

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

**Eigenschaften der Erythrozyten
von Patienten mit
Neuroakanthozytose Syndromen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES 2022

vorgelegt von: Antonia Rabe

geboren am: 03.02.1998 in Minden

Tag der Promotion: 13.09.2022

Dekan: Univ. -Prof. Dr. Med. Michael D. Menger

Berichterstattende: Prof. Dr. Lars Kästner

Prof. Dr. Hermann Eichler

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/Abstract	5
Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
1 Einleitung	11
1.1 Blut	11
1.2 Erythrozyten und Zytoskelett	11
1.3 Erythropoese	13
1.4 Akanthozyten	16
1.5 Neuroakanthozytose Syndrome	18
1.6 Lyn-Kinase	22
1.7 Dasatinib	24
1.8 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Geräte	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3 Software	27
2.1.4 Chemikalien	27
2.1.5 Lösungen	29
2.2 Methoden	31
2.2.1 Einwilligung der Spender und Ethikvotum	31
2.2.2 Laborwerte	31
2.2.3 Zellkultur	31
2.2.4 Durchflusszytometrie	33
2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie	36
2.2.6 3D Aufnahmen von Erythrozyten	37
2.2.7 Blutausstriche	38
2.2.8 Expansionsmikroskopie	39
2.2.9 Aktinfärbung mit Phalloidin 647N	42
2.2.10 Calciummessung	43
2.2.11 Blutsenkungsgeschwindigkeit	44
2.2.12 Statistik	45
3 Ergebnisse	46
3.1 Patientendaten	46

3.2	Laborparameter	48
3.3	Erythropoese.....	51
3.4	3D Aufnahmen von Erythrozyten und Blutausstriche	55
3.4.1	3D Aufnahmen	55
3.4.2	Auswertung der 3D Aufnahmen durch verschiedene Beurteiler	59
3.4.3	Vergleich von 3D Aufnahmen und Blutausstrichen	60
3.5	Calciummessung	62
3.6	Expansionsmikroskopie und Aktinfärbung	65
3.7	Blutsenkungsgeschwindigkeit	69
4	Diskussion	72
4.1	Laborparameter	72
4.2	Erythropoese.....	75
4.3	3D Aufnahmen von Erythrozyten und Blutausstriche	77
4.4	Calciummessung	82
4.5	Aktinfärbung und Expansionsmikroskopie	84
4.6	Blutsenkungsgeschwindigkeit	88
5	Literaturverzeichnis	93
6	Danksagung	101
7	Lebenslauf	102
8	Publikationen	103

Zusammenfassung

Neuroakanthozytose Syndrome sind seltene neurodegenerative Erkrankungen, die als gemeinsames Merkmal sogenannte Akanthozyten – stachelig verformte Erythrozyten – im Blut aufweisen. In dieser Arbeit wurden Chorea Akanthozytose Patienten und McLeod Syndrom Patienten hinsichtlich verschiedener Parameter untersucht.

Hierbei zeigte sich eine deutlich verlangsamte Blutsenkung bei beiden Erkrankungen im Vergleich zu Kontrollen. Die Ursache dessen liegt sowohl in der Zusammensetzung des Blutplasmas als auch in der Form und Verformbarkeit der Erythrozyten. Die Blutsenkgeschwindigkeit kann als Marker für die Erkrankungen Chorea Akanthozytose und McLeod Syndrom herangezogen werden. Im Gegensatz dazu war die Klassifikation der Erythrozyten nach ihrer Morphologie zum einen in konventionellen Blutausstrichen als auch in dreidimensionalen Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop nicht verlässlich. Aufgrund des fließenden Übergangs der Zellformen war eine Klassifikation in verschiedene Kategorien stark untersucherabhängig. Für die Diagnostik der Neuroakanthozytose Syndrome spielt die genaue Form der Zellen eine untergeordnete Rolle, da Patienten generell eine größere Anzahl an unnormal geformten, nicht-Diskozyten aufweisen.

Im basalen Calciumgehalt gab es sowohl für McLeod als auch für Chorea Akanthozytose Patienten keine Unterschiede zu gesunden Kontrollerythrozyten. Das filamentöse Aktin war ebenfalls bei Chorea Akanthozytose nicht verändert.

Bei der Untersuchung einiger Laborparameter von McLeod und Chorea Akanthozytose Patienten gab es Abweichungen von den Kontrollpatienten zum einen im Fibrinogen, welches ein Grund für die verlangsamte Blutsenkung ist.

Der Kinase-Inhibitor Dasatinib nimmt Einfluss auf die Lyn-Kinase, welche bei der Pathophysiologie der Neuroakanthozytose Syndrome eine Rolle spielt. Dieser Inhibitor wurde in einem individuellen Heilversuch bei zwei Patienten mit Chorea Akanthozytose angewandt. In dieser Arbeit wurde die Blutsenkgeschwindigkeit unter dem Einfluss von Dasatinib für diese zwei Patienten untersucht. Für McLeod Syndrom Patienten wurden erste Daten zur Erythropoese und dem Einfluss von Dasatinib auf die Erythropoese erhoben, wobei sich bei zwei Patienten keine Unterschiede in der Erythropese im Vergleich zu Kontrollen zeigten.

Neben der Untersuchung der Akanthozyten wird in dieser Arbeit eine neue Methode zur Mikroskopie erstmals an Erythrozyten versucht. Die Expansionsmikroskopie gelang an Erythrozyten in Suspension, wobei das Zytoskelett noch nicht beurteilt werden konnte.

Abstract

Characteristics of erythrocytes in patients with neuroacanthocytosis syndromes

Neuroacanthocytosis syndromes are a group of very rare diseases which all show acanthocytes – misshapen erythrocytes – in the blood. In this thesis different blood parameters of patients who suffer from McLeod syndrome and Chorea Acanthocytosis were examined.

A slowed down erythrocyte sedimentation rate was found in both diseases and identified as a new tool for screening for neuroacanthocytosis syndrome. The cause for this is the composition of blood plasma on the one hand and the shape and stiffness of the erythrocytes on the other hand. In contrast to the difference of erythrocytes sedimentation rate from patients to controls, the conventional screening method of evaluating the cells morphology was not reliable. This was examined in blood smears and in 3D confocal images. The classification of red cell morphology depended on the examiner using those methods. For diagnosis of acanthocytosis the exact shape of the red blood cell is not important, because neuroacanthocytosis syndrome patients show a high amount of all kinds of misshapen cells in blood.

The basal calcium concentration of erythrocytes from McLeod syndrome and Chorea Acanthocytosis patients did not differ from healthy controls. As well the filamentous actin was not altered in Chorea Acanthocytosis.

Regarding the blood parameters there were some deviations in the fibrinogen which are one reason for the slow erythrocyte sedimentation rate.

The tyrosine kinase inhibitor Dasatinib has an effect on the lyn-kinase, which plays a role in the pathophysiology of neuroakanthocytosis syndromes. Two patients with chorea acanthocytosis were treated in an off label trial with Dasatinib and in this thesis their erythrocyte sedimentation rate was examined. For McLeod syndrome first results in the examination of in-vitro erythropoiesis and the influence of the tyrosine kinase inhibitor Dasatinib on erythropoiesis are shown. There was no difference in the erythropoiesis between patients and controls and also no effect of the drug could be found.

Next to the study of the acanthocytes in this thesis a new method for erythrocyte microscopy was tried. The so called Expansion Microscopy was successful in erythrocytes in suspension, but the cytoskeleton could not be evaluated yet.

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
µm	Mikrometer
Abb	Abbildung
BFU-E	Burst-forming unit erythroid
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
Ca	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
CFU-E	Colony-forming unit erythroid
ChAc	Chorea-Akanthozytose
CRP	C-reaktives Protein
dl	Deziliter
Epo	Erythropoetin
Et al	Et alii
Em	Emission
Ex	Excitation
fl	Femtoliter
g	Gramm
h	Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
HSC	Hematipoetic stem cell
IgG	Immunglobulin Typ G
IgM	Immunglobulin Typ M
l	Liter
log	Logarithmus
max	maximal
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCV	Mean Corpuscular Volume
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
min	Minute(n)
Mio	Millionen

MLS	McLeod Syndrom
mosm	Milliosmol
nm	Nanometer
Nr	Nummer
n.s.	Nicht signifikant
pg	Pikogramm
RDW	Red blood cell deviation with
RNA	Ribonukleinsäure
SCF	Stem cell factor
SD	Standard deviation
s.o	Siehe oben
t	Zeitpunkt
vs	versus
vgl	vergleiche
WGA	Wheat germ agglutinin
xg	Das Vielfache der Erdbeschleunigung
Z.n	Zustand nach

Abbildungsverzeichnis

Abb. Nr.	Titel	Seitenzahl
1	Schematische Darstellung des Aufbaus von Membran und Zytoskelett eines Erythrozyten	13
2	Darstellung der Zwischenstufen der Erythropoese	14
3	Veränderungen der Zellen während der Erythropoese	16
4	Blutausstrich mit Akanthozyten	17
5	3D Aufnahmen von Akanthozyten	17
6	Aufbau der Lyn-Kinase	23
7	Auftrennung des Blutes nach Dichtegradienten in Plasma, PBMCs, Ficoll, Erythrozyten	32
8	Beispielhafte Darstellung des Gatings	35
9	Schematische Darstellung des Strahlengangs bei einem Fluoreszenzmikroskop	36
10	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Konfokalmikroskops	37
11	Darstellung der Schritte der Expansionsmikroskopie	39

12	Aufbau und Bindung von Acryloyl-X	41
13	Aufbau der Gelkammer	41
14	Versuchsaufbau Blutsenkung	44
15	Laborwerte	49,50
16	Laborwerte von Chorea Akanthozytose Patienten vor und nach Behandlung mit Dasatinib	51
17	Reifung und Enukleation von gesunden Erythrozyten in vitro	52
18	Expression der Oberflächenmarker CD71 und CD235 im Verlauf der Erythropoese bei einem McLeod Syndrom Patienten und einer Kontrolle mit und ohne Dasatinib Behandlung	54
19	Expression der Oberflächenmarker CD71 und CD235 im Verlauf der Erythropoese bei einem McLeod Syndrom Patienten und einer Kontrolle	54
20	Enukleationsparamter von zwei Patienten und zwei Kontrollen	55
21	3D Aufnahmen von Erythrozyten	56
22	Verteilung der Erythrozyten Zellformen bei Kontrollpatienten, McLeod Syndrom- und Chorea Akanthozytosepatienten	58
23	Auszählung der Akanthozyten bei 3D Aufnahmen durch zwei Auswerter	60
24	Blutausstrich Neuroakanthozytose Syndrom Patient	61
25	Vergleich von Blutausstrichen und 3D Aufnahmen in Hinblick auf die Zellklassifizierung	62
26	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung des Calciumgehalts von Erythrozyten mit Fluo-4	64
27	Mit WGA 488 und Phalloidin 647N gefärbte Erythrozyten vor und nach Expansion	66
28	Erythrozyten nach Expansion gefärbt mit WGA488	67
29	Färbung des filamentösen Aktins in Erythrozyten mit Phalloidin Atto647N	68,69
30	Versuchsaufbau und Ergebnisse der Blutsenkungsgeschwindigkeit von Chorea Akanthozytose Patienten, McLeod Syndrom Patienten und gesunden Kontrollen	70
31	Zeitpunkte der Probenentnahme unter Dasatinib Behandlung	71
32	Blutsenkungsgeschwindigkeit nach 2h bei Behandlung mit Dasatinib	71
33	Stomatozyt-Diskozyt-Echinozyt-Transformation	78
34	Ergebnisse der Zellklassifikation durch ein künstliches neuronales Netzwerk	80
35	Beibehaltende Fluoreszenzintensität nach Expansion	85

36	Aufnahmen nach Expansion von Aktin (rot) und Paxillin (grün) bei HEK293FT Zellen	85
37	Vergleich der Aktinfärbung	87
38	Flussexperiment bei ChAc	91

Tabellenverzeichnis

Tab. Nr.	Titel	Seitenzahl
1	Erkrankungen mit Akanthozyten	17
2	Übersicht über die Neuroakanthozytose Syndrome	22
3	Geräte	26
4	Verbrauchsmaterialien	26,27
5	Software	27
6	Chemikalien	27,28,29
7	Lösungen	29,30
8	Laborwerte	31
9	Zusammensetzung der Zellkulturmedien	33
10	Übersicht über die verwendeten Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie	34
11	Mikroskop- und Kamera-Einstellungen 3D Aufnahmen	38
12	Einteilungskriterien Zellformen	38
13	Mikroskop- und Kameraeinstellungen Aktinmessung	42
14	Mikroskop- und Kameraeinstellungen Calciummessung	43
15	Übersicht über die Patientendaten Chorea Akanthozytose	46,47
16	Übersicht über die Patientendaten McLeod Syndrom	47
17	Häufigkeiten der jeweiligen Zellformen bei gesunden Kontrollen, Chorea Akanthozytose Patienten und McLeod Syndrom Patienten	59
18	Physiologische Auswirkungen von Calcium auf Erythrozyten	82

1 Einleitung

1.1 Blut

Das Blut macht etwa 6-8% des menschlichen Körpergewichts aus und besteht aus zellulären und flüssigen Bestandteilen. Zu den Blutzellen gehören Erythrozyten und Leukozyten. Weiterhin kommen die für die Blutgerinnung entscheidenden Blutplättchen vor. Das flüssige Blutplasma enthält neben Wasser und Elektrolyten Proteine, welche zum Beispiel für die Immunabwehr (Immunglobuline) und die Blutgerinnung (Fibrinogen) zuständig sind. Weitere Bestandteile sind Stoffwechselprodukte wie zum Beispiel Glucose, Harnstoff und Kreatinin (Behrends et al. 2016).

1.2 Erythrozyten und Zytoskelett

Erythrozyten machen den zellulären Hauptbestandteil des Blutes aus. Ihre Hauptaufgabe besteht aus dem Sauerstofftransport zum Gewebe, der durch die Bindung an Hämoglobin möglich gemacht wird, und den Kohlenstoffdioxidtransport zur Lunge. Weiterhin ist Hämoglobin auch beteiligt an der Aufrechterhaltung des Blut-pH-Wertes. Die Erythrozyten sind kernlos und besitzen keine Zellorganellen. Das Fehlen dieser, sowie der besondere Aufbau des Zytoskeletts sind für die gute Verformbarkeit der Zellen im Kapillarsystem verantwortlich (Pape et al. 2018).

In Ruhe weisen die Erythrozyten eine diskoide Form mit einem Durchmesser von ca. 7,5 µm und einer Dicke von ca. 1,5 µm auf. Die Zellmembran der Erythrozyten besteht als Lipiddoppelschicht aus Cholesterinen, Phospholipiden und Glykolipiden, deren Verteilung sich zwischen innerer und äußerer Schicht unterscheidet. Charakteristische Proteine auf der Außenseite der Membran bestimmen die Blutgruppe des Trägers (Pape et al. 2018).

Durch die Membran spannen sich integrale Membranproteine, wie der Anionenaustauscher 1 (Bande-3-Protein) und Glykophorin, sowie der Wasserkanal Aquaporin 1. Über diesen Kanal findet die Anpassung der Erythrozyten an den osmotischen Druck in ihrem Medium statt. Bei höheren osmotischen Werten im umgebenen Medium strömt Wasser aus der Zelle hinaus und die Zelle verformt sich zu einem Echinozyten. Bei niedrigeren Werten gelangt Flüssigkeit in die Zelle und es entstehen Stomatozyten oder sogar kugelförmige Sphärozyten oder die Zellen platzen. Die Sphärozyten sind weniger stabil als Diskozyten und weisen eine verkürzte Lebensdauer auf (Behrends et al. 2016).

Auf der zytosolischen Seite der Membran liegt das Zytoskelett, welches in Erythrozyten wie folgt aufgebaut ist: Spektrinmoleküle, die den Hauptanteil des Zytoskeletts ausmachen, sind miteinander durch Aktin, Ankyrin und Bande-4.1-Protein verknüpft (Pape et al. 2018). Die Kopplung an die Zellmembran erfolgt durch Multiproteinkomplexe, die Bande-4.1-Protein und Ankyrin enthalten und damit das Zytoskelett an Bande-3-Protein binden (De Franceschi et al. 2014). Die Morphologie sowie der Aufbau des Zytoskeletts eines gesunden Diskozyten sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Spektrin: Spektrin liegt im Zytoskelett der Erythrozyten als langes Protein, bestehend aus einer alpha- und einer beta-Kette vor. An einem Ende liegen Bindungstellen für Ankyrin und andere Spektrinmoleküle. Am anderen Ende bindet Spektrin an Protein 4.1R, Protein 4.2 und Aktin. Spektrinmoleküle liegen in Erythrozyten als Dimere, vor allem als Tetramere, aber auch als größere Oligomere vor, welche jeweils helikal aufgebaut sind. Dabei ist die Bindung zwischen den Spektrinmolekülen innerhalb der Molekülkomplexe relativ schwach ausgeprägt und kann sich schnell lösen, was ein aneinander Entlanggleiten der Spektrinketten ermöglicht und damit die Verformbarkeit der roten Blutzellen im Kapillarsystem begünstigt (Lux 2016). Die Spektrinmoleküle weisen eine Länge von etwa 200 nm auf, wobei der Abstand zwischen zwei Aktinfilamenten nur 80-100 nm beträgt. Damit liegen die Spektrinmoleküle in einer entspannten Form im Erythrozyten in Ruhe vor (Gov et al. 2007).

Aktin: Kurze Aktinmoleküle liegen in roten Blutzellen in filamentöser Form als F-Aktin vor, wobei diese aus glomerulären Aktinmolekülen zusammengesetzt ist. Im Zytoskelett wird Aktin durch Spektrin und mit Hilfe von Protein 4.1R quervernetzt (Lux 2016).

Bande-3-Protein: SLC4A1, Anionenaustauscher 1 oder Bande-3-Protein ist mit über 1 Mio. Kopien pro Erythrozyt das häufigste in der Membran roter Blutzellen vorkommende Protein. Dieses Protein besitzt eine membranständige Untereinheit, die den Anionenaustauscher darstellt und eine periphere, zytosolisch liegende Einheit, welche das Zytoskelett bindet. Damit ist das Protein sowohl Bestandteil des Ankyrin-Komplexes (Ankyrin, Spektrin, Bande-3-Protein), als auch des Aktin Junctional-Komplex (Bande-3-Protein, Adduktin, Protein 4.2, Protein 4.1, Aktin) und verantwortlich für die Kopplung des Zytoskeletts an die Zellmembran (Lux 2016).

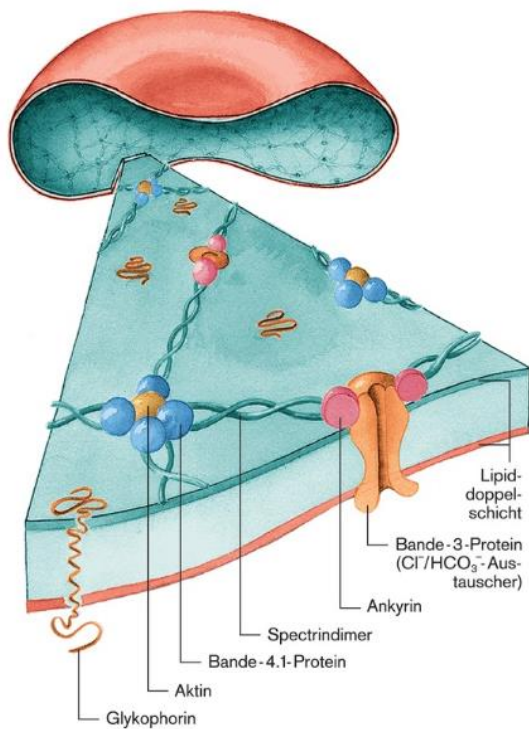


Abb. 1 Schematische Darstellung des Aufbaus von Membran und Zytoskelett eines Erythrozyten: Die Lipiddoppelschicht wird von dem Anionenaustauscher 1 (Bande-3-Protein) und Glykophorin durchspannt. Bande-3-Protein ist auch Bestandteil des Zytoskeletts und über Ankyrin mit den Spectrindimeren verbunden. Mehrere Spectrinmoleküle sind über F-Aktin vernetzt. Die Bindung unterstützt Bande-4.1-Protein (nach Pape et al. 2018).

1.3 Erythropoese

Übersicht

Die Erythrozyten zirkulieren etwa 120 Tage im Blut, bis sie von Makrophagen phagozytiert werden. So wird täglich etwa 0,8% dieser Zellen durch neu gebildete Erythrozyten ersetzt. Der Vorgang der Neubildung wird als Erythropoese bezeichnet, dauert etwa eine Woche und findet, wie bei allen Blutzellen im Knochenmark ausgehend von einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle statt. Die erste, der erythrogenen Zelllinie zugeordnete Vorstufe stellt der Proerythroblast dar, auf den der basophile Erythroblast folgt. Weitere Zwischenstufen werden nach ihrer Morphologie als basophiler und orthochromatischer Erythroblast bezeichnet. Retikulozyten, die die direkte Vorstufe von Erythrozyten sind, besitzen bereits keinen Kern mehr und nur noch Reste von Ribosomen. Insgesamt werden die Zellen im Laufe dieser Differenzierung kleiner, gewinnen an Hämoglobin und verlieren durch Ausstoßung von Kern und weiteren Organellen an Komplexität (Ulfig 2015). Diese Schritte der Erythropoese und die Morphologie der jeweiligen Zellen sind in Abbildung 2 dargestellt.

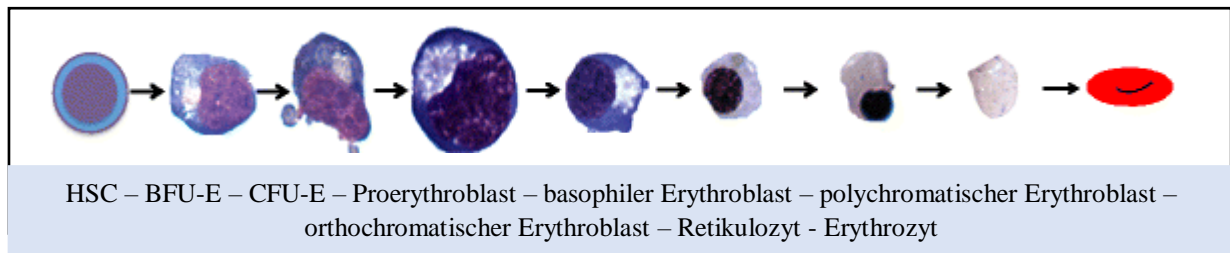


Abb. 2 Darstellung der Zwischenstufen der Erythropoese von der Hämatopoetischen Stammzelle (HSC) zum Erythrozyten. (BFU-E = burst-forming-unit erythroid, CFU-E = Colony-forming unit erythroid). Überarbeitet nach Zivot et al. (2018).

Regulation

Die Stimulation der Erythropoese erfolgt über verschiedene Zytokine, wie zum Beispiel Erythropoietin (Epo), welches in der Niere gebildet wird. Diese Bildung von Epo wird vom Sauerstoffpartialdruck im Blut reguliert, sodass bei Hypoxien eine vermehrte und schnellere Blutbildung gewährleistet ist. Dazu bindet Epo an den Erythropoietinrezeptor, der auf den frühen Stufen der Erythropoese (BFU-E bis Erythroblast) vorkommt. Die direkten Wirkungen von Epo auf die Zelle sind vor allem proliferativ und antiapoptotisch. Für die Bildung der roten Blutzellen ist weiterhin die Bildung von Hämoglobin und RNA notwendig. Für diese Schritte benötigen die Vorläuferzellen die Vitamine B12 und Folsäure sowie Eisen. Verschiedene Formen von Anämien entstehen daher unter anderem durch den Mangel an Epo, Eisen, Vitamin B12 oder Folsäure (Fandrey et al. 2015). Ein weiterer wichtiger Wachstumsfaktor, der an der Erythropoese beteiligt ist, ist Stem Cell Factor (SCF). Dieser kann sowohl den Epo-Rezeptor über Signalwege phosphorylieren als auch direkt mit Epo zusammewirken. Seine Funktionen übt SCF über Bindung an den KIT-Rezeptor aus (Nandakumar et al. 2016).

Frühe Erythropoese

Das erste Kompartiment der Erythropoese stellen die Progenitorzellen BFU-E (burst-forming unit erythroid) und CFU-E (colony-forming erythroid) dar. Diese Zellen haben die Eigenschaft im Knochenmark in großen Gruppen zusammenzuliegen. Das Überleben dieser wird vor allem wie oben beschrieben durch Epo gewährleistet (Palis 2014).

Terminale Erythropoese

In dieser Phase entstehen aus den Progenitorzellen die Proerythroblasten, die im Knochenmark in Nischen um einen zentralen Makrophagen angeordnet sind und zunächst durch Zellteilung proliferieren. Daraufhin kommt es durch die Reifung der Zellen, die für die Generation von Erythrozyten nötig ist zu den morphologisch verschiedenen Zwischenstufen, die nach ihrer Anfärbbarkeit als basophil,

polychromatisch und orthochromatisch bezeichnet werden. Während dieser Reifung unterliegen die Zellen zahlreichen Veränderungen, die unter anderem die membrangebundenen Oberflächenmoleküle, das Hämoglobin und die Bestandteile des Zytoskeletts betreffen. Während die Zellen zu Beginn der Erythropoese beispielsweise noch CD44 und alpha4 Integrin exprimieren, besitzen spätere Stadien diese Marker nicht mehr. Die auch noch im reifen Erythrozyten vorkommenden Proteine Glykophorin A (CD 234a) und Bande-3-Protein werden dagegen erst im Laufe der Differenzierung exprimiert. Die Expression des Transferrinrezeptors CD71 nimmt zunächst zu, jedoch verlieren die Zellen diesen später wieder (Nandukamar et al. 2016).

Die Differenzierung vom Proerythroblasten zum orthochromatischen Erythroblasten ist gekennzeichnet durch eine stetige Zunahme des Hämoglobingehaltes der Zellen. Hämoglobin ist ein für den Sauerstofftransport wichtiges Protein, welches postnatal aus zwei alpha- und zwei beta-Globinketten besteht und über vier Porphyrinringsysteme mit einem zentralen Eisenion verfügt (Pape et al. 2018). Antiparallel zur Synthese von Hämoglobin nimmt der Gehalt an Ribosomen und Mitochondrien in den Zellen mit zunehmender Differenzierung ab. Als wichtige Mechanismen für die Entfernung von Membranproteinen und Zellorganellen sind die Autophagie und Exozytose zu nennen. Bei der Exozytose gehen neben Proteinen auch Teile der Membran in Form von Endosomen verloren, wodurch die Zelle immer kleiner wird (Lüllmann-Rauch et al. 2012, Moras et al. 2017). Diese genannten Veränderungen, die die Zellen während der Erythropoese durchmachen, sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Enukleation und Reifung

Wenn der orthochromatische Erythroblast seinen Kern verliert, entsteht mit dem Retikulozyten die direkte Vorstufe des Erythrozyten. Bei dieser sogenannten Enukleation wird ein Teil der Zelle, der den Kern, Zytoplasma und auch Teile der Lipidmembran enthält, ausgestoßen und dieser als Pyrenozyt bezeichnete Rest phagozytiert (Palis 2014). Der entstandene Retikulozyt reift unter physiologischen Bedingungen noch drei Tage im Knochenmark und gelangt dann als Erythrozyt in den Blutkreislauf. Die Reifung des Retikulozyten sowie die vorangehende Differenzierung können durch eine Stimulation der Erythropoese abgekürzt werden, was sich in einem vermehrten Auftreten von Retikulozyten im peripheren Blut zeigt (Lüllmann-Rauch et al. 2012).

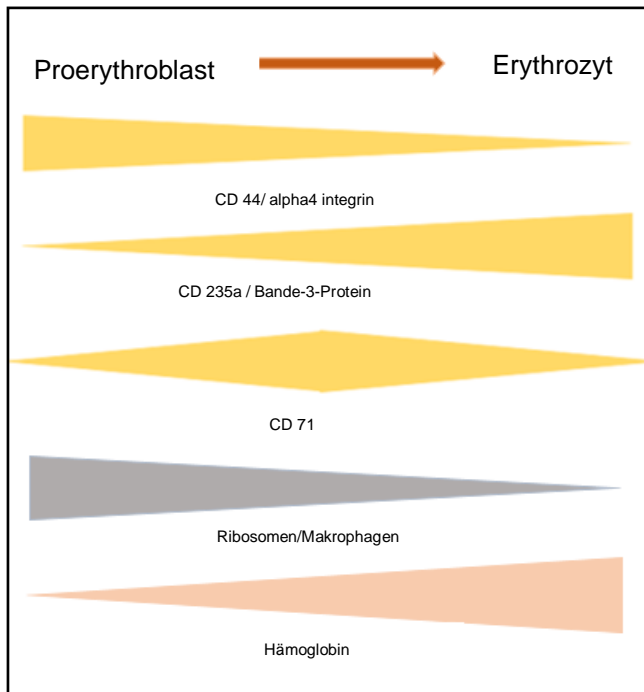


Abb. 3 Veränderungen der Zellen während der Erythropoese. Während der Differenzierung der Zellen in der terminalen Erythropoese nimmt deren Größe stetig ab. Parallel dazu verlieren die Zellen ihre Zellorganellen wie Makrophagen und Ribosomen, sowie die Oberflächenproteine CD44 und alpha4 Integrin. Der Gehalt an Hämoglobin nimmt zu und die Zellen gewinnen die Proteine CD235A und Bande-3-Protein, welche auch noch für den reifen Erythrozyten charakteristisch sind. Der Transferrinrezeptor CD71 wird zu Beginn und zu Ende der Erythropoese nicht exprimiert.

1.4 Akanthozyten

Akanthozyten sind Erythrozyten, die eine ungewöhnliche Form aufweisen, da sie über stachelförmige Ausläufer verfügen, die unregelmäßig verteilt sind und unterschiedliche Größen haben. Beispielhaft sind in Abbildung 4 Blutausstriche solcher Zellen und in Abbildung 5 dreidimensionale Aufnahmen gezeigt.

Derartig veränderte Erythrozyten erscheinen bei verschiedenen Erkrankungen im peripheren Blut der Patienten. Einerseits werden sie bei Pathologien des Lipidstoffwechsels (Abetalipoproteinämie; Hypolipoproteinämie) beobachtet. Andererseits bei Neuroakanthozytose Syndromen (s.u.). Eine Auflistung von Erkrankungen, bei denen Akanthozyten vorkommen ist in Tabelle 1 zu sehen. Es wird vermutet, dass die Akanthozytosegeneration bei den Neuroakanthozytose Syndromen eine andere Ursache hat, als bei Lipidmetabolismusstörungen. Die bei der Abetalipoproteinämie und Hypolipoproteinämie nachgewiesene veränderte Zusammensetzung der Lipidmembran von Erythrozyten konnte bisher nicht bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten gezeigt werden (Bosman 2018).

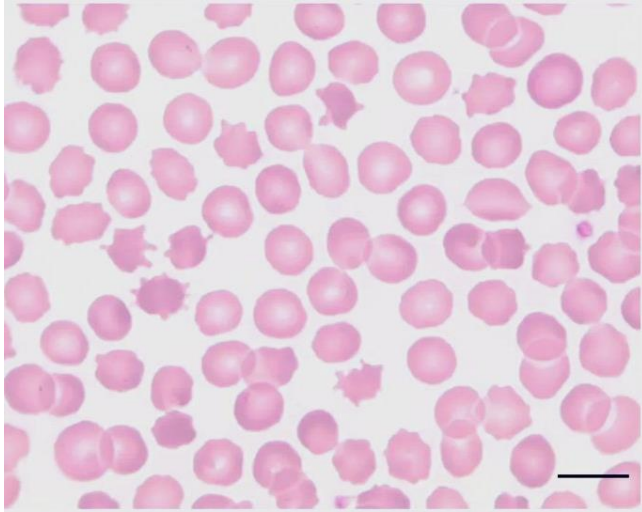


Abb. 4 Blutausschlag mit Akanthozyten. Mikroskopische Aufnahme von roten Blutzellen in einem Blutausschlag in 100x Objektiv (Maßstab 10µm). Akanthozyten mit stachelförmigen unregelmäßigen Ausläufern. (Jung et al. 2011)



Abb. 5 3D Aufnahmen von Akanthozyten. Akanthozyten von Chorea Akanthozytose und McLeod Syndrom Patienten. Dreidimensionale Aufnahmen, die im Rahmen dieser Arbeit mit dem Konfokalmikroskop aufgenommen wurden.

Tab. 1 Erkrankungen mit Akanthozyten Nach Jung et al. 2011

Neuroakanthozytose Syndrome	Chorea-Akanthozytose McLeod Syndrom Huntington Disease like 2 Pantothenkinaseassoziierte Neurodegeneration
Neuroakanthozytose Syndrome mit Fettstoffwechselstörungen	Abetalipoproteinämie Hypobetalipoproteinämie Morbus Andersen
Andere	Mangelernährung Malignome Z.n. Splenektomie Leberzirrhose Psoriasis Schilddrüsenerkrankungen

1.5 Neuroakanthozytose Syndrome

Die Neuroakanthozytose Syndrome bilden eine Gruppe von seltenen Erkrankungen, die auf genetischen Grundlagen beruhen und zu einer Neurodegeneration in den Basalganglien führen. Gemeinsames Merkmal dieser Erkrankungen ist weiterhin das Vorkommen von Akanthozyten im peripheren Blut, welches allerdings nicht bei allen betroffenen Patienten zu finden ist. Zu den Haupt-Neuroakanthozytose Syndromen zählt man die Chorea Akanthozytose (ChAc) und das McLeod Syndrom (MLS). Hinzu kommen die Huntington Disease like 2 und die panthothenkinaseassoziierte Neurodegeneration (PKAN) (Jung et al. 2011). Die wichtigsten Aspekte zu diesen Erkrankungen sind im Folgenden Abschnitt sowie in Tabelle 2 dargestellt.

Chorea Akanthozytose

Die grundlegende Mutation der Chorea Akanthozytose liegt auf Chromosom 9 und betrifft das VPS13A-Gen, welches für das Protein Chorein codiert. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt (De Franceschi et al. 2014). Die Symptome beginnen in der Regel im frühen Erwachsenenalter mit psychiatrischen Auffälligkeiten. Im weiteren Verlauf entwickeln sich Chorea und orofaziale Dyskinesien mit Zungenprotrusion. Weiterhin leidet ein Teil der Patienten an Krämpfen und Epilepsien (Jung et al. 2011). Chorea als namensgebendes Symptom dieser Akanthozytose ist gekennzeichnet durch unwillkürliche abrupte Bewegungen, die Extremitäten aber auch Gesicht und Stamm betreffen kann und die Patienten unruhig und ungeschickt erscheinen lässt.

Chorein: Die der Chorea Akanthozytose zugrunde liegende Mutation des VPS13A Gens führt zum Verlust oder der Veränderung des Proteins Chorein, welches in Erythrozyten, sowie vielen anderen Geweben (v.a. Gehirn, Hoden, Niere, Milz) vorkommt. Die Funktion von Chorein ist nicht gänzlich geklärt, es scheint jedoch Funktionen in Zytoskelettorganisation, Apoptose und Autophagie auszuüben (Lang et al. 2017).

Membran: Alterationen in der Zusammensetzung der Membranlipide sind in Erythrozyten von Chorea Akanthozytose Patienten nicht nachgewiesen worden. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die Verknüpfung von Lipidmembran und Zytoskelett verändert ist (De Franceschi et al. 2014). Weiterhin ist bei Erythrozyten von Akanthozytosepatienten die Formation von Endovesikeln insgesamt gestört und auch die medikamenteninduzierte Bildung dieser Vesikel ist vermindert (Oberwagner et al. 2017). Dieser Umstand wird dadurch erklärt, dass die Bildung von Endovesikeln durch die Substanzen Chlorpromazin und Primaqin durch eine relative Ausdehnung der Membran zustande kommt. Da die Akanthozythen bereits eine stärker gedehnte Membran aufweisen, wird vermutet, dass die gleiche Konzentration an Substanz nicht ausreicht, um eine derart starke relative Ausdehnung zu erreichen, dass sich Endovesikel bilden (Siegl et al. 2013).

Zytoskelett: Es ist bekannt, dass verschiedene Zytoskelettbestandteile von Erythrozyten mit VPS13A Mutation eine vermehrte Phosphorylierung aufweisen. Dazu gehören Spektrin, Adductin und Bande-3-Protein. Die Ursache dessen scheint in einer verstärkten Aktivität der Lyn-Kinase zu liegen (De Franceschi et al. 2011). Lyn ist eine membranassoziierte Tyrosinkinase, welche zur Familie der SRC-Kinasen gezählt wird. Sie ist Bestandteil von sowohl inaktivierenden, als auch aktivierenden Signalwegen und unterliegt physiologisch einer Zusammenarbeit mit der Syk-Kinase (Ingley 2012). In ChAc-Erythrozyten wurde jedoch eine von Syk unabhängige verstärkte Funktion von Lyn gezeigt. Diese wird als Ursache der verstärkten Protein-Phosphorylierung von u.a. Bande-3-Protein vermutet (De Franceschi et al. 2011).

Neben der vermutlich fehlerhaften Interaktion von Bande-3-Protein und weiteren membranassoziierten Proteinen mit der Lipidmembran, ist in Erythrozyten von Chorea Akanthozytose Patienten, wie auch in Fibroblasten und Neuronen auch das filamentöse Aktin verringert (Lang et al. 2017). Als Ursache für die Depolymerisation des Aktins in Erythrozyten wird ebenfalls der Mangel an Chorein diskutiert, da Chorein auf verschiedene Regulatoren im Signalweg, der für die Zytoskelettorganisation verantwortlich ist, einwirkt (Föllner et al. 2012). Depolymerisierte Filamente liegen vor allem in großen Ausläufern von Akanthozyten vor (Terada et al. 1999).

Autophagie: Zusätzlich zur Akkumulation von aktiver Lyn-Kinase, wurde auch eine Anhäufung von ULK1 und Atg7 gezeigt, die ebenfalls auf eine verstärkte Phosphorylierung dieser durch Lyn zurückgeführt wird. Ulk1 und Atg7 sind an der Autophagie beteiligt, die bei Chorea-Erythrozyten defekt zu sein scheint. Bezüglich dessen wurden vermehrt Lysosomen und Mitochondrien in der späten Erythropoese von ChAc Patienten nachgewiesen (Lupo et al. 2016).

Erythropoese: Für eine physiologische Erythropoese ist eine funktionierende Regulation der Lyn Kinase nötig, da Lyn an der Expression des Epo-Rezeptors beteiligt ist. Im Maus-Modell mit überaktiver Lyn-Kinase konnte des Weiteren eine hämolytische Anämie mit Auftreten von dysmorphen Erythrozyten sowohl bei heterozygoten, als auch bei homozygoten Formen ausgelöst werden. Bezüglich der Erythropoese wurde hier eine größere Anzahl an Progenitorzellen (CFU, BFU) im Knochenmark sowie eine kompensatorische extramedulläre Blutbildung beobachtet (Slavova-Azmanova et al. 2013).

Auch in der menschlichen Erythropoese konnte in vitro eine Dyserythropoese gezeigt werden. Diese zeichnete sich durch Akkumulation von Vesikeln und mehrkernigen Zellen in der späten Erythropoese aus. Weiterhin kommt es zur verstärkten Apoptose in Chorea-Proerythroblasten (Lupo et al. 2016).

Calcium in Erythrozyten und bei der Chorea Akanthozytose

Calcium spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus, der Form und dem Überleben von Erythrozyten. Zwischen extra- und intrazellulär herrscht bei Erythrozyten ein großes Gefälle im Calciumgehalt und der Einstrom von Calcium kann zahlreiche Signalwege aktivieren. So ist dieser Einstrom von Calcium

zum Beispiel bei einigen Erkrankungen wie der Sichelzellanämie erhöht (Bogdanova et al. 2013) und bei Chorea Akanthozytose vermindert (Siegl et al. 2013). Zudem spielen die von Calcium regulierten Signalwege wie calciumabhängige Phosphorylierung und der Calcium-Calmodulin Komplex auch eine Rolle in der Stabilität des Zytoskeletts. Erhöhtes intrazelluläres Calcium geht mit einer verminderten Stabilität des Zytoskeletts einher, was physiologisch eine Rolle in der Verformbarkeit der Erythrozyten spielt, da Calcium bei mechanischen Deformationen der Erythrozyten vermehrt einströmt. Bei hämolytischen Anämien ist die Instabilität der Zellen in einem dauerhaft erhöhten Calciumeinstrom begründet (Bogdanova et al. 2013). Da bei den Neuroakanthozytosen eine verringerte Verformbarkeit der Erythrozyten vermutet wird, sowie ebenfalls Veränderungen im Zytoskelett, könnte die Ursache hierfür in der Calciumhomöostase liegen. Versuche, die im Rahmen zu Untersuchungen der Endovesikelformation bei Akanthozyten durchgeführt wurden, haben ergeben, dass bei Akanthozyten die Aufnahme von Calcium vermindert ist. In diesem Versuch wurde die durch Lysophosphatidsäure (LPA) induzierte Calciumaufnahme von Chorea-Akanthozytose Erythrozyten untersucht und deutlich niedrigere Uptakes im Vergleich zu Kontrollen festgestellt. LPA sorgt für die Öffnung von Calciumkanälen (Wang et al. 2021) und ist auch an Signalwegen in neuronalen Zellen beteiligt (Siegl et al. 2013).

Calcium hat über den Gardoskanal in Erythrozyten auch Auswirkungen auf deren Kaliumgehalt und Volumen. Ein Einstrom von Calcium aktiviert den Gardoskanal, durch welchen Kalium und Chlorid aus der Zelle strömen und diese dehydriert und schrumpft (Bogdanova et al. 2013). Ein vermindertes Kalium und eine relative Dehydratation wurde bereits in Erythrozyten von Chorea Akanthozytose und McLeod Syndrom Patienten nachgewiesen (Clark et al. 1989 und Ballas et al. 1990).

Zusammenfassend lässt sich in Bezug auf das Calcium bei der Chorea Akanthozytose sagen, dass die Untersuchungen bisher teilweise widersprüchliche Ergebnisse zeigen und die Beteiligung des Calciums an der Pathophysiologie der Neuroakanthozytose Syndrome noch ungeklärt ist.

McLeod Syndrom

Das McLeod Syndrom wird x-chromosomal rezessiv vererbt und beruht auf einem Fehlen des XK-Proteins. Das XK-Protein ist Teil der Zellmembran von Erythrozyten und ist hier gebunden an Kell-Glykophorin, welches bei McLeod Patienten ebenfalls vermindert vorliegt (De Franceschi et al. 2014). Die neurologische Symptomatik ähnelt der, der Chorea Akanthozytose, ist jedoch oft weniger stark ausgeprägt. Zusätzlich entwickeln McLeod Syndrom Patienten häufig zusätzlich eine Kardiomyopathie und kompensierte hämolytische Anämien (Jung et al. 2011).

Zu Veränderungen von Erythrozyten von McLeod Patienten liegen nur wenige Daten vor. Die bekannte zugrunde liegende Mutation liegt im XK-Protein, welches in gesunden Erythrozyten in der Zellmembran vorkommt und bei McLeod fehlt. Ebenso weisen Patienten ein vermindertes Kell-Glykophorin auf, das normalerweise an XK gebunden in der Membran vorliegt. Obwohl in McLeod

bisher keine Mutation in VPS13A nachgewiesen wurde, scheint auch bei diesen Patienten Chorein vermindert in den Zellen vorzuliegen (Urata et al. 2019). Die Ursache dessen könnte darin liegen, dass XK Komplexe mit Vps13a bildet (Park et al. 2020). Weiterhin wurden auch für das McLeod Syndrom wie oben bei der Chorea Akanthozytose beschrieben verstärkte Kinaseaktivitäten in Erythrozyten beschrieben (De Franceschi et al. 2012)

Auch beim McLeod Syndrom scheinen postranskriptionale Modifikationen von Zytoskelettbestandteilen eine Rolle zu spielen. Im Vergleich zu gesunden Erythrozyten wurde hier eine verstärkte Phosphorylierung von Ankyrin und Protein 4.1 nachgewiesen (De Franceschi et al. 2014).

Huntington Disease like 2 und Pantothenkinase-assoziierte Neurodegeneration

Huntington Disease like 2 ist eine autosomal dominant vererbte Trinukleotiderkrankung, bei der es zu Triplet-Repeats im Junctophilin-3-Gen kommt (De Franceschi et al. 2014). Die Patienten entwickeln ebenfalls Chorea sowie dementielle Symptome, jedoch sind periphere Nerven und Muskeln unauffällig (Jung et al. 2011).

Der Pantothenkinase-assoziierte Neurodegeneration (PKAN) liegt eine Mutation des Gens, welches für die Pantothenkinase 2 codiert, zugrunde. Diese wird autosomal rezessiv vererbt und führt zu Eisenablagerungen im Gehirn. Die Symptome manifestieren sich hier bereits in der Kindheit und umfassen Dystonien, Sprachprobleme und kognitive Einschränkungen sowie Retinopathien (Jung et al. 2011).

Die vorgestellten Erkrankungen führen meistens nach langsam progredientem Verlauf zum Tod. Die Todesursachen sind zum Beispiel Krampfanfälle oder Aspirationspneumonien aufgrund von Schluckstörungen (Jung et al. 2011). Derzeit ist keine kausale Therapie für Neuroakanthozytose Syndrome bekannt und die molekularen Mechanismen der Erkrankungen sind weitestgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen den veränderten Blutzellen und der Degeneration von Neuronen gibt. Möglicherweise führen veränderte Flusseigenschaften der Akanthozyten zur Unterversorgung mit Sauerstoff in bestimmten Hirnarealen (Adjobo-Hermans et al. 2015). Weiterhin scheinen Neuronen, ebenso wie Erythrozyten bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten anfälliger für Stress, Sauerstoffmangel und Infektionen zu sein (Bosman 2018). Des Weiteren lässt sich vermuten, dass beeinträchtigte Signalwege, die in Erythrozyten gezeigt werden konnten auch bei Neuronen eine Rolle spielen und deren Funktion und Überleben schädigen (Siegl et al. 2013).

Tab. 2 Übersicht über Neuroakanthozytose Syndrome (Nach Jung et al. 2011)

	Chorea Akanthozytose	Mc Leod Syndrom	Huntington Disease like 2	Panθοthenkinase- assoziierte Neurodegeneration
Genetik	Erbgang: autosomal rezessiv Gen: VPS13A Protein: Chorein	Erbgang: x-chromosomal rezessiv Gen: XK Protein: XK- Protein	Erbgang: autosomal dominant Gen: JPH3 Protein: Junctophilin-3	Erbgang: autosomal rezessiv Gen: PANK 2 Protein: Panθοthenkinase 2
Manifestations- alter (Jahre)	20-30	25-60	20-40	<14
Symptome	Chorea, orofaziale Dyskinesien, Krämpfe, Lippenbeißen, Psychosen, Areflexie, Muskelatrophie	Chorea, Kardiomyopathie, Kardiale Arrhythmien, hämolytische Anämie, Krämpfe, Areflexie, Muskelatrophie	Chorea, Dystonie	Chorea, Dystonie, Retinopathie, Spastik
Häufigkeit	Wenige 1000 weltweit	Wenige 100 weltweit	Ca. 50 weltweit	1-3 : 1 000 000
Diagnostik	CK erhöht Akanthozyten +++ Westernblot Chorein MRT	CK erhöht Akanthozyten +++ Durchflusszyto- metrie: kein kx- Antigen, Kell- Glykophorin reduziert MRT	Akanthozyten +/- Genetik MRT	Akanthozyten +/- Genetik MRT

1.6 Lyn-Kinase

Die Lyn-Kinase ist eine von neun membranassoziierten Tyrosinkinase aus der Familie der Src-Kinasen (Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Hck, Fgr, Blk, Yrk), die besonders in hämatopoetischen Zellen vorkommen. Die Lyn Kinase und wahrscheinlich auch Hck und Fgr sind in menschlichen

Erythrozyten zu finden (De Franceschi et al. 1997). Es existieren zwei Isoformen der Kinase (Lyn A und Lyn B), die zwei Spleißvarianten darstellen und sich im N-terminalen pY32 unterscheiden. Der Aufbau der Lyn-Kinase ist in Abbildung 6 dargestellt.

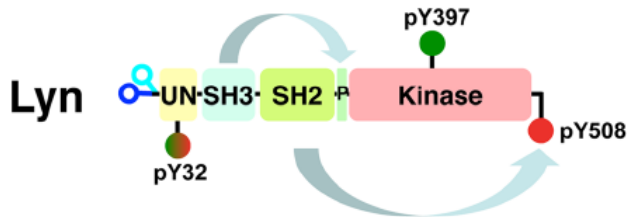


Abb. 6 Aufbau der Lyn-Kinase Lyn verfügt über eine N-terminale SH4-Region (UN), sowie eine SH3 und SH2 Region für Protein-Interaktionen, die sie mit anderen Mitgliedern der Src-Kinasen gemein hat, sowie eine Kinase-Region. Im aktivierten Zustand ist pY397 phosphoryliert, im inaktiven Zustand interagiert SH2 mit dem phosphorylierten pY508 und führt zu einer geschlossenen Konformation der Kinase. Ebenso die Interaktion zwischen SH3 und der Gelenk Region (Prolin (P)) stabilisiert den inaktiven Zustand. pY32, welches nur in der LynA-Isoform vorkommt, scheint ebenfalls an der Regulation der Kinaseaktivität beteiligt zu sein. Häufig ist der N-terminus myristoyliert und palmoytoyliert (blaue Symbole) (Ingley 2012).

Die Lyn Kinase ist Bestandteil zahlreicher zellulärer Signalwege und beteiligt an der Signalweiterleitung über verschiedene Rezeptoren. In reifen Erythrozyten phosphoryliert Lyn zum Beispiel Bande-3-Protein und beeinflusst damit die Bindung der Lipidmembran an das Zytoskelett (Ingley 2012). In Erythroblasten ist Lyn beteiligt am Signalweg, der vom Epo-Rezeptor durch Erythropoietin ausgelöst wird und spielt damit eine Rolle in der Reifung von roten Blutzellen (Tilbrook et al. 1997).

Die Lyn Kinase selbst wird durch sowohl Proteinbindungen als auch Phosphorylierungen reguliert. Im inaktiven Zustand ist pY508 phosphoryliert und bindet an die SH2-Region, wodurch die Kinase in einem geschlossenen und inaktiven Zustand vorliegt. Wird pY508 durch Phosphatasen wie CD45 oder SHP2 dephosphoryliert, löst sich die Bindung und Lyn kann aktiviert werden. Daraufhin kommt es zu einer Autophosphorylierung von pY397, die auch von einer anderen Kinase aus der Familie der SRC-Kinasen ausgeführt werden kann und Lyn ist in einem aktiven Zustand.

In verschiedenen Erkrankungen spielt die Lyn-Kinase eine Rolle. Eine Überexpression der Kinase konnte beispielsweise in Prostatakarzinomen, Kolorektalen Karzinomen, Mammakarzinomen und Glioblastomen gezeigt werden (Ingley 2012). Weiterhin scheint die Lyn-Kinase Teil der Pathophysiologie des Neuroakanthozytose Syndroms Chorea Akanthozytose zu sein (De Franceschi et al. 2011).

1.7 Dasatinib

Dasatinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der heute vor allem in der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie, sowie akuten lymphatischen Leukämie mit Philadelphia Chromosom eingesetzt wird, da der Wirkstoff zu einer Hemmung der BCR-Abl Tyrosinkinase, sowie der Src-Kinasen führt, welche in den Leukämien verstärkt aktiv sind (Konig et al. 2008). Aus diesem Grund wird Dasatinib als Behandlungsoption bei der Chorea-Akanthozytose diskutiert, da auch hier verstärkt aktive Tyrosin-Kinasen nachgewiesen wurden. Es wurde bereits ein individueller Heilversuch bei Chorea Akanthozytose Patienten in Deutschland durchgeführt. Neuere Untersuchungen an Vps13a knockout Mäusen mit Dasatinib zeigten, dass Dasatinib die Lyn-Kinase in Erythrozyten hemmt und zu einer Verbesserung der Autophagie führt. Ein anderer Tyrosinkinaseinhibitor, das Nilotinib zeigte ebenfalls diese Auswirkungen und zusätzlich eine Reduktion der Akanthozyten und auch eine Hemmung der aktiven Lyn-Kinase im ZNS (Peikert et al. 2021).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen einige Eigenschaften von Akanthozyten – pathologischen Formen von Erythrozyten, die bei den Neuroakanthozytosen vorkommen – untersucht werden. Hierbei liegt der Fokus auf der Chorea Akanthozytose und dem McLeod Syndrom. Erythrozyten von Neuroakanthozytose Syndrom Patienten sollen auf ihren basalen Calciumgehalt, das Vorkommen von filamentösem Aktin und das Verhalten bei der Blutsenkung jeweils in Vergleich zu Kontrollzellen von gesunden Spendern untersucht werden. Des Weiteren sollen die Formen der Erythrozyten genauer klassifiziert werden. Dazu werden sowohl klassische Blutausstriche, als auch dreidimensionale Aufnahmen der Zellen mit dem Konfokalmikroskop erstellt. Hier soll vor allem die Genauigkeit und Wiederholbarkeit der Methode überprüft werden.

Neben der Untersuchung der Erythrozyten bei den Neuroakanthozytose Syndromen, sollen weiterhin die übrigen Laborparameter der Patienten bestimmt und mit gesunden Kontrollen verglichen werden.

Um in Zukunft auch den Aufbau von Zellbestandteilen, wie dem Zytoskelett, welches bei Erkrankungen der Erythrozyten verändert sein kann, untersuchen zu können, wird in dieser Arbeit eine neue Methode getestet, die die Auflösung von Zellstrukturen mit herkömmlichen Mikroskopen verbessern soll. Diese sogenannte Expansionsmikroskopie wird im Rahmen dieser Arbeit erstmals mit Erythrozyten durchgeführt.

Außerdem soll untersucht werden, ob sich Neuroakanthozytose Syndrom induzierte Veränderungen in der Erythropoese widerspiegeln. Dazu wird die Erythropoese in vitro durchgeführt und mit Hilfe der Durchflusszytometrie charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 3 aufgelistet

Tab. 3 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Binder DE
CCD-Kamera DP73	Olympus JPN
Confocal Head CSU-W1	Yokogawa Electric Corporation JPN
Confocal Laser Beam LU-NV Laser Unit 647nm/488nm	Nikon JPN
Digitalkamera Orca-Flash 4.0	Hamamatsu Photonics JPN
Durchflusszytometer LSRFortessa	BD US
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf DE
Laser Scan Mikroskop LSM 880	Zeiss DE
Malassez Zählkammer	Marienfeld DE
Mikroskop Eclipse Ti	Nikon JPN
Mikroskop BX60	Olympus JPN
Mikroskopie Objektiv CFI Plan Apo Lambda 60x oil NA=1,40	Nikon JPN
Mikroskopie Objektiv Plan Apo TIRF 100x oil NA=1,49	Nikon JPN
Zentrifuge Z 326 K	Hermle Labortechnik DE

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tab. 4 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Dispette original GS1500	Guest Scientific AG SFR
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5ml und 2ml	Eppendorf DE
Mikroskopie Deckgläschen	VWR US
Mikroskopie Objektträger	VWR US
Multiwellplatten	Greiner Bio-One AT
Petrischalen	Greiner Bio-One AT

Pipetten	Eppendorf DE Sarstedt DE
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One AT
Rundboden Teströhrchen	BD US
Serologische Pipetten 10ml und 25ml	Sarstedt DE
Zentrifugenröhrchen 14 ml und 50ml	Greiner Bio-One AT

2.1.3 Software

Die in dieser Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 5 aufgelistet

Tab. 5 Software

Software	Entwickler
3dsmax	Autodesk USA
FacsDiva	BD US
FlowJo	BD US
ImageJ	Wayne Rasband (NIH) US
MatLab R 2017a	MathWorks US
NIS-Elements	Nikon JPN
Prism 8	GraphPad Software US
ZEN	Zeiss DE
Microsoft Word 2013	Microsoft Coporation US

2.1.4 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tab. 6 Chemikalien

Reagenz	Hersteller	Stockkonzentration
Acrylamid	Sigma Aldrich US	
Acryloyl X SE	Thermo Fisher Scientific US	5mg/500µl DMSO
Ammoniumchlorid NH ₄ Cl	Grüssing GmbH DE	
Antikörper Anti-Human CD235a PE	BioLegend US	
Antikörper Anti-Human CD71 VioBlue	Miltenyi Biotech DE	
Antikörper Anti-alpha1- Spektrin	Thermo Fisher Scientific US	

Ammoniumpersulfat APS	Sigma Aldrich US	10g/100ml Wasser
Antikörper Goat Anti-rabbit Alexa Fluor488	Thermo Fisher Scientific US	2 mg/ml
Antikörper Goat Anti-rabbit Alexa Fluor647	Thermo Fisher Scientific US	2 mg/ml
Bovines Serum Albumin	Sigma Aldrich US	
CaCl ₂ Calciumchlorid	Sigma Aldrich US	
Cell Mask deep red Plasma membrane stain	Thermo Fisher Scientific US	0,5mg/ml
CellQuin	Sanquin, NL	
CellTak	Corning US	
Dasatinib	SYNkinase Australia	1 mmol/l
Dexamethason	Sigma Aldrich	1 mM in Ethanol
Dimethylsulfoxid DMSO	Sigma Aldrich	
Draq5	Abcam USA	5mM
EDTA	Thermo Fisher Scientific	
Ethanol	Merck DE	
Erythropoietin	Prospec Israel	6,66µg/ml
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Sanquin NL	70µg/ml
Fetales Kälberserum FCS	Thermo Fisher Scientific USA	
Fluo-4	Thermo Fisher Scientific USA	
Ficoll-Paque™	GE Healthcare US	
Gimsa-Lösung	Carl Roth DE	1/20 in Wasser
Glucose	Sigma Aldrich USA	
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich USA	25% in Wasser
Heparin	MP Biomedicals	5000 IU/ml
HEPES	Carl Roth DE	
Isotypenkontrolle: Brilliant Violet 510 Mouse IgG1 κ Isotype control Antibody	BioLegend USA	
Isotypenkontrolle: Mouse IgG1 PE-conjugated antibody	R&D Systems USA	
L-Glutamin	Merck DE	
KH ₂ PO ₄ Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich USA	
KHCO ₃ Kaliumbicarbonat	Merck DE	

KCl Kaliumchlorid	Carl Roth DE	
May-Grünwald-Lösung	Carl Roth DE	
Methanol	Merck DE	
N,N'-Methylenbisacrylamid	Sigma Aldrich USA	
MgCl ₂ Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich USA	
MgSO ₄ *7H ₂ O	Grüssing GmbH DE	
Microbeads CA 20	Microbeads AS Norwegen	
Natriumacrylat	Sigma Aldrich USA	
NaHCO ₃ Natriumbicarbonat	Sigma Aldrich USA	
NaCl Natriumchlorid	Sigma Aldrich USA	
PBS	Gibco Thermo Fisher USA	
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich USA	
Phalloidin Atto 488	Atto-Tec DE	10µM in Methanol
Phalloidin Atto 647N	Atto-Tec DE	10µM in Methanol
Plasma		
Propidiumiodid	Thermo Fisher Scientific USA	
Proteinase K	New England Biolabs US	
Stem cell factor SCF	ITK Diagnostics BV NL	10mg/ml
Triton X-100	ITW Reagents USA	
Tetramethylenethyldiamid TEMED	Thermo Fisher Scientific USA	10g/100ml
Tris-HCl	Sigma Aldrich USA	
Wheat germ Agglutinin Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific USA	

2.1.5 Lösungen

Die Zusammensetzungen der in dieser Arbeit verwendeten Lösungen sind in Tabelle 7 aufgelistet

Tab. 7 Lösungen

Erythrozyten-Lyse-Puffer	155 mM NH ₄ Cl 12 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA
HEPES Puffer	132 mM NaCl 6 mM KCl 1 mM MgSO ₄ *7H ₂ O 1,2 mM KH ₂ PO ₄

	20 mM HEPES pH-Wert 7,39 280-295 mOsm/l
Monomer Stock Lösung (Stock X)	8,6g/100ml Natriumacrylat 2,5g/100ml Acrylamid 0,15g/100ml N,N'-Methylenbisacrylamid 11,7g/100ml NaCl
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Tyrode	135 mM NaCl 5,4 mM KCL 10 mM Glucose 10 mM HEPES 1 mM MgCl ₂ 1,8 mM CaCl ₂
Verdauungspuffer	0,5g/100ml Triton X-100 0,2m/100ml EDTA (0,5 M) 5ml/100ml Tris-HCl (1 M) 4,67 g/100ml NaCl

2.2 Methoden

2.2.1 Einwilligung der Spender und Ethikvotum

Die für diese Arbeit verwendeten Blutproben stammen von Spendern, die über den Zweck und die Verwendung der Proben informiert wurden und dieser zugestimmt haben. Die Identität der Spender wurde in der Arbeit anonymisiert.

Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes unter der Kennnummer 51/18 und mit dem Titel

Untersuchung zellulärer und kollektiver Eigenschaften von Blut und dessen Bestandteilen

genehmigt.

2.2.2 Laborwerte

Die gewonnenen Blutproben von Patienten und gesunden Kontrollspendern wurden für einen Routine Laborbefund dem Zentrallabor des Universitätsklinikum des Saarlandes zugeführt. Hier wurden die in Tabelle 8 dargestellten Werte bestimmt.

Tab. 8 Laborwerte

<i>Klinische Chemie (EDTA-Blut)</i>	<i>Eiweiß, Albumin</i>
<i>Hämatologie (EDTA-Blut)</i>	<i>Leukozyten, Erythrozyten, Hb, Hkt, MCV, MCH, MCHC, RDW, Thrombozyten, MPV</i>
<i>Gerinnung (Citrat-Blut)</i>	<i>Fibrinogen</i>
<i>Immunologie</i>	<i>CRP, IgG, IgM</i>

2.2.3 Zellkultur

Die Untersuchung der Erythropoese in vitro erfolgte anhand eines zweistufigen Zell-Kultur Protokolls. Zunächst wurden Stammzellen aus dem peripheren Blut isoliert, welche sich dann etwa 11 Tage in einem Expansionsmedium geteilt haben. Daraufhin folgte die Differenzierung zu Retikulozyten, welche etwa in einem Zeitraum von 13 Tagen stattfand.

Isolierung von mononuklearen Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs)

Zur Isolation von Stammzellen aus dem peripheren Blut wurden zunächst 5ml der Blutprobe mit 5ml PBS verdünnt und daraufhin vorsichtig auf 20ml Ficoll-Paque™ pipettiert. Dieses weist eine Dichte von 1,077g/ml auf und dient der Dichtegradientenzentrifugation. Daraufhin wurde die Probe 30 min

bei 400 xg und einer Deceleration von 0 zentrifugiert. Damit wurde eine Separierung von Erythrozyten und PBMCs sowie Plasma der Probe ermöglicht, dieser Schritt ist in Abbildung 7 dargestellt. Die PBMCs enthaltende Schicht wurde abpipettiert und in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Diese wurde dann bei 500 xg 5 min zentrifugiert und mit PBS gewaschen, bis der Überstand klar war. Verbleibende Erythrozyten wurden durch Zugabe von Red Blood Cell Lysis Buffer für 10 min lysiert. Die Probe wurde erneut gewaschen um den Lysepuffer zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen entweder eingefroren (s.u.) oder mit Hilfe einer Mallasez-Zählkammer gezählt und in einer Dichte von 10 Mio. Zellen/ml in CellQuin Zellkulturmedium verdünnt. Es wurden 1µM Dexamethason (dex), 100 ng/ml Stem cell factor (SCF) und 2 U/ml Erythropoietin (EPO) hinzugegeben und die Suspension in Zellkultur-Multiwellplatten überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 Grad Celsius Temperatur und 5% CO₂ Gehalt.

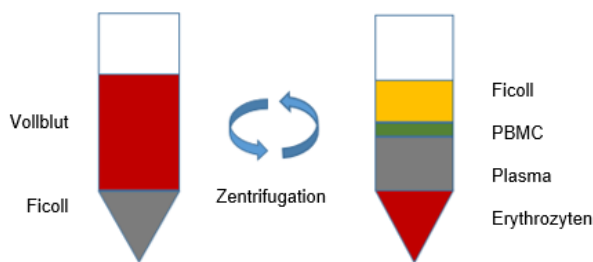


Abb. 7 Auftrennung des Blutes nach Dichtegradienten in Plasma, PBMCs, Ficoll, Erythrozyten. Links ist die Probe vor der Zentrifugation dargestellt. Das aufzutrennende Blut wird vorsichtig auf Ficoll pipettiert und so entstehen zwei Phasen. Rechts nach der Zentrifugation: Durch die unterschiedliche Dichte der Bestandteile des Blutes liegen diese nun aufgetrennt vor.

Expansion

Zwei Tage nach Isolierung der Stammzellen wurde die Hälfte des Mediums ausgewechselt. Dabei wurde das frische Medium mit 2 IU/ml Epo, 100 nmol/ml SCF angereichert und mit der Zellsuspension gemischt. Die gesamte Lösung wurde dann auf 1µM Dexamethason eingestellt (vgl. Tab. 9)

Der Wechsel des halben Mediums erfolgt daraufhin alle zwei Tage. Die Zellen wurden regelmäßig in neue Platten überführt, um Makrophagen zu beseitigen. Ab Tag 7 der Expansion kommen Erythroblasten auf. Nun wurden diese jeden Tag gezählt und jeweils auf eine Dichte von $0,7 \times 10^6$ /ml verdünnt.

Am 13. Tag der Expansion wurde mit der Zelldifferenzierung begonnen.

Differenzierung

Um die Differenzierung der Zellen zu beginnen, wurden zunächst die Kulturen bei 500 xg für 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Daraufhin wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und gezählt. Für die Differenzierung wurden die Zellen in einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ /ml ausgesät. Das Differenzierungsmedium setzt sich aus 10 IU/ ml Epo, 5 IU/ ml Heparin, 5 % Plasma und 700 µg/ ml Holotransferrin zusammen (vgl. Tab. 9)

Tab. 9 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Expansionsmedium	Cell Quin Zellkulturmedium Erythropoietin 2 IU/ml Stem Cell Factor 100 nmol/ml Dexamethason 1 µmol/l
Differenzierungsmedium	Cell Quin Zellkulturmedium Erythropoietin 10 IU/ml Heparin 5 IU/ml Plasma 5% Holotransferrin 700 µg/ml

Zellzählung

Die Zählung der Erythroblasten erfolgte mit Hilfe einer Malassez-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Dazu wurden 10µl der Zellen in Kulturmedium mit 90µl PBS verdünnt. 15µl der Zellsuspension wurden dann in ein Feld der Zählkammer pipettiert und 10 Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zahl in 10 Quadraten korrespondiert mit der Anzahl von Zellen in 0,1µl.

Behandlung mit Dasatinib

Zu Beginn der Differenzierung an Tag 0 und jeden zweiten Tag während der Zelldifferenzierung, wenn die Hälfte des Mediums durch Frisches ersetzt wurde, wurde 100 nM Dasatinib zum gesamten Zellkulturmedium hinzugegeben

2.2.4 Durchflusszytometrie

Theorie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das verschiedene Eigenschaften von einzelnen Zellen messen kann. Dazu gehören die Größe, die innere Granularität und auch Fluoreszenzsignale. Zellen werden mit Hilfe einer Flüssigkeit einzeln durch ein Rohr geleitet und mit einem Laser gescannt. Das Fluoreszenz- oder Streulichtsignal wird dann von verschiedenen Detektoren aufgefangen, sodass alle Parameter parallel erfasst werden und die Zellen anhand ihrer Eigenschaften in verschiedenen

Populationen dargestellt werden können. Mit einigen Geräten können Zellen auch anhand dieser detektierten Parametern sortiert werden (fluorescence-activated-cell-sorting FACS).

Überwachung der Erythropoese

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann anhand von Oberflächenmarkern auf den Zellen der Stand der Erythropoese bestimmt werden. In diesem Experiment wurden hierfür CD71 (Transferrinrezeptor) und CD235a (Glykophorin a) verwendet. Für die Zählung von toten Zellen in der Kultur wurde Propidiumiodid (PI) genutzt und die Eukleation wurde mit Hilfe von Draq5 überwacht.

Die Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie wurde nach folgendem Schema durchgeführt: Insgesamt wurden pro Kultur vier gefärbte Proben vorbereitet, bei denen jeweils 500.000 Zellen gefärbt wurden. Gegen CD71 und CD235a wurden Farbstoff-gekoppelte Antikörper verwendet und PI und DRAQ5 sind selbst fluoreszente Farbstoffe, welche an Strukturen der Zellen binden. Neben einer ungefärbten Probe und einer Isotypenkontrolle für PE und VioBlue (die Farbstoffe, die an die Antikörper gekoppelt waren) wurde eine Probe mit CD71 VioBlue und CD235a PE gefärbt und eine mit PI und Draq5. Die verwendeten Antikörper- und Farbstoffkonzentrationen, sowie deren jeweilige maximale Anregungswellenlängen (Max. Ex.) und Emissionswellenlängen (Max. Em.) sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10 Übersicht über die verwendeten Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie

Antikörper/Farbstoff	Ziel	Fluoreszenzsignal	Konzentration
CD71	Transferrinrezeptor; exprimiert von Proerythroblasten	Farbstoff: VioBlue Max. Ex.: 490-495 nm Max. Em.: 518 nm	1:50
Mouse Anti-Human CD235a	Glykophorin A; exprimiert von Retikulozyten und reifen Erythrozyten	Farbstoff: Phycoerythrin (PE) Max. Ex.: 650 nm Max. Em.: 660 nm	1:400
Propidiumiodid (PI)	Bindet DNA von toten Zellen, da nur diese eine für PI permeable Zellmembran haben	Max. Ex.: 488 nm Max. Em.: 590 nm	1: 2000
Draq5	Bindet DNA	Max. Ex.: 647 nm Max. Em.: 681 nm	1: 2500
Isotypen Kontrolle	Unspezifische Antikörper- Bindungen		1:200

Die Zellen wurden zunächst mit HEPES Lösung gewaschen. Dann wurden die Antikörper und Isotypenkontrollen in der jeweiligen Konzentration verdünnt in HEPES Lösung mit 0,5 % BSA hinzugegeben und für 30 min bei 4 Grad Celsius inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und zu den entsprechenden Proben die Farbstoffe PI und Draq5 hinzugegeben.

Dann wurde die Durchflusszytometrie mit dem LSRFortessa von BD durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software FlowJo. Grundlage für die Analyse stellt das sogenannte Gating dar. In diesem Schritt werden Abgrenzungen in den erhaltenden Punktdiagrammen gesetzt und so Populationen (z.B. Zellen – Zelltrümmer, ungefärbte Zellen – gefärbte Zellen) voneinander getrennt. Wie das Gating in diesem Experiment vorgenommen wurde, zeigt exemplarisch Abb. 8.

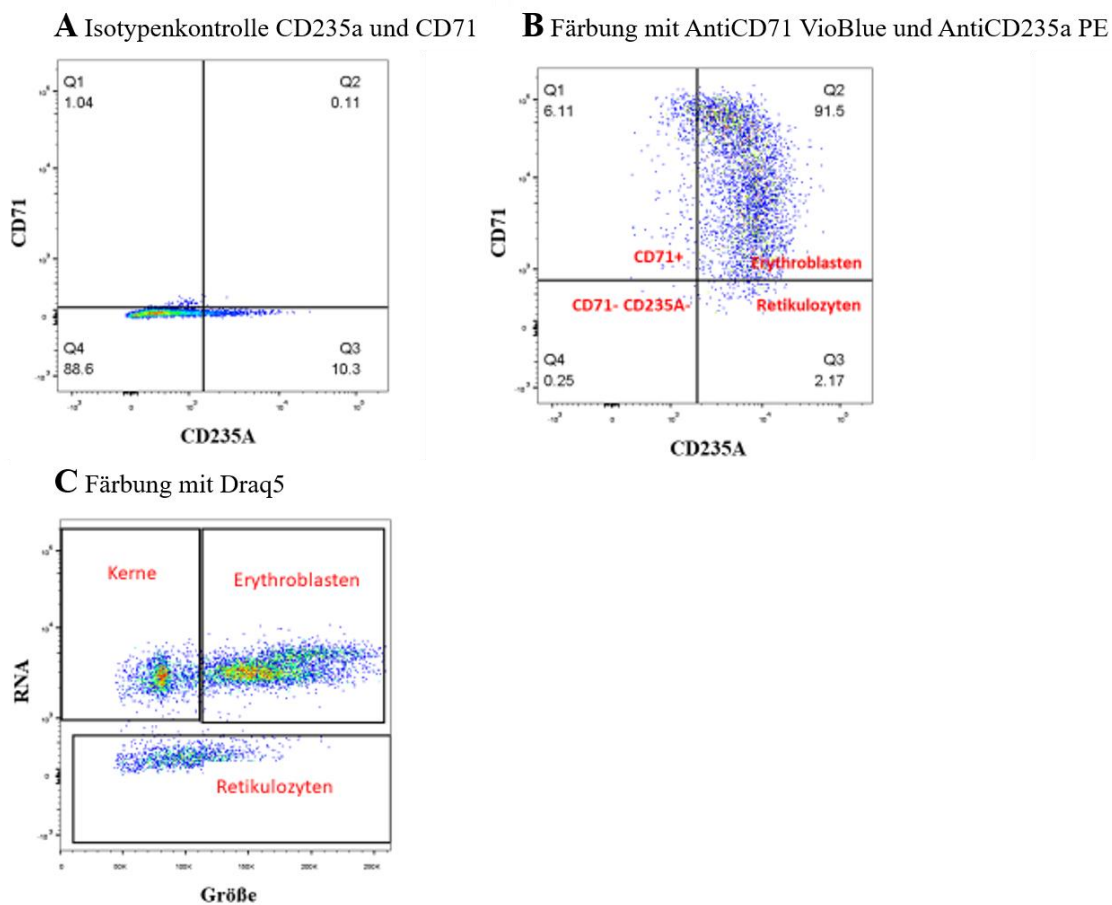


Abb. 8 Beispielhafte Darstellung des Gatings. Nachdem in einem ersten Schritt die Zellpopulation von Zelltrümmern abgegrenzt und nur einzelne Zellen in die Auswertung einbezogen wurden, kann die Isotypenkontrolle verwendet werden, um in einer nicht gefärbten Probe das Gating zu setzen (Abb. 8A). Hiermit wird ein Quadrant (Q4) festgelegt, in dem ungefärbte Zellen beim Experiment auftauchen. Das gleiche Gating wird dann für die gefärbten Proben übernommen und man erhält eine Abbildung wie in B. Hier sind CD71 gegen CD235a aufgetragen (Tag 4 der Differenzierung). Während der Erythropoese verlaufen die Zellen vom linken oberen Quadranten (CD71+) über rechts oben (CD71+ CD235a+) nach rechts unten (CD235a+). Für die Darstellung der Enukleation (C) wird mit der Isotypenkontrolle für Draq5 gleich verfahren, wie zuvor beschrieben. Hier lassen sich dann in der gefärbten Probe Gatings für Zellkerne (Draq5+ und klein), Proerythroblasten (Draq5+ und groß), sowie für Retikulozyten abgrenzen.

2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie und Konfokalmikroskopie

Für einige Versuche in dieser Arbeit wurde ein Konfokalmikroskop verwendet, dessen Funktionsweise im Nachfolgenden kurz dargestellt wird, bevor die einzelnen Versuche detailliert beschrieben werden.

Für die Fluoreszenzmikroskopie ist von Bedeutung, dass einige Moleküle die Eigenschaft besitzen, bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, energieärmere, längere Wellen zu emittieren. So können mit der Fluoreszenzmikroskopie beispielsweise Zellstrukturen mit solchen fluoreszierenden Stoffen markiert und sichtbar gemacht werden. Bei dieser Methode wird das Anregungslicht heute häufig durch einen Laser erzeugt. Im Mikroskop ist dafür ein sogenannter dichrotischer Spiegel verbaut, der das Licht einer Wellenlänge reflektiert und das einer anderen Wellenlänge passieren lässt. So gelangt das Anregungslicht des Lasers auf die Probe und das Fluoreszenzlicht zum Detektor. Der Strahlengang bei einem solchen Fluoreszenzmikroskop ist in Abbildung 9 dargestellt.

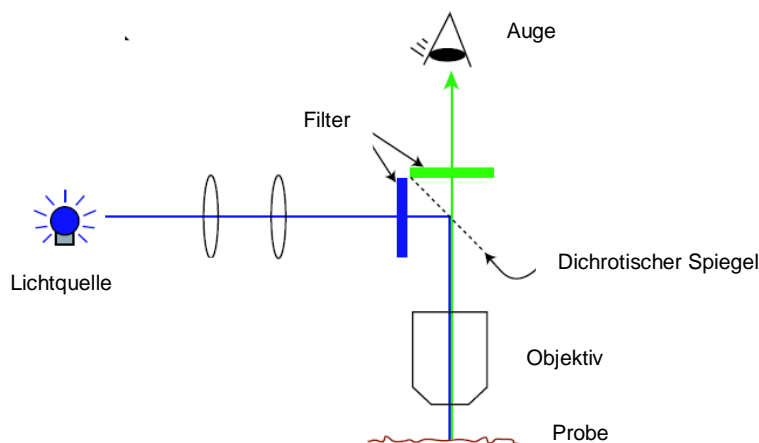


Abb. 9 Schematische Darstellung des Strahlengangs bei einem Fluoreszenzmikroskop. Das Anregungslicht gelangt über einen Filter der passenden Wellenlänge entlang des dichrotischen Spiegels auf die Probe. Von dort wird Licht einer anderen Wellenlänge emittiert und erreicht durch den dichrotischen Spiegel das Auge des Betrachters (Abbildung bearbeitet aus Weeks et al. 2005).

Ein Konfokalmikroskop verbessert durch seinen speziellen Aufbau die Auflösung in z-Richtung und den Kontrast des zu untersuchenden Bildes. Um dieses möglich zu machen, wird die Probe Punkt für Punkt rasterförmig abgescannt (bei Laser-Scan Mikroskopen) oder der Laserstrahl durch eine rotierende sogenannte Nipkow-Scheibe geleitet und dabei Licht von außerhalb der Fokalebene abgeschirmt. Diese Abschirmung geschieht durch den Einsatz von zwei Lochblenden. Eine befindet sich zwischen Lichtquelle und Probe, die zweite Lochblende wird vom emittierten Licht passiert und liegt daher zwischen Probe und Detektor (vgl. Abbildung 10). Da eine vollständige Betrachtung der Probe bei dieser Technik nicht möglich ist, erzeugt ein Computer aus den einzelnen Scans ein Gesamtbild. Aus den einzelnen z-Schnitten kann dann ein dreidimensionales Bild erzeugt werden.

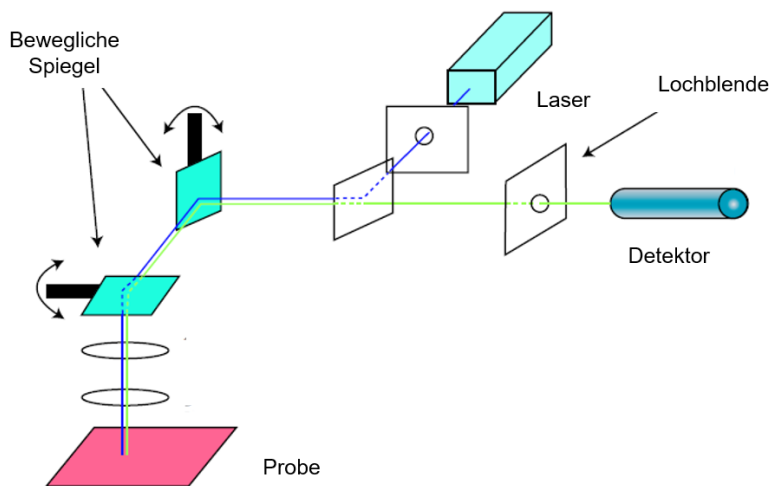


Abb. 10 Schematische Darstellung des Aufbaus eines Konfokalmikroskops. Das Licht, das durch einen Laser erzeugt wird, passiert die erste Lochblende und wird vom dichrotischen Spiegel über bewegliche Spiegel zur Probe geleitet. Die Spiegel sorgen für eine Punkt-für-Punkt Rasterung der Probe. Das Fluoreszenzlicht gelangt dann durch den dichrotischen Spiegel und durch eine zweite Lochblende zum Detektor. (Abbildung aus: Weeks et al. 2005)

2.2.6 3D Aufnahmen von Erythrozyten

50 μ l Vollblut wurde in 1 ml 0,1 % Glutaraldehyd für mehrere Tage fixiert und dann drei mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1300 xg für 4 min). Die Färbung der Erythrozyten erfolgte mit Cell Mask deep red. Dafür wurde der Farbstoff in einer Konzentration von 0,5 mg/ml mit PBS verdünnt und 5 μ l dieser Verdünnung in 1 ml Zellsuspension gemischt. Daraufhin folgte eine Inkubationszeit von 48 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Die Proben wurden weitere drei Mal mit PBS gewaschen.

Die Aufnahmen erfolgten mit dem Konfokalmikroskop. Dazu wurde ein Glasdeckgläschen mit 20 μ m großen Beads, die in PBS suspendiert wurden, punktförmig bedeckt. Diese Beads dienen als Abstandhalter zwischen den Deckgläsern und verhindern so eine Verformung der Zellen. Dann wurden 80 μ l der gefärbten Zellsuspension auf das Glas pipettiert und mit einem zweiten Deckglas bedeckt.

Daraufhin wurden mit dem Konfokalmikroskop Scans in z-Richtung mit den in Tabelle 11 dargestellten Einstellungen durchgeführt.

Anschließend wurden alle Zellen anhand ihrer Morphologie manuell in 5 Gruppen eingeteilt. Die Einteilungskriterien sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tab. 11 Mikroskop- und Kamera-Einstellungen 3D Aufnahmen

Mikroskop Einstellungen	Laser	Kameraeinstellungen	z-Scan Ti Piezo ZDrive
Modus: Konfokal	Exzitationswellenlänge: 647 nm	Belichtungszeit 20ms	Schrittgröße: 0,3 µm
Objektiv: 60x	Laserintensität: 100 %	Kein Binning	Anzahl der Schritte: 68
Pinhole: 50 µm			

Tab. 12 Einteilungskriterien Zellformen

Zellform	Morphologie
Stomatozyten	Zelle mit nur einseitiger Wölbung. Mundförmige zentrale Eindellung auf der anderen Seite
Echinozyten	Zelle mit regelmäßig verteilten, kurzen Ausläufern der gleichen Größe
Diskozyten	Flache, runde Zelle mit beidseitiger zentraler Eindellung
Akanthozyten	Zelle mit unregelmäßigen langen Ausläufern
Andere	Zellformen, die keiner der o.g. Gruppen eindeutig zugeordnet werden konnten
	(Ford 2013)

2.2.7 Blutausstriche

Für die Blutausstriche der Chorea-Akanthozytose Patienten und Kontrollen wurde Vollblut zunächst 1:1 mit einer Lösung aus 0,9% NaCl und 5 IU/ml Heparin gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden Ausstriche dieser Lösung auf Glasobjektträgern angefertigt.

Für die Färbung der Blutausstriche wurden diese zunächst mit 0,5ml May-Grünwald-Lösung überschichtet und für 3min inkubiert. Danach wurden sie mit 0,5ml Aqua dest. für 1 min überschichtet. Die Objektträger wurden dann mit Aqua dest. abgespült und danach mit Giemsa-Lösung überschichtet, die für 20min einwirken gelassen wurde. Dann wurden die Objektträger erneut mit Wasser gespült und trocknen gelassen. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Mikroskop der Marke

Olympus (BX60) mit einem 40x Luftobjektiv und einer CCD-Kamera von Olympus (DP73). Die Zellen wurden dann anhand der Fotos nach Akanthozyten, Echinozyten und Diskozyten ausgezählt.

2.2.8 Expansionsmikroskopie

Theorie:

Die Expansionsmikroskopie ist ein Verfahren, mit dem Proben in ein Gel eingebettet werden, das durch Wasserzugabe anschwillt und so die Probe gleichmäßig dreidimensional vergrößert wird. So ist es möglich, mit konventionellen Mikroskopen eine bessere Auflösung zu erzielen. Die Proben können mit Hilfe der Expansionsmikroskopie etwa um den Faktor 4,5 vergrößert werden und die Auflösung liegt dann bei 70nm (Chen et al. 2015). Diese Methode wurde bisher für RNA, Proteine und histologische Präparate entwickelt. In dieser Arbeit wurde das Protokoll der „Protein Retentions Expansionsmikroskopie“ verfolgt. Hierbei werden konventionelle Fluorochrom-gekoppelte Antikörper genutzt, die an das zu expandierende Gel gebunden werden. Dieses ist eine Weiterentwicklung des ursprünglichen Protokolls, das selbst hergestellte Marker benötigt hat (Tillberg et al. 2016). Die Schritte, die durchgeführt werden müssen, um eine expandierte Probe zu erhalten, die dann mit einem Konfokalmikroskop dargestellt werden kann, sind Folgende, die zusätzlich in Abbildung 11 dargestellt sind:

1. (optional: Aufbringen auf einem Deckglässchen)
2. Fixierung der Zellen
3. Färbung der Zellen
4. Einbetten der Zellen in das Gel
5. Verdauung der Zellstrukturen
6. Expansion
7. Mikroskopie

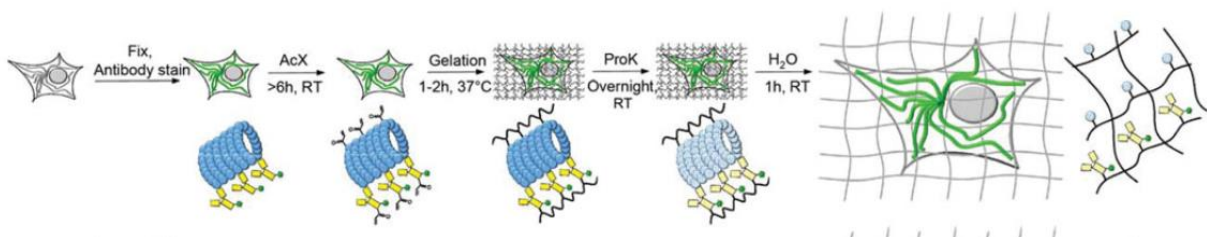


Abb. 11 Darstellung der Schritte der Expansionsmikroskopie. Zunächst erfolgt an der ursprünglichen Probe die gewünschte Färbung. Schritt 2 ist die Inkubation mit Acrylyl-X, welches die Färbung stabilisieren soll. Hier dargestellt für 6 Stunden, wobei in späteren Protokollen 3 Stunden verwendet wurden. Durch die Einbettung ins Gel ergeben sich keine Veränderungen an der Probe. Die Verdauung mit Proteinase K trennt die Strukturen der Zelle auf, welche dann durch Zugabe von Wasser auseinandergezogen werden (Asano et al. 2018).

Aufbringen der Zellen auf ein Deckgläschen

Für die Einbettung der Zellen in ein Gel und die darauffolgende Expansion wurde das von Asano et al. 2018 veröffentlichte Protokoll der ProExM (Protein Retentions Expansionsmikroskopie) befolgt. Da im Gegensatz zu den im Protokoll verwendeten Zellen die roten Blutzellen in Suspension vorlagen, wurden diese in einigen Versuchen zunächst auf Glasdeckgläschen mit CellTak befestigt. Dazu wurde der Zellkleber mit Natriumbicarbonat gemischt (Verhältnis 1:29) und für 20 Minuten auf dem Glas inkubiert. Danach wurde das Glas mit PBS gewaschen und die Zellsuspension wurde daraufgegeben. Die Zellen wurden 10 Minuten sedimentieren gelassen und erneut mit PBS gewaschen.

Wurden die Zellen in Suspension geliert, fand die Fixierung und Färbung (s.u) im Eppendorfgefäß statt.

Fixierung

Wurden die Erythrozyten zuvor mit CellTak auf ein Deckgläschen gebracht, wurden diese für 10 min mit 0,1 % Glutaraldehyd überschichtet und dann mehrmals mit PBS abgespült. Fand die Expansion später mit suspendierten Zellen im Eppendorfgefäß statt, wurde hierfür 50µl Vollblut für 10 min mit 0,1 % Glutaraldehyd inkubiert. Darauf folgte dreimaliges Waschen mit PBS bei jeweils 1300 xg für 4 min.

Färbung

In dieser Arbeit wurden zwei Zellstrukturen der roten Blutzellen mit verschiedenen Farbstoffen gefärbt. Zum einen wurde Wheat germ agglutinin (gekoppelt an AlexaFluor488)(WGA) verwendet, welches an Bestandteile der Glykokalix bindet (Bindung an Glykokonjugate wie N-Acetylneuraminsäure und N-Acetylglucosamin (Monsigny et al. 1980)). Weiterhin sollte das Zytoskelett der Erythrozyten dargestellt werden. Hierfür wurde das Aktin mit dem Farbstoff Phalloidin 647N gefärbt.

Die Proben wurden zunächst 10 min mit 2µg/ml WGA inkubiert und mit PBS gewaschen. Dann folgte die Permeabilisierung der Membran mit 0,5% Triton für ebenfalls 10min. Danach wurde Phalloidin für 30 min hinzugegeben. Nach der Inkubation und erneutem Waschen mit PBS konnte mit der Gelation begonnen werden.

Gelation

Auf die Zellen wurde AcryloylIX (AcX) in einer Konzentration von 1:100 pipettiert und für mindestens 3 Stunden inkubiert. Das AcX bindet an die Proteine und wird später in das Gel eingebettet (siehe Abbildung 12). Nach drei Stunden wurden die Zellen zwei mal mit PBS gewaschen. Die Gelkammern wurden vorbereitet, indem zwei Objektträger mit Parafilm bedeckt wurden, die den Boden und den Deckel der Kammer bilden. Als Abstandshalter wurden jeweils drei Deckgläschen

(Dicke: 1,7mm) benutzt. Das Deckglas mit den Zellen wurde mit der Zellseite nach oben auf den Boden der Gelkammer gelegt (vgl. Abbildung 13 für den Aufbau der Gelkammer). Die Komponenten der Gellösung (Monomerlösung Stock X, TEMED, APS, Wasser) wurden langsam aufgetaut, indem die Eppendorfgläser für etwa eine Stunde auf Eis gestellt wurden. Für die Gelierung wurden die Komponenten im Verhältnis 47:1:1:1 gemischt. Für eine Probe wurden etwa 50 µl Gellösung verwendet. Diese wurde auf die Zellen pipettiert und der Deckel der Kammer daraufgelegt und mit leichtem Druck befestigt. Dabei musste ein Scheren der beiden Gläser verhindert werden, um das Gel nicht zu beschädigen. Die Gelkammer wurde für 1 h bei 37 Grad inkubiert

Wurden die Zellen in Suspension geliert, wurden die gleichen Gelationskammern verwendet, die Gellösung wurde jedoch direkt im Eppendorfgläser mit den pelletierten Zellen gemischt und diese Suspension auf ein Deckgläschen in der Gelkammer pipettiert.

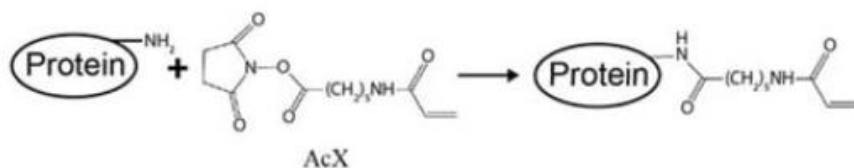


Abb. 12 Aufbau und Bindung von Acryloyl-X Acryloyl-X bindet die Aminogruppe der fluoreszenzmarkierten Proteine (Asano et al. 2018).

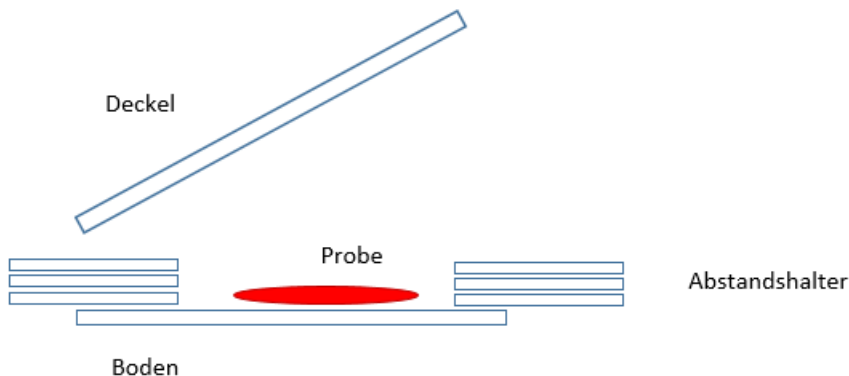


Abb. 13 Aufbau der Gelkammer Boden und Deckel bilden herkömmliche Glasobjektträger. Als Abstandshalter werden je nach gewünschter Dicke des späteren Gels Deckgläschen mit etwas Wasser fixiert. In meinen Versuchen wurden drei Deckgläschen verwendet. Die Probe wird in der Kammer mit dem Gel bedeckt und dann inkubiert. Später wird die Probe wieder aus der Kammer entfernt.

Verdauung

Die Gläser der Gelkammer wurden vorsichtig mit Hilfe eines Skalpellts voneinander getrennt und das Deckglas mit dem Gel unter einem Lichtmikroskop in Form geschnitten, um eine zu untersuchende Region zu erhalten. Das überschüssige Gel wurde vorsichtig vom Deckglas entfernt und das Glas dann

in eine Mikroskopierschale gelegt. Dem Verdauungspuffer wurde Proteinase K im Verhältnis 1:100 hinzugefügt und 2 ml des Puffers zu dem Gel pipettiert. Der Verdauung wurde über Nacht Zeit gelassen.

Expansion

Bereits die Zugabe des Verdauungspuffers führt zu einer Expansion des Gels, die definitive Expansion wurde jedoch durchgeführt, indem zunächst der Verdauungspuffer entfernt und durch Wasser ersetzt wurde. In diesem Schritt konnte auch das Deckgläschen, von dem sich das Gel gelöst hat, entfernt werden. Nach 20 min wurde das Wasser erneut entfernt und durch neues ersetzt. Dieser Schritt wurde insgesamt 3 mal durchgeführt bis die Probe mikroskopiert wurde.

2.2.9 Aktinfärbung mit Phalloidin 647N

Das Aktin im Zytoskelett von Kontroll- und Patientenerthrozyten wurde mit Atto647N gekoppeltem Phalloidin gefärbt. Phalloidin ist ein Toxin aus dem grünen Knollenblätterpilz *Amanita Phalloides*. Der Stoff bindet filamentöses Aktin und stabilisiert diese Form gegen Depolymerisation (Wieland 1987). Für die Färbung wurde folgendermaßen mit den Erythrozyten verfahren: Zunächst wurde Vollblut in PBS in 0,1% Glutaraldehyd für 10min fixiert und daraufhin einmal mit PBS gewaschen (1300 xg 4 min). Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet wurde mit Triton X-100 in einer Konzentration von 0,5% gemischt und für 10 min inkubiert. Triton permeabilisiert die Membran und macht diese durchgängig für den Farbstoff. Die Zellen wurden dann erneut mit PBS gewaschen und daraufhin mit 0,3 µM Phalloidin Atto647N in PBS für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Vor den Aufnahmen wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und dann wurden mit dem Konfokalmikroskop dreidimensionale Aufnahmen mit den in Tabelle 13 stehenden Einstellungen gemacht.

Tab. 13 Mikroskop- und Kameraeinstellungen Aktinmessung

Mikroskop	Laser	Kameraeinstellungen	Z-Scan Ti-Piezo Z-Drive
Modus: Konfokal	Excitationswellenlänge: 647 nm	Belichtungszeit: 200 ms	Schrittgröße: 0,3 µM
Objektiv: 100x	Laserintensität: 100%	Kein Binning	Anzahl der Schritte: 68
Pinhole: 50 µM			

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ. Hier wurden die z-Stacks zunächst mit dem Tool „Z-Projekt“ in eine Ebene gebracht und damit das Fluoreszenzsignal der gesamten Zelle auf eine Bildebene projiziert. Dann wurde das Hintergrundsignal der Bilder subtrahiert und die Raw Integrated Density der einzelnen Zellen gemessen. Dieses Tool addiert alle Werte der in der ausgewählten Region liegenden Pixel. Mit diesem Vorgehen sollte der Gehalt an filamentösem Aktin der gesamten Zelle gemessen werden.

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm Prism 8 verwendet. Zunächst wurden die Werte auf die Kontrollwerte normiert und dann ein ungepaarter t-Test durchgeführt.

2.2.10 Calciummessung

In dieser Arbeit wurde das intrazelluläre Calcium von Chorea Akanthozytose Patienten sowie gesunden Kontrollspendern mit Hilfe einer Fluo-4-Färbung und Konfokalmikroskopie gemessen. Fluo-4 ist ein Calciumdetektor, der bei Bindung an Calcium mit einer Wellenlänge von 488nm fluoresziert. Die Zellen wurden zunächst gefärbt, daraufhin wurden sie mit dem Konfokalmikroskop aufgenommen und das Fluoreszenzsignal gemessen.

Für die Färbung wurde 10µl Vollblut in 1ml Tyrode-Puffer gegeben und für 3 min bei 2500 xg zentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt, durch frischen Tyrode-Puffer ersetzt und diese Schritte 3 mal wiederholt. Zu der 1ml Zellsuspension wurde dann 5µM Fluo-4 gegeben und 1 h bei 37 Grad Celsius inkubiert. Es erfolgte eine weitere Waschung mit Tyrode-Puffer.

Für das Imaging mit dem Konfokalmikroskop wurden Ividi-Mikroskopier-Schalen verwendet. In diese wurden 100µl der Zellsuspension pipettiert und 900µl frischer Tyrode-Puffer ergänzt. Nach der Sedimentation wurden Bilder der Zellen mit den in Tabelle 14 stehenden Einstellungen aufgenommen.

Tab. 14 Mikroskop- und Kameraeinstellungen Calciummessung

Mikroskop	Laser	Kamera
Modus: Konfokal	Excitationswellenlänge: 488 nm	Belichtungszeit: 1000 ms
Objektiv: 100x	Laserintensität: 100%	Kein Binning
Pinhole: 50 µM		

Die Auswertung der Daten wurde mit dem Programm ImageJ vorgenommen. Es wurde jeweils die Mittlere Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen gemessen und die Intensität des Hintergrundes von diesen Werten abgezogen.

Daraufhin folgte die statistische Auswertung der Daten mit dem Programm Prism 8. Hierfür wurden die Werte auf die Kontrollwerte normiert und ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test durchgeführt.

2.2.11 Blutsenkungsgeschwindigkeit

Die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) oder auch Erythrozytensedimentationsgeschwindigkeit nach Westergren bezeichnet die Sedimentation von Erythrozyten in einem speziellen Röhrchen pro Zeiteinheit. Ein erhöhter Wert ist ein unspezifischer Marker für entzündliche Reaktionen wie sie zum Beispiel im Rahmen von rheumatologischen Erkrankungen auftreten oder auch für maligne Prozesse. Im klinischen Alltag ist heute die Messung des CRP (C-reaktives Protein) weiter verbreitet als die Bestimmung der BSG. Die Ursache in der gesteigerten Sedimentationsrate liegt bei Entzündungen an der reaktiven Bildung von Akute-Phase-Proteinen, durch welche die Erythrozyten aggregieren und diese Aggregate in der Probe schneller absinken als einzelne Erythrozyten (Ott 2020). Die BSG ist allerdings nicht speziell abhängig vom CRP (Flormann et al. 2015).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Messungen der Blutsenkungsgeschwindigkeit von Blut von Neuroakanthozytose Syndrom Patienten wurde wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. Die für die Messung der BSG standardisierten Westergren-Röhrchen wurden vollständig mit EDTA-Vollblut gefüllt und automatisch jede Minute ein Foto aufgenommen. Abbildung 14 zeigt diesen Versuchsaufbau exemplarisch.

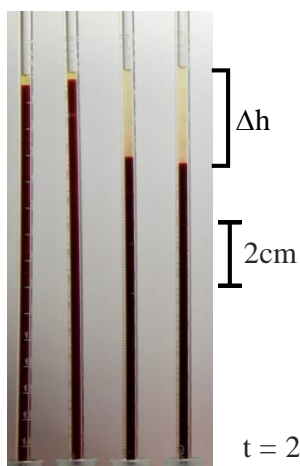


Abb. 14 Versuchsaufbau Blutsenkung. EDTA Blut wurde in Westergren-Glasröhrchen gefüllt und in kurzen Zeitabständen automatisch fotografiert. Hier ist beispielhaft die Senkung (Δh) nach $t=2$ Stunden von einem Patienten (zwei Röhrchen links) und einer Kontrolle (zwei Röhrchen rechts) dargestellt.

2.2.12 Statistik

Die statistischen Auswertungen in dieser Arbeit erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism 8. Für die Testung der Normalverteilung wurde ein Shapiro-Wilk Test verwendet. Signifikante Unterschiede zwischen Testergebnissen wurden je nach Experiment mit einem ungepaarten oder gepaarten t-Test, einem One-Way-ANOVA mit anschließendem Tukeys Test oder einem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test überprüft. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf $\alpha=0,05$ festgelegt. Für die Signifikanzen gilt: n.s. $\alpha>0,05$, * $\alpha <0,05$, ** $\alpha<0,01$, *** $\alpha<0,001$

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden Blutproben von sowohl Chorea-Akanthozytose Patienten, als auch von McLeod Syndrom Patienten untersucht. Die Informationen zu diesen Patienten sind in den Tabellen 15 und 16 aufgeführt. Insgesamt liegen Daten von 6 Chorea-Akanthozytose Patienten vor, von denen fünf männlich und einer weiblich war. Das Durchschnittsalter dieser Patienten lag bei 44 Jahren. Weiterhin wurden Proben von zwei männlichen Patienten untersucht, die zum Zeitpunkt der Versuche mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib behandelt wurden. Diese Patienten waren 29 und 34 Jahre alt. Zur Verfügung standen außerdem Proben von 4 McLeod-Patienten, die alle männlich und im Durchschnitt 54 Jahre alt waren. Es wurden nicht alle folgenden Versuche mit allen Patientenproben durchgeführt. Die jeweiligen Anzahlen an Patienten sind bei den Versuchen angegeben.

Tab. 15: Übersicht über die Patientendaten Chorea Akathozytose

Geschlecht	Alter	Symptome	Dauer der Erkrankung (Jahre)	Medikation
M	53	Parkinson-ähnlich, Dystonie, Dasarthritis, Neuropathie, Depression	15	Scopoderm transdermal
F	51	Epilepsie, Parkinson-ähnlich, Dystonie, Dysarthrie, Neuropathie, kognitive Beeinträchtigung	30	Levetiracetam, Valproat, Clobazam, Zonisamid, Vitamin D
M	54	Epilepsie, Parkinson-ähnlich, Dystonie, Dysarthrie, Dysphagie Neuropathie, kognitive Beeinträchtigung	21	Lamotrigin, Oxcarbazepin, Lacosamid, Levodopa, Esomeprazol
M	34	Medikamentenresistente Epilepsie, Chorea, Tics, kognitive Beeinträchtigung, Neuropathie, Myopathie	11	Lacosamid, Zonisamid, Perampanel Vitamin D, Lorazepam/Midazolam (b. Bedarf)

M	29	Medikamentenresistente Epilepsie, Chorea, Tics, kognitive Beeinträchtigung, Ängste, Depression, Psychose	15	Lacosamid, Zonisamid, Mirtazapin, Olanzapin, Vitamin D, Lorazepam/Midazolam (b. Bedarf)
M	42	Epilpsie, Essensassoziierte orolinguale Dyskinesien, Orofaziale Dyskinesien, Chorea, Neuropathie, Myopathie, Störung der Impulskontrolle	12	Levitiracetam, Quetiapin, Ramipril, Metoprolol, Bei Bedarf: Metamizol, Ibuprofen, Pantoprazol

Tab. 16: Übersicht über die Patientendaten McLeod Syndrom

Geschlecht	Alter	Symptome	Dauer der Erkrankung (Jahre)	Medikation
M	58	Myopathie	15	Nahrungsergänzungsmittel: Magnesium, St. John's wort extract, Kürbiskernzubereitung Bei Bedarf: Pantoprazol
M	51	Epilepsie, Neuropathie, Myopathie	40	Levitiracetam, Lamotrigin, Candesartan, Vitamin D Bei Bedarf: Methylprednisolon
M	52	Neuropathie, Myopathie	18	-
M	54	Neuropathie, Kardiomyopathie	5	Bisoprolol, Eplerenon, Apixaban, Torasemid

3.2 Laborparameter

Neben der Untersuchung der Erythrozyten von Neuroakanthozytose Syndrom Patienten sollten auch weitere Laborparameter, die im klinischen Alltag eine Rolle spielen, bestimmt werden. Hierfür wurden vom Zentrallabor des Universitätsklinikums in Homburg die Laborwerte von 8 gesunden Probanden, 3 McLeod Syndrom Patienten, 6 Chorea Akanthozytose Patienten, sowie von 2 der ChAc Patienten nach Dasatinibeinnahme bestimmt.

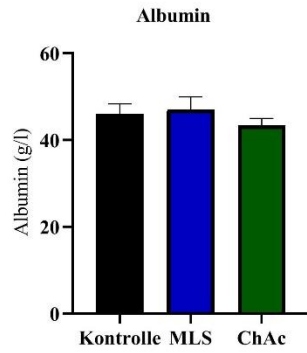
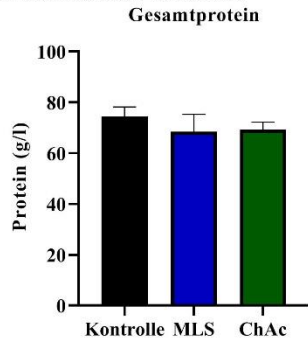
Beim Gesamtprotein im Plasma und dem Albumin zeigten sich keine Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten (Abb 15A).

Das Fibrinogen wurde bestimmt, weil es einen Effekt auf die Blutsenkungsgeschwindigkeit hat und zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und Chorea Akanthozytose Patienten, bei welchen es erniedrigt war (Abb 15B).

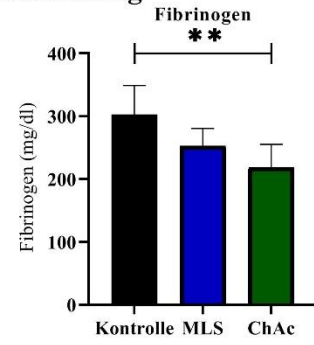
Im Bereich der Immunologie wurden das CRP, IgG und IgM bestimmt. Bei diesen ergab sich lediglich beim IgM eine Abweichung vom Kontrollwert, dieses war bei Patienten mit McLeod Syndrom erniedrigt (Abb 15C).

Als hämatologische Parameter wurden bestimmt: Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hkt), Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, das mittlere Thrombozytenvolumen, das mittlere Hämoglobin der Erythrozyten (MCH), das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV), sowie die mittlere Hämoglobinkonzentration (MCHC) und die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW). Bei ersteren Parametern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Allerdings war die Anzahl der Thrombozyten bei Chorea Akanthozytose Patienten signifikant erniedrigt, das Volumen der Thrombozyten jedoch normwertig. Weiterhin fielen Unterschiede beim MCH und MCHC auf. Die Mittlere Hämoglobinkonzentration (MCHC) war bei McLeod Syndrom und Chorea Akanthozytose erhöht. Das gesamt Erythrozyten-Hämoglobin (MCH) nur bei ChAc. Bei der Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) gab es keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen (Abb 15D-E).

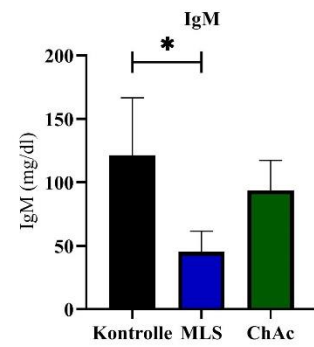
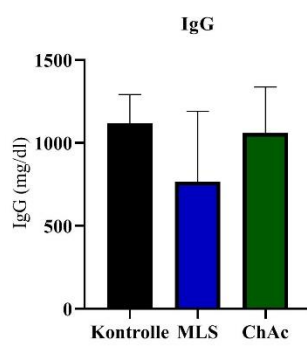
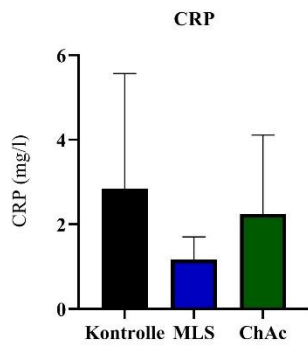
A Klinische Chemie



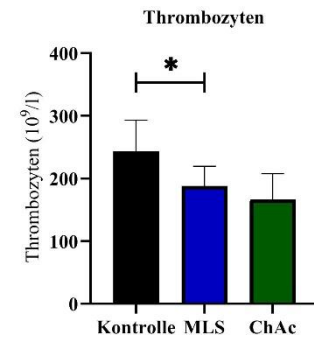
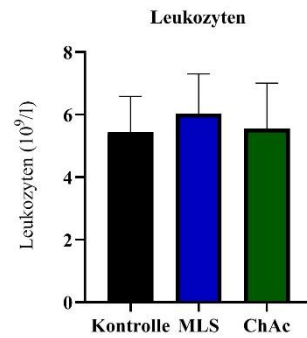
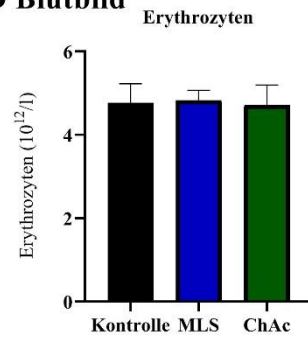
B Gerinnung



C Immunologie



D Blutbild



E Hämatologie

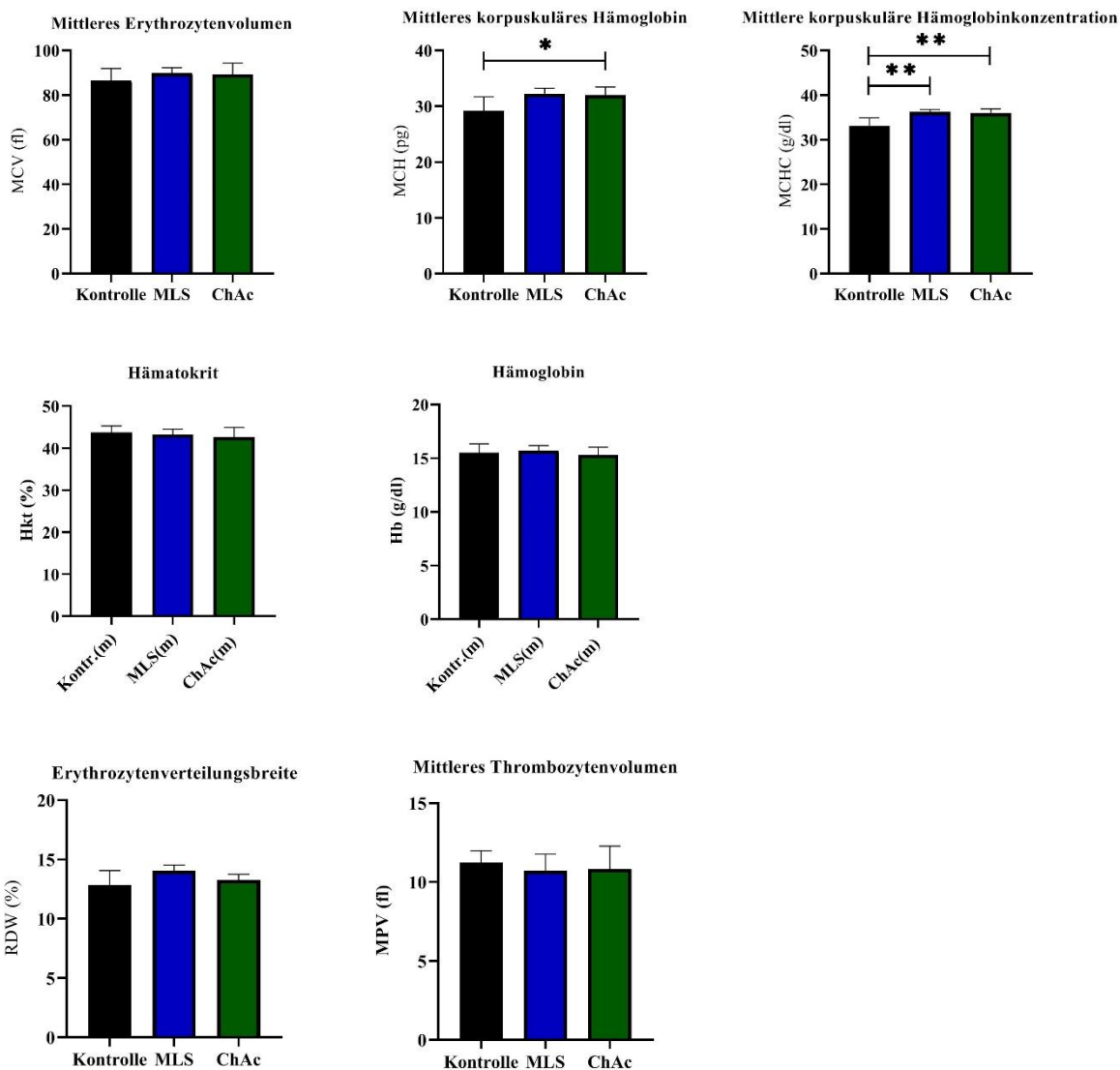


Abb. 15 A-E Laborwerte von gesunden Probanden (n=8), McLeod Syndrom Patienten (n=3) und Chorea Akanthozytose Patienten (n=6). Für die statistische Auswertung der Laborwerte von Chorea Akanthozytose und McLeod Syndrom Patienten wurde ein One-Way-ANOVA Test mit anschließendem Tukey-Test durchgeführt. Für die Blutwerte Hämatokrit und Hb (Abb 15E) wurden aufgrund der Abhängigkeit vom Geschlecht nur die männlichen Patienten und Kontrollen in die Auswertung einbezogen. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung. Größtenteils zeigten sich keine Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten. Signifikante Unterschiede zeigten sich bei folgenden Parametern: Fibrinogen war bei ChAc erniedrigt ($p=0,0035$)(15B). Die Thrombozytenzahl war bei ChAc erniedrigt ($p=0,0146$)(15D). IgM war bei MLS erniedrigt ($p=0,0071$)(15C). Das MCH war bei ChAc ($p=0,0427$) gegenüber Kontrollen erhöht. Das MCHC war bei beiden Patientenkollektiven erhöht ($p=0,0032$ für ChAc, $p=0,0044$ für MLS)(15E).

Die Laborwerte von zwei Chorea Akanthozytose Patienten, die mit Dasatinib behandelt wurden, wurden jeweils vor und nach Einnahme des Medikaments bestimmt. Diese Daten sind in Abbildung 16 dargestellt. Hierbei fiel bezüglich der Werte, die in den vorherigen Messungen bei Chorea Akanthozytose signifikant von Kontrollen verschieden waren, Folgendes auf: Die Zahl der Thrombozyten nahm unter Behandlung mit Dasatinib leicht zu, Fibrinogen nahm bei Patient 1 ab, bei Patient 2 zu und das MCH blieb gleich. Ein Wert, der sich bei ChAc Patienten ohne Dasatinib

Behandlung nicht von dem Gesunder unterschied, sich bei den beiden Patienten unter Dasatinib jedoch veränderte, war das Albumin. Vor Behandlung mit dem Medikament hatten beide Patienten Albuminwerte, die unter dem Mittelwert der Kontrollen lagen, nach Behandlung stieg dieser Wert jedoch über den Durchschnitt an.

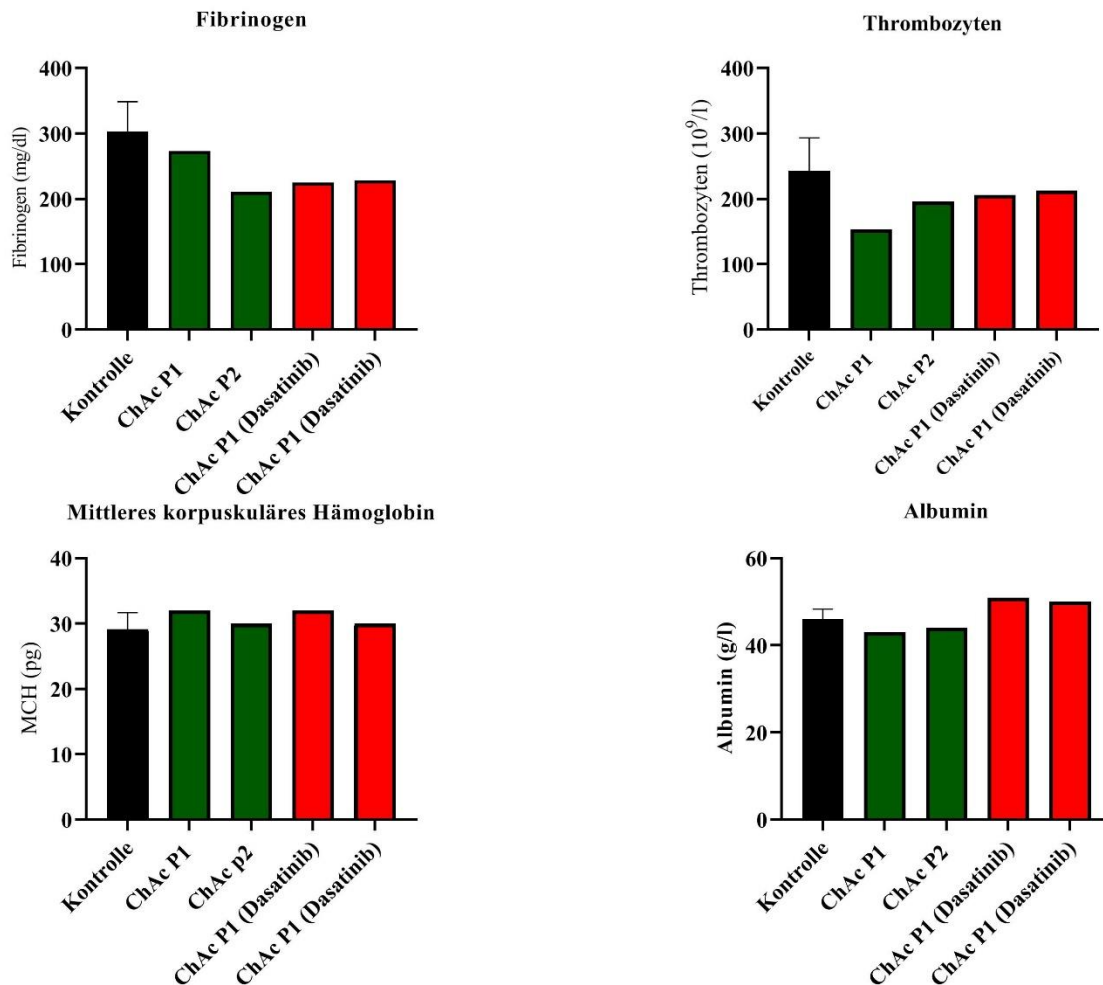


Abb. 16 Laborwerte von Chorea Akanthozytose Patienten vor und nach Behandlung mit Dasatinib. Die Thrombozytenzahlen waren zunehmend bei Behandlung mit Dasatinib. Fibrinogen nahm bei einem Patienten zu, bei dem anderen ab und das MCH ist gleich geblieben. Albumin war vor Behandlung im Vergleich zu Kontrollen niedriger und nach Behandlung mit Dasatinib höher bei Patienten als bei Kontrollen

3.3 Erythropoese

In dieser Arbeit sollte ebenfalls untersucht werden, ob sich die Erythropoese bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten von gesunden Probanden unterscheidet. Dafür wurden Retikulozyten aus CD24+ Stammzellen, die von Patienten aus dem peripheren Blut gewonnen wurden, mit Hilfe einer Zellkultur gebildet und der Verlauf der Erythropoese mit Durchflusszytometrie überwacht. Das

Zellkulturprotokoll sowie die Durchführung der Durchflusszytometrie-Experimente habe ich zunächst an Zellen gesunder Spender etabliert. Ein Auszug der Ergebnisse von fünf gesunden Kontrollen (im weiteren Text als Vorkontrollen bezeichnet) ist in Abbildung 17 dargestellt. Abbildung 17A zeigt die Entwicklung der Expression der Oberflächenmarker CD71 und CD235 von Tag 0 der Differenzierung, bis zu Tag 13. Mit Hilfe des Gatings bei der Analyse der Durchflusszytometrie können CD71- /CD235- , CD71+/CD235- Zellen, Erythroblasten (CD71+/CD235+) und Retikulozyten (CD71- /CD235+) unterschieden werden. Hier wird deutlich, dass bei der Erythropoese in vitro am ersten Tag noch undifferenzierte CD71+/CD235- Zellen vorlagen. Zudem nahm der Anteil der Retikulozyten im Verlauf der Tage zu, während immer weniger Erythroblasten vorlagen. Abbildung 17B zeigt die Enukleationsrate. Die zugrundeliegenden Daten (für Abbildung 17B-D) wurden durch die Anfärbung der RNA mit Draq5 generiert. Für die Enukleationsrate wird das Verhältnis von Retikulozyten (R) und der Summe von Retikulozyten und Erythroblasten (EBL) gebildet. In diesem Versuch konnte eine stetig zunehmende Enukleationsrate von bis zu 70% an Tag 13 erreicht werden. In Abbildung C ist der Quotient aus Retikulozyten (R) und Kernen (N) dargestellt, welcher das Überleben von Retikulozyten in der Kultur anzeigt. Ab Tag 3 der Differenzierung lag dieser Wert etwa um 1. Der Anteil an ausgestoßenden Kernen während der Kultur kann durch den Quotienten aus Kernen (N) und der Summe aus Kernen und Erythroblasten (EBL) berechnet werden (Abb 17D). Dieser nahm bei den Kontrollen passend zu der Enukleationsrate über den Verlauf der Differenzierung zu.

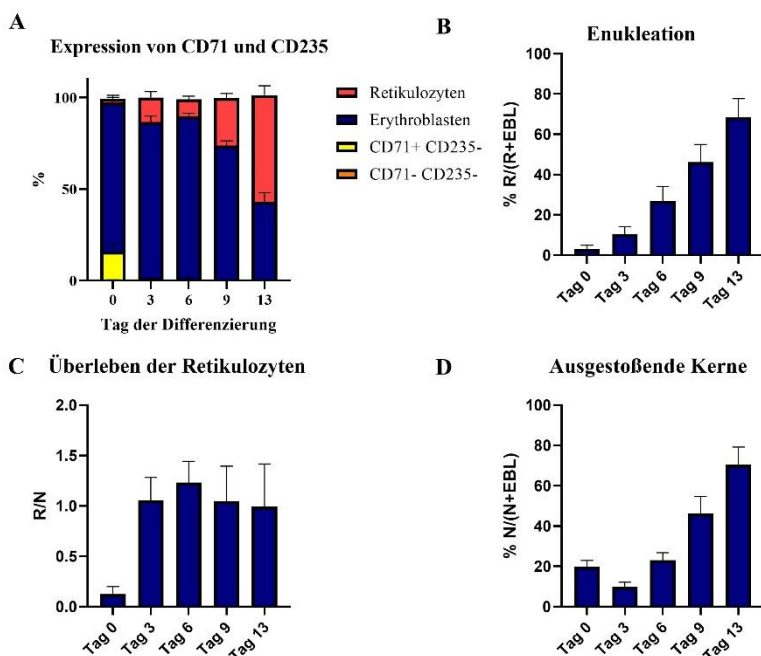


Abb. 17 A-D Reifung und Enukleation von gesunden Erythrozyten in vitro. A zeigt die Expression der Oberflächenmarker CD71 und CD235 über die Differenzierung. Hierbei ist abhängig von der Expression dieser Marker der Anteil der Zellen in der Kultur dargestellt. Abbildungen B-D geben Aufschluss über das Überleben der Retikulozyten in der Kultur und die Enukleation. B zeigt die Enukleationsrate als $R/(R+EBL)$ C zeigt das Überleben der Retikulozyten, welches mit R/N dargestellt wird. D zeigt die Ausstoßung der Kerne, berechnet mit $N/(N+EBL)$. Die Balken zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichung an. Die in dieser Abbildung dargestellten Ergebnisse sind in Zusammenarbeit mit Simionato G. entstanden.

Das gleiche Experiment sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Neuroakanthozytose Syndrom Patienten und gesunden Probanden durchgeführt werden. Dabei sollte zudem der Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors Dasatinib in vitro auf die Erythropoese untersucht werden. Dasatinib wurde während der Zelldifferenzierung beim Austauschen des Mediums in einer Konzentration von 100 nM hinzugegeben. Leider konnten nur bei zwei Kontrollen und zwei Patienten während der Zellkultur ausreichend Zellen für die Experimente reifen, weshalb hier nur ein erster Eindruck der Ergebnisse ohne statistische Analysen gezeigt werden kann. Die beiden Patienten waren McLeod Syndrom Patienten. Abbildung 18 zeigt die repräsentativen Ergebnisse für einen Patienten und eine Kontrolle ohne und mit Dasatinib Behandlung. Hier wird die Expression der Oberflächenmarker CD71 und CD235 von Tag 0 bis Tag 9 der Erythropoese dargestellt. Zu erkennen ist eine stetige Abnahme der CD71+ und CD235- Zellen, wobei Tag 7 bei allen Proben eine Ausnahme darstellt. Hier waren wieder mehr der Zellen als an Tag 4 zu finden. Bei allen Proben begann ab Tag 4 der Anteil der Retikulozyten zuzunehmen. Die Unterschiede in der Reifung zwischen unbehandelten und behandelten Proben scheinen unwesentlich zu sein. Zwischen Kontrollen und Patienten lassen sich minimale Unterschiede feststellen: Zum einen verloren die Patientenproben schneller die CD71+ und CD235- Zellen als die Kontrollen. Zum anderen war der Anteil an Retikulozyten an Tag 9 bei dem Patienten geringer. Dieses gilt jedoch nicht für das andere untersuchte Kontroll-Patienten Paar (Abb. 19), bei welchem der Anteil an Retikulozyten bei den Patienten etwas höher war. Im Vergleich zu den Vorkontrollen war der höchst erreichte Anteil von Retikulozyten in meinem Experiment wesentlich niedriger. Weiterhin blieben länger CD71+ und CD235- Zellen in der Kultur. Diese Ergebnisse fielen ansonsten für beide Kontroll-Patienten Paare weitestgehend gleich aus.

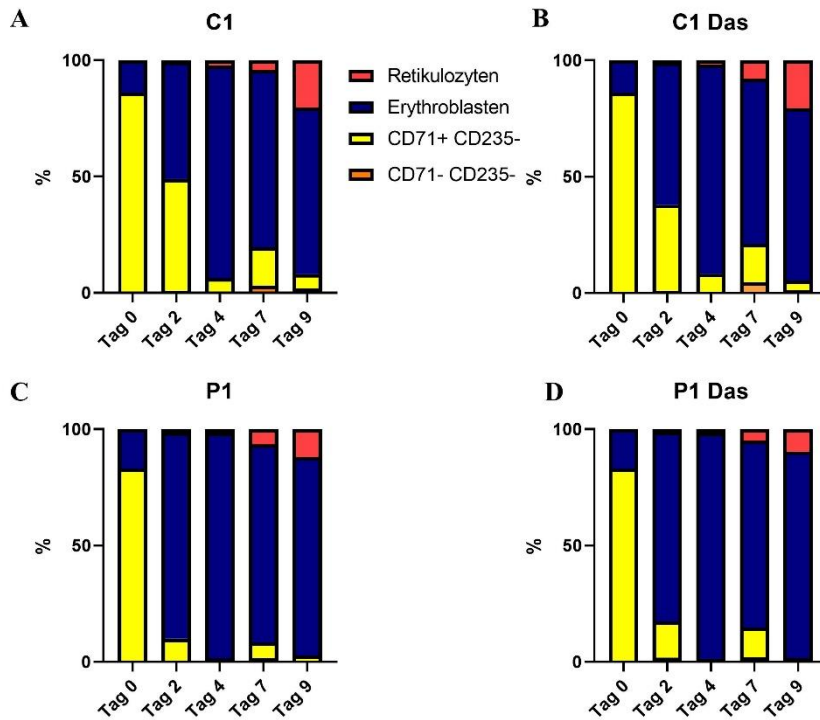


Abb. 18 A-D Expression der Oberflächenmarker CD71 und CD235 im Verlauf der Erythropoese bei einem McLeod Syndrom Patienten und einer Kontrolle mit und ohne Dasatinib Behandlung. Dargestellt sind die Ergebnisse von Patient und Kontrolle 1. Die Ergebnisse stammen aus den durchflusszytometrischen Daten nach Färbung der Zellen für CD71 und CD235.

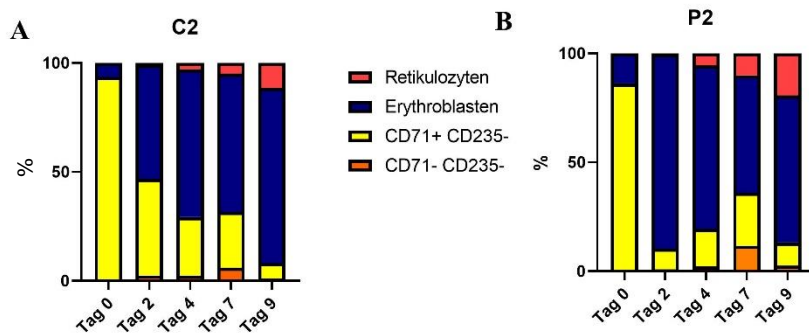


Abb. 19 A-B Expression der Oberflächenmarker CD71 und CD235 im Verlauf der Erythropoese bei einem McLeod Syndrom Patienten und einer Kontrolle. Zum Vergleich mit Patient und Kontrolle 1 sind hier die Ergebnisse von den unbehandelten Proben 2 dargestellt.

Abbildung 20 A-F zeigt die Parameter der E nukleation analog zu denen der Vorkontrollen in Abb. 17 für die beiden Kontrollen und Patienten jeweils mit Dasatinib und ohne Behandlung. Zwischen Patient und Kontrolle und zwischen Behandlung und nicht-Behandlung lassen sich hier kaum Unterschiede feststellen. Lediglich der Quotient aus R/N war für die unbehandelte Kontrolle 1 an Tag 9 der Differenzierung höher als bei den anderen Proben. Im Vergleich zu den Vorkontrollen waren einige Ergebnisse abweichend. Zum Beispiel war die E nukleationsrate für Patient und Kontrolle 1 nach Tag 7 bereits bei >60% und danach eher abnehmend, als zunehmend. Bei Patient und Kontrolle 2 gab es wie in den Vorkontrollen jedoch noch eine Zunahme des Wertes nach Tag 7, wobei auch insgesamt höhere Werte als bei Patient/Kontrolle 1 erreicht wurden. R/N lag in meinem Experiment an Tag 9 mit

einem Wert von >2 bei allen Proben über dem der Vorkontrollen. Weiterhin fällt im Unterschied zu den Vorkontrollen eine nach Tag 7 abnehmende Zahl an Kernen auf.

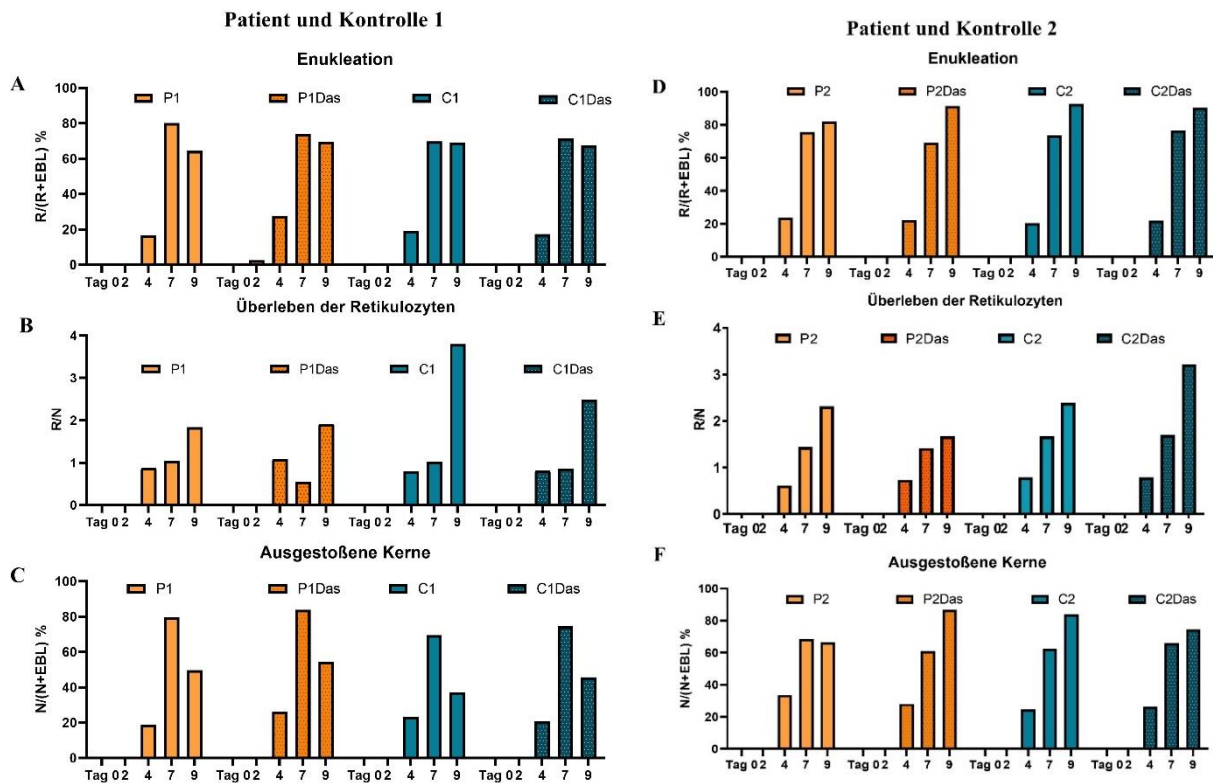


Abb. 20 A-F Eukleationsparameter von zwei Patienten und zwei Kontrollen A-C zeigen die Ergebnisse von Patient und Kontrolle 1 jeweils mit und ohne Dasatinib Behandlung. Dabei werden Eukleationsrate ($R/(R+EBL)$) (A,D), Überleben der Retikulozyten (R/N) (B,D), Rate der ausgestoßenden Kerne ($N/(N+EBL)$) (C,F) jeweils für die einzelnen Proben dargestellt. D-F stellt die Ergebnisse für ein weiteres Patienten-Kontroll-Paar dar.

3.4 3D Aufnahmen von Erythrozyten und Blutausstriche

3.4.1 3D Aufnahmen

Die Klassifikation von Erythrozytenmorphologien erfolgt in der Klinik normalerweise mit Hilfe eines Blutausstrichs. In dieser Arbeit wurde eine andere Methode verwendet, um einzelne Zellen nicht nur in x-y-Richtung, sondern auch in z-Richtung und damit dreidimensional betrachten und klassifizieren zu können. Diese dreidimensionalen Aufnahmen der Zellen erfolgten für Proben von 4 McLeod Syndrom Patienten, 6 Chorea Akanthozytose Patienten, 2 Chorea Akanthozytose Patienten, die unter Behandlung mit Dasatinib standen und 10 Kontrollen. Die Auswertung erfolgte nach direkter Fixation mit Glutaraldehyd nach der Entnahme des Blutes und Färbung mit dem Farbstoff CellMask deep red. Die Klassifikation der Zellformen wurde nach den Kategorien Diskozyt, Echinozyt, Stomatozyt,

Akanthozyt und „Andere“, nicht eindeutig einer Kategorie zupassender Form vorgenommen. Diese Kategorien sind in Abb. 21 in der Form dargestellt, in der sie mit der verwendeten Methode erzeugt wurden. In dem verwendeten Programm konnten die Zellen rotiert und von allen Seiten aus betrachtet werden.

Während der Klassifizierung fiel auf, dass häufig die Unterscheidung zwischen Echinozyten und Akanthozyten nicht eindeutig war. Abb. 21 zeigt anhand einiger Beispiele, dass diese beiden Kategorien durchaus stark überschneidende Merkmale aufweisen und eine Abgrenzung nicht immer möglich ist. Die Echinozyten waren etwas regelmäßiger und mit kleineren Spikes geformt, während die Akanthozyten unregelmäßigere Ausstülpungen aufwiesen.

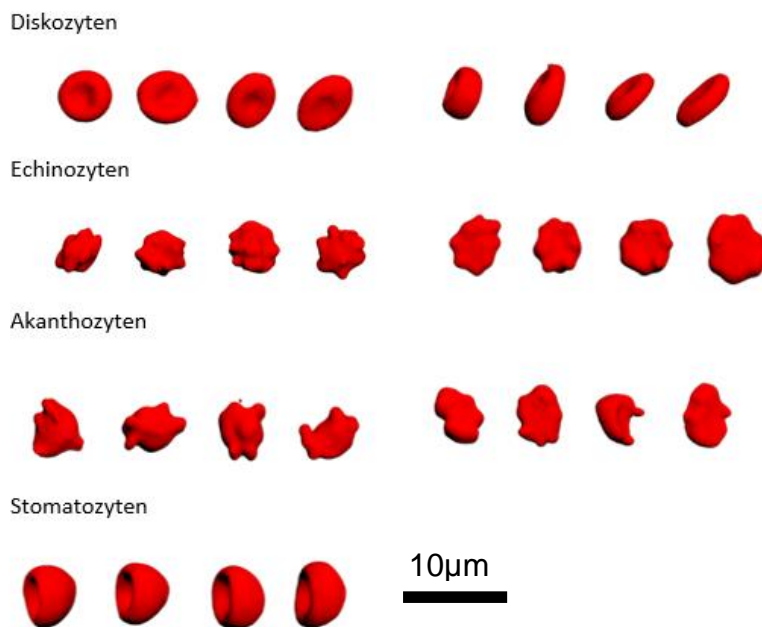


Abb. 21 3D Aufnahmen von Erythrozyten Die Abbildung zeigt dreidimensionale Aufnahmen von Erythrozyten verschiedener Kategorien nach Färbung mit CellMask deep red. Bei der Klassifizierung der Zellen von Patienten und Kontrolle wurden diese Kategorien verwendet. Zellen, die keiner dieser Formen zugeordnet werden konnten, wurden in die Gruppe „Andere“ eingetragen. Die Abbildung zeigt, dass vor allem die Abgrenzung zwischen Akanthozyten und Echinozyten weniger eindeutig ist, als die zu den anderen Kategorien. Diskozyten und Stomatozyten unterscheiden sich sehr deutlich untereinander und von Echinozyten und Akanthozyten, während letztere überschneidende Merkmale aufweisen.

Die Zählung ergab, dass die interindividuelle Variabilität zwischen den Kontrollen deutlich geringer war, als zwischen den Patienten. Der Anteil der Diskozyten bei den gesunden Patienten lag zwischen 53% und 95%, wobei die anderen Anteile in diesen Fällen zum Großteil von Stomatozyten ausgemacht wurde, deren Anteil zwischen 3% und 41% lag. Andere Zellformen, wie Echinozyten, Akanthozyten und nicht eindeutig klassifizierbare Formen lagen zwischen 0-3% (Echinozyten) 0-2% (Akanthozyten) und 1-5% (Andere). Die Zusammensetzung der Zellmorphologien bei den Kontrollen ist in Abb. 22 gemittelt für alle 10 Kontrollen dargestellt.

Bei sowohl der Chorea Akanthozytose als auch beim McLeod Syndrom fielen deutliche Unterschiede zwischen den Individuen auf. Für die Chorea Akanthozytose gilt, dass der Anteil der Diskozyten

zwischen 35% und 83% lag. Stomatozyten traten nur zwischen 0-4% auf, der Anteil der Echinozyten lag zwischen 5% und 27%. Akanthozyten waren mit 1-8% vertreten und der Anteil der Anderen Formen lag bei 6-29%. Insgesamt wiesen die Chorea Akanthozytose Patienten damit einen geringeren Anteil an Diskozyten und Stomatozyten auf, als gesunde Kontrollen. Gleichzeitig fiel deutlich der höhere Anteil an nicht klassifizierbaren Zellen auf (vgl. Abb. 22).

Beim McLeod Syndrom lag der Anteil der Diskozyten bei 48-72% und damit nochmal deutlich niedriger als bei Kontrollen und der Chorea Akanthozytose. Stomatozyten traten mit 2-10% auf, Echinozyten mit 4-15%. Der Anteil der Akanthozyten lag zwischen 1% und 11%. Andere Zellformen waren mit 8-28% vertreten. Die Zusammensetzung der Zellformen ist in Abb. 22 repräsentativ für je zwei Chorea Akanthozytose und McLeod Patienten dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Patienten und Kontrollen sind zusätzlich in Tabelle 16 aufgezeichnet.

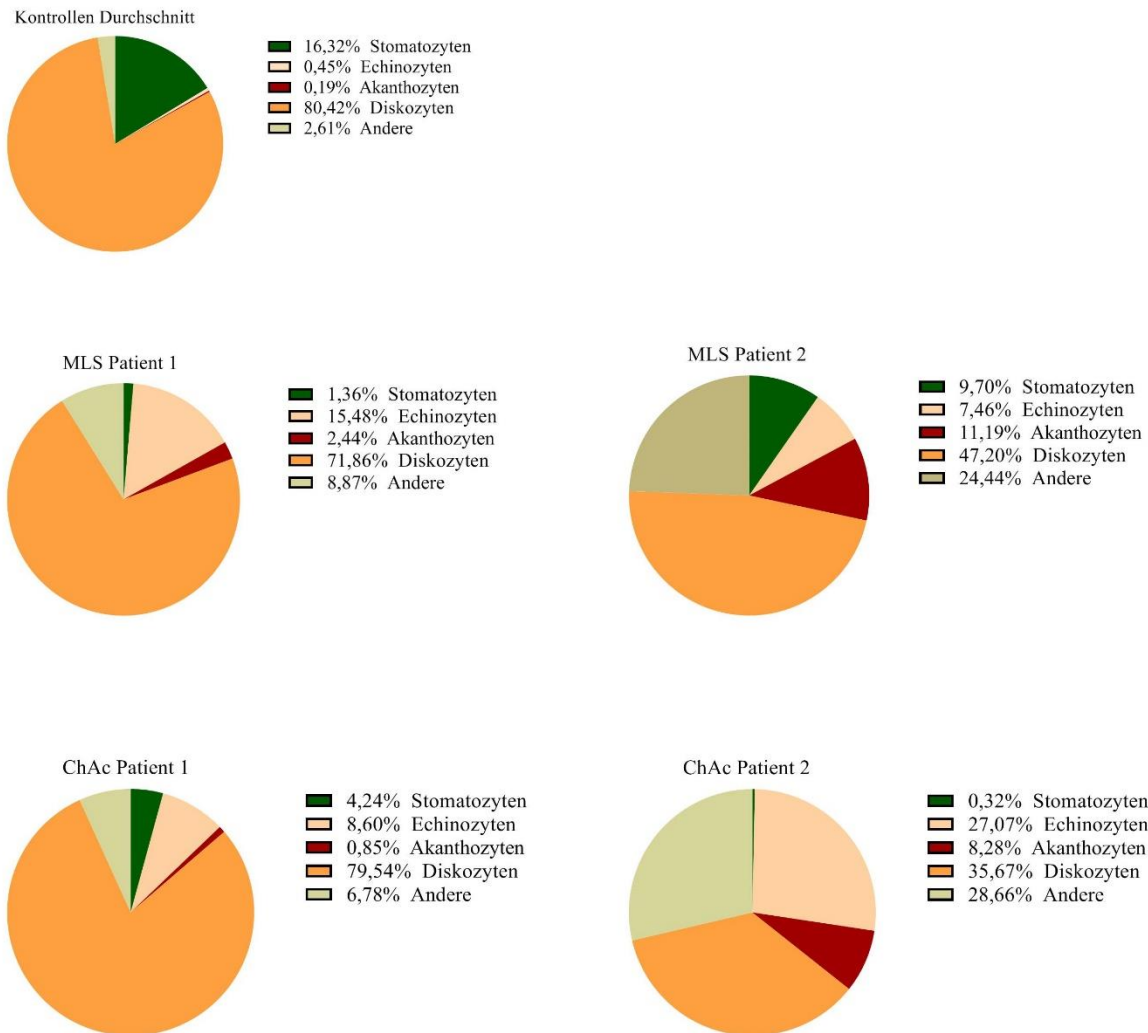


Abb. 22 A-E Verteilung der Erythrozyten Zellformen bei Kontrollpatienten und McLeod Syndrom und Chorea Akanthozytosepatienten- Repräsentative Beispiele Die Ergebnisse der Auszählung der verschiedenen Zellformen bei den 3D Aufnahmen sind in dieser Abbildung in Form von Kreisdiagrammen gemittelt für alle Kontrollen und einzeln jeweils exemplarisch für zwei McLeod Syndrom und zwei Chorea Akanthozytose Patienten dargestellt. Bei der Beurteilung der Verteilungen fällt die große Varianz zwischen den Patienten der gleichen Erkrankung auf. Weiterhin wiesen Neuroakanthozytose Syndrom Patienten deutlich mehr Echinozyten auf als gesunde Kontrollpersonen. Dagegen lagen bei gesunden Patienten mehr Stomatozyten vor.

Tab. 17 Häufigkeiten der jeweiligen Zellformen bei gesunden Kontrollen, Chorea Akanthozytose Patienten und McLeod Syndrom Patienten. Die Anteile der jeweiligen Zellform sind gemittelt und mit ihrer Standardabweichung in % dargestellt.

	Zellform	Mittelwert der Anteile der Zellform (%)	SD (%)
Kontrollen N=10	Diskozyten	81	12,5
	Stomatozyten	16	12,1
	Echinozyten	0,5	0,9
	Akanthozyten	0,2	0,6
	Andere	2,6	1,5
ChAc N=6	Diskozyten	69,3	18,3
	Stomatozyten	1,5	1,6
	Echinozyten	11,9	8,3
	Akanthozyten	2,8	2,8
	Andere	14,5	10,1
MLS N=4	Diskozyten	59,3	13,6
	Stomatozyten	4,9	3,6
	Echinozyten	10	5
	Akanthozyten	6,4	5,6
	Andere	17,1	7,7

3.4.2 Auswertung der 3D Aufnahmen durch verschiedene Beurteiler

Die Auswertung der dreidimensionalen Bilder wurde durch zwei verschiedene Auswerter unabhängig voneinander vorgenommen, um Unterschiede in der subjektiven Beurteilung zu untersuchen. Neben mir wurden die Daten auch von einer Kollegin, welche viel Erfahrung mit der Klassifikation von Zellformen hat und diese Methode der Färbung mit CellMask deep red und 3D-Projektion bereits für andere Erythrozyten-Erkrankungen durchgeführt hat, ausgewertet. Vor allem sollte der Unterschied zwischen den Anteilen der Akanthozyten, welche für die Diagnose der Neuroakathozytose Syndrome entscheidend sind beobachtet werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 dargestellt. Dabei fiel auf, dass die Abweichung zwischen den Auswertern bei 50-85% lag. Die in eine andere Kategorie eingeordneten Zellen fielen in dem Fall in die Kategorien Echinozyten und Andere. Durchgehend ordnete Auswerter 2 mehr Zellen in die Kategorie Akanthozyten, während bei Auswerter 1 mehr

dieser nicht-Diskozyten den Kategorien „Andere“ und Echinozyten zugeordnet wurden. Grundsätzlich fällt jedoch auf, dass die beiden Auswerter auf ähnliche Tendenzen hinsichtlich der Anteile an Akanthozyten kamen. In Abbildung 23 wird dieses unter anderem deutlich bei den Patienten 8 und 9. Obwohl sich hier die Zahlen zwischen den Auswertern deutlich unterschieden, kamen beide zu dem Ergebnis, dass die beiden Patienten eine annähernd gleich große Zahl an Akanthozyten aufwiesen. Gleiches ist bei den Patienten 1-3 zu beobachten.

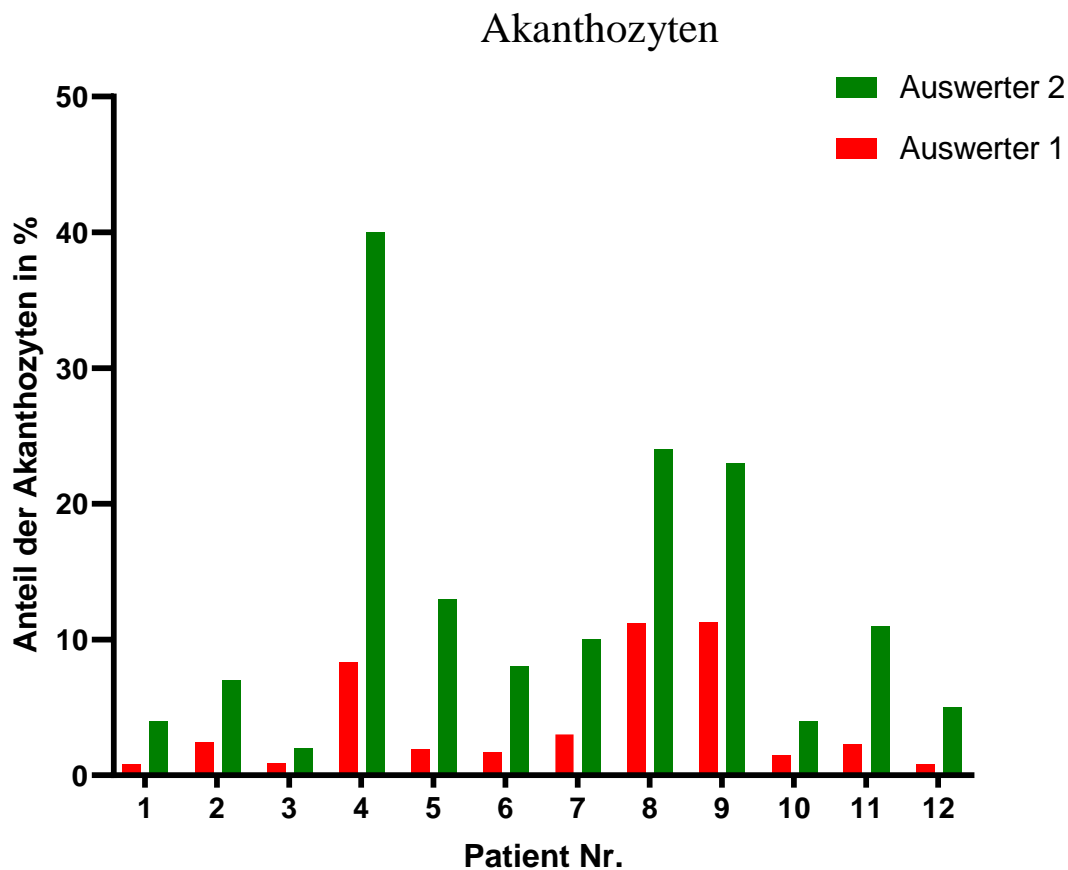


Abb. 23 Auszählung der Akanthozyten bei 3D Aufnahmen durch zwei Auswerter. Die von den beiden Personen gezählten Anteile der Akanthozyten sind für jeden Patienten, sowohl MLS, als auch ChAc in % dargestellt. Auswerter 2 (grün) ordnete durchgehend mehr Zellen in die Kategorie Akanthozyten ein als Auswerter 1 (rot). Die Tendenzen zu einem großen oder einem kleinen Anteil an Akanthozyten sind jedoch ähnlich.

3.4.3 Vergleich von 3D Aufnahmen und Blutausstrichen

Von jeweils drei Chorea Akanthozythose Patienten und drei gesunden Kontrollen wurden Blutausstriche angefertigt und die Zellformen ausgezählt. Dabei wurde nach den Kategorien Diskozyten, Echinozyten, Akanthozyten und Andere unterschieden. Einen beispielhaften Blutausstrich eines Chorea Akanthozythose Patienten zeigt Abb. 24.

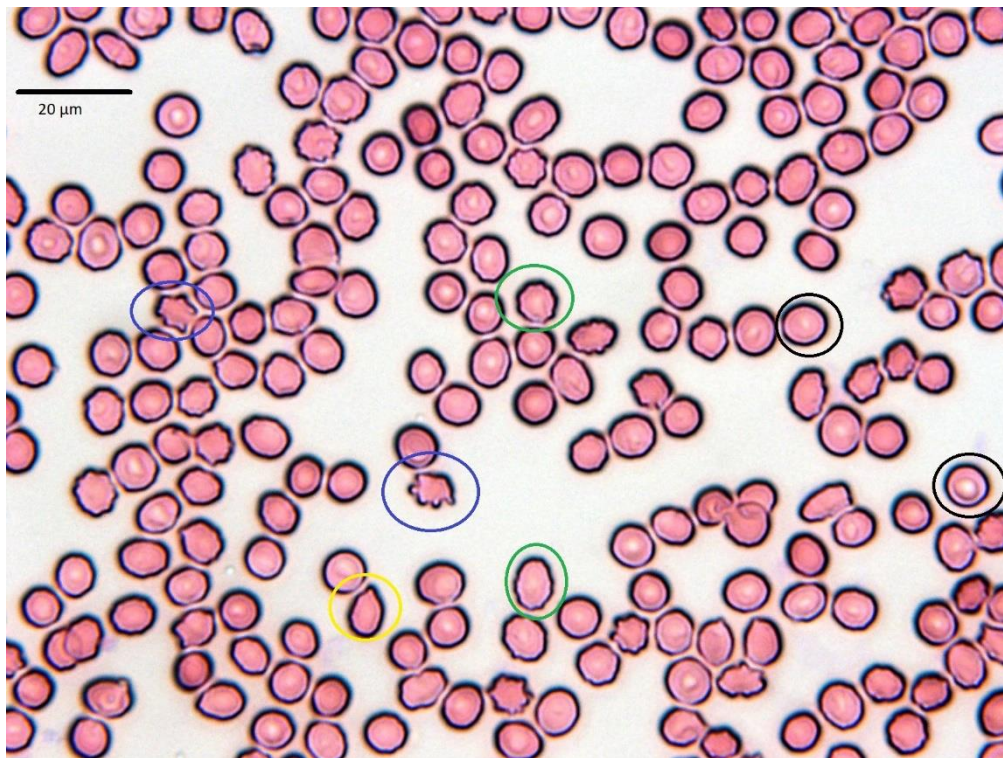


Abb. 24 Blutausstrich Neuroakanthozytose Syndrom Patient Das Bild wurden mit einem 40x Luftobjektiv und anschließender 2facher Vergrößerung aufgenommen. Im Blutausstrich des Chorea Akanthozytose Patienten sind Akanthozyten (blau) Echinozyten (grün), Diskozyten (schwarz) und „Andere“ (gelb) markiert.

Um die Methoden 3D Aufnahmen und konventionelle Blutausstriche bei der Klassifizierung von Zellformen zu unterscheiden, wurden bei drei Chorea Akanthozytose Patienten beide Methoden verwendet und verglichen. Die Ergebnisse dieser Auszählung sind in Abbildung 25 dargestellt. Es wurde bei der Klassifizierung der Blutausstriche im Gegensatz zu den 3D Aufnahmen auf die Detektion von Stomatozyten verzichtet, da diese in dem zweidimensionalen Bild schwer zu erkennen sind.

Betrachtet man die Patientendaten, so fällt auf, dass bei allen Patienten der Anteil an Diskozyten zugunsten von Echinozyten bei den Blutausstrichen abnahm. Auch hier fielen bei zwei von drei Patienten in den 3D Aufnahmen mehr Zellen in die Kategorie „Andere“ als bei den Ausstrichen. Der Anteil der Akanthozyten, welcher bei der Diagnostik der Neuroakanthozytose Syndrome eine Rolle spielt, ist bei einem Patienten in beiden Methoden gleich gewesen und bei den anderen beiden Patienten unterschieden sich die Ergebnisse leicht. Nach statistischer Auswertung (gepaarter t-Test) waren diese Unterschiede jedoch nicht signifikant.

Bei der Auswertung der Kontrollzellen fiel auf, dass zwei Probanden im Ausstrich deutlich mehr Echinozyten aufwiesen als in den 3D Aufnahmen. Des Weiteren wurden bei der Auswertung der dreidimensionalen Bilder mehr Zellen in die Kategorie Andere zugeordnet. Auch hier zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

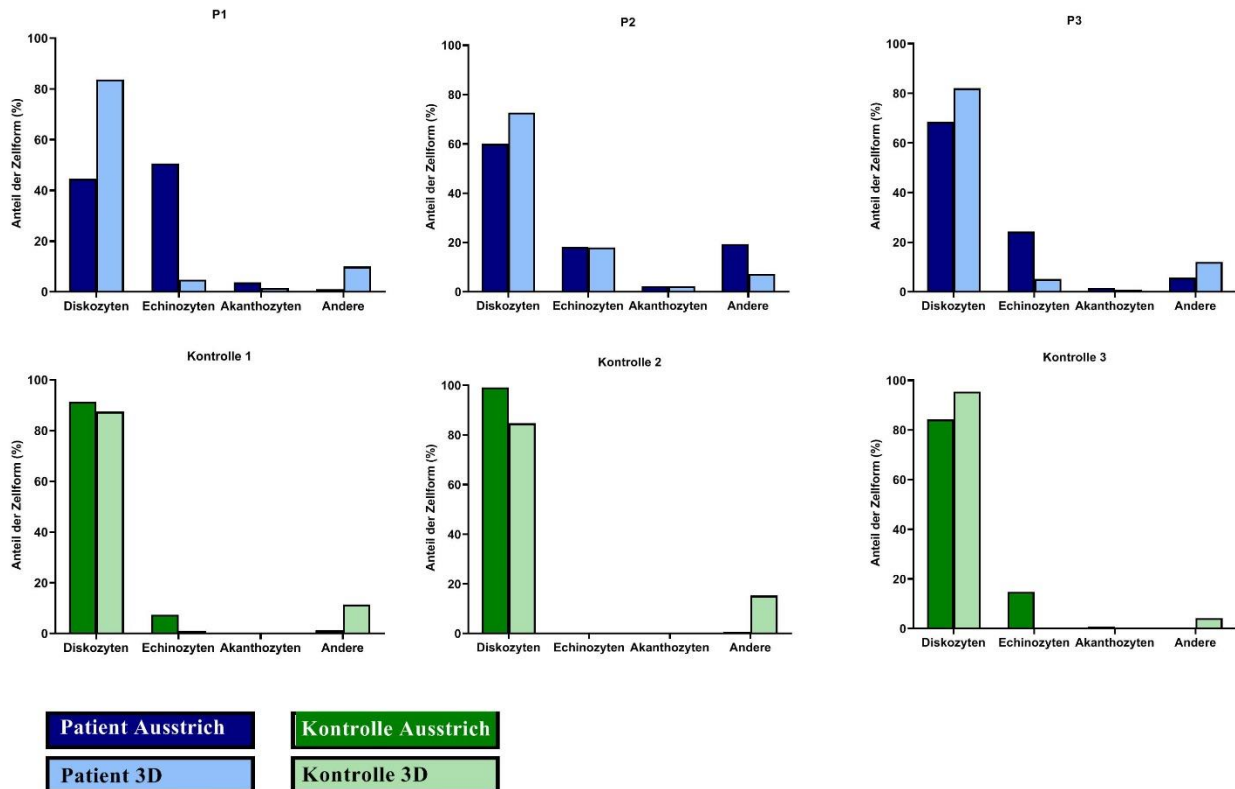
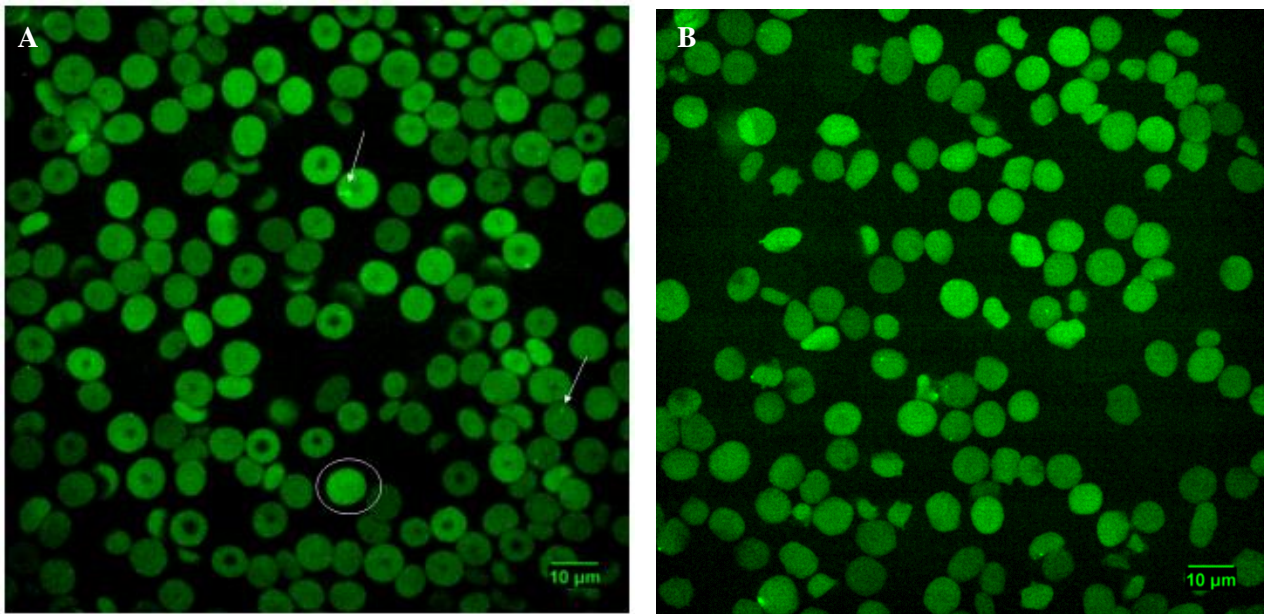


Abb. 25 A-F Vergleich von Blutausstrichen und 3D Aufnahmen in Hinblick auf die Zellklassifizierung. Für drei Chorea Akantchozytose Patienten (Abb A-C) und drei Kontrollen (Abb E-F) wurden die Klassifizierungen durch Ausstriche und 3D Aufnahmen vergleichend dargestellt. Unterschiede zwischen Ausstrich und 3D Aufnahme zeigten sich vor allem bei Patienten im Anteil der Echinozyten und Diskozyten, Zudem wurden sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen in den 3D Aufnahmen mehr Zellen der Kategorie „Andere“ zugeordnet.

3.5 Calciummessung

In diesem Versuch sollte mit einer Färbung des intrazellulären Calciums mit dem Farbstoff Fluo-4 und anschließender Fluoreszenzmessung der Calciumgehalt von Erythrozyten bei Chorea Akantchozytose Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gemessen werden. Dabei wurde nicht der absolute Calciumgehalt gemessen, sondern Abweichungen von den gesunden Kontrollzellen untersucht. Es wurden insgesamt 7 Chorea Akantchozytose Proben mit den zugehörigen Transportkontrollen verglichen. Dabei hat ein Patient im Abstand von 6 Monaten zwei Blutproben abgegeben. Diese Messungen wurden unabhängig voneinander in die Statistik einbezogen. Die mit dem Konfokalmikroskop aufgenommenen Bilder zeigten hierbei eine weitestgehend homogene Färbung der Zellen. Dieses gilt sowohl für Diskozyten, als auch für die in Patientenproben sichtbaren verformten roten Bluzellen. Teilweise konnten sowohl intra- als auch extrazellulär kleine hellere, calciumgefüllte Vesikel gesehen werden (siehe Pfeile in Abb. 26A). Des Weiteren fiel auf, dass immer einige Zellen ein besonders helles Fluoreszenzsignal zeigten (siehe z.B. Kreis in Abbildung Abb 26A).

Die Messung der genauen mittleren Fluoreszenzintensitäten wurde mit Hilfe von ImageJ durchgeführt. Dabei wurden je nach Probe und Dichte der Zellen in den Aufnahmen zwischen 165 und 900 Zellen ausgewertet und diese für die statistische Auswertung mit dem Programm Graph Pad Prism8 analysiert. Hierfür wurden die Werte für die Mittlere Fluoreszenzintensität der Patientenzellen auf die Werte der Kontrollen normiert. Da die Werte nicht normalverteilt waren, wurden die Mediane ermittelt und verglichen. Dafür wurde ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. In Abbildung 26C sind die Mediane der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von Patienten und Kontrollen in Form eines Boxplots dargestellt. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten.



C Calciumgehalt patientenbasiert

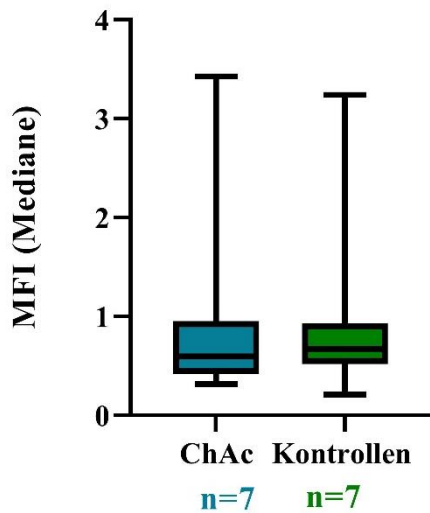


Abb 26 A-C Fluoreszenzmikroskopische Messung des Unterschiedes im intrazellulären Calcium von Chorea-Akanthozytose-Erythrozyten und gesunden Kontroll-Erythrozyten mit Fluo-4. Abbildung 26A zeigt exemplarisch eine Aufnahme von Kontrollerythrozyten eines gesunden Spenders, während Abbildung 26B die Aufnahme von Blutzellen eines Chorea Akanthozytose Patienten zeigt. In Abbildung 26B fallen die Akanthozyten auf, die jedoch im Vergleich zu den anderen Erythrozyten und auch im Vergleich zur Kontrollprobe keinen Unterschied in der Farbintensität aufweisen. Im Diagramm 26C sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI), die mit dem Programm ImageJ gemessen wurden für Patienten und Kontrollproben aufgezeigt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test $p=0,6875$) in der Fluoreszenzintensität und damit kein Unterschied im Calciumgehalt von Patienten und Kontrolle. Das Diagramm in 26C zeigt die Werte für Kontrollen und Patientenzellen in Form eines Boxplots.

3.6 Expansionsmikroskopie und Aktinfärbung

Da die Bildung von Akanthozyten bei der Chorea Akanthozytose vermutlich auch auf eine Veränderung der Bestandteile des Zytoskeletts zurückzuführen ist, sollte in diesen Versuchen das Aktin in Erythrozyten von Chorea Akanthozytose untersucht werden. Um diesen Bestandteil des Zytoskeletts besser beurteilen zu können, wurde zunächst die neue Methode Expansionsmikroskopie für Erythrozyten etabliert. Das Ziel der Expansionsmikroskopie ist es, zelluläre Strukturen physikalisch zu vergrößern und so die Auflösung bei der Mikroskopie zu verbessern. In dieser Arbeit sollte zunächst das Protokoll für die Expansion von Zellen an Erythrozyten angepasst werden, da das originale Protokoll mit adhärennten Zellen arbeitet (siehe Methoden), Erythrozyten jedoch nicht adhärennd sind. Dann sollten die Strukturen des Zytoskeletts, vor allem Aktin gefärbt und expandiert werden, um diese Methode dann auch bei Patientenzellen anwenden zu können.

Zunächst wurden mit Glutaraldehyd fixierte Erythrozyten mit dem Zellkleber CellTak auf die entsprechenden Deckgläschen befestigt, danach gefärbt und dann das Expansionsprotokoll wie im Abschnitt Methoden beschrieben verfolgt. Bei dieser Methode gingen die meisten Erythrozyten während der folgenden Arbeitsschritte vom Glas verloren, sodass nach der Expansion nur Aufnahmen von wenigen Zellen erfolgen konnten. Die Aufnahmen, die mit dem Konfokalmikroskop durchgeführt wurden, zeigten vor der Expansion Zellen mit einem Durchmesser von ca. $6\mu\text{m}$, die eine diskoide Form aufwiesen (Abb. 27A). Nach der Expansion waren die Zellen etwa um das 3-3,5fache vergrößert, und größtenteils war weiterhin die typische Zellform eines Diskozyten zu erkennen (Abb. 27C,E). In diesem Versuch wurden die Zellen mit Wheat Germ Agglutinin (WGA) gekoppelt an Alexa Fluor 488 (grün), welches an die Glykokalix bindet, gefärbt. Als zweite Struktur sollte Aktin mit Phalloidin 647N (rot) angefärbt werden. Es ist zu sehen, dass vor der Expansion das rote Aktinsignal deutlich zu erkennen war, nach der Expansion allerdings nur noch fragmentiert in rot die Zellkontur zu erkennen war. Das grüne WGA Signal blieb auch nach der Expansion gut sichtbar (Abb. 27D,E). Insgesamt war bei den expandierten Zellen eine eher punktförmige Färbung der Strukturen zu sehen, welche vorher noch kontinuierlich angefärbt wurden. Außerdem behielten nicht alle Zellen ihre diskoide Form (z.B. Abb. 27D). Die Versuche eine dreidimensionale Aufnahme (z-Stack) zu machen, gelang in den meisten Fällen nicht, da das Gel ohne Wasser sehr schnell schrumpfte und sich verschob. Bei einer Zelle konnte dennoch eine 3D Rekonstruktion erfolgen (Abb. 27G).

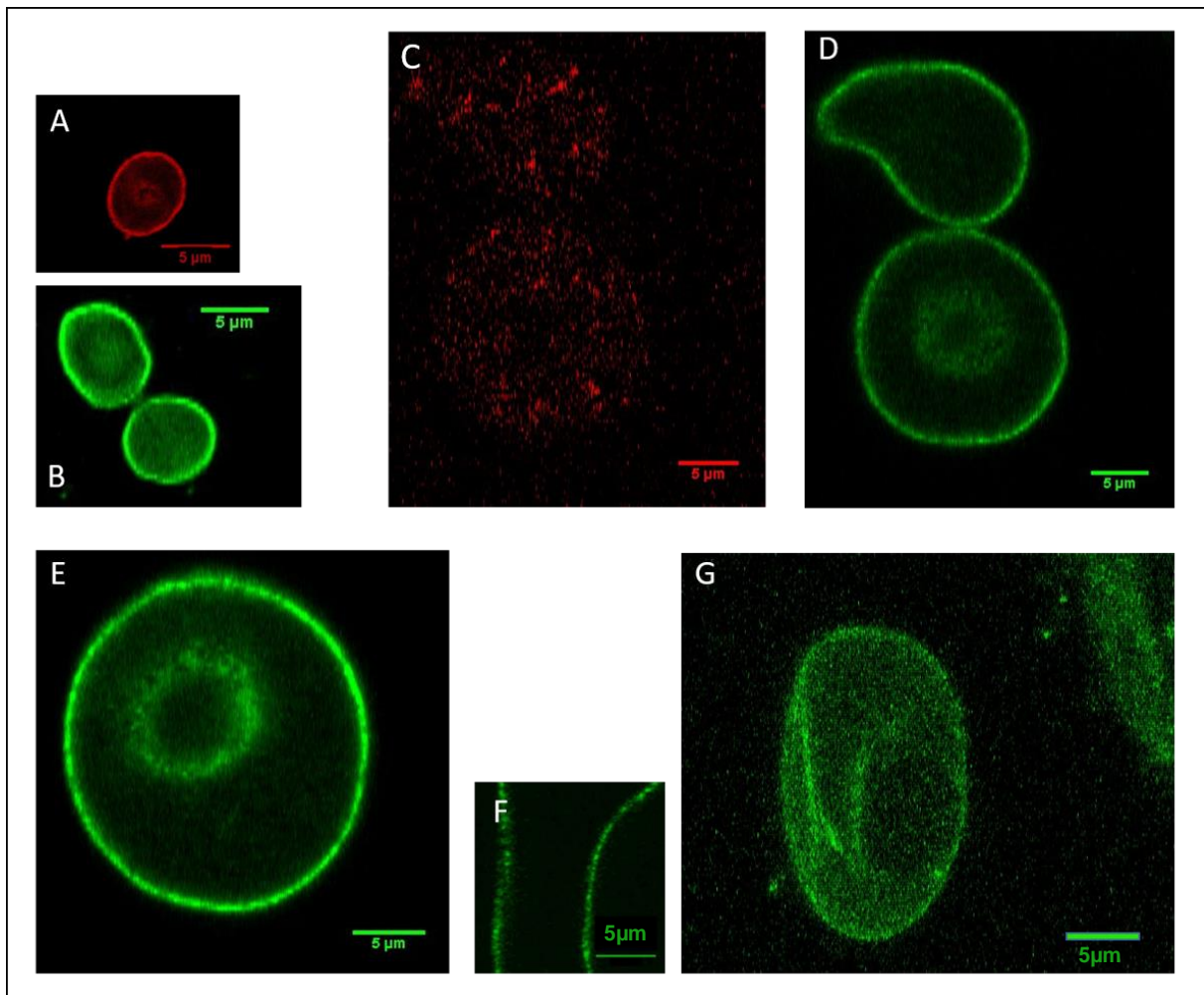


Abb. 27 A-G Mit WGA 488 und Phalloidin 647N gefärbte Erythrozyten vor und nach Expansion. In den ersten Versuchen wurden die Erythrozyten mit CellTak auf Objektträger geklebt und so expandiert. Abb. A und B zeigen Erythrozyten gefärbt mit WGA 488 (A) und Phalloidin 647N (B) vor der Expansion. Hier zeigten sich ca. 6µm große Erythrozyten mit diskoider Form und beide Strukturen (Glykokalix und Aktin), die dargestellt werden sollten, wiesen ein gutes Fluoreszenzsignal auf. Die restlichen Abbildungen zeigen beispielhaft ein paar, der wenigen Zellen, die nach der Expansion fotografiert werden konnten. Die Erythrozyten wurden durch die Expansion um etwa den Faktor 3-3,5 vergrößert (Abb. D und E) und größtenteils zeigte sich immer noch die diskoider Form, was in Abb. E zu erkennen ist. Abbildung F zeigt einen Ausschnitt der Zelle an der dünnsten Stelle des Diskozyten, hier fällt eine punktförmige Färbung auf. WGA 488 konnte gut in den Aufnahmen nach Expansion gesehen werden (Abb. D), während das Phalloidinsignal nur noch sehr schwach war (Abb. C). In einem Versuch gelang eine 3D Rekonstruktion (Abb. G) (Größenbalken repräsentieren jeweils 5µm).

Um in den Arbeitsschritten auf das CellTak verzichten zu können, wurde daraufhin das Protokoll mit Zellen in Suspension durchlaufen. Die Erythrozyten wurden also in PBS gemischt im Eppendorfgefäß mit Glutaraldehyd fixiert und anschließend gefärbt. Die Komponenten der Gellösung wurden wie im Abschnitt Methoden dargestellt, im Eppendorfgefäß mit den Zellen vermischt und dann in die Gelationskammer pipettiert. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 28 dargestellt. Insgesamt wurde eine höhere Zelldichte erzeugt, sodass die Mikroskopie deutlich vereinfacht wurde. Es fielen hier stärker verformte Zellen auf, die nicht mehr die typische diskoider Form hatten. Zudem war auch in diesem Versuch die Anfärbung mit WGA 488 nach der Expansion eher punktförmig, als kontinuierlich.

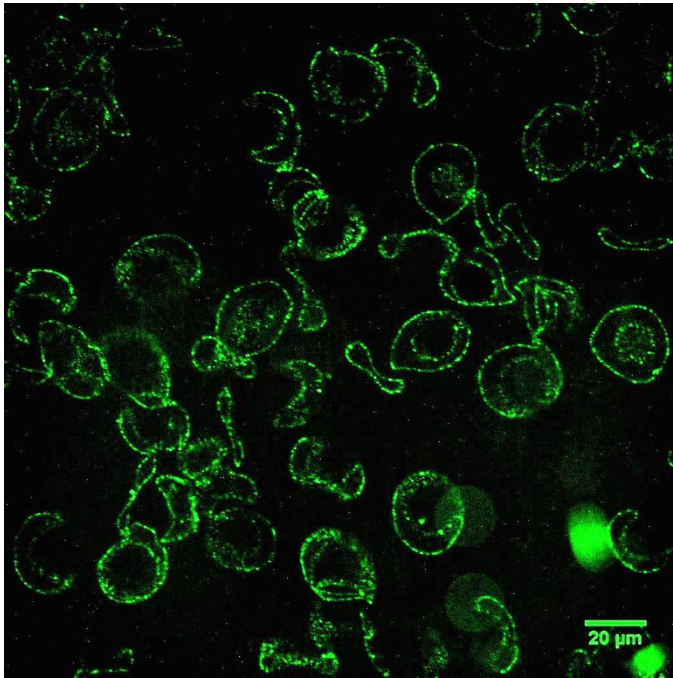


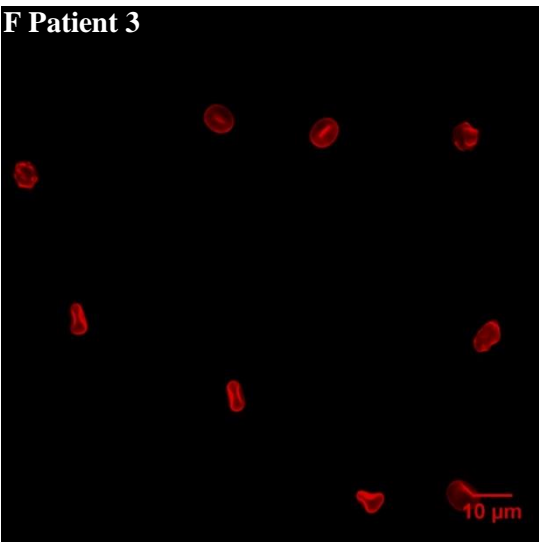
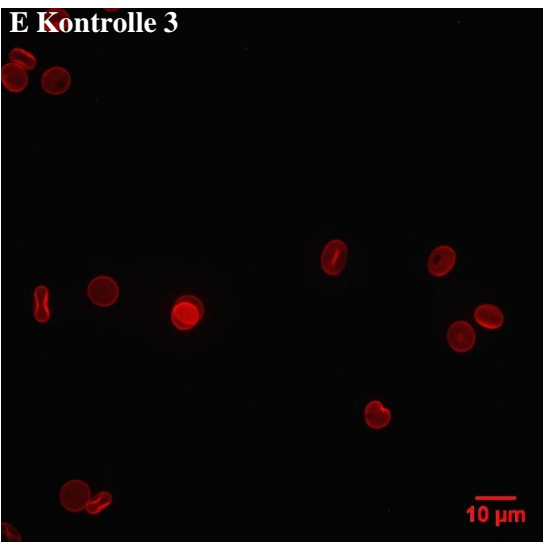
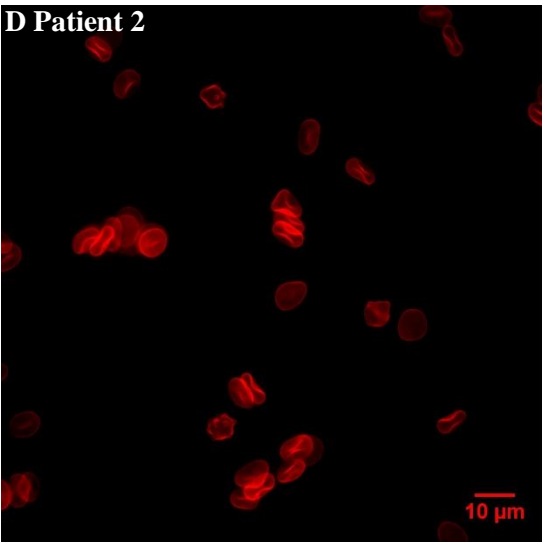
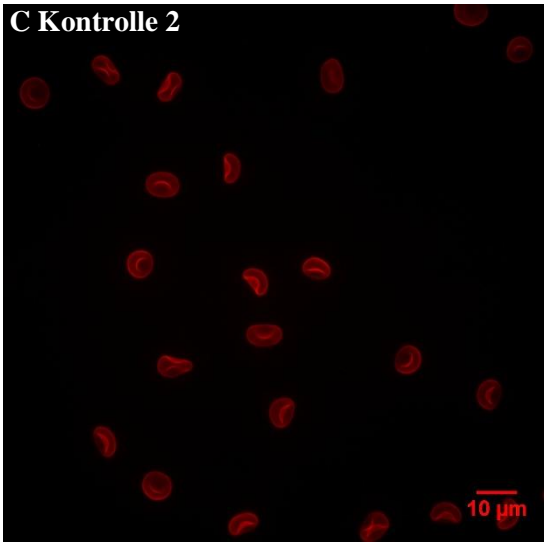
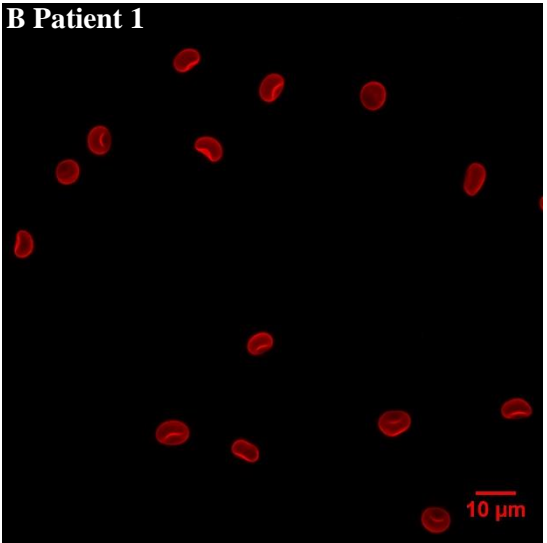
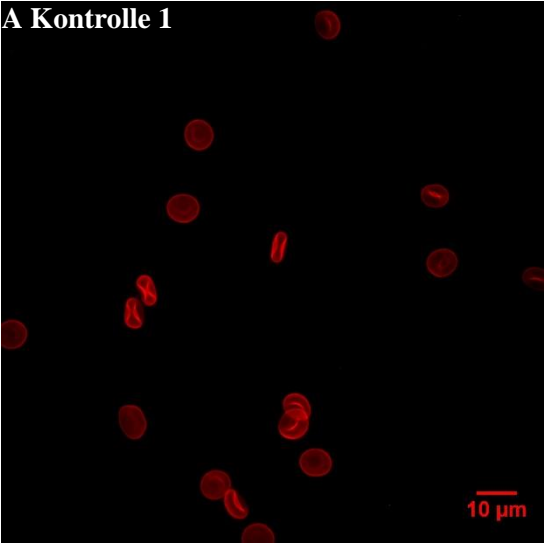
Abb. 28 Erythrozyten nach Expansion gefärbt mit WGA488. Die Zellen in diesem Versuch wurden in Suspension gefärbt und mit der Gellösung vermischt. Die Aufnahmen zeigen eine große Dichte an Zellen, die ebenfalls vergrößert sind. Teilweise fallen verformte Erythrozyten auf. Auffällig ist auch hier eine unterbrochene, punktförmige Anfärbung der Zellstrukturen.

So konnte die Methode der Expansionsmikroskopie grob an Erythrozyten angepasst werden.

Insgesamt zeigte sich jedoch, dass bisher nur die Färbung mit WGA erfolgreich war. Somit konnten zumindest mit diesem Protokoll keine Ergebnisse für den wichtigen Zytosklettbestandteil, das Aktin erzielt werden. Aufgrund dessen habe ich die Methode nicht auf Neuroakanthozytose Syndrom Patienten Erythrozyten übertragen, sondern um das Aktin in diesen Proben zu beurteilen, eine andere Methode verwendet. Hierbei wurde der Gehalt des filamentösen Aktins in Erythrozyten von Patienten bestimmt und mit Kontrollen verglichen.

Die Färbung fand mit dem Farbstoff Phalloidin gekoppelt an ein fluoreszierendes Molekül statt, da Phalloidin selektiv nur das filamentöse und nicht das glomeruläre Aktin bindet. Dieser Versuch wurde mit Blut von drei Chorea Akanthozytose Patienten und drei entsprechenden Transportkontrollen von gesunden Spendern durchgeführt. Von den gefärbten Zellen wurden dann dreidimensionale Aufnahmen erstellt. Bei Betrachtung der Bilder 29A-E, die hier bereits mit dem Tool Z-Projekt bearbeitet worden sind, und die Fluoreszenzen aller Slices auf eine Ebene projiziert darstellen, fällt auf, dass bei den Patientenzellen einige verformte Erythrozyten zu finden sind. Ein besonders auffälliger Unterschied im Aktingehalt oder in der Anordnung des Aktins ist anhand der Bilder nicht auszumachen. Auch nach der Auswertung, bei der die Raw integrated density, das heißt die Summe aller Fluorezenzwerte einer Zelle bestimmt und für Kontrolle und Patient verglichen wurde, bestätigte sich, dass es im Gehalt von filamentösem Aktin bei Chorea-Akanthozytose Erythrozyten keinen Unterschied zu Zellen von gesunden Spendern gab. Je nach Probe wurden zwischen 80 und 190 Zellen gemessen. Für die statistische Auswertung wurden zunächst alle Werte auf die Kontrollzellen

normiert. Da die Werte nicht normalverteilt waren, wurden dann von jedem Patienten und jeder Kontrolle jeweils der Median bestimmt und für diese ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Dieser ergab mit $p=0,9841$ keine statistische Signifikanz zwischen den Medianen der jeweiligen Patienten- und Kontrollwerte (Abb 29G).



G

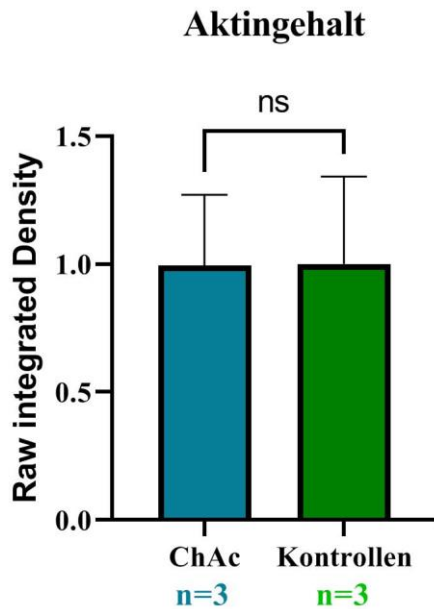


Abb. 29 A-G Färbung des filamentösen Aktins in Erythrozyten mit Phalloidin Atto647N In dieser Abbildung sind jeweils für jeden Patienten und jede Kontrolle ein beispielhaftes Bild der Aktinfärbung gezeigt. Es ist zu erkennen, dass sowohl Patienten, als auch Kontrollerythrozyten eine deutliche Färbung im Bereich der Zellmembran aufweisen. Hierbei lässt sich kein Unterschied zwischen Erythrozyten von Chorea Akanthozytose Patienten und Kontrollen sehen. Zudem sind auch die in Abb 29D und 29F zu sehenden Akanthozyten gleich stark angefärbt. Die Messung der Fluoreszenzintensität, deren Ergebnisse in 29G dargestellt sind, zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und den Patienten (t-Test $p=0,9841$). Die Balken zeigen den jeweiligen Mittelwert der Mediane pro Probe an. Dabei ist $n=3$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

3.7 Blutsenkungsgeschwindigkeit

In diesem Versuch sollte die Blutsenkungsgeschwindigkeit von Neuroakanthozytose Syndrom Patienten mit der gesunder Kontrollen verglichen werden. Dazu wurden Proben von 8 Kontrollen, 6 Chorea Akanthozytose Patienten und 3 McLeod Patienten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 30 dargestellt. Auf den Aufnahmen der Blutsenkungen wurde bereits deutlich, dass sich diese zwischen Patienten und Kontrollen unterschied. Diese verlief bei Patienten deutlich langsamer (Abb. 30A). Der Verlauf der Blutsenkung als Funktion von der Differenz zwischen Messbeginn und Zeitpunkt t nach Messbeginn (Δh) und der Zeit zeigt ebenfalls einen deutlichen Unterschied. Die Kurven der beiden Patienten verlaufen ähnlich, jedoch deutlich unter der der Kontrolle (Abb. 30B). Die patientenbasierte statistische Analyse nach den Zeitpunkten 30min, 1h und 2h ergab, dass sich McLeod und Chorea Akanthozytose Patienten in der Geschwindigkeit der Blutsenkung nicht signifikant unterschieden. Der Unterschied zu gesunden Patienten war signifikant für McLeod bereits nach 30min und für Chorea Akanthozytose nach einer Stunde (Abb. 30C). Die Darstellung aller individueller Messungen in Abbildung 30D macht deutlich, dass sich nach zwei Stunden keine der Messwerte für Δh mehr überschritten.

Zusammenfassend hat dieser Versuch gezeigt, dass die Blutsenkung bei den Neuroakanthozytose Syndromen langsamer verläuft, als bei gesunden Patienten. Die Differenz zwischen dem Höhenstand der Erythrozyten nimmt mit der Zeit zu und ab zwei Stunden Messzeit gibt es keine Überschneidungen mehr zwischen Patient und Kontrolle.

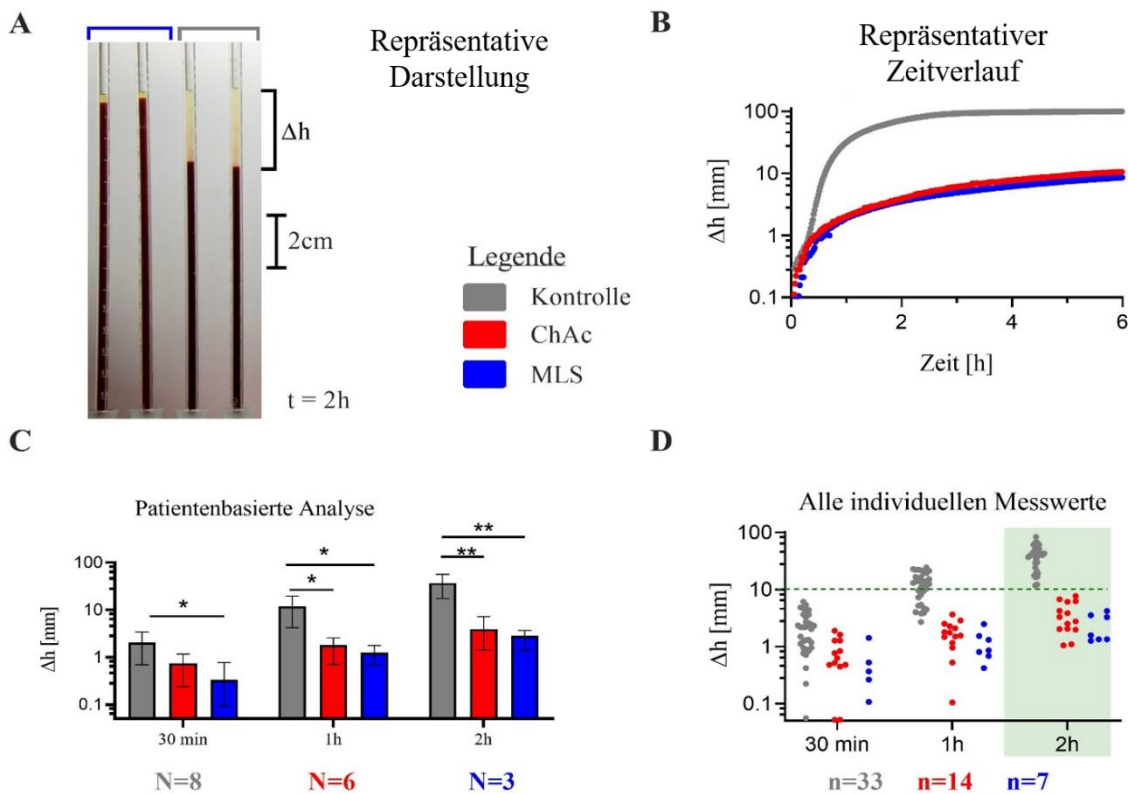


Abb. 30 Versuchsaufbau und Ergebnisse der Blutsenkungsgeschwindigkeit von Chorea Akanthozytose Patienten, McLeod Syndrom Patienten und gesunden Kontrollen Die Messung der Blutsenkungsgeschwindigkeit von Neuroakanthozytose Syndrom Patienten und Kontrollen wurde anhand der standardisierten Methode nach Westergren durchgeführt und dabei in regelmäßigen Zeitabständen automatisch Fotos des Versuchsaufbaus gemacht. Beispielhaft ist dieses hier in Abbildung 30A dargestellt für eine Messung nach 2h von einem McLeod Syndrom Patienten (links in blau) und einer gesunden Kontrolle (rechts in grau). Von je dem Patienten und der Kontrolle wurden zwei Blutsenkungen angefertigt, die nebeneinander dargestellt sind. Die Differenz zwischen dem Erythrozytenstand zu Beginn der Messung und zum Zeitpunkt t ist mit Δh bezeichnet (Abb 30A). Abb 30B zeigt den Zeitverlauf für eine Kontrolle und je einen Patienten. Dabei ist die Differenz Δh in mm (y-Achse, log-Darstellung) in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden (x-Achse) aufgezeichnet. Für die 8 Kontrollen, 6 Chorea Akanthozytose Patienten und 3 McLeod Syndrom Patienten wurde eine patientenbasierte statistische Analyse in Form eines One-Way-ANOVA von Δh zu den Zeitpunkten 30min, 1h, 2h durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen in diesem Diagramm die gesamte Range der Werte an (Abb 30C). Alle individuellen Messwerte nach den drei Zeitpunkten sind in Abb 30D in Form eines Streudiagramms dargestellt, wobei die grüne Markierung bei $x=10\text{mm}$ den Punkt markiert, an dem es keine Überschneidungen mehr zwischen Messwerten für Kontrollen und Patienten gibt. Dieser Zeitpunkt liegt bei 2 Stunden. Die in dieser Abbildung dargestellten Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit Darras A. und Kästner L.

Zwei der Chorea Akanthozytose Patienten wurden im Rahmen eines individuellen Heilversuchs mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib behandelt. Die Messungen der BSG von diesen Proben fanden zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Behandlung statt (vgl. Abb. 31). Erstens 80 Tage nach Beginn der Therapie (t1), zweitens 57 Tage nach der letzten Einnahme (t2) und drittens 295 Tage nach der

letzten Einnahme (t3). Für die Beurteilung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass noch unklar ist, ob sich der Tyrosinkinaseinhibitor auf die Erythropoese oder auf die reifen Erythrozyten in der Blutbahn auswirkt. t1 und t2 spiegeln in Bezug auf die Erythropoese die gleiche Situation wieder, das bedeutet, dass sich zu diesen beidem Zeitpunkten jeweils gleich viele Erythrozyten in der Blutbahn befanden, welche unter Dasatinib Therapie gebildet wurden. Zum Zeitpunkt t3 waren keine solche Erythrozyten mehr vorhanden (vgl. Abb. 31). Die Messungen der BSG (Δh) nach 2h zeigten hier etwas höhere Werte unter Dasatinib Therapie als nach Absetzen des Medikaments (Abb. 32). Insgesamt war die BSG auch unter Behandlung wesentlich langsamer, als bei gesunden Kontrollen. Eine statistische Auswertung war aufgrund der niedrigen Patientenzahl zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

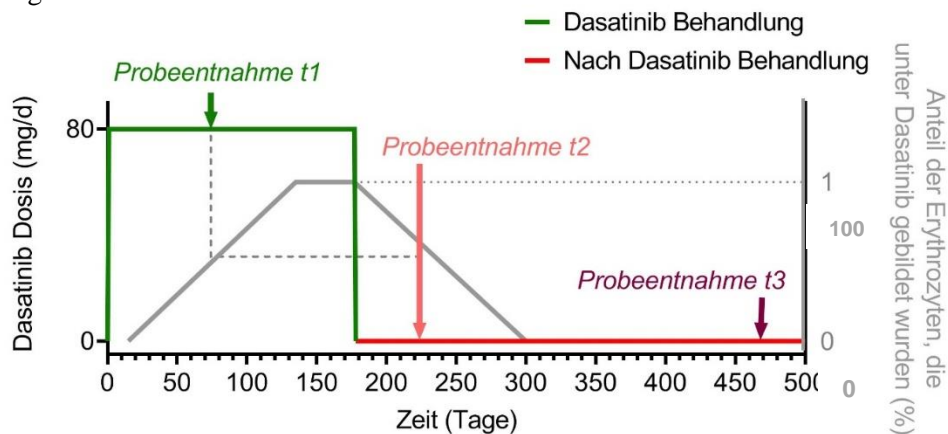


Abb 31: Zeitpunkte der Probenentnahme unter Dasatinib Behandlung. Die Abbildung zeigt den zeitlichen Ablauf des Versuchs mit Dasatinib. Die Probenentnahme für die BSG-Versuche fanden zu den Zeitpunkten t1, t2 und t3 statt. Der graue Graph zeigt etwa den Anteil der Erythrozyten, der unter Dasatinib Behandlung neu gebildet wurde. Diesem liegt eine ungefähre Überlebenszeit der Erythrozyten von 120 Tagen zugrunde. Es zeigt sich, dass der Anteil an Erythrozyten unter Dasatinib Einfluss zu den Zeitpunkten t1 und t2 etwa gleich war und zum Zeitpunkt t3 keine Erythrozyten mehr im Blut waren, welche unter Medikamenteneinfluss gebildet worden sind.

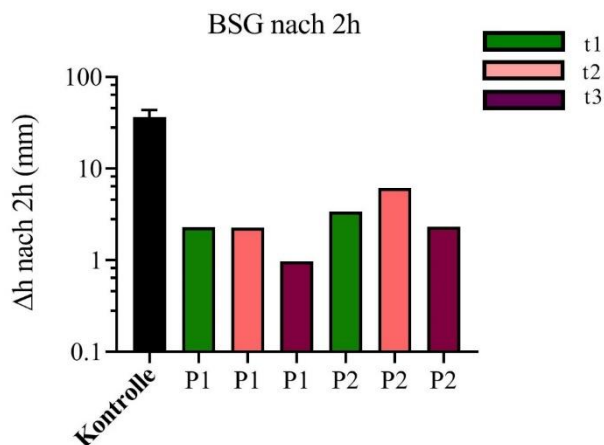


Abb. 32: Blutsenkungsgeschwindigkeit nach 2h bei Behandlung mit Dasatinib. Das Diagramm zeigt die BSG nach 2 Stunden bei gesunden Kontrollen in schwarz (N=8) und die Ergebnisse von zwei Chorea Akanthozytose Patienten zu den jeweiligen Zeitpunkten unter Dasatinib Behandlung. Die Ergebnisse in dieser Abbildung entstanden in Zusammenarbeit mit Darras A. und Kästner L.

4 Diskussion

4.1 Laborparameter

Bisher wurde in Bezug auf die Laborparameter von Neuroakanthozytose Syndrom Patienten beschrieben, dass vor allem die Kreatinkinase sowohl bei Chorea Akanthozytose, als auch bei McLeod Syndrom häufig erhöht ist, was teilweise auch zur Diagnosestellung beiträgt. Die Ursache liegt hier vermutlich in der Muskelbeteiligung bei den Erkrankungen, die sich in neuro- und myopathischen Veränderungen mit Areflexie, Atrophie und Muskelschwäche zeigt. Diese Symptome sind bei McLeod Syndrom stärker ausgeprägt, zudem kommt bei dieser Erkrankung häufig eine Beteiligung des Herzmuskels vor. Weiterhin wurden bei Neuroakanthozytose Syndromen Hepato-Splenomegalien als Folge von Anämien beschrieben, deren Ursache in einer vermehrten Phagozytose von den Akanthozyten in der Milz liegt (Jung et al. 2011). Für die Erkrankung Pantothenkinase assoziierte Neurodegeneration (PKAN), die ebenfalls Akanthozyten aufweist, wurde bereits eine höhere Fragilität der Erythrozyten im Milzmodell gezeigt (Cluitmans et al. 2015).

In meiner Arbeit wurden zusätzlich einige Standardlaborparameter für die Patienten und Kontrollen bestimmt, von denen ein direkter Einfluss auf die Erythrozyten und deren Aggregation erwartet wurde. Dabei wurde nicht nur die Abweichung von dem vom Labor festgelegten Normwert, sondern der Vergleich zu den gesunden Kontrollen untersucht. Hierbei fielen bei den Patienten zwar keine Unterschiede zu den Normwerten auf, jedoch teilweise signifikante Unterschiede zu den gesunden Kontrollen, d.h. Patienten wiesen Werte im oberen oder unteren Normalbereich auf. Dies bedeutet, dass die hier detektierten Abweichungen zwar keinen konkreten Krankheitswert haben, aber dennoch bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten gehäuft vorkommen. Insgesamt ist zu bedenken, dass die Messungen mit standardisierten Geräten durchgeführt wurden, die auf die Verwendung mit normal geformten Erythrozyten, das heißt Diskozyten geeicht sind. Da die Neuroakanthozytose Syndrome sehr seltene Erkrankungen sind und die Eigenschaften der Erythrozyten hierbei noch nicht umfassend geklärt sind, könnten einige der Ergebnisse durch diese veränderten Eigenschaften (Form, Verformbarkeit) beeinträchtigt sein.

Bezogen auf die oben beschriebenen Anämien bei Patienten fiel in unseren Messungen im Bereich der typischen Anämieparameter (Hb, MCV, MCH, Erythrozytenzahl, RDW) kein Hinweis auf eine akute Anämie auf. Hier müsste vor allem der Hb erniedrigt sein, der bei beiden Erkrankungen nicht von Kontrollen abwich (Abb. 15). Geht man von dem oben beschriebenen Mechanismus aus, dass Akanthozyten vermehrt in der Milz aussortiert werden, wäre die Folge eine hämolytische Anämie. Bei dieser Form der Anämie unterscheidet man zwischen kompensierter und unkompensierter Anämie, wobei bei der kompensierten die Produktion von Erythrozyten gesteigert wird. Dabei können die

Blutwerte normwertig sein und nur die Retikulozytenzahl ansteigen (Matzdorff et al. 2012). Des Weiteren sind die Erkrankungen bei den hier untersuchten Patienten schon länger bekannt und diese stehen dementsprechend unter Therapie, weshalb möglicherweise auftretende Anämien bereits behandelt werden. Um genauere Aussagen über mögliche Anämien bei den Patienten zu machen, bräuchte man weitere Informationen, zum Beispiel ob eine Splenomegalie vorliegt, ob Anämien in der Vergangenheit festgestellt und therapiert wurden und ggf. auch weitere Blutparameter wie die Retikulozytenzahl. Diese könnte einen Hinweis auf eine gesteigerte Erythropoese bei den Patienten geben. Die Medikation der Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme zeigte dahingehend bei keinem der Patienten eine Anämie an (vgl. Tab. 15 und 16). In einer Arbeit, die von einem Chorea Akanthozytose Patienten und einem McLeod Patienten diese Parameter (Hb, Hkt, Retikulozytenzahl) bestimmte, deuten die Ergebnisse auf eine hämolytische Anämie hin (Terada et al. 1999).

In den Messungen in dieser Arbeit fiel jedoch ein hohes MCH bei Chorea Akanthozytose auf (Abb. 15), welches normalerweise im Zuge einer hyperchromen, makrozytären Anämie zum Beispiel als Folge einer Vitamin B12 oder Folsäure Mangels auftritt. Diese hyperchromen Zellen scheinen allerdings generell charakteristisch für Erythrozyten von Neuroakanthozytose Syndrom Patienten zu sein (Jung et al. 2011). Es wird vermutet, dass die Zellen dehydriert sind und daher relativ mehr Hämoglobin aufweisen (Clark et al. 1989). Adjobo-Hermans et al. stellten 2015 die Hypothese auf, dass die verminderte Verformbarkeit von Akanthozyten zu einer Minderperfusion und damit verringerten Versorgung mit Sauerstoff von empfindlichen Zellen führt. Damit wird die Degeneration von nur bestimmten Zellen im Striatum erklärt und auch eine Erklärung für die vermehrte Aktivität der Lyn-Kinase in Neuroakanthozytose Syndrom Erythrozyten gegeben. Diese Zellen im Striatum seien besonders anfällig für Hypoperfusion und die Lyn-Kinase sei unter hypoxischen Bedingungen stärker aktiv (Adjobo-Hermans et al. 2015). Folge dieser minimalen Hypoxie könnte dann eine kompensatorisch verstärkte Erythropoese vor allem mit hohem Hämoglobingehalt der Erythrozyten sein, welche die höheren MCH Werte bei ChAc erklären würden. Das MCHC ist bei Erkrankungen mit verformten Erythrozyten wie zum Beispiel der Sphärozytose erhöht und weist auf eine höhere innere Viskosität der Erythrozyten und damit eine geringere Verformbarkeit hin (Sysmex Deutschland GmbH 2013). Im Falle der Sphärozytose übersteigen die Werte allerdings den Normbereich, bei den Neuroakanthozytose Syndromen weichen sie nur vom Durchschnitt ab, was darauf hinweisen kann, dass die Verformbarkeit der Zellen zwar im Gegensatz zu gesunden Erythrozyten eingeschränkt ist, jedoch nicht in dem hohen Maße, wie es bei der Sphärozytose der Fall ist. Zusammenfassend kann die Ursache für die erhöhten Hämoglobinwerte also zum einen in der Form der Erythrozyten liegen, wobei nur relativ zu viel Hämoglobin pro Zelle vorliegen würde. Denkbar wäre aber auch eine durch die Pathologie der Neuroakanthozytose Syndrome gesteigerter Hämoglobingehalt der Erythrozyten während der Erythropoese. Dabei korreliert der Hämoglobingehalt vermutlich mit der Verformbarkeit der Zellen.

Ein weiterer Parameter, dessen Abweichung vor allem bei Chorea Akanthozytose auffiel, war das Fibrinogen (Abb. 15). Die Ursache dieser Werte ist unklar, wobei verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen werden müssen. Es gibt Erkrankungen, bei denen Mutationen im Gen für Fibrinogen vorliegen und die mit einer verminderten oder ausbleibenden Bildung von Fibrinogen einhergehen (Matzdorff et al. 2012). Dass die Ursache für die niedrigeren Fibrinogenwerte bei Neuroakanthozytose Syndromen ebenfalls genetisch bedingt sind ist unwahrscheinlich, da eine solche Mutation im Gen für Fibrinogen bei den Erkrankungen bisher nicht gezeigt wurde. Zudem liegen die Werte bei den Patienten nur im niedrigen Normbereich und schwankten zusätzlich bei den beiden Patienten, die unter Dasatinib Behandlung standen. Eine weitere Ursache für niedrige Fibrinogenwerte ist der Bildungsort, die Leber. Bei Erkrankungen der Leber wie Zirrhosen ist die Bildung von Fibrinogen beeinträchtigt. Eine Arbeit, in der von einem Chorea Akanthozytose Patienten und einem McLeod Syndrom Patienten Parameter der Leberfunktion (Leberenzyme) bestimmt wurden, gibt in der Hinsicht allerdings keine Hinweise auf eine eingeschränkte Funktion (Terada et al. 1999). In einer anderen Arbeit wurden zumindest bei McLeod Patienten erhöhte Leberwerte und Spleno- und Hepatomegalie gefunden (Danek et al. 2001). Der Grund dafür könnte in der Erkrankung selbst liegen, oder an der mit chronischer Erkrankung einhergehenden Einnahme von zahlreichen Medikamenten, die Auswirkungen auf die Leberfunktion haben. Ein häufiges Symptom bei Neuroakanthozytose Syndromen sind zum Beispiel epileptische Anfälle (Jung et al. 2011), welche unbedingt therapiebedürftig sind, wobei antikonvulsive Medikamente oft Einfluss auf die Leberfunktion haben (z.B. Valproat) (Aktories et al. 2017). Die Medikation der Patienten (siehe Tabellen 15,16) zeigt, dass diese zum Teil mehrere solcher antikonvulsiver Medikamente einnehmen.

Bei Chorea Akanthozytose waren weiterhin die Thrombozytenzahlen gegenüber Kontrollen erniedrigt (Abb. 15). Gründe hierfür gehen mit den oben beschriebenen Mechanismen einher. Zum einen kann eine vermehrte Phagozytose in der Milz bei Splenomegalie für niedrige Thrombozytenzahlen sorgen. Des Weiteren wird das für die Thrombopoese wichtige Thrombopoetin in der Leber gebildet, und bei Einschränkungen der Leberfunktion ebenfalls weniger produziert (Lüllmann-Rauch et al. 2012). Für eine Ursache, die in der Erkrankung selbst liegt, spricht die Beobachtung, dass die Patienten nach Dasatinib Behandlung wieder leicht höhere Werte aufwiesen, als zuvor. Um diese Annahme zu stützen fehlen allerdings noch weitere Messungen von Patienten unter Dasatinib Behandlung. Wenn man davon ausgeht, dass die Neuroakanthozytose Syndrome Einfluss auf die Hämatopoese nehmen, könnte sich dieses auch auf andere Zelllinien außer den Erythrozyten auswirken und die abweichenden Thrombozytenzahlen erklären.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die Ursachen der Abweichungen der untersuchten Parameter entweder indirekte oder direkte Folgen der Erkrankung sein können, wobei diese noch weitestgehend unklar sind. Insgesamt sind die hier beschreibenden Ergebnisse jedoch alle nicht in pathologischem Maße verändert und ebenso nicht sinnvoll in der Diagnostik der Neuroakanthozytose

Syndrome einsetzbar. Dennoch scheint zumindest das Fibrinogen wie oben diskutiert eine von mehreren Ursachen für die verlangsamte Blutsenkung bei der Erkrankung zu sein.

4.2 Erythropoese

Die Untersuchung der Erythropoese bei Neuroakanthozytose Syndromen erfolgte in vitro mit einem zweistufigen Zellkulturprotokoll, welches unterschiedliche Zusätze für die Expansionsphase und die Differenzierungsphase verwendet. Bisher wurden nur Zellen von Chorea Akanthozytose Patienten mit einem einstufigen Modell untersucht. Hierbei wurden jedoch auch, wie in meinem Experiment periphere Stammzellen aus dem Blut der Spender als Ausgang für die Zellkultur untersucht. Hier wurde festgestellt, dass ab Tag 11 der Zellkultur das Wachstum der Patientenzellpopulation im Vergleich zu Kontrollen abnahm (Lupo et al. 2016). Lupo et al. 2016 stellten insgesamt eine Dyserythropoese fest, die sich unter anderem in einer veränderten Zellmorphologie zeigte. Es traten vermehrt multinukleäre Zellen während der Erythropoese auf, die Kerne waren weniger kondensiert und im Zytoplasma konnten akkumulierte Vesikel und Reste von Zellorganellen festgestellt werden. Zu einem späten Zeitpunkt der Erythropoese bestand die Chorea Akanthozytose Zellpopulation mehr als die der gesunden Kontrollen aus späten Erythroblasten und weniger aus Proerythroblasten (Lupo et al. 2016). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Untersuchungen an Mäusen mit hyperaktiver Lyn-Kinase als Chorea Akanthozytose Modelle. Bei diesen Mäusen wurde eine verstärkte Erythropoese mit abnormal großen Erythroblasten, vermehrten BFU-E Zellen und auch einer extramedullären Blutbildung als Kompensation für eine hämolytische Anämie gezeigt (Slavova-Azmanova et al. 2013). Insgesamt wird eine toxische Anhäufung der Lyn-Kinase mit Einfluss auf diverse Signalwege als Ursache für die Veränderungen in der Erythropoese vermutet (Lupo et al. 2016). Diese Beobachtungen gelten bisher nur für die Chorea Akanthozytose, es lässt sich jedoch vermuten, dass sie zum Teil auch bei McLeod Syndrom vorkommen könnten. Obwohl die Erkrankungen auf unterschiedlichen Mutationen beruhen (Fehlen von XK-Protein im Gegensatz zu Fehlen von Chorein) gibt es Parallelen in der Pathophysiologie. Zum einen weisen McLeod Syndrom Erythrozyten genau wie Chorea Akanthozytose Erythrozyten weniger Chorein auf (Urata et al. 2019) und es gibt direkte Interaktionen zwischen dem XK-Protein und Vps13a (Park et al. 2020). Ebenfalls haben Untersuchungen der Kinase-Interaktion bei beiden Erkrankungen Parallelen aufgezeigt. Bei beiden Erkrankungen liegen Imbalancen zwischen der Aktivität von phosphorylierenden Kinasen und Phosphatasen zugunsten der Kinasen vor. Zudem ähneln sich die Interaktionen von einigen Kinasen inklusive Lyn bei sowohl MLS als auch bei ChAc (De Franceschi et al. 2012). Deshalb wurde in meiner Arbeit die Erythropoese bei McLeod Syndrom Patienten untersucht und diese ebenfalls mit der Behandlung mit dem Lyn-Kinase Inhibitor Dasatinib kombiniert. Die Wirkung von Dasatinib beruht auf der Hemmung der Tyrosinkinase BCR-ABL (relevant bei Leukämien) und Kinasen der SRC Familie (z.B. Lyn). Bisher konnte ich bei den zwei Patienten keinen Unterschied in der Differenzierung und Enukleation zu

gesunden Kontrollen feststellen. Wichtig scheinen aber auch die morphologischen Unterschiede während der Erythropoese zu sein, welche ich bei meinen Experimenten nicht untersucht habe. Bezüglich des Tyrosinkinase Inhibitors Dasatinib lässt sich vermuten, dass die verwendete Konzentration von 100nM zumindest keinen toxischen Effekt auf die Erythropoese hat, jedoch auch keinen Einfluss auf die Erythropoese bei kranken Erythrozyten. Von daher sollte in zukünftigen Experimenten möglicherweise eine höhere Konzentration verwendet werden. Ich habe mich nach Zusammenschau der Literatur zu Dasatinib für eine Konzentration für 100nM entschieden. Die IC50 für die Hemmung der reinen SRC-Kinasen ist für Dasatinib mit 0,5nM (Datasheet zu Dasatinib der Firma SynKinase Australia) bis 8,5nM (Nam et al. 2005) angegeben. An Zellen in einer Kultur wurde Dasatinib bisher zum Beispiel bei verschiedenen Adenokarzinomzellen, die eine Überexpression für Lyn zeigen (IC50 für Lyn = 226 nM und 349 nM) (O'Hare et al. 2005) und Prostatakarzinomzellen, bei denen bei einer Konzentration von 100nM eine Abnahme der phosphorylierten Lyn gezeigt wurde (Nam et al. 2005). Die Europäische Arzneimittelagentur (EMA) gibt für Dasatinib eine benötigte Konzentration von 91nM zur Inhibition von 50% der phosphorylierten Src-Kinasen in peripheren mononukleären Stammzellen an (European Medicines Agency, 2006). Eine sinnvolle Ergänzung meiner Experimente wäre die Durchführung von Western Blots zu verschiedenen Zeitpunkten der Zellkultur, um die Expression der Lyn-Kinase und den möglichen Einfluss von Dasatinib auf diese deutlich zu machen. Ebenfalls sollte das Experiment auch mit Chorea Akanthozytose Zellen wiederholt werden, da zum bisherigen Zeitpunkt nur hier direkt die verstärkte Phosphorylierung der Lyn-Kinase bewiesen wurde und die Behandlung mit Dasatinib sich bisher experimentell auf Chorea Akanthozytose Patienten beschränkt.

Dass es einige Unterschiede in den Ergebnissen der Erythropoese in vitro zwischen den Vorkontrollen und dem eigentlichen Experiment gab, lässt sich wahrscheinlich zum einen dadurch erklären, dass die Experimente in verschiedenen Laboren und auch verschiedenen Durchflusszytometern durchgeführt wurden. Dass in den ersten Tagen der Differenzierung in meinem zweiten Experiment noch vermehrt CD71+/CD235a- Zellen vorkamen (vgl. Abb. 18), könnte zum einen daran liegen, dass insgesamt die Differenzierung langsamer verlief, oder dass sich die durchflusszytometrischen Messungen und das spätere Gating unterschieden. Dennoch sind die Resultate in meinem Experiment zwischen Patienten und Kontrollen vergleichbar. Der Quotient R/N gibt das Verhältnis von Retikulozyten zu Kernen an, welches wenn alle Retikulozyten in der Kultur überleben nahe 1 liegen sollte (für jeden ausgestoßenden Kern liegt auch ein Retikulozyt vor). Höhere Werte, wie sie in meinem zweiten Experiment auftraten (vgl. Abb. 20), lassen sich wahrscheinlich durch die vermehrte Degradation von Kernen zurückführen, die in der Messung dann nur noch als Zelltrümmer vorliegen und beim Gating ausgeschlossen werden. Dieses unterstützt auch die vor allem bei Patient und Kontrolle 1 niedrigen Werte für $N/(N+EBL)$ an Tag 9 (vgl. Abb. 20). Dieser Wert wird ebenfalls niedriger ausfallen, wenn weniger Kerne in der untersuchten Population vorliegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Betrachtung der Literatur zur Erythropoese bei Neuroakanthozytose Syndromen bisher nur Ergebnisse zur Chorea Akanthozytose vorliegen, es sich jedoch vermuten lässt, dass es auch bei dem McLeod Syndrom zu Abweichungen kommen könnte. Meine bisher durchgeführten Experimente mit McLeod Zellen weisen jedoch noch nicht auf einen solchen Unterschied hin. Die Anwendung des Tyrosinkinaseinhibitors Dasatinib in der Zellkultur ist sowohl bei Chorea Akanthozytose, als auch bei McLeod Syndrom sinnvoll, wobei wahrscheinlich mit einer höheren Konzentration als 100nM gearbeitet werden und das Experiment durch eine Ergänzung von Western Blots zur Quantifizierung der Lyn-Kinase komplettiert werden sollte.

4.3 3D Aufnahmen von Erythrozyten und Blutausstriche

3D Aufnahmen

Für die Diagnose eines Neuroakanthozytose Syndroms ist das Vorliegen von >4% Akanthozyten im peripheren Blut ausschlaggebend (Grehl et al. 2016). Als Methode für die Detektion der Akanthozyten wird zumeist ein Blutausstrich vorgeschlagen. In dieser Arbeit sollte eine andere Methode verwendet werden, um die Zellformen von Neuroakanthozytose Syndrom Patienten zu klassifizieren, mit den Ergebnissen eines konventionellen Blutausstrichs zu vergleichen und die Objektivität der Methode zu untersuchen.

Die Färbung der Erythrozyten mit CellMask deep red und Generierung von 3D Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop war eine sehr einfache Methode um anschauliche und vor allem sehr deutliche Aufnahmen der einzelnen Zellen zu erstellen. Ich habe mich dafür entschieden, neben Diskozyten und Akanthozyten noch die Kategorien Echinozyten und „Andere“ in die Klassifikation einzubeziehen. Bei der Zählung und auch dem Vergleich von den Ergebnissen von zwei Auswertern fiel auf, dass die Unterscheidung der Kategorien Akanthozyten, Echinozyten und Andere oft nicht einheitlich war (vgl. Abb. 23). Hier sollte die Definition der Zellformen genauer betrachtet werden. Echinozyten werden auch Stechapfelzellen genannt und zeichnen sich durch eine kugelige Form mit kleinen, gleichmäßig verteilten spitzen Ausstülpungen aus. Akanthozyten hingegen werden als Stachelzellen bezeichnet und sollten unregelmäßigere längere Ausläufer zeigen, als Echinozyten (Ford, 2013). Hier ist zu erwähnen, dass es noch eine Unterteilung der Echinozytenformen gibt (I-IV). Diese sind in Abbildung 33 dargestellt.

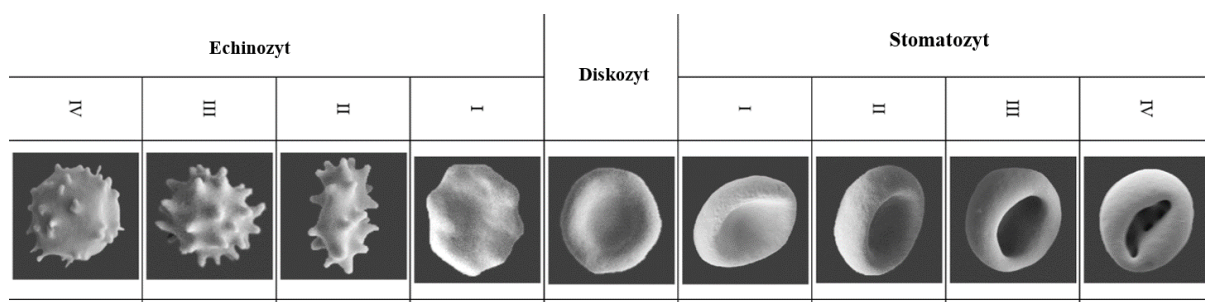


Abb. 33 Stomatozyt-Diskozyt-Echinozyt-Transformation. Die Abbildung zeigt den fließenden Übergang der Stadien von Echinozyten über die normalen Diskozyten zu Stomatozyten und deren Unterteilung in verschiedene Stadien. (Abbildung überarbeitet nach Geekiyanage et al. 2019)

In der Praxis war es trotz Beachtung dieser Definitionen auch in der 3D Darstellung der Zellen oft schwierig zwischen den Formen zu unterscheiden, was dazu führte, dass besonders viele Zellen in die Kategorie „Andere“ eingeordnet wurden und auch große Unterschiede zwischen zwei Auszählungen von verschiedenen Beurteilern zur Folge hatte. Wenn man die Grenze von 4% Akanthozyten für die Definition von Neuroakanthozytose Syndromen nimmt, kam Auswerter 1 nur bei 3 von insgesamt 12 Patienten über diese hinaus. Bei Auswerter 2 lagen 11 von 12 Patienten über 4% Akanthozyten (vgl. Abb. 23). Man kann also davon ausgehen, dass Auswerter 1 wesentlich mehr Zellen als Echinozyten oder „Andere“ bezeichnet hat, die eigentlich eher als Akanthozyten zu klassifizieren gewesen wären. Auswerter 2 liegt mit 2-40% Akanthozyten außerdem nah am Konsens anderer Arbeiten, die für McLeod und Chorea Akanthozytose von Akanthozyten zwischen 25-60% (De Franceschi et al. 2014) oder 1-50% (Siegl et al. 2013) ausgehen. Allerdings gibt es in der Literatur auch Angaben über Chorea Akanthozytose Patienten, die keine Akanthozyten aufweisen (Bayreuther et al. 2010). Ein weiteres Problem ist, dass Echinozyten oft nur in-vitro-Artefakte durch Einfluss von hypertonen Lösungen und der Interaktion mit der Glasoberfläche darstellen und in-vivo nicht vorkommen dürften.

Dementsprechend müssten alle Echinozyten, die gezählt wurden erst durch die Präparation der Probe entstanden sein und die ursprüngliche Form im Patientenblut wäre nicht mehr nachweisbar. Da bei den Patienten jedoch von beiden Untersuchern mehr Echinozyten gezählt wurden, als bei Kontrollen, kann geschlussfolgert werden, dass Patientenzellen empfindlicher auf äußere Einflüsse reagieren, als Kontrollzellen. Dieser Umstand wird sich auch bei einigen Methoden zur Detektion von Akanthozyten zunutze gemacht (Storch et al. 2005).

Unter Stomatozyten fielen bei der Klassifikation alle Zellen, die nur eine anstatt zwei Konkavitäten aufwiesen. Auch die Stomatozyten werden wie die Echinozyten noch in mehrere Stadien unterteilt (I-IV) (siehe Abbildung 33). Die Erythrozyten ohne schlitzförmige Konkavität aber mit einer konvexen Seite, wie sie hier auftraten, zählen zu Stomatozyten I-II.

Da der Übergang zwischen den Formen Echinozyt, Diskozyt und Stomatozyt fließend ist, ist häufig die quantitative Einteilung in diese Kategorien nicht einfach. Untersuchungen, die nicht von einer manuellen, definitiven Einteilung dieser Zellformen abhängig sind, sind zum Beispiel trainierte

künstliche neuronale Netzwerke (Kaestner 2020, Simionato et al. 2021). Hiermit können Verzerrungen der Ergebnisse, die durch subjektive Einschätzungen entstehen, verhindert werden. Es kann auch die Verteilung der Unterformen von Echinozyten und Stomatozyten zuverlässig gemessen und eine Verteilung dargestellt werden (SDE-Verteilung). Zählungen von Chorea Akanthozytose Erythrozyten und gesunden Kontrollen zeigen hier für Patienten eine breitere Verteilung und unterstützen damit die Ergebnisse, die durch die subjektiven Klassifizierungen in dieser Arbeit erzielt wurden (vgl. Abb. 34).

Klassifikation

SDE-Verteilung



Abb. 34: Ergebnisse der Zellklassifikation durch ein künstliches neuronales Netzwerk. Dargestellt ist die sogenannte SDE-Verteilung der Erythrozyten und die Anteile der jeweiligen Zellformen bei gesunden Kontrollen (blau) und zwei Chorea Akanthozytose Patienten zum Teil unter Dasatinib Behandlung zu den verschiedenen Zeitpunkten (s.o) und ohne Behandlung (violett) (Abbildung bearbeitet aus Rabe et al. 2021).

Dieser Vergleich zwischen nur zwei Untersuchern hat gezeigt, wie groß die Subjektivität der Klassifikation von Zellen nach ihrer Morphologie ist. Demnach können mit der Methode, die hier in der Arbeit verwendet wurde zwar sehr anschauliche Abbildungen von Zellen erzielt werden, sie eignet sich jedoch vermutlich nicht zur zuverlässigen Bestimmung der Akanthozytenzahlen bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten. Zudem ist bereits bekannt, dass das Auftreten von Akanthozyten zwar charakteristisch für die Erkrankungen ist, aber nicht mit der Stärke der Symptome korreliert, großen zeitlichen Schwankungen und interindividuellen Unterschieden unterlegen ist. Deshalb ist die genaue Bestimmung der Menge an Akanthozyten nicht klinisch relevant. Für die generelle Detektion von verformten Zellen im Blut bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten, zum Beispiel um eine festgelegte Grenze bei einem Screening eines Patienten mit Symptomen zu überschreiten, können die hier als Echinozyten und „Andere“ bezeichnete Zellen vermutlich mit in die Zählung einbezogen werden, da diese neben den nach der Definition eindeutigen Akanthozyten ebenfalls bei Patienten vermehrt auftreten und damit charakteristisch für die Erkrankung sind. Automatisierte Zellklassifikationen zum Beispiel durch ein künstliches neuronales Netz sind dabei hilfreich um einheitliche Ergebnisse zu erzielen.

Blutausstriche und 3D Aufnahmen

In vielen Quellen wird die Akanthozytose „im Blutausstrich“ als diagnostischer Wegweiser für die Neuroakanthozytose Syndrome genannt. Deshalb habe ich in dieser Arbeit Blutausstriche angefertigt und die Ergebnisse der Zellzählung mit der oben beschriebenen 3D Methode verglichen. Storch et al. untersuchten 2005 die Blutausstriche zur Detektion von Akanthozyten bereits und stellten fest, dass die Standardmethode des EDTA-Blutausstrichs weniger sensitiv war, als andere Verfahren. Vor allem die Anfertigung von nassen Präparationen in isotoner Kochsalzlösung war dem Verfahren mit trockenen Ausstrichen überlegen. Dabei wurde in der Arbeit nicht zwischen Echinozyten und Akanthozyten unterschieden und festgestellt, dass sich bei den Patienten durch die Mischung mit isotoner Flüssigkeit ausgelöster echinozytischer Stress stärker auf Patienten als auf Kontroll-Erythrozyten auswirkt (Storch et al. 2005). Ich habe Blutausstriche nach Dilution mit 0,9% Kochsalzlösung angefertigt und nach dem Trocknen gefärbt. Die Ausstriche wurden dann fotografiert und anhand der Fotografien die Zellen ausgezählt und versucht die Kategorien Akanthozyten und Echinozyten zu trennen, was jedoch wie bereits oben bei den 3D Aufnahmen beschrieben sehr schwer fiel. Insgesamt traten bei den Ausstrichen der Patienten mehr Echinozyten auf, als in den 3D Aufnahmen, was wahrscheinlich wie bei Storch et al. 2005 beschrieben an der Verdünnung mit der Kochsalzlösung liegt. Diese Beobachtung, dass Patientenerythrozyten empfindlicher auf derartige Bedingungen reagieren stützt die Vermutung, dass Veränderungen bei den Neuroakanthozytose Syndromen alle Erythrozyten betreffen, egal welche Form sie haben.

Da die Zellen bei den 3D Aufnahmen deutlich genauer betrachtet werden konnten, erhielt die Kategorie „Andere“ mehr Zellen als bei den Ausstrichen, bei denen die Form der Zelle oft nur grob

beurteilt werden konnte (vgl. Abb. 25). Es fiel weiterhin auf, dass sich wenn mehrere Ausstriche für einen Patienten angefertigt wurden die einzelnen Ausstriche unterschieden und auch die Randbereiche der Ausstriche teilweise mehr Echinozyten/Akanthozyten aufwiesen. Hinzu kommt, dass in meiner Arbeit die Ausstriche nicht frisch, sondern nach längerer Zeit und anhand von Fotos ausgewertet wurden, was die Beurteilung erschwert. Insgesamt zeigte sich, dass die Methode des Blutausstrichs nicht so gut geeignet war wie die 3D Aufnahmen, obwohl es in den Zählungen zwischen Blutausstrich und 3D keine signifikanten Unterschiede in den Zellzahlen gab. Für das Beispiel der Sphärozytose zeigten Simionato et al. 2021 ebenfalls, dass es deutliche Unterschiede in der Genauigkeit von 3D Aufnahmen der Zellen gegenüber Blutausstrichen gibt (Simionato et al. 2021).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Detektion von Akanthozyten als Marker für die Neuroakanthozytose Syndrome zwar eine klinische Relevanz hat, der genaue Anteil an Akanthozyten jedoch nicht. Zusätzlich ist keine der verwendeten Methoden stabil genug, um durch verschiedene Beurteiler gleich bewertet zu werden. Weiterhin besteht zwischen den Zellmorphologien ein fließender Übergang, was vor allem die tatsächliche Abgrenzung von Akanthozyten zu Echinozyten erschwert. Insgesamt ist es wichtig festzuhalten und auch mit allen Methoden festzustellen, dass Neuroakanthozytose Syndrom Patienten unnormale geformte Zellen verschiedenster Ausprägungen im Blut aufweisen.

4.4 Calciummessung

Die Literaturübersicht, die in der Einleitung dargestellt ist, macht deutlich, dass eine Untersuchung des Calciumgehalts bei Neuroakanthozytose Syndromen bedeutsam ist und weitere Einsicht in die Pathophysiologie der Erkrankung geben kann. Calcium in Erythrozyten ist beteiligt an der Stabilität des Zytoskeletts, der Integrität der Zellen und dem Ionen- und Wassergehalt (Bogdanova et al. 2013). In der Tabelle 17 sind die Vorgänge in Erythrozyten, die mit einem Calciumeinstrom einhergehen dargestellt, sowie ob solche Veränderungen auch bei Neuroakanthozytosen nachgewiesen wurden.

Tab. 18 Physiologische Auswirkungen von Calcium auf Erythrozyten Nach Bogdanova et al. 2013

Folgen von Calciumeinstrom	Ausprägung bei den Neuroakanthozytose Syndromen
Veränderungen des Zytoskeletts (Instabilität und Phosphorylierung) +	+
Hämolyse +	+
Kalium –	-
Dehydratation +	+
Verformbarkeit +	-

Die Physiologie der Calciumhomöostase in Erythrozyten und die Pathologie der Akanthozytosen passen nicht in allen Punkten zusammen. Aufgrund dessen ist es sinnvoll zunächst das basale Calcium in Chorea-Akanthozytose Erythrozyten und gesunden Erythrozyten zu vergleichen, was ich in dieser Arbeit getan habe. Dabei habe ich die Messungen mit einer Fluoreszenzmessung im Konfokalmikroskop durchgeführt. Diese Methode ist für die Messung des Calciumgehalts in Erythrozyten etabliert (Fermo et al. 2017) und in einigen Punkten der Messung mit anderen Methoden wie zum Beispiel Durchflusszytometrie überlegen (Minetti et al. 2013). Des Weiteren habe ich die Zellen fast unmittelbar nach Entnahme des Blutes untersucht. So wurde das Risiko, dass es zu Artefakten durch eine längere Lagerung oder Konservierung der Zellen kam, vermindert. Ich konnte mit meinen Untersuchungen im basalen Calciumgehalt der Chorea-Akanthozytose Erythrozyten keinen signifikanten Unterschied zu gesunden Kontrollen feststellen (Abb. 26). Es lässt sich also vermuten, dass zumindest bei der Chorea Akanthozytose das basale Calcium nicht pathologisch erhöht oder erniedrigt ist. Für einige der Veränderungen in Akanthozyten, die möglicherweise auf Abweichungen im Calciumgehalt zurückzuführen sind gibt es auch andere Erklärungsmöglichkeiten. Veränderungen im Zytoskelett, die vor allem in einer Phosphorylierung von Zytoskelettbestandteilen bestehen, liegen zum Beispiel in einer veränderte Aktivität verschiedener Kinasen begründet, welche auch unabhängig von Calcium funktionieren (De Franceschi et al. 2014, Ingley 2012). Die Hämolyse bei den Neuroakanthozytose Syndromen ist zudem vermutlich auch keine intravasale Hämolyse aufgrund von einer Instabilität der Zellen, sondern eine vermehrte Aussortierung in der Milz aufgrund der verminderten Verformbarkeit (s.o.).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass einige der nachgewiesenen Veränderungen in Akanthozyten zwar auf Pathologien in der Calciumhomöostase der Erythrozyten zurückzuführen sein könnten, es hier jedoch auch Widersprüche gibt. In meinem Experiment konnte gezeigt werden, dass im basalen Calcium von Chorea-Akanthozytose-Erythrozyten kein Unterschied zu gesunden Zellen besteht. Jedoch wurde in vergangenen Versuchen zum Beispiel schon die reduzierte Aufnahme von Calcium induziert durch LPA gezeigt, was auf eine verringerte Möglichkeit der Zellen zur Endovesikelformation hinweist (Siegl et al. 2013). So kann mein Experiment noch keine Aussagen zum Transport von Calcium in Akanthozyten unter verschiedenen Bedingungen oder auch den intrazellulären Signalwegen mit Calcium treffen. Eine Messung des Calciums bei Verformung der Zellen und auch eine Messung des Calciums bei den anderen Neuroakanthozytose Syndromen könnte in Zukunft weiteren Aufschluss über die Beteiligung des Calciums an dieser Erkrankung geben.

4.5 Aktinfärbung und Expansionsmikroskopie

Aktin ist neben Spektrin ein wichtiger Bestandteil im Zytoskelett der Erythrozyten, welches für Form und Verformbarkeit dieser verantwortlich ist. Aufgrund dessen sind Veränderungen im Zytoskelett eine mögliche Ursache für die Formveränderungen der Erythrozyten bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten. In den Versuchen meiner Arbeit sollte die Struktur des Aktins bei den Erkrankungen genauer untersucht werden und dafür sollte als neue hochauflösende Methode zunächst die Expansionsmikroskopie für Erythrozyten etabliert werden. In meinen Experimenten wurde die Protein Retention Expansions Mikroskopie (proExM) verwendet, weshalb ich mich im Folgenden nur auf diese Methode beziehe.

Wie bereits im Abschnitt Methoden beschrieben, habe ich zwei verschiedene Ansätze gewählt, um das Protokoll für Erythrozyten anzupassen. Bei der Verwendung von CellTak wurden die Zellen in den nachfolgenden Arbeitsschritten auf dem Deckgläschen fixiert weiterverarbeitet. Die Antikörperfärbung und Gelation musste dementsprechend auf den kleinen Gläschen erfolgen, was bei vielen Proben mit einem hohen Zeitaufwand verbunden war. Wenn das Gel augehärtet war, und man es vom Deckgläschen entfernen musste, blieben bei den Versuchen mit CellTak die meisten Zellen auf dem Glas zurück und waren nicht im Gel eingebettet. Nach der Expansion durch Hinzugabe von Wasser war das Gel sehr schwer zu sehen und fragil. Zusätzlich kam es während der Mikroskopie, die auf Grund der nur wenig zu findenden Zellen häufig lange dauerte, zu einer Schrumpfung des Gels. Das Gel bewegte sich außerdem durch den Flüssigkeitsfilm unter dem Mikroskop, was vor allem die Aufnahme von Stacks unmöglich machte. Des Weiteren befanden sich bei dem Versuch mit CellTak alle Zellen in einer Ebene im Gel, welche auf Grund der wenigen Zellen und schwachen Fluoreszenz schwer im Mikroskop zu finden war. Dazu muss erwähnt werden, dass die Probe nach der Expansion komplett transparent und nicht mehr mit Lichtmikroskopen sichtbar ist. Die wenigen Zellen, die in der Mikroskopie gefunden werden konnten, waren etwa um den erwarteten Faktor 3,5 vergrößert, wobei leider keine Aussagen zum Zytoskelett getroffen werden konnten, da nach der Expansion das Fluoreszenzsignal von Phalloidin nicht mehr zu sehen war. Im Protokoll wird für das Atto647N eine gute Retention des Fluoreszenzsignals nach der Expansion angegeben (Tillberg et al. 2016, vgl. Abb. 35). Daher kann vermutet werden, dass die Ursache des schlechten Signals eher in der angefärbten Struktur, dem Aktin lag. Dessen Struktur hat möglicherweise der Expansion und vor allem der Verdauung mit Proteinase K in den Erythrozyten nicht standgehalten. Bisher konnte in anderen Zellen (HEK293FT) jedoch durchaus auch das Aktin nach der Expansion mikroskopiert werden, wie in Abbildung 36 dargestellt ist (Tillberg et al. 2016, vgl. Abb. 36).

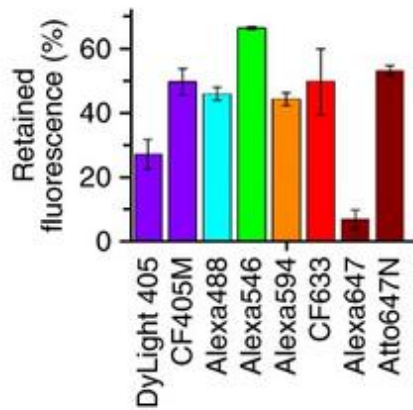


Abb. 35 Beibehaltende Fluoreszenzintensität nach Expansion. Die Werte wurden an einem Schnitt eines Maus-Hirns ermittelt. Dabei ist für verschiedene Farbstoffe die relative Fluoreszenzintensität in % nach der Expansion im Vergleich zu vorher aufgetragen. In meinen Experimenten habe ich Alexa488 und Atto647N verwendet. Für diese beiden Stoffe ist hier eine Fluoreszenzretention von etwa 50% angegeben, was ein auch nach der Expansion gutes und vor allem für beide Stoffe ähnliche Fluoreszenzsignal erwarten lässt. (Abbildung aus Tillberg et al. 2016).

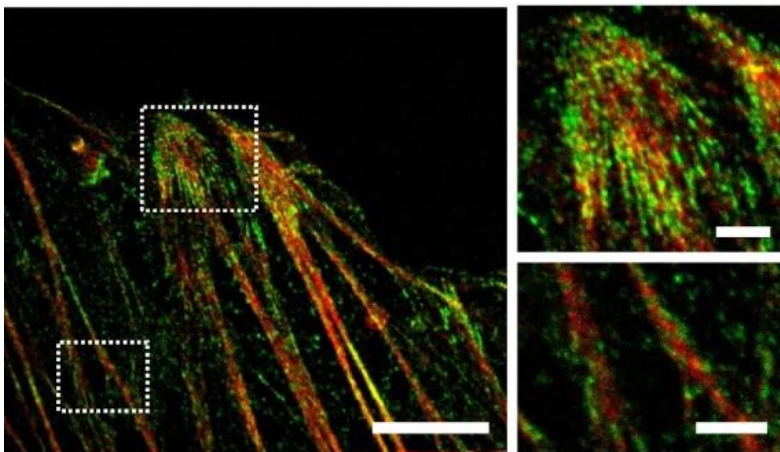


Abb. 36 Aufnahmen nach Expansion von Aktin (rot) und Paxillin (grün) bei HEK293FT Zellen. Aktin wurde hier mit mRuby2 gefärbt und Paxillin mit mEmerald. Der Balken repräsentiert 5µm im Übersichtsbild und 1µm in den Vergrößerungen. (Abbildung aus Tillberg et al. 2016).

Im zweiten Vorgehen habe ich versucht zunächst die Dichte der Zellen in der Probe zu erhöhen, um die Mikroskopie zu vereinfachen. Dafür wurde die Gelation in Suspension durchgeführt. Tatsächlich konnten daraufhin viel mehr Zellen gleichzeitig geimaged werden, zudem war das Handling der Probe vor der Gelation einfacher. Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt einerseits auf, dass die Zellen nicht mehr alle die diskoide Form aufwiesen. Die Ursache dessen könnte entweder bei den Schritten vor Gelation, also bei der Fixierung liegen. Wenn das Glutaraldehyd schnell zu den Zellen hinzupipettiert wird, werden diese verformt und so direkt fixiert. Allerdings habe ich die gleiche Art der Fixierung auch bei anderen Experimenten (z.B. den 3D Aufnahmen) verwendet, wobei keine stark verformten Zellen auftraten. Der gleiche Effekt könnte auch bei der Hinzugabe der Gelkomponenten zu den Zellen auftreten. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Verdauung und Expansion selbst die Form der Zellen verändert.

Die einzige Struktur, die ich in meinen Experimenten nach Expansion erfolgreich beurteilen konnte, ist die Glykokalix gefärbt mit Wheat Germ Agglutinin (WGA). WGA bindet an Sialinsäure und N-Acetylglucosamin, die Bestandteile der Glykokalix von Erythrozyten sind. Die Glykokalix besteht aus mehrkettigen Zuckern, die an integrale Membranproteine und die Membranlipide gebunden sind. Vor der Expansion zeigte das WGA eine kontinuierliche Anfärbung der äußeren Zellkontur. Nach der Expansion war das Signal eher punktförmig unterbrochen. Durch die Expansion werden die Fluoreszenzmoleküle in allen drei Dimensionen etwa um den Faktor 3,5 auseinandergezogen. Denkbare Ursache für die punktförmige Anfärbung nach Expansion wäre also ein Abstand der Moleküle, der größer als die Auflösungsgrenze des Mikroskops ist. Wenn man davon ausgeht, dass das WGA die gesamte Glykokalix anfärbt, ist diese Erklärung allerdings unwahrscheinlich, da in dem Fall auch bei 3,5facher Expansion nicht die Auflösungsgrenze erreicht wäre.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Versuch einer Expansionsmikroskopie an Erythrozyten gezeigt hat, dass bei diesen Zellen die Methode in Suspension verwendet werden sollte. Allerdings scheinen die Zellen nach der Expansion ihre Form verändert zu haben, wobei die genaue Ursache unklar ist. Obwohl vor allem Aussagen über das Zytoskelett auch in Bezug auf spätere Versuche mit Neuroakanthozytose Syndrom Zellen interessant gewesen wären, konnten diese Strukturen bisher noch nicht erfolgreich angefärbt werden. Offenbar ist für die Anwendung des Protokolls auf andere Zelltypen eine noch weitergehende Modifikation des Protokolls nötig. Eine Überlegung um das Zytoskelett besser beurteilen zu können wäre die Anfärbung von zum Beispiel Spektrin in den Erythrozyten.

Um dennoch das Aktin der Erythrozyten bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten zu untersuchen, wurde daraufhin eine andere, quantitative Methode verwendet. Dafür habe ich das Aktin in Erythrozyten von Chorea Akanthozytose Patienten und Kontrollen mit dem gleichen Verfahren, das auch für die Expansionsmikroskopie genutzt wurde gefärbt und die Fluoreszenzintensitäten verglichen.

Föller et al. färbten 2012 bereits Erythrozyten in einem mit Methanol fixierten Blutausschlag und zeigten weniger filamentöses Aktin in Chorea Akanthozytose Patientenerythrozyten in der Konfokalmikroskopie sowie auch eine höhere G/F-Aktin Relation mit Hilfe eines Western Blots (Föller et al. 2012) (vgl. Abb. 37). Ich habe die Erythrozyten zunächst mit Glutaraldehyd in Suspension fixiert und dann mit Phalloidin 647N für 30 min gefärbt. Daraufhin wurden mit dem Konfokalmikroskop dreidimensionale Aufnahmen erstellt. Dabei konnte ich bei drei Chorea Akanthozytose Patienten und zugehörigen Kontrollen keinen signifikanten Unterschied im Gehalt von filamentösem Aktin nachweisen. Diese Messungen gelten für die Gesamtzeit der gemessenen Zellen (sowohl Diskozyten, als auch verformte Erythrozyten). Rein optisch fällt auch bei den Akanthozyten in meinen Aufnahmen außer der Form kein wesentlicher Unterschied in der Fluoreszenzintensität auf. Des Weiteren betrifft die Mutation im Chorein-Gen, welche ursächlich für die Erkrankung ist, alle

Zellen. Da eine direkte Verbindung zwischen der Expression von Chorein und der Depolymerisation des Aktins gezeigt wurde (Shiokawa et al. 2013), ist davon auszugehen, dass sich die Unterschiede im Aktin Gehalt in allen Erythrozyten zeigen würden.

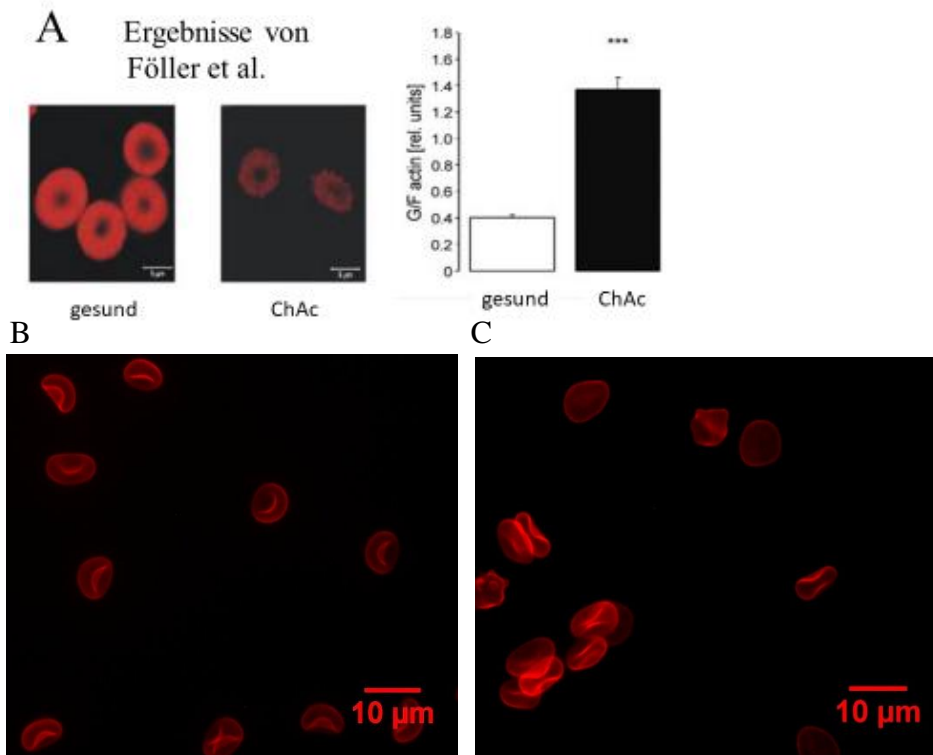


Abb. 37 A-C Vergleich der Aktinfärbung. A Stellt die Resultate von Föller et al. 2012 dar. Hier wurden Blutausstriche mit Methanol fixiert und das Aktin mit Rhodamine Phalloidin gefärbt (Größenbalken 5µm). Zudem wurden Western Blots für filamentöses und glomeruläres Aktin bei Patienten und Kontrollen durchgeführt. Es zeigte sich eine schwächere Anfärbung der Patientenerythrozyten und eine höhere G/F Aktin Ratio, was vermuten lässt, dass bei Chorea Akanthozytose der Gehalt an filamentösem Aktin zugunsten von glomerulärem vermindert ist. Abbildung B und C zeigen die Ergebnisse meiner Arbeit von mit Glutaraldehyd fixierten und Phalloidin647N gefärbten Erythrozyten. Hier liegt sowohl bei Diskozyten, als auch bei Akanthozyten eine homogene Färbung im Bereich der Zellmembran vor.

Es stellt sich nun die Frage, warum in meinen Experimenten der zuvor beschriebene Unterschied im Aktin Gehalt bei der Erkrankung nicht gemessen werden konnte. Die von mir und Föller et al. 2012 verwendeten Methoden unterscheiden sich in zwei Punkten, die Ursache für die abweichenden Ergebnisse sein könnten. Zum einen wurden in der o.g Arbeit Blutausstriche gefärbt und begutachtet, während bei meinem Versuch mit Zellen in Suspension gearbeitet wurde. Möglicherweise nimmt das Ausstreichen und trocknen lassen der Zellen einen Einfluss auf diese, der bei Chorea Akanthozytose Erythrozyten stärker ausgeprägt ist, als bei gesunden Kontrollen. Zum Beispiel habe ich bei meinen angefertigten Blutausstrichen eine Zunahme an Echinozyten bei den Patientenproben beobachtet (s.o). Zum anderen habe ich meine Zellen mit Glutaraldehyd fixiert, welches selbst eine Fluoreszenz aufweist und mit Zellstrukturen interagiert. Glutaraldehyd bindet unter anderem an Aminogruppen und führt so zu einer Quervernetzung der Proteine einer Zelle (Abay et al. 2019). In meinen Versuchen wurden die Zellen nur für kurze Zeit mit einer relativ niedrigen Konzentration (10min mit 0,1%) mit

Glutaraldehyd fixiert. Dennoch scheint die Autofluoreszenz von Glutaraldehyd vor allem bei einer Wellenlänge von 647nm, auch bei der niedrigen Konzentration relevant zu sein (Abay et al. 2019).

Es lässt sich zusammenfassen, dass ich bei drei Chorea Akanthozytose Patienten mit meiner gewählten Methode keinen Unterschied im Gehalt von filamentösem Aktin zu gesunden Kontrollen nachweisen konnte. In der Literatur wurden andere Methoden bereits durchgeführt, die einen solchen Unterschied allerdings vermuten lassen.

4.6 Blutsenkungsgeschwindigkeit

Die Blutsenkungsgeschwindigkeit ist ein Testverfahren, das bereits vor mehr als 100 Jahren entwickelt wurde und die Absenkung der Erythrozyten im Plasma untersucht (Grzybowski et al. 2012). Diese wird heute im klinischen Alltag zum Monitoring von entzündlichen Erkrankungen zum Beispiel aus dem rheumatischen Formenkreis und zur Detektion von malignen Prozessen (z.B. Sturzsenkung bei Plasmozytom) verwendet. Klassischerweise wird beschrieben, dass die BSG von der Zusammensetzung des Plasmas abhängt. In der Regel stellt in diesem Zusammenhang eine erhöhte BSG eine Pathologie dar (Ott 2020).

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass bei den Neuroakanthozytose Syndromen McLeod Syndrom und Chorea Akanthozytose eine langsamere Blutsenkung stattfindet, als bei Kontrollen. Damit kann das Verfahren als neuer Marker für die Diagnostik der beiden Erkrankungen gelten. Trotz der Seltenheit der Erkrankung und der relativ niedrigen Zahl an Patienten wurde ein signifikanter Unterschied in der Geschwindigkeit der Blutsenkung festgestellt. Dabei kann als Cut-off der Wert nach zwei Stunden gesehen werden, bei dem sich keine der Messwerte zwischen Patienten und Kontrollen überschneiden. Die BSG ist damit ein einfaches Tool zur Detektion der Neuroakanthozytose Syndrome und besser geeignet als die Zählung der Akanthozyten im Blutausschlag (s.o.).

Diese Ergebnisse gelten für die beiden häufigsten Neuroakanthozytose Syndrome McLeod Syndrom und Chorea Akanthozytose. Zwischen den beiden Erkrankungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der BSG gefunden werden. Ebenso bleibt offen, ob der Test auch auf die anderen Erkrankungen der Neuroakanthozytose Syndrome angewendet werden kann und ob die Methode neben einer hohen Sensitivität für die Neuroakanthozytose Syndrome auch eine hohe Spezifität aufweist, da bisher nur Referenzwerte für die hohen Blutsenkungsgeschwindigkeiten existieren.

Als Ursachen für die Abweichung der BSG von Neuroakanthozytose Syndrom Patienten kommen mehrere Erklärungsmöglichkeiten in Betracht:

- Verhältnis zwischen Blutzellen und Blutplasma
- Zusammensetzung der Plasmaproteine

- Form der Erythrozyten
- Verformbarkeit der Erythrozyten

Verhältnis zwischen Blutzellen und Blutplasma

Der Blutwert, der das Verhältnis von Blutzellen zu Blutplasma anzeigt ist der Hämatokrit. Bei einem hohen Hämatokrit wäre eine langsame Blutsenkung zu erwarten. Im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Laborwerte der Patienten zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Hämatokrit von Patienten und Kontrollen. Ebenso war die Erythrozytenzahl bei Patienten und Kontrollen gleich groß. Ein Laborwert, der die Dichte der Erythrozyten anzeigt, ist die mittlere Hämoglobinkonzentration pro Erythrozyt (MCHC). Eine geringe Dichte der Zellen könnte die langsame Sedimentation erklären, jedoch lag bei beiden Patientenkollektiven ein signifikant höheres MCHC als bei Kontrollen vor, was das Gegenteil zu Folge hätte (Abb. 15).

Zusammensetzung der Plasmaproteine

Die schnellere Blutsenkung, die im Rahmen von entzündlichen Prozessen auftritt, ist auf einen Anstieg der sogenannten Akute-Phase-Proteine zurückzuführen. Die entsprechenden Blutwerte wurden in dieser Arbeit untersucht. Zu den Akute-Phase-Proteinen gehört unter anderem das CRP, welches bei Patienten und Kontrollen jedoch gleich war, und das Fibrinogen, welches in den vorliegenden Messungen bei Chorea Akanthozytose Patienten erniedrigt war (Abb. 15). Der Wert für McLeod Syndrom Patienten unterschied sich zwar nicht signifikant von dem der Kontrollen, was allerdings möglicherweise auf die niedrige Patientenzahl (n=4) in unseren Messungen zurückgeführt werden kann. Dementsprechend ist es möglich, dass der niedrige Wert für Fibrinogen im Plasma bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten eine Ursache für die langsame Blutsenkungsgeschwindigkeit spielt. Untersuchungen zeigen, dass eine Erhöhung des Fibrinogens im Plasma zum Beispiel im Rahmen einer Akute-Phase-Reaktion eine schnellere BSG bewirkt. Dabei hat Fibrinogen einen größeren Einfluss auf die BSG als andere Proteine, wie zum Beispiel CRP (Flormann et al. 2015). Die Ursache dafür scheint eine durch Fibrinogen verursachte stärkere Interaktion zwischen Erythrozyten zu sein (Brust et al. 2014). Damit lässt sich zusammenfassen, dass die Ursache für die verlangsamte Blutsenkung bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten, auf jeden Fall bei Chorea Akanthozytose zum Teil durch niedrige Fibrinogenwerte im Plasma verursacht wird. Bis auf CRP und Albumin wurden im Rahmen dieser Arbeit zwar keine weiteren Akute-Phase-Proteine (z.B. Alpha1-Anti-Trypsin, Haptoglobin, Ferritin) bestimmt, es zeigte sich jedoch in vorherigen Versuchen (s.o.), dass vermutlich das Fibrinogen den größten Einfluss auf die BSG hat.

Form der Erythrozyten

Neben der Zusammensetzung des Plasmas könnte auch die Form der Zellen einen Einfluss auf die BSG haben. Dieses wurde nicht in meiner Arbeit untersucht, jedoch weisen andere Arbeiten darauf hin und sollen der Vollständigkeit halber kurz vorgestellt werden. Ein Experiment, in dem Plasma und Erythrozyten von Neuroakanthozytose Syndrom Patienten vertauscht und mit diesen Proben eine Blutsenkung durchgeführt wurde lässt vermuten, dass beide Bestandteile eine Rolle spielen. Hier zeigte sich, dass gesunde Erythrozyten in Neuroakanthozytose Syndrom Plasma schneller sinken, als Akanthozyten (Ursache liegt beim Erythrozyten) und dass Patienten Erythrozyten in gesundem Plasma ebenfalls eine höhere BSG aufweisen, als in ihrem eigenen Plasma (Ursache liegt im Plasma)(Darras et al. 2021). Das Phänomen der langsameren Blutsenkung wurde des Weiteren auch bei anderen Erkrankungen mit verformten Erythrozyten, wie der Sichelzellanämie beschrieben (Lessing et al. 2007). Neben Diskozyten liegen bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten auch zu unterschiedlichen Anteilen verformte Erythrozyten vor allem Akanthozyten vor. Hinzu kommt, dass sich das Fibrinogen, auf dessen Rolle bereits zuvor eingegangen wurde, ebenfalls durch seinen Einfluss auf die Interaktion zwischen den Erythrozyten auf die Blutsenkung auswirkt.

Während die ursprüngliche Erklärung der Blutsenkung auf die Formung von Zellaggregaten, die im Plasma absinken, zielt, wird derzeit eine neuere Betrachtungsweise erarbeitet. Dabei wird ein Gel-Modell verwendet, nach dem die Erythrozyten ein kompaktes Netzwerk mit Kanälen bilden, durch die das Plasma nach oben steigen und das Netzwerk absinken kann (Pribush et al. 2010, Darras et al. 2021). Es wurde gezeigt, dass diese Kanäle bei Proben von gesunden Patienten, deren Erythrozyten geldrollenartige Strukturen durch Aneinanderlagerung bilden, größer sind als bei Neuroakanthozytose Syndrom Patienten (Darras et al. 2021).

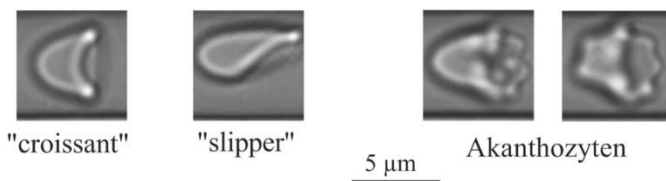
Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Interaktion der Erythrozyten, bei denen die Form und auch Plasmaproteine wie Fibrinogen eine Rolle spielen an der Geschwindigkeit der Blutsenkung beteiligt ist.

Verformbarkeit der Erythrozyten

Es lässt sich zusätzlich vermuten, dass nicht nur die Form der Zellen, sondern auch die Verformbarkeit, welche bei Diskozyten in hohem Maße gegeben ist und auch bei der Aggregation beobachtet werden kann, eine Rolle spielt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Blutsenkgeschwindigkeit nur schwach mit der Anzahl an Akanthozyten korreliert (Darras et al. 2021). Hätte nur die Zellform an sich Einfluss auf die Aggregation und damit die Sedimentation, wäre eine stärkere Korrelation zu erwarten. Geht man jedoch davon aus, dass bei Neuroakanthozytose Syndromen nicht nur die offensichtlichen Akanthozyten, sondern alle Erythrozyten in Ihrer Struktur und damit möglicherweise der Verformbarkeit beeinträchtigt sind, unterstützt dieses die vorliegenden Ergebnisse.

Die Verformbarkeit von Erythrozyten bei ChAc und dessen Einfluss auf die ESR wurde einerseits mit kapillären Flussmessungen und andererseits mit theoretischen Berechnungen genauer untersucht (Rabe et al. 2021). Hierbei zeigte sich, dass bei ChAc alle Zellen und nicht nur Akanthozyten eine höhere Steifigkeit aufwiesen. Dieses zeigte sich dadurch, dass der Übergang von sogenannten „croissants“ (Zellform bei niedrigen Flussgeschwindigkeiten) in „slippers“ (Zellform bei hohen Flussgeschwindigkeiten) bei ChAc später auftrat, als bei gesunden Kontrollen (Abb. 38). Die bereits oben erwähnten Netzwerke aus Zellagregaten werden ebenfalls von der Steifigkeit der Zellen und nicht nur von der Anzahl an Akanthozyten beeinflusst. Bei einem größeren Anteil an steiferen Zellen nahm die Größe der Löcher im Netzwerk ab (daraus resultiert bei steiferen Zellen eine langsamere BSG).

A Erythrozytenform im Flussexperiment



B Repräsentative Phasendiagramme

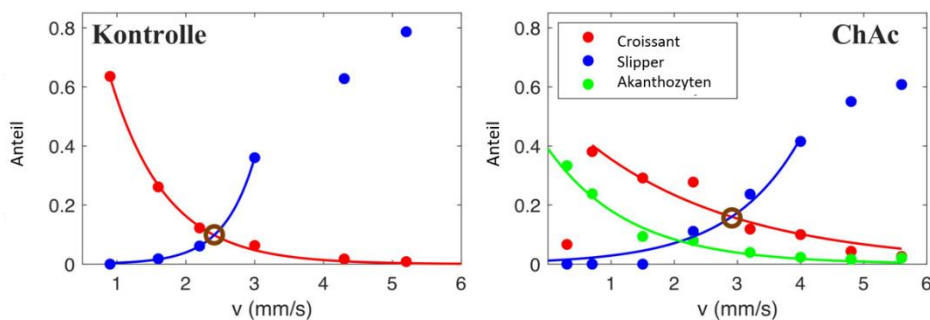


Abb. 38 Flussexperiment bei ChAc. A zeigt beispielhaft Aufnahmen der Erythrozyten im kapillären Fluss. Diese nehmen zwei verschiedene Zustände bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten an. Die Phasendiagramme in B zeigen die Anteile dieser jeweiligen Formen und den Übergangspunkt von „slippers“ zu „croissants“ links bei einer gesunden Kontrolle und rechts bei einem Chorea Akanthozytose Patient. Hier zeigte sich ein Umschlag von der einen zur anderen Form erst bei höheren Flussgeschwindigkeiten (übersetzt aus Rabe et al.).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Untersuchungen der Blutsenkgeschwindigkeit gezeigt haben, dass diese einfache Methode ein guter Marker für die Neuroakanthozytose Syndrome Chorea Akanthozytose und McLeod Syndrom darstellt, bei welcher der Wert nach 2 Stunden Senkung den besten Hinweis auf die Erkrankung geben kann. Es bleibt zu untersuchen, ob die Beobachtungen auch für die anderen Neuroakanthozytose Syndrome, welche jedoch noch seltener vorkommen, gelten. Weiterhin muss der Einfluss von Medikamenten, die derzeit in Studien bei Neuroakanthozytose Syndromen eingesetzt werden, auf die Blutsenkung genauer beobachtet werden. In dieser Arbeit konnte in Bezug auf den Kinase-Inhibitor Dasatinib ein erster Hinweis auf das mögliche Monitoring

des Therapieerfolgs mit Hilfe der BSG gegeben werden. Zudem wurden Überlegungen zur Ursache der veränderten BSG angestellt, welche gezeigt haben, dass sowohl Komponenten des Plasmas (Fibrinogen), als auch die Form und Verformbarkeit der Erythrozyten einen Einfluss auf die Aggregation und Senkung der Blutzellen haben.

5 Literaturverzeichnis

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 and Kaestner L (2019) **Glutaraldehyde – A Subtle Tool in the Investigation of Healthy and Pathologic Red Blood Cells**. *Front. Physiol.* 10:514. doi: 10.3389/fphys.2019.00514

Adjobo-Hermans MJW, Cluitmans JCA, Bosman GJCGM (2015) **Neuroacanthocytosis: observations, theories and perspectives on the origin and significance of acanthocytes**. *Tremor and Other Hyperkinet Mov.* 5. 328. 10.7916/D8VH5N2M

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2017) **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie** 12. Auflage Elsevier

Asano SM, Gao R, Wassie AT, Tillberg PW, Chen F, Boyden ES (2018) **Expansion Microscopy: Protocols for Imaging Proteins and RNA in Cells and Tissues**. *Current Protocols in Cell Biology* 80:56. doi: 10.1002/cpcb56

Ballas SK, Bator SM, Aubuchon JP, Marsh WL, Sharp DE, Toy EM (1990) **Abnormal membrane physical properties of red cells in McLeod syndrome**. *Transfusion*, 30:722-727. doi:10.1046/j.1537-2995.1990.30891020333.x

Bayreuther C, Borg M, Ferrero-Vacher C, Chausseot A, Lebrun C (2010) **Choréo-acanthocytose sans acanthocytes [Chorea-acanthocytosis without acanthocytes]**. *Rev Neurol (Paris)*. 166:100-3. French. doi: 10.1016/j.neurol.2009.03.005

Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R (2016) **Duale Reihe Physiologie** 173-180 Hrsg 3, Vollständig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag

Bogdanova A, Makhro A, Wang J, Lipp P, Kaestner L (2013) **Calcium in Red Blood Cells—A Perilous Balance** *Int. J. Mol. Sci* 4:9848-9872 doi:10.3390/ijms14059848

Bosman GJCGM (2018) **Disturbed Red Blood Cell Structure and Function: An Exploration of the role of Red Blood Cells in Neurodegeneration**. *Frontiers in Medicine* 5:189 doi:10.3389/fmed.2018.00198

Brust M, Aouane O, Thiébaud M, Flormann D, Verdier C, Kaestner L, Laschke MW, Selmi H, Benyoussef A, Podgorski T, Coupier G, Misbah C, Wagner C (2014) **The plasma protein fibrinogen stabilizes clusters of red blood cells in micro-capillary flows.** *Sci. reports* 4:1–6

<https://doi.org/10.1038/srep04348>

Chen F, Tillberg PW, Boyden ES (2015) **Expansion Microscopy.** *Science* 347:543-548

doi: 10.1126/science.1260088

Clark MR, Aminoff MJ, Chiu DT, Kuypers FA, Friend DS (1989) **Red cell deformability and lipid composition in two forms of acanthocytosis: enrichment of acanthocytic populations by density gradient centrifugation.** *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 113:469-481

Cluitmans JCA, Tomelleri C, Yapici Z, Dinkla S, Bovee-Geurts P, Chokkalingam V, De Franceschi L, Brock R, Bosman GJGCM (2015) **Abnormal Red Cell Structure and Function in**

Neuroacanthocytosis. *PLoS ONE* 10:0125580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125580>

Danek A, Rubio JP, Rampoldi L, Ho M, Dobson-Stone C, Tison F, Symmans WA, Oechsner M, Kalckreuth W, Watt JM, Corbett AJ, Hamdalla HH, Marshall AG, Sutton I, Dotti MT, Malandrini A, Walker RH, Daniels G, Monaco AP (2001) **McLeod neuroacanthocytosis: genotype and phenotype.** *Ann Neurol.* 50:755-64. *doi: 10.1002/ana.10035. PMID: 11761473.*

Darras A, Peikert K, Rabe A, Yaya F, Simionato G, John T, Dasanna A K, Buvalyy S, Geisel J, Hermann A, Fedosov D A, Danek A, Wagner C, Kaestner L (2021) **Bloody jello: colloidal physics states acanthocyte sedimentation rate as a diagnostic biomarker for neuroakanthocytosis.** *Cells* **10:788** <https://doi.org/10.3390/cells10040788>

De Franceschi L, Fumagalli L, Olivieri O, Corrocher R, Lowell CA, Berton G (1997) **Deficiency of Src family kinases Fgr and Hck results in activation of erythrocyte K/Cl cotransport.** *J Clin Invest* 99:220-7

De Franceschi L, Tomelleri C, Matte A, Brunati AM, Bovee-Geurts PH, Bertoldi M, Lasonder E, Tibaldi E, Danek A, Walker RH, Jung HH, Bader B, Siciliano A, Ferru E, Mohandas N, Bosman GJ (2011) **Erythrocyte membrane changes of chorea-acanthocytosis are the result of altered Lyn kinase activity.** *Blood.* 118:5652-63. *doi: 10.1182/blood-2011-05-355339*

De Franceschi L, Scardoni G, Tomelleri C, Danek A, Walker RH, Jung HH, Bader B, Mazzucco S, Dotti MT, Siciliano A, Pantaleo A, Laudanna C (2012). **Computational identification of phospho-tyrosine sub-networks related to acanthocyte generation in neuroacanthocytosis**. PloS one, 7(2) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031015>

De Franceschi L, Bosman GJCGM, Mohandas N (2014) **Abnormal red cell features associated with hereditary neurodegenerative disorders: the neuroacanthocytosis syndromes**. Current Opinion Hematol 21:201-9. doi: 10.1097/MOH.0000000000000035

European Medicines Agency, Sprycel: EPAR – Scientific Discussion (2006)

Fandrey J, Hallek M. (2015) **Erythropoese**. Internist 56:970–977 <https://doi.org/10.1007/s00108-015-3712-1>

Fermo E, Bogdanova A, Petkova-Kirova P, Zaninoni A, Marcello AP, 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. 7:1744. doi: 10.1038/s41598-017-01591-w.

Flormann D, Kuder E, Lipp P, Wagner C, Kaestner L (2015) **Is there a role of C-reactive protein in red blood cell aggregation ?** Int J Lab Hematol 37:474-482 doi:10.1111/ijlh.12313

Föllner M, Hermann A, Gu S, Alesutan I, Qadri SM, Borst O, Schmidt EM, Schiele F, von Hagen JM., Saft C, Schöls L, Lerche H, Stournaras C, Storch A, Lang, F (2012), **Chorein-sensitive polymerization of cortical actin and suicidal cell death in chorea-acanthocytosis**. The FASEB Journal, 26:1526-1534. doi:10.1096/fj.11-198317

Ford J (2013) **Red Blood cell morphology**. Int J Lab Hematol 35:351-7 doi: 10.1111/ijlh.12082

Geekiyana NM, Balanant MA, Sauret E, Saha SC, Flower RL, Lim CT, YuanTong G (2019) **A coarse-grained red blood cell membrane model to study stomatocyte-discocyte-echinocyte morphologies**. PLOS ONE. 14:0215447. 10.1371/journal.pone.0215447.

Gov NS (2007) **Physical Review: Active elastic network: Cytoskeleton of the red blood cell, Soft Matter Phys.** 75:011921

- Grehl H, Reinhard FM (Hrsg.) (2016) in **Checkliste Neurologie**. 6. Aufl. Thieme, Stuttgart
- Grzybowski A, Sak J. (2012) **A short history of the discovery of the erythrocyte sedimentation rate**. *Int J Lab Hematol* 34:442-4. doi:10.1111/j.1751-553X.2012.01430.x.
- Ingleby E (2012) **Functions of the Lyn tyrosine kinase in health and disease**. *Cell Communication & Signaling* 10:21. doi: 10.1186/1478-811X-10-21
- Jung H, Danek A, Walker RH (2011) **Neuroacanthocytosis Syndromes**. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6:68 <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-68>
- Kaestner 2020, **Artificial Intelligence Meets Hematology**. *Trans. Aph. Sci.* 59(6), 102986
- Konig H, Copland M, Chu S, Jove R, Holyoake TL, Bhatia R (2008) **Effects of dasatinib on SRC kinase activity and downstream intracellular signaling in primitive chronic myelogenous leukemia hematopoietic cells**. *Cancer Res* 68:9624-33. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1131. PMID: 19047139; PMCID: PMC2786265.
- Lang F, Pelzl L, Schöls L, Hermann A, Föller M, Schäffer TE, Stournaras C (2017) **Neurons, Erythrocytes and Beyond – The Diverse Functions of Chorein**. *Neurosignals* 25:117-126. doi: 10.1159/000485457
- Lessing Ph, Delmenico S (2007) **Die erhöhte Blutsenkungsreaktion** doi:10.4414/smf.2007.06286
- Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. (2012) **Taschenlehrbuch Histologie 4**. Vollständig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag
- Lupo F, Tibaldi E, Malte A, Sharma AK, Brunati AM, Alper SL, Zancanaro C, Benati D, Siciliano A, Bertoldi M, Zonta F, Storch A, Walker R, Danek A, Bader B, Hermann A, De Franceschi L (2016) **A new molecular link between defective autophagy and erythropoiesis abnormalities in chorea-acanthocytosis**. *Blood* 25:117–126 <https://doi.org/10.1159/000485457>
- Lux IV SE (2016) **Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions**. *Blood* 127:187-99. doi: 10.1182/blood-2014-12-512772
- Matzdorff A, Fritze D (2012) **Hämatologie** in: Arastéh K, Baenkler H, Bieber C et al. *Duale Reihe Innere Medizin*. 3. überarbeitete Auflage. Stuttgart, Thieme

Minetti G, Egée S, Mörsdorf D, Steffen P, Makhro A, Achilli C, Ciana A, Wang J, Bouyer G, Bernhardt I, Wagner C, Thomas S, Bogdanova A, Kaestner L (2013) **Red cell investigations: art and artefacts.** Blood Rev 27:91-101. doi: 10.1016/j.blre.2013.02.002. Epub 2013 Feb 18. PMID: 23425684.

Monsigny M, Roche A, Sene C, Maget-Dana R, Delmotte F (1980) **Sugar-Lectin Interactions: How Does Wheat-Germ Agglutinin Bind Sialoglycoconjugates ?** Eur. J. Biochem. 104, 147-153

Moras M, Lefevre SD, Ostuni MA (2017) **From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals.** Frontiers in Physiology 8:1076
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01076>

Nam S, Kim D, Cheng JQ, Zhang S, Lee JH, Buettner R, Mirosevich J, Lee FY, Jove R (2005) **Action of the Src family kinase inhibitor, dasatinib (BMS-354825), on human prostate cancer cells.** Cancer Res 65:9185-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1731. PMID: 16230377.

Nandakumar SK, Ulirsch JC, Sankaran VC (2016) **Advances in Understanding Erythropoiesis: Evolving Perspectives.** Br J Haematol. 173:206–218 doi: 10.1111/bjh.13938

Oberwagner W, Sauer T, Hermann A, Prohaska R, Müllner EW, Salzer U (2017) **Drug-induced endovesiculation of erythrocytes is modulated by the dynamics in the cytoskeleton/membrane interaction, Blood Cells.** Molecules and Diseases 64:15-22 doi: 10.1016/j.bcnd.2017.03.004

O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ (2005) **In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants.** Cancer Res. 65:4500-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0259. PMID: 15930265.

Ott AE (aktualisiert 3.2020) **Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit** in Psychrembel online, Walter de Gruyter GmbH Internetlink:
<https://www.psychrembel.de/Blut%C3%B6rperchensenkungsgeschwindigkeit/K03XJ>

Palis J (2014) **Primitive and definitive Erythropoiesis in mammals.** Frontiers in Physiology 5:3
doi: 10.3389/fphys.2014.00003

Pape H, Kurtz A, Silbernagl S. (2018) **Kapitel 7: Blut: ein flüssiges Organsystem.** Physiologie 274-281 9. Auflage, Georg Thieme Verlag

Park JS, Neiman AM (2020). **XK is a partner for VPS13A: a molecular link between Chorea-Acanthocytosis and McLeod Syndrome**. *Molecular biology of the cell*, 31:2425–2436.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E19-08-0439-T>

Peikert K, Federti E, Matte A, Constantin G, Pietronigro EC, Fabene PF, Defilippi P, Turco E, Del Gallo F, Pucci P, Amoresano A, Illiano A, Cozzolino F, Monti M, Garello F, Terreno E, Alper SL, Glaß H, Pelzl L, Akgün K, Ziemssen T, Ordemann R, Lang F, Brunati AM, Tibaldi E, Andolfo I, Iolascon A, Bertini G, Buffelli M, Zancanaro C, Lorenzetto E, Siciliano A, Bonifacio M, Danek A, Walker RH, Hermann A, De Franceschi L (2021). **Therapeutic targeting of Lyn kinase to treat chorea-acanthocytosis**. *Acta neuropathologica communications*, 9:81 <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01181-y>

Pribush A, Meyerstein D, Meyerstein N (2010) **The mechanism of erythrocyte sedimentation. part 1: Channeling in sedimenting blood Colloids surfaces B**. *Biointerfaces* 75:214–223

Rabe A, Kihm A, Darras A, Peikert K, Simionato G, Dasanna AK, Glaß H, Geisel J, Quint S, Danek A, Wagner C, Fedosov DA, Hermann A, Kaestner L (2021) **The Erythrocyte Sedimentation Rate and Its Relation to Cell Shape and Rigidity of Red Blood Cells from Chorea-Acanthocytosis Patients in an Off-Label Treatment with Dasatinib**. *Biomolecules* 11:727.
<https://doi.org/10.3390/biom1105072>

Shiokawa N, Nakamura M, Sameshima M, Deguchi A, Hayashi T, Sasaki N, Sano A (2013) **Chorein, the protein responsible for chorea-acanthocytosis, interacts with b-adducin and b-actin**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 441:96-101 DOI:
[10.1016/j.bbrc.2013.10.011](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.011)

Siegl C, Hamminger P, Jank H, Ahting U, Bader B, Danek A, Gregory A, Hartig M, Hayflick S, Hermann A, Prokisch H, Sammler EM, Yapici Z, Prohaska R, Salzer U (2013) **Alterations of Red cell Membrane Properties in Neuroacanthocytosis**. *PLoS ONE* 8:76715. doi:
[10.1371/journal.pone.0076715](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076715)

Simionato G, Hinkelmann K, Chachanidze R, Bianchi P, Fermo E, Wijk R van, Leonetti M, Wagner C, Kaestner L, Quint S (2021). **Red blood cell phenotyping from 3D confocal images using artificial neural networks**. *PLoS Comp. Biol.*, 17, e1008934. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008934>

Slavova-Azmanova NS, Kucera N, Satiaputra J, Stone L, Magno A, Maxwell MJ, Quilici C, Erber W, Klinken SP, Hibbs ML, Ingley E (2013) **Gain-of-Function Lyn induces anemia: appropriate Lyn**

activity is essential for normal erythropoiesis and Epo receptor signaling. Blood 122:262-71. doi: 10.1182/blood-2012-10-463158

Storch A, Kornhass M, Schwarz J (2005) **Testing for acanthocytosis A prospective reader-blinded study in movement disorder patients.** J Neurol 252:84-90. doi: 10.1007/s00415-005-0616-3.

Sysmex Deutschland GmbH **Themenblätter Die Erythrozytenindices** (2013) Xtra Vol. 17.1 Nr. 04
Internetlink:

https://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Xtra/Themenblaetter/17.1.04_Erythrozytenindices.pdf
(aufgerufen am 21.03.2020)

Terada N, Fujii Y, Ueda H, Kato Y, Baba T, Hayashi R, Ohno S (1999) **Ultrastructural changes of erythrocyte membrane skeletons in chorea-acanthocytosis and McLeod Syndrome revealed by the quick-freezing and deep-etching method.** Acta Haematol. 101:25-31

Tillberg PW, Chen F, Piatkevich KD, Zhao Y, Yu CC, English BP, Gao L, Martorell A, Suk HJ, Yoshida F, DeGennaro EM, Roossien DH, Gong G, Seneviratne U, Tannenbaum SR, Desimone R, Cai D, Boyden ES (2016) **Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies.** Nature Biotechnology 34:987–992.

Tilbrook PA, Ingley E, Williams HW, Hibbs ML, Klinken SP (1997) **Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells.** The EMBO Journal 16:1610-1619

Ulfig N. (2015) **Die Erythropoese.** Kurzlehrbuch Histologie, 4. korrigierte Auflage, Georg Thieme Verlag

Urata Y, Nakamura M, Sasaki N, Shiokawa N, Nishida Y, Arai K, Hiwatshi H, Yokohama I, Narumi S, Terayama Y, Murakami T, Ugawa Y, Sakamoto S, Kaneko S, Nakazawa Y, Yamasaki R, Sadashima S, Sakai T, Arai H, Sano A (2019) **Novel pathogenic XK mutations in McLeod syndrome and interaction between XK protein and chorein.** Neurol Genet 5:328
doi:10.1212/NXG.0000000000000328

Wang J, Hertz L, Ruppenthal S, El Nemer W, Connes P, Goede J.S, Bogdanova A, Birnbaumer L, Kaestner L.(2021) **Lysophosphatidic Acid-Activated Calcium Signaling Is Elevated in Red Cells from Sickle Cell Disease Patients.** Cells 10: 456 <https://doi.org/10.3390/cells10020456>

Weeks ER, Semwogerere D (2005) **Confocalmicroscopy**. Eyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering (Taylor & Francis) DOI: 10.1081/E-EBBE-120024153

Wieland T (1987) **50 Jahre Phalloidin Seine Entdeckung, Charakterisierung sowie gegenwärtige und zukünftige Anwendung in der Zellforschung** Naturwissenschaften 74, 367-373 Springer Verlag

Zivot A, Lipton JM., Narla A, Blanc L (2018) **Erythropoiesis: insight into pathophysiology and treatments in 2017**. Molecular Medicine 24:11 doi: 10.1186/s10020-018-0011-z

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne allen, die mir bei der Fertigstellung dieser Doktorarbeit geholfen haben, danken.

Prof. Dr. Lars Kästner danke ich zum einen für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Betreuung anzufertigen, zum anderen aber auch für die wertvolle Unterstützung sowohl während der Forschungsarbeit als auch während des Schreibprozesses.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Christian Wagner:

Danke Dr. Greta Simionato für die Einführung in die Zellkultur und für die Unterstützung bei den 3D Aufnahmen und der Zellklassifikation. Ebenso für die zahlreichen Tipps und Ideen rund um alle meine anderen Experimente.

Danke Karin Kretsch für die Bearbeitung meiner Bestellungen und die Hilfe und Unterstützung bei allen Aufgaben aus dem chemischen Bereich.

Ich danke ebenfalls der Forschungsabteilung für Hämatopoese bei Sanquin in den Niederlanden, dass ich einige Wochen in der Zellkultur mitarbeiten und viele neue Methoden wie die Durchflusszytometrie erlernen durfte.

Ein großes Dankeschön für die Hilfe beim Immunostaining und der Expansionsmikroskopie und am Konfokalmikroskop geht außerdem an Dr. Daniel Flormann.

Danken möchte ich ebenfalls denjenigen, die mir indirekt bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen haben:

Meiner Familie. Dafür, dass Ihr mir dieses Studium ermöglicht und mich immer unterstützt.

Meinen Freunden, von denen ich an dieser Stelle besonders namentlich Maik-Nolan Metzger und Jennifer Jahraus danken möchte. Für gute Tipps und seelische Unterstützung.

Meinem Freund Tobias Schaffrath. Dafür, dass du immer für mich da bist

Meiner Mutter Anja Hilker. Für alles.

7 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

8 Publikationen

Darras A, Peikert K, Rabe A, Yaya F, Simionato G, John T, Dasanna AK, Buvalyy S, Geisel J, Hermann A, Fedosov DA, Danek A, Wagner C, Kaestner L (2021) **Acanthocyte Sedimentation Rate as a Diagnostic Biomarker for Neuroacanthocytosis Syndromes: Experimental Evidence and Physical Justification.** *Cells* 10:788. doi: 10.3390/cells10040788. PMID: 33918219; PMCID: PMC8067274.

Rabe A, Kihm A, Darras A, Peikert K, Simionato G, Dasanna AK, Glaß H, Geisel J, Quint S, Danek A, Wagner C, Fedosov DA, Hermann A, Kaestner L (2021) **The Erythrocyte Sedimentation Rate and Its Relation to Cell Shape and Rigidity of Red Blood Cells from Chorea-Acanthocytosis Patients in an Off-Label Treatment with Dasatinib.** *Biomolecules* 11:727. <https://doi.org/10.3390/biom1105072>

Simionato G, Rabe A, Gallego-Murillo J.S, van der Zwaan C, Hoogendijk A.J, van den Biggelaar M, Minetti G, Bogdanova A, Mairbäurl H, Wagner C, Kaestner L, van den Akker E (2022) **In Vitro Erythropoiesis at Different pO₂ Induces Adaptations That Are Independent of Prior Systemic Exposure to Hypoxia.** *Cells* 11: 1082. <https://doi.org/10.3390/cells11071082>