodurch eine Beteiligung des Kanals am LPA Signalwegs gezeigt werden konnte (Wagner-Britz et al., 2013). Die Signalübertragung von LPA Rezeptor zu  $Ca_v2.1$  erfolgt über  $PI_3K$  und Proteine des MAP-Kinase-Wegs. Durch den  $PI_3K$  Inhibitor sowie den MEK Inhibitor U0126 lässt sich eine Inhibierung des LPA-induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstroms erzielen, zudem ist die Aktivität von p-MAPK, dem katalytischen Produkt der MEK, erhöht in Erythrozyten, die zuvor mit LPA behandelt wurden (Wang, 2013).

Ebenso spielt die  $PKC\alpha$  eine Rolle im LPA Signalweg. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass  $PKC\alpha$  und  $Ca_v2.1$  unabhängig voneinander interagieren (Wagner-Britz et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass der LPA Signalweg aus zwei nebeneinander laufenden Kaskaden besteht. Auf einer Seite kommt es zur Aktivierung von  $Ca_v2.1$ , auf der anderen zur Öffnung des Kationenkanals TRPC6, was durch eine Reduktion des  $Ca^{2+}$ -Einstroms an LPA-behandelten Erythrozyten von TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden konnte. Die Aktivierung der zweiten Kaskade erfolgt vermutlich über die Spaltung von Phosphatidylinositol-2-phosphat ( $PIP_2$ ) durch die Phospholipase  $C_\beta$  (Smrcka, 2008). Die dabei entstehenden Spaltprodukte Inositol-3-phosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) vermitteln die Aktivierung der  $PKC\alpha$ , wodurch es am Ende der Signalkaskade zur Öffnung des TRPC6 Kanals kommt. Eine Funktion der  $PKC\alpha$  im Signalweg konnte durch den inhibitorischen Einfluss der  $PKC$  Antagonisten Gö6983 bzw. Gö6976 auf den LPA-induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstrom nachgewiesen werden (Wagner-Britz et al., 2013; Wang, 2013). Eine schematische Darstellung des Signalwegs und der beteiligten Enzyme und Kanäle zeigt Abbildung 6.

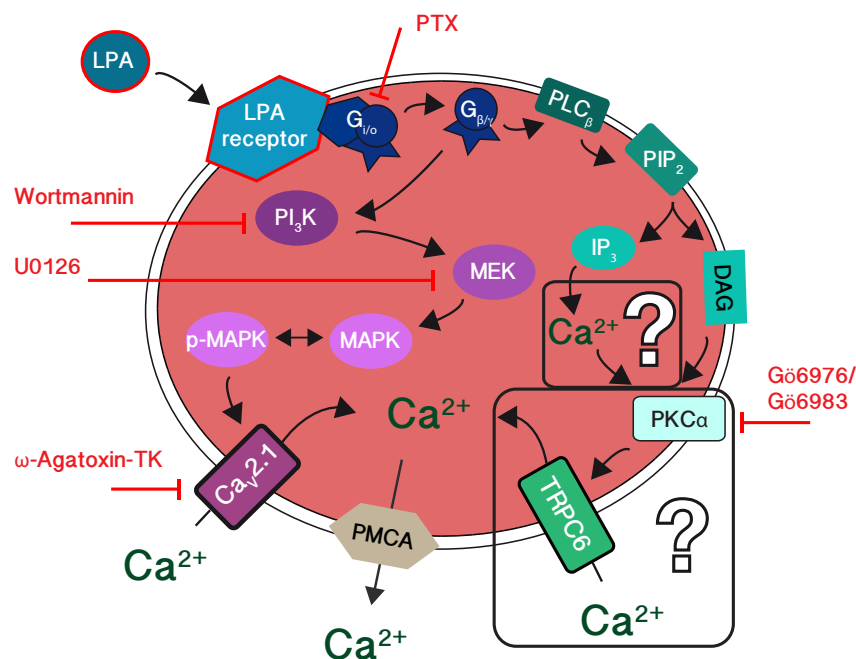


Abbildung 6: Schematische Darstellung des LPA Signalwegs in Erythrozyten. Durch Bindung von LPA an den membranständigen LPA Rezeptor kommt es zunächst zur Dissoziation der gekoppelten  $G_{i/o}$ -Protein-



Untereinheiten  $G_\alpha$  und  $G_{\beta\gamma}$ . Danach teilt sich der Signalweg in zwei Kaskaden. Auf einer Seite kommt es zur Aktivierung von  $PI_3K$ , MEK, MAPK und zu einem Einstrom von Calcium über  $Ca_v2.1$ . Als zweiter Kanal wird TRPC6 geöffnet über die Aktivierung von  $PLC_\beta$  und  $PKC\alpha$ . Fraglich ist weiterhin wie TRPC6 durch die  $PKC\alpha$  reguliert wird und woher das initiale Calcium stammt, das für die Aktivität der  $PKC\alpha$  notwendig ist.

Einige Fragen bezüglich des Ablaufs der Signalkaskade sind an dieser Stelle allerdings noch offen. So ist bisher noch unklar, wie genau es zur Öffnung des TRPC6 Kanals durch die  $PKC\alpha$  kommt. Eine  $PKC$ -vermittelte Phosphorylierung von TRPC6 wird in der Literatur mit einer Deaktivierung des Kanals in Verbindung gebracht (Bousquet et al., 2010). Ebenso stellt sich die Frage, wie es überhaupt zur Aktivierung der  $PKC\alpha$  kommt, da diese initial bereits Calcium benötigt. Das im Signalweg gebildete  $IP_3$  fungiert in anderen Zelltypen als  $Ca^{2+}$ -Mobilisierer: durch seine Bindung an den  $IP_3$  Rezeptor in der Membran des ERs kommt es zur Freisetzung des gespeicherten Calcium ins Zytoplasma (Mikoshiba, 2015). Da Erythrozyten keine intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher besitzen, muss das initiale Calcium über einen noch ungeklärten Mechanismus in die Zelle gelangen.

## 1.7 Hereditäre hämolytische Anämien

Eine Anämie ist definiert durch eine Verminderung des Hämoglobingehaltes im Blut unterhalb eines Normwertes (Blanc et al., 1968). Ursächlich dabei kann sowohl eine Abnahme der Erythrozytenzahl sein, als auch eine zu geringe Beladung der Zellen mit Hämoglobin (Jelkmann, 2010; McLean et al., 2009). Zu einer Abnahme der Erythrozytenzahl kann es durch starken Blutverlust, eine unzureichende oder gestörte Hämatopoese oder Hämolyse, einem beschleunigten Abbau der Zellen kommen (Ossendorf, 2003). Eine Hämolyse der Erythrozyten kann korpuskulär sowie extrakorpuskulär bedingt sein. Auf der Seite der korpuskulären Hämolyse stehen meist hereditäre Veränderungen der Erythrozyten, die sich in drei Gruppen einteilen lassen: Membrandefekte, Hämoglobindefekte oder Stoffwechseldefekte. Eine extrakorpuskuläre Hämolyse hingegen ist ein erworbener Defekt, der z. B. durch Infektionen wie Malaria, durch Antikörper, in Form einer Autoimmunerkrankung oder arzneimittelinduziert sein kann (Ossendorf, 2003). Beispiele für hereditäre Membrandefekte der Erythrozyten sind die Sphärozytose (Kugelzellanämie), Elliptozytose, Stomatozytose oder auch Xerozytose (dehydrierte Stomatozytose). Hämoglobinopathien betreffen schätzungsweise 7% der Weltbevölkerung und sind daher die häufigsten monogen-vererbten Erkrankungen (Kohne, 2011). Sie entstehen entweder durch eine gestörte Synthese des Hämoglobins, wie bei einer Thalassämie, oder, am Beispiel der Sichelzellanämie, durch Veränderungen der Hämoglobinstruktur. Zu den Enzymopathien zählen alle Erkrankungen der Erythrozyten, bei denen es durch genetische Defekte zu Störungen im Stoffwechsel der Zellen kommt.

### 1.7.1 Membranopathien

Als Membranopathien werden alle hämolytischen Erkrankungen zusammengefasst, die mit Mutationen in Strukturproteinen der Membran und des Zytoskeletts einhergehen. Daraus resultierend kommt es zu einer verringerten Membrankohäsion oder Stabilität, die mit einer verstärkten Vesikelbildung und dem Verlust von Membranoberfläche einhergeht (An and Mohandas, 2008). Eine hämolytische Anämie, durch die verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten ist eine weitere Folge. Die hereditäre Sphärozytose tritt dabei als häufigste Membranopathie auf. Bei Menschen mit nordeuropäischer Abstammung liegt die Inzidenz bei 1:2000 bis 1:5000 (Delaunay, 2002; Eber and Lux, 2004). In 75% der Fälle wird die Krankheit autosomal dominant vererbt, sie kann aber auch rezessiv oder mit einer *de novo* Mutation auftreten (Barcellini et al., 2011). Betroffen sind dabei Gene, die für die Strukturproteine Ankyrin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektrin, Bande 3 Protein, Protein 4.2 und RhAG kodieren. Eine Vielzahl verschiedener Mutationen sind bereits bekannt: der größte Anteil mit 30-65% machen Mutationen in *ANK-1* aus, *SLC4A1* ist zu 20-35% betroffen und *SPTB* zu 15-30%. Mutationen in den anderen Genen treten mit einer Häufigkeit von unter 5% auf (Da Costa et al., 2013). Defekte in den Strukturproteinen der Zelle führen zu einer defekten vertikalen Verknüpfung der Membran und des Zytoskeletts (Vergleich Abbildung 4). Die Instabilität der Membran und Verringerung der Membranoberfläche der Erythrozyten, führt zu einer vermehrten Bildung von Mikrovesikeln und damit einhergehend „dichten“ Zellen mit einer verringerten Deformierbarkeit (Da Costa et al., 2001). Die Morphologie der Zellen verändert sich dabei ebenfalls von einer Diskozytenform zu einer Sphärozytenform (An and Mohandas, 2008). Es erfolgt ein vermehrter Abbau der rigiden Sphärozyten in der Milz, weshalb auch bei Patienten mit schweren anämischen Symptomen eine Splenektomie durchgeführt wird (Eber and Lux, 2004). Eine Zusammenfassung der bekannten Mechanismen der Pathobiologie der hereditären Sphärozytose zeigt Abbildung 7.

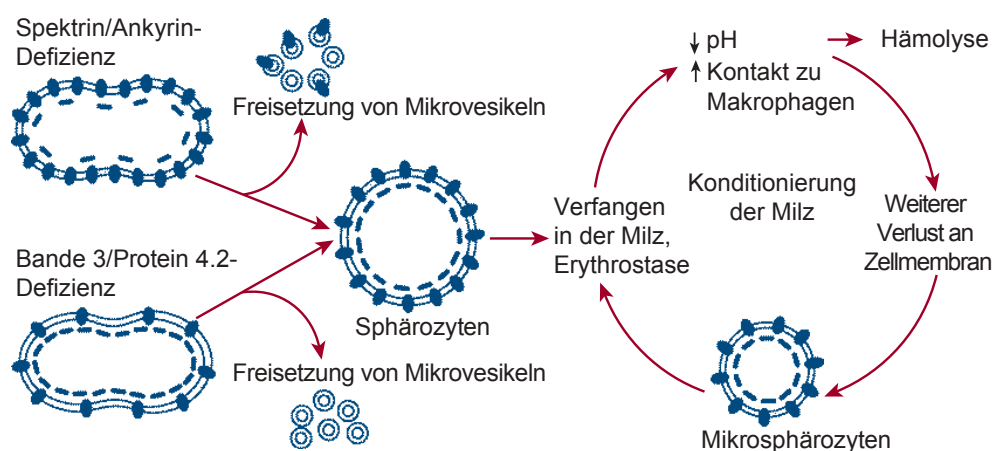


Abbildung 7: Pathobiologie der Hereditären Sphärozytose. Mutationen in den Proteinen Spektrin, Ankyrin, Bande 3 Protein oder Protein 4.2 führen zur Freisetzung von Mikrovesikeln. Der damit einhergehende Verlust an Membran und Zelloberfläche führt zur Bildung von Kugelzellen. Diese Sphärozyten bleiben aufgrund ihrer verminderten Deformierbarkeit vermehrt in der Milz hängen. Es kommt zu weiteren Schäden und Verlust an

Zellmembran, was endgültig in einer Hämolyse resultiert. Abbildung modifiziert nach (Coetzer, 2016) mit freundlicher Genehmigung des Verlages McGraw-Hill Education.

Mutationen, die einen Defekt der horizontalen Verknüpfung des Zytoskeletts und der Membran bewirken, z. B. in *EPB41*, führen zum Erkrankungsbild der Hereditären Elliptozytose (Andolfo et al., 2016).

Die Hereditäre Xerozytose ist eine Unterform der Stomatozytose, die mit einer Dehydrierung der Erythrozyten durch den Verlust an intrazellulären Kationen, hauptsächlich  $K^+$ , und Wasser einhergeht (Da Costa et al., 2013). Es handelt sich hierbei um eine sehr seltene Erkrankung, die mit einer Inzidenz von 1:50000 auftritt. Es wird jedoch vermutet, dass die wirkliche Zahl, bedingt durch Fehldiagnosen, wesentlich höher liegt (Kaufman et al., 2017). Ursächlich für die Entstehung der Xerozytose sind Mutationen im Gen *FAM38A* (*Piezo1*) (Andolfo et al., 2016; Zarychanski et al., 2012). Die meisten bisher bekannten Mutationen im *FAM38A* Gen bedingen einen „*gain-of-function*“ Phänotyp, wodurch es zu einer gesteigerten Permeabilität des *Piezo1* Kanals kommt (Albuisson et al., 2013; Glogowska et al., 2017). Durch diese erhöhte Permeabilität kommt es vermutlich zu einem Einstrom von Calcium in die Zellen, der Gardos-Kanal wird aktiviert, gefolgt von einem Ausstrom an  $K^+$  und Wasser (Gallagher, 2013). Mutationen im Gen *KCNN4* (Gardos-Kanal) wurden ebenfalls mit der Xerozytose in Verbindung gebracht, man geht jedoch mittlerweile von einem eigenständigen Krankheitsbild aus, der *Gardos-Channelopathie* (Fermo et al., 2017). Die mutierten Formen des Gardos-Kanals zeigen eine Hyperaktivierung, wodurch es ebenfalls zu einer Dehydrierung der Erythrozyten kommt (Fermo et al., 2017; Rapetti-Mauss et al., 2015). Die Vermutung liegt nahe, dass es ein physiologisches Zusammenspiel von *Piezo1* und Gardos-Kanal gibt, das essentiell für die Volumenregulation der Zellen ist (Andolfo et al., 2016; Kaestner et al., 2018).

### 1.7.2 Enzymopathien

Als Enzymopathien werden Erkrankungen der Erythrozyten zusammengefasst, bei denen es durch Mutationen in verschiedenen Enzymen zu Störungen im Stoffwechsel der Zellen kommt. Im Gegensatz zu den anderen genetischen Erkrankungen kommt es bei den Enzymopathien nicht zu einer morphologischen Veränderung der Erythrozyten. Daher wird das Krankheitsbild als hereditäre, nicht-sphärozytische, hämolytische Anämie bezeichnet (Koralkova et al., 2014). Da Erythrozyten im Laufe ihrer Differenzierung sowohl Nukleus als auch Organellen verlieren, reduziert sich ihr Stoffwechsel auf die anaerobe Glykolyse, den Pentosephosphatweg, den Rapoport-Luebering-Zyklus sowie den Glutathion- und Nukleotidstoffwechsel (Koralkova et al., 2014). Eine Übersicht der Stoffwechselwege und beteiligter Enzyme im Erythrozyten ist in Abbildung 8 dargestellt. Es sind Enzymdefekte in allen Stoffwechselwegen identifiziert worden (Jacobasch and Rapoport, 1996). Der am

häufigsten auftretende Enzymmangel ist der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)-Mangel, von dem mehr als 400 Millionen Fälle bekannt sind (Leopold and Loscalzo, 2005).

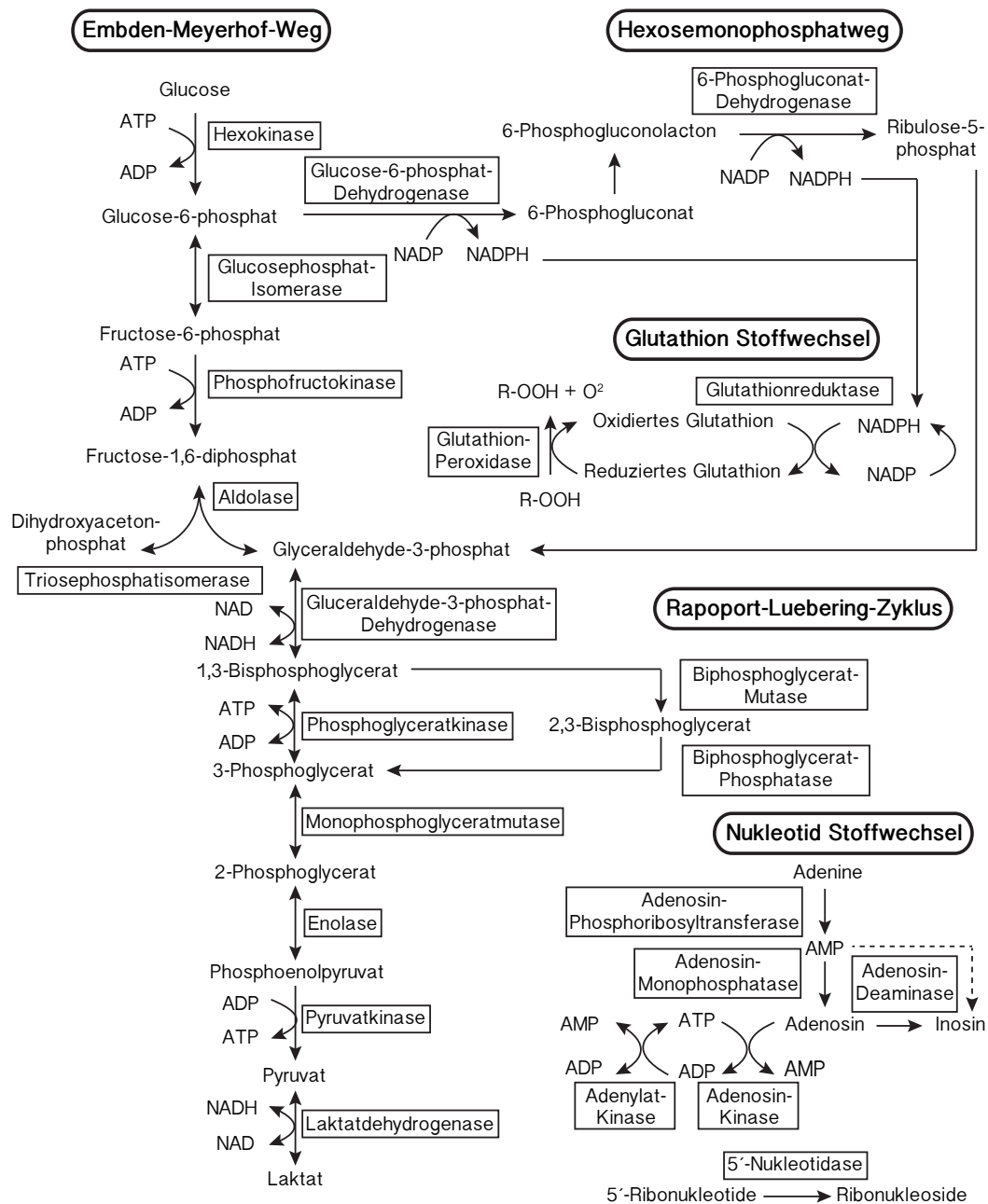


Abbildung 8: Übersicht über die Hauptstoffwechselwege in Erythrozyten: Die anaerobe Glykolyse (Embden-Meyerhof Weg), der Pentosephosphatweg, der Glutathionstoffwechsel, der Rapoport-Luebering-Zyklus und der Nukleotidstoffwechsel. Abbildung modifiziert nach (Koralkova et al., 2014) mit freundlicher Genehmigung des Verlages John Wiley and Sons.

Bei Mutations-bedingten Defekten in Enzymen, die relevant für den Ablauf der Glykolyse, der einzigen Möglichkeit zur Energiegewinnung der Zellen sind, kommt es zu einem ATP-Mangel im Erythrozyten. Als prominentestes Beispiel gilt hier der Pyruvatkinase-Mangel, der mit einer geschätzten Inzidenz von 1:20000 in der hellhäutigen Bevölkerung auftritt und bei dem es zudem zu einem Anstieg des intrazellulären 2,3-DPG kommt (Beutler and Gelbart, 2000). Ist der Glutathionstoffwechsel betroffen, steigt das Level an oxidativem Stress in den

Erythrozyten, da den Zellen reduziertes Glutathion zum Schutz der Makromoleküle, insbesondere des Hämoglobins, fehlt (van Zwieten et al., 2014). Enzymopathien werden generell über die Bestimmung der Enzymaktivität diagnostiziert und können auf genetischer Ebene gesichert werden (Kim et al., 2017). Es lässt sich meist kein Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp der Erkrankung, also dem Schweregrad der Anämie, ausmachen (Koralkova et al., 2014).

## 1.8 Trogozytose – Interzellulärer Transfer von Zelloberflächenproteinen

Als Trogozytose wird der Prozess des interzellulären Austauschs von Zelloberflächenproteinen bezeichnet. Dieses weit verbreitete Phänomen konnte bei verschiedenen Zelltypen der Leukozyten beobachtet werden, dazu zählen Monozyten, B-Zellen, T-Zellen sowie NK-Zellen (HoWangYin et al., 2010). Ebenfalls beschrieben wurde der Austausch von Proteinen zwischen Monozyten/Makrophagen und Tumorzellen (Beum et al., 2008), als auch ein homotypischer Austausch zwischen malignen Lymphomzellen untereinander (Poupot and Fournié, 2003). Wichtig scheint dieser Prozess insbesondere bei der Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen zu sein. Durch den Austausch von Zelloberflächenproteinen kann sich der Phänotyp einer Immunzelle ändern, weshalb vermutet wird, dass die Trogozytose zur Regulation der Immunantwort beiträgt (Davis, 2007). Diese Regulation kann sowohl stimulierend als auch inhibitorisch sein. Zunächst wurde von einem unidirektionalen Proteintransfer ausgegangen, es konnte jedoch gezeigt werden, dass es sowohl bei menschlichen als auch murinen Zellen zu einem bidirektionalen Austausch kommen kann (Ahmed et al., 2008). Die Auswahl der transferierten Proteine ist dabei jedoch nicht zufällig, sondern scheint von spezifischer Natur zu sein (Vanherberghen et al., 2004). Der genaue Ablauf der Trogozytose ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt Hinweise auf verschiedene Mechanismen, die zum Protein/Membranaustausch beitragen (Ahmed et al., 2008): (1) Nach T-Zell Rezeptor-vermittelter Interaktion kommt es zur Endozytose von Membranfragmenten und anschließendem *Recycling* und Präsentation der aufgenommenen Moleküle auf der Zelloberfläche. (2) Nach T-Zell Rezeptor-vermittelter Interaktion kommt es zum spontanen Aufbrechen des Zellkontaktes, wodurch Molekülkomplexe transferiert werden können. (3) Der Austausch von Membranproteinen erfolgt über die Sekretion und Aufnahme spezialisierter Vesikel wie Exosomen. (4) Ein Transfer der Proteine erfolgt durch Ausbildung von Membranschläuchen (*Nanotubes*) zwischen zwei Zellen.

Bisher gibt es in der Literatur keine Hinweise darauf, dass der Prozess der Trogozytose auch bei Erythrozyten auftritt. Beobachtet wurde allerdings ein Proteintransfer von Erythrozyten auf Modellmembranen (Newton and Huestis, 1988). Bei den transferierten Proteinen, für die dieses Phänomen beschrieben wurden, handelt es sich um den Anionentransporter Bande 3

Protein, Glykophorin, Acetylcholinesterase und Bande 7 Protein (Huestis and Newton, 1986). Auch ein umgekehrter Transfer von Bande 3 Protein-haltigen Liposomen in die Plasmamembran von Erythrozyten mit inaktiviertem Bande 3 Transporter ist möglich (Newton et al., 1983). Die Funktion und Orientierung des Transportes in der Membran bleiben dabei erhalten. Dieser Prozess findet vermutlich ohne Fusion der Vesikel mit der Zellmembran statt, sondern nur über den Kontakt der Membranen und einer kurzfristigen Verschmelzung der beiden äußeren Membranblätter (Huestis and Newton, 1986). Für die Selektion der transferierten Proteine scheint dabei die Zusammensetzung der Empfängermembran eine Rolle zu spielen: Cholesterol in der Membran erhöht den Transfer von Bande 3, bei Vorhandensein von anionischen Phospholipiden findet sich ein reduzierter Transfer (Waters et al., 1996). Bisherige Versuche zum Proteintransfer in Erythrozyten wurden nur *in vitro* durchgeführt. Hinweise darauf, dass dieser Prozess auch *in vivo* abläuft gibt es bis dato noch nicht.

## 1.9 Teilprojekte und Ziele dieser Arbeit

### ***Teilprojekt 1: Intrazelluläres Calcium in Erythrozyten von Patienten mit hereditären hämolytischen Anämien***

Das erste Teilprojekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit seltenen hämolytischen Anämien, im Speziellen mit dem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt pathologisch veränderter Erythrozyten. Hierzu wurden Blutproben von Patienten mit folgenden hämolytischen Erkrankungen untersucht: Hereditäre Sphärozytose, Hereditäre Xerozytose, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel,  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase-Mangel, Glutathiondisulfid-Reduktase-Mangel, Gardos-*Channelopathie* und uncharakterisierte hämolytische Anämie. Da die Blutproben aus verschiedenen Kliniken innerhalb Europas transportiert werden mussten, wurde zu jedem Patienten eine Kontrollblutprobe eines gesunden Spenders untersucht. Von verschiedenen anderen Anämien, wie z. B. der Sichelzellanämie, ist bekannt, dass in Erythrozyten dieser Patienten eine erhöhte basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vorliegt. Daher wurden mittels des fluoreszenten  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fluo-4 Untersuchungen zum intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Erythrozyten dieser Patienten gemacht. Durchgeführt wurden dazu fluoreszenzmikroskopische Einzelzellmessung sowie durchflusszytometrische Analysen. Die statistische Auswertung erfolgte jeweils im Vergleich zur transportierten gesunden Kontrollblutprobe für einzelne Patienten, bzw. gruppiert für Patienten mit gleicher Erkrankung.

**Fragestellung des Projekts: Ist das Ungleichgewicht in der intrazellulären Ionenhomöostase, insbesondere des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts, ein allgemeine Komponente in der Pathophysiologie hämolytischer Erkrankungen?**

**Teilprojekt 2: Der Lysophosphatidsäure Signalweg in humanen und murinen Erythrozyten**

In einem weiterem Teilprojekt dieser Arbeit wurde der LPA Signalweg in humanen und murinen Erythrozyten untersucht. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass es durch LPA zu einem konzentrationsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen kommt. Dieser Einstrom wird über eine zweiteilige Signalkaskade vermittelt. LPA interagiert zunächst mit dem G-Proteingekoppelten LPA Rezeptor auf der Zellmembran. Rezeptor-vermittelt kommt es anschließend über eine zelluläre Signaltransduktion zur Öffnung der beiden Ionenkanäle  $\text{Ca}_v2.1$  und TRPC6. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur genauen Aktivierung des TRPC6 Kanals durchgeführt. Dazu erfolgten fluoreszenzmikroskopische Einzelzellmessungen an humanen und murinen Erythrozyten mittels des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fluo-4, und es wurde der Einfluss verschiedener pharmakologischer Inhibitoren auf den LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom analysiert. Neben Wildtyp Erythrozyten wurden außerdem Versuche an Zellen von TRPC6-Knockout Mäusen durchgeführt, die aufgrund des fehlenden Kanals eine schwächere Reaktion auf die Stimulation mit LPA zeigen.

**Fragestellungen des Projekts: Wie vermittelt die  $\text{PKC}\alpha$  eine Aktivierung des TRPC6 Kanals und woher stammt das initiale Calcium, dass zur Aktivierung der  $\text{PKC}\alpha$  benötigt wird?**

**Teilprojekt 3: Transfusionsversuche am Modell der TRPC6<sup>-/-</sup> Maus**

Das letzte Teilprojekt dieser Arbeit behandelt einen möglichen Protein-/Membranaustausch von Erythrozyten untereinander oder mit anderen Zellen. Hinweise hierauf gab es aus verschiedenen Vorversuchen. Zum einen zeigen Retikulozyten einen geringeren LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom als ausdifferenzierte Erythrozyten. Zum anderen gibt es generell eine sehr große Varianz in der Reaktion der Zellen auf LPA: diese reicht von einem sehr starken Einstrom von Calcium mit verbundener Hämolyse, über einen nur transienten schwachen Einstrom bis hin zu keiner Reaktion. Dies spricht dafür, dass die am Signalweg beteiligten Enzyme oder Kanäle in Retikulozyten in geringerer Anzahl und in Erythrozyten mit unterschiedlicher Anzahl vorliegen. Des Weiteren zeigt eine eigene Transkriptomanalyse, dass am Signalweg beteiligte Enzyme teilweise nicht in humanen Retikulozyten exprimiert werden, dazu zählt u. a. auch TRPC6. Für murine Erythrozyten konnte der Kanal auf

Proteinebene bereits nachgewiesen werden, für humane Erythrozyten ist dieser Nachweis bisher noch nicht möglich gewesen.

Zur Untersuchung, ob es zu einem Transfer des TRPC6 Kanals zwischen Erythrozyten kommt, wurden Transfusionsversuche durchgeführt und auf Basis des LPA Signalweges in TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen analysiert. Dabei wurde sich zu Nutze gemacht, dass Erythrozyten dieser Mauslinie einen geringeren LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom als Erythrozyten einer Wildtyp Maus zeigen. Kommt es nach Transfusion zu einem Transfer des TRPC6 Kanals sollten sich daher Änderungen im LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom der transfundierten Zellen feststellen lassen. Im Rahmen dieses Teilprojektes wurden ebenfalls verschiedene Methoden zur Markierung und Detektion von Erythrozyten als Voraussetzung für eine Transfusion getestet.

**Fragestellung des Projekts: Erfolgt ein Transfer des TRPC6 Kanals von Wildtyp Zellen auf Erythrozyten der TRCP6<sup>-/-</sup> Maus und kann dieser Transfer mittels des Lysophosphatidsäure-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms visualisiert werden?**



## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller	Stockkonzentration
Agarose LE	Biozym Scientific, Deutschland	
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, USA	2% in PBS
CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth, Deutschland	1 M in Aqua dest.
Cell-Tak	Corning, USA	
Cyclosporin A	Tocris, Vereinigtes Königreich	1 mM in DMSO
Diluent C	Sigma-Aldrich, USA	
DirectPCR Lysis Reagent	Viagen Biotech, USA	
DMSO	Carl Roth, Deutschland	
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific, USA	
DreamTaq Green DNA Polymerase (5U/l)	Thermo Fisher Scientific, USA	
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific, USA	
Ferrosomal	UCB Pharma, Belgien	
FK506	Abcam, Vereinigtes Königreich	10 mM in DMSO
Fluo-4 AM	Thermo Fischer Scientific, USA	1 mM in Pluronic-F127
Folsäure	Hevert, Deutschland	
GeneRuler 1kb DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific, USA	
Glucose	Sigma-Aldrich, USA	
GsMTx-4	Alomone Labs, Israel	1 mM in Aqua dest.
Gö6976	Tocris, Vereinigtes Königreich	1 mM in DMSO
Heparin	Braun Melsungen, Deutschland	

HEPES	Carl Roth, Deutschland	
Hoechst 33258	Sigma Aldrich, USA	10 mg/ml in Aqua dest.
Isofluran	AbbVie, USA	
Larixylacetat	Sigma-Aldrich, USA	5 mM in DMSO
Lysophosphatidsäure	Cayman Chemicals, USA	5 mM in PBS
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth, Deutschland	1 M in Aqua dest.
NaCl	Sigma-Aldrich, USA	
NaCl – Lösung (0,9%)	Braun Melsungen, Deutschland	
NaHCO <sub>3</sub>	Zentrales Chemikalienlager UdS	0,1 M in Aqua dest.
NaOH	Carl Roth, Deutschland	5 M in Aqua dest.
Oligonukleotide (Primer)	Thermo Fisher Scientific, USA	10 mM in Aqua dest.
PBS (Tabletten)	VWR, USA	
PKH26 Mini Kit	Sigma-Aldrich, USA	
PKH67 Mini Kit	Sigma-Aldrich, USA	
Pluronic-F127	Thermo Fischer Scientific, USA	
Proteinase K	Quiagen, Niederlande	
Rimadyl	Pfizer, USA	2.5 mg/ml in 0.9% NaCl
SAR7334	Tocris, Vereinigtes Königreich	10 mM in Aqua dest.
Streptavidin-PE	BioLegend, USA	
Streptavidin-APC-Cy7	BioLegend, USA	
Sulfo NHS-SS-Biotin (Pierce Premium Grad)	Thermo Fischer Scientific, USA	1mg/100µl in 0.9% NaCl
TER119-FITC	BioLegend, USA	

## 2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Hersteller	Material/Gerät
Abaxis, USA	Hämatologiegerät: VetScan HM5
Becton Dickinson, USA	BD Vacutainer® Blutentnahmesystem, Durchflusszytometer: FACSScan & FACSAriaIII
Bioer Technologies, China	Heizblock MB-102
Biozym Scientific, Deutschland	Filterpipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1250 µl) PCR-Gefäße (0,2 ml)
Eppendorf, Deutschland	Pipettensatz
GE Healthcare, UK	Whatman® No.4, Filter Papier
Greiner Bio-one, Deutschland	Falcons (50 ml, 15 ml) Zellkultur Multiwell Platten (12 well) Petrischalen (35 mm)
Hamamatsu Photonics K.K., Japan	EM-CCD Kamera: ORCA-Flash4.0 V2
Heidolph Instruments, Deutschland	Magnetrührer: MR 3001 K
Heraeus Holding, Deutschland	Tischzentrifuge: Biofuge pico Brutschränke: Hera cell 150
Leica Mikrosystems, Deutschland	Leica TCS SP5 II Konfokal-Mikroskop 63x Öl Plan Apo Objektiv
Liebherr, Deutschland	Kühl- und Gefrierschränke
Napco, Thermo Fischer Scientific, USA	Zentrifugen: 2028R, 2019R
Nikon Inc., Japan	Inverses Mikroskop: TE2000 60x Öl Plan Fluor Objektiv 100x Öl Plan Fluor Objektiv
Olympus, Japan	Inverses Mikroskop: IX70 Stereomikroskop: SZX12
Sarstedt, Deutschland	Safety-Lanzetten 21G Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml) Filterspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl) Microvette® EDTA (0.5 ml)
Sartorius, Deutschland	Feinwaage CPA225D

Scientific Industries, USA	Vortex-Mixer: Genie 2
Sutter Instruments, USA	Laserpuller P-2000
	Deckgläser
Thermo Fischer Scientific, USA	Analysewaage ProFlex Thermal Cycler 3x32
TILL Photonics, Deutschland	Monochromator: Polychrome IV
Warner Instruments, USA	1 mm Ø Borosilikat Glaskapillaren
Waters-Millipore, USA	Milliporewasseranlage MilliQ
Werkstatt Anatomie, UdS	Elektrophoresekammer
Wescor, EliTechGroup, USA	Dampfdruck-Osmometer: 5520
WTW, Deutschland	pH-Meter: Inolab pH Level 2
Zeiss, Deutschland	Fluoreszenzmikroskop Observer.Z1 LED-Lampe Colibri.2 Plan Apo 63x Öl Objektiv
Ziegra, Deutschland	Eismaschine

---

### 2.1.3 Verwendete Software

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Software

<b>Entwickler</b>	<b>Software</b>
Adobe Systems, USA	Illustrator CS6
Arivis, Deutschland	Vision 4D 2.12.5
David Nečas & Petr Klapetek, Metrologisches Institut, Tschechien	Gwyddion 2.0
Graphpad Software, USA	Prism 6
Leica, Deutschland	Leica Application Suite 2.4
Mathworks, USA	Matlab R2014a
Nikon, Japan	NIS Elements 4.00
TILL Photonics, Deutschland	Live Aquisition 2.0
Wavemetrics, USA	Igor Pro 6.34
Wayne Rasband, NIH, USA	ImageJ64
Zeiss, Deutschland	Zen pro 2.5

### 2.1.4 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

- Cell-Tak Puffer:  
Zusammensetzung (in mM): 100 NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4.
- PBS:  
Zusammensetzung (in mM): 137 NaCl, 2,7 KCl, 10 Phosphatpuffer, pH 7,4, 300 mosmol/l.
- TBE-Puffer (5x):  
Zusammensetzung in (mM): 500 Tris, 500 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 12,5 EDTA, pH 8,3.
- Tyrodelösung:  
Zusammensetzung (in mM): 135 NaCl, 5,4 KCl, 10 Glucose, 10 HEPES, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 mit NaOH, 300 mosmol/l.

### 2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe, Antikörper und Zellmarker

In dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gearbeitet. Ein Fluorophor besitzt die Fähigkeit Energie in Form von Licht zu absorbieren, dabei wird ein Elektron durch Aufnahme dieser Energie aus dem Grundzustand  $S_0$  in einen energetisch höher liegenden Zustand  $S_1$  oder  $S_2$  befördert. Die möglichen Übergänge zurück in den Grundzustand können in einem Jablonski-Diagramm beschrieben werden. Ein vereinfachtes Jablonski-Diagramm ist in Abbildung 9 dargestellt.

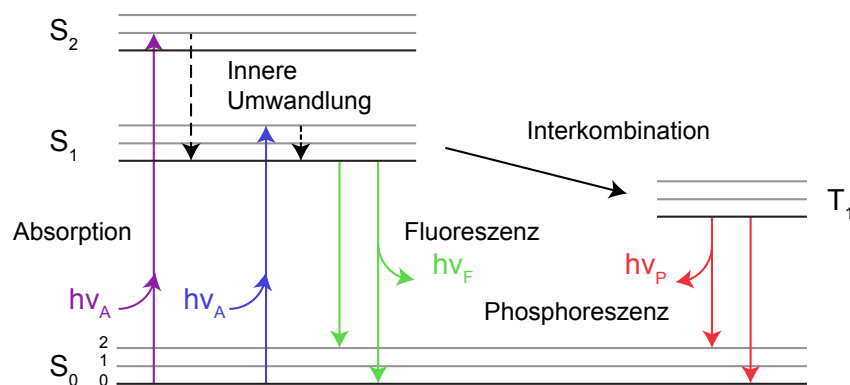


Abbildung 9: Jablonski-Diagramm. Abbildung modifiziert nach (Lakowicz, 2006) mit freundlicher Genehmigung des Verlages Springer Nature.

Unterschieden werden kann dabei zwischen strahlenden und strahlungslosen Prozessen. Zu den strahlungslosen Prozessen zählen die vibronische Relaxation, bei der ein Elektron in den Grundzustand zurückgeht, die innere Umwandlung, bei der ein Elektron in einen schwingungsangeregten Zustand gleicher Multiplizität wechselt, und die Interkombination, bei der ein Elektron aus dem Singulettzustand in den Triplettzustand wechselt. Strahlende Prozesse kann man als Lumineszenz zusammenfassen, dabei fällt ein Elektron zurück in

den Grundzustand  $S_0$ . Erfolgt der Übergang dabei aus dem Triplettzustand so handelt es sich um Phosphoreszenz, wenn er aus dem Singulettzustand erfolgt, spricht man von Fluoreszenz. Da es beim Übergang zwischen den Zuständen zu einem Energieverlust kommt, besitzt das Emissionslicht eine höhere Wellenlänge als das absorbierte Licht, auch als Stokes Verschiebung bekannt (Lakowicz, 2006).

### 2.1.5.1 Fluo-4 AM

In den durchgeführten Experimenten zum intrazellulären Calcium der Erythrozyten wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM (Thermo Fischer Scientific, USA) gearbeitet. Dieser bindet mit hoher Affinität an  $Ca^{2+}$ -Ionen, wodurch sich seine Fluoreszenzintensität bis zu 100-fach verstärken kann (Gee et al., 2000). Im ungebundenen Zustand zeigt der Farbstoff so gut wie keine Fluoreszenz. Der  $K_d$ -Wert von Fluo-4 für Calcium liegt bei einer Temperatur von  $22^\circ C$  bei 345 nM. Sein Anregungsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 494 nm und ist daher gut kompatibel mit einem Standard-488nm-Laser. Das emittierte Licht des Farbstoffs hat dabei ein Maximum von 520 nm und dessen Intensität korreliert mit der vorliegenden  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Fluo-4 ist eine verbesserte Version des Farbstoffes Fluo-3, mit höherer Fluoreszenzintensität bei gleicher Anregung und  $Ca^{2+}$ -Konzentration (dargestellt in Abbildung 10), sowie einer hohen Zellpermeabilität (Gee et al., 2000).

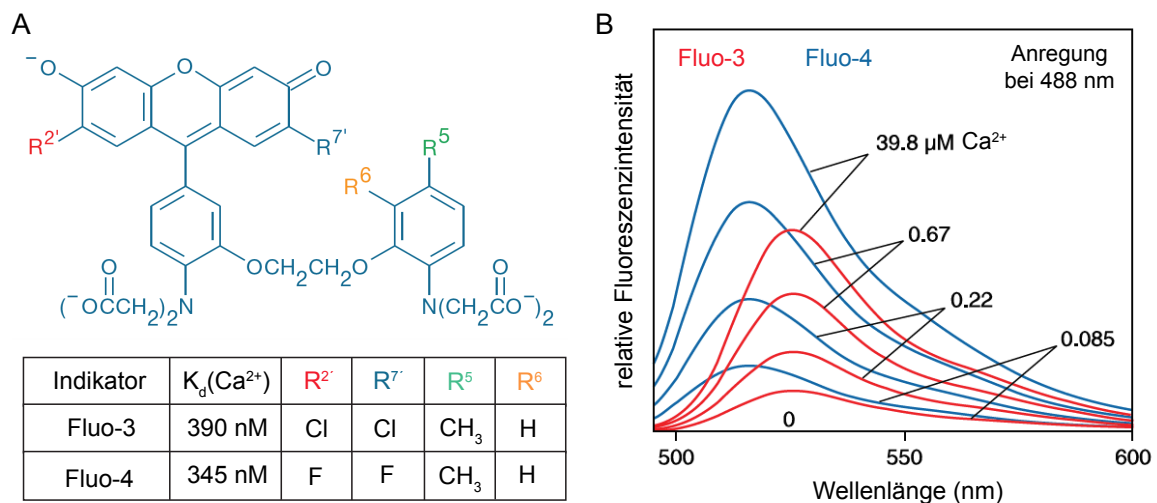


Abbildung 10: Strukturformeln der  $Ca^{2+}$ -Indikatoren Fluo-3 und Fluo-4, sowie deren  $K_d$ -Werte bei  $22^\circ C$  (Panel A). Panel B: Fluoreszenzspektren der Farbstoffe Fluo-3 (rot) und Fluo-4 (blau) in Abhängigkeit verschiedener  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen bei einer Anregung mit 488 nm. Abbildung modifiziert nach (Gee et al., 2000; Minta et al., 2001) mit freundlicher Genehmigung des Verlages Elsevier und der American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Die Permeabilität wird bei beiden Farbstoffen durch eine angefügte Acetoxymethylgruppe erreicht, die nach Aufnahme in die Zelle durch unspezifische Esterasen abgespalten wird. Die Bevorzugung von Fluo-4 als eingesetztem Fluoreszenzfarbstoff über z. B. Fura-2, mit welchem eine quantitative Aussage über die  $Ca^{2+}$ -Konzentration möglich wäre, begründet

sich darin, dass die Fluoreszenzeigenschaften von Fluo-4 durch das in Erythrozyten enthaltene Hämoglobin wenig beeinflusst wird und es zu keiner signifikanten Autofluoreszenz kommt (Kaestner et al., 2006). Fluo-4 wurde als 1 mM Stocklösung in Pluronic F-127 (20% in DMSO, Thermo Fischer Scientific, USA) angesetzt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.1.5.2 PKH26 und PKH67

Die Farbstoffe PKH26 und PKH67 (Sigma-Aldrich, USA) wurden zur allgemeinen Färbung der Plasmamembran von Erythrozyten verwendet. PKH26 ist ein rot fluoreszierender Farbstoff mit einem Anregungsmaximum von 551 nm und einem Emissionsmaximum von 567 nm. PKH67 ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, Anregung und Emission liegen bei 490 bzw. 502 nm. Die Spektren beider Farbstoffe sind in Abbildung 11 dargestellt. In Kombination mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Experimenten wurde PKH26 eingesetzt, da sich dieser durch Verwendung von FITC und TRITC Filtern spektral gut von dem verwendeten  $\text{Ca}^{2+}$ -Farbstoff Fluo-4 trennen lässt.

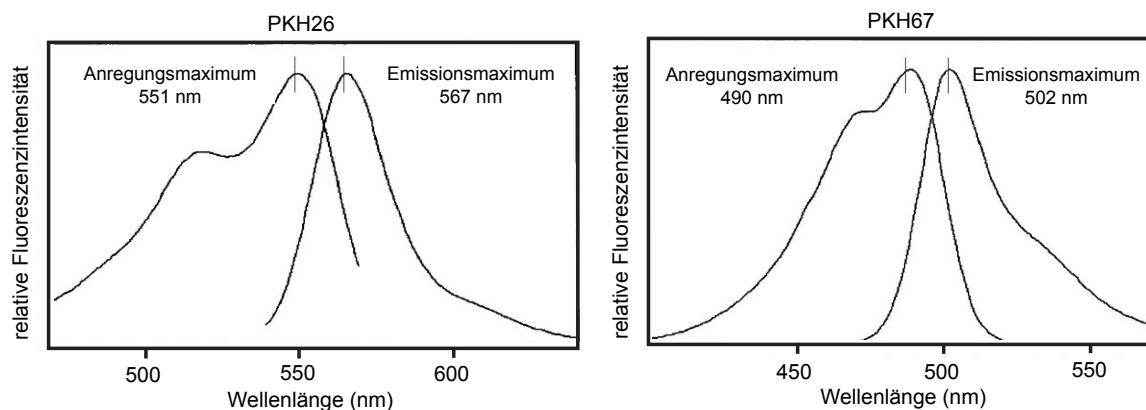


Abbildung 11: Fluoreszenzspektren der Membranfarbstoffe PKH26 und PKH67 mit Anregungs- und Emissionsmaxima. Abbildung modifiziert nach (Poon et al., 2000) mit freundlicher Genehmigung des Verlages Springer Nature.

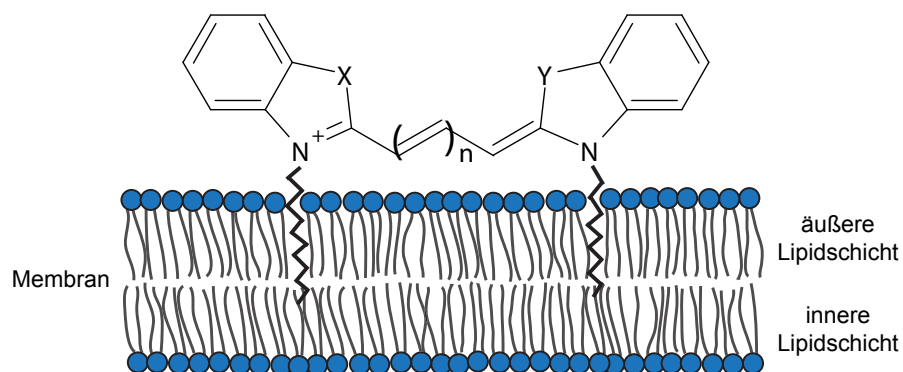


Abbildung 12: Strukturformel der PKH-Farbstoffe mit Einlagerungsmechanismus in die Membran. Abbildung modifiziert nach (Wallace et al., 2008) mit freundlicher Genehmigung des Verlages John Wiley and Sons.



Beide Farbstoffe sind Lipid-ähnliche Moleküle, bestehend aus einer fluoreszierenden Kopfgruppe und aliphatischen Seitenketten. Über diese Seitenketten erfolgt eine starke nicht-kovalente Bindung des Farbstoffs an die Lipide der Zellmembran, wodurch eine Markierung der gewünschten Zellen ermöglicht wird (Wallace et al., 2008). Bildlich dargestellt ist die Struktur der Farbstoffe sowie die Einlagerung in die Zellmembran in Abbildung 12. In sich nicht teilenden Zellen wie Erythrozyten sind die Farbstoffe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für Monate stabil. Sigma-Aldrich gibt den Transfer von Farbstoff aus der Membran gefärbter Zellen zu einer Co-Kultur mit unter 0,3% in 24 h an.

### 2.1.5.3 Sulfo-NHS-SS-Biotin

Als weitere Methode zur Markierung von Zellen wurde die Biotinylierung angewandt. Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Fischer Scientific, USA) ist ein Amino-reaktives Reagenz, bestehend aus einem Biotin-Molekül, einem „Spacerarm“ und einer Sulfo-NHS-Estergruppe. Die Strukturformel ist in Abbildung 13 dargestellt.

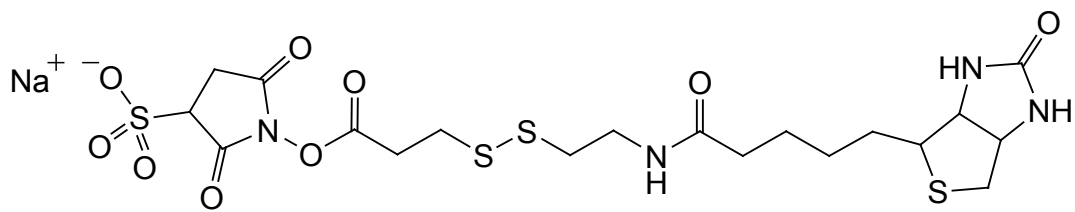


Abbildung 13: Strukturformel des Sulfo-NHS-SS-Biotin Moleküls.

Die Reaktivität des Biotin-Reagenz wird über die Estergruppe vermittelt. Biochemisch erfolgt ein nukleophiler Angriff der NHS-Gruppe auf primäre Amine, wie sie im N-Terminus von Proteinen oder der Aminogruppe von Lysinresten vorkommen. Dabei kommt es zur Ausbildung einer stabilen Peptidbindung. Der Sulfo-NHS-Ester macht das Biotin-Reagenz zudem wasserlöslich und impermeabel für Zellmembranen. Dies bietet den Vorteil, dass das Reagenz gut in physiologischen Puffern gelöst werden kann und bei Inkubation mit Zellen ausschließlich extrazelluläre Membranproteine markiert werden. Nach erfolgter Biotinylierung der Proteine, kann eine weitere Markierung und Visualisierung der Proteine über Streptavidin-Antikörper erfolgen. Streptavidin ist ein Protein aus dem Bakterienstamm *Streptomyces avidinii*, das eine sehr hohe Affinität zu Biotin besitzt und mit diesem eine sehr starke, nicht-kovalente Bindung eingeht. Der im Biotin-Reagenz eingebaute „Spacerarm“ verhindert dabei eine sterische Blockade des Biotin-Moleküls.

### 2.1.5.4 Verwendete Antikörper zur Visualisierung biotinylierter Proteine

Zur Visualisierung biotinylierter Oberflächenproteine wurde mit fluoreszenzmarkierten Streptavidin-Antikörpern (BioLegend, USA) gearbeitet. Als Markierung wurde der orange-fluoreszierende Farbstoff PE (Phycoerythrin) und das dunkelrote APC-Cy7 (Allophycocyanin-Cy7) gewählt. Die Fluoreszenzspektren beider Farbstoffe sind in Abbildung 14 dargestellt. PE kann mit einem 488 nm oder 561 nm Laser angeregt werden und emittiert darauf im Bereich von 550 bis 650 nm, mit einem Maximum bei etwa 580 nm. Das Anregungsmaximum von APC-Cy7 liegt bei 755 nm, es kann jedoch eine Anregung mit einem 633 nm Laser erfolgen. Das Emissionsmaximum liegt bei 775 nm.

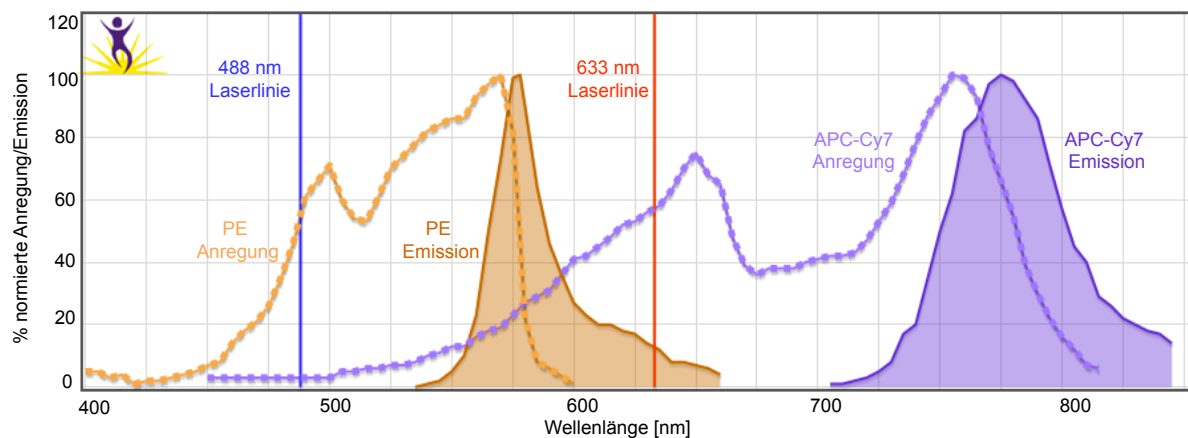


Abbildung 14: Anregungs- und Emissionsspektren der Fluorophore PE und APC-Cy7. Modifiziert aus „Fluorescence Spectra Analyzer“, BioLegend, USA (<https://www.biolegend.com/en-us/spectra-analyzer>).

### 2.1.5.5 Verwendete Antikörper und Farbstoffe zur Charakterisierung von Knochenmarkszellen

Zur Charakterisierung von Knochenmarkszellen (2.5.4) wurde eine Kernfärbung der Zellen mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 durchgeführt. Das Anregungs- und Emissionsspektrum dieses Farbstoffs zeigt Abbildung 15.

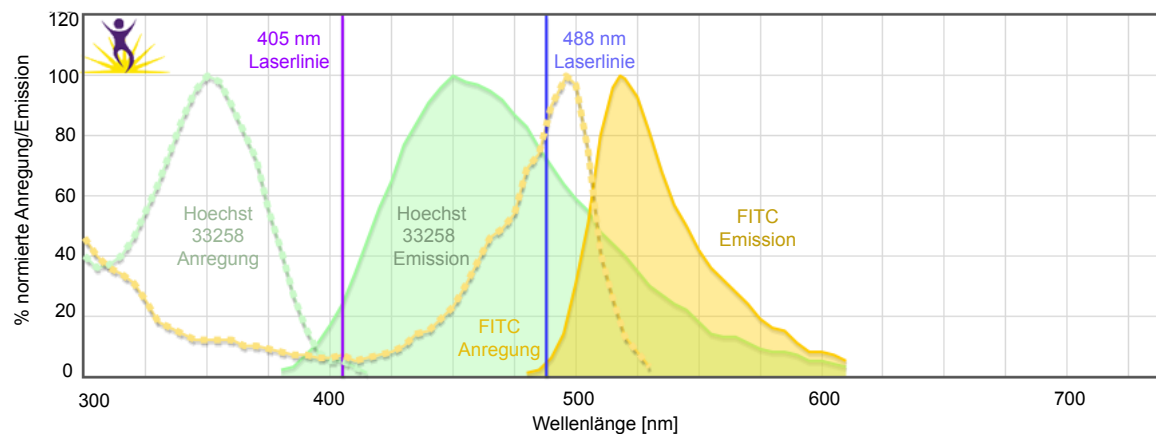


Abbildung 15: Anregungs- und Emissionsspektren der Fluorophore Hoechst 33258 und FITC. Modifiziert aus „Fluorescence Spectra Analyzer“, BioLegend, USA (<https://www.biolegend.com/en-us/spectra-analyzer>).

Das Anregungsmaximum liegt bei 350 nm, eine Anregung kann jedoch auch mit einem 405 nm Laser erfolgen. Das Emissionsmaximum liegt bei 450 nm. Zusätzlich wurde der erythroid-spezifische Antikörper TER-119 verwendet, um Zellen der erythroiden Differenzierungslinie im Knochenmark identifizieren zu können. Der verwendete Antikörper ist gekoppelt an das Fluorophor Fluoresceinisothiocyanat (FITC), dessen Anregungs- und Emissionsspektrum in Abbildung 15 dargestellt ist. Angeregt werden kann FITC mit einem 488 nm Laser, knapp unterhalb des Anregungsmaximums von 496 nm. Das Emissionsmaximum dieses Fluorophors liegt bei 520 nm.

### 2.1.6 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

In dieser Arbeit wurde mit mehreren Mauslinien gearbeitet. Als Wildtyp Mäuse wurden Mäuse der Linie C57Bl6/N genutzt, als zweites die Linie B6.129Sv-Trpc6<sup>tm1Lbi</sup>/Uhg (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Marc Freichel). Diese Linie generiert TRPC6-Knockout Mäuse (TRPC6<sup>-/-</sup>), bei denen das Exon 7 des TRPC6 Gens durch Insertion einer PGK-Neo-Kassette deletiert wurde (Dietrich et al., 2005). Die Tierhaltung erfolgte im Tierhaltungsraum des Instituts für Molekulare Zellbiologie der Universität des Saarlandes. Die Tiere wurden in einem 12-Stunden-Rhythmus gehalten (12h hell, 12h dunkel) und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland). Gezüchtet wurden die Mäuse in der spezifisch pathogenfreien (SPF) – Tierhaltung der Pharmakologie (Gebäude 61.4). Die durchgeführten Experimente wurden nach §8 TierSchG (Tierschutzgesetz) von der zuständigen Behörde genehmigt (02-2015 „ERY015“; 27-2018 „ERY018“).

Als weitere Mauslinie (*R26-tdRFP-CMV*) wurde eine neue Kreuzung aus zwei bereits etablierten Linien generiert. Hierbei handelt es sich um die Linien *Rosa26-tdRFP* und *CMV-Cre* x C57Bl6/N (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Ulrich Böhm und Frau Dr. Petra Weißgerber). Die Linie *Rosa26-tdRFP* ist homozygot für ein gefloxtes *RFP*-Gen innerhalb des *ROSA26* Locus. Durch Verpaarung mit der Linie *CMV-Cre*, kommt es daher in Cre-positiven Nachkommen zur Expression des *RFPs*. Die Züchtung und Haltung dieser Tiere erfolgte ebenfalls wie zuvor beschrieben.

Die Linie *R26-tdRFP-CMV* wurde zudem mit der eingangs beschriebenen Mauslinie B6.129Sv-Trpc6<sup>tm1Lbi</sup>/Uhg verpaart. Die dadurch generierte Linie *R26-tdRFP-CMV-TRPC6<sup>-/-</sup>* exprimiert ubiquitär RFP und besitzt einen Knockout für TRPC6. Die Züchtung und Haltung dieser Tiere erfolgte ebenfalls wie zuvor beschrieben.

Die Kreuzung der Mauslinien ist in Kapitel 2.5.2 genauer beschrieben.

## 2.2 Verwendete Mikroskop Setups

### 2.2.1 Video Imaging Setup TILL Photonics

Wenn nicht anders spezifiziert, wurden alle Messungen zum intrazellulären Calcium am Video Imaging Setup durchgeführt. Das Setup besteht aus einem inversen Mikroskop (TE2000, Nikon, Japan) mit motorisiertem Objektisch (ASI, Applied Spectral Imaging, Israel), einem Monochromator (Polychrome V, TILL Photonics, Deutschland) als Lichtquelle, einer CCD Kamera (Flash4.0 V2, Hamamatsu Photonics K.K., Japan) und der ICU (engl.: „imaging controlling unit“) (TILL Photonics, Deutschland) als zentraler Kontrolleinheit. Gesteuert wird das Setup mittels der LA Live Aquisition Software (TILL Photonics, Deutschland). Für Messungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Farbstoff Fluo-4 wurde ein FITC Filtersatz verwendet. Für rote Farbstoffe wurde entweder ein TRITC oder ein Texas Red Filter verwendet. Der Aufbau der Filterwürfel ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Aufbau der verwendeten Fluoreszenz-Filterwürfel

[nm]	Anregungsfilter	Dichroitischer Spiegel	Emissionsfilter
FITC	485/20	505	535/20
TRITC	545/25	565	605/55
Texas Red	560/20	585	610/40

Zudem ist das Setup ausgestattet mit einem laborintern gefertigten, gravitationsgetriebenen Multikanal-Perfusionssystem, das es ermöglicht, die Zellen während des Experiments mit verschiedenen Lösungen lokal zu perfundieren.

### 2.2.2 Video Imaging Setup Zeiss

Die Versuche an frischen Blutproben wurden im Institut für Klinische Chemie und Hämatologie am Universitair Medisch Centrum (UMC) in Utrecht (Niederlande) durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls ein inverses Fluoreszenzmikroskop Z1 (Zeiss, Deutschland) verwendet, als Lichtquelle kam die LED-Beleuchtungseinheit Colobri 2.0 (Zeiss, Deutschland) zum Einsatz. Gesteuert wurde das automatisierte Mikroskop mittels der Zen Pro Software (Zeiss, Deutschland). Der Aufbau des FITC Filters unterscheidet sich leicht von dem zuvor verwendeten (Anregungsfilter: 470/40 nm, Dichroitischer Spiegel: 495 nm, Emissionsfilter: 525/50 nm), zudem erfolgte die Anregung des Fluo-4 Farbstoffes mit einer 470 nm LED. Das Perfusionssystem wurde durch eine Peristaltikpumpe ersetzt, wobei Zu- und Ablauf über zwei Kanülen auf dem Deckglas erfolgte.

### 2.2.3 Konfokal Mikroskop Leica TCS SP5

Als weiteres Setup wurde das Konfokal System TCS SP5 der Firma Leica eingesetzt. Das System ist an ein inverses Mikroskop gekoppelt, besitzt einen Tandem-Scanner (konventionell und resonant) und drei Detektionskanäle. Als Lichtquellen besitzt das System mehrere eingebaute Laser, wobei zur Anregung des Fluo-4  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators der Argon Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm eingesetzt wurde und zur Detektion des tdRFPs die 561 nm DPSS Laserlinie (Melles Griot, Deutschland) verwendet wurde. Gesteuert wird das automatisierte System mittels der Leica Application Suite Software (LAS 2.4, Leica, Deutschland). Bilder wurden unter Verwendung eines Plan Apo 63x Öl-Objektivs (Leica, Deutschland) bei 30% Laserintensität und einer Scanfrequenz von 200 Hz aufgenommen.

### 2.2.4 Konfokal Mikroskop Nikon/CSU-W1

Weiterhin wurde ein inverses Mikroskop (Eclipse Ti, Nikon, Japan) gekoppelt mit einem konfokalen Spinning-Disks-System (CSU-W1, Yokogawa Electric Cooperation, Japan) verwendet. Als Lichtquelle ist das Setup ausgestattet mit Dioden- und Festkörperlasern (LU-NV Lasereinheit, Nikon, Japan). Folgende Laserlinien kamen zum Einsatz: 405 nm (Hoechst33258), 488 nm (FITC) und 561 nm (RFP). Bildaufnahmen wurden unter Verwendung eines 100x Öl-Objektiv mittels der NIS Elements Software (Nikon, Japan) und einer Digitalkamera gemacht (Orca-Flash4.0, Hamamatsu Photonics, Japan). 3D-Rekonstruktionen wurden mittels der Software Vision 4D durchgeführt (Arivis, Deutschland)

### 2.2.5 Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie

Die Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie (SICM, engl.: „*scanning ion conductance microscopy*“) ist eine Methode zur bildlichen Darstellung von nichtleitenden Oberflächen, wie biologischen Membranen, mittels elektrischen Stroms. Das erste Mal beschrieben wurde diese Methode 1989 (Hansma et al., 1989). Die zu scannende Probe wird in eine Elektrolytlösung gegeben und der Strom, wie bei einer Patch-Clamp-Messung, über zwei Elektroden gemessen. Dabei ist eine Elektrode als Referenzelektrode fest in der Lösung, die zweite Elektrode, die sich in einer Glaskapillare befindetet, „scant“ die Probe ab und wird über einen Piezomotor gesteuert. Bildlich ist das Prinzip der Messmethodik der Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie in Abbildung 16 dargestellt. Man macht sich bei dieser Methode zu Nutze, dass der gemessene Strom, der zwischen den beiden Elektroden fließt, abnimmt, desto näher die Kapillare der zu scannenden Oberfläche kommt. Wird dabei ein zuvor festgelegter Grenzwert des Stroms unterschritten, folgt ein Feedback-Signal an die Software, die Kapillare wird in z-Richtung nach oben bewegt und der Scan an diesem Punkt

beendet. Nun wird die Kapillare in x-y-Richtung zu einem neuen Punkt bewegt und dort der nächste Scan in z-Richtung durchgeführt. In diesem „*Hopping-Modus*“ (Chen et al., 2012) wird der vorher ausgewählte Bereich der Zelloberfläche abgescannet. Die Software kann so am Ende des Scans ein topografisches 3D-Bild der gescannten Oberfläche erstellen, da zu jedem x-y-Punkt ein Messwert in z-Richtung ermittelt wird. Die Auflösung des Scans wird dabei durch die Anzahl der gescannten Pixelpunkte sowie durch den inneren Durchmesser der verwendeten Kapillare bestimmt.

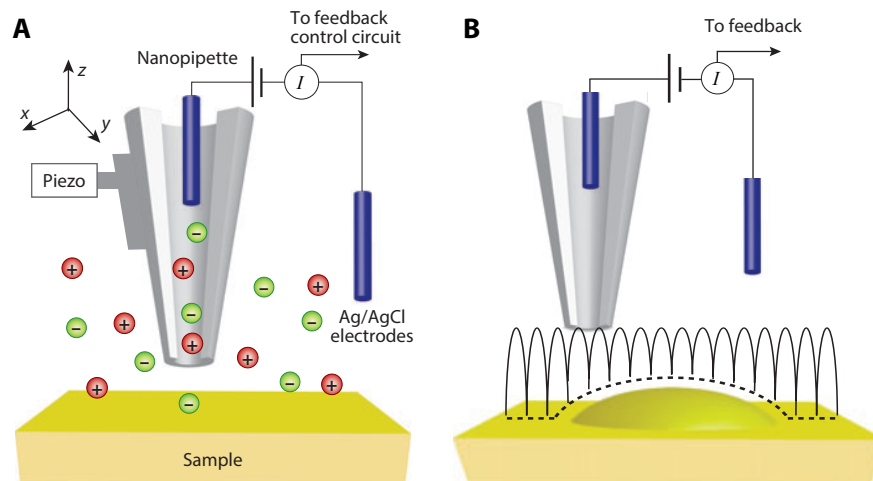


Abbildung 16: Bildliche Darstellung des Prinzips der Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie. Panel A: Schematische Darstellung der Messmethode. Panel B: Schematische Darstellung des „Hopping-Modus“ mit dem die Zelloberfläche untersucht wird. Die Elektrode nähert sich dabei der Oberfläche bis der dabei gemessene Strom unter einen festgesetzten Grenzwert fällt, dann bewegt sie sich wieder nach oben und anschließend in x-y-Richtung, um den nächsten Punkt in z-Richtung zu scannen. Abbildung modifiziert nach (Chen et al., 2012) mit freundlicher Genehmigung des Verlages Annual Reviews.

Das in dieser Arbeit verwendete Setup stammt von der Firma OpenIOlabs (Cambridge, UK) und setzt sich aus einem Hochspannungsverstärker, einer Kontrolleinheit (ICNano2000) und dem Scankopf ICnano2015 mit Vorverstärker, Pipettenhalter und einem Piezosystem ( $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ ) zusammen. Der Scankopf wurde zudem auf ein inverses Mikroskop (Olympus, Japan) montiert, sodass eine gleichzeitige lichtmikroskopische Beobachtung des Scans und der Zellen möglich ist. Gesteuert wird das ganze System über einen PC mittels der ICNano2000GUI Software. Als Pipetten wurden  $1\ \text{mm}$   $\varnothing$  Borosilikat Glaskapillaren (Warner Instruments, USA) verwendet und diese mittels eines P-2000 Laserpullers (Sutter Instruments, USA) gezogen, sodass sie einen inneren Durchmesser von etwa  $100\ \text{nm}$  hatten. Die Zellen wurden vor einem Scan in Tyrodelösung in  $35\ \text{mm}$  Petrischalen (Greiner Bio-one, Österreich) gegeben. Für einen typischen Scan wurde etwa ein Bereich von  $100\ \mu\text{m}^2$  mit einer Auflösung von  $12\ \text{px}/\mu\text{m}$  gescannt, was in einer Scandauer von etwa 2 Stunden resultiert. Durchgeführt wurden die Scans mit einer Spannung von  $200\ \text{mV}$ , der durchschnittliche gemessene Strom betrug dabei etwa  $1,8\ \text{nA}$ . Der Grenzwert des gemessenen Stroms wurde auf  $0,4\%$  gesetzt. Fertige Scans wurden mit der freien

Auswertungs-Software Gwyddion ausgewertet (David Nečas und Petr Klapetek, Tschechisches metrologisches Institut, 2004).

## 2.3 Angewandte Methoden Kapitel hereditäre hämolytische Anämien

### 2.3.1 Humane Blutspender

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von verschiedenen Anämie Patienten untersucht. Die Blutentnahme erfolgte an Kliniken in den Niederlanden (Universitair Medisch Centrum UMC, Utrecht), Spanien (Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer IDIBAPS, Barcelona) und Italien (Fisiopatologia delle Anemie Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Mailand) nach vorherigem Einverständnis der Patienten und in ethischer Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki. Die Blutentnahme wurde genehmigt durch das Ethikkomitee des UMC, des IDIBAPS und der Policlinico di Milano (Referenznummern 15/426M und 2013/8436). Nach der Abnahme erfolgte ein Versand der Blutproben ohne Temperaturkontrolle in Lithium-Heparin Röhrchen nach Homburg (Deutschland). Zusätzlich zu den Patientenproben wurden Blutproben von gesunden Spendern unter denselben Bedingungen versendet, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Blutproben wurden innerhalb eines Zeitfensters von 24 bis 48 h nach Abnahme untersucht. Es wurden zudem am Institut für Klinische Chemie und Hämatologie des UMC (Utrecht, Niederlande) Versuche an frischen Patientenproben sowie ebenfalls Kontrollblut durchgeführt. Die Experimente konnten dabei innerhalb einer Stunde nach Blutentnahme begonnen werden. Eine Zusammenstellung aller Patienten mit diagnostizierter Krankheit und, falls bekannt, zugrundeliegender Mutation findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Auflistung aller humaner Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden. Falls bekannt, sind die Form der Anämie, das betroffene Gen und die Mutation der Patienten angegeben. Die Nummerierung der Patienten erfolgte analog zu vorherigen Publikationen (Fermo et al., 2017; Hertz et al., 2017; Petkova-Kirova et al., 2019) (HS: Hereditäre Sphärozytose, G6PD: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, GCL: Glutamat-Cystein-Ligase, GSR: Glutathiondisulfid-Reduktase, HX: Hereditäre Xerozytose).

Patient	Form der Anämie	Betroffenes Gen	Mutation Allel 1	Mutation Allel 2
P10.1	HS	<i>SPTB</i>	c.2470C>T p.Gln824	normal
P10.2	HS	<i>ANK1</i>	c.2394_2397delCAGT p.Ser799fs	normal

P11.1	HS	<i>SPTB</i>	c.154delC p.Arg52fs	normal
P11.2	HS	<i>ANK1</i>	c.1943delC p.Ala648fs	normal
P12.1	HS	<i>SLC4A1</i>	c.2348T>A p.Ile783Asn	normal
P13.1	HS	<i>ANK1</i>	c.344T>C p.Leu115Pro	normal
P13.2	HS	<i>ANK1</i>	c.344T>C p.Leu115Pro	normal
P14.1	HS	<i>ANK1</i>	c.2559-2A>G (splicing)	normal
P15.1	HS	<i>SPTA1</i>	c.4339-99C>T p.(?)	normal
P16.1	HS	<i>SLC4A1</i>	c.2057+1G>A (splicing)	normal
P17.1	HS	<i>ANK1</i>	c.341C>T p.Pro114Leu	normal
P17.2	HS	<i>ANK1</i>	c.341C>T p.Pro114Leu	normal
P18.1	HS	<i>SPTA1</i>	c.2755G>T p.Glu919*	$\alpha^{\text{LELY}}$
P19.1	HS	<i>SPTA1</i>	c.678G>A p.Glu227fs	$\alpha^{\text{LELY}}$
P20.1	HS	<i>SPTA1</i>	c.(4339-99C>T; 4347G>T) p.(?; Lys1449Asn)	c.4339-99C>T p.(?)
P21.1	HS	<i>SPTB</i>	c.3349G>A p.Trp1150	normal
		<i>SPTA1</i>	$\alpha^{\text{LELY}}$	$\alpha^{\text{LELY}}$
P30.1	Hämolytische Anämie	-	Keine Mutationen gefunden	-



P31.1	Hämolytische Anämie	<i>ANK1</i>	c.997G>A p.Asp333Asn	normal
P32.1	Hämolytische Anämie	<i>RHAG</i> <i>ANK1</i>	c.808G>A p.Val270Ile c.4875+71T>G (splicing)	normal
P40.1	G6PD Mangel	<i>G6PD</i>	c.208T>C p.Tyr70His	normal
P41.1	G6PD Mangel	<i>G6PD</i>	c.563C>T p.Ser188Phe	normal
P42.1	G6PD Mangel	<i>G6PD</i>	c.871G>A; p.Val291Met	normal
P43.1	GCL Mangel	<i>GCL</i>	c.473C>T p.Pro158Leu	c.473C>T p.Pro158Leu
P44.1	GSR Mangel	<i>GSR</i>	c.993G>A p.Trp331*	c.1121G>C p.Gly374Ala
P50.1	HX	<i>FAM38A</i>	c.1276T>C p. Cys426Arg	normal
P50.2	HX	<i>FAM38A</i>	c.1276T>C p. Cys426Arg	normal
P51.1	HX	<i>FAM38A</i>	c. 7367G>A p.Arg2456His	normal
P51.2	HX	<i>FAM38A</i>	c. 7367G>A p.Arg2456His	normal
P51.3	HX	<i>FAM38A</i>	c. 7367G>A p.Arg2456His	normal
P51.4	HX	<i>FAM38A</i>	c. 7367G>A p.Arg2456His	normal
P52.1	HX	<i>FAM38A</i>	c.7483_7488dupCTGGAG p.2495_2496dupLeuGlu	normal
P53.1	HX	<i>FAM38A</i>	c. 6262C>G p. Arg2088Gly	normal

P53.2	HX	<i>FAM38A</i>	c. 6262C>G p. Arg2088Gly	normal
P53.3	HX	<i>FAM38A</i>	c. 6262C>G p. Arg2088Gly	c.6495-6508delAGA p.2166-2169delLys
PI.1	Gardos- <i>Channelopathie</i>	<i>KCNN4</i>	c.940T<C p.Ser314Pro	normal
PI.2	Gardos- <i>Channelopathie</i>	<i>KCNN4</i>	c.940T<C p.Ser314Pro	normal
PII.4	Gardos- <i>Channelopathie</i>	<i>KCNN4</i>	c.1055G>A p.Arg352His	normal
PIII.1	Gardos- <i>Channelopathie</i>	<i>KCNN4</i>	c.1055G>A p.Arg352His	normal
P1	HS	<i>ANK1</i>	c.2559-2A>G ( <i>Splicing</i> )	normal
P2	HS	<i>SPTB</i>	c.2137C>T p.Gln713X	normal
P3	HS	<i>SPTB</i> <hr/> <i>SPTA1</i>	c.808G>A p.Val270Ile <hr/> $\alpha^{\text{LELY}}$	normal

Die Aufbereitung der Blutproben erfolgte dabei wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben. Die anschließende Färbung der Erythrozyten und Durchführung der Messung ist in Kapitel 2.7 erläutert.

## 2.4 Angewandte Methoden Kapitel Lysophosphatidsäure Signalweg

### 2.4.1 Blutentnahme an Mensch und Maus

Die für die Untersuchungen zum LPA Signalweg verwendeten humanen Blutproben wurden von freiwilligen gesunden Spendern am Institut für Molekulare Zellbiologie entnommen nach Genehmigung durch die Ethik Kommission der Ärztekammer des Saarlandes unter dem Versuchsvorhaben „Untersuchungen der Kalzium Regulation in Erythrozyten von gesunden Probanden und anämischen Patienten zur Evaluierung der molekularen Mikroskopie als Werkzeug bei der Therapie und personalisierten Medikation seltener Anämien“ mit der Kennnummer 132/08. Die Entnahme erfolgte bei geringen Blutmengen aus der Fingerbeere

mittels Safety-Lanzetten (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland), ansonsten durch Punktion einer Armvene mit dem BD Vacutainer® Blutentnahmesystem (Becton Dickinson, USA) in Lithium-Heparin Röhrchen.

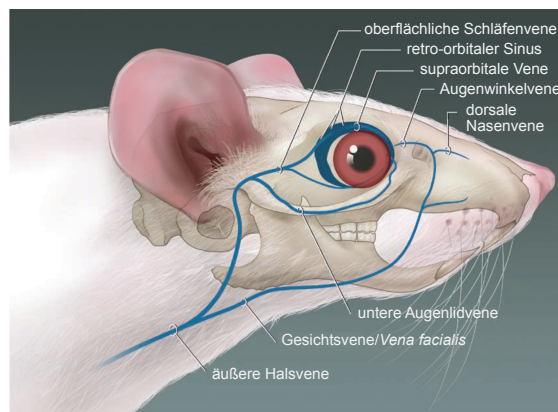


Abbildung 17: Schematische Zeichnung der Blutgefäße, die zum retrobulbären Venenplexus der Maus führen. Abbildung modifiziert nach (Yardeni et al., 2011) mit freundlicher Genehmigung des Verlages Springer Nature.

Mausblut wurde von Wildtyp Mäusen (C57Bl6/N) sowie von TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen gewonnen unter Beachtung des Tierschutzgesetzes und mit geringstmöglicher Belastung für die Tiere (Anzeige für die Blutentnahmen unter den Aktenzeichen H1-2.4.3.5 und C1-2.4.3.4). Die Entnahme erfolgte durch Punktion der *Vena facialis* im submandibulären Gesichtsbereich der Maus mittels einer Lanzette. Eine schematische Zeichnung der *Vena facialis*, sowie weiterer Gefäße, ist in Abbildung 17 dargestellt. Pro Maus (>25 g Körpergewicht) und Tag wurden maximal 20 µl Blut entnommen, was unterhalb der Grenze von 1% des geschätzten Blutvolumens der Maus liegt. Die Einstichstelle wird nach der Punktion für etwa eine Minute komprimiert, um Hämatome zu vermeiden. Die Blutentnahme wird ohne Narkose durchgeführt, da diese nur eine geringfügige Belastung für das Tier darstellt. Die Blutentnahmen an Mäusen wurden von verschiedenen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Zellbiologie durchgeführt.

#### 2.4.2 Aufbereitung der Blutproben

Zur Aufbereitung der Blutproben wurden 10 µl Vollblut in 1 ml Tyrodelösung, vorgelegt in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß, überführt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei etwa 2500x g, wurde die Tyrodelösung im Überstand abgenommen und durch frische Lösung ersetzt. Die Zellen im Pellet wurden mittels eines Vortexmischers resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt und die Zellen nach dem letzten Schritt erneut in 1 ml Lösung aufgenommen.

## 2.5 Angewandte Methoden Kapitel Charakterisierung der *R26-tdRFP-CMV* Maus

### 2.5.1 *In vivo*-Biotinylierung

Als eine Methode zur Markierung der TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten vor der Transfusion wurde die *in vivo*-Biotinylierung ausgewählt. Bei dieser Methode wurde das reaktive Biotin direkt in den Blutstrom der Maus injiziert und die Markierung der Zellen *in vivo* durchgeführt. Dies hat den Vorteil einer geringeren Manipulation der Zellen, die mit einer *ex vivo*-Färbung einhergehen würde und daraus folgend einer geringeren Verfälschung der Versuchsergebnisse. Durchgeführt wurde die Biotinylierung wie in der Literatur beschrieben mit leichten Abwandlungen (Dholakia et al., 2015; Hoffmann-Fezer et al., 1991; Saxena et al., 2012). Die Mäuse erhielten 2 Dosen des Biotins im Abstand von 2 Stunden. Dazu wurde je 1 mg Sulfo-NHS-SS Biotin direkt vor der Injektion in 100 µl steriler Kochsalzlösung gelöst. Davon wurden jeweils 75 µl retrobulbär unter Isofluran-Inhalationsnarkose (3% zur Einleitung, im Verlauf 1,5%) in die Maus injiziert (Yardeni et al., 2011). Bei der retrobulbären Injektion wurde eine 27-G Kanüle durch den inneren Augenwinkel der Maus geführt und die Flüssigkeit in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Bildlich dargestellt ist diese Injektionsmethode in Abbildung 18. Die tierexperimentellen Eingriffe wurden von verschiedenen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Zellbiologie durchgeführt.

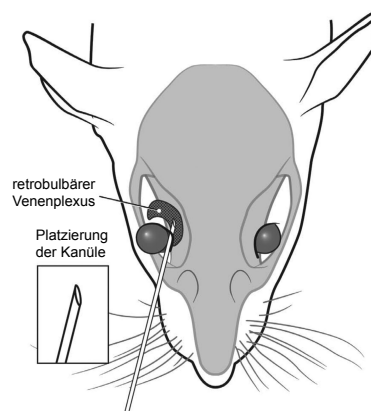


Abbildung 18: Schematische Darstellung der retrobulbären Injektionsmethode. Dabei wird eine Injektionskanüle durch den inneren Augenwinkel vorbei am Augapfel geführt und die Flüssigkeit in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Abbildung modifiziert nach (Yardeni et al., 2011) mit freundlicher Genehmigung des Verlages Springer Nature.

### 2.5.2 Kreuzungsschema der *R26-tdRFP*, *CMV-Cre* und *TRPC6*<sup>-/-</sup> Mauslinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Mauslinie generiert. Eine schematische Zusammenfassung der Mausplanung ist in Abbildung 19 dargestellt. Zielsetzung dabei war es, eine transgene Maus zu generieren, die fluoreszenzmarkierte Erythrozyten besitzt. Da

bei den meisten Versuchen der grün-fluoreszierende  $Ca^{2+}$ -Indikator Fluo-4 zum Einsatz kam, fiel die Wahl auf ein rotes Fluoreszenzprotein. Ausgangslinie war daher die *R26-tdRFP* Maus (Luche et al., 2007). Diese Maus besitzt eine induzierbare *tdRFP*-Kassette im *ROSA26* Locus. Zur Expression des *tdRFPs* in einer Zelle kommt es nach Aktivierung der Kassette, die durch zusätzliche Expression der Cre-Rekombinase erreicht werden kann. Durch Auswahl eines geeigneten Cre-Promotors ist daher auch eine Zelltyp-spezifische Expression des RFPs möglich. In diesem Fall wurde eine CMV-Cre Mauslinie ausgewählt (Schwenk et al., 1995).

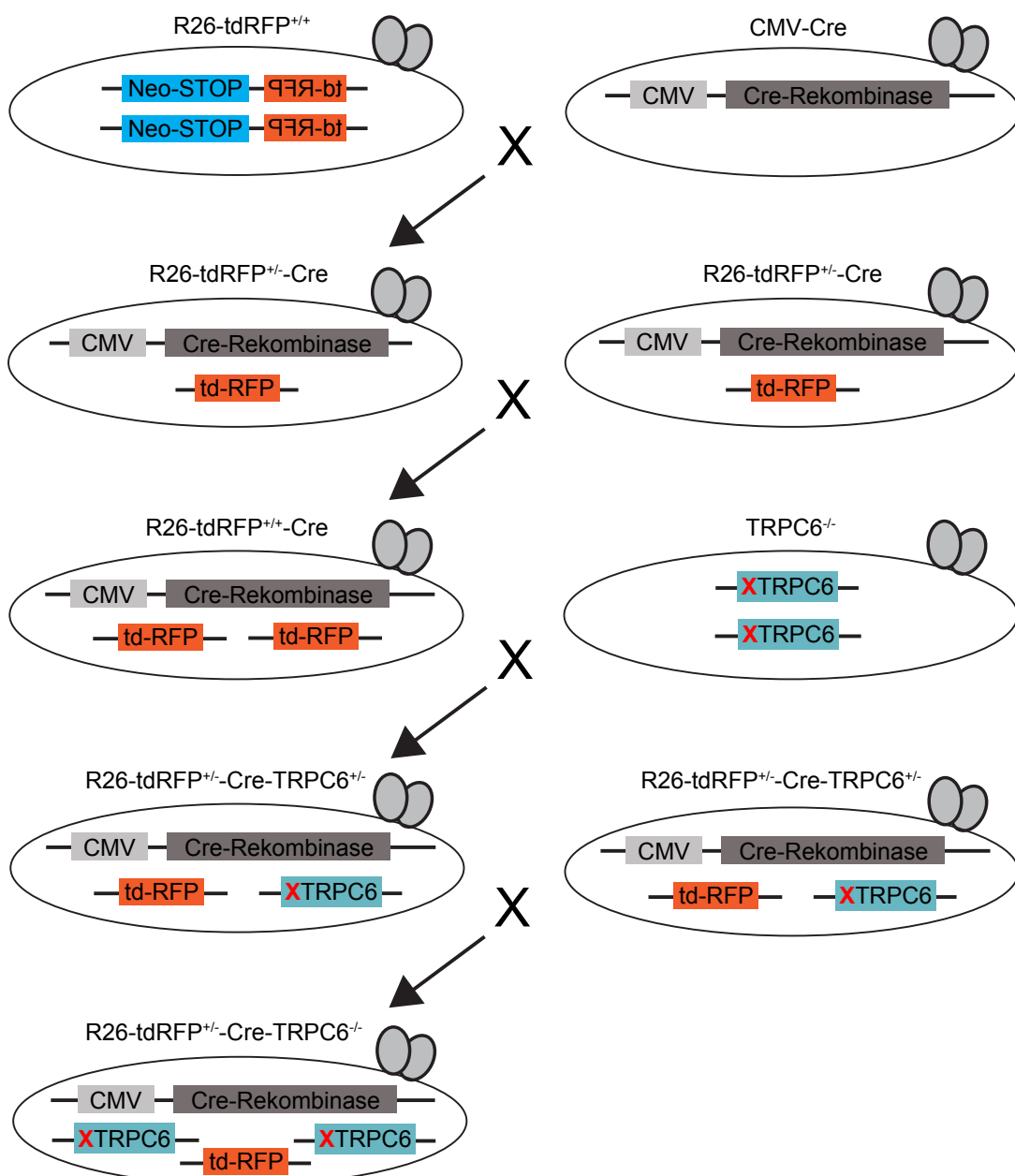


Abbildung 19: Schematisches Kreuzungsschema zur Generierung der *R26-tdRFP-CMV-TRPC6<sup>-/-</sup>* Maus.

Nach Verpaarung der *R26-tdRFP* und CMV-Cre Mäuse erhielten wir *R26-tdRFP-CMV* Mäuse, die das RFP in allen Körperzellen exprimieren, jedoch nur einen heterozygoten Genlocus besitzen. Zur Generierung homozygoter Mäuse ( $RFP^{+/+}$ ) wurden heterozygote Mäuse ( $RFP^{+/-}$ ) der F1 Generation erneut untereinander verpaart.

Um die in Kapitel 2.6.3 beschriebenen Transfusionsversuche mit RFP-markierten Erythrozyten durchzuführen, wurden im nächsten Schritt *TRPC6<sup>-/-</sup>* Mäuse mit *R26-tdRFP-CMV* Mäuse verpaart. Die dabei generierte F1-Generation war sowohl bezüglich des *RFP* als auch des *TRPC6* Locus heterozygot. Es erfolgte darauf eine Rückkreuzung mit *TRPC6<sup>-/-</sup>* Mäusen, um für diesen Locus homozygote Tiere zu erhalten. Die zur Transfusion eingesetzten Mäuse hatten folgende genotypische Eigenschaften: *TRPC6<sup>-/-</sup>*,  $RFP^{+/-}$  und Cre positiv.

### 2.5.3 Genotypisierung der *R26-tdRFP-CMV* und *R26-tdRFP-CMV-TRPC6<sup>-/-</sup>* Mäuse

Zur Genotypisierung der *R26-tdRFP-CMV* und *R26-tdRFP-CMV-TRPC6<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden die in Tabelle 6 aufgezeigten Primer verwendet. Die Primer wurden als Standard-Oligonukleotide bei Thermo Fischer Scientific bestellt und als 100 mM Stocklösung in Aqua dest. gelöst.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer zur Genotypisierung der *R26-tdRFP-CMV* und *R26-tdRFP-CMV-TRPC6<sup>-/-</sup>* Mäuse mit Sequenzen

Primer	Nukleotidsequenz in 5' - 3'Richtung
new ROSA <i>for</i>	GGA AGC ACT TGC TCT CCC AAA G
new ROSA WT <i>rev</i>	CTT TAA GCC TGC CCA GAA GAC TC
new R26 <i>rev</i>	AAC CAC TGG AAA GAC CGC GAA G
Cre <i>for</i>	ACC TGA AGA TGT TCG CGA TTA TCT
Cre <i>rev</i>	ACC GTC AGT ACG TGA GAT ATC TT
TRPC6 WT <i>for</i>	CAG ATC ATC TCT GAA GGT CTT TAT GC
TRPC6 WT <i>rev</i>	TGT GAA TGC TTC ATT CTG TTT TGC GCC
TRPC6 MT <i>for</i>	ACG AGA CTA GTG AGA CGT GCT ACT TCC
TRPC6 MT <i>rev</i>	GGG TTT AAT GTC TGT ATC ACT AAA GCC TCC

Als Ausgangsmaterial für die Genotypisierung wurden Gewebeproben der Mausohren verwendet. Zur Gewinnung der DNA wurden die Gewebeproben über Nacht bei 56°C verdaut. Dabei wurden pro Probe 50 µl des DirectPCR Lysis Reagent (Viagen Biotech, USA)

mit 1 µl Proteinase K (Quiagen, Niederlande) angesetzt. Die Reaktion wurde am folgenden Tag durch 45-minütiges Erhitzen auf 85 °C abgestoppt.

Die PCR wurde unter Verwendung der DreamTaq DNA Polymerase und des Green-DreamTaq Buffer (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt. Dieser Puffer enthält ein Dichte-Reagenz, und zwei Farbstoffe, sodass die Proben ohne Zugabe von Ladepuffer in einem Agarosegel aufgetrennt werden können. Für die PCR wurde ein Mastermix aus allen Reagenzien außer der DNA hergestellt. Die Mengen, die für jeweils eine Probe benötigt wurden, sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für eine DNA-Probe

Reagenz	Menge
DreamTaq DNA Polymerase	0,2 µl
DreamTaq Green Buffer (10x)	2,5 µl
Primer <i>for</i> (10 mM)	0,8 µl
Primer <i>rev</i> (10 mM)	0,8 µl
dNTPs	0,5 µl
(DNA)	(0,5 µl)
A. dest	ad 25 µl

Durchgeführt wurde die PCR in einem ProFlex Thermocycler (Thermo Fischer Scientific, USA). Dabei wurde das in Tabelle 8 beschriebene Temperaturprotokoll verwendet.

Tabelle 8: Temperaturprotokoll der DreamTaq PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	30 s	
Primerhybridisierung	60	30 s	35
Ampifikation	72	1 min	
Finale Amplifikation	72	10 min	1

Die PCR Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel in 0,5% TBE-Puffer für 35 min bei 130 V aufgetrennt. Die Mäuse der CMV-Cre Linie konnten nach Durchführung der PCR gruppiert werden in Cre-positive Mäuse, bei Vorhandensein eines PCR Produkts, und in Cre-negative Mäuse (kein PCR Produkt). Für die *R26-tdRFP* Linie ergab sich entweder ein PCR-Produkt aus Kombination des *forward* Primers mit dem *reverse* Primer des Wildtyp *ROSA26*

Lokus oder mit dem *reverse* Primer des transgenen *ROSA26* Lokus. Die Größe des Wildtyp *ROSA26* Lokus entspricht 256 bp, der transgene Lokus ist aufgrund des RFP-Inserts größer und liegt bei 336 bp. Zur Genotypisierung des *TRPC6* Lokus wurden ebenfalls zwei Primerpaare verwendet. Der Wildtyp Lokus wird am Exon 7 erkannt und erzeugt ein PCR-Produkt mit 234 bp. Bei *TRPC6*<sup>-/-</sup> Mäusen ist zur Geninaktivierung an dieser Stelle eine PGK-Neo-Kassette eingefügt, die durch das zweite Primerpaar erkannt wird. In der PCR wurde daher ein Fragment von 339 bp für den transgenen *TRPC6* Lokus amplifiziert.

#### **2.5.4 Charakterisierung der *R26-tdRFP-CMV* Maus**

Zur Charakterisierung der *R26-tdRFP-CMV* Mauslinie, insbesondere der Erythrozyten, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurde ein Differentialblutbild der Mäuse erstellt. Die verwendeten Mäuse wurden wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben final entblutet. 200 µl Herzblut wurden mittels einer Spritze in 0,5 ml EDTA Microvetten® überführt. Die Blutproben wurden mit dem Hämatologiegerät VetScan HM5 (Abaxis, USA) analysiert.

Die Morphologie der RFP-exprimierenden Erythrozyten wurde zudem konfokalmikroskopisch untersucht. Dazu wurde das Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 (Kapitel 2.2.3) verwendet.

Zur Untersuchung der generellen RFP-Expression wurden verschiedene Organe einer *RFP*<sup>+/+</sup> und einer *RFP*<sup>-/-</sup> Maus auf Fluoreszenz untersucht. Die Mäuse wurden zunächst narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Nach Eröffnung von Bauch- und Brustraum wurden folgende Organe freipräpariert: Darm, Magen, Leber, Niere, Lunge, Herz, Skelettmuskel und Hohlvene. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Organe wurden mittels des Stereomikroskops SZX12 (Olympus, Japan) und eines Texas Red Filtersets gemacht.

Des Weiteren wurde eine Analyse der RFP-Expression an verschiedenen Vorläuferzellen des Knochenmarks durchgeführt. Die Mäuse wurden dazu durch eine Überdosis der Anästhetika Ketamin und Xylazin mit anschließendem Genickbruch getötet. Die Entnahme des Knochenmarks erfolgte aus Tibia und Femur. Dazu wurden beide Knochen freipräpariert und zur Öffnung der Knochenmarkshöhle die Epiphysen abgetrennt. Das Knochenmark wurde darauf mittels einer 27-G Kanüle und Tyrodelösung aus der Markhöhle herausgespült. Die Präparation des Knochenmarks wurde von Prof. Dr. Matthias Laschke am Institut für Experimentelle Chirurgie (Universität des Saarlandes) durchgeführt. Zur Differenzierung unterschiedlicher Knochenmarkszellen wurde anschließend eine Anfärbung der Zellen mit Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, USA) zur Darstellung der Zellkerne, und mit dem erythroid-spezifischen Antikörper Ter-119-FITC (BioLegend, USA) durchgeführt. Die Färbung erfolgte



für 20 min bei RT in PBS mit einer Konzentration von 10 µg/ml Hoechst und 2 µg/ml Ter-119. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mittels des Konfokalmikroskops Nikon/CSU-W1 (Kapitel 2.2.4). Dazu wurden die Zellen in PBS + 0,1% BSA suspendiert und zur Mikroskopie zwischen zwei Deckgläser gebracht mit 20 µm großen Polystyrol-Kugeln (Sigma-Aldrich, USA) als Abstandshalter.

Als weitere Untersuchung wurde eine Vergleichsstudie durchgeführt, bei der die Überlebensrate der Erythrozyten nach Transfusion ermittelt wurde. Dabei wurden sowohl PKH67 gefärbte Zellen als auch RFP-exprimierende Erythrozyten zusammen in eine Wildtyp Maus transfundiert. Als Basis für die PKH67 gefärbten Zellen wurde eine Wildtyp Maus final entblutet (Kapitel 2.6.1) und die Färbung wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben durchgeführt. Ebenfalls wurde eine Maus der Linie *R26-tdRFP-CMV* final entblutet und die Blutprobe dreimal in steriler Kochsalzlösung gewaschen. Beide Blutproben wurden anschließend mit einem Hämatokrit von 50% in Kochsalzlösung aufgenommen und in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Die Transfusion wurde wie beschrieben durchgeführt (Kapitel 2.6.3), dabei wurden pro Maus 200 µl der RFP/PKH-Zellmischung injiziert. Zur Beobachtung der Überlebensrate der transfundierten Zellen wurden den Mäusen in verschiedenen Zeitabständen durch Punktion der *Vena facialis* Blutproben von 10 µl entnommen. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch mittels des FACSAriaIII (Becton Dickinson, USA). Die Detektion des RFPs erfolgt im „PE Kanal“, d.h. nach Anregung mit einem 561 nm Laser wurde das Emissionslicht durch einen 582/15 nm Filter detektiert. Fluo-4 und PKH67 Messungen erfolgten im „FITC Kanal“: Angeregt wurde dabei mit einem 488 nm Laser und Emissionslicht der Wellenlängen 530/30 nm gefiltert.

## **2.6 Angewandte Methoden Kapitel Transfusion**

### **2.6.1 Induktion einer Retikulozytose**

Zur Erhöhung der Retikulozytenanzahl im Blut der TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse wurde vor der Transfusion eine Retikulozytose durchgeführt. Diese Methode wurde mit leichten Abwandlungen zur Literatur durchgeführt (Joiner et al., 1995; Liu et al., 2010). Dabei wurde die Erhöhung der Retikulozytenzahl durch wiederholte kontrollierte Blutungen erreicht. An Tag 1 wurden der Maus als Vorbereitung 1 Stunde vor Blutentnahme 1 ml körperwarmer, physiologische Kochsalzlösung (Braun, Melsungen, Deutschland) subkutan injiziert. Anschließend wurden der Maus unter Isofluran-Inhalationsnarkose (3% zur Einleitung, im Verlauf 1,5%) etwa 500 µl Blut durch Punktion des retrobulbären Venenplexus entnommen. Nach der Entnahme wurde der Maus als Substitution für den Blutverlust erneut 1 ml körperwarmer Kochsalzlösung, sowie 0,25 mg (5 mg/kg) des Schmerzmittels Carprofen

(Pfizer GmbH, Deutschland) intraperitoneal (i. p.) injiziert. Als Kompensation für den Blutverlust erhielten die Mäuse zudem täglich bis zur finalen Blutentnahme 150 µg Fe<sup>2+</sup> (Ferrosanol Tropfen, UCB Pharma, Deutschland) und 1 µg Folsäure (Hevert-Arzneimittel, Deutschland). Diese Prozedur wurde ein zweites Mal an Tag 3 durchgeführt und die Maus an Tag 5 final entblutet. Die finale Blutentnahme erfolgte ebenfalls unter Isofluran-Narkose direkt aus dem Herzen. Getötet wurde die Maus im Anschluss durch Genickbruch. Die tierexperimentellen Eingriffe wurden von verschiedenen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Zellbiologie durchgeführt.

### **2.6.2 Färbung der Erythrozyten mit dem PKH26/PKH67 Mini Kit**

Die PKH Mini Kits bestehen jeweils aus dem in Ethanol gelösten PKH-Farbstoff und dem Färbepuffer Diluent C. Diluent C ist ein isoosmotischer und salzfreier Puffer, in dem die Färbefizienz am höchsten ist. Je nach Aufgabenstellung wurden 5 bis 100 µl humanes oder murines Blut in 1 ml steriler Kochsalzlösung (bei Transfusionsversuchen) oder Tyrodelösung (bei *in vitro* Experimenten) in einem 2 ml Reaktionsgefäß suspendiert und dreimal wie bereits beschrieben gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen im mitgelieferten Diluent C aufgenommen und auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Je nach Zellzahl wurden 2 – 5 µl des PKH-Farbstoffs in ebenfalls 500 µl Diluent C aufgenommen. Das Farbstoff/Diluent C Gemisch wurde zu den Zellen pipettiert und sofort gut durchmischt. Die Färbung erfolgte für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler, um ein möglichst homogenes Ergebnis zu erreichen. Ein Abstoppen der Färbereaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 2%iger BSA-Lösung erreicht. Das Reaktionsgefäß wurde für eine weitere Minute rotiert und danach abzentrifugiert. Die Zellen wurden nach der Färbung dreimal in steriler Kochsalz- bzw. Tyrodelösung gewaschen. Für die Transfusionsversuche wurden die Zellen mit einem Hämatokrit von 50% suspendiert.

### **2.6.3 Transfusion der TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten in Wildtyp Mäuse**

Zur Untersuchung eines möglichen Proteinaustauschs zwischen Erythrozyten und/oder anderen Blutzellen wurden Erythrozyten aus TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen in Wildtyp Mäuse transfundiert. Dazu wurden die TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen zunächst entweder mit PKH67 gefärbt oder mittels Biotin markiert. Die markierten Zellen wurden anschließend in einem Hämatokrit von 50% in steriler Kochsalzlösung aufgenommen und pro Knockout Maus in je 2 - 3 Wildtyp Mäuse injiziert. Die Transfusion von etwa 200 µl Blut/Maus erfolgte erneut retrobulbär unter Isofluran-Inhalationsnarkose (zur Einleitung 3%, im Verlauf 1,5%). Im Verlauf der nachfolgenden zwei Wochen wurde den transfundierten Mäusen alle 2 – 3 Tage eine Blutprobe von 10 µl entnommen. Die Abnahme erfolgte wie bereits beschrieben an der *Vena*

*facialis*. Die tierexperimentellen Eingriffe wurden von verschiedenen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Zellbiologie durchgeführt.

Zudem wurden die gleichen Transfusionsversuche mit zuvor splenektomierten Wildtyp Mäusen durchgeführt. Die Splenektomie wurde von Prof. Dr. Matthias Laschke am Institut für Experimentelle Chirurgie (Universität des Saarlandes) durchgeführt und die Mäuse anschließend in die Tierhaltung des Instituts für Molekulare Zellbiologie überführt, wo sie eine einwöchige Erholungszeit unter besonderer Beobachtung erhielten. Als Vorbereitung auf die OP wurden die Mäuse durch Injektion von Ketamin (75 mg/kg) und Xylazin (15 mg/kg) i. p. narkotisiert. Mittels medianer Laparotomie wurde der Bauchraum eröffnet, die *Vena* und *Arteria splenica* mittels Ligatur verschlossen und die Milz entfernt. Der Bauchraum wurde anschließend wieder mit einer Haut- und Muskelnahnt verschlossen.

## 2.7 Messungen des intrazellulären Calciums

Zur Detektion des intrazellulären Calciums wurde der Farbstoff Fluo-4 AM verwendet. Die humanen und murinen Erythrozyten wurden wie in Kapitel 2.4.2 bereits beschrieben vorbereitet. Für mikroskopische Experimente wurden die Zellen mit 5  $\mu$ M Fluo-4 beladen, bei durchflusszytometrischen Analysen wurde 1  $\mu$ M des Farbstoffs eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C, während der der Farbstoff von den Zellen aufgenommen wurde, wurden die Zellen einmal gewaschen. Als „Coating“ Reagenz wurde der Zellkleber Cell-Tak verwendet (Corning, Inc., Corning, USA). Dieser wurde im Vorfeld getestet und zeigte, im Gegensatz zum häufig verwendeten Poly-L-Lysin, keine Beeinflussung des intrazellulären Calciums in Erythrozyten. Der Kleber besteht aus polyphenolischen Proteinen, die aus der Miesmuschel *Mytilus edulis* gewonnen und in 5% Essigsäure gelagert werden. Cell-Tak entfaltet seine Klebfähigkeit erst bei einem neutralen pH zwischen 6.5 und 8. Daher wurde der Kleber vor Verwendung in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (Cell-Tak Puffer) gelöst. Pro Deckglas wurden 50  $\mu$ l Puffer und 2  $\mu$ l Cell-Tak ( $\approx$  2  $\mu$ g) angesetzt, auf die Mitte des Deckglases gegeben und für 1 h bei RT inkubiert, die Deckgläser wurden dazu in 12-well Platten verteilt. Vor Verwendung wurden die Deckgläser zweimal mit 1 ml Aqua dest. und anschließend einmal mit 1 ml Tyrode gewaschen.

Vor Versuchsbeginn wurden 100  $\mu$ l der Zellsuspension auf ein beschichtetes Deckglas gegeben und etwa 5 Minuten gewartet, bis sich eine dünne Zellschicht abgesetzt hatte. Anschließend wurde mit 900  $\mu$ l Tyrode aufgefüllt und die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. Wenn nicht anders spezifiziert, wurden die Ca<sup>2+</sup>-Messungen am Flash4.0 Video Imaging Setup durchgeführt (beschrieben in Kapitel 2.2.1). Die am Mikroskop befindliche Perfusion wurde lokal auf die Zellen im Fokus gerichtet und die Zellen je nach durchzuführender Messung mit verschiedenen Lösungen perfundiert. Während der ersten

Minute wurde grundsätzlich mit Tyrode gespült, um das basale intrazelluläre Calcium der Zellen zu ermitteln. Die Fluo-4 Emission wurde für die Dauer von 15 Minuten in 5 s Abständen bildlich erfasst. Insgesamt wurden also 180 Bilder pro Messung aufgenommen.

## 2.8 Datenanalyse

Zur Bildverarbeitung wurden die Programme ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, USA) sowie Arivis Vision 4D (Arivis AG, München, Deutschland) verwendet. Mit der LA (TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland) und Zen Pro Software (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurden 16-Bit Tiff Bilder/Videos mit einem Binning von 2x2 aufgenommen. Die LAS Software (Leica, Wetzlar, Deutschland) generierte 8-Bit Lif Dateien.

### 2.8.1 Auswertung in ImageJ

Die Auswertung in ImageJ wurde wie folgt durchgeführt. Für jede Zelle (Ausnahmen: Randbereiche und überlappende Zellen) wurde manuell eine ROI „region of interest“ gesetzt und für jedes Bild/Frame der Fluoreszenzwert dieser Zelle als „mean gray value“ innerhalb der ROI ermittelt. Anhand der Änderung des Fluoreszenzwertes zwischen den Einzelbildern, kann eine Aussage über den Zeitverlauf des intrazellulären Calciums der Zellen während der Messung getroffen werden. Beispielhaft ist diese Auswertung in Abbildung 20 A dargestellt. Zur Bereinigung der Hintergrundfluoreszenz wurde ein Mittelwert von 10 ROIs im Hintergrund (Bereich der Aufnahme ohne Zellen) gebildet und dieser Wert vom Fluoreszenzwert jeder Zelle abgezogen. Zur Auswertung des basalen Calciums der Erythrozyten wurde lediglich der Fluoreszenzwert (in a. u., „arbitrary units“) der ersten Bildaufnahme bei 0 Minuten nach Bereinigung der Hintergrundfluoreszenz herangezogen.

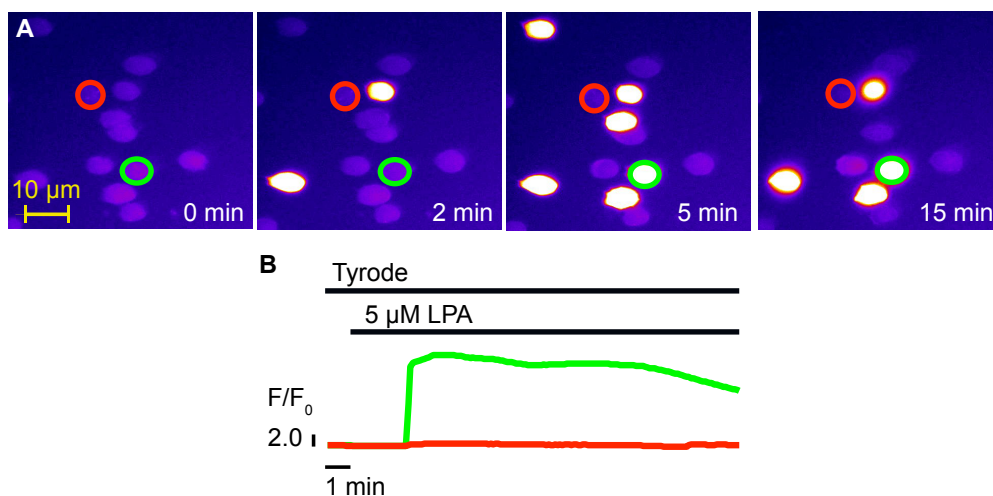


Abbildung 20: Beispielhafte Auswertung der Fluo-4 Emission und grafische Darstellung als  $F/F_0$  mittels ImageJ (Panel A) und IgorPro (Panel B). Zu sehen sind in Panel A Aufnahmen der Fluo-4 Emission einer LPA Messung

zu den Zeitpunkten 0, 2, 5 und 15 Minuten. ROIs wurden an zwei Zellen gesetzt (grüner und roter Kreis). Panel B zeigt die beispielhafte Darstellung des  $F/F_0$  der zuvor markierten Zellen während der Perfusion mit Tyrode und 5  $\mu\text{M}$  LPA.

Bei LPA-Messungen wurden aus den Fluoreszenzwerten der ersten 12 Bildaufnahmen jeder Zelle (Zeit in der ausschließlich mit Tyrode perfundiert wurde) ein Mittelwert ( $= F_0$ ) gebildet und die 180 Einzelfluoreszenzwerte ( $= F$ ) jeder Zelle durch diesen Wert geteilt. Daraus ergibt sich ein Verhältnis ( $F/F_0$ ) zum basalen Wert jeder Zelle, das Aufschluss darüber gibt, wie sich das intrazelluläre Calcium während der Messung verändert. Grafisch ist der Verlauf des  $F/F_0$  während einer Messung als Beispiel in Abbildung 20 B dargestellt.

Von jeder Zelle erhält man nach der Auswertung daher 180  $F/F_0$  Werte, von denen jeweils nur der maximale Wert für die weitere statistische Auswertung verwendet wurde. Die „mean gray value“ Werte aus ImageJ wurden in die Software MATLAB (The Mathworks, Inc., Natick, USA) überführt, wo die Hintergrundkorrektur und die Berechnung des  $F/F_0$  durchgeführt wurde.

### 2.8.2 Auswertung in Arivis Vision 4D

Als weitere Analysesoftware wurde Arivis Vision 4D (Arivis AG, Unterschleißheim, Deutschland) verwendet. Diese Software ermöglicht eine automatische Auswertung der Datensätze, ohne manuelles Setzen der ROIs auf jeder Zelle. Dazu wurde der Software eine „Pipeline“ vorgegeben mit Analyseparametern, die nacheinander abgearbeitet werden sollen. Zur Auswertung des basalen Calciums wurde die in Abbildung 21 A dargestellte Analysepipeline angewendet. Auch hier wurde zunächst eine Hintergrundkorrektur mittels des „*Enhancement*“ und „*Denoising*“ Filters durchgeführt. Ein Vergleich der Originaldaten und eines Datensatzes nach Hintergrundkorrektur ist in Abbildung 21 B und C zu erkennen. Zur Segmentierung der Zellen wurde der „*Blob Finder*“ eingesetzt. Der „*Threshold*“- Wert des „*Blob Finders*“ musste dabei für jede Messung neu experimentell eingestellt und an die Intensitätswerte der Zellen angepasst werden. Wie in Abbildung 21 D zu sehen, findet dieser nicht nur die Zellen, sondern auch Strukturen im Hintergrund. Diese wurden über verschiedene Größen- und Intensitätsfilter ausgeschlossen. Das Endergebnis einer Segmentierung ist in Abbildung 21 E zu erkennen. Nach erfolgreicher Segmentierung wurden die Intensitätswerte der gefundenen Zellen als „*mean intensity values*“ der einzelnen Segmente exportiert. Diese Werte entsprechen dem  $F_0$  der Zellen, da die Hintergrundkorrektur bereits in der Software durchgeführt wurde.

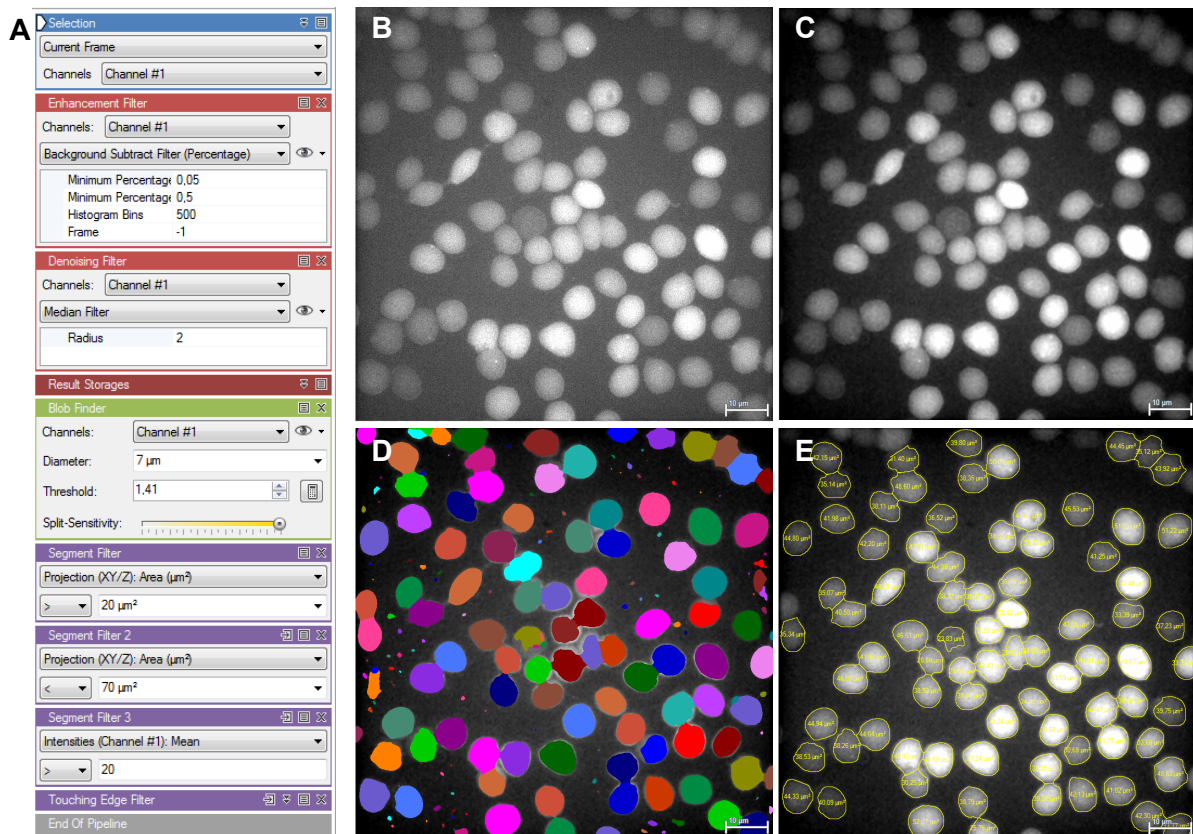


Abbildung 21: Bildliche Zusammenfassung einer Auswertung mittels Arivis Vision 4D. Panel A: Angewandte Analysepipeline. Panel B: Originalbild nach Import. Panel C: Nach Hintergrundkorrektur durch den „Enhancement“ und „Denoising“ Filter. Panel D: Anwendung des „Blob Finders“ zur Detektion der Zellen. Panel E: Endergebnis der Segmentierung nach Größen- und Intensitäts-Korrektur.

### 2.8.3 Statistische Auswertung

Zur Datenanalyse wurde die Software Graphpad Prism (Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA) verwendet. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt mit Blutproben von drei verschiedenen Spendern (entweder Maus oder Mensch), wobei mindestens 100 Zellen ausgewertet wurden. Aus der vorherigen Bildanalyse wurde für jede Zelle ein Fluoreszenzwert ermittelt, für basales Calcium das  $F_0$ , bei LPA-Messungen der maximale  $F/F_0$  Wert. Jede Zellpopulation wurde zunächst auf Normalverteilung getestet (D'Agostino Pearson Test). Wenn der Test positiv ausfiel, wurden die Daten als Säulendiagramme aufgetragen. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde zur grafischen Auswertung jede Zellpopulation als Box-Whiskers-Plot aufgetragen. Dabei zeigt die Box den Median und den 25–75% Bereich der Daten an, und die Fehlerbalken den 10–90% Bereich. Ebenso wurde bei normalverteilten Daten die Signifikanz mittels des t-Tests bestimmt, ansonsten unter Anwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt gesetzt:  $p > 0,5$  = nicht signifikant,  $p < 0,5$  = \*,  $p < 0,1$  = \*\* und  $p < 0,01$  = \*\*\*.

Für eine Maus- oder Mensch-basierte Auswertung wurde von jedem Zell-basierten Datensatz der Median genommen und dieser zunächst normiert. Bei Patientenproben erfolgte eine Normierung auf die zugehörige Transportkontrolle (siehe Kapitel 3.1.2.4), bei Transfusionsmäusen auf die zugehörige Wildtyp Maus (siehe Kapitel 3.4.4). Die normierten Mediane wurden zu Gruppen zusammengefasst und erneut statistisch wie bereits beschrieben analysiert.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Intrazelluläres Calcium in hereditären hämolytischen Anämien

##### 3.1.1 Patienten-Screening im Rahmen des CoMMITMenT Projekts

Im Rahmen des CoMMITMenT Projekts wurden Blutproben von Patienten untersucht, die an sehr seltenen Anämien erkrankt sind. Teilweise sind von diesen Erkrankungen bisher nur weniger als 10 Fälle bekannt, wie man am Beispiel des Glutamat-Cystein-Ligase Mangels sieht (van Wijk and van Solinge, 2016). Der Transport der Blutproben dieser Patienten sowie gesunder Kontrollspender erfolgte daher aus spezialisierten Kliniken innerhalb Europas. Obwohl die genetische Grundlage dieser Anämien meist bekannt ist, fehlt es am genauen Verständnis, wie sich diese auf die Zellphysiologie auswirkt und letztlich zu einer verfrühten Elimination der Erythrozyten führt. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt pathologischer Erythrozyten durchgeführt.

Dazu wurden die Blutproben in physiologischer Lösung gewaschen und die Erythrozyten mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-4 AM beladen. Es erfolgte eine mikroskopische und teilweise durchflusszytometrische Analyse der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs, die mit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Erythrozyten korreliert. In Abbildung 22 ist eine Zusammenstellung beispielhafter mikroskopischer Aufnahmen der Erythrozyten von Patienten mit verschiedenen Anämien sowie von Kontrollblutproben gesunder Spender zu sehen.

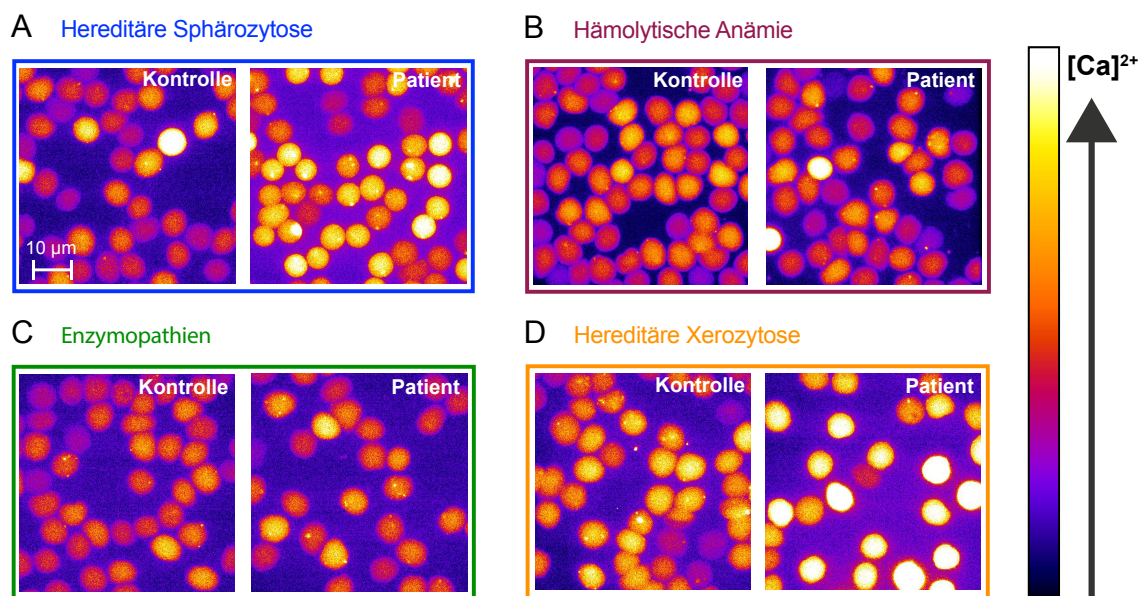


Abbildung 22: Beispielhafte mikroskopische Aufnahmen von Patienten sowie Kontrollerythrozyten gesunder Spender nach Beladung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Farbstoff Fluo-4 AM. Rechts: Farbskala der Fluoreszenzintensität skaliert



von schwarz (geringste  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration) nach weiß (höchste  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration). Panel A: Erythrozyten eines Patienten mit Hereditärer Sphärozytose und dazugehöriger Transportkontrollblutprobe. Panel B: Erythrozyten eines Patienten mit uncharakterisierter hämolytischer Anämie und dazugehöriger Transportkontrollblutprobe. Panel C: Erythrozyten eines Patienten mit vorliegender Enzymopathie und dazugehöriger Transportkontrollblutprobe. Panel D: Erythrozyten eines Patienten mit Hereditärer Xerozytose und dazugehöriger Transportkontrollblutprobe. Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2017).

Die Analyse der Patientendaten erfolgte gruppiert nach der Art der vorliegenden Anämie. Die zwei größten Patientengruppen machen die Gruppen Hereditäre Sphärozytose (Abbildung 22 A) und Hereditäre Xerozytose (Abbildung 22 D) aus. Die Patienten ohne genaue Diagnose wurden als hämolytische Anämie (Abbildung 22 B) zusammengefasst. Die letzte Gruppe besteht aus Patienten mit verschiedenen Enzymopathien (Abbildung 22 C).

### 3.1.2 Vorarbeiten zur Analyse des intrazellulären Calciums

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Bildverarbeitungsprogramme zur Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen der Erythrozyten verwendet. ImageJ ist eine „Open-Source-Software“, bei der eine manuelle Selektion der Zellen vor der Analyse durchgeführt wurde (Vergleich Kapitel 2.8.1). Mittels Arivis Vision 4D ist es möglich, durch Wahl geeigneter Filter eine automatische Selektion und Analyse der Zellen zu erreichen, was sich erheblich auf die Dauer der Analyse auswirkt (Vergleich Kapitel 2.8.2). Um jedoch auszuschließen, dass die Art der Analyse Einfluss auf das Ergebnis hat, wurden die mikroskopischen Aufnahmen mehrerer gesunder sowie anämischer Blutproben mit beiden Programmen ausgewertet. Den Vergleich beider Auswertungen zeigt Abbildung 23.

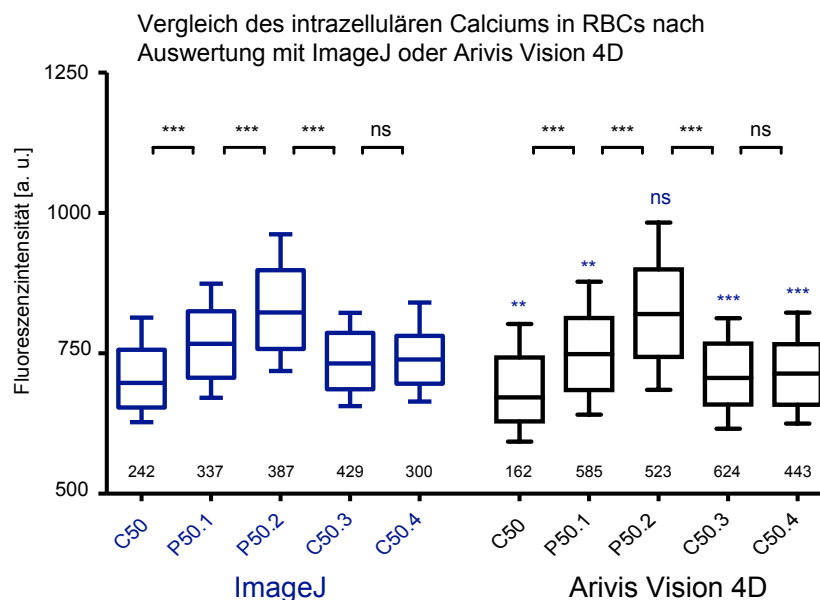


Abbildung 23: Vergleich der Auswertung der mikroskopischen Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-4 gefärbten Erythrozyten mittels ImageJ und Arivis Vision 4D. Beispielhaft analysiert wurden Blutproben humaner gesunder Blutspender (C50, C50.3 und C50.4) sowie HX Patienten (P50.1 und P50.2). Schwarze Boxen: ImageJ, Blaue Boxen: Arivis Vision 4D. Dargestellt sind die Daten als Box-Plots mit Median und 25-75% Quartilen und

Whiskern im 10-90% Bereich. Zusätzlich angegeben ist die Anzahl der analysierten Zellen. Signifikanzen wurden bestimmt mittels des Mann-Whitney Tests (\*\*\*) =  $p < 0,01$ , \*\* =  $p < 0,1$ , ns =  $p > 0,5$ ).

Die Auswertung mittels Arivis Vision 4D ergibt einzeln betrachtet für jede analysierte Probe eine geringe Fluoreszenzintensität als die Auswertung mittels ImageJ. Der Vergleich der Patienten und Kontrollen untereinander (jeweils blaue und schwarze Gruppe untereinander) zeigt jedoch mit beiden Analyseprogramme dieselbe Tendenz.

### 3.1.2.1 Hereditäre Sphärozytose

Die Hereditäre Sphärozytose (HS) ist die am häufigsten auftretende Membranopathie, eine Erkrankung mit Defekten der Zellmembran der Erythrozyten (Da Costa et al., 2013). Dabei kann die Ursache dieser Erkrankung zurückgeführt werden auf Mutationen in den Membranproteinen Ankyrin-1 (*ANK1*), Bande 3 Protein (*SLC4A1*), Protein 4.2 (*EPB42*) sowie  $\alpha$ - (*SPTA1*) und  $\beta$ -Spektrin (*SPTB*) (Narla and Mohandas, 2017). In dieser Arbeit wurden Blutproben von 16 Patienten mit diagnostizierter HS auf den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Erythrozyten untersucht. Abbildung 24 A zeigt die Auswertung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Fluo-4 Fluoreszenzintensität) aller einzelner Patienten und von 12 Kontrollblutproben. Es ist deutlich zu erkennen, dass es eine hohe Varianz zwischen den Patienten und Kontrollproben gibt, aber auch zwischen den einzelnen Kontrollproben untereinander (Abbildung 24 A, schwarze Boxen). Betrachtet man die Proben jedoch nur im Vergleich innerhalb einer „Lieferung“ mit identischen Transportkonditionen (Abbildung 24 A, graue oder weiße Hinterlegung der Boxen gruppiert Blutproben eines Transports), liegt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration immer innerhalb derselben Größenordnung. Alle 16 Hereditäre Sphärozytose Patienten zeigen einen signifikant erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt im Vergleich mit ihrer jeweiligen gesunden Transportkontrolle. Für die Patienten-basierte Auswertung wurden die Patientenproben immer im Vergleich zur zugehörigen Transportkontrollblutprobe analysiert, heißt auf diese normiert. Die Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von HS Patienten gruppiert nach Mutationen im selben Membranprotein ist in Abbildung 24 B dargestellt. Es wurden 7 Patienten analysiert mit Mutationen in *ANK1*, 2 Patienten mit Mutationen in *SLC4A1* und 4 bzw. 3 Patienten mit Mutationen in *SPTA1* und *SPTB*. Die Mutation selbst ist innerhalb einer Gruppe jedoch nicht identisch. Nur für die Gruppe der Patienten mit *ANK1* Mutationen konnte ein signifikanter Anstieg im intrazellulären Calcium gemessen werden. Die anderen Patientengruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe der gesunden Kontrollblutproben.

Des Weiteren wurden die Patienten unterteilt in die Gruppen splenektomiert und nicht splenektomiert. Die zugehörige Auswertung ist in Abbildung 24 C dargestellt. Hier konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts im Vergleich mit der

Gesamtpopulation an Patienten festgestellt werden. Splenektomierte und nicht splenektomierte Patienten zeigen dasselbe Level an intrazellulärem Calcium in Erythrozyten.

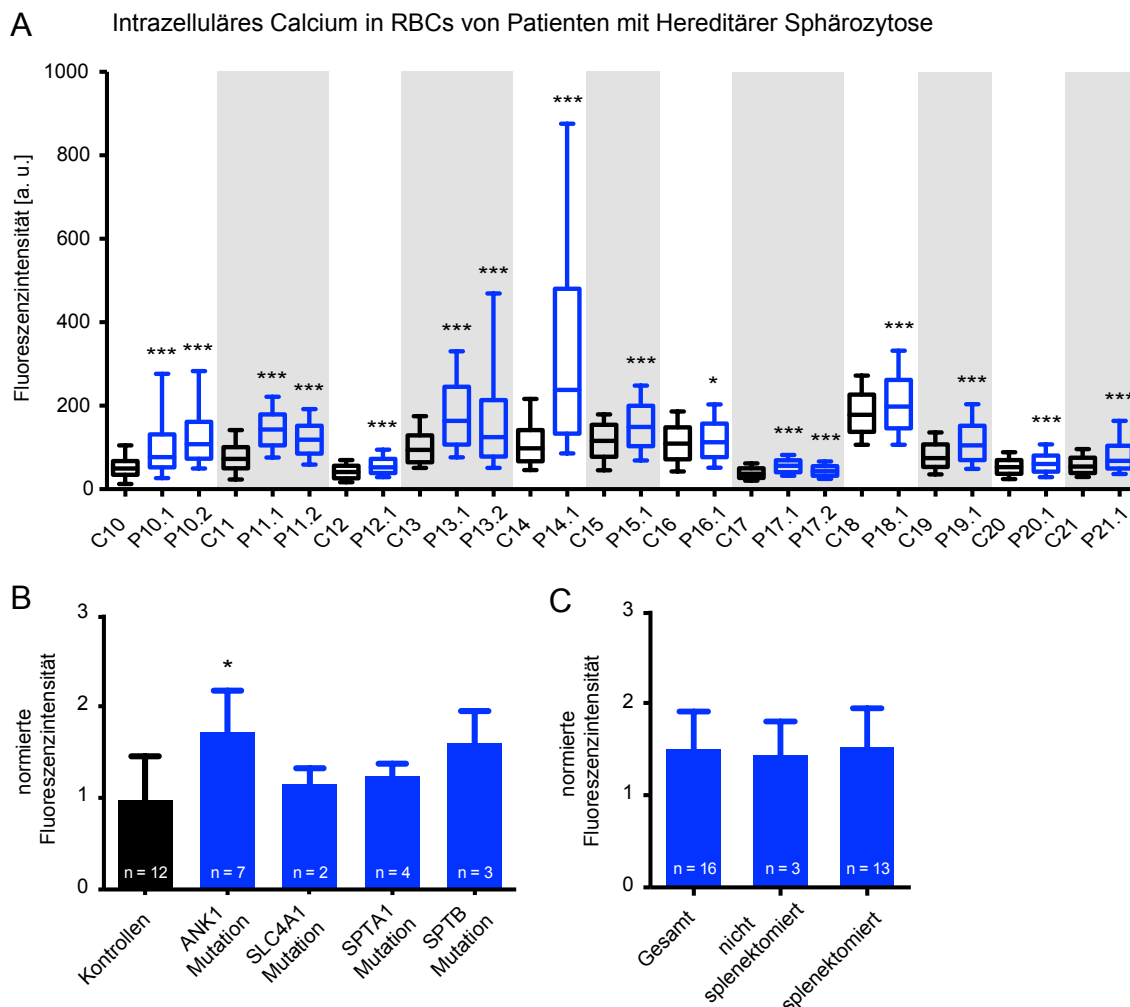


Abbildung 24: Auswertung der mikroskopischen Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-4 gefärbten Erythrozyten humaner gesunder Blutspender sowie HS Patienten. Schwarze Boxen: Kontrollen, Blaue Boxen: Patienten. Graue und weiße Hinterlegung gruppiert Blutproben innerhalb einer „Lieferung“ (identische Transportbedingungen). Panel A: Einzelne Darstellung aller Patienten mit dazugehöriger Transportkontrolle (jeweils die vorherige schwarze Box). Panel B: Vergleich der normalisierten Fluoreszenzintensität zwischen Kontrollen und nach Mutationen gruppierten Patienten. Kontrollen wurde dazu auf ihren Mittelwert normalisiert und die Patienten auf ihre zugehörige Transportkontrolle. Panel C: Vergleich der normalisierten Fluoreszenzintensität zwischen der Gesamtpopulation der Patienten und den Gruppen aus splenektomierten und nicht splenektomierten Patienten. \*\*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,5$ . Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2017).

### 3.1.2.2 Hereditäre Xerozytose (Dehydrierte Stomatozytose)

Die Hereditäre Xerozytose (HX), auch dehydrierte Stomatozytose genannt, ist eine seltene Erkrankung der Erythrozyten bei der es zu einer Veränderung der Membranpermeabilität gegenüber monovalenten Kationen kommt (Archer et al., 2014). Ursächlich sind dabei Mutationen im *FAM38A* Gen, das für den mechanosensitiven Kationenkanal Piezo1 kodiert (Zarychanski et al., 2012). Die in dieser Arbeit untersuchten 11 Patienten mit diagnostizierter HX weisen ebenfalls alle eine Mutation in diesem Gen auf. Abbildung 25 zeigt die

Auswertung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf Basis der Fluo-4 Fluoreszenzintensität aller einzelner HX Patienten und von 5 Kontrollblutproben. Wie bei der Hereditären Sphärozytose, zeigt sich auch hier teilweise eine hohe Varianz in der Analyse des intrazellulären Calcium der Erythrozyten zwischen Patienten und Kontrollen aus verschiedenen „Lieferungen“. Daher wurden erneut die Patientenproben nur im Vergleich zur dazugehörigen gesunden Transportkontrollblutprobe ausgewertet. Von 11 analysierten HX Patienten zeigen 9 einen signifikant erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt. Bei den restlichen zwei Patienten (P50.1, P51.2) liegt die Konzentration des Calciums etwa im Bereich der Transportkontrollen.

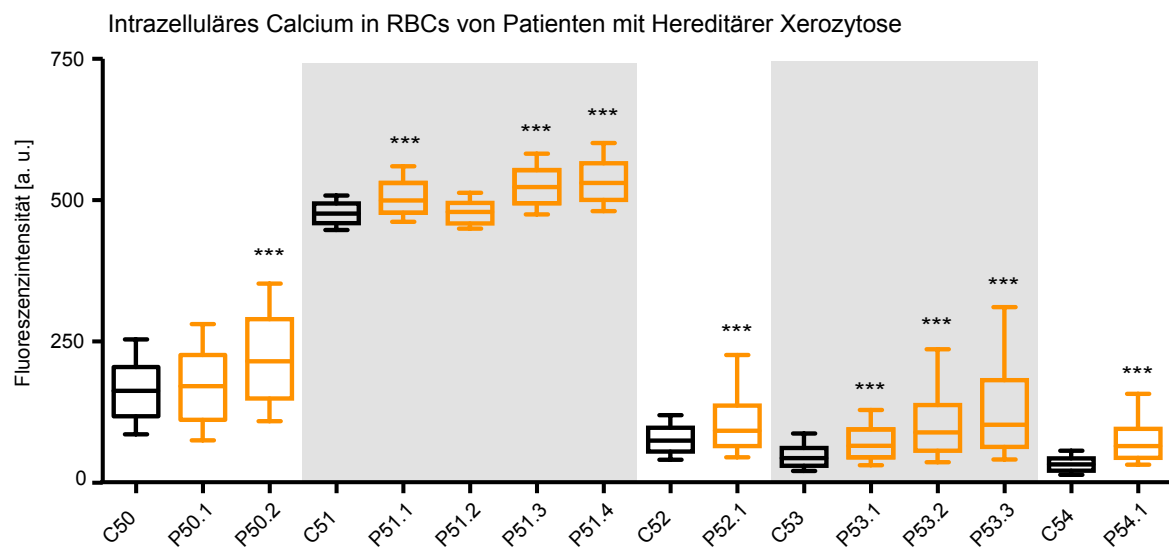


Abbildung 25: Auswertung der mikroskopischen Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-4 gefärbten Erythrozyten humaner gesunder Blutspender sowie HX Patienten. Schwarze Boxen: Kontrollen, orange Boxen: Patienten. Graue und weiße Hinterlegung gruppiert Blutproben innerhalb einer Lieferung (identische Transportbedingungen). Einzelne Darstellung aller Patienten mit dazugehöriger Transportkontrolle (jeweils die erste schwarze Box). \*\*\* =  $p < 0,01$ . Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2017).

### 3.1.2.3 Hämolytische Anämien und Enzymopathien

Zwei sehr heterogene Gruppen bilden die Patienten mit Enzymopathien und hämolytischer Anämie. Letztere Gruppe fasst die drei analysierten Patienten zusammen, bei denen bisher keine eindeutige Diagnose gestellt werden konnte, die Anämie also noch uncharakterisiert ist. Zur ersten Gruppe zählen drei Patienten mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase Mangel und jeweils ein Patient mit Glutathion-Reduktase und  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase Mangel. Zusammengefasst wurden beide Gruppen, um eine statistische Analyse zu erlauben, die einzelnen Patienten zeigen jedoch kein einheitliches Bild. Abbildung 26 A zeigt die Zell-basierte statistische Auswertung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration/Fluo-4 Fluoreszenzintensität der Patienten mit uncharakterisierter Anämie und der dazugehörigen gesunden Transportkontrollblutproben. Bei einem Patienten (P30.1) lässt sich hier eine

signifikante Erhöhung des intrazellulären Calciums im Vergleich zur Kontrollblutprobe feststellen, die beiden anderen Patienten zeigen ein signifikant niedrigeres  $\text{Ca}^{2+}$ -Level als die zugehörigen Kontrollen (P31.1, P32.1). Abbildung 26 B zeigt die statistische Auswertung der Patienten mit verschiedenen Enzymopathien. Drei der fünf analysierten Patienten zeigen erneut ein signifikant erhöhtes Level an intrazellulärem Calcium im Vergleich zu ihrer Transportkontrolle (P41.1, P42.1, P43.1). Bei einem Patienten lässt sich kein Unterschied zur Kontrolle feststellen (P40.1), und der letzte Patient zeigt wiederum eine signifikante Verringerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (P44.1).

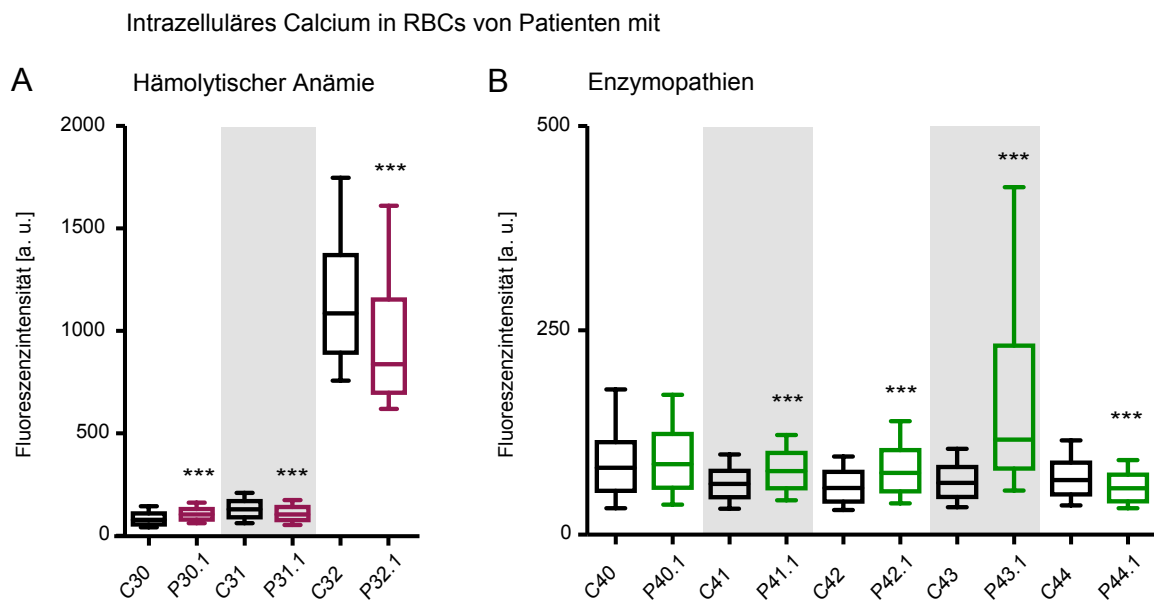


Abbildung 26: Auswertung der mikroskopischen Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-4 gefärbten Erythrozyten humaner gesunder Blutspender sowie Anämie Patienten. Schwarze Boxen: Kontrollen, violette Boxen: uncharakterisierten Anämie Patienten, grüne Boxen: Patienten mit Enzymopathien. Graue und weiße Hinterlegung gruppiert Blutproben innerhalb einer Lieferung (identische Transportbedingungen). Panel A: Einzelne Darstellung aller Patienten mit uncharakterisierter Anämie und dazugehöriger Transportkontrolle (jeweils die erste schwarze Box). Panel B: Einzelne Darstellung aller Patienten mit Enzymopathien und dazugehöriger Transportkontrolle (jeweils die erste schwarze Box). \*\*\* =  $p < 0,01$ . Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2017).

### 3.1.2.4 Patienten-basierte Analyse

Um eine allgemeine Aussage zum intrazellulären Calcium in Anämie Patienten treffen zu können wurden die einzelnen Patienten zu verschiedenen Gruppen zusammengefasst. Dazu wurde zunächst aus der Zell-basierten Auswertung der Median der Fluoreszenzintensität ( $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration) für jeden Patienten und jede Kontrolle ermittelt. Die Kontrolle wurde anschließend auf den Mittelwert aller Kontrollen der jeweiligen Gruppe normiert und die Patienten jeweils auf ihre zugehörige Transportkontrolle. Gruppirt wurden die Patienten anhand ihrer diagnostizierten Erkrankung in Hereditäre Sphärozytose, Hereditäre Xerozytose, Enzymopathien und hämolytische Anämien. Ebenfalls erfolgte ein Vergleich aller Anämie Patienten als eine Gruppe mit der Gesamtheit der gemessenen gesunden

Transportkontrollblutproben. Die statistische Auswertung der Gruppen aus allen Anämie Patienten und Kontrollproben ist in Abbildung 27 A dargestellt. Die Gruppe der 35 Anämie Patienten zeigt eine hoch signifikant erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Vergleich zu den 25 gemessenen gesunden Transportkontrollen. Unterteilt man die Patienten wieder und gruppiert sie nach Art der Anämie, so lässt sich dieser signifikante Anstieg im intrazellulären Calcium nur für die Patienten mit den Membranopathien Sphärozytose und Xerozytose bestätigen (Abbildung 27 B). Für die beiden kleineren Patientengruppen mit den Enzymopathien und der uncharakterisierten hämolytischen Anämie zeigt die Auswertung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels keinen signifikanten Unterschied zu den gemessenen gesunden Kontrollen.

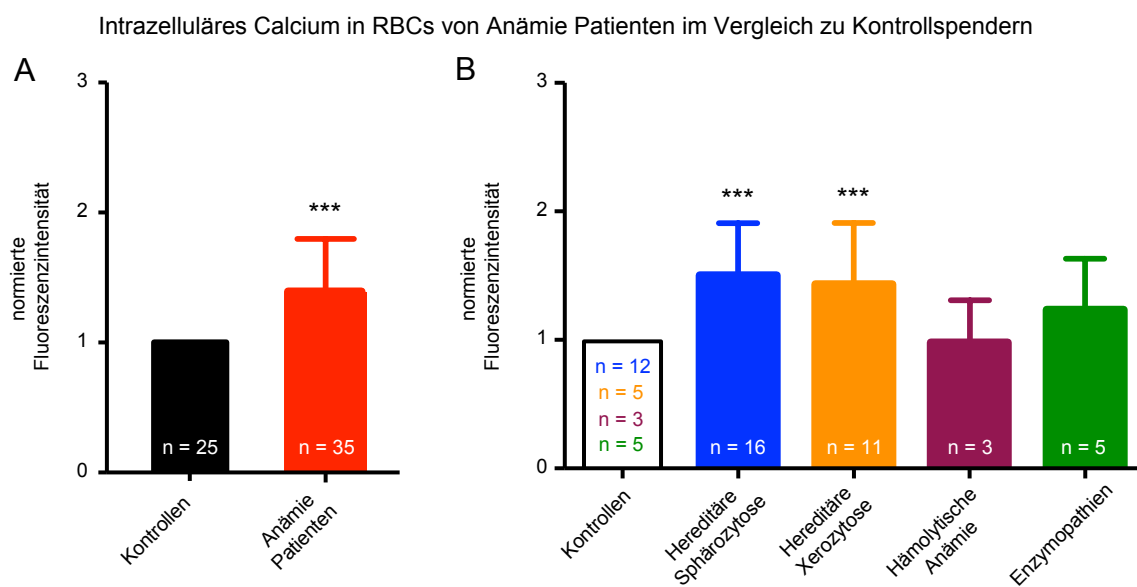


Abbildung 27: Patienten-basierte statistische Auswertung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Panel A: Statistische Auswertung der normalisierten Fluoreszenzintensität aller gemessener Patienten (roter Balken) und gesunder Kontrollblutproben (schwarzer Balken). Panel B: Statistische Auswertung der normalisierten Fluoreszenzintensität aller gemessener Patienten gruppiert als Hereditäre Sphärozytose (blauer Balken), Hereditäre Xerozytose (orangefarbener Balken), hämolytische Anämien (violetter Balken), Enzymopathien (grüner Balken) und gesunder Kontrollblutproben (schwarz-weißer Balken). \*\*\* =  $p < 0,01$ . Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2017).

### 3.1.3 Hereditäre Sphärozytose Patienten – Analyse des intrazellulären Calciums in „frischen“ Blutproben

Zur Überprüfung der nach Transport der Blutproben gewonnenen Daten zum intrazellulären Calcium in Anämie Patienten, wurde das intrazelluläre Calcium in Erythrozyten frischer Blutproben analysiert. Gemessen wurden dazu drei Blutproben von Patienten mit Hereditärer Sphärozytose, sowie drei gesunde Spender als Vergleichskontrollen. Die Messungen erfolgten 1 – 2 Stunden nach Blutentnahme und wurden am Institut für Klinische Chemie und Hämatologie des Universitair Medisch Centrum Utrecht (Niederlande) durchgeführt. Die

Vorbereitung der Zellen erfolgte auf gleiche Weise wie die, der zuvor transportierten Erythrozyten. Abbildung 28 A zeigt die Zell-basierte Auswertung des intrazellulären Calciums in RBCs „frischer“ Blutproben der einzelnen Kontrollproben und HS Patienten. In Panel B ist die zusammengefasste Zell-basierte Auswertung dargestellt. Die Erythrozyten der Patientenproben zeigen eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität als die der gemessenen Kontrollblutproben. Bei der Blutproben-basierten Auswertung der Patienten und Kontrollen in Abbildung 28 C lässt sich dieselbe Tendenz erkennen, jedoch ohne Signifikanz.

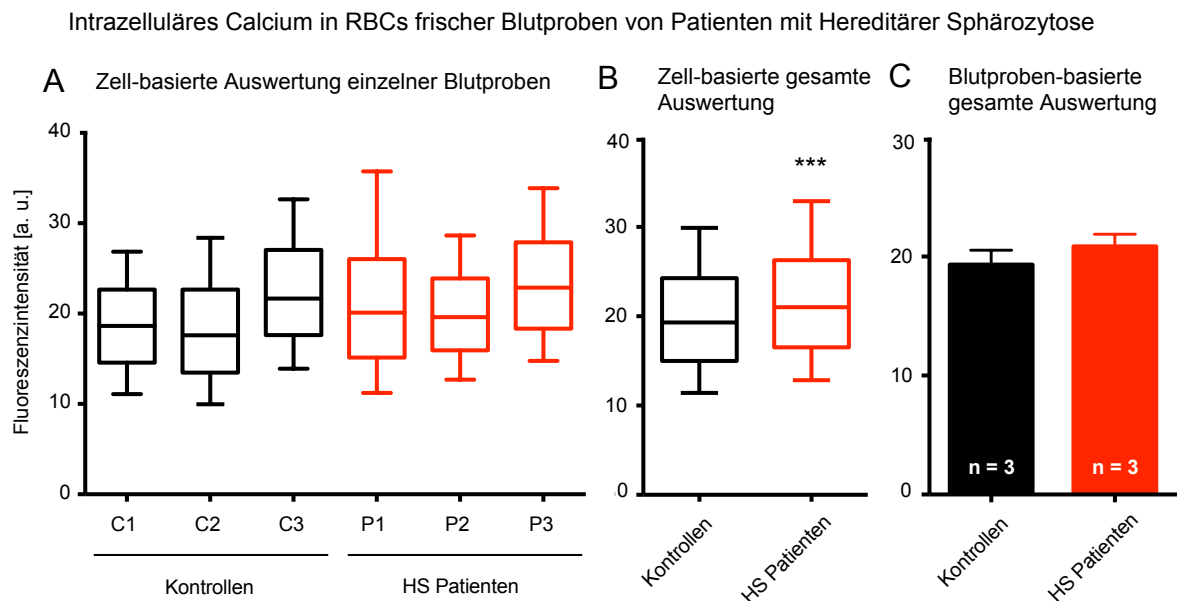


Abbildung 28: Auswertung der mikroskopischen Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-4 beladenen Erythrozyten aus frischen Blutproben humaner gesunder Spender (schwarze Boxen) sowie Patienten mit Hereditärer Sphärozytose (rote Boxen). Die Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen (Setup Zeiss, Kapitel 2.2.2) erfolgte mittels Arivis Vision 4D. Panel A: Darstellung einzelner Kontrollen und Patienten nach Zell-basierter Auswertung. Panel B: Darstellung aller Kontrollen und Patienten nach Zell-basierter Auswertung. Panel C: Darstellung aller Kontrollen und Patienten nach Blutproben-basierter Auswertung. \*\*\* =  $p < 0,01$ .

### 3.1.4 Patienten mit Gardos-Channelopathie

Des Weiteren wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik Ospedale Maggiore in Mailand (Italien) Patienten mit verschiedenen Mutationen im Gardos-Kanal (*KCNN4*) untersucht. Diese Patienten zeigen ebenfalls eine chronische hämolytische Anämie. Der betroffene Kanal ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver  $\text{K}^{+}$ -Kanal, der an der Volumenregulation der Erythrozyten beteiligt ist (siehe auch Kapitel 1.4). Mutationen in diesem Kanal wurden bei den untersuchten Patienten mittels „Next Generation Sequencing“ nachgewiesen.

#### 3.1.4.1 S314P Mutation

Eine der gefundenen Mutationen des *KCNN4* Gens ist die Mutation c.940T<C (S314P), die dazu führt, dass bei der Translation des Proteins anstelle eines Serin an Stelle 314 ein Prolin

eingebaut wird. Es handelt sich hierbei um eine Mutation, die zu einer Funktionsverstärkung führt. Die betroffene Stelle befindet sich in der Calmodulin Bindungsdomäne des Proteins und führt zu einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des Gardos-Kanals (unpublizierte Daten). Beide untersuchten Patienten (Vater I.1 und Sohn I.2) sind heterozygote Träger dieser Mutation. Bei Patient I.1 wurde zusätzlich eine Mutation des  $\beta$ -Globin Gens (*HBB*) detektiert. Beide Patienten sind cholezystektomiert, jedoch nicht splenektomiert. Da der Gardos-Kanal über Calcium reguliert wird, wurden Untersuchungen zur intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der pathologischen Erythrozyten durchgeführt und erneut als Vergleich Transportkontrollen analysiert.

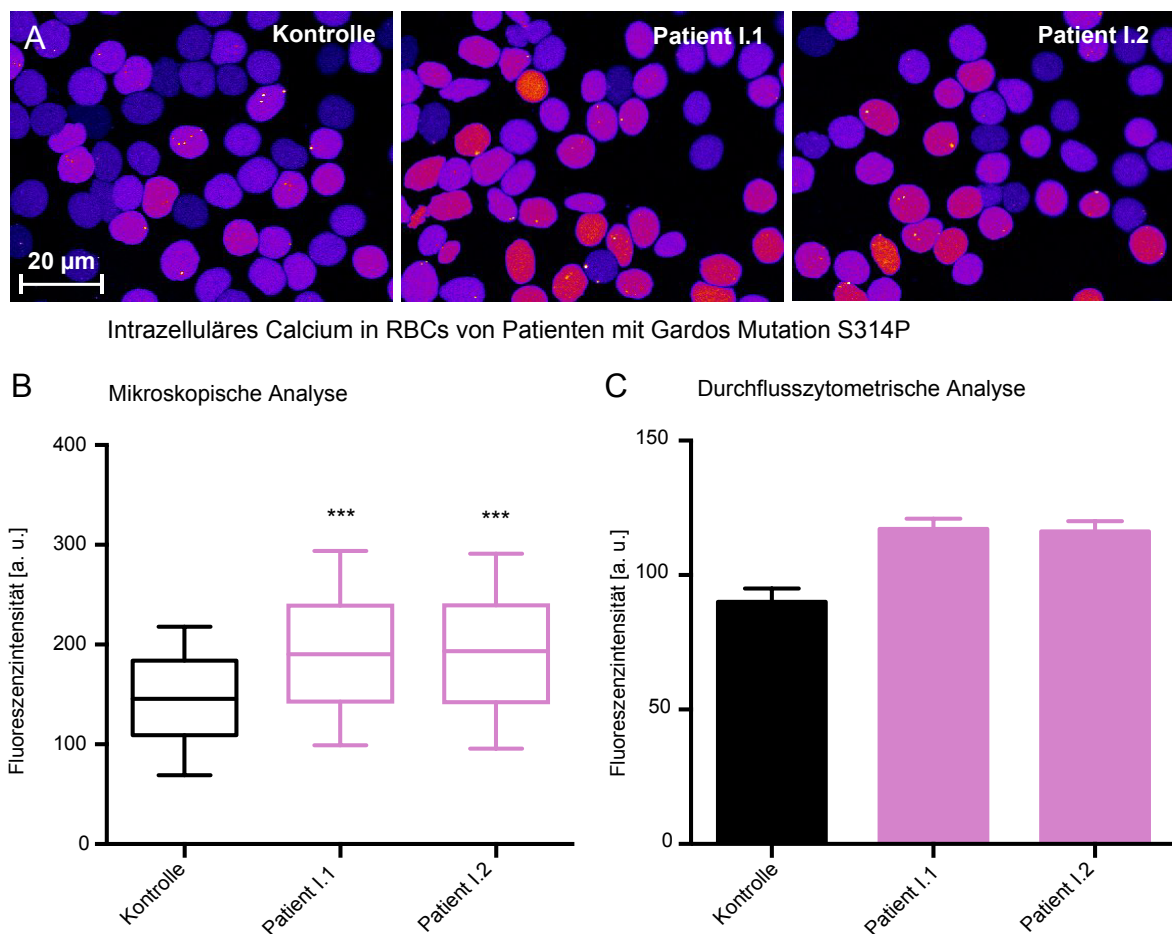


Abbildung 29: Mikroskopische und durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Kontrollblut sowie Blutproben der Gardos-*Channelopathie* Patienten I.1 und I.2. Panel A: Beispielhafte mikroskopische Aufnahmen (Setup Leica, Kapitel 2.2.3) von Patienten- sowie Kontrollerythrozyten nach Färbung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Farbstoff Fluo-4 AM. Panel B: Mikroskopische Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Patienten (pinke Boxen) und Kontrolle (schwarze Box). Panel C: Durchflusszytometrische Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Patienten (pinke Säulen) und Kontrolle (schwarze Säule). \*\*\* =  $p < 0,01$ .

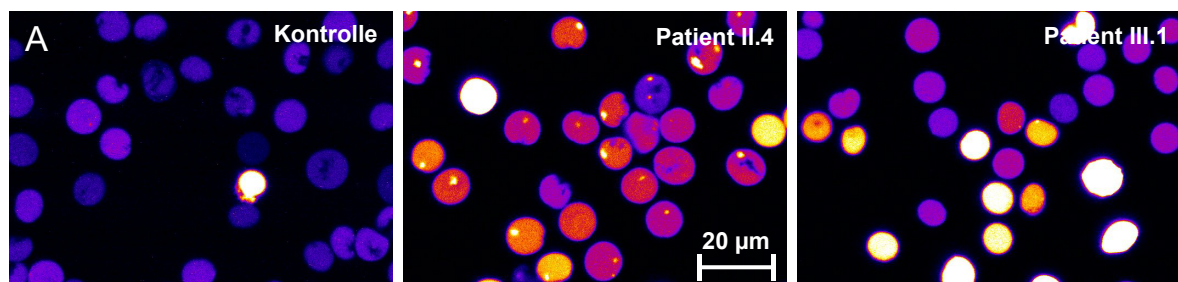
Abbildung 29 A zeigt beispielhafte mikroskopische Aufnahmen von Fluo-4 gefärbten Erythrozyten der Patienten sowie der Kontrollblutprobe. Auf Basis der Fluo-4 Fluoreszenzintensität wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Erythrozyten analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist in Abbildung 29 C dargestellt.



Beide Patienten zeigen ein erhöhtes, etwa gleiches Level an intrazellulärem Calcium im Vergleich zur Transportkontrolle. Dieses Ergebnis konnte auch mikroskopisch bestätigt werden. Beide Patienten zeigen in der Auswertung in Abbildung 29 B eine signifikant erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

### 3.1.4.2 R352H Mutation

Als weitere Mutation im *KCNN4* Gen wurde die Mutation c.1055G>A (p.R352H) entdeckt. Das dadurch translatierte Protein erhält an der Stelle 352 anstatt eines Arginins ein Histidin. Diese Mutation befindet sich ebenfalls in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsdomäne des Gardos-Kanals und erhöht dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität. Beide Patienten (II.4 Vater, III.1 Tochter) sind heterozygote Träger der Mutation. Weitere Mutationen in Kanalproteinen oder Proteinen der Membran oder des Zytoskeletts roter Blutzellen konnten mittels „*Next Generation Sequencing*“ nicht nachgewiesen werden. Patient II.4 ist zudem splenektomiert. Da der Gardos-Kanal über Calcium reguliert wird, wurden Untersuchungen zur intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der pathologischen Erythrozyten durchgeführt und erneut als Vergleich Transportkontrollen analysiert.



Intrazelluläres Calcium in RBCs von Patienten mit Gardos Mutation R352H

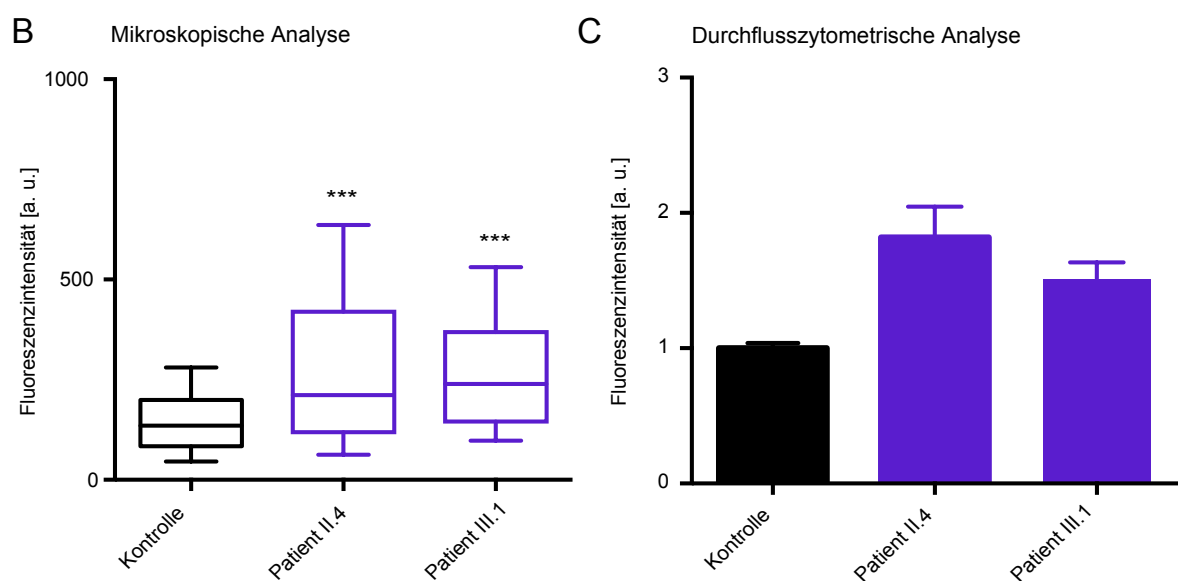


Abbildung 30: Mikroskopische und durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Kontrollblut sowie Blutproben der Gardos-*Channelopathie* Patienten II.4 und III.1. Panel A: Beispielhafte

mikroskopische Aufnahmen (Setup Leica, Kapitel 2.2.3) von Patienten- sowie Kontrollerythrozyten nach Färbung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-4 AM. Panel B: Mikroskopische Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Patienten (violette Boxen) und Kontrolle (schwarze Box). Panel C: Durchflusszytometrische Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Patienten (violette Säulen) und Kontrolle (schwarze Säule). Abbildung modifiziert nach (Fermo et al., 2017).

Abbildung 30 A zeigt beispielhafte mikroskopische Aufnahmen von Fluo-4 gefärbten Erythrozyten der Patienten II.4 und III.1 sowie der Kontrollblutprobe. Anhand der Fluo-4-Fluoreszenzintensität wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Erythrozyten analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist in Abbildung 30 C dargestellt. Beide Patienten zeigen ein erhöhtes Level an intrazellulärem Calcium im Vergleich zur Transportkontrolle, wobei Patient III.1 eine geringere Erhöhung als Patient II.4 aufweist. Dieses Ergebnis konnte auch mikroskopisch bestätigt werden. Beide Patienten zeigen in der Auswertung in Abbildung 30 B eine signifikant erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

## 3.2 Untersuchungen zum Lysophosphatidsäure Signalweg

### 3.2.1 Aktivierung des TRPC6 Kanals über die PKC $\alpha$

Im zweiten Teilbereich dieser Arbeit wurde der LPA Signalweg in murinen und humanen Erythrozyten untersucht. Aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe sowie der Literatur ist bekannt, dass LPA zu einem konzentrationsabhängigen Einstrom von Calcium in die Zellen führt (Wang, 2013; Yang et al., 2000). Es konnte bereits gezeigt werden, dass LPA über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor agiert und zwei separate Signalwege in den Erythrozyten aktiviert. Zum einen kommt es durch die Aktivierung der PI<sub>3</sub>K und mehrerer Kinasen des MAP-Kinase-Wegs zur Öffnung des Ca<sub>v</sub>2.1 Kanals, auf der anderen Seite erfolgt ein Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über den TRPC6 Kanal. Da dieser Teil des Signalweges sensitiv für Inhibitoren der PKC $\alpha$  ist, konnte eine Beteiligung dieses Enzyms in der Kaskade ebenfalls belegt werden (Kaestner et al., 2012; Wagner-Britz et al., 2013; Wang, 2013). Es stellte sich jedoch die Frage, wie die Signalweitergabe an dieser Stelle genau abläuft, da in der Literatur eine PKC $\alpha$ -vermittelte Phosphorylierung des TRPC6 Kanals bisher mit dessen Inaktivierung in Verbindung gebracht wurde (Ambrus et al., 2015; Bousquet et al., 2010). Zur weiteren Untersuchung der Signalkaskade wurde der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den LPA-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom analysiert. Eine Auswertung zu Untersuchungen an humanen Erythrozyten ist in Abbildung 31 dargestellt.

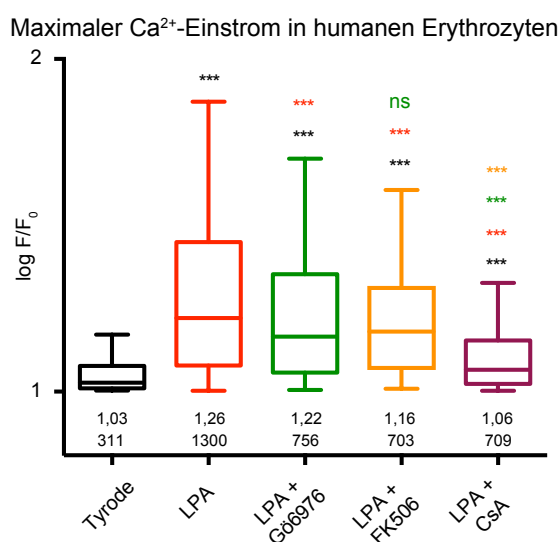


Abbildung 31: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in humanen Erythrozyten. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei analysierten Blutproben als logarithmisch aufgetragene Box-Plots mit Median und 25-75% Quartilen und Whiskern im 10%-90% Bereich der Daten. Schwarz: Kontrollperfusion mit Tyrode. Rot: Perfusion mit 5  $\mu$ M LPA. Grün: Perfusion mit 5  $\mu$ M LPA und 1  $\mu$ M Gö6976. Orange: Perfusion mit 5  $\mu$ M LPA und 10  $\mu$ M FK506. Weinrot: Perfusion mit 5  $\mu$ M LPA und 5  $\mu$ M CsA. Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney Tests ermittelt (ns =  $p > 0,5$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Untersucht wurden die beiden pharmakologischen Substanzen FK506 und Cyclosporin A (CsA). Als Kontrollmessung wurden die Erythrozyten mit Tyrode perfundiert (Abbildung 31, schwarze Box). Bei Perfusion der Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  LPA kommt es zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Calcium (Abbildung 31, rote Box). Durch eine vorherige Inkubation der Erythrozyten mit 1  $\mu\text{M}$  Gö6976 (Abbildung 31, grüne Box) oder 10  $\mu\text{M}$  FK506 (Abbildung 31, orange Box) kann dieser Anstieg signifikant reduziert werden, für beide Substanzen auf dasselbe Niveau. Einen ebenfalls inhibierenden Effekt auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom hat die Anwendung von 5  $\mu\text{M}$  Cyclosporin A (Abbildung 31, weinrote Box). Hier zeigt sich ein noch stärkerer Inhibitionseffekt, das intrazelluläre Calcium ist jedoch weiterhin höher als in der Kontrollmessung. Analog dazu wurden die Inhibitoren an murinen Erythrozyten von Wildtyp sowie  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäusen untersucht. In Abbildung 32 sind die Messungen mit Gö6976 und FK506 dargestellt. Ebenso wie in humanen Erythrozyten führt die Perfusion mit LPA (Abbildung 32, rote Boxen), im Vergleich zur Kontrollmessung mit Tyrode (Abbildung 32, schwarze Boxen) zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ , der in Zellen von  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäusen (schraffierte Boxen) geringer ausfällt als in Wildtyp Mäusen (nicht schraffierte Boxen). Dieser Anstieg lässt sich in Wildtyp Mäusen durch die Inkubation mit den Inhibitoren Gö6976 und FK506 signifikant reduzieren (Abbildung 32, grüne und orangene Boxen). In  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäusen zeigt sich durch die Verwendung der beiden Substanzen kein signifikanter Unterschied des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms im Vergleich zur alleinigen Perfusion mit LPA (Abbildung 32, grüne und orange, schraffierte Boxen).

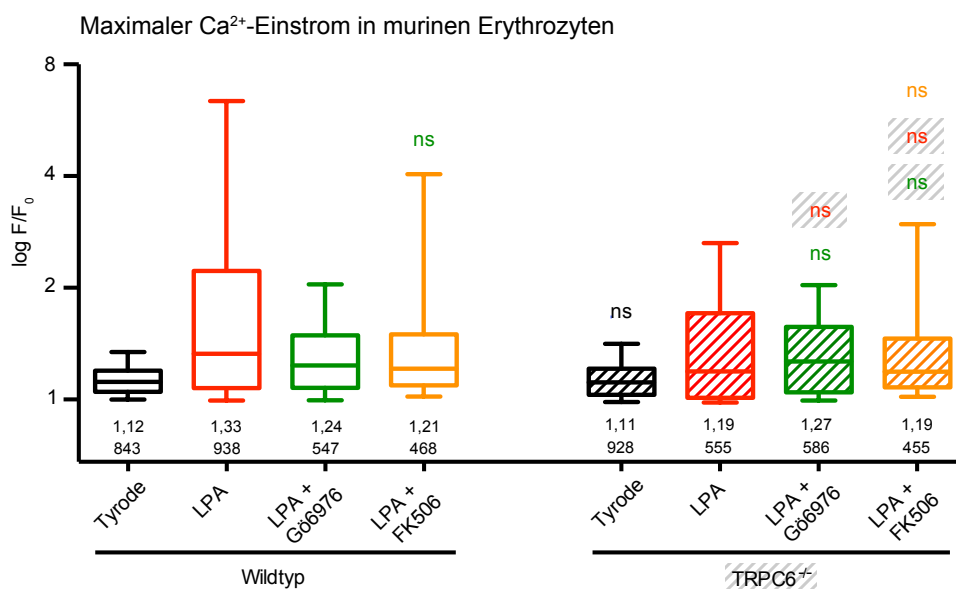


Abbildung 32: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in murinen Erythrozyten. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei analysierten Blutproben als logarithmisch aufgetragene Box-Plots mit Median und 25–75% Quartilen und Whiskern im 10-90% Bereich der Daten. Schwarz: Kontrollperfusion mit Tyrode. Rot: Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA. Grün: Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA und 1  $\mu\text{M}$  Gö6976. Orange: Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA und 10  $\mu\text{M}$  FK506. Schraffierte Boxen:  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäuse, Nicht schraffierte Boxen: Wildtyp Mäuse. Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney Tests ermittelt (ns =  $p > 0,5$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ). Zur besseren Übersicht wurden

nur nicht signifikante Daten markiert, alle weiteren Datensätze sind mit \*\*\* signifikant unterschiedlich. Daten in Zusammenarbeit mit Dr. Jue Wang erstellt.

Abbildung 33 zeigt die Auswertung der Messungen an murinen Erythrozyten unter Verwendung des Cyclosporin A. Da hier eine neue Charge LPA verwendet wurde, kann kein direkter Vergleich zu den vorherigen Daten in Abbildung 32 gezogen werden (Vergleich Kapitel 4.2.4.). Ebenso wurde für die Datensätze von TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen (Abbildung 33, schraffierte Boxen) und Wildtyp Mäusen (Abbildung 33, nicht schraffierte Boxen) mit zwei verschiedenen Chargen LPA gearbeitet. Durch die Inkubation mit 5  $\mu$ M Cyclosporin A lässt sich in Erythrozyten von Wildtyp als auch TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen der LPA-induzierte Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Levels signifikant inhibieren (Abbildung 33, Vergleich rote und weinrote Boxen).

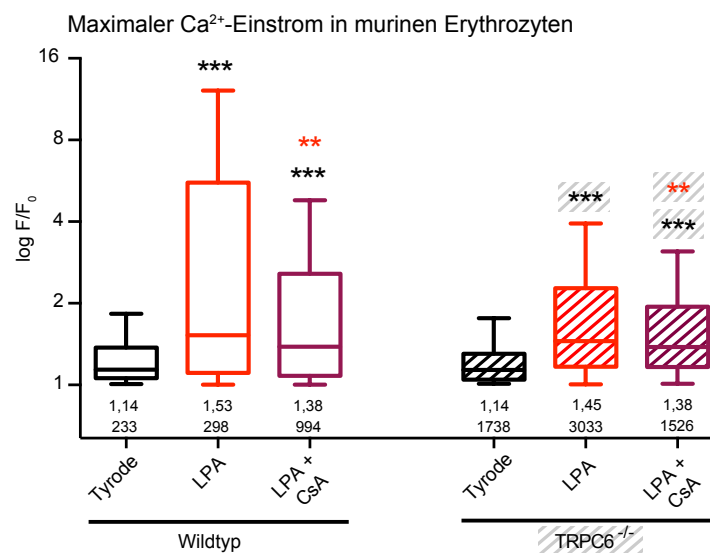


Abbildung 33: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in murinen Erythrozyten. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei analysierten Blutproben als logarithmisch aufgetragene Box-Plots mit Median und 25-75% Quartilen und Whiskern im 10-90% Bereich der Daten. Schwarz: Kontrollperfusion mit Tyrode. Rot: Perfusion mit 5  $\mu$ M LPA. Violett: Perfusion mit 5  $\mu$ M LPA und 1  $\mu$ M CsA. Schraffierte Boxen: TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse, Nicht schraffierte Boxen: Wildtyp Mäuse. Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney Tests ermittelt (ns =  $p > 0,5$ , \*\* =  $p < 0,01$ ).

### 3.2.2 Mechanosensitivität des LPA Signalweges

Eine weitere Unklarheit bezüglich des LPA Signalweges war die initiale Aktivierung der PKC $\alpha$ . Diese benötigt neben Diacylglycerol (DAG) auch Calcium, das aber erst nach Aktivierung der bisher bekannten Signalkaskade in die Zelle einströmt. Da Erythrozyten keine intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher besitzen, kann auch das im Signalweg gebildete IP<sub>3</sub> kein Calcium mobilisieren, wie es aus anderen Zellarten bekannt ist. Da gezeigt werden konnte, dass der LPA-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch die Behandlung der Erythrozyten (Schütteln vs.

Vortexen) beeinflussbar ist (Wesseling et al., 2016a), wurde die Hypothese aufgestellt, dass es eine bisher unbekannte mechanosensitive Komponente im Signalweg geben könnte.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der Einfluss des Inhibitors GsMTx-4 auf den LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom untersucht. GsMTx-4 wirkt u. a. inhibitorisch auf den mechanosensitiven Kationenkanal Piezo1. Hier zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Perfusion der Erythrozyten mit LPA und GsMTx-4 signifikant weniger Calcium in die Zellen einströmt (Abbildung 34 A, blaue Box) als bei alleiniger Perfusion mit LPA (Abbildung 34, rote Box). Das intrazelluläre Calcium ist jedoch im Vergleich zur Kontrollmessung mit Tyrodelösung leicht erhöht (Abbildung 34 A, schwarze Box). Zudem wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nach Zugabe von LPA ohne Perfusion untersucht. Dabei zeigte sich, dass es ohne Perfusion zu keinem LPA-induzierten Einstrom von Calcium in humane Erythrozyten kommt (Abbildung 34 A, graue Box). Das Level des intrazellulären Calciums ist hierbei sogar signifikant geringer als das der Kontrollperfusion mit Tyrode (Abbildung 34 A, schwarze Box).

Analog dazu wurden dieselben Messungen mit murinen Erythrozyten durchgeführt (Abbildung 34 B). Auch hier zeigte sich, dass es bei Zugabe von LPA ohne Perfusion zu einem signifikant geringeren Einstrom von Calcium in die Zellen kommt (Abbildung 34 B, Vergleich rote und graue Box), der jedoch immer noch höher ist als bei alleiniger Perfusion mit Tyrodelösung (Abbildung 34 B, schwarze Box). Ebenfalls lässt sich durch die gleichzeitige Zugabe von LPA und GsMTx-4 zur Perfusionslösung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei murinen Erythrozyten reduzieren (Abbildung 34 B, blaue Box).

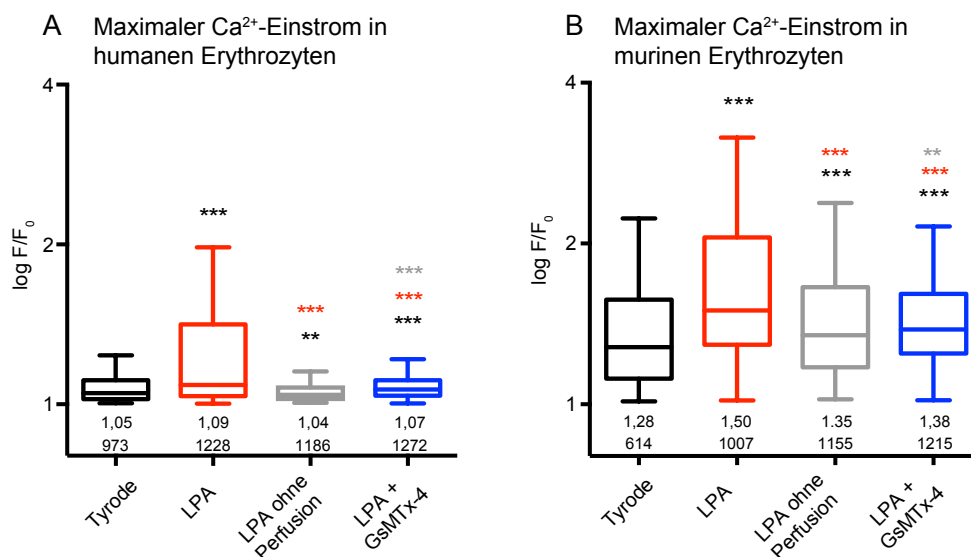


Abbildung 34: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in Erythrozyten (Panel A: Human, Panel B: Maus). Dargestellt sind die Ergebnisse von drei analysierten Blutproben als logarithmisch aufgetragene Box-Plots mit Median und 25-75% Quartilen und Whiskern im 10-90% Bereich der Daten. Zusätzlich angegeben sind Median und Anzahl der analysierten Zellen pro Datensatz. Schwarz: Kontrollperfusion mit Tyrode. Rot: Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA. Grau: 5  $\mu\text{M}$  LPA ohne Perfusion. Blau: Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA und 2  $\mu\text{M}$  GsMTx-4. Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney Tests ermittelt (\*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.2.3 Analyse der TRPC6 Inhibitoren Larixylacetat und SAR7334

Das Interesse der Pharmakologie an TRPC6 beruht u. a. auf seiner Assoziation mit verschiedenen pulmonalen Erkrankungen. So kommt es zu einer Überexpression des Kanals in Zellen der Pulmonalarterie bedingt durch chronische Hypoxie oder pulmonale Hypertonie (Lin et al., 2004; Yu et al., 2004). Ebenfalls kommt es bei der Glomerulosklerose zu einer mutationsbedingten erhöhten Aktivität des TRPC6 Kanals (Schloendorff and Pollak, 2006; Winn, 2005). Aufgrund der Ähnlichkeit der Kanäle der TRPC Subfamilien untereinander war die Entwicklung eines selektiven Inhibitors jedoch schwierig. Mittlerweile gibt es zwei kommerziell verfügbare Inhibitoren: Larixylacetat und SAR7334. Larixylacetat ist ein Diterpen, das im Harz der europäischen Lerche entdeckt wurde. Der  $IC_{50}$  Wert für TRPC6 liegt bei  $0,1 \mu\text{M}$  und ist damit 12-mal höher als der für TRPC3/7, weshalb Larixylacetat als selektiver TRPC6 Inhibitor gilt (Urban et al., 2015). SAR7334, ein Aminoindanol-Derivat, inhibiert TRPC6 mit einem  $IC_{50} < 10 \text{ nM}$  und hat eine 20 – 30-fache Präferenz für TRPC6 gegenüber TRPC3/7 (Maier et al., 2015). Beide Inhibitoren wurden an humanen und murinen Erythrozyten getestet. Abbildung 35 zeigt die Auswertung des Einflusses der TRPC6 Inhibitoren auf den LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in humanen Erythrozyten. Die Perfusion mit  $5 \mu\text{M}$  LPA bewirkt einen signifikant erhöhten Einstrom von Calcium in Erythrozyten (Abbildung 35, rote Box) im Vergleich zur Kontrollperfusion mit Tyrodelösung (Abbildung 35, schwarze Box). Bei Zugabe von LPA und  $5 \mu\text{M}$  Larixylacetat (Abbildung 35, dunkelblaue Box) in die Perfusionslösung zeigt sich ein weiterer geringer, jedoch signifikanter Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms im Vergleich zur Zugabe von LPA alleine. Die Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  SAR7334 zusätzlich zur Perfusion mit LPA (Abbildung 35, hellblaue Box) hat keinen signifikanten Einfluss auf den LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom.

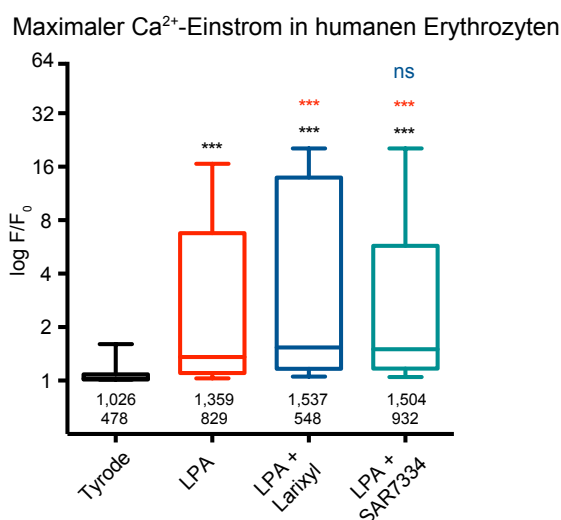


Abbildung 35: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms humaner Erythrozyten. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Blutspenders als logarithmisch aufgetragene Box-Plots mit Median und 25-75% Quartilen und Whiskern im 10-90% Bereich der Daten. Zusätzlich angegeben sind Median und Anzahl der

analysierten Zellen pro Datensatz. Schwarz: Kontrollperfusion mit Tyrode. Rot: Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA. Dunkelbau: Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA und 5  $\mu\text{M}$  Larixylacetat. Hellblau: Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA und 1  $\mu\text{M}$  SAR7334. Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney Tests ermittelt (ns =  $p > 0,5$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Zudem wurden Versuche mit beiden Inhibitoren an murinen Erythrozyten durchgeführt. In Abbildung 36 ist die Auswertung dieser Versuche an Wildtyp und TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen dargestellt. Durch Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA (Abbildung 36, rote Box) kommt es sowohl in Wildtyp als auch in TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Gehalts im Vergleich zur Kontrollperfusion (Abbildung 36, schwarze Box). Eine Perfusion mit zusätzlich 5  $\mu\text{M}$  Larixylacetat führt in Wildtyp Mäusen zu einer signifikanten Reduktion des LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms (Abbildung 36, dunkelblaue Box), in TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten kommt es jedoch zu einem weiteren signifikanten Anstieg des Ca<sup>2+</sup>-Levels (Abbildung 36, dunkelblaue schraffierte Box). Der Inhibitor SAR7334 bewirkt in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  bei zusätzlicher Perfusion mit LPA in Wildtyp Erythrozyten einen minimalen, aber signifikanten Anstieg des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms (Abbildung 36, hellblaue Box). In Erythrozyten aus TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen kommt es zu keiner Änderung im Ca<sup>2+</sup>-Gehalt durch SAR7334 im Vergleich zur Perfusion mit LPA alleine (Abbildung 36, hellblaue schraffierte Box).

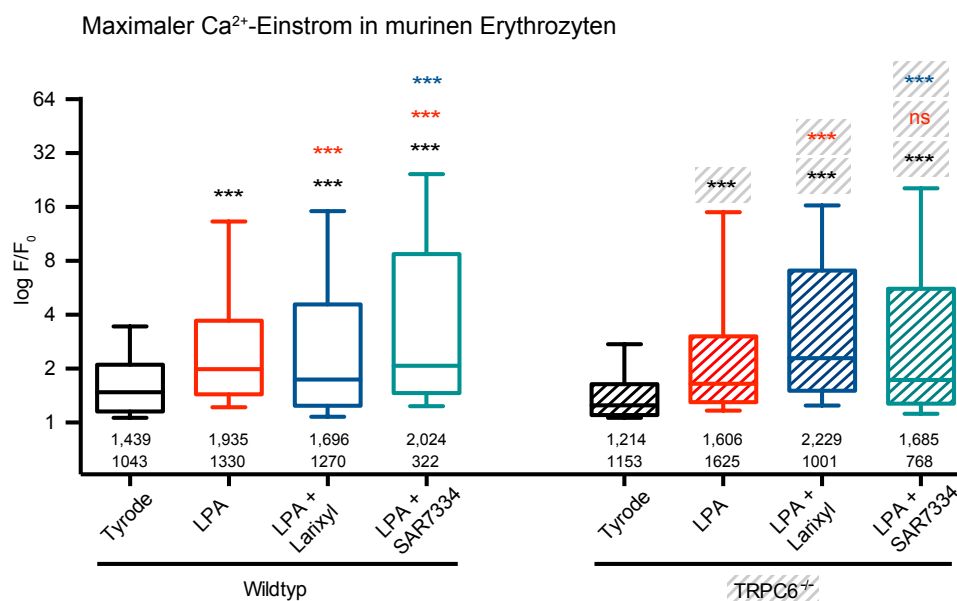


Abbildung 36: Auswertung des LPA-induzierten, maximalen Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in murinen Erythrozyten. Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils einer analysierten Blutprobe als logarithmisch aufgetragene Box-Plots mit Median und 25-75% Quartilen und Whiskern im 10-90% Bereich der Daten. Zusätzlich angegeben sind Median und Anzahl der analysierten Zellen pro Datensatz. Schraffierte Boxen: TRPC6<sup>-/-</sup> Mäuse, Nicht schraffierte Boxen: Wildtyp Mäuse. Schwarz: Kontrollperfusion mit Tyrode. Rot: Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA. Dunkelblau: Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA und 5  $\mu\text{M}$  Larixylacetat. Hellblau: Perfusion mit 5  $\mu\text{M}$  LPA und 1  $\mu\text{M}$  SAR7334. Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney Tests ermittelt (ns =  $p > 0,5$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).



### 3.3 Charakterisierung der *R26-tdRFP-CMV* Maus

#### 3.3.1 Vorversuche zur Markierung von Erythrozyten mittels Biotin

Eine derzeit beliebte Methode um Zellen, speziell auch Erythrozyten, zu markieren, ist die Biotinylierung (de Back et al., 2018). Eine Methode zur *in vivo*-Biotinylierung (Saxena et al., 2012) wurde auch innerhalb dieser Arbeit getestet. Hierbei wurde mit einem reaktiven Biotin-Reagenz gearbeitet, welches den Mäusen intravenös injiziert wurde. Durch diese Behandlung kommt es zu einer Biotinylierung aller Oberflächenproteine der Blut- und Endothelzellen. Die Visualisierung dieser Markierung ist daher durch fluoreszenzgekoppelte Streptavidin-Antikörper möglich. Die *in vivo*-Biotinylierung wurde an drei Wildtyp Mäusen durchgeführt und Blutproben dieser Mäuse für eine Woche durchflusszytometrisch sowie mikroskopisch untersucht. Die Auswertung dieser Studie zeigt Abbildung 37.

Durchflusszytometrische und mikroskopische Analyse *in vivo*-biotinylierter und Streptavidin-PE-markierter, muriner Erythrozyten

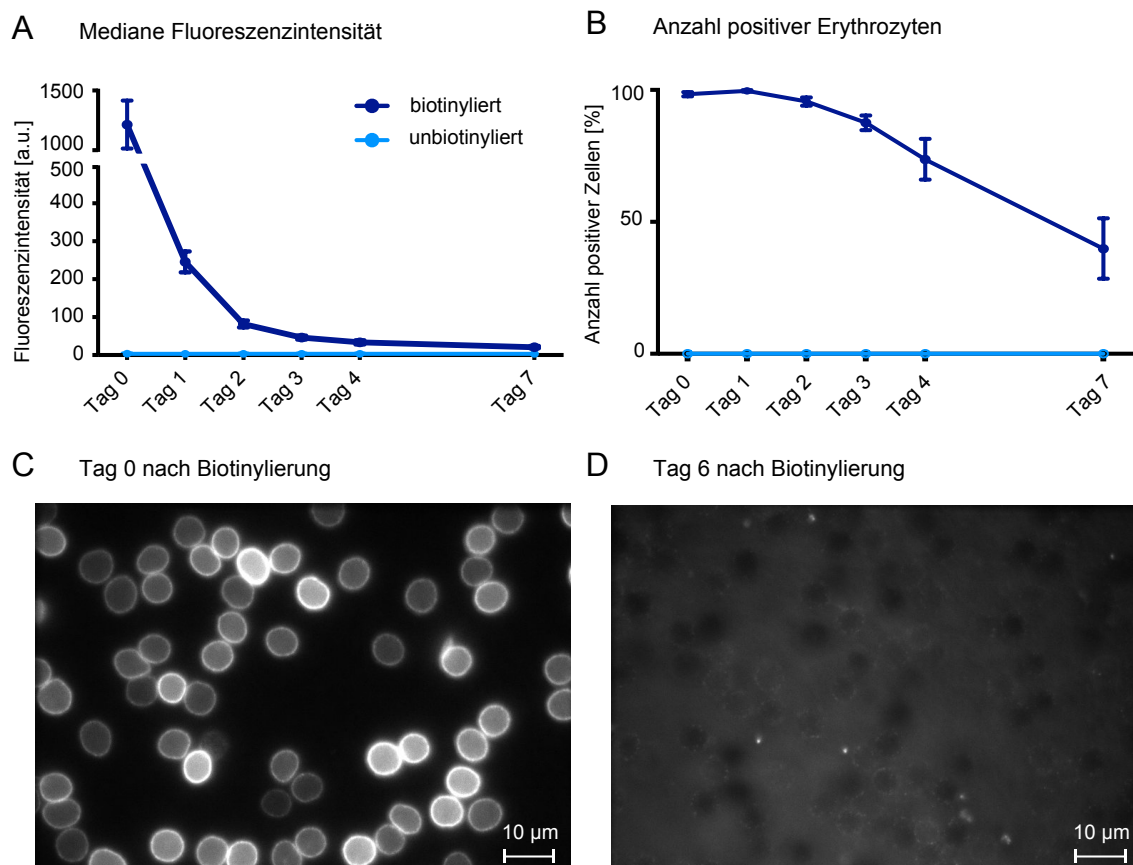


Abbildung 37: Auswertung der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Analyse *in vivo*-biotinylierter und unbiotinylierter muriner Erythrozyten nach Streptavidin-PE Färbung. Panel A: Auswertung der medianen Fluoreszenzintensität von Tag 0 bis Tag 7 nach Injektion. Panel B: Auswertung der Anzahl Streptavidin-positiver Zellen von Tag 0 bis Tag 7 nach Injektion. Panel C: Mikroskopische Aufnahme Streptavidin-PE markierter Zellen an Tag 0 nach Injektion. Panel D: Mikroskopische Aufnahme Streptavidin-PE markierter Zellen an Tag 6 nach Injektion.

Sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Anzahl der Streptavidin-PE-gefärbten Zellen nimmt im Verlauf einer Woche stark ab. An Tag 7 sind im Mittel nur noch weniger als 50% der Zellen biotinyliert bzw. Streptavidin-positiv (Abbildung 37 B) und durch die schwache Fluoreszenzintensität (Abbildung 37 A) durchflusszytometrisch nicht mehr eindeutig von unbiotinylierten Zellen zu trennen. Auch fluoreszenzmikroskopisch lässt sich nach einer Woche kein ausreichendes Streptavidin-PE Signal mehr detektieren, um biotinylierte von Biotin-negativen Zellen zu unterscheiden (Vergleich Abbildung 37 C und D).

### **3.3.2 Generierung einer transgenen Maus mit fluoreszenzmarkierten Erythrozyten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine transgene Mauslinie generiert mit dem Ziel Erythrozyten „stabil“ zu markieren, im Sinne von Expressions- und Fluoreszenzstärke. Erythrozyten der generierten *R26-tdRFP-CMV* Maus besitzen, durch die Expression von tdRFP, rot-fluoreszierende Erythrozyten. Anwendungsmöglichkeiten einer solchen Maus sind Transfusionen mit anschließenden *ex vivo* Untersuchungen oder auch *in vivo* Imaging (Hertz et al., 2019). Durch das RFP sollte zudem eine Co-Färbung mit dem grün-fluoreszierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-4 möglich gemacht werden. Es wurden zunächst verschiedene Untersuchungen zur RFP-Expression sowie der Physiologie der tdRFP-exprimierenden Erythrozyten gemacht: Untersuchungen der RFP-Fluoreszenz verschiedener Organe, Analyse verschiedener Knochenmarkszellen, Bestimmung der Erythrozytenparameter und Indizes, konfokalmikroskopische Analyse der Erythrozyten-Morphologie, durchflusszytometrische Messungen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-4 und eine Vergleichsstudie mit dem Zellmembranfarbstoff PKH.

### **3.3.3 Untersuchung der generellen tdRFP-Expression in verschiedenen Organen**

Die Expression des tdRFPs wurden in verschiedenen Organen einer  $\text{RFP}^{+/+}$  Maus fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Kontrolle dazu wurden ebenfalls Organe einer Wildtyp Maus betrachtet. Abbildung 38 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der RFP-Expression von Herz, Magen, Lunge, Niere, Darm, Leber, Hohlvene und Skelettmuskulatur. Das dargestellte Herz einer Wildtyp Maus (sowie nicht gezeigte weitere Organe) zeigt keine Expression des tdRFPs. Die schwächste Expression des Fluoreszenzproteins definiert anhand der Fluoreszenzstärke fand sich im Herzen der  $\text{RFP}^{+/+}$  Maus, die stärkste fand sich im Magen der Maus. Die Fluoreszenzstärke der weiteren Organe ist in Abbildung 38 relativ zum Herzen angegeben.

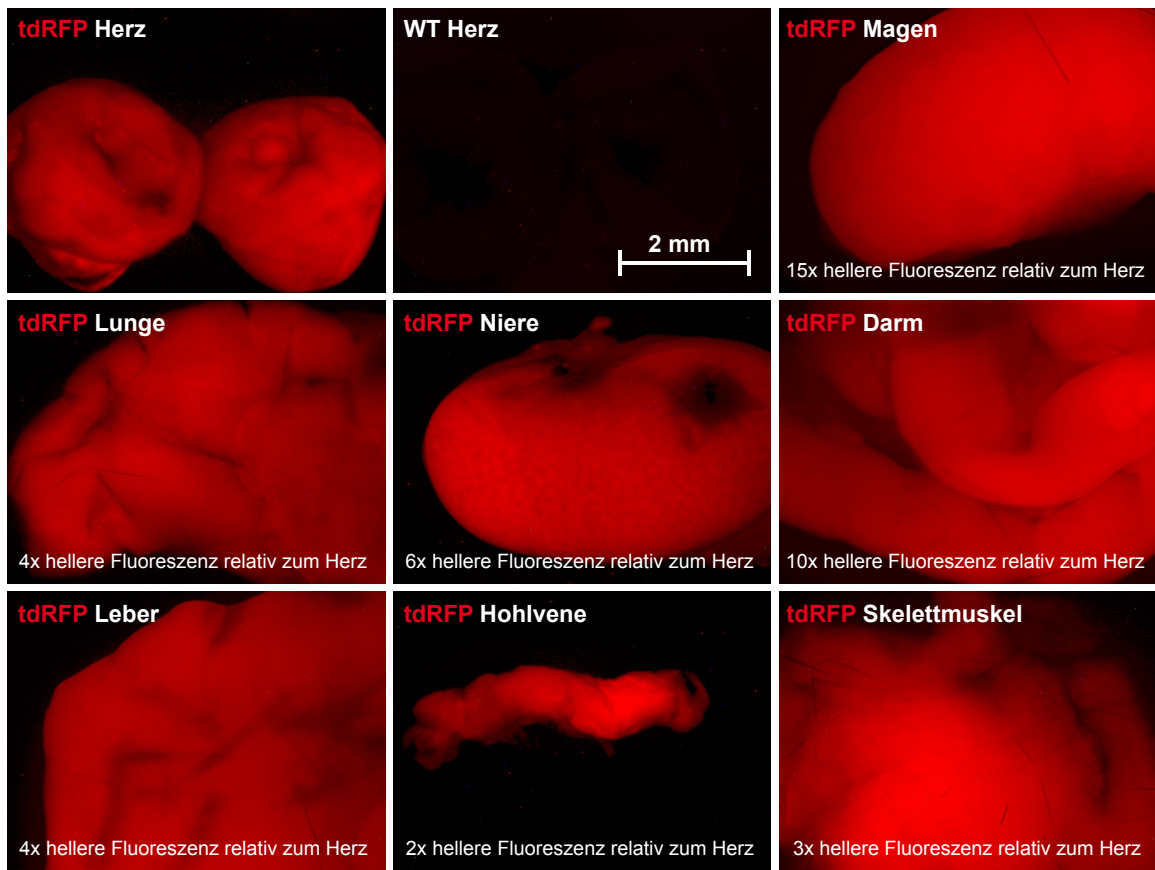


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der tdRFP-Expression in verschiedenen Organen einer  $RFP^{+/+}$  Maus und einer WT Maus. Für die Wildtyp Maus konnte keinerlei Fluoreszenz detektiert werden, beispielhaft ist daher nur die Aufnahme des Herzens dargestellt (oben Mitte). Die schwächste Fluoreszenzstärke fand sich im Herzen der  $RFP^{+/+}$  (oben links), weshalb die Fluoreszenzstärke der weiteren Organe relativ zum Herzen angegeben wurde. Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2019).

### 3.3.4 Untersuchung der tdRFP-Expression in Zellen des Knochenmarks

Zur Untersuchung der tdRFP-Expression in erythroiden Vorläuferzellen wurde  $RFP^{+/+}$  Mäusen Knochenmark aus Tibia und Femur entnommen. Zur genaueren Charakterisierung wurden die Knochenmarkszellen zusätzlich mit einem erythroid-spezifischen Antikörper und einem DNA-Farbstoff zur Darstellung der Zellkerne angefärbt. Abbildung 39 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme verschiedener Knochenmarkszellen.

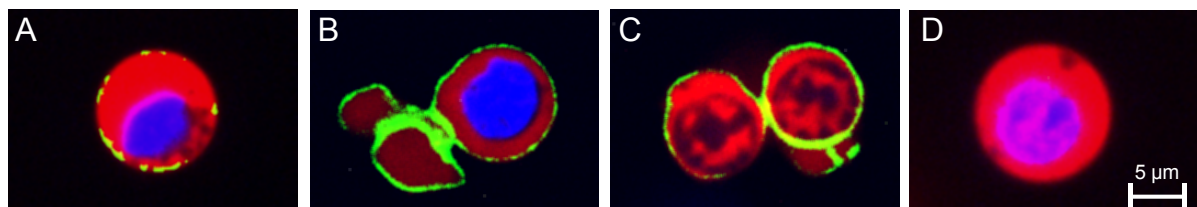


Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener Knochenmarkszellen einer  $RFP^{+/+}$  Maus nach Gegenfärbung mit Ter119-FITC (grüne Fluoreszenz) und Hoechst 33258 (blaue Fluoreszenz). Panel A: Proerythroblast. Panel B: Erythroblast und zwei kernlose Erythrozyten. Panel C: Kernlose Erythrozyten. Panel D: Nicht-erythroide Knochenmarkszelle. Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2019). Daten in Zusammenarbeit mit Greta Simionato erstellt.

Alle Knochenmarkszellen zeigten eine rote Fluoreszenz durch Expression des RFPs. Hoechst-positive Zellen mit Kern (Abbildung 39 D) zeigten eine starke Fluoreszenz als kernlose Zellen (Abbildung 39 C). Es konnten im Knochenmark zudem sowohl Ter119 positive, erythropoetische (Abbildung 39 A-C) als auch negative Zellen entdeckt werden (Abbildung 39 D), die nicht der erythropoetischen Linie entspringen.

### 3.3.5 Bestimmung der Erythrozytenparameter und Indizes der *R26-tdRFP-CMV* Mauslinie

Mittels des VetScan HM5 (Abaxis, USA) wurde ein kleines Blutbild verschiedener Tiere der Mauslinie *R26-tdRFP-CMV* erstellt. Verglichen wurden dabei Mäuse, die keine RFP-Expression zeigen mit Tieren, die das RFP homozygot bzw. heterozygot exprimieren. Die Tiere wurden dazu sowohl genetisch auf das Vorhandensein des tdRFP-Lokus als auch durchflusszytometrisch auf eine RFP-Expression untersucht. Eine Zusammenstellung der Erythrozyten-relevanten Parameter mit Referenzbereichen ist in Abbildung 40 dargestellt. Es wurden jeweils mindestens fünf Tiere analysiert und für jeden Parameter Mittelwert und Standardabweichung ermittelt.

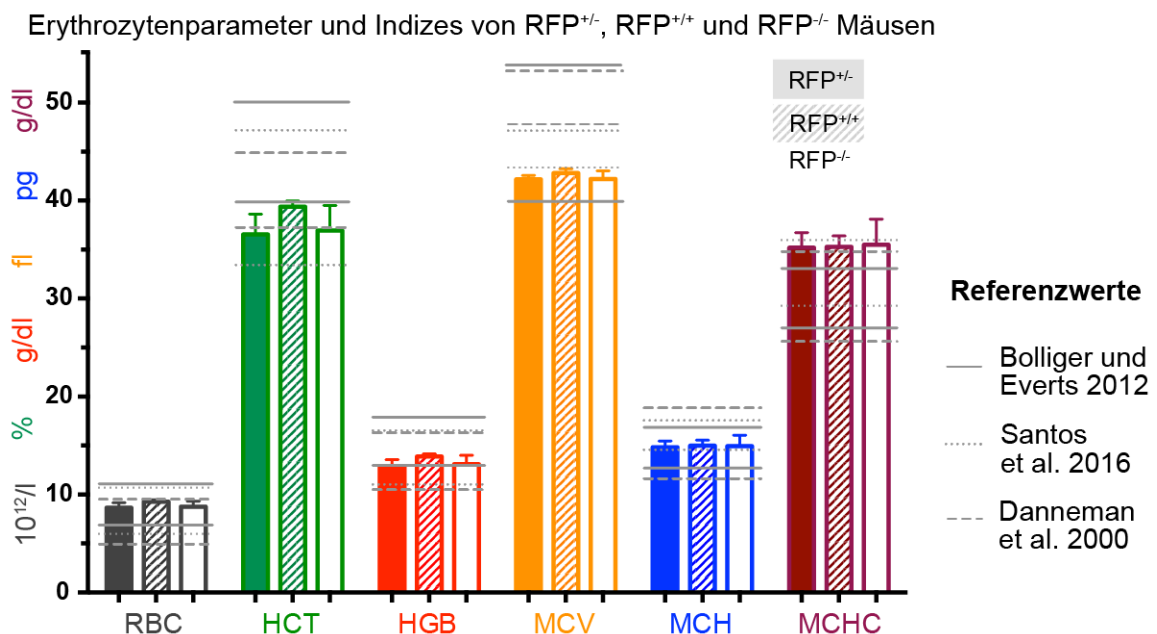


Abbildung 40: Zusammenstellung der Erythrozytenparameter und Indizes muriner Blutproben von RFP<sup>+/-</sup> (gefüllte Balken), RFP<sup>+/+</sup> (schraffierte Balken) und RFP<sup>-/-</sup> (leere Balken) Mäusen. Dunkelgrau: RBC = Anzahl der Erythrozyten [10<sup>12</sup>/l], grün: HCT = Hämatokrit [%], rot: HGB = Hämoglobin [g/dl], orange: MCV = Mittleres korpuskuläres Volumen [fl], blau: MCH = Mittleres korpuskuläres Hämoglobin [pg], weinrot: MCHC = Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration [g/dl]. Linien stellen Normbereiche für die jeweiligen Parameter verschiedener Quellen bezogen auf Labormäuse allgemein (durchgezogene (Bolliger and Everds, 2012) und gestrichelte Linien (Danneman et al., 2000) sowie auf C57Bl6/N Mäuse (gepunktete Linien (Santos et al., 2016)) dar. Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2019).

Wie aus Abbildung 40 ersichtlich, liegen die Werte der Erythrozyten Anzahl (RBC) für alle drei untersuchten Maustypen in einem sehr ähnlichen Bereich. Für RFP<sup>+/-</sup> Tiere bei 8,6 x

$10^{12}/l$ , RFP<sup>+/+</sup> bei  $9,2 \times 10^{12}/l$  und für RFP-negative Tiere bei  $8,7 \times 10^{12}/l$ . Der Hämatokrit (HCT, Abbildung 40) von RFP<sup>+/-</sup> und RFP<sup>-/-</sup> Mäusen liegt bei etwa 36%, für RFP<sup>+/+</sup> Mäuse findet sich ein leicht höherer Wert von 39%. Gleiches gilt auch für die Hämoglobinkonzentration des Blutes (HGB, Abbildung 40). RFP<sup>+/-</sup> und RFP<sup>-/-</sup> Mäuse haben einen Hämoglobingehalt von 13 g/dl, RFP<sup>+/+</sup> Mäuse etwa 14 g/dl. Die daraus errechneten Indices MCV, MCH und MCHC liegen für alle drei Maustypen wiederum sehr nah beieinander. Das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV, Abbildung 40) liegt bei 42 (RFP<sup>+/-</sup> und RFP<sup>-/-</sup> Mäuse) bis 43 fl (RFP<sup>+/+</sup> Mäuse). Der MCH Wert (mittleres korpuskuläres Hämoglobin, Abbildung 40) beträgt 14 pg (RFP<sup>+/-</sup> und RFP<sup>-/-</sup> Mäuse) bzw. 15 pg für RFP<sup>+/+</sup> Mäuse. Für die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC, Abbildung 40) beträgt der Wert bei allen drei Maustypen etwa 35 g/dl. Zur Beurteilung der gemessenen Erythrozytenparameter und Indizes wurden Normwerte verschiedener Quellen betrachtet, sowohl für Labormäuse allgemein (Bolliger and Everds, 2012; Danneman et al., 2000), als auch für C57Bl6/N Mäuse (Santos et al., 2016), da die *R26-tdRFP-CMV* Linie auf diesem Hintergrund gezüchtet wurde. Die drei angegebenen Referenzbereiche aus der Literatur zeigen eine große Spanne für die Normwerte von Labormäusen auf. Die Mittelwerte der gemessenen Erythrozytenparameter und Indizes liegen für alle Werte in mindestens einem dieser Referenzbereiche.

### 3.3.6 Konfokalmikroskopische Analyse der RFP<sup>+/+</sup> Erythrozyten

Zur Analyse der Morphologie der RFP-exprimierenden Erythrozyten wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen gemacht. Eine beispielhafte Fluoreszenzaufnahme (A) sowie eine 3D-rekonstruierte Darstellung (B) einer solchen Aufnahme ist in Abbildung 41 dargestellt. Die Form der meisten RFP<sup>+/+</sup> Erythrozyten entspricht der physiologischen Diskozytenform. Die Expressionsstärke des RFPs ist zudem stark genug für konfokalmikroskopische Aufnahmen.

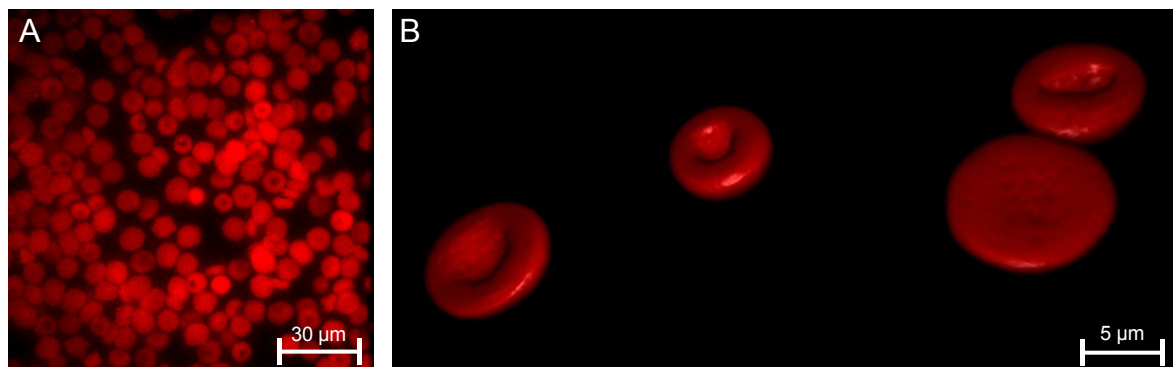


Abbildung 41: Konfokalmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen (Setup Leica, Kapitel 2.2.3) der Erythrozyten einer *R26-tdRFP-CMV* Maus (Panel A). Panel B: 3D-Rekonstruktion einer konfokalmikroskopischen Aufnahme. Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2019).

### 3.3.7 Durchflusszytometrische Untersuchungen der RFP-exprimierenden Erythrozyten

Des Weiteren erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der RFP-exprimierenden Erythrozyten. Dazu wurden Erythrozyten von Wildtyp Mäusen und RFP<sup>+/+</sup>-Mäusen der *R26-tdRFP-CMV* Linie verwendet und diese sowohl ungefärbt als auch nach Beladung mit dem Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fluo-4 gemessen.

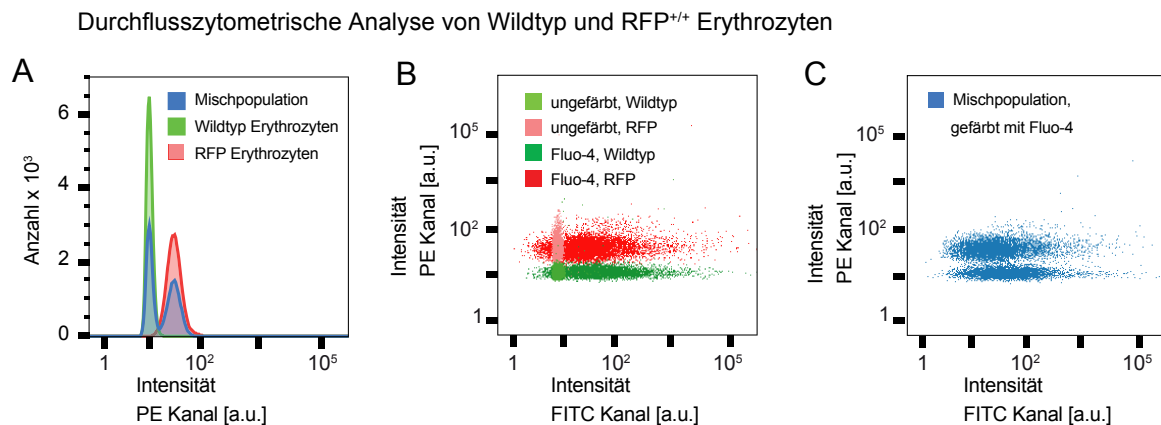


Abbildung 42: Durchflusszytometrische Analyse von Wildtyp und RFP<sup>+/+</sup>-Erythrozyten. Panel A: Zusammenstellung der Messungen von Wildtyp Erythrozyten (grün), RFP<sup>+/+</sup>-Erythrozyten (rot) sowie einer Mischpopulation beider Zellen (blau) als Histogramm im PE Kanal. Panel B: Zusammenstellung der Messungen von ungefärbten (hell) sowie mit dem Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fluo-4 beladener Erythrozyten (dunkel) von Wildtyp (grün) und RFP-Mäusen (rot). Dargestellt ist die Intensität im FITC Kanal vs. PE Kanal. Panel C: Messung einer Mischpopulation von Wildtyp und RFP-Erythrozyten nach Färbung mit dem Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fluo-4. Dargestellt ist die Intensität im FITC Kanal vs. PE Kanal. Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2019).

Abbildung 42 A zeigt eine Zusammenstellung der Messungen von ungefärbten Erythrozyten. RFP-exprimierende Zellen (rot) zeigen eine höhere Intensität im „PE Kanal“ (siehe Kapitel 2.5.4) als Wildtyp Zellen (grün). Es lassen sich daher auch in der Mischpopulation (blau) zwei Peaks erkennen, die eindeutig den zwei Erythrozytenarten zugeordnet werden können. Diese Trennung ist auch noch nach Färbung mit dem Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fluo-4 möglich. Abbildung 42 B zeigt Einzelmessungen von Fluo-4 gefärbten und ungefärbten Wildtyp sowie RFP-exprimierenden Erythrozyten. Hier lassen sich erneut die RFP<sup>+/+</sup>-Zellen durch die höhere Intensität im „PE-Kanal“ identifizieren. Die gleiche Intensitätsverteilung zeigt die Messung der gefärbten Mischpopulation in Abbildung 42 C.

Durchflusszytometrisch wurde ebenfalls eine Untersuchung zur Anzahl der RFP-exprimierenden Zellen in Wildtyp, sowie heterozygoten und homozygoten RFP-Mäusen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt Abbildung 43 A.

Bei Erythrozyten von Wildtyp Mäusen (RFP<sup>-/-</sup>) lässt sich keine RFP-Fluoreszenz detektieren und dementsprechend keine Expression des RFP-Proteins nachweisen. Erythrozyten von Mäusen mit einem homozygoten Genotyp (RFP<sup>+/+</sup>) zeigen zu 100% eine Expression des RFP-Proteins. Bei heterozygoten Mäusen (RFP<sup>+/-</sup>) zeigt auch die Expression des RFPs ein

sehr heterogenes Bild. Drei der sieben analysierten Mäuse zeigen ebenfalls zu 100% positive Erythrozyten, eine Maus exprimiert keinerlei RFP und bei den restlichen drei Mäusen finden sich zwischen 60 und 85% RFP-exprimierende Erythrozyten.

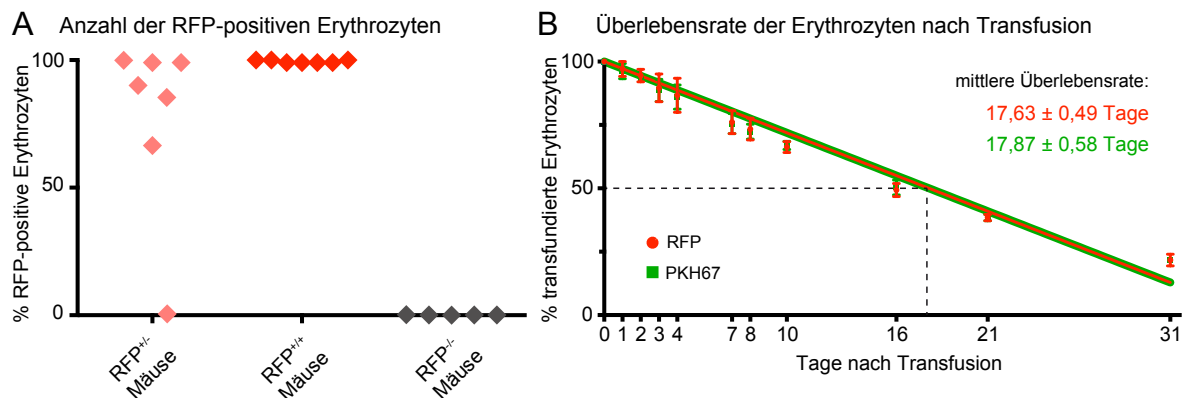


Abbildung 43: Verschiedene durchflusszytometrische Analysen von Erythrozyten der Mäuse der Linie *R26-tdRFP-CMV*. Panel A: Analyse der Anzahl der RFP-exprimierenden Erythrozyten in Wildtyp (grün), RFP<sup>+/-</sup> (hellrot) und RFP<sup>+/+</sup> (dunkelrot) Mäusen. Panel B: Vergleich der Überlebensrate von Erythrozyten nach Transfusion in Wildtyp Mäusen zwischen RFP-exprimierenden Zellen (rote Kurve) und Erythrozyten, die mit dem grünen Membranfarbstoff PKH67 angefärbt wurden (grüne Kurve). Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2019).

Abbildung 43 B zeigt eine Vergleichsstudie der Überlebensrate von Erythrozyten nach Transfusion in Wildtyp Mäusen. Dazu wurden Erythrozyten einer Wildtyp Maus, die mit dem Membranfarbstoff PKH67 gefärbt wurden, und RFP-exprimierende Erythrozyten einer *R26-tdRFP-CMV* Maus gemischt und als Bluttransfusion in eine Wildtyp Maus injiziert. Die Anzahl der vorhandenen transfundierten Zellen wurde von vier transfundierten Mäusen in verschiedenen Zeitabständen bis zu 31 Tagen bestimmt und auf die Ausgangszahl normiert. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Überlebensdauer der beiden Erythrozytentypen nach Transfusion. Die mittlere Überlebensrate PKH67 gefärbter Erythrozyten beträgt  $17,87 \pm 0,58$  Tage, die der RFP-exprimierenden Zellen  $17,63 \pm 0,49$  Tage.

### 3.4 Transfusion von TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten in Wildtyp Mäuse

Zur Untersuchung eines möglichen Membran- und/oder Proteinaustausches zwischen Erythrozyten untereinander und/oder anderen Blutzellen wurden verschiedene Transfusionsversuche durchgeführt. Hierbei wurde sich erneut das Mausmodell der TRPC6<sup>-/-</sup> Maus zu Nutze gemacht. Erythrozyten dieser Mauslinie zeigen nur eine schwache Reaktion auf die Stimulation mit LPA, da ihnen der an diesem Signalweg beteiligte Kanal TRPC6 in der Membran fehlt. Bei einem möglichen Austausch von Proteinen oder Membranabschnitten, würde es auch zu einem Austausch von TRPC6 zwischen den Zellen kommen und die TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten würden mit einem stärkeren Ca<sup>2+</sup>-Signal auf das LPA reagieren (siehe auch Kapitel 1.9). Um diese These zu untermauern, wurden Erythrozyten der Knockout-Mauslinie in Wildtyp Mäuse transfundiert und der LPA-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zellen über die Dauer von zwei Wochen nach Transfusion beobachtet. Voraussetzung für diese Messungen war eine geeignete Markierung der TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten, um sie nach der Transfusion auf Dauer wieder zu erkennen. Es wurden verschiedene Ansätze zur Zellmarkierung durchgeführt.

#### 3.4.1 Markierung der TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten mittels PKH26

Als erste Methode zur Markierung der TRPC6<sup>-/-</sup> Zellen wurde die Färbung mittels des Membranfarbstoffes PKH26 gewählt. Dessen Fluoreszenzemission liegt im orange-roten Bereich des Spektrums und kann daher gut zusammen mit dem „grünen“ Ca<sup>2+</sup>-Farbstoff Fluo-4 verwendet werden. Zur Durchführung der Transfusion wurde einer TRPC6<sup>-/-</sup> Maus Blut entnommen, dieses mit PKH26 *in vitro* angefärbt, in physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) gewaschen und anschließend fand die retrobulbäre Injektion in eine Wildtyp Maus statt. Zur Untersuchung der TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten wurde den transfundierten Mäusen für die Dauer von 2 Wochen in verschiedenen Abständen Blutproben entnommen. Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.4 beschrieben vorbereitet und die Stimulation mit LPA durchgeführt. Analysiert wurde darauf der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die PKH26-positiven Erythrozyten auf Basis der Fluo-4 Fluoreszenzintensität. Abbildung 44 zeigt die Zell-basierte Auswertung dieser Analyse an Tag 3, Tag 5, Tag 7, Tag 10, Tag 12 und Tag 14 nach Transfusion (blaue Boxen) von drei Mäusen (Ausnahme Tag 12 und Tag 14: zwei Mäuse). Im Vergleich dazu ist der LPA-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom der TRPC6<sup>-/-</sup> (rote Box) und Wildtyp Mäuse (grüne Box) vor der Transfusion aufgetragen. Hier zeigt sich, dass es von Tag 3, über Tag 5 bis Tag 7 zu einem signifikanten Anstieg des Ca<sup>2+</sup>-Signals kommt. Ebenfalls ist der Unterschied zwischen TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen vor Transfusion und an Tag 3 nach Transfusion hoch signifikant. Ab Tag 7 bis zum Ende der Messreihe zeigt sich keine Veränderung mehr in der Reaktion auf LPA.



Der Vergleich des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms der  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Erythrozyten an Tag 14 nach Transfusion mit dem von Wildtyp Zellen zeigt zudem keinen Unterschied. Die Wildtyp Erythrozyten zeigen eine höhere Varianz in der Reaktion auf LPA, der Median beider Datensätze ist jedoch annähernd identisch: 2,02 für Wildtyp Zellen und 2,05 für  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Erythrozyten an Tag 14.

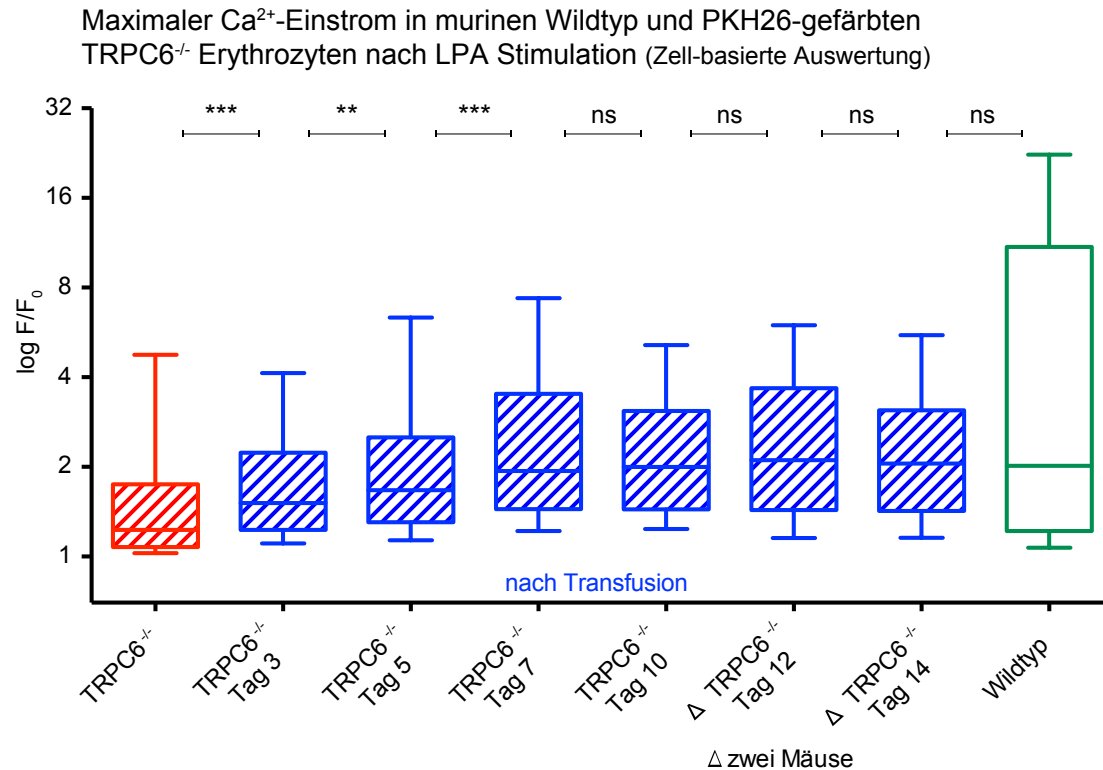


Abbildung 44: Zell-basierte Auswertung der mikroskopischen Analyse des maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms nach Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  LPA in murinen Erythrozyten von  $\text{TRPC6}^{+/+}$  Mäusen (rote Box),  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäusen nach PKH26 Färbung an Tag 3, 5, 7, 10, 12 und 14 nach Transfusion (blaue Boxen) und Wildtyp-Mäusen (grüne Box). Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils drei analysierten Mäusen (Ausnahme Tag 12 und Tag 14 nach Transfusion) als logarithmisch aufgetragene Box-Plots mit Median und 25-75% Quartilen und Whiskern im 10-90% Bereich der Daten. Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney Tests ermittelt (ns =  $p > 0,5$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.4.2 Markierung der $\text{TRPC6}^{-/-}$ Erythrozyten durch Expression des tdRFP

Um eine endogene Markierung der  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Erythrozyten zu erreichen, wurde eine neue Mauslinie aus  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäusen und  $R26\text{-tdRFP-CMV}$  Mäusen generiert. Diese Mäuse exprimieren das RFP ubiquitär, ebenfalls in Erythrozyten (siehe Kapitel 3.3), und besitzen zusätzlich den Knockout des  $\text{TRPC6}$  Kanals. Die Transfusionsversuche konnten mit dieser Mauslinie ohne zusätzliche Färbung durchgeführt werden. Die Durchführung erfolgte ansonsten analog zu den bisherigen Versuchen. Es wurden erneut Blutproben an verschiedenen Tagen nach der Transfusion entnommen und der LPA-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die RFP-positiven Erythrozyten der  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäuse analysiert. Abbildung 45 zeigt die Zell-basierte Auswertung dieser Analyse an Tag 3, Tag 5, Tag 7, Tag 10, Tag 12 und Tag 14 nach Transfusion (blaue Boxen) von 4 Mäusen (Ausnahme Tag 14: 2 Mäuse).

Im Vergleich dazu ist der LPA-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom der  $\text{TRPC6}^{-/-}$  (rote Box) und Wildtyp Mäuse (grüne Box) vor der Transfusion aufgetragen. Bei Vergleich von  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Zellen vor Transfusion und an Tag 3 nach Transfusion lässt sich ein signifikanter Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals feststellen. Ebenfalls gibt es einen signifikanten Anstieg in der Reaktion auf LPA von Tag 5 auf Tag 7 und von Tag 10 auf Tag 12, bis zum Ende der Messreihe zeigt sich keine Veränderung mehr. Zudem gibt es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der Wildtyp Zellen mit  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Erythrozyten an Tag 14 nach Transfusion. Die Mediane beider Datensätze liegen in einem ähnlichen Bereich, für Wildtypen bei 1,87 und  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Erythrozyten bei 1,98.

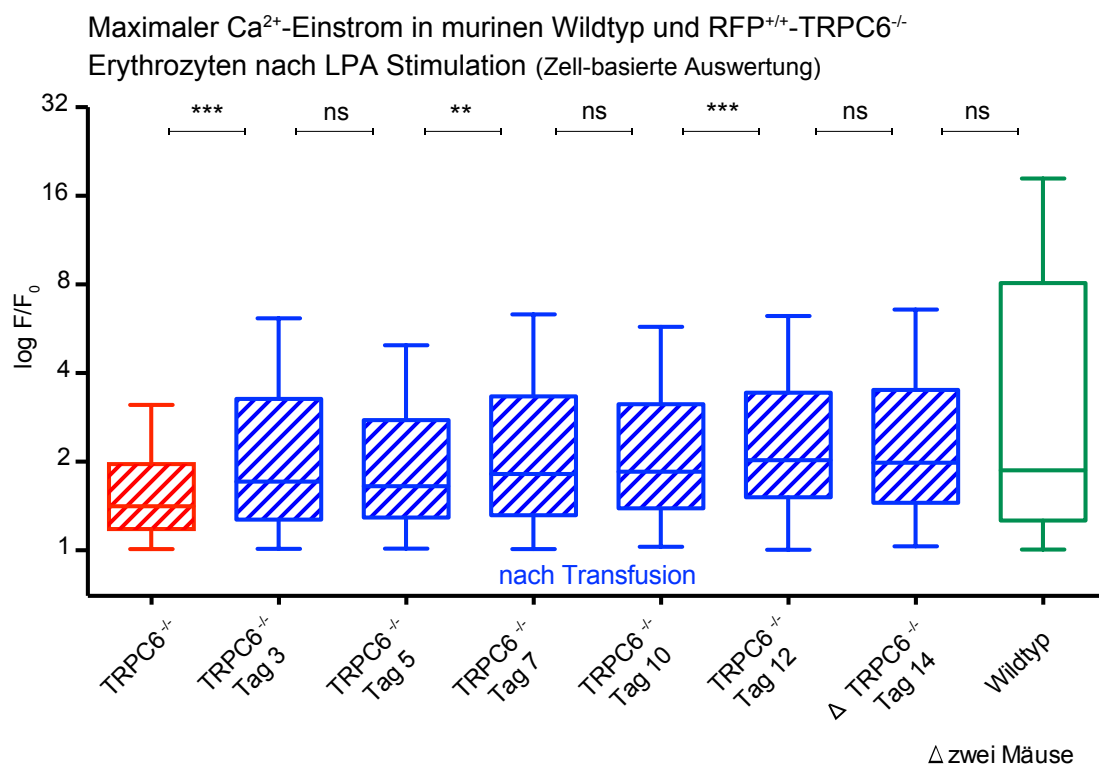


Abbildung 45: Zell-basierte Auswertung der mikroskopischen Analyse des maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms nach Stimulation mit  $5 \mu\text{M}$  LPA in murinen Erythrozyten von  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäusen (rote Box),  $\text{RFP}^{+/+}$ - $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäusen an Tag 3, 5, 7, 10, 12 und 14 nach Transfusion (blaue Boxen) und Wildtyp Mäusen (grüne Box). Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils vier analysierten Mäusen (Ausnahme Tag 14 nach Transfusion) als logarithmisch aufgetragene Box-Plots mit Median und 25-75% Quartilen und Whiskern im 10-90% Bereich der Daten. Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney Tests ermittelt (ns =  $p > 0,5$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.4.3 Markierung der $\text{TRPC6}^{-/-}$ Erythrozyten durch Expression des tdRFP und Transfusion in splenektomierte Wildtyp Mäuse

Um weitere Erkenntnisse zum Phänomen des Protein- oder Membranaustauschs zu erhalten, wurden die Transfusionsversuche an splenektomierten Wildtyp Mäusen wiederholt. Den Wildtyp Mäusen wurde dazu zwei Wochen vor Durchführung der Transfusion die Milz operativ entfernt. Die Durchführung erfolgte ansonsten analog zu den bisherigen Versuchen

(Ausnahme ist die Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  LPA, siehe dazu Kapitel 4.2.4). Es wurden erneut Blutproben an verschiedenen Tagen nach der Transfusion entnommen und der LPA-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die RFP-positiven Erythrozyten der  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäuse analysiert. Abbildung 46 zeigt die Zell-basierte Auswertung dieser Analyse an Tag 3, Tag 5, Tag 7, Tag 10, Tag 12 und Tag 14 nach Transfusion (blaue Boxen) von 4 Mäusen. Im Vergleich dazu ist der LPA-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom der  $\text{TRPC6}^{-/-}$  (rote Box) und Wildtyp Mäuse (grüne Box) vor der Transfusion aufgetragen. Bei Vergleich von  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Zellen vor Transfusion und an Tag 3 nach Transfusion lässt sich ein signifikanter Abfall des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals feststellen. Danach gibt es einen signifikanten Anstieg in der Reaktion auf LPA von Tag 3 auf Tag 5, von Tag 7 auf Tag 10 und von Tag 12 auf Tag 14. Im Vergleich der Wildtyp Zellen mit  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Erythrozyten gibt es keinen signifikanten Unterschied mehr an Tag 14 nach Transfusion. Die Mediane beider Datensätze liegen hier in einen ähnlichen Bereich, für Wildtyp Zellen bei 1,71 und  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Erythrozyten bei 1,69.

Maximaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in murinen Wildtyp sowie  $\text{RFP}^{+/+}$ - $\text{TRPC6}^{-/-}$  Erythrozyten nach Transfusion in splenektomierte Mäuse und LPA Stimulation (Zell-basierte Auswertung)

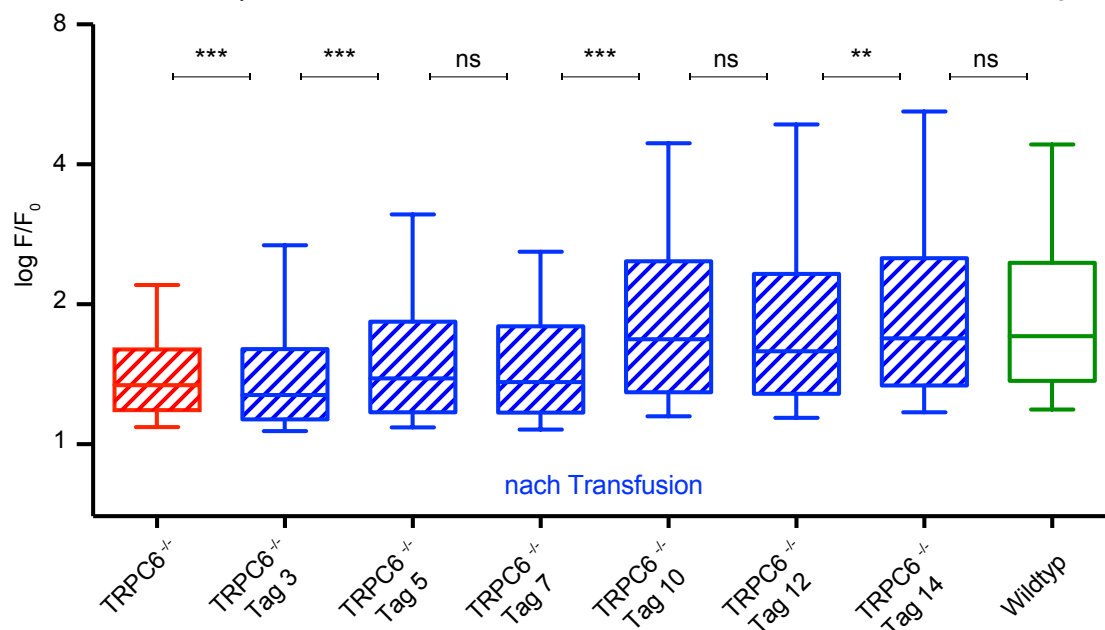


Abbildung 46: Zell-basierte Auswertung der mikroskopischen Analyse des maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms nach Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  LPA in murinen Erythrozyten von  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäusen (rote Box),  $\text{RFP}^{+/+}$ - $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäusen an Tag 3, 5, 7, 10, 12 und 14 nach Transfusion in splenektomierte Wildtyp Mäuse (blaue Boxen) und Wildtyp Mäusen (grüne Box). Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils vier analysierten Mäusen als logarithmisch aufgetragene Box-Plots mit Median und 25-75% Quartilen und Whiskern im 10-90% Bereich der Daten. Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney Tests ermittelt (ns =  $p > 0,5$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.4.4 Auswertung der Transfusionsversuche als mausbasierte Statistik

Neben der bisherigen Zell-basierten Auswertung wurde zudem eine Maus-basierte Statistik durchgeführt. Da die Ergebnisse der Transfusion nach Färbung mit PKH, Markierung mit RFP sowie vorherigen Durchführung der Splenektomie zum gleichen Resultat kamen,

wurden dafür alle transfundierten Mäuse zusammengefasst. Die Datensätze der einzelnen Mäuse wurden zunächst auf die zugehörige Wildtyp Maus normiert und anschließend die Resultate von mindestens sechs transfundierten Mäusen statistisch analysiert. Abbildung 47 zeigt die Auswertung dieser Statistik. Es zeigt sich ein leicht signifikanter Anstieg des LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms der  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Erythrozyten von vor der Transfusion (rote Box) bis Tag 3 nach Transfusion (erste blaue Box). Ebenfalls signifikant ist der Anstieg zwischen Tag 3 und Tag 7, sowie Tag 3 und Tag 10. Nach Tag 10 erreicht der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom das Niveau der Wildtyp Mäuse (grüne Box), weshalb sich kein signifikanter Unterschied hier feststellen lässt. Ebenfalls signifikant unterschiedlich ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom der Gruppe der  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäuse vor der Transfusion im Vergleich zu den Kontroll-Wildtyp Mäusen (rote Box vs. grüne Box).

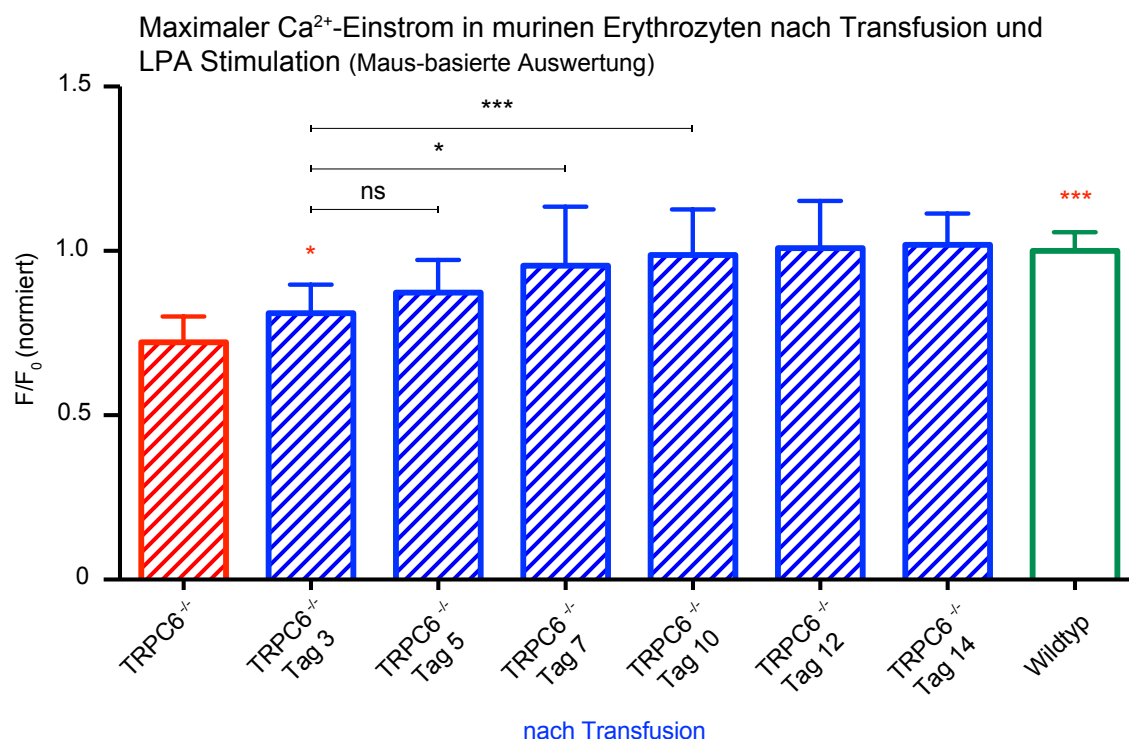


Abbildung 47: Maus-basierte Auswertung der mikroskopischen Analyse des normierten maximalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms nach Stimulation mit LPA in Erythrozyten von  $\text{TRPC6}^{-/-}$  Mäusen (rote Box),  $\text{RFP}^{+/+}$ - $\text{TRPC6}^{-/-}$  und  $\text{PKH26-TRPC6}^{-/-}$  Mäusen an Tag 3, 5, 7, 10, 12 und 14 nach Transfusion (blaue Boxen) und Wildtyp Mäusen (grüne Box). Dargestellt sind die Ergebnisse von mindestens sechs analysierten Mäusen als Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. Für jede Maus und Tag wurde der Median aus der Zell-basierten Auswertung ermittelt und auf den Mittelwert der Wildtyp Mäuse normiert. Signifikanzen wurden mittels des ungepaarten t-Tests ermittelt, da die Daten eine Normalverteilung zeigten (ns =  $p > 0,5$ , \* =  $p < 0,1$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Intrazelluläres Calcium in hereditären hämolytischen Anämien

Als Anämie wird der Zustand einer verminderten Konzentration des Blutfarbstoffs Hämoglobin bezeichnet. Dieser Zustand kann aus einer verminderten Produktion oder einem gesteigerten Abbau von Erythrozyten sowie aus einem akuten Blutverlust resultieren (Jelkmann, 2010). Einteilen kann man hämolytische Erkrankungen nach korpuskulären Veränderungen, die meist hereditär sind, und extrakorpuskulären mit meist erworbener Ursache. Erworbene extrakorpuskuläre Veränderungen können z. B. immunologisch, mechanisch oder arzneimittelinduziert auftreten oder auch durch Infektionen wie Malaria hervorgerufen werden (Ossendorf, 2003). Hereditäre hämolytische Erkrankungen lassen sich weiterhin unterteilen in Membranopathien, Hämoglobinopathien und Enzymopathien.

Wenn ein gesteigerter Abbau der Erythrozyten nicht durch eine vermehrte Produktion kompensiert werden kann, tritt das symptomatische Bild einer Anämie auf. Weltweit gesehen ist etwa jeder vierte Mensch an einer Anämie erkrankt, also schätzungsweise fast 2 Milliarden Menschen (McLean et al., 2009). Ein Großteil davon ist bedingt durch Mangelernährung oder Malaria-Infektionen, aber etwa 10% dieser Fälle sind zurückzuführen auf seltene hereditäre Anämien. Bedingt durch die geringe Anzahl an Patienten ist es häufig schwierig diese Anämien richtig zu diagnostizieren. Zudem fehlt es am Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankungen, auch wenn die genaue molekulare Basis bereits bekannt ist. Als Beispiel sei hier die Sichelzellanämie zu nennen. Bereits 1958 wurde eine Punktmutation des  $\beta$ -Globin Gens *HBB* als Ursache dieser Erkrankung erkannt (Ingram, 1958). Das mutierte Hämoglobin HbS neigt zur Kristallisation, ein Effekt, der durch die auftretende Dehydratation der Zellen verstärkt wird. Die Dehydratation der Zellen lässt sich auf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Aktivierung des Gardos-Kanals mit Verlust von KCl und Wasser zurückführen, da bekannt ist, dass Sichelzellen einen erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt aufweisen (Tiffert et al., 2003). Beteiligt am erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom sind NMDA-Rezeptoren in der Erythrozytenmembran, die von Sichelzellen in vermehrter Anzahl exprimiert werden (Hänggi et al., 2014). Ein genauer molekularer Zusammenhang zwischen Hämoglobinmutation und der vermehrten Anzahl an NMDA-Rezeptoren, die für das erhöhte intrazelluläre Calcium verantwortlich sind, gibt es bisher noch nicht. Vermutet werden kann hier jedoch, dass die erhöhte NMDAR-Konzentration auf ein Anämie-bedingtes, vermehrtes Auftreten von Retikulozyten zurückzuführen ist, die von Natur aus eine höhere Anzahl der Rezeptoren besitzen. Auch von anderen hämolytischen Krankheiten wie der  $\beta$ -Thalassämie oder des Phosphofruktokinase-Mangels ist bekannt, dass Erythrozyten ein erhöhtes Level an

intrazellulärem Calcium aufweisen (Bookchin et al., 1988; Sabina et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Untersuchungen zum intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Erythrozyten von Patienten mit weiteren seltenen Anämien durchgeführt. Untersucht wurden Patienten mit Hereditärer Sphärozytose, Hereditärer Xerozytose, uncharakterisierter hämolytischer Anämie, Gardos-*Channelopathie* und den Enzymopathien Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel, Glutamat-Cystein-Ligase-Mangel und Glutathiondisulfid-Reduktase-Mangel.

#### **4.1.1 Vergleich der Auswertung von mikroskopischen Daten zum intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt mittels ImageJ und Arivis Vision 4D**

Zur Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Fluo-4 Emission wurde mit zwei Bildanalyseprogrammen gearbeitet: ImageJ und Arivis Vision 4D. Der direkte Vergleich einer Auswertung mehrerer mikroskopischer Aufnahmen zeigt, dass mittels Arivis Vision 4D generell geringere Werte für die Fluo-4 Emission bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ermittelt werden als mittels ImageJ (Vergleich Abbildung 23). Dies lässt sich dadurch erklären, dass zur Auswertung in ImageJ die Zellen manuell selektiert wurden, wohingegen die Arivis Software eine automatische Selektion der Zellen übernimmt. Bei der manuellen Selektion werden Randzellen eher ausgelassen, die automatische Selektion „findet“ je nach angewandten Filtern alle Zellen in einer Aufnahme (Vergleich Kapitel 2.8.2). Da die Intensitätsverteilung einer mikroskopischen Aufnahme nicht homogen ist, sondern am Rand schwächer ist als in der Mitte, zeigen Randzellen eine geringere Fluo-4 Emission. Bei Analyse von mehr Randzellen ist daher im Mittel die ausgewertete  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Zellen geringer. Vergleicht man jedoch jeweils die Auswertung von Patienten und Kontrollen miteinander, die mit demselben Bildanalyseprogramm durchgeführt wurden, lässt sich immer dieselbe Tendenz feststellen unabhängig von der verwendeten Analysesoftware. Beide Programme sind daher zur Auswertung des intrazellulären Calcium in Erythrozyten geeignet, erlauben jedoch keinen direkten Vergleich untereinander. Durch die automatische Selektion der Zellen in der Arivis Software, sollte eine Zeitersparnis bei der Auswertung der mikroskopischen Daten möglich sein. Als problematisch erwies sich hier jedoch die sehr unterschiedliche Fluoreszenzintensität der Zellen in verschiedenen Aufnahmen und auch zwischen Zellen in einer Aufnahme (Vergleich Abbildung 22). Es musste daher für jede Bildaufnahme eine Anpassung der Segmentierungfilter erfolgen. Bei Videoaufnahmen, wie sie zur Messung des LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms gemacht wurden, ändert sich die Fluoreszenzintensität der Zellen in jeder der Einzelaufnahmen. Da eine Anpassung der Parameter für jede Aufnahme zu keiner Zeitersparnis führte, wurden LPA-Messungen

weiterhin manuell mittels ImageJ ausgewertet. Zur Auswertung der basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Erythrozyten zeigt sich die Arivis Vision 4D Software jedoch als effektiv.

#### **4.1.2 Intrazelluläres Calcium in Erythrozyten von Patienten mit Hereditärer Sphärozytose**

Zur Analyse des intrazellulären Calciums wurden fluoreszenzmikroskopische Messungen der Erythrozyten nach Beladung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-4 gemacht und diese statistisch ausgewertet. Untersucht wurden 16 Patienten, die an Hereditärer Sphärozytose erkrankt sind. Die Diagnose wurde dabei mittels der aktuellen *Goldstandard*-Methoden gestellt (Huisjes et al., 2019). Da die Blutproben der Patienten aus spezialisierten Kliniken innerhalb Europas versendet wurden, wurden zudem Messungen an Erythrozyten von gesunden Kontrollspendern durchgeführt, die dieselben Transportkonditionen erfahren haben (Einfluss des Transports siehe Kapitel 4.1.6). Die statistische Auswertung jedes Patienten erfolgte daher im Vergleich zur zugehörigen Transportkontrolle. Für alle analysierten Patienten zeigte sich auf zellulärer Ebene ein signifikant erhöhter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Erythrozyten. Die Erkrankung der Sphärozytose kann durch Mutationen in verschiedenen Membranproteinen ausgelöst werden. Die untersuchten Patienten zeigen Mutationen in den Proteinen Ankyrin (7 Patienten), Bande 3 (2 Patienten),  $\alpha$ -Spektrin (4 Patienten) und  $\beta$ -Spektrin (3 Patienten). Die Patienten-basierte Analyse auf Basis der ursächlichen Mutation zeigt nur für die Gruppe der Ankyrinmutationen eine signifikante Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ . Ebenfalls stark erhöht, jedoch nicht signifikant ist das Level bei Patienten mit einer  $\beta$ -Spektrin Mutation. Problematisch ist hierbei und ebenfalls bei den letzten Gruppen vermutlich die Stichprobenzahl. Aufgrund der Seltenheit der Anämien, war es jedoch nicht möglich weitere Patienten mit Mutationen in diesen Proteinen zu untersuchen.

Woraus genau die Überladung mit Calcium in Sphärozyten resultiert, bedarf weiterer Untersuchungen. Bekannt ist, dass die Stabilität des Zytoskeletts in Sphärozyten stark beeinträchtigt ist (Da Costa et al., 2013). Ein Resultat dieser Instabilität könnte die Aktivierung mechanosensitiver Kanäle in der Erythrozytenmembran sein, z. B. Piezo1, durch die Calcium in die Zelle einströmt. Experimentell könnten dazu Untersuchungen nach Behandlung der Sphärozyten mit Inhibitoren mechanosensitiver Kanäle durchgeführt und der Einfluss auf das intrazelluläre Calcium der Zellen analysiert werden.

Denkbar ist auch, dass die Überladung mit Calcium durch eine gestörte Funktion der PMCA zustande kommt. Die PMCA verbraucht dabei ATP, um Calcium aus den Erythrozyten heraus zu transportieren. Das dafür benötigte ATP ist gebunden in membran-assoziierten Komplexen (Chu et al., 2012). Als Bestandteile dieser Komplexe wurden u. a. die

Membranproteine Bande 3 Protein, Ankyrin und  $\beta$ -Spektrin identifiziert. Mutationen in diesen Proteinen könnten zu einer Störung dieser Komplexe führen. Infolgedessen würde die PMCA nicht ausreichend mit ATP versorgt werden und sich das Level an intrazellulärem Calcium erhöhen. Ein gestörter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport aus der Zelle und eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme können unabhängig voneinander auftreten oder sich gegenseitig verstärken (Hertz et al., 2017).

Als weiterer Parameter wurde der Einfluss einer Splenektomie auf das intrazelluläre Calcium der Erythrozyten von HS Patienten untersucht. Die Entfernung der Milz ist eine Methode, die erst bei einer schweren klinischen Anämie indiziert ist und zur Verbesserung der Symptome beiträgt (Barcellini et al., 2011). Bei 13 der analysierten Patienten wurde diese Maßnahme durchgeführt, nur 3 Patienten waren unsplenektomiert. Es zeigt sich jedoch, dass die Entfernung der Milz nicht mit einer Veränderung im intrazellulären Calcium der Erythrozyten einhergeht. Die klinische Verbesserung ist vermutlich auf ein reduziertes Aussortieren der Zellen in der Milz zurückzuführen.

#### **4.1.3 Intrazelluläres Calcium in Erythrozyten von Patienten mit Hereditärer Xerozytose**

Ebenfalls untersucht wurden 11 Patienten, die mit der Hereditären Xerozytose diagnostiziert wurden. Zur Analyse des intrazellulären Calciums wurden erneut fluoreszenzmikroskopische Messungen der Erythrozyten nach Beladung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-4 gemacht und diese statistisch ausgewertet. Für 9 der analysierten Patienten zeigte sich auf zellulärer Ebene ein signifikant erhöhter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in den Erythrozyten, bei zwei Patienten zeigte sich ein „normales“ Level an intrazellulärem Calcium. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls im Vergleich zu gesunden Kontrollblutproben mit identischen Transportbedingungen. Molekulare Grundlage der Xerozytose ist in allen analysierten Fällen eine Mutation des mechanosensitiven Kationenkanals Piezo1. Dieser Kanal ist für Calcium permeabel und könnte die Ursache für einen erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom darstellen. Bei den 11 Patienten innerhalb dieser Studie wurden vier verschiedene Mutationen des Kanals entdeckt. Der genaue Einfluss dieser Mutationen auf die Physiologie des Kanals ist bisher nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Für sechs andere bekannte Piezo1 Mutationen, die ebenfalls das klinische Bild der Xerozytose auslösen, wurde eine verlangsamte Inaktivierungskinetik beobachtet, die mit einer erhöhten Aktivität einhergeht (Albuisson et al., 2013). Eine erhöhte Aktivität des Piezo1 Kanals könnte den gefundenen Anstieg des intrazellulären Calciums in Erythrozyten von Hereditäre Xerozytose Patienten erklären. Durch eine Behandlung der Erythrozyten mit dem mechanosensitiven Kanalinhistor GsMTx-4 könnte *in vitro* eine Beteiligung dieses Kanals am  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in



mutierten Zellen überprüft werden. Es wurde zudem berichtet, dass Piezo1 die ATP-Abgabe aus humanen Erythrozyten regulieren kann und dass diese Funktion durch Mutationen im Kanal verändert wird (Cinar et al., 2015). Wenn die gefundenen Piezo1 Mutationen zu einer erhöhten Abgabe von ATP aus den Erythrozyten führen, kann es ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Funktion der PMCA kommen, was zu einem weiteren Anstieg des intrazellulären Calcium beitragen würde. Ein gestörter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport aus der Zelle und eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme können unabhängig voneinander auftreten oder sich gegenseitig verstärken (Hertz et al., 2017).

#### **4.1.4 Intrazelluläres Calcium in Erythrozyten von Patienten mit Enzymopathien und uncharakterisierter hämolytischer Anämie**

Weiterhin wurden 5 Patienten mit diagnostizierten Enzymopathien untersucht. Davon waren 3 Patienten an Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel erkrankt, und jeweils einer an Glutamat-Cystein-Ligase- bzw. Glutathiondisulfid-Reduktase-Mangel. Die meisten Enzymopathien sind sehr seltene Erkrankungen, so sind z. B. bisher weniger als 10 Fälle des GCL-Mangels bekannt (van Wijk and van Solinge, 2016). Zur Analyse des intrazellulären Calciums wurden erneut fluoreszenzmikroskopische Messungen der Erythrozyten nach Beladung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-4 gemacht und diese statistisch ausgewertet. Die Analyse zeigte hier jedoch kein eindeutiges Bild. Das Level an intrazellulärem Calcium war in den Erythrozyten von zwei Patienten mit G6PD-Mangel und dem Patienten mit GCL-Mangel erhöht. Der Patient mit GSR-Mangel sowie der dritte Fall von G6PD-Mangel zeigten einen verringerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Erythrozyten im Vergleich zur analysierten gesunden Transportkontrollblutprobe.

Bei Enzymopathien hängt der Schweregrad der Anämie von mehreren Faktoren ab, wie dem betroffenen Stoffwechselweg, der Rolle des mutierten Enzyms in diesem Stoffwechselweg, die Auswirkung der Mutation auf die Funktion des Enzyms und der Möglichkeit des Erythrozyten die Enzymaktivität zu kompensieren (Koralkova et al., 2014). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Enzymopathien betreffen Enzyme, die innerhalb des Pentosephosphatweges und Glutathionstoffwechsels agieren. Beide Stoffwechselwege sind wichtig zur Aufrechterhaltung der Reduktionskraft der Zelle und zum Schutz der Zelle vor oxidativem Stress. Der Pentosephosphatweg stellt die einzige Möglichkeit des Erythrozyten dar NADPH zu generieren, das benötigt wird, um oxidiertes Glutathion zu reduzieren. Glutathion ist ein ROS-Fänger und schützt daher die intrazellulären Makromoleküle, insbesondere Hämoglobin, vor Oxidation (Leopold and Loscalzo, 2005). Enzymopathien verlaufen meist klinisch asymptomatisch. Zur Hämolyse mit daraus folgenden anämischen Symptomen kommt es nur bei erhöhtem oxidativem Stress, der z. B. durch Einnahme

bestimmter Medikamente oder Konsum von Favabohnen („Favismus“) entstehen kann (van Zwielen et al., 2014). Die Behandlung von humanen Erythrozyten mit  $H_2O_2$ , was eine Form des oxidativen Stresses darstellt, führt zu einem Einstrom von Calcium in die Zellen (Aiken et al., 1995). Dabei kommt es zur Oxidation des Hämoglobinmoleküls, wodurch Methämoglobin entsteht. Methämoglobin hat eine verstärkte Tendenz an die Zellmembran zu binden (Welbourn et al., 2017). Dass die Stress-induzierte Bildung von Methämoglobin für den Einstrom von Calcium verantwortlich ist, konnte durch Behandlung der Erythrozyten mittels Kohlenmonoxid gezeigt werden: Kohlenmonoxid stabilisiert das Hämoglobinmolekül und verhindert die Bildung von Methämoglobin, gleichzeitig kann dadurch der  $Ca^{2+}$ -Einstrom inhibiert werden. Es wird vermutet, dass die Interaktion von Methämoglobin mit der Membran eine Konformationsänderungen von Ionenkanälen bewirkt und so den  $Ca^{2+}$ -Einstrom ermöglicht (Aiken et al., 1995).

Ein erhöhter  $Ca^{2+}$ -Gehalt in Erythrozyten von Patienten mit Enzymopathien, die den Redoxstatus der Zelle beeinträchtigen, scheint daher plausibel. Es lässt sich aber auch erklären, warum die analysierten Patienten kein einheitliches Bild zeigen. Ein erhöhtes  $Ca^{2+}$ -Level findet sich nur bei erhöhtem oxidativem Stress, den die Zelle nicht mehr bewältigen kann. Wie stark die Auswirkung des Stresses ist, hängt auch von den eingangs erwähnten Faktoren ab wie der Rolle des betroffenen Enzyms im Stoffwechsel und seiner Restaktivität. Da die analysierten Patienten Mutationen in drei verschiedenen Enzymen besitzen und sich auch die drei Patienten mit G6PD-Mangel in ihrer Mutation unterscheiden, kann nicht von einem einheitlichen Krankheitsbild ausgegangen werden. Um eine aussagekräftige Analyse des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Levels durchzuführen, müssten daher Blutproben der Patienten während einer akuten hämolytischen Krise untersucht werden.

Die Patienten mit uncharakterisierter hämolytischer Anämie zeigen ebenfalls kein homogenes Bild. Bei zwei Patienten fand sich in den Erythrozyten ein erhöhter Gehalt an intrazellulärem  $Ca^{2+}$ , der dritte Patient zeigte ein signifikant geringeres Level im Vergleich zur gesunden Transportkontrollblutprobe. Da es bisher keinerlei Informationen zur Ursache der Anämie gibt, wäre jede Überlegung zum Ursprung des  $Ca^{2+}$ -Einstroms reine Spekulation.

#### **4.1.5 Intrazelluläres Calcium in Erythrozyten von Patienten mit Gardos-Channelopathie**

Als weitere Gruppe wurden Patienten mit Mutationen im Gen *KCNN4*, das für den Gardos-Kanal kodiert, analysiert. Die Analyse des intrazellulären Calciums wurde durch fluoreszenzmikroskopische sowie durchflusszytometrische Messungen der Erythrozyten nach Beladung mit dem  $Ca^{2+}$ -Indikator Fluo-4 und anschließender statistischer Auswertung durchgeführt. Für alle vier analysierten Patienten zeigte sich sowohl mikroskopisch als auch



Kanal bei einer physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration konstitutiv aktiv ist, wäre eine starke Dehydrierung der Erythrozyten zu erwarten, bedingt durch den Verlust von  $\text{K}^+$  durch den Gardos-Kanal, sowie von  $\text{Cl}^-$  und Wasser. Dies konnte aber nach Untersuchung der Patienten nicht bestätigt werden. Eine schematische Darstellung möglicher Kompensationsmechanismen der Zelle zeigt Abbildung 48. Der erhöhte Ausstrom von  $\text{K}^+$  wird durch eine verstärkte Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  Cotransporters NKCC1 und des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  Cotransporters KCC1 aufgehoben. Ebenfalls konnte anhand eines  $\text{K}^+(86\text{Rb}^+)$ -Fluss-Tests gezeigt werden, dass der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Austausch NHE1 eine erhöhte Aktivität aufweist. Bedingt durch NKCC und NHE kommt es zu einem experimentell bestätigten Anstieg des intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Gehalts verbunden mit einem Anschwellen der Zellen. Kompensatorisch wird die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aktiviert, was den verringerten ATP Gehalt und die Stimulation der Glykolyse in den Zellen erklärt. Das Anschwellen der Erythrozyten bewirkt möglicherweise eine Aktivierung mechanosensitiver Kanäle in der Membran, wie Piezo1, wodurch es zu dem gemessenen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels kommt (Fermo et al., 2017).

Die zweite Mutation der analysierten Patienten innerhalb dieser Arbeit, S314P, befindet sich ebenfalls in der Ca-CaM Bindestelle und führt zu einer verstärkten Aktivierung des Gardos-Kanals. Ein ähnlicher Pathomechanismus wie für die R352H Mutation beschrieben, ist daher naheliegend.

#### **4.1.6 Intrazelluläres Calcium in „frischen“ Blutproben und der Einfluss des Transports**

Ein Transport von Blutproben ist für viele Untersuchungen eine notwendige Maßnahme, z. B. bei der Durchführung von Doping Tests oder zu Forschungszwecken. Auch zur Untersuchung der Blutproben von Patienten mit seltenen Anämien im Rahmen dieser Arbeit war ein Transport der Proben nötig. Bedingt durch die Seltenheit der Anämien mussten Patienten aus verschiedenen Kliniken innerhalb Europas untersucht werden, um eine aussagekräftige und statistisch sinnvolle Stichprobenzahl zu gewinnen.

Eine Studie, die sich mit Transportbedingungen von Blutproben und verschiedener zu analysierender Blutparameter beschäftigte, kam zu dem Schluss, dass es keine allgemein gültige „optimale“ Transportbedingung gibt (Makhro et al., 2016). Untersucht wurde der Einfluss verschiedener Antikoagulanzen und Temperaturen auf Parameter der allgemeinen hämatologischen Laborwerte, des Erythrozyten-Stoffwechsels oder auch des Ionenhaushalts bis 72 h nach Blutentnahme. Hierbei zeigte sich, dass Temperatur und Antikoagulanzen in Abhängigkeit des zu untersuchenden Parameters gewählt werden sollten, aber eine Messung innerhalb von 24 h generell aussagekräftig ist. Speziell für Messungen zum intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ , wie sie auch in dieser Arbeit durchgeführt werden sollten, zeigte CPDA

die beste Reproduzierbarkeit und eine Unabhängigkeit von der vorliegenden Temperatur. Blutproben in Heparin zeigten erst nach 72 h keine verlässlichen Ergebnisse mehr zum intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt. Da Heparin, im Gegensatz zu CPDA kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator ist und dementsprechend die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht verändert, wurde dieses Antikoagulans zum Transport der zu untersuchenden Patientenblutproben ausgewählt. Alle Messungen zum intrazellulären Calcium wurden daher auch innerhalb von 48 h nach Blutentnahme am Patienten durchgeführt.

Vergleicht man die analysierten Kontrollblutproben innerhalb dieser Arbeit, stellt man große Abweichungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt fest, während die Kontrollproben innerhalb der erwähnten Studie konsistente Ergebnisse liefern. Dies lässt sich darauf zurückzuführen, dass innerhalb der Studie der Transport nur unter identischen Bedingungen simuliert wurde. Bei dem „wirklichen“ Transport der Blutproben in dieser Arbeit sind die Bedingungen von Temperatur, Stärke und Dauer der Erschütterungen unbekannt und nicht für jeden Transport einheitlich gewesen. Darin begründet liegt vermutlich auch der große Unterschied der Blutproben zwischen verschiedenen Transporten. Da die Ergebnisse des intrazellulären Calcium innerhalb eines Transports mit identischen Lieferbedingungen vergleichbar sind, wurde eine Normierung der Patientenblutproben auf die jeweils mitgeführte Kontrollprobe eines gesunden Spenders durchgeführt. Eine Ungewissheit der durchgeführten Studie war jedoch, ob sich in Erythrozyten von Anämie Patienten ein tatsächlich erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt findet oder ob dieses Resultat ein Artefakt des Transports ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden Messungen an Erythrozyten von drei HS Patienten „vor Ort“ in einem Zeitfenster von wenigen Stunden nach Blutentnahme durchgeführt. Auch hier zeigte sich ein leicht, aber signifikant erhöhter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in den Zellen im Vergleich zu Erythrozyten von gesunden Kontrollblutspendern. Ein reiner Transporteffekt, der zu den erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Werten in Erythrozyten von Anämie Patienten führt, kann also ausgeschlossen werden. Allerdings ist es möglich, dass der Transport den Unterschied im intrazellulären Calcium zwischen Kontrollen und Patienten verstärkt, da pathologische Erythrozyten oft instabiler sind und eine geringere Stresstoleranz besitzen. Dies könnte sich aber wiederum auch unter physiologischen Bedingungen wiederfinden. Auch im Körper wirkt eine Form von mechanischem „Stress“ auf die Zellen, z. B. beim Passieren von Kapillaren oder den Milzsinusoiden. Wenn pathologische Erythrozyten diesen Stress ebenfalls weniger tolerieren, könnte sich das auch *in vivo* in einem erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Level zeigen.

#### **4.1.7 Intrazelluläres Calcium allgemein in Anämien**

Für seltene Anämien, wie sie im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, fehlt meist neben einer routinierten Diagnostik auch eine gezielte Therapie. Erschwert wird beides durch den

Mangel an Patienten und daraus bedingtem Mangel an Wissen über die Pathophysiologie dieser Erkrankungen. Die Wichtigkeit einer richtigen Diagnose zeigt sich z. B. bei der Hereditären Xerocytose. Eine Splenektomie ist in vielen Fällen hilfreich zur symptomatischen Behandlung einer Anämie. Bei Xerocytose Patienten kommt es jedoch nach einer Entfernung der Milz sehr häufig zu thromboembolischen Komplikationen, weshalb hier eine Fehldiagnose fatal sein kann (Iolascon et al., 2017). Eine Diagnose auf genetischer Ebene setzt sich daher vermehrt durch (Kim et al., 2017). Auch bei der Therapie von schweren Anämien wird in den meisten Fällen zu einer rein symptomatischen Behandlung durch Bluttransfusionen gegriffen. Diese haben aber auf lange Zeit gesehen viele Nebenwirkungen, wie eine Eisenüberladung oder die Entstehung von Gallensteinen (Barcellini et al., 2011). Eine Entwicklung von gezielteren Therapiemöglichkeiten ist daher zwingend notwendig. Betrachtet man die Daten der einzelnen, in dieser Arbeit untersuchten hämatologischen Erkrankungen, deutet sich ein genereller Zusammenhang zwischen erhöhtem intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in Erythrozyten und einer symptomatischen Anämie an. Die Überladung mit Calcium hat mehrere zelluläre Auswirkungen, die für eine verfrühte Aussortierung der Zellen aus dem Blutstrom verantwortlich sein könnten. Zusammengefasst sind diese in Abbildung 49.

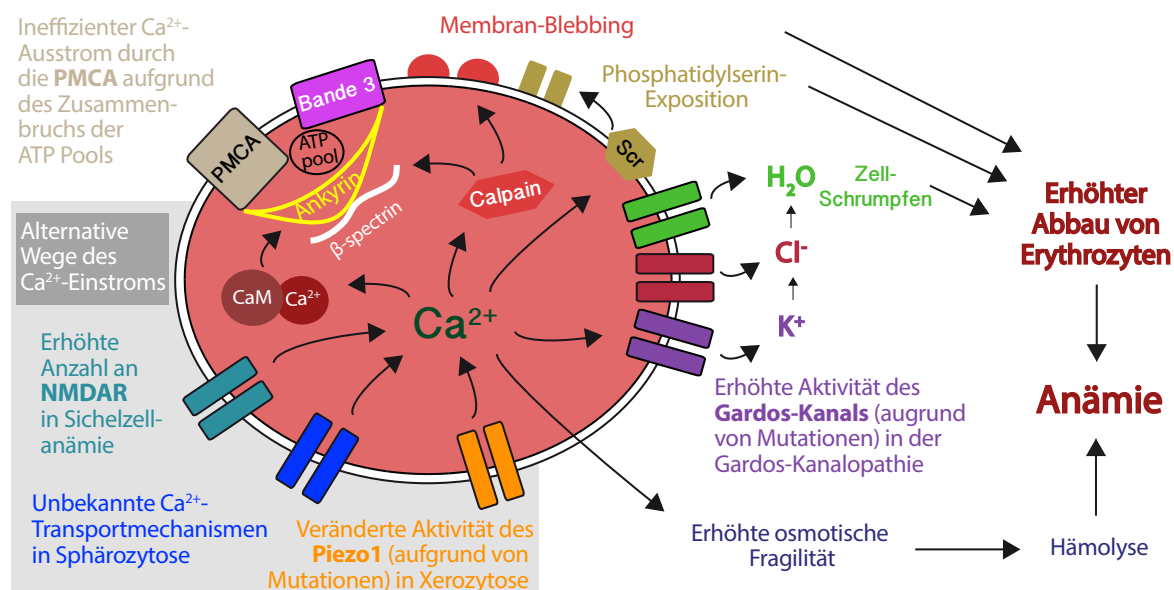


Abbildung 49: Zusammenfassung der möglichen Mechanismen, die zur Pathophysiologie von Anämie Erkrankungen beitragen. Es kommt allgemein zu einem erhöhten Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ , durch erhöhte Expression von NMDA-Rezeptoren bei der Sichelzellanämie, durch veränderte Aktivität des Piezo1 in der Xerocytose, durch erhöhte Aktivität des Gardos-Kanals in der Gardos-Channelopathie oder durch bisher unbekanntes  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportmechanismen in der Sphärozytose. Intrazelluläre Ziele des Calciums sind Calpain, Calmodulin, die Scramblase oder auch der Gardos-Kanal. Folgen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung sind daher die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran, das Membran-Blebbing, das Schrumpfen der Erythrozyten durch Aktivierung des Gardos-Kanals und der Zusammenbruch der membran-assoziierten ATP-Pools und folgendem ineffizienten Transport des Calciums aus der Zelle. Die durch Calcium bedingte erhöhte osmotische Fragilität führt zur Hämolyse der Zellen und zusammen mit einem gesteigerten Abbau kommt es zur Entstehung einer Anämie. Abbildung modifiziert nach (Hertz et al., 2017).

Durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Aktivierung von Calpain und des Ca-CaM-Komplexes kommt es zu einem Verlust der Zytoskelett-Stabilität. Phosphatidylserin wird auf der Außenseite der Membran exponiert durch eine aktivierte Scramblase. Der Gardos-Kanal wird aktiviert, wodurch es zu einem Verlust von KCl und Wasser kommt und das Zellvolumen abnimmt. Diese Effekte sind bei seneszenten Erythrozyten zu beobachten (Lutz and Bogdanova, 2013). Eine gezielte Therapie zur Behandlung dieser Anämien sollte daher darauf beruhen, die Überladung der Zellen mit Calcium zu verhindern oder einzuschränken. Dafür ist es notwendig den genauen Aufnahmeweg des Calciums in die Zelle zu kennen. Für die Sichelzellanämie hat sich eine erhöhte Anzahl an NMDA-Rezeptoren als beteiligte Ursache am erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom herausgestellt. Durch spezifische Inhibition dieser Rezeptoren kann das  $\text{Ca}^{2+}$ -Level in Sichelzellen gesenkt werden (Hänggi et al., 2014). Ein spezifischer NMDA-Rezeptor Inhibitor zeigte sich in einer Pilotstudie erfolgreich in der Behandlung von Sichelzellanämie Patienten (Bogdanova et al., 2017). Bei der Hereditären Xerozytose ist vermutlich der mutierte Piezo1 Kanal verantwortlich für den erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, weshalb dieser das pharmakologische Ziel zur Behandlung von Hereditäre Xerozytose Patienten darstellen kann. Auch bei Patienten mit Gardos-*Channelopathie* könnte Piezo1 am pathologisch erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt beteiligt sein, weshalb auch hier eine gezielte Inhibition des Kanals als Therapie in Frage kommt. Bei der Hereditären Sphärozytose ist derzeit noch unklar, wie es zu einem erhöhten Einstrom von Calcium kommt. Zur Entwicklung einer Therapie, die auf die Senkung des intrazellulären Calcium abzielt, bedarf es daher noch weiterer Forschung.

## 4.2 Lysophosphatidsäure Signalweg in murinen und humanen Erythrozyten

### 4.2.1 Aktivierung von TRPC6 durch die PKC $\alpha$

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Fragestellungen zum Signalweg des LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms bearbeitet. Bekannt ist, dass LPA über einen G-Proteingekoppelten Rezeptor agiert, der in der Zelle zwei Signalkaskaden aktiviert. Zusammengefasst kommt es auf einer Seite zur PI<sub>3</sub>K und MAP-Kinasen-vermittelten Öffnung des Ca<sup>2+</sup>-Kanals Ca<sub>v</sub>2.1, auf der anderen Seite wird über die PLC $\beta$  und die PKC $\alpha$  der Kanal TRPC6 geöffnet (siehe auch Kapitel 1.6). Für die PKC-vermittelte Phosphorylierung von TRPC6 wurde in der Literatur sowohl eine Deaktivierung (Bousquet et al., 2010) als auch eine Aktivierung beschrieben (Kim and Saffen, 2005). Im Falle der Aktivierung kommt es ebenfalls zunächst durch die PKC $\alpha$ -vermittelte Phosphorylierung zu einer Inaktivierung des TRPC6. Der phosphorylierte Kanal rekrutiert das FK506-Bindungsprotein (FKBP12), das wiederum einen Komplex mit Calcineurin und Calmodulin bildet. Die Aktivierung von Calcineurin in diesem Komplex führt erneut zu einer Dephosphorylierung von TRPC6, wodurch eine Öffnung des Kanals möglich ist. Da eine Inhibition der PKC $\alpha$  in murinen und humanen Erythrozyten zu einer Verringerung des LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms führt, musste es zu einer Aktivierung des TRPC6 Kanals durch die PKC $\alpha$  kommen. Untersucht wurde daher eine Beteiligung von Calcineurin und FKBP12 am LPA Signalweg. Hierzu kamen die pharmakologischen Substanzen Gö6976, Cyclosporin A (CsA) und FK506 zum Einsatz. Durch alle drei Substanzen lässt sich der LPA-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom sowohl in murinen als auch humanen Erythrozyten verringern. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es innerhalb des LPA Signalweges ebenfalls zu einer Proteinkomplexbildung von TRPC6, FKBP12, Calcineurin und möglicherweise Calmodulin kommt, die notwendig ist zur Aktivierung des TRPC6 Kanals. Eine schematische Darstellung dieses Ablaufs zeigt Abbildung 50.

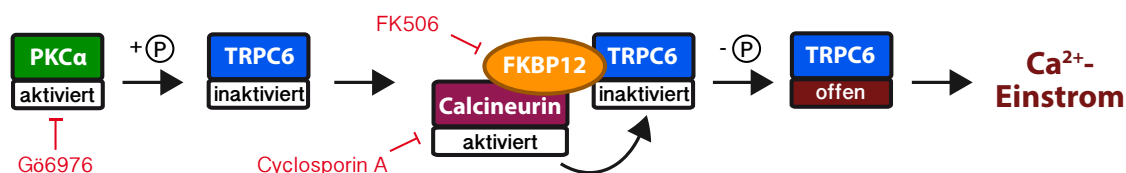


Abbildung 50: Schematische Darstellung der PKC $\alpha$ -vermittelten Aktivierungskaskade von TRPC6.

Die Anwendung des Calcineurininhibitors CsA führt in humanen Erythrozyten zu einer stärkeren Reduktion des LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms als die Inhibition der PKC $\alpha$  durch Gö6976 und des FKBP12 durch FK506 (Vergleich Abbildung 31). Ebenso kann bei TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten eine weitere Reduktion des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms festgestellt werden (Vergleich



Abbildung 32), obwohl Calcineurin und TRPC6 auf derselben Seite des Signalweges agieren und es nicht zu einem synergistischen Effekt kommen sollte. Beide Ergebnisse deuten darauf hin, dass Calcineurin eventuell eine sekundäre, bisher unbekannte Aufgabe im LPA Signalweg zukommt. Dass CsA neben der Inhibition von Calcineurin weitere Effekte in Erythrozyten hat ist bereits bekannt. So bewirkt CsA z. B. eine Verminderung der Deformierbarkeit der Zellen, die durch eine Änderung in der Membranlipidkomposition hervorgerufen wird (Ademoglu et al., 2004).

#### 4.2.2 Mechanosensitivität des LPA Signalweges

Eine weitere zentrale Frage innerhalb des Signalweges ist die nach dem Ursprung des initialen Calciums, das zur Aktivierung der PKC $\alpha$  benötigt wird. Im Laufe der LPA Kaskade kommt es durch die Spaltung von PIP<sub>2</sub> zur Entstehung von IP<sub>3</sub>, das als Mediator für die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern fungiert (Vergleich Kapitel 1.6). Da Erythrozyten nicht über diese Speicher verfügen, muss das benötigte Calcium von außen über die Plasmamembran in die Zelle gelangen. Hier wäre denkbar, dass das Calcium, welches die PKC $\alpha$  zur Aktivierung benötigt, durch den Ca<sub>v</sub>2.1 Kanal über die zweite Seite des Signalwegs in die Zelle gelangt. Eine Inhibierung des Ca<sub>v</sub>2.1 durch  $\omega$ -Agatoxin TK würde dann allerdings zu einer vollständigen Inhibierung des LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms führen, da beide Seiten des Signalweges betroffen wären. Experimentell konnte der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom jedoch nicht vollständig inhibiert werden (Wang, 2013), weshalb diese Theorie verworfen werden kann.

Aus der Literatur gibt es Hinweise auf eine Beteiligung mechanosensitiver Kanäle am LPA-induzierten Signalweg (Wesseling et al., 2016a). So konnte gezeigt werden, dass die Behandlungsmethode der Erythrozyten mit LPA Einfluss auf die Stärke des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms hat: das Mischen der Zellen mittels eines Vortexers nach Zugabe von LPA führt zu einem höheren Ca<sup>2+</sup>-Signal als manuelles Schütteln der Zellsuspension. Ebenso zeigen durchflusszytometrische Messungen einen stärkeren Ca<sup>2+</sup>-Einstrom als mikroskopische Messungen bei identischer Vorbehandlung. Eine mögliche Erklärung kann der erhöhte mechanische Stress sein, der bei einer durchflusszytometrischen Messung auf die Erythrozyten wirkt und zu einer Aktivierung mechanosensitiver Kanäle wie Piezo1 führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle LPA-Messungen mikroskopisch unter Verwendung eines gravitationsgetriebenen Perfusionssystem durchgeführt. Auch hier konnte beobachtet werden, dass die Höhe der Flüssigkeitssäule im Perfusionssystem die Stärke des Ca<sup>2+</sup>-Signals beeinflusst, weshalb die Messungen mit einem einheitlichen Lösungsvolumen durchgeführt wurden.

Zur weiteren Untersuchung einer Beteiligung mechanosensitiver Kanäle am Signalweg, wurde der Einfluss des Inhibitors GsMTx-4 auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom untersucht. Für GsMTx-4 konnte an humanen Erythrozyten bereits ein inhibitorischer Effekt auf einen mechanisch-induzierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom gezeigt werden, der mit Piezo1 in Verbindung gebracht wird, (Danielczok et al., 2017). Sowohl bei murinen als auch bei humanen Erythrozyten führt die Behandlung mit GsMTx-4 zu einer Verringerung des LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms (Vergleich Abbildung 34). Ebenfalls verringert werden kann das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal durch manuelles Zugeben des LPAs ohne stetige Perfusion während der Messung (Vergleich Abbildung 34). Durch die Beteiligung eines mechanosensitiven Kanals am Signalweg, wie Piezo1, ließe sich der Ursprung des zur Aktivierung der PKC $\alpha$  benötigten Calciums erklären.

GsMTx-4 ist allerdings kein spezifischer Inhibitor für Piezo1, sondern wirkt u. a. auf den ebenfalls am Signalweg beteiligten Kanal TRPC6. TRPC6 kann ebenfalls durch mechanischen oder osmotischen Stretch der Membran aktiviert werden kann, ist also mechanosensitiv (Spasova et al., 2006). Die Inhibition mit GsMTx-4 macht den Kanal sowohl insensitiv für mechanische Veränderungen als auch chemisch-inaktivierbar durch DAG oder die PLC. Es ist daher auch möglich, dass der beobachtete Effekt auf den LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom nicht durch Inhibition des Piezo1 Kanals, sondern lediglich durch eine Inhibition von TRPC6 erfolgt. In humanen Erythrozyten führt die Stimulation mit LPA ohne Perfusion zu einem geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom als die durchgeführte Kontrollperfusion mit Tyrode (Vergleich Abbildung 34). Hier kann spekuliert werden, dass eine initiale mechanische Stimulation zur Aktivierung der LPA Kaskade notwendig ist, was gegen eine ausschließliche mechanische Inhibition von TRPC6 spricht. Dieser Effekt konnte jedoch in murinen Wildtyp Erythrozyten nicht bestätigt werden (Vergleich Abbildung 34). Hier sollte ebenfalls der Effekt von GsMTx-4 auf den LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten untersucht werden. Wenn hier ein Unterschied zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ohne Inhibitor festgestellt werden kann, würde das ebenfalls für die Beteiligung eines weiteren mechanosensitiven Kanals wie Piezo1 sprechen.

Eine weitere Möglichkeit die Beteiligung des Piezo1 Kanals am Signalweg zu untersuchen bietet der Mangan-Quenching-Test (Pan et al., 2018). Dabei macht man sich zu Nutze, dass Mangan im Vergleich zu Calcium eine höhere Affinität zum Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 hat und es nach Bindung von Mangan zu einem Quenchen des Fluoreszenzsignals kommt. Im Gegensatz zu TRPC6, der permeabel ist für Mangan (Bouron et al., 2015), zeigt Piezo1 keine Permeabilität für Mangan (Gnanasambandam et al., 2015), wodurch eine Identifizierung des am LPA Signalwegs beteiligten Kanals möglich sein sollte.

### 4.2.3 Untersuchung verschiedener TRPC6 Inhibitoren

Als weitere Untersuchungen des LPA Signalwegs wurden die TRPC6 Inhibitoren Larixylacetat und SAR7334 getestet. Beide Substanzen inhibieren aufgrund der Sequenzhomologie ebenfalls TRPC3 und TRPC7, haben jedoch eine 12-fache (Larixylacetat) bis 20-fache (SAR7224) Präferenz für TRPC6 (Maier et al., 2015; Urban et al., 2015). In humanen Erythrozyten führt die Verwendung der Inhibitoren jedoch nicht zu der erwarteten Reduktion des LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms. Stattdessen wurde sogar eine Verstärkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals für beiden Substanzen im Vergleich zur alleinigen Perfusion mit LPA beobachtet (Vergleich Abbildung 35). In murinen Wildtyp Erythrozyten findet sich ebenfalls ein erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom für SAR7334 im Vergleich zu LPA allein, die Anwendung von Larixylacetat auf den LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom hat eine Reduktion zur Folge (Vergleich Abbildung 36). Zur weiteren Überprüfung der Substanzen wurden zusätzlich Versuche an Erythrozyten von TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt. Hier sollte kein Effekt auf den LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom auftreten. Dies konnte allerdings nur für SAR7334 beobachtet werden. Larixylacetat führt auch in TRPC6 defizienten Erythrozyten zu einer Verstärkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals nach Behandlung mit LPA (Vergleich Abbildung 36). Bisherige Untersuchungen zur Spezifität der beiden Inhibitoren wurden an der Zelllinie HEK 293 durchgeführt, in der die TRPC Kanäle überexprimiert wurden (Maier et al., 2015; Urban et al., 2015). Eine Übertragung der gefundenen Effekte in diesen Zellkultursystemen auf humane und murine Erythrozyten ist daher nicht unbedingt möglich. Da es teilweise sogar zu einer weiteren Verstärkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals gekommen ist, besteht die Möglichkeit, dass die Substanzen neben der Inhibition von TRPC6, weitere unspezifische Wirkungen haben, die in Erythrozyten besonders hervortreten. Es lässt sich daher sagen, dass die Inhibitoren Larixylacetat und SAR7334 zur Untersuchung des LPA Signalweges in Erythrozyten nicht geeignet sind.

### 4.2.4 Experimentelle Variation

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten LPA-Messungen wurden mehrere Chargen von LPA verwendet und diese auch von verschiedenen Firmen bezogen. Hierbei wurde festgestellt, dass jede Charge eine unterschiedliche starke Potenz zur Induktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms aufweist. Diese Beobachtung deckt sich mit einer aktuellen Studie zu methodischen Problemen bei der Analyse des intrazellulären Calciums in Erythrozyten (Wesseling et al., 2016a). In dieser Studie wurden ebenfalls mehrere Chargen von LPA von zwei verschiedenen Herstellern untersucht und dabei festgestellt, dass es chargenabhängig zu einem signifikant unterschiedlichen Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels in humanen Erythrozyten

kommt bei ansonsten vollkommen identischer Behandlung der Zellen. Diese Beobachtung hat zur Folge, dass LPA-Messungen, die mit unterschiedlichen LPA Chargen durchgeführt wurden, nicht miteinander verglichen werden können. Dies betrifft im Rahmen dieser Arbeit alle Datensätze, die nicht in einer Abbildung zusammengefasst sind. Für alle Untersuchungen wurden daher auch neue Kontrollmessungen zur statistischen Analyse am selben Tag und unter identischen Bedingungen durchgeführt.

Unabhängig vom verwendeten LPA zeigen humane und murine Erythrozyten eine sehr heterogene Reaktion auf die Behandlung mit LPA. Neben Zellen, die keine Reaktion zeigen, gibt es Zellen mit einer schwachen bis sehr ausgeprägten Reaktion in Form des LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms. Diese Heterogenität wurde in Verbindung gebracht mit dem Alter der Erythrozyten, konnte dadurch jedoch nur teilweise erklärt werden (Wang et al., 2013). Retikulozyten zeigen zwar einen signifikant geringeren Einstrom von Calcium nach Behandlung mit LPA, seneszente Erythrozyten weisen aber ebenfalls eine starke Heterogenität auf. Die LPA Signalkaskade besteht aus einer beträchtlichen Anzahl an Enzymen und Modulatoren. Die Heterogenität könnte daher durch die in der Zelle vorliegende Menge an Enzymen beeinflusst werden, die zwischen den Zellen variieren kann. Aufgrund der fehlenden Translation in Erythrozyten, kann eine Regulation des Signalweges auf translatorischer Ebene ausgeschlossen werden, jedoch können am Signalweg beteiligte Proteine durch Translokation, posttranslationale Modifikationen oder Degradation in ihrer Funktion verändert werden. In Betracht ziehen muss man auch indirekte Modulatoren des Signalweges, besonders die PMCA, die Calcium aktiv wieder aus der Zelle heraustransportiert. Die Aktivität der Pumpe ist stark abhängig vom ATP-Gehalt des Erythrozyten. Der metabolische Status kann ebenfalls zwischen den Zellen stark variieren (Magnani et al., 1983), wodurch sich ein heterogener Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts erklären lässt.

Allgemein wird die Reaktion von Erythrozyten auf LPA mit einer aktiven Rolle der Zellen bei der Thrombusbildung und Blutgerinnung assoziiert (Yang et al., 2000). Es wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Anzahl an Erythrozyten und der Blutungsdauer nach Verletzung sowie dem Auftreten von thrombotischen Ereignissen festgestellt: So kann eine anhaltende Blutung durch Transfusion von Erythrozyten behandelt werden, auf der anderen Seite finden sich bei Patienten mit Polycythemia Vera, die eine abnorme Vermehrung von roten Blutzellen aufweisen, gehäuft Thrombosen (Chung et al., 2007). LPA ist ein extrazelluläres Signalmolekül, das u. a. von aktivierten Thrombozyten im Rahmen der Blutgerinnung abgegeben wird (Eichholtz et al., 1993). Der LPA-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bewirkt in Erythrozyten verschiedene zelluläre Mechanismen (Vergleich Kapitel 1.5 und 4.1.7). Dazu zählen die Aktivierung der Scramblase, wodurch es zum Zusammenbruch der

Asymmetrie der Membranlipide und Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Membranseite kommt (Wesseling et al., 2016b). Weiterhin wird der Gardos-Kanal aktiviert und es kommt, bedingt durch den Ausstrom von  $K^+$ , gefolgt von  $Cl^-$  und Wasser, zu einem Schrumpfen der Erythrozyten (Hoffman et al., 2003). Durch die Aktivierung von Calpain und dessen Spaltung verschiedener Komponenten des Zytoskeletts kommt es zudem zu einer Instabilität der Erythrozyten (Bogdanova et al., 2013).

*In vitro* konnte durch die Stimulation mit LPA bereits eine Aggregation von Erythrozyten mit vermehrter Exposition von PS gefunden werden (Kaestner et al., 2012; Steffen et al., 2011), diese PS Exposition auf Erythrozyten und eine erhöhtes Auftreten von Thrombosen konnte ebenfalls *in vivo* im Tiermodell beobachtet werden (Shin et al., 2007). Dadurch wird die Hypothese der aktiven Beteiligung von Erythrozyten an der physiologischen Blutgerinnung sowie der pathologischen Entstehung von Thrombosen unterstützt.

Das genaue Verständnis des LPA Signalweges ist daher von großen Interesse zur therapeutischen Behandlung von pathologisch auftretenden Thrombosen und sich daraus entwickelnden kardiovaskulären Erkrankungen.

#### **4.2.5 Hypothese zum Ursprung des TRPC6 in der Erythrozytenmembran**

Funktionell lässt sich der TRPC6 Kanal sowohl in murinen als auch humanen Erythrozyten nachweisen. Der Knockout des Kanals in Mäusen zeigt, ebenso wie die Inhibition mehrerer Enzyme des LPA Signalweges die zur Aktivierung des Kanals führen, einen geringeren LPA-induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstrom. An humanen Zellen führt die Inhibition dieser intrazellulären Signalkaskade zum selben Ergebnis, weshalb auf das Vorhandensein des TRPC6 Kanals in der Membran geschlossen werden kann. Ein direkter Nachweis des Kanals konnte bisher jedoch nicht erbracht werden. In murinen Erythrozyten konnte das Vorhandensein des Kanals auf Proteinebene mittels Western Blot gezeigt werden (Föller et al., 2008), in aufgereinigten und Leukozyten-depletierten humanen Erythrozyten war dies bisher nicht möglich. Die TRPC6 Expression wurde zudem in eigenen Transkriptomanalysen von Retikulozyten (unpublizierte Daten) untersucht. In murinen Retikulozyten konnte TRPC6 mRNA nachgewiesen werden, in humanen Retikulozyten konnte keine mRNA detektiert werden. Zusammen mit der Tatsache, dass Retikulozyten keinen  $Ca^{2+}$ -Einstrom nach Stimulation mit LPA zeigen (Wang et al., 2013), kann darauf geschlossen werden, dass TRPC6 von humanen Retikulozyten nicht exprimiert wird. Der funktionelle Nachweis über den LPA-induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstrom, zeigt jedoch das Vorhandensein des Kanals in der Membran von adulten Erythrozyten. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung bietet das Phänomen der Trogozytose, bei dem es zum Austausch von Proteinen und/oder Membranfragmenten zwischen Zellen kommt, insbesondere Leukozyten (Ahmed et al.,

2008). Zur Untersuchung eines möglichen Austausches des TRPC6 Kanals zwischen Erythrozyten und anderen Zellen kann man sich das Modell der TRPC6<sup>-/-</sup> Maus zu Nutze machen. Markierte Erythrozyten dieser Maus, die einen geringeren LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom zeigen, können in Wildtyp Mäuse transfundiert werden und Untersuchungen zum LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach Transfusion durchgeführt werden. Bei einem Austausch des TRPC6 Kanals sollte es zu einer Veränderung des Ca<sup>2+</sup>-Signals der Knockout-Zellen nach Stimulation mit LPA kommen. (Vergleich Kapitel 4.4).

### 4.3 Fluoreszenzmarkierung von Erythrozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Transfusionsversuche an transgenen Mäusen geplant. Eine Voraussetzung für die Durchführung solcher Versuche ist die stabile und verlässliche Markierung der Zellen, die es ermöglicht, diese nach der Transfusion im Blut des Empfängertieres wiederzuerkennen. Hierzu ist die Anwendung verschiedener Methoden bekannt, von denen mehrere getestet und durchgeführt wurden. Eine Markierung der Zellen kann durch fluoreszentes Anfärben der Zellmembran erfolgen, in dieser Arbeit wurden die Membranfarbstoffe PKH26 und PKH67 verwendet. Ebenfalls getestet wurde die Methode der Biotinylierung, bei der es durch die Zugabe eines reaktiven Biotinreagenz zur Markierung aller Oberflächenproteine auf der Zelle kommt. Visualisiert werden kann diese Markierung durch Biotin-bindende, fluoreszente Antikörper. Als dritte Methode wurde eine endogene Markierung der Erythrozyten gewählt. Dazu wurde eine transgene Maus generiert, die das Fluoreszenzprotein RFP exprimiert.

#### 4.3.1 *In vivo*-Biotinylierung von Erythrozyten

Eine beliebte Methode zur Markierung von Erythrozyten oder anderen Blutzellen ist die Biotinylierung. Hierbei werden die Zellen mit einem reaktiven Biotinreagenz behandelt, wodurch es zu einer kovalenten Bindung des Biotins an Oberflächenproteine auf der Zellmembran kommt. Mit fluoreszierenden (Strept-)Avidin-Konjugaten kann diese Markierung der Zellen visualisiert werden.

Um eine Vorbehandlung der Zellen vor Durchführung der Transfusion, wie sie bei der Anfärbung mit z. B. PKH nötig ist, zu vermeiden, wurde die Biotinylierung in dieser Arbeit direkt *in vivo* durchgeführt. Dadurch kann eine Manipulation und mögliche Hämolyse der Erythrozyten vor Versuchsbeginn reduziert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass biotinylierte Erythrozyten eine normale Lebensdauer nach Transfusion zeigen (Mock et al., 1999). Messungen dazu wurden größtenteils durchflusszytometrisch durchgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte durchflusszytometrische Analyse der *in vivo*-biotinylierten Erythrozyten zeigte vergleichbare Resultate. Die Stärke des gemessenen Fluoreszenzsignals zeigte jedoch einen sehr starken Abfall, weshalb sich nach einer Woche biotinylierte Zellen nur noch schwer von unbiotinylierten Erythrozyten unterscheiden ließen. Die Anzahl der positiven Zellen zeigte allerdings keinen starken Abfall. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es nicht zu einem Abbau der biotinylierten Zellen kommt, sondern zu einem Verlust der Oberflächenmarkierung. Dieses Phänomen ist aus der Literatur bereits bekannt (Bogusiewicz et al., 2004a). Ein Aufspalten der Biotinbindung kann enzymatisch, durch im Blutplasma enthaltene Enzyme, und nichtenzymatisch erfolgen

(Bogusiewicz et al., 2004b). Für die *in vivo* – Biotinylierung wird eine relativ hohe Dosis des Biotins benötigt, die mit einem schnelleren Abbau der Markierung in Zusammenhang gebracht wird (Mock et al., 2014). Erfolgreicher wäre daher der Einsatz einer geringeren Dosis, die wiederum eine *in vitro* Anwendung des Biotinreagenz voraussetzt. Ebenfalls ist bekannt, dass die Auswahl des Biotinreagenz bzw. die Art der Protein-Biotin-Bindung und die Länge des Linkerarms wichtig ist für die Stabilität der Biotinmarkierung. Eine Amidbindung zwischen Protein und Biotinmolekül zeigt eine höhere Stabilität als eine Hydrazinbindung. Zusätzlich wird die Bindung stabiler wenn die Distanz zwischen Biotinmolekül und Biotin-Protein-Bindung größer ist (Bogusiewicz et al., 2004a). Das verwendete Sulfo-NHS-SS Biotin erfüllte diese beiden Voraussetzungen und wurde deshalb zur Durchführung der *in vivo*-Biotinylierung ausgesucht. Für durchflusszytometrische Messung war die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Biotinylierung auch erfolgreich. Für mikroskopische Analysen, wie sie im weiteren Verlauf geplant waren, war das gemessene Fluoreszenzsignal allerdings nach einer Woche nicht mehr stark genug, um Streptavidin-positive Zellen eindeutig von negativen Erythrozyten zu unterscheiden. Ein weiterer Nachteil der Biotinylierung ist der unbekannte Einfluss auf die Zelloberflächenproteine, die durch die Modifizierung mit Biotin hervorgerufen wird (Mock et al., 2014).

Da die *in vivo*-Biotinylierung keine zufriedenstellenden Ergebnisse zeigte, wurde eine andere Methode zur Markierung der Erythrozyten zur Durchführung einer Transfusion mit dem TRPC6<sup>-/-</sup> Modell ausgewählt.

#### **4.3.2 Charakterisierung der *R26-tdRFP-CMV* Maus**

Als weitere Methode zur Markierung von Erythrozyten wurde die endogene Expression eines Fluoreszenzproteins gewählt. Dazu wurde eine transgene Maus generiert, die mehrere Voraussetzungen erfüllen musste. Das Emissionsspektrum des Fluoreszenzproteins sollte im langwelligen roten Wellenlängenbereich liegen, um eine Kombination mit dem Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fluo-4 zu ermöglichen, ohne „Crosstalk“ zu erzeugen (1). Die Expression des Fluoreszenzproteins sollte stark genug sein, um eine Detektion in ausgereiften Erythrozyten, in denen Transkription und Translation abgeschaltet sind, zu erlauben (2). Das exprimierte Fluoreszenzprotein sollte zytosolisch vorliegen, um keine Veränderungen in der Membran hervorzurufen (3). Das Kreuzungsschema zur Generierung der transgenen Maus findet sich in Kapitel 2.5.2. Als Ausgangslinie wurde die Reportermaus *R26-tdRFP* verwendet (Luche et al., 2007). Mäuse dieser Linie besitzen am Genlocus *ROSA26* ein gefloxtes *tdRFP*-Gen mit einer Stopp-Kassette. Diese Stopp-Kassette verhindert die Expression des *tdRFP*. Das *tdRFP* ist ein Tandemprotein bestehend aus zwei RFP Monomeren, das eine höhere Fluoreszenzintensität aufweist als das RFP-Monomer (Campbell et al., 2002). Zur



Aktivierung der *tdRFP*-Expression wurden homozygote Mäuse dieser Linie mit einer Cre-Mauslinie verpaart. Die ausgewählte Mauslinie CMV-Cre generiert Mäuse, die das Enzym Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CMV Promotors und dadurch ubiquitär exprimieren (Schwenk et al., 1995). Durch die Expression der Cre-Rekombinase kommt es zu einem Herausschneiden der Stopp-Kassette am *R26-tdRFP*-Lokus und zu einer Expression des *tdRFPs*, das in der Zelle zytosolisch vorliegt. Die neue Mauslinie *R26-tdRFP-CMV* erfüllte daher alle Bedingungen, die an eine transgene Maus gestellt wurden.

Zur Überprüfung der ubiquitären Expression des *tdRFPs*, wurden folgende Organe der *RFP<sup>+/+</sup>* Mäuse präpariert und auf Fluoreszenz untersucht: Herz, Magen, Lunge, Niere, Darm, Leber, Skelettmuskel und Hohlvene. Die RFP-Expression konnte in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden (Vergleich Abbildung 38). Eine unterschiedlich starke Expression des Fluoreszenzproteins in den einzelnen Organen lässt sich durch eine unterschiedliche Aktivität des endogenen *ROSA26* Promotors in verschiedenen Zellen erklären.

Die Analyse des Knochenmarks aus Tibia und Femur *RFP*-positiver Mäuse zeigte ebenfalls eine ubiquitäre Expression des *tdRFPs*. Zur Identifizierung von erythropoetischen Zellen wurde neben der Kernfärbung mittels Hoechst 33258 ein FITC-markierter Anti-Ter-119 Antikörper verwendet. Ter-119 ist ein mit Glykophorin A-assoziiertes Molekül, dass in murinen Zellen vom Stadium des Erythroblasten bis zum ausgereiften Erythrozyten exprimiert wird (Kina et al., 2000). In Ter-119-negativen Zellen zeigte sich eine stärkere RFP-Fluoreszenz als in positiven Zellen, ebenfalls zeigten kernhaltige Ter-119-positive Zellen eine höhere Expression als kernlose. Dies lässt sich durch die Hochregulierung erythroid-spezifischer Gene und eine anschließende abnehmende Transkriptions- und Translationsrate im Laufe der Differenzierung der Erythrozyten erklären.

Da das Hauptaugenmerk auf den Erythrozyten dieser Mauslinie lag, wurden die wichtigsten hämatologischen Parameter der Erythrozyten bestimmt. Untersucht wurden dabei hetero- und homozygote *R26-tdRFP-CMV* Mäuse (*RFP<sup>+/-</sup>* und *RFP<sup>+/+</sup>*) im Vergleich mit Geschwistertieren, die kein RFP exprimieren (*RFP<sup>-/-</sup>*). Bestimmt wurden die Anzahl der Erythrozyten, das MCV, der Hämatokrit und der Hämoglobinwert. Anhand dieser Werte wurden zudem die Erythrozytenindizes MCH und MCHC berechnet. Verglichen wurden die ermittelten Werte mit Normalwerten aus der Literatur. Hier zeigten sich große Abweichungen in den Normalwerten zwischen verschiedenen Referenzen. Es wurden daher mehrere Referenzbereiche betrachtet und zum Vergleich herangezogen. Mit Ausnahme des MCHC lagen alle Werte innerhalb der betrachteten Referenzbereiche. Die Variabilität von Laborwerten ist allgemein abhängig von den verwendeten Laborinstrumenten, deren

Analysemethode, der Art der Blutentnahme, der Mauslinie sowie Alter und Geschlecht der Mäuse (O'Connell et al., 2015). Für verschiedene Mauslinien finden sich daher in der Literatur auch verschiedene Normalwerte, ausgewählt wurden Referenzen für Labormäuse allgemein (Bolliger and Everds, 2012; Danneman et al., 2000) und spezifisch für die Wildtypmauslinie C57BL/6 (Santos et al., 2016). Die beiden verpaarten Mauslinien besitzen beide einen C57BL/6 Hintergrund. Die CMV-Cre Mauslinie besitzt zusätzlich noch den genetischen Hintergrund einer CBA-Maus, die *R26-tdRF* Maus eine BALB/c Hintergrund. Dementsprechend stellt die neu generierte *R26-tdRFP-CMV* Maus eine genetische Mischung aller drei Mauslinien dar, was die Anwendung eines geeigneten Referenzbereiches zum Vergleich der Erythrozytenparameter erschwert. Da sich für den MCHC in der Literatur auch Normalwerte bis 38 g/dl für Labormäuse finden (O'Connell et al., 2015), worunter das gemessene Maximum des MCHC-Werte der RFP Mäuse fällt, spiegelt dieser Wert vermutlich eine natürliche Varianz wieder. Um die Anzahl an Tieren zu verringern, die für diese Studie benötigt wurden, wurden zudem weibliche und männliche Mäuse untersucht. Da sich geschlechtsspezifische Unterschiede in den Normalwerten finden, können sich auch hieraus Abweichungen von den Referenzwerten ergeben.

Zwischen den drei Maustypen der *R26-tdRFP-CMV* Linie fanden sich für die bestimmten Parameter allerdings kaum Abweichungen untereinander. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Expression des RFP keinen Einfluss auf die hämatologischen Parameter nimmt.

Die Mäuse der *R26-tdRFP-CMV* Linie wurden sowohl genetisch mittels PCR als auch durchflusszytometrisch auf die Expression des RFPs untersucht. Hier zeigten sich teilweise Diskrepanzen zwischen Genotyp und Phänotyp der Mäuse. Wie erwartet zeigten  $RFP^{-/-}$  Mäuse keinerlei detektierbare RFP-Fluoreszenz in den Erythrozyten und bei  $RFP^{+/+}$  Mäusen fanden sich zu 100% rot fluoreszierende Erythrozyten. Für heterozygote Mäuse zeigte sich allerdings ein sehr heterogenes Bild: es fanden sich sowohl Mäuse mit keinerlei RFP-Expression als auch Mäuse mit 60 - 100% RFP-positiven Erythrozyten. Ursächlich für die unterschiedlichen Expressionslevel heterozygoter Mäuse könnte ein für den *ROSA26* Locus beschriebener Mosaikeffekt sein (Nyabi et al., 2009). In einer publizierten Studie, die ebenfalls die Kreuzung der Mauslinien *R26-tdRFP* und *CMV-Cre* beschreibt, wurde keine RFP Fluoreszenz in Erythrozyten entdeckt (Luche et al., 2007). Allerdings wurden in dieser Studie nur heterozygote Mäuse untersucht, die zudem mehrfach rückgekreuzt wurden auf die Wildtyp Mauslinie C57BL/6. Es lässt sich also schlussfolgern, dass für eine erfolgreiche und stabile Expression des *tdRFPs* in Erythrozyten, die Generierung homozygoter Mäuse notwendig ist.

Zur Untersuchung der Morphologie der RFP-exprimierenden Erythrozyten wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen gemacht. Die Expression des RFPs in Erythrozyten zeigte eine ausreichende Fluoreszenzstärke für diese Untersuchung. Anhand von 3D-Rekonstruktionen konfokaler Aufnahmen konnte zudem eine überwiegende Diskozytenform der RFP<sup>+/+</sup> Erythrozyten festgestellt werden.

Als weitere Untersuchung wurden Wildtyp und RFP-Erythrozyten vor und nach Beladung mit dem Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fluo-4 durchflusszytometrisch gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass beide Zelltypen (RFP<sup>+/+</sup> und RFP<sup>-/-</sup>) auch in einer Mischpopulation eindeutig voneinander zu unterscheiden sind. Ebenfalls gibt es keine spektrale Überlappung der Fluoreszenzspektren in Kombination mit Fluo-4, weshalb sich auch nach Beladung mit dem Farbstoff noch zwei eindeutig getrennte Populationen definieren lassen.

Da die *R26-tdRFP-CMV* Maus als Basis für zukünftige Transfusionsversuche eingesetzt werden sollte, wurde die Überlebenszeit RFP-positiver Zellen nach Transfusion untersucht. Dazu wurde Blut einer RFP<sup>+/+</sup> Maus in eine Wildtyp Maus injiziert und die Anzahl der RFP-Erythrozyten für die Dauer eines Monats bestimmt. Im Vergleich dazu wurde die Überlebensrate PKH67-gefärbter Erythrozyten untersucht, die derselben Wildtyp Maus injiziert wurden. Für beide Markierungsmethoden wurde eine fast identische mittlere Überlebensdauer von etwa 18 Tagen nach Transfusion gefunden. Auch in der Literatur wird für biotinylierte Erythrozyten eine ähnliche mittlere Überlebensdauer von etwa 20 Tagen nach Transfusion angegeben (Dholakia et al., 2015). Die durchschnittliche Lebensdauer muriner Erythrozyten verschiedener Mauslinien wird mit 38 - 42 Tagen angegeben (Horký et al., 1978). Die gefundene Lebensdauer der transfundierten RFP- und PKH-Erythrozyten entspricht daher den physiologischen Werten. Es findet ebenfalls kein vermehrter Abbau der markierten Erythrozyten statt. Seneszente Wildtyp Erythrozyten werden mit einer Rate von 0,6-1,2% pro Tag aus dem Blutstrom aussortiert und abgebaut (Horký et al., 1978), wobei zusätzlich noch bis zu 2% der Zellen unabhängig vom Alter willkürlich aussortiert werden (Mairbäurl, 2018). Im Vergleich zur durchgeführten Biotin-Markierung von Erythrozyten findet bei PKH-Färbung sowie RFP-Expression jedoch kein Verlust der Fluoreszenzintensität mit der Zeit statt. Sowohl PKH-als auch RFP-positive Zellen lassen sich auch einen Monat nach Transfusion noch eindeutig von negativen Zellen unterscheiden und sind daher besser geeignet zur Markierung von Erythrozyten. Die PKH-Färbung kann allerdings nur *in vitro* durchgeführt werden und ist mit mehreren Zentrifugations- und Waschschritten verbunden. Diese Methode stellt daher die größere Manipulation der Zellen dar, weshalb eine endogene Markierung der Erythrozyten durch Expression eines Fluoreszenzproteins zu bevorzugen ist. Für PKH26 wurde zudem ein Transfer des Farbstoffs von gefärbten Zelldebris *in vitro* auf ungefärbte Zellen in Kokultur, als auch *in vivo* auf Zellen in verschiedenen Organe wie Leber

und Milz des transfundierten Wirtes beobachtet (Li et al., 2013). Dieser Transfer tritt vermutlich durch Phagozytose des markierten Zelldebris auf, ein Prozess zu dem Erythrozyten nicht fähig sind, und sollte daher keinen Einfluss auf die durchgeführten Experimente haben.

Die durchgeführten konfokalmikroskopischen und durchflusszytometrischen Messungen zeigen, dass die generierte *R26-tdRFP-CMV* Mauslinie für die geplanten Transfusionsversuche geeignet ist, da die Expression des RFPs stark genug ist für morphologische Untersuchungen und sich das Fluoreszenzprotein spektral gut vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator Fluo-4 trennen lässt.

Die Mauslinie kann ebenfalls zur Untersuchung des Alterungsmechanismus von Erythrozyten eingesetzt werden. Retikulozyten und sehr junge Erythrozyten können über den Transferrinrezeptor (CD71) erkannt und sortiert werden. Eine vergleichbare Möglichkeit zur Bestimmung des Alters einzelner Zellen für anderen Stadien des Erythrozytenlebens gibt es jedoch nicht. Die Methode des Aufreinigens unterschiedlich alter Erythrozyten anhand ihrer verschiedenen Dichten ist durch das Phänomen der Dichte-Umkehrung alter Erythrozyten nicht verlässlich (Lew and Tiffert, 2013). Durch die Markierung von Erythrozyten oder besser Retikulozyten und anschließender Transfusion kann das Alter der Zellen bestimmt und können Veränderungen im Laufe des Erythrozytenlebens beobachtet werden.

Weitere Anwendungsbeispiele der *R26-tdRFP-CMV* Maus wie die *in vivo*-Bildgebung der  $\text{RFP}^{+/+}$  Erythrozyten im Blutstrom zur Untersuchung von Fließeigenschaften finden sich in (Hertz et al., 2019).

#### 4.4 Transfusionsversuche am Modell der TRPC6<sup>-/-</sup> Maus

Zur Untersuchung eines möglichen Membran- und/oder Proteinaustauschs zwischen Erythrozyten untereinander und/oder anderen Blutzellen wurden verschiedene Transfusionsversuche durchgeführt. Hierbei wurde sich erneut das Mausmodell der TRPC6<sup>-/-</sup> Maus zu Nutze gemacht. Erythrozyten dieser Mauslinie zeigen nur eine schwache Reaktion auf die Stimulation mit LPA, da ihnen der an diesem Signalweg beteiligte Ca<sup>2+</sup>-Kanal TRPC6 in der Membran fehlt. Bei einem möglichen Austausch von Proteinen oder Membranabschnitten, würde es auch zu einem Austausch von TRPC6 zwischen den Zellen kommen und die TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten würden mit einem stärkeren Ca<sup>2+</sup>-Signal auf das LPA reagieren (siehe auch Kapitel 1.9). Um diese These zu untersuchen, wurden Erythrozyten der Knockout-Mauslinie in Wildtyp Mäuse transfundiert und der LPA-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Zellen über die Dauer von zwei Wochen nach Transfusion beobachtet. Voraussetzung für diese Messungen war eine geeignete Markierung der TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten, um sie nach der Transfusion auf Dauer wieder zu erkennen. Es wurden verschiedene Ansätze zur Zellmarkierung mit anschließender Transfusion durchgeführt.

Zur Durchführung der ersten Transfusionsversuchsreihe wurde der Membranfarbstoff PKH eingesetzt. Für die transfundierten TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten konnte ein Anstieg des LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms festgestellt werden. Sieben Tage nach Transfusion erreicht dieser Anstieg ein Plateau und unterscheidet sich nicht mehr signifikant vom Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in Wildtyp Erythrozyten (Vergleich Abbildung 44). Es kann also geschlussfolgert werden, dass es zu einer Rettung des Phänotyps der TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten kommt. Diese Rettung kann nur durch den Austausch von Membranproteinen, in diesem Falle des Kanals TRPC6 erfolgen, zwischen Erythrozyten untereinander oder mit anderen Blut- oder Endothelzellen. Eine mögliche Fehlerquelle in der Interpretation dieser Ergebnisse stellt die Markierung der Erythrozyten dar. Sollte diese nicht stabil sein und auf andere Erythrozyten (der WT Maus) übergehen können, würde das ein vergleichbares Ergebnis in Bezug auf den LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom liefern. Da für den PKH26 Farbstoff genau dieses Phänomen bereits *in vitro* sowie *in vivo* beschrieben wurde (Li et al., 2013), wurde zur Überprüfung die Transfusion erneut mittels RFP<sup>+/+</sup> exprimierender TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten durchgeführt. Hier zeigte sich ein annähernd identisches Ergebnis zur vorherigen Transfusionsversuchsreihe: der LPA-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in den transfundierten TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten zeigt einen Anstieg und erreicht das Niveau von WT Zellen ohne statistisch signifikanten Unterschied (Vergleich Abbildung 45). Der zeitliche Verlauf weicht jedoch vom vorherigen ab, da das Plateau erst 12 Tage nach Transfusion erreicht wird. Dieses Ergebnis bestätigt erneut die aufgestellte Hypothese, dass es zu einem Austausch von Membranproteinen kommt, der für die Rettung des TRPC6<sup>-/-</sup> Phänotyp in Erythrozyten verantwortlich ist.

Erythrozyten kommen vor allem in der Milz in engen Kontakt mit anderen Zellen, insbesondere Makrophagen. Die Blutflussgeschwindigkeit in der Milz ist stark verringert im Vergleich zum restlichen Blutkreislauf, weshalb der lokale Hämatokrit in der Milz etwa zweifach erhöht ist (MacDonald et al., 1991). Das Herabsetzen der Flussgeschwindigkeit wird vermutlich auch über Interaktion von Oberflächenmolekülen zwischen Erythrozyten und Zellen der Milz vermittelt und ist nicht nur Resultat des verringerten Gefäßdurchmessers (MacDonald et al., 1991). Die Milz bietet daher gute Voraussetzungen als Ort, an dem es zum Austausch von Membranproteinen kommen kann. Um diese Hypothese zu untersuchen wurde erneut eine Transfusionsversuchsreihe durchgeführt, bei der die RFP-exprimierenden TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten in zuvor splenektomierte Wildtyp Mäuse injiziert wurden. Der Effekt der Rettung des TRPC6<sup>-/-</sup> Phänotyps im Bezug auf den LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom konnte auch nach der Entfernung der Milz beobachtet werden (Vergleich Abbildung 46). Das maximale Ca<sup>2+</sup>-Signal erreicht jedoch erst 14 Tage nach Durchführung der Transfusion das Level der Wildtyp Mäuse.

Vor Durchführung der Transfusionsversuche wurde in den TRPC6<sup>-/-</sup> Mäusen durch mehrfache Blutungen eine Retikulozytose induziert (Vergleich Kapitel 2.6.1). Durch diese Methode kann die Anzahl an Retikulozyten im Blutstrom auf über 30% gesteigert werden (Joiner et al., 1995). Eine zunächst durchgeführte Transfusionsreihe ohne vorherige Retikulozytose brachte keine schlüssigen Ergebnisse (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Es kann daher vermutet werden, dass besonders Retikulozyten die Fähigkeit haben Membranproteine auszutauschen. Für den *in vitro* Transfer von Bande 3 Proteinen von Modellmembranen auf Erythrozyten wurde eine Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der Empfängermembran beschrieben: Cholesterol in der Membran erhöht den Transfer von Bande 3 Protein, bei Vorhandensein von anionischen Phospholipiden findet ein reduzierter Transfer statt (Waters et al., 1996). Die Membran von Retikulozyten besitzt etwa 20% mehr Cholesterol als die eines ausgereiften Erythrozyten (Liu et al., 2010), da es während der Differenzierung zu einem selektiven Verlust von Cholesterol kommt (Minetti et al., 2018). Durch den höheren Cholesterolanteil in der Membran lässt sich die Retikulozytose als Voraussetzung zur Visualisierung des Phänomens des Membranproteinaustausches anhand des Modells des LPA-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstroms erklären. Ebenso kann geschlussfolgert werden, dass durch die induzierte Retikulozytose das Phänomen des Proteinaustauschs vermutlich verstärkt wird, da unter physiologischen Bedingungen der Retikulozytenanteil im Blutstrom lediglich rund 1% beträgt (Faller and Schünke, 2016).

Zur Durchführung einer Maus-basierten Statistik, die im Vergleich zur Zell-basierten Statistik eine höhere Aussagekraft hat, wurden alle durchgeführten Transfusionsreihen

zusammengefasst. Da alle Transfusionsversuche unabhängig von Markierungsart der Erythrozyten und Durchführung der Splenektomie dasselbe Ergebnis lieferten, war diese Zusammenfassung möglich. Dazu wurde eine Normierung der einzelnen Mäuse auf die Wildtyp Maus der zugehörigen Transfusionsrunde durchgeführt. Auch in der Maus-basierten Statistik lässt sich ein signifikanter Anstieg des LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten von vor der Transfusion bis Tag 10 nach Transfusion feststellen. Danach erreicht das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal erneut das Level der Wildtyp Mäuse (Vergleich Abbildung 47).

Für dieses Ergebnis kann es mehrere Gründe geben. Zum einen wäre es möglich, dass der Austausch von Membranproteinen nicht in der Milz stattfindet. Die spezialisierten Makrophagen, die an der Erkennung und Aussortierung von Erythrozyten beteiligt sind, finden sich nicht ausschließlich in der Milz, sondern kommen auch in der Leber und im Knochenmark vor. Nach einer Splenektomie kommt es unter physiologischen Bedingungen nicht zu einer Verlängerung der Lebensdauer der Erythrozyten, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass Leber und Knochenmark den Ausfall der Milz kompensieren können (Knutson and Wessling-Resnick, 2008). Da es dabei ebenfalls zu einer Interaktion von Makrophagen mit Erythrozyten kommt, könnte auch in diesen Organen ein Austausch von Oberflächenproteinen stattfinden. Zusätzlich kann das Vorhandensein von Nebenmilzen in Betracht gezogen werden. Bei Menschen treten diese etwa 1 cm großen Organe mit einer Häufigkeit von 10-30% auf und können bei einer Splenektomie leicht übersehen werden (Varga et al., 2018). Auch bei Mäusen ist das Auftreten von Nebenmilzen bekannt (Krinke, 2004). Da sie sich funktionell und strukturell nicht von der normalen Milz unterscheidet, kann es durch eine Hyperplasie der Nebenmilz nach Splenektomie zu einer vollständigen Wiederherstellung ihrer Funktion kommen (Radu et al., 2014).

Auch ist das Modell des LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms, anhand dessen das Phänomen des Membranproteinaustauschs untersucht wurde, stark limitierend. Erythrozyten zeigen eine sehr heterogene Reaktion auf die Stimulation mit LPA, sowohl in der Stärke des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals als auch in der Reaktionszeit (Wang, 2013). Nach durchgeführter Splenektomie könnte es zu einer zeitlichen Verzögerung im Austausch von Membranproteinen kommen, da in den Transfusionsversuchen nach Splenektomie die TRPC6<sup>-/-</sup> Erythrozyten erst nach 14 Tagen das Signifikanzniveau des Wildtypen erreichen, ohne Splenektomie wurde dieses Niveau bereits nach kürzerer Zeit erreicht. Durch die Heterogenität des Modellversuchs könnte dies verschleiert werden. Dafür spricht ebenfalls der zunächst beobachtete Abfall des LPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms an Tag 3 nach Transfusion in splenektomierte Wildtypmäuse. Generell kann dies erklärt werden, durch die erhöhte Anzahl an Retikulozyten in der Population der transfundierten Zellen. Das dieser Abfall im  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ohne

Splenektomie nicht zu erkennen ist, könnte auf einen schnelleren Austausch der Membranproteine bei Vorhandensein der Milz hindeuten.

Für Leukozyten ist das Phänomen des interzellulären Austauschs von Zelloberflächenproteinen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits beobachtet worden und wird als Trogozytose bezeichnet (Ahmed et al., 2008). Wichtig scheint dieser Prozess insbesondere bei der Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen zu sein und kann hier bei der Regulation der Immunantwort mitwirken (Davis, 2007). Der genaue Mechanismus, über den der Austausch von Proteinen im Rahmen der Trogozytose stattfindet ist noch nicht aufgeklärt. Hinweise gibt es auf folgende Szenarien (Ahmed et al., 2008): (1) Nach T-Zell Rezeptor-vermittelter Interaktion kommt es zur Endozytose von Membranfragmenten und anschließendem *Recycling* und Präsentation der aufgenommenen Moleküle auf der Zelloberfläche. (2) Nach T-Zell Rezeptor-vermittelter Interaktion kommt es zum spontanen Aufbrechen des Zellkontaktes, wodurch Molekülkomplexe transferiert werden können. (3) Der Austausch von Membranproteinen erfolgt über die Sekretion und Aufnahme spezialisierter Vesikel wie Exosomen. (4) Ein Transfer der Proteine erfolgt durch Ausbildung von Membranschläuchen (*Nanotubes*) zwischen zwei Zellen.

Auch für Erythrozyten ist eine Rezeptor-vermittelte Interaktion, die zum Austausch von Proteinen führt, denkbar. Insbesondere auf Makrophagen gibt es verschiedene Rezeptoren, die an Oberflächenproteine von Erythrozyten binden. Dazu zählen Stabilin-2, Tim-4, SIRP $\alpha$ , TAM-Rezeptoren, CR3 und Fc Rezeptoren (de Back et al., 2014). Ausgeschlossen werden kann eine Endozytose mit einem anschließenden Recycling der Oberflächenmoleküle, da dieser Prozess in Erythrozyten nicht stattfindet. Ein Austausch durch spontanes Aufbrechen des Zellkontaktes scheint hier also naheliegend. Bei seneszenten Erythrozyten kommt die Interaktion mit Makrophagen vermutlich über eine höhere Anzahl an Rezeptoren zustande als bei Retikulozyten, da sie auf der Oberfläche auch mehr Erkennungsmoleküle tragen. Dadurch bedingt könnte die Wahrscheinlichkeit eines Aufbrechens des Zellkontaktes und Austauschs von Membranproteinen bei Retikulozyten erhöht sein.

Für den *in vitro* beobachteten Transfer von Bande 3 Proteinen zwischen Liposomen und Erythrozyten wird vermutet, dass der Austausch über eine kurzfristige Verschmelzung der beiden äußeren Membranblätter stattfindet (Huestis and Newton, 1986). Die Ausbildung von Membranschläuchen, als möglicher Mechanismus bei der Trogozytose beschrieben, konnte ebenfalls *in vitro* bei Erythrozyten sowohl konfokalmikroskopisch als auch mittels SICM beobachtet werden (eigene Daten, nicht gezeigt) und könnte daher ebenfalls ein



Mechanismus sein, über den es zum Proteinaustausch zwischen Erythrozyten und anderen Zellen kommt.

In adulten Erythrozyten sind Translation und Transkription aufgrund fehlender intrazellulärer Organellen zum Stillstand gekommen. Neue Proteine können daher nicht synthetisiert werden und müssen ihre Funktion über die gesamte Lebenszeit des Erythrozyten (50 Tage für murinen Zellen – 120 Tage für humane Zellen) aufrechterhalten können. Da die Hauptaufgabe des Erythrozyten der Sauerstofftransport ist und das dafür benötigte Hämoglobin in einer sehr hohen Anzahl in den Zellen vorkommt (ca. 30% der Masse des Erythrozyten), scheint dies auch plausibel. Da viele Proteine aber auch eine kürzere Halbwertszeit von Stunden bis wenige Tagen haben, könnte das Phänomen des Proteinaustauschs zwischen Erythrozyten und anderen Blutzellen einen Beitrag zur Aufrechterhaltung des zellulären Proteoms leisten. Welche Bedingungen und welcher Mechanismus diesem Austausch zugrunde liegen, ist allerdings noch völlig offen und bedarf weiterer Untersuchungen. Ebenfalls stellt sich die Frage, ob das beobachtete Phänomen auch bei humanen Erythrozyten auftritt. Indizien, die dafürsprechen, liefert jedoch die fehlende Expression des TRPC6 Kanals in humanen Retikulozyten, bei gleichzeitig funktionellem Nachweis des Kanals in der Membran von Erythrozyten.

Bluttransfusionen zur Behandlung von akutem Blutverlust oder als Therapie bei Anämie Patienten werden heutzutage standardmäßig durchgeführt. Damit verbunden sind jedoch auch einige Probleme: So ist zum einen der Bedarf an benötigten Blutkonserven in vielen Ländern nicht gedeckt. Zudem kommt es bei Patienten, die häufige Bluttransfusionen erhalten, zu einer Alloimmunisierung (Shah et al., 2014). Sie entwickeln Antikörper gegen die transfundierten Erythrozyten, wodurch transfusionsbedingte hämolytische Krisen entstehen können (Alkindi et al., 2010). Das Risiko zur Entwicklung einer Alloimmunisierung steigt dabei mit jeder durchgeführten Transfusion (Rosse et al., 1990). Auf dem Gebiet der Transfusionsmedizin wird daher derzeit intensiv an einer personalisierten Transfusionsmöglichkeit geforscht. Dabei werden *ex vivo* in speziellen Kultursystemen rote Blutzellen generiert. Diese *in vitro* Erythropoese geht meist von hämatopoetischen Stammzellen aus, die sich zu einem geringen Prozentsatz auch im peripheren Blut befinden (van den Akker et al., 2010). Bei der Entwicklung einer personalisierten Therapie wird daher dem Patienten zunächst Blut abgenommen, die darin enthaltenen Stammzellen expandiert und ausdifferenziert. Die so gewonnenen Blutzellen besitzen ein zum Patienten identisches Blutgruppenprofil und können ohne das Risiko einer Alloimmunisierung zurücktransfundiert werden. Zur Therapie von hereditären hämolytischen Erkrankungen besteht hierdurch auch die Möglichkeit einer genetischen Manipulation der Zellen in einem Vorläuferstadium, sodass ein vorliegender Gendefekt in ausdifferenzierten Erythrozyten aufgehoben werden kann.

Zwei große Probleme müssen in der Entwicklung dieser Therapiemöglichkeit jedoch noch bewältigt werden (Ovchynnikova et al., 2018): (1) Derzeit existierende Kultursysteme können rote Blutzellen noch nicht in einer ausreichenden Anzahl generieren. (2) Die *in vitro* generierten Zellen differenzieren sich nicht endgültig zu einem Erythrozyten, sondern erreichen nur das Stadium eines Retikulozyten. Damit verbunden ist auch eine verkürzte Lebenszeit nach Transfusion, die mit einer mittleren Überlebensdauer von 26 Tagen angegeben wird (Giarratana et al., 2011).

Falls ein Proteinaustausch ebenfalls bei humanen Erythrozyten stattfindet und dieser wie vermutet bei Retikulozyten verstärkt auftritt, kann man sich das Problem der *ex vivo* generierten Retikulozyten zu Nutze machen. Als personalisierte Therapie einer hereditären hämolytischen Erkrankung auf Basis der *in vitro* Erythropoese, können Erythroblasten genetisch so verändert werden, dass sie das mutierte Protein, das ursächlich für die Anämie ist, als funktionsfähige, unmutierte Variante überexprimieren. Die differenzierten Retikulozyten, die dadurch ebenfalls vermehrt dieses Protein besitzen, werden dem Patient als Bluttransfusion gegeben. Kommt es nun zu einem Austausch des überexprimierten Proteins zwischen den „defekten“ Erythrozyten und den Retikulozyten, kann es eventuell zu einer Rettung des Phänotyps der defizienten Erythrozyten kommen. Voraussetzung hierfür wäre, dass auch ein Proteinaustausch von Retikulozyten auf Erythrozyten stattfindet. Da sich im Blut eines anämischen Patienten meist erhöhte Retikulozytenzahlen finden (Koralkova et al., 2014; Narla and Mohandas, 2017), könnte auch ein Austausch zwischen Retikulozyten erfolgen.

Eine kurative Behandlung der hämolytischen Erkrankungen ist dadurch nicht möglich, da diese nur durch eine Stammzelltransplantation gegeben ist. Jedoch kann durch diese personalisierte Therapie der Bedarf an Transfusionen vermutlich reduziert werden, da die Lebensdauer, der im Körper produzierten Erythrozyten durch den Proteinaustausch verlängert sein sollte.

#### 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Daten des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts in Erythrozyten von Anämie Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, zusammen mit weiteren Daten aus der Literatur geben starke Hinweise darauf, dass eine Überladung mit Calcium zu einem verfrühten Abbau der Erythrozyten beiträgt und eine generelle Komponente in der Entstehung von Anämien ist. Teilweise ist der Eintrittsweg des Calciums in die Zelle bereits bekannt, für die meisten Erkrankungen bedarf dieser jedoch weiterer Untersuchungen. Die Entwicklung neuer Medikamente dürfte vom Verständnis dieser molekularen Zusammenhänge profitieren (Hertz et al., 2017).

Der untersuchte LPA Signalweg steht in engem Zusammenhang mit der Hypothese, dass Erythrozyten eine aktive Rolle bei der Blutgerinnung übernehmen (Byrnes and Wolberg, 2017). Zur therapeutischen Behandlung von pathologisch auftretenden Thrombosen ist das Verständnis der zellulären Abläufe dieses Signalweges daher eine Voraussetzung. Die offenen Fragen zur Aktivierung des TRPC6 Kanals und der PKC $\alpha$  konnten in dieser Arbeit beantwortet werden. Die Beteiligung eines mechanosensitiven Kanals am Signalweg konnte ebenfalls gezeigt werden, um welchen Kanal es sich handelt, muss jedoch noch weiter untersucht werden.

Die durchgeführten Transfusionsversuche anhand des Modellsystems der TRPC6<sup>-/-</sup> Maus zeigen, dass es zu einem Austausch des Kanals zwischen murinen Retikulozyten und anderen Blutzellen kommt. Unter welchen Bedingungen dieser Austausch stattfindet, und ob er sich auch bei humanen Zellen findet, muss weiter untersucht werden. Welche Rolle dieser Prozess in der Physiologie der Erythrozyten übernimmt bedarf ebenso weiterer Forschung.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen die Bedeutung des intrazellulären Calciums als Signalmolekül in der Physiologie und Pathophysiologie von Erythrozyten.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abramowitz, J., and Birnbaumer, L. (2009). Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *FASEB J* 23, 297–328. doi:10.1096/fj.08-119495.
- Ademoglu, E., Tamer, S., Albeniz, I., Gokkusu, C., and Tanrikulu, S. (2004). Cyclosporin A-associated changes in red blood cell membrane composition, deformability, blood and plasma viscosity in rats. *Acta Haematol* 112, 184–188. doi:10.1159/000081269.
- Ahmed, K. A., Munegowda, M. A., Xie, Y., and Xiang, J. (2008). Intercellular trogocytosis plays an important role in modulation of immune responses. *Cell Mol Immunol* 5, 261–269. doi:10.1038/cmi.2008.32.
- Aiken, N. R., Galey, W. R., and Satterlee, J. D. (1995). A peroxidative model of human erythrocyte intracellular Ca<sup>2+</sup> changes with in vivo cell aging: measurement by 19F-NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1270, 52–57.
- Albuisson, J., Murthy, S. E., Bandell, M., Coste, B., Louis-dit-Picard, H. L. N., Mathur, J., et al. (2013). Dehydrated hereditary stomatocytosis linked to gain-of-function mutations in mechanically activated PIEZO1 ion channels. *Nat Comms* 4, 165–19. doi:10.1038/ncomms2899.
- Alkindi, S., Zadjali, Al, S., Madhani, Al, A., Daar, S., Haddabi, Al, H., Abri, Al, Q., et al. (2010). Alloimmunization in Patients with Sickle Cell Disease and Thalassemia: Experience of a Single Centre in Oman. *Hemoglobin* 34, 135–144. doi:10.3109/03630261003677213.
- Ambrus, L., Oláh, A., Oláh, T., Balla, G., Saleem, M. A., Orosz, P., et al. (2015). Inhibition of TRPC6 by protein kinase C isoforms in cultured human podocytes. *J Cel Mol Med* 19, 2771–2779. doi:10.1111/jcmm.12660.
- An, X., and Mohandas, N. (2008). Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol* 141, 367–375. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07091.x.
- Andolfo, I., Russo, R., Gambale, A., and Iolascon, A. (2016). New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. *Haematol* 101, 1284–1294. doi:10.3324/haematol.2016.142463.
- Andral, G. (1844). *Pathological hematology: an essay on the blood in disease*. Philadelphia: Lea and Blanchard.
- Andrews, D. A., Yang, L., and Low, P. S. (2002). Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells. *Blood* 100, 3392–3399. doi:10.1182/blood.V100.9.3392.
- Arashiki, N., Takakuwa, Y., Mohandas, N., Hale, J., Yoshida, K., Ogura, H., et al. (2016). ATP11C is a major flippase in human erythrocytes and its defect causes congenital hemolytic anemia. *Haematol* 101, 559–565. doi:10.3324/haematol.2016.142273.
- Archer, N. M., Shmukler, B. E., Andolfo, I., Vandorpe, D. H., Gnanasambandam, R., Higgins, J. M., et al. (2014). Hereditary xerocytosis revisited. *Am J Hematol* 89, 1142–1146. doi:10.1002/ajh.23799.

- Barcellini, W., Bianchi, P., Fermo, E., Imperiali, F. G., Marcello, A. P., Vercellati, C., et al. (2011). Hereditary red cell membrane defects: diagnostic and clinical aspects. *Blood Transfus* 9, 274–277. doi:10.2450/2011.0086-10.
- Beum, P. V., Mack, D. A., Pawluczkwycz, A. W., Lindorfer, M. A., and Taylor, R. P. (2008). Binding of rituximab, trastuzumab, cetuximab, or mAb T101 to cancer cells promotes trogocytosis mediated by THP-1 cells and monocytes. *J. Immunol.* 181, 8120–8132. doi:10.4049/jimmunol.181.11.8120.
- Beutler, E., and Gelbart, T. (2000). Estimating the prevalence of pyruvate kinase deficiency from the gene frequency in the general white population. *Blood* 95, 3585–3588.
- Bevers, E. M., and Williamson, P. L. (2010). Phospholipid scramblase: An update. *FEBS Letters* 584, 2724–2730. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.020.
- Blanc, B., Finch, C. A., Halberg, L., Herbert, V., Lawkowicz, W., Layrisse, M., et al. (1968). Nutritional anaemias: Report of a WHO scientific group. *WHO Tech Rep Ser*, 1–40.
- Bogdanova, A., Makhro, A., Seiler, E., Max Gass, A., Hegemann, I., Muller, R., et al. (2017). N-methyl D-glutamate receptor as a pharmacological target for treatment of sickle cell disease: effect of memantine on red cells of patients on a pilot clinical trial MemSID. *21th Meeting of the European Red Cell Society*.
- Bogdanova, A., Makhro, A., Wang, J., Lipp, P., and Kaestner, L. (2013). Calcium in red blood cells-a perilous balance. *Int J Mol Sci* 14, 9848–9872. doi:10.3390/ijms14059848.
- Bogusiewicz, A., Mock, N. I., and Mock, D. M. (2004a). Instability of the biotin-protein bond in human plasma. *Anal Biochem* 327, 156–161. doi:10.1016/j.ab.2004.01.011.
- Bogusiewicz, A., Mock, N. I., and Mock, D. M. (2004b). Release of biotin from biotinylated proteins occurs enzymatically and nonenzymatically in human plasma. *Anal Biochem* 331, 260–266. doi:10.1016/j.ab.2004.05.020.
- Bolliger, A. P., and Everds, N. (2012). “Hematology of the Mouse,” in *The Laboratory Mouse*, ed.H. J. Hedrich (London: Academic Press), 331–334.
- Bookchin, R. M., Ortiz, O. E., Shalev, O., Tsurei, S., Rachmilewitz, E. A., Hockaday, A., et al. (1988). Calcium transport and ultrastructure of red cells in beta-thalassemia intermedia. *Blood* 72, 1602–1607.
- Bouron, A., Kiselyov, K., and Oberwinkler, J. (2015). Permeation, regulation and control of expression of TRP channels by trace metal ions. *Pflugers Arch* 467, 1143–1164. doi:10.1007/s00424-014-1590-3.
- Bousquet, S. M., Monet, M., and Boulay, G. (2010). Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. *J Biol Chem* 285, 40534–40543. doi:10.1074/jbc.M110.160051.
- Bouyer, G., Cueff, A., Egée, S., Kmiecik, J., Maksimova, Y., Glogowska, E., et al. (2011). Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by Plasmodium falciparum. *Blood* 118, 2305–2312. doi:10.1182/blood-2011-01-329300.
- Brewer, G. J. (1974). “General Red Cell Metabolism,” in *The Red Blood Cell*, ed.D. Surgenor

- (New York: Academic Press), 387–433.
- Brugnara, C. (2003). Sick cell disease: from membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 25, 927–933.
- Burns, K. F., and De Lannoy, C. W. (1966). Compendium of normal blood values of laboratory animals, with indication of variations. *Toxicol Appl Pharmacol* 8, 429–437.
- Byrnes, J. R., and Wolberg, A. S. (2017). Red blood cells in thrombosis. *Blood* 130, 1795–1799. doi:10.1182/blood-2017-03-745349.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., et al. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7877–7882.
- Carafoli, E. (1992). The plasma membrane calcium pump. Structure, function, regulation. *Biochim Biophys Acta* 1101, 266–267.
- Chen, C.-C., Zhou, Y., and Baker, L. A. (2012). Scanning Ion Conductance Microscopy. *Annual Rev. Anal. Chem.* 5, 207–228. doi:10.1146/annurev-anchem-062011-143203.
- Chien, S. (1987). Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev Physiol* 49, 177–192.
- Christophersen, P., and Bennekou, P. (1991). Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 1065, 103–106.
- Chu, H., Puchulu-Campanella, E., Galan, J. A., Tao, W. A., Low, P. S., and Hoffman, J. F. (2012). Identification of cytoskeletal elements enclosing the ATP pools that fuel human red blood cell membrane cation pumps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12794–12799. doi:10.1073/pnas.1209014109/-/DCSupplemental.
- Chu, X., Tong, Q., Cheung, J. Y., Wozney, J., Conrad, K., Mazack, V., et al. (2004). Interaction of TRPC2 and TRPC6 in Erythropoietin Modulation of Calcium Influx. *J Biol Chem* 279, 10514–10522. doi:10.1074/jbc.M308478200.
- Chung, S.-M., Bae, O.-N., Lim, K.-M., Noh, J.-Y., Lee, M.-Y., Jung, Y.-S., et al. (2007). Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 414–421. doi:10.1161/01.ATV.0000252898.48084.6a.
- Cinar, E., Zhou, S., DeCoursey, J., Wang, Y., Waugh, R. E., and Wan, J. (2015). Piezo1 regulates mechanotransductive release of ATP from human RBCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 11783–11788. doi:10.1073/pnas.1507309112.
- Coetzer, T. L. (2016). “Erythrocyte Membrane Disorders,” in *Williams Hematology*, eds. K. Kaushansky, J. T. Prchal, O. W. Press, M. A. Lichtman, M. Levi, L. J. Burns, et al. (New York: McGraw-Hill Education), 661–688.
- Connor, J., Pak, C. C., and Schroit, A. J. (1994). Exposure of Phosphatidylserine in the Outer Leaflet of Human Red Blood Cells. *J Biol Chem* 269, 2399–2404.
- Cumano, A., and Godin, I. (2007). Ontogeny of the Hematopoietic System. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 745–785. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141538.

- Da Costa, L., Galimand, J., Fenneteau, O., and Mohandas, N. (2013). Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev* 27, 167–178. doi:10.1016/j.blre.2013.04.003.
- Da Costa, L., Mohandas, N., Soretto, M., Grange, M.-J., Tchernia, G., and Cynober, T. (2001). Temporal differences in membrane loss lead to distinct reticulocyte features in hereditary spherocytosis and in immune hemolytic anemia. *Blood* 98, 2894–2899.
- Daleke, D. L. (2008). Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol* 15, 191–195. doi:10.1097/MOH.0b013e3282f97af7.
- Danielczok, J. G., Terriac, E., Hertz, L., Petkova-Kirova, P., Lautenschläger, F., Laschke, M. W., et al. (2017). Red Blood Cell Passage of Small Capillaries Is Associated with Transient Ca<sup>2+</sup>-mediated Adaptations. *Front Physiol* 8, 1884–11. doi:10.3389/fphys.2017.00979.
- Danneman, P. J., Suckow, M. A., and Brayton, C. (2000). “Important biological features,” in *The Laboratory Mouse* (Boca Raton: Taylor & Francis), 1–20.
- Davis, D. M. (2007). Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nat Rev Immunol* 7, 238–243. doi:10.1038/nri2020.
- de Back, D. Z., Kostova, E. B., van Kraaij, M., van den Berg, T. K., and van Bruggen, R. (2014). Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front Physiol* 5, 9. doi:10.3389/fphys.2014.00009.
- de Back, D. Z., Vlaar, R., Beuger, B., Daal, B., Lagerberg, J., Vlaar, A. P. J., et al. (2018). A method for red blood cell biotinylation in a closed system. *Transfusion* 45, 659–9. doi:10.1111/trf.14535.
- Delaunay, J. (2002). Molecular basis of red cell membrane disorders. *Acta Haematol* 108, 210–218. doi:10.1159/000065657.
- Dholakia, U., Bandyopadhyay, S., Hod, E. A., and Prestia, K. A. (2015). Determination of RBC Survival in C57BL/6 and C57BL/6-Tg(UBC-GFP) Mice. *Comp Med* 65, 196–201.
- Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Gollasch, M., Gross, V., Storch, U., Dubrovskaja, G., et al. (2005). Increased Vascular Smooth Muscle Contractility in TRPC6<sup>-/-</sup> Mice. *Mol Cell Biol* 25, 6980–6989. doi:10.1128/MCB.25.16.6980-6989.2005.
- Dumez, H., Reinhart, W. H., Guetens, G., and de Bruijn, E. A. (2004). Human red blood cells: rheological aspects, uptake, and release of cytotoxic drugs. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41, 159–188. doi:10.1080/10408360490452031.
- Dyrda, A., Cytlak, U., Ciuraszkiewicz, A., Lipinska, A., Cuff, A., Bouyer, G., et al. (2010). Local membrane deformations activate Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> and anionic currents in intact human red blood cells. *PLoS one* 5, e9447–14. doi:10.1371/journal.pone.0009447.
- Dzierzak, E., and Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a011601. doi:10.1101/cshperspect.a011601.
- Eber, S., and Lux, S. E. (2004). Hereditary spherocytosis—defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Semin Hematol* 41, 118–141. doi:10.1053/j.seminhematol.2004.01.002.

- Ehrlich, P. (1880). Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie de verschiedenen Formen von Leukocyten. *Z Klin Med* 1, 553–560.
- Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I., and Moolenaar, W. H. (1993). The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 291, 677–680.
- Estacion, M., Sinkins, W. G., Jones, S. W., Applegate, M. A. B., and Schilling, W. P. (2006). Human TRPC6 expressed in HEK 293 cells forms non-selective cation channels with limited Ca<sup>2+</sup> permeability. *J Physiol* 572, 359–377. doi:10.1113/jphysiol.2005.103143.
- Faller, A., and Schünke, M. (2016). “Blut, Immunsystem und lymphatische Organe,” in *Der Körper des Menschen* (Stuttgart: Thieme), 302–349.
- Faucherre, A., Kissa, K., Nargeot, J., Mangoni, M. E., and Jopling, C. (2014). Piezo1 plays a role in erythrocyte volume homeostasis. *Haematol* 99, 70–75. doi:10.3324/haematol.2013.086090.
- Fermo, E., Bogdanova, A., Petkova-Kirova, P., Zaninoni, A., Marcello, A. P., Makhro, A., et al. (2017). “Gardos Channelopathy”: a variant of hereditary Stomatocytosis with complex molecular regulation. *Sci Rep* 7, 1–13. doi:10.1038/s41598-017-01591-w.
- Föller, M., Kasinathan, R. S., Koka, S., Lang, C., Shumilina, E., Birnbaumer, L., et al. (2008). TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 21, 183–192. doi:10.1159/000113760.
- Gallagher, P. G. (2013). Disorders of red cell volume regulation. *Curr Opin Hematol* 20, 201–207. doi:10.1097/MOH.0b013e32835f6870.
- Gardos, G. (1958). The function of calcium in the potassium permability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 30, 653–654.
- Gauthier, E., Guo, X., Mohandas, N., and An, X. (2011). Phosphorylation-dependent perturbations of the 4.1R-associated multiprotein complex of the erythrocyte membrane. *Biochem* 50, 4561–4567. doi:10.1021/bi200154g.
- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W.-N. U., Bishop-Stewart, J., Gray, D., and Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes. *Cell Calcium* 27, 97–106. doi:10.1054/ceca.1999.0095.
- George, A., Pushkaran, S., Li, L., An, X., Zheng, Y., Mohandas, N., et al. (2010). Altered phosphorylation of cytoskeleton proteins in sickle red blood cells: the role of protein kinase C, Rac GTPases, and reactive oxygen species. *Blood Cells Mol Dis* 45, 41–45. doi:10.1016/j.bcmd.2010.02.006.
- Giarratana, M.-C., Rouard, H., Dumont, A., Kiger, L., Safeukui, I., Le Pennec, P.-Y., et al. (2011). Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood* 118, 5071–5079. doi:10.1182/blood-2011-06-362038.
- Glogowska, E., Schneider, E. R., Maksimova, Y., Schulz, V. P., Lezon-Geyda, K., Wu, J., et al. (2017). Novel mechanisms of PIEZO1 dysfunction in hereditary xerocytosis. *Blood* 130, 1845–1856. doi:10.1182/blood-2017-05-786004.
- Gnanasambandam, R., Bae, C., Gottlieb, P. A., and Sachs, F. (2015). Ionic Selectivity and Permeation Properties of Human PIEZO1 Channels. *PloS one* 10, e0125503–16.



doi:10.1371/journal.pone.0125503.

- Govekar, R., and Zingde, S. (2001). Protein kinase C isoforms in human erythrocytes. *Ann Hematol* 80, 531–534. doi:10.1007/s002770100352.
- Grygorczyk, R., Schwarz, W., and Passow, H. (1984). Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human red cells. Comparison of single-channel currents with ion fluxes. *Biophys J* 45, 693–698.
- Haase, V. H. (2013). Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews* 27, 41–53. doi:10.1016/j.blre.2012.12.003.
- Hajdu, S. I. (2003). A Note from History: The Discovery of Blood Cells. *Ann Clin Lab Sci* 33, 237–238.
- Hallbach, J. (2006). "Elektrolyte und Osmolalität," in *Klinische Chemie für den Einstieg* (Stuttgart: Thieme), 226–237.
- Halwachs-Baumann, G. (2011). "Hämatologische Labordiagnostik," in *Labormedizin* (Wien: Springer), 207–270. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0203-9.
- Hansma, P. K., Drake, B., Marti, O., Gould, S. A. C., and Prater, C. B. (1989). The Scanning Ion-Conductance Microscope. *Science* 243, 641–643.
- Harper, M. T., and Poole, A. W. (2010). Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation. *J Thromb Haemost* 8, 454–462. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03722.x.
- Hänggi, P., Makhro, A., Gassmann, M., Schmutz, M., Goede, J. S., Speer, O., et al. (2014). Red blood cells of sickle cell disease patients exhibit abnormally high abundance of N-methyl D-aspartate receptors mediating excessive calcium uptake. *Br J Haematol* 167, 252–264. doi:10.1111/bjh.13028.
- Hertz, L., Huisjes, R., Llaudet-Planas, E., Petkova-Kirova, P., Makhro, A., Danielczok, J. G., et al. (2017). Is Increased Intracellular Calcium in Red Blood Cells a Common Component in the Molecular Mechanism Causing Anemia? *Front Physiol* 8, 1–7. doi:10.3389/fphys.2017.00673.
- Hertz, L., Ruppenthal, S., Simionato, G., Quint, S., Kihm, A., Abay, A., et al. (2019). The evolution of erythrocytes becoming red in respect to fluorescence. *Front Physiol*. doi:10.3389/fphys.2019.00753.
- Hirschler-Laszkiwicz, I., Tong, Q., Conrad, K., Zhang, W., Flint, W. W., Barber, A. J., et al. (2009). TRPC3 activation by erythropoietin is modulated by TRPC6. *J Biol Chem* 284, 4567–4581. doi:10.1074/jbc.M804734200.
- Hoffman, J. F., Joiner, W., Nehrke, K., Potapova, O., Foye, K., and Wickrema, A. (2003). The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7366–7371. doi:10.1073/pnas.1232342100.
- Hoffmann-Fezer, G., Maschke, H., Zeitler, H. J., Gais, P., Weger, H., Ellwart, J., et al. (1991). Direct in vivo biotinylation of erythrocytes as an assay for red cell survival studies. *Ann Hematol* 63, 214–217.
- Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G.

- (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259–263. doi:10.1038/16711.
- Horký, J., Vácha, J., and Znojil, V. (1978). Comparison of life span of erythrocytes in some inbred strains of mouse using <sup>14</sup>C-labelled glycine. *Physiol Bohemoslov* 27, 209–217.
- HoWangYin, K. Y., Alegre, E., Daouya, M., Favier, B., Carosella, E. D., and LeMaoult, J. (2010). Different functional outcomes of intercellular membrane transfers to monocytes and T cells. *Cell Mol Life Sci* 67, 1133–1145. doi:10.1007/s00018-009-0239-4.
- Huestis, W. H., and Newton, A. C. (1986). Intermembrane protein transfer. Band 3, the erythrocyte anion transporter, transfers in native orientation from human red blood cells into the bilayer of phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 261, 16274–16278.
- Huisjes, R., Makhro, A., Llaudet-Planas, E., Hertz, L., Petkova-Kirova, P., Verhagen, L. P., et al. (2019). Density, heterogeneity and deformability of red cells as markers of clinical severity in hereditary spherocytosis. *Haematol*, haematol.2018.188151–47. doi:10.3324/haematol.2018.188151.
- Ingram, V. M. (1958). Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by fingerprinting. *Biochim Biophys Acta* 28, 539–545.
- Iolascon, A., Andolfo, I., Barcellini, W., Corcione, F., Garçon, L., De Franceschi, L., et al. (2017). Recommendations regarding splenectomy in hereditary hemolytic anemias. *Haematol* 102, 1304–1313. doi:10.3324/haematol.2016.161166.
- Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X., and Chun, J. (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* 73, 321–354. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073731.
- Jacobasch, G., and Rapoport, S. M. (1996). Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies. *Mol Aspects Med* 17, 143–170.
- Jarret, H. W., and Kyte, J. (1979). Human erythrocyte calmodulin. *J Biol Chem* 254, 8237–8244.
- Jelkmann, W. (2010). “Blut,” in *Physiologie des Menschen*, eds. R. F. Schmidt, F. Lang, and M. Heckmann (Heidelberg: Springer).
- Joiner, C. H., Franco, R. S., Jiang, M., Franco, M. S., Barker, J. E., and Lux, S. E. (1995). Increased cation permeability in mutant mouse red blood cells with defective membrane skeletons. *Blood* 11, 4307–4314.
- Kaestner, L. (2011). Cation Channels in Erythrocytes - Historical and Future Perspective. *Open Biol J* 4, 27–34. doi:10.2174/1874196701104010027.
- Kaestner, L., and Egée, S. (2018). Commentary: Voltage Gating of Mechanosensitive PIEZO Channels. *Front Physiol* 9, 1–3. doi:10.3389/fphys.2018.01565.
- Kaestner, L., Christophersen, P., Bernhardt, I., and Bennekou, P. (2000). The non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane: reconciliation between two conflicting reports and further characterisation. *Bioelectrochemistry* 52, 117–125.
- Kaestner, L., Steffen, P., Nguyen, D. B., Wang, J., Wagner-Britz, L., Jung, A., et al. (2012).

- Lysophosphatidic acid induced red blood cell aggregation in vitro. *Bioelectrochemistry* 87, 89–95. doi:10.1016/j.bioelechem.2011.08.004.
- Kaestner, L., Tabellion, W., Weiss, E., Bernhardt, I., and Lipp, P. (2006). Calcium imaging of individual erythrocytes: problems and approaches. *Cell Calcium* 39, 13–19. doi:10.1016/j.ceca.2005.09.004.
- Kaestner, L., Wang, X., Hertz, L., and Bernhardt, I. (2018). Voltage-Activated Ion Channels in Non-excitable Cells—A Viewpoint Regarding Their Physiological Justification. *Front Physiol* 9, 1–5. doi:10.3389/fphys.2018.00450.
- Kaufman, H. W., Niles, J. K., Gallagher, D. R., Rivera, A., Alper, S. L., Brugnara, C., et al. (2017). Revised prevalence estimate of possible Hereditary Xerocytosis as derived from a large U.S. Laboratory database. *Am J Hematol* 93, 9–12. doi:10.1002/ajh.24923.
- Khandelwal, S., and Saxena, R. K. (2006). Assessment of survival of aging erythrocyte in circulation and attendant changes in size and CD147 expression by a novel two step biotinylation method. *Exp Gerontol* 41, 855–861. doi:10.1016/j.exger.2006.06.045.
- Kim, J. Y., and Saffen, D. (2005). Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *J Biol Chem* 280, 32035–32047. doi:10.1074/jbc.M500429200.
- Kim, Y., Park, J., and Kim, M. (2017). Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era. *Blood Res* 52, 84–11. doi:10.5045/br.2017.52.2.84.
- Kina, T., Ikuta, K., Takayama, E., Wada, K., Majumdar, A. S., Weissman, I. L., et al. (2000). The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Br J Haematol* 109, 280–287. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02037.x.
- Knutson, M., and Wessling-Resnick, M. (2008). Iron Metabolism in the Reticuloendothelial System. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38, 61–88. doi:10.1080/713609210.
- Kohne, E. (2011). Hemoglobinopathies. *DTsch Arztl Int* 108, 532–540. doi:10.3238/arztebl.2011.0532.
- Koralkova, P., van Solinge, W. W., and van Wijk, R. (2014). Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia - pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. *Int J Lab Hematol* 36, 388–397. doi:10.1111/ijlh.12223.
- Krinke, G. J. (2004). “Normative Histology of Organs,” in *The Laboratory Mouse*, ed.H. Hedrich (London: Elsevier Science), 133–166.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed., ed.J. R. Lakowicz (New York: Springer US).
- Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M., and Wesselborg, S. (2004). Clearance of Apoptotic Cells: Review Getting Rid of the Corpses. *Mol Cell* 14, 277–287.
- Lederer, S. E. (2008). “Reinventing Blood Transfusion in the Twentieth Century,” in *Flesh and Blood: Organ Transplantation and Blood Transfusion in 20th Century America* (New York: Oxford University Press), 32–67.
- Leopold, J. A., and Loscalzo, J. (2005). Oxidative enzymopathies and vascular disease.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1332–1340.  
doi:10.1161/01.ATV.0000163846.51473.09.
- Leuner, K., Kazanski, V., Mueller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., et al. (2007). Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J* 21, 4101–4111. doi:10.1096/fj.07-8110com.
- Lew, V. L., and Tiffert, T. (2013). The terminal density reversal phenomenon of aging human red blood cells. *Front Physiol* 4, 171–3. doi:10.3389/fphys.2013.00171.
- Lew, V. L., Daw, N., Perdomo, D., Etzion, Z., Bookchin, R. M., and Tiffert, T. (2003). Distribution of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump activity in normal human red blood cells. *Blood* 102, 4206–4213. doi:10.1182/blood-2003-06-1787.
- Li, H., Lu, L., Li, X., Buffet, P. A., Dao, M., Karniadakis, G. E., et al. (2018). Mechanics of diseased red blood cells in human spleen and consequences for hereditary blood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 9574–9579. doi:10.1073/pnas.1806501115/-/DCSupplemental.
- Li, P., Zhang, R., Sun, H., Chen, L., Liu, F., Yao, C., et al. (2013). PKH26 Can Transfer to Host Cells In Vitro and Vivo. *Stem Cells Dev* 22, 340–344. doi:10.1089/scd.2012.0357.
- Lim, G., Wortis, M., and Mukhopadhyay, R. (2008). “Red Blood Cell Shapes and Shape Transformations,” in *Soft Matter: Volume 4*. eds. G. Gompper and M. Schick (Weinheim: Wiley-VCH), 83–204. doi:10.1002/9783527623372.
- Lin, M.-J., Leung, G. P. H., Zhang, W.-M., Yang, X.-R., Yip, K.-P., Tse, C.-M., et al. (2004). Chronic Hypoxia–Induced Upregulation of Store-Operated and Receptor-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 95, 496–505. doi:10.1161/01.RES.0000138952.16382.ad.
- Liu, J., Guo, X., Mohandas, N., Chasis, J. A., and An, X. (2010). Membrane remodeling during reticulocyte maturation. *Blood* 115, 2021–2027. doi:10.1182/blood-2009-08-241182.
- Luche, H., Weber, O., Nageswara Rao, T., Blum, C., and Fehling, H. J. (2007). Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in “knock-in” Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur. J. Immunol.* 37, 43–53. doi:10.1002/eji.200636745.
- Lutz, H. U., and Bogdanova, A. (2013). Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Front Physiol* 4, 387. doi:10.3389/fphys.2013.00387.
- Lux, S. E. (2016). Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood* 127, 187–199. doi:10.1182/blood-2014-12-512772.
- MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., and Groom, A. C. (1991). The high splenic hematocrit: a rheological consequence of red cell flow through the reticular meshwork. *Microvasc. Res.* 42, 60–76.
- Magnani, M., Piatti, E., Serafini, N., Palma, F., Dachà, M., and Fornaini, G. (1983). The age-dependent metabolic decline of the red blood cell. *Mech Ageing Dev* 22, 295–308. doi:https://doi.org/10.1016/0047-6374(83)90084-2.
- Maher, A. D., and Kuchel, P. W. (2003). The Gárdos channel: a review of the Ca<sup>2+</sup>-activated

- K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1182–1197. doi:10.1016/S1357-2725(02)00310-2.
- Maier, T., Follmann, M., Hessler, G., Kleemann, H.-W., Hachtel, S., Fuchs, B., et al. (2015). Discovery and pharmacological characterization of a novel potent inhibitor of diacylglycerol-sensitive TRPC cation channels. *Br J Pharmacol* 172, 3650–3660. doi:10.1111/bph.13151.
- Mairböurl, H. (2018). Neocytolysis: How to Get Rid of the Extra Erythrocytes Formed by Stress Erythropoiesis Upon Descent From High Altitude. *Front Physiol* 9, 345–7. doi:10.3389/fphys.2018.00345.
- Makhro, A., Hänggi, P., Goede, J. S., Wang, J., Brüggemann, A., Gassmann, M., et al. (2013). N-methyl-D-aspartate receptors in human erythroid precursor cells and in circulating red blood cells contribute to the intracellular calcium regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 305, C1123–38. doi:10.1152/ajpcell.00031.2013.
- Makhro, A., Huisjes, R., Verhagen, L. P., Mañú-Pereira, M. D. M., Llaudet-Planas, E., Petkova-Kirova, P., et al. (2016). Red Cell Properties after Different Modes of Blood Transportation. *Front Physiol* 7, 183–21. doi:10.3389/fphys.2016.00288.
- Makhro, A., Wang, J., Vogel, J., Boldyrev, A. A., Gassmann, M., Kaestner, L., et al. (2010). Functional NMDA receptors in rat erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C1315–C1325. doi:10.1152/ajpcell.00407.2009.
- Manno, S., Takakuwa, Y., and Mohandas, N. (2002). Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1943–1948.
- McLean, E., Cogswell, M., Egli, I., Wojdyla, D., and de Benoist, B. (2009). Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993–2005. *Public Health Nutr* 12, 444–454. doi:10.1017/S1368980008002401.
- Mebius, R. E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5, 606–616. doi:10.1038/nri1669.
- Mikoshiba, K. (2015). Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases. *Adv Biol Regul* 57, 217–227. doi:10.1016/j.jbior.2014.10.001.
- Minetti, G., Achilli, C., Perotti, C., and Ciana, A. (2018). Continuous Change in Membrane and Membrane-Skeleton Organization During Development From Proerythroblast to Senescent Red Blood Cell. *Front Physiol* 9, 286–10. doi:10.3389/fphys.2018.00286.
- Minta, A., Kao, J. P. Y., and Tsien, R. Y. (2001). Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores\*. *J Biol Chem* 264, 8171–8178.
- Mock, D. M., Lankford, G. L., Widness, J. A., Burmeister, L. F., Kahn, D., and Strauss, R. G. (1999). Measurement of red cell survival using biotin-labeled red cells: validation against <sup>51</sup>Cr-labeled red cells. *Transfusion* 39, 156–162.
- Mock, D. M., Widness, J. A., Veng-Pedersen, P., Strauss, R. G., Cancelas, J. A., Cohen, R. M., et al. (2014). Measurement of Posttransfusion Red Cell Survival With the Biotin Label. *Transfus Med Rev* 28, 114–125. doi:10.1016/j.tmr.2014.03.003.
- Mohandas, N., and Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future.

- Blood* 112, 3939–3348. doi:10.1182/blood-2008.
- Molinari, M., Anagli, J., and Carafoli, E. (1994). Ca(2+)-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J Biol Chem* 269, 27992–27995.
- Moolenaar, W. H. (1995). Lysophosphatidic acid signalling. *Curr Opin Cell Biol* 7, 203–210.
- Moroni, M., Servin-Vences, M. R., Fleischer, R., Sanchez-Carranza, O., and Lewin, G. R. (2018). Voltage gating of mechanosensitive PIEZO channels. *Nat Comms* 9, 1096. doi:10.1038/s41467-018-03502-7.
- Mortensen, A. M., and Novak, R. F. (1992). Dynamic changes in the distribution of the calcium-activated neutral protease in human red blood cells following cellular insult and altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Toxicol Appl Pharmacol* 117, 180–188.
- Munker, R. (2007). “Basic Biology of Hemopoiesis,” in *Modern Hematology*, eds. R. Munker, E. Hiller, J. Glass, and R. Paquette (Totowa: Humana Press), 1–18.
- Narla, J., and Mohandas, N. (2017). Red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol* 39, 47–52. doi:10.1111/ijlh.12657.
- Ness, P. M., and Stengle, J. M. (1974). “Historical Introduction,” in *The Red Blood Cell*, ed. D. Surgenor (New York: Academic Press).
- Newton, A. C., and Huestis, W. H. (1988). Vesicle-to-cell protein transfer: insertion of band 3, the erythrocyte anion transporter, into lymphoid cells. *Biochem* 27, 4655–4659.
- Newton, A. C., Cook, S. L., and Huestis, W. H. (1983). Transfer of band 3, the erythrocyte anion transporter, between phospholipid vesicles and cells. *Biochem* 22, 6110–6117. doi:10.1021/bi00295a011.
- Ney, P. A. (2011). Normal and disordered reticulocyte maturation. *Curr Opin Hematol* 18, 152–157. doi:10.1097/MOH.0b013e328345213e.
- Nunomura, W., Denker, S. P., Barber, D. L., Takakuwa, Y., and Gascard, P. (2012). Characterization of cytoskeletal protein 4.1R interaction with NHE1 (Na<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1). *Biochem J* 446, 427–435. doi:10.1042/BJ20120535.
- Nyabi, O., Naessens, M., Haigh, K., Gembarska, A., Goossens, S., Maetens, M., et al. (2009). Efficient mouse transgenesis using Gateway-compatible ROSA26 locus targeting vectors and F1 hybrid ES cells. *Nucleic Acids Res* 37, e55. doi:10.1093/nar/gkp112.
- O'Connell, K. E., Mikkola, A. M., Stepanek, A. M., Vernet, A., Hall, C. D., Sun, C. C., et al. (2015). Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. *Comp Med* 65, 96–113.
- Ossendorf, M. (2003). “Erythrozyten,” in *Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin: Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie*, ed. H. Renz (Berlin: de Gruyter), 157–184.
- Ovchynnikova, E., Aglialoro, F., Lindern, von, M., and van den Akker, E. (2018). The Shape Shifting Story of Reticulocyte Maturation. *Front Physiol* 9, 829–14. doi:10.3389/fphys.2018.00829.

- Pan, Z., Choi, S., and Luo, Y. (2018). "Mn<sup>2+</sup>Quenching Assay for Store-Operated Calcium Entry," in *The CRAC Channel Methods and Protocols*. eds.A. Penna and B. Constantin (New York, NY: Springer New York), 55–62. doi:10.1007/978-1-4939-8704-7\_4.
- Pasini, E. M., Kirkegaard, M., Mortensen, P., Lutz, H. U., Thomas, A. W., and Mann, M. (2006). In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* 108, 791–801. doi:10.1182/blood-2005-11-007799.
- Perrotta, S., Gallagher, P. G., and Mohandas, N. (2008). Hereditary spherocytosis. *Lancet* 372, 1411–1426. doi:10.1016/S0140-6736(08)61588-3.
- Petkova-Kirova, P., Hertz, L., Danielczok, J., Huisjes, R., Makhro, A., Bogdanova, A., et al. (2019). Red Blood Cell Membrane Conductance in Hereditary Haemolytic Anaemias. *Front Physiol* 10, 386–17. doi:10.3389/fphys.2019.00386.
- Piazza, M., Taiakina, V., Dieckmann, T., and Guillemette, J. G. (2017). Structural Consequences of Calmodulin EF Hand Mutations. *Biochem* 56, 944–956. doi:10.1021/acs.biochem.6b01296.
- Plotniov, M. B., Aliev, O. I., Tyukavkina, N. A., and Plotnikov, T. M. (2006). "Hemorheological effects of antioxidant complex comprising dihydroquercetin and ascorbic acid (ascorvertin) - a new aspect of antioxidants application," in *Frontiers in Antioxidants Research*, ed.H. V. Panglossi (New York: Nova Science Publishers), 103–131.
- Poon, R. Y. M., Ohlsson-Wilhelm, B. M., Bagwell, C. B., and Muirhead, K. A. (2000). "Use of PKH membrane intercalating dyes to monitor cell trafficking and function," in *In Living Color*, eds.R. A. Diamond and S. Demaggio (Berlin, Heidelberg), 302–352. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-57049-0.
- Poupot, M., and Fournié, J.-J. (2003). Spontaneous membrane transfer through homotypic synapses between lymphoma cells. *J Immunol* 171, 2517–2523. doi:10.4049/jimmunol.171.5.2517.
- Radu, C. C., Muțiu, G., and Pop, O. (2014). Accessory spleen. *Rom J Morphol Embryol* 55, 1243–1246.
- Rapetti-Mauss, R., Lacoste, C., Picard, V., Guitton, C., Lombard, E., Loosveld, M., et al. (2015). A mutation in the Gardos channel is associated with hereditary xerocytosis. *Blood* 126, 1273–1280. doi:10.1182/blood-2015-04-642496.
- Rapetti-Mauss, R., Soriani, O., Vinti, H., Badens, C., and Guizouarn, H. (2016). Senicapoc: a potent candidate for the treatment of a subset of hereditary xerocytosis caused by mutations in the Gardos channel. *Haematol* 101, e431–e435. doi:10.3324/haematol.2016.149104.
- Riedelsheimer, B., and Büchl-Zimmermann, S. (2015). "Färbungen," in *Romeis - Mikroskopische Technik*, eds.M. Mulisch and U. Welsch (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 171–282. doi:10.1007/978-3-642-55190-1\_10.
- Rosse, W. F., Gallagher, D., Kinney, T. R., Castro, O., Dosik, H., Moohr, J., et al. (1990). Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 76, 1431–1437.
- Sabina, R. L., Waldenström, A., and Ronquist, G. (2006). The contribution of Ca<sup>+</sup> calmodulin

- activation of human erythrocyte AMP deaminase (isoform E) to the erythrocyte metabolic dysregulation of familial phosphofructokinase deficiency. *Haematol* 91, 652–655.
- Salamino, F., De Tullio, R., Mengotti, P., Viotti, P. L., Melloni, E., and Pontremoli, S. (1993). Site-directed activation of calpain is promoted by a membrane-associated natural activator protein. *Biochem J* 290, 191–197.
- Santos, E. W., Oliveira, D. C. de, Hastreiter, A., Silva, G. B. D., Beltran, J. S. de O., Tsujita, M., et al. (2016). Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 53, 138–8. doi:10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145.
- Saxena, R. K., Bhardwaj, N., Sachar, S., Puri, N., and Khandelwal, S. (2012). A Double in vivo Biotinylation Technique for Objective Assessment of Aging and Clearance of Mouse Erythrocytes in Blood Circulation. *Transfus Med Hemother* 39, 335–341. doi:10.1159/000342524.
- Schatzmann, H. J. (1966). ATP-dependent  $Ca^{++}$ -extrusion from human red cells. *Experientia* 22, 364–365.
- Schloendorff, J. S., and Pollak, M. R. (2006). TRPC6 in glomerular health and disease: What we know and what we believe. *Sem Cell Develop Biol* 17, 667–674. doi:10.1016/j.semcd.2006.11.003.
- Schwenk, F., Baron, U., and Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* 23, 5080–5081.
- Shah, S., Huang, X., and Cheng, L. (2014). Concise review: stem cell-based approaches to red blood cell production for transfusion. *Stem Cells Transl Med* 3, 346–355. doi:10.5966/sctm.2013-0054.
- Shi, J., Mori, E., Mori, Y., Mori, M., Li, J., Ito, Y., et al. (2004). Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol* 561, 415–432. doi:10.1113/jphysiol.2004.075051.
- Shin, J.-H., Lim, K.-M., Noh, J.-Y., Bae, O.-N., Chung, S.-M., Lee, M.-Y., et al. (2007). Lead-induced procoagulant activation of erythrocytes through phosphatidylserine exposure may lead to thrombotic diseases. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 38–43. doi:10.1021/tx060114.
- Shoji, M., Girard, P. R., Mazzei, G. J., Vogler, W. R., and Kuo, J. F. (1986). Immunocytochemical evidence for phorbol ester-induced protein kinase C translocation in HL60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 135, 1144–1149.
- Silbernagl, S. (2012). “Blut,” in *Taschenatlas Physiologie*, eds. S. Silbernagl and A. Despopoulos (Stuttgart: Thieme).
- Smrcka, A. V. (2008). G protein  $\beta\gamma$  subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci* 65, 2191–2214. doi:10.1007/s00018-008-8006-5.
- Song, J., Midson, C., Blachly-Dyson, E., Forte, M., and Colombini, M. (1998). The sensor regions of VDAC are translocated from within the membrane to the surface during the gating processes. *Biophys J* 74, 2926–2944. doi:10.1016/S0006-3495(98)78000-2.
- Spassova, M. A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., and Gill, D. L. (2006). A common



- mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16586–16591. doi:10.1073/pnas.0606894103.
- Steffen, P., Jung, A., Nguyen, D. B., Müller, T., Bernhardt, I., Kaestner, L., et al. (2011). Stimulation of human red blood cells leads to Ca<sup>2+</sup>-mediated intercellular adhesion. *Cell calcium* 50, 54–61. doi:10.1016/j.ceca.2011.05.002.
- Stout, J. G., Zhou, Q., Wiedmer, T., and Sims, P. J. (1998). Change in conformation of plasma membrane phospholipid scramblase induced by occupancy of its Ca<sup>2+</sup> binding site. *Biochem* 37, 14860–14866. doi:10.1021/bi9812930.
- Strehler, E. E., and Zacharias, D. A. (2001). Role of Alternative Splicing in Generating Isoform Diversity Among Plasma Membrane Calcium Pumps. *Physiol Rev* 81, 21–50.
- Takakuwa, Y. (2001). Regulation of red cell membrane protein interactions: implications for red cell function. *Curr Opin Hematol* 8, 80–84.
- Thiagarajan, P., and Prchal, J. T. (2016). “Erythrocyte Turnover,” in *Williams Hematology*, eds. K. Kaushansky, J. T. Prchal, O. W. Press, M. A. Lichtman, M. Levi, L. J. Burns, et al. (New York: McGraw-Hill Education), 495–502.
- Thiele, T., Steil, L., Völker, U., and Greinacher, A. (2010). Transfusion medicine and proteomics. Alliance or coexistence? *Blood Transfus* 8 Suppl 3, s16–25. doi:10.2450/2010.004S.
- Tiffert, T., Bookchin, R. M., and Lew, V. L. (2003). “Calcium Homeostasis in Normal and Abnormal Human Red Cells,” in *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*, eds. I. Bernhardt and J. C. Ellory (Springer), 373–405.
- Tomaiuolo, G. (2014). Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics* 8, 051501–19. doi:10.1063/1.4895755.
- Urban, N., Wang, L., Kwiek, S., Rademann, J., Kuebler, W. M., and Schaefer, M. (2015). Identification and Validation of Larixyl Acetate as a Potent TRPC6 Inhibitor. *Mol Pharmacol* 89, 197–213. doi:10.1124/mol.115.100792.
- van den Akker, E., Satchwell, T. J., Pellegrin, S., Daniels, G., and Toyé, A. M. (2010). The majority of the in vitro erythroid expansion potential resides in CD34(-) cells, outweighing the contribution of CD34(+) cells and significantly increasing the erythroblast yield from peripheral blood samples. *Haematol* 95, 1594–1598. doi:10.3324/haematol.2009.019828.
- van Leeuwenhoek, A. (1675). Other microscopical observations, made by the same, about the texture of the blood, the sap of some plants, the figure of sugar and salt, and the probable cause of the difference of their tastes. *Philos Trans R Soc London* 10, 380–385.
- van Leeuwenhoek, A. (1695). *Arcana naturae detecta. Delphis Batav.*
- van Wijk, R., and van Solinge, W. W. (2016). “Erythrocyte Enzyme Disorders,” in *Williams Hematology*, eds. K. Kaushansky, J. T. Prchal, O. W. Press, M. A. Lichtman, M. Levi, L. J. Burns, et al. (New York: McGraw-Hill Education), 689–723.
- van Zwieten, R., Verhoeven, A. J., and Roos, D. (2014). Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. *Free Radic Biol Med* 67, 377–386.

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.022.

- Vanherberghen, B., Andersson, K., Carlin, L. M., Nolte-'t Hoen, E. N. M., Williams, G. S., Höglund, P., et al. (2004). Human and murine inhibitory natural killer cell receptors transfer from natural killer cells to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16873–16878. doi:10.1073/pnas.0406240101.
- Varga, I., Babala, J., and Kachlik, D. (2018). Anatomic variations of the spleen: current state of terminology, classification, and embryological background. *Surg Radiol Anat* 40, 21–29. doi:10.1007/s00276-017-1893-0.
- Verkleij, A. J., Zwaal, R. F., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn D, and van Deenen, L. L. (1973). The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 323, 178–193.
- Wagner-Britz, L., Wang, J., Kaestner, L., and Bernhardt, I. (2013). Protein kinase Ca and P-type Ca channel CaV2.1 in red blood cell calcium signalling. *Cell Physiol Biochem* 31, 883–891. doi:10.1159/000350106.
- Wallace, P. K., Tario, J. D., Jr., Fisher, J. L., Wallace, S. S., Ernstoff, M. S., and Muirhead, K. A. (2008). Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: Monitoring proliferation by dye dilution. *Cytometry* 73A, 1019–1034. doi:10.1002/cyto.a.20619.
- Wang, J. (2013). *Calcium Signaling in Red Blood Cells*. Homburg: Dissertation, Universität des Saarlandes doi:10.22028/D291-21998.
- Wang, J., Wagner-Britz, L., Bogdanova, A., Ruppenthal, S., Wiesen, K., Kaiser, E., et al. (2013). Morphologically homogeneous red blood cells present a heterogeneous response to hormonal stimulation. *PloS one* 8, e67697. doi:10.1371/journal.pone.0067697.
- Waters, S. I., Sen, R., Brunauer, L. S., and Huestis, W. H. (1996). Physical determinants of intermembrane protein transfer. *Biochem* 35, 4002–4008. doi:10.1021/bi950433s.
- Waugh, R. E., Mohandas, N., Jackson, C. W., Mueller, T. J., Suzuki, T., and Dale, G. L. (1992). Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood* 79, 1351–1358.
- Welbourn, E. M., Wilson, M. T., Yusof, A., Metodiev, M. V., and Cooper, C. E. (2017). The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radic Biol Med* 103, 95–106. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.024.
- Wesseling, M. C., Wagner-Britz, L., Boukhdoud, F., Asanidze, S., Nguyen, D. B., Kaestner, L., et al. (2016a). Measurements of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Content and Phosphatidylserine Exposure in Human Red Blood Cells: Methodological Issues. *Cell Physiol Biochem* 38, 2414–2425. doi:10.1159/000445593.
- Wesseling, M. C., Wagner-Britz, L., Nguyen, D. B., Asanidze, S., Mutua, J., Mohamed, N., et al. (2016b). Novel Insights in the Regulation of Phosphatidylserine Exposure in Human Red Blood Cells. *Cell Physiol Biochem* 39, 1941–1954. doi:10.1159/000447891.
- Winn, M. P. (2005). A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Science* 308, 1801–1804. doi:10.1126/science.1106215.

- Wolff, D., Cecchi, X., Spalvins, A., and Canessa, M. (1988). Charybdotoxin blocks with high affinity the Ca-activated K<sup>+</sup> channel of Hb A and Hb S red cells: Individual differences in the number of channels. *J Membr Biol* 106, 243–252.
- Woon, L. A., Holland, J. W., Kable, E. P. W., and Roufogalis, B. D. (1999). Ca<sup>2+</sup> sensitivity of phospholipid scrambling in human red cell ghosts. *Cell Calcium* 25, 313–320.
- Yanagida, K., Kurikawa, Y., Shimizu, T., and Ishii, S. (2013). Current progress in non-Edg family LPA receptor research. *Biochim Biophys Acta* 1831, 33–41. doi:10.1016/j.bbaliip.2012.08.003.
- Yang, L., Andrews, D. A., and Low, P. S. (2000). Lysophosphatidic acid opens a Ca<sup>2+</sup> channel in human erythrocytes. *Blood* 95, 2420–2425.
- Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H. D., Huizing, M., and Hoogstraten-Miller, S. (2011). Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim* 40, 155–160. doi:10.1038/labani0511-155.
- Yoshida, T., Prudent, M., and D'alessandro, A. (2019). Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. *Blood Transfus* 17, 27–52. doi:10.2450/2019.0217-18.
- Yu, Y., Fantozzi, I., Remillard, C. V., Landsberg, J. W., Kunichika, N., Platoshyn, O., et al. (2004). Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13861–13866. doi:10.1073/pnas.0405908101.
- Yung, Y. C., Stoddard, N. C., and Chun, J. (2014). LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J. Lipid Res.* 55, 1192–1214. doi:10.1194/jlr.R046458.
- Zarychanski, R., Schulz, V. P., Houston, B. L., Maksimova, Y., Houston, D. S., Smith, B., et al. (2012). Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis. *Blood* 120, 1908–1915. doi:10.1182/blood-2012-04-422253.
- Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J. G., Luhm, R. A., Wiedmer, T., and Sims, P. J. (1997). Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* 272, 18240–18244.
- Zwaal, R. F., and Schroit, A. J. (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89, 1121–1132.

### Internetquellen:

Fluorescence Spectra Viewer, Biolegend, USA,

unter: <https://www.biolegend.com/en-us/spectra-analyzer> (abgerufen am 23.05.2019)

## 6 PUBLIKATIONEN

- Hertz L**, Ruppenthal S, Simionato G, Quint S, Kihm A, Abay A, Petkova-Kirova P, Boehm U, Weissgerber P, Wagner C, Laschke M W, Kaestner L, 2019. The evolution of erythrocytes becoming red in respect to fluorescence. *Front Physiol.* doi: 10.3389/fphys.2019.00753.
- Huisjes R, Makhro A, Llaudet-Planas E, **Hertz L**, Petkova-Kirova P, Verhagen LP, Pignatelli S, Rab MAE, Schiffelers RM, Seiler E, van Solinge WW, Vives Corrons JL, del Mar Mañu-Pareira M, Kaestner L, Bogdanova A, van Wijk R, 2019. Density, heterogeneity and deformability of red cells as markers of clinical severity in hereditary spherocytosis. *Haematol.* doi: 10.3324/haematol.2018.188151.
- Abay A, Simionato G, Chachanidze R, Bogdanova A, **Hertz L**, Bianchi P, Van den Akker E, Von Lindern M, Leonetti M, Minetti G, Wagner C, Kaestner L, 2019. Glutaraldehyde – a subtle tool in the investigation of healthy and pathologic red blood cells. *Front Physiol.* doi: 10.3389/fphys.2019.00514.
- Petkova-Kirova P, **Hertz L**, Danielczok J G, Huisjes R, Makhro A, Bogdanova A, del Mar Mañu-Pareira M, Vives Corrons J L, van Wijk R, Kaestner L, 2019. Red Blood Cell Membrane Conductance in Hereditary Haemolytic Anaemias. *Front Physiol.* doi: 10.3389/fphys.2019.00386.
- Petkova-Kirova P, **Hertz L**, Makhro A, Danielczok J, Huisjes R, Llaudet-Planas E, del Mar Mañu-Pareira M, Vives Corrons J L, van Wijk R, Bogdanova A, Lars Kaestner, 2018. A Previously Unrecognized Ca<sup>2+</sup>-inhibited Nonselective Cation Channel in Red Blood Cells. *HemaSphere.* doi: 10.1097/HS9.000000000000146.
- Kaestner L, Wang X, **Hertz L**, Bernhardt I, 2018. Voltage-activated ion channels in non-excitable cells- a viewpoint regarding their physiological justification. *Front Physiol.* doi: 10.3389/fphys.2018.00450.
- Danielczok J G, Terriac E, **Hertz L**, Petkova-Kirova P, Lautenschläger F, Laschke M W, Kaestner L, 2017. Red blood cell passage of small capillaries is associated with transient Ca<sup>2+</sup>-mediated adaptations. *Front Physiol.* doi: 10.3389/fphys.2017.00979.
- Hertz L**, Huisjes R, Llaudet-Planas E, Petkova-Kirova P, Makhro A, Danielczok J G, Egée S, Del Mar Mañu-Pereira M, van Wijk R, Vives Corrons J L, Bogdanova A, Kaestner L,

2017. Is increased intracellular calcium in red blood cells a common component in the molecular mechanism causing anemia? *Front Physiol.* doi: 10.3389/fphys.2017.00673.

Fermo E, Bogdanova A, Petkova-Kirova P, Zaninoni A, Marcello A P, Makhro A, Hänggi P, **Hertz L**, Danielczok J, Vercellati C, Mirra N, Zanella A, Cortelezzi A, Barcellini W, Kaestner L, Bianchi P, 2017. 'Gardos Channelopathy': a variant of hereditary stomatocytosis with complex molecular regulation. *Sci Rep.* doi: 10.1038/s41598-017-01591-w.

Danielczok J, **Hertz L**, Ruppenthal S, Kaiser E, Petkova-Kirova P, Bogdanova A, Krause E, Lipp P, Freichel M, Kaestner L, Birnbaumer L, 2017. Does erythropoietin regulate TRPC channels in red blood cells? *Cell Physiol Biochem.* doi: 10.1159/000464384.

Himbert S, Alsop R J, Rose M, **Hertz L**, Dhaliwal A, Moran-Mirabal J M, Verschoor C P, Bowdish D M, Kaestner L, Wagner C, Rheinstädter M C, 2017. The molecular structure of human red blood cell membranes from highly oriented, solid supported multi-lamellar membranes. *Sci Rep.* doi: 10.1038/srep39661.

Wesseling M C, Wagner-Britz L, Huppert H, Hanf B, **Hertz L**, Nguyen D B, Bernhardt I, 2016. Phosphatidylserine exposure in human red blood cells depending on cell age. *Cell Physiol Biochem.* doi: 10.1159/000443081.

## 7 DANKSAGUNG

Ganz herzlich bedanken möchte ich bei:

meinem Doktorvater Prof. Dr. Lars Kaestner für die großartige Betreuung, die vielen Ideen, die ständige Unterstützung und Motivation, und ganz besonders für den unermüdlichen Optimismus.

Prof. Dr. Peter Lipp für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Molekulare Zellbiologie anzufertigen, die Unterstützung in der Endphase und die, für alle Fragen und Anliegen offen stehende Tür.

Prof. Dr. Ingolf Bernhardt für die stete Unterstützung und den "Schubs in die richtige Richtung".

Dr. Sandra Ruppenthal, die mir bei allen molekularbiologischen Problemen immer eine große Hilfe war und mit zahlreichen Tipps zur Seite stand.

Prof. Dr. Matthias Laschke für die Durchführung der tierexperimentellen Versuche.

PD Dr. Elmar Krause und Ruth Nickels für die großartige Hilfe bei der Durchflusszytometrie.

dem Hühnerhaufen aus dem Großraumbüro und Sekretariat: Conny Feß, Katja Flügel, Elisabeth Kaiser, Tanja Kuhn, Polina Petkova-Kirova, Laura Schröder, Karin Schuhmacher, Julia Schweizer für die unglaublich tolle Zeit, die ich während meiner Promotion hatte!

den allerbesten Arbeitskolleginnen, die man sich nur wünschen kann, Moni und Sabrina. Ihr wisst schon wofür!

allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Zellbiologie für die super Zusammenarbeit und Unterstützung in unserer Gruppe.

meinen Schwestern Natalie und Kaja dafür, dass sie immer für mich da sind, wenn ich sie brauche.

meiner Familie für Alles!

meinem Freund Christoph dafür, dass er meine Welt auf den Kopf stellt.

und *last but not least*

allen, die freiwillig oder "unfreiwillig" für meine Experimente Blut gespendet haben.