

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

# Das Membranpotential von Erythrozyten: Methodische Entwicklungen und Untersuchung von Patientenproben

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

2023

Vorgelegt von Julia Maria Jansen

geboren am 26. Dezember 1997 in Iserlohn

# I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Zusammenfassung.....	IV
III.	Summary.....	V
1	Einleitung.....	1
1.1	Blut.....	1
1.2	Membranpotential.....	4
1.3	Zelluläre Transportprozesse.....	8
1.3.1	Grundlagen des zellulären Transportes.....	8
1.3.2	Carrier.....	9
1.3.3	Ionenkanäle.....	9
1.3.4	Die wichtigsten Ionenkanäle in der Membran menschlicher Erythrozyten.....	14
1.4	Das Neuroakanthozytose Syndrom.....	48
1.4.1	Chorea Neuroakanthozytose.....	50
1.4.2	McLeod Syndrom.....	51
1.5	Säure- Basen Haushalt.....	53
1.5.1	pH-Wert.....	53
1.5.2	Puffersysteme.....	54
1.5.3	Messung von pH-Werten.....	56
1.6	Ausblick.....	59
2	Frage- und Aufgabenstellung.....	60
3	Material und Methoden.....	61
3.1	Material.....	61
3.1.1	Verwendete Softwares.....	61
3.1.2	Verwendete Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	61
3.1.3	Verwendete Chemikalien.....	63
3.2	Methoden.....	66
3.2.1	Die Macey- Bennekou- Egée- Methode (MBE-Methode).....	66
3.2.2	pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit Berechnung des Fluoreszenzverhältnisses	

## I Inhaltsverzeichnis

3.2.3	Phasenkontrast Mikroskopie von Erythrozyten und Beurteilung ihrer Form.....	73
3.2.4	Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium Permeabilität von zentrifugierten Überständen am Konfokalmikroskop mit Überprüfung der pH-Werte am pH- Meter .....	73
4	Ergebnisse .....	76
4.1	Etablierung der MBE Methode .....	76
4.1.1	Grundprinzipien der MBE Methode.....	76
4.1.2	Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kaliumpermeabilität mittels Zugabe von Valinomycin .....	78
4.1.3	Einfluss des Hämatokrit .....	81
4.1.4	Kanal spezifische Experimentprotokolle.....	84
4.2	Optische Messung der MBE- Methode am Konfokalmikroskop .....	99
4.2.1	Messungen mit der MBE- Methode und Fluoreszenzfarbstoffen.....	99
4.2.2	pH- Kalibrierungen am Konfokalmikroskop.....	107
4.2.3	Paralleles Durchführen des Experiments mit A23187bromo am pH-Meter und Konfokalmikroskop.....	109
4.2.4	Messungen mit verschiedenen Arten Gel.....	109
4.2.5	Experimente mit „schwerem Wasser“.....	109
4.2.6	Fluoreszenzintensität- Messung von Überständen der Lösungen aus Experimenten mit Manipulation verschiedener Ionenkanäle, nach Zentrifugation der Erythrozytensuspension .....	116
4.3	Experimente mit Blutproben von Patienten mit verschiedenen Mutationen .....	123
4.3.1	Experimente mit Proben einer Patientin mit Mutationen in Piezo1 und Spektrin.....	123
4.3.2	Experimente mit Proben eines Patienten mit McLeod-Syndrom .....	126
4.3.3	Experimente mit Proben zweier Patienten mit Chorea- Akanthozytose (CHAC)- Mutation	127
4.3.4	Experimente mit Proben eines Patienten ATP11C Mutation .....	135
5	Diskussion .....	139
5.1	Etablierung der MBE Methode in Saarbrücken .....	139
5.1.1	Grundprinzipien der MBE Methode.....	139

## I Inhaltsverzeichnis

5.1.2	Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin .....	141
5.1.3	Einfluss der Hämatokrit Konzentration.....	143
5.1.4	Kanal spezifische Experimentprotokolle.....	145
5.2	Optische Messung der MBE- Methode am Konfokalmikroskop .....	151
5.2.1	Messungen mit der MBE- Methode und Fluoreszenzstoffen .....	151
5.2.2	pH-Kalibrierungen am Konfokalmikroskop.....	154
5.2.3	Paralleles Durchführen des Experiments mit A23187bromo am pH- Meter und Konfokalmikroskop.....	155
5.2.4	Messungen mit verschiedenen Arten Gel.....	155
5.2.5	Experimente mit „schwerem Wasser“ .....	156
5.2.6	Messung des Membranpotentials am Konfokalmikroskop mit Zentrifugieren der Experiment Lösung .....	158
5.3	Experimente mit Blutproben von Patienten mit verschiedenen Mutationen .....	161
5.3.1	Experimente mit Proben einer Patientin mit Mutationen in Piezo1 und Spektrin.....	161
5.3.2	Experimente mit Proben eines Patienten mit McLeod Neuro-Akanthozytose Syndrom	162
5.3.3	Experimente mit Proben zweier Patienten mit Chorea- Akanthozytose (CHAC)- Mutation	162
5.3.4	Experimente mit Proben eines Patienten ATP11C Mutation .....	166
6	Literaturverzeichnis.....	168
7	Abkürzungsverzeichnis .....	180
8	Abbildungsverzeichnis .....	184
9	Tabellenverzeichnis.....	189
10	Graphikverzeichnis.....	190
11	Veröffentlichungen.....	194
12	Danksagung .....	195
13	Lebenslauf .....	197

## II. Zusammenfassung

Begonnen habe ich mit der Aufgabenstellung, die MBE- Methode an der Universität des Saarlandes zu etablieren. MBE steht dabei für Macey, Bennekou und Egée, welche diese Methode entwickelt und weiterentwickelt haben. Dabei handelt es sich um eine Messung des Potentials des Wasserstoffs (pH, lateinisch pondus hydrogenii) einer Suspension aus einer Ringerlösung und gepackten Erythrozyten, welchen verschiedene Substanzen zugefügt werden können, um das Öffnungs- und das Schließverhalten verschiedener Ionenkanäle zu beeinflussen. Wichtig ist, dass es sich bei der Ringerlösung um eine ungepufferte Lösung handelt und dass der Protonophor Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) hinzugefügt wird. Durch CCCP haben die Protonen die Möglichkeit, sich frei über die Membran zu bewegen, sodass sich die  $H^+$ - Verteilung entsprechend des Membranpotentials einstellt. Über eine Formel, welche ich im weiteren Verlauf dieser Arbeit erkläre, können die pH-Wert Veränderungen in das Membranpotential der Erythrozyten umgerechnet werden und somit Membranpotentialveränderungen gemessen werden, welche sich durch Manipulation der Erythrozyten ergeben. Dies ist möglich, da der pH-Wert im Zellinneren der Erythrozyten aufgrund der Pufferkapazität des Hämoglobins stabil bei ungefähr pH 7,0 liegt und somit die Änderungen des extrazellulären pH-Wertes streng proportional zum Membranpotential verlaufen.

Im Rahmen der Etablierung habe ich unter anderem anhand von Experimenten untersucht, welche Hämatokritanteile am geeignetsten für die verschiedenen Experimentprotokolle sind und in welcher Konzentration die verschiedenen Ionenkanalmanipulatoren ihre stärkste Wirkung zeigen. Inzwischen wird die MBE-Methode in der Arbeitsgruppe auch von weiteren Wissenschaftlern für Forschungszwecke genutzt und stellt eine Methode dar, welche reproduzierbare und somit gut vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Nach der Etablierung der MBE-Methode habe ich versucht die Membranpotenzialveränderungen über pH-Wert abhängige Farbstoffe am Konfokalmikroskop optisch darzustellen und dazu verschiedene Ansätze getestet und untersucht, welche allerdings alle ohne Erfolg blieben.

Weiterhin habe ich mithilfe der MBE-Methode verschiedene Patientenproben untersucht. Die Patienten, deren Blutproben ich für diese Arbeit verwenden durfte, haben verschiedene Mutationen in Ionenkanälen ihrer Erythrozyten oder andere Erkrankungen ihrer Erythrozyten. Ich konnte für die jeweiligen Erythrozytenanomalien typische Membranpotentialverläufe charakterisieren und beispielsweise feststellen, dass Patienten mit Chorea-Akanthozytose (ChAc) auf den Gárdos-Kanal Aktivator 3-Oxime-6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione (NS309) mit einer deutlich stärkeren Hyperpolarisation des Membranpotentials reagieren als gesunde Kontrollen. Dies kann damit erklärt werden, dass die Erythrozyten der Patienten mit Chorea-Akanthozytose eine geringere Lebensdauer haben. Beim Alterungsprozess von Erythrozyten nimmt die Funktionsfähigkeit der Gárdos-Kanäle ab. Somit reagieren die Erythrozyten der ChAc- Patienten, deren Erythrozyten jünger sind und damit eine höhere Anzahl von Gárdos- Kanälen aufweisen, stärker auf die Aktivierung des Gárdos-Kanals.

### III. Summary

I started with the task of establishing the MBE method at Saarland University. MBE is the short form of Macey, Bennekou and Egée, who developed and refined this method. It is a pH measurement of a suspension consisting of a Ringer's solution and packed erythrocytes, to which various substances can be added to influence the opening and closing behaviour of various ion channels. It is important that the Ringer's solution is an unbuffered solution and that the protonophore carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) is added. CCCP allows the protons to move freely across the membrane, so that the  $H^+$  distribution is adjusted according to the membrane potential. Using a formula, which I will explain later in this paper, the pH changes can be converted into the membrane potential of the erythrocytes. Thus membrane potential changes, which are resulting from manipulation of the erythrocytes can be measured. This is possible because the pH value inside the erythrocytes is stable at about pH 7.0 due to the buffering capacity of haemoglobin and thus the changes in the extracellular pH value are strictly proportional to the membrane potential.

Within the framework of the establishment, I have investigated, among other things, by means of experiments, which haematocrit is most suitable for the different experimental protocols and at which concentration the different ion channel manipulators show their strongest effect.

In the meantime, the MBE method is also used by other scientists of the work-group for research purposes and represents a method that achieves reproducible and thus easily comparable results.

After establishing the MBE method, I tried to visualise the membrane potential changes using pH-dependent dyes on the confocal microscope and tested and investigated various approaches for this purpose, which were all unsuccessful.

Furthermore, I examined various patient samples using the MBE method. The patients whose blood samples I could use for this work have various mutations in ion channels of their erythrocytes or other diseases of their erythrocytes. I was able to characterize typical membrane potential courses for the respective erythrocyte anomalies and determine, for example, that patients with chorea-acanthocytosis (ChAc) react to the Gárdos channel activator 3-oxime-6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione (NS309) with a significantly stronger hyperpolarisation of the membrane potential than healthy controls. This can be explained by the fact that the erythrocytes of patients with chorea acanthocytosis have a shorter lifespan. During the ageing process of erythrocytes, the functionality of the Gárdos channels decreases. Thus, the erythrocytes of ChAc patients, whose erythrocytes are younger and have a higher number of active Gárdos channels, react more strongly to the activation of the Gárdos channel.

# 1 Einleitung

## 1.1 Blut

Blut ist in vielerlei Hinsicht ein besonderer und lebensnotwendiger Bestandteil des menschlichen Körpers. Dies zeigt sich unter anderem in der Tatsache, dass es das einzige flüssige Organ des Menschen ist [89].

Blut übernimmt als Transportsystem sehr vielfältige Aufgaben. Es transportiert nicht nur Sauerstoff und Nährstoffe zur Versorgung aller Organe, sondern auch Kohlenstoffdioxid und Metabolite, sodass diese ausgeschieden werden können.

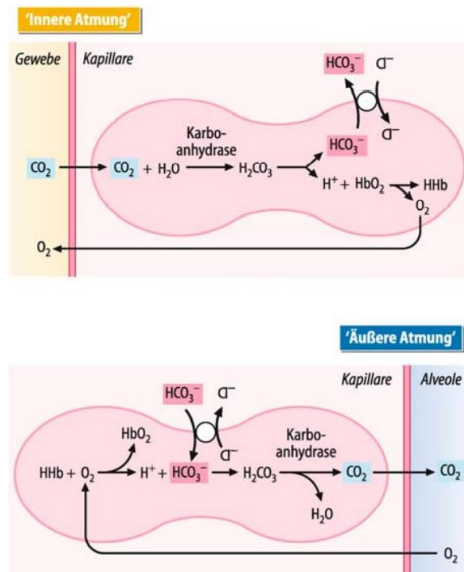
Blut speichert Wärme und Wasser und fungiert damit als Flüssigkeitsreservoir unseres Körpers. Des Weiteren wird über das Blut ein Kommunikationssystem aufrechterhalten, welches es den verschiedenen Organen ermöglicht über Botenstoffe, wie zum Beispiel (z.B.) Hormonen, miteinander zu kommunizieren und das Gleichgewicht zwischen den Geweben aufrecht zu erhalten [58,121].

Diagnostisch eröffnet dies viele Möglichkeiten, da über das Blut und die Zusammensetzung von dessen Inhaltsstoffen sehr viele, klinisch relevante Informationen gewonnen werden können. Auch für die Immunabwehr und die Gerinnung spielt das Blut eine entscheidende Rolle. Blut mit all seinen Bestandteilen nennt man Vollblut. Durch Zentrifugieren können Plasma und Blutzellen voneinander getrennt werden. Entnimmt man dem zentrifugierten Blut das Plasma bleibt nur der zelluläre Bestandteil übrig, welchen man Hämatokrit nennt [89,121].

Im Blut befinden sich viele verschiedene Zellarten, die sich sowohl morphologisch als auch funktionell voneinander unterscheiden. Meist wird eine Einteilung in Erythrozyten, Leukozyten und Blutplättchen vorgenommen. Erythrozyten sind mit circa (ca.) 99% die am stärksten vertretene Zellgruppe des Hämatokrits. So befinden sich in einem Mikroliter Humanblut ungefähr 5 Millionen rote Blutzellen. Durch ihren Inhaltsstoff Hämoglobin erscheinen sie rot. Ihr großes Oberflächen-Volumen Verhältnis entsteht durch ihre bikonkave Form mit einer zentralen Eindellung. Erythrozyten haben einen Durchmesser von 7,5 Mikrometern [58,89,121].

Dieser Aufbau perfektioniert sie für ihre Hauptaufgabe, den Gastransport. Um Sauerstoff transportieren zu können, wird dieser in die Lunge aufgenommen und im Blut an Hämoglobin gebunden, welches in hoher Konzentration in den Erythrozyten vorhanden ist. In der Peripherie wird der Sauerstoff an Zellen abgegeben, wo er der lebensnotwendigen Energiegewinnung dient. Auf dem Rückweg zur Lunge ist der Erythrozyt auch am Abtransport des Kohlenstoffdioxids beteiligt, welcher bei der Energiegewinnung als Produkt anfällt [90,121].

# 1 Einleitung



**Abbildung 1:** ([58]) **Chemische Reaktionen im Erythrozyten beim Gasaustausch im Gewebe.** Diese Abbildung wurde reproduziert aus dem Lehrbuch „Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie (2007)“, mit der Erlaubnis des Springerverlags.

Hämoglobin spielt außerdem eine wichtige Rolle in der pH-Pufferung des Blutes. Ihren eigenen Energiebedarf decken Erythrozyten über anaerobe Glykolyse, da sie keine Mitochondrien besitzen [90,121].

Ein Bestandteil der Erythrozyten ist ihr Zytoskelett. Dieses verleiht ihnen starke Flexibilität, die es ihnen ermöglicht sich reversibel passiv zu deformieren, um auch durch die engsten Kapillaren und Endothelschlitze in Milz und Knochenmark zu passen. Neben der starken passiven Deformierbarkeit der Erythrozyten durch das Zytoskelett kommt es auch durch mechanischen Stress in den kleinen Kapillaren zur Schrumpfung der Erythrozyten, da dieser die mechanosensitiven Piezo1 Kanäle öffnet und so zu einem Kalziumeinstrom in die Zellen führt, welcher wiederum die Gárdos- Kanäle öffnet. So kommt es auch zu einer aktiven Volumen Anpassung der Erythrozyten. Sobald die Kraft, die zur Verformung führt, nachlässt, kehren die Erythrozyten in ihre konkave Scheibenform zurück. Das Zytoskelett besteht aus einem flächigen Netz, welches aus Spektrinfilamenten aufgebaut ist, die durch kürzere Aktinfilamente zusammengehalten werden. Dieses Netz ist über Adaptorproteine an integralen Proteinen der Plasmamembran verankert. Die Plasmamembran der Erythrozyten ist aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit und unkomplizierten Präparation gut erforscht. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in welche verschiedene Membran- und Kanalproteine eingebaut sind. Auf ihrer Außenseite befinden sich spezifische Komponenten, wie beispielsweise die Blutgruppenantigene [18,77,90,121].



1 Einleitung

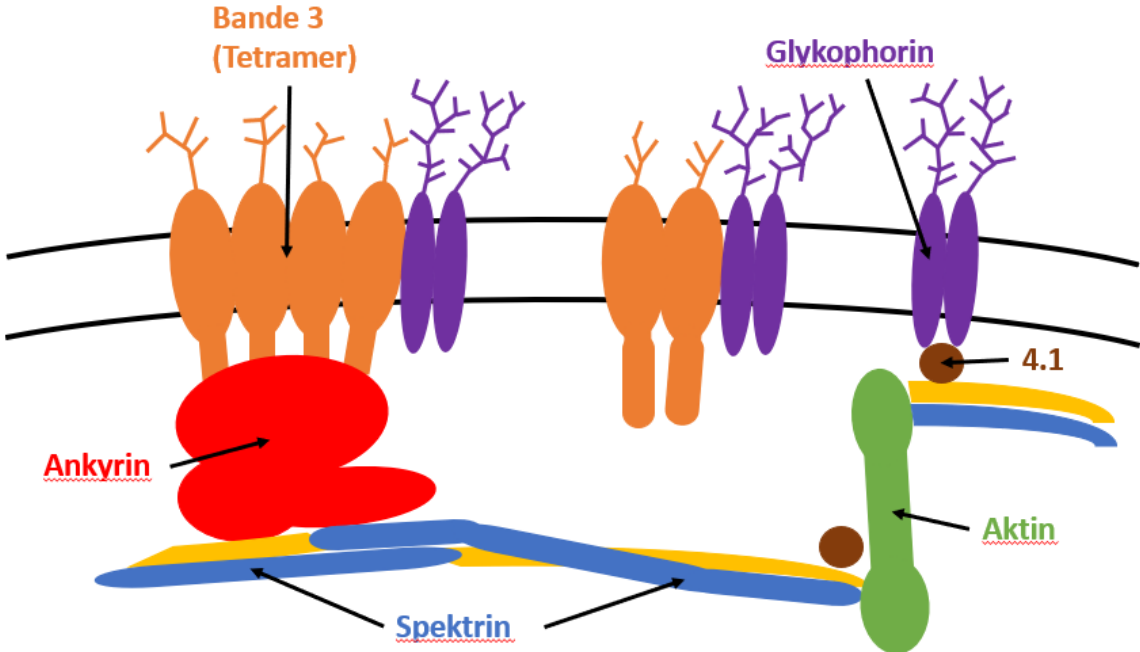


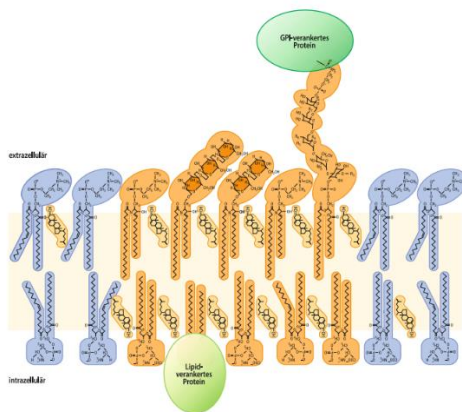
Abbildung 2: Membranskelett eines Erythrozyten im Schnitt.

# 1 Einleitung

## 1.2 Membranpotential

Erythrozyten sind, wie oben bereits erwähnt, durch ihre in sich geschlossene Plasmamembran von der Umgebung abgegrenzt. Dies ermöglicht ihnen einen kontrollierten Stoffaustausch und so ein Gleichgewicht gegenüber den schwankenden Bedingungen der Umgebung. Durch diese Funktion wird die Plasmamembran zur essenziellen Grundstruktur. Bei irreversibler Zerstörung kommt es zum Zelltod [26,46].

Um ein Gleichgewicht herstellen zu können weisen Plasmamembranen eine selektive Permeabilität für verschiedene Ionen auf. Strukturelle Grundlage hierfür ist die Lipiddoppelschicht, das heißt (d.h.) die Membranen bestehen aus zusammengelagerten amphiphilen Molekülen. Dabei handelt es sich vor allem um Phosphoglycerolipide, Sphingolipide und Cholesterin. Ihre hydrophoben Anteile liegen zusammen im Inneren der Plasmamembran, die hydrophilen Kopfgruppen weisen jeweils zum äußeren, wässrigen Milieu [26,46].



**Abbildung 3 ([46]): Lipidstruktur einer Zellmembran.**

Diese Abbildung wurde reproduziert aus dem Lehrbuch „Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie“ mit der Erlaubnis des Springerverlags.

Diese Lipophilie wirkt als Diffusionsbarriere für Ionen und andere polare Moleküle, sodass Proteine für den Transport von Ionen und anderen Stoffen nötig sind und nur ausgewählte Moleküle die Membran überwinden können. So können intra- und extrazellulär verschiedene Ionenkonzentrationen aufrechterhalten werden, sodass ein elektrischer Potentialgradient entsteht. Diese Spannung nennt man Membranpotential. Sie ist nutzbar für die Signalübertragung und den Transport von Substanzen entlang des elektrischen Feldes. Um diesen Ionengradienten aufrecht zu erhalten, müssen Zellen einen Großteil ihrer Energie verwenden. Jede Zelle hat ein Ruhemembranpotential, welches durch die beschriebene Ungleichverteilung von Ionen zwischen Intra- und Extrazellulärraum entsteht [26,29].

Einen sehr bedeutenden Anteil am Ruhemembranpotential, in fast allen Zelltypen, hat Kalium. Aber auch alle anderen relevanten Ionen, für welche die Membran permeabel ist sind involviert. Zum Beispiel spielen Natrium und Chlorid eine nicht unbedeutende Rolle. Ausnahme bezüglich der Relevanz von Kalium für das Ruhemembranpotential sind Erythrozyten, da ihre Membranen kaum für

## 1 Einleitung

Kalium permeabel sind und ihr Ruhemembranpotential hauptsächlich durch Chlorid beeinflusst wird [26,78].

Denn die Bedeutsamkeit einer Ionenart für das Ruhemembranpotential ist abhängig von der relativen Permeabilität der Membran für das jeweilige Ion. Je nach Zellart kann die Membranpermeabilität stark variieren. Weist die Plasmamembran einer Zelle hauptsächlich Kaliumkanäle auf, so liegt das Ruhemembranpotential dieser Zelle in der Nähe des Kalium- Gleichgewichts, weist sie, wie bei Erythrozyten, hauptsächlich Chloridkanäle auf, liegt es nahe des Chlorid-Gleichgewichts [26,78].

Durch die Natrium- Kalium Adenosintriphosphatase (ATPase), die in praktisch allen Zellen dauerhaft aktiv ist und unter Energieverbrauch drei Natriumionen aus der Zelle heraus und zwei Kaliumionen in die Zelle hinein transportiert, füllt sich das Zellinnere mit Kaliumionen. Somit entsteht ein nach außen gerichteter Konzentrationsgradient für Kalium. Über Ionenkanäle können Kaliumionen diesem Konzentrationsgefälle folgen und durch die Membran nach außen diffundieren [26,29].

Der Diffusionsstrom, getrieben durch den Konzentrationsgradienten, lässt sich durch das Fick'sche Gesetz berechnen:

$$J_{Diff} = -D \times \frac{d[K^+]}{dx}$$

Dabei steht  $d[K^+]$  für den Konzentrationsunterschied und  $dx$  für die Diffusionsstrecke über die Membran.  $D$  ist eine Proportionalitätskonstante welche als Diffusionskoeffizient betitelt wird und die Einheit ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) (Quadratzentimeter pro Sekunde) hat [26].

Jedes zurückdiffundierende Kaliumion stellt für die Zelle einen Verlust an positiver Ladung da, wodurch das Zellinnere immer negativer geladen wird. Dies führt wiederum zu einer elektrostatischen Anziehungskraft der Kaliumionen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle. So entsteht ein elektrischer Strom  $J_{elek}$ , der durch den Potentialunterschied über der Membran angetrieben wird und dem Ohm'schen Gesetz folgt:

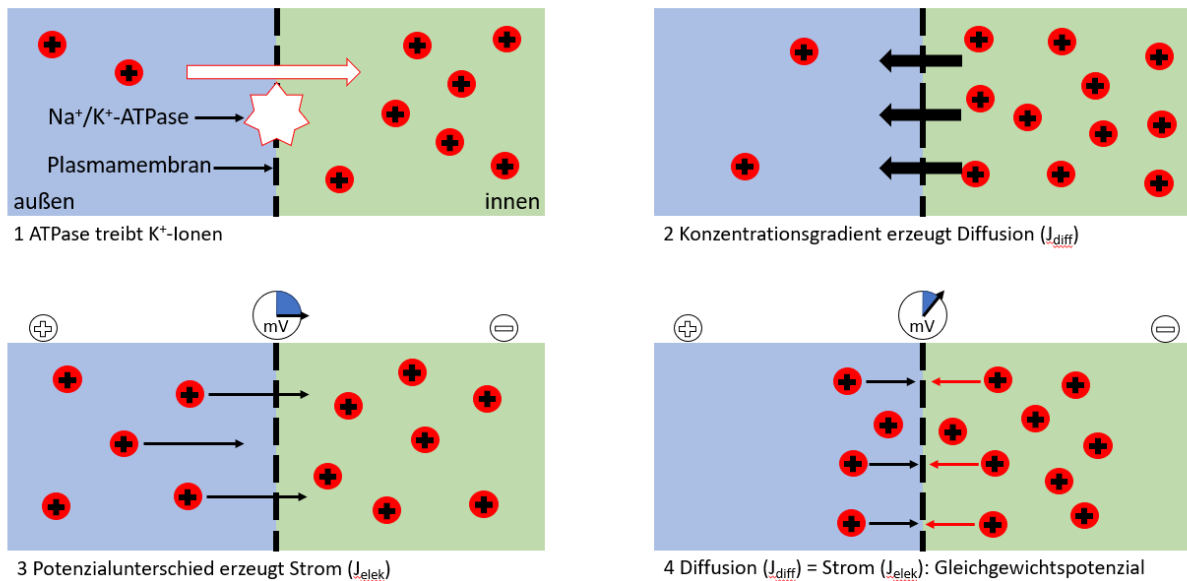
$$J_{elek} = -G \times \frac{dE}{dx}$$

Dabei ist  $G$  die Leitfähigkeit, also der Kehrwert des elektrischen Widerstandes,  $dE$  beschreibt die Differenz des elektrischen Feldes [26].

Durch die beiden entgegengesetzten chemischen und elektrischen Triebkräfte entsteht ein Gleichgewicht, ist dieses erreicht diffundieren jeweils gleich viele Kaliumionen nach innen wie nach außen, der Nettostrom ist gleich null. Dies lässt sich durch die Formel  $J_{Diff} = -J_{elek}$  ausdrücken. Jede gegebene Ionenverteilung erreicht bei einem bestimmten elektrischen Potential diesen

# 1 Einleitung

Gleichgewichtszustand [26,29].



**Abbildung 4: Entstehung eines Gleichgewichtspotentials.**

Auf Grundlage dieses Gleichgewichts zwischen  $J_{Diff}$  und  $J_{Elek}$  sowie durch Einsetzen der entsprechenden Diffusionstherme und durch Ersetzen der Leitfähigkeit  $D$  und des Diffusionskoeffizienten  $G$  durch fundamentale Konstanten lässt sich die folgende Formel ableiten:

$$-D \times \frac{d[K^+]}{dx} = -G \times \frac{dE}{dx}$$

Dabei ist die Leitfähigkeit  $G$  die Funktion der Beweglichkeit  $\mu$  von Ionen, ihrer Ladungszahl  $z$  und ihrer Konzentration:  $G = \mu \times z \times [K^+]$

Der Diffusionskoeffizient  $D$  lässt auch auf die Ionenbewegung schließen:  $D = R \times T \times \frac{\mu}{F}$ . Hierbei steht  $R$  für die allgemeine Gaskonstante,  $T$  für die absolute Temperatur und  $F$  für die Faraday-Konstante, die die Zahl der Elementarladungen pro Mol angibt.

Durch Zusammenführen beider Terme ergibt sich

$$\frac{\mu \times R \times T}{F} * \frac{d[K^+]}{dx} = \mu \times z \times [K^+] \times \frac{dE}{dx}$$

Daraus lässt sich durch Multiplikation mit dem Diffusionsstrom ( $dx$ ) und Integration beider Seiten die Nernst-Gleichung ableiten, welche den quantitativen Zusammenhang zwischen Kaliumkonzentration und elektrischem Potential widerspiegelt [26]:

$$E = -\frac{RT}{zF} \times \ln \frac{[K^+]_{in}}{[K^+]_{out}}$$

Natrium und Kalium tragen jeweils eine positive Ladung, daher ist  $z$  gleich eins, Chlorid und Hydrogencarbonat tragen eine negative Ladung, dementsprechend ist hier  $z$  gleich minus eins. Dagegen trägt Kalzium zwei positive Ladungen, also  $z$  gleich zwei.  $[K^+]_{in}$  und  $[K^+]_{out}$  bezieht sich auf die Ionenkonzentrationen innen und außen [26].

## 1 Einleitung

Da die Nernst- Gleichung auf Grundlage des Gleichgewichts zwischen  $J_{Diff}$  und  $J_{Elek}$  basiert, gibt sie das Membranpotential  $E$  für eine bestimmte Ionenart an, bei dem dieses Gleichgewicht erreicht ist. Wie oben erwähnt, ist das Membranpotential der meisten Zellen, ausgenommen der Erythrozyten, abhängig vom Kalium Gleichgewicht. Daher kann  $E$  in diesem Fall als  $E_{K^+}$  bezeichnet werden. Zur Vereinfachung der Formel kann der dekadische Logarithmus ( $\log = 2,303 \ln$ ) verwendet werden und für die Temperatur die menschliche Körpertemperatur von  $37^\circ\text{C}$  eingesetzt werden. Werden weiterhin die Werte der Konstanten mit einberechnet, sodass für die Gaskonstante  $R=8,314 \text{ kg}\cdot\text{m}^2/\text{s}^2\cdot\text{mol}\cdot\text{K}$  eingesetzt wird und für die Faraday Konstante  $9,648 \text{ A}\cdot\text{s}/\text{mol}$ , ergibt sich

$$E_{K^+} = -61\text{mV} \times \log \frac{[K^+]_{in}}{[K^+]_{out}}$$

[26].

Plasma, somit lässt sich das Kalium Gleichgewicht eines Erythrozyten wie folgend berechnen:

$$E_{K^+} = -61\text{mV} \times \log \frac{100 \text{ mmol/l}}{4 \text{ mmol/l}}$$

$$E_{K^+} = -85,27 \text{ mV}$$

[130]

So lässt sich das Gleichgewichtspotential einer Membran berechnen, die nur für eine Ionenspezies durchlässig ist, was nur sehr selten vorkommt. Um die Permeabilität mehrerer Ionenspezies zu berücksichtigen kann die die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung verwendet werden [26,29].

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \times \ln \frac{P_{Na}[Na_{out}] + P_K[K_{out}] + P_{Cl}[Cl_{in}]}{P_{Na}[Na_{in}] + P_K[K_{in}] + P_{Cl}[Cl_{out}]}$$

Somit können alle permeierenden Ionen, wie Natrium und Chlorid mit einberechnet werden.  $P_{Ion}$  drückt dabei die relative Permeabilität für jedes Ion aus. Dabei leitet sich die Permeabilität vom Fick'schen Diffusionsgesetz ab [26,29].

Aber auch die Berechnung des Gleichgewichtspotentials mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung ist nur eine Annäherung, da sie Voraussetzungen schafft, die nicht komplett erfüllt sind. So wird von einem elektrischen Feld über der Membran ausgegangen, welches linear abfällt, sowie davon, dass die Ionenkonzentrationen unmittelbar im Gleichgewicht stehen und sich gegenseitig in der Diffusion nicht beeinflussen. Dennoch liefert sie korrekte Voraussagen für passive Ionenflüsse über semipermeable Membranen und kann als gute Näherung Gebrauch finden [26].

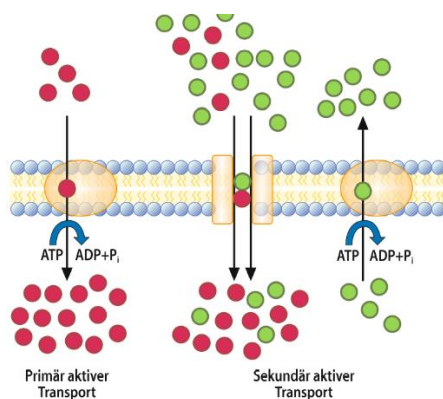
# 1 Einleitung

## 1.3 Zelluläre Transportprozesse

### 1.3.1 Grundlagen des zellulären Transportes

Da Zellen von Lipidmembranen begrenzt sind und diese für die meisten chemischen Moleküle impermeabel sind, können nur gelöste Gase wie zum Beispiel Sauerstoff, Kohlenstoff und Wasser, sowie ungeladene Verbindungen wie Harnstoff die Membran ungehindert durchqueren. Damit hydrophile Substanzen, wie Kohlenhydrate und Aminosäuren die Barriere überwinden können, braucht es spezifische Transportproteine. Der Proteinanteil in den unterschiedlichen zellulären Membranen liegt zwischen 20% (zu finden in Myelinmembranen) und 80% (zu finden in mitochondrialen Innenmembranen). Der Proteinanteil in Erythrozytenmembranen liegt bei 49% [46,105].

Transportproteine können verschiedene Arten der Energetik nutzen. Es gibt passive Transporte, bei denen der Transporter selbst keine Energie aufwenden muss, da der Transport durch hydrostatische Druckgradienten, Konzentrationsgradienten oder elektrische Spannung angetrieben wird (Uniporter und Kanäle), und aktive Prozesse bei denen aktiv Energie aufgewandt werden muss, um die Substrate entgegen dem Konzentrationsgefälle zu transportieren (Pumpen). Meist wird die Energie durch die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat bereitgestellt. Die benötigte Energie kann auch durch Kopplung des Transportvorgangs an einen anderen aktiven Transport gewonnen werden, sodass der durch einen primär aktiven Transport aufgebaute Ionengradient genutzt wird, um Substrate durch Symport zu transportieren (Symporter, Antiporter). Diese Kopplungen werden als sekundär aktive Transporte bezeichnet [39,46,70].



**Abbildung 5** ([46]): Primär und sekundär aktiver Transport. Diese Abbildung wurde reproduziert aus dem Lehrbuch „Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie“ mit der Erlaubnis des Springer-Verlags.

Für die Durchlässigkeit von biologischen Membranen sind drei verschiedene Klassen von Membrantransportproteinen verantwortlich: Pumpen, Carrier und Kanäle. Da Pumpen in meiner Doktorarbeit keine Rolle spielen, werden sie im Folgenden vernachlässigt. Membranproteine sind meist Glykoproteine, die Kohlenhydratketten sind dabei immer mit der im extrazellulären Raum befindlichen Proteindomäne kovalent verknüpft. Da Membranproteine Carrier oder Kanäle sein

## 1 Einleitung

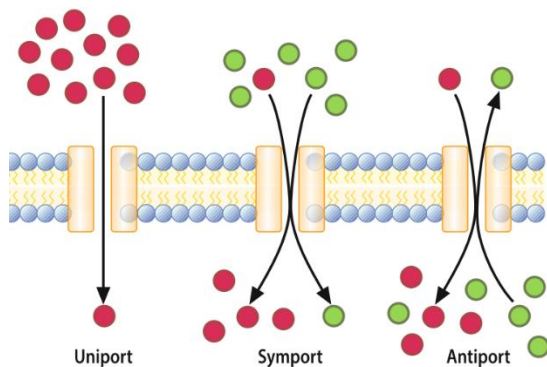
können, ermöglichen sie den Transport von Molekülen durch die Membran und stellen somit eine Kommunikationsmöglichkeit der Zelle mit der Außenwelt dar. Sie können als nutritive Rezeptoren Nährstoffmoleküle wie LDL (Low Density Lipoprotein; Lipoprotein niedriger Dichte) aufnehmen, als Signalrezeptoren die Signaltransduktion einleiten und als Integrine Zell-Zell, bzw. Zell-Matrix-Kontakte knüpfen [46,70].

Kanäle und Carrier sind in ihrer Proteinstruktur aus mehreren Domänen aufgebaut, welche als integrale Membranproteine mehrfach die gesamte Zellmembran durchziehen. Sie weisen in den meisten Fällen eine hohe Spezifität für ihr Substrat oder eine Substratfamilie auf. Unterschiede der verschiedenen Kanäle und Carrier liegen in ihrer Permeabilität und molekularen Struktur [38].

### 1.3.2 Carrier

Carrier unterscheiden sich in dem Aspekt von Ionenkanälen, dass Kanäle in geöffnetem Zustand fähig sind Teilchen ohne Konformationsänderung und somit in sehr hoher Geschwindigkeit passieren zu lassen, wohingegen Carrier bei jeder Aufnahme und Abgabe von Substraten ihre Form verändern und ihr Transport dadurch deutlich langsamer verläuft [38].

Auch innerhalb der Gruppe der Carrier gibt es verschiedene Transportmöglichkeiten. So unterscheidet man den Uniport, bei dem nur ein Substrat von einer Seite der Membran auf die andere Seite transportiert wird vom Symport bei dem gleichzeitig zwei Substrate in dieselbe Richtung transportiert werden. Außerdem gibt es den Antiport. Hier wird ein Substrat in die eine Richtung und im Austausch ein anderes in die entgegengesetzte Richtung transportiert[38,46].

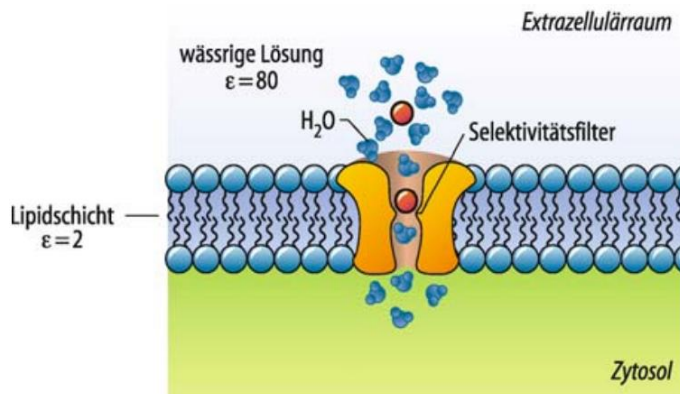


**Abbildung 6** ([46]): Darstellung verschiedener Transportmechanismen durch die Zellmembran. Diese Abbildung wurde reproduziert aus dem Lehrbuch „Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie“ mit der Erlaubnis des Springerverlags.

### 1.3.3 Ionenkanäle

Eine andere Art der Transportproteine sind die Ionenkanäle. Dabei handelt es sich um integrale Membranproteine, die einen Diffusionsweg durch die Membran bilden, welcher aus selektiv und komplex regulierten Poren besteht. Sie sind für geladene Teilchen permeabel und tragen so entscheidend zur elektrischen Leitfähigkeit bei [29,38,70].

## 1 Einleitung



**Abbildung 7** ([29]): **Konzept des Ionenkanals.** Diese Abbildung wurde reproduziert aus dem Lehrbuch „Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie (2007)“, mit der Erlaubnis des Springerverlags.

Der mittlere Strom durch einen Ionenkanal hängt sowohl von der Leitfähigkeit als auch von der Offenwahrscheinlichkeit des Kanalproteins ab. Der resultierende makroskopische Strom ( $I$ ) den man über der gesamten Zellmembran messen kann, ist damit das Produkt aus Anzahl der Kanäle ( $N$ ), dem Einzelkanalstrom ( $i$ ) und der Offenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ ):

$$I = N \times P_o \times i$$

[29,38,70]

Da Ionenkanäle ihre Konformation nur zum Öffnen und Schließen ändern müssen, aber nicht für jedes einzelne permeierende Ion, sind sie sehr effektive Ionentransporter mit Raten von ca.  $10^7$ - $10^8$  Ionen pro Sekunde. Die Ionenkanaldichte in der Zellmembran kann von weniger als einem bis über 1000 Kanäle pro Quadratmikrometer variieren und hängt von Kanal- und Zelltyp ab. Bei Erythrozyten liegt die Dichte bei unter einem Kanal pro Quadratmikrometer. Sie sind vor allem dort zu finden, wo große elektrische Ströme fließen [26,38,70].

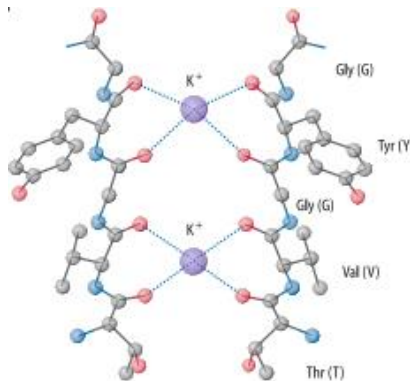
Die verschiedenen Ionenkanäle können nach ihrer Selektivität eingeteilt werden. Grob sind sie einteilbar in Kationenkanäle und Anionenkanäle und etwas genauer einteilbar in Kalium-, Natrium-, Chlorid oder Kalziumkanäle. Aber auch spezifischere Einteilungen sind möglich. So gibt es beispielsweise verschiedene Typen und Familien von Kaliumkanälen mit jeweils unterschiedlicher Struktur, Funktion Regulation und Gewebeverteilung [29,70].

Die Selektivität entsteht durch verschiedene Anordnungen von bestimmten Proteinuntereinheiten und akzessorischen Proteinen, sie bilden den Selektivitätsfilter. Dies ist die engste Stelle der Kanalpore und nahe dem extrazellulären Eingang zu finden. Bei spannungsgesteuerten Kaliumkanälen besteht er beispielsweise aus dem C-terminalen Abschnitt der P-Domäne und der Porenhelix, einem kurzen helikalen Abschnitt. Die Wand der Kanalpore wird bei allen Kaliumkanälen aus der charakteristischen Aminosäuresequenz Glycin-Tyrosin-Glycin gebildet. Sie hat die strukturelle Besonderheit, dass die vier Kanaluntereinheiten, mit den Karbonsäuregruppen ihres Tyrosin- und inneren Glycinrestes eine Ringstruktur schaffen, die die Hydrathülle eines Kaliumions perfekt ersetzen kann, nicht aber



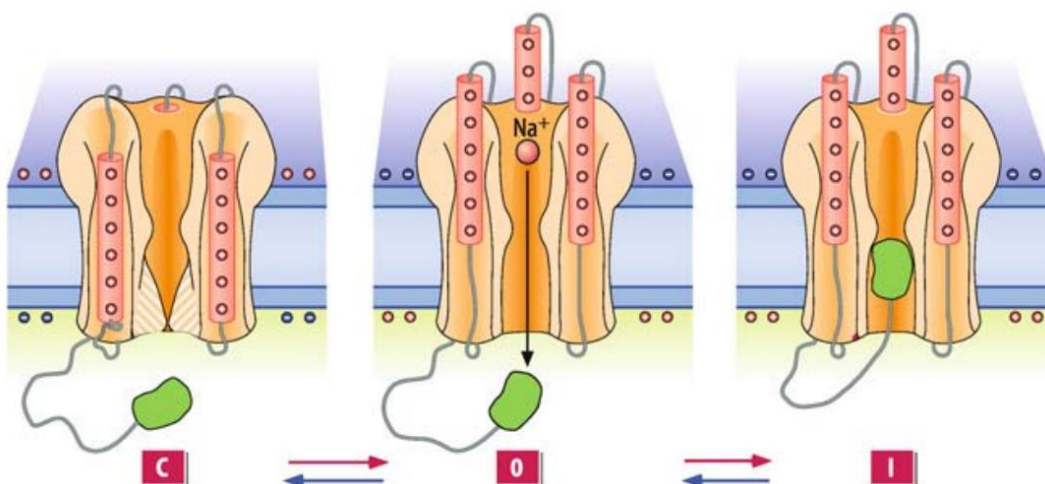
## 1 Einleitung

Hydrathüllen eines Natriumions oder Kalziumions. Durch diesen Hydrathüllenersatz ist es möglich, dass die Poren selektiv für die großen Kaliumionen (Radius 1,33 Ångström (Å)) sind, aber nicht für die kleineren Natriumionen (0,95Å) [29].



**Abbildung 8 [29]): Positionierung der Kaliumionen bei Interaktion mit den Carbonylsauerstoffen der Aminosäuren. Diese Abbildung wurde reproduziert aus dem Lehrbuch „Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie (2007)“, mit der Erlaubnis des Springerverlags.**

Weiterhin ist eine Einteilung abhängig von der Regulation der Ionenkanäle möglich. Hier wird unterschieden zwischen spannungsgesteuerten Ionenkanälen, Liganden gesteuerten Ionenkanälen (ionotrope Rezeptoren) und konstitutiv aktiven bzw. komplex regulierten Ionenkanälen, welche z.B. durch spezifische Kinasen phosphoryliert und damit aktiviert werden. Ionenkanäle sind nicht dauerhaft aktiv und somit nicht immer geöffnet, sondern lassen nur einen geregelten Ionenfluss zu, indem sie durch spezifische Konformationsänderungen ständig von einem offenen (O-) in einen geschlossenen (C-) oder inaktiven (I-) Zustand wechseln und umgekehrt. Diese Eigenschaft wird als Kanalschaltverhalten (Gating) bezeichnet und durch verschiedene Reize, wie z.B. der Änderung der Membranspannung oder Transmitterkonzentration gesteuert. Die Kinetik des Gatings ist je nach Ionenkanaltyp unterschiedlich, wodurch auch die Offen- und Geschlossenzeiten der Kanäle von Millisekunden- bis Sekundenbereichen schwanken. Das Schaltverhalten ermöglicht damit schnelle Veränderungen des elektrischen Stroms durch eine Zellmembran als Reaktion auf äußere Reize, was die Grundlage zellulärer elektrischer Signale darstellt [29,38,70].

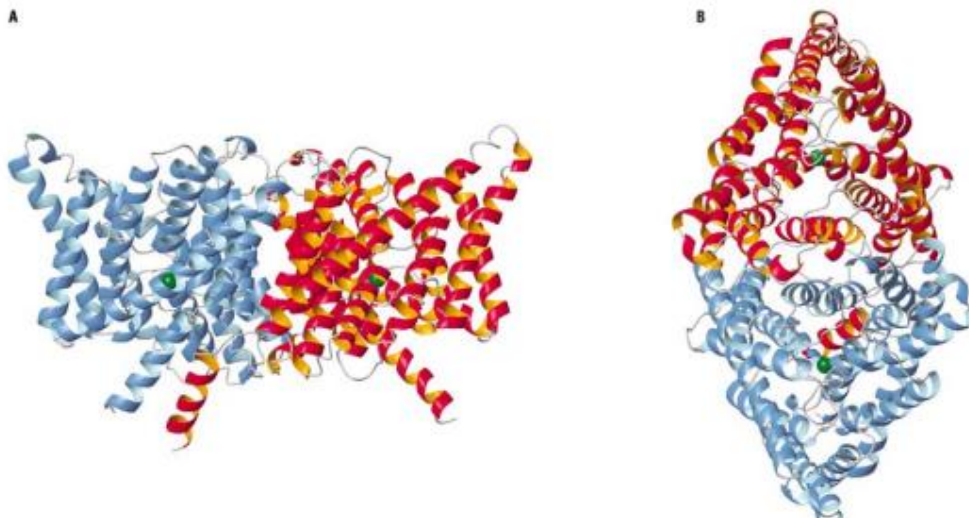


## 1 Einleitung

**Abbildung 9 ([29]): Grundprinzip des Schaltverhaltens spannungsgesteuerter Ionenkanäle. Diese Abbildung wurde reproduziert aus dem Lehrbuch „Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie (2007)“, mit der Erlaubnis des Springerverlags.**

Spannungsgesteuerte Ionenkanäle öffnen als Reaktion auf eine Änderung des Membranpotentials.[29].

Da bisher hauptsächlich von Kationenkanälen die Rede war, ist zu betonen, dass auch Anionenkanäle existieren. Ein Beispiel ist der spannungsabhängige Chloridkanal (ClC-Kanal). Spannungsgesteuerte ClC-Kanäle kommen sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen vor und haben keinerlei Strukturverwandschaft mit spannungsgesteuerten Kationenkanälen. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten, sogenannten Dimeren und bilden zwei Kanalporen aus [29].



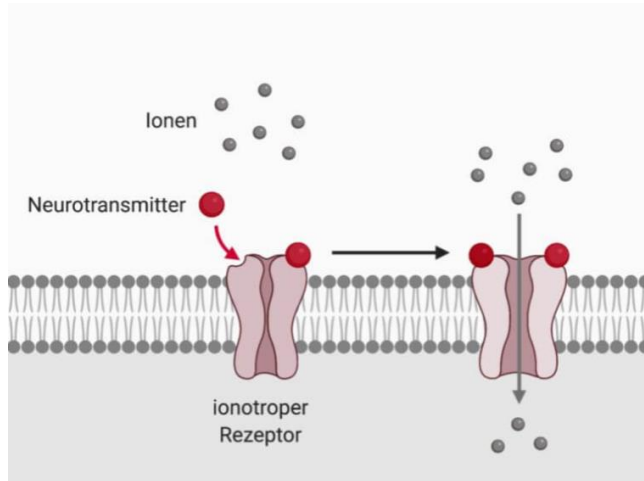
**Abbildung 10 ([29]): Aufbau eines ClC-Kanals, abgeleitet aus der Kristallstruktur des Proteins. Diese Abbildung wurde reproduziert aus dem Lehrbuch „Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie (2007)“, mit der Erlaubnis des Springerverlags.**

Sie sind nicht selektiv für Chlorid, sondern lassen ein breites Spektrum verschiedenster Anionen passieren. Auch im Gating Vorgang bestehen Differenzen zu den Kationenkanälen. Statt des S4-Segments fungiert bei den ClC-Kanälen das permeierende Anion als extrinsischer Spannungssensor. Damit ist die Chlorid Leitfähigkeit von der extrinsischen und intrinsischen Chloridkonzentration abhängig. Dies ist möglich, da der Selektivitätsfilter der ClC- Kanäle kürzer ist als in Kationenkanälen, wie z.B. Kaliumkanälen. Durch ein positives elektrostatisches Potential in der Pore werden negativ geladene Ionen angezogen und dehydriert [29].

Auch bei den Anionen Kanälen existieren verschiedene Klassen, die wichtigsten sind die spannungsabhängigen ClC-Kanäle, die Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulatoren (CFTR; eine Gruppe von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) abhängigen Chloridkanälen) als epitheliale Anionenkanäle, und die ionotropen  $\gamma$ -Aminobuttersäure- (GABA-) und Glycinrezeptoren, auf die im weiteren Verlauf noch eingegangen wird und die Bestrophine, welche  $\text{Ca}^{2+}$ - aktivierte Anionenkanäle sind [29].

## 1 Einleitung

Liganden gesteuerte Ionenkanäle öffnen und schließen im Unterschied zu spannungsgesteuerten Ionenkanälen nicht in Abhängigkeit von der Membranspannung, sondern reagieren auf intrazelluläre oder extrazelluläre Transmitter, welche an spezifische Bindestellen der Kanalporen binden und so das Signal zum Öffnen geben [29].



**Abbildung 11** ([131]): **Schema eines ligandenaktivierten Ionenkanals.**

**Diese Abbildung wurde erstellt von Jessica Nolte mithilfe von BioRender.com und lizenziert unter CC BY-NC-SA 3.0. Sie wurde reproduziert mit der Erlaubnis der DocCheck Community Gesellschaft mit beschränkter Haftung (GmbH).**

Diese sogenannten Liganden sind meistens die Namensgeber der Kanäle. Als Beispiel ist hier der Acetylcholin Rezeptor zu nennen, welcher durch Acetylcholin gesteuert wird. Liganden gesteuerte Kanäle, auch ionotrope Ionenkanäle genannt, können nach ihrer Funktion unterteilt werden. Liganden gesteuerte Kationenkanäle führen zu einer Exzitation, wohingegen ionotrope Anionenkanäle inhibitorisch wirken [29].

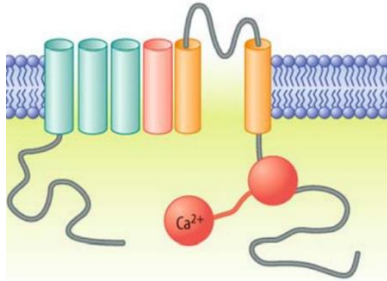
Wie bei den spannungsabhängigen Ionenkanälen sind die Öffnungsreaktionen je nach Kanaltyp unterschiedlich schnell. Einige Rezeptoren, zum Beispiel (z.B.) der  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptor (AMPA-Rezeptor) und verschiedene nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR), benötigen für die Öffnung weniger als eine Millisekunde. Verglichen damit braucht der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor mit 10 Millisekunden und mehr deutlich länger[29].

Neben der oben beschriebenen Deaktivierung der ionotropen Rezeptoren durch Abdiffundieren ihres Liganden gibt es auch die Möglichkeit der Desensibilisierung bzw. Inaktivierung. Dabei verbleibt der Agonist am Rezeptor, der Kanal blockiert trotzdem. Bei der Desensibilisierung handelt es sich um einen Sicherheitsmechanismus, welcher zu große und zu lang andauernde Aktivierungen verhindert.

Auch Kalzium kann als Gating-Substanz wirken. Bindet Kalzium an Calmodulin, ein Kalziumbindungsprotein, welches mit der  $\alpha$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Kalziumkanals  $Ca_v1$  und des Kalzium-aktivierten Kaliumkanals (SK-Kanal) verbunden ist, kommt es zu einer

## 1 Einleitung

Konformationsänderung, welche auf die Kanalpore übertragen wird. Bei den SK-Kanälen führt dies zu einer Aktivierung, bei den  $Ca_v1$ -Kanälen zu einem Verschluss des Kanals [29].



**Abbildung 12 ([29]): Alternative Gating- Mechanismen: Darstellung eines SK-Kanals mit Kalzium-Sensor.** Diese Abbildung wurde reproduziert aus dem Lehrbuch „Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie (2007)“, mit der Erlaubnis des Springerverlags.

Beispiele für Kanal Gating in Abhängigkeit von physikalischen Faktoren sind die Transienten Rezeptor Potential (TRP)-Kanäle, eine Familie von Typ-6-Segment-Kanälen. Ein Anstieg der Temperatur führt zur Aktivierung von den Vanilloid Rezeptoren der TRP-Kanalfamilie, TRPV1 und TRPV2. Ein Abfall der Temperatur führt zur Öffnung der Melastin-Rezeptor-Unterfamilie der TRP-Kanäle, der TRPM8 Kanäle. Eine Erhöhung der Osmolarität aktiviert TRPV4-Kanäle. Umgekehrt werden diese Kanäle durch entgegengesetzte Änderungen deaktiviert [29].

### 1.3.4 Die wichtigsten Ionenkanäle in der Membran menschlicher Erythrozyten

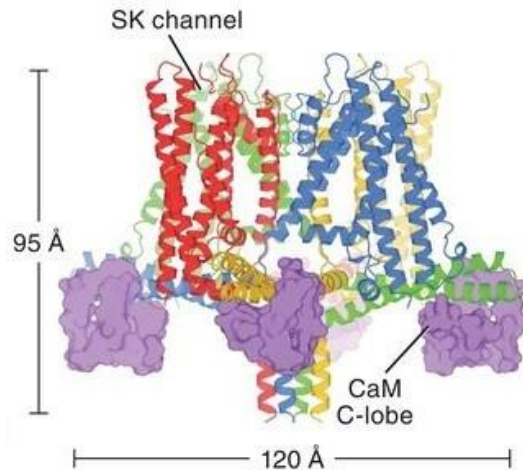
In der Membran menschlicher Erythrozyten gibt es viele verschiedene Kanäle, die zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts des Zellvolumens, des gesamten Ionenhaushalts und der einzelnen Ionentypen genutzt werden und so auch kommunikative Funktionen haben. Sie unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von den Kanaltypen anderer Zellen. So spielen zum Beispiel Kaliumkanäle in Erythrozyten eine andere Rolle als in anderen Zellen. Weiterhin haben erythrozytäre Chlorid- und Kalziumkanäle im Vergleich zu anderen Zellen eine deutlich wichtigere Rolle inne [78].

#### 1.3.4.1 Der Gárdos- Kanal

Der Gárdos- Kanal war der erste Kanal, der durch Patch-Clamp in Erythrozyten gefunden wurde [49,50]. Seinen Namen verdankt er G. Gárdos, welcher erstmals den “Gárdos- Effekt” beschrieb. Der Gárdos- Kanal trägt auch die Bezeichnungen KCNN4,  $K_{cs}3.1$ ,  $I_{K1}$  und  $S_{K4}$ , denn die humane Isoform von SK4 ist das Gen, welches für den Gárdos- Kanal der menschlichen Erythrozyten kodiert [56,64].

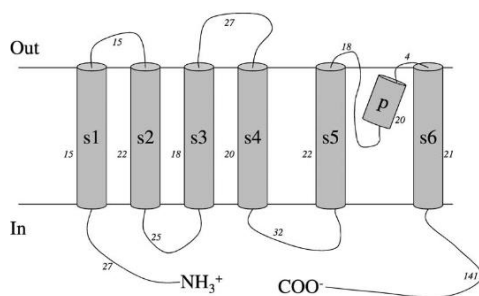
Es handelt sich dabei um einen Kalzium aktivierten Kalium-Kanal in der Erythrozytenmembran [126]. Die Struktur des Gárdos- Kanals ist ein Homotetramer aus Polypeptiden, welches aus sechs Transmembrandomänen und vier identischen Untereinheiten besteht. Es ist ungefähr 95Å lang und 120Å breit [74,115].

## 1 Einleitung



**Abbildung 13 ([74]):** Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) -Struktur des  $\text{Ca}^{2+}$ -freien SK-Calmodulin (SK-CaM) -Komplexes. Jede Kanaluntereinheit ist in einer anderen Farbe dargestellt. Diese Abbildung ist ein Nachdruck der Abbildung 1b aus „Lee et al., *SCIENCE*, 4 May 2018“ und wurde reproduziert mit der Genehmigung von American Association for the Advancement of Science (AAAS).

Die Carbonylsauerstoffatome in den Polypeptid- Rückränder der Untereinheiten bilden den Selektivitätsfilter für Kalium, die Porenregion („p“) befindet sich zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne, welche von den in die Membran eingebetteten Helices S1 und S4 umgeben ist [25,74].



**18 ([79]):** Einfache Schema-Darstellung der Topologie der monomeren Untereinheit des Gárdos- Kanals in einer Zellmembran. „s1-s6“ steht für die sechs mutmaßlichen Transmembrandomänen und „p“ steht für die porenbildende Region mit ihrem Selektivitätsfilter. Die Zahlen stehen für die Anzahl der Aminosäuren im entsprechenden Segment. Diese Abbildung wurde reproduziert aus „The Gárdos channel: a review of the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel in human erythrocytes (2003)“ von Maher A und Kuchel P, mit der Erlaubnis des Elsevierverlags.

Der Kalium Ausstrom aus der Zelle führt aufgrund des Membranpotentials indirekt auch zu einem Ausstrom von Chloridionen. Diesem folgen Wasser-Ionen aus der Zelle, welche, getrieben durch den osmotischen Gradienten, über Aquaporine aus der Zelle strömen. Durch die Verschiebung von Kalium, Chlorid- und Wasser-Ionen kann der Gárdos- Kanal nicht nur das Volumen der Erythrozyten regulieren, sondern auch das Verformungs- und maher Fließverhalten der Erythrozyten beeinflussen [64].

Auch wenn das Vorhandensein von Kalzium Voraussetzung für die Kanalaktivierung ist, sind Blei, Cadmium, Strontium und Barium weitere potenzielle Aktivatoren des Gárdos- Kanals [13]. Außerdem wird die Kanalaktivität beeinflusst durch intrazelluläre Signale, wie cAMP, MgATP und Theophillyn,

## 1 Einleitung

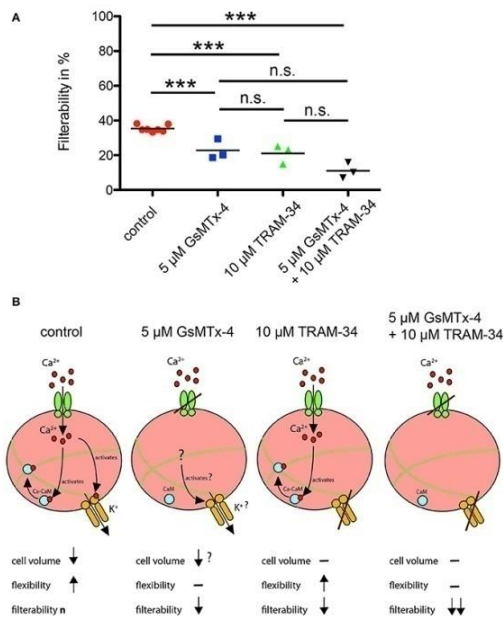
welche über eine endogene Proteinkinase (PKA) die Kalziumsensibilität des Gárdos- Kanals modulieren können[104].

Des Weiteren scheint eine hormonelle indirekte Aktivierung möglich, da diskutiert wird, ob ProstaglandinE<sub>2</sub> aus aktivierten Blutplättchen über die Initiierung eines Kalziumeinstroms den Kanal aktivieren kann. Dies würde bedeuten, dass Erythrozyten in gewissem Maße selbst zur Steuerung des Kanals beitragen könnten, da sie fähig sind, in Stresssituationen Prostaglandin freizusetzen [75]. Neben all diesen Faktoren wird die Kanalaktivität auch durch die Temperatur und das Alter der Erythrozyten beeinflusst. Mit abnehmender Temperatur sinkt die Leitfähigkeit des Kanals und mit steigendem Alter sinkt die Kanalaktivität [64,113].

Die physiologische Funktion des Kalzium-abhängigen Kalium-Effluxes, welcher auch als Gárdos-Effekt bezeichnet wird, war in reifen, gesunden Erythrozyten bis vor kurzem unklar. Man ging davon aus, er spiele nur eine geringe Rolle, da der Kanal nach Schätzungen auf Grundlage von Einzelkanalaufnahmen im Durchschnitt nur ungefähr zehn Mal pro Erythrozyt vorkommt [47], oder er habe die Funktion, bei Kalziumerhöhung durch Gerinnungsbildung und thrombotischen Ereignissen einen programmierten Zelltod der Erythrozyten einzuleiten, indem er durch Ionenverluste zu Dehydratation führe [64]. Inzwischen zeigten Experimente, dass der Gárdos- Kanal eine wichtige Rolle für die Modulation der Verformbarkeit von Erythrozyten spielt, wenn diese beispielsweise Kapillaren oder Milzschlitze passieren, welche schmaler sind als der Erythrozyten Durchmesser. Bei dieser Art von mechanischem Stress dringt durch andere Kanäle Kalzium in die Zelle ein. Es ist nicht abschließend geklärt, durch welche Ionenkanäle dies geschieht, aber einige Fakten deuten darauf hin, dass der Piezo1-Kanal, der weiter unten vorgestellt wird, hierbei eine wichtige Rolle spielt und somit in engem Zusammenspiel mit dem Gárdos- Kanal steht. Kommt es durch den beschriebenen Kalziumeinstrom zu einer Aktivierung des Gárdos- Kanals, können initial Kalium, gefolgt von Chlorid und Wasser aus dem Erythrozyten ausströmen, wodurch dieser schrumpft. Diese Volumen Anpassung erleichtert den ungehinderten Fluss der roten Blutzellen durch die engen Kapillaren. Abbildung 14 zeigt, dass Erythrozyten, welche mit dem Gárdos- Kanal Inhibitor Triarylmethane 34 (Tram 34) vorinkubiert wurden, eine deutlich verminderte Anpassungsfähigkeit an das Volumen zeigen, als ohne Hemmung der Gárdos Funktion [18].



# 1 Einleitung



**Abbildung 14 ([18]): Filtrierbarkeit von Erythrozyten und vermutete Mechanismen. (A) Messungen der Filtrierbarkeit von Erythrozyten unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von Grammostola Mechanotoxin 4 (GsMTx-4), von Tram 34 und in Gegenwart beider Medikamente. (B) mutmaßlicher Mechanismus für alle vier in (A) dargestellten Versuchsbedingungen. Kontrollbedingungen: Interaktion der Erythrozyten mit der Zellulose aktiviert die mechanosensitive Kanäle wie Piezo1 (grünes Kanalsymbol),  $Ca^{2+}$  aktiviert den Gárdos-Kanal (orangenes Kanalsymbol) und löst durch Bildung des Kalzium-Calmodulin-Komplexes (Ca-CaM; assoziierte blaue und rote Kreise) die vernetzten Spektrin-Tetramere (grüne Linien). Es kommt zu verringertem Zellvolumen und erhöhter Flexibilität der Zelle, was zu einer "normalen" Filtrierbarkeit n führt. Blockiert GsMTx-4 den Piezo1 Kanal, wird der  $Ca^{2+}$ -Eintrittsweg verhindert und der oben beschriebene Prozess verringert. Es bleibt unklar, ob auch andere  $Ca^{2+}$ -permeable Kanäle als Piezo1 beteiligt sind, so dass es zu einer leichten Anpassung des Zellvolumens kommt. Blockiert Tram 34 den Gardos-Kanal, kann  $Ca^{2+}$  weiterhin über Piezo1 in die Zelle gelangen, was die Veränderung des Spektrin-Netzwerks, nicht aber die Volumen Anpassung ermöglicht, die zu einer verminderten Filterfähigkeit führt. Bei Hemmung von Piezo1 und dem Gardos-Kanal werden alle oben beschriebenen Mechanismen blockiert. Diese Abbildung wurde reproduziert aus „Red blood cell passage of small capillaries is associated with transient  $Ca^{2+}$ -mediated adaptations“ von Danielczok et al., aus *Frontiers in Physiology*, (2017), 979, 8(DEC). Die Erlaubnis zum Nachdruck erteilte Frontiers Media.**

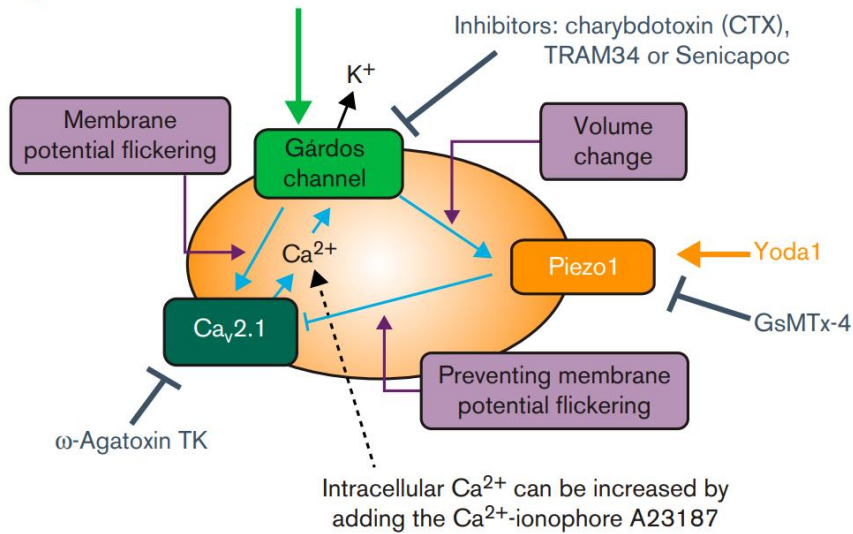
Außerdem geht man davon aus, dass die Aktivierung des Gárdos- Kanals das Membranpotential des Erythrozyten zum Flackern bringt, das heißt es schwankt zwischen ungefähr minus 10 und minus 60 mV. Dies führt wiederum dazu, dass sich der Kalziumkanal  $Ca_v2.1$  öffnet und die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht. Der  $Ca_v2.1$  Kanal scheint außerdem von Piezo1 beeinflusst zu werden [57,63]

Abbildung 15 zeigt schematisch diese Korrelation, sowie den Einfluss von Kanalblockern und Kanalaktivatoren sowie einer Gain-of-Function- Mutation des Gárdos- Kanals. Gárdos – Kanalopathien, welche auf ‘Gain-of-function‘ Mutationen beruhen, wurden mit verschiedenen Formen der hämolytischen Anämie in Verbindung gebracht, wie der hereditären Stomatozytose oder auch der

## 1 Einleitung

Sichelzellanämie [1,2,44,57,64].

**Gain of function mutation,  
experimental activation with NS309**



**Abbildung 15 ([57]): Mechanistische Hypothese, wie die Aktivität des Gardos-Kanals einen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration auslöst. Die Öffnung des Gardos-Kanals induziert Membranpotentialänderungen, welche den spannungsgesteuerten Kalzium-Kanal Cav<sub>2.1</sub> aktivieren, der möglicherweise durch den mechanosensitiven Piezo1-Kanal moduliert wird. Wird Piezo1 blockiert, ist die durch den Gárdos-Kanal induzierte Öffnung von Cav<sub>2.1</sub> maximal. Im Gegensatz dazu baut die Piezo1-Aktivität aufgrund der nichtselektiven Kationenpermeabilität des Kanals die durch den Gárdos-Kanal induzierte Hyperpolarisation ab. Infolgedessen wird die Cav<sub>2.1</sub>-Aktivität reduziert. Das Schema enthält Anmerkungen zu den experimentellen Manipulationen an den molekularen Akteuren. Ein Pfeil steht für die Aktivierung und ein Anker für die Hemmung des Transportproteins.**

Diese Abbildung wurde veröffentlicht in Jansen et al. (2021) und mit der Erlaubnis vom Elsevier Verlag reproduziert.

Hereditäre Stomatozytosen sind vererbliche Krankheiten der Erythrozyten, die zu einer erhöhten Permeabilität der Erythrozytenmembran für Kationen führen und demzufolge den Hydratationszustand der roten Blutzellen verändern, sodass es zu einer erhöhten Hämolyserate kommt. Sie können auf verschiedenen Mutationen beruhen, wie beispielsweise der Gárdos-Kanal Mutation oder der Piezo1-Mutation. Bei letzterem handelt es sich um einen mechanosensitiven Ionenkanal, auf welchen ich im nächsten Kapitel genauer eingehen möchte.

Die häufigste Stomatozytose ist die dehydrierende Stomatozytose, welche auch als hereditäre Sphärozytose bekannt ist. Ihr Phänotyp ist geprägt durch chronische Hämolyse, aber auch durch nicht hämatologische Erscheinungen wie transiente perinatale Ödeme, Pseudohyperkaliämien, Eisenüberladung und thrombembolische Komplikationen im Fall einer Splenektomie. Der hereditären Sphärozytose liegt eine Gain-of-function-Mutation des Piezo1 Kanals zugrunde, welche zu einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration führt und dadurch den Gárdos-Kanal aktiviert. Als Folge der Gárdos Aktivierung strömt Kalium aus den Zellen aus und Wasser folgt aus osmotischen Gründen, sodass die betroffenen Erythrozyten dehydrieren [97].

Eine andere Form der hereditären Stomatozytose ist die Gárdos-Kanalopathie. Sie beruht auf einer Gain-of-function Punktmutation des KCNN4-Kanals und äußert sich bei den betroffenen Personen, wie bei der hereditären Sphärozytose, durch Anämie, Hämolyse und Eisenüberladung. Es gibt aber



## 1 Einleitung

auch einige Unterschiede zur hereditären Sphärozytose, so dehydrieren beispielsweise weniger Erythrozyten bei der Gárdos- Kanalopathie als bei der hereditären Sphärozytose, was zu einer erschweren Diagnosestellung über Ektazytometrie führt [97].

Ein weiterer bedeutender Unterschied der beiden Anämieformen ist das thromboembolische Risiko der Patienten nach erfolgter Splenektomie. Picard et al. (2019) fanden in ihren Untersuchungen bei 8 von 8 Patienten mit hereditärer Sphärozytose thromboembolische Ereignisse. Diese 100% Quote deckt sich mit den Ergebnissen weiterer Studien. Dagegen traten in den Daten von Picard et al. (2019), die auch vier Gárdos- Kanalopathie Patienten in ihre Studie einschlossen, bei diesen Patienten keine Thrombosen nach Splenektomie auf. Die Ergebnisse dieser Studie müssen vorsichtig betrachtet werden, da zum einen eine Probandenzahl von vier Patienten mit Gárdos- Kanalopathie nicht sehr repräsentativ ist und zum anderen vier der Patienten mit thrombotischer Komplikation nicht genotypisiert wurden. Dennoch scheint die Piezo1 Mutation ein erhöhtes Risiko für Thrombosen zu bergen [31,97].

Dass die Patienten mit Gárdos- Kanalopathie weniger anfällig waren für Thrombosen könnte durch eine Interaktion mit weiteren Ionenkanälen, wie beispielsweise dem mechanosensitiven Piezo1 Kanal begründet werden. So formulierten Fermo et al. (2017) die Theorie, die Anpassungsfähigkeit der Gárdos- Kanalopathie Erythrozyten läge darin begründet, dass wenn die mechanosensitive Kanäle der Erythrozyten beim Passieren von engen Kapillaren aktiviert werden, der Kalziumeinstrom zur Aktivierung des Gárdos- Kanals führt, welcher durch die Mutation aktiver und noch empfindlicher gegenüber Kalzium ist. Somit komme es zur Volumen Anpassung. Sie vermuteten weiterhin, dass dieser Mechanismus in den Erythrozyten der Patienten mit hereditärer Sphärozytose dadurch gestört sei, dass die mechanosensitive Funktion von Piezo1 verändert ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass eine Hemmung des Gárdos- Kanals sowie die Hemmung mechanosensitiver Kanäle zu einer verringerten Filtrierbarkeit führen [31].

Insgesamt könnte die Gárdos- Kanalopathie, von welcher verschiedene Typen entdeckt wurden, durch unterschiedliche Auswirkungen auf die Regulierungsmechanismen zu einer komplexen Pathologie führen, welche verschiedene andere Kanäle mitbeeinträchtigt und sich somit in weiteren Aspekten von der hereditären Sphärozytose abgrenzt [31].

Ein Beispiel für eine solche veränderte Kanalinteraktion bei Gárdos- Kanalopathie ist der erhöhte intrazelluläre Kalziumgehalt der betroffenen Erythrozyten, welcher wahrscheinlich durch eine Interaktion mit dem  $Ca_v2.1$  Kanal zustande kommt. Dieser wird durch das Flackern des Membranpotentials nach Öffnung des Gárdos- Kanals aktiviert und führt zu einem gesteigerten Kalziumeinstrom (Abbildung 15). Der erhöhte Kalziumgehalt der Erythrozyten wurde bisher sowohl für die Gárdos- Kanalopathie Variante p.R352H nachgewiesen, als auch für die Variante KCNN4 p.S314P [31,57].

## 1 Einleitung

Außerdem fällt als Unterschied zwischen den beiden Stomatozytoseformen auf, dass die Piezo1-Sphärozytose eine mildere Ausprägung der Anämie zeigen. Nur 27% der untersuchten Patienten wiesen einen Hämoglobinwert von weniger als 120 g/l auf, wohingegen es bei der Gárdos-Kanalopathie 75% waren. Einige der Patienten mit Piezo1 Mutation hatten in der Studie von Picard et al. (2019) sogar Hämoglobinwerte im oberen Bereich der Norm. Somit kann von einer kompensierten Hämolyse gesprochen werden. Dies könnte durch eine verstärkte Erythropoese begründet sein, die möglicherweise durch die Mutation selbst stimuliert sein könnte [97].

Es ist davon auszugehen, dass die Kalzium-Sensitivität des Gárdos-Kanals über Calmodulin vermittelt wird. Calmodulin ist eng mit der zytoplasmatischen Domäne des Gárdos-Kanals verbunden und so könnte die Bindung von Kalzium an Calmodulin zu einer Konformationsänderung in Segment sechs führen, welche in einer Leitfähigkeit für Kalium resultiert [79].

Als Agonisten sind der Betablocker Propranolol, Calpromontin und Calmodulin am Gárdos-Kanal wirksam, wobei Calmodulin, wie oben beschrieben, ein Teil des Proteinkomplexes darstellt. [79] Außerdem wirken NS309 und A23187 agonistisch, wobei NS309 direkt agonistisch wirkt, in dem es die Kalziumsensitivität erhöht und A23187 indirekt den Gárdos-Kanal aktiviert, indem es dazu führt, dass Kalzium in die Zelle strömt, welches dann als Agonist wirkt.

NS309 ist der stärkste bisher bekannte  $IK_1$ - Agonist und aktiviert auch unter subphysiologischen intrazellulären Kalziumspiegeln den Gárdos-Kanal, indem er dessen Empfindlichkeit gegenüber Kalzium erhöht. Dabei reichen sogar intrazelluläre Kalziumspiegel aus, welche zwei Größenordnungen unter denen liegen, die ohne NS309 benötigt werden [5,101,108].

Dies scheint weder über eine Interaktion mit Calmodulin noch über eine Erhöhung der Kalziumdurchlässigkeit der Erythrozytenmembran erreicht zu werden, sondern über direkte Interaktion mit dem Gárdos-Kanal. Durch die Aktivierung kommt es zu einer Hyperpolarisation und Dehydrierung der Erythrozyten [5,101]. Dabei führt NS309 zu einer Dehydrierung der Erythrozyten nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, d.h. die betroffenen Erythrozyten dehydrieren entweder vollständig oder gar nicht. Hierzu besteht auf Grundlage verschiedener Experimente die Hypothese, dass in älteren Erythrozyten höhere Kalziumspiegel zur Aktivierung nötig seien als in jungen Erythrozyten, da der Mechanismus hinter der Erhöhung der Kalziumsensitivität durch NS309 in älteren Erythrozyten weniger wirksam sei [101].

Ähnliche Wirkung, aber durch einen anderen Mechanismus, entfaltet A23187. Dabei handelt es sich um ein Carbonsäure-Antibiotikum, welches als Ionophore für Kalzium wirkt, sowie mit geringerer Affinität auch Magnesium und andere zweiwertige Ionen über Membranen transportieren kann. Dadurch ist A23187 fähig, indirekt über die Erhöhung des intrazellulären Kalziums, den Gárdos-Kanal zu aktivieren [76,99,107]

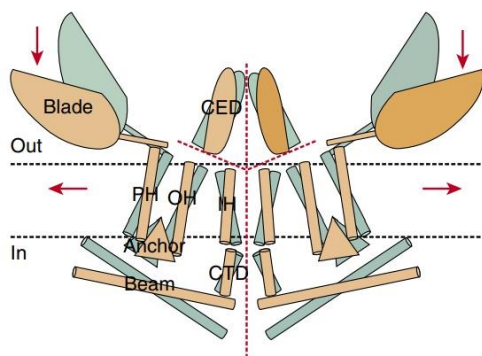
Eine Hemmung des Kanals kann mit Hilfe der Medikamente Clotrimazol und Charybdotoxin erreicht werden, sowie durch Vorinkubation der Zellen in einer Kaliumfreien Lösung. Weiterhin ist Bis(4-

## 1 Einleitung

fluorphenyl)phenylacetamid (Seniapoc) ein selektiver und sehr wirksamer Gárdos- Kanal Inhibitor [4].Außerdem vermindert der Kalzium-Kanal-Blocker Nitredipin den Kalium-Fluss, sowie Halothan und volatile Anästhetika. Ein weiterer Inhibitor, Tram 34 wurde erst kürzlich entwickelt und besticht durch eine sehr hohe Spezifität für den Kalzium aktivierten Kaliumkanal  $I_K$ . Tram 34 verfügt über eine Tri-Phenyl-Gruppe, welche die Inhibition der Kalium- Kanäle ermöglicht. [79].

### 1.3.4.2 Der Piezo1 – Kanal

Der Piezo1 Kanal gehört zur Piezo-Familie, einer Gruppe echter, mechanosensitiver Ionenkanäle, die gemischt kationisch und nicht selektiv sind. In Säugetieren sind sowohl das Piezo1 Gen als auch das Piezo2 Gen von Relevanz. Beide Gene kommen in verschiedenen Geweben, wie z.B. der Lunge und der Niere vor, in denen Mechanosensitivität von Bedeutung ist. Da Piezo1 in der Membran von menschlichen Erythrozyten vorkommt, wird der Fokus im Folgenden auf diesem Kanal liegen. Dabei handelt es sich um ein Homotrimer, welcher als mechanosensitiver Katalysator voll aktiv ist [32,42,67].



**Abbildung 16 ([40]): Vorgeschlagenes Modell von PIEZO Kanälen auf der Grundlage kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen. Die grauen und braunen Modelle stellen geschlossene und offene Kanäle dar. Rote gestrichelte Linien zeigen mögliche Ionenleitwege an. Vermutlich führt die kraftinduzierte Bewegung (Pfeile) der peripheren Klinge oder peripheren Helices (PH) zur Konformationsanordnung und zum Gating des des Kanals. Nachdruck aus Ge et al „Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel“, mit Erlaubnis von Springer Nature.**

Piezo1 ist ein mechanisch aktivierbarer Kanal, das bedeutet, er reagiert vor allem auf Dehnung, Scherstress, Berührung und Hypotonizität und ist dadurch ohne die Beteiligung weiterer Proteine komplett aktivierbar. Die Aktivierung von Piezo1 dauert nur wenige Millisekunden und es kommt auch innerhalb von Millisekunden zu einer Deaktivierung [17,27]

Piezo1 hat verschiedene Funktionen. So ist Piezo1 in Zusammenarbeit mit dem Gárdos- Kanal an der Regulierung des Erythrozytenvolumens beteiligt. Dabei würde der Piezo1 vermittelte Kalziumeinstrom zu einer Aktivierung des Gárdos- Kanals führen, welcher durch Ausstrom von Kalium, Chlorid und Wasser eine bessere Verformbarkeit der Erythrozyten gewährleistet. Die Verformbarkeit der roten Blutzellen ist beim Fluss durch enge Kapillaren von großer Bedeutung. Danielczok et al. (2017) konnten diese These durch Experimente stützen, bei denen nach

## 1 Einleitung

mechanischer Stimulation die Erythrozyten mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration reagierten. Diese Reaktion zeigte eine starke Reproduzierbarkeit. Außerdem konnte durch den Piezo1-Inhibitor GsMTx-4 der Kalzium-Anstieg blockiert werden. Weiterhin zeigten sie, dass die Höhe des Kalziumanstiegs mit der Enge der Kapillaren korreliert, die die Erythrozyten passieren müssen. Des Weiteren zeigten Experimente von Faucherre et al. (2014), dass der Knockdown von Piezo1 zu einer Zellschwellung und Membranverformung der Erythrozyten führt, sowie zu einem unterbrochenen Randband aus Mikrotubuli, was wahrscheinlich eine Hämolyse zur Folge hat. Zusammengefasst spricht dies dafür, dass Piezo1 an der Volumenregulation der Erythrozyten bei Passage durch enge Kapillaren beteiligt ist [18,30,64].

Da Piezo1 durch Membrandehnung aktiviert wird, führt eine Zellschwellung in gesunden Erythrozyten zu einer Öffnung der Piezo1-Kanäle, wodurch dem Wassereinstrom entgegengewirkt wird. Bei Knockdown oder Mutation von Piezo1 fehlt dieser Schutzmechanismus, sodass es zur Zellyse und somit zur Anämie kommt [30].

Auch wenn Piezo1 mit hereditärer Sphärozytose in Verbindung gebracht wird, basiert dies nicht auf dem oben erklärten Mechanismus.

Wie im Kapitel zum Gárdos- Kanal bereits in Teilen dargestellt, handelt es sich bei der hereditären Sphärozytose um eine autosomal dominante hämolytische Anämie mit verschiedenen Varianten, welche unter der Bezeichnung Hereditäres Xerozytose Syndrom subsummiert werden und die häufigsten primären Störungen der Erythrozyten-Hydratation darstellen. Sie werden durch einen Defekt in der Zellmembran ausgelöst, der zu einem Kaliumausstrom und damit zur Dehydrierung der Erythrozyten führt. Des Weiteren liegt eine Piezo1 Mutation vor, bei welcher es sich in den meisten Fällen um eine gain-of-function Mutation handelt. Diese kann zu einer Verlangsamung der Inaktivierungsrate (ca. 200ms) und zu einer Verlängerung der Latenzzeit bis zur erneuten Aktivierung des Kanals führen. Durch die verzögerte Kanalaktivierung, welche von beiden genannten Veränderungen den größeren Einfluss zu haben scheint, bleibt Piezo1 länger geöffnet, wodurch die Erythrozyten dehydrieren.

In Letztgenanntem liegt der entscheidende Unterschied von Anämien durch Knock-out von Piezo1 und hereditärer Sphärozytose, denn der Knock-out führt zu Zellschwellung, wohingegen bei hereditärer Sphärozytose die Zellen dehydrieren [17,30,39].

Außerdem scheint Piezo1 eine Rolle in Regulation der mechanotransduktiven ATP-Freisetzung zu spielen, da es über die Kontrolle des scherungsinduzierten Kalziumeinstroms aus roten Blutzellen indirekt Einfluss auf die ATP- Freisetzung nehmen kann. Dabei korreliert die Menge der ATP-Freisetzung mit der Höhe des Kalziumeinstroms.

Allerdings ist für eine signifikante ATP- Freisetzung eine Mindestkonzentration an extrazellulärem Kalzium nötig.

## 1 Einleitung

Dabei stellt sich die Frage, was genau der Mechanismus hinter der Kalzium getriggerten ATP-Freisetzung ist. Für Urothelzellen konnten Miyamoto et al. (2014) zeigen, dass Piezo1 über eine Kalzium-regulierte vesikuläre Exozytose an der ATP-Freisetzung beteiligt ist. Da Erythrozyten jedoch keine Organellen haben und somit keine Vesikel bilden können, ist dieses Schema nicht auf erythrozytäre ATP-Freisetzung übertragbar. Bogdanova et al. (2013) zeigten, dass lokal erhöhte Kalziumspiegel in der Nähe der Plasmamembran Wechselwirkungen zwischen Protein 4.1R und dem Spektrin-Aktin-Netzwerk reduzieren, und so die Depolymerisation der Aktin-Filamente verstärkt wird [71]. Aktin kann CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), eine bestimmte Art von Chlorid-Kanälen, aktivieren, welche fähig sind die ATP-Freisetzung zu stimulieren [45,106]. Daher ist als Mechanismus für die Piezo1 induzierte ATP-Freisetzung anzunehmen, dass der Kalziumstrom durch Piezo1 zu einer veränderten Wechselwirkung zwischen Aktin und CFTR führt, welche dann die ATP-Freisetzung initiiert [17]

Ein weiterer Erklärungsansatz führt über Pannexin1, ein Protein, welches in Erythrozyten ATP-Kanäle bildet. So könnte der scherungsinduzierten Kalziumstrom durch Piezo1 als direkter Pannexin1-Aktivator zu ATP-Freisetzung führen [17].

Zu beachten ist bei diesen Überlegungen, dass ATP nicht ausschließlich über die Mitwirkung von Piezo1 freigesetzt wird [17].

Über die ATP-Freisetzung können die Erythrozyten Einfluss auf die vaskuläre Signalübertragung nehmen und somit unter anderem den mikrovaskulären Tonus mitbeeinflussen, denn das ATP kann an muskarinerge Rezeptoren binden, welche dadurch beispielsweise den Vasodilatator Stickstoffmonoxid freisetzen [17].

Bei Experimenten mit Piezo1 spielen insbesondere die Piezo1 Agonisten Yoda1, sowie Jedi 1 und 2 eine wichtige Rolle. Als Antagonisten sind das bereits erwähnte Tarantula-Spinnen Toxin GsMTx4, Rutheniumrot und dreiwertige Kationen zu nennen [27].

### 1.3.4.3 *Der TRPV2 Kanal*

Fortfahren möchte ich mit dem oben bereits erwähnten „Transient receptor potential vanilloid type 2“- (TRPV2-) Kanal, der zur Familie der TRPV-Kanäle gehört und als Homotetramer vorliegt. Es handelt sich um einen mechanosensitiven Ionenkanal mit höchster Permeabilität für Kalzium, der aber auch Magnesium, Natrium, Caesium und Kalium passieren lässt und eine typische nach außen gleichrichtende Strom-Spannungskurve (IV) hat [6,27].

Erst vor kurzem konnte nachgewiesen werden, dass sich TRPV2 in der Erythrozytenmembran befindet [6], auch wenn sich dort nur sehr wenige Ionenkanalkopien pro Erythrozyten finden lassen [62]. Neben Erythrozyten kommt TRPV2 außerdem in verschiedenen Organen, wie beispielsweise der glatten Gefäßmuskulatur vor [91].

## 1 Einleitung

Verschiedene Faktoren können zur Aktivierung von TRPV2 beitragen, so kommt es durch Membrandehnung und durch hypotone Stimulation zur Aktivierung. Die Mechanosensitivität könnte auf molekularer Ebene durch Ankyrin-Wiederholungen in der N-terminalen Region begründet sein, die mit bestimmten Proteinen des Zytoskeletts interagieren und so mechanische Signale empfangen könnten [91]. Bezüglich des Mechanismus der hypotonen Stimulation wird diskutiert, ob die Zellschwellung einen endogenen Liganden erzeugt, welcher den TRPV2 aktiviert [91]. Außerdem besteht die Möglichkeit der Kanalaktivierung durch hohe Temperaturen ( $>52^{\circ}\text{C}$ ). Weiterhin führen Wachstumsfaktoren wie Insulin-Wachstumsfaktor und Thrombozytenwachstumsfaktor zur konstitutiven Aktivierung des TRPV2 [14,65,91].

Allerdings ist wichtig zu erwähnen, dass bisher keine Daten über die mechanische Aktivierung des TRPV2 in Erythrozyten vorliegen. Es wurde aber die These aufgestellt, TRPV2 könnte ähnliche Wirkung haben wie Piezo1. Dafür sprächen, dass die benötigte Membranspannung für die Aktivierung kompatibel ist mit denen im Blutkreislauf und sogar bei der Milzfiltration [27].

Die Aktivierung von TRPV2 resultiert in einem Kalzium-Einstrom, und damit in einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration [91]. Durch diesen Anstieg der Kalziumkonzentration kann es zu verschiedenen Folgereaktionen kommen. Zum einen kann dadurch der Gárdos- Kanal aktiviert werden, welcher zu Kaliumverlust und weiterhin zu Wasserverlusten der Zelle und somit zu ihrer Dehydratation führt, wie es auch für den Piezo1-Kanal diskutiert wird. Allerdings schließt der TRPV2 Kanal physiologischerweise nach seiner Öffnung sehr schnell, sodass es meist nicht zu einer Gárdos-Kanal Aktivierung kommt [27]. Außerdem führt eine Aktivierung des Gárdos- Kanals zu einer Dehydrierung, bei der TRPV2 Aktivierung kommt es dagegen zu einer Zellschwellung.

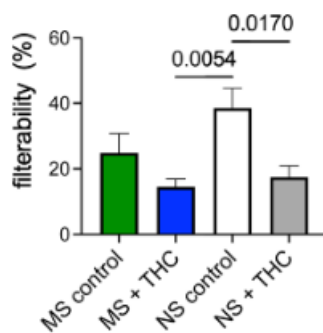
Die einzige sinnvolle Erklärung für das Schwellen liegt in einem Natriumeinstrom über den TRPV2 Kanal, welcher den Kaliumausstrom über den Gárdos- Kanal übersteigt, was auch in einer unterschiedlichen Häufigkeit der beiden Kanäle Begründung finden könnte. Somit lässt sich festhalten, dass es durch die Aktivierung von TRPV2 zu einer transienten Zellschwellung kommt, welche verschiedenen Gegenregulationsmechanismen unterliegt wie beispielsweise der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase und der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und somit schnell wieder abnimmt. Außerdem kann es bei Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch den TRPV2 Kanal zur Aktivierung des Gárdos- Kanals kommen, wodurch direkt eine Zellschwellung unterbunden wird, da der Gárdos- Kanal durch Kaliumausstrom zu Wasserverlust aus der Zelle führt [27,34,67].

Kommt es zur vorübergehenden Zellschwellung könnte diese das Fließverhalten der Erythrozyten behindern, wenn ihr Durchmesser größer würde als der der Gefäße. Diese Hypothese wird bestärkt durch die Tatsache, dass nach Cannabiskonsum gehäuft Thrombosen auftreten, denn bei dem im Cannabis enthaltenen  $\Delta^9$ - tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) und Cannabidiol (CBD) handelt es sich um spezifische TRPV2 Agonisten. Dabei ist zu beachten, dass Cannabiskonsum auch zu Vasokonstriktion führt, was die Gefäßverstopfung wahrscheinlicher werden lässt [6,23,34,87,96,124].

## 1 Einleitung

Belkacemi et al. (2021) zeigten, dass die CBD und  $\Delta^9$ -THC abhängigen TRPV2-Aktivierungen Kalziumströme hervorrufen, die dann die Hypotonie abhängige Hämolyse verringern und zu einer konkaven Erythrozytenform führen. Der Effekt auf die Erythrozytenfragilität konnte durch die Zugabe des Gárdos- Kanal Antagonisten Tram 34 verhindert werden und die induzierte Formveränderung wurde trotz CB1 und CB2 Antagonisten beibehalten. Das lässt vermuten, dass die  $\Delta^9$ -THC und CBD abhängige Formveränderung der Erythrozyten durch den TRPV2 Kanal vermittelt wird und dass als Folge einer ausreichenden Erhöhung des intrazellulären Kalziums nach dessen Öffnung der Gárdos-Kanal tatsächlich aktiviert wird. Dieser würde dann über einen Kalium Ausstrom die Erythrozyten resistenter gegen hypotoniebedingte Hämolyse machen, wie dies auch für Piezo1 diskutiert wird. Somit handelt es sich beim TRPV2 und beim Piezo1 Kanal um mechanosensitive Kationen-Kanäle, welche für die Feinmodulation der Kalzium- Signalisierung eine große Bedeutung haben und damit Einfluss auf die Filtrierbarkeit und die Lebenszeit der Erythrozyten nehmen [6,27].

Auch neuste Arbeitsgruppeninterne Ergebnisse befassen sich mit der Frage, ob die Cannabinoid-Exposition von Erythrozyten zur Begünstigung von thrombotischen Vorfällen führt. Flormann et al. (2022) machten Experimente zur Beeinflussung der Filtrierbarkeit der Erythrozyten durch  $\Delta^9$ -THC und zeigten eine signifikante Modulation, wie Belkacemi et al. (2021) es auch postulierte (Abbildung 17). Allerdings konnten sie keine Veränderungen in den Fließeigenschaften der Erythrozyten finden, was gegen eine Förderung der Thromboseereignisse durch Exposition der Erythrozyten mit  $\Delta^9$ -THC



spricht.

**Abbildung 17 [34]: Messung der Filtrierbarkeit der Erythrozyten mit Filtern auf Zellulosebasis von Marihuana Rauchern (MS, Marijuana Smoker) und Nichtrauchern (NS, Non- smoker) mit und ohne  $30\mu\text{M}$   $\Delta^9$ -THC-Inkubation. Die Statistiken basieren auf dreifachen Messungen für jeden Spender. Diese Abbildung ist ein Nachdruck aus „Transient receptor potential channel vanilloid type 2 in red cells of cannabis consumer“ von Daniel Flormann, Min Qiao, Nicoletta Murciano, et al., aus dem American Journal of Hematology. Die Abbildung wurde mit Erlaubnis von John Wiley and Sons reproduziert.**

Andererseits spricht für die Hypothese, dass das Anschwellen der Zelle durch den TRPV2 Kanal ein vorübergehendes Ereignis darstellt und somit die Thrombosen direkt nach der Substanzaufnahme zu erwarten sind, wie es in den bisherigen Fällen auch berichtet wurde. Daher ist bezüglich der Erhöhung der Wahrscheinlichkeit auf thrombotische Ereignisse durch den Cannabis Konsum weiter zu forschen, um diese Frage endgültig zu beantworten[34].

## 1 Einleitung

Weiterhin stellten sich Flormann et al. (2022) die Frage, ob es durch den regelmäßigen Konsum von Cannabis zu veränderten Reaktionen der Erythrozyten auf  $\Delta 9$ -THC und CBD kommt. Sie beobachteten am Konfokalmikroskop, dass die Erythrozyten eines Probanden, welcher seit einigen Monaten täglich 2-3 g (Gramm) Marihuana konsumierte, nach der Stimulation mit  $\Delta 9$ -THC eine deutlich stärkere Fraktion an super-hydrierten Sphärozyten aufwies als eine gesunde, altersgekoppelte Kontrolle ohne bisherigen Cannabiskonsum. Flormann et al. (2022) konnten zeigen, dass diese erhöhte Reaktion nicht auf einer vermehrten Expression des TRPV2 Kanals beruht, sondern durch Veränderungen in der Sensitivität oder in den Gating-Mechanismen des TRPV2-Kanals begründet sein könnte. Beispielsweise könnte eine Störung in den Ionenpumpen vorliegen, welche als Gegenregulation fungieren, wenn es durch den TRPV2-Kanal zum Natriumeinstrom, und damit verbunden zur Wasseraufnahme in die Zellen kommt [34].

Außerdem könnte der TRPV2 Kanal eine Rolle in der Veränderung der Sauerstoffaffinität spielen. Makhro et al. (2013) beschrieb eine Regulierung der Sauerstoffaufnahme in Erythrozyten durch eine transiente Kalziumaufnahme und zeigte, dass eine geringe Erhöhung der Kalzium Konzentration die Sauerstoffbindungsaffinität des Hämoglobins in den Erythrozyten erhöht. Makhro et al. (2013) führte die Kalzium-induzierten Veränderungen in der Sauerstoffaffinität von Hämoglobin auf Konformationsänderungen im Hämoglobin zurück, wie zum Beispiel durch (De-) Protonierung. Aufbauend auf dieser Erkenntnis stellten Egée und Kaestner (2021) die Hypothese auf, eine geringe TRPV2 Aktivierung könnte stimulierend sein und vorteilhaft für eine erhöhte Sauerstoffbindungsaffinität des Hämoglobins. Denkt man diese Umstände weiter, müsste es sich um einen Kalziumeinstrom handeln, welcher zu schwach für eine Zellschwellung ist, da eine Zellschwellung zum Verlust der bikonkaven Erythrozytenform führen würde und so den Gastransport wiederum behindern würde.

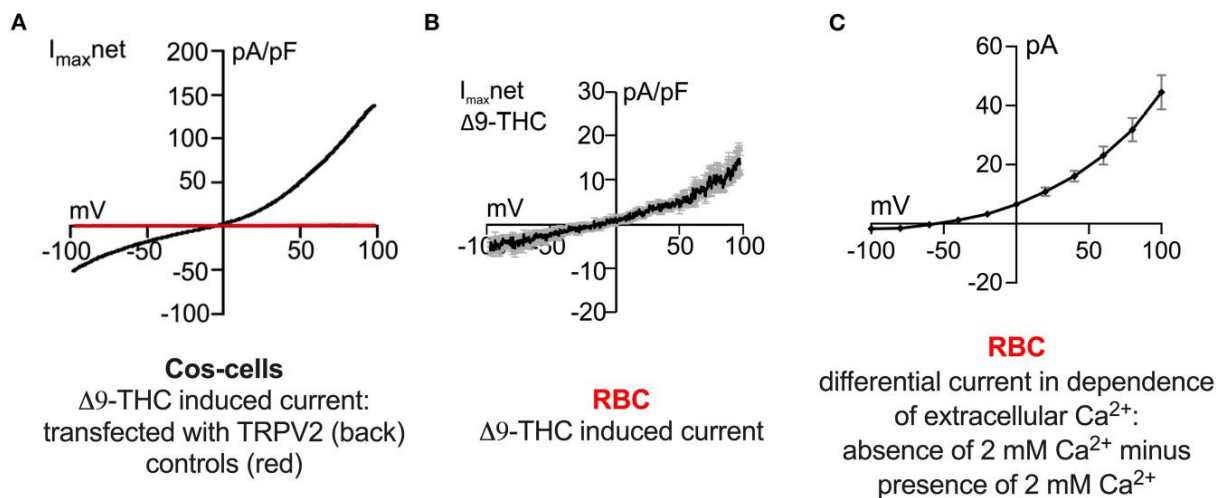
Weiterhin wird der TRPV2 Kanal für mechanosensitive Depolarisationen der Erythrozyten verantwortlich gemacht, denn auch ohne das Mitwirken anderer Kanäle, wie beispielsweise des Gárdos- Kanals, können geringe Kalziumeinströme zur Depolarisation und zur Beeinflussung der Kalziumsignalwege führen. [6,27,91]

Der TRPV2-Kanal weist große Parallelen mit einem nicht selektiven Kationenkanal in menschlichen Erythrozyten auf, welcher durch niedrige extrazelluläre Kalziumkonzentrationen aktiviert wird und somit als Kalzium-inhibierter Kanal (CiCC) betitelt wird. Er trägt möglicherweise zu den Lecks bei, die bei der Erythrozytenlagerung in Kalzium armen Lösungen zu Konzentrationsgradienten führen. Denn sowohl der TRPV2 Kanal als auch der beschriebene nicht selektive Kationenkanal zeigen trotz fehlender Bindungsstellen für Calmodulin (CaM), Adenosintriphosphat (ATP) oder Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) eine, vom extrazellulären Kalziumspiegel abhängige Desensibilisierung [85,94,95]. Um die Ähnlichkeiten im Verhalten dieser beiden Kanäle zu verdeutlichen, entwarfen Egée und Kaestner ein Schaubild (Abbildung 18). Die abgebildeten, nach



## 1 Einleitung

außen gleichrichtenden Strom-Spannungskurven sehen sich dabei sehr ähnlich, was eine Übereinstimmung von TRPV2 [6] und dem CiCC Kanal, der durch Kalziumentzug aktiviert wird, [95] nahe legt.

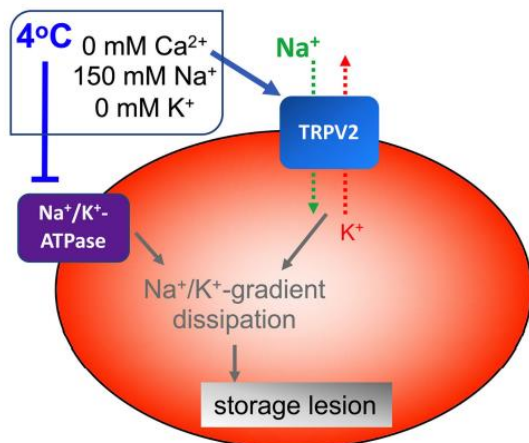


**Abbildung 18** ([27]): Vergleich des I/V- (Strom/ Spannungs-) Verhaltens von Ionenkanälen. (A) Ganzzellströme, gemessen in Cos-Zellen (Fibroblastenähnliche Zelllinien, die aus Affenierringewebe stammen), die TRPV2 überexprimieren (schwarze Kurve) und Kontrollzellen (rote Spur), beide stimuliert mit  $30\mu\text{M}$  (Mikromolar) 19-THC. Die interne Lösung enthielt (in mM): 120 Cs-Glutamat, 8 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) (HEPES), 10 Cs- (1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA), 3,1 CaCl<sub>2</sub> (entspricht 100 nM freiem  $Ca^{2+}$ ), der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,2 eingestellt und die externe Lösung enthielt (in mM): 140 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Glukose, der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt. Für die TRPV2-Stimulation wurde der externen Lösung 19-THC zugesetzt und über eine Applikationspipette direkt auf die geklammerte Zelle appliziert. Spannungsrampen von 400 ms (Millisekunden) Dauer, die einen Spannungsbereich von -100 bis 100 mV (Millivolt) abdeckten, wurden mit 0,5 Hz von einem Haltepotential von 0 mV über einen Zeitraum von 300-400 Sekunden (s) angelegt. (B) Ganzzellströme, gemessen in Erythrozyten (RBCs, red bloodcells), die mit  $30\mu\text{M}$  19-THC stimuliert wurden. Die Aufzeichnungsbedingungen waren identisch mit den in (A) beschriebenen. (C) Differenzielle Ganzzellströme, die in Erythrozyten gemessen werden, wenn 2 mM (Millimolar)  $Ca^{2+}$  aus der extrazellulären Lösung entfernt wird. Der in 2 mM  $CaCl_2$ -externer Lösung aufgezeichnete Strom wurde von dem in 0 mM  $CaCl_2$ -externer Lösung aufgezeichneten Strom subtrahiert. Die interne Lösung enthielt (in mM): 50 CsCl, 20 NaCl, 60 CsF, 5 MgATP, 10 HEPES, 20 Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,2 eingestellt, und die externe Lösung enthielt (in mM): 0 oder 2 mM  $Ca^{2+}$ , 125 Tetraethylammoniumchlorid (TEACl), 10 HEPES, 5 MgCl<sub>2</sub>, 45 Glucose, der pH-Wert wurde mit Tetraethylammoniumhydroxid (TEA-OH) auf 7,3 eingestellt. Zu beachten ist, dass Tetraethylammonium (TEA) für die meisten Kationenkanäle nicht permeabel ist und daher keine kationische Auswärtsströme (entsprechend negativen Membranpotentialen) zu erwarten sind. Aus demselben Grund wird das Umkehrpotential (Membranpotential, wenn keine Ströme auftreten - Schnittpunkt der Kurve mit der x-Achse) voraussichtlich zu negativeren Werten hin verschoben sein. Die Aufzeichnungen wurden mit Spannungsschritten von -100 bis 100 mV für 500 ms in 20 mV-Schritten in Abständen von 5 s durchgeführt, wobei das Haltepotential auf -30 mV gesetzt wurde. In (A,B) ist der Strom auf die Zellkapazität (pA/pF (Pikampere/ Pikofarad)) normiert, während in (C) die Autoren der Ansicht sind, dass die Kapazität in den planaren Chips die Kapazität die Zelloberfläche nicht korrekt widerspiegelt und daher nur den Strom pro Zelle aufzeichnet (pA). Außerdem waren die Aufzeichnungsprotokolle völlig unterschiedlich: Bei (A, B) wurden Spannungsrampen angelegt, während bei (C) diskrete Spannungsschritte aufgezeichnet wurden, um die Strom-Spannungs-Beziehung zu erstellen. Abbildungen (A,B) sind Nachdrucke aus Belkacemi et al. (2021) „The TRPV2 channel mediates  $Ca^{2+}$  influx and the  $\Delta 9$ -THC-dependent decrease in osmotic fragility in red blood cells“ mit Erlaubnis von Haematologica und (C) ist ein Nachdruck aus Petkova-Kirova et al. (2018) „A Previously Unrecognized  $Ca^{2+}$ -inhibited Nonselective Cation Channel in Red Blood Cells“ und reproduziert mit der Erlaubnis von HemaSphere.

Da dies aber noch nicht bewiesen ist, muss weiter erforscht werden, ob TRPV2 an der Entstehung der Lecks bei der Erythrozytenlagerung beteiligt ist und eventuell einen pharmakologischen Angriffspunkt darstellt, um die Lagerungsbedingungen zu verbessern [27]. Trotz dieser Ungewissheit erstellten Egée und Kaestner ein Schema des hypothetischen Beitrags von TRPV2 zum genannten Kationengradienten bei der Erythrozytenlagerung.

## 1 Einleitung

### hypothetical role of TRPV2 in RBCs during storage



**Abbildung 19 ([27]): Hypothetische Kanalaktivität in Erythrozyten während ihrer Lagerung. Das Rechteck neben dem Erythrozyten beschreibt die Hauptkomponenten typischer Lagerungsbedingung. Diese Abbildung ist ein Nachdruck aus „The Transient Receptor Potential Vanilloid Type 2 (TRPV2) Channel—A New Druggable Ca<sup>2+</sup> Pathway in Red Cells, Implications for Red Cell Ion Homeostasis“ (2021) von Egée, Kästner et al., sie wurde mit Erlaubnis des Verlags Frontiers Media reproduziert.**

Aufgrund der These, bei dem Kalzium-inhibierte Kanal (CiCC) könnte es sich um den TRPV2 Kanal handeln, möchte ich im Folgenden Abschnitt die bisher publizierten Erkenntnisse zum CiCC vorstellen.

#### 1.3.4.4 Der Kalzium-inhibierte Kanal (CiCC)

Der Kalzium-inhibierte Kanal (CiCC) blieb bis vor kurzem unentdeckt. Inzwischen gibt es aber deutliche Hinweise, dass er in menschlichen Erythrozyten exprimiert wird, so konnte er durch Patch-Clamp in Erythrozyten detektiert werden. Das Prinzip eines Kanals, welcher durch Verminderung der extrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert wird, war allerdings auch schon vor seiner Detektion bekannt. So wurde dieses Phänomen bereits für Epithelzellen von Froschhaut und Kröten Harnblasen sowie für den Darm von Hühnern und Hasen beschrieben, wo dem Kanal eine Rolle im Volumengleichgewicht zugeschrieben wird [64,95].

Den I/V- Kurven von Aufnahmen des durch Kalzium blockierten Kanals in physiologischen Lösungen sowie Lösungen auf Caesium (Cs<sup>+</sup>) und Tetraethylammonium (TEA) Basis nach zu urteilen, handelt es sich um einen spannungsunabhängigen Kanal, welcher sowohl für Caesium als auch für Natrium und Kalium permeabel ist. Die Leitfähigkeit für Kalium scheint dabei stärker zu sein als die für Natrium. Der Gesamtkationenfluss, welcher den CiCC durchströmt, wurde auf 4.3 mM/min (Millimeter pro Minute) geschätzt. Leider konnten bisher noch keine Details zum Aufbau erforscht oder funktionelle Nachweise des Kanals erbracht werden [95].

Der CiCC kommt den neusten Patch-Clamp Aufnahmen nach in fast jeder menschlichen roten Blutzelle vor. Daher stellt sich die Frage, warum er trotz reichlicher Forschung an Erythrozyten und

## 1 Einleitung

ihren Ionenkanälen so lange unentdeckt blieb. Kaestner et al. (2020) diskutierten diese Frage, und kamen zu dem Ergebnis, dass der Kanal von Wissenschaftlern mit einem Leck in der Erythrozytenmembran verwechselt worden sein könnte, da Kationen, und in besonderem Umfang auch Kalzium für die Dichtigkeit der Erythrozyten Membran von Bedeutung ist und es somit auf der Hand liegt, den Strom als ein Leck in Folge der Kationen Depletion miss zu deuten. Dies könnte Wissenschaftler vom Berichten über einen Kalzium- inhibierten Kanal abgehalten haben. Da die I-U-Kurve des Kationenstroms keinen ohmschen Verlauf zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass die Deutung als Kanal korrekt ist [64].

Eine weitere Beobachtung, die dafürspricht, dass es sich um einen Ionenkanal handelt, ist, dass durch diesen Kanal das Phänomen der Dissipation des Gradienten von einwertigen Ionen in Röhren mit konserviertem Blut erklärt würde. Möchte man Blut mit Hilfe von Kalzium-Chelatbildnern konservierfähig machen, beispielsweise um es für Patienten mit Anämie zu verwenden, muss beachtet werden, dass es zu sogenannten Lagerungsläsionen kommt. Diese beinhalten funktionelle Veränderungen sowie Veränderungen der Ionenkonzentrationen in den Erythrozyten, welche mit einem schlechteren Verlauf für die Patienten verbunden sind, die die Bluttransfusion erhalten. Viele Theorien befassen sich mit der Frage, wie es zu diesen Läsionen kommt und vor allem, wie sie verhindert werden könnten. Neben Teilerklärungen die auf Stoffwechselveränderungen, wie z.B. der verringerten Glykolyse und ATP-Produktion basieren sowie dem Verlust antioxidativer Enzyme, erhöhten Lactatspiegeln, verminderten pH-Werten und der Bildung von Vesikeln könnte die Existenz eines durch den Verlust von Kalzium aktivierten Kanal in Erythrozyten die beschriebenen Veränderungen erklären, da Kalzium Chelatbildner, wie beispielsweise Ethylendinitrilotetraessigsäure(EDTA) durch Bindung des freien Kalziums zu einer Verringerung der Kalziumkonzentration und somit zu einer Öffnung dieser Kationenkanäle führen würden. Petkova-Kirova, Hertz, Makhro, Danielczok, Huisjes, Llaudet-Planas, Mañú-Pereira, Corrons, et al. (2018) konnten zeigen, dass frisch abgenommenes Blut von gesunden Spendern in EDTA, verglichen mit dem Antikoagulans Heparin, welches die Kalziumkonzentration nicht beeinflusst, zu Veränderungen in der Natrium- und Kaliumkonzentration führt. Diese Veränderungen sind mit der Aktivierung des CiCC in Einklang zu bringen. Weiterhin konnten sie zeigen, dass der für den Kationenkanal geschätzte Fluss einwertiger Kationen von 4.3mM/min in Größe und Zeit übereinstimmt mit dem Ungleichgewicht in der Kationenkonzentration, welche kurz nach den Blutentnahmen gemessen wurden [33,95].

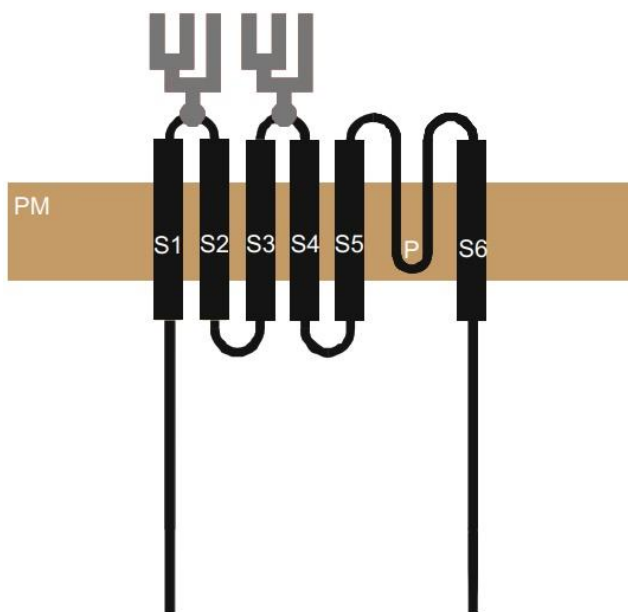
Falls sich die beschriebene Hypothese weiterhin als korrekt erweist wäre in Bezug auf die Lagerungsläsionen von weitreichenden Konsequenzen auszugehen, wie beispielsweise frühen Veränderungen der Morphologie der Erythrozyten, der verstärkten Zellschädigung und der Exposition von Phosphatidylserin mit folgender Phagozytose der Erythrozyten. Diese Erkenntnis wäre weiterhin für die Prävention der Schäden der Blutkonserven erfolgsversprechend, denn statt den Kalzium Chelatbildnern könnte zur Antikoagulation beispielsweise Heparin genutzt werden, welches statt mit

## 1 Einleitung

Kalzium mit Antithrombin 3 interagiert. Bisher waren Chelatbildner wie EDTA und Citrat beliebte Antikoagulantien, da sie über den Entzug von Kalzium aus der Lösung zur Verminderung der Proteolyse beitragen und eventuell auch positiven Effekt auf die Verminderung der Gárdos- Kanal Aktivität haben. Außerdem tragen sie zu Erhaltung der erythrozytären Hydratation und Erhalt des ATP-Spiegels bei. In Anbetracht ihrer Aktivierung des CiCC könnte die Abwägung zwischen Nutzen und Nachteil allerdings anders ausfallen[95].

### 1.3.4.5 Der Transiente Rezeptorpotential Kanal 6 (TRPC6)

Weiterhin möchte ich den „Transienten Rezeptorpotential Kationen Kanal 6“ (TRPC6) vorstellen, der wie der TRPV2 zur Familie der TRP Kanäle gehört, aber nicht zur Untergruppe der TRPV Kanäle (Vanilloid Rezeptor Kanal, Unterfamilie der TRP-Kanäle), sondern zur Gruppe der TRPC Kanäle. Die verschiedenen Untergruppen vereint das Vorliegen von sechs Transmembrandomänen mit einer Pore zwischen Segment fünf und sechs Abbildung 20. Sie sind jeweils als Tetramere aufgebaut und haben ein N- und ein C- Terminus. In der Struktur der N- und C- Termini liegt der größte Unterschied der verschiedenen Untergruppen zueinander. Die TRPC- Gruppe vereint sieben verschiedene Rezeptoren, von denen vier auch in Säugetieren vorkommen. Dazu gehören TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5[22,66].



**Abbildung 20 ([22]): Topologie von TRPC6 in der Plasmamembran (PM) mit Angabe der Transmembranbereiche (S1-S6) und der vorhergesagten Porendomäne (P). Zwei glykosylierte Stellen in TRPC6 sind durch kovalent gebundene Kohlenhydrate gekennzeichnet (in grau).**

**Diese Abbildung ist ein Nachdruck aus „TRPC6: Physiological Function and Pathophysiological Relevance“ von Dietrich, Gudermann et al. (2014), sie wurde reproduziert mit der Erlaubnis von Springer Nature.**

Sowohl TRPC3 als auch TRPC6 wurden auf erythroiden Vorläuferzellen nachgewiesen [54], aber nur für TRPC6 gibt es ernst zu nehmende Hinweise darauf, dass er auf den Membranen von menschlichen Erythrozyten vorkommt [6,61]. Zum Beispiel deutete Ergebnisse von Immunoblots gegen TRPC6 auf

## 1 Einleitung

dessen Proteinexpression in menschlichen Erythrozyten hin [35]. Daher werde ich mich im Folgenden auf den TRPC6- Kanal konzentrieren.

Auch Hertz et al. (2023) erfassten sich mit der möglichen Expressierung von TRPC6 auf menschlichen Erythrozyten. Da sie TRPC6 genetisch nicht in Erythrozyten von Menschen nachweisen konnten, aber ihre Experimente zur TRPC6 Funktion ein Vorhandensein dieses Kanals nahelegten, stellten sie die These auf, TRPC6 könnte von Extern in die Erythrozyten aufgenommen werden [53]. Hertz et al. (2023) konnten durch Transfusion von TRPC6-Knock-out Erythrozyten in Wildtyp-Mäuse eine sogenannte „TRPC6-Rettung“ zeigen. Weitere Experimente mit definierter mechanischer Beanspruchung von Erythrozyten durch den Probenarm eines Rasterkraftmikroskops und gleichzeitiger Beobachtung dieser durch ein Konfokalmikroskop zeigten die Formation von Membranschläuchen. Diese Beobachtungen unterstreichen ihre These der mechanisch stimulierten Aufnahme von TRPC6 in den Erythrozyten. Dies könnte sich nach Hertz et al. (2023) beispielsweise in der Milz abspielen, in welcher die Erythrozyten einem enormen mechanischen Druck ausgesetzt sind. Sollte der beschriebene Mechanismus des Proteintransfers sich in weiteren Studien bestätigen, wäre dies ein wichtiger neuer Angriffspunkt für die medikamentöse Therapie von hereditären Erythrozytenkrankheiten, wie beispielsweise der Xerocytose oder Gárdos- Channelopathy[53].

Neben dem potenziellen Vorkommen von TRPC6 in Erythrozyten und der nachgewiesenen TRPC6 Expression in erythroiden Vorläuferzellen ist der Rezeptor fast ubiquitär im menschlichen Körper zu finden, wo TRPC6 verschiedenen Funktionen nachgeht. So ist es zum Beispiel in glatten Muskelzellen zusammen mit spannungsaktivierten Kalziumkanälen maßgeblich an der Kontraktion beteiligt, in Neuronen dient er dem Schutz vor Ischämien und in den Nieren ist er ein wichtiger Bestandteil der Schlitzmembranen der Podozyten. Besonders stark ist die TRPC6 Expression im Menschen in der Lunge, der Plazenta, den Eierstöcken und der Milz [22,66].

Die Tetramere von TRPC6 können innerhalb der Grenzen der TRPC3/6/7-Subfamilie sowohl heterolog als auch homolog exprimiert sein. Dabei zeigen heterolog exprimierte Kanal-Homotetramere eine doppelt gleichrichtende Strom- Spannungs- Beziehung mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 28-37 Pikosiemens (pS). Weiterhin können sie mit anderen Adaptorproteinen in supramolekularen Signalkomplexen angeordnet sein, welche Signalplexe genannt werden.[22]

Für die Struktur von TRPC6 sind außerdem zwei Glykosylierungsstellen in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife von Bedeutung, welche eine Rolle spielen in der Steuerung des TRPC6-Rezeptors. Mutationen in einer der Glykosylierungsstellen können zu einer erhöhten Kanalaktivität führen. Außerdem besitzt TRPC6 zwei Kalzium- Calmodulin abhängige Kinase 2 Phosphorylierungsstellen und eine "Coiled-Coil"-Domäne 3 zu TRP- und Calmodulin binding/inositol 1,4,5-triphosphate receptor binding site (CRIB) -Domänen, über welche die Kanalaktivität gesteuert werden kann [21,22,54].

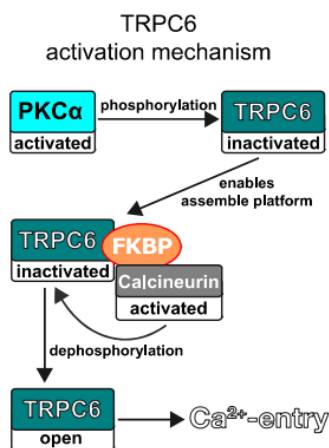
## 1 Einleitung

TRPC6 ist Teil einer Signalkaskade, welche in gesunden Erythrozyten, sowie in Erythrozyten von Patienten mit Sichelzellanämie (SCD) zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium Konzentration führt. In den Erythrozyten von Patienten mit SCD ist der Kalziueinstrom besonders hoch und Teil des Pathomechanismus, welcher zu vaso-okklusiven Krisen führen kann [120].

Die Signalkaskade startet mit der Aktivierung eines Lysophosphatsäure (LPA) Rezeptors durch Lysophosphat, welche zur Aktivierung eines  $G\alpha_i$  Rezeptors führt. Über die Aktivierung der Phospholipase  $C_\beta$ , von PIP2 und Diacylglycerol (DAG) wird die Proteinkinase  $C\alpha$  ( $PKC_\alpha$ ) aktiviert, diese führt durch Phosphorylierung des TRPC6 Rezeptors zur Inaktivierung desselben [122].

Experimente der Arbeitsgruppe von Wang et al. (2021) deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung und Inaktivierung von TRPC6 die Bindung von Immunophilin Peptidyl-Propyl cis-trans-Isomerase (FKBP12) an diesen ermöglicht.

Dies könnte zur Bildung eines Multiprotein Komplexes mit Calcineurin und Calmodulin führen, wodurch Calcineurin TRPC6 phosphorylieren und diesen somit aktivieren würde [68].



**Abbildung 21 ([122]): Aktivierungsmechanismus von TRPC6 durch  $PKC_\alpha$ .**

Diese Abbildung ist ein Nachdruck aus „Lysophosphatidic Acid-Activated Calcium Signaling Is Elevated in Red Cells from Sickle Cell Disease Patients“ von Wang, Hertz et al. (2021), sie wurde reproduziert mit der Erlaubnis von MDPI.

Experimente mit dem FKBP12 Inhibitor Tacrolimus (FK506) und dem Calcineurin Inhibitor CyclosporinA (CsA), sowie weitere Experimente mit dem spezifischen PKC alpha Inhibitor (12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]Carbazol) (Gö6976) unterstützen diese Theorie [122].

Eine schematische Darstellung der gesamten Signalkaskade ist in Abbildung 22 zu sehen.

## 1 Einleitung

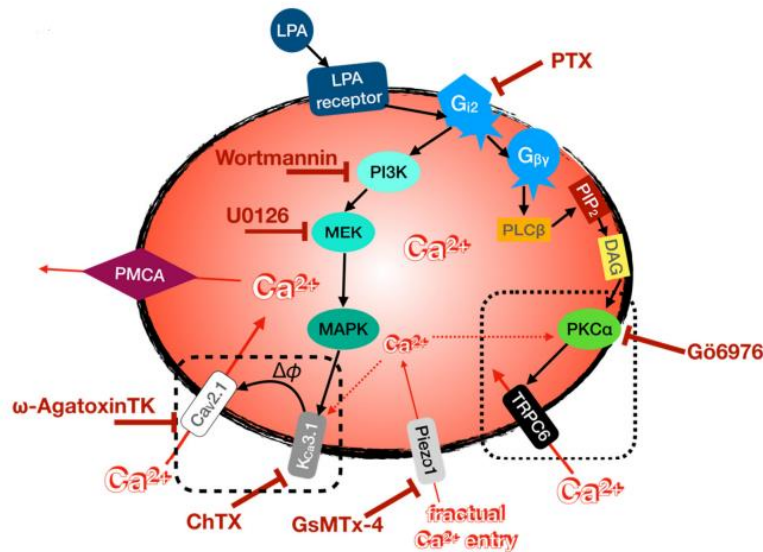


Abbildung 22 ([122]): Überblick über die hypothetische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalkaskade inklusive pharmakologischer Mittel zur Untersuchung der Erythrozyten.

Diese Abbildung ist ein Nachdruck aus „Lysophosphatidic Acid-Activated Calcium Signaling Is Elevated in Red Cells from Sickle Cell Disease Patients“ von Wang, Hertz et al. (2021), sie wurde reproduziert mit der Erlaubnis von MDPI.

Neben dem hier beschriebenen Weg, scheint es noch einen weiteren Weg derselben Signalkaskade zu geben. Dieser hat denselben Startpunkt, führt jedoch über die Aktivierung des Gárdos- Kanals zum Kalziueinstrom durch  $\text{CaV}2.1$ . Er soll hier der Vollständigkeit halber Erwähnung finden und ist auch in Abbildung 22 zu sehen, beinhaltet aber keine Aktivierung von TRPC6 [122].

Verschiedene Experimente und Studien zeigen, dass TRPC6 einen Beitrag zum Kationenleck der Erythrozytenmembran leistet, welcher als sensitiv auf Amilorid und (Ethylisopropylamilorid; 3-Amino-N-8aminoiminomethyl)-6-chlor-5-[ethyl(1-methylethyl)amino]-2-pyrazincarboxamid) (EIPA) identifiziert wurde[35].

Außerdem konnte seine Rolle im stressinduzierten programmierten Zelltod der Erythrozyten gezeigt werden, welcher eine kolloidosmotische Hämolyse verhindert. Dabei werden Kalzium- durchlässige Kationenkanäle wie TRPC6 durch abnehmende intra- und extrazelluläre Chloridionenkonzentrationen, oxidativen Stress, die Verarmung von Glukose sowie durch hyperosmotischen Schock aktiviert. Außerdem wird die Aktivierung durch Prostaglandin E2 stimuliert, welches von den Erythrozyten selbst produziert werden kann. Auf eine Aktivierung dieser Kanäle folgt ein Kalzium Einstrom, der durch einen steilen, einwärtsgerichteten elektrochemischen Gradienten angetrieben wird. Da das Zytosol der Erythrozyten nur über eine geringe Pufferaffinität für Kalzium verfügt kommt es schnell zu einem starken Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, auch wenn TRPC6 eine sehr geringe Basalaktivität hat. Bei einer übermäßigen Kanalaktivierung ist die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration so hoch, dass sie Calpain aktiviert, eine Protease, die das Zytoskelett zersetzt. Weiterhin wird durch die hohe Kalziumkonzentration eine Scramblase aktiviert, welche Phosphatidylserin (PS) vom inneren Membranblatt der Lipiddoppelschicht an das äußere



## 1 Einleitung

Membranblatt transportiert, wodurch es zur Zerstörung der Zellmembran kommt. Da Makrophagen PS- Rezeptoren exprimieren, können sie die betroffenen Zellen erkennen und aus dem Blutkreislauf eliminieren. Gleichzeitig kommt es durch die erhöhte Kalziumkonzentration zur Aktivierung Kalziumsensitiver Kanäle, wie beispielsweise dem Gárdos- Kanal, welcher zu einer Hyperpolarisation der Membran führt und somit Chlorid und Kalium sowie Wasser aus der Zelle ausströmt. Dadurch schrumpft der Erythrozyt, was über eine Aktivierung der Sphingomyelinase und der darauffolgenden Bildung von Ceramid auch zu einer Phospholipidverschiebung führt, welche als Erkennungssignal für die Makrophagen fungiert. Wichtig ist, dass auch schon TRPC6 unabhängiger PS Transport beobachtet wurde, welche möglicherweise durch eine Sphingomyelinase- Aktivierung zu Stande kommt, der eine Kalziumerhöhung durch andere Kanäle zugrunde liegt. Patch-Clamp Aufnahmen zeigten auch andere Kalzium- permeable Kationenkanäle in menschlichen Erythrozyten. Dass TRPC6 trotzdem eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Erythrozytenvolumens, der PS- Exposition und damit der Eryptose spielt wurde durch Experimente deutlich, welche zeigten, dass Chlorid- Depletion bei einem signifikant höheren Prozentsatz der Wildtyp Erythrozyten eine PS- Exposition auslöst als bei TRPC6  $-/-$  Erythrozyten. Außerdem schrumpften TRPC6  $-/-$  und TRPC6  $+/+$  Erythrozyten bei Chloridverarmung in verschiedenem Ausmaß [6,35].

Da TRPC6 Kalzium-permeabel ist, hat es Bedeutung in der Signalweiterleitung durch Kalzium und beeinflusst somit grundlegende Vorgänge in Zellen wie z.B. die Sekretion, Mobilität, Kontraktion, Zellteilung und wie bereits detaillierter erläutert den programmierten Zelltod der Erythrozyten [66].

In erythroiden Vorläuferzellen hemmt es die durch Erythropoietin (EPO) vermittelte Steigerung der Expression von TRPC3 auf der Zelloberfläche sowie dessen Kalziumleitfähigkeit durch direkte Interaktion mit TRPC3. Dabei scheinen TRPC3 und TRPC6 endogen verbunden zu sein. TRPC6 selbst ist dabei nicht durch EPO beeinflussbar, da es im C-Terminus andere Domänen exprimiert und dadurch die Bindung von TRPC6 an den EPO- Rezeptor erschwert ist. Während der Zelldifferenzierung nimmt die Expression von TRPC6 ab und die von TRPC3 zu, dadurch kommt es bis zu einem späten Zeitpunkt in der Zelldifferenzierung, an dem die Anzahl der EPO- Rezeptor herunterreguliert wird, kontinuierlich zu einer Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration als Reaktion auf die Stimulierung durch EPO. Auf Grundlage dieser Beobachtungen ist möglicherweise zu schlussfolgern, dass die Veränderungen im Expressionsverhältnis von TRPC6 und TRPC3 eine Rolle spielen für die regelrechte Entwicklung der erythroiden Vorläuferzellen. Ähnliche Veränderungsmuster der Expression von den beiden TRPC Isoformen wurde im Kleinhirn von Ratten gefunden und auch in Monozyten spielt die Entwicklung des TRPC3/TRPC6 Verhältnisses für Regulationsprozesse eine Rolle [54].

Neben physiologischen Funktionen hat der TRPC6 auch in der Pathophysiologie Relevanz. Beispielsweise ist der TRPC6 Rezeptor an der Proliferation von menschlichen Gliomzellen, sowie an der Entstehung der



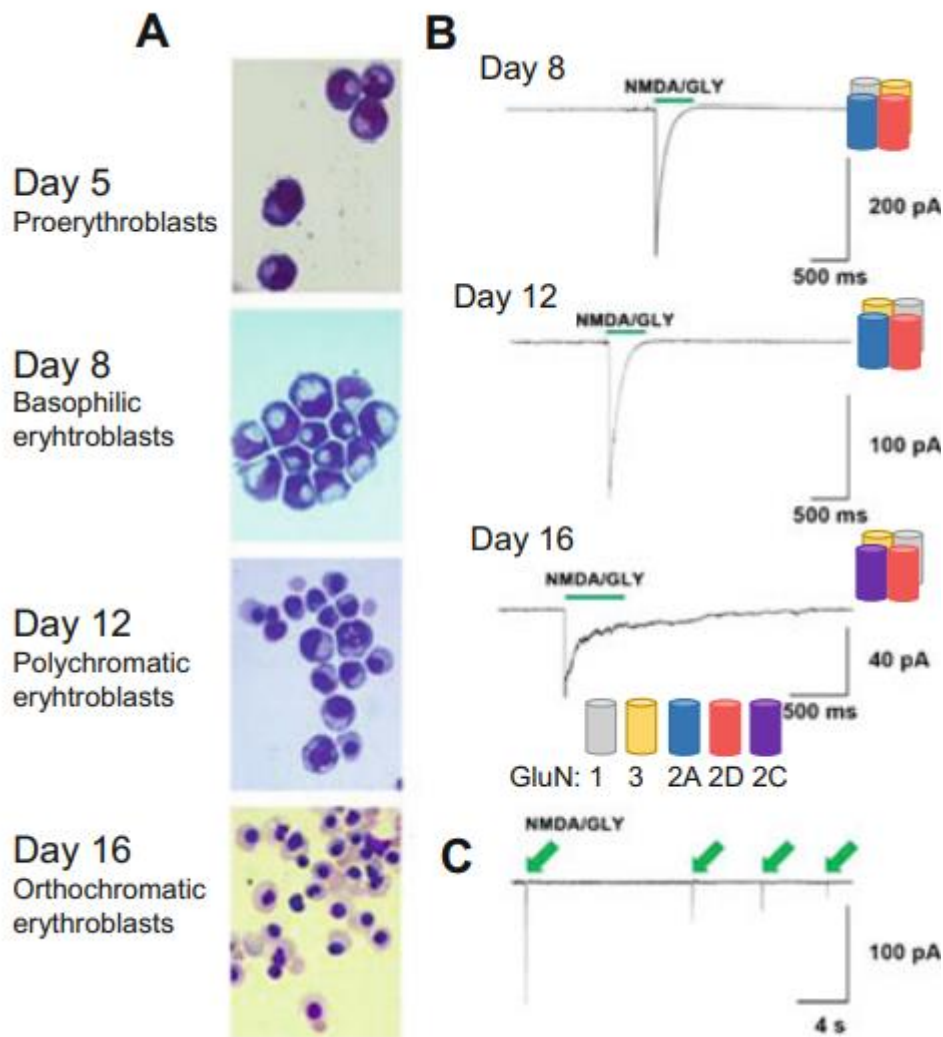
## 1 Einleitung

Alzheimer- Krankheit beteiligt [66]. Weiterhin sind verschiedene Gain-of-function Mutationen des TRPC6-Rezeptors bekannt, welche zum Beispiel mit Proteinurie in Verbindung gebracht werden [22].

### *1.3.4.6 Der N- Methyl- D- Aspartat- Rezeptor*

Der N- Methyl- D- Aspartat (NMDA-) Rezeptor ist, wie weiter oben bereits beschrieben, ein ionotroper, nicht selektiver Glutamat- Rezeptor, der in verschiedenen Geweben vorkommt. Zu diesen gehören erythroide Vorläuferzellen und zirkulierende Erythrozyten, sowie das Gehirn, die Nieren und Knochen. Ich möchte mich in diesem Abschnitt auf die NMDA- Rezeptoren in den Membranen von Erythrozyten und ihren Vorläuferzellen konzentrieren. Menschliche, erythroide NMDA-Rezeptoren sind Heterotetramere, welche aus NR1, NR2A, 2C, 2D, NR3A und 3B-Untereinheiten aufgebaut sind und sich somit vom Aufbau der neuronalen NMDA-Rezeptoren unterscheiden. Die verschiedenen Untereinheiten haben unterschiedliche Funktionen: Die Untereinheiten NR1 und NR3A und -B können Glycin oder D-Serin binden, wohingegen über die Untereinheiten NR2A, B, C und D die Interaktion mit Glutamat, Homocystein, Homozysteinsäure (HCA) und NMDA abläuft. Dabei ist zu beachten, dass im Laufe der Zelldifferenzierung zu Erythrozyten sowohl die Zusammensetzung der einzelnen Rezeptoruntereinheiten (Abbildung 23) variiert, als auch die NMDA-Rezeptordichte. So kommen zu Beginn der Erythropoese deutlich mehr Rezeptoren pro Zelle vor (ca. 1000 Rezeptoren pro Proerythroblast), als gegen Ende (ca. 30 Rezeptoren pro Retikulozyt und ca. 5 pro Erythrozyt) [64,80].

## 1 Einleitung



**Abbildung 23** ([64]) **Struktur und Funktion von NMDA-Rezeptoren.** (A) Erythroide NMDA-Rezeptoren werden früh in differenzierenden erythroiden Vorläuferzellen exprimiert, angefangen von Proerythroblasten (CD34 + -abgeleitete Zellen am 5. Tag in Kultur) bis zu orthochromatischen Erythroblasten (16. Tag in Kultur). (B) Elektrophysiologische Aufzeichnungen von Strömen, die durch die Behandlung dieser Zellen mit den Agonisten NMDA und Glycin vermittelt werden, zeigen die Veränderung der Untereinheitenzusammensetzung des Rezeptors während der Differenzierung. Während Proerythroblasten und polychromatische Erythroblasten mit Rezeptoren ausgestattet sind, die aus Glycin-bindenden GluN1- und 3A/B- Untereinheiten und Glutamat/NMDA-bindenden GluN2A- und 2D-Untereinheiten bestehen, ist bei den in späten orthochromatischen Erythroblasten und Retikulozyten enthaltenen Rezeptoren, GluN2A durch GluN2C ersetzt. Dies hat zur Folge, dass Kanäle mit hohen Stromamplituden und kurzen Zeiten bis zur Inaktivierung in frühen Vorläuferzellen vorkommen und langsam inaktivierende Kanäle mit geringerer Amplitude in späten Vorläuferzellen und zirkulierenden Erythrozyten. (C) Die wiederholte Aktivierung von extrasynaptischen N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (eNMDARs) löst eine Inaktivierung der Kanäle aus. Diese Abbildung ist ein Nachdruck aus „Calcium Channels and Calcium-Regulated Channels in Human Red Blood Cells“ von Kaestner, Bogdanova, Egée et al. (2020), sie wurde reproduziert mit der Erlaubnis von Springer Nature.

Auch die Stromamplituden und Inaktivierungszeiten der Kanäle unterliegen im Verlauf der Differenzierung Veränderungen. Aus den GluN2A/2D- haltigen Rezeptoren der Proerythroblasten mit hoher Stromamplitude und kurzer Inaktivierungszeit werden in den Erythroblasten und Retikulozyten GluN2C/ 2D- haltige Rezeptoren mit geringerer Stromamplitude und verlängerter Inaktivierungszeit. Das hängt damit zusammen, dass die Zusammensetzung der Untereinheiten die Öffnungseigenschaften und die Ionen-Präferenzen bestimmt, sowie die Affinitäten zu Agonisten und Antagonisten [64,80].

## 1 Einleitung

Einer Hypothese von Kaestner et al. (2020) zufolge, kommt der Verlust der NMDA-Rezeptoren während der Zelldifferenzierung durch das Abschnüren der Rezeptoren und anderen Membranproteinen zu Vesikeln zustande, die dann aus der Membran freigesetzt werden [64].

Beim NMDA-Rezeptor handelt es sich um einen Liganden gesteuerten Glutamat-Rezeptor. Dadurch, dass Glutamat beispielsweise bei Ausdauerübungen und von Megakaryozyten freigesetzt wird, unterliegt die Aktivität des NMDA-Rezeptors verschiedenen physiologischen Faktoren und schwankt je nach körperlicher Verfassung, Bewegung, Geschlecht, Ernährung und Alter[64,80].

Neben Glutamat reagiert der NMDA-Rezeptor auch sensitiv auf Glycin, NMDA und HCA, wodurch sich diese Substanzen sehr gut zur experimentellen Modulation des Rezeptors, in diesem Falle als Agonisten, eignen. Als porenblockierender Antagonisten können Dizocilpin (MK-801) und Memantin genutzt werden. Bei experimenteller Änderung der Rezeptoraktivität kann beobachtet werden, dass die Erythrozyten und ihre Vorläuferzellen je nach Differenzierungsstadium und damit je nach Aufbau unterschiedlich stark auf die Modulatoren reagieren [64,80,81].

Außer der Aktivierung durch Liganden berichtete Danielczok et al. (2017) von einer Mechanosensitivität des NMDA- Rezeptors und Makhro et al. (2013) von einer Empfindlichkeit bei Aktivierung der Phospholipase C–Inositol-3- Phosphat-Kinase Signalkaskade. Letzteres bedeutet, dass der NMDA-Rezeptor Ziel der regulatorischen Proteinkinase C- induzierten Phosphorylierung ist [82,125].

NMDA-Rezeptoren gehören zu den nicht-selektiven Kationenkanälen, haben aber eine zehnfach stärkere Präferenz zu Kalzium verglichen mit Natrium und Kalium. Dadurch spielen sie eine Rolle bei der Kalzium-gesteuerten Signalübertragung während der erytroiden Differenzierung.

Die Rezeptorhäufigkeit und -aktivität in den Zellmembranen korreliert hierbei mit den intrazellulären Kalziumspiegeln.

Dabei scheinen die NMDA-Rezeptoren während der Zelldifferenzierung eine überlebenswichtige Rolle zu spielen, besonders in den Proliferationsstadien der burst- forming units erythroid (BFU-E) und colony- forming units erythroid (CFU-E) [64,80].

Durch Aktivierung des NMDA-Rezeptors kommt es unter anderem zu einer vorübergehenden Kalzium-Akkumulation, welche zur Aktivierung des oben beschriebenen Gárdos- Kanals und damit zur Schrumpfung der Erythrozyten führt. Der Wasserverlust der Erythrozyten bei der Zellschrumpfung führt zu einem zeitweisen Anstieg der intrazellulären 2,3-Bisphosphoglycerinsäure (2,3-DPG) und ATP- Konzentration.

Die erhöhte 2,3DPG-Konzentration könnte entscheidend sein für eine weitere Beobachtung nach NMDA-Rezeptoraktivierung: In Anwesenheit von 2,3-DPG induziert eine erhöhte Kalziumkonzentration die Verschiebung der Protonierung des Hämoglobins und damit eine intrazelluläre Übersäuerung. In Abwesenheit von 2,3- DPG bleibt der pH- Wert konstant. Die

## 1 Einleitung

Abnahme des pH-Wertes führt wiederum zu einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. Dies könnte durch eine 2,3-DPG abhängige Stabilisierung des Hämoglobins im T-Zustand und einer damit verbundenen erleichterten Sauerstoffabgabe begründet sein. Somit ist der NMDA-Rezeptor indirekt an der Regulierung der Sauerstoffbindung beteiligt. Aber ebenso wie schon für die pH Verschiebung beschrieben ist auch die Sauerstoffaffinität in Abwesenheit von 2,3-DPG unempfindlich gegenüber steigenden Kalziumspiegeln [80].

Weiterhin erwähnenswert ist, dass die durch den NMDA-Rezeptor erhöhten Kalziumkonzentrationen über die Aktivierung der Nikotinamadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) und der Stickstoffmonoxid-Synthase zu oxidativem Stress führen und somit den Erythrozyten schaden können. Um dies zu verhindern und die intrazelluläre Kalziumkonzentration auf einem unschädlichen Niveau zu halten, befördert die Plasmamembran Kalzium-Pumpe (PMCA) aktiv Kalziumionen aus den Erythrozyten. Einen weiteren Faktor zur Kontrolle des Kalziumeintritts stellt die geringe passive Permeabilität der Plasmamembran für Kalzium dar [80].

Trotz dieser Kontrollmechanismen existieren verschiedene Krankheiten, welche mit einer Erhöhung der intrazelluläre Kalziumkonzentration assoziiert sind. Beispiele sind die Thalassämie und die Sichelzellerkrankheit [80].

Die Sichelzellanämie (SCA) ist eine autosomal rezessiv vererbliche Hämoglobinopathie, welcher eine Punktmutation zugrunde liegt, die zu einer veränderten Bildung des Hämoglobins führt. Die Krankheit ist charakterisiert durch Episoden, in welchen es zu einer Sichelung der Erythrozyten verbunden mit einer Hämoglobinkristallisation kommt, was wiederum zu einer vaso-okklusiven Krise führen kann [79].

Es wird diskutiert, dass die desoxygenierungs- induzierte Sichelbildung durch einen Einstrom von Kalzium getriggert wird, dessen Eintrittspfad  $P_{\text{sickle}}$  genannt wird. Während der symptomatischen Desoxygenierungsperioden sei  $P_{\text{sickle}}$  aktiv, denn er werde durch Kontakt der Erythrozytenmembranen mit Hämoglobin S (HbS)- Polymeren aktiviert. Danach komme es zur Deaktivierung der beteiligten Kanäle und die Kalzium-ATPase reguliere das Kalziumlevel wieder herunter. Die molekulare Identität der Kanäle, die Teil des  $P_{\text{sickle}}$  sind ist nicht geklärt, allerdings gibt es Hypothesen, welche unter anderem dem NMDA-Rezeptor eine Mitwirkung zuschreiben [8,39,80,111].

Dieser Theorie liegen verschiedene Beobachtungen zugrunde.

Zum Beispiel weisen Erythrozyten von SCA- Patienten eine abnormal erhöhte Fülle und Aktivität von NMDA- Rezeptoren in ihrer Membran auf. Dieser Rezeptorreichtum ist sowohl während der asymptomatischen Perioden zu beobachten als auch während der hämolytischen Krisen, nimmt aber während der letztgenannten noch weiter zu.

Dadurch liegen die intrazellulären Kalziumspiegel der Erythrozyten von Patienten mit SCA viel höher als diejenigen gesunder Erythrozyten. Dies ist von besonderer Relevanz, da der Grad der Sichelung

## 1 Einleitung

mit dem intrazellulären Kalziumlevel korreliert. Grund dafür ist, dass durch die Desoxygenierung die Kalziumaufnahme in die Zellen gefördert wird und außerdem die Freisetzung von ionisiertem Kalzium aus intrazellulären Proteinen durch die Reduktion der Pufferkapazität getriggert wird. Zum anderen führen erhöhte Kalziumspiegel zu einer Öffnung des Kalzium-sensitiven Gárdos-Kanals und anderer Anionen-Kanäle, welche über den Ausstrom von Wasser und verschiedenen Ionen Einfluss auf das Erythrozytenvolumen nehmen [8,64].

Ein weiteres Argument für die Rolle von NMDA-Rezeptoren im  $P_{\text{sickle}}$  ist, dass verschiedene Studien zeigen, dass der Kalziumeinstrom in die Erythrozyten nicht nur von der Hämoglobin-Desoxygenierung abhängt, sondern auch von der Anwesenheit der NMDA-Rezeptor-Agonisten Glycin und Glutamat, sowie von Scherstress [8,51,116].

Außerdem kann die mechanosensitive Dehydrierung und Sichelung der Sichelzellen durch die NMDA-Rezeptorantagonisten Memantin und MK-801 verhindert werden, was die These weiter unterstützt [8,51].

### 1.3.4.7 *Der spannungsabhängige Anionenkanal (voltage dependent anion channel; VDAC)*

Ein weiterer wichtiger Kanal, der in der menschlichen Erythrozytenmembran vorkommt, ist der spannungsabhängige Anionenkanal, genannt VDAC (voltage dependent anion channel). Lange Zeit war sein Vorkommen in Erythrozyten unerforscht und der VDAC war ausschließlich als mitochondriale Pore in der Leber und als Komponente von Synaptosomen im Gehirn bekannt. Aktuelle Studien weisen das Vorhandensein in der Plasmamembran jedoch eindeutig nach [10,41,111].

Beim VDAC handelt es sich um ein Protein mit gut konservierten strukturellen und funktionellen Eigenschaften, obwohl es mit verschiedenen Sequenzen vorkommt. Beschäftigt man sich mit dem VDAC in den Erythrozytenmembranen ist es wichtig zu beachten, dass die meisten Studien nicht an erythrozytären VDACs durchgeführt wurden, sondern an mitochondrialen Proteinen und meist mithilfe künstlicher Rekonstitution, sodass die Ergebnisse zu den verschiedenen VDA-Kanälen nicht immer auf alle anderen Kanäle der Familie übertragbar sind. Dies wird durch die Tatsache deutlich, dass es bei Säugetieren drei verschiedene Isoformen des VDAC gibt: VDAC1, VDAC2 und VDAC3. Die am besten untersuchte Isoform ist VDAC1. In Erythrozyten kommt hauptsächlich VDAC3 vor und unterscheidet sich in mehreren Merkmalen von VDAC1, wie z.B. in der Kinetik, den Gating-Mechanismen und den Permeabilitätseigenschaften [102,111].

Außerdem ist VDAC in verschiedenen Oligomierzuständen zu finden, so existieren Monomere, Dimere aber auch Hexamere und andere Formen. Auch die verschiedenen Isoformen können in jeweils mehreren Zuständen vorkommen, so zeigt die Rasterkraftmikroskopie von VDAC1 die Präsenz von VDAC1-Monomeren, -Dimeren und auch von größeren VDAC1-Oligomeren. Die Dimerform scheint bei VDAC1 zu dominieren [64].

## 1 Einleitung

Die Leitfähigkeit und Selektivität des VDAC sind, wie der Name schon sagt spannungsabhängig. Liegen niedrige Spannungen vor zwischen -10 mV und +10mV ist der Kanal in einem stabilen offenen Zustand. Wichtig ist, dass obwohl das Ruhemembranpotential der Erythrozyten bei ca. -10 mV liegt und damit in Bereichen, die schlussfolgern lassen, der VDAC der Erythrozytenmembranen sei offen, der Kanal unter diesen Bedingungen meist trotzdem geschlossen ist. Das ist durch zusätzliche, spezifische Gating-Mechanismen zu erklären. Dabei scheint die Anwesenheit von menschlichem Plasma und verschiedenen darin enthaltenen Bestandteilen eine Rolle zu spielen, die wiederum physiologischen Prozessen unterliegen können. Details zu diesen Gating-Mechanismen müssen noch weiter erforscht werden. [41,55,111].

Der beschriebene Offenzustand bei niedrigen Potentialen ändert sich außerdem bei stärker positiven oder stärker negativen Potentialen, wie beispielsweise Werten größer als -40 mV oder auch +40 mV: Unter diesen Bedingungen zeigt der VDAC verschiedene Zustände der Permeabilität, der Selektivität und auch der Schließkinetik. Dabei korreliert die Häufigkeit des Kanalschlusses positiv mit dem Anstieg der Membranspannung.

In Bezug auf die Veränderungen der Permeabilität lässt sich festhalten, dass bei niedrigen Potentialen sowohl kleine Ionen wie Natrium, Kalium und Chlorid die spannungsabhängigen Anionenkanäle passieren können, als auch große Anionen (wie Glutamat und ATP) und große Kationen (wie beispielsweise Dopamin, Acetylcholin und Tris). Die Leitfähigkeit für Anionen ist allerdings bei gleicher Mobilität der Ionen mit einem Verhältnis von 2:1 der Leitfähigkeit für Kationen überlegen. Anders ist es bei höheren Membranpotentialen mit niedrigeren Leitwerten: Hier besteht eine erhöhte Permeabilität für kleine Ionen, mit Präferenz für Kationen statt für Anionen [43,64].

In Bezug auf die Kalziumleitfähigkeit des VDACs ist wichtig, dass der VDAC1 eine sehr niedrige Leitfähigkeit hat, verglichen mit Chlorid (ca. 1: 19). Er kann aber dennoch innerhalb kürzester Zeit zu einem enormen Kalziumeinstrom in die Zelle führen, da ein sehr starker elektrochemischer Gradient zwischen Intra- und Extrazellularraum besteht. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der VDAC in seiner Dimerform leitfähiger für Kalzium ist als in anderen Formen [41,64].

Neben der Membranspannung kann der VDAC auch durch andere Modulatoren beeinflusst werden. Glutamat kann beispielsweise in hoher Konzentration Einfluss auf die Kanalleitfähigkeit nehmen und so die Glockenform der Spannungsabhängigkeit verändern [41].

## 1 Einleitung

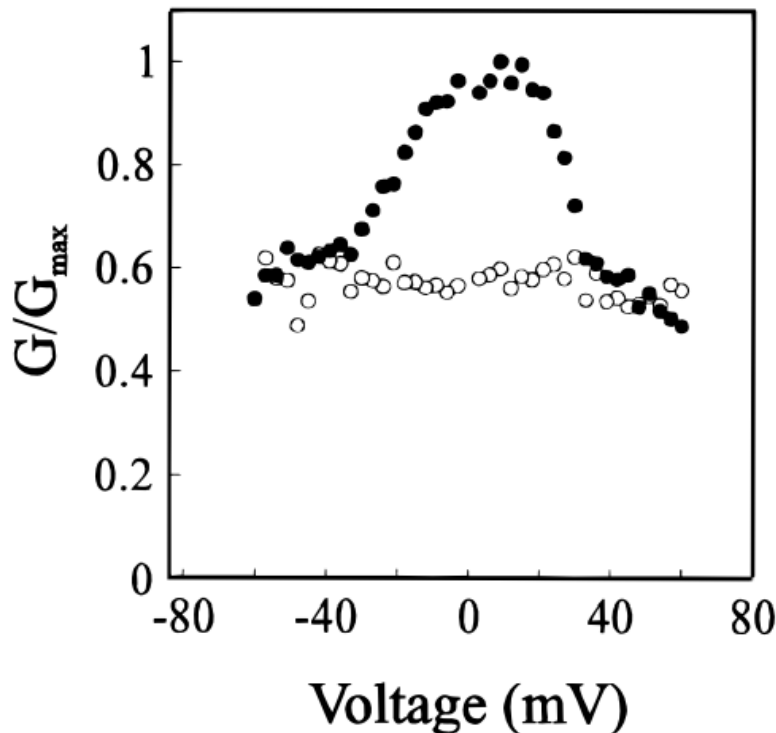


Abbildung 24 ([41]): Durchschnittliche Steady-State-Leitfähigkeit von VDAC, relativ zur maximalen Leitwert bei 10 mV, in symmetrischen Lösungen von 0,5 Molar (M) NaCl (geschlossene Kreise) oder nach Ersetzen der NaCl-Lösung durch 0,5 M Natrium Glutamat (offene Kreise) als Funktion der Spannung; bestimmt durch Messung der durchschnittlichen Leitfähigkeit von mindestens 20 Kanälen.

Diese Abbildung ist ein Nachdruck aus „Modulation of the Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) by Glutamate“ von Gicel, Silberberg, Shoshan-Barmatz et al. (2000) und wurde reproduziert mit der Erlaubnis von Springer Nature.

Bei Einzelkanalexperimenten mit niedrigen Spannungen führte Glutamat zu schnellen Wechseln zwischen den Kanalzuständen vollständig geöffnet, nur sehr gering leitfähig, vollständig geschlossen und weiteren Leitfähigkeitsstufen, sodass es insgesamt zu einer Hemmung des Kanals kommt. Dabei ist die Beeinflussung durch Glutamat bei diesen geringen positiven und negativen Spannungen (z.B.  $\pm 10$  mV) wiederum auch spannungsabhängig, sodass für den Wechsel zwischen den beschriebenen Zuständen kurzweilige Erhöhungen (sowohl negativer als auch positiver Art) des Membranpotentials notwendig sind. Bei der Modulation durch Glutamat handelt es sich um eine für Glutamat spezifische Beeinflussung des Gatings, denn beispielsweise GABA und Aspartat zeigten keinen Einfluss. Daher scheint es plausibel, dass der VDAC über eine Glutamat-spezifische Bindestelle verfügt, welche für die Modulation verantwortlich ist. Bei den Erkenntnissen zur Modulation durch Glutamat ist zu beachten, dass die Experimente an spannungsabhängigen Anionen Kanälen aus Schafshirnsynaptosomen und Rattenlebermitochondrien durchgeführt wurden, und nicht an VDACs, welche aus Erythrozytenmembranen gewonnen wurden. Die Beeinflussung durch Glutamat ist dennoch vor allem Hinblick auf die VDACs in den Membranen von Erythrozyten von Bedeutung, und müssen in Bezug auf ihre Funktion weiter erforscht werden [41].

Wie oben bereits beschrieben spielen auch Blutplasmabestandteile eine Rolle bei der Kontrolle und Modulation des VDACs, aber auch Oxydo- Reduktionszustände und PKA- abhängige

## 1 Einleitung

Phosphorylierung tragen ihren Teil bei. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie Kalzium-Ionen scheinen zur Aktivierung des VDAC beizutragen, genau wie die Proteinkinase A, sodass die Leitfähigkeit der VDACs über den cAMP- Weg beeinflusst werden kann [86,118].

Weiterhin ist der VDAC modulierbar durch verschiedene synthetische Polyanionen, welche die Spannungsabhängigkeit des Kanals erhöhen können. Beispiele sind König's Polyanion, Dextran Sulfate und Polyaspartate. Entgegengesetzte Wirkung zeigen biogene Polyamine wie Spermine, Putrecine, Spermidine. Sie setzen die Spannungsabhängigkeit des VDAC herab. Weiteren Modulatoren des Kanals stellen Ruthenium Rot, 4'- Diisothiocyano-2,2'- disulfonsäure- stilben (DIDS), La<sup>3+</sup> und Tb<sup>3+</sup> dar. Besonders Ruthenium Rot wird in Experimenten gerne genutzt, um den VDAC komplett zu verschließen. Dieser Kanalschluss kann durch Zugabe von Kalzium verhindert werden, da es mit den Kalziumbindungsstellen interagiert. Neben Ruthenium Rot, DIDS, La<sup>3+</sup> und Tb<sup>3+</sup> wirkt auch NADH antagonistisch, denn es erhöht die Wahrscheinlichkeit des Schließens von VDAC. Außerdem verändert ATP die Kanalaktivität, wenn es als Ligand an den spannungsabhängigen Anionenkanal bindet [41,42,111].

Für valide Aussagen über die Funktion des spannungsabhängigen Anionen Kanals weist die bisherige Datenlage zum VDAC in Erythrozytenmembranen zu viele Lücken auf. Auf Grundlage mehrerer Diskussionen in Veröffentlichungen verschiedener Autoren lässt sich allerdings zusammenfassen, dass ihm Kontrollfunktionen „an einem breiten Spektrum dynamischer Veränderungen der Homöostase und der Membranpermeabilität der roten Zellen“[102] zugesprochen werden, zum Beispiel in Bezug auf das Kalziumgleichgewicht, das Volumengleichgewicht und somit Verformbarkeit der Erythrozyten, sowie der Regulierung der Sauerstoffzufuhr. Gegebenenfalls ist der VDAC dabei Teil einer Kettenreaktion mit Beteiligung anderer Kanäle wie z.B. dem Gárdos- Kanal oder einer Zusammenarbeit dieser durch synergistische Funktionen. Des Weiteren wird dem VDAC eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Passage von Adenin-Nukleotiden und negativ geladenen Metaboliten zugeschrieben, da diese durch die große Pore des spannungsabhängigen Anionenkanals diffundieren können [10,41,111]

In der Plasmamembran kommen die VDACs separat vor oder in einem Komplex mit dem Adenin-Nukleotid Transporter (ANT) und dem Translokatorprotein (TSPO), welches auch als Isochinolin-bindendes Protein (IBP) bekannt ist. Die Kommunikation dieser Proteine untereinander wird durch Bindungsstellen ermöglicht und ihre Bindung untereinander durch TSPO gesichert. Für jede der Komponenten codieren mehrere Gene. So existieren neben den drei verschiedenen VDAC-Genen die TSPO Gene 1 und 2 und die ANT Gene 1 bis 4, wobei ANT 4 hodenspezifisch ist und somit in Erythrozyten keine Rolle spielt. Den beschriebenen Komplex, der mindestens aus diesen drei Komponenten gebildet wird, nennt man peripheren Benzodiazepin-Rezeptor (PBR).

Der PBR ist affin für PK 11195, Ro5-4864 und Diazepam. Dabei interagiert der Ligand PK 11195 nur mit dem Translokationsprotein und wirkt antagonistisch, während Ro5-4864 und Diazepam an alle



## 1 Einleitung

drei Komponenten binden und agonistische Wirkung zeigen. Der PBR Komplex kommt neben der Erythrozytenmembran, wo er mit 100-200 Rezeptoren pro Erythrozyten vertreten ist, auch in hämatopoetischen Zellen vor, besonders in lymphoiden Zellen. Lymphozyten weisen jeweils ca. 750.000 PBR-Komplexe auf [10,69,83,110,111,117].

Auch über die Funktion des PBR Komplexes kann auf dem aktuellen Stand der Forschung noch keine abschließende Aussage getroffen werden. In Anbetracht der Kenntnisse über die drei Komponenten kann aber geschlussfolgert werden, dass er eine wichtige Rolle im Transport über die Erythrozytenmembran, sowie der Regulierung von Volumen, Elektrolythaushalt, Redoxsystem und Säure-Basen Haushalt der Erythrozyten spielt. Für den mitochondrialen spannungsabhängigen Ionenkanal konnte gezeigt werden, dass er eine Rolle in der Kontrolle des Austausches von Ionen und Metaboliten zwischen Zytosol und Mitochondrien spielt. Übertragen auf den erythrozytären VDAC im PBR Komplex wäre eine Kontrollfunktion zwischen dem Intrazellularraum und Extrazellularraum der Erythrozyten denkbar. Außerdem zeigten verschiedene Studien, dass der PBR zu einem Maxi-Ionenstrom führt, welcher eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie von Malaria spielt [10,111]

### *1.3.4.8 Der spannungsaktivierte Kalzium Kanal 2.1 (Ca<sub>v</sub>2.1)*

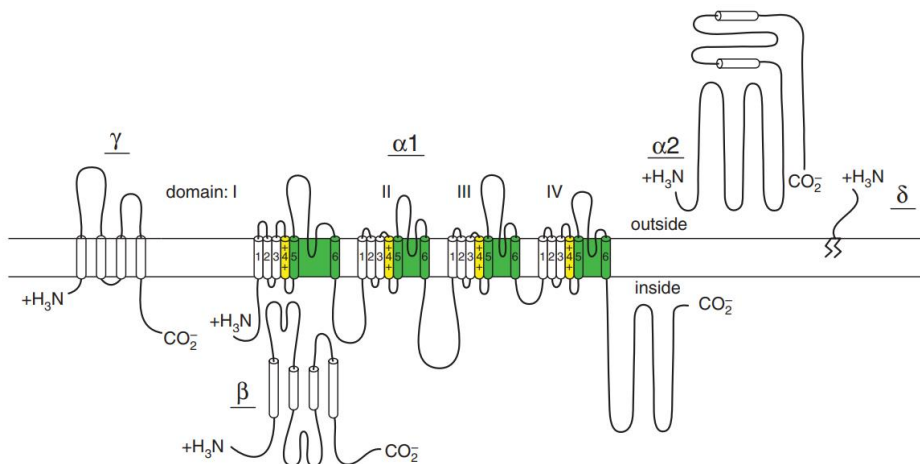
Neben dem spannungsabhängigen Anionenkanal VDAC gibt es noch weitere spannungsaktivierten Kanäle. Viele Studien befassten sich mit Existenz spannungsaktivierter Kalzium Kanäle auf der Membran menschlicher Erythrozyten und konnten durch verschiedene Verfahren, wie Tracer Fluss und immunologische Untersuchungen den Nachweis verschiedener Subtypen erbringen [98,100]. Für den spannungsaktivierten Kalzium Kanal 2.1 (Ca<sub>v</sub>2.1) konnten zwar bisher keine Patch-Clamp Aufnahmen erbracht werden, womit seine Existenz in Erythrozyten fraglich ist, über Western Blot Verfahren und pharmakologische Interaktion mit dem Spinnengift  $\omega$ -AgatoxinTK konnten aber für diesen Kanal die sichersten Nachweise für einen spannungsaktivierten Kalzium Kanal erbracht werden [3,119]. Deshalb wird mein Fokus im Folgenden auf dem Ca<sub>v</sub>2.1- Kanal liegen[15].

Mitglieder der Gruppe spannungsabhängiger Kalzium Kanäle kommen in vielen verschiedenen Zellen von Säugern vor. Für den Ca<sub>v</sub>2.1 ist neben der fraglichen Expression in Erythrozyten beispielsweise das Vorkommen in präsynaptischen Nervenendigungen von Dendriten belegt [15].

Die porenbildenden Untereinheiten von Kalziumkanälen sind verwandt mit denen von Natrium- und Kalium- Kanälen. Untersuchungen dieser Untereinheiten konnten die wichtigsten funktionellen Domänen identifizieren. So konnte gezeigt werden, dass jede Domäne der Haupt- Untereinheit aus jeweils sechs transmembranären  $\alpha$ - Helices besteht (S1-S6) und einer membranassoziierten Schleife zwischen Segment fünf und sechs. Das vierte Segment dient als Spannungssensor während Segment fünf und sechs mit der zwischen ihnen befindlichen Schleife die Kanalpore auskleiden. Dabei enthält

## 1 Einleitung

die Porenschleife Glutamatreste, welche für die Kalzium- Selektivität bedeutsam sind[16].



**Abbildung 25 ([16]): Struktur der Untereinheiten von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen. Die Strukturen der Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Untereinheiten sind als Transmembran-Faltmodelle dargestellt; vorhergesagte  $\alpha$ -Helices sind als Zylinder dargestellt; die Längen der Linien entsprechen in etwa den Längen der dargestellten Polypeptidsegmente, und die Zickzacklinie auf der  $\delta$ -Untereinheit veranschaulicht deren Glycophosphatidylinositol-Anker.**

**Diese Abbildung ist ein Nachdruck aus „Voltage-Gated Calcium Channels“ von Catterall et al. (2011) und wurde reproduziert mit der Erlaubnis von Cold Spring Harbor Laboratory Press.**

Kalzium Kanäle bestehen weiterhin aus Komplexen mit verschiedenen Untereinheiten, wie der  $\alpha 1$ -Untereinheit, welche die Pore des Kanals bildet und auf ca. 190-250 Kilodalton(kDa) geschätzt wird. Außerdem gibt es transmembranäre, über Disulfidbrücken verknüpfte Komplexe aus  $\alpha 2$ - und  $\delta$ -Untereinheiten sowie eine intrazelluläre  $\beta$ - Untereinheit. In einzelnen Fällen kommen auch  $\gamma$ -Untereinheiten vor. Es sind bisher insgesamt zehn  $\alpha 1$ - Untereinheiten, vier  $\alpha 2$ - $\delta$ - Komplexe, vier  $\beta$ -Untereinheiten und zwei  $\gamma$ - Untereinheiten bekannt[15].

Die Vielfalt in der Struktur und Funktion der verschiedenen Kalziumkanäle ist durch die  $\beta$ -Untereinheiten und ihre Isoformen begründet. Experimente an Kalzium Kanälen aus Gehirnzellen zeigten, dass sie teilweise mit den  $\alpha$ - Untereinheiten assoziiert und auf die Gating- Mechanismen und Spannungsabhängigkeit Einfluss nehmen, sodass sie die physiologische Funktion der  $\alpha$ -Untereinheiten verändern können[16].

Bisher konnten zehn verschiedene Kalzium Kanäle charakterisiert werden, die in die Gruppe der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle gehören. Sie gehen verschiedenen Aufgaben in der zellulären Signaltransduktion nach und unterschieden sich strukturell hauptsächlich in ihren  $\alpha 1$ - Untereinheiten. Diese Untereinheiten lassen sich in drei, strukturell und funktionell verwandte Familien gliedern: Cav1, Cav2 und Cav3. Cav2.1 gehört zur zweiten Gruppe, welche in unter 40% der Aminosäuresequenz mit der ersten Gruppe (Cav1) übereinstimmt [16,103].

Auch die Kalziumströme, welche durch die verschiedenen Kalziumkanäle fließen, wurden aufgrund elektrophysiologischer Daten eingeteilt und als L-, N-, P-, Q-, R- und T- Ströme betitelt. Es gibt verschiedene Veröffentlichungen darüber, welche Art durch den CaV2.1 fließt. Einerseits wird ihm die Passage von Typ P und Q- Strömen zugeschrieben, andererseits die von Typ N- Strömen. Dennoch

## 1 Einleitung

lässt sich festhalten, dass im  $Ca_v2.1$   $\alpha1$  und  $\alpha2\delta$  Untereinheiten vorkommen und  $\beta$ - Untereinheiten sowie die dort erst kürzlich entdeckten  $\gamma$  Untereinheiten. Diese Eigenschaft teilen sowohl N-, als auch P/Q Typ Kalziumkanäle [15,16].

Im Gehirn und in verschiedenen anderen Geweben existiert eine Reihe von sieben  $\gamma$  Untereinheiten, welche den  $\gamma$  Untereinheiten im  $Ca_v2.1$  sehr ähnlich sind und dessen Spannungsabhängigkeit modulieren können. Möglicherweise sind sie in vivo mit den  $Ca_v2.1$  in nicht-neuronalen Geweben verknüpft [16].

In der Regel wird die Aktivität von  $Ca_v2.1$  durch Veränderungen des Membranpotentials reguliert. Auch wenn es sich bei Erythrozyten nicht um erregbare Zellen handelt, kommt es durch beispielsweise die Gárdos- Kanal Aktivität zu Veränderungen des Membranpotentials, welche ausreichen um den Zustand von  $Ca_v2.1$  zu verändern [63]. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass bei Gárdos- Kanal Aktivierung das Ruhemembranpotential von ca. -10 mV auf ca. -70 mV fällt [112]. Zur Aktivierung des  $Ca_v2.1$  ist allerdings keine Hyperpolarisation nötig, sondern eine Depolarisation [16]. Trotzdem trägt der Gárdos- Kanal entscheidend zur Funktionsfähigkeit von  $Ca_v2.1$  bei, denn damit dieser in den offenen Zustand wechseln kann muss er erst vom inaktiven Zustand in den geschlossenen Zustand überführt werden, wozu eine Hyperpolarisation, wie die durch die Öffnung des Gárdos-Kanals, nötig ist [15,16,63].

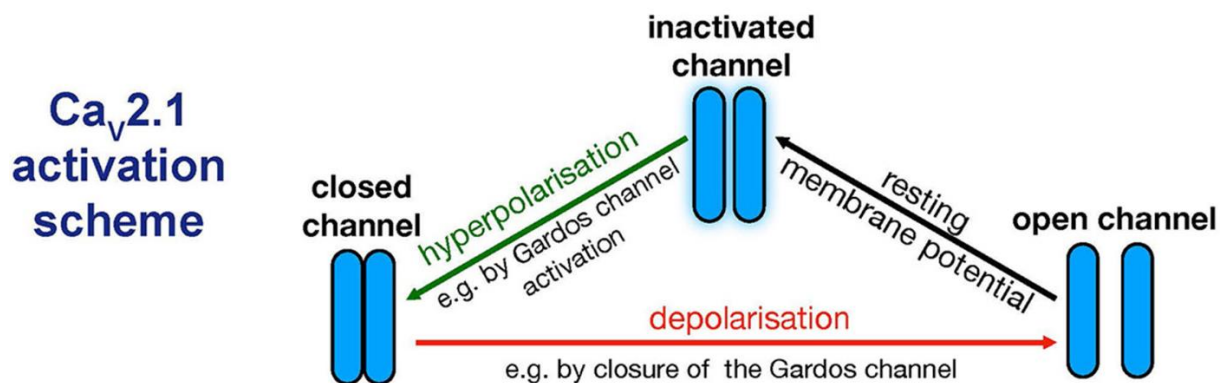


Abbildung 26 ([63]): Aktivierungsschema für den  $Ca_v2.1$ -Kanal, moduliert durch die zugrunde liegende Gárdos-Kanalaktivität.

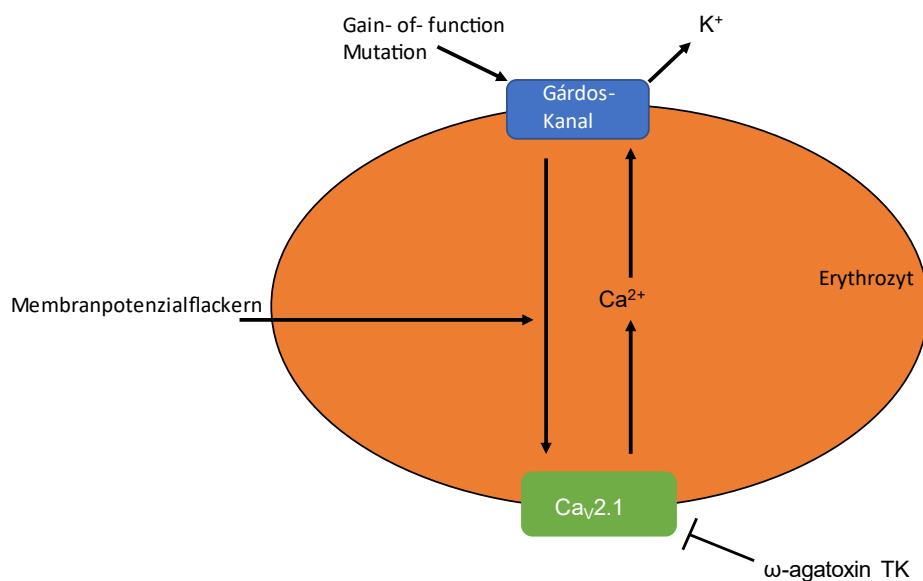
Diese Abbildung ist ein Nachdruck aus „Voltage-activated ion channels in non-excitabile cells-a viewpoint regarding their physiological justification“ von Kaestner, Wang et al. (2018) aus *Frontiers in Physiology* und wurde reproduziert mit der Erlaubnis von *Frontiers Media*.

Kaestner et al. (2018) stellten außerdem die These auf, das Schließen des Gárdos- Kanals könnte durch die daraus resultierende Depolarisation der Membran zur Aktivierung des  $Ca_v2.1$  führen. Ganz-Zell-Strom Messungen des Gárdos- Kanals zeigen ein Flackern der Aktivität, was diese Hypothese unterstützt, wobei auch andere Mechanismen denkbar wären. So kann unter Berücksichtigung der Kalzium Pumpe, welche bei steigenden Kalziumkonzentrationen arbeitet, und unter Berücksichtigung des Alles-oder-Nichts-Prinzips des Gárdos- Kanals angenommen werden, dass das Schaltverhalten des

## 1 Einleitung

Gárdos- Kanals in direkter Abhängigkeit von Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration steht [63].

Interessant ist, dass bei einem Patienten mit der Gárdos- Kanal Variante p.S314P, bei der es sich um eine Gain- of- function Mutation handelt, eine erhöhte freie Kalzium- Konzentration gefunden wurde. Da es sich bei dem Gárdos- Kanal um einen Kalium- Kanal handelt (1.3.4.1) kann diese Erhöhung nicht direkt auf eine erhöhte Gardos- Kanal Aktivität zurückgeführt werden. Daher wird diskutiert, ob spannungsabhängige Kalziumkanäle, wie der Cav2.1 eine Rolle spielen könnten. Diese würden durch das Flackern des Membranpotentials aufgrund der Gárdos- Kanal Aktivität stimuliert und würden so den erhöhten Kalziueintrag begründen [57].



**Abbildung 27 (in Anlehnung an [57]): Mechanistische Hypothese, wie die Aktivität des Gárdos- Kanals einen Anstieg der intrazellulären Erythrozyten Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auslöst. Die durch die Öffnung des Gárdos- Kanals induzierten Membranpotentialänderungen aktivieren den spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanal Cav2.1. Cav2.1 kann durch ω-agatoxin TK (Toxin im Gift der Trichternetzspinne Agelenopsis aperta) gehemmt werden. Pfeile stehen für die Aktivierung und Anker für die Hemmung des jeweiligen Transportproteins.**

Da der Gárdos- Kanal durch das Öffnen von Piezo1 aktiviert wird, wäre weiterhin eine Beeinflussung des Cav2.1 über Piezo1 denkbar. In offenem Zustand könnte Piezo1 durch Einstrom von Kationen die vom Gárdos- Kanal ausgehende Hyperpolarisation vermindern und somit die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung von Cav2.1 heruntersetzen. Liegt andererseits Piezo1 in geschlossenem Zustand vor, könnte dieser Umstand die Aktivierung von Cav2.1 erleichtern, wodurch die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigen würde (Abbildung 15). Experimente mit dem Cav2.1-Kanalblocker ω-agatoxin TK zeigten eine Verminderung der erhöhten Kalzium Konzentration und unterstreichen so die Hypothese. Außerdem kommt es durch immer stärkere Erhöhung der Gárdos- Kanal Aktivität, nach einem Peak, zur Abnahme der Kalziumkonzentration. Auch diese Tatsache spricht für die Hypothese, da wenn der Gárdos- Kanal hauptsächlich in offenem Zustand vorliegt die

## 1 Einleitung

Membranpotentialschwankungen nicht mehr ausreichend groß sind um die  $Ca_v2.1$  Kanäle zu öffnen [57,63]

Weitere Modulation der  $Ca_v2.1$ - Kanalaktivität durch Interaktionen könnte in Bezug auf die Proteinkinase  $C\alpha$  ( $PKC\alpha$ ) vorliegen. Verschiedene Studien legen nahe, die  $PKC\alpha$  stimuliere direkt den  $Ca_v2.1$  Kanal. Allerdings gibt es auch Studien, welche zu der Schlussfolgerung kommen, es liege keine Modulation vor. Durch Experimente mit Phorbol 12-myristate 13- acetate (PMA), einem Aktivator ausschließlich für  $PKC\alpha$  und  $\omega$ -agatoxin TK, einem  $Ca_v2.1$ - Inhibitor konnten Wagner-Britz et al. (2013) zeigen, dass es durch Stimulierung der Erythrozyten mit Hilfe von PMA zu zwei verschiedenen Phasen des Kalziumeinstroms kommt. Die erste Phase ist nicht hemmbar durch  $\omega$ -agatoxin TK und ist daher als unabhängig von  $Ca_v2.1$  anzusehen. Im Gegensatz dazu steht die zweite Phase, in der  $\omega$ -agatoxin TK den Kalzium Einstrom zum Versiegen bringen kann. Somit kann geschlussfolgert werden, dass  $PKC\alpha$  indirekt  $Ca_v2.1$  moduliert. Weitere Experimente mit dem physiologischen Stimulans Oleoyl-L- $\alpha$ - Lysophosphat-Säure (LPA), welches zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt, zeigten, dass auch  $PKC\alpha$ - unabhängige Kalziumeinströme vorliegen. Dies unterstreicht wiederum, dass es sich nur um eine indirekte Modulation von  $Ca_v2.1$  durch  $PKC\alpha$  handelt und nicht um eine direkte Verbindung in der Signalkaskade[119].

Es sind viele weitere Modulationsmechanismen der  $Ca_v2$ - Familie und im speziellen des  $Ca_v2.1$  bekannt. Die meisten Erkenntnisse dazu basieren allerdings auf Studien zu  $Ca_v2.1$  in Neuronen oder Herzmuskelzellen und bedürfen weiterer Forschung in Bezug auf die Übertragbarkeit auf spannungsabhängige Kalzium-Kanäle in Erythrozyten.

Neben den Funktionen in beispielsweise Nervenzellen, in denen das durch den  $Ca_v2.1$  einströmende Kalzium als second Messenger fungiert und für unter anderem die synaptische Transmission eine Rolle spielt [15], hat es auch in Erythrozyten, in denen normalerweise eine niedrige Kalzium Konzentration vorliegt, bedeutende Funktionen. So können nach extrazellulären Stimuli und darauffolgender erhöhter Kalzium Konzentration verschiedene zelluläre Mechanismen aktiv werden, welche folgend zu Veränderungen der Eigenschaften und Beschaffenheit des gesamten Erythrozyten führen [119].

Erhöhte intrazellulären Kalziumkonzentrationen durch den  $Ca_v2.1$ , wie z.B. auch als Folge der Aktivität von TRPC6, führen zu einer Aktivierung der Phospholipid-Scramblase und so über weitere Teilschritte auch zum Transport von Phosphatidylserin (PS) vom inneren Membranblatt der Lipiddoppelschicht an die äußere Zellmembran. Der PS-Transport führt wie bereits beschrieben über Bindung an die PS- Rezeptoren der Makrophagen zur erleichterten Phagozytose von alten Erythrozyten, die die enorm erhöhten Kalziumspiegel aufgrund unzureichender Pump-Fähigkeit nicht mehr ausreichend herunterregulieren können [35,100,119].

## 1 Einleitung

Außerdem führen erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel über die Aktivierung des Gárdos- Kanals mit nachfolgendem Ausstrom von KCl und Wasser zur Schrumpfung der Erythrozyten [119].

### 1.4 Das Neuroakanthozytose Syndrom

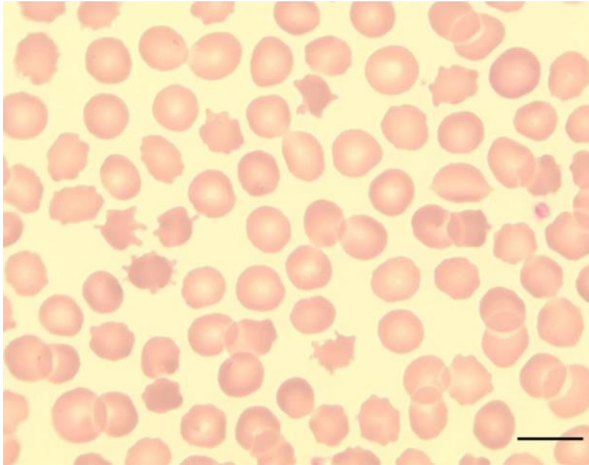
Eine für diese Arbeit wichtige Gruppe von Erkrankungen der Erythrozyten, welche nicht direkt in Verbindung mit einer der bisher beschriebenen Kanäle stehen, sind die Neuroakanthozytose Syndrome (NAS). Dabei handelt es sich um eine genetisch definierte Gruppe von Krankheiten, welche sich durch eine Akanthozytose der Erythrozyten, eine fortschreitende Degeneration der Basalganglien und dadurch resultierende Symptome, wie hyperkinetische Bewegungsstörungen, ähnlich der Huntington Krankheit, psychiatrischen Manifestationen, wie beispielsweise Depression, kognitiver Verfall, und Multisystemerkrankungen, wie axonale Neuropathie und Myopathie auszeichnen [20,59].

Zum NAS (Neuroakanthozytose Syndrom) werden die Chorea-Akanthozytose und die McLeod-Syndrome gezählt. Außerdem werden Akanthozyten auch in verschiedenen vererbten Störungen des Lipoprotein-Stoffwechsels gefunden, wie beispielsweise der Abetalipoproteinämie (Bassen-Kornzweig-Syndrom). Um Verwechslungen der verschiedenen Krankheiten, die unter dem Begriff Neuroakanthozytose subsumiert werden zu vermeiden, wurde vorgeschlagen diesen Begriff zu vernachlässigen und die Chorea-Akanthozytose nach ihrer Mutation als VPS13A Krankheit zu betiteln sowie das McLeod- Syndrom in XK-Krankheit umzubenennen. Die Prävalenz dieser Störungen ist mit jeweils ca 1-5: 1.000.000 sehr gering, allerdings ist zu bedenken, dass viele Patienten unterdiagnostiziert sein könnten [20,59,120].

Ausgelöst werden diese Syndrome durch spezifische Mutationen. Der Mechanismus, durch den diese Mutationen zu Neurodegenerationen führen, ist bisher jedoch unklar. Wissenschaftler gehen von einem gemeinsamen Pathomechanismus der verschiedenen Krankheiten dieses Syndroms aus, da die Assoziation zwischen der Bildung von Akanthozyten und der selektiven Degeneration der Basalganglien diese Parallele nahelegt [20,59].

Zur Diagnose der NAS werden Labortests, wie die Bestimmung der Kreatininkinase im Serum herangezogen, da diese oft erhöht ist. Außerdem können spezifische Gentests durchgeführt werden. Durch kraniale Magnetresonanztomografie (MRT) Untersuchungen kann eine Striatusatrophie nachgewiesen werden und durch die Mikroskopie eines Blutausrichs das Vorhandensein von Akanthozyten überprüft werden. Als Akanthozyten bezeichnet man Erythrozyten mit „ährenförmigen Ausstülpungen“ [59].

## 1 Einleitung



**Abbildung 28 [59]: Peripherer Blutausstrich mit Akanthozytose bei einem Patienten mit McLeod-Syndrom (May Gruenwald-Giemsa; x100; Maßstabsleiste = 10 µm).**

Diese Abbildung ist ein Nachdruck aus „Neuroacanthocytosis Syndromes“ von Jung, Danek, Walker et al. (2011) aus dem Journal „Orphanet Journal of Rare Diseases“ und wurde reproduziert mit der Erlaubnis von Bio Med. Central Ltd.

Allerdings können diese Verformungen variabel sein und die der NAS kann auch ohne ihren Nachweis gestellt werden. Wie es zur Verformung der Erythrozyten kommt, muss noch abschließend erforscht werden, durch proteomische und funktionelle Daten von Erythrozyten von Patienten mit VSP13A Krankheit oder XK-Krankheit kann aber davon ausgegangen werden, dass Bande3 eine zentrale Rolle dabei spielt, was auf eine zugrundeliegende Protein-Protein-Interaktion schließen ließe, die durch phosphorylierungsbezogene Signalverarbeitung gesteuert würden. Bande3 verbindet durch Brücken, an denen auch Ankyrin und Protein4.1 beteiligt sind, das Membranskelett mit der Erythrozytenmembran. Durch Mutationen in diesen vertikalen Interaktionen kommt es zum Verlust der Membranoberfläche und damit zur Verformung der Erythrozyten [9,20,59].

Die NAS zeigen deutliche Parallelen mit der Huntington-Krankheit. Beide Krankheiten zeigen eine neuromuskuläre Beteiligung mit Myopathie und fehlenden Sehnenreflexen und teilweise auch eine Hepatosplenomegalie, außerdem brechen sie im Jugendalter aus und zeigen eine langsame Progredienz im Krankheitsverlauf über 2 bis 3 Jahrzehnte [59].

Bisher können die NAS aufgrund fehlender kurativer Maßnahmen nur symptomatisch behandelt werden. Dafür kommen Antidepressiva gegen die mögliche Depression zum Einsatz, sowie Antikonvulsiva gegen Krampfanfälle, Dopaminantagonisten gegen die hyperkinetischen Bewegungsstörungen und tiefe Hirnstimulation, sowie nichtmedikamentöse Therapien wie beispielsweise Sprachtherapien [59].

Die Prognose der NAS ist schlecht. Nach einem nicht aufhaltbaren fortschreitenden Verlauf über mehrere Jahrzehnte enden die Erkrankungen durch plötzlichen Tod. Dieser kann beispielsweise durch Krampfanfälle, autonome Dysfunktionen und allgemeine Schwäche ausgelöst werden [59].

## 1 Einleitung

Im Folgenden möchte ich mich auf die Chorea-Akanthozytose und die McLeod-Syndrome konzentrieren, da ich mit Erythrozyten von Patienten dieser Syndrome Experimente durchführen durfte.

### 1.4.1 Chorea Neuroakanthozytose

Bei der Chorea Neuroakanthozytose (VPS13A Krankheit) handelt es sich um eine autosomal rezessive neurodegenerative Erkrankung der Gruppe der NAS. Charakteristisch für VPS13A Krankheit Patienten sind choreatische Bewegungsstörungen, eine „Fütterungsdystonie“ mit vorgestreckter Zunge, orofaziale Dyskinesien, Dystonien der Gliedmaßen, unkontrollierbare Vokalisationen, Dysarthrie sowie Zungen- und Lippenbeißen. Auch ihr Gangbild zeigt durch Rumpfinstabilität und plötzliche Rumpfspasmen Besonderheiten und verleiht den Patienten das Erscheinungsbild eines Gummimenschen. Diese neurodegenerativen Symptome brechen meist in den 20er Jahren der Patienten aus, Vorboten können kognitive und psychische Ausfälligkeiten, wie Depression, schizophrenieähnliche Psychosen und Zwangsstörungen sein. Diese können schon Jahre vor Beginn der neuromotorischen Symptome auftreten. Neben der, von dem Großteil der Patienten entwickelten, generalisierten Chorea, entwickeln einige Patienten einen Parkinsonismus oder eine Beeinträchtigung ihrer kognitiven Funktionen. Bei der VPS13A Krankheit handelt es sich um eine unaufhaltsame Erkrankung, welche langsam, progredient fortschreitet, bis sie nach 15 bis 30 Jahren im plötzlichen Tod durch Krampfanfälle oder eine autonome Beteiligung ihr Ende findet [59].

Auffällig bei Patienten mit VPS13A Krankheit, wie bei den meisten NAS, ist ein erhöhter Wert der Plasma Kreatinin Kinase. Dieser steht in Zusammenhang mit den neuromotorischen Symptomen der Patienten. Obwohl Patienten mit VPS13A Krankheit, anders als XK-Krankheit Patienten, in der Regel (i.d.R.) keine oder nur eine sehr gering ausgeprägte Myopathie entwickeln, treten andere neuromuskuläre Manifestationen in Erscheinung. So sind diesbezüglich Areflexie, sensomotorische Neuropathie, Muskelatrophie und variable Muskelschwäche zu nennen. Allerdings sind bei Muskelbiopsien nur selten myopathische Veränderungen erkennbar [59].

Die VPS13A Krankheit entsteht durch verschiedene Mutationen auf einem Gen auf Chromosom 9, genannt VPS13A. VPS13A kodiert für Chorein, ein 360 kDa Proteinprodukt, welches im Gehirn, in reifen Erythrozyten und in verschiedenen inneren Organen exprimiert wird und an intrazellulären Proteinsortierungen beteiligt ist, dessen physiologische Funktion aber noch nicht geklärt ist. Fast alle bisher gefundenen Mutationen führen zum Fehlen von Chorein in den Erythrozyten der Patienten. Eine partielle Manifestation der Krankheit, beispielsweise bei heterozygoten Trägern, wurde bisher nicht beobachtet[20,24].

Das Fehlen von Chorein wird zur Diagnosestellung der Erkrankung herangezogen, denn es kann durch Western Blots detektiert werden [59].



## 1 Einleitung

Da die Datenlage zur biochemischen Struktur und zu den Interaktionen von Chorein mit anderen Proteinen sehr limitiert ist, gelang es bisher nicht, eine Hypothese zur Rolle von Chorein in dem Erythrozyten-Gleichgewicht zu formulieren. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Erythrozyten von Patienten mit VPS13A Krankheit zeigten aber eine heterogene Verteilung des Zytoskeletts, welches in einigen Bereichen der Membran kondensierte Zytoskelettstrukturen um Protrusionen zeigte, sowie weniger filamentöse Strukturen. Ansonsten waren keine größeren Unterschiede zu gesunden Erythrozyten in der Zusammensetzung und Häufigkeit der Erythrozytenmembranproteine zu finden. Dennoch wurde in einer kleinen Anzahl von VPS13A Krankheit Patienten Erythrozyten eine Erhöhung der Ne (g-glutamyl) Lysin isopeptid Konzentration in Verbindung mit der Erythrozytenmembran detektiert.

Das Isopeptid der Ne (g-glutamyl) Lysin vernetzt ein multikomplexes Protein, dessen Organisation durch Transglutaminase2 katalysiert wird. Frühere Daten postulierten eine Störung des Skelettnetzwerks und eine mögliche Instabilität der auf Bande3 basierenden Multiproteinkomplexe in Abwesenheit von Chorein. Diese These kann nun durch eine erst kürzlich beschriebene Anreicherung von Aktin in der Triton-löslichen Fraktion der Erythrozyten von Patienten mit VPS13A Krankheit unterstützt werden. Weiterhin wurde bei diesen Erythrozyten eine verminderte intrazelluläre Kaliumkonzentration gefunden [20,36,84,92,109].

Anhand dieser Daten ist von einem komplexen Zusammenspiel bei der VPS13A Krankheit auszugehen, welches möglicherweise posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen involviert, welche dann Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen und dem skelettartigen Netzwerk beeinflussen [20].

Für diese These spricht weiterhin, dass in den Erythrozyten von VPS13A Krankheit Patienten erhöhte Tyrosinphosphorylierungszustände mehrerer Membranen, einschließlich Bande3 gefunden wurden, welche auf einer abnormen Lyn-Kinase-Aktivierung basieren. Diese könnten die Stabilität der Komplexe, an denen Bande3 beteiligt ist und die die Membran mit dem Skelettnetz verbindet, beeinflussen. Aus diesen Veränderungen der Junktionskomplexe könnte die Bildung von Akanthozyten bei den Patienten begründet liegen. Bisher gibt es allerdings keine konsistenten Daten zur Veränderung der Membranlipidzusammensetzung bei Akanthozyten von Patienten mit der VPS13A Krankheit [20].

### 1.4.2 McLeod Syndrom

Bei dem McLeod Neuro-Akanthozytose- Syndrom (XK-Krankheit) handelt es sich um eine multisystemische, X-chromosomal rezessiv vererbte Unterform der Neuroakanthozytose mit zentralnervösen, neuromuskulären, kardiovaskulären und hämatologischen Symptomen. So zeigen die XK-Krankheit Patienten die für die NAS typischen Symptome durch die Degeneration der Basalganglien mit psychiatrischen und kognitiven Veränderungen sowie hyperkinetischen Bewegungsstörungen, welche sich nur schwer von denen der Chorea-Huntington Patienten abgrenzen

## 1 Einleitung

lassen. Neuromuskulär sind Muskelschwäche und -atrophie zu nennen sowie sensomotorische Axonopathie, welche allerdings vom Patienten unbemerkt bleiben können. Außerdem kommen, anders als bei den anderen NAS, dilatative Kardiomyopathien, Vorhofflimmern und Tachyarrhythmien vor. Diese betreffen bis zu 60% der Patienten und gehören zu den häufigsten Todesursachen dieser Patientengruppe. Daher sind regelmäßige kardiologische Kontrollen für die betroffenen Patienten besonders wichtig [59,60].

Weiterhin sind die hämatologischen Auffälligkeiten von besonderem Interesse, denn die XK-Krankheit entsteht durch Mutationen im XK-Gen. Bisher konnten 28 verschiedene dieser Mutationen identifiziert werden. Sie bestehen aus verschieden großen Deletionen, Frameshift- oder Nonsense-Mutationen, welche alle zu einem Fehlen oder einer Verkürzung des XK-Proteins führen. Dieses wird ubiquitär exprimiert.

Durch die fehlende Expression des KX-Erythrozyten- Antigens sowie einer damit verbundenen verminderten Expression der Kell- Blutgruppen- Antigene wurde für die XK-Krankheit Patienten ein eigener Blutgruppenphänotyp definiert, welcher, wie das Syndrom selbst auch, nach dem ersten bekannten Patienten benannt wurde: Hugh McLead. Die Erythrozyten der betroffenen Patienten formen sich, wie bei den anderen NAS, zu Akanthozyten, denn das XK-Protein ist mit dem Spektrin-Aktin-Protein4.1-Verbindungskomplex assoziiert. Sein Fehlen führt bei der XK-Krankheit zu einem abnormalen Phosphorylierungszustand des Membranskelettnetzes und somit zur Bildung von Akanthozyten. Außerdem wurde ein abnormer Tyrosin-Phosphorylierungszustand von Ankyrin und Protein4.1 in XK-Erythrozyten gefunden, was wiederum darauf hinweist, dass Veränderungen im Protein4.1-Phosphorylierungszustand Einfluss auf die Membranstabilität der Erythrozyten haben und somit an der Bildung von Akanthozyten beteiligt sind. Des Weiteren kommt es bei der XK-Krankheit zu einer kompensierten Hämolyse [19,20,60].

Funktionelle Studien zeigten, dass die Erythrozyten der Patienten mit XK-Krankheit eine verminderte Resistenz gegenüber mechanischem Stress haben, sowie eine erhöhte Erythrozytendichte, welche mit einem verminderten intrazellulären Kaliumgehalt einhergeht. Weiterhin zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen eine heterogene Verteilung des Membranskeletts der Erythrozyten, besonders in dichteren Erythrozytenfraktionen mit Akanthozyten [20].

Die Diagnosestellung wird bei Probanden, bei welchen der Verdacht auf XK-Krankheit besteht, anhand von klinischen, labortechnischen und bildgebenden Untersuchungen gestellt, sowie unter Berücksichtigung der Familienanamnese und molekulargenetischer Tests, welche entweder eine pathogene XK-Variante zeigen oder eine hemizygoten Deletion von Xp21.1 mit XK. Manchmal wird auch die schwache Expression des Kell-Antigens zufällig in Routineuntersuchungen erkannt, was dann zur Diagnosestellung führen kann [59,60].

## 1 Einleitung

Zur Behandlung der Chorea werden Dopaminagonisten und Dopamin-Depletoren eingesetzt. Weiterhin werden abhängig vom klinischen Erscheinungsbild der einzelnen Patienten Herzanomalien, psychiatrische Probleme und Krampfanfälle behandelt. Nicht nur den Patienten selbst, sondern auch ihren Familien sollte eine multidisziplinäre, psychosoziale Betreuung angeboten werden [60].

Außerdem ist es von besonderem Interesse, Bluttransfusionen mit dem KX-Antigen zu vermeiden. Stattdessen sollte KX-Antigen negatives Spenderblut oder am geeignetsten Eigenblut aus der Blutbank verwendet werden. Aufgrund der Gefahr einer inkompatiblen Bluttransfusion sollte auch der genetische Status von Verwandten der Patienten mit XK-Krankheit, wenn auch klinisch unauffällig, evaluiert werden [60].

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben, ist die Prognose der NAS, und somit auch der XK-Krankheit, sehr schlecht, da es sich um stetig fortschreitende und nicht aufhaltbare Krankheiten handelt. Dennoch ist die Überlebenszeit nach Ausbruch der Erkrankung bei XK-Krankheit mit mehr als 30 Jahren besser als bei der VPS13A Krankheit [59].

Ein weiterer Unterschied zur VPS13A Krankheit ist das Fehlen bzw. nur extrem seltene Auftreten von Lippen- und Zungenbeißen, Dysphagie, Dystonie oder Parkinsonismus. Dennoch zeigen auch XK-Patienten Chorea ähnliche Symptome wie Dyskinesien und Vokalisationen. Auch psychiatrische Manifestationen wie Depression, Zwangsstörungen und Schizophrenie ähnliche Psychosen sind typisch und können viele Jahre vor dem Beginn der motorischen Auffälligkeiten auftreten. Bei ca. 50% der Patienten mit XK-Krankheit kommen generalisierte Krampfanfälle vor und obwohl nur bei ca. 50% der XK-Krankheit Patienten Muskelschwäche und Muskelatrophie in Erscheinung treten, ist bei fast allen Patienten das Serum-CK erhöht. Weiterhin entwickeln einige Patienten kognitive Defizite, vor allem in späten Krankheitsstadien [59].

### 1.5 Säure- Basen Haushalt

#### 1.5.1 pH-Wert

Bei der Frage nach dem Säure-Basen-Haushalt steht das Proton, oder  $H^+$ - Ion im Mittelpunkt. Eigentlich liegt  $H^+$  im Wasser als Hydroniumion ( $H_3O^+$ ) vor, zur Vereinfachung ist aber oft nur von Protonen und ihren Konzentrationen die Rede. Die Konzentration der Hydroniumionen ist für den reibungslosen Ablauf vieler Körperfunktionen von enormer Bedeutung. Viele Proteine im menschlichen Körper enthalten Seitenketten, welche  $H^+$ - Ionen abgeben oder binden können. Diese nennt man, nach Brønsted und Lowry, Säuren bzw. Basen. Säuren geben Protonen ab, sie werden auch Protonendonatoren genannt. Basen sind Protonenakzeptoren, sie nehmen  $H^+$ - Ionen auf [12,28,127].

Durch Protonenabgaben und -Aufnahmen kommt es zu Konformationsänderungen der Moleküle und damit zur Beeinflussung vieler biochemischer und physiologischer Prozesse. Ein Beispiel hierfür sind die oben bereits erwähnten pH-sensitiven Ionenkanäle [28,128].

## 1 Einleitung

Ein Zustand, in dem der Anteil an Basen überwiegt, nennt man Alkalose, überwiegen die Säuren spricht man von einer Azidose. Um die Basizität und Azidität verschiedener Lösungen zu vergleichen könnte man die Konzentration der Hydronium-Ionen ( $H_3O^+$ ) oder Hydroxid-Ionen ( $OH^-$ ) heranziehen. Hierbei ist allerdings die Rede von Zehnerpotenzen mit negativen Exponenten, was sich als unübersichtlich darstellt. Daher wurde der negative dekadische Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration als pH-Wert definiert:

$$pH = -\log_{10} [H_3O^+] = -\lg[H_3O^+]$$

Somit entspricht beispielsweise eine Hydroniumionenkonzentration von 1 mM einem pH von 4 [129].

Auf Grundlage dieser Definition wurde eine pH-Skala etabliert. Diese reicht von pH=0 ( $[H_3O^+]=10^0$  M) bis pH=14 ( $[H_3O^+]=10^{-14}$  M). Weiterhin gibt es eine gegenläufige Skala, die pOH-Skala, welche über das Ionenprodukt des Wassers errechnet werden kann. Bei einer neutralen Lösung kann der Neutralpunkt erreicht werden, dann gilt  $pH=pOH=7$  [129].

Aufgrund der dekadischen Darstellung entspricht eine Änderung der Hydroniumionenkonzentration um den Faktor 10 „nur“ einer Änderung des pH- Wertes um eine Einheit. Dies darf allerdings nicht dazu verleiten kleine pH-Änderungen als unwichtig zu deuten. So bedeutet eine pH-Abnahme um 0,3 Einheiten, von 7,4 auf 7,1 weiterhin eine Verdopplung der Protonenkonzentration von 40 nM auf 80 nM, was zu erheblichen Störungen im Organismus führen kann. Daher ist die Konstanthaltung einer ausgewogenen Wasserstoffionenkonzentration, sowohl intrazellulär als auch extrazellulär von großer Bedeutung [12,72].

### 1.5.2 Puffersysteme

Um starke pH-Schwankungen zu verhindern, gibt es verschiedene Puffersysteme. Dabei handelt es sich um schwache Säuren und Basen, welche hinzukommende Protonen teilweise binden, bzw. verlorene Protonen zum Teil (z.T.) ersetzen können und somit Änderungen im pH dämpfen [12].

Um den Zusammenhang zwischen pH-Wert und der Säurekonstante ( $pK_s$ ) sowie dem Konzentrationsverhältnis von konjugierter Base und schwacher Säure zu beschreiben, kann die Henderson-Hasselbalch Gleichung herangezogen werden:

$$pH = pK_s + \lg \frac{[konjugierte Base]}{[Säure]}$$

Dabei beschreibt die Säurekonstante  $pK_s$  die Fähigkeit eines Stoffes zur Protolyse, also als Protonendonator zu wirken [52].

Liegen bei einem Puffer konjugierte Base und Säure in gleicher Konzentration vor, so liegt das Konzentrationsverhältnis bei eins. Da der Logarithmus von eins null ist, entfällt der Teil der Rechnung und es gilt  $pH=pK_s = 4,8$ . Ist das Konzentrationsverhältnis nicht gleich eins, wird eine pH-Wert

## 1 Einleitung

Änderung um eine Einheit erst durch einen zehnfachen Überschuss des einen Partners über den anderen bewirkt [129].

Im Intrazellularraum und Extrazellularraum unterscheiden sich die Puffersysteme. Intrazellulär gibt es Proteinat- und Phosphatpuffer, im Extrazellulärraum ist das Kohlendioxid-Hydrogencarbonat-Puffersystem zu finden.

Der Phosphatpuffer ist ein geschlossenes System, das heißt, keiner der Reaktionspartner kann aus dem System entweichen. Das Maximum seiner Pufferkapazität liegt bei einem pH von 6,8 und somit weniger als eine pH- Einheit vom pH des arteriellen Blutes entfernt. Aus diesem Grund eignet er sich für den menschlichen Körper besonders gut. Allerdings liegt die Gesamtkonzentration der beiden Phosphatformen, Dihydrogenphosphat und Hydrogenphosphat, welche miteinander im Gleichgewicht stehen, bei nur ein bis zwei millimolar. Daher erreicht der Phosphatpuffer trotz starker Pufferkapazität nur eine geringe Wirkung.

Auch beim Protein-Puffersystem handelt es sich um ein geschlossenes System, da sich die Proteinkonzentration im Plasma und Erythrozyten nicht verändert. In den Proteinen puffern die Aminosäurereste, welche meist mehr negative Ladungen tragen als positive, sodass negative Überschussladungen entstehen. Je nach Zusammensetzung der Aminosäurereste kann das Maximum der Pufferkapazität sehr schwanken. Da die Zahl der puffernden Aminosäurereste an Plasmaproteinen und intrazellulären Proteinen sehr hoch ist, entfaltet das Proteinpuffersystem eine große Wirkung [12,28,72].

Außerdem spielt das Bicarbonatpuffersystem im Blutplasma eine bedeutende Rolle. Die zugehörige Reaktionsgleichung lautet:  $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$ .

Die maximale Pufferkapazität liegt bei einem pH von 6,1 und ist damit weit vom physiologischen pH des arteriellen Blutes entfernt, daher ist die Pufferkapazität trotz relativ hoher Gesamtkonzentration von 25,2 mM niedrig. Allerdings passt sich die Lungenventilation, in physiologischem Zustand, genau der  $CO_2$  Produktion des Körpers an, sodass die  $CO_2$ - Konzentration des arteriellen Blutes bei 1,2 mM konstant gehalten werden kann. Des Weiteren wirkt die Niere begrenzend auf Schwankungen in der Bicarbonatkonzentration, indem sie die Bicarbonatausschüttung anpassen kann. Somit handelt es sich beim Bicarbonatpuffer um ein offenes System [12].

Formuliert man die Henderson-Hasselbalch- Gleichung für das Bicarbonatpuffersystem wird deutlich, dass der pH mit steigender  $CO_2$  Konzentration sinkt und mit steigender  $HCO_3^-$  Konzentration steigt:

$$pH = 6,1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}$$

Durch Einsetzen der Normalwerte des Blutplasmas ist ein Blutplasma-pH von 7,4 (40 nmol (nanomol)  $H^+$ / l) errechenbar:

## 1 Einleitung

$$7,4 = 6,1 + \log \frac{24 \text{ mmol/l}}{1,2 \text{ mmol/l}}$$

[12,72]

Allerdings unterliegt auch der pH des arteriellen Blutes leichten Schwankungen. Daher sind Werte zwischen 7,36 und 7,44 als physiologisch zu werten. Da in Erythrozyten die Bicarbonatkonzentration nur bei 14 mM liegt, die CO<sub>2</sub> Konzentration jedoch gleich ist, liegt der intrazelluläre pH nur bei 7,2 [12,72].

Für zelluläre Funktionen ist besonders der intrazelluläre pH-Wert von Bedeutung. Deshalb existieren neben den Puffersystemen auch andere Transportmechanismen für den Protonenexport und Basenimport. Beispielsweise wird HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> im Austausch gegen extrazelluläre Chloridionen, über den Anionenantiporter AE1, aus der Zelle transportiert [12,72].

### 1.5.3 Messung von pH-Werten

Da die Messung von pH-Werten, insbesondere mithilfe eines pH-Meters in dieser Arbeit eine bedeutende Rolle spielt möchte ich im Folgenden näher darauf eingehen:

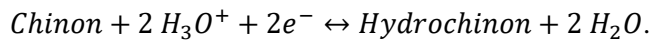
Um den pH-Wert einer Lösung genau zu messen oder einzustellen, gibt es zwei Möglichkeiten. Eine Möglichkeit ist die Messung mithilfe von Indikatoren (HInd). Indikatoren sind schwache organische Säuren oder Basen. Bei Protonierung und Deprotonierung durch Zugabe von Säuren oder Basen ändern sie ihre Farbe. Ein Beispiel für einen Indikator ist Lackmus, welches in Säuren rot wird und in Basen blau. Ist die Lösung neutral, entsteht eine Mischung aus rot und blau. Allerdings sind Mischfarben schlecht mit dem Auge sichtbar, deshalb beschränkt man sich bei Indikatormessungen auf die optische Wahrnehmung der reinen Farben. Mit der Formel  $pH = pK_{Ind} \pm 1$  kann der Umschlagsbereich jedes Indikators berechnet werden. Aus dem Grenzwert  $\pm 1$  ist ableitbar, dass der Farbumschlag erst optisch erkennbar ist, wenn die Konzentration von HInd zehn Mal größer ist als die Konzentration von Ind<sup>-</sup> oder umgekehrt. Daher ist diese Messmethode sehr ungenau [129].

Etwas genauer ist die Messung mit Indikatorpapier, die in der Praxis oft verwendet wird. Dabei handelt es sich um Papierstreifen, welche mit Kombinationen von Indikatormischungen imprägniert sind. Mit Hilfe von Farbskalen kann dann der pH-Wert der Lösung, in welche der Papierstreifen eingetaucht wurde, relativ genau abgelesen werden [129].

Ist eine exakte Messung des pHs gewünscht, kann auf Elektroden zurückgegriffen werden. Diese Messungen basieren auf der pH-Abhängigkeit von Redox-Potentialen. So kann beispielsweise die Lösung mit einer Wasserstoffelektrode gegen das Potential einer Normalwasserstoffelektrode vermessen werden. [129]

## 1 Einleitung

Neben Wasserstoffelektroden gibt es auch Chinhydron-Elektroden mit dem Redoxpaar Chinon/Hydrochinon. Liegen beide Formen in gleicher Konzentration vor, nutzt man die Bezeichnung Chinhydron. Die zugrunde liegende Gleichung dieser Reaktion lautet



Wird eine inerte Platinelektrode in eine zu messende Lösung getaucht, welche Chinon und Hydrochinon in gleicher Konzentration enthält, hängt das Potential der Halbzelle nur vom pH der Messlösung ab. Dies ist herleitbar aus der Nernst Gleichung, welche die Abhängigkeit des Elektrodenpotentials einer Halbzelle von der Konzentration der Partner eines Redox-Paars beschreibt:

$$E = E^0 + \frac{0,06 \text{ V}}{z} \lg \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$$

Dabei ist E das wirksame Potential (in Volt) und  $E^0$  das Normalpotential (in Volt) [127,129].

Wendet man die Nernst Gleichung auf die Redoxreaktion zwischen Chinon und Hydrochinon an ergibt sich:

$$E = E^0 + \frac{0,06 \text{ V}}{2} \lg \frac{[\text{Chinon}][\text{H}_3\text{O}^+]^2}{[\text{Hydrochinon}]}$$

$$E = E^0 + 0,03 \text{ V} \lg \frac{[\text{Chinon}]}{[\text{Hydrochinon}]} + 0,06 \text{ V} \lg[\text{H}_3\text{O}^+]$$

$$E = E^0 + 0,03 \text{ V} \lg \frac{[\text{Chinon}]}{[\text{Hydrochinon}]} - 0,06 \text{ V} \text{ pH}$$

[129].

Nun kann die Halbzelle mit einer Bezugslektrode mit bekanntem Potential in Kontakt gebracht werden. Aus der Potentialdifferenz wird dann der pH-Wert ableitbar [129].

Des Weiteren können Glaselektroden genutzt werden. Auch hierbei wird mit einer Bezugslektrode und einer Ableitelektrode gearbeitet, allerdings nicht mit einem pH-abhängigen Redox-Paar. Stattdessen werden spezielle Glasmembranen in die Lösung eingetaucht und damit ein Potential erzeugt. Damit das Potential entstehen kann, muss die Membran innen und außen mit Lösungen benetzt sein, welche sich im pH-Wert unterscheiden. Dazu wird der pH-Wert innen mit Hilfe von Pufferlösungen stabilisiert. Dann werden die Elektroden positioniert: Die Ableitelektrode wird innen, in Membrannähe angebracht und reagiert auf pH-Änderungen der äußeren Membranseite. Sie leitet das entsprechende Potential weiter. Die Bezugslektrode wird außen in die Messlösung getaucht, ihr Potential ist nicht abhängig vom pH-Wert und kann an der Glasmembran abgegriffen werden. Durch Eichung erreicht man eine Proportionalität zwischen der gemessenen Potentialdifferenz und dem pH-Wert der Messlösung.[129]

## 1 Einleitung

Moderne Einstabmessketten beinhalten sowohl die Ableitelektrode als auch die Bezugselektrode und stehen über eine seitliche Membran mit der zu messenden Lösung in Kontakt [129].

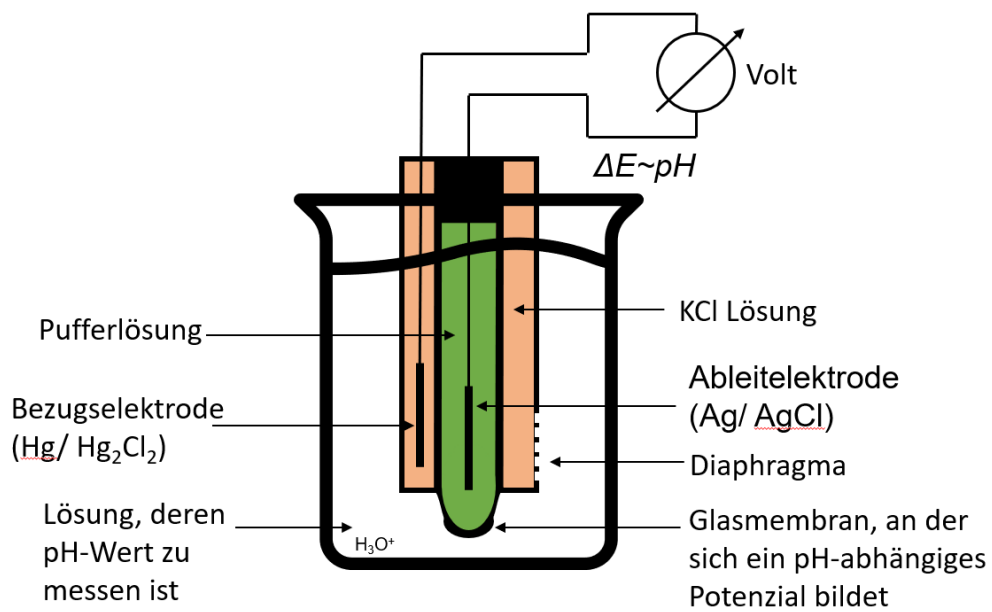


Abbildung 29: Glaselektrode zur Messung von pH-Werten



## 1 Einleitung

### 1.6 Ausblick

Die Ionenströme durch die oben genannten Ionenkanäle in den Erythrozyten erzeugen Schwankungen des pH-Wertes. Durch diese Veränderungen des pH-Wertes konnte ich die Ionenverschiebungen zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum der Erythrozyten darstellen und das Membranpotential der Erythrozyten errechnen. Dazu habe ich verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren genutzt, welche spezifisch auf die zu untersuchenden Kanäle wirken. Dieses Vorgehen möchte im Folgenden zeigen.

Weiterhin habe ich diese Methode bei Erythrozyten von Patienten angewendet, welche Mutationen in Genen tragen, die für bestimmte Ionenkanäle kodieren. Dadurch wollte ich die Unterschiede in den Funktionen von mutierten und gesunden Kanälen optisch messen. Außerdem habe ich durch diese Methode versucht, Sekundäreffekte von Mutationen zu erforschen.

Da sich somit auch eine Möglichkeit für die Diagnostik verschiedener Mutationen ergibt, welche jedoch aufwändig ist, wollte ich außerdem die pH-Messungen so weiterentwickeln, dass die pH Verschiebungen über pH-abhängige Floreszenzen am Konfokalmikroskop detektierbar sind. Damit wollte ich eine Schnelldiagnostik für Kanalmutationen entwickeln, bei der durch das Messen der Floreszenzen auf Multiwell-Platten mit vielen verschiedenen Wells innerhalb von wenigen Minuten die Erythrozyten von vielen verschiedenen Patienten gleichzeitig untersucht werden können.

## 2 Frage- und Aufgabenstellung

1. Etablierung der MBE-Methode an der Universität des Saarlandes
2. Ist eine Übertragung der MBE-Methode vom pH-Meter auf eine optische Messung am Konfokalmikroskop möglich?
3. Anwendung der MBE-Methode an Patientenproben und Charakterisierung der verschiedenen Mutationen in den Patientenerthrozyten: Ergeben sich Unterschiede in den Ergebnissen der Experimente an den Patientenproben verglichen mit gesunden Kontrollen?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verwendete Softwares

**Tabelle 1: Verwendete Softwares**

<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort der Firma</b>
Computersoftware zur optischen Messung der pH-Messungen	Arbeitsgruppen intern programmiert	Saarbrücken, Deutschland
Excel Programm	Microsoft	Redmond, WA, USA
Fiji Programm, Image J	Wayne Rasband, National Institute of Health	Bethesda, USA
Graph Pad Prism 9	Graph Pad	San Diego, CA, USA

##### 3.1.2 Verwendete Geräte und Gebrauchsgegenstände

**Tabelle 2: Verwendete Geräte und Gebrauchsgegenstände**

<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort der Firma</b>
Blutsenkungsgeschwindigkeits- (BSG) Pipetten nach Westgren	Sigmed	Mickiewiczza Cisek, Polen
ES Kompressen 5x5cm	Hartmann	Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Falkon 15ml	Greiner	Kremsmünster, Österreich
Falkon 50ml	Greiner	Kremsmünster, Österreich
Gefäßhalterung für 2ml (Milliliter) Reaktionsgefäße von Eppendorf	Arbeitsgruppenintern entworfen und produziert	Saarbrücken; Deutschland
Glasflasche 1000ml	Schott; VWR	Mainz, Deutschland; West Chester, Pennsylvania, USA
Kodanspray Tinktur forte farblos antiseptic	Schülke	Norderstedt, Deutschland
Nipkow Disk basiertes Konfokalmikroskopsystem	Andor Technologies	Belfast, UK
Reaktionsgefäß 15ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Lithium- Heparin S- Monovette 9ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Magnetfeld mit Wärmeplatte RCT basic	IKA	Staufen, Deutschland
Magnetrührstäbchen 8x3mm, zylindrisch	VWR	West Chester, Pennsylvania, USA
Messkolben 25ml	Labsolute	Renningen, Deutschland

### 3 Material und Methoden

Messkolben 50ml	Hirschmann EM	Eberstadt, Deutschland
µ-Platte Angiogenesis 96 Well	Ibidi	Gräfeling, Deutschland
µ- Slide Angiogenesis Glass bottom	ibidi	Gräfeling, Deutschland
Objektiv (20-fach, Luftobjektiv) für das Konfokalmikroskop	Nikon	Chiyoda, Tokio, Japan
Objektiv (40-fach, Luftobjektiv) für das Phasenkontrast Mikroskop	Nikon	Chiyoda, Tokio, Japan
Phasenkontrast Mikroskop	Nikon	Chiyoda, Tokio, Japan
pH- Elektrode In Lab Solids pro- ISM	Mettler Toledo	Giessen, Deutschland
pH-Kalibrierungslösung 4,01	Mettler Toledo	Giessen, Deutschland
pH-Kalibrierungslösung 10,00	Mettler Toledo	Giessen, Deutschland
pH- Meter Seven Compact S210	Mettler Toledo	Giessen, Deutschland
Pipette 0,1- 2,5 µl (Mikroliter), Modell Research plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipette 0,5-10 µl, Modell Research plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipette 2-20 µl, Modell Research plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipette 20-200 µl, Modell Research plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipette 100-1000 µl, Research plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1-2,5 µl, ep. T.I.P.S	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen universal 200µl, Easy load	Easy load; greiner bio- one	Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen universal 1000µl, Easy load	greiner bio- one	Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen 0,5-10ml, ep Dualfilter T.I.P.S.	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Sterile Safety- Multifly-Kanüle	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

### 3 Material und Methoden

Tischzentrifuge (Mini Zentrifuge LGG-uni CFUGE 5 with timer and digital display)	LGG Labware	Meckenheim, Deutschland
Tubes 1,5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tubes 2ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Universal 19x 40mm (Millimeter) Pflaster	Leukoplast	Hamburg, Deutschland
Vortex- Genie 2	Scientif industries	Bohemia, New York, USA
Windows- Computer, Software Version Windows 11 Home und Windows 10 Education	Windows	Redmond, Washington, USA
Zentrifuge Typ Z36 HK	Hermele Labor Technik	Wehingen, Deutschland

#### 3.1.3 Verwendete Chemikalien

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien**

<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort der Firma</b>
2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Acetoxymethyl Ester (BCECF)	Merck Sigma-Aldrich; Scbt	St. Luis, MO, USA Dallas, Texas, USA
4-Brom-Kalzium-Ionophor A23187 (4-Bromo A23187)	Cyman Cay20438-5	Ann Arbor, Michigan, USA
Bovines Serumalbumin; Rinderalbumin (BSA)	Merck Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
((3-Chlorphenyl)hydrazono)malonitril ( $\geq 97$ (TLC))	Merck Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
Deuterium Oxid (D <sub>2</sub> O)	Merck Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
Ethanol ( $\geq 99\%$ , vergällt mit 1% Methylethylketon)	Chemikalien-Zentrallager der Universität des Saarlandes	Saarbrücken, Deutschland
Hepes ( $>99,5\%$ )	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
KCl ( $\geq 99,5\%$ , p.a.; ACS, ISO)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
NaCl ( $\geq 99,5\%$ , p.a.; ACS, ISO)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
NS309	Merck Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
NS3623	Merck Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
(5-(-6)- Carboxy SNARF-1) (Snarf)	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Tram 34	Tocris	Pune, Indien
Triton X- 100	Merck Sigma-Aldrich	St. Luis, MO; USA
Valinomycin	Merck Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA
Yoda1	Sigma-Aldrich	St. Luis, MO, USA

### 3 Material und Methoden

Ringerlösungen	verschiedene Konzentration (nach folgenden Protokollen selbst gemischt)	Saarbrücken, Deutschland
----------------	---	--------------------------

#### 3.1.3.1 Zusammensetzung der Ringerlösungen in verschiedenen Konzentrationen:

NaCl Lösung: 0,4558 g auf 50 ml Milli Q Wasser

c (%) = 9,116 g auf 1l

= 0,9116 %

Massenkonzentration:

b= Masse pro Volumen: kg/ m<sup>3</sup>

= 0,009116kg/ 0.001 = 9.116 g/l

KCl Lösung: 0.2909 KCl auf 25ml Milli Q Wasser

= 11,637 g auf 1l

= 1,1637%

b= 0.011637kg / 0.001m<sup>3</sup>

= 11.6 g/l

**Tabelle 4: Zusammensetzung der Ringerlösungen in verschiedenen Konzentrationen**

Ringerlösung-Nr.	NaCl	KCl
1	1,54ml b= 8.974 g/l c= 0.15356 M	0.02ml b= 0.14919 g/l c= 2.00094 mM
2	1.46 ml b= 8.525 g/l c= 0.14588 M	0.1 ml b= 0.74596 g/l c= 0.01 M
3	1.31 ml b= 7.6538 g/l c= 0.13097 M	0.25 ml b= 1.8649 g/l c= 0.02501 M
4	1.06 ml b= 6.19 g/l c= 0.10592 M	0.5 ml b= 3.72981 g/l c= 0.05002 M
5	0.81 ml b= 1.62 g/l c= 0.02772 M	0.75 ml b= 5.59471 g/l c= 0.07504 M
6	0.02 ml b= 0.1168 g/l	1.54 ml b= 11.48781 g/l c= 0.15407 M

### 3 Material und Methoden

	$c = 1.998 \times 10^{-3} \text{ M}$ $= 1,998 \text{ mM}$	
--	--	--

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, handelt es sich bei dieser Ringerlösung um eine nominal Kalzium freie Lösung. Dennoch ist nach Berechnungen von Baunbæk und Bennekou (2008) davon auszugehen, dass ca. 4 bis 6  $\mu\text{M}$  Kalzium in der Lösung vorhanden sind [5].

### 3 Material und Methoden

#### 3.2 Methoden

##### 3.2.1 Die Macey- Bennekou- Egée- Methode (MBE-Methode)

Die Messungen des Membranpotentials von Erythrozyten wurden gemäß einer Methode durchgeführt, welche erstmals von Macey et al (1978) beschrieben wurde und später von Poul Bennekou genutzt und weiterentwickelt wurde (z.B. Baunbæk & Bennekou, 2008). Stéphane Egée nutzte und perfektionierte sie weiterhin in seinen Laboren [32] und verhinderte so, dass die Methode in Vergessenheit geriet. Daher wurde die Methode, nach diesen drei Herren, als MBE- Methode betitelt [57].

###### 3.2.1.1 Vorbereitung

Zur Durchführung des Experiments am pH-Meter wurde dem Patienten venös Blut mit 9 ml Lithium-Heparin S-Monovetten der Marke Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) abgenommen.

Das Blut aus den Reaktionsgefäßen wurde nun in 15 ml Falcon Röhrchen der Marke Greiner (Kremsmünster, Österreich) pipettiert und mit einem entsprechenden Gegengewicht bei 8000 relativer Zentrifugalbeschleunigung (rcf; relative centrifugal force;) und 25° Celsius drei Minuten lang zentrifugiert. Sowohl Beschleunigung als auch Abbremsrate wurden auf Stufe 9 eingestellt. Hierfür wurde die Zentrifuge Typ Z 36 HK von Hermle Labor Technik (Wehingen, Deutschland) genutzt.

Nach dem Zentrifugieren wurde das Plasma mit einer Pipette entnommen und 5 ml 0.9 %ige Kochsalzlösung hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde wenige Sekunden auf dem Vortex- Genie 2 von Scientif Industries (Bohemia, New York, USA) bei Stärke 10/10 geschüttelt und erneut bei denselben Einstellungen zentrifugiert. Im Anschluss wurde erneut der Überstand entfernt und der Waschvorgang zwei weitere Male wiederholt.

Die gepackten Blutzellen wurden im Thermomixer comfort von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) bei 35° Celsius und 540 Umdrehungen pro Minute (rpm; Revolutions per minute) bis zur Durchführung des Experiments gelagert.

Weiterhin wurde die Ringerlösung angesetzt. Hierzu wurde frisches Milli Q Wasser mit, Natriumchlorid ( $\geq 99.5\%$ ; p.a.; ACS; ISO; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Kaliumchlorid ( $\geq 99.5\%$ ; p.a.; ACS; ISO, von Carl Roth Karlsruhe, Deutschland) gemischt, die Konzentrationen variierten Protokoll abhängig.

Von der Ringer Lösung wurde pro durchzuführendem Experiment 1 ml in jeweils ein 2ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abgefüllt und ein Magnetrührstäbchen (zylindrisch, 8x3mm; VWR, West Chester, Pennsylvania, USA) hinzugegeben.



### 3 Material und Methoden

Außerdem wurde der Protonophor Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP;  $\geq 97\%$  (TLC), Sigma-Aldrich, St Luis, MO, USA) auf eine Konzentration von 18 mM hinzu pipettiert.

Das Gefäß wurde danach auf einem Magnetfeld mit Wärmeplatte in einer Halterung fixiert und bei 990 rpm auf 36° Celsius erwärmt.

Nun wurde das kalibrierte pH-Meter (SevenCompact S210, Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland) mit Lösungen für pH 4.01 und 10.01 kalibriert und die Elektrode (In Lab Solids pro-ISM, Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland) so tief in die Flüssigkeit eingetaucht, dass einerseits eine fehlerfreie Messung möglich war aber gleichzeitig weder der Magnetrührer berührt wurden noch Platzmangel beim zu pipettieren weiterer Substanzen entstand.

Die Elektrode wurde vor jeder Nutzung mit 99% Ethanol gesäubert.

#### 3.2.1.2 Durchführung

Jede Sekunde wurde ein pH-Wert gemessen und von einer speziell dafür entwickelten Computersoftware auf einem, mit dem pH-Meter verbundenem, Computer gespeichert.

Mit einer Stoppuhr wurden die Experimentdurchläufe synchronisiert.

Eine Minute nach Aufzeichnungsbeginn wurden 150  $\mu$ l gepackte rote Blutzellen in die Ringerlösung mit CCCP pipettiert und nach speziellen Protokollen verschiedene weitere Substanzen hinzugefügt. Mit einer Zugabe von Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurden die Erythrozyten lysiert, um eine Kalibrierung von 0 mV zu erreichen und darauffolgend die Aufzeichnung gestoppt.

#### 3.2.1.3 Auswertung

Die gespeicherten Daten wurden in Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) übertragen und die aufgezeichneten pH-Werte mit der Formel

$$mV = -61.5 * (pH_{out} - pH_{in})$$

in das Membranpotential umgerechnet. Hierbei ist  $pH_{out}$  der gemessene pH während des Experiments und  $pH_{in}$  der letzte pH-Wert, welcher sich nach Zellyse in der Aufzeichnung stabilisierte.

Abschließend wurden die Membranpotentiale im Programm Graph Pad Prism 9 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) gegen die Zeit als Graph aufgetragen.

#### 3.2.1.4 Protokolle der verschiedenen Experimente

Alle Angaben zu den Konzentrationen wurden für den Zeitpunkt nach ihrer Zugabe in die Gesamtlösung gemacht. Ausnahme bildet hier die Angabe zum Hämatokrit, welche für den Zeitpunkt nach Zell Lyse gemacht wurde, da erst zu diesem Zeitpunkt die vollständige Vermischung mit der Lösung stattfindet.

### 3 Material und Methoden

#### 3.2.1.4.1 Experiment zur Bestimmung des Kaliumpotentials

**Tabelle 5: Experiment zur Bestimmung des Kaliumpotentials**

Stoff	Konzentration (c) bei Zugabe ( $\mu\text{M}$ )	Entsprechende Zugabe bei Messung mit pH- Meter ( $\mu\text{l}$ )
Ringerlösung	z.B. Nr.1 (Konzentration NaCl und KCl siehe Tabelle oben)	1000
CCCP (18,08 mM)	27,2	1,66
BCECF (25 mM)	25	1
Gepackte Erythrozyten	8,4 % Hämatokrit (Hkt.)	100
NS3623 (54,6 mM)	13,6	0,274
Valinomycin (4,087 mM)	14,5	3,915
Triton X- 100 (13,23 $\mu\text{M}$ )	0,9	80

#### 3.2.1.4.2 Grundlegendes Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität

**Tabelle 6: Grundlegendes Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität**

Stoff	Konzentration (c) bei Zugabe ( $\mu\text{M}$ )	Entsprechende Zugabe bei Messung mit pH- Meter (ml)
Ringerlösung	z.B. Nr.1 (Konzentration NaCl und KCl siehe Tabelle oben)	1000
CCCP (18,08 mM)	27,2	1,66
BCECF (25 mM)	25	1
Gepackte Erythrozyten	13,0% Hkt.	50
4-Bromo A23187 (10 mM)	1	0,115
Tram 34 (10 mM)	10	1,15

### 3 Material und Methoden

Triton X- 100 (13,23 $\mu\text{M}$ )	0,9	80
---	-----	----

Beim Experiment mit verschiedenen 4-Bromo A23187 Konzentrationen (4.1.4.1.2) entspricht eine Konzentration von 5 $\mu\text{M}$  4-Bromo A23187 einer Zugabe von 0,575  $\mu\text{l}$  10 mM A23187bromo, eine A23187bromo Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  entspricht einer Zugabe von 1,15  $\mu\text{l}$  10mM A23187bromo, 15  $\mu\text{M}$  entsprechen 1,725  $\mu\text{l}$  A23187bromo und 20  $\mu\text{M}$  entsprechen einer Zugabe von 2,3  $\mu\text{l}$  A23187bromo.

#### 3.2.1.4.3 Verbessertes Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität

**Tabelle 7: Verbessertes Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität**

Stoff	Konzentration (c) bei Zugabe ( $\mu\text{M}$ )	Entsprechende Zugabe bei Messung mit pH- Meter ( $\mu\text{l}$ )
Ringerlösung	z.B. Nr.1 (Konzentration NaCl und KCl siehe Tabelle oben)	1000
CCCP (18,08 mM)	27,2	1,66
BCECF (25 mM)	25	1
Gepackte Erythrozyten	13,0% Hkt.	150
NS3623 (54,6 mM)	13,5	0,286
4-Bromo A23187 (10 mM)	1	0,115
Tram 34 (10 mM)	10	1,15
Triton X- 100 (13,23 $\mu\text{M}$ )	0,9	80

#### 3.2.1.4.4 Alternatives Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität

**Tabelle 8: Alternatives Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität**

Stoff	Konzentration (c) bei Zugabe (in $\mu\text{M}$ )	Entsprechende Zugabe bei Messung mit pH- Meter (ml)
Ringerlösung	z.B. Nr.1 (Konzentration NaCl und KCl siehe Tabelle oben)	1000
CCCP (18,08 mM)	27,2	1,66
BCECF (25 mM)	25	1
Gepackte Erythrozyten	13,0% Hkt.	150
NS309 (100mM)	50	0,6
Tram 34 (10 mM)	10	1,15

### 3 Material und Methoden

Triton X- 100 (13,23 $\mu\text{M}$ )	0,9	80
--------------------------------------	-----	----

#### 3.2.1.4.5 Weiteres Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität

**Tabelle 9: Weiteres Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität**

Stoff	Konzentration (c) bei Zugabe	Entsprechende Zugabe bei Messung mit pH- Meter ( $\mu\text{l}$ )
Ringerlösung	z.B. Nr.1 (Konzentration NaCl und KCl siehe Tabelle oben)	1000
CCCP (18,08 mM)	27,24	1,66
BCECF (25 mM)	25	1
Gepackte Erythrozyten	13,0% Hkt.	150
NS3623 (54,6 mM)	13,5	0,286
NS309 (100mM)	50	0,6
Tram 34 (10 mM)	10	1,15
Triton X- 100 (13,23 $\mu\text{M}$ )	0,9	80

#### 3.2.1.4.6 Experiment zur Untersuchung der Piezo1- Kanalaktivität

**Tabelle 10: Experiment zur Untersuchung der Piezo1- Kanalaktivität**

Stoff	Konzentration (c) bei Zugabe (in $\mu\text{M}$ )	Entsprechende Zugabe bei Messung mit pH- Meter ( $\mu\text{l}$ )
Ringerlösung	z.B. Nr.1 (Konzentration NaCl und KCl siehe Tabelle oben)	1000
CCCP (18,08 mM)	27,2	1,66
Gepackte Erythrozyten	13,0% Hkt.	150
Yoda 1 (a) 10 mM, verdünnt auf 626 $\mu\text{M}$ mit DMSO; b) 10 mM)	a) 625 nM b) 10 $\mu\text{M}$	1,15
Triton X- 100 (13,23 $\mu\text{M}$ )	0,9	80

### 3 Material und Methoden

#### 3.2.1.4.7 Erweitertes Experiment zur Untersuchung der Piezo1- Kanalaktivität

**Tabelle 11: Erweitertes Experiment zur Untersuchung der Piezo1- Kanalaktivität**

Stoff	Konzentration (c) bei Zugabe (in $\mu\text{M}$ )	Entsprechende Zugabe bei Messung mit pH- Meter ( $\mu\text{l}$ )
Ringerlösung	z.B. Nr.1 (Konzentration NaCl und KCl siehe Tabelle oben)	1000
CCCP (18,08 mM)	27,2	1,66
BCECF (25 mM)	25	1
Gepackte Erythrozyten	13,0% Hkt.	150
NS309 (100 mM)	50	0,6
Yoda 1 (a)10 mM, verdünnt auf 626 $\mu\text{M}$ mit DMSO; b) 10 mM)	a) 625 nM b) 10 $\mu\text{M}$	1,15
Triton X- 100 (13,23 $\mu\text{M}$ )	0,9	80

#### 3.2.1.4.8 Alternatives Experiment zur Untersuchung der Piezo1- Kanalaktivität

**Tabelle 12: Alternatives Experiment zur Untersuchung der Piezo1- Kanalaktivität**

Stoff	Konzentration (c) bei Zugabe	Entsprechende Zugabe bei Messung mit pH- Meter ( $\mu\text{l}$ )
Ringerlösung	z.B. Nr.1 (Konzentration NaCl und KCl siehe Tabelle oben)	1000
CCCP (18,08 mM)	27,2	1,66
Gepackte Erythrozyten	13,043% Hkt.	150
Yoda 1 (a)10 mM, verdünnt auf 626 $\mu\text{M}$ mit DMSO; b) 10 mM)	a) 625 nM b) 10 $\mu\text{M}$	1,15
Tram 34 (10 mM)	10	1,15
Triton X- 100 (13,23 $\mu\text{M}$ )	0,9	80

### 3 Material und Methoden

#### 3.2.2 pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit Berechnung des Fluoreszenzverhältnisses

##### 3.2.2.1 Vorbereitung

Zur Vorbereitung der pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop wurden mehrere Lösungen mit verschiedenen pH-Werten angesetzt. Dazu wurden hauptsächlich Ringerlösungen auf MilliQ-Wasser (Reinstwasser) Basis genutzt, die Nutzung von D<sub>2</sub>O (Merck Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) Ringerlösungen sowie Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS; Merck Sigma-Aldrich St. Luis, MO, USA) ist aber auch möglich. Diesen Lösungen wurde die gewünschte Konzentration eines pH-abhängigen Fluoreszenzstoffes zugegeben. Dazu wurde sowohl vom Fluoreszenzstoff BCECF (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(6)-Carboxyfluorescein, Acetoxymethyl Ester) (von Merck Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA; bzw. von Scbt, Dallas, Texas, USA) als auch vom Fluoreszenzstoff Snarf (Fisher Scientific GmbH; Schwerte, Deutschland) Gebrauch gemacht. Die Lösungen wurden durch Einpipettieren von Salzsäure (HCl) bzw. Natriumhydroxid (NaOH) und mit Hilfe eines kalibrierten pH-Meters (Seven Compact S210, von Mettler Toledo, Giessen, Deutschland) auf die gewünschten pH-Werte eingestellt. Kurz vor Durchführung der Messungen am Nipkow Disk basiertes Konfokalmikroskopsystem (Andor Technologies, Belfast, UK) wurden den Lösungen wenige Mikroliter Kochsalzlösung zugefügt, in welcher sich ein Tropfen unbearbeitetes Blut befand, welches zuvor durch einen Stich mit einer Lanzette in eine Fingerbeere gewonnen wurde. Dies diente der vereinfachten Fokussierung unter dem Konfokalmikroskop durch die Möglichkeit, einzelne Erythrozyten zu fokussieren.

##### 3.2.2.2 Durchführung

Zur Mikroskopie der Lösungen wurden diese auf  $\mu$ -Slide Glass bottom Objektträger (ibidi, Gräfeling, Deutschland) pipettiert und unter dem Objektiv (Nikon, Chiyoda, Tokio, Japan) platziert. Hierzu wurde eine 20-fache Vergrößerung mit einem Luftobjektiv gewählt. Nach Fokussieren der Flüssigkeit wurden Aufnahmen gemacht, bei welchen die Lösungen mit BCECF mit Lasern der Wellenlängen 488 nm und 405 nm angeregt wurden. Die Lösungen mit dem Farbstoff Snarf wurden mit den Lasern 488 nm und 561 nm belichtet. Neben Aufnahmen der fluoreszierenden pH-Lösungen wurden auch Aufnahmen von Ringerlösung ohne Farbstoff gemacht, um die Intensität der Helligkeit des Hintergrundes zu messen.

##### 3.2.2.3 Auswertung

Die Aufnahmen des Konfokalmikroskops wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Fiji von ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, USA) ausgewertet. Dazu wurden die Farbintensitäten der Aufnahmen gemessen und von den Ergebnissen wurde die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes subtrahiert. Weiterhin wurden die errechneten Daten aus den Aufnahmen von Laser eins (bei BCECF 488; bei Snarf 561) durch die Daten der Aufnahmen des zweiten Lasers (bei BCECF

### 3 Material und Methoden

405; bei Snarf 488) dividiert. Diese Verhältnisse wurden mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 9 vom Graph Pad (San Diego, CA, USA) in Graphen veranschaulicht.

#### 3.2.3 Phasenkontrast Mikroskopie von Erythrozyten und Beurteilung ihrer Form

##### 3.2.3.1 Vorbereitung

Zuerst wurde eine Ringerlösung (meist mit den Salzkonzentrationen der Ringerlösung Nr. 1) auf Basis von Deuterium Oxid, sogenanntes schweres Wasser (Merck Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) angesetzt und in ein 15 ml Falcon Röhrchen (Greiner; Kremsmünster, Österreich) pipettiert. Dann wurde dieser D<sub>2</sub>O Ringerlösung BSA (Merck Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) hinzugefügt, sodass das BSA in einer Konzentration von 0,5% in der Lösung vorlag. Weiterhin wurden mehrere Lösungen angesetzt, welchen in verschiedenen Mengen die D<sub>2</sub>O Ringerlösung mit BSA zugefügt wurde, sowie pures Deuterium Oxid. Die Konzentrationen wurden zwischen 80% D<sub>2</sub>O Ringerlösung mit 20% purem D<sub>2</sub>O und 100% D<sub>2</sub>O Ringerlösung mit 0% purem D<sub>2</sub>O gewählt. Dann wurde den Lösungen jeweils wenige Mikroliter Blut hinzu pipettiert, welches zuvor mit einer Lanzette frisch aus einer Fingerbeere entnommen wurde.

##### 3.2.3.2 Durchführung

Die verschiedenen Lösungen wurden nacheinander auf Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas versehen und unter dem Phasenkontrast Mikroskop (Nikon, Chiyoda, Tokio, Japan) mit einem 40er Luftobjektiv (Nikon, Chiyoda, Tokio, Japan) mikroskopiert. Dazu wurden Erythrozyten gesucht, welche jeweils im Querschnitt zu sehen waren. Weiterhin wurden Aufnahmen dieser Erythrozyten gemacht.

##### 3.2.3.3 Auswertung

Nach dem Mikroskopieren der Erythrozyten aus allen Lösungen wurden die Abbildungen analysiert. Dazu wurde nach der Form der Erythrozyten geschaut, vor allem, ob diese so genannte Spikes zeigten oder eine gesunde, runde bzw. diskusförmige Erythrozyten Form.

#### 3.2.4 Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären

Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium Permeabilität von zentrifugierten Überständen am Konfokalmikroskop mit Überprüfung der pH-Werte am pH- Meter

##### 3.2.4.1 Vorbereitung

Für die Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität von Überständen zentrifugierter Experiment-Lösungen am Konfokalmikroskop sowie parallel am pH-Meter waren Vorbereitungen nötig. Diese Vorbereitungen entsprachen denen derselben Messung mit der MBE-Methode am pH-

### 3 Material und Methoden

Meter (siehe 3.2.1). Wichtig ist dabei, dass auch der Fluoreszenzstoff BCECF, beispielsweise in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  zugegeben wird.

#### 3.2.4.2 Durchführung

Die grundlegenden Abläufe der Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin mit Zentrifuge stimmen mit denen überein, die für die MBE-Methode beschrieben wurden (s. 3.2.1.2). Vor Beginn der Messung wurde am Konfokalmikroskop eine Aufnahme des Hintergrundes durchgeführt. Beim Durchführen der Kalium Kalibrierung wurde sich nach dem zeitlichen Protokoll der Kalium Kalibrierung mit der MBE-Methode orientiert. Allerdings wurde zu dem Zeitpunkt, an dem bei der MBE-Methode normalerweise die nächste Substanz zugefügt wird, stattdessen das 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aus dem Wasserbad entnommen und für eine Minute bei 2000 rpm in einer Tischzentrifuge (Mini Zentrifuge LGG-uni CFUGE 5; LGG Labware, Meckenheim, Deutschland) zentrifugiert. Nach vollendeter Zentrifugation wurden 45  $\mu\text{l}$  des Überstandes entnommen und in eine Vertiefung eines  $\mu$ -Slide Glass bottom Objektträgers (ibidi; Gräfeling, Deutschland) pipettiert. Dann wurde der Objektträger unter einem Luft Objektiv mit 20-facher Vergrößerung (Nikon; Tokio, Japan) platziert und scharf eingestellt. Während der Anregung des Fluoreszenzstoffes BCECF mit den Lasern 405 und 488 nm wurden Aufnahmen generiert. Während dieser Aufnahmen wurde der pH-Wert der restlichen Lösung mithilfe des pH-Meters Seven Compact S210 (Mettler Toledo, Giessen, Deutschland) und der pH- Elektrode In Lab Solids pro- ISM (Mettler Toledo, Giessen, Deutschland) gemessen und dokumentiert. Nach Vollendung der Messungen am pH- Meter und Anfertigung der Aufnahmen am Konfokalmikroskop wurde das Reaktionsgefäß mit der zentrifugierten Experiment Lösung durch vorsichtiges Schwenken durchmischt und die nächste Substanz hinzugegeben. Bei Erreichen des Zeitpunktes, an dem die darauffolgende Substanz laut Protokoll der MBE- Methode zugegeben werden sollte, wurde das Zentrifugieren und die Messungen wiederholt.

Alternativ besteht die Möglichkeit, für jede Substanz, die hinzugegeben wird, das Experiment neu zu starten, sodass das 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit der Experimentlösung insgesamt nur einmal zentrifugiert werden muss und die Abläufe vor dem Zentrifugieren identisch sind mit denen bei Durchführung einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin mit der MBE-Methode. Dies hat den Vorteil, dass der Hämatokrit nicht im Laufe des Experiments, durch Abpipettieren des Überstandes zunimmt. Da ich gesehen habe, dass dies in den Ergebnissen der Experimentwiederholungen keine bedeutende Rolle spielt, es aber ein Vielfaches der Materialien kostet, habe ich mich dagegen entschieden.



### 3 Material und Methoden

#### 3.2.4.3 *Auswertung*

Die Fluoreszenzverhältnisse aus den Aufnahmen am Konfokalmikroskop wurden wie bei der pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop (3.2.2.3) beschrieben, berechnet. Weiterhin wurden die Verhältnisse und die Ergebnisse der Messungen am pH-Meter mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism 9 von Graph Pad (San Diego, CA, USA) veranschaulicht.

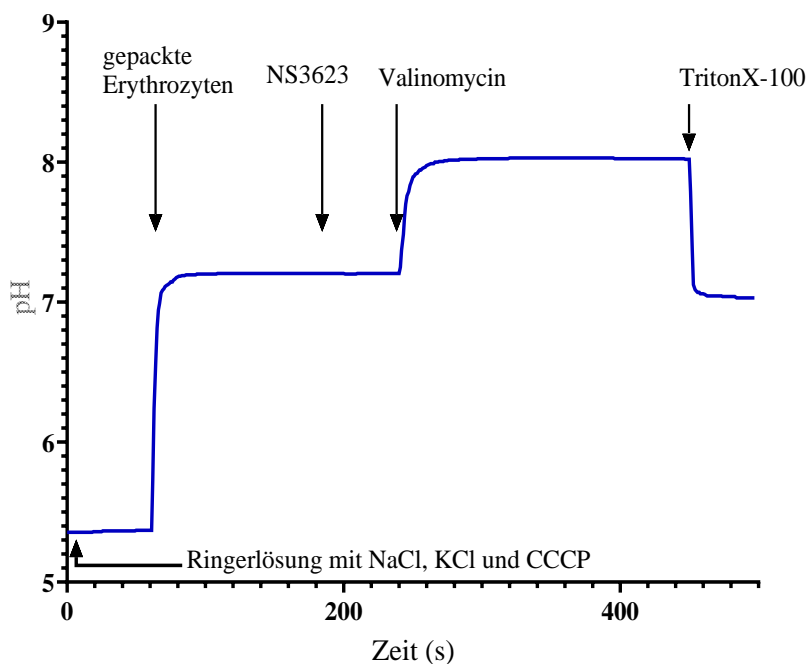
### 4 Ergebnisse

#### 4.1 Etablierung der MBE Methode

##### 4.1.1 Grundprinzipien der MBE Methode

Eines der Ziele dieser Doktorarbeit war es, die Die Macey-Bennekou-Egée-Methode (MBE-Methode) selbst im Labor zu etablieren. Dabei handelt es sich um eine Methode zur Messung des Membranpotentials von Erythrozyten, welche experimentell verschiedenen Substanzen ausgesetzt werden, die spezifisch die Aktivität verschiedener Ionenkanäle modifizieren.

#### Darstellung der pH Veränderungen während eines Experimentes mit NS3623, Valinomycin und TritonX- 100



**Graph 1: Beispielhafte pH-Messung während eines Experimentverlaufs mit NS3623, Valinomycin und TritonX- 100.**

In Graph 1 ist eine beispielhafte pH-Messung gezeigt, die während eines Experiments mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100 durchgeführt wurde.

In der ersten Minute nach Beginn der Messungen ist ein konstanter pH-Wert zu sehen, der ungefähr bei pH 5,35 liegt und den pH-Wert der Ringerlösung mit CCCP widerspiegelt. Die genaue Zusammensetzung der Ringerlösung ist im Methodenteil erklärt. Durch Zugabe von gepackten Erythrozyten zur Experiment-Lösung steigt der pH-Wert steil bis auf einen Wert von ca. 7,2 an, welcher später ins Ruhemembranpotential der Erythrozyten umgerechnet werden kann. Gepackte Erythrozyten beschreibt dabei die Tatsache, dass die Erythrozyten vor Zugabe zur Experimentlösung mithilfe von isotoner Natrium-Chlorid-Lösung und durch mehrere Zentrifugationen von Plasmabestandteilen befreit wurden und somit in einer sehr hohen Konzentration vorliegen, welche dem Hämatokrit gleichgesetzt werden kann.

Der beschriebene pH-Wert bleibt konstant und wird auch durch Zugabe des Anionen-Austausch-

## 4 Ergebnisse

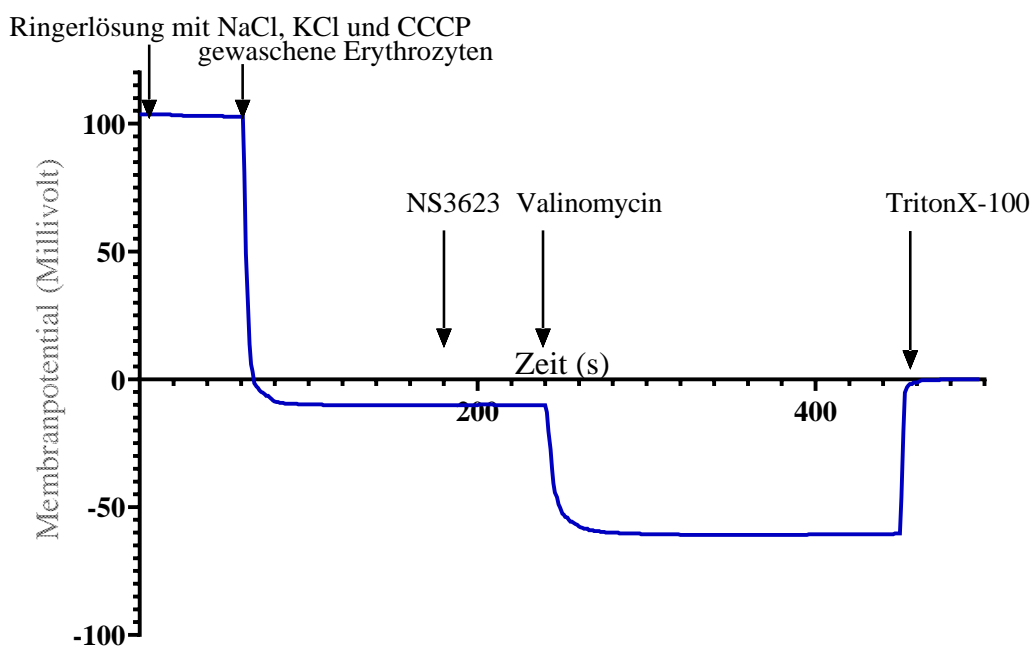
Inhibitors NS3623 nicht ausschlaggebend beeinflusst. Erst durch Zugabe des Kalium Ionophors Valinomycin steigt der pH-Wert ein weiteres Mal steil an, bis er bei ca. pH 8 ein konstantes Potential ausbildet.

Zuletzt führt die Zugabe von TritonX-100 zur Lyse der Erythrozyten. Durch die Zerstörung der Erythrozytenmembranen durch das seifenähnliche TritonX-100 gelangen die intrazellulären Bestandteile der Erythrozyten in die Ringerlösung und es stellt sich ein pH-Wert um pH 7 ein, der ungefähr dem im Intrazellulärraum der roten Blutzellen entspricht.

Mithilfe des pH-Wertes nach Zell Lyse und der in der Einleitung und dem Methodenteil erklärten Formel zur Berechnung des Membranpotentials ( $V_m = -61.5 * (pH_{out} - pH_{in})$ ) lässt sich aus den gemessenen pH-Werten das Membranpotential der Erythrozyten zu jedem Zeitpunkt des Experiments ausrechnen. Durch Auftragung dieser Werte gegen die Zeit lässt sich ein Graph zur Darstellung der Veränderungen des Membranpotentials der Erythrozyten während des Experiments erstellen. Zur Veranschaulichung möchte ich den mit den pH-Werten aus Graph 1 berechneten Membranpotentialverlauf zeigen.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werde ich im folgenden Verlauf der Doktorarbeit nur noch die Graphen zum Membranpotential zeigen und erst mit der Zugabe der Erythrozyten zur Ringerlösung starten.

### Darstellung der Membranpotential Veränderungen während eines Experimentes mit NS3623, Valinomycin und TritonX- 100



Graph 2: Beispielhafte Veränderung des Erythrozyten Membranpotentials während eines Experimentverlaufs mit NS3623, Valinomycin und TritonX- 100.

## 4 Ergebnisse

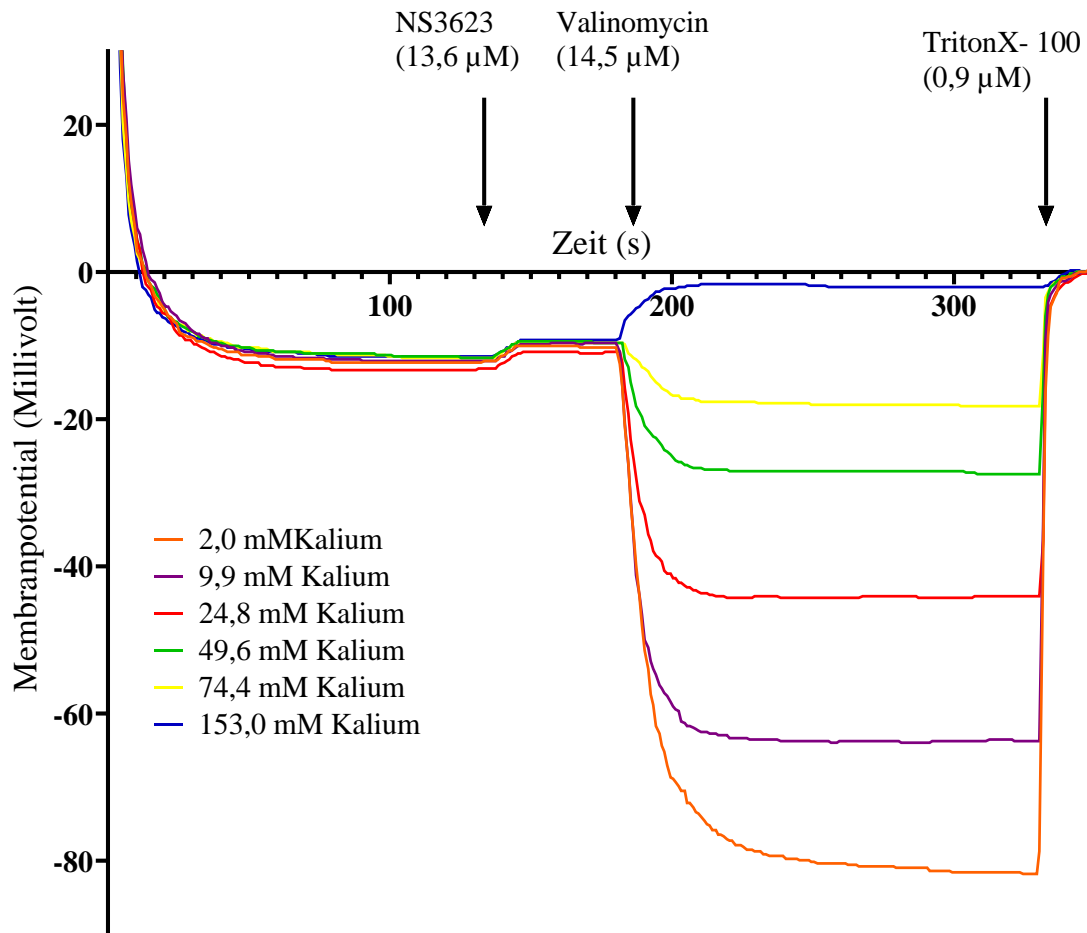
### 4.1.2 Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kaliumpermeabilität mittels Zugabe von Valinomycin

Um zu zeigen, dass die Methode funktioniert und nicht beliebige, sondern untereinander vergleichbare Ergebnisse zeigt, habe ich eine Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin mit der MBE-Methode durchgeführt. Dafür habe ich denselben Experimentaufbau mit sechs verschiedenen Ringerlösungen durchgeführt. Der Unterschied der Ringerlösungen bestand in ihren Kaliumkonzentrationen. So enthielt die erste Ringerlösung eine Kaliumkonzentrationen von 2,0 mM, die zweite eine Kaliumkonzentration von 9,9 mM, die dritte von 24,8 mM, die vierte von 49,6 mM, die fünfte von 74,4 mM und die letzte enthielt eine Kaliumkonzentration von 153,0 mM.

Weiterhin setzte ich zur Manipulation der Erythrozyten zuerst den Anionenaustauschhemmer NS3623 ein, um die Chlorid Leitfähigkeit zu blockieren und somit das isolierte Messen der Kaliumleitfähigkeit zu ermöglichen. Anschließend setzte ich zur Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit den Ionophor Valinomycin ein.

Da bei der geringsten Kaliumkonzentration (Ringerlösung Nr.1) der Kaliumgradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum am höchsten ist, war davon auszugehen, dass auch der Austausch der Kaliumionen zwischen Intra- und Extrazellulärraum bei dieser Ringerlösung am stärksten ist. Dies müsste sich bei Funktionieren der MBE-Methode wiederum in den stärksten pH- und somit Membranpotentialveränderungen widerspiegeln. Da die Kaliumkonzentration innerhalb der sechs Ringerlösungen verglichen zur Ringerlösung Nr.1 verschieden stark zunimmt, wollte ich weiterhin zeigen, dass die Reaktion auf den Kalium Ionophor Valinomycin in negativer Korrelation zur Kaliumkonzentration steht und somit ein Stufenmuster der verschiedenen Ringerlösungen entsteht.

### Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration



**Graph 3: Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität. Die Messungen wurden mit NS3623, Valinomycin, TritonX-100 und sechs Ringerlösungen mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen durchgeführt.**

Graph 3 zeigt die Schwankungen im Membranpotential bei der Durchführung der oben beschriebenen Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität. Die Experimente wurden durchgeführt mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100.

Auf der X-Achse des Liniendiagramms ist die Zeit in Sekunden abzulesen, dabei ist Sekunde null nicht mit dem Beginn der Messung, sondern mit dem Beginn der Erythrozyten Zugabe mit darauffolgender Einstellung des Ruhemembranpotentials gleichzusetzen. Auf der Y-Achse ist das Membranpotential der Erythrozyten abzulesen, angegeben in Millivolt.

Durch Pfeile mit Angaben zur Art der Manipulation und der Konzentration der betroffenen Stoffe ist erkenntlich, zu welchem Zeitpunkt NS3623, Valinomycin und TritonX-100 zugegeben wurden, sowie in welcher Konzentration die Stoffe nach Zugabe in der Lösung vorlagen.

#### 4 Ergebnisse

In verschiedenen Farben sind die Verläufe der Experimente mit den sechs verschiedenen Ringerlösungen dargestellt. So ist der Verlauf des Experiments mit Ringerlösung Nummer eins beispielsweise in orange ablesbar. Die Linien zeigen zu ihrer Kaliumkonzentration jeweils den Durchschnitt aus drei Messwiederholungen derselben Probe.

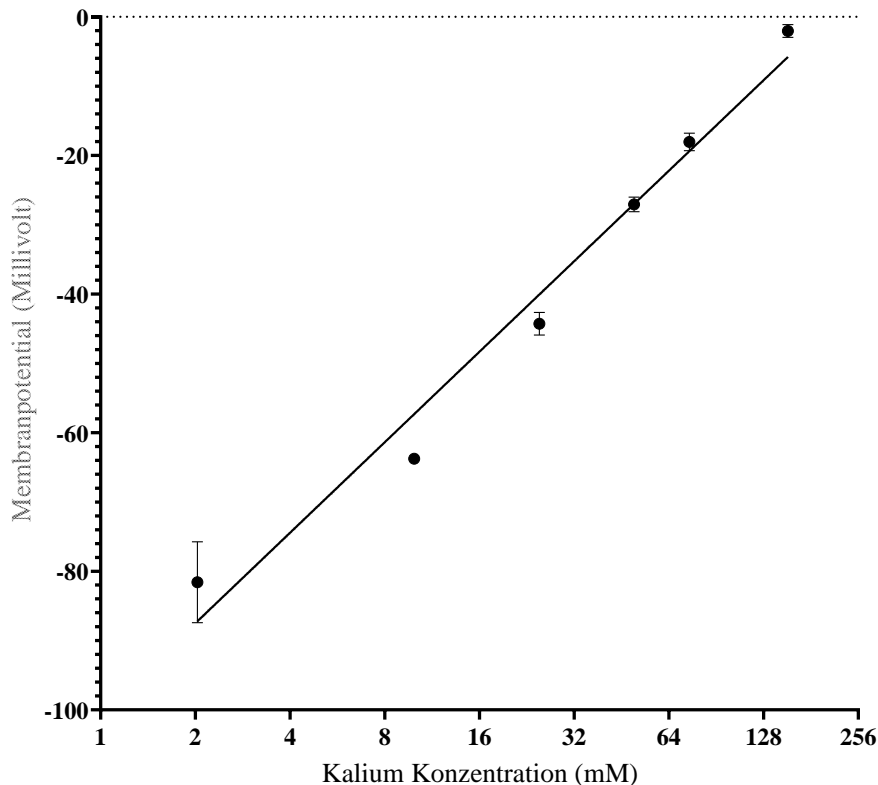
Vergleicht man die sechs Kurven, fällt auf, dass ihr Verlauf bis zur Zugabe von Valinomycin identisch ist und sie dadurch am Anfang kaum voneinander zu unterscheiden sind. Durch Zugabe der Erythrozyten entwickelt sich in jeder der sechs Lösungen ein Ruhemembranpotential von ca. minus 10 mV, welches durch Zugabe von NS3623 minimal ansteigt. Durch Zugabe von Valinomycin kommt es im Verlauf der Experimente mit den Ringerlösungen eins bis fünf zu verschieden starken Abfällen des Membranpotentials und in Ringerlösung sechs zu einem Anstieg des Membranpotentials. Die Reihenfolge in der Stärke der Reaktion auf die Valinomycin Zugabe steht in negativer Korrelation mit der Höhe der Kaliumkonzentration ihrer jeweiligen Ringerlösungen. Die Abstände der Plateaus nach Valinomycin Zugabe sind vergleichbar und belaufen sich auf jeweils ca. 20 mV, nur der Abstand zwischen den Plateaus der Ringerlösungen Nummer vier und fünf ist geringfügig schmaler.

Durch Zugabe von TritonX-100 kommt es bei jedem Experimentverlauf zur Zell Lyse und somit zum Steigen, bzw. Sinken des Membranpotentials auf 0mV, wo sich die Kurven aller Verläufe vereinen.

Um den Einfluss der Kaliumkonzentration in der Ringerlösung auf das Membranpotential der Erythrozyten nach Zugabe von Valinomycin zu untermauern, möchte ich einen weiteren Graphen anbringen, welchen ich auf Grundlage der Daten aus dem oben beschriebenen Experiment erstellt habe.

## 4 Ergebnisse

### Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration



**Graph 4:** Darstellung der Korrelation der Kaliumkonzentrationen in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe von Valinomycin bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität. Die Experimente wurden durchgeführt mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100.

Bei diesem Graphen handelt es sich um ein Diagramm, bei welchem das Membranpotential nach Zugabe von Valinomycin auf der Y-Achse aufgetragen ist, gegen die Kaliumkonzentration der Ringerlösung, in welcher das jeweilige Experiment durchgeführt wurde, auf der X-Achse. Dabei ist die Kaliumkonzentration in mM angegeben und auf einer Log<sub>2</sub>-Skala abzulesen.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der jeweils drei Experimentdurchläufe pro Kaliumkonzentration mit verschiedenen Blutproben. Sie sind mit einer semilogarithmischen Regressionslinie gefittet.

Das Membranpotential nach Valinomycin Zugabe steigt mit der Erhöhung der Kaliumkonzentrationen in den Ringerlösungen kontinuierlich an. Die Differenz ihres Minimalwertes (ca. minus 90 mV) und ihres Maximalwertes (ca. minus 1 mV) liegt bei ca. 90 mV.

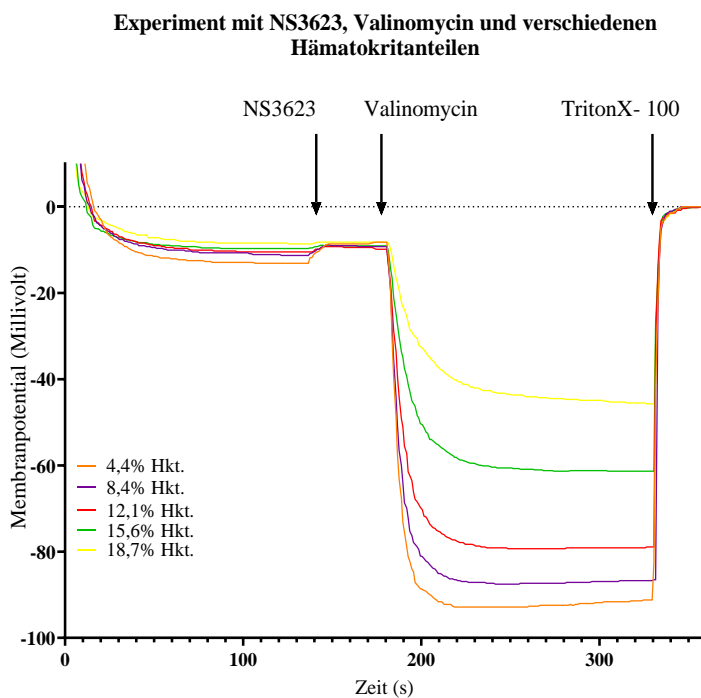
#### 4.1.3 Einfluss des Hämatokrit

Nach Beweis der korrekten Funktion der MBE-Methode wollte ich herausfinden, welche Menge gepackter Erythrozyten am geeignetsten für die Zugabe während der Experimente ist.

## 4 Ergebnisse

Auch Macay befasste sich mit dieser Frage. Er kam zu dem Ergebnis, die Hämatokrit Konzentration in der Lösung sei irrelevant für das Gelingen der MBE Methode, solange die Konzentration nicht unter 3 Prozent liege [78]. Mir war es wichtig, dies selbst zu evaluieren, da es für mich logischer erschien, dass durch einen hohen Hämatokrit insgesamt mehr Kaliumionen nach Zugabe des Kalium Ionophors Valinomycin, ihrem Konzentrationsgradienten folgend, in die Lösung diffundieren als bei einem geringeren Hämatokrit. Da das Membranpotential unter anderem stark von der Kaliumkonzentration abhängt, müsste der Hämatokrit einen Einfluss auf den Verlauf des Membranpotentials haben.

Um herauszufinden, ob die Menge der Erythrozyten im Experimentaufbau eine Rolle spielt, und wenn ja, welches der geeignetste Hämatokrit für diese Messungen ist, habe ich das Experiment mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100 mit verschiedenen großen Zugaben gepackter Erythrozyten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Graph 5 dargestellt.



**Graph 5: Verlauf des Experiments mit NS3623, Valinomycin, TritonX-100 und fünf verschiedenen Hämatokrit Konzentrationen zwischen 4 und 19% Hkt..**

In Graph 5 wird durch verschiedene Farben der einzelnen Kurven und ihrer Legende deutlich, welche Hämatokritkonzentrationen jeweils in den einzelnen Experimenten vorlagen. Beispielsweise liegt der orangen Kurve ein Experimentverlauf mit 4,4% Hkt. zugrunde. Die Experimente wurden jeweils mit einer Kaliumkonzentration von 2,0 mM in der Ringerlösung durchgeführt.

Es wurden drei Messwiederholungen der Experimente mit denselben Proben zu jedem Hämatokrit gemacht. Die verschiedenfarbigen Kurven zeigen jeweils den Durchschnitt dieser drei Messungen an.

Beschriftete Pfeile zeigen an, zu welchem Zeitpunkt die Erythrozyten mit welcher Substanz moduliert wurden. Da jeweils das Volumen von NS3623 (3  $\mu$ l einer 54,6 mM NS3623 Lösung) und



## 4 Ergebnisse

Valinomycin (3,915 µl einer 4,1 mM Lösung) sowie TritonX-100 (80 µl einer 13,2 mM Lösung) konstant gehalten wurde ergeben sich bei der Zugabe der verschiedenen Blutvolumina unterschiedliche Konzentrationen.

Der Verlauf aller fünf Kurven ist identisch. So liegt das Ruhemembranpotential bei allen Kurven jeweils bei minus 10 mV und durch Zugabe des Anionenaustausch Inhibitors NS3623 steigt das Membranpotential um wenige Millivolt an. Durch Zugabe des Kalium Ionophors Valinomycin erreichen alle Kurven ihren Minimalwert, auf welchem sie ein Plateau ausbilden. Dieses Plateau steigt bei den drei höchsten Hämatokrit-Werten sehr leicht wieder an, bis sich alle Kurven nach Zugabe von TritonX-100 und daraus folgender Zell Lyse bei Null Millivolt vereinen.

Wenn die Verläufe der Kurven auch prinzipiell gleich sind, ist doch ein wichtiger Unterschied sichtbar, welcher sich auf das Minimalpotential der einzelnen Kurven bezieht und somit auch auf die Höhe der Plateaubildung nach Valinomycin Zugabe. Denn je höher der Hämatokrit gewählt wurde, desto positiver ist der Bereich, in dem ein konstantes Potential ausgebildet wird. Beispielsweise fällt die orange Kurve, welche mit 4,4% Hkt. die geringste Erythrozyten Zugabe anzeigt, bis auf ca. minus 90 mV ab, während die gelbe Kurve, mit einem Hämatokrit von 18,7% schon bei ca. minus 45 mV stabil bleibt.

Weiterhin ist auffällig, dass die Abstände zwischen den Membranpotential Minima größer werden, je weniger gepackte Erythrozyten hinzugegeben wurden. Das bedeutet der Unterschied des Potentials zwischen 4,4% Hkt. und 8,4% Hkt. ist mit einer Differenz von ca. minus 15 mV deutlich größer als die Differenz der Plateaus bei Zugabe von 15,6% Hkt. und 18,7% Hkt., welche bei unter 10 mV liegt. Dies ist interessant, da die Unterschiede im Volumen der zugegebenen, gepackten Erythrozyten mit 50 µl jeweils gleich sind.

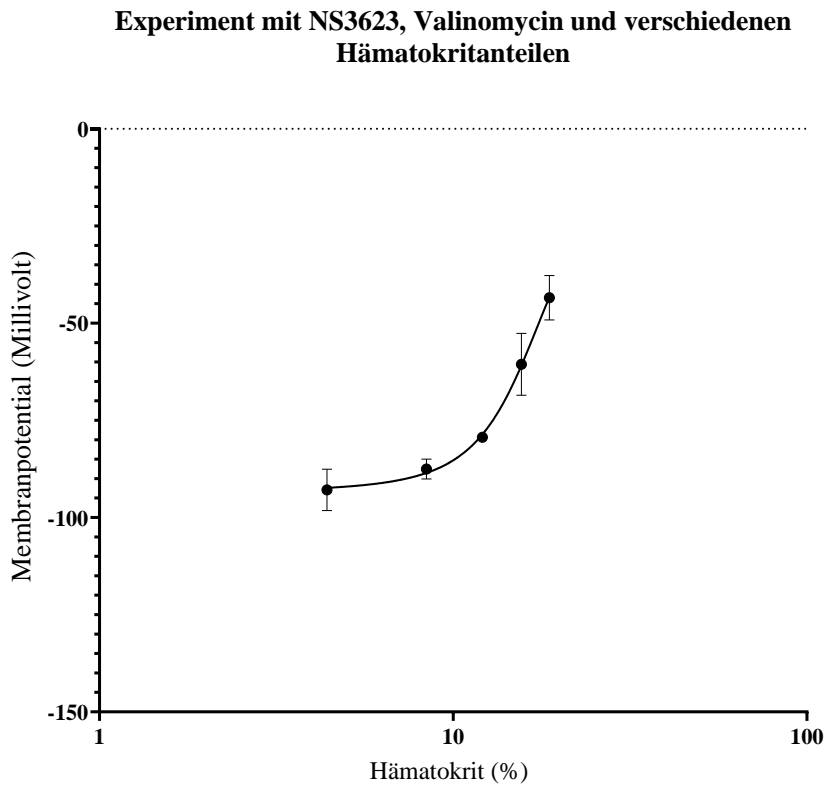
Um die Abhängigkeit der Membranpotential Minima von der Hämatokrit Konzentration in den Ringerlösungen besser darzustellen, habe ich in Graph 6 das Membranpotential nach Valinomycin Zugabe, auf der Y-Achse, gegen die jeweilige Hämatokrit Konzentration auf der X-Achse aufgetragen.

Die Angaben zum Membranpotential sind in Millivolt gezeigt, der Hämatokrit ist auf einer dekadisch logarithmischen Skala in Prozent dargestellt. Die Skala der logarithmischen Darstellung geht von eins bis 100, die Angaben zum Membranpotential sind auf einer Skala von 0 mV bis minus 150 mV eingezeichnet.

Die Durchschnittswerte der jeweils drei Messwiederholungen der Experimente mit denselben Proben sind als Punkte eingezeichnet und mit Fehlerbalken versehen, welche die Standardabweichung zeigen. Dass bei 12,1% Hämatokrit kein Fehlerbalken sichtbar ist, liegt daran, dass dieser schmaler ist als der Punkt für den Durchschnittswert. Die Punkte sind weiterhin mit einer Regressionslinie verbunden und zeigen einen sigmoidalen Kurvenverlauf.

## 4 Ergebnisse

Durch den sigmoidalen Kurvenverlauf wird unterstrichen, dass die Differenzen zwischen den Membranpotentialen nach Valinomycin Zugabe umso größer sind, je höher der Hämatokrit in der jeweiligen Messlösung ist.



**Graph 6:** Darstellung der Korrelation von Hämatokrit in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe von Valinomycin während einer experimentellen Manipulation der Erythrozyten mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100. Die verschiedenen Hämatokrit Anteile belaufen sich auf Werte zwischen 4,4 und 18,7% Hkt..

### 4.1.4 Kanal spezifische Experimentprotokolle

Um die MBE-Methode zur Funktionsanalyse spezifischer Ionenkanäle einzusetzen, habe ich Experimente mit verschiedenen, Kanal-spezifischen Aktivatoren und Inhibitoren durchgeführt. So konnte ich die für mein Ziel geeignetsten Protokolle entwickeln.

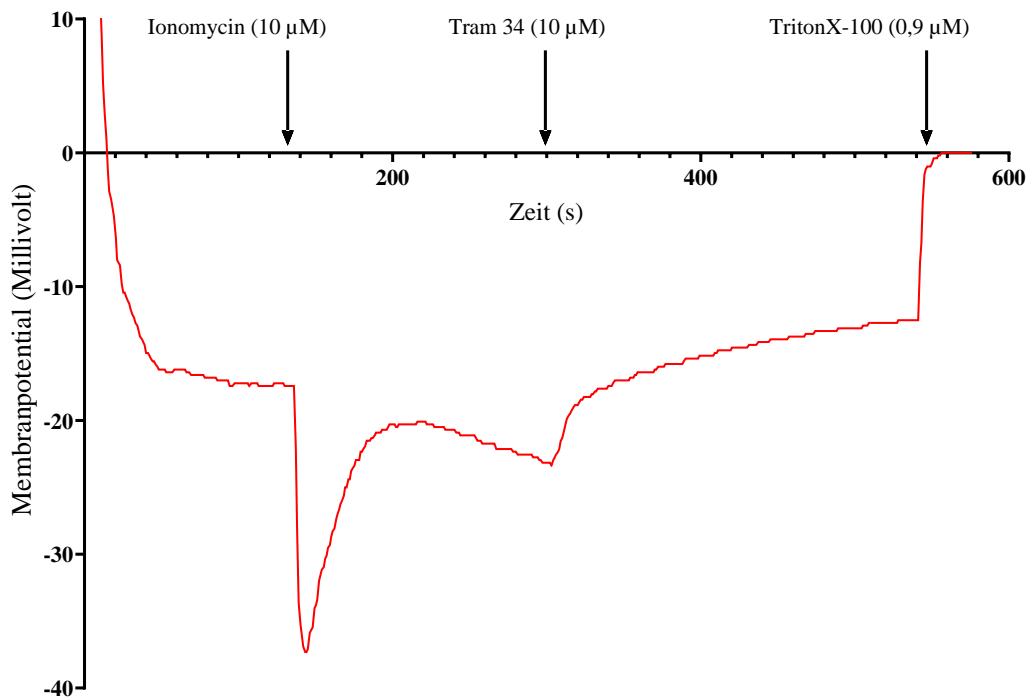
#### 4.1.4.1 Experimentprotokolle zum Gárdos- Kanal

##### 4.1.4.1.1 Vergleich verschiedener Kalzium Ionophore

Um das geeignetste Protokoll zur Evaluierung der Gárdos- Kanal Funktion zu finden, habe ich mich zunächst mit verschiedenen Kalzium Ionophoren befasst. Dazu habe ich sowohl Experimente mit Ionomycin gemacht als auch mit A23187bromo.

## 4 Ergebnisse

### Experiment mit Ionomycin, Tram 34 und TritonX-100



**Graph 7: Verlauf des Experiments mit Ionomycin, Tram 34 und TritonX-100.**

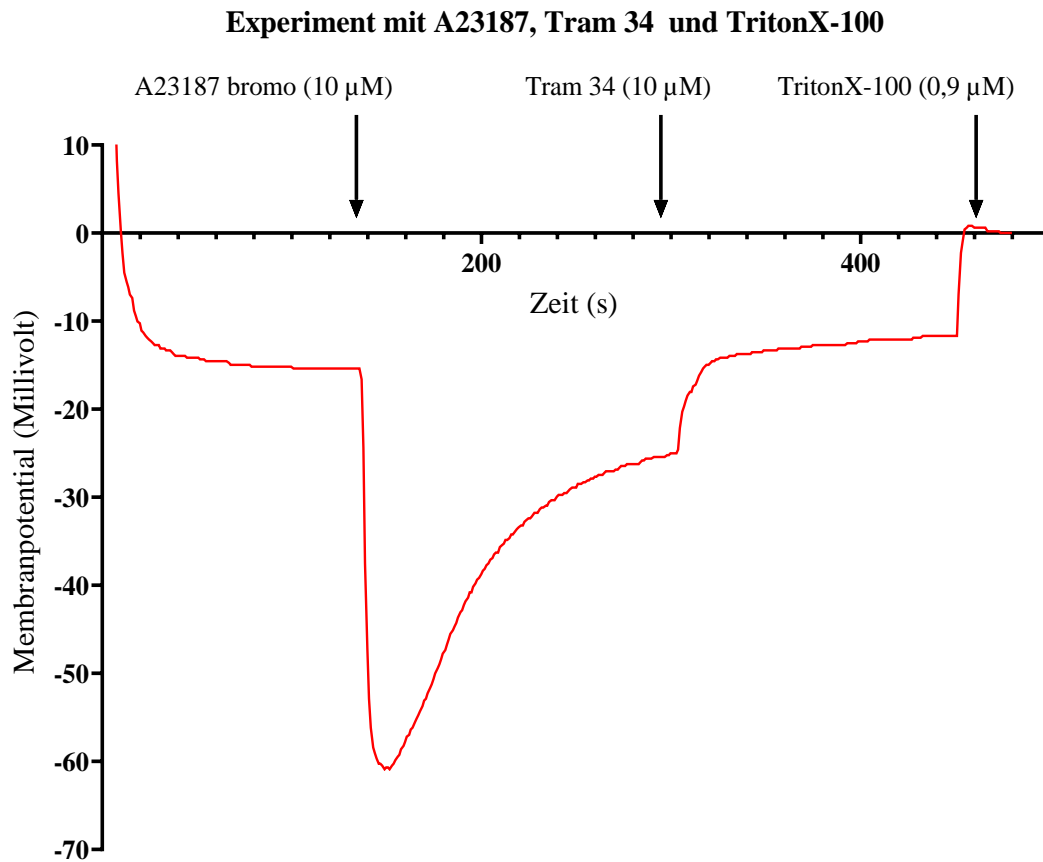
Graph 7 ist ein Liniendiagramm, welches die Membranpotentialschwankungen der Erythrozyten während eines Experiments mit dem Kalzium Ionophor Ionomycin, dem Gárdos- Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100 zur Lyse der Zellen zeigt.

Durch Pfeile und ihre Beschriftungen ist ersichtlich, zu welchem Zeitpunkt und in welcher Konzentration Ionomycin, Tram 34 und TritonX-100 hinzugegeben wurden. Das Experiment wurde mit jedem Hämatokrit jeweils dreifach mit derselben Blutprobe wiederholt. Die rote Linie zeigt den Durchschnitt dieser Messreihe.

Es ist erkennbar, dass das Membranpotential nach Ionomycin Zugabe steil abfällt, bei ca. minus 40 mV seinen Minimalwert erreicht und dann etwas weniger steil wieder ansteigt, bis es bei ca. minus 20 mV wenige Sekunden stabil bleibt um folgend wieder anzusteigen. Durch Zugabe von Tram 34 steigt das Membranpotential zunächst sehr steil, aber nach einigen Sekunden dann deutlich flacher wieder an. Aufgrund der Zell Lyse nach TritonX-100 Zugabe steigt das Membranpotential auf 0 mV an.

## 4 Ergebnisse

Exakt denselben Experimentaufbau habe ich weiterhin mit dem Kalzium Ionophor A23187bromo durchgeführt. Der Verlauf des Experiments ist in Graph 8 dargestellt.



**Graph 8: Verlauf des Experiments mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100.**

Auch bei Graph 8 handelt es sich um ein Liniendiagramm. In diesem Experiment Protokoll wurde als Kalzium Ionophor A23197bromo anstelle von Ionomycin genutzt. Die darauffolgende Zugabe des Gárdos- Inhibitors Tram 34 sowie TritonX-100 zur Zell Lyse und folgender Kalibrierung des Membranpotentials sind identisch wie im Experiment zu Graph 7.

Anhand von Pfeilen wird deutlich, zu welchem Zeitpunkt die Manipulation der Erythrozyten stattgefunden hat, und dass sowohl A23187bromo als auch Tram 34 nach Zugabe in die Ringerlösung in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  vorlagen.

Das Experiment wurde dreifach mit derselben Blutprobe durchgeführt. Die rote Kurve zeigt den Durchschnitt der Messreihe.

Aus dem Graphen ist ablesbar, dass sich zuerst ein stabiles Ruhemembranpotential entwickelt, welches durch Zugabe von A23187 steil abfällt, bis es bei ca. minus 60 mV sein Minimum erreicht und etwas flacher wieder ansteigt. Die Geschwindigkeit des Anstiegs nimmt immer weiter ab, bis die Kurve bei ca. minus 25 mV kaum noch steigt. Durch Zugabe des Gárdos- Kanal Inhibitors Tram 34 kommt es wiederum zu einem Anstieg des Membranpotentials, welcher auch zunächst steil verläuft

## 4 Ergebnisse

und dann immer weiter abflacht, bis er bei ca. minus 10 mV fast ein Gleichgewicht erreicht. Durch Manipulation der Zellen mit TritonX-100 kommt es zur Zell Lyse und damit zum erneuten Anstieg des Membranpotentials, bis es auf 0 mV das Ende der Messung erreicht.

Vergleicht man Graph 7 mit Graph 8, so ist ein prinzipiell ähnlicher Verlauf des Membranpotentials zu erkennen: Durch die beiden Kalzium Ionophore kommt es zum steilen Abfall des Membranpotentials, welches durch darauffolgendes steiles Ansteigen einen Peak zeigt. Allerdings liegt der Peak beim Experiment mit Ionomycin bei ca. minus 40 mV, während er beim Experiment mit A23187bromo bei ca. minus 60 mV liegt. Weiterhin entwickelt sich durch Zugabe von A23187bromo nach einiger Zeit ein Gleichgewicht, während nach Zugabe von Ionomycin das Potential, nachdem es wieder angestiegen ist, direkt wieder sinkt. Auch nach Zugabe von Tram 34 zeigt sich beim Experiment mit A23187bromo schnell ein konstantes Membranpotential, im Experiment mit Ionomycin fällt das Membranpotential dagegen langsam immer weiter ab und erreicht in der Zeitspanne des Experiments kein konstantes Membranpotential. Durch Zell Lyse mithilfe von TritonX-100 enden beide Experimente bei null Millivolt.

Da der Membranpotentialverlauf im Experiment mit A23187bromo schneller konstante Potentiale entwickelt und somit sowohl sauberer darstellbar ist als auch im Zeitaufwand der Experimente praktischer ist, habe ich mich für diesen Kalzium Ionophor entschieden und werde mich in folgenden Experimenten auf A23187bromo konzentrieren.

### 4.1.4.1.2 Bestimmung der geeignetsten A23187bromo Konzentration für Experimente mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100

Um die Reaktion der Erythrozyten auf die Zugabe des Kalzium Ionophors A23187bromo zu maximieren, erschien es mir wichtig die A23187bromo Konzentration mit der stärksten Reaktion im Membranpotential der Erythrozyten herauszufinden.

Dazu entwarf ich ein Experimentprotokoll, in welchem ich eine Hämatokrit Konzentration von 12,2% wählte, sowie vier verschiedene A23187bromo Konzentrationen: 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M sowie 20  $\mu$ M A23187bromo.

Als Konzentration für den Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 wählte ich wie bisher 10 $\mu$ M, da diese Konzentration in den Experimenten zuvor gut funktioniert hat, die Gárdos- Kanäle wieder zu schließen und so das Membranpotential auf positivere Werte zu verschieben.

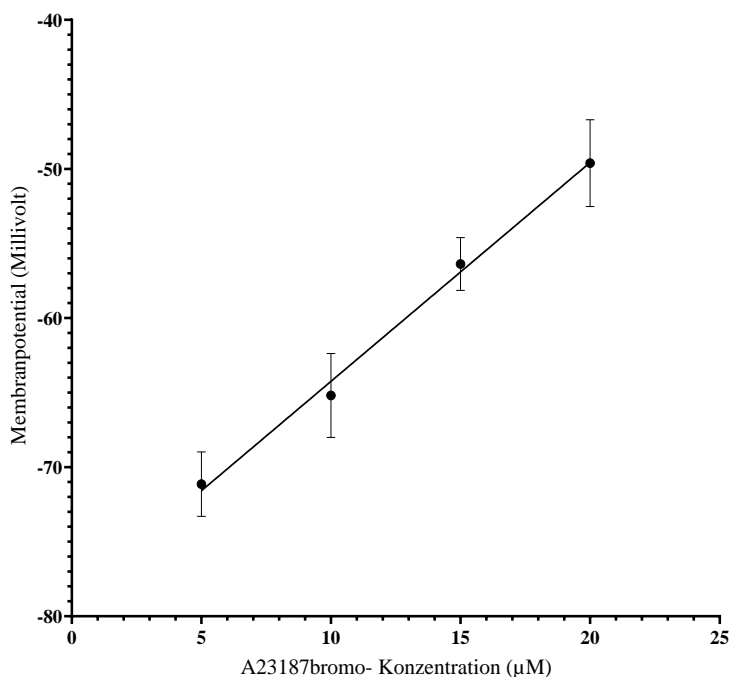
Die Membranpotentialverläufe während der experimentellen Manipulation der Erythrozyten sehen prinzipiell genauso aus wie der in Graph 8 dargestellte Membranpotentialverlauf. Es gibt nur zwei Unterschiede: Zum einen unterscheidet sich die Höhe der Membranpotentialminima durch A23187bromo Zugabe zwischen den verschiedenen Konzentrationen, wie es zuvor auch im Experiment mit den verschiedenen Hämatokrit Konzentrationen beobachtet werden konnte. Zum

## 4 Ergebnisse

anderen zeigt sich ein Unterschied in der Geschwindigkeit des Membranpotential Anstiegs nach Erreichen des Potentialpeaks. Da die Höhe des Membranpotentialminimums nach A23187bromo Zugabe für meine Arbeit die größere Relevanz darstellt, möchte ich mich zuerst damit befassen, um im Weiteren auch auf den Unterschied in der Geschwindigkeit des Membranpotentialanstiegs nach Erreichen des Minimums einzugehen.

Um die Unterschiede der Membranpotentialminima übersichtlich darzustellen, habe ich die Ergebnisse dieser Experimentreihe als Auftragung der A23187bromo Konzentration gegen die geringste Höhe des Membranpotentials nach A23187bromo Zugabe in Graph 9 zusammengefasst.

**Experiment mit A23187bromo, Tram 34 und verschiedenen A23187bromo Konzentrationen**



**Graph 9: Darstellung der Korrelation der A23187bromo Konzentration in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe dessen während einer experimentellen Manipulation der Erythrozyten mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100. Die gewählten A23187bromo Konzentrationen waren 5 µM, 10 µM, 15 µM und 20 µM.**

Graph 9 ist ein Liniendiagramm, welches den Einfluss der A23187bromo Konzentration beim Experiment mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100 auf das minimale Membranpotential nach A23187bromo Zugabe widerspiegelt.

Durch Punkte sind die Durchschnittswerte der Membranpotentiale dargestellt, welche sich aus einer dreifachen Wiederholung der Experimentdurchläufe mit den jeweils gleichen A23187bromo Konzentrationen und den gleichen Blutproben ergeben. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. Die Punkte sind durch eine lineare Regressionslinie verbunden und zeigen kaum Abweichungen von dieser Linie.

#### 4 Ergebnisse

Durch den linearen Anstieg der Kurve mit steigenden A23187bromo Konzentrationen wird deutlich, dass geringere Konzentrationen A23187bromo zu negativeren Membranpotentialen führen und somit zu einer stärkeren Reaktion der Erythrozyten auf den Kalzium Ionophor.

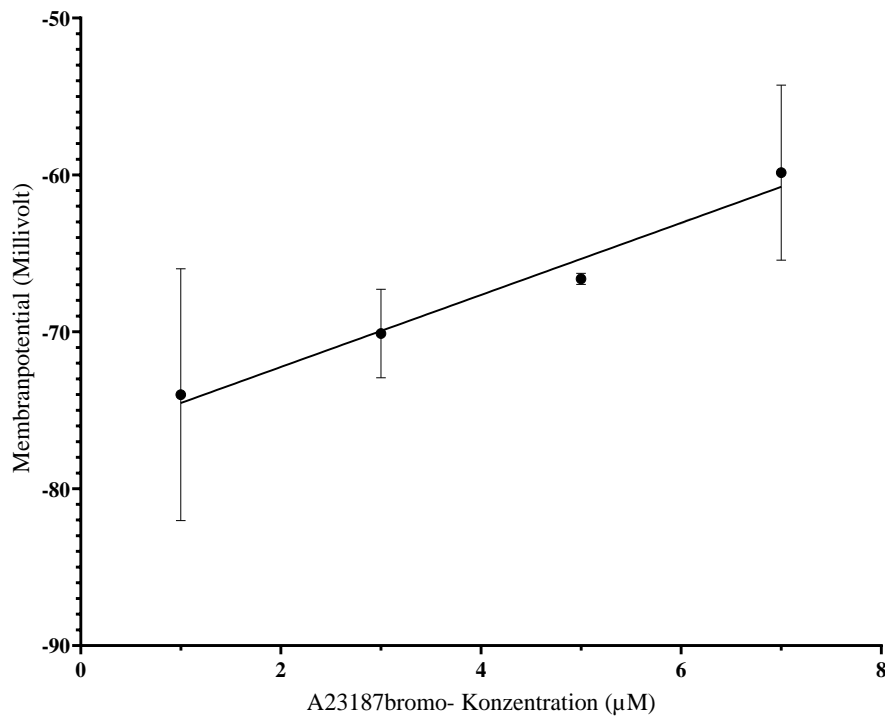
Weiterhin zeigt die Linearität des Verlaufes, dass das Membranpotential proportional zur sinkenden A23187bromo Konzentration fällt. Die Membranpotentialdifferenzen zwischen den verschiedenen Konzentrationsstufen, die in ihrer Konzentration jeweils 5  $\mu\text{M}$  voneinander abweichen, sind mit ca. 7,5 mV jeweils sehr ähnlich und unterstreichen diese Proportionalität.

Da die von mir gewählte niedrigste A23187bromo Konzentration die stärkste Veränderung des Membranpotentials zeigt, führte ich dasselbe Experiment mit niedrigeren A23187bromo Konzentrationen noch einmal durch, um sicher zu stellen, die geeignetste Konzentration mit dem negativsten Membranpotentialpeak zu finden. Dazu nutze ich wieder das Protokoll mit 12,2% Hämatokrit und 10  $\mu\text{M}$  Tram 34 aber dieses Mal die A23187bromo Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  sowie noch einmal 5  $\mu\text{M}$  und auch 7  $\mu\text{M}$ . Eine A23187bromo Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  entspricht dabei einer Zugabe von 0,115  $\mu\text{l}$  10mM A23187bromo, 3  $\mu\text{M}$  entsprechen 0,345  $\mu\text{l}$  A23187bromo Zugabe, 5  $\mu\text{M}$  entsprechen 0,575  $\mu\text{l}$  und 7  $\mu\text{M}$  entsprechen einer Zugabe von 0,805  $\mu\text{l}$  A23187bromo.

Die Ergebnisse dieser Experimentreihe habe ich wieder als Auftragung der A23187bromo Konzentration gegen die minimale Höhe des Membranpotentials nach dessen Zugabe aufgetragen. Sie sind in Graph 10 dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### Experiment mit A23187bromo, Tram 34 und verschiedenen A23187bromo Konzentrationen



**Graph 10: Darstellung der Korrelation der A23187bromo Konzentration in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe dessen während einer experimentellen Manipulation der Erythrozyten mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100. Die gewählten A23187bromo Konzentrationen waren 1 µM, 3 µM, 5 µM und 7 µM.**

Graph 10 zeigt auch die Korrelation der A23187bromo Konzentration in der Ringerlösung und der minimalen Höhe des Membranpotentials nach A23187bromo Zugabe.

Auch von diesem Experimentprotokoll sind für jede A23187bromo Konzentration drei Durchläufe mit jeweils derselben Blutprobe gemacht worden, deren Durchschnittswerte durch Punkte mit Fehlerbalken dargestellt sind, die die Standardabweichung darstellen.

Wie auch in Graph 9 sind die Durchschnittswerte durch eine lineare Regressionslinie verbunden, von welcher die Punkte nur minimal abweichen, und welche wieder mit steigender A23187bromo Konzentration ansteigt. Die Differenzen zwischen den Membranpotentialminima nach A23187bromo Zugabe liegen jeweils bei ca. 5 mV und zeigen damit eine Proportionalität, wobei die Differenzen zwischen 1 µM und 3 µM sowie zwischen 3 µM und 5 µM leicht unter 5 mV liegen und die Differenz zwischen 5 µM und 7 µM leicht über 5 mV liegt. Insgesamt sind die Differenzen des Membranpotentials zwischen den A23187bromo Konzentrationen, welche jeweils nur 2 µM voneinander abweichen aber gut mit den Differenzen zwischen den A23187bromo Konzentrationen in Graph 9 vergleichbar, welche mit ca. 7,5 mV zwar deutlich über 5 mV liegen, aber mit 5 µM auch einen größeren Abstand zwischen den einzelnen Konzentrationen hatten.

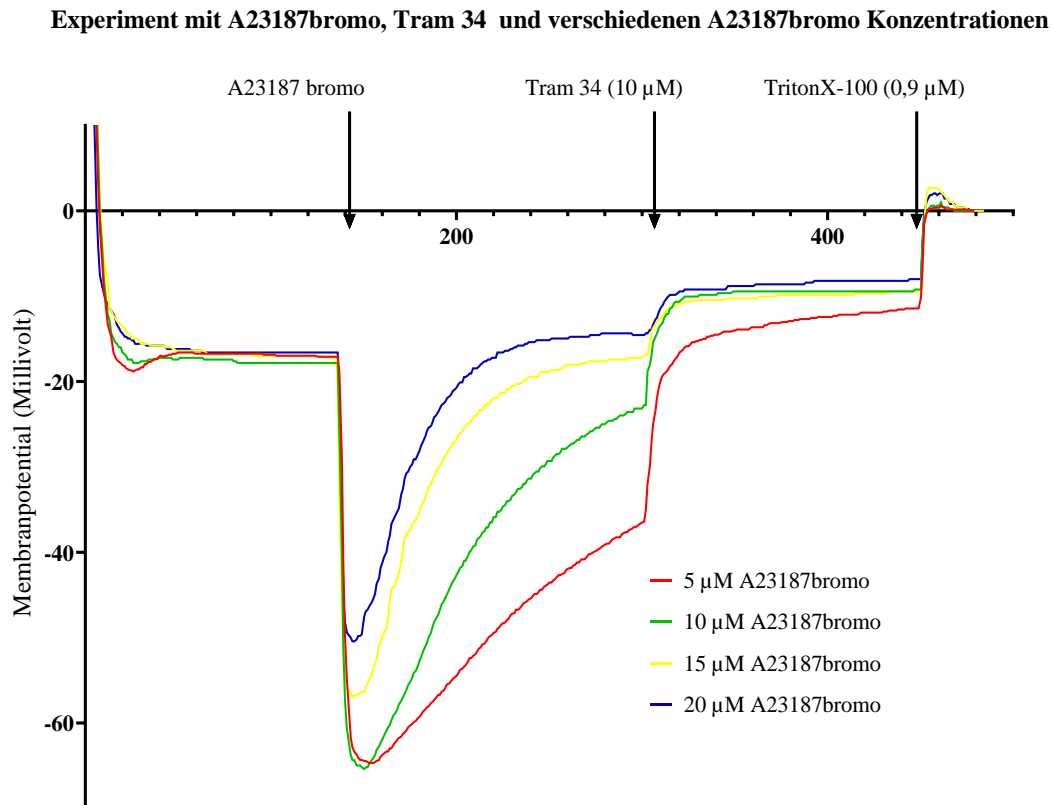
Wie auch in Graph 9 zeigt die geringste A23187bromo Konzentration den höchsten Ausschlag des Membranpotentials nach A23187bromo Zugabe und die höchste Konzentration die geringste Reaktion



## 4 Ergebnisse

auf die Zugabe, sodass ich mich entschieden habe in den weiteren Experimentprotokollen jeweils nur 1  $\mu\text{M}$  A23187bromo zuzugeben, um die höchstmögliche Reaktion der Erythrozyten zu erreichen.

Weiterhin möchte ich nun auf die Unterschiede in der Geschwindigkeit eingehen, mit der das Membranpotential der Erythrozyten nach Erreichen des Membranpotentialpeaks wieder ansteigt. Um diese zu veranschaulichen, möchte ich die Membranpotentialverläufe der Erythrozyten bei den oben beschriebenen Experimenten zeigen (Graph 11, Graph 12).



**Graph 11: Verlauf des Experiments mit A23187bromo, Tram 34, TritonX-100 und verschiedenen A23187bromo Konzentrationen zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$ .**

Graph 11 zeigt den Membranpotentialverlauf der Erythrozyten während der oben beschriebenen Experimentreihe mit dem Kalzium Ionophor A23187bromo, dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34, TritonX-100 welches der Zell Lyse dient und verschiedenen A23187bromo Konzentrationen zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$ . Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf den Zeitpunkt direkt nach der A23187bromo Zugabe in der Ringerlösung.

In verschiedenen Farben sind die Membranpotentialverläufe der Erythrozyten mit den verschiedenen A23187bromo Konzentrationen in der Ringerlösung dargestellt. Dabei spiegelt jede Kurve den Durchschnittswert aus jeweils drei Messwiederholungen mit denselben Proben wider.

Anhand von Pfeilen ist abzulesen, zu welchem Zeitpunkt die Manipulation der Erythrozyten mit den Substanzen A23187bromo, Tram 34 (10  $\mu\text{M}$ ) und TritonX-100 stattfand.

#### 4 Ergebnisse

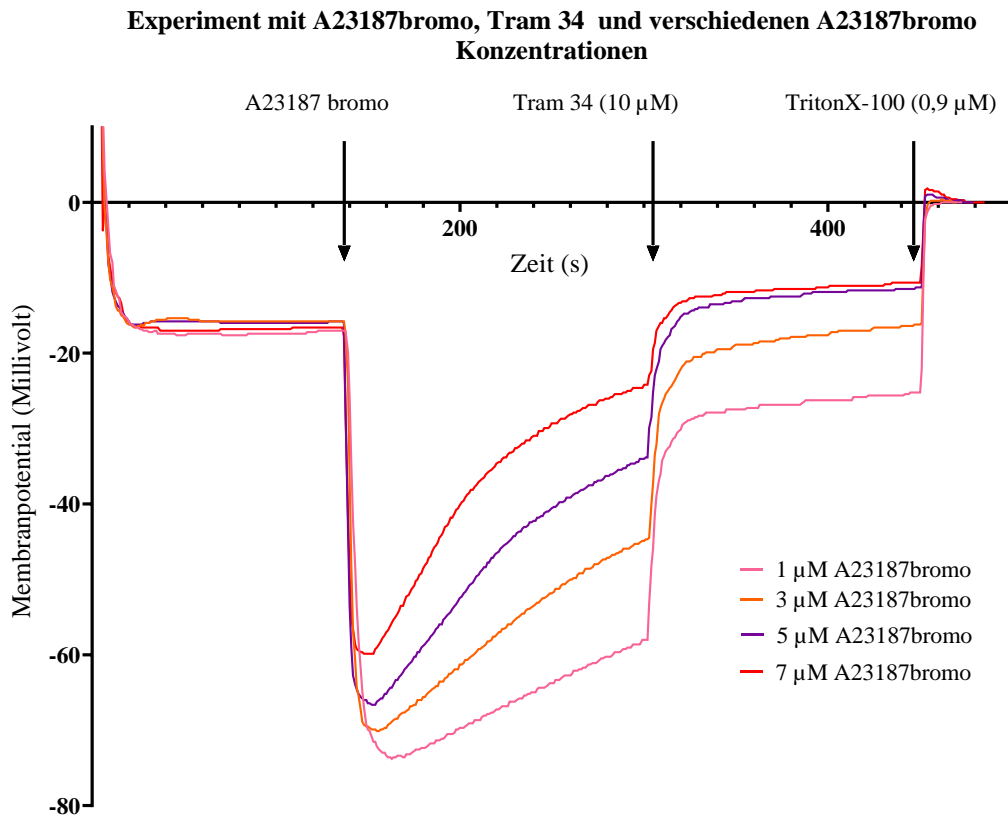
Wie oben bereits beschrieben ähneln sich die Membranpotentialverläufe in ihrer Reaktion auf die Zugabe von A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100 stark. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Kurven liegen in der Höhe des Membranpotentialauschlags nach A23187bromo Zugabe und der Geschwindigkeit des Potentialanstiegs nach Erreichen des Minimalwertes. Da ich erstgenanntes bereits in Graph 9 und Graph 10 gezeigt habe, möchte ich nun auf die Differenzen im Anstieg des Membranpotentials nach A23187bromo Zugabe eingehen.

Diesbezüglich ist in Graph 11 ersichtlich, dass mit steigender A23187bromo Konzentration das Membranpotential schneller und somit steiler wieder ansteigt. So steigt in den ersten 20 Sekunden nach Erreichen des negativsten Wertes durch Zugabe von A23187bromo das Potential bei 20  $\mu\text{M}$  A23187bromo mit 0,76 mV/s an, wohingegen der Anstieg bei 5  $\mu\text{M}$  A23187bromo eine Geschwindigkeit von 0,15 mV/s zeigt.

Dieses Phänomen zeigt sich auch bei den niedrigeren A23187bromo Konzentrationen im Experiment mit 1 bis 7  $\mu\text{M}$  A23187bromo. Die Membranpotentialverläufe zu diesem Experiment sind in Graph 12 dargestellt, welcher im Aufbau identisch zu Graph 11 ist, nur dass die Skala auf der Y-Achse statt bis minus 70 mV bis minus 80 mV reicht und die Konzentrationen von A23187bromo kleiner gewählt sind.

Auch in Graph 12 steigt das Membranpotential des Experiments mit 7  $\mu\text{M}$  A23187bromo mit einer Geschwindigkeit von 0,35 mV/s in den ersten 20 Sekunden nach Erreichen des negativsten Wertes deutlich schneller an als das Membranpotential beim Experiment mit 1  $\mu\text{M}$  A23187bromo, bei dem die Geschwindigkeit bei 0,01 mV/s liegt.

## 4 Ergebnisse



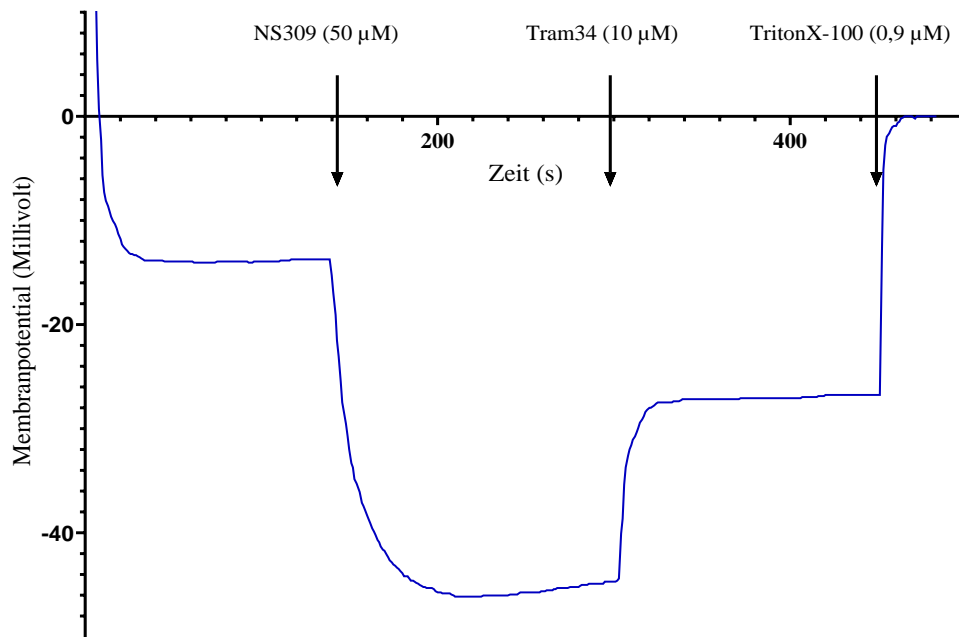
**Graph 12: Verlauf des Experiments mit A23187bromo, Tram 34, TritonX-100 und verschiedenen A23187bromo Konzentrationen zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 7  $\mu\text{M}$ .**

### 4.1.4.1.3 Experimente mit dem Gárdos- Kanal Aktivator NS309

Neben der indirekten Aktivierung des Gárdos- Kanals über Kalzium Ionophore wie A23187bromo und Ionomycin, welche es Kalzium Ionen ermöglichen in die Zelle zu strömen, wodurch die Öffnung des Gárdos- Kanals getriggert wird, gibt es auch NS309 als direkten Aktivator des Gárdos- Kanals. NS309 wirkt agonistisch auf den Gárdos- Kanal, indem es dessen Kalzium Sensitivität erhöht.

Um die Experimente am Gárdos- Kanal nicht nur mithilfe von Kalzium Ionophoren umzusetzen, sondern auch eine direkte Aktivierung zu ermöglichen habe ich Experimente mit NS309 durchgeführt. Den Membranpotentialverlauf zu diesem Experimentaufbau habe ich in Graph 13 dargestellt.

## 4 Ergebnisse



**Graph 13: Verlauf des Experiments mit NS309, Tram 34 und TritonX-100.**

Graph 13 zeigt den Verlauf des Membranpotentials von Erythrozyten während der experimentellen Manipulation mit dem Gárdos- Kanal Aktivator NS309, dem Inhibitor desselben Kanals, Tram 34, sowie TritonX-100.

Pfeile markieren die Zeitpunkte der experimentellen Manipulation. Außerdem sind sie mit den Namen der Substanzen beschriftet, die zugegeben wurden, sowie in welcher Konzentration sie zugegeben wurden. Aus den Beschriftungen ist abzulesen, dass die NS309 Konzentration 50  $\mu\text{M}$  betrug und die Tram 34 Konzentration 10  $\mu\text{M}$ . Der Hämatokrit betrug in diesem Experimentaufbau 12,2%, so wie es für die bisherigen Gárdos- Kanal Experimente am geeignetsten war.

Die blaue Kurve gibt den Durchschnitt der Ergebnisse aus sechs Durchführungen des Experiments an. Es ist erkennbar, dass das Membranpotential durch Zugabe von NS309 deutlich abfällt. Zuerst fällt es sehr schnell ab, im Verlauf des Abfalls verlangsamt sich dieser jedoch, bis bei ca. minus 50 mV das Minimum des Membranpotentials erreicht ist. Anders als beispielsweise bei der A23187bromo Zugabe steigt das Membranpotential nach Erreichen seines Peaks nicht direkt wieder steil an, sondern bleibt ungefähr auf dem Niveau seines kleinsten Membranpotentials und steigt nur sehr langsam wieder an. Erst durch Zugabe des Gárdos- Kanal Inhibitors Tram 34 steigt das Membranpotential schneller an, bis es bei ca. minus 28 mV ein Plateau ausbildet. Dieses konstante Potential wird erst durch Zugabe von TritonX-100 mit folgender Lyse der Zellen und Steigen des Membranpotentials auf die kalibrierten 0mV durchbrochen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1.4.2 Experimentprotokolle zum Piezo1- Kanal

#### 4.1.4.2.1 Experimente mit dem Piezo1-Kanal Aktivator Yoda1 sowie mit dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34

Da ich nicht nur Experimente zum Gárdos- Kanal, sondern auch zu anderen Ionenkanälen machen wollte, habe ich mich auch mit der Aktivierung anderer Kanäle befasst. Ein für das Volumengleichgewicht der Erythrozyten sehr wichtiger Ionenkanal ist der Piezo1- Kanal.

Der Piezo1- Kanal ist ein mechanosensitiver, nicht selektiver Ionenkanal in der Zellmembran der Erythrozyten. Er kann, wie in der Einleitung beschrieben (s. 1.3.4.2) durch Yoda1 aktiviert werden und scheint durch Kalziumeinstrom die Öffnung des Gárdos- Kanals triggern zu können [18].

Um die Aktivität des Piezo1 Kanals darstellen zu können habe ich mithilfe der MBE- Methode ein Experiment durchgeführt, bei welchem ich die Reaktion des Membranpotentials der Erythrozyten auf den Piezo1 Agonisten Yoda1 beobachten konnte.

Um außerdem zu prüfen, ob die These von u.a. Danielczok et al. (2017) stimmt, und die Piezo1 Aktivität einen Einfluss auf den Gárdos- Kanal hat, habe ich dem Experimentprotokoll mit Yoda1 die Manipulation mit dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 hinzugefügt. Falls die Aktivität des Piezo1 Kanals, den Gárdos- Kanal aktiviert, sollte bei Zugabe des Gárdos- Inhibitors Tram 34 ein deutlicher Anstieg des Membranpotentials durch Schließen der Gárdos- Kanäle zu sehen sein.

Dazu habe ich eine Ringerlösung mit 2,0 mM Kalium angesetzt und 150 µl gepackte Erythrozyten (12,2% Hkt.) hinzugefügt. Diese habe ich weiterhin mit 1,15 µl 10 mM Yoda1 manipuliert, sodass die Konzentration von Yoda1 in der Ringerlösung 10 µM ergab. Im weiteren Verlauf habe ich außerdem Tram 34 in derselben Konzentration hinzugefügt. Zum Beenden des Experiments habe ich die Zellen mit TritonX-100 lysiert, um mithilfe des End-pH Wertes das Membranpotential kalibrieren zu können. Den Verlauf des Membranpotentials während dieses Experiments habe ich in Graph 14 dargestellt.

Graph 14 ist ein Liniendiagramm und zeigt den Verlauf des Experiments mit dem Piezo1 Agonisten Yoda1 sowie Tram34 und TritonX-100.

Pfeile markieren den Zeitpunkt der Zugabe von Yoda1, Tram34 und TritonX-100, ihren Beschriftungen ist außerdem zu entnehmen, dass Yoda1 und Tram34 nach Zugabe in einer Konzentration von 10 µM in der Ringerlösung vorlagen.

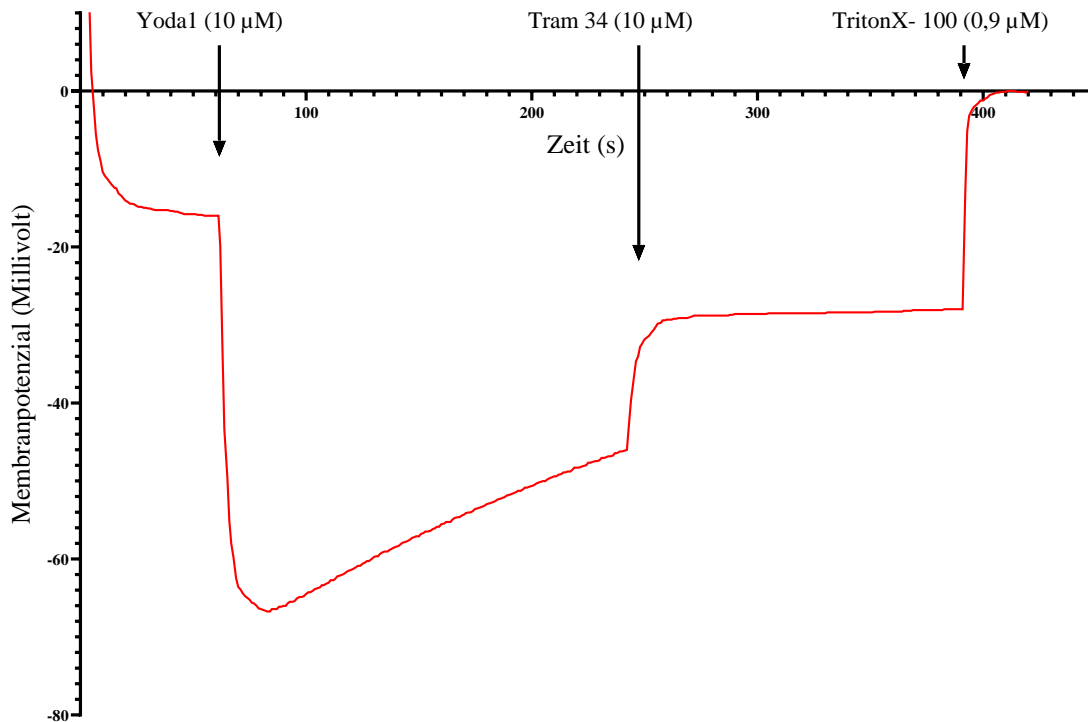
Die rote Kurve ergibt sich aus dem Mittelwert von sechs verschiedenen Experimentdurchläufen mit den Erythrozyten von zwei Personen, deren Proben jeweils für drei Durchführungen des Experiments genutzt wurden.

Der Verlauf zeigt nach dem Ruhemembranpotential einen starken Abfall bis ca. minus 70 mV durch die Zugabe des Piezo1 Aktivators Yoda1. Nach Erreichen dieses Minimal Membranpotentials steigt es

## 4 Ergebnisse

langsam, aber gleichmäßig wieder an. Durch Zugabe des Gárdos- Kanal Aktivators Tram 34 wird dieser gleichmäßige Anstieg durch einen sehr schnellen Anstieg unterbrochen, welcher bei ca. minus 30 mV stoppt, um ein Plateau auszubilden. Dieses konstante Potential wird erst durch die Zugabe von TritonX-100, zur Zell Lyse, durchbrochen, wodurch das Potential auf 0 mV ansteigt, der Wert, auf welchen es kalibriert wurde.

### Experiment mit Yoda1, Tram 34 und TritonX-100



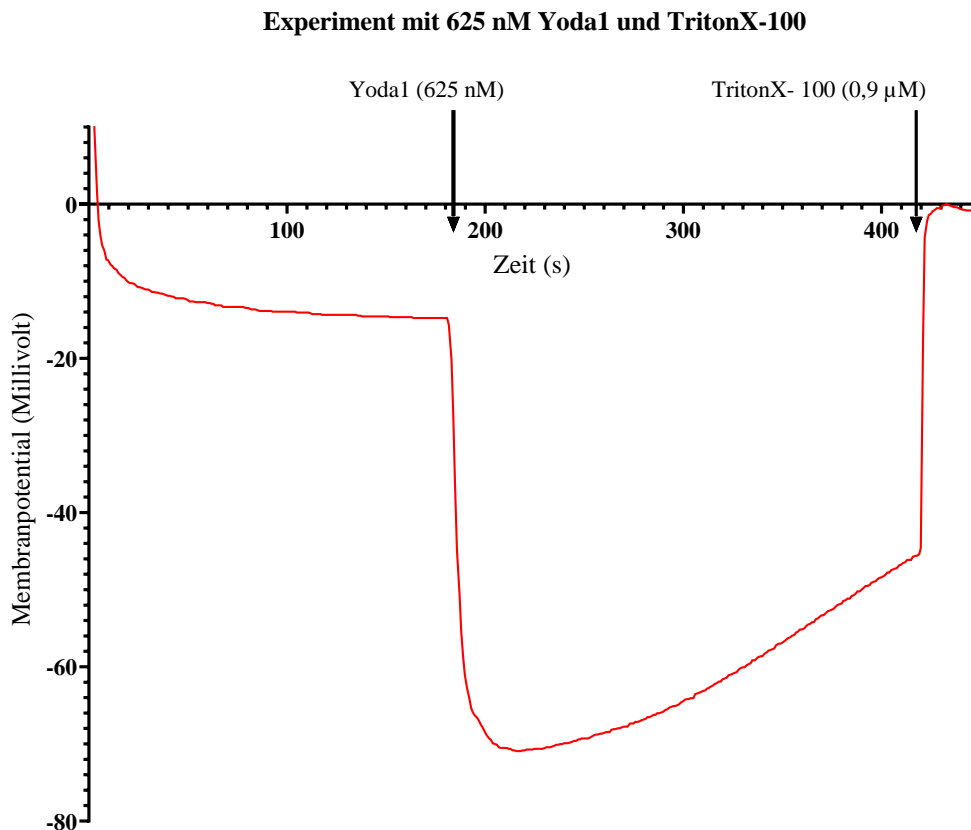
**Graph 14:** Verlauf des Experiments mit dem Piezo1 Agonisten Yoda1, dem Gárdos- Inhibitor Tram 34 und TritonX-100.

An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass ich, trotz Etablierung des Yoda1 Protokolls mit 10 μM Yoda1, bei Experimenten mit Patientenproben eines Kindes mit Piezo1- und Spektrin Mutation sowie mit Proben seiner Eltern, Yoda1 nicht auf eine Konzentration von 10 μM pipettiert habe, sondern nur eine Konzentration von 625 nM Yoda1 nach Zugabe in die Ringerlösung genutzt habe. Die Experimente mit Blutproben dieser Patientin und ihrer Eltern werden im weiteren Verlauf noch gezeigt.

Diese Veränderung in der Konzentration von Yoda1 ist damit zu begründen, dass die Konzentration von Yoda1 zur etwa halben Aktivierung des Gárdos-Kanals (IC50), also die Konzentration, bei der die Hälfte der maximal möglichen Reaktion des Gárdos-Kanals auf den Aktivator Piezo1 Aktivator Yoda1 erreicht wird, bei 625nM liegt. Der Gárdos-Kanal wird dabei dadurch aktiviert, dass Yoda1 den Piezo1 Kanal zum Öffnen bringt, welcher infolgedessen zum Kalziumeinstrom in die Erythrozyten führt, was wiederum den Gárdos-Kanal aktiviert. Diese Konzentrationsangabe basiert auf Dosis-Wirkungs-Messungen von David Monedero Alonso aus Roscoff [48]. Da über die Mutation dieser

## 4 Ergebnisse

Patientin nicht bekannt war, ob sie zu einer verstärkten oder verminderten Reaktion führt, und die Reaktion nur zu leichten Unterschieden führt und den Gárdos- Kanal nicht bspw. komplett blockiert, konnten durch die IC50 Konzentration kleinere Veränderungen des Membranpotentials in beide Richtungen aufgezeigt werden. Aufgrund von Unterschieden in den Verläufen der Membranpotentialkurven durch die verschiedenen Yoda1 Konzentrationen, möchte ich in Graph 15 den Verlauf des Membranpotentials bei Zugabe von 625nM Yoda1 zeigen.



**Graph 15: Experimentverlauf mit 625 nm Yoda1 und TritonX-100.**

Graph 15 stellt als Liniendiagramm den Verlauf des Membranpotentials von Erythrozyten während eines Experiments mit dem Piezo1 Agonisten Yoda1, in einer Konzentration von 625nM, und TritonX-100 zur Zell Lyse dar.

Es handelt sich hierbei um dasselbe Experimentprotokoll wie für Graph 14, nur ohne Tram 34, und um dieselbe Grundgestaltung des Graphen. Allerdings liegt einerseits hier nur eine Yoda1 Konzentration von 625nM vor, statt wie in Graph 14 von 10  $\mu$ M und andererseits erfolgte die Zugabe der einzelnen Substanzen zeitlich etwas versetzt.

Die rote Linie ergibt sich aus dem Durchschnittswert der Ergebnisse von zwei Probanden, mit deren Proben ich das Experiment jeweils dreimal durchgeführt habe. Pfeile über der Kurve geben den Zeitpunkt und die Art der Manipulation der Erythrozyten an.

#### 4 Ergebnisse

Es ist zu sehen, dass durch die Zugabe von 625 nM Yoda1 das Membranpotential deutlich abfällt, sogar bis ca. minus 70 mV. Darauffolgend steigt das Membranpotential ohne weitere Zugaben wieder an, in einem leicht konvexen Kurvenverlauf. Durch Zugabe von TritonX-100 endet das Experiment bei einem Membranpotential von 0 mV.

Im Vergleich zwischen Graph 14 und Graph 15 ist zu sehen, dass die Reaktionen auf die Zugabe von Yoda1 in 10  $\mu$ M und in 625 nM Konzentration jeweils gleich sind. So fallen beide Membranpotentialkurven nach Yoda1 Zugabe stark ab. Allerdings fällt die Kurve mit 625 nM Yoda1 bis auf ca. minus 70 mV ab und damit in einen deutlich negativeren Bereich als in Graph 14 mit 10  $\mu$ M Yoda1. Hier liegt das Minimum des Membranpotentials bei ca. minus 38 mV. Außerdem steigt das Membranpotential nach Erreichen seines tiefsten Punktes in Graph 15, also mit 625 nM deutlich langsamer an.



## 4 Ergebnisse

### 4.2 Optische Messung der MBE- Methode am Konfokalmikroskop

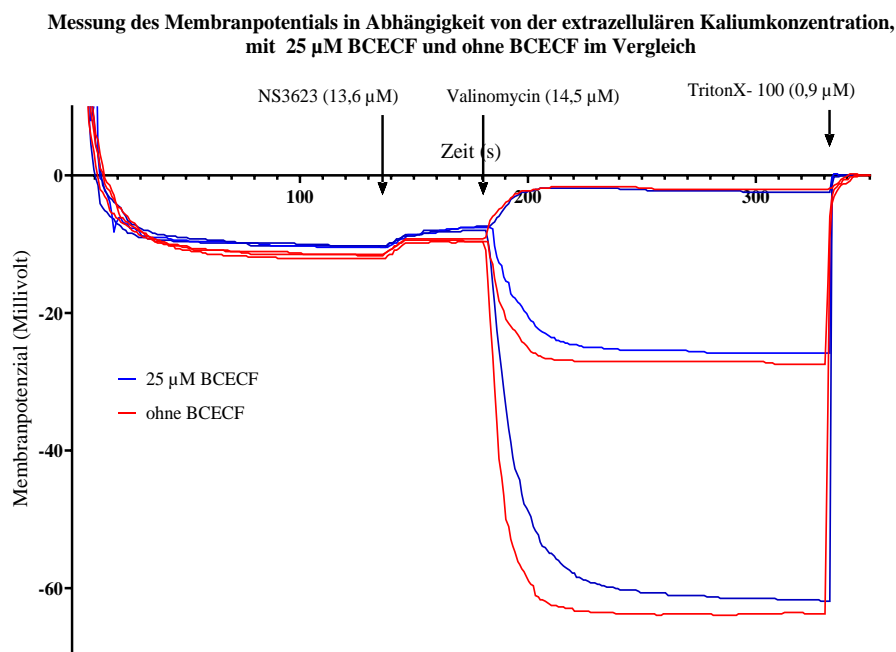
Nach der Etablierung der MBE-Methode im Labor an der Universität des Saarlandes war es mein Ziel, mithilfe von pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffen die Membranpotentialveränderungen am Konfokalmikroskop optisch zu messen, um ein schnelles Diagnostikverfahren für die Erkennung von Kanalmutationen in der Erythrozyten Membran zu entwickeln.

#### 4.2.1 Messungen mit der MBE- Methode und Fluoreszenzfarbstoffen

##### 4.2.1.1 Einfluss von BCECF auf die Ergebnisse von Experimenten mit der MBE-Methode

Um diese optische Messung zu ermöglichen, habe ich zunächst mit dem pH-abhängigen Farbstoff 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl) -5-(and-6) -Carboxyfluorescein (BCECF) Experimente am pH-Meter gemacht, um herauszufinden, ob die Zugabe dieses Stoffes in die Ringerlösung zu Veränderungen im Verlauf der Membranpotentialkurve führt.

Dazu habe ich Messungen des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100 einmal mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF und einmal ohne BCECF durchgeführt und die Verläufe des Membranpotentials in Graph 16 gemeinsam dargestellt. Da sich in der Etablierung der MBE-Methode für Experimente mit NS3623 und Valinomycin, einem Hämatokrit von 8,4% als am geeignetsten erwies, habe ich diese Konzentration auch hier gewählt.



**Graph 16:** Vergleich des Membranpotentialverlaufs während einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität durch Valinomycin-Zugabe. Die Messungen wurden mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF und ohne BCECF durchgeführt.

Graph 16 zeigt als Liniendiagramm den Membranpotentialverlauf von Erythrozyten während einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei

## 4 Ergebnisse

künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität. Die Experimente wurden mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100 sowie drei verschiedene Ringerlösungen mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen (9,9 mM, 49,6 mM, 153,0 mM Kalium) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Gegenüberstellung der Ergebnisse von Messungen mit 25  $\mu$ M des pH-abhängigen Farbstoffes BCECF sowie ohne BCECF.

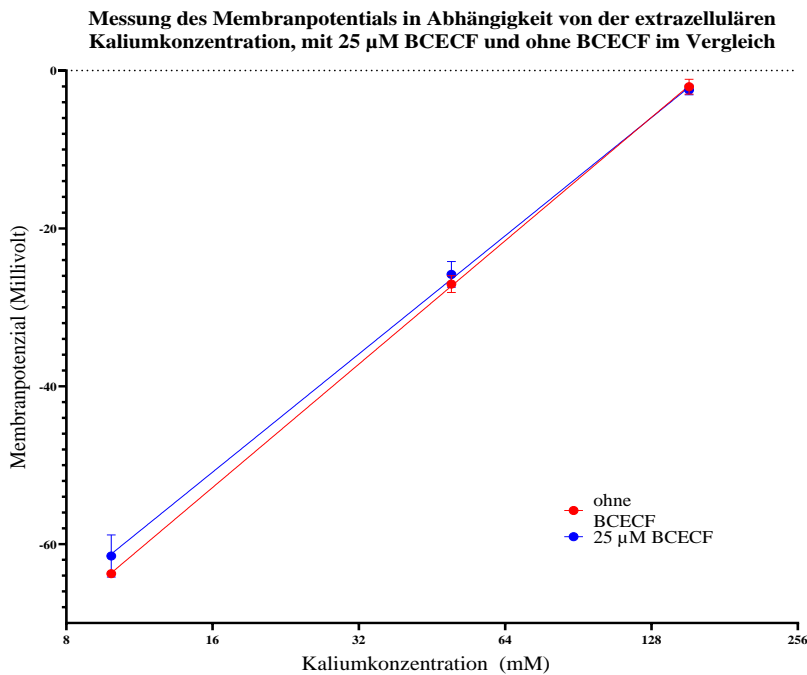
Die Zeitpunkte der Zugabe von NS3623, Valinomycin und TritonX-100 sind durch Pfeile mit jeweiliger Beschriftung gekennzeichnet. Ihnen ist auch zu entnehmen, in welcher Konzentration die Stoffe zugegeben wurden.

Durch rote Kurven ist der Verlauf des Membranpotentials während der Experimente ohne BCECF gekennzeichnet. In blau ist der Verlauf mit 25  $\mu$ M BCECF dargestellt. Zu jeder der drei Kaliumkonzentrationen in beiden BCECF Konzentrationen wurden drei Experimentwiederholungen mit denselben Blutproben gemacht, deren Durchschnittswerte den Kurvenverlauf bilden.

Im Vergleich der roten und blauen Kurven wird deutlich, dass es keine Unterschiede im prinzipiellen Kurvenverlauf gibt. Sowohl die roten als auch die blauen Kurven bilden ein Plateau durch das Erreichen des Ruhemembranpotentials, steigen durch Zugabe des Anionen-Austausch Inhibitors NS3623 leicht an und teilen sich durch Zugabe von Valinomycin, je nach Kaliumkonzentration in der Ringerlösung in drei Stufen auf, die jeweils ein konstantes Potential bilden, welches erst durch Zell Lyse nach TritonX-100 Zugabe durchbrochen wird und auf 0 mV steigt.

Dennoch sind auch Unterschiede zwischen den beiden BCECF-Konzentrationen erkennbar. Das Ruhemembranpotential zu Beginn des Experiments liegt bei allen roten Kurven leicht unter den blauen Kurven. Außerdem liegen die Werte aller blauen Kurven (mit BCECF) auch nach Zugabe von Valinomycin leicht über denen der Kurven ohne BCECF. Bei dieser Beobachtung fällt außerdem auf, dass die Abstände zwischen den beiden verschiedenfarbigen Kurven mit sinkender Kaliumkonzentration größer werden. So verlaufen bei der Ringerlösung mit 153 mM Kalium beide Kurven übereinander und zeigen fast keinen Unterschied, während bei der Ringerlösung mit 9,9 mM Kalium die größte Differenz zwischen beiden Membranpotentialverläufen zu erkennen ist. Um dieses Phänomen zu verdeutlichen, habe ich die Membranpotentiale nach Valinomycin Zugabe gegen die Kaliumkonzentration der betroffenen Ringerlösung aufgetragen und in Graph 17 gegenübergestellt.

## 4 Ergebnisse



**Graph 17:** Darstellung der Korrelation der Kaliumkonzentrationen in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe von Valinomycin bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität. Die Messungen wurden mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100 durchgeführt, zum Vergleich zwischen einer Ringerlösung mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF und einer Ringerlösung ohne BCECF.

Graph 17 stellt den Unterschied in der Korrelation von der Kaliumkonzentration in der Ringerlösung und der Höhe des Membranpotentials nach Valinomycin Zugabe bei einem Experiment mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF und einem Experiment ohne BCECF dar.

Durch jeweils drei Punkte mit Fehlerbalken sind die Durchschnittswerte und Standardabweichungen der Ergebnisse von jeweils drei Messwiederholungen der Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mit und ohne BCECF zu sehen. Außerdem sind die Durchschnittswerte einer BCECF-Konzentration durch eine halblogarithmische Regressionslinie verbunden.

Die roten Punkte stehen für die Ergebnisse der Messungen ohne BCECF und die blauen Punkte für die Messungen mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF. Es ist zu sehen, dass sich bei beiden BCECF Konzentrationen das Membranpotential nach Valinomycin Zugabe mit steigender Kaliumkonzentration null Millivolt annähert. Außerdem wird durch die halblogarithmische Regressionslinie deutlich, dass die Differenzen zwischen den Ergebnissen mit und ohne BCECF in der Ringerlösung bei Anstieg der Kaliumkonzentrationen abnehmen und sich die Ergebnisse bei 153 mM Kalium fast komplett überlagern. Weiterhin werden auch die Fehlerbalken mit steigender Kaliumkonzentration schmaler. Auch wenn die Differenzen zwischen den beiden BCECF Konzentrationen mit sinkender Kaliumkonzentration größer werden, so liegen die Membranpotentiale dennoch sehr nah beieinander.

## 4 Ergebnisse

### 4.2.1.2 *Einfluss verschiedener BCECF Konzentrationen auf die Messung des Membranpotentials mit der MBE-Methode, in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität durch Zugabe von Valinomycin*

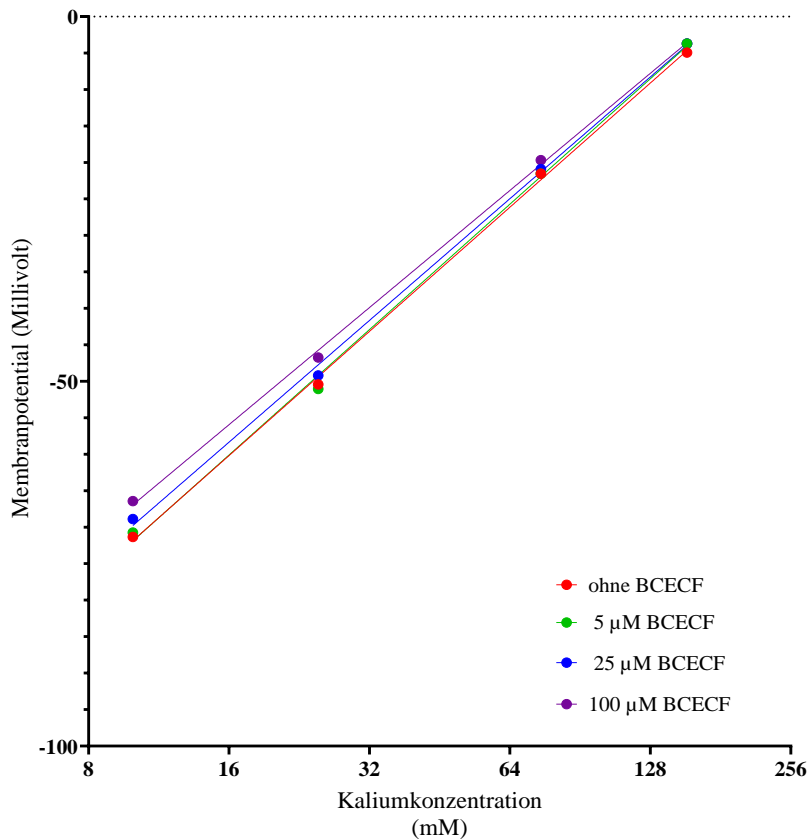
Um herauszufinden, ob die Potentiale nach Valinomycin Zugabe auch bei höheren und niedrigeren BCECF Konzentrationen vergleichbar bleiben mit den konstanten Potentialen, die sich in einer Lösung ohne BCECF nach Valinomycin Zugabe einstellen, habe ich die Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität durch Zugabe von Valinomycin wiederholt. Neben den BCECF Konzentrationen 0  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$ , die ich aufgrund einer besseren Vergleichbarkeit auch noch einmal mitgemessen habe, habe ich die Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin auch mit 5  $\mu\text{M}$  BCECF und 100  $\mu\text{M}$  BCECF in der Ringerlösung durchgeführt. Aufgrund des hohen experimentellen Aufwands durch die verschiedenen BCECF-Konzentrationen mit jeweils verschiedenen Kaliumkonzentrationen konnte ich die Messreihe nur einmal durchführen.

Weiterhin interessierte mich bei diesen Messungen, ob auch in den anderen BCECF-Konzentrationen die Differenzen des Membranpotentials nach Valinomycin Zugabe mit sinkender Kaliumkonzentration ansteigen.

Die einzelnen Membranpotential-Messungen unterscheiden sich nicht in ihrem Verlauf, sondern nur in ihrem Ruhemembranpotential und ihrem Membranpotential nach Valinomycin Zugabe. Die Unterschiede im Ruhemembranpotential belaufen sich wie in Graph 16 darauf, dass mit steigender BCECF Konzentration das Ruhemembranpotential weniger negativ ausfällt. Da die Unterschiede nach Valinomycin Zugabe deutlicher ausfallen, habe ich sie aus Gründen der Übersichtlichkeit in Graph 18 dargestellt und verglichen.

## 4 Ergebnisse

Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration, mit NS3623, Valinomycin, TritonX-100 und verschiedenen BCECF Konzentrationen



**Graph 18:** Darstellung der Korrelation der Kaliumkonzentrationen in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe von Valinomycin bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität. Die Messungen wurden mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100 durchgeführt, als Vergleich zwischen Ringerlösungen ohne BCECF, mit 5 µM BCECF, 25 µM BCECF und 100 µM BCECF.

Das Liniendiagramm in Graph 18 stellt eine Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität dar, die Messungen wurden mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100 durchgeführt. Der Graph veranschaulicht die Veränderungen des Membranpotentials nach Valinomycin Zugabe in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration in der jeweiligen Ringerlösung. Da Daten mit 5 µM BCECF, 25 µM BCECF, 100 µM BCECF und ohne BCECF gezeigt werden, sind diese untereinander gut vergleichbar.

Punkte in verschiedenen Farben zeigen die Membranpotentialwerte an, welche sich nach Valinomycin Zugabe eingestellt haben. Dabei steht die Farbe Rot für die Messreihe ohne den pH-abhängigen Farbstoff BCECF, grün für die Messungen mit 5 µM BCECF in der Ringerlösung, blau für 25 µM BCECF und lila für 100 µM BCECF.

Alle Ergebnisse derselben BCECF Konzentration sind untereinander jeweils durch eine halblogarithmische Regressionslinie verbunden.

## 4 Ergebnisse

Es wird deutlich, dass die Membranpotentiale, wie schon in Graph 17, mit sinkender Kaliumkonzentration negativer werden. Weiterhin ist eine Reihenfolge der Graden zu sehen: Je höher die BCECF Konzentration in der Ringerlösung, desto positiver fallen die Membranpotentiale aus. Allerdings verändert BCECF nicht das Membranpotential selbst, da es sich nicht um einen Manipulator von Ionenkanälen handelt, sondern verändert nur die Messung des Membranpotentials, da es sich bei BCECF um einen membrangängigen, doppelanregbar ratiometrischen pH-Wert Indikator handelt. Dabei ist allerdings anzumerken, dass, auch wenn diese Aufteilung deutlich erkennbar ist und auch über den gesamten Potentialverlauf konstant bleibt, die Differenzen in den Membranpotentialen, mit einer maximalen Differenz von 5 mV zwischen der höchsten (100  $\mu$ M) und der niedrigsten BCECF Konzentration (0  $\mu$ M), sehr gering sind.

Außerdem ist in Graph 17 zu sehen, dass die Differenzen zwischen den Membranpotentialen der verschiedenen BCECF Konzentrationen mit steigender Kalium Konzentration abnehmen und sich immer stärker überlappen, sodass teilweise nicht mehr alle Messpunkte zu sehen sind.

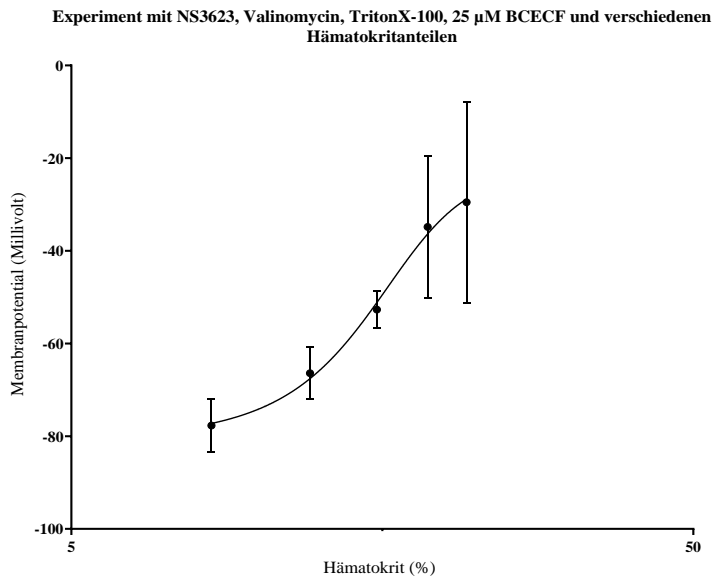
Besonders die Ergebnisse der Messreihen mit 5  $\mu$ M BCECF und ohne BCECF überschneiden sich in weiten Teilen, auch während des gesamten Potentialverlaufs und nicht nur in den hohen Kaliumkonzentrationen.

Da die Unterschiede zwischen den Membranpotentialen nach Valinomycin Zugabe bei den verschiedenen BCECF-Konzentrationen zwar sichtbar, aber trotzdem sehr gering sind, habe ich mich entschieden, für weitere Experimente mit BCECF und der MBE-Methode 25  $\mu$ M BCECF zu wählen, da die Möglichkeit besteht, dass eine Konzentration von 5  $\mu$ M BCECF für Experimente am Konfokalmikroskop zu niedrig sein könnte. Gegen 100  $\mu$ M BCECF habe ich mich entschieden, da die Membranpotentiale nach Valinomycin Zugabe deutlich stärker von den Ergebnissen ohne BCECF abwichen als bei 25  $\mu$ M BCECF und diese BCECF Konzentration hoch genug ist, um davon auszugehen, dass sie verwertbare Floreszenzen unter dem Konfokalmikroskop zeigt.

### 4.2.1.3 Einfluss des Hämatokrit auf Experimente mit BCECF

Um zu testen, ob der für die Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin etablierte Hämatokrit von 8,4% auch für dieselben Experimente mit BCECF die deutlichsten Reaktionen auf die experimentelle Manipulation mit Valinomycin zeigt, habe ich das beschriebene Experiment mit fünf verschiedenen Hämatokrit Werten durchgeführt. Diese Hämatokrit Werte betragen 8,4%, 12,1%, 15,5%, 18,7% sowie 21,6%. Alle Experimente wurden mit einer Kaliumkonzentration von 2,0 mM in der Ringerlösung durchgeführt und die Valinomycin- und NS3623 Zugabe Volumina wurden konstant gehalten. Die Ergebnisse sind in Graph 19 dargestellt.

## 4 Ergebnisse



**Graph 19:** Darstellung der Korrelation des Hämatokrit in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe von Valinomycin während einer experimentellen Manipulation der Erythrozyten mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100, sowie 25  $\mu$ M BCECF. Die verschiedenen Hämatokritwerte liegen zwischen 8 und 22%.

Um die Abhängigkeit der Membranpotential Minima vom Hämatokrit in den Ringerlösungen übersichtlich zu veranschaulichen, habe ich in Graph 19 das Membranpotential nach Valinomycin Zugabe, auf der Y-Achse, gegen den jeweiligen Hämatokrit, auf der X-Achse, aufgetragen. Die Angaben zum Membranpotential sind in Millivolt gemacht, und der Hämatokrit ist auf einer dekadisch logarithmischen Skala in Prozent dargestellt.

Punkte stellen die Durchschnittswerte von dreifachen Experimentwiederholungen mit denselben Blutproben dar, ihre Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an. Die Punkte sind weiterhin mit einer Regressionslinie verbunden und zeigen einen sigmoidalen Kurvenverlauf.

Je niedriger der Hämatokrit gewählt ist, desto negativere Membranpotentiale werden nach Valinomycin Zugabe erreicht.

Durch den sigmoidalen Kurvenverlauf wird deutlich, dass die Differenzen zwischen den Membranpotentialen nach Valinomycin Zugabe in den niedrigen Hämatokrit Bereichen gering sind, zwischen 12% und 18% deutlich an Unterschied zunehmen und in noch höherer Konzentration wieder näher beieinander liegen. Dies ist vergleichbar mit dem Verlauf einer Sättigungskurve.

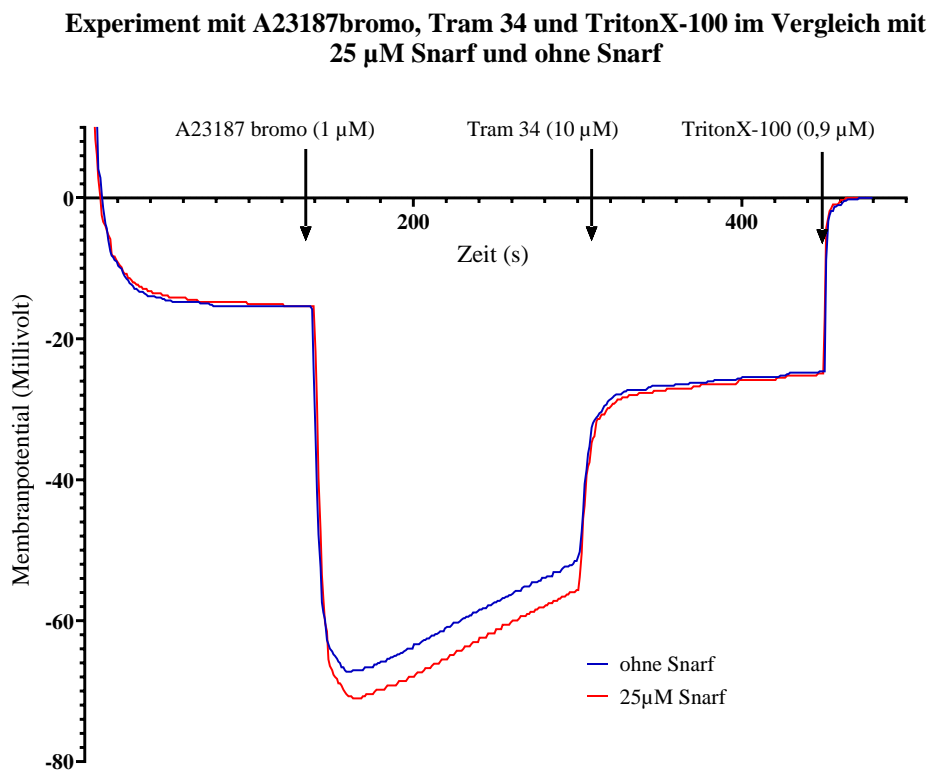
Auffällig ist, dass die Fehlerbalken bei den hohen Hämatokrit Werten größere Schwankungen der Ergebnisse darstellen als bei niedrigerem Hämatokrit.

Da die Erythrozyten Zugabe von 100 $\mu$ l, auf einen Hämatokritwert von 8,4%, wie auch bei den Membranpotentialmessungen ohne BCECF, die größte Verschiebung des Membranpotentials nach Valinomycin Zugabe zeigt, habe ich mich entschieden, diese für die nachfolgenden Experimente zu nutzen.

## 4 Ergebnisse

### 4.2.1.4 Einfluss von Snarf auf die Ergebnisse von Experimenten mit der MBE- Methode

Ein weiterer pH-abhängiger Farbstoff, welcher für die optische Messung der MBE-Methode am Konfokalmikroskop infrage kommt, ist Snarf. Die Ergebnisse der Experimente mit BCECF zeigten zwar gute Ergebnisse, aber bevor ich mich weiter mit BCECF beschäftigte, wollte ich testen, ob sich Snarf für meine Experimente eignet und ob es sogar bessere Ergebnisse zeigt. Daher habe ich am pH-Meter das Experimentprotokoll mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100 durchgeführt, und verglichen, ob die Zugabe von Snarf einen Unterschied im Verlauf des Membranpotentials macht. Die Ergebnisse sind in Graph 20 dargestellt.



**Graph 20: Vergleich des Membranpotentialverlaufs während eines Experiments mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100 mit 25  $\mu$ M Snarf und ohne Snarf.**

Graph 20 zeigt den Membranpotentialverlauf von Erythrozyten bei der Manipulation mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100. Die Ergebnisse der Messungen ohne Zugabe eines Farbstoffes sind Ergebnissen gegenübergestellt, bei welchen 25  $\mu$ M Snarf in die Ringerlösung hinzugefügt wurden.

Pfeile zeigen zu welchem Zeitpunkt und in welcher Konzentration die Manipulation der Erythrozyten mit dem Kalzium Ionophor A23187bromo, dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 und TritonX-100 stattfand.

In blau sind die Durchschnittswerte einer dreifachen Wiederholung des Experiments ohne Snarf dargestellt, in rot diejenigen mit 25  $\mu$ M Snarf. Die Membranpotentiale der Erythrozyten reagieren bei beiden Experimentprotokollen gleich auf die Manipulationen. Sie fallen nach Zugabe von



## 4 Ergebnisse

A23187bromo, steigen durch Zugabe von Tram 34 und steigen auf null Millivolt durch Lyse mithilfe von TritonX-100.

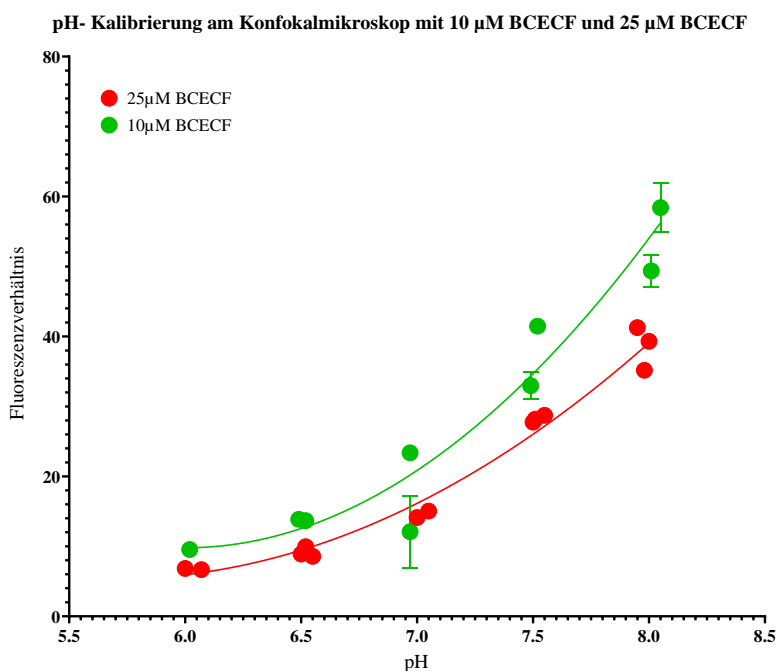
Auffällig ist, dass das Membranpotential der Erythrozyten, deren Ringerlösung mit 25  $\mu\text{M}$  Snarf versetzt ist, ca. 5 mV tiefer abfällt als beim Potential ohne Snarf Zugabe. Da diese Differenz nur minimal ist und auch bei den Experimenten mit BCECF minimale Differenzen im Membranpotential vorkamen, habe ich mich entschieden, beide Farbstoffe am Konfokalmikroskop zu testen.

### 4.2.2 pH- Kalibrierungen am Konfokalmikroskop

#### 4.2.2.1 pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit BCECF

Damit BCECF als Farbstoff für die optische Messung der MBE- Methode geeignet ist, reicht es nicht aus, dass es den Verlauf des Membranpotentials nicht verändert. Es muss auch pH-abhängig verschiedene, messbare Fluoreszenzintensitäten zeigen, damit die Membranpotentialverläufe anhand der Mikroskopie detektierbar und berechenbar sind. Daher habe ich eine pH-Kalibrierung mit BCECF am Konfokalmikroskop durchgeführt und anhand der Fotos die Fluoreszenzverhältnisse der verschiedenen pH-Lösungen berechnet.

Da die Membranpotentiale bei Experimenten mit geringen BCECF Konzentrationen näher an den Potentialen ohne BCECF lagen, habe ich neben der pH-Kalibrierung mit 25  $\mu\text{M}$  auch eine pH-Kalibrierung mit 10  $\mu\text{M}$  BCECF durchgeführt. Ich wollte wissen, ob auch so geringe BCECF Konzentrationen für die Fluoreszenzmessung am Konfokalmikroskop ausreichen. Die Ergebnisse sind in Graph 21 zu sehen.



Graph 21: pH- Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit 10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  BCECF.

## 4 Ergebnisse

Graph 21 zeigt die Höhe der gemessenen Fluoreszenzverhältnisse in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung.

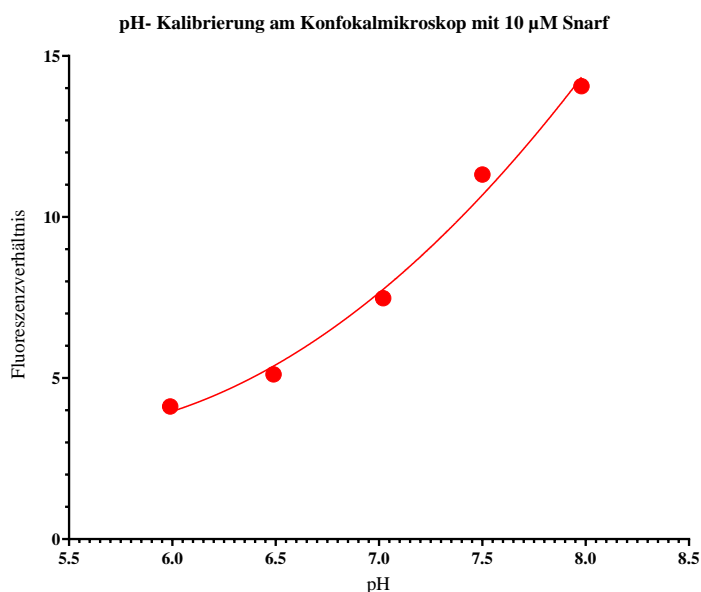
Die Ergebnisse der Messungen mit 10  $\mu\text{M}$  BCECF wurden anhand von grünen Punkten mit Fehlerbalken für die Standardabweichungen dargestellt, die der Messungen mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF in rot. Weiterhin sind die Punkte durch eine polynomiale Regressionslinie zweiter Ordnung verbunden. Die Werte der Farbverhältnisse nehmen parallel zu den steigenden pH-Werten zu.

Die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse der pH-Kalibrierung mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF liegen deutlich näher an der Regressionslinie als die Ergebnisse aus den Messungen mit 10  $\mu\text{M}$  BCECF. Dies zeigen besonders die Ergebnisse, die um pH-Wert 7 liegen und bei 10  $\mu\text{M}$  BCECF deutliche Differenzen zeigen.

Insgesamt ist von einer Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzverhältnis-Werte von dem pH-Wert der Lösung zu sprechen, womit diese Voraussetzung für die optische Messung der MBE-Methode mit BCECF gegeben ist.

### 4.2.2.2 pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit Snarf

Die pH-Kalibrierung, welche ich mit BCECF durchgeführt habe, habe ich auch mit Snarf gemacht. Ich wollte sehen, wie geeignet Snarf für die Messungen am Konfokalmikroskop ist, und ob sich Unterschiede zur pH-Kalibrierung mit BCECF zeigen. Die Laser, mit denen Snarf angeregt wird, haben die Wellenlängen 488 nm und 561 nm Wie zuvor mit BCECF habe ich auch bei den Experimenten mit Snarf Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  getestet. Da die Messungen mit 25  $\mu\text{M}$  Snarf keine eindeutige Abhängigkeit zwischen pH-Wert und Fluoreszenzverhältnissen zeigten, werde ich mich auf die Ergebnisse mit 10  $\mu\text{M}$  Snarf konzentrieren, sie sind in Graph 22 dargestellt.



Graph 22: pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit 10  $\mu\text{M}$  Snarf.

## 4 Ergebnisse

Graph 22 ist ein Liniendiagramm. Es zeigt die Höhe der Fluoreszenzverhältnisse in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung, in der 10 $\mu$ M Snarf gelöst waren.

Anhand von roten Punkten sind die Messwerte aufgetragen, sie sind durch eine polynomiale Regressionslinie zweiter Ordnung verbunden. Die Fluoreszenzverhältnis-Werte steigen mit Erhöhung des pH-Wertes an und liegen sehr dicht an der Regressionslinie.

### 4.2.3 Paralleles Durchführen des Experiments mit A23187bromo am pH-Meter und Konfokalmikroskop

Da die Ergebnisse der Experimente mit BCECF und Snarf sowohl am pH-Meter als auch am Konfokalmikroskop vielversprechend ausfielen, führte ich als nächsten Schritt das Experimentprotokoll mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100 mit 25  $\mu$ M BCECF am Konfokalmikroskop durch und maß gleichzeitig am pH-Meter die pH-Werte zu den jeweiligen Bildern. Dasselbe Experiment wollte ich danach mit 10  $\mu$ M Snarf durchführen, musste aber feststellen, dass das Experiment, unabhängig vom Fluoreszenzstoff, keine adäquate Messung zuließ, da sich durch die sedimentierten Erythrozyten zu wenig Fluoreszenzfarbstoff in der Fokusebene befand.

### 4.2.4 Messungen mit verschiedenen Arten Gel

Um das Problem zu lösen, dass durch die für das Gelingen des Experiments nötige Erythrozyten Menge der Extrazellulärraum am inversen Konfokalmikroskop verlegt wird, welcher für die Messungen notwendig ist, habe ich mit verschiedenen Arten Gel experimentiert.

Die Idee hinter den Experimenten mit Agar Gel und Gelatine Gel war, dass diese den nötigen Extrazellulärraum für die Messungen bieten, aber keine Erythrozyten in das Gel gelangen können. Dazu setzte ich Agar- und Gelatine Gel (jeweils 1%ig) an und füllte sie vor dem Aushärten in die Kavitäten der  $\mu$ - Platten- Angiogenese- 96- Well von ibidi. Das Gel bedeckte den Boden, ließ aber darüber noch genügend Platz für die Durchführung des Experiments. Allerdings ergaben sowohl die Messungen mit BCECF in der Lösung als auch mit BCECF im Gel oder in beidem keine Ergebnisse, die zu der pH-Kalibrierung gepasst hätten oder eine andere Regelmäßigkeit zeigten.

### 4.2.5 Experimente mit „schwerem Wasser“

#### 4.2.5.1 *Sedimentationsgeschwindigkeit von Deuteriumoxid*

Da die Experimente mit Gel nicht funktionierten, galt es weiterhin das Problem zu lösen, dass die Erythrozyten zu schnell auf den Boden des Objektträgers sinken und es somit unmöglich ist, am inversen Konfokalmikroskop den Extrazellulärraum zu messen. Ein weiterer Ansatz, dieses Problem zu lösen, war es, das MilliQ-Wasser in der Ringerlösung durch Deuteriumoxid (D<sub>2</sub>O) zu ersetzen und so die Sedimentationsgeschwindigkeit der Erythrozyten zu senken. Bei D<sub>2</sub>O handelt es sich um so genanntes schweres Wasser, denn das Deuterium im D<sub>2</sub>O beinhaltet verglichen zum Hydrogen in H<sub>2</sub>O ein Neutron mehr.

## 4 Ergebnisse

Die Sedimentationsgeschwindigkeit der Erythrozyten ist von mehreren Faktoren abhängig und wird in der Formel  $v_s = \frac{8}{9}g \times d^2 \times \Delta\rho$  beschrieben. Dabei steht  $v_s$  für die Sedimentationsgeschwindigkeit in m/s,  $g$  für die Erdanziehungskraft (9,81 m/s),  $d$  für den Durchmesser der Erythrozyten und  $\Delta\rho$  ist die Differenz zwischen der Dichte der Zellen und ihrer Umgebung ( $\rho_{in} - \rho_{out}$ ). Die Ringerlösung aus MilliQ-Wasser ( $\rho_{out}$ ) hat eine Dichte von ca. 1 g/cm<sup>3</sup> (Gramm pro Kubikzentimeter) und die Dichte der Erythrozyten ( $\rho_{in}$ ) beträgt ca. 1,1 g/cm<sup>3</sup>. Daraus resultiert, dass die Zellen sinken. Die Dichte von D<sub>2</sub>O beträgt wie die Dichte der Erythrozyten ca. 1,1 g/cm<sup>3</sup>, damit wäre davon auszugehen, dass die Erythrozyten in Ringerlösung aus Deuteriumoxid und Salz nicht sinken. Das würde bedeuten, dass in D<sub>2</sub>O der Extrazellulärraum messbar, und somit die optische Messung umsetzbar wäre.

Um diese Theorie zu testen, habe ich ein Experiment durchgeführt, in welchem ich Erythrozyten mit D<sub>2</sub>O und Salzen, wie in der Ringerlösung, zentrifugiert habe. Der oben beschriebenen Theorie und Berechnung nach war davon auszugehen, dass sich die Erythrozyten nicht am Boden absetzen, sondern weiterhin in der Lösung schwimmen. Allerdings zeigte sich nach zwei Minuten des Zentrifugierens, dass die Erythrozyten ein Sediment bilden. Die Erklärung dieses Phänomens ist, dass durch Aquaporine in den Erythrozyten ein Austausch des intrazellulären H<sub>2</sub>O durch D<sub>2</sub>O stattfindet und dadurch die Dichte der Erythrozyten steigt, was sie sinken lässt [93].

Trotz des Austauschs von H<sub>2</sub>O durch D<sub>2</sub>O sedimentieren die Erythrozyten im schweren Wasser langsamer. Das zeigt sich auch in einem weiteren Experiment, in welchem ich zwei BSG (Blutsenkungsgeschwindigkeit) Pipetten nach Westgren nebeneinander gestellt habe und über mehrere Stunden regelmäßig die Sedimentation anhand von Fotos dokumentiert habe. Im linken Röhrchen befand sich Ringerlösung aus Milli-Q Wasser mit Erythrozyten und im rechten Röhrchen befand sich Ringerlösung auf Basis von D<sub>2</sub>O mit Erythrozyten. Einige Beispielfotos möchte ich im Folgenden zeigen.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 30: Vergleich der Sedimentation von Erythrozyten in Ringerlösungen auf Basis von  $H_2O$  und  $D_2O$ .**

Die Fotodokumentation der Sedimentation zeigt, dass die Erythrozyten im rechten Röhrchen, bei dem die Ringerlösung auf Basis von  $D_2O$  angesetzt wurde, deutlich langsamer sinken als im Linken.

Dass die Erythrozyten in  $D_2O$  ca. die doppelte Zeit zum Sedimentieren benötigen als in  $H_2O$ , bedeutet, dass ich bei meinen Messungen auch das Doppelte der Zeit zur Verfügung habe, bis das Sediment den Boden so dicht bedeckt, dass keine Messungen im Extrazellulärraum mehr möglich sind.

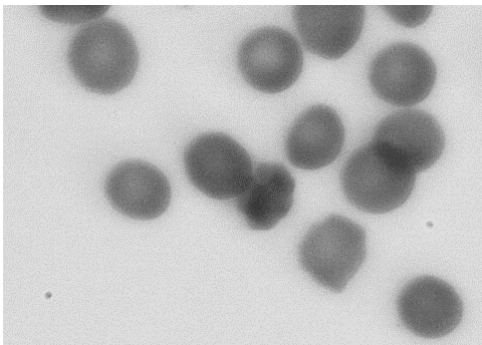
### 4.2.5.2 Osmolarität von Deuteriumoxid

Bevor ich die Messungen am Konfokalmikroskop mit  $D_2O$  allerdings durchführen konnte, galt es ein weiteres Problem zu lösen: Der Dampfdruck von  $H_2O$  liegt bei  $20^\circ C$  bei 17,36 mm, wogegen der Dampfdruck von  $D_2O$  nur bei 15,06 mm liegt [11]. Das bedeutet, dass eine andere Salzkonzentration notwendig ist, um aus  $D_2O$  eine isotone Lösung in Bezug auf die Erythrozyten herzustellen. Die Ringerlösung der Experimente muss isoton sein, da bei Schädigung der Erythrozyten die MBE-Methode nicht mehr funktionieren würde, beispielsweise, da Hämoglobin in die Lösung freigesetzt würde und zu einer Pufferung führen würde. Dementsprechend konnte ich nicht dieselbe Konzentration an Salzen in die Ringerlösung auf  $D_2O$  Basis hinzufügen, wie ich es für die Ringerlösung auf MilliQ-Wasser Basis etabliert hatte. Um herauszufinden, welche Salzkonzentration am geeignetsten ist, habe ich verschiedene Lösungen angesetzt und unter dem Dunkelfeldmikroskop die Größe der Erythrozyten bestimmt, welche ich dann mit der Größe der Erythrozyten in isotoner Kochsalzlösung verglich. Bei Zugabe von Salzen in die  $D_2O$  Lösung zeigte sich keine Hämolyse, was die Theorie bestätigt, dass pures  $D_2O$  hypoton ist und eine Zugabe von Salzen nötig ist, um eine

## 4 Ergebnisse

isotone Lösung zu gestalten. In einer Lösung aus 90% Ringerlösung auf  $D_2O$ , mit einer Salzkonzentration wie bei der MilliQ-Ringerlösung und 10% purem  $D_2O$  zeigte sich eine Verkleinerung der Zellen, was durch eine Verformung der Zellen zu begründen ist.

Um die Form der Erythrozyten genauer beurteilen zu können und die exakte Salzkonzentration herauszufinden, die für die Herstellung einer isotonen  $D_2O$  Lösung nötig ist, nahm ich das Phasenkontrastmikroskop zur Hilfe. Aus den Messungen am Dunkelfeldmikroskop wusste ich, dass die Konzentration der Salzlösung höher sein muss als eine Lösung aus 10% purem  $D_2O$  und 90% Ringerlösung auf  $D_2O$  Basis, mit einer Salzkonzentration wie in der Ringerlösung auf  $H_2O$  Basis. Daher setzte ich zuerst eine Lösung aus 98%  $D_2O$  Ringerlösung und 2% purem  $D_2O$  an und mikroskopierte die Erythrozyten, die ich in diese Lösung gab. Abbildung 31 zeigt das Ergebnis dieses Experiments:

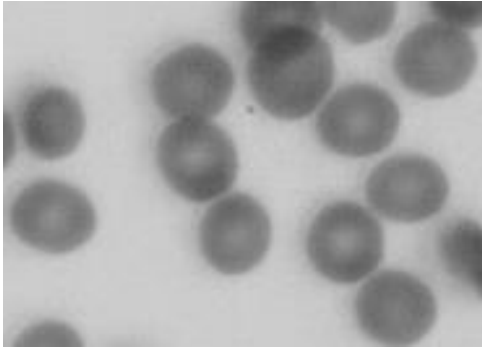


**Abbildung 31: Phasenkontrastmikroskopie von Erythrozyten in einer Lösung aus 2% purem  $D_2O$  und 98%  $D_2O$  Ringerlösung, angesetzt wie im Methodenteil erläutert.**

Es ist zu sehen, dass einige Erythrozyten statt einer runden Form Stacheln (sog. Spikes) ausgebildet haben. Das spricht dafür, dass die Lösung, in der die Erythrozyten suspendiert wurden, hyperton ist und die intrazelluläre Flüssigkeit der Erythrozyten ausgeströmt ist, um dem osmotischen Gradienten zu folgen.

Für die Entwicklung einer isotonen  $D_2O$  Ringerlösung bedeutet es, dass die Lösung weniger Salze enthalten muss. Daher habe ich eine Lösung mit 95%  $D_2O$  Ringerlösung und 5% purem  $D_2O$  angesetzt, in welche ich wiederum einige Erythrozyten hinzugegeben habe und diese unter dem Phasenkontrastmikroskop begutachtet habe. Die Mikroskopie ist in Abbildung 32 gezeigt.

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 32: Phasenkontrastmikroskopie von Erythrozyten in einer Lösung aus 5% purem D<sub>2</sub>O und 95% D<sub>2</sub>O Ringerlösung, angesetzt wie im Methodenteil erläutert.**

Es ist zu sehen, dass alle Erythrozyten eine runde Scheibenform haben. Somit kann geschlossen werden, dass eine Lösung aus 5% purem D<sub>2</sub>O und 95% D<sub>2</sub>O Ringerlösung, mit einem Salzgehalt wie in der Ringerlösung auf H<sub>2</sub>O Basis, isoton ist und sich damit für weitere Experimente am Konfokalmikroskop eignet.

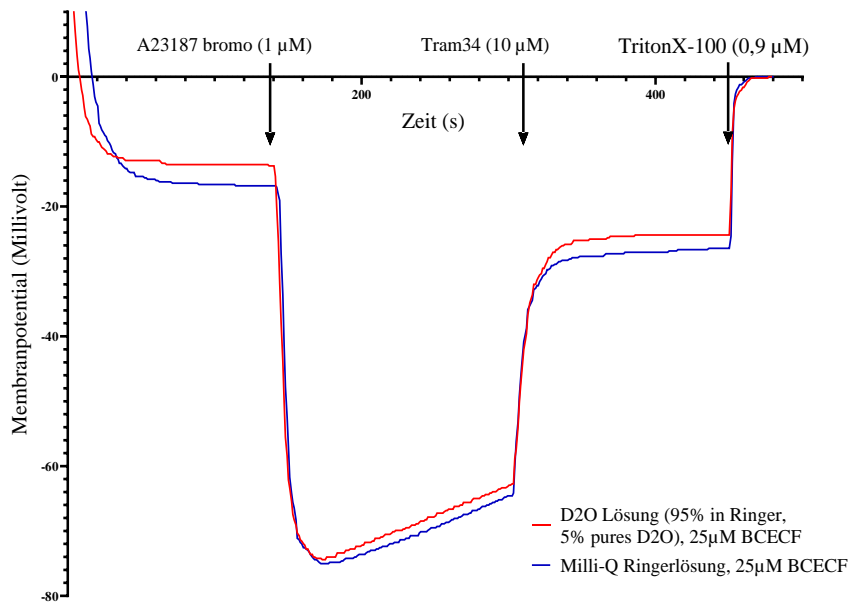
### 4.2.5.3 Experimente mit Deuteriumoxid und der MBE-Methode

Auf Grundlage der isotonen D<sub>2</sub>O Ringerlösung machte ich Experimente mit der MBE-Methode, um sicherzustellen, dass diese auch mit schwerem Wasser zuverlässige Ergebnisse zeigt. Dazu führte ich das Experimentprotokoll mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100 durch und verglich, ob sich Unterschiede zeigten zwischen Erythrozyten die in D<sub>2</sub>O- Lösung (95% D<sub>2</sub>O Ringerlösung, 5% pures D<sub>2</sub>O) mit 25 µM BCECF suspensiert wurden und Erythrozyten, die in MilliQ-Ringerlösung mit 25 µM BCECF suspensiert wurden. Ich entschied mich bei diesem Vergleich für BCECF statt Snarf, da beide Farbstoffe sowohl am pH-Meter als auch am Konfokalmikroskop sehr gute Ergebnisse gezeigt hatten.

Den Verlauf der Membranpotentiale aus dem beschriebenen Experiment habe ich in Graph 23 dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### Experiment mit A23187bromo, Tram 34, TritonX-100 und 25 $\mu\text{M}$ BCECF mit verschiedenen Ringerlösungen



**Graph 23: Vergleich des Membranpotentialverlaufs bei zwei Ringerlösungen aus D<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>O während des Experiments mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100.**

Graph 23 ist ein Liniendiagramm, welches den Membranpotentialverlauf während eines Experiments mit A23187bromo darstellt. Verglichen wurden die Ergebnisse bei Nutzung einer extrazellulären Lösung aus 95% D<sub>2</sub>O Ringerlösung und 5% purem D<sub>2</sub>O sowie bei Benutzung einer Ringerlösung auf MilliQ- Wasser Basis.

Anhand von Pfeilen kann der Zeitpunkt der Zugabe von A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100 abgelesen werden, sowie ihre Konzentrationen nach Zugabe in die Lösung.

Als rote Kurve ist der Verlauf des Membranpotentials abzulesen, der sich bei Nutzung der D<sub>2</sub>O Ringerlösung mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF ergab, in blau ist der des Experiments mit MilliQ-Wasser Ringerlösung und 25  $\mu\text{M}$  BCECF gezeigt. Beide Kurven zeigen die Durchschnittswerte einer dreifachen Experimentdurchführung.

Die Reaktionen des Membranpotentials auf die Manipulationen sind bei beiden Experimenten gleich, allerdings liegt das Ruhemembranpotential der Erythrozyten in D<sub>2</sub>O Lösung ca. drei Millivolt positiver als derjenigen in MilliQ-Wasser Ringerlösung. Auch nach Zugabe von Tram 34 liegt das Plateau der Erythrozyten in D<sub>2</sub>O Lösung in einem leicht positiveren Bereich. Weiterhin steigt das Potential der Erythrozyten in der Ringerlösung etwas steiler an. Der Punkt des negativsten Membranpotentials ist in beiden Kurven nahezu gleich.

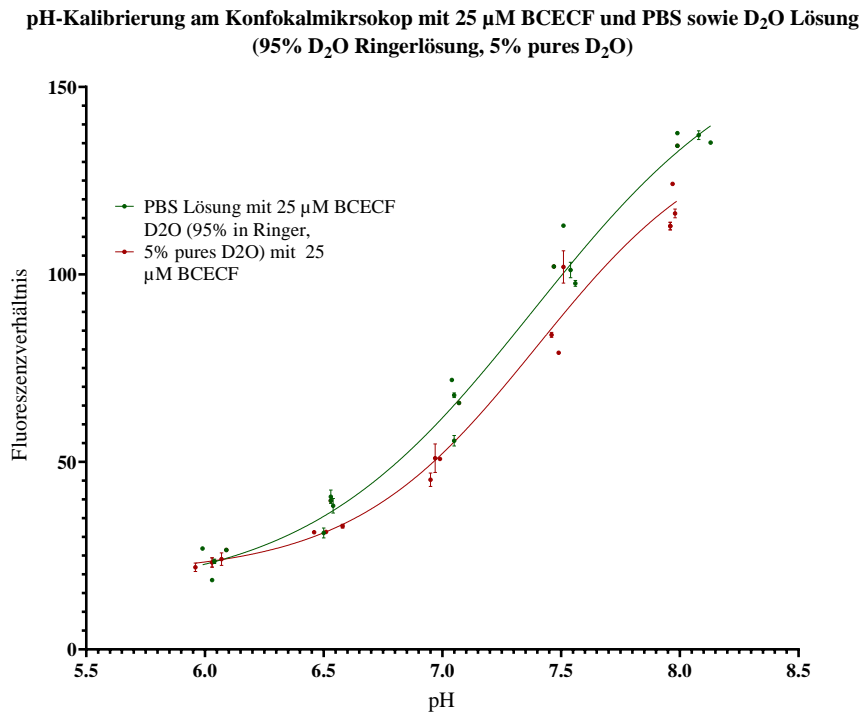
#### 4.2.5.4 Experimente mit Deuteriumoxid am Konfokalmikroskop

Um zu überprüfen, dass BCECF auch in D<sub>2</sub>O Lösung pH abhängig fluoresziert, habe ich die pH-Kalibrierung, welche ich bereits mit verschiedenen BCECF Konzentrationen durchgeführt habe, mit



## 4 Ergebnisse

D<sub>2</sub>O Lösung (95% D<sub>2</sub>O Ringerlösung, 5% pures D<sub>2</sub>O) und 25 µM BCECF vollzogen. Als Vergleich habe ich dieselbe pH-Kalibrierung mit PBS Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Graph 24 veranschaulicht.



**Graph 24: pH- Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit 25 µM BCECF sowohl in D<sub>2</sub>O Lösung als auch in PBS.**

Graph 24 ist ein Liniendiagramm, es zeigt die Höhe der gemessenen Fluoreszenzverhältnisse in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung.

Die Ergebnisse der Messungen mit PBS Lösung wurden anhand von grünen Punkten mit Fehlerbalken für die Standardabweichungen dargestellt, die der Messungen mit D<sub>2</sub>O Lösung (95% D<sub>2</sub>O Ringerlösung, 5% pures D<sub>2</sub>O) in rot. Weiterhin sind die Punkte durch eine Regressionslinie verbunden. Die Werte der Fluoreszenzverhältnisse nehmen mit steigenden pH-Werten zu. Beide Kurven steigen zwischen pH 6 und 6,5 nur leicht an, der Anstieg nimmt aber mit steigendem pH-Wert zu und wird erst ab einem pH-Wert von ca. 7,7 wieder flacher.

Die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse der pH-Kalibrierung mit D<sub>2</sub>O Lösung zeigen insgesamt geringere Werte als die in der PBS Lösung. Der Verlauf beider Kurven ist sehr ähnlich. Bei pH 6 zeigen beide Kurven dieselben Verhältnisse, die Differenz zwischen den zwei Ergebnissen nimmt aber mit steigendem pH-Wert zu.

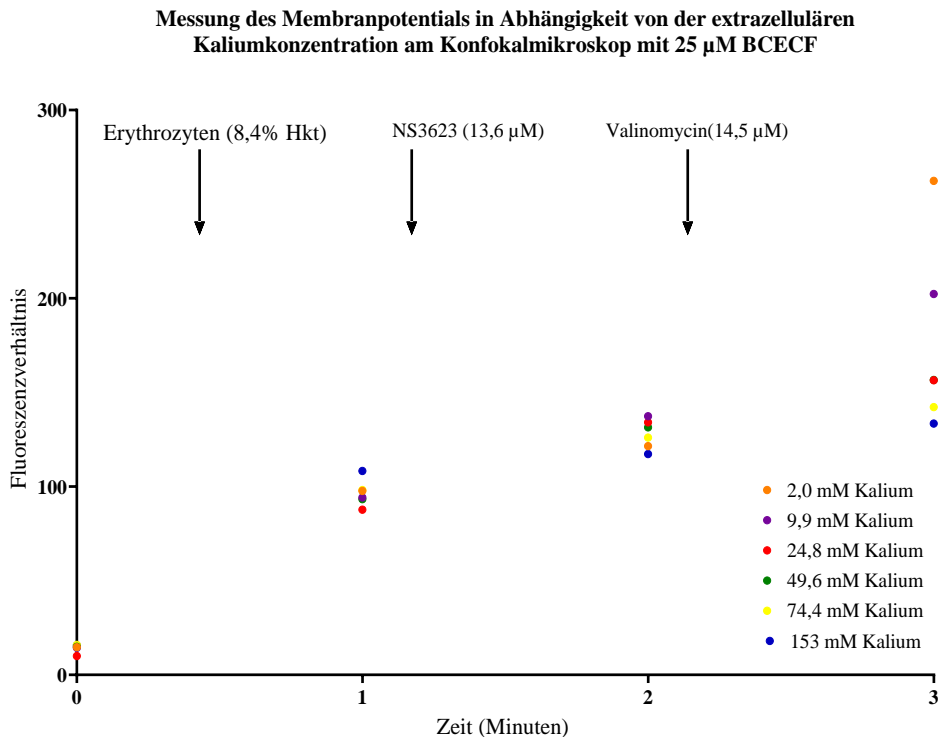
## 4 Ergebnisse

### 4.2.6 Fluoreszenzintensität- Messung von Überständen der Lösungen aus Experimenten mit Manipulation verschiedener Ionenkanäle, nach Zentrifugation der Erythrozytensuspension

#### 4.2.6.1 *Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin am Konfokalmikroskop mit 25 $\mu\text{M}$ BCECF und Zentrifugieren der Experiment Lösung*

Da die Fluoreszenzmessung am Konfokalmikroskop mit schwerem Wasser zwar möglich war, die Ergebnisse aber eine breite Streuung zeigten, versuchte ich einen anderen Weg zu finden, die MBE-Methode optisch zu messen, ohne dass das Sediment aus Erythrozyten die Fluoreszenzmessungen verhindern kann. Dazu führte ich mit der MBE-Methode eine Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF in den Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durch, wie ich es auch für die Messungen am pH-Meter gemacht hatte, und zentrifugierte die gesamte Lösung. Das Zentrifugieren führte ich so durch, dass es nicht zur Hämolyse kam, die Erythrozyten aber ein Sediment bildeten und ich den Überstand abpipettieren konnte. Von diesem Sediment maß ich dann die Fluoreszenz unter dem Konfokalmikroskop. Dadurch ermöglichte ich den Erythrozyten auf die Substanzen zu reagieren und so den pH-Wert der Lösung zu verändern, verhinderte aber andererseits, dass sie unter dem Konfokalmikroskop die Fluoreszenz Messungen störten. Parallel zum Mikroskopieren führte ich zu jeder Lösung eine Messung des pH-Werts am pH- Meter durch, um die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse einordnen und kontrollieren zu können. Die Ergebnisse der gemessenen Fluoreszenzverhältnisse sind in Graph 25 dargestellt.

## 4 Ergebnisse



**Graph 25: Darstellung der gemessenen Fluoreszenzverhältnisse bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin, mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF und Messen des Überstandes nach Zentrifugieren.**

Graph 25 ist ein Liniendiagramm, welches die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse in Bezug auf die Zeit nach Start des Experiments darstellt. Bei dem durchgeführten Experiment handelt es sich um eine Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin. Die Zeit ist in Minuten dargestellt und die Skala reicht von Minute null, bei der nur die Ringerlösung mit CCCP und BCECF vorlag, bis Minute drei. Die Werte der Fluoreszenzverhältnisse sind auf der Y-Achse aufgetragen und reichen von null bis 300. Anhand von Pfeilen ist gezeigt, wann NS3623 und Valinomycin in welcher Konzentration hinzugefügt wurden. Die Messdaten zu den einzelnen Kaliumkonzentrationen sind in verschiedenen Farben dargestellt. Zu jeder Kaliumkonzentration liegen vier Messpunkte vor. Wie bei der parallelen Messung der hier mikroskopierten Lösungen am pH-Meter, teilen sich die Messdaten nach Zugabe von Valinomycin in Reihenfolge der Kaliumkonzentration auf. Je niedriger die Kaliumkonzentration der Lösung ist, desto höher ist das gemessene Fluoreszenzverhältnis. Auffällig ist, dass im Gegensatz zu den pH-Messungen, die Farbverhältnisse auch nach Zugabe von NS3623 ansteigen. Die pH-Werte, die ich parallel zur Kontrolle der vorliegenden Fluoreszenzverhältnisse gemessen habe, bleiben dagegen nach Zugabe von NS3623 konstant.

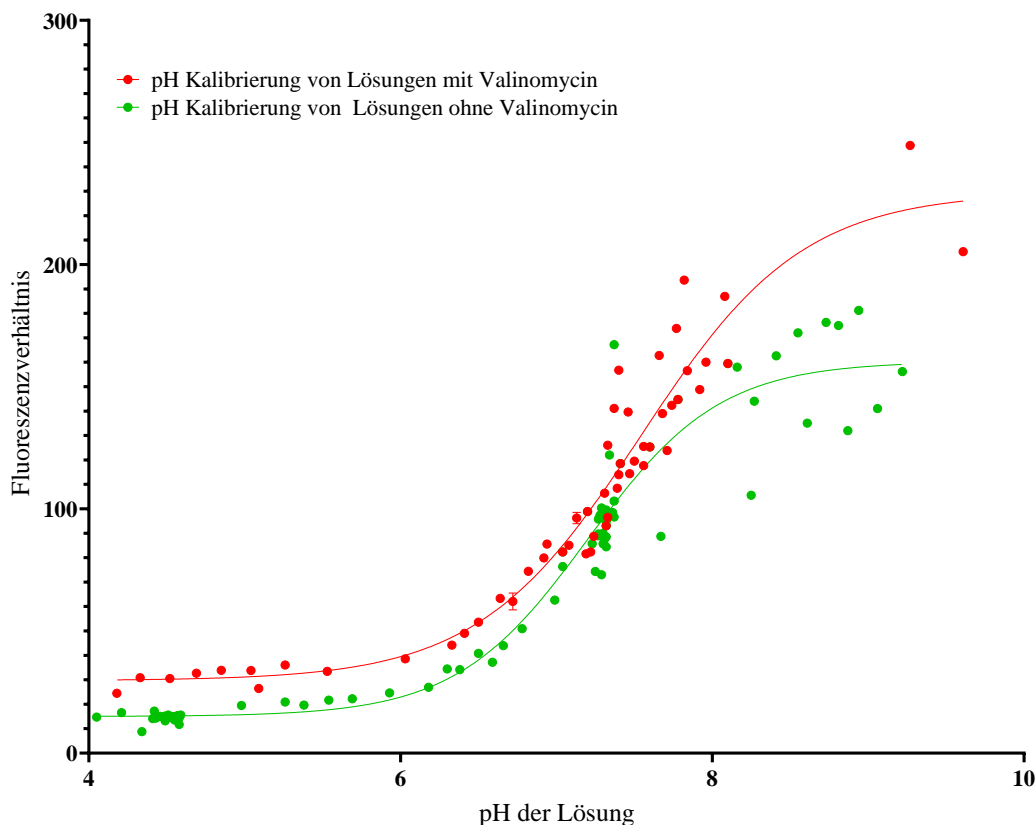
### 4.2.6.2 pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop ohne NS3623

Da sich rausstellte, dass NS3623 selbst fluoresziert, und somit die Fluoreszenzverhältnisse verfälscht, habe ich Experimente ohne den Chloridionen Austausch Inhibitor durchgeführt. Dieser ist in den

## 4 Ergebnisse

Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin zwar hilfreich, da er verhindert, dass beispielsweise Chloridionen die Erythrozyten Membran passieren und somit Einfluss auf den Verlauf des Membranpotentials nehmen, er ist aber nicht zwingend notwendig und somit bei den Experimenten am Konfokalmikroskop besser wegzulassen. Da dem Kalium Ionophor Valinomycin, welcher für die Messungen unerlässlich ist, auch eine Ringstruktur zugrunde liegt, musste ich davon ausgehen, dass auch Valinomycin fluoreszent ist und zu veränderten Fluoreszenzverhältnissen führt. Daher führte ich eine neue pH-Kalibrierung durch, in welcher ich einmal Werte aus Lösungen einfließen ließ, die Valinomycin beinhalten und einmal Lösungen ohne Valinomycin nutzte. Durch den Vergleich beider Messungen wollte ich herausfinden, ob Valinomycin fluoreszent ist. Weiterhin wollte ich die Kalibrierung, falls sich zeigen sollte, dass Valinomycin fluoreszent ist, nutzen, um die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse korrekt in ihren zugrundeliegenden pH-Wert zu übertragen. Die pH-Kalibrierung ist in Graph 26 dargestellt.

**Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration am Konfokalmikroskop mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF**



**Graph 26: pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit und ohne Valinomycin.**

Graph 26 ist ein Punktdiagramm, welches die Fluoreszenzverhältnisse in Abhängigkeit vom pH-Wert der gemessenen Lösung darstellt. Als Farbstoff wurde 25  $\mu\text{M}$  BCECF gewählt.

## 4 Ergebnisse

In rot sind die Messdaten der Fluoreszenzverhältnisse von Lösungen mit Valinomycin eingezeichnet, in grün die Werte aus Messungen ohne Valinomycin. Durch die Punkte sind jeweils Regressionslinien gezogen.

Es ist zu erkennen, dass sich die Fluoreszenzverhältnisse der Lösungen, die einen pH-Wert zwischen vier und sechs hatten, nur leicht unterscheiden, wohingegen die Farbverhältnisse bei pH-Werten zwischen sechs und acht mit steigendem pH-Wert stark ansteigen. In pH-Bereichen größer als 8 flacht der Anstieg wieder ab. Außerdem weichen hier die Messwerte deutlich stärker von den Regressionslinien ab als bei den kleineren pH-Werten.

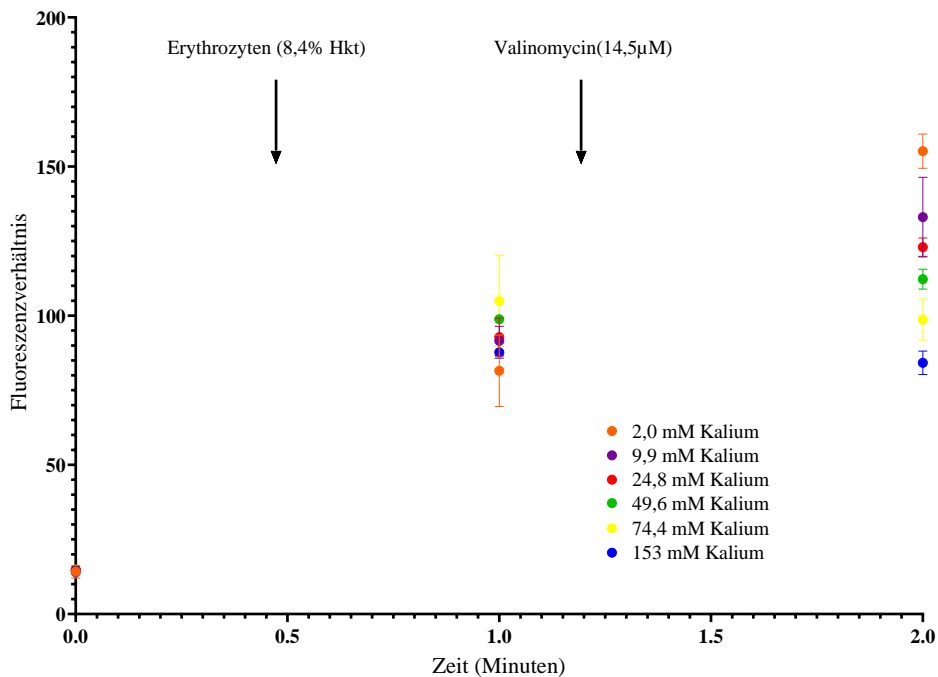
Vergleicht man beide Kurven, so fällt auf, dass die Fluoreszenz Intensität bei den Lösungen mit Valinomycin etwas höher sind.

### 4.2.6.3 *Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin am Konfokalmikroskop mit Überständen zentrifugierter Experimentlösungen und ohne NS3623*

Als nächsten Schritt habe ich die Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin mit Zentrifugieren der Experiment Lösungen und Messen der Fluoreszenz im Überstand am Konfokalmikroskop wiederholt. Dieses Mal habe ich das Experiment ohne Zugabe von NS3623 durchgeführt, um die Verfälschung der Fluoreszenzverhältnisse zu verhindern. Die Ergebnisse sind in Graph 27 dargestellt.

## 4 Ergebnisse

Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration am Konfokalmikroskop ohne NS3623, mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF und Messung auf einer Heizplatte



Graph 27: Darstellung der gemessenen Fluoreszenzverhältnisse bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität, ohne NS3623, mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF und Messen des Überstandes nach Zentrifugieren.

Graph 27 ist ein Liniendiagramm, in welchem die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse gegen die Zeit des Experimentverlaufs in Minuten aufgetragen sind. Die Zeitspanne ist auf der Y-Achse dargestellt und reicht von Minute null, in der nur die Ringerlösung ohne Zugabe der Erythrozyten vorlag, bis Minute zwei. Pfeile zeigen die Zeitpunkte, an denen die Erythrozyten sowie Valinomycin hinzugegeben wurden. Der Hämatokrit lag nach Zugabe der Erythrozyten in die Ringerlösung bei ca. 8,4%, und die Valinomycin Konzentration lag bei ca. 14,5  $\mu\text{M}$ .

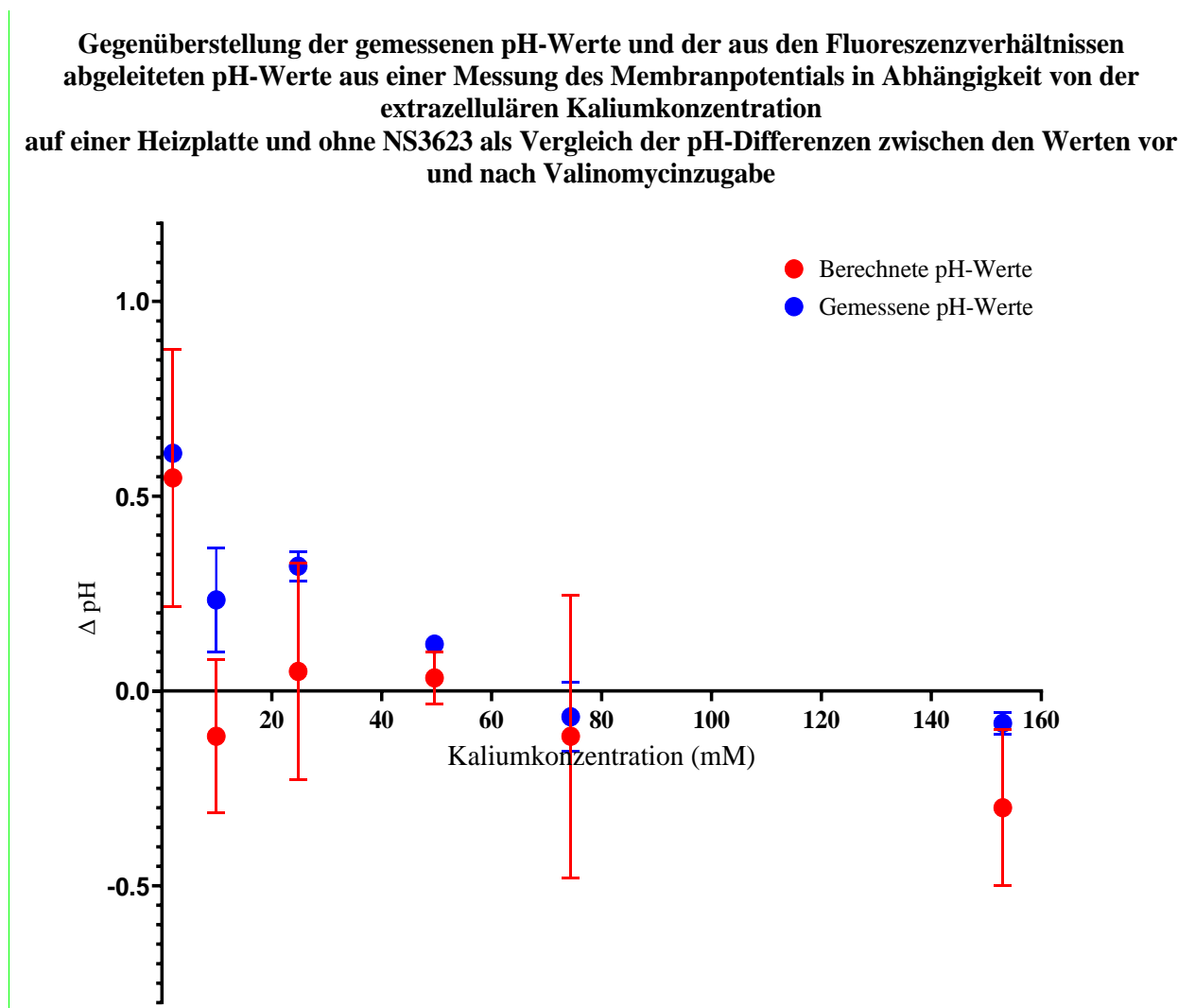
Anhand von verschiedenfarbigen Punkten sind die durchschnittlichen Messwerte der verschiedenen Kaliumkonzentrationen eingezeichnet. Zu jedem Punkt existieren drei Messdaten, durch Fehlerbalken sind die Standardabweichungen eingezeichnet.

Es ist zu sehen, dass nach Zugabe der Erythrozyten die Fluoreszenzverhältnisse deutlich ansteigen, wie wir es vom pH-Wert bei denselben Experimenten am pH-Meter kennen. Durch Zugabe von Valinomycin teilen sich die Werte der Fluoreszenzverhältnisse der verschiedenen Ringerlösungen in die Reihenfolge der Höhe ihrer Kaliumkonzentration auf.

## 4 Ergebnisse

### 4.2.6.4 Vergleich der in pH-Werte übertragenen Fluoreszenzverhältnisse mit den tatsächlich gemessenen pH-Werten der Membranpotentialmessung in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin

Um zu überprüfen, dass nicht nur der prinzipielle Verlauf der Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin, sondern auch die exakten Fluoreszenzverhältnisse zum Experimentverlauf am pH-Meter passen, habe ich die Fluoreszenzverhältnisse aus Graph 27 anhand der pH-Kalibrierungskurven (Graph 26) in pH-Werte übertragen. Die Differenzen der berechneten pH-Werte vor und nach Valinomycinzugabe habe ich dann mit denselben Differenzen aus den Werten gegenübergestellt, die ich tatsächlich während des Experimentverlaufs mit dem pH-Meter gemessen habe. Die Gegenüberstellung ist in Graph 28 gezeigt.



Graph 28: Gegenüberstellung von pH-Werten, welche aus den Fluoreszenzverhältnissen der Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin abgeleitet sind, mit den tatsächlich gemessenen pH-Werten.

#### 4 Ergebnisse

Bei Graph 28 handelt es sich um ein Punktdiagramm, in welchem die Differenzen der pH-Werte ( $\Delta\text{pH}$ ) vor und nach der Valinomycinzugabe gegen die Kaliumkonzentration der Ringerlösung aufgetragen sind. Dabei ist die Kaliumkonzentration von 0 Millimolar bis 160 Millimolar zu sehen. Die pH-Skala reicht von pH-Wert minus 0,8 bis pH-Wert 1,2.

In rot sind die Durchschnitte der pH-Wert Differenzen aufgetragen, die während der Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin, mit der pH-Elektrode gemessen wurden. Die blauen Punkte sind Daten, die aus einer Übertragung der gemessenen Fluoreszenzverhältnisse in pH-Werte resultieren. Die Übertragung wurde mithilfe der pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop durchgeführt, welche in Graph 26 dargestellt ist. Dafür habe ich die Werte aus Graph 27 in pH-Werte übertragen. Fehlerbalken zeigen die Standardfehler der Messdaten aus jeweils drei Experimentdurchgängen mit denselben Blutproben.

Es ist zu erkennen, dass die errechneten pH- Werte und die gemessenen pH-Werte bei denselben Kaliumkonzentrationen im Betrag ihrer pH-Wert Differenz fallen bzw. steigen. Allerdings zeigen die berechneten pH-Werte sowohl größere Schwankungen in der Differenz der pH-Werte zwischen den einzelnen Kaliumkonzentrationen der Ringerlösungen als auch deutlich größere Spannbreiten ihrer Fehlerbalken. Weiterhin wird deutlich, dass die gemessenen pH-Werte bei jeder der Kaliumkonzentrationen positivere Differenzwerte zeigen als die errechneten pH-Werte.



## 4 Ergebnisse

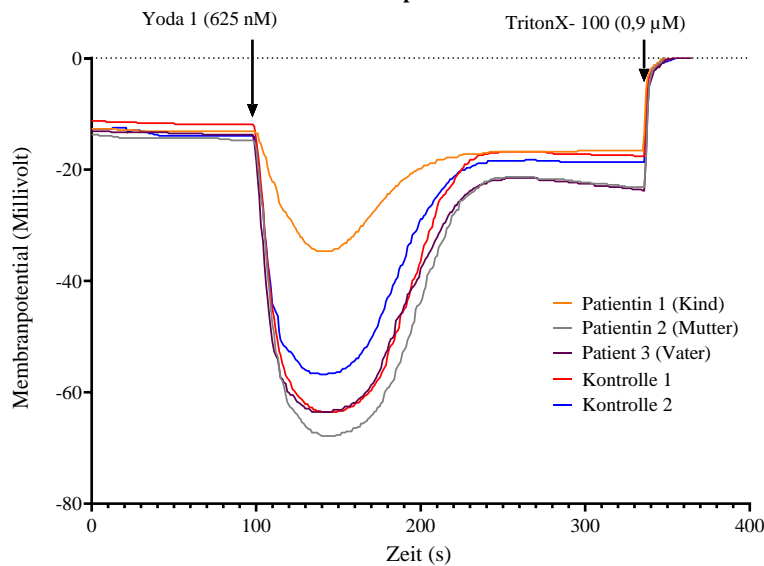
### 4.3 Experimente mit Blutproben von Patienten mit verschiedenen Mutationen

Ich habe die MBE-Methode, welche ich in Saarbrücken etabliert habe, für Experimente an Blutproben von Patienten mit verschiedenen Mutationen genutzt.

#### 4.3.1 Experimente mit Proben einer Patientin mit Mutationen in Piezo1 und Spektrin

##### 4.3.1.1 *Experiment zur Bestimmung der Piezo1 - Kanal Aktivität einer Patientin mit Mutation in den Genen für Piezo1 und Spektrin alpha- Zeitpunkt 1*

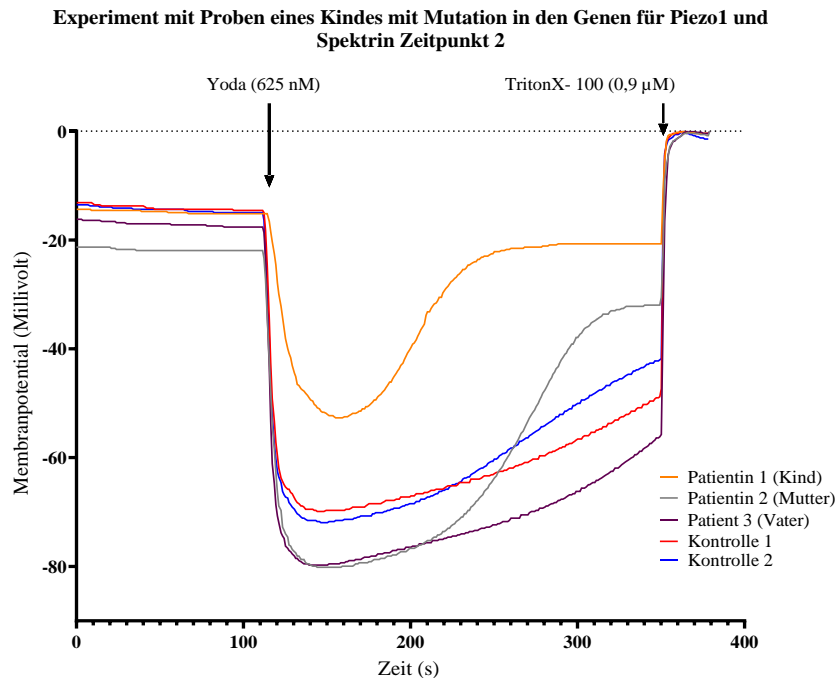
###### Experiment mit Proben eines Kindes mit Mutation im Gen für Piezo1 und Spektrin Zeitpunkt 1



**Graph 29: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten einer Patientin mit Mutation in den kodierenden Genen für Piezo1 und Spektrin alpha, sowie ihrer Eltern, welche jeweils eine der Mutationen tragen und gesunden Kontrollen mit dem Piezo1 Aktivator Yoda1 und TritonX-100 zur Lyse der Erythrozyten.**

## 4 Ergebnisse

### 4.3.1.2 Experiment zur Bestimmung der Piezo1 - Kanal Aktivität einer Patientin mit Mutation in den Genen für Piezo1 und Spektrin- Zeitpunkt 2



**Graph 30: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten einer Patientin mit Mutation in den kodierenden Genen für Piezo1 und Spektrin alpha, sowie ihrer Eltern, welche jeweils eine der Mutationen tragen und gesunden Kontrollen mit dem Piezo1 Aktivator Yoda1 und TritonX-100 zur Lyse der Erythrozyten.**

Für die Ergebnisse aus den Graph 29 und Graph 30 wurden identische Experimentprotokolle verwendet und die Erythrozyten derselben Patienten genutzt. Die Zeitpunkte der Experimente unterscheiden sich: Zeitpunkt eins, welcher in Graph 29 dargestellt ist, liegt ca. 4 Monate vor Zeitpunkt zwei.

Anhand der Pfeile mit den Beschriftungen „Yoda1 (625nM)“ und „Triton X-100“ ist der Zeitpunkt der experimentellen Manipulation der roten Blutzellen erkenntlich und, dass der Piezo1 Aktivator Yoda1, sowie TritonX-100 verwendet wurden. Letzteres führt zur Zell Lyse und dient somit Kalibrierungszwecken des Membranpotentials. Yoda1 wurde genutzt, um den Piezo1 Kanal zu aktivieren, welcher bei der Tochter und der Mutter mutiert ist. Die dargestellten Kurven zeigen jeweils die Mittelwerte einer dreifachen Wiederholung der Experimente.

Die orange Kurve zeigt jeweils die Werte der ersten Patientin („Kind“), welche sowohl eine Mutation im Gen für Piezo1 und für Spektrin alpha aufweist. In grau sind die Daten ihrer Mutter, Patientin zwei abzulesen, welche dieselbe Mutation des Piezo1- kodierenden Gens trägt, ansonsten aber gesund ist. Die Messwerte des Patienten drei, des Vaters der Patientin eins, sind in lila aufgetragen. Er trägt dieselbe Mutation im Spektrin alpha Gen wie seine Tochter, aber keine Mutation in Piezo1. Außerdem sind in rot und blau die Ergebnisse zweier gesunder Kontrollpersonen dargestellt, die weder eine Spektrin- noch eine Piezo1 Mutation haben: In rot Kontrolle eins und in blau Kontrolle zwei. Die

## 4 Ergebnisse

Proben der Kontrollpersonen sind unter denselben Bedingungen transportiert worden wie die Patientenproben. Allerdings sind beim ersten Zeitpunkt andere Kontrollpersonen gewählt worden als beim zweiten Experiment Durchlauf. Weiterhin wurden die Proben beim ersten Mal per Post von Graz nach Saarbrücken gesendet und bei der Wiederholung der Experimente wurden die neuen Proben persönlich aus Graz abgeholt und mit dem Auto nach Saarbrücken gebracht, sodass nur eine Zeitspanne von ca. zehn Stunden zwischen Blutentnahme und Beginn des Experiments lag.

Die prinzipiellen Reaktionen im Verlauf des Experiments sind bei allen Probanden gleich: Nachdem sich das Membranpotential der unbehandelten Erythrozyten in der Ringerlösung stabil eingestellt hat, sinkt es nach Zugabe von Yoda 1 innerhalb von wenigen Sekunden auf ein Minimum ab und steigt daraufhin langsamer wieder an.

Bei Graph 29 ist zu erkennen, dass das Membranpotential der verschiedenen Probanden durch Aktivierung des Piezo1 Kanals mit Hilfe von Yoda1, auf ein Minimum fällt. Im weiteren Verlauf steigt es wieder an, erreicht aber nicht ganz den Startwert von ca. minus 12 mV, sondern bleibt bei ca. minus 18 bis 20 mV (je nach Probanden) relativ konstant.

Weiterhin ist deutlich sichtbar, dass nach Zugabe von Yoda1 das Membranpotential bei Messungen mit dem Blut von Patientin eins sehr viel geringer fällt als bei allen anderen Probanden. So erreicht die orange Kurve einen Minimalwert von nicht ganz minus 40 mV, während in den Experimenten mit den Proben der Patientin zwei das Membranpotential fast auf minus 70 mV fällt.

Auch in Graph 30 sind die Verläufe der Membranpotentialschwankungen als Reaktion auf die Manipulationen mit Yoda1 und TritonX-100 bei allen Probanden ähnlich. Auffällig ist eine deutliche Differenz in den Membranpotential Minima der Patienten zwei (Mutter) und drei (Vater) sowie der Kontrollen eins und zwei verglichen mit Patientin eins nach Zugabe von Yoda1. Die Daten von Patientin eins erreichen bei ca. minus 50 mV ihr Minimum und steigen wieder an, während die Daten der anderen Probanden mindestens ein Minimum von ca. minus 70 mV erreichen. Die negativsten Minima erreichen hier Patientin zwei und Patient drei, welche sich nur geringfügig in ihren Minimalwerten unterscheiden und fast minus 80 mV erreichen. Mit etwas Abstand zu den Kurven der Patienten zwei und drei erreichen die gesunden Kontrollen eins und zwei ihre Minima bei ca. minus 70 mV.

Weiterhin ist zu beachten, dass die nicht-manipulierten Ruhemembranpotentiale in ihren Werten voneinander abweichen. Die Messungen der Experimente von Patientin zwei zeigen zu Beginn ein Membranpotential von ca. minus 21 mV und die des Patienten drei ca. minus 19 mV, während die übrigen drei Startpunkte der Messungen bei ca. minus 18 mV liegen.

Der Vergleich von Graph 29 und Graph 30 zeigt, dass die Membranpotentialverläufe der einzelnen Probanden in den jeweiligen Graphen ähnlich sind. Sie zeigen dieselben Reaktionen auf die

## 4 Ergebnisse

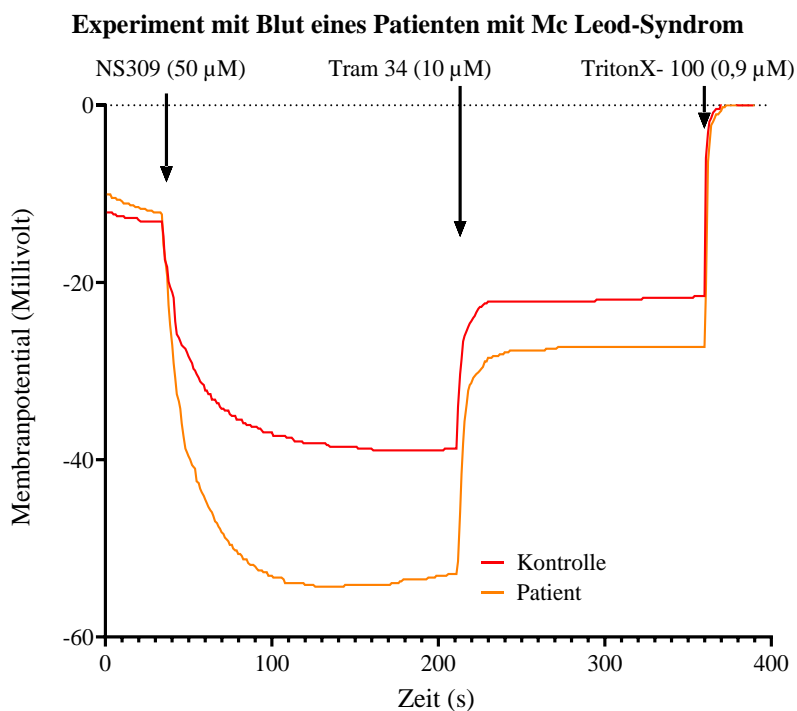
experimentellen Manipulationen. Als Ausnahmen ist der steilere Anstieg des Membranpotentials nach Erreichen seines Minimums von Mutter und Tochter in Graph 30 zu nennen. Außerdem stellt sich nach Erreichen des Membranpotential-Minimums durch Yoda1 und darauffolgenden Anstieg der Potentiale bei Graph 30, anders als bei Graph 29, kein konstanter Wert ein. Die Kurven steigen stattdessen kontinuierlich bis zur Zugabe von TritonX-100 an.

In beiden Experimentabläufen liegt mit ca. 20 bis 30 mV eine signifikante Differenz zwischen den Minimalwerten des Membranpotentials von Patientin eins und den anderen Probanden vor.

Außerdem zeigt Patientin zwei durch das jeweils negativste Membranpotential in beiden Graphen die stärkste Reaktion auf die Zugabe von Yoda1. Das zweittiefste Potential zeigt in beiden Graphen Patient drei, gefolgt von Kontrolle eins und zwei, welche in den zwei Graphen jeweils abwechselnd Rang drei und vier der niedrigsten Membranpotentiale stehen.

### 4.3.2 Experimente mit Proben eines Patienten mit McLeod-Syndrom

#### 4.3.2.1 Experiment zur Bestimmung der Gárdos- Kanal Aktivität eines Patienten mit McLeod-Neuro-Akanthozytose-Syndrom



**Graph 31: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten eines Patienten mit McLeod-Neuro-Akanthozytose-Syndrom und gesunden Kontrollen mit dem Gárdos- Kanal Aktivator NS309 und dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100.**

Graph 31 zeigt ein Kurvendiagramm. Durch Pfeile, welche mit den Namen der im Experiment genutzten Stoffe und ihren Konzentrationen beschriftet sind, ist erkennbar, zu welchem Zeitpunkt im Verlauf des Experiments die Zugabe des Gárdos- Kanal Aktivators NS309 (50µM), des Gárdos- Kanal

## 4 Ergebnisse

Inhibitors Tram 34 (10 $\mu$ M) und TritonX-100 erfolgte. Letztgenanntes führt dabei zur Lyse der Erythrozyten, was wichtig ist, um den pH-Wert korrekt in das Membranpotential umzurechnen.

Dargestellt sind zwei Kurven, welche jeweils den Durchschnitt von drei Wiederholungen der Experimente aufzeigen. Die orange Kurve zeigt die Veränderungen des Membranpotentials während der experimentellen Manipulation der Blutprobe des Patienten mit McLeod Neuro-Akanthozytose-Syndrom und die rote Kurve zeigt den Verlauf einer gesunden Transportkontrolle.

Die Erythrozyten beider Probanden reagieren auf die Substanzen NS309, Tram 34 und TritonX-100 prinzipiell gleich: Nach Zugabe von NS309, also durch Aktivierung des Gárdos- Kanals, fällt das bis dahin konstante Ruhemembranpotential steil ab. Nach wenigen Sekunden nimmt die Geschwindigkeit ab, mit der das Membranpotential fällt, bis es ein Plateau erreicht bzw. minimal wieder ansteigt. Durch Zugabe von Tram 34 steigt das Membranpotential dann wieder steil an und erreicht schnell einen konstanten Wert. Erst durch Zugabe von TritonX-100 steigt das Potential erneut steil an und erreicht bei null Millivolt seinen kalibrierten Endwert.

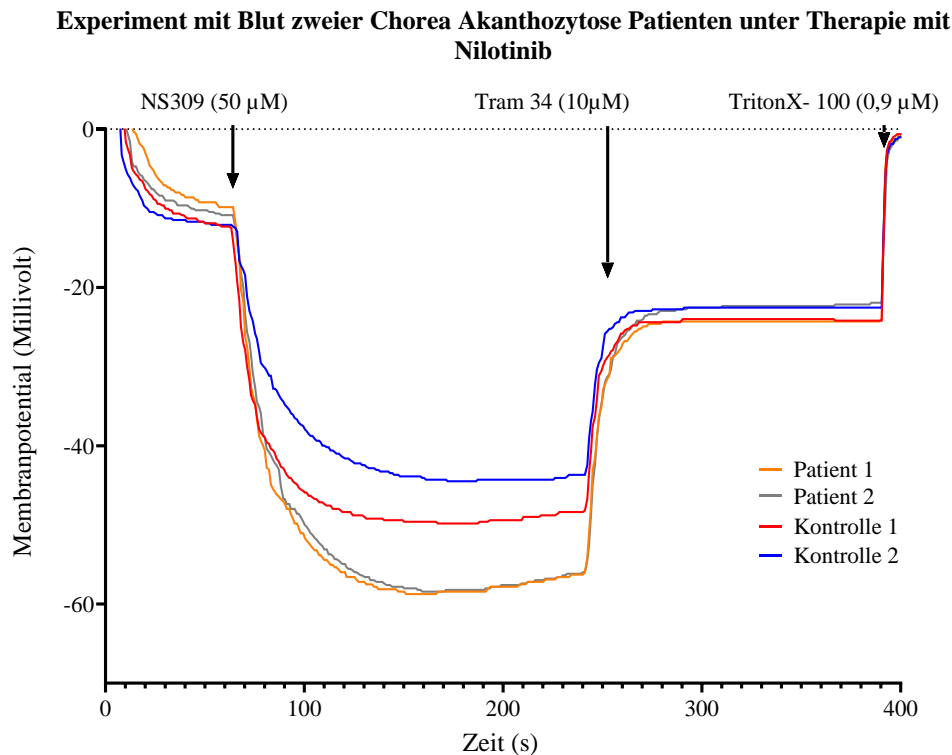
Die Daten des McLeod Neuro-Akanthozytose Patienten unterscheidet sich dahingehend von seiner gesunden Kontrolle, dass sein Membranpotential nach Zugabe des Gárdos- Aktivators NS309 auf deutlich negativere Werte fällt als das der Kontrollperson. So erreicht der McLeod Neuro-Akanthozytose Patient Membranpotentialwerte um minus 55 mV, wohingegen sich das Minimum der Kontrollperson bei ca. minus 40 mV findet. Außerdem steigt das Membranpotential des Patienten nach Zugabe von Tram 34 mit einem Wert von minus 27 mV in deutlich positivere Bereiche als das der Kontrolle, welche bei minus 22 mV ihr Plateau erreicht. Durch Zugabe von TritonX-100 synchronisieren sich beide Kurven wieder.

### 4.3.3 Experimente mit Proben zweier Patienten mit Chorea- Akanthozytose (CHAC)- Mutation

Im Folgenden möchte ich meine Daten zur Arbeit mit zwei Brüdern zeigen, welche an Chorea-Akanthozytose leiden. Mir war es möglich, sie während einer Zeitspanne von sieben Monaten mit meinen Experimenten zu begleiten. In dieser Zeit begannen die Patienten mit einer neuen Medikation namens Nilotinib (individueller Heilversuch), welche sie ab dem 03.11.2021 und über den gesamten Zeitraum konstant einnahmen. Mein Ziel war es herauszufinden, ob eine Wirkung des Medikamentes durch die Experimente darstellbar ist und zu sehen, ob und wie sich die Erythrozyten Reaktion auf experimentelle Manipulation in diesem Zeitraum verändert hat.

## 4 Ergebnisse

### 4.3.3.1 Beispielhafter Graph zum Verlauf des Membranpotentials der Patienten mit Chorea-Akanthozytose bei einem Experiment zur Untersuchung der Aktivität des Gárdos-Kanals



**Graph 32: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten zweier Patienten mit Chorea Akanthozytose und gesunden Kontrollen mit dem Gárdos- Kanal Aktivator NS309 und dem Gárdos-Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100.**

Graph 32 ist ein Beispiel für den Aufbau eines Experiments, welches ich mit den Proben zweier Brüder mit Chorea Akanthozytose in einem Zeitraum von sieben Monaten regelmäßig wiederholte, um die Wirkung der Einnahme ihres Medikamentes Nilotinib darzustellen und zu beobachten.

Anhand von Pfeilen mit den Beschriftungen „NS309 (50 µM)“, „Tram 34 (10 µM)“ und „TritonX-100“ ist ersichtlich, zu welchem Zeitpunkt die Erythrozyten mit welcher Substanz und in welcher Konzentration manipuliert wurden. Hierbei dient NS309 zur Aktivierung des Gárdos- Kanals und Tram 34 zur Inhibierung desselben. Den Gárdos- Kanal wählte ich aus, da der Zusammenhang zwischen den Symptomen bei Chorea Akanthozytose und der Mutation noch nicht ausreichend erforscht ist und es denkbar wäre, dass die Mutation einen Einfluss auf den Gárdos- Kanal hat, der dann Ursache eines Teils der Symptome sein könnte.

Vier Kurven in den Farben orange, grau, rot und blau zeigen die Verläufe der Membranpotentiale während der experimentellen Manipulation an, dabei stellt jede einzelne Kurve den Durchschnitt einer dreifachen Messwiederholung dar. In orange und grau sind die Verläufe der Membranpotentiale der beiden Brüder mit Chorea- Akanthozytose dargestellt. In blau und rot können die Potentialveränderungen der beiden gesunden Kontrollen abgelesen werden, welche in Alter und

## 4 Ergebnisse

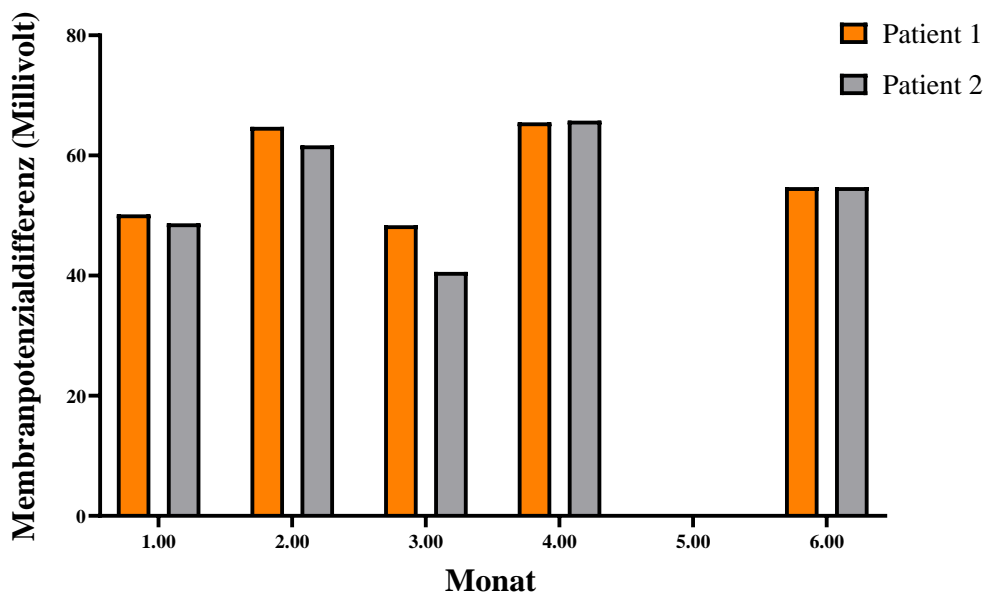
Geschlecht auf die Brüder abgestimmt wurden (Patient eins mit Kontrolle eins und Patient zwei mit Kontrolle zwei) und auch unter denselben Bedingungen nach Saarbrücken transportiert wurden.

Der Verlauf der Kurven innerhalb des Experiments ist jeweils ähnlich. Nach einer Phase, in der das Membranpotential konstant bei minus 10 mV liegt und das Ruhemembranpotential darstellt fallen die Potentiale durch Zugabe des Gárdos- Kanal Aktivators NS309 steil auf ihr Minimum ab, welches je nach Probanden bei zwischen minus 40 mV und minus 60 mV liegt. Im Anschluss steigen alle vier Graphen minimal an, bis sie durch Manipulation mit dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 sehr steil steigen und bei ca. minus 23 mV ein Plateau erreichen. Dieses konstante Potential wird durch die Zugabe von TritonX-100 und damit durch einen weiteren Anstieg des Membranpotentials auf null Millivolt durchbrochen.

Auch wenn die grundlegenden Verläufe der vier Kurven deutliche Parallelen aufweisen, sind dennoch deutliche Unterschiede zu erkennen. So zeigen beide Patienten mit ca. minus 60 mV zwar beinahe identische Minimalwerte nach Zugabe von NS309 an, diese unterscheiden sich aber deutlich von denen der Kontrollpersonen, welche mit minus 49 mV (Kontrolle eins) und minus 44 mV (Kontrolle zwei) auch untereinander noch deutlich abgrenzbar sind.

### 4.3.3.2 Graph zur Übersicht der Ergebnisse mehrerer Experimente zur Untersuchung der Aktivität des Gárdos- Kanals bei Patienten mit Chorea- Akanthozytose

#### Differenz zwischen dem Ruhemembranpotenzial und der maximalen Polarisation bei Experimenten mit Proben zweier Chorea- Neuroakanthozytose Patienten im Verlauf eines halben Jahres der Einnahme von Nilotinib



Graph 33: Veränderungen der Differenz zwischen Ruhemembranpotential und maximaler Polarisation der Erythrozyten von zwei Patienten mit Chorea Akanthozytose bei Experimenten mit dem Gárdos- Kanal Aktivator NS309 und seinem Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100 zur Lyse der Erythrozyten im Laufe eines halben Jahres mit neuer Medikation.

## 4 Ergebnisse

Um die Veränderungen der Experimentergebnisse im Verlauf der Medikamenteneinnahme besser vergleichbar zu machen, habe ich die Ergebnisse der beiden Brüder in einem Säulendiagramm vereint.

Zu sehen ist ein Säulendiagramm mit zwei verschiedenfarbigen Säulentypen: Orange Säulen bilden die Potentiale des Patienten eins ab, graue Säulen die seines Bruders, Patient zwei. Jede Säule stellt den Durchschnittswert aus drei Messwiederholungen dar. Auf der X-Achse ist der Zeitverlauf in Monaten sichtbar, dabei steht eins für Januar, zwei für Februar, drei für März usw. bis sechs für Juni. Das Experimentprotokoll zu den vorliegenden Experimenten habe ich ein halbes Jahr lang jeden Monat (bis auf den Mai), einmal mit den Proben der beiden Patienten durchgeführt, daher ist für jeden Monat und jeden Patienten eine Säule sichtbar, außer im Mai (Monat fünf). In diesem Zeitraum nahmen die Patienten eine neue Therapiemöglichkeit wahr, namens Nilotinib. Auf der Y-Achse ist die Membranpotentialdifferenz zwischen dem Ruhemembranpotential der Erythrozyten in ihren jeweiligen Experimenten, und der maximalen Polarisation im Experimentverlauf dargestellt. Die Angaben zur Potentialdifferenz sind in Millivolt angegeben und reichen von null Millivolt bis 80mV. Der Punkt der maximalen Polarisation trat jeweils nach Zugabe von NS309 ein.

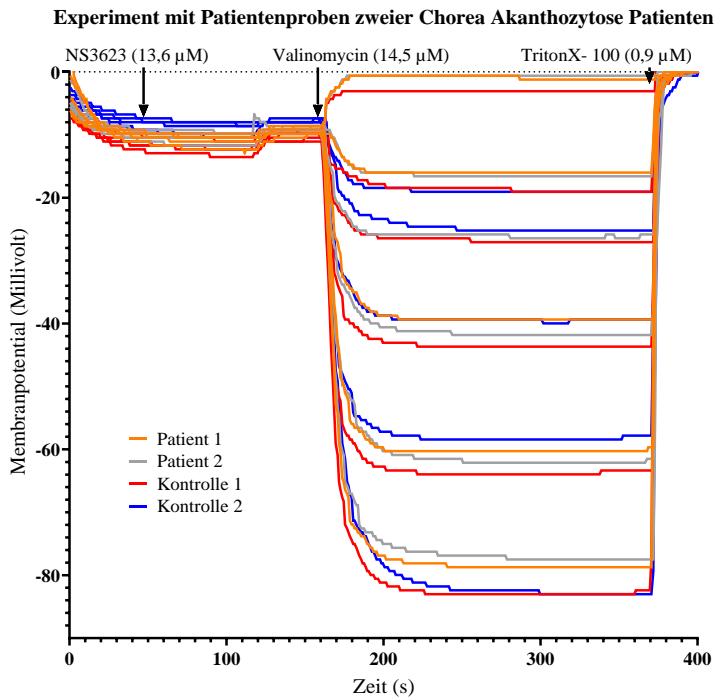
Im Vergleich der Säulen der beiden Patienten wird deutlich, dass sie sowohl sehr ähnliche Mittelwerte der Potentialdifferenzen zeigen wie beispielsweise bei den Experimenten im Monat Juni, aber auch untereinander Differenzen aufkommen. Beispielsweise im Januar, Februar und März. Hier zeigt Patient eins jeweils größere Potentialdifferenzen als Patient zwei. Patient zwei scheint nur im April eine etwas stärkere Differenz zwischen Ruhemembranpotential und stärkster Polarisation zu erreichen, allerdings ist der Unterschied zu seinem Bruder so gering, dass sie vernachlässigbar scheint und wie im Juni als identische Differenz der beiden Brüder interpretiert werden kann.

Weiterhin ist auffällig, dass im Hinblick auf die Veränderungen der Differenzen im Verlauf der Monate zwar kein Muster zu erkennen ist, aber die Säulen der Brüder im Vergleich zum Vormonat entweder beide steigen oder beide sinken.

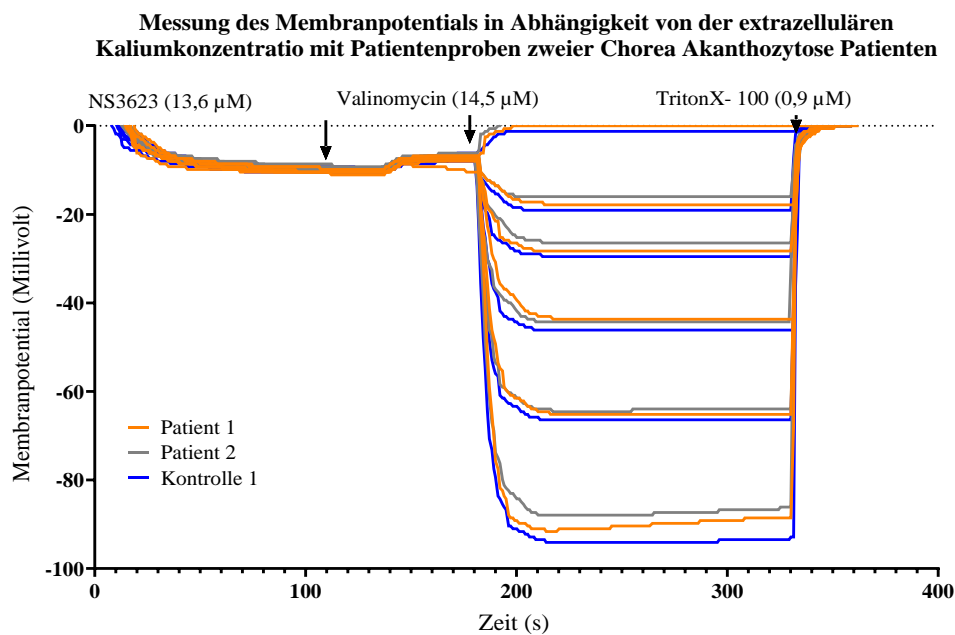


## 4 Ergebnisse

### 4.3.3.3 Experimente zur Bestimmung des Kaliumpotentials bei Patienten mit Chorea Akanthozytose



Graph 34: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten zweier Patienten mit Chorea Akanthozytose und gesunden Kontrollen mit dem Chloridionen Austausch- Inhibitor NS3623 und Valinomycin sowie TritonX-100 mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen in der Ringerlösung zur Bestimmung des Kaliumpotentials.



Graph 35: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten zweier Patienten mit Chorea Akanthozytose und gesunden Kontrollen mit dem Chloridionen Austausch- Inhibitor NS3623 und Valinomycin sowie TritonX-100 mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen in der Ringerlösung zur Bestimmung des Kaliumpotentials.

#### 4 Ergebnisse

Graph 34 und Graph 35 zeigen ein anderes Experimentprotokoll als in Graph 32 und Graph 33 aber mit denselben Patienten.

Anhand von beschrifteten Pfeilen ist ersichtlich, wann die Erythrozyten mit den Substanzen NS3623 (13,6  $\mu\text{M}$ ), Valinomycin (14,5  $\mu\text{M}$ ) und TritonX-100 manipuliert wurden. NS3623 ist ein Chloridionen Austausch- Inhibitor und blockiert dadurch die Chlorid Leitfähigkeit, sodass nur die Kaliumleitfähigkeit bestehen bleibt. Valinomycin dient als Ionophor sodass Kalium besser die Erythrozyten Membran passieren kann und Triton X-100 lysiert die roten Blutzellen, denn der pH-Wert der lysierten Erythrozyten ist zur Kalibrierung des Membranpotentials notwendig. Auch hier wurden die Substanzen gewählt, um eine mögliche Veränderung der Kanalaktivität zu finden, durch welche Symptome der Patienten begründet sein könnten.

In verschiedenen Farben sind die Potentialänderungen der einzelnen Probanden aufgetragen. In orange und grau sind jeweils die beiden Brüder eingezeichnet, welche an Chorea Acanthozytose leiden und in blau die Kontrollperson, welche in Bezug auf Alter und Geschlecht auf die Patienten abgestimmt wurde und deren Probe auch dieselben Transportbedingungen unterlag wie die der Patientenproben. Graph 34 zeigt noch eine weitere Kontrollperson, sodass in diesem Graph beide Brüder eine exakte Kontrolle in Bezug auf Alter und Geschlecht sowie Transportbedingungen haben.

Der Verlauf der Kurven in beiden Graphen ist zu Beginn sehr ähnlich. Zuerst zeigen alle Proben ein Ruhemembranpotential von ca. minus 10 mV, welches nach Zugabe von NS3623 minimal sinkt und nach einer kurzen Phase des Plateaus wieder ungefähr auf den Ausgangswert ansteigt. Durch Zugabe von Valinomycin teilen sich die Gruppen mit den jeweils verschiedenen Kaliumkonzentrationen auf und die Proben mit den gleichen Ringerlösungen liegen jeweils dicht beieinander: Je geringer der Kaliumanteil in der Ringerlösung, desto stärker die Polarisation und somit desto negativer das resultierende Membranpotential. Auffällig ist, dass alle Kurven durch Zugabe von Valinomycin auf ein negativeres Membranpotential fallen, bis auf die Probengruppe, welche als einzige eine Ringerlösung mit mehr Kaliumchlorid als Natriumchlorid aufweist und statt zu fallen leicht ansteigt. Durch Zugabe von TritonX-100 lysieren die Erythrozyten, sodass sich die Kurven aller Konzentrationsgruppen auf null Millivolt vereinen.

In Graph 34 bildet sich bedingt eine sich wiederholende Reihenfolge der Probanden in den jeweiligen Ringerlösungen. Beispielsweise ist das Membranpotential der Kontrolle eins bis auf Ringerlösung fünf immer am negativsten der vier Probanden. Weiterhin heben sich die Patientenproben in ihren Reaktionen auf die experimentelle Manipulation nicht deutlich von den gesunden Kontrollen ab. Sie zeigen zwar in vielen Gruppen die geringsten Polarisationen und Depolarisationen, aber dadurch, dass sie auch mehrfach stärkere Polarisationen zeigen als die Kontrollen kann diese Beobachtung in Graph 34 nicht als signifikant gewertet werden

## 4 Ergebnisse

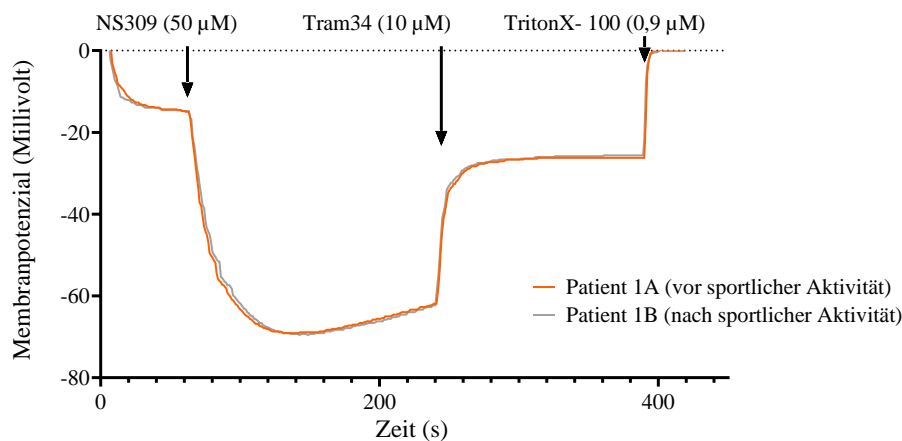
Außerdem ist zu beachten, dass in Graph 34 aufgrund von Problemen während des Experimentablaufes bei Konzentration vier Patient eins nicht aufgezeichnet wurde und bei Konzentration sechs die Kurve von Kontrolle zwei fehlt.

In Graph 35 ist dagegen eine sich eindeutig wiederholende Reihenfolge der Probanden in den einzelnen Gruppen mit denselben Ringerlösungen zu erkennen. So zeigt Kontrolle eins jeweils die stärksten Polarisationen nach Valinomycin Zugabe und Patient zwei die jeweils geringsten Polarisationen.

Im Vergleich von Graph 34 und Graph 35 wird deutlich, dass dieselben Experimentverläufe zu sehen sind und die einzelnen Kaliumchlorid Konzentrationsgruppen auch jeweils sehr ähnliche Membranpotentialwerte zeigen.

### 4.3.3.4 Experimente zur Bestimmung Gárdos- Kanal Aktivität bei Patienten mit Chorea Akanthozytose vor und nach sportlicher Betätigung

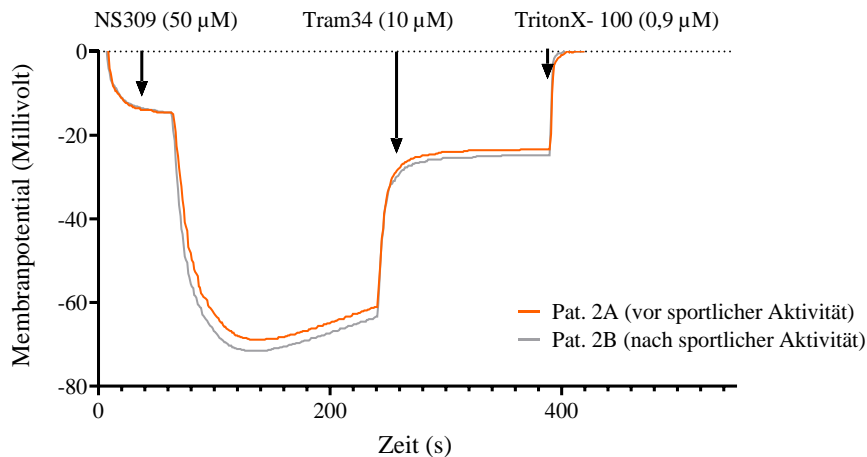
#### Experiment mit Proben eines Chorea Akanthozytose Patienten vor und nach sportlicher Betätigung



**Graph 36: Veränderungen des Membranpotentials von Erythrozyten eines Patienten mit Chorea- Akanthozytose vor und nach sportlicher Betätigung während einer Manipulation mit dem Gárdos- Aktivator NS309 und dem Gárdos- Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100.**

## 4 Ergebnisse

### Experiment mit Proben eines Chorea Akanthozytose Patienten vor und nach sportlicher Betätigung



**Graph 37: Veränderungen des Membranpotentials von Erythrozyten eines Patienten mit Chorea- Akanthozytose vor und nach sportlicher Betätigung während einer Manipulation mit dem Gárdos- Kanal Aktivator NS309 und dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100.**

Graph 36 und Graph 37 zeigen beide ein Liniendiagramm, auf welchem die Zeit in Sekunden gegen das Membranpotenzial in Millivolt aufgetragen ist, durch Pfeile im Graph ist gekennzeichnet zu welchem Zeitpunkt dem Experiment der Gárdos- Kanal Aktivator NS309, in einer Konzentration von 50 µM, der Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34, in einer Konzentration von 10 µM, sowie TritonX-100 in einer Konzentration von 0,9 µM zugefügt wurden. Letzteres dient der Zell Lyse, die nötig ist, um das Membranpotential kalibrieren zu können.

In beiden Graphen sind jeweils zwei verschiedenfarbige Kurven zu sehen. Jede Kurve zeigt den Durchschnitt einer dreifachen Experimentwiederholung. Dabei zeigt die orange Kurve die Messdaten der Patientenprobe vor einer sportlichen Betätigung und die graue Kurve die desselben Patienten nach sportlicher Betätigung. In Graph 36 handelt es sich um Patient eins, in Graph 37 um seinen Bruder, Patient zwei. Beide Patienten leiden an Chorea- Akanthozytose.

Beide Proben reagieren in beiden Graphen gleich auf die Gárdos- Kanal Aktivierung durch NS309, sowie auf dessen Inhibierung durch Tram 34 und auf TritonX-100. Durch Zugabe von NS309 sinkt das bis dahin stabile Membranpotential auf einen Minimalwert ab, welcher sehr langsam wieder ansteigt. Nach Zugabe von Tram 34 steigt das Membranpotential sehr schnell auf Werte um minus 20 mV, wo sich das Potential schnell stabilisiert. Durch TritonX-100 finden alle Kurven ein Ende bei null Millivolt.

Sowohl in Graph 36 als auch in Graph 37 wird deutlich, dass die sportliche Betätigung der beiden Patienten keinen Unterschied im Experimentverlauf macht. In Graph 37 liegen die graue und die orange Kurve sehr eng aneinander und in Graph 36 überlagern sich sogar beide Kurven.

## 4 Ergebnisse

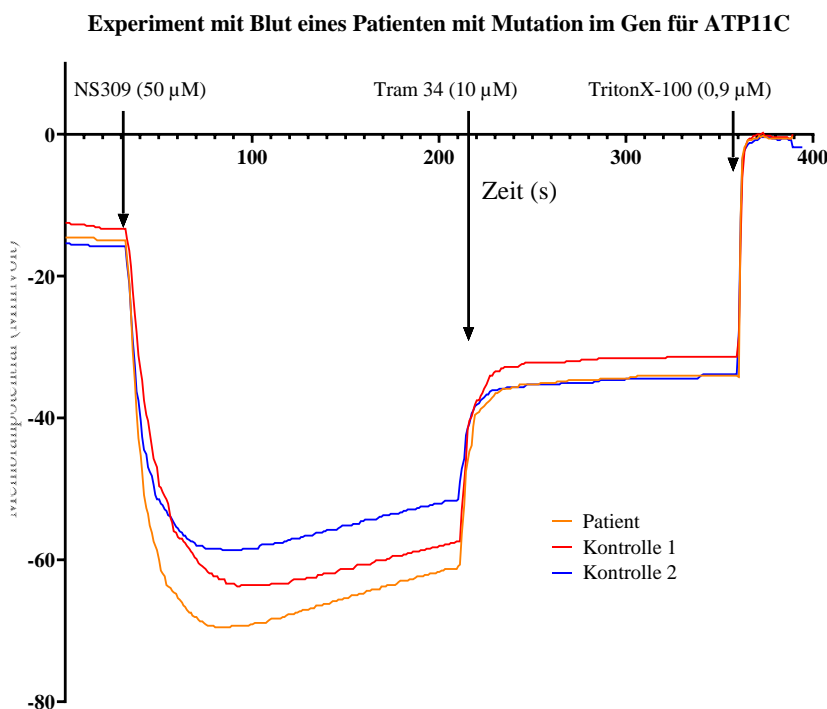
### 4.3.4 Experimente mit Proben eines Patienten ATP11C Mutation

Die ATP11C Mutation ist eine neue Mutation, die mit einer verminderten Aktivität der Phosphatidylserin-Flippase der roten Blutzellen einhergeht. Sie führt zu einer kongenitalen, hämolytischen Anämie.

Der genaue Name der bei diesem Patienten vorhandenen Mutation ist mATP11C Leu786Phe. ATP11C ist die einzige, in menschlichen Erythrozyten reichlich vorhandene P4-ATPase-Phospholipid-Flippase und für den Aufbau sowie die Aufrechterhaltung der Phospholipid Assymetrie verantwortlich.

Bisher sind weltweit nur zwei Patienten mit ATP11C Leu786Phe Mangel bekannt. Bei dem Patienten, wessen Blutproben ich untersucht habe, handelt es sich um einen 37-jährigen Mann. Seine mit der Mutation assoziierten Beschwerden sind Unterleibsschmerzen, eine milde Splenomegalie, eine chronische Müdigkeit sowie eine verminderte körperliche Leistungsfähigkeit und eine milde, normozytäre Anämie.

#### 4.3.4.1 Experiment zur Bestimmung der Gárdos- Kanal Aktivität eines Patienten mit ATP11C Mutation



**Graph 38: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten eines Patienten mit ATP11C Mutation und gesunden Kontrollen mit dem Gárdos- Kanal Aktivator NS309 und dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100.**

Graph 38 zeigt die Veränderungen des Membranpotentials von Erythrozyten eines Patienten mit ATP11C Mutation im Vergleich zu zwei gesunden Transportkontrollen bei Veränderung der Ionendurchlässigkeit der roten Blutzellen durch den Gárdos- Kanal Aktivator NS309 und den Gárdos-

#### 4 Ergebnisse

Kanal Inhibitor Tram 34, sowie TritonX-100, welches am Ende des Experiments zur Lyse der Erythrozyten führt, wodurch das Membranpotential kalibriert werden kann.

Anhand von Pfeilen mit den Beschriftungen NS309 (50 $\mu$ M), Tram 34 (10 $\mu$ M) und TritonX-100 wird der Zeitpunkt, sowie die Art und Konzentration der experimentellen Manipulation der Erythrozyten deutlich.

Es sind drei verschiedenfarbige Kurven zu sehen, die jeweils den Durchschnitt einer dreifachen Messwiederholung widerspiegeln. In orange werden die Membranpotentialveränderungen der Patienten-Erythrozyten dargestellt, in rot und blau sind jeweils die beiden Kontrollproben eingezeichnet, welche unter denselben Bedingungen wie die Patientenprobe transportiert wurden.

Alle drei Verläufe zeigen erst ein konstantes Ruhemembranpotential bei ca. minus 15 mV, welches nach Zugabe von NS309 deutlich abfällt und nach Erreichen eines Minimums in Sekunde 210 nach Start wieder langsam und kontinuierlich ansteigt. Nach Zugabe von Tram 34 steigen alle drei Potentiale wieder sehr steil an, bis sie zwischen minus 30 mV und minus 40 mV ein Plateau erreichen. Dieses bleibt bis zur Zugabe von TritonX-100 und damit zum Anstieg des Membranpotentials auf null Millivolt konstant.

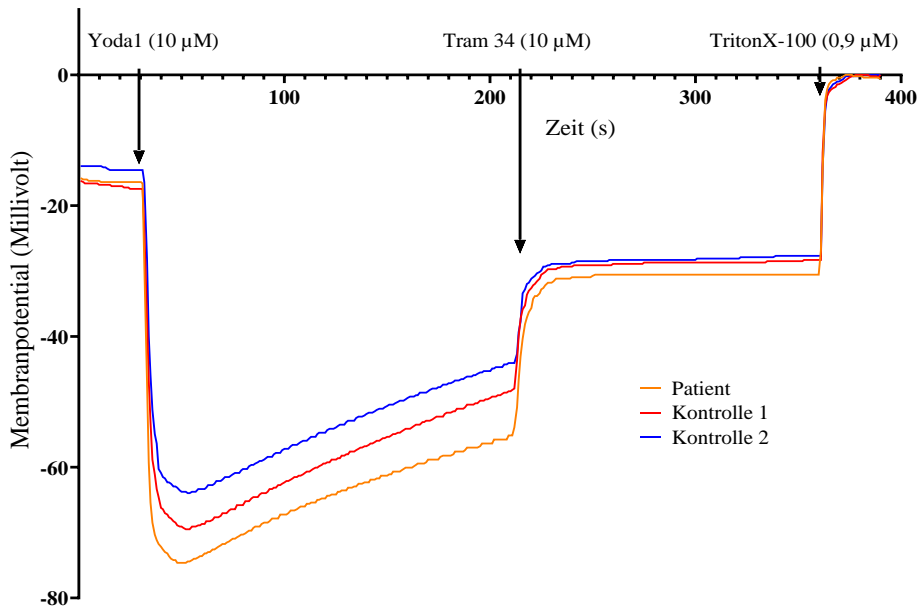
Im Vergleich der drei Probanden wird deutlich, dass das Membranpotential des Patienten nach Zugabe von NS309 am tiefsten abfällt. Allerdings liegt die Differenz der Minima zwischen dem Patienten und Kontrolle eins sowie Kontrolle eins und Kontrolle zwei jeweils bei ca. 5 mV, sodass sich insgesamt ein homogenes Bild ergibt.

Weiterhin ist auffällig, dass Kontrolle eins nach Zugabe von Tram 34 mit minus 31 mV ein sichtbar positiveres Plateau zeigt als der Patient und die zweite Kontrolle, die beide bei minus 34 mV konstante Werte zeigen.

## 4 Ergebnisse

### 4.3.4.2 Experiment zur Bestimmung der Piezo- und Gárdos- Kanal Aktivität eines Patienten mit ATP11C -Mutation

#### Experiment mit Blut eines Patienten mit Mutation im Gen für ATP11C



**Graph 39:** Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten eines Patienten mit ATP11C- Mutation und gesunden Kontrollen mit dem Piezo1 Aktivator Yoda1 und dem Gárdos- Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100.

Graph 39 befasst sich mit demselben Patienten und denselben Kontrollen wie Graph 38. Die Daten wurden auch zum selben Zeitpunkt erhoben. Das Protokoll des Experiments weicht aber von dem für Graph 38 ab, denn hier wurde das Membranpotential statt durch NS309 durch einen anderen Piezo1 Aktivator, Yoda1 manipuliert, sowie durch den Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 und durch TritonX-100.

Pfeile mit den Schriftzügen „Yoda1 (10 µM)“, „Tram 34 (10 µM)“ und „TritonX-100“ geben Auskunft über die verschiedenen Manipulationen der Erythrozyten inklusive der Konzentration der hinzugefügten Substanz sowie des Zeitpunktes der Zugabe. TritonX-100 wird dabei zur Zell Lyse eingesetzt, durch welche das Membranpotential kalibrierbar wird.

Im Graphen sind drei verschiedenfarbige Kurven eingezeichnet, welche jeweils den Durchschnitt einer dreifachen Wiederholung des Experiments angeben. In orange ist die Veränderung des Membranpotentials der Patientenprobe zu sehen, in blau und rot sind die gesunden Transportkontrollen ablesbar.

Die einzelnen Kurven zeigen jeweils ähnliche Verläufe. Zu Beginn des Experiments zeigen sie alle ein Plateau, welches das Ruhemembranpotential widerspiegelt. Nach Zugabe von Yoda1 fallen die drei Kurven rasant auf ein Minimum ihres Membranpotentials, um langsam und kontinuierlich wieder anzusteigen, bis durch Zugabe von Tram 34 das Membranpotential der Erythrozyten aller Probanden

#### 4 Ergebnisse

wieder auf positivere Werte steigt. Bei ca. minus 30 mV erreicht es ein Plateau. Dieses Plateau wird erst durch Zugabe von TritonX-100 aufgehoben, da die Membranpotentiale durch die Zell Lyse auf ein Potential von null Millivolt steigen.

Im Vergleich der drei verschiedenen Kurven fällt auf, dass das Ruhemembranpotential von Kontrolle zwei mit minus 13,5 mV ca. 2 mV positiver ist als die Durchschnittswerte der Ruhemembranpotentiale von Kontrolle eins und dem Pateinten. Bezogen auf die Minima der Membranpotentiale zeigt der Patient mit minus 73 mV die stärkste Reaktion auf Yoda1, gefolgt von Kontrolle eins und Kontrolle zwei, die jeweils eine Differenz von 5 mV im Vergleich auf ihre Nachbarkurven zeigen. Bei der Plateaubildung nach Zugabe von Tram 34 zeigen beide Kontrollen mit einem Mittelwert von minus 28,3 mV identische Werte, wohingegen die Kurve der Patientenprobe mit minus 30 mV leicht negativere Werte zeigt.



## 5 Diskussion

### 5.1 Etablierung der MBE Methode in Saarbrücken

#### 5.1.1 Grundprinzipien der MBE Methode

Wie auch im Ergebnisteil, möchte ich zuerst auf die Grundprinzipien der MBE- Methode eingehen. Dieses basiert auf der permanenten Messung des pH-Wertes der ungepufferten Experimentlösung, wodurch Veränderungen im pH-Wert dargestellt und später umgerechnet werden können. Daraus folgt, dass nur Substanzen Teil der Lösung sein dürfen, welche keine Pufferfunktion haben, da ansonsten die Veränderung im pH-Wert ausgeglichen würde und somit Reaktionen der Erythrozyten auf die Zugabe von beispielsweise Kanalaktivatoren oder -inhibitoren nicht detektierbar wären.

In Graph 1 sind beispielhaft die Veränderungen im pH-Wert dargestellt, die während eines Experiments mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100 gemessen wurden. Zuerst wird nur der pH-Wert der Ringerlösung gemessen, welcher der Protonophor CCCP beigefügt ist. Da es sich hierbei um eine homogene Flüssigkeit handelt, zeigt sich ein stabiles Membranpotential. Durch Zugabe der gepackten Erythrozyten steigt der pH-Wert auf ca. 7,2 an, das spiegelt den extrazellulären pH-Wert in der Erythrozyten-Suspension wider. Dabei ist es wichtig, nicht zu wenig Erythrozyten hinzuzugeben, da der Einfluss des pH-Wertes der Ringerlösung dann nicht mehr vernachlässigbar gering wäre.

Durch Ionenverschiebungen über die Erythrozytenmembran, wie beispielsweise nach Zugabe der Kalium Pore Valinomycin, ändert sich die Leitfähigkeit der Membran, welche zu einer Änderung des Membranpotentials führt. Durch den Protonophor CCCP haben die Protonen die Möglichkeit, sich frei über die Membran zu bewegen, sodass sich die H<sup>+</sup>- Verteilung entsprechend des Membranpotentials einstellt. Der pH-Wert im Zellinneren der Erythrozyten ist aufgrund der Pufferkapazität des Hämoglobins stabil bei ungefähr pH 7, sodass die Änderung des extrazellulären pH-Wertes streng proportional dem Membranpotential folgt und somit aus dem gemessenen pH-Wert das Membranpotential berechnet werden kann.

Über die Formel  $\Delta V_M = -61.5 * (pH_o - pH_i)$  können die pH-Werte, welche während des Experiments mit der Frequenz von 1 Hz gemessen und gespeichert werden, so in das entsprechende Membranpotential umgerechnet werden. Dabei ist pH<sub>o</sub> der zu dem gewählten Zeitpunkt in der Ringerlösung gemessene pH-Wert und pH<sub>i</sub> der pH-Wert, welcher nach Lyse der Erythrozyten gemessen wurde.

Diese Gleichung ist angelehnt an die Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung, welche in der Einleitung erläutert ist. Sie dient der Berechnung des Membranpotentials anhand der Verteilung von im Gleichgewicht stehenden Protonen und Anionen, sodass auch über die Beobachtung extrazellulärer pH-Änderungen eines ungepufferten Mediums die Bestimmung des Membranpotentials ermöglicht wird [48].

## 5 Diskussion

Da in den Erythrozyten eine nach innen gerichtete Antriebskraft für die positiv geladenen  $H^+$  Ionen existiert, kann über ihr Gleichgewicht das Membranpotential berechnet werden. Der wichtigste Faktor, welcher die Berechnung bei Erythrozyten ermöglicht, ist, dass sie mit Hämoglobin gefüllt sind, welches eine große Pufferkapazität besitzt.

Somit kann über die Beobachtung der Veränderungen im pH-Wert eines ungepufferten Mediums das Membranpotential berechnet werden:

$$V_M = \frac{R \times T}{F} \ln \frac{[H^+]_o}{[H^+]_i} = 2,303 \times \frac{R \times T}{F} \times (pH_i - pH_o)$$

$V_M$  steht für das Membranpotential, die Konstanten dieser Gleichung sind bereits in der Einleitung erklärt und können dort nachgelesen werden.

Da das Zytoplasma durch das in ihm vorliegende Hämoglobin gepuffert ist, ist davon auszugehen, dass  $pH_i$  konstant ist. Durch Zugabe von TritonX-100 kommt es zur Lyse aller Erythrozyten und damit zur Entfernung aller Plasmamembranen. Somit ergibt sich aus der pH Messung der Erythrozyten Suspension nach TritonX-100 Zugabe  $V_M = 0$  mV und  $pH_i = pH_o$ , also  $pH_i$  bei  $V_M = 0$  mV. Daraus lässt sich  $pH_i = pH_{Lysat} = pH_{V_M=0}$  ableiten. Bei der Berechnung der Konstanten wird das Membranpotential bei 37°C durch eine einfache Gleichung ermittelt, nämlich  $\Delta V_M = -61.5 * (pH_o - pH_{V_M=0})$  [48].

Dies entspricht der zu Anfang erklärten Formel  $\Delta V_M = -61.5 * (pH_o - pH_i)$ , über welche die Veränderungen des Membranpotentials aus Graph 2 berechnet wurden.

Im gewählten Beispiel in Graph 1 wurde als nächstes der Chloridionen Austausch Inhibitor NS3623 zugegeben. Dieser blockiert die Passage der Chloridionen über die Erythrozyten Membran. Diese Zugabe löst fast keine Veränderung des pH-Wertes aus, was dadurch begründet werden kann, dass innerhalb der Erythrozyten und in der Ringerlösung eine ähnliche Chlorid Konzentration vorliegt. Dadurch bedarf es zum Erreichen eines Gleichgewichts keiner großen Chloridionen Verschiebungen mehr. Für diese Homöostase sind auch Kationen, wie Kalium, von Bedeutung. Die Zugabe von NS3623 ist für den Experimentverlauf wichtig, um sicherzustellen, dass die Reaktion auf den Kalium Ionophor Valinomycin nicht durch Anionen Passagen verfälscht wird. Valinomycin wird nach NS3623 der Lösung hinzugefügt.

Im Gegensatz zu NS3623 löst die Zugabe von Valinomycin eine große Verschiebung des pH-Wertes aus. In Graph 1 steigt der pH nach Zugabe von Valinomycin von ca. 7,2 auf ca. 8 an. Der Grund dieses starken pH-Anstiegs ist die durch Valinomycin ermöglichte Verschiebung von Kaliumionen aus den Zellen nach extrazellulär. Nach Erreichen des pH-Wertes von ca. 8 bildet sich ein Plateau aus, da an diesem pH-Wert gleichviele Kaliumionen intrazellulär vorliegen, wie extrazellulär. Dieser Zustand wird erst durch die Zugabe von TritonX-100 durchbrochen.

## 5 Diskussion

Bei TritonX-100 handelt es sich um eine seifenähnliche Flüssigkeit, welche durch die Zerstörung der Lipiddoppelschicht der erythrozytären Plasmamembran zur Lyse der roten Blutzellen führt, wodurch alle Zellbestandteile in die Experimentlösung freigesetzt werden. Durch die Lyse der Zellen sinkt der pH-Wert in der Lösung auf einen Wert von ca. 7,0. Dieser Wert ist gleichzusetzen mit dem intrazellulären pH-Wert der Erythrozyten.

### 5.1.2 Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin

Um zu beweisen, dass die MBE-Methode realistische Ergebnisse zeigt, habe ich eine Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität durchgeführt, mit dem Chloridionen Austauschinhistor NS3623, dem Kalium Ionophor Valinomycin, TritonX-100 und sechs verschiedenen Kaliumkonzentrationen in der Ringerlösung. Die Potentialverläufe sind in Graph 3 dargestellt.

In der Theorie ist davon auszugehen, dass durch eine geringere Kaliumkonzentration in der Ringerlösung, wie beispielsweise bei Ringerlösung eins mit 2,0 mM Kalium, der Kaliumgradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum der Erythrozyten am größten ist, denn die intrazelluläre Kaliumkonzentration der Erythrozyten liegt mit ca. 100 mM sehr hoch. Durch den hohen Kaliumgradienten kann angenommen werden, dass die Fluktuation der Kaliumionen zwischen Intra- und Extrazellulärraum am höchsten ist und somit auch der pH-Wert die größten Differenzen verzeichnet. Dadurch müssten auch die Änderungen im Membranpotential der Erythrozyten bei dieser geringeren Kaliumkonzentration in der Ringerlösung sehr hoch ausfallen.

Das Membranpotential der Erythrozyten kann weiterhin durch die Nernst Gleichung ausgerechnet werden, die in der Einleitung erläutert ist. Normalerweise müsste anstelle der Nernst-Gleichung die Goldman- Hodgkin- Katz Gleichung zur Berechnung des Membranpotentials gewählt werden, denn das Membranpotenzial von Erythrozyten wird nicht nur durch eine Ionenart bestimmt. Da aber in meinen Experimenten die Chloridleitfähigkeit durch Zugabe von NS3623 blockiert wird, basiert das Membranpotenzial der Erythrozyten überwiegend auf der Leitfähigkeit für Kaliumionen.

In der Nernst Gleichung ist die Spannung über der Erythrozytenmembran bei geringer extrazellulärer Kaliumkonzentration dadurch verdeutlicht, dass die extrazelluläre Kaliumkonzentration im Nenner der Rechnung steht. Dadurch ergeben sich bei der Division kleiner extrazelluläre Kaliumkonzentrationen große Zahlen, die dann wiederum in die Multiplikation eingehen und somit die Unterschiede im Membranpotential zwischen hohen und niedrigen extrazellulären Kaliumkonzentrationen verstärkt werden.

Die in Graph 3 dargestellten Ergebnisse beweisen durch ihre Aufteilung und die Reihenfolge der verschiedenen Gleichgewichtskonzentrationen nach Zugabe von Valinomycin, dass die MBE-

## 5 Diskussion

Methode, inklusive der Umrechnung der gemessenen pH-Werte in die Membranpotentiale, funktioniert. Diese Ergebnisse sind in Graph 4 durch die logarithmische Darstellung der Korrelation zwischen Kaliumkonzentration in der Ringerlösung und konstantem Potential nach Zugabe von Valinomycin verdeutlicht: Je kleiner die extrazelluläre Kaliumkonzentration ist, desto höher ist das Membranpotential nach Zugabe des Ionophors.

Weiterhin möchte ich diskutieren, ob auch die Höhe der konstanten Potentiale nach Valinomycin Zugabe mit der Theorie übereinstimmt, und nicht nur die Reihenfolge der Aufteilung korrekt ist. Dazu habe ich mithilfe der Nernst Gleichung zu jeder der sechs Kaliumkonzentrationen das theoretische Membranpotential ausgerechnet und es mit den Daten aus der Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin verglichen. Die intrazelluläre Kaliumkonzentration habe ich dafür mit einem Wert von 100 mM bedacht, welcher in Lehrbüchern nachzuschlagen ist [130].

Als Beispiel möchte ich die Rechnung zur ersten Ringerlösung anbringen:

$$E_{K^+} = -61mV \times \log \frac{\frac{100mmol}{l}}{\frac{2,0mmol}{l}} = -103,6mV$$

Das experimentell erhaltene Membranpotential liegt mit ca. minus 85 mV über den errechneten minus 103,64 mV, zeigt also eine geringere Änderung als erwartet. In diese Differenz könnten verschiedene Faktoren eingespielt haben. Als wichtigsten Grund kann genannt werden, dass sich bei einem großen Konzentrationsgradienten der Gradient durch den Kaliumstrom verringert, dies geschieht bei geringeren Gradienten weniger, sodass bei kleineren Gradienten die Potentiale genauer übereinstimmen. Außerdem war zum einen durch die Zugabe von NS3623 zwar die Passage der Anionen durch die Erythrozyten Membran blockiert, dennoch spielen neben Kalium auch andere Ionen, wie beispielsweise Natrium, eine Rolle im Gleichgewichtspotential der Erythrozyten und können das Ergebnis beeinflusst haben. Weiterhin kann es durch beispielsweise die Zugabe von TritonX-100 oder anderen Substanzen des Experimentprotokolls zu Abweichungen des End-pH Wertes vom intrazellulären pH-Wert der Erythrozyten gekommen sein. Da der nach Zell Lyse gemessene pH-Wert in die Berechnung des Membranpotentials eingeht, wäre eine Verfälschung hierdurch denkbar. Allerdings ist dabei zu beachten, dass das Hämoglobin, welches durch die Zell Lyse in die Lösung freigesetzt wird, ein starker Puffer ist und somit große Veränderungen des pH-Wertes verhindert.

Dennoch sind auch Messungenauigkeiten, wie z.B. durch geringfügige Kontaminationen, denkbar und würden die Ergebnisse verändern.

## 5 Diskussion

Das mit der Nernst Gleichung errechnete Membranpotential für die Ringerlösung mit 9,9 mM Kalium stimmt verglichen zur ersten Ringerlösung sehr gut mit den experimentellen Ergebnissen überein. Hier müsste sich laut Nernst Gleichung ein Gleichgewichtspotential von minus 61,3 mV ergeben. Das in der Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin gemessene Potential lag mit ca. minus 63 mV nur ca. 1,5 mV daneben. Dies kann als Messungenauigkeit gewertet werden.

Für Ringerlösung 3, mit 24,8 mM Kalium errechnet sich ein Membranpotential von minus 36,9 mV. Das zugehörige Potential aus der Membranpotentialmessung liegt bei minus 44 mV und somit auch noch sehr nah an dem berechneten Wert. Fast dieselbe Differenz zwischen errechnetem Wert und experimentell gemessenem Membranpotential zeigt die Ringerlösung mit 49,6 mM Kalium. Hier liegt das Membranpotential laut Nernst Gleichung bei minus 18,6 mV und laut Ergebnissen der Experimentreihe bei minus 27 mV.

Etwas größere Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden zur Bestimmung des Membranpotentials liegen in Ringerlösung fünf und sechs vor. Hier liegt die Differenz bei ca. 10 mV (Ringerlösung Nr. 5; 74,4 mM Kalium) und ca. 13 mV (Ringerlösung Nr.6; 153,0 mM Kalium). Diese Abweichungen können ebenfalls durch die zur ersten Ringerlösung diskutierten Gründe entstanden sein.

Insgesamt zeigt die Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin, dass die MBE Methode sehr valide Ergebnisse zeigt, auch wenn sie durch beispielsweise Messungenauigkeiten nicht immer 100%ig mit den mithilfe der Nernst-Gleichung errechneten Daten übereinstimmen. Da sich die Nernst-Gleichung nur auf das Kalium Gleichgewichtspotential beschränkt, liegt auch auf Seiten der Gleichung eine Fehlerquelle vor, die neben Messungenauigkeiten zu den Differenzen geführt haben könnte.

### 5.1.3 Einfluss der Hämatokrit Konzentration

Um mir ein Bild davon zu machen, ob die Hämatokrit Konzentration einen Einfluss auf den Potentialverlauf während der Durchführung der MBE- Methode hat, und falls ja, welches die geeignetste Zugabe Menge gepackter Erythrozyten ist, habe ich das Experimentprotokoll mit dem Chloridionen Austausch Inhibitor NS3623, dem Kalium Ionophor Valinomycin sowie TritonX-100 mit verschiedenen Hämatokrit Konzentrationen durchgeführt.

Macay befasste sich bereits vor mir mit dieser Fragestellung und kam zu dem Ergebnis, die Höhe der Hämatokrit Konzentration im Experiment habe keinen Einfluss auf dessen Verlauf, solange dieser nicht unter 3% liege [78].

## 5 Diskussion

Diese Theorie erschien mir allerdings unrealistisch. Meines Erachtens muss der Hämatokrit einen Einfluss auf die Höhe des Membranpotentials nehmen, da mit dem Vorliegen von vielen Erythrozyten auch die Summe an Kaliumionen steigt, die potenziell nach Zugabe des Kalium Ionophors in die Lösung diffundieren können. Da durch die Zugabe von NS3623 die Chlorid Leitfähigkeit blockiert ist, wird das Membranpotential durch die Kaliumverteilung bestimmt. Das hat als Folge, dass bei einer hohen Kaliumkonzentration, wie sie in den Erythrozyten vorliegt (ca. 100 mM), und einer geringen Kaliumkonzentration in der Ringerlösung, ein großer Potentialsprung zu verzeichnen ist. Da durch einen hohen Hämatokrit Anteil mehr Kaliumionen in die Ringerlösung strömen können, muss es ab einer bestimmten Hämatokrit Konzentration zum Erliegen des Konzentrationsgradienten kommen und damit zu einem geringeren Ausschlag des Membranpotentials.

Die Ergebnisse meiner Experimente (Graph 5, Graph 6) zeigen, dass eine hohe Hämatokrit Konzentration mit einem geringeren Abfall des Membranpotentials nach Valinomycin Zugabe einhergeht. Somit unterstützen sie meine Hypothese. Allerdings ist zu beachten, dass auf Grundlage dieser Hypothese davon auszugehen ist, dass die Abnahme des konstanten Potentials durch eine Abnahme des Membranpotentialbetrags auch während des Experiments zu sehen sein muss. Dies ist für die Hämatokrit Konzentrationen 4,4% und 8,4% und geringfügig auch für 12,1% der Fall, da die Potentiale nach Erreichen ihres Plateaus leicht wieder steigen. Dieser Anstieg bleibt aber bei den höheren Konzentrationen aus. Daher wären weitere Ursachen für den Unterschied in den Potentialen nach Valinomycin Zugabe zu erforschen.

Da im Experimentprotokoll die Volumina von NS3623 und Valinomycin konstant gehalten wurden, ergibt sich infolge der verschiedenen Erythrozyten Volumina je nach Hämatokrit Konzentration eine andere NS3623- und Valinomycin Konzentration. Je höher der Hämatokrit Anteil in der Ringerlösung ist, desto geringer fällt die Konzentration der beiden genannten Stoffe aus. Daher könnte argumentiert werden, dass die Valinomycin Konzentration bei den hohen Hämatokrit Zugaben nicht mehr für alle Erythrozyten ausreicht. Somit würde ein Teil der Erythrozyten polarisieren und der andere Teil, ohne Valinomycin Einfluss bliebe ohne Veränderung des Membranpotentials. Da die MBE- Methode den durchschnittlichen Membranpotentialverlauf aller Erythrozyten der Population misst, würde dies bedeuten, dass das gemessene Ergebnis einen Durchschnitt aus polarisierten und nicht polarisierten Potentialen widerspiegelt. Durch die nicht polarisierten Zellen würde damit der Wert des Membranpotentials abnehmen. Folglich würde ein immer kleinerer Wert des Membranpotentials resultieren, je mehr Zellen nicht polarisieren. Allerdings spricht gegen diese Argumentation, dass selbst in der höchsten Hämatokritkonzentration (18,7%) noch  $3,868 \cdot 10^6$  Valinomycin Moleküle pro Erythrozyten in der Lösung vorliegen und somit davon auszugehen ist, dass die Wirkung von Valinomycin alle Erythrozyten ausreichend erreicht.

## 5 Diskussion

Somit muss argumentiert werden, dass die Abnahme des Kaliumgradienten wahrscheinlich die größte Rolle bei der Entstehung der Membranpotentiale der verschiedenen Hämatokrit Konzentrationen spielt.

Trotz meiner Beobachtung ist nicht ausgeschlossen, dass auch Macay et al. in ihrer These recht haben, denn ist zu beachten, dass sich die Daten, auf denen Macays Aussage basiert, auf Messungen von Erythrozyten in Salzlösungen beziehen. Das bedeutet, dass keine Manipulation durch Valinomycin vorlag. Meine Ergebnisse zeigen vor Zugabe von Valinomycin auch kaum einen Unterschied zwischen den verschiedenen Hämatokrit Konzentrationen. Durch Öffnung der Kaliumkanäle nach Valinomycin Zugabe ergeben sich die Differenzen zwischen den verschiedenen Hämatokrit Werten, sodass beide Thesen stimmen könnten und sich nicht widersprechen müssen. Macey et al. (1978) argumentiert außerdem, es komme bei nicht ausreichender Waschung der Erythrozyten oder bei Freisetzung von Hämoglobin in die extrazelluläre Lösung zu Veränderungen des Membranpotentials je nach Hämatokrit Zugabe. Da das von Macey et al. (1978) beschriebene dreifache Waschen der Erythrozyten mit isotoner, ungepufferter Lösung und Zentrifugieren bei 3000 rcf meinem dreifachen Zentrifugieren der Erythrozyten für jeweils drei Minuten bei 8000 rcf und Waschen mit isotoner, ungepufferter Salzlösung sehr ähnlich ist, kann diese Begründung der Membranpotential Differenzen hier ausgeschlossen werden. Auch eine Hämolyse der Zellen wäre beim Waschen aufgefallen, da sich dann der Überstand durch das Hämoglobin verfärbt hätte.

Zur Fragestellung, welches der geeignetste Hämatokrit für die Nutzung der MBE-Methode ist, habe ich mich für 8,4% Hkt. entschieden, was einer Zugabe gepackter Erythrozyten von 100 µl entspricht. Diese Konzentration habe ich gewählt, da sie mit 4,4% Hämatokrit die stärksten Ausschläge nach Valinomycin Zugabe gezeigt hat. Zwischen den Potentialen bei der Zugabe von 4,4% Hkt. und 8,4% Hkt. ist die Differenz sehr gering, aber der Fehlerbalken im Graph 6 ist bei 4,4% Hkt. deutlich breiter als der von 8,4% Hkt., sodass ich mich gegen 4,4% Hkt. entschieden habe.

### 5.1.4 Kanal spezifische Experimentprotokolle

#### 5.1.4.1 *Experimentprotokolle zum Gárdos- Kanal*

##### 5.1.4.1.1 Vergleich verschiedener Kalzium Ionophore

Um ein geeignetes Protokoll für Experimente zu finden, die die Funktion des Gárdos- Kanals darstellen, habe ich sowohl Experimente mit Ionomycin, als auch mit A23187bromo durchgeführt. Bei beiden Substanzen handelt es sich um Kalzium Ionophore, welche es Kalzium Ionen ermöglichen die Erythrozyten Membran zu passieren. Durch Einstrom von Kalzium Ionen in die Erythrozyten steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration, welche ab einer bestimmten Höhe als Signal für den Gárdos- Kanal wirkt, sich zu öffnen. Daher habe ich diese beiden Substanzen gewählt, um die Aktivität des Gárdos- Kanals darzustellen.

## 5 Diskussion

Graph 7 zeigt den Membranpotentialverlauf beim Experiment mit Ionomycin, dem Gárdos- Inhibitor Tram 34 und TritonX-100. Graph 8 zeigt denselben Experimentverlauf, nur mit A23187bromo statt Ionomycin. Im Vergleich beider Graphen fällt auf, dass beide Membranpotentiale prinzipiell die gleichen Veränderungen und Reaktionen auf die Manipulationen durchlaufen. Diese Beobachtung verwundert nicht, da beide Substanzen, wie oben beschrieben, über dieselbe Wirkung zur Öffnung des Gárdos- Kanals führen. Durch dessen Öffnung kommt es zum Ausstrom von Kalium aus der Zelle in die Ringerlösung und damit zur Negativierung des Membranpotentials. Obwohl beide Ionophore bei den Experimenten in derselben Konzentration vorlagen, scheint A23187bromo ein kompetenterer Aktivator des Gárdos- Kanals zu sein, da das Membranpotential beim Protokoll mit A23187bromo auf ca. minus 60 mV fällt, und damit ca. 20 mV tiefer als bei Ionomycinzugabe. Dieser Beobachtung könnte zugrunde liegen, dass A23187bromo zu einer längeren Öffnung der Kalziumkanäle führt oder zu einer Öffnung von mehr Kalziumkanälen, sodass es zur Längeren Aktivierung des Gárdos- Kanals kommt, durch den dann mehr Kalium ausströmen und so das Membranpotential in negativere Bereiche verschieben kann. Auch Langes et al. (2009) kamen beim Vergleich der Ionophore Ionomycin und A23187bromo zu der Erkenntnis, dass A23187bromo eine effektivere Aktivierungsfähigkeit zeigt und somit zu einer effizienteren Freisetzung von Kalzium führt [73].

Im weiteren Verlauf der Graphen steigen in beiden Experimenten die Membranpotentiale wieder an, was durch ein Zurückdiffundieren der Kaliumionen in die Erythrozyten begründet sein kann. Beim Experiment mit A23187bromo scheint sich langsam ein konstantes Potential auszubilden, denn das Steigen des Potentials wird immer langsamer. Dies spricht für eine ausgeglichene Kaliumkonzentration über der Erythrozyten Membran.

Anders als bei A23187bromo ist für den Verlauf beim Experiment mit Ionomycin nicht von der Ausbildung eines konstanten Potentials zu sprechen. Hier sinkt das Potential, nachdem es zuvor angestiegen war, wieder. Dies könnte durch ein verzögertes Öffnen einer geringeren Anzahl von Gárdos-Kanälen begründet sein, sowie durch das Öffnen von anderen Ionenkanälen oder durch einen intermittierendes Öffnen der Gárdos-Kanäle. Es scheint nie ein Gleichgewicht zu entwickeln, denn das Steigen des Membranpotentials spricht für einen Kaliumgradienten von extra- nach intrazellulär, und das darauffolgende Sinken spricht dafür, dass Ionomycin schnell abgebaut wird und somit nicht dauerhaft zu einem Kalziumeinstrom führen kann, welcher über das Öffnen der Gárdos-Kanäle eine Hyperpolarisation des Membranpotentials verursacht. Dadurch dass die Zellen in der kurzen Zeitspanne, in der Ionomycin seine volle Wirkung entfaltet nur begrenzte Mengen Kalzium aufnehmen können, kann die Kalzium-Pumpe das Kalzium schnell aus den Erythrozyten pumpen und die Gárdos- Kanäle gehen wieder in einen inaktiven Zustand über.

Auch nach Zugabe des Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34, welcher zum Schließen der Gárdos- Kanäle und somit zu einem steilen Anstieg des Membranpotentials führt, bildet sich beim A23187bromo- Experiment schnell ein konstantes Potential aus, während beim Experiment mit Ionomycin das



## 5 Diskussion

Membranpotential immer weiter abfällt und sich in der Zeitspanne des Experimentverlaufs kein konstantes Potential ausbildet. Da nicht von einem fehlenden bzw. verminderten Ansprechen des Gárdos- Kanals auf Tram 34 ausgegangen werden kann, da das Membranpotential im Experiment mit A23187bromo sofort ein Schließen der Gárdos- Kanäle mit folgendem Anstieg des Potentials gezeigt hat, muss der langsame Anstieg eine andere Begründung haben. Da das Ansteigen des Potentials für einen Kaliumgradienten von extrazellulär nach intrazellulär spricht, wäre denkbar, dass es wie bereits diskutiert zu einem verzögerten oder intermittierenden Öffnen und Schließen der Gárdos- Kanäle kommt, beispielsweise weil die Kalziumkonzentration, die durch die Zugabe von Ionomycin in die Zelle strömt, nicht für die Öffnung aller Gárdos- Kanäle in vollem Maß ausreicht. Da nur Kanäle durch Tram 34 geschlossen werden können, die zuvor offen waren, könnte es zu einem verzögerten, unsynchronen Schließen der Kanäle und damit zu dem langsamen Anstieg des Membranpotentials kommen.

Weil der Experimentverlauf mit A23187bromo deutlichere und schnellere Reaktionen des Membranpotentials auf die experimentelle Manipulation zeigt, habe ich mich entschieden, mich bei Experimenten zur Aktivität des Gárdos- Kanals auf diesen Kalzium Ionophor zu konzentrieren.

### 5.1.4.1.2 Bestimmung der geeignetsten A23187bromo Konzentration für Experimente mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100

Um auch in Bezug auf die A23187bromo Konzentration die stärkste Reaktion des Membranpotentials zu finden, habe ich das Experiment mit A23187bromo und Tram 34 mit vier verschiedenen A23187bromo Konzentrationen durchgeführt (s. Graph 9, Graph 10, Graph 11 und Graph 12). Dass die Verläufe des Membranpotentials im Grundsatz gleich sind, ist dadurch zu begründen, dass es sich um fast identische Protokolle handelt. Dennoch fallen zwei Unterschiede in den Kurven der verschiedenen Konzentrationen auf.

Zuerst ist zu nennen, dass sich die Höhe der Membranpotentialausschläge als Folge auf die indirekte Aktivierung des Gárdos- Kanals durch Zugabe von A23187bromo unterscheidet. Hierzu zeigen Graph 9 und Graph 10 eine lineare Abhängigkeit der Membranpotentialminima von der A23187bromo Konzentration. Die Abhängigkeit verläuft antiparallel, sodass die kleinsten A23187bromo Konzentrationen zu den stärksten Reaktionen führen. Dies ist überraschend, da die Theorie, dass eine hohe Kalzium- Ionophor Konzentration zu sehr hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen führt, welche dann die Gárdos- Kanäle in großem Umfang und langer Dauer aktivieren können und so eine große Zahl Kaliumionen aus den Erythrozyten in die Ringerlösung verschieben können, sehr logisch erschien. Die Verschiebung der hohen Kaliumkonzentration würde nach dieser Theorie mit einer starken Veränderung des Membranpotentials einhergehen.

Möglicherweise ist die antiparallele Beziehung damit zu erklären, dass es durch hohe A23187bromo Konzentrationen zwar über einen hohen Kalziumstrom in die Erythrozyten zu einer starken Gárdos-

## 5 Diskussion

Kanal Aktivierung kommt und damit zu einem starken Kaliumausstrom aus den Zellen. Dieser aber durch Sinken des Kaliumgradienten in einem geringeren Membranpotentialwert resultiert als bei geringeren A23187bromo Konzentrationen. Bei letztgenannten bliebe der Kaliumgradient hoch, da weniger Kalzium in die Erythrozyten strömt und Gárdos- Kanäle öffnen kann, sodass weniger Kalium aus den Zellen in die Ringerlösung strömen kann und der Wert des Membranpotentials hoch ausfällt.

Weiterhin könnte argumentiert werden, bei sehr hohen Kalzium Ionophor Konzentrationen komme es zu einer negativen Rückkopplung, beispielsweise über eine schnelle und hohe Kaliumverschiebung, sodass die Gárdos- Kanäle schneller schließen und damit insgesamt weniger Kalium diffundieren kann als bei etwas langsamerer Diffusion nach der Zugabe einer geringeren Ionophor Konzentration.

Außerdem ist in den Membranpotentialverläufen zu erkennen, dass der Anstieg des Membranpotentials nach Erreichen seines negativsten Punktes bei hohen A23187bromo Konzentrationen viel schneller und somit steiler verläuft als bei niedrigen A23187bromo Konzentrationen (s. Graph 11, Graph 12). Diese Beobachtung ist mit der Höhe der Gradienten zu erklären und stützt daher die oben beschriebene These zum Sinken des Kaliumgradienten. Bei hohen A23187bromo Konzentrationen strömt mehr Kalium aus den Zellen, wodurch der Kaliumgradient zwischen Extrazellulärraum und Intrazellulärraum abnimmt. Dadurch sinkt auch der Membranpotentialwert.

Da durch die kleinsten A23187bromo Konzentrationen die stärksten Potentialänderungen hervorgerufen wurden, und es außerdem ökonomisch und ökologisch sinnvoll ist, wenig Material zu nutzen, habe ich mich dafür entschieden, in die A23187bromo Konzentration 1  $\mu\text{M}$  für weitere Messungen in mein Protokoll aufzunehmen.

### 5.1.4.1.3 Experimente mit dem Gárdos- Kanal Aktivator NS309

Um den Gárdos- Kanal nicht nur indirekt mit Kalzium Ionophoren, sondern auch direkt durch den Agonisten NS309 zu öffnen, habe ich Experimente mit NS309, Tram 34 und TritonX-100 durchgeführt, welche in Graph 13 dargestellt sind.

Im Vergleich des Membranpotentialverlaufs bei Zugabe des Kalzium Ionophors A23187bromo und des Gárdos- Kanal Agonisten NS309 fällt auf, dass nach Zugabe von NS309 das Membranpotential genauso schnell fällt wie bei Zugabe von A23187bromo, sodass davon auszugehen ist, dass beide Aktivatoren des Gárdos- Kanals gleich schnell wirken. Allerdings fällt das Membranpotential bei Zugabe von NS309 ca. 15 mV weniger tief. Das bedeutet, dass A23187bromo ein kompetenterer Gárdos- Kanal Aktivator ist und mehr Gárdos- Kanäle zu öffnen vermag. Dabei ist allerdings zu beachten, dass ein einziger aktivierter Gárdos- Kanal, oder sehr wenige aktivierte Gárdos- Kanäle pro Zelle, für die Polarisierung des Membranpotentials ausreichen sollten. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die Gárdos- Kanäle ein stochastisches Öffnungsverhalten zeigen[57]. Dieses schnelle Öffnen und Schließen der Kanäle hat aber nur dann einen Einfluss auf das Membranpotential, wenn

## 5 Diskussion

nur ein einziger oder sehr wenige Gárdos- Kanäle geöffnet sind, sind hingegen viele Gárdos- Kanäle geöffnet, hat das Flackern der Kanäle keinen Einfluss mehr auf das Membranpotential, da immer genug Kanäle in geöffnetem Zustand vorliegen, um das Membranpotential zu polarisieren.

Außerdem fällt nach Zugabe von NS309 das Potential nicht direkt auf sein Minimum, sondern fällt erst steil und dann immer langsamer. Das zeigt, dass NS309 nur als indirekter Aktivator fungiert, indem es die Kalziumsensitivität erhöht und die Gárdos-Kanäle dadurch früher öffnen. A23187bromo hingegen führt zu einer Permeabilität der Erythrozytenmembran für Kalzium und damit zu einer stärkeren Wirkung, sodass die Hyperpolarisation nach A23187bromo Zugabe deutlich stärker ausfällt als nach NS309 Zugabe.

Weiterhin scheinen durch das Erhöhen der Kalziumsensitivität zwar viele, aber nicht alle Gárdos-Kanäle direkt zu öffnen. Möglicherweise entsteht die Verzögerung, weil trotz erhöhter Kalziumsensitivität nicht genügend intrazelluläres Kalzium vorliegt, um alle Kanäle zu öffnen.

Des Weiteren steigt das Membranpotential nach Zugabe von NS309 nicht wie bei Zugabe von A23187bromo direkt nach Erreichen des Minimalpotentials wieder an, sondern bildet auf seinem Minimalwert ein konstantes Membranpotential aus. Das könnte damit verbunden sein, dass die Wirkung der erhöhten Kalziumsensitivität länger andauert als die Wirkung des Kalziumeinstroms durch die Zugabe eines Ionophors.

Dies zeigt, dass NS309 zwar keine so schnelle und so große Wirkung auf den Gárdos- Kanal hat wie A23187bromo, aber dass die Wirkung dafür länger anhält.

### 5.1.4.2 *Experimentprotokolle zum Piezo1- Kanal*

#### 5.1.4.2.1 Experimente mit dem Piezo1-Kanal Aktivator Yoda1 sowie mit dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34

Um die Aktivität des Piezo1 Kanals darzustellen, habe ich Experimente mit dessen Aktivator Yoda1 durchgeführt. Diese sind in Graph 14 dargestellt.

Fast parallel zum Verlauf des Membranpotentials bei Zugabe von A23187bromo fällt das Membranpotential durch Zugabe von Yoda1 steil ab und bildet einen spitzen Peak. Darauf folgend steigt es erst steil und dann immer langsamer werdend wieder an, bis es sich fast nicht mehr verändert. Die Parallele der Yoda1 Kurve zur A23187bromo Kurve ist dadurch zu begründen, dass Yoda1 zwar kein Ionophor ist, aber durch Öffnen des unspezifischen Kationenkanals Piezo1 auch zum Kalziumeinstrom in die Erythrozyten und damit zur Öffnung des Gárdos- Kanals führt. Somit ist das Resultat beider Manipulationen der Einstrom von Kalziumionen in die Erythrozyten.

Dass diese These richtig ist, unterstreicht der Membranpotentialverlauf nach Zugabe des Gárdos-Kanal Inhibitors Tram 34. Dieser führt zu einem Steigen des Membranpotentials und damit zu einem Inhibieren der Reaktion auf die Zugabe von Yoda1. Dies ist nur möglich, da die Öffnung von Piezo1 zu einer Öffnung des Gárdos- Kanals führt.

## 5 Diskussion

Im Vergleich der beiden Yoda1 Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  (Graph 14) und 625 nM (Graph 15) fällt das Membranpotential nach Zugabe der geringeren Yoda1 Konzentration, wie auch bei dem A23187bromo Konzentrationsvergleich, stärker ab. Dies könnte durch eine negative Rückkopplung begründet werden, bei welcher beispielsweise hohe Kaliumverschiebungen zum Schließen der Gárdos-Kanäle führen und somit bei sehr hohen Konzentrationen eines Piezo1 Aktivators durch das schnelle Schließen der Kanäle insgesamt weniger Kaliumionen aus den Erythrozyten raus diffundieren können. Eine andere mögliche Begründung ist, dass durch die geringere Konzentration, wie bereits für A23187bromo diskutiert, weniger Kalium Ionen aus den Zellen diffundieren können und somit die Kaliumkonzentration im Extrazellulärraum gering bleibt. Dies führt dazu, dass der Kaliumgradient hoch ist und damit auch das Membranpotential einen hohen Wert erreicht. Das würde auch erklären, warum bei geringeren A23187bromo Konzentrationen dasselbe Phänomen beobachtet werden konnte.

Weiterhin steigt nach einer geringeren Konzentration Yoda1, wie auch bei der geringeren A23187bromo Konzentration, das Membranpotential nach Erreichen seines negativsten Wertes weniger steil an. Dies ist auch durch den Gleichgewichtsgradienten begründbar, denn wenn mehr Kalium aus der Zelle ausströmt, nimmt der Kaliumgradient schon während des Experiments stärker ab, wodurch der Membranpotentialwert sinkt.

### 5.2 Optische Messung der MBE- Methode am Konfokalmikroskop

#### 5.2.1 Messungen mit der MBE- Methode und Fluoreszenzstoffen

##### 5.2.1.1 Einfluss von BCECF auf die Ergebnisse von Experimenten mit der MBE- Methode

Um herauszufinden, ob der Fluoreszenzstoff einen Einfluss auf den Membranpotentialverlauf hat, den ich mithilfe der MBE-Methode messe, habe ich eine Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität, mittels Zugabe von Valinomycin, mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF und ohne BCECF durchgeführt.

Graph 16 zeigt, dass es keine Unterschiede im grundlegenden Verlauf der beiden Membranpotentialmessungen gibt, was zeigt, dass BCECF nicht mit den Stoffen interagiert, welche im Verlauf des Experiments genutzt werden und somit als Fluoreszenzstoff für die optische Messung geeignet ist. Allerdings zeigt sich eine leichte Verschiebung des Ruhemembranpotentials und des Membranpotentials während des Experimentverlaufs mit BCECF zu positiveren Membranpotentialen. Dies ist durch die Pufferkapazität von BCECF begründbar, welche durch die geringe Konzentration von BCECF in der Lösung begrenzt ist und so nur zu minimalen Differenzen führt. Die Differenzen im Potential nach Valinomycin Zugabe nehmen mit sinkender Kaliumkonzentration zu (Graph 17), was bedeutet, dass starke Veränderungen des Membranpotentials stärker gepuffert werden. Durch Umrechnung der Membranpotentiale in ihre pH-Werte ist zu folgern, dass die Pufferkapazität von BCECF bei hohen pH-Werten stärker ist. Da der pH-Wert mit der stärkste Pufferkapazität eines Stoffes durch dessen pKs Wert definiert ist, müsste BCECF demzufolge einen hohen pKs Wert haben, z.B. bei einem pH von 8. Denn das Membranpotential von ca. minus 60 mV, welches in Graph 16 die höchste Differenz zum Wert ohne BCECF zeigt, ist aus pH-Messpunkten abgeleitet, die bei einem pH-Wert um 8 liegen. Allerdings beträgt der pKs Wert von BCECF 6,99. PH 6,99 liegt noch niedriger als das Ruhemembranpotential der Erythrozyten mit ca. pH 7,2 und ist damit am ehesten vergleichbar mit dem pH, der von der höchsten Kaliumkonzentration nach Zugabe von Valinomycin erreicht wurde. Dies ist erstaunlich, da sich hier beide Membranpotentialverläufe komplett überlagern und somit davon auszugehen ist, dass in diesem Punkt keine Pufferung vorliegt.

Weiterhin möchte ich vergleichen, ob die Membranpotentiale, die bei den drei Kaliumkonzentrationen gemessen wurden, näher am theoretischen Membranpotential liegen, welches ich mit der Nernst-Gleichung errechnet habe, oder ob sie weiter entfernt davon liegen.

Für die Kaliumkonzentration 9,9 mM errechnet sich ein Potential von minus 61,3 mV. Das Potential der Messung ohne BCECF liegt bei minus 63 mV. Das Potential der Messung mit BCECF liegt mit minus 61 mV genau auf dem errechneten Potential und nur sehr gering vom Potential ohne BCECF entfernt.

## 5 Diskussion

Bei der Ringerlösung mit 49,6 mM Kalium liegen beide Messwerte neben dem errechneten Membranpotential von minus 18,6 mV. Die Experimente ohne BCECF ergeben ein Potential von minus 27 mV, während das Potential aus dem Experiment mit 25  $\mu$ M BCECF bei minus 25,8 mV liegt. 25,8 mV liegt zwar deutlich neben dem errechneten Wert, aber näher an diesem als das Potential beim Experiment ohne BCECF Zugabe.

Anders ist es beim Experiment mit 153 mM Kalium in der Ringerlösung. Hier zeigen beide Experimente Potentiale um minus 2 mV. Damit liegen diese Werte deutlich neben den errechneten 11,3 mV.

Das zeigt, dass sich die Messdaten, welche ohne BCECF durchgeführt wurden und meist in negativeren Bereichen lagen als das errechnete Potential, durch die Pufferung von BCECF an die errechneten Werte annähern. Allerdings liegen sie oft trotzdem noch einige Millivolt vom errechneten Wert entfernt.

Insgesamt verändert die Zugabe von BCECF minimal das Membranpotential, vor allem bei geringen Kaliumkonzentrationen der Ringerlösung. Dennoch eignet sich BCECF für die optische Messung, da die Veränderung des Membranpotentials nur minimal ist und sogar näher an den berechneten Werten liegt als die Ergebnisse ohne BCECF.

### 5.2.1.2 *Einfluss verschiedener BCECF Konzentrationen auf die Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mit der MBE- Methode*

Im Vergleich mehrerer BCECF Konzentrationen bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin zeigte sich, dass neben einer leichten Verschiebung des Ruhemembranpotentials, wie in Graph 16, auch das Potential nach Zugabe von Valinomycin zwischen den einzelnen BCECF Konzentrationen voneinander abweicht (Graph 18). Das Ruhemembranpotential zeigt mit steigender BCECF Konzentrationen positivere Werte, also eine geringere Verschiebung des Membranpotentials. Dies kommt durch die Pufferkapazität von BCECF zustande, welche mit steigender BCECF Konzentration zunimmt.

Auch die Höhe des Membranpotentials nach Valinomycin Zugabe korreliert auf diese Weise mit der Höhe der BCECF Konzentration. Je höher die BCECF Konzentrationen angesetzt war, desto höher fällt auch die Verschiebung des Membranpotentials zu positiveren Werten aus. Dies zeigt, wie beim Ruhemembranpotential, dass die Pufferkapazität von BCECF mit dessen Konzentration in der Lösung korreliert.

Weiterhin nimmt wie bei Graph 16 die Membranpotentialdifferenz der verschiedenen BCECF Konzentrationen mit steigender Kaliumkonzentration ab. Bei hohen Kaliumkonzentrationen

## 5 Diskussion

entwickelt sich das Gleichgewicht nach Valinomycin Zugabe bei geringen pH-Werten und damit bei nur leicht negativen Membranpotentialen. In diesem pH-Bereich (ca. 7,0) scheint die Pufferkapazität von BCECF sehr gering zu sein, da die Ergebnisse der verschiedenen BCECF Werte kaum Unterschiede untereinander zeigen. Dieses Phänomen ist sehr überraschend, da der pKs von BCECF, wie bereits zu Graph 16 besprochen, 6,99 beträgt und damit genau in diesem Bereich sehr hohe Pufferkapazität zeigen müsste.

Die Differenzen zwischen den Membranpotentialen nach Valinomycin Zugabe bei den verschiedenen BCECF-Konzentrationen sind zwar sichtbar, aber trotzdem sehr gering. Aus diesem Grund habe ich für weitere Experimente mit BCECF für eine Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  BCECF entschieden, denn es ist denkbar, dass eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  BCECF für Experimente am Konfokalmikroskop zu niedrig ist. 100  $\mu\text{M}$  BCECF wären zwar für die Arbeit am Konfokalmikroskop am wahrscheinlichsten ausreichend, allerdings weichen die Ergebnisse auch am stärksten von denen ohne BCECF ab.

### 5.2.1.3 Einfluss des Hämatokrit auf Experimente mit BCECF

Graph 19 zeigt den Vergleich mehrerer Hämatokrit Konzentrationen beim Experiment mit NS3623, Valinomycin, TritonX-100 sowie 25  $\mu\text{M}$  BCECF in Bezug auf die Höhe des Membranpotentials nach Zugabe von Valinomycin. Sinn dieses Experiments war es, herauszufinden, ob die für dasselbe Experimentprotokoll etablierte Hämatokrit Konzentration von 8,4% auch bei Zugabe von BCECF am geeignetsten ist.

Zu sehen ist, dass bei niedrigen Hämatokrit Konzentrationen das Membranpotential nach Valinomycin Zugabe auf negativere Werte fällt als bei hohem Hämatokrit. Diese Korrelation war schon beim Hämatokrit Vergleich ohne BCECF zu beobachten und ist damit zu begründen, dass bei hohem Hämatokrit mehr Erythrozyten in der Lösung vorliegen, deren Kalium Ionen in die Ringerlösung strömen können. Dadurch steigt bei hohen Hämatokrit Werten die Kaliumkonzentration der Ringerlösung stärker und die Kalium Differenz zwischen Intra- und Extrazellulärraum sinkt. Durch Sinken des Kaliumgradienten sinkt auch der Membranpotentialwert und so kommt es zu den verschiedenen Membranpotentialen nach Valinomycin Zugabe.

Weiterhin zeigt die Kurve einen sigmoidalen Verlauf, was bedeutet, dass die Differenzen zwischen den Membranpotentialen nach Valinomycin Zugabe in den höchsten und niedrigsten Hämatokrit Anteilen untereinander sehr gering sind. In den Bereichen dazwischen (ca. 12% bis 18% Hkt.) zeigt das Membranpotential zwischen den einzelnen Hämatokrit Anteilen aber starke Unterschiede. Dies ist damit zu begründen, dass in den niedrigen Hämatokrit Bereichen die Menge an Kalium auf das Volumen der Ringerlösung keinen großen Unterschied macht. Da die extrazelluläre Kaliumkonzentration mit in die Berechnung des Membranpotentials eingeht bleiben auch die Membranpotentialschwankungen gering. Dass die Unterschiede in den hohen Hämatokrit Bereichen auch gering ausfallen, könnte durch eine Sättigung begründet sein. Wenn aus vielen Erythrozyten viel

## 5 Diskussion

Kalium in die Ringerlösung ausströmt kommt der Konzentrationsgradient zum Erliegen, da dann die Kaliumkonzentration in der Ringerlösung schon so stark gestiegen ist. Damit ist im Vergleich zwischen den hohen Hämatokrit Bereichen kaum noch ein Unterschied in der extrazellulären Kaliumkonzentration erreichbar, wodurch, wie oben beschrieben, die Unterschiede im Membranpotential nach Valinomycin Zugabe begrenzt sind. Der sigmoidale Verlauf des Hämatokrit Vergleichs in Graph 19 ist vergleichbar mit dem sigmoidalen Verlauf des Hämatokrit Vergleichs bei Experimenten mit dem Kalzium Ionophor A23187bromo. Es ist davon auszugehen, dass beide Kurven aus denselben Gründen diese Sigmoidalität zeigen.

Da, vergleichbar zum Hämatokrit Vergleich ohne BCECF, 8,4% Hämatokrit die stärksten Membranpotentialveränderungen nach Valinomycin Zugabe zeigt, habe ich mich für folgende Experimente dazu entschieden diese Konzentration zu nutzen.

### 5.2.1.4 Einfluss von Snarf auf die Ergebnisse von Experimenten mit der MBE- Methode

Graph 20 zeigt den Membranpotentialverlauf von Erythrozyten während einer Manipulation mit dem Kalzium Ionophor A23187bromo, dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100. Anhand der Gegenüberstellung der Verläufe mit Zugabe von 25  $\mu\text{M}$  Snarf und ohne Snarf ist zu sehen, dass Snarf keinen Einfluss auf die grundlegende Reaktion der Erythrozyten auf ihre Manipulation hat. Diese Tatsache ist eine Voraussetzung für die optische Messung am Konfokalmikroskop, womit Snarf als Fluoreszenzstoff für diese Messung infrage kommt.

Allerdings ist auch ein Unterschied zwischen beiden Kurven zu erkennen: Das Membranpotential der Erythrozyten, deren Ringerlösung auch Snarf enthält, fällt nach Zugabe von A23187bromo ca. 5 mV tiefer ab als die Kontrolle ohne Snarf. Das zeigt, dass Snarf im Gegensatz zu BCECF nicht puffert, aber auch zu einer leichten Verschiebung des Membranpotentials führt.

Sowohl BCECF als auch Snarf veränderten den Verlauf des Membranpotentials während der Experimente nicht grundlegend. Auch die Differenzen im Membranpotential nach Öffnung der Kalium Kanäle war bei beiden Farbstoffen nur minimal und damit vergleichbar. Daher habe ich beschlossen, beide Farbstoffe am Konfokalmikroskop zu testen, um zu sehen, ob sich dort größere Unterschiede in der Verwendbarkeit der Stoffe für die optische Messung zeigen.

## 5.2.2 pH-Kalibrierungen am Konfokalmikroskop

### 5.2.2.1 pH- Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit BCECF

Graph 21 zeigt die Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenzverhältnisse von dem pH-Wert der Lösung. Mit steigendem pH-Wert nimmt auch das gemessene Fluoreszenzverhältnis zu. Das zeigt, dass eine Kalibrierung der pH-Werte mit Fluoreszenzverhältnissen am Konfokalmikroskop möglich ist und somit eine wichtige Voraussetzung für die optische Messung der MBE-Methode am Konfokalmikroskop erfüllt ist.



## 5 Diskussion

Weiterhin fällt auf, dass die Kurven der Ergebnisse mit 10  $\mu\text{M}$  BCECF und 25  $\mu\text{M}$  BCECF parallel verlaufen, aber die Fluoreszenzverhältnisse der Kalibrierung mit 10  $\mu\text{M}$  BCECF etwas geringere Werte zeigen als die mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF. Da es sich um eine ratiometrische Berechnung handelt, ist allerdings eine Unabhängigkeit dieser Ergebnisse von der Farbstoffkonzentration zu erwarten. Außerdem weichen die Ergebnisse der Kalibrierung mit 10  $\mu\text{M}$  stärker von der Regressionslinie ab als die Ergebnisse mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF. Daraus kann geschlossen werden, dass die pH-Kalibrierung mit 10  $\mu\text{M}$  BCECF zwar möglich ist, die höhere Konzentration (25  $\mu\text{M}$  BCECF) aber deutlich besser geeignet ist, da die Abweichungen geringer sind.

### 5.2.2.2 *pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit Snarf*

Aus Graph 22 ist ablesbar, dass eine Abhängigkeit zwischen den Fluoreszenzverhältnissen und dem pH-Wert der Lösung vorliegt, in dem 10  $\mu\text{M}$  Snarf gelöst waren. Je höher der pH-Wert ist, desto höher liegt auch das Verhältnis der gemessenen Fluoreszenz. Außerdem weichen die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse nur sehr gering von der Regressionslinie ab. Das zeigt, dass die pH-Kalibrierung mit Snarf funktioniert und somit eine weitere Voraussetzung für die Entwicklung der optischen Messung der MBE-Methode am Konfokalmikroskop erfüllt ist.

Daher kann ich davon ausgehen, dass sich sowohl BCECF als auch Snarf für die optische Messung eignen. Dabei ist allerdings zu beachten, dass Snarf in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  vorliegen sollte und die Experimente mit BCECF bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  bessere Ergebnisse zeigen.

### 5.2.3 Paralleles Durchführen des Experiments mit A23187bromo am pH- Meter und Konfokalmikroskop

Als nächsten Schritt der Etablierung führte ich das Experiment mit A23187bromo, Tram 34, TritonX-100 und 25  $\mu\text{M}$  BCECF durch. Ich führte am Konfokalmikroskop Fluoreszenz-Messungen durch und kontrollierte parallel die pH-Werte mithilfe der pH-Elektrode, um eine Kontrolle der Fluoreszenzverhältnisse zu haben. Allerdings brachten die Messungen am Konfokalmikroskop keine nutzbaren Ergebnisse. Der Grund dafür ist, dass es sich beim Konfokalmikroskop um ein inverses Mikroskop handelt. Bei Zugabe der Erythrozyten sinken diese auf den Boden der Kavität des  $\mu$ -slide Angiogenesis Objektträgers und absorbieren Teile des Lichtspektrums. Für das Experimentprotokoll mit A23187bromo, welches ich für die MBE- Methode etabliert habe, ist ein hoher Hämatokrit notwendig, um das Membranpotential messen zu können. Bei Zugabe dieser großen Menge Erythrozyten kommt es zur Verlegung des gesamten Objektträger Bodens durch die Zellen. Allerdings muss die Messung der Fluoreszenz im Extrazellulärraum stattfinden was somit unmöglich ist.

### 5.2.4 Messungen mit verschiedenen Arten Gel

Die Experimente mit verschiedenen Arten Gel, welches den Boden der Objektträger bedeckte und somit Platz bot den Extrazellulärraum zu messen, brachten keine Ergebnisse, die zu der pH-Kalibrierung passten oder eine andere Regelmäßigkeit zeigten.

## 5 Diskussion

Der Grund dafür liegt in der Pufferfähigkeit von Agar und Gelatine Gel. Durch Experimente, bei denen ich verschiedene pH-Lösungen in Gefäße gab, deren Boden mit Gel bedeckt war und dann den pH der Lösung nochmal maß, musste ich feststellen, dass beispielsweise alle pH-Lösungen zwischen pH 6 und 8 nach einiger Zeit auf Agar Gel einen pH- Wert von über 8 hatten. Das Prinzip der MBE-Methode beruht aber auf einer ungepufferten Lösung, da sonst die Veränderungen im pH-Wert der extrazellulären Lösung vermindert werden und beim Umrechnen der pH-Werte in das Membranpotential verfälschte Ergebnisse resultieren. Daher ist optische Messung der MBE- Methode mithilfe von Agar- oder Gelatine- Gel nicht durchführbar.

### 5.2.5 Experimente mit „schwerem Wasser“

#### 5.2.5.1 *Sedimentationsgeschwindigkeit von Erythrozyten in Deuteriumoxid*

Abbildung 30 zeigt, dass die Erythrozyten, welche von Ringerlösung auf D<sub>2</sub>O Basis umgeben waren, deutlich langsamer sedimentieren als die Erythrozyten in der Ringerlösung, die mit MilliQ- Wasser angesetzt wurde. Es kann von ca. der Hälfte der Sedimentationsgeschwindigkeit gesprochen werden. Die verlangsamte Sedimentation ist zu beobachten, obwohl davon auszugehen ist, dass das intrazelluläre H<sub>2</sub>O durch extrazelluläres D<sub>2</sub>O ausgetauscht wird und somit die Dichte der Erythrozyten steigt und sie zum Sinken bewegt. Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist auch in diesem Fall ansatzweise berechenbar.

Es ist anzunehmen, dass Erythrozyten zur Hälfte aus Flüssigkeit bestehen und zur anderen Hälfte aus Feststoffen, sowie dass die Dichte der Flüssigkeit der von Wasser mit ca. 1,0 g/m<sup>3</sup> ähnelt und die der Feststoffe bei ca. 1,2 g/cm<sup>3</sup> liegt. Dann beträgt die Dichte von in H<sub>2</sub>O suspendierten Erythrozyten insgesamt ca. 1,1 g/cm<sup>3</sup>. Wird nun das extrazelluläre H<sub>2</sub>O durch D<sub>2</sub>O ersetzt ergibt sich eine Erythrozyten Dichte von ca. 1,15 g/cm<sup>3</sup>, denn das D<sub>2</sub>O, welches das intrazelluläre H<sub>2</sub>O ersetzt hat eine Dichte von 1,1 g/cm<sup>3</sup>. Somit beträgt der Differenz zwischen der intra- und extrazellulären Dichten bei den Erythrozyten in H<sub>2</sub>O bei  $\Delta \rho = 0.1 \text{ g/cm}^3$  und bei den Erythrozyten in D<sub>2</sub>O bei  $\Delta \rho = 0.05 \text{ g/cm}^3$ . Die Formel zur Berechnung der Sedimentationsgeschwindigkeit schließt diese Differenz als Wert ein, mit welchem es zu multiplizieren gilt. Dadurch ergibt sich neben der Beobachtung des etwa halb so schnellen Sinkens der Erythrozyten auch rechnerisch, dass die Sedimentationsgeschwindigkeit von Erythrozyten in D<sub>2</sub>O ca. die Hälfte der Sedimentationsgeschwindigkeit von Erythrozyten in H<sub>2</sub>O beträgt:

$$v_s = \frac{8}{9} \times g \times d^2 \times \Delta \rho$$
$$v_{s,D_2O} = \frac{1}{2} \times v_{s,H_2O}$$

Daraus folgt, dass die doppelte Zeit für die Messungen am Konfokalmikroskop zur Verfügung steht, bevor das Sediment der Zellen eine Messung im Extrazellulärraum verhindert.

## 5 Diskussion

### 5.2.5.2 Osmolarität von Deuteriumoxid

Im Experiment am Dunkelfeldmikroskop zeigte sich, dass bei einer extrazellulären Lösung aus 90% D<sub>2</sub>O Ringerlösung und 10% purem D<sub>2</sub>O der Durchmesser der Erythrozyten abnimmt. Dies ist nicht damit zu begründen, dass es sich um eine hypertone Lösung handelt und die Zellen geschrumpft sind, sondern dass die Lösung trotz Salzzugabe hypoton ist und die Zellen Flüssigkeit aufgenommen haben. Der Durchmesser der Erythrozyten hat durch das Anschwellen nicht zugenommen, sondern abgenommen. Das liegt daran, dass die Form der Erythrozyten von Scheiben zu Kugeln übergegangen ist und somit der Durchmesser trotz eines größeren Volumens kleiner geworden ist [37].

Im Experiment am Phasenkontrastmikroskop (Abbildung 31, Abbildung 32) zeigte sich, dass Erythrozyten in einer Lösung, die einen höheren Salzgehalt und damit eine größere Osmolarität hat als der Intrazellulärraum der Zellen, schrumpfen und Spikes bilden. Das liegt daran, dass bei einer hypertonen Lösung der osmotische Gradient die Flüssigkeit aus dem Intrazellulärraum in die Lösung zieht, um den höheren Salzgehalt, der extrazellulär vorliegt, zu verdünnen. Umgekehrt würde bei einer hypotonen Flüssigkeit, die eine geringere Osmolarität zeigt als die ca. 300 mOsmol des Zellplasmas der Erythrozyten, in die Erythrozyten diffundieren, um dort die höhere Salzkonzentration auszugleichen. Das würde zu einem Anschwellen der Zellen führen und bei hohen Gradienten zum Platzen der Zellen. Werden Zellen in einer isotonen Flüssigkeit suspendiert, so verändert sich die Form der Erythrozyten nicht, denn es strömt die gleiche Menge Flüssigkeit aus den Zellen raus, wie in die Zellen hinein [37].

### 5.2.5.3 Experimente mit Deuteriumoxid und der MBE- Methode

In Graph 23 ist der Verlauf des Membranpotentials der Erythrozyten in D<sub>2</sub>O Lösung dem Potentialverlauf der Erythrozyten in Ringerlösung auf MilliQ- Wasser Basis gegenübergestellt. Während beider Messungen fand eine Manipulation mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100 statt.

Es ist zu sehen, dass das Ruhemembranpotential und das konstante Membranpotential nach Zugabe von Tram 34 bei den Erythrozyten in D<sub>2</sub>O Lösung etwas positiver liegt als das der Erythrozyten in MilliQ-Wasser Ringerlösung. Das stellt aber kein Hindernis da, die MBE-Methode mit D<sub>2</sub>O Lösung zu nutzen. Der Verlauf des Membranpotentials als Reaktion auf die Zugabe der Stoffe bleibt unverändert und sogar der negativste Wert beider Kurven nach Zugabe von A23187bromo ist nahezu identisch, sodass man schlussfolgern kann, dass eine Durchführung von Experimenten mit der MBE-Methode auch mit Ringerlösung auf Basis von schwerem Wasser durchführbar ist. Dies stellt eine Voraussetzung dar für die Entwicklung einer Methode zur optischen Messung der MBE-Methode mit D<sub>2</sub>O Ringerlösung.

## 5 Diskussion

### 5.2.5.4 *Experimente mit Deuterium Oxid am Konfokalmikroskop*

Graph 24 zeigt, dass die pH-abhängige Fluoreszenz von BCECF auch in D<sub>2</sub>O Lösung (95% D<sub>2</sub>O Ringerlösung, 5% pures D<sub>2</sub>O) detektierbar ist. Die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse steigen parallel zu den Werten der Farbverhältnisse, welche in PBS gemessen wurden, mit zunehmendem pH-Wert an. Die Fluoreszenzverhältnisse bei den Messungen in D<sub>2</sub>O Lösung liegen leicht unter den Werten aus der PBS-Lösung. Die Fluoreszenzstärke reicht dennoch für die Detektion der pH-Abhängigkeit aus. Allerdings zeigt die Kalibrierungskurve, dass einige Messpunkte nicht genau auf der Regressionslinie liegen, sondern von ihr abweichen, was eine Umrechnung der Fluoreszenzverhältnisse in ihre pH-Werte und ihr Membranpotential, wie es für die Entwicklung der optischen Messung der MBE-Methode nötig ist, erschwert. Daher habe ich nach einer Alternative für die Messungen mit Deuterium Oxid gesucht.

### 5.2.6 Messung des Membranpotentials am Konfokalmikroskop mit Zentrifugieren der Experiment Lösung

#### 5.2.6.1 *Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin am Konfokalmikroskop mit 25 µM BCECF und Zentrifugieren der Experiment Lösung*

Graph 25 zeigt die Fluoreszenzverhältnisse, die bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität, mittels Zugabe von Valinomycin, mit 25 µM BCECF am Konfokalmikroskop gemessen wurden. Dafür wurde das Reaktionsgefäß mit der gesamten Experiment Lösung zentrifugiert und der Überstand mikroskopiert. Die Fluoreszenzverhältnisse sind am Anfang des Experiments niedrig, steigen nach Zugabe der Erythrozyten deutlich an und teilen sich nach Valinomycin Zugabe in Reihenfolge der Höhe der Kaliumkonzentration auf. Das zeigt, dass die Messung der Fluoreszenzverhältnisse in den Überständen der Experiment Lösung einen korrekten Verlauf der pH-Werte, von denen die Fluoreszenzstärke abhängt, widerspiegeln. Zur Kontrolle der Fluoreszenzverhältnisse hatte ich parallel die pH-Werte der Lösungen gemessen, welche mikroskopiert wurden, auch diese Ergebnisse zeigten einen Verlauf, wie er für die Fluoreszenzverhältnisse dargestellt ist.

Allerdings steigen in Graph 25 nach Zugabe von NS3623 die Werte der Fluoreszenzverhältnisse an, wohingegen der gemessene pH-Wert stabil bleibt. Dies zeigt, dass der Stoff NS3623 selbst fluoreszent ist und somit zu höheren Farbintensitäten führt. Dies ist in Hinblick auf die Strukturformel von NS3623 realistisch, da es sich dabei um eine Ringstruktur handelt.

#### 5.2.6.2 *pH- Kalibrierung am Konfokalmikroskop ohne NS3623*

In Graph 26 ist eine pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop abgebildet, bei der die Fluoreszenzverhältnisse von Lösungen ohne Valinomycin anderen Fluoreszenzverhältnissen

## 5 Diskussion

gegenübergestellt sind, die bei Lösungen gemessen wurden, bei denen Valinomycin zugegeben wurde. Ziel war es zu erkennen, ob Valinomycin fluoreszent ist.

Vergleicht man beide Kurven zeigt sich, dass die Fluoreszenzverhältnisse, die in den Lösungen mit Valinomycin gemessen wurden, deutlich höher liegen als die Werte der Lösungen, denen kein Valinomycin zugegeben wurde. Somit ist davon auszugehen, dass es sich bei Valinomycin um einen Stoff handelt, der fluoresziert. Anhand der Kalibrierung sind im Weiteren die Fluoreszenzverhältnisse dennoch auf ihre pH- Werte zurückverfolgbar, solange bei den Fluoreszenzverhältnissen der Lösungen die korrekte Kalibrierungskurve zur Hilfe genommen wird.

### *5.2.6.3 Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin am Konfokalmikroskop mit Überständen zentrifugierter Experimentlösungen und ohne NS3623*

Graph 27 stellt die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität ohne NS3623, mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF und Messen des Überstandes der Experimentlösungen nach Zentrifugieren dar. Es zeigt sich, dass die gemessenen Fluoreszenzverhältnisse einen Verlauf haben, der deutliche Parallelen zum pH-Wert Verlauf bei demselben Experiment zeigt. So steigt der Wert der Fluoreszenzverhältnisse nach Zugabe der Erythrozyten deutlich an und durch Zugabe von Valinomycin teilen sich die Messdaten in der Reihenfolge ihrer Kaliumkonzentration auf. Daraus kann geschlossen werden, dass der Verlauf der Membranpotentialmessungen am Konfokalmikroskop mit korrekter Aufteilung der Kaliumkonzentrationen und passendem Anstieg der Fluoreszenzverhältnisse nach Zugabe der Erythrozyten darstellbar ist.

### *5.2.6.4 Vergleich der in pH-Werte übertragenen Fluoreszenzverhältnisse mit den tatsächlich gemessenen pH-Werten der Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin*

Aus Graph 28, welcher die gemessenen pH-Werte mit pH-Werten vergleicht, die aus den Fluoreszenzverhältnissen umgerechnet wurden, ist ersichtlich, dass die Differenzen zwischen den pH-Werten vor und nach Valinomycinzugabe bei denselben Kaliumkonzentrationen steigen bzw. fallen. Das zeigt, dass die optische Messung die Grundlagen der pH-Verschiebungen gut widerspiegelt.

Allerdings zeigen die aus den Fluoreszenzverhältnissen berechneten pH-Werte deutlich größere Schwankungen zwischen den verschiedenen Kaliumkonzentrationen und ihre Fehlerbalken sind deutlich größer als die der gemessenen pH-Wert Differenzen. Dies zeigt, dass durch die Umrechnung der Fluoreszenzverhältnisse in pH-Werte eine große Ungenauigkeit der Daten entsteht. Daher können die berechneten pH-Werte nicht mit den Ergebnissen aus exakten pH-Wert Messungen gleichgesetzt werden.

## 5 Diskussion

Insgesamt ist daher das Fazit zu ziehen, dass der Fluoreszenzverlauf bei Experimenten mit BCECF und mit einer Zentrifuge prinzipiell darstellbar ist, die Fluoreszenzverhältnisse aber eine zu große Spannbreite haben, um eine exakte Umrechnung in das vorliegende Membranpotential zu gewährleisten. Hier besteht eine Parallele zu den Ergebnissen aus den Experimenten mit schwerem Wasser.

Die zuverlässige Umrechnung in das Membranpotential ist eine Voraussetzung für die Entwicklung einer Diagnostik zur Detektion von Kanal-Mutationen in Erythrozyten. Daher muss ich schlussfolgern, dass mein Plan, die MBE-Methode für diagnostische Zwecke am Konfokalmikroskop optisch zu messen, nicht umsetzbar ist.

## 5 Diskussion

### 5.3 Experimente mit Blutproben von Patienten mit verschiedenen Mutationen

Da es sich bei den Mutationen um extrem selten vorkommende Pathologien handelt und die Patientenproben meist von hämatologischen Zentren außerhalb Deutschlands geschickt wurden war es nicht möglich, die Reproduzierbarkeit meiner Ergebnisse durch eine Vielzahl von Wiederholungen zu beweisen. Dennoch habe ich die einzelnen Experimente mit jeweils mindestens drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

#### 5.3.1 Experimente mit Proben einer Patientin mit Mutationen in Piezo1 und Spektrin

Durch die vergleichbaren Ergebnisse von Graph 29 und Graph 30, welche in einem Abstand von vier Monaten erhoben wurden, ist von einer Reproduzierbarkeit der Daten auszugehen.

Patientin 1 trägt sowohl eine Mutation im Gen für den mechanosensitiven, nicht selektiven Kationenkanal Piezo1 [30], als auch im Gen für den Proteinkomplex Spektrin alpha, welcher eine bedeutende Rolle im Membranskelett von Erythrozyten spielt [77]. Die Kombination beider Mutationen löst bei ihr einen deutlich schwereren Phänotyp aus als das Tragen nur einer der beiden Mutationen, wie es bei ihren Eltern beobachtet werden kann. Ihr Phänotyp ist geprägt durch eine starke Splenomegalie, welche auch trotz Teilresektionen der Milz eine starke Anämie zur Folge hat. Durch eine antikoagulative Therapie konnten thrombotische Komplikationen bisher verhindert werden.

Die Tatsache, dass ihre Membranpotential Kurve als Reaktion auf die Zugabe des Piezo1- Aktivators Yoda1 am geringsten von allen Probanden abfällt liegt daran, dass eine starke Hämolyse vorgelegen hat. Durch die Hämolyse konnte das Hämoglobin die zerstörten Erythrozyten verlassen und lag frei in der Lösung vor. Da Hämoglobin eine starke Pufferfunktion hat wurde der pH-Wert in den Experimenten mit den Proben der Patientin stabilisiert und schwankte bei Zugabe der Modulatoren weniger stark. Die pH-Werte sind Grundlage der Berechnung des Membranpotentials und dessen Veränderungen, somit ist es logisch, dass die Kurve im Fall der Patientin weniger großen Schwankungen unterliegt. Aus diesem Grund ist es nicht möglich den Grad der Polarisierung als Vergleichsparameter zu nutzen.

Weiterhin ist bemerkenswert, dass sich die Kinetik des Potentials von Tochter (Patientin 1) und Mutter (Patientin 2) in der schnellen Depolarisierung ähneln (s. Graph 30), dies könnte als Loss-of-function Mutation interpretiert werden. Dabei wäre denkbar, dass diese durch eine Verkürzung der Öffnungszeit der Piezo1 Kanäle nach Yoda1 Zugabe zustande kommt.

Allerdings konnte bisher auch nach vielzähligen Diskussionen mit mehreren Genetikern nicht abschließend geklärt werden, ob es sich tatsächlich um eine loss- of- function Mutation handelt.

Im Vergleich der beiden Graphen wird deutlich, dass durch den ähnlichen Verlauf der Kurven mit einer vergleichbaren Reihenfolge der Probanden in Bezug auf den Minimalwert ihres

## 5 Diskussion

Membranpotentials große Parallelen vorliegen. Daher kann von einer guten Reproduzierbarkeit der Daten gesprochen werden.

Somit scheint neben der Pufferung der Reaktion der Patienten Erythrozyten durch das Hämoglobin auch eine mögliche Loss-of-function Mutation im Sinne einer Verkürzung der Öffnungszeit der Piezo1 Kanäle nach Yoda1 Zugabe eine Rolle bei der Kinetik der Membranpotentialkurven gespielt zu haben.

5.3.2 Experimente mit Proben eines Patienten mit McLeod Neuro-Akanthozytose Syndrom  
Graph 31 zeigt das Verhalten des Membranpotentials eines McLeod Neuroakanthozytose Syndrom (MLS) Patienten verglichen mit einer gesunden Kontrolle bei Manipulation ihrer Erythrozyten durch den Gárdos- Kanal Aktivator NS309, den Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 und TritonX-100 zur Zell Lyse. Da die Verbindung zwischen den Symptomen der MLS Patienten und ihrer Mutation noch unklar ist, wollte ich wissen, ob beispielsweise als Sekundäreffekt der Gárdos- Kanal betroffen sein könnte.

Da beide Membranpotentiale generell denselben Verlauf zeigen, ist davon auszugehen, dass eine Reproduzierbarkeit besteht. Dennoch sind deutliche Differenzen zwischen den Reaktionen des gesunden Spenderblutes und den Erythrozyten des MLS Patienten sichtbar. Diese zeigen sich zum einen durch einen großen Abstand zwischen den beiden konstanten Membranpotenzialwerten nach Zugabe von NS309, denn die gesunde Kontrolle erreicht nur einen Minimalwert von minus 40 mV, wohingegen das Membranpotential des MLS Patienten auf minus 55 mV absinkt. Andererseits steigt das Membranpotential nach Zugabe von Tram 34 bei der gesunden Kontrolle auf minus 22 mV an und das des Patienten nur auf minus 27 mV.

Die Begründung für diese Differenzen liegt darin, dass die Erythrozyten der MLS Patienten möglicherweise eine verkürzte Überlebenszeit haben und damit nur junge Erythrozyten in ihrem Blut vorkommen. Da die Gárdos- Kanäle mit dem Älterwerden der Erythrozyten ihre volle Funktionsfähigkeit verlieren ist davon auszugehen, dass in den Erythrozyten der MLS Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen mehr funktionsfähige Gárdos- Kanäle vorkommen und somit die Polarisation nach Öffnen der Gárdos- Kanäle stärker ist.

5.3.3 Experimente mit Proben zweier Patienten mit Chorea- Akanthozytose (CHAC)- Mutation

5.3.3.1 *Beispielhafter Graph zum Verlauf des Membranpotentials der Patienten mit Chorea- Akanthozytose bei einem Experiment zur Untersuchung der Aktivität des Gárdos- Kanals*

Aus Graph 32 ist der Verlauf des Membranpotentials der Erythrozyten von zwei Brüdern, welche beide an ChAc leiden zu sehen. Außerdem sind zwei auf die Brüder in Alter, Geschlecht und Transportbedingungen abgestimmte Kontrollpersonen zu sehen. Der Verlauf des Membranpotentials



## 5 Diskussion

wurde durch die Substanzen NS309, Tram 34 und TritonX-100 beeinflusst. Da die Verbindung zwischen der Mutation der ChAc- Patienten und ihren Symptomen noch nicht abschließend erforscht ist, wollte ich wissen, ob beispielsweise als Sekundäreffekt der Erkrankung eine Beeinflussung des Gárdos- Kanals vorliegt.

Die Erythrozyten aller vier Probanden reagieren generell gleich auf die experimentelle Manipulation, allerdings fällt das Membranpotential der beiden ChAc Patienten nach Zugabe von NS309 auf deutlich negativere Werte ab. Der Minimalwert der Kontrolle eins liegt mit minus 44 mV, 5 mV negativer als der Minimalwert der Kontrolle zwei, was darauf hindeutet, dass auch unter gesunden Probanden geringe Differenzen nachzuweisen sind. Die Membranpotentiale der Brüder zeigen dagegen mit jeweils minus 60 mV nach Zugabe von NS309 keine Unterschiede.

Ein Aspekt, der das deutlich negativere Membranpotential der Erythrozyten von den Patienten begründen kann, ist die Tatsache, dass die Erythrozyten von Patienten mit Chorea- Akanthozytose nur halb so alt sind wie die Erythrozyten der Kontrollen (nicht publizierte Daten, persönliche Kommunikation: Lars Kaestner). Dieses Phänomen tritt beispielsweise auch bei Erythrozyten von Patienten mit McLeod- Syndrom auf. Dadurch, dass die Erythrozyten jünger sind, enthalten noch mehr funktionsfähige Gárdos- Kanäle was zu einem stärkeren Kaliumstrom führt und somit zu einem stärkeren Abfall des Membranpotentials.

Dass die beiden Graphen der Brüder so nah nebeneinander, bzw. teilweise übereinander verlaufen könnte dadurch begründet werden, dass die Krankheit, wie oben beschrieben, den Verlauf des Membranpotentials verändert und die Ausprägung der Chorea- Akanthozytose bei den Patienten gleich stark ausfällt. Diese Theorie kann durch die Beobachtung gestützt werden, dass es auch im phänotypischen Schweregrad der Chorea- Akanthozytose kaum Differenzen gibt, da beispielsweise eine partielle Krankheit nie beobachtet wurde [20].

### 5.3.3.2 *Graph zur Übersicht der Ergebnisse mehrerer Experimente zur Untersuchung der Aktivität des Gárdos- Kanals bei Patienten mit Chorea- Akanthozytose*

Bei Graph 33 handelt es sich um eine Darstellung der Veränderungen der Differenz zwischen der maximalen Polarisierung und des jeweiligen Ruhemembranpotentials bei Experimenten mit NS309, Tram 34 und TritonX-100, wie es beispielsweise in Graph 32 dargestellt ist. Die Säulendiagramme beziehen sich auf die beiden bereits beschriebenen ChAc Patienten. Der gewählte Zeitraum von einem halben Jahr deckt die Zeit ab, in der die beiden Brüder ein Medikament namens Nilotinib einnahmen und unserer Arbeitsgruppe regelmäßig Blutproben zur Verfügung stellten. Bei Nilotinib handelt es sich um einen Tyrosinkinaseinhibitor, welcher zur Therapie der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt wird. Beim Einsatz von Nilotinib bei Patienten mit Chorea- Akanthozytose handelt es sich um einen individuellen Heilversuch, dessen Wirksamkeit wir mit unseren Experimenten überprüfen wollten [123].

## 5 Diskussion

Die Säulen der Patienten zeigen pro Monat jeweils sehr ähnliche Mittelwerte der Membranpotentialdifferenzen, lassen aber kein Muster innerhalb der Zeitspanne erkennen, wie beispielsweise einen kontinuierlichen Anstieg oder Abfall. Die Unregelmäßigkeit der Daten innerhalb des halben Jahres kann als eine fehlende Wirksamkeit des Präparates betrachtet werden oder auf eine unregelmäßige Compliance der beiden Patienten zurückzuführen sein.

Gegen den zweiten Punkt spricht allerdings, dass die Daten beider Patienten im Vergleich zum Vormonat immer entweder steigen oder fallen und auch insgesamt nur minimale Unterschiede zeigen, vor allem in den Monaten April und Juni. Damit die Schwankungen im Zeitverlauf mit einer fehlenden Compliance der Probanden begründet werden könnten, müssten beide Patienten in denselben Monaten die Medikamente mehr oder weniger regelmäßig eingenommen haben. Dies wäre bei Geschwistern zwar denkbar, aber dennoch sehr unwahrscheinlich.

Damit der erste Punkt plausibel ist, müsste die Krankheit selbst in Schüben verlaufen, welche bei beiden Patienten zur selben Zeit verlaufen müssten, denn nur so wäre erklärbar, dass ein Medikament keinen Einfluss hat, die beiden Brüder aber zur selben Zeit die gleichen Veränderungen in ihren Potentialdifferenzen zeigen.

Das inhomogene Muster der Differenzen über die Zeit hinweg, mit Parallelen beider Probanden, könnte auch für minimale Unterschiede in der Experimentdurchführung sprechen. Da allerdings sowohl Temperatur als auch alle Substanzen und Zeitvorgaben jeweils identisch gewählt waren, kommt nur ein Unterschied in den Transportbedingungen in Frage. Allerdings wurde auch hier auf eine möglichst identische Beförderung der Proben geachtet, mit identischer Lagerung bei Raumtemperatur und einer möglichst kurzen Transportzeit. Letztere war jedoch durch verschiedene Verkehrslagen nicht immer umsetzbar.

### 5.3.3.3 *Experimente zur Bestimmung des Kaliumpotentials bei Patienten mit Chorea Acanthozytose*

In Graph 34 und Graph 35 sind jeweils die Veränderungen des Membranpotentials der beiden ChAc Patienten und zwei gesunder Kontrollen aufgetragen, während einer experimentellen Manipulation der Erythrozyten durch den Chloridionen Austausch- Inhibitor NS3623, den Kalium Ionophor Valinomycin und TritonX-100 zur Zell Lyse. Dabei wurden die Experimente der einzelnen Probanden jeweils in sechs verschiedenen Ringerlösungen durchgeführt. Die Ringerlösungen unterschieden sich dabei ausschließlich in den Kaliumchlorid- und Natriumchlorid Konzentrationen. Wie auch im Experiment mit NS309 sollte durch die Manipulation der Erythrozyten eine mögliche Veränderung der Kanalaktivität aufgezeigt werden, die der Grund verschiedener Symptome der ChAc Patienten sein könnte.

Nach Zugabe von Valinomycin zeigen die Proben in den Ringerlösungen mit der geringsten Kaliumchlorid Konzentration die höchsten Polarisationen. Dies zeigt, dass nach Zugabe des Kalium

## 5 Diskussion

Ionophors Valinomycin je nach Kaliumkonzentration in der Ringerlösung mehr oder weniger Kaliumionen die Erythrozytenmembran passieren. Diese verändern durch den Austritt aus der Zelle das Membranpotential der Erythrozyten. Ist die Kaliumkonzentration der Ringerlösung niedrig ist das Bestreben ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen Intra- und Extrazellulärraum zu bilden höher und somit diffundieren bei Zugabe des Ionophors mehr Kaliumionen aus der Zelle nach außen. Die Polarisation ist entsprechend hoch. Andersrum ist das Bestreben, ein Gleichgewicht zu erreichen bei Ringerlösung fünf, in welcher die Kaliumkonzentration innerhalb und außerhalb der Zelle nahezu identisch ist, nicht sehr hoch und die Polarisation bleibt minimal. In der sechsten Ringerlösung, in welcher mehr Kaliumchlorid vorliegt als Natriumchlorid, strömen die Kaliumionen aus der Ringerlösung in die Zelle, um so den Konzentrationsausgleich zu erreichen. Daher kommt es bei den Experimenten mit dieser Ringerlösung zu einer Depolarisation, also einer Verschiebung des Membranpotentials in positivere Bereiche.

Dass nach Zugabe von TritonX-100 alle Proben in allen Experimenten sich bei 0 mV vereinen liegt daran, dass das Membranpotential anhand der intrazellulären pH-Werte der Erythrozyten in den jeweiligen Experimenten kalibriert werden, welche nach Zell Lyse ablesbar sind. Daher enden alle kalibrierten Membranpotentiale nach der vollendeten Zell Lyse bei 0 mV.

Vergleicht man Graph 34 mit Graph 35 zeigt sich, dass die Kurven dieselben Verläufe nehmen und die einzelnen Gruppen derselben Ringerlösungen in beiden Graphen ungefähr in denselben Spannen des Membranpotentials liegen. Dies zeigt eine Reproduzierbarkeit der Daten.

Unterschiede zwischen Graph 34 und Graph 35 zeigen sich in der Reihenfolge der jeweiligen Probanden innerhalb der einzelnen Gruppen mit denselben Ringerlösungen.

Auch innerhalb der beiden Graphen zeigt sich nur eine bedingte Übereinstimmung darüber, welcher Proband im Experiment mit welcher Probe die stärkste bzw. schwächste Polarisation vorweist. So polarisiert beispielsweise in Graph 34 die Probe von Kontrolle zwei je nach Zusammensetzung der Ringerlösung mal am stärksten und mal am schwächsten. Andererseits zeigt Kontrolle eins im selben Graphen, bis auf das Experiment mit Ringerlösung fünf immer die höchsten Polarisationen, also die negativsten Minima. Dies kann damit begründet werden, dass die Erythrozyten der einzelnen Probanden unterschiedlich hohe intrazelluläre Kaliumkonzentrationen haben. Daher reagieren sie unterschiedlich stark auf die Zugabe von Valinomycin. Dass sie nicht konstant dieselben Reihenfolgen in der Stärke der Polarisation zeigen, kann daran liegen, dass die intrazellulären Erythrozyten Konzentrationen dennoch sehr nah beieinander liegen und somit minimale Unterschiede in den einzelnen Erythrozyten schon die Reihenfolge verändern können.

In Graph 35 ist die Reihenfolge in der Höhe der Polarisation eindeutiger. Hier zeigt Kontrolle eins immer die stärksten Polarisationen und Patient zwei die geringsten Ausschläge des Potentials (Ausnahme hierbei ist das Experiment mit Ringerlösung fünf, in welchem Patient eins noch negativere

## 5 Diskussion

Potentiale zeigte als Patient zwei). Somit zeichnen sich in Graph 35, verglichen zu Graph 34 auch deutlichere Unterschiede zwischen den beiden Patienten und der Kontrolle ab. Es ist davon auszugehen, dass die Erythrozyten von Kontrolle eins die höchsten intrazellulären Kaliumkonzentrationen aufweisen und diejenigen von Patient zwei die geringsten, gefolgt von Patient eins.

Dadurch, dass wenn die Experimentverläufe der fünf verschiedenen Ringerlösungen beider Zeitpunkte zusammengenommen werden, meistens die Patienten geringere Polarisierungen zeigten als die der Kontrollen, kann auf eine Differenz im Kaliumhaushalt durch die Chorea-Akanthozytose geschlossen werden. Dies wird gestützt durch die Beobachtung von de Franceschi et al. (2014), dass die Erythrozyten von ChAc Patienten eine geringere intrazelluläre Kaliumkonzentrationen haben.

### 5.3.3.4 Experimente zur Bestimmung Gárdos- Kanal Aktivität bei Patienten mit Chorea Akanthozytose vor und nach sportlicher Betätigung

In Graph 36 und Graph 37 sind die Membranpotentialverläufe von jeweils einem der ChAc Patienten während einer experimentellen Manipulation ihrer Erythrozyten mit NS309, Tram 34 und TritonX-100 dargestellt. Die Daten der Patienten wurden vor und nach einer sportlichen Aktivität erhoben.

Insgesamt zeigen beide Kurven in beiden Graphen denselben Verlauf, was bedeutet, dass die generelle Aktivierung und Inhibierung des Gárdos- Kanals weder durch Sport noch durch die Chorea-Akanthozytose beeinflusst wurde.

Sowohl in Graph 36 als auch in Graph 37 zeigt sich kein Unterschied in der Stärke der Reaktion auf NS309 und Tram 34 vor dem Sport und danach. In Graph 37 liegen die Kurven (2A und 2B) sehr eng nebeneinander und in Graph 36 überlappen sich beide Kurven (1A und 1B) sogar, sodass wiederum das Fazit gezogen werden kann, dass auch das Ausmaß der Kanalaktivierung und Kanalinhibierung von Gárdos nicht durch körperliche Aktivität beeinflussbar ist.

### 5.3.4 Experimente mit Proben eines Patienten ATP11C Mutation

Aus Graph 38 ist der Verlauf des Membranpotentials eines Patienten mit ATP11C Mutation bei der experimentellen Manipulation mit NS309, Tram 34 und TritonX-100, im Vergleich zu den Verläufen zweier gesunder Kontrollen, abzulesen. Da die Verbindung zwischen der Mutation und den Symptomen noch unklar ist, wollte ich wissen, ob eine Veränderung in der Aktivität des Gárdos-Kanals vorliegt, welche als Sekundäreffekt Symptome auslösen könnte.

Der im Allgemeinen gleiche Verlauf der drei verschiedenen Kurven zeigt, dass sie jeweils dieselben Reaktionen auf die Substanzen NS309, Tram 34 und TritonX zeigen.

Allerdings fällt das Membranpotential des Patienten nach Zugabe von NS309 auf ca. minus 74 mV und damit in einen deutlich negativeren Bereich als die beiden Kontrollen. Dies kann dadurch erklärt

## 5 Diskussion

werden, dass es durch die Mutation zu einer erhöhten Aktivität des Gárdos- Kanals führt, wodurch mehr Kalium aus der Zelle in die Lösung gelangen kann und somit das Membranpotential stärker fällt. Dadurch liegt das Membranpotential in entsprechend negativeren Bereichen als bei der gesunden Kontrolle, bei der weniger Kalium in die Lösung strömen kann. Die erhöhte Aktivität der Kanäle kann weiterhin dadurch begründet werden, dass die Erythrozyten des Patienten jünger sind und somit eine höhere Gárdos- Kanal Dichte aufweisen als ältere [114].

Bei dieser Erklärung ist zu beachten, dass die Differenz zwischen dem Minimalwert des Patienten mit ATP11C Mutation und des nächstgelegenen Minimums, der des Membranpotentials von Kontrolle eins, sich mit einer Differenz von 5mV zwar deutlich abhebt, aber dass die Differenz zwischen Kontrolle eins und Kontrolle zwei ebenso bei 5mV liegt. Daher ist ein Zusammenhang zwischen der gemessenen Differenz des Membranpotentials und dem Vorliegen der Mutation in ATP11C zu hinterfragen.

Auch bei Graph 39 sind ähnliche Phänomene zu erkennen. Hier wurden die Erythrozyten aus denselben Proben statt mit NS309 und Tram 34 mit Yoda1 und Tram 34 manipuliert. Da beide Stoffe den Gárdos- Kanal aktivieren, verwundert es nicht, dass auch die Membranpotentialverläufe der drei Probanden die gleiche Reihenfolge zeigen.

Die Tatsache, dass das Plateau der Patientenprobe in Graph 39 nach Zugabe von Tram 34 mit ca. minus 30 mV etwas negativer ist als die Plateauwerte der Kontrollen, die beide bei ca. minus 28 mV liegen, zeigt, dass die Mutation möglicherweise zu robusteren Erythrozyten führt, welche weniger Hämolyse zeigen als Erythrozyten gesunder Probanden und somit weniger Hämoglobin als Puffer in der Lösung vorliegt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Etablierung der MBE-Methode an der Universität des Saarlandes erfolgreich war und zu einer sehr einfach durchführbaren und inzwischen durch weitere Wissenschaftler der Arbeitsgruppe genutzte Methode darstellt, welche reproduzierbare und dadurch sehr gut vergleichbare Ergebnisse liefert. Dadurch konnten auch die Proben von Patienten mit verschiedenen Mutationen in Erythrozyten Kanälen auf verschiedene Aspekte untersucht werden, was neue Aufschlüsse über die betroffenen Krankheiten und neue Perspektiven für weitere Forschungen brachte.

Allerdings konnte ich aufgrund verschiedener experimenteller Komplikationen das Ziel, die MBE-Methode am Konfokalmikroskop mit pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffen optisch darzustellen, nicht umsetzen. Dadurch war die Möglichkeit, aus dieser optischen Messung eine Schnelldiagnostik für Mutationen zu entwickeln, für mich leider nicht umsetzbar.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Andolfo I, Russo R, Manna F, Shmukler BE, Gambale A, Vitiello G, de Rosa G, Brugnara C, Alper SL, Michael Snyder L, Iolascon A (2015) Novel Gardos channel mutations linked to dehydrated hereditary stomatocytosis (xerocytosis). *Am J Hematol* 90:921–926
2. Andolfo I, Russo R, Rosato BE, Manna F, Gambale A, Brugnara C, Iolascon A (2018) Genotype-phenotype correlation and risk stratification in a cohort of 123 hereditary stomatocytosis patients. *Am J Hematol* 93:1509–1517
3. Andrews DA, Yang L, Low PS (2002) Phorbol ester stimulates a protein kinase C–mediated agatoxin-TK–sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells. *Blood* 100:3392–3399
4. Ataga KI, Investigators for the I-17043-05, Smith WR, Investigators for the I-17043-05, de Castro LM, Investigators for the I-17043-05, Swerdlow P, Investigators for the I-17043-05, Sauntharajah Y, Investigators for the I-17043-05, Castro O, Investigators for the I-17043-05, Vichinsky E, Investigators for the I-17043-05, Kutlar A, Investigators for the I-17043-05, Orringer EP, Investigators for the I-17043-05, Rigdon GC, Investigators for the I-17043-05, Stocker JW, Investigators for the I-17043-05 (2008) Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia. *Blood* 111:3991–3997
5. Baunbæk M, Bennekou P (2008) Evidence for a random entry of Ca<sup>2+</sup> into human red cells. *Bioelectrochemistry* 73:145–150
6. Belkacemi A, Fecher-Trost C, Tinschert R, Flormann D, Malihpour M, Wagner C, Meyer MR, Beck A, Flockerzi V (2021) The TRPV2 channel mediates Ca<sup>2+</sup> influx and the Δ<sup>9</sup>-THC-dependent decrease in osmotic fragility in red blood cells. *Haematologica* 106:2246
7. Bogdanova A, Makhro A, Wang J, Lipp P, Kaestner L (2013) Calcium in Red Blood Cells—A Perilous Balance. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, Vol 14, Pages 9848-9872 14:9848–9872
8. Bogdanova A, Makhro A, Kaestner L (2015) Calcium handling in red blood cells of sickle cell disease patients. Nova Science Publishers , New York
9. Bosman GJCGM, de Franceschi L (2008) Neuroacanthocytosis-Related Changes in Erythrocyte Membrane Organization and Function. *Neuroacanthocytosis Syndromes II* 133–142

## 6 Literaturverzeichnis

10. Bouyer G, Cueff A, Egée S, Kmiecik J, Maksimova Y, Glogowska E, Gallagher PG, Thomas SLY (2011) Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood* 118:2305–2312
11. Brooks SC (1937) Osmotic Effects of Deuterium Oxide (Heavy Water) on Living Cells. *Science* (1979) 86:497–498
12. Burckhardt G (2010) Säuren- Basen- Haushalt. Thieme, Stuttgart
13. Cao YJ, Houamed KM (1999) Activation of recombinant human SK4 channels by metal cations. *FEBS Lett* 446:137–141
14. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436–441
15. Catterall WA (2003) Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels. <http://dx.doi.org/101146/annurev.cellbio161521> 16:521–555
16. Catterall WA (2011) Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947
17. Cinar E, Zhou S, Decourcey J, Wang Y, Waugh RE, Wan J (2015) Piezo1 regulates mechanotransductive release of ATP from human RBCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:11783–11788
18. Danielczok JG, Terriac E, Hertz L, Petkova-Kirova P, Lautenschläger F, Laschke MW, Kaestner L (2017) Red blood cell passage of small capillaries is associated with transient Ca<sup>2+</sup>-mediated adaptations. *Front Physiol* 8:979
19. 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:e31015
20. de Franceschi L, Bosman GJCGM, Mohandas N (2014) Abnormal red cell features associated with hereditary neurodegenerative disorders: The neuroacanthocytosis syndromes. *Curr Opin Hematol* 21:201–209
21. Dietrich A, Mederos Y Schnitzler M, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T, Gudermann T (2003) N-Linked Protein Glycosylation Is a Major Determinant for Basal TRPC3 and TRPC6 Channel Activity \*. *Journal of Biological Chemistry* 278:47842–47852

22. Dietrich A, Gudermann T (2014) TRPC6: Physiological Function and Pathophysiological Relevance. *Handb Exp Pharmacol* 222:157–188
23. Disdier P, Granel B, Serratrice J, Constans J, Michon-Pasturel U, Hachulla E, Conri C, Devulder B, Swiader L, Piquet P, Branchereau A, Jouglard J, Moulin G, Weiller P-J (2001) Cannabis Arteritis Revisited. *Angiology* 52:1–5
24. Dobson-Stone C, Velayos-Baeza A, Filippone LA, Westbury S, Storch A, Erdmann T, Wroe SJ, Leenders KL, Lang AE, Dotti MT, Federico A, Mohiddin SA, Fananapazir L, Daniels G, Danek A, Monaco AP (2004) Chorein detection for the diagnosis of chorea-acanthocytosis. *Ann Neurol* 56:299–302
25. Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science* (1979) 280:69–77
26. Draghun A (2010) Membranpotenzial und Signalübertragung in Zellverbänden. Thieme, Stuttgart
27. Egée S, Kaestner L (2021) The Transient Receptor Potential Vanilloid Type 2 (TRPV2) Channel—A New Druggable Ca<sup>2+</sup> Pathway in Red Cells, Implications for Red Cell Ion Homeostasis. *Front Physiol* 12:677573
28. Ehmke H (2017) Säuren- Basen- Haushalt. Thieme (Duale Reihe), Stuttgart
29. Fakler B, Fahlke C (2007) Grundlagen zellulärer Erregbarkeit. Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-Lehrbuch), Berlin, Heidelberg
30. Faucherre A, Kissa K, Nargeot J, Mangoni ME, Jopling C (2014) Piezo1 plays a role in erythrocyte volume homeostasis. *Haematologica* 99:70
31. 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. *Scientific Reports* 2017 7:1 7:1–13
32. Fermo E, Monedero-Alonso D, Petkova-Kirova P, Makhro A, Pérès L, Bouyer G, Marcello AP, Longo F, Graziadei G, Barcellini W, Bogdanova A, Egee S, Kaestner L, Bianchi P (2020) Gardos channelopathy: functional analysis of a novel *KCNN4* variant. *Blood Adv* 4:6336–6341



33. Flatt F. JF, Bawazir M. WM, Bruce LJ (2014) The involvement of cation leaks in the storage lesion of red blood cells. *Front Physiol* 5 JUN:214
34. Flormann D, Qiao M, Murciano N, Iacono G, Darras A, Hof S, Recktenwald SM, Rotordam MG, Becker N, Geisel J, Wagner C, von Lindern M, van den Akker E, Kaestner L (2022) Transient receptor potential channel vanilloid type 2 in red cells of cannabis consumer. *Am J Hematol*
35. Föllner M, Kasinathan RS, Koka S, Lang C, Shumilina E, Birnbaumer L, Lang F, Huber SM (2008) TRPC6 Contributes to the Ca<sup>2+</sup> Leak of Human Erythrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry* 21:183–192
36. Föllner M, Hermann A, Gu S, Alesutan I, Qadri SM, Borst O, Schmidt E-M, Schiele F, Müller vom Hagen J, Saft C, Schöls L, Lerche H, Stournaras C, Storch A, Lang F, vom Hagen M (2012) Chorein-sensitive polymerization of cortical actin and suicidal cell death in chorea-acanthocytosis. *The FASEB Journal* 26:1526–1534
37. Friebel M, Helfmann J, Meinke MC (2010) Influence of osmolarity on the optical properties of human erythrocytes. <https://doi.org/10.1117/13486542.15.055005>
38. Fromm M (2007) *Transport in Membranen und Epithelien*. Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-Lehrbuch), Berlin, Heidelberg
39. Gallagher PG (2017) Disorders of erythrocyte hydration. *Blood* 130:2699–2708
40. Ge J, Li W, Zhao Q, Li N, Chen M, Zhi P, Li R, Gao N, Xiao B, Yang M (2015) Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature* 527:64–69
41. Gincel D, Silberberg SD, Shoshan-Barmatz V (2000) Modulation of the Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) by Glutamate<sup>1</sup>. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2000 32:6 32:571–583
42. GINCEL D, ZAID H, SHOSHAN-BARMATZ V (2001) Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochemical Journal* 358:147–155
43. Glogowska E, Dyrda A, Cueff A, Bouyer G, Egée S, Bennekou P, Thomas SLY (2010) Anion conductance of the human red cell is carried by a maxi-anion channel. *Blood Cells Mol Dis* 44:243–251

## 6 Literaturverzeichnis

44. Glogowska E, Lezon-Geyda K, Maksimova Y, Schulz VP, Gallagher PG (2015) Mutations in the Gardos channel (KCNN4) are associated with hereditary xerocytosis. *Blood* 126:1281–1284
45. Gov NS, Safran SA (2005) Red Blood Cell Membrane Fluctuations and Shape Controlled by ATP-Induced Cytoskeletal Defects. *Biophys J* 88:1859–1874
46. Graeve L, Müller M (2014) *Biomembranen*. Springer (Springer-Lehrbuch), Berlin
47. Grygorczyk R, Schwarz W, Passow H (1984) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human red cells. Comparison of single-channel currents with ion fluxes. *Biophys J* 45:693–698
48. Guizouarn H, Mariano OSTUNI P, Paola BIANCHI P, Lars KAESTNER P, François LALLIER P, Egee S David MONEDERO ALONSO Composition du jury Characterization of cationic conductances of human erythrocytes and their involvement in health and disease Examinateur Rapporteur Rapportrice Examinateur Directeur de thèse Examinatrice.
49. Hamill OP (1981) POTASSIUM CHANNEL CURRENTS IN HUMAN RED-BLOOD-CELLS. *Journal of Physiology*, The 97
50. Hamill OP (1983) Potassium and Chloride Channels in Red Blood Cells. Single-Channel Recording 451–471
51. Hänggi P, Makhro A, Gassmann M, Schmutz M, Goede JS, Speer O, Bogdanova A (2014) Red blood cells of sickle cell disease patients exhibit abnormally high abundance of N-methyl D-aspartate receptors mediating excessive calcium uptake. *Br J Haematol* 167:252–264
52. Heinrich PC (2014) *Ohne Wasser kein Leben*. Springer (Springer-Lehrbuch), Berlin
53. Hertz L, Flormann D, Birnbaumer L, Wagner C, Laschke MW, Kaestner L (2023) Evidence of in vivo exogen protein uptake by red blood cells: a putative therapeutic concept. *Blood Adv* 7:1033–1039
54. Hirschler-Laszkiwicz I, Tong Q, Conrad K, Zhang W, Flint WW, Barber AJ, Barber DL, Cheung JY, Miller BA (2009) TRPC3 activation by erythropoietin is modulated by TRPC6. *J Biol Chem* 284:4567–4581
55. Hodge T, Colombini M (1997) Regulation of Metabolite Flux through Voltage-Gating of VDAC Channels. *The Journal of Membrane Biology* 197 157 :3 157:271–279

## 6 Literaturverzeichnis

56. Hoffman JF, Joiner W, Nehrke K, Potapova O, Foye K, Wickrema A The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca<sup>2+</sup>-activated K channel (Gardos channel) in human red blood cells. URL: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1232342100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1232342100)
57. Jansen J, Qiao M, Hertz L, Wang X, Fermo E, Zaninoni A, Colombatti R, Bernhardt I, Bianchi P, Kaestner L (2021) Mechanistic ion channel interactions in red cells of patients with Gárdos channelopathy. *Blood Adv* 5:3303–3308
58. Jelkmann W (2007) *Blut*. Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-Lehrbuch), Berlin, Heidelberg
59. Jung HH, Danek A, Walker RH (2011) *Neuroacanthocytosis Syndromes*.
60. Jung HH, Danek A, Walker RH, Frey BM, Gassner C (2019) *McLeod Neuroacanthocytosis Syndrome*. Washington
61. Kaestner L (2013) Cation Channels in Erythrocytes - Historical and Future Perspective. *Calcium signalling* 223–233
62. Kaestner L (2015) Channelizing the red blood cell: Molecular biology competes with patch-clamp. *Front Mol Biosci* 2:46
63. Kaestner L, Wang X, Hertz L, Bernhardt I (2018) Voltage-activated ion channels in non-excitabile cells-a viewpoint regarding their physiological justification. *Front Physiol* 9:450
64. Kaestner L, Bogdanova A, Egee S (2020) Calcium Channels and Calcium-Regulated Channels in Human Red Blood Cells. *Adv Exp Med Biol* 1131:625–648
65. Kanzaki M, Zhang\* Y-Q, Mashima\* H, Li\* L, Shibata\* H, Kojima I (1999) Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* 1:165–170
66. Kayaaltı A (2021) *Transient Receptor Potential (TRP) Channels and Functions*.
67. Kihm A, Quint S, Laschke MW, Menger MD, John T, Kaestner L, Wagner C (2021) Lingering Dynamics in Microvascular Blood Flow. *Biophys J* 120:432–439
68. Kim JY, Saffen D (2005) Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *Journal of Biological Chemistry* 280:32035–32047

## 6 Literaturverzeichnis

69. Kirk K (2001) Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev* 81:495–537
70. Korbmacher C, Brenner B (2010) *Funktion und Interaktion von Zellen*. Thieme, Stuttgart
71. Kuhlman PA, Hughes CA, Bennett V, Fowler VM (1996) A New Function for Adducin: CALCIUM/CALMODULIN-REGULATED CAPPING OF THE BARBED ENDS OF ACTIN FILAMENTS (\*). *Journal of Biological Chemistry* 271:7986–7991
72. Kurtz A (2014) *Der Säure- Basen- und Mineralhaushalt*. Springer (Springer-Lehrbuch), Berlin
73. Lages B, Weiss HJ (2009) Original Article: Comparison of A23187 vs Ionomycin-induced Responses and Cytosolic Calcium Increases in Aequorin-loaded Human Platelets. Evidence for Ionophore-specific Differences in Intracellular Calcium Release. <http://dx.doi.org/103109/09537109509078472> 6:359–365
74. Lee CH, MacKinnon R (2018) Activation mechanism of a human SK-calmodulin channel complex elucidated by cryo-EM structures. *Science* (1979) 360:508–513
75. Li Q, Jungmann V, Kiyatkin A, Low PS (1996) Prostaglandin E2 Stimulates a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> Channel in Human Erythrocytes and Alters Cell Volume and Filterability. *Journal of Biological Chemistry* 271:18651–18656
76. Luckasen JR, White JG, Kersey JH (1974) Mitogenic Properties of a Calcium Ionophore, A23187. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71:5088–5090
77. Lüllmann-Rauch RAE (2015) *Taschenbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
78. Macey RI, Adorante JS, Orme FW (1978) Erythrocyte membrane potentials determined by hydrogen ion distribution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 512:284–295
79. Maher AD, Kuchel PW (2003) The Gárdos channel: a review of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1182–1197
80. Makhro A, Hänggi P, Goede JS, Wang J, Brüggemann A, Gassmann M, Schmutz M, Kaestner L, Speer O, Bogdanova A (2013) N-methyl-D-aspartate receptors in human erythroid precursor cells and in circulating red blood cells contribute to the intracellular calcium regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 305:1123–1138

81. Makhro A, Haider T, Wang J, Bogdanov N, Steffen P, Wagner C, Meyer T, Gassmann M, Hecksteden A, Kaestner L, Bogdanova A (2016) Comparing the impact of an acute exercise bout on plasma amino acid composition, intraerythrocytic Ca<sup>2+</sup> handling, and red cell function in athletes and untrained subjects. *Cell Calcium* 60:235–244
82. Mandal M, Yan Z (2009) Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate Regulation of N-Methyl-d-aspartate Receptor Channels in Cortical Neurons. *Mol Pharmacol* 76:1349–1359
83. Mcenery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:3170–3174
84. Melone MAB, di Fede G, Peluso G, Lus G, di Iorio G, Sampaolo S, Capasso A, Gentile V, Cotrufo R (2002) Abnormal Accumulation of tTGase Products in Muscle and Erythrocytes of Chorea-Acanthocytosis Patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:841–848
85. Mercado J, Gordon-Shaag A, Zagotta WN, Gordon SE (2010) Ca<sup>2+</sup>-Dependent Desensitization of TRPV2 Channels Is Mediated by Hydrolysis of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *Journal of Neuroscience* 30:13338–13347
86. Merckx A, Nivez MP, Bouyer G, Alano P, Langsley G, Deitsch K, Thomas S, Doerig C, Egée S (2008) Plasmodium falciparum Regulatory Subunit of cAMP-Dependent PKA and Anion Channel Conductance. *PLoS Pathog* 4:e19
87. Mittleman MA, Lewis RA, Maclure M, Sherwood JB, Muller JE (2001) Triggering Myocardial Infarction by Marijuana. *Circulation* 103:2805–2809
88. Miyamoto T, Mochizuki T, Nakagomi H, Kira S, Watanabe M, Takayama Y, Suzuki Y, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M (2014) Functional Role for Piezo1 in Stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> Influx and ATP Release in Urothelial Cell Cultures \*. *Journal of Biological Chemistry* 289:16565–16575
89. Müller-Newen G, Petrides PE (2014) Blut- Bestandteile und Blutplasma. Springer (Springer-Lehrbuch), Berlin
90. Müller-Newen G, Petrides PE (2014) Blut- Hämatopoese und Erythrocyten. Springer (Springer-Lehrbuch), Berlin

## 6 Literaturverzeichnis

91. Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y (2003) TRPV2 Is a Component of Osmotically Sensitive Cation Channels in Murine Aortic Myocytes. *Circ Res* 93:829–838
92. Murthy SNP, Wilson J, Zhang Y, Lorand L (1994) Residue Gln-30 of human erythrocyte anion transporter is a prime site for reaction with intrinsic transglutaminase. *Journal of Biological Chemistry* 269:22907–22911
93. Odeblad E, Bhar BN, Lindström G (1956) Proton magnetic resonance of human red blood cells in heavy-water exchange experiments. *Arch Biochem Biophys* 63:221–225
94. Petkova-Kirova P, Hertz L, Makhro A, Danielczok J, Huisjes R, Llaudet-Planas E, Mañú-Pereira M del M, Vives Corrons J-L, van Wijk R, Bogdanova A, Kaestner L (2018) A Previously Unrecognized Ca<sup>2+</sup>-inhibited Nonselective Cation Channel in Red Blood Cells. *Hemasphere* 2:e146
95. Petkova-Kirova P, Hertz L, Makhro A, Danielczok J, Huisjes R, Llaudet-Planas E, Mañú-Pereira M del M, Corrons J-LV, Wijk R van, Bogdanova A, Kaestner L (2018) A Previously Unrecognized Ca<sup>2+</sup>-inhibited Nonselective Cation Channel in Red Blood Cells. *Hemasphere* 2:e146
96. Peyrot I, Garsaud A-M, Saint-Cyr I, Quitman O, Sanchez B, Quist D (2007) Cannabis arteritis: a new case report and a review of literature. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 21:388–391
97. Picard V, Guitton C, Thuret I, Rose C, Bendelac L, Ghazal K, Aguilar-Martinez P, Badens C, Barro C, Bénéteau C, Berger C, Cathébras P, Deconinck E, Delaunay J, Durand JM, Firah N, Galactéros F, Godeau B, Jaïs X, de Jaureguiberry JP, le Stradic C, Lifermann F, Maffre R, Morin G, Perrin J, Proulle V, Ruivard M, Toutain F, Lahary A, Garçon L (2019) Clinical and biological features in PIEZO1-hereditary xerocytosis and Gardos channelopathy: a retrospective series of 126 patients. *Haematologica* 104:1554
98. Pinet C, Antoine S, Filoteo AG, Penniston JT, Coulombe A (2002) Reincorporated Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase can Mediate B-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Observed in Native Membrane of Human Red Blood Cells. *The Journal of Membrane Biology* 2002 187:3 187:185–201
99. Reed PW, Lardy HA (1972) A23187: A Divalent Cation Ionophore. *Journal of Biological Chemistry* 247:6970–6977

## 6 Literaturverzeichnis

100. Romero PJ, Romero EA, Mateu D, Hernández C, Fernández I (2006) Voltage-dependent calcium channels in young and old human red cells. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2006 46:3 46:265–276
101. Seear R v., Lew VL (2011) IKCa agonist (NS309)-elicited all-or-none dehydration response of human red blood cells is cell-age dependent. *Cell Calcium* 50:444–448
102. Shoshan-Barmatz V, de Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N (2010) VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med* 31:227–285
103. Snutch TP, Reiner PB (1992) Ca<sup>2+</sup> channels: diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol* 2:247–253
104. Soldati L, Adamo D, Spaventa R, Bianchi G, Vezzoli G (2000) Chloride Fluxes Activated by Parathyroid Hormone in Human Erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 269:470–473
105. Spektrum Akademischer Verlag H (1999) Erythrocytenmembran.
106. Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Kleinhenz ME, Lonigro AJ (1998) Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275:
107. Stocker JW, de Franceschi L, McNaughton-Smith GA, Corrocher R, Beuzard Y, Brugnara C (2003) ICA-17043, a novel Gardos channel blocker, prevents sickled red blood cell dehydration in vitro and in vivo in SAD mice. *Blood* 101:2412–2418
108. Strøbæk D, Teuber L, Jørgensen TD, Ahring PK, Kjær K, Hansen RS, Olesen SP, Christophersen P, Skaaning-Jensen B (2004) Activation of human IK and SK Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by NS309 (6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione 3-oxime). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1665:1–5
109. 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
110. Thinnes FP, Götz H, Kayser H, Benz R, Schmidt WE, Kratzin HD, Hilschmanna N (1989) [Identification of human porins. I. Purification of a porin from human B-lymphocytes (Porin 31HL) and the topochemical proof of its expression on the plasmalemma of the progenitor cell.]. *Biol Chem Hoppe Seyler* 370:1253–1264

## 6 Literaturverzeichnis

111. Thomas SLY, Bouyer G, Cuffe A, Egée S, Glogowska E, Ollivaux C (2011) Ion channels in human red blood cell membrane: Actors or relics?
112. Tiffert T, Bookchin RM, Lew VL (2003) Calcium Homeostasis in Normal and Abnormal Human Red Cells. *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease* 373–405
113. Tiffert T, Daw N, Etzion Z, Bookchin RM, Lew VL (2007) Age Decline in the Activity of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> Channel of Human Red Blood Cells. *Journal of General Physiology* 129:429–436
114. van Dijk MJ, van Oirschot BA, Harrison AN, Recktenwald SM, Qiao M, Stommen A, Cloos AS, Vanderroost J, Terrasi R, Dey K, Bos J, Rab MAE, Bogdanova A, Minetti G, Muccioli GG, Tyteca D, Egée S, Kaestner L, Molday RS, van Beers EJ, van Wijk R (2023) A novel missense variant in ATP11C is associated with reduced red blood cell phosphatidylserine flippase activity and mild hereditary hemolytic anemia. *Am J Hematol*
115. Vandorpe DH, Shmukler BE, Jiang L, Lim B, Maylie J, Adelman JP, de Franceschi L, Cappellini MD, Brugnara C, Alper SL (1998) cDNA Cloning and Functional Characterization of the Mouse Ca<sup>2+</sup>-gated K<sup>+</sup> Channel, mIK1. *Journal of Biological Chemistry* 273:21542–21553
116. Vandorpe DH, Xu C, Shmukler BE, Otterbein LE, Trudel M, Sachs F, Gottlieb PA, Brugnara C, Alper SL (2010) Hypoxia Activates a Ca<sup>2+</sup>-Permeable Cation Conductance Sensitive to Carbon Monoxide and to GsMTx-4 in Human and Mouse Sickle Erythrocytes. *PLoS One* 5:e8732
117. Veenman L, Gavish M (2006) The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. *Pharmacol Ther* 110:503–524
118. Veenman L, Shandalov Y, Gavish M VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis.
119. Wagner-Britz L, Wang J, Kaestner L, Bernhardt I (2013) Protein Kinase C $\alpha$  and P-Type Ca<sup>2+</sup> Channel CaV2.1 in Red Blood Cell Calcium Signalling. *Cellular Physiology and Biochemistry* 31:883–891
120. Walker RH, Danek A (2021) “Neuroacanthocytosis” – Overdue for a Taxonomic Update. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements* 11:1–6
121. Walzog B, Fandrey J (2010) Blut: Ein flüssiges Organsystem. Thieme, Stuttgart



## 6 Literaturverzeichnis

122. Wang J, Hertz L, Ruppenthal S, Nemer W el, Connes P, Goede JS, Bogdanova A, Birnbaumer L, Kaestner L (2021) Lysophosphatidic Acid-Activated Calcium Signaling Is Elevated in Red Cells from Sickle Cell Disease Patients. *Cells* 2021, Vol 10, Page 456  
10:456
123. Wei G, Rafiyath S, Liu D (2010) First-line treatment for chronic myeloid leukemia: Dasatinib, nilotinib, or imatinib. *J Hematol Oncol* 3:1–10
124. Wolff V, Lauer V, Rouyer O, Sellal F, Meyer N, Raul JS, Sabourdy C, Boujan F, Jahn C, Beaujeux R, Marescaux C (2011) Cannabis Use, Ischemic Stroke, and Multifocal Intracranial Vasoconstriction. *Stroke* 42:1778–1780
125. Xiao Z, Jaiswal MK, Deng PY, Matsui T, Shin HS, Porter JE, Lei S (2012) Requirement of phospholipase C and protein kinase C in cholecystokinin-mediated facilitation of NMDA channel function and anxiety-like behavior. *Hippocampus* 22:1438–1450
126. Yingst DR, Hoffman JF (1984) Ca-induced K transport in human red blood cell ghosts containing arsenazo III. Transmembrane interactions of Na, K, and Ca and the relationship to the functioning Na-K pump. *Journal of General Physiology* 83:19–45
127. Zeeck SC, Grond S, Papastavrou I, Zeeck A (2017) *Metallkomplexe*. Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG, Philadelphia
128. Zeeck SC, Grond S, Papastavrou I, Zeeck A (2017) *Säuren und Basen*. Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG, Philadelphia
129. Zeeck SC, Grond S, Papastavrou I, Zeeck A (2017) *Oxidation und Reduktion*. Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG, Philadelphia
130. (2018) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik
131. Ligandengesteuerter Ionenkanal - DocCheck Flexikon. URL:  
[https://flexikon.doccheck.com/de/Ligandengesteuerter\\_Ionenkanal](https://flexikon.doccheck.com/de/Ligandengesteuerter_Ionenkanal)

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Avogadro-Konstante
Å	Ångström (Maßeinheit der Länge)
AAAS	American Association for the Advancement of Science; Amerikanische Vereinigung zur Förderung der Wissenschaft
ADP	Adenosindiphosphat
AE1	Anionenantiporter; Bande3 Protein
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATP11C-Mutation	Mutation, die mit einer verminderten Aktivität der Phosphatidylserin-Flippase der roten Blutzellen einhergeht
ATPase	Adenosintriphosphatase
A23187bromo	4-Brom-A23187
BAPTA	1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
BCECF	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Acetoxymethyl Ester
BFU-E	Burst-forming unit erythroid; Erythrozyten Vorläuferzellen
BSA	Bovines Serumalbumin; Rinderalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
Bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca.	circa
CaM	Calmodulin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca <sub>v</sub>	Spannungsgesteuerter Kalziumkanal
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; Transmembran Leitfähigkeitsregulator für Mukoviszidose
CFU-E	Colony-forming unit erythroid; Erythrozyten Vorläuferzellen
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CiCC	Kalzium- inhibierter Kanal
ClC-Kanal	Chloridkanal
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
Cos-Zellen	Fibroblastenähnliche Zelllinien, die aus Affennierengewebe stammen
CRIB	Calmodulin binding/inositol 1,4,5-triphosphate receptor binding site; Bindungsstelle für den Calmodulin/ Inositol-1,4,5-triphosphat- Rezeptor
CsA	Cyclosporin A
CTX	Charybdotoxin
D	Leitfähigkeit
DAG	Diacylglycerol
dE	Differenz des elektrischen Feldes

## 7 Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\text{pH}$	pH-Wert Differenz
d.h.	Das heißt
DIDS	Dinatrium-4,4'-diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonat
$d[\text{K}^+]$	Konzentrationsunterschied von Kalium
Dr.	Doktor
3D	dreidimensional
dx	Diffusionsstrom über der Membran
$\text{D}_2\text{O}$	Deuteriumoxid
E	Membranpotential
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EIPA	Ethylisopropylamilorid; 3-Amino-N-8aminoiminomethyl)-6-chlor-5-[ethyl(1-methylethyl)amino]-2-pyrazincarboxamid
$E_{\text{K}^+}$	Membranpotential bei einer festgelegten Kaliumkonzentration
eNMDAR	Extrasynaptischer N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
EPO	Erythropoietin
F	Faraday Konstante
FKBP12	Peptidyl-Propyl cis-trans-Isomerase vom FKBP-Typ; humanes Protein, welches Tacrolimus bindet
FK506	Tacrolimus
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GluN1/ GluN2/ GluN3	Untereinheiten von NMDA- Rezeptoren
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gö6976	12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]Carbazol
GsMTx-4	Grammostola Mechanotoxin 4
HCA	Homocysteinsäure
Hb	Hämoglobin
HbS	Hämoglobin S; tritt bei Patienten mit Sichelzellanämie auf
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hkt	Hämatokrit
IBP	Isochinolin-bindendes Protein
i.d.R.	In der Regel
$I_{\text{K}}$	Kalzium aktivierter Kaliumkanal
I/V Kurve	Strom-Spannungs-Kurve
$J_{\text{Diff}}$	Diffusionsstrom
$J_{\text{Elek}}$	Elektrischer Strom
K	Kelvin
$\text{K}_{\text{Ca}}^{2+}$	Kalzium- aktivierter Kalium Kanal
KCNN4	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4; Kalziumaktivierter Kaliumkanal mit mittlerer/ kleiner Leitfähigkeit, Unterfamilie N, Mitglied

## 7 Abkürzungsverzeichnis

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Kryo- EM	Kryoelektronenmikroskopie
l	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein; Lipoprotein niedriger Dichte
LPA	Lysophosphatsäure
M	Molar
m	Meter
MAPK	Mitogen aktiviertes Protein- Kinase
MBE- Methode	Macey- Bennekou- Egée- Methode
m <sup>3</sup>	Kubikmeter
MEK	Mitogen aktiviertes Protein- Kinase Kinase
µl	Mikroliter
MilliQ- Wasser	Reinstwasser
min	Minute
MK-801	Dizocilpin; NMDA-Rezeptor Antagonist
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
µM	Mikromolar
mol	Mol
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Marijuana smoker, Marihuana Raucher
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
nAChR	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NAS	Neuroakanthozytose Syndrom
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nmol	Nanomol
NS	Non smoker; Nichtraucher
NS309	3-Oxime-6,7-dichloro-1H-indole-2,3-dione
ω-agatoxin TK	Toxin im Gift der Trichternetzspinne Agelenopsis aperta
Osmol/m <sup>3</sup>	Osmolarität; osmotische Konzentration
pA	Pikoampere
PBR	Peripherer Benzodiazepin Rezeptor
PBS	Phosphate-buffered saline; Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
pF	Pikofarad
pH	Potential des Wasserstoffs, lateinisch pondus hydrogenii
pH <sub>i</sub>	pH- Wert, der nach Lyse der am Experiment beteiligten Erythrozyten gemessen wird
pH <sub>Lysat</sub>	pH- Wert des Lysats
pH <sub>o</sub>	pH-Wert, der zu einem ausgewählten Zeitpunkt in der Ringerlösung gemessen wird
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKCα	Proteinkinase Cα

## 7 Abkürzungsverzeichnis

pK <sub>s</sub>	Säurekonstante K <sub>s</sub> ; dimensionslose Größe der Stärke einer Säure
PLC $\beta$	Phospholipase C $\beta$
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMCA	Plasmamembran Kalzium-Pumpe
Prof.	Professor
Protein 4.1R	Protein, welches Teil des erythrozytären Zytoskeletts ist
PS	Phosphatidylserin
pS	Pikosiemens
PTX	Pertussis Toxin
R	Allgemeine Gaskonstante
RBC	Red Blood Cells; Erythrozyten
rcf	relative centrifugal force; relative Zentrifugalbeschleunigung
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
s.	siehe
SCD	Sickle cell disease; Sichelzellanämie
Seniapoc	Bis(2-fluorphenyl)phenylacetamid
SK- Kanal	Kalzium- aktivierter Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit
Snarf	(5-(6)-Carboxy SNARF1
S <sup>2</sup>	Quadratsekunde
T	Absolute Temperatur
TEA	Tetraethylammonium
Tram 34	Triarylmethane 34
TRPC	Transient receptor potential channel; transienter Rezeptor Potential Kanal
TRPV	Vanilloid Rezeptor, Unterfamilie der TRP-Kanäle
TRPM	Melastin Rezeptor, Unterfamilie der TRP-Kanäle
TSPO	Translokatorprotein
U0126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien;
VDAC	Voltage dependent anion channel; spannungsabhängiger Anionenkanal
4-Bromo A23187	4-Brom-Kalzium-Ionophor A23187
V <sub>M</sub>	Membranpotential
VPS13A	Gen auf Chromosom 9, kodiert für Chorein
VPS13A- Krankheit	Chorea- Akanthozytose
XK-Krankheit	McLeod- Syndrom
Z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil
2,3-DPG	2,3-Bisphosphoglycerinsäure

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ([58]) Chemische Reaktionen im Erythrozyten beim Gasaustausch im Gewebe

Abbildung 2 ([77]): Membranskelett des Erythrozyten im Schnitt. Spektrin-Filamente (blau/ gelb, Tetramer aus zwei Spektrin- Typen) sind durch Aktin- Filamente (grün) speichenförmig zu einem Netz verbunden. Dieses ist durch Ankyrin (rot) bzw Protein 4.1 an Transmembranproteinen befestigt, nämlich am Bande-3 Protein, einem Bikarbonat/ Chlorid- Anionenaustauscher, sowie an Glykophorinen. Weitere beteiligte Proteine sind nicht gezeigt.[...] E und I, Extra- und Intrazellulärraum. PM, Plasmamembran.

\* Proteine, deren genetisch bedingter Funktionsverlust zu Kugelzellanämie führt.“

Abbildung 3 ([46]): Lipidstruktur einer Zellmembran

Abbildung 4: Entstehung eines Gleichgewichtspotentials

Abbildung 5 ([46]): Primär und sekundär aktiver Transport

Abbildung 6 ([46]): Darstellung verschiedener Transportmechanismen durch die Zellmembran

Abbildung 7 ([29]): Konzept des Ionenkanals

Abbildung 8 [29]): Positionierung der Kaliumionen bei Interaktion mit den Karbonylsauerstoffen der Aminosäuren

Abbildung 9 ([29]): Grundprinzip des Schaltverhaltens spannungsgesteuerter Ionenkanäle

Abbildung 10 ([29]): Aufbau eines ClC-Kanals, abgeleitet aus der Kristallstruktur des Proteins

Abbildung 11 ([131]): Schema eines ligandenaktivierten Ionenkanals

Abbildung 12 ([29]): Alternative Gating- Mechanismen: Darstellung eines SK-Kanals mit Kalzium-Sensor

Abbildung 13 ([74]): Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) -Struktur des Ca<sup>2+</sup>-freien SK-Calmodulin (SK-CaM) -Komplexes. Jede Kanaluntereinheit ist in einer anderen Farbe dargestellt.

18 ([79]): Einfache Schema-Darstellung der Topologie der monomeren Untereinheit des Gárdos-Kanals in einer Zellmembran. „s1-s6“ steht für die sechs mutmaßlichen Transmembrandomänen und „p“ steht für die porenbildende Region mit ihrem Selektivitätsfilter. Die Zahlen stehen für die Anzahl der Aminosäuren im entsprechenden Segment.

Abbildung 14 ([18]): Filtrierbarkeit von Erythrozyten und vermutete Mechanismen. (A) Messungen der Filtrierbarkeit von Erythrozyten unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von Grammostola

## 8 Abbildungsverzeichnis

Mechanotoxin 4 (GsMTx-4), von Tram 34 und in Gegenwart beider Medikamente. (B) mutmaßlicher Mechanismus für alle vier in (A) dargestellten Versuchsbedingungen. Kontrollbedingungen: Interaktion der Erythrozyten mit der Zellulose aktiviert die mechanosensitive Kanäle wie Piezo1 (grünes Kanalsymbol),  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert den Gárdos-Kanal (orange Kanalsymbol) und löst durch Bildung des Kalzium-Calmodulin-Komplexes (Ca-CaM; assoziierte blaue und rote Kreise) die vernetzten Spektrin-Tetramere (grüne Linien). Es kommt zu verringertem Zellvolumen und erhöhter Flexibilität der Zelle, was zu einer "normalen" Filtrierbarkeit führt. Blockiert GsMTx-4 den Piezo1 Kanal, wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintrittsweg verhindert und der oben beschriebene Prozess verringert. Es bleibt unklar, ob auch andere  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Kanäle als Piezo1 beteiligt sind, so dass es zu einer leichten Anpassung des Zellvolumens kommt. Blockiert Tram 34 den Gardos-Kanal, kann  $\text{Ca}^{2+}$  weiterhin über Piezo1 in die Zelle gelangen, was die Veränderung des Spektrin-Netzwerks, nicht aber die Volumen Anpassung ermöglicht, die zu einer verminderten Filterfähigkeit führt. Bei Hemmung von Piezo1 und dem Gardos-Kanal werden alle oben beschriebenen Mechanismen blockiert

Abbildung 15 ([57]): Mechanistische Hypothese, wie die Aktivität des Gardos-Kanals einen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration auslöst. Die Öffnung des Gardos-Kanals induziert Membranpotentialänderungen, welche den spannungsgesteuerten Kalzium-Kanal  $\text{CaV}2.1$  aktivieren, der möglicherweise durch den mechanosensitiven Piezo1-Kanal moduliert wird. Wird Piezo1 blockiert, ist die durch den Gárdos-Kanal induzierte Öffnung von  $\text{CaV}2.1$  maximal. Im Gegensatz dazu baut die Piezo1-Aktivität aufgrund der nichtselektiven Kationenpermeabilität des Kanals die durch den Gárdos-Kanal induzierte Hyperpolarisation ab. Infolgedessen wird die  $\text{CaV}2.1$ -Aktivität reduziert. Das Schema enthält Anmerkungen zu den experimentellen Manipulationen an den molekularen Akteuren. Ein Pfeil steht für die Aktivierung und ein Anker für die Hemmung des Transportproteins.

Abbildung 16 ([40]): Vorgeschlagenes Modell von PIEZO Kanälen auf der Grundlage kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen. Die grauen und braunen Modelle stellen geschlossene und offene Kanäle dar. Rote gestrichelte Linien zeigen mögliche Ionenleitwege an. Vermutlich führt die kraftinduzierte Bewegung (Pfeile) der peripheren Klinge oder peripheren Helices (PH) zur Konformationsanordnung und zum Gating des Kanals. Nachdruck aus Ge et al „Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel“ (2015), mit Erlaubnis von Springer Nature.

Abbildung 17 [34]: Messung der Filtrierbarkeit der Erythrozyten mit Filtern auf Zellulosebasis von Marihuana Rauchern (MS, Marijuana Smoker) und Nichtrauchern (NS, Non-smoker) mit und ohne  $30\mu\text{M}$   $\Delta^9\text{-THC}$ -Inkubation. Die Statistiken basieren auf dreifachen Messungen für jeden Spender.

Abbildung 18 ([27]): Vergleich des I/V- (Strom/ Spannungs-) Verhaltens von Ionenkanälen. (A) Ganzzellströme, gemessen in Cos-Zellen (Fibroblastenähnliche Zelllinien, die aus Affenierengewebe stammen), die TRPV2 überexprimieren (schwarze Kurve) und Kontrollzellen (rote Spur), beide

## 8 Abbildungsverzeichnis

stimuliert mit 30 $\mu$ M (Mikromolar) 19-THC. Die interne Lösung enthielt (in mM): 120 Cs-Glutamat, 8 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) (HEPES), 10 Cs- (1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA), 3,1 CaCl<sub>2</sub> (entspricht 100 nM freiem Ca<sup>2+</sup>), der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,2 eingestellt und die externe Lösung enthielt (in mM): 140 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Glukose, der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt. Für die TRPV2-Stimulation wurde der externen Lösung 19-THC zugesetzt und über eine Applikationspipette direkt auf die geklammerte Zelle appliziert. Spannungsrampen von 400 ms (Millisekunden) Dauer, die einen Spannungsbereich von -100 bis 100 mV (Millivolt) abdeckten, wurden mit 0,5 Hz von einem Haltepotential von 0 mV über einen Zeitraum von 300-400 Sekunden (s) angelegt. (B) Ganzzellströme, gemessen in Erythrozyten (RBCs, red bloodcells), die mit 30 $\mu$ M 19-THC stimuliert wurden. Die Aufzeichnungsbedingungen waren identisch mit den in (A) beschriebenen. (C) Differenzielle Ganzzellströme, die in Erythrozyten gemessen werden, wenn 2 mM (Millimolar) Ca<sup>2+</sup> aus der extrazellulären Lösung entfernt wird. Der in 2 mM CaCl<sub>2</sub>-externer Lösung aufgezeichnete Strom wurde von dem in 0 mM CaCl<sub>2</sub>-externer Lösung aufgezeichneten Strom subtrahiert. Die interne Lösung enthielt (in mM): 50 CsCl, 20 NaCl, 60 CsF, 5 MgATP, 10 HEPES, 20 Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), der pH-Wert wurde mit CsOH auf 7,2 eingestellt, und die externe Lösung enthielt (in mM): 0 oder 2 mM Ca<sup>2+</sup>, 125 Tetraethylammoniumchlorid (TEACl), 10 HEPES, 5 MgCl<sub>2</sub>, 45 Glucose, der pH-Wert wurde mit Tetraethylammoniumhydroxid (TEA-OH) auf 7,3 eingestellt. Zu beachten ist, dass Tetraethylammonium (TEA) für die meisten Kationenkanäle nicht permeabel ist und daher keine kationische Auswärtsströme (entsprechend negativen Membranpotentialen) zu erwarten sind. Aus demselben Grund wird das Umkehrpotential (Membranpotential, wenn keine Ströme auftreten - Schnittpunkt der Kurve mit der x-Achse) voraussichtlich zu negativeren Werten hin verschoben sein. Die Aufzeichnungen wurden mit Spannungsschritten von -100 bis 100 mV für 500 ms in 20 mV-Schritten in Abständen von 5 s durchgeführt, wobei das Haltepotential auf -30 mV gesetzt wurde. In (A,B) ist der Strom auf die Zellkapazität (pA/pF (Pikampere/ Pikofarad)) normiert, während in (C) die Autoren der Ansicht sind, dass die Kapazität in den planaren Chips die Kapazität die Zelloberfläche nicht korrekt widerspiegelt und daher nur den Strom pro Zelle aufzeichnet (pA). Außerdem waren die Aufzeichnungsprotokolle völlig unterschiedlich: Bei (A, B) wurden Spannungsrampen angelegt, während bei (C) diskrete Spannungsschritte aufgezeichnet wurden, um die Strom-Spannungs-Beziehung zu erstellen.

Abbildungen (A,B) sind Nachdrucke aus Belkacemi et al. (2021) „The TRPV2 channel mediates Ca<sup>2+</sup> influx and the  $\Delta$ 9-THC-dependent decrease in osmotic fragility in red blood cells“ mit Erlaubnis von Haematologica und (C) ist ein Nachdruck aus Petkova-Kirova et al. (2018) „A Previously



## 8 Abbildungsverzeichnis

Unrecognized Ca<sup>2+</sup>-inhibited Nonselective Cation Channel in Red Blood Cells“ und reproduziert mit der Erlaubnis von HemaSphere.

Abbildung 19 ([27]): Hypothetische Kanalaktivität in Erythrozyten während ihrer Lagerung. Das Rechteck neben dem Erythrozyten beschreibt die Hauptkomponenten typischer Lagerungsbedingung

Abbildung 20 ([22]): Topologie von TRPC6 in der Plasmamembran (PM) mit Angabe der Transmembranbereiche (S1-S6) und der vorhergesagten Porendomäne (P). Zwei glykosylierte Stellen in TRPC6 sind durch kovalent gebundene Kohlenhydrate gekennzeichnet (in grau).

Abbildung 21 ([122]): Aktivierungsmechanismus von TRPC6 durch PKC $\alpha$ .

Abbildung 22 ([122]): Überblick über die hypothetische Ca<sup>2+</sup>-Signalkaskade inklusive pharmakologischer Mittel zur Untersuchung der Erythrozyten.

Abbildung 23 ([64]) Struktur und Funktion von NMDA-Rezeptoren. (A) Erythroide NMDA-Rezeptoren werden früh in differenzierenden erythroiden Vorläuferzellen exprimiert, angefangen von Proerythroblasten (CD34 + -abgeleitete Zellen am 5. Tag in Kultur) bis zu orthochromatischen Erythroblasten (16. Tag in Kultur). (B) Elektrophysiologische Aufzeichnungen von Strömen, die durch die Behandlung dieser Zellen mit den Agonisten NMDA und Glycin vermittelt werden, zeigen die Veränderung der Untereinheitenzusammensetzung des Rezeptors während der Differenzierung. Während Proerythroblasten und polychromatische Erythroblasten mit Rezeptoren ausgestattet sind, die aus Glycin-bindenden GluN1- und 3A/B- Untereinheiten und Glutamat/NMDA-bindenden GluN2A- und 2D-Untereinheiten bestehen, ist, bei den in späten orthochromatischen Erythroblasten und Retikulozyten enthalten Rezeptoren, GluN2A durch durch GluN2C ersetzt. Dies hat zur Folge, dass Kanäle mit hohen Stromamplituden und kurzen Zeiten bis zur Inaktivierung in frühen Vorläuferzellen vorkommen und langsam inaktivierende Kanäle mit geringerer Amplitude in späten Vorläuferzellen und zirkulierenden Erythrozyten. (C) Die wiederholte Aktivierung von extrasynaptischen N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (eNMDARs) löst eine Inaktivierung der Kanäle aus.

Abbildung 24 ([41]): Durchschnittliche Steady-State-Leitfähigkeit von VDAC, relativ zur maximalen Leitwert bei 10 mV, in symmetrischen Lösungen von 0,5 Molar (M) NaCl (geschlossene Kreise) oder nach Ersetzen der NaCl-Lösung durch 0,5 M Natrium Glutamat (offene Kreise) als Funktion der Spannung; bestimmt durch Messung der durchschnittlichen Leitfähigkeit von mindestens 20 Kanälen

Abbildung 25 ([16]): Struktur der Untereinheiten von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen. Die Strukturen der Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Untereinheiten sind als Transmembran-Faltmodelle dargestellt; vorhergesagte  $\alpha$ -Helices sind als Zylinder dargestellt; die Längen der Linien entsprechen in etwa den Längen der dargestellten

## 8 Abbildungsverzeichnis

Polypeptidsegmente, und die Zickzacklinie auf der  $\delta$ -Untereinheit veranschaulicht deren Glycophosphatidylinositol-Anker

Abbildung 26 ([63]): Aktivierungsschema für den CaV2.1-Kanal, moduliert durch die zugrunde liegende Gárdos- Kanalaktivität.

Abbildung 27 (in Anlehnung an [57]): Mechanistische Hypothese, wie die Aktivität des Gárdos-Kanals einen Anstieg der intrazellulären Erythrozyten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auslöst. Die durch die Öffnung des Gárdos- Kanals induzierten Membranpotentialänderungen aktivieren den spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal CaV2.1. CaV2.1 kann durch  $\omega$ -agatoxin TK (Toxin im Gift der Trichternetzspinne *Agelenopsis aperta*) gehemmt werden. Pfeile stehen für die Aktivierung und Anker für die Hemmung des jeweiligen Transportproteins

Abbildung 28 [59]: Peripherer Blutaussstrich mit Akanthozytose bei einem Patienten mit McLeod-Syndrom (May Gruenwald-Giemsa; x100; Maßstabsleiste = 10  $\mu\text{m}$ ).

Abbildung 29: Glaselektrode zur Messung von pH-Werten

Abbildung 30: Vergleich der Sedimentation von Erythrozyten in Ringerlösungen auf Basis von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$ .

Abbildung 31: Phasenkontrastmikroskopie von Erythrozyten in einer Lösung aus 2% purem  $\text{D}_2\text{O}$  und 98%  $\text{D}_2\text{O}$  Ringerlösung, angesetzt wie im Methodenteil erläutert.

Abbildung 32: Phasenkontrastmikroskopie von Erythrozyten in einer Lösung aus 5% purem  $\text{D}_2\text{O}$  und 95%  $\text{D}_2\text{O}$  Ringerlösung, angesetzt wie im Methodenteil erläutert.

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Softwares	61
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Gebrauchsgegenstände	61
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	63
Tabelle 4: Zusammensetzung der Ringerlösungen in verschiedenen Konzentrationen	64
Tabelle 5: Experiment zur Bestimmung des Kaliumpotentials	68
Tabelle 6: Grundlegendes Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität	68
Tabelle 7: Verbessertes Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität	69
Tabelle 8: Alternatives Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität	69
Tabelle 9: Weiteres Experiment zur Untersuchung der Gárdos- Kanalaktivität	70
Tabelle 10: Experiment zur Untersuchung der Piezo1- Kanalaktivität	70
Tabelle 11: Erweitertes Experiment zur Untersuchung der Piezo1- Kanalaktivität	71
Tabelle 12: Alternatives Experiment zur Untersuchung der Piezo1- Kanalaktivität	71

## 10 Graphikverzeichnis

Graph 1: Beispielhafte pH-Messung während eines Experimentverlaufs mit NS3623, Valinomycin und TritonX- 100. 76

Graph 2: Beispielhafte Veränderung des Erythrozyten Membranpotentials während eines Experimentverlaufs mit NS3623, Valinomycin und TritonX- 100. 77

Graph 3: Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität. Die Messungen wurden mit NS3623, Valinomycin, TritonX-100 und sechs Ringerlösungen mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen durchgeführt. 79

Graph 4: Darstellung der Korrelation der Kaliumkonzentrationen in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe von Valinomycin bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität. Die Experimente wurden durchgeführt mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100. 81

Graph 5: Verlauf des Experiments mit NS3623, Valinomycin, TritonX-100 und fünf verschiedenen Hämatokrit Konzentrationen zwischen 4 und 19% Hkt.. 82

Graph 6: Darstellung der Korrelation von Hämatokrit in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe von Valinomycin während einer experimentellen Manipulation der Erythrozyten mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100. Die verschiedenen Hämatokrit Anteile belaufen sich auf Werte zwischen 4,4 und 18,7% Hkt.. 84

Graph 7: Verlauf des Experiments mit Ionomycin, Tram 34 und TritonX-100. 85

Graph 8: Verlauf des Experiments mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100. 86

Graph 9: Darstellung der Korrelation der A23187bromo Konzentration in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe dessen während einer experimentellen Manipulation der Erythrozyten mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100. Die gewählten A23187bromo Konzentrationen waren 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M und 20  $\mu$ M. 88

Graph 10: Darstellung der Korrelation der A23187bromo Konzentration in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe dessen während einer experimentellen Manipulation der Erythrozyten mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100. Die gewählten A23187bromo Konzentrationen waren 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 7  $\mu$ M. 90

Graph 11: Verlauf des Experiments mit A23187bromo, Tram 34, TritonX-100 und verschiedenen A23187bromo Konzentrationen zwischen 5  $\mu$ M und 20  $\mu$ M. 91

## 10 Graphikverzeichnis

Graph 12: Verlauf des Experiments mit A23187bromo, Tram 34, TritonX-100 und verschiedenen A23187bromo Konzentrationen zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 7  $\mu\text{M}$ . 93

Graph 13: Verlauf des Experiments mit NS309, Tram 34 und TritonX-100. 94

Graph 14: Verlauf des Experiments mit dem Piezo1 Agonisten Yoda1, dem Gárdos- Inhibitor Tram 34 und TritonX-100. 96

Graph 15: Experimentverlauf mit 625 nm Yoda1 und TritonX-100. 97

Graph 16: Vergleich des Membranpotentialverlaufs während einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität durch Valinomycin-Zugabe. Die Messungen wurden mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF und ohne BCECF durchgeführt. 99

Graph 17: Darstellung der Korrelation der Kaliumkonzentrationen in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe von Valinomycin bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalium-Konzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität. Die Messungen wurden mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100 durchgeführt, zum Vergleich zwischen einer Ringerlösung mit 25  $\mu\text{M}$  BCECF und einer Ringerlösung ohne BCECF. 101

Graph 18: Darstellung der Korrelation der Kaliumkonzentrationen in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe von Valinomycin bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität. Die Messungen wurden mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100 durchgeführt, als Vergleich zwischen Ringerlösungen ohne BCECF, mit 5  $\mu\text{M}$  BCECF, 25  $\mu\text{M}$  BCECF und 100  $\mu\text{M}$  BCECF. 103

Graph 19: Darstellung der Korrelation des Hämatokrit in den Ringerlösungen und dem Membranpotential nach Zugabe von Valinomycin während einer experimentellen Manipulation der Erythrozyten mit NS3623, Valinomycin und TritonX-100, sowie 25  $\mu\text{M}$  BCECF. Die verschiedenen Hämatokritwerte liegen zwischen 8 und 22%. 105

Graph 20: Vergleich des Membranpotentialverlaufs während eines Experiments mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100 mit 25  $\mu\text{M}$  Snarf und ohne Snarf. 106

Graph 21: pH- Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit 10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  BCECF. 107

Graph 22: pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit 10  $\mu\text{M}$  Snarf. 108

## 10 Graphikverzeichnis

Graph 23: Vergleich des Membranpotentialverlaufs bei zwei Ringerlösungen aus D<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>O während des Experiments mit A23187bromo, Tram 34 und TritonX-100. 114

Graph 24: pH- Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit 25 µM BCECF sowohl in D<sub>2</sub>O Lösung als auch in PBS. 115

Graph 25: Darstellung der gemessenen Fluoreszenzverhältnisse bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin, mit 25 µM BCECF und Messen des Überstandes nach Zentrifugieren. 117

Graph 26: pH-Kalibrierung am Konfokalmikroskop mit und ohne Valinomycin. 118

Graph 27: Darstellung der gemessenen Fluoreszenzverhältnisse bei einer Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität, ohne NS3623, mit 25 µM BCECF und Messen des Überstandes nach Zentrifugieren. 120

Graph 28: Gegenüberstellung von pH-Werten, welche aus den Fluoreszenzverhältnissen der Messung des Membranpotentials in Abhängigkeit der extrazellulären Kaliumkonzentration bei künstlicher Erhöhung der Kalium-Permeabilität mittels Zugabe von Valinomycin abgeleitet sind, mit den tatsächlich gemessenen pH- Werten. 121

Graph 29: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten einer Patientin mit Mutation in den kodierenden Genen für Piezo1 und Spektrin alpha, sowie ihrer Eltern, welche jeweils eine der Mutationen tragen und gesunden Kontrollen mit dem Piezo1 Aktivator Yoda1 und TritonX-100 zur Lyse der Erythrozyten. 123

Graph 30: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten einer Patientin mit Mutation in den kodierenden Genen für Piezo1 und Spektrin alpha, sowie ihrer Eltern, welche jeweils eine der Mutationen tragen und gesunden Kontrollen mit dem Piezo1 Aktivator Yoda1 und TritonX-100 zur Lyse der Erythrozyten. 124

Graph 31: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten eines Patienten mit McLeod-Neuro-Akanthozytose-Syndrom und gesunden Kontrollen mit dem Gárdos-Kanal Aktivator NS309 und dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100. 126

Graph 32: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten zweier Patienten mit Chorea Akanthozytose und gesunden Kontrollen mit dem Gárdos- Kanal Aktivator NS309 und dem Gárdos- Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100. 128

## 10 Graphikverzeichnis

Graph 33: Veränderungen der Differenz zwischen Ruhemembranpotential und maximaler Polarisation der Erythrozyten von zwei Patienten mit Chorea Akanthozytose bei Experimenten mit dem Gárdos-Kanal Aktivator NS309 und seinem Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100 zur Lyse der Erythrozyten im Laufe eines halben Jahres mit neuer Medikation. 129

Graph 34: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten zweier Patienten mit Chorea Akanthozytose und gesunden Kontrollen mit dem Chloridionen Austausch-Inhibitor NS3623 und Valinomycin sowie TritonX-100 mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen in der Ringerlösung zur Bestimmung des Kaliumpotentials. 131

Graph 35: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten zweier Patienten mit Chorea Akanthozytose und gesunden Kontrollen mit dem Chloridionen Austausch-Inhibitor NS3623 und Valinomycin sowie TritonX-100 mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen in der Ringerlösung zur Bestimmung des Kaliumpotentials. 131

Graph 36: Veränderungen des Membranpotentials von Erythrozyten eines Patienten mit Chorea-Akanthozytose vor und nach sportlicher Betätigung während einer Manipulation mit dem Gárdos-Aktivator NS309 und dem Gárdos- Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100. 133

Graph 37: Veränderungen des Membranpotentials von Erythrozyten eines Patienten mit Chorea-Akanthozytose vor und nach sportlicher Betätigung während einer Manipulation mit dem Gárdos- Kanal Aktivator NS309 und dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100. 134

Graph 38: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten eines Patienten mit ATP11C Mutation und gesunden Kontrollen mit dem Gárdos- Kanal Aktivator NS309 und dem Gárdos- Kanal Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100. 135

Graph 39: Veränderungen des Membranpotentials während der Manipulation von Erythrozyten eines Patienten mit ATP11C- Mutation und gesunden Kontrollen mit demPiezo1 Aktivator Yoda1 und dem Gárdos- Inhibitor Tram 34 sowie TritonX-100. 137

## 11 Veröffentlichungen

Jansen J, Qiao M, Hertz L, Wang X, Fermo E, Zaninoni A, Colombatti R, Bernhardt I, Bianchi P, Kaestner L (2021) Mechanistic ion channel interactions in red cells of patients with Gárdos channelopathy. Blood Adv 5:3303–3308

Polina Petkova-Kirova, Nicoletta Murciano, Julia Jansen, Greta Simionato, Giulia Iacono, Maria Giustina Rotordam, Thomas John, Min Qiao, Laura Hertz, Arjan J. Hoogendijk, Nadine Becker, Christian Wagner, Marieke von Lindern, Stephane Egee, Emile van den Akker, Lars Kaestner (2023) The Gárdos channel and Piezo1 revisited: Comparison between reticulocytes and mature red blood cells. IJMS submitted



## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich direkt oder indirekt bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Zuallererst ist mein Doktorvater Prof. Lars Kästner zu nennen, dem ich für die Bereitstellung meines Themas danken möchte und dafür, dass er bei Fragen und Unklarheiten jederzeit zur Verfügung stand und meine Arbeit sehr gut betreut hat.

Auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Prof. Christian Wagner danke ich für die vielen hilfreichen Tipps und für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Im Besonderen möchte ich Dr. Thomas John danken, der mir mehrfach sowohl mit seinen Kenntnissen über Informatik als auch mit 3D-Drucken geholfen hat.

Ein großer Dank gebührt auch Karin Kretsch für ihre fachliche Unterstützung im Umgang mit und der Bereitstellung von Chemikalien und Arbeitsgeräten sowie für meine Einarbeitung in die Arbeit im Labor.

Dankeschön Min Qiao für konstruktive Gespräche und das gemeinschaftliche Arbeiten an unserem Paper.

Weiterhin möchte ich allen Patienten und Arbeitsgruppenmitgliedern danken, die ihr Blut für meine Experimente zur Verfügung stellten.

Danke an Dr. Stephan Egée aus Roscoff, auf Grundlage dessen Forschung zur MBE-Methode ich meine Arbeit aufbauen durfte.

Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle danken, dass sie mich während meines gesamten Studiums unterstützt und mir dieses ermöglicht haben, aber auch meinem Bruder Hendrik, der jederzeit für motivierende Telefonate erreichbar war.

Ein sehr großes Dankeschön gilt meinem Freund Tobias Kaspers für seine grenzenlose Geduld darin, mir Rechnungen für die Ausarbeitung meiner Experimente zu erklären und weil er immer für mich da ist.

Weiterhin möchte ich meinen Freund\*innen Julia Folz, Alisia Dalhäuser, Catherine Bopp, Nadine Graf, Josy Wolfgang und Nicholas Fuchs danken, die mich die letzten Jahre liebevoll unterstützt haben. Hierbei möchte ich besonders Julia Folz hervorheben, dafür dass sie als Freundin und Mitbewohnerin nach Feierabend immer für mich da war und sich sogar für Blutentnahmen für meine Experimente von mir wecken ließ, Alisia Dalhäuser für besonders motivierende Gespräche und Nikolas Fuchs, der mir den Umgang mit Mendeley näher brachte.

## **12 Danksagung**

Auch meinem guten Freund aus meiner Heimat, dem Sauerland, Tim Müller, möchte ich danken. Dafür, dass er sich Zeit genommen hat mir den Umgang mit Excel und Citavi zu zeigen, als auch für wertvolle Tipps zum Formatieren mit Microsoft Word.

Vielen Dank. Ohne Euch alle wäre meine Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

## 13 Lebenslauf

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

## 14 Kolloquiumsvermerk

Tag der Promotion: 11.03.2024

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Lars Kästner

Prof. Dr. Adolfo Cavalié