

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Nephrologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Hoyer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in  
Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

**Progressive Splenomegalie und Makrozytose bei  
K<sub>Ca</sub>3.1-defizienten Mäusen:  
Die physiologische Bedeutung des Gardos-Kanals im  
Erythrozyten**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
gesamten Humanmedizin**

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Steffen Paschen  
aus Sittensen

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin am: 04.11.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

**Dekan:** Prof. Dr. M. Rothmund

**Referent:** PD Dr. R. Köhler

**1. Koreferent:** Prof. Dr. S. Waldegger

**2. Koreferent:** Frau PD Dr. R. Preisig-Müller

*Meinen Eltern*

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Gardos-Kanal ( $K_{Ca3.1}$ ) vermittelt den  $Ca^{2+}$ -abhängigen Ausstrom von  $K^+$  und  $Cl^-$  (den Gardos-Effekt) im Erythrozyten. Hierdurch kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und einem osmotisch bedingten Schrumpfen der Zelle.

Diesem  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanal wird daher eine entscheidende Rolle für die physiologische Volumenregulation in zirkulierenden Erythrozyten, sowie auch für Krankheiten mit einer pathologischen Volumenregulation zugeschrieben.

Insbesondere in der Pathogenese der Sichelzellanämie nimmt der Gardos-Kanal eine zentrale Stellung ein, wodurch diesem Kanal ein besonderes Interesse zuteil wird. Hochpotente, selektive Gardos-Kanal-Inhibitoren, wie beispielsweise Senicapoc, werden aktuell in der Therapie der Sichelzellanämie evaluiert.

Während die pathophysiologische Bedeutsamkeit des Gardos-Kanals in der Sichelzellanämie und anderen Erkrankungen intensiv untersucht wurde, ist die tatsächliche funktionelle Relevanz von  $K_{Ca3.1}$  sowohl für die physiologische Volumenregulation als auch für die Mechanismen der Eryptose (in Anlehnung an die Apoptose kernhaltiger Zellen) unklar. Auch wurden die Folgen einer genetischen Störung der Expression bis dato nicht detailliert untersucht.

Die vorliegende Studie erlaubt die Einordnung der physiologischen Rolle.

Bei einer Störung der genetischen Expression von  $K_{Ca3.1}$  in Mäusen entwickeln diese Tiere eine progressive, moderate Splenomegalie und eine milde Makrozytose. Die Erythrozyten dieser Knock-out Mäuse weisen eine erhöhte Fragilität bei hypoosmotischem Stress im Sinne einer gestörten Volumenregulation und eine verminderte Deformierbarkeit bei der Filtration durch kleine Poren auf. Diese funktionellen Defekte führen zu einer erhöhten

Sequestration in der Milz, begleitet von einer erhöhten Eisenablagerung, die hierauf mit einer Arbeitshypertrophie in Form einer stetig zunehmenden Splenomegalie reagiert.

Weiterhin konnte mit dieser Studie gezeigt werden, dass der Gardos-Kanal eine zentrale Stellung in der physiologischen Volumenregulation im Erythrozyten einnimmt, die bei einem Ausfall nicht durch andere Systeme kompensiert werden kann. Anders als von anderen Autoren postuliert, konnte keine maßgebliche Rolle von  $K_{Ca}3.1$  für die Eryptose nachgewiesen werden. Dabei stellt die vorliegende Studie die erste in vivo Studie zu diesem Themenkomplex dar.

---

# INHALT

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>Inhalt</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Der Gardos-Kanal als Mitglied der Gruppe der K<sup>+</sup>-Kanäle und seine Bedeutung für die Volumenregulation im Erythrozyten</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Überblick über die Gruppe der K <sup>+</sup> -Kanäle .....	2
1.1.2 Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Ca <sup>2+</sup> -aktivierten K <sup>+</sup> -Kanäle .....	4
1.1.3 Mechanismen der Volumenregulation im Erythrozyten und die physiologische Bedeutung des Gardos-Kanals .....	9
1.1.3.1 Mechanismen der Volumenregulation im Erythrozyten .....	9
1.1.3.2 Physiologische Eigenschaften des Gardos-Kanals .....	12
1.1.3.3 Der Gardos-Kanal als pathologisches Korrelat von Krankheiten mit gestörter Volumenregulation .....	16
1.1.3.4 Die Relevanz des Gardos-Kanals für die Eryptose als Bestandteil der Sequestration von Erythrozyten .....	18
<b>1.2 Fragestellung und Zielsetzung</b> .....	<b>20</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 Chemikalien</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2 Mäuse und Genotypisierung</b> .....	<b>22</b>
2.2.1 Mäuse .....	22
2.2.2 Genotypisierung .....	23
<b>2.3 Blutanalysen</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4 Histologie, Immunhistologie und Transmissions-Elektronenmikroskopie</b> .....	<b>25</b>

---

<b>2.5</b>	<b>Osmotische Toleranz.....</b>	<b>26</b>
2.5.1	Prinzip der Methode .....	26
2.5.2	Durchführung der Experimente .....	26
<b>2.6</b>	<b>Deformierbarkeit .....</b>	<b>28</b>
2.6.1	Deformierbarkeit bei Einwirken von Scherkräften .....	28
2.6.1.1	Prinzip der Methode.....	28
2.6.1.2	Durchführung der Experimente.....	30
2.6.2	Deformierbarkeit als Ausdruck der Filtrabilität .....	31
2.6.2.1	Prinzip der Methode.....	31
2.6.2.2	Durchführung der Experimente.....	32
<b>2.7</b>	<b>Durchflusszytometrie.....</b>	<b>34</b>
2.7.1	Prinzip der Methode .....	34
2.7.2	Aufbereitung der Erythrozytenproben .....	35
2.7.3	Annexin-V Färbung.....	36
2.7.4	Analyse im Durchflusszytometer .....	37
2.7.5	Verwendete Lösungen und Chemikalien .....	38
<b>2.8</b>	<b>Statistikangaben .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1	Progressive Splenomegalie bei $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -defizienten Mäusen .....	40
3.2	Erhöhtes MCV in allen Altersgruppen bei $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Störung .....	47
3.3	Gestörte $Ca^{2+}$ -abhängige Volumenregulation bei $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen.....	51
3.4	Verminderte osmotische Resistenz der Erythrozyten .....	53
3.5	Keine Veränderung der Elongationsfähigkeit bei Einwirken von Scherkräften .....	55
3.6	Gestörte Filtrierbarkeit von $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Erythrozyten beim Fluss durch 3 $\mu$ m-Poren 57	
3.7	Gleicher prozentualer Anteil Annexin-V positiver Zellen im peripheren Blut ...	59
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>

---

<b>6</b>	<b><i>Abbildungsverzeichnis</i></b> .....	<b>76</b>
<b>7</b>	<b><i>Tabellenverzeichnis</i></b> .....	<b>77</b>
<b>8</b>	<b><i>Anhang</i></b> .....	<b>78</b>
8.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	78
8.2	Danksagung .....	78
8.3	Ehrenwörtliche Erklärung .....	79

---

## ABKÜRZUNGEN

1-EBIO	1-ethyl-2-benzimidazolin
2TM	2-transmembran-Helices
AE1	Anionen-Exchanger 1 ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Ausstauscher)
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
BB	Blutbild
BK	large (big) conductance $\text{K}_{\text{Ca}}$ , $\text{K}_{\text{Ca}}$ mit hoher Leitfähigkeit
Bsp	beispielsweise
BSS	gepufferte Kochsalzlösung (buffered saline solution)
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	intrazelluläre freie Calciumkonzentration
CaM	Calmodulin
$\text{Cl}^-$	Chlorid
DC-EBIO	5,6-dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Elongation
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EZR	Extrazellulär
FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
$\text{H}^+$	Wasserstoff
Hb	Hämoglobin

---

HbS	Hämoglobin S
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
Hkt	Hämatokrit
HS	hereditäre Sphärozytose
hRBC	humane Erythrozyten (red blood cells)
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IK	intermediate conductance K <sub>Ca</sub> , K <sub>Ca</sub> mit mittlerer Leitfähigkeit
IUPHAR	International Union of Pharmacology
IZR	Intrazellulär
K <sup>+</sup>	Kalium ( <i>potassium</i> )
K <sub>Ca</sub>	Ca <sup>2+</sup> -aktivierte K <sup>+</sup> -Kanäle
K <sub>ir</sub>	inwardly-rectifying (einwärts gleichrichtende) K <sup>+</sup> -Kanäle
K <sub>U</sub>	spannungs-aktivierte K <sup>+</sup> -Kanäle
KCC	K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> -Kotransporter
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
m	männlich
MCV	mean corpuscular volume
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration
min	Minute
Na <sup>+</sup>	Natrium ( <i>sodium</i> )
P	P-loop
PBS	phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
pS	picco Siemens (Maß der elektrischen Leitfähigkeit)

---

PS	Phosphatidylserin
RBC	Erythrozyten (red blood cells)
RP	Rote Pulpa
rpm	Runden pro Minute (rounds per minute)
SCD	Sichelzellanämie (sickle cell disease)
SK	small conductance $K_{Ca}$ , $KCa$ mit kleiner Leitfähigkeit
TRAM-34	1-((2-chlorophenyl)diphenylmethyl)-1H-pyrazol
w	weiblich
WP	Weiße Pulpa
WT	Wildtyp

## 1 EINLEITUNG

K<sub>Ca</sub>3.1-defiziente Mäuse entwickeln eine progressive Splenomegalie. Dieses Ergebnis aus anderen Versuchen der Arbeitsgruppe stellte den Ausgangspunkt der vorliegenden Studie dar.

Das Ziel der Untersuchungen war es, zum einen die Ursache der Splenomegalie der K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup>-Mäuse zu eruieren und zum anderen die physiologische Relevanz des Gardos-Kanals (Synonyme: K<sub>Ca</sub>3.1; IK<sub>Ca</sub>-1, SK4) im Erythrozyten insbesondere für die Volumenregulation, die Eryptose und die Deformierbarkeit zu bestimmen.

Zur Einleitung in das Thema wird zuerst ein allgemeiner Überblick über K<sup>+</sup>-Kanäle und Ca<sup>2+</sup>-aktivierte K<sup>+</sup>-Kanäle gegeben, wobei die Ausführungen als Hintergrundinformationen zu verstehen sind.

Anschließend werden die an der Volumenregulation im Erythrozyten beteiligten Systeme mit Schwerpunkt auf den Gardos-Kanal dargestellt. Mit der Darstellung der assoziierten Krankheiten mit einer pathologischen Volumenregulation wird vorrangig unterstrichen, warum der Gardos-Kanal so intensiv erforscht wird. Eigentliches Thema dieser Studie sind die physiologischen Eigenschaften dieses Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanals. Abschließend wird die Relevanz von K<sub>Ca</sub>3.1 für die Eryptose erläutert.

### **1.1 Der Gardos-Kanal als Mitglied der Gruppe der K<sup>+</sup>-Kanäle und seine Bedeutung für die Volumenregulation im Erythrozyten**

#### **1.1.1 Überblick über die Gruppe der K<sup>+</sup>-Kanäle**

Ionenkanäle erlauben den Fluss von elektrisch geladenen Atomen und Molekülen entlang ihres elektrochemischen Gradienten über die lipophile Plasmamembran. Die Existenz dieser integralen Transmembranproteine wurde zuerst von A. Hodgkin und A. Huxley für die Signalübertragung zwischen Neuronen postuliert (Hodgkin and Huxley 1952), wofür sie 1963 den Nobel-Preis erhielten. Die Selektivität für bestimmte Ionen, wie z.B. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> oder Ca<sup>2+</sup> wird dabei durch die Struktur der wassergefüllten Pore bestimmt und führt dazu, dass andere Stoffe von der Permeation ausgeschlossen werden (Hille, Armstrong et al. 1999; Choe 2002). Kristallographische Strukturanalysen, die für einen K<sup>+</sup>-Kanal erstmals 1998 durchgeführt wurden (Doyle, Morais Cabral et al. 1998), erlauben heutzutage einen genauen Einblick in die Struktur und ein tieferes Verständnis der Funktion solcher Proteine.

Grundsätzlich bildet die Leitfähigkeit der K<sup>+</sup>-Kanäle die Grundlage für eine Vielzahl von physiologischen, zellulären Prozessen, wie für die Zellvolumenregulation, die Hormonsekretion und die elektrische Erregbarkeit von Zellen (Mackinnon 2003). Die K<sup>+</sup>-Kanäle bilden die größte und inhomogenste Gruppe unter den Ionenkanälen (Coetzee, Amarillo et al. 1999; Gutman, Chandy et al. 2005). Gemeinsam ist allen die spezifische Selektivität für K<sup>+</sup> gegenüber anderen Ionen, wie z.B. Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> oder Cl<sup>-</sup>, die durch die K<sup>+</sup>-Kanal-Signatur-Sequenz erreicht wird (Doyle, Morais Cabral et al. 1998).

## Einleitung

---

Die Hauptunterschiede zwischen den einzelnen  $K^+$ -Kanälen werden durch die Mechanismen der Aktivierung (Gating) und Inaktivierung bestimmt. Das Gating erfolgt bei den  $K^+$ -Kanälen durch Liganden und Spannungsänderungen des Membranpotentials. Dabei können als Liganden Ionen wie  $Ca^{2+}$  bei den  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanälen ( $K_{Ca}$ ), organische Moleküle wie ATP oder Proteine wie G-Protein-Untereinheiten bei den inwardly-rectifying  $K^+$ -Kanälen ( $K_{ir}$ ) fungieren. Spannungs-aktivierte  $K^+$ -Kanäle ( $K_U$ ) ändern ihre Konformation bei De- und Hyperpolarisation des Membranpotentials (Mackinnon 2003).

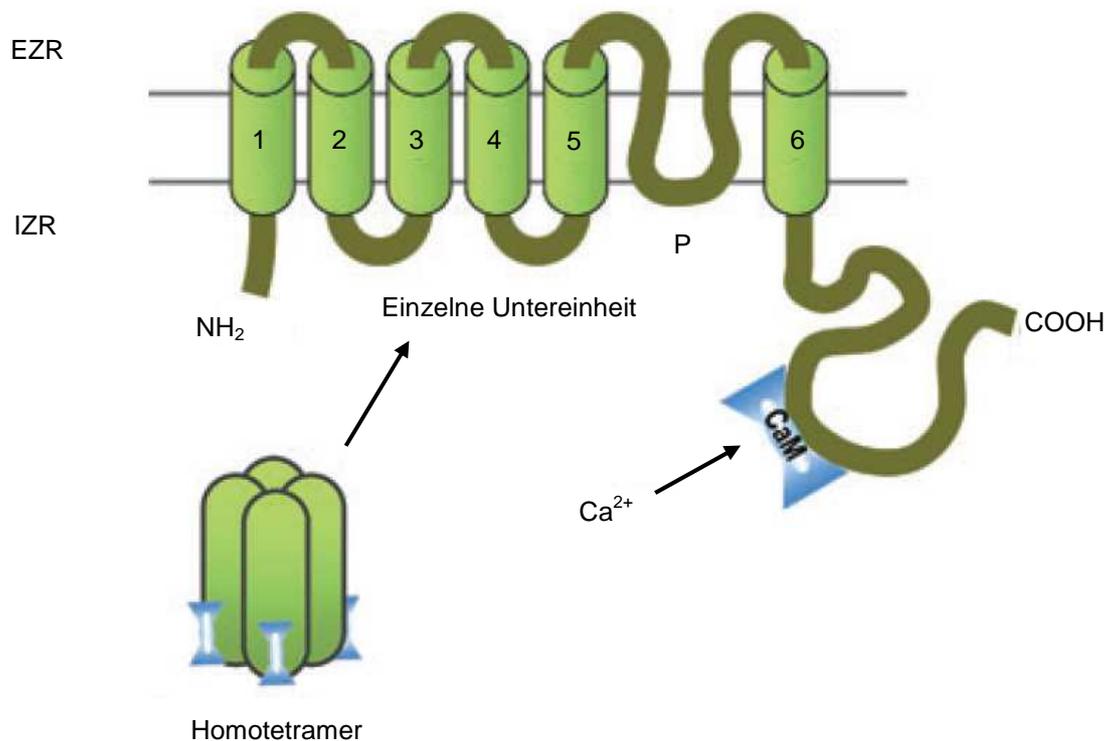
Die Unterschiede im Gating-Verhalten dienen als Grundlage für die Einteilung in vier Subgruppen und die derzeit gültige Nomenklatur für  $K^+$ -Kanäle, die zuletzt durch die International Union of Pharmacology (IUPHAR, [www.iuphar.org](http://www.iuphar.org)) 2005 aktualisiert wurde. Hierbei werden inwardly-rectifying (einwärts gleichrichtende), spannungs-aktivierte,  $Ca^{2+}$ -aktivierte, und two-P  $K^+$ -Kanäle unterschieden.

Die strukturellen und physiologischen Eigenschaften sollen hier nur für die  $K_{Ca}$  ausführlich dargestellt werden.

Wie die  $K^+$ -Kanäle allgemein, sind die  $K_{Ca}$  aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut (Abb. 1). Eine Untereinheit der  $K_{Ca}$  setzt sich aus vier transmembranösen Helices und einer 2TM/P-Struktur zusammen. Die 2TM/P-Struktur bezeichnet eine kurze Aminosäuresequenz, den P-loop (P), die zwei Transmembranhelices (2TM) miteinander verbindet (Hille, Armstrong et al. 1999; Choe 2002).

## Einleitung

---



**Abb. 1: Struktur des K<sub>Ca</sub>3.1 (Gardos-Kanal) und der K<sub>Ca</sub>2.1-3**

Dargestellt ist die Membrantopologie der Mitglieder der K<sub>Ca</sub>2/3-Gruppe. Die vier identischen Untereinheiten bilden ein Homotetramer, wobei sich eine Untereinheit aus sechs transmembranösen Helices (TM) und dem P-loop (P) zwischen S5 und S6 zusammensetzt (6TM/P-Kanal). Die Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität wird über das konstitutiv gebundene Calmodulin (CaM) vermittelt.

EZR = Extrazellulär, IZR = Intrazellulär (nach (Grgic, Kaistha et al. 2009)).

### 1.1.2 Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Ca<sup>2+</sup>-aktivierten K<sup>+</sup>-Kanäle

Veränderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration sind an zahlreichen Signalwegen beteiligt. Bei den K<sub>Ca</sub> führen Erhöhungen der intrazellulären Konzentration dieses second messengers zu einer Erhöhung ihrer Öffnungswahrscheinlichkeit P(o), was wiederum eine Hyperpolarisation der Zellmembran bedingt (Vergara, Latorre et al. 1998).

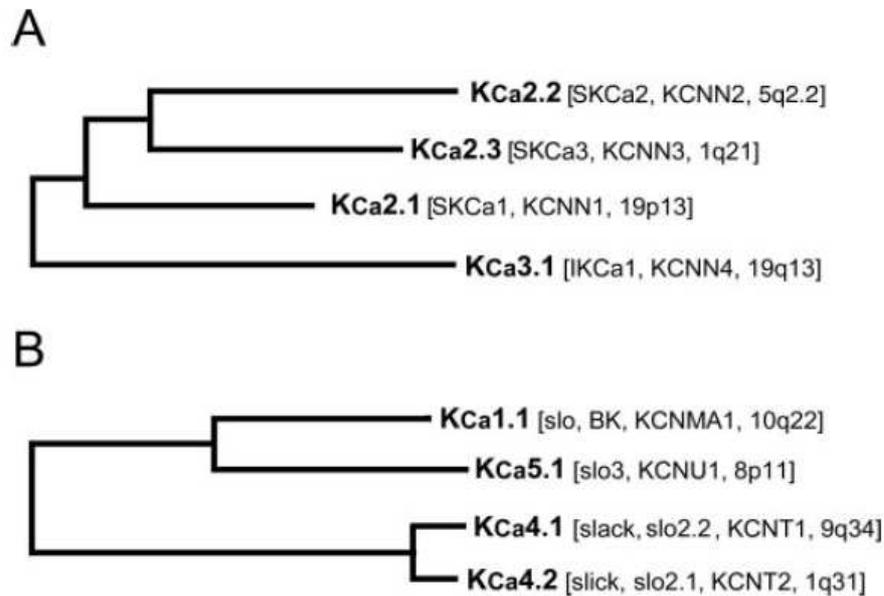
## Einleitung

---

Insbesondere bei der neuronalen Erregbarkeit, der Neurosekretion in chromaffinen Zellen, der Tonusregulation in der glatten Muskulatur, dem Blutfluss und der Zellproliferation nehmen sie durch die Steuerung der Repolarisation eine entscheidende Rolle als Regulator ein (Vergara, Latorre et al. 1998; Stocker 2004).

Zuerst wurden sie in Erythrozyten (RBC) charakterisiert (Gardos 1958), wo die Aktivierung des Gardos-Kanals ( $K_{Ca3.1}$ ) zu einer Hyperpolarisation und konsekutiv zu einem Zellschrumpfen führt. Hierauf werde ich im Detail bei der Vorstellung des  $K_{Ca3.1}$  eingehen (s. Abschnitt 1.1.3).

Nach der aktuellen Nomenklatur der IUPHAR von 2005 werden zwei große Gruppen von  $K_{Ca}$  unterschieden (Abb. 2), die nur entfernt funktionelle Ähnlichkeiten aufweisen (Wei, Gutman et al. 2005). Grundsätzlich unterscheiden sich die einzelnen  $K_{Ca}$  in ihrer Primärstruktur, in ihren Einzelkanalleitfähigkeiten (small – intermediate – big conductance), in ihren pharmakologischen Eigenschaften, in ihrer Untereinheitenstruktur und in ihrer Spannungsabhängigkeit. So sind die  $K_{Ca}$  der Gruppe A,  $K_{Ca2.1}$ ,  $K_{Ca2.2}$ ,  $K_{Ca2.3}$  und  $K_{Ca3.1}$  (Abb. 2a), spannungsunabhängig und durch geringe intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen ( $[Ca^{2+}]_i$ ) aktivierbar. Von den Mitgliedern der Gruppe B (Abb. 2b) wird häufig nur  $K_{Ca1.1}$  zu den  $Ca^{2+}$ -aktivierten  $K^+$ -Kanälen im engeren Sinne gezählt (Vergara, Latorre et al. 1998; Wei, Gutman et al. 2005), wobei es sich bei ihm um einen spannungsabhängigen und  $Ca^{2+}$ -modulierten  $K_{Ca}$  handelt. Die anderen drei Mitglieder dieser Gruppe wurden den  $K_{Ca}$  lediglich aufgrund ihrer Ähnlichkeiten in der Genstruktur zugeordnet (Wei, Gutman et al. 2005).



**Abb. 2: Phylogenetischer Baum der  $K_{Ca}$ -Kanäle**

**a)**  $K_{Ca}2/3$ -Gruppe **b)**  $K_{Ca}1/4/5$ -Gruppe. Dargestellt sind die Namen der IUPHAR, des HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) und ihre Chromosomenlokalisierung (nach (Wei, Gutman et al. 2005)).

Die Mitglieder der  **$K_{Ca}2.1-3$ -Gruppe**, auch bezeichnet als SK1, SK2 und SK3, sind hochsensitive und schnelle  $Ca^{2+}$ -Sensoren und damit geeignet, die  $[Ca^{2+}]_i$  mit dem Membranpotenzial zu verbinden (Stocker 2004; Wei, Gutman et al. 2005). Sie werden hauptsächlich im ZNS exprimiert und sind hier an der Neurotransmission beteiligt (Kohler, Hirschberg et al. 1996; Stocker 2004). Ihre Einzelkanalleitfähigkeit liegt bei ca. 10 pS (small conductance  $K_{Ca}$ , SK) und ist damit kleiner als die von  $K_{Ca}3.1$  mit ca. 35 pS (intermediate conductance  $K_{Ca}$ , IK) und der von  $K_{Ca}1.1$  mit 200-300 pS (big conductance  $K_{Ca}$ , BK) (Vergara, Latorre et al. 1998; Stocker 2004). Weiter differenzieren lassen sich die SK-Kanäle anhand ihrer Sensitivität gegenüber dem Antagonisten Apamin, einem Bienengift (Strobaek, Jorgensen et al. 2000).

## Einleitung

---

Wie bereits erwähnt, besitzen **K<sub>Ca</sub>1.1** (auch als BK bezeichnet) sehr hohe Einzelkanalleitfähigkeiten für K<sup>+</sup> (200-300 pS) und werden durch das gemeinsame Einwirken von Membrandepolarisation und Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> aktiviert (Atkinson, Robertson et al. 1991; Butler, Tsunoda et al. 1993). Im Gegensatz zu den Mitgliedern der K<sub>Ca</sub>2/3-Gruppe binden BK-Kanäle Ca<sup>2+</sup> direkt an eine Bindestelle, den Ca<sup>2+</sup>-Bowl (Schreiber and Salkoff 1997; Xia, Hirschberg et al. 1998). Sie finden sich häufig in der Nähe von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in Neuronen, der glatten Muskulatur und in der Cochlea, für die sie die Funktion eines Feedback-Modulators übernehmen (Roberts, Jacobs et al. 1990; Robitaille, Garcia et al. 1993; Nelson, Cheng et al. 1995).

Abschließend sollen einige allgemeine Eigenschaften des K<sub>Ca</sub>3.1 benannt werden. Eine detaillierte Darstellung erfolgt bei der Vorstellung von K<sub>Ca</sub>3.1 im Erythrozyten (s. Abschnitt 1.1.3.2), hier in Abgrenzung zu K<sub>Ca</sub>3.1 in anderen Geweben als Gardos-Kanal bezeichnet.

Im Jahr 1997 entdeckten drei Arbeitsgruppen gleichzeitig das Gen (KCNN4), welches für **K<sub>Ca</sub>3.1** kodiert (Ishii, Silvia et al. 1997; Joiner, Wang et al. 1997; Logsdon, Kang et al. 1997). Es zeigte sich, dass K<sub>Ca</sub>3.1 einen Anteil von ca. 40% an gleichen Aminosäuren (AS) im Vergleich zu jedem der drei SK-Kanäle besitzt (Ishii, Silvia et al. 1997; Joiner, Wang et al. 1997; Logsdon, Kang et al. 1997), die wiederum durch die Gene KCNN1-3 kodiert werden (Kohler, Hirschberg et al. 1996; Litt, LaMorticella et al. 1999). Aus dieser Ähnlichkeit in der Primärstruktur folgen auch die Gemeinsamkeiten in den physiologischen Eigenschaften. So werden K<sub>Ca</sub>3.1, wie auch die K<sub>Ca</sub>2.1-3, durch geringe intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen aktiviert, sind zeit- und spannungsunabhängig und besitzen eine einwärts gleichrichtende Funktion (inward rectification) (Ishii, Silvia et al. 1997; Joiner, Wang et al. 1997; Vandorpe, Shmukler et al. 1998). Die Einzelkanalleitfähigkeit liegt, wie

## Einleitung

---

bereits erwähnt, mit ca. 35 pS zwischen der von SK und BK (Grygorczyk and Schwarz 1983; Ishii, Silvia et al. 1997; Logsdon, Kang et al. 1997; Jensen, Strobaek et al. 1998). Weitere Unterschiede bestehen vor allem in der Pharmakologie. So können  $K_{Ca3.1}$  u. a. durch Clotrimazol, Charybdotoxin und TRAM-34 inhibiert werden, sind aber unempfindlich gegenüber dem SK-Blocker Apamin und dem BK-Blocker Iberiotoxin (Kaczorowski, Knaus et al. 1996; Kohler, Hirschberg et al. 1996; Ishii, Maylie et al. 1997; Ishii, Silvia et al. 1997; Joiner, Wang et al. 1997; Wulff, Miller et al. 2000).

$K_{Ca3.1}$  finden sich bevorzugt in Zellen des hämatopoetischen Systems und in allen Organen, die in den Salz und den Flüssigkeitstransport involviert sind (inkl. Niere, Kolon, Lunge und Speicheldrüsen) (Ishii, Silvia et al. 1997; Joiner, Wang et al. 1997; Logsdon, Kang et al. 1997; Vandorpe, Shmukler et al. 1998; Warth, Hamm et al. 1999). Im Endothel sind sie, zusammen mit  $K_{Ca2.3}$ , mit der Freisetzung des Endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF) verknüpft und spielen eine Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen, wie bsp. in der arteriellen Hypertonie und dem Diabetes mellitus, sowie vermutlich auch in der Arteriosklerose (Si, Heyken et al. 2006; Kohler and Hoyer 2007; Brahler, Kaistha et al. 2009; Grgic, Kaistha et al. 2009).

### 1.1.3 Mechanismen der Volumenregulation im Erythrozyten und die physiologische Bedeutung des Gardos-Kanals

#### 1.1.3.1 *Mechanismen der Volumenregulation im Erythrozyten*

Beim Fluss durch enge Kapillaren in der Mikrozirkulation müssen Erythrozyten in der Lage sein, ihre äußere Form möglichst schnell den erhöhten Scherkräften und strukturellen Gegebenheiten anzupassen. Diese Fähigkeit ist in erster Linie von der intrazellulären Viskosität abhängig, die vorrangig durch die intrazelluläre Hämoglobin-Konzentration bestimmt wird (Mohandas and Gallagher 2008).

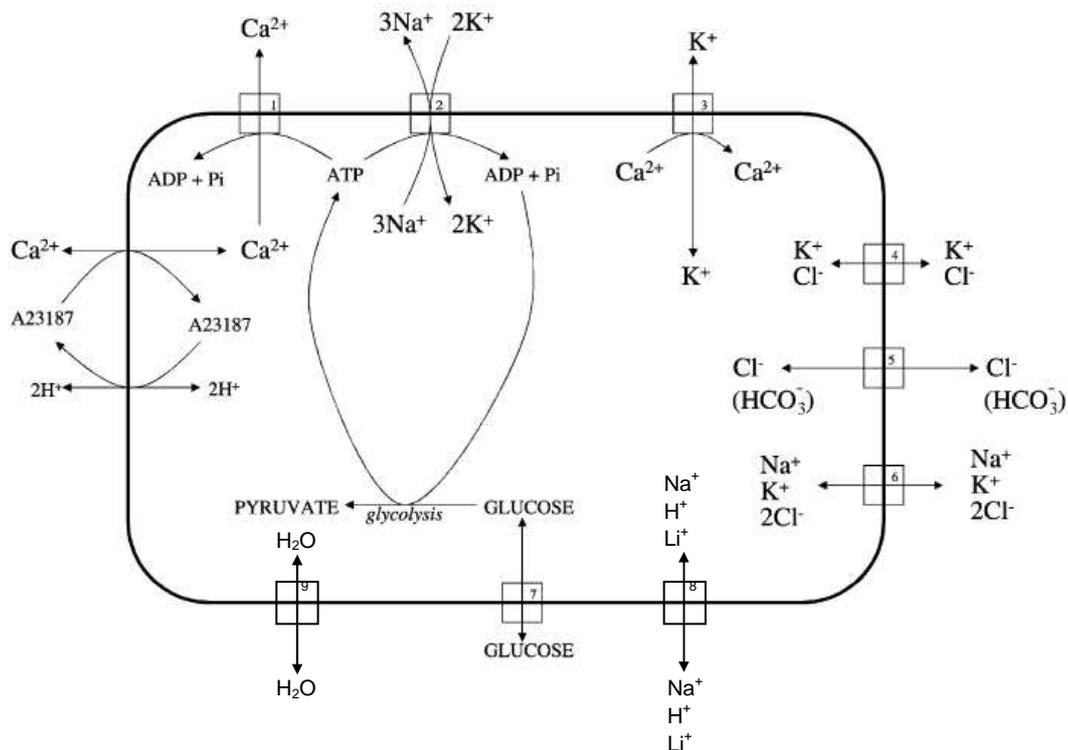
Da der Hämoglobin-Gehalt über die Lebenszeit eines Erythrozyten nahezu konstant bleibt, wird die Hämoglobin-Konzentration somit allein über das Zellvolumen gesteuert (Brugnara 1997). Die exakte Regulation des Volumens ist daher für die Deformierbarkeit essentiell.

Mehrere Systeme wurden bis dato identifiziert, die an der Volumenregulation beteiligt sind (Abb. 3). Hierbei handelt es sich um Kationen- und Anionentransporter, die kontinuierlich reguliert werden und miteinander in Interaktion treten. Sie bestimmen die intrazelluläre Ionenkonzentration, die wiederum maßgeblich für den osmotischen Wasserein- und -ausstrom über Aquaporine ist (Brugnara 1997; Maher and Kuchel 2003).

Die Hauptgradienten für Kationen werden in RBC dabei von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aufrecht erhalten. Insbesondere für die Volumenregulation relevant sind der  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter (KCC), ein  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (Anionenexchanger 1, AE1) und der Gardos-Kanal (Brugnara 1997). Auf diese Systeme möchte ich im Folgenden näher eingehen.

Eine weitere Funktion für die Volumenregulation haben der  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter und  $\text{Cl}^-$ -Kanäle, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

## Einleitung



**Abb. 3: Ionen-transportwege in Erythrozyten**

Zusätzlich dargestellt ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport über die Membran via A23187, der ein Abkoppeln der Aktivität des Gardos-Kanals von der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase erlaubt. Das per Glycolyse gewonnene ATP dient sowohl der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase also auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase als Energiequelle.

Dargestellt sind: **1)**  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, **2)**  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, **3)** der Gardos-Kanal, **4)**  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter, **5)** Anionen-Austauscher 1 **6)**  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter, **7)** Glukose-Transporter, **8)**  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher, **9)** Aquaporin 1 (nach (Brugnara 1997; Maher and Kuchel 2003)).

Um die physiologische Relevanz eines dieser Systeme für die Volumenregulation und anderer funktioneller Eigenschaften von RBC zu ermitteln, werden häufig Studien an Knock-out Mäusen durchgeführt. Für den  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter und den  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher zeigte sich hierbei eine besondere funktionelle Bedeutsamkeit, was nun erläutert werden soll.

Rust et al. störten die genetische Expression des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporters 1 und 3 (KCC1 und KCC3) in Mäusen (Rust, Alper et al. 2007), die durch die *Kcc1/3*-Gene kodiert werden (Pellegrino, Rybicki et al. 1998; Rust, Alper et al. 2007). Mit Hilfe dieser Knock-out Mäuse ließ sich nachweisen, dass KCCs

## Einleitung

---

maßgeblich an der Regulation des Volumens und der Dichte in RBC beteiligt sind, wobei insbesondere KCC3 diese Funktionen ausübt. So haben Erythrozyten von  $Kcc1^{-/-}Kcc3^{-/-}$ -Mäusen ein erhöhtes mean corpuscular volume (MCV), eine verminderte mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) und eine erhöhte Empfindlichkeit für osmotische Lyse (Rust, Alper et al. 2007), alles Parameter, die eine gestörte Volumenregulation anzeigen (Begenisich, Nakamoto et al. 2004). Ebenso wie der Gardos-Kanal weisen auch die KCCs eine erhöhte Aktivität bei der Sichelzellerkrankung (SCD) auf (Brugnara, Bunn et al. 1986) und sind hier an der Dehydrierung und der konsekutiven Sichelzellbildung beteiligt (Lew and Bookchin 2005; Joiner, Rettig et al. 2007).

Der Anionen-Austauscher 1 (AE1), ein  $Cl^{-}/HCO_3^{-}$ -Austauscher, ist das meist verbreitete intrinsische Protein in der Zellmembran von Erythrozyten (Knauf 2003) und vermittelt hier den schnellen Austausch von  $Cl^{-}$  und  $HCO_3^{-}$ .

Wie auch beim  $K^{+}/Cl^{-}$ -Kotransporter wurde die physiologische Relevanz dieses Systems anhand von Knock-out Mäusen ermittelt:  $AE-1^{-/-}$ -Mäuse entwickeln eine schwere hämolytische Anämie mit gesteigerter Erythropoese und die Erythrozyten sind verstärkt spherozytär und zeigen vermehrt Phosphatidylserin (PS) an ihrer Oberfläche (Peters, Shivdasani et al. 1996; Southgate, Chishti et al. 1996; Akel, Wagner et al. 2007). Letzteres dient Makrophagen als Signal zur Phagozytose und wird als essentieller Faktor zum Mechanismus der Eryptose (in Anlehnung an die Apoptose kernhaltiger Zellen) diskutiert (s. Abschnitt 1.1.3.4) (Akel, Wagner et al. 2007).

Über die physiologische Bedeutsamkeit des Gardos-Kanals ist weit weniger bekannt. Als gesichert gilt, dass der Gardos-Kanal einen  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^{+}$ -Ausstrom in den RBC vermittelt. Hierbei kommt es nach Einstrom von  $Ca^{2+}$  zur Hyperpolarisation der Zellmembran, dem Ausstrom von  $K^{+}$  und begleitend  $Cl^{-}$  (zur Wahrung der Elektroneutralität) aus dem Erythrozyten und schließlich zum osmotisch bedingten Wasserausstrom und Schrumpfen der Zelle (Gardos 1958; Brugnara, de Franceschi et al. 1993; Brugnara 1997;

## Einleitung

---

Hoffman, Joiner et al. 2003). Daher wird dem Gardos-Kanal eine entscheidende Rolle für die Volumenregulation in RBC zugeschrieben (Brugnara 2003).

Diese Aktivierung der  $K^+$ -Permeabilität soll Erythrozyten auch vor hyper- und hypotoner Lyse schützen, bsp. bei Durchquerung der hypertonen Umgebung des Nierenmarks (De Franceschi, Saadane et al. 1994; Begenisich, Nakamoto et al. 2004).

Bemerkenswerterweise wird  $K_{Ca3.1}$  eine besondere Relevanz bei Krankheiten mit gestörter erythrozytärer Volumenregulation zugeschrieben, wie bei der hereditären Sphärozytose (HS) (Bertles 1957; Jacob and Jandl 1964; De Franceschi, Rivera et al. 2005) und der Sichelzellerkrankheit (SCD) (Brugnara, de Franceschi et al. 1993; Brugnara 2003). Hierauf möchte ich im Abschnitt 1.1.3.3 näher eingehen. Zuvor soll allerdings eine ausführliche Darstellung der bekannten, physiologischen Eigenschaften des Gardos-Kanals erfolgen.

### 1.1.3.2 *Physiologische Eigenschaften des Gardos-Kanals*

Ein  $Ca^{2+}$ -abhängiger  $K^+$ -Ausstrom in humanen Erythrozyten (hRBC) wurde zuerst in den 50er Jahren von Dr. George Gardos beschrieben (Gardos 1958). Folgende Studien zeigten, dass  $K_{Ca3.1}$  (der Gardos-Kanal) für dieses Phänomen (den Gardos-Effekt) verantwortlich ist (Hoffman, Joiner et al. 2003; Begenisich, Nakamoto et al. 2004).

Reguliert wird die Aktivität des Gardos-Kanals sowohl durch mono- als auch divalente Kationen, wobei den monovalenten eine eher untergeordnete Rolle zukommt (Maher and Kuchel 2003). So kann durch Präinkubation von RBC in einem  $K^+$ -freien Medium  $K_{Ca3.1}$  inhibiert werden, was ebenfalls durch abnehmende intra- und extrazelluläre  $H^+$ -Ionenkonzentrationen (abnehmender pH-Wert) möglich ist (Heinz and Passow 1980; Grygorczyk, Schwarz et al. 1984; Heinz and Hoffman 1990).

## Einleitung

---

Bei den divalenten Kationen wurde vor allem der Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Kanalaktivität intensiv untersucht. Die normale, freie, intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration liegt in RBC bei ca. 60 nM, was durch die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Abb. 3/1) bedingt ist (Gilboa, Chapman et al. 1994). Eine Aktivierung von  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  in RBC erfolgt bei einer Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  über 100 nM. Unter experimentellen Voraussetzungen ist es daher oftmals notwendig, die Aktivität des Gardos-Kanals von der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase abzukoppeln. Dies wird mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors A23187 (Abb. 3) erreicht (Maher and Kuchel 2003).

Wie bereits erwähnt, sind eine Reihe von inhibitorischen Substanzen für den Gardos-Kanal bekannt. Da eine Blockierung von  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  in hRBC ebenfalls als therapeutisches Mittel in der Behandlung der Sichelzellanämie (SCD) eingesetzt wird (s. Abschnitt 1.1.3.3), wurden immer spezifischere und potentere Substanzen entwickelt.

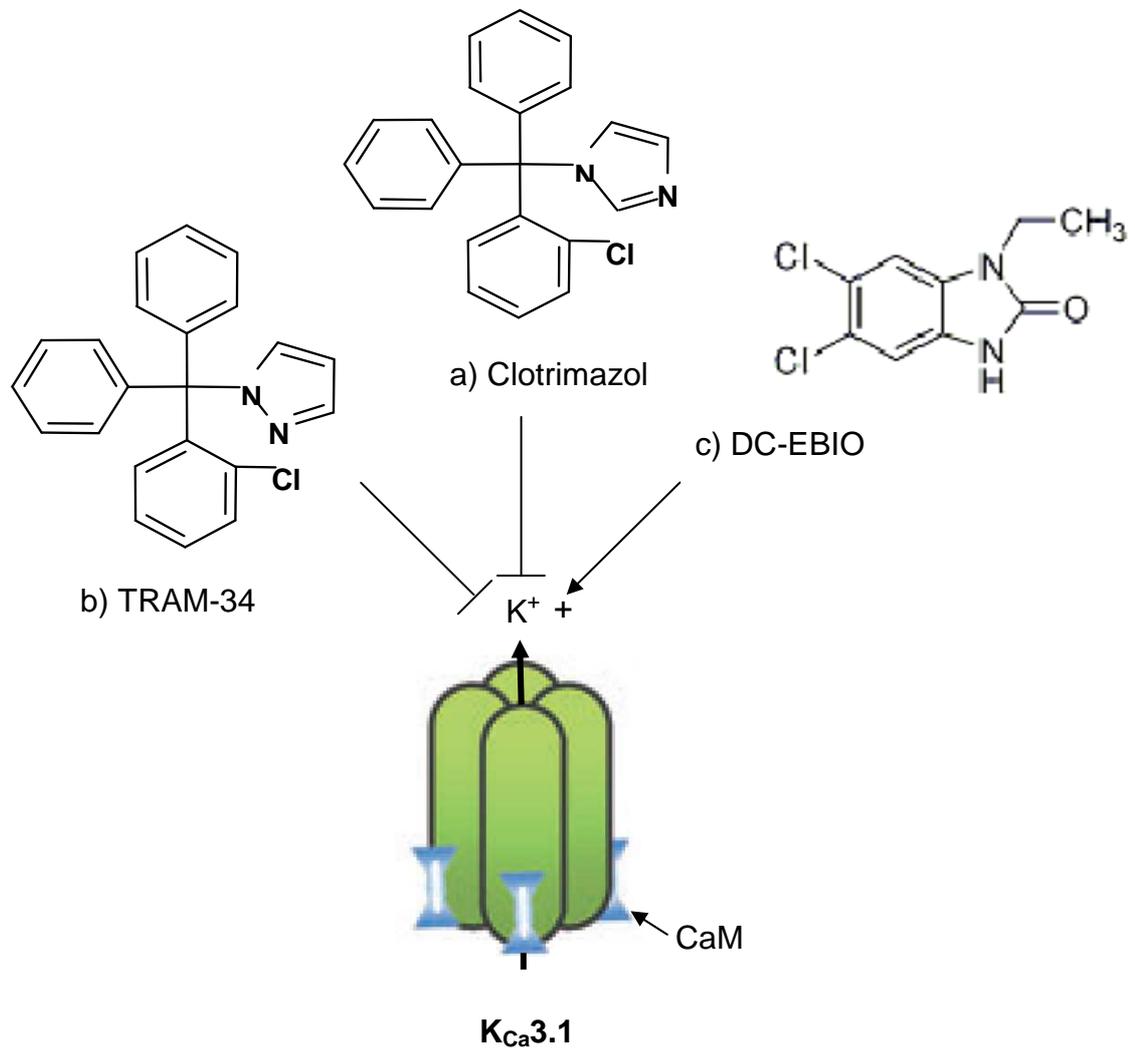
Einer der bekanntesten Inhibitoren des Gardos-Kanals ist das Antimykotikum Clotrimazol (Abb. 4a). Die antimykotische Wirkung wird über eine Hemmung des Cytochrom P-450 vermittelt, hingegen erfolgt die inhibitorische Wirkung beim Gardos-Kanal via direkter Blockade ( $\text{IC}_{50} \sim 70$  nM) (Alvarez, Montero et al. 1992; Ishii, Silvia et al. 1997; Dunn 1998). Eine ähnlich hohe Potenz wie Clotrimazol aber höhere Spezifität für  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  besitzt „TRAM-34“ (1-((2-Chlorophenyl)diphenylmethyl)-1H-pyrazol;  $\text{IC}_{50} \sim 20$  nM; Abb. 4b), wobei dieses Clotrimazol-Derivat eine deutlich geringere Affinität zu anderen  $\text{K}_{\text{Ca}}$  besitzt und keine Hemmung des Cytochrom P-450 bewirkt (Wulff, Miller et al. 2000; Wulff, Gutman et al. 2001). Weitere Inhibitoren von  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  sind das Skorpiontoxin Charybdotoxin (des Skorpions *Leiurus quinquestriatus*;  $\text{IC}_{50} \sim 5$  nM), welches ebenfalls  $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$  (BK) blockt (Kaczorowski, Knaus et al. 1996; Ishii, Silvia et al. 1997; Joiner, Wang et al. 1997), das Skorpiontoxin Maurotoxin (des Skorpions *Scorpio maurus*;  $\text{IC}_{50} \sim 1$  nM) (Visan, Fajloun et al. 2004), der  $\text{Ca}^{2+}$ -Blocker Nitrendipin (Ellory, Kirk et al. 1992), einige volatile Anaesthetika (Caldwell and Harris 1985) und Senicapoc (ICA-17043; Bis(4-

## Einleitung

---

fluorophenyl)phenyl acetamid;  $IC_{50} \sim 11$  nM), ein neuartiges Clotrimazol-Derivat, das derzeitig als Therapeutikum für die SCD evaluiert wird (s. Abschnitt 1.1.3.3) (Stocker, De Franceschi et al. 2003; Ataga, Smith et al. 2008).

Neben den bereits erwähnten Aktivatoren sind zahlreiche Substanzen bekannt, die die Öffnungswahrscheinlichkeit von  $K_{Ca3.1}$  erhöhen. Als Beispiele seien „1-EBIO“ (1-ethyl-2-benzimidazolin) (Devor, Singh et al. 1996) und „DC-EBIO“ (5,6-dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one; Abb. 4c) (Singh, Syme et al. 2001) genannt, beides etablierte  $K_{Ca3.1}$ -Öffner, die zusätzlich auch  $K_{Ca2.1-3}$  aktivieren.



**Abb. 4: Pharmakologie von  $K_{Ca3.1}$ : Block durch Clotrimazol und TRAM-34, Öffnung durch DC-EBIO**

Dargestellt ist  $K_{Ca3.1}$  mit seinen vier Untereinheiten (Homotetramer) und dem konstitutiv gebundenen Calmodulin (CaM).

Das Antimykotikum **a)** Clotrimazol und sein Derivat **b)** TRAM-34, bei dem der Imidazol-Ring durch einen Pyrazol-Ring ersetzt wurde, wirken als Antagonisten, wohingegen **c)** DC-EBIO die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht.

CaM = Calmodulin. DC-EBIO = 5,6-dichloro-1-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one. TRAM-34 = 1-((2-chlorophenyl)diphenylmethyl)-1H-pyrazol (nach (Grgic, Kaistha et al. 2009)).

## Einleitung

---

### 1.1.3.3 *Der Gardos-Kanal als pathologisches Korrelat von Krankheiten mit gestörter Volumenregulation*

Die Dehydrierung von Erythrozyten ist ein charakteristisches Kennzeichen zahlreicher hämatologischer Erkrankungen (De Franceschi, Rivera et al. 2005), einschließlich der Sichelzellerkrankung (SCD) und der hereditären Sphärozytose (HS). Im Folgenden soll beschrieben werden, welche Rolle der Gardos-Kanal in der jeweiligen Pathogenese spielt. Mit den Ausführungen wird vorrangig unterstrichen, warum der Gardos-Kanal so intensiv erforscht wird. Der eigentliche Schwerpunkt dieser Studie sind die physiologischen Eigenschaften von  $K_{Ca}3.1$  im Erythrozyten.

Im Zentrum der Pathophysiologie der **Sichelzellerkrankung** steht die Polymerisation des Hämoglobin S (HbS), die unmittelbar mit der Bildung von sichelförmigen, dehydrierten Erythrozyten assoziiert ist (Bunn 1997). Die Sichelzellbildung führt wiederum zu den bekannten Vasookklusionen bzw. zu einem gestörten Blutfluss (Hebbel 1997). Dabei ist die Polymerisationsrate vor allem von der intrazellulären HbS-Konzentration und somit also auch vom Hydratationsstatus der Zelle abhängig (Eaton and Hofrichter 1987; Mozzarelli, Hofrichter et al. 1987; Bunn 1997): Je höher die HbS-Konzentration im Erythrozyten, umso höher auch die Polymerisationsrate bzw. Sichelzellbildung (Eaton and Hofrichter 1990; Brugnara 2003).

Wie bereits erwähnt, ist die Dehydrierung der sichelförmigen Erythrozyten vor allem durch einen gesteigerten Ausstrom von  $K^+$  über zwei Signalwege bedingt (Ataga, Smith et al. 2008): zum einen über den  $K^+/Cl^-$ -Kotransporter (Brugnara, Bunn et al. 1986; Joiner, Rettig et al. 2007; Rust, Alper et al. 2007) und zum anderen über den Gardos-Kanal (Brugnara, de Franceschi et al. 1993; Stocker, De Franceschi et al. 2003; Ataga, Smith et al. 2008), worauf ich im Folgenden näher eingehen möchte.

Sowohl die HbS-Polymerisation als auch die Sichelzellbildung führen zu einem Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Murphy, Berkowitz et

## Einleitung

---

al. 1987; Rhoda, Apovo et al. 1990; Brugnara 2003). In der Folge kommt es zu einer Aktivierung des Gardos-Kanals mit einem massiven Ausstrom von  $K^+$  und Wasser, einem konsekutivem Zellschrumpfen, einer vermehrten HbS-Polymerisation (im Sinne eines positiven Feedbacks) und der Bildung von irreversibel sichelförmigen Zellen, deren Form auch bei vollständiger Oxygenierung des Blutes bestehen bleibt (Brugnara, de Franceschi et al. 1993; Brugnara 2003).

Folglich wurde der hoch-potente, selektive Gardos-Kanal-Inhibitor Senicapoc (ICA-17043) entwickelt (Stocker, De Franceschi et al. 2003). In einer Phase 2-Studie ließen sich unter dieser Therapie deutliche Anstiege der Hämoglobin-Konzentrationen und abnehmende Hämolysemarker bei Patienten mit SCD nachweisen (Ataga, Smith et al. 2008). Eine anschließend durchgeführte Phase 3-Studie wurde jedoch abgebrochen, da eine Reduktion von Sichelzellkrisen wenig wahrscheinlich war (Ataga, Smith et al. 2008). Dennoch gilt die Inhibition des Gardos-Kanals aktuell als möglicher therapeutischer Ansatz für die Behandlung der SCD (Brugnara 2003; Lew and Bookchin 2005; Ataga, Smith et al. 2008).

Erythrozyten von Patienten mit **hereditärer Sphärozytose** (HS) besitzen mehrere charakteristische Eigenschaften: eine spheroidale Form, eine verminderte Membranoberfläche, eine erhöhte osmotische Fragilität und ein vermindertes Zellvolumen (Bertles 1957; Jacob and Jandl 1964; De Franceschi, Rivera et al. 2005). Die Dehydrierung der Erythrozyten ist, ebenso wie bei der SCD, die Folge eines verminderten, intrazellulären  $K^+$ -Gehalts (De Franceschi, Rivera et al. 2005).

In einem Modellversuch der HS mit Knock-out Mäusen störten De Franceschi et al. die Expression des Proteins 4.1, welches eine wichtige Komponente des Zytoskeletts von RBC darstellt (De Franceschi, Rivera et al. 2005). Die dadurch erzeugte zytoskelettale Instabilität bedingte eine Verminderung der Membranoberfläche, eine Dehydrierung, einen verminderten  $K^+$ -Gehalt und

## Einleitung

---

eine abnormale Aktivierung des Gardos-Kanals der Erythrozyten. Eine Blockade des Gardos-Kanals in vivo bei diesen Mäusen führte zu einer Verstärkung der Anämie bzw. einer gesteigerten Hämolyse, so dass dies als Beweis für eine protektive Funktion des Gardos-Kanals bei Patienten mit HS bewertet wird (De Franceschi, Rivera et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich also eine zentrale Stellung des Gardos-Kanals in der Pathogenese sowohl bei der SCD und als auch bei der HS feststellen.

### *1.1.3.4 Die Relevanz des Gardos-Kanals für die Eryptose als Bestandteil der Sequestration von Erythrozyten*

Die Apoptose ist ein physiologischer Mechanismus zur Entfernung von potenziell schädigenden, kernhaltigen Zellen aus der Zirkulation (Green and Reed 1998). Dabei weisen apoptotische Zellen typische Kennzeichen auf: eine Kondensation des Nucleus, die Fragmentierung der DNA, eine mitochondriale Depolarisation, eine Zellvolumenabnahme und eine veränderte Verteilung der Plasmamembran-Lipide (Green and Reed 1998; Gulbins, Jekle et al. 2000; Elliott and Higgins 2003; Lang, Lang et al. 2003).

In normalen Zellen sind die Plasmamembran-Phospholipide asymmetrisch verteilt, wobei sich Phosphatidylserin (PS) vorrangig an der Innenseite der Membran befindet (Boas, Forman et al. 1998; Fadok, de Cathelineau et al. 2001). Mit der Einleitung der Apoptose wird PS vermehrt zur Außenseite der Membran mittels eines Enzyms transloziert und an der Zelloberfläche exponiert (Fadok, de Cathelineau et al. 2001), was auch als Zusammenbruch der Phosphatidylserin-Asymmetrie bezeichnet wird (Lang, Durantou et al. 2003; Akel, Wagner et al. 2007). Es dient hier Phagozyten, die entsprechende Rezeptoren besitzen, als Signal zum „Fressen“ bzw. zur Phagozytose (Fadok, Bratton et al. 2000; Fadok, de Cathelineau et al. 2001). Für die Entfernung von Erythrozyten aus der Zirkulation werden mehrere Modelle diskutiert (Mohandas and Gallagher 2008). Im Mittelpunkt stehen

## Einleitung

---

hierbei Ansätze, die ebenfalls eine Phagozytose der Erythrozyten durch Makrophagen beschreiben, was in Anlehnung an die Apoptose kernhaltiger Zellen auch als Eryptose bezeichnet wird (Lang, Lang et al. 2005). Als Erkennungssignal für die Makrophagen wird zum einen eine vermehrte Exposition von PS und zum anderen eine clusterförmige Anhäufung von Band 3/AE 1 an der Oberfläche der Zellen beobachtet, wobei die Gewichtung der einzelnen Wege noch unklar ist (Mohandas and Gallagher 2008).

Eine erhöhte PS-Exposition an der Zelloberfläche von Erythrozyten lässt sich experimentell bsp. durch oxidativen Stress, osmotischen Schock, Energieentzug und durch eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Zugabe von Ionomycin hervorrufen (Lang, Durantou et al. 2003; Lang, Kaiser et al. 2003; Lang, Lang et al. 2005). Dabei kommt es zuerst zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritt in den Erythrozyten, anschließend zu einem Zellschrumpfen mit Abnahme des  $\text{K}^+$ -Gehalts und letztlich zu einem Zusammenbruch der PS-Asymmetrie, alles Schritte, die auch bei der Apoptose kernhaltiger Zellen beobachtet werden (Lang, Durantou et al. 2003; Akel, Wagner et al. 2007). Je höher der Gehalt von PS an der Zellmembranoberfläche, umso schneller werden solche RBC aus der Zirkulation entfernt (Boas, Forman et al. 1998).

Durch in vitro Studien gibt es sowohl für die Apoptose als auch für die Eryptose beachtenswerte Hinweise, dass der Gardos-Kanal insbesondere an der Zellvolumenabnahme, aber auch an der PS-Translokation an die Zelloberfläche beteiligt sein könnte (Elliott and Higgins 2003; Lang, Kaiser et al. 2003). So konnten nach gleichzeitiger Zugabe sowohl von Ionomycin als Induktor der Eryptose als auch von Charybdotoxin als Inhibitor des Gardos-Kanals die eryptotische Volumenabnahme und auch die PS-Translokation an die Erythrozytenoberfläche inhibiert werden (Lang, Kaiser et al. 2003). Dies könnte auf eine zentrale Stellung des Gardos-Kanals für die Eryptose hindeuten. Die tatsächliche funktionelle Relevanz des Gardos-Kanals, insbesondere für die Eryptose, ist jedoch unklar, da entsprechende in vivo Studien bisher nicht durchgeführt wurden.

### 1.2 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Studie ist es, die physiologische Bedeutung des Gardos-Kanals im Erythrozyten zu ermitteln.

Frühere Studien zeigten vor allem eine hohe Relevanz von  $K_{Ca}3.1$  für Erkrankungen mit gestörter erythrozytärer Volumenregulation, wie für die Sichelzellerkrankung und die hereditäre Sphärozytose (Brugnara 2003; De Franceschi, Rivera et al. 2005). In Bezug auf die physiologischen Aufgaben des Gardos-Kanals im Erythrozyten ist jedoch nur wenig bekannt.

Spezifische Ziele dieser Studie:

Es soll ermittelt werden, welche physiologischen Folgen eine genetische Störung von  $K_{Ca}3.1$ -Genen in Mäusen (Si, Heyken et al. 2006) hat. Insbesondere ist die Ursache für die beobachtete Splenomegalie zu eruieren.

Im Einzelnen ist zu untersuchen:

- 1) ab welchem Lebensalter der  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäuse die Splenomegalie signifikant nachweisbar ist, ob eine Progression der Organomegalie stattfindet und ob eine Geschlechtspräferenz zu ermitteln ist.
- 2) Weiterhin ist zu bestimmen, ob sich strukturelle Veränderungen in der Architektur der Milz und im hämatologischen System insgesamt nachweisen lassen. Hierfür sind histologische, immunhistologische und transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen der Milz, sowie histologische Untersuchungen der Leber und des Knochenmarks durchzuführen.
- 3) Bei der Untersuchung des hämatologischen Systems ist weiterhin zu ermitteln, ob es zu Veränderungen der Erythrozytenzahlen und –indizes als Hinweis auf eine Hämolyse oder eine gesteigerte bzw. gestörte Hämatopoese kommt. Ferner sind das Differentialblutbild, die Thrombozytenzahlen, sowie Hämolyse- und Entzündungsparameter in der klinischen Chemie zu analysieren.

## Einleitung

---

- 4) Auf funktioneller Ebene ist zu bestimmen, ob die Erythrozyten der  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäuse eine erhöhte osmotische Fragilität bzw. eine gestörte Volumenregulation aufweisen und
- 5) ob sich Veränderungen bei der Deformierbarkeit (bei der Adaption an hohe Scherkräfte in großen Gefäßen) und bei der Filtrierbarkeit (bei der Passage durch enge Kapillaren und Milzschlitze) zeigen.
- 6) Ferner soll untersucht werden, welche Konsequenzen ein genetisches Defizit von  $K_{Ca}3.1$  für die Signale der Eryptose hat. Dabei ist die Phosphatidylserin-Translokation an die Oberfläche der Erythrozyten zu betrachten.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien waren:

- A23187, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor
- Bumetanid, zur Inhibition des  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransportes
- Dimethylsulfoxid (DMSO), ein Vehikel
- Ouabain, zur Inhibition der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase
- Proteinase K, ein Verdauungsenzym
- Sulfamat, als Ersatz für  $\text{Cl}^-$  und zur Inhibition des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporters
- Taq Polymerase, für die PCR (bezogen über Invitrogen)
- TRAM-34 (1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazol), ein selektiver Gardos-Kanal-Inhibitor

Alle oben angegebenen Chemikalien sowie alle herkömmlichen Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Sigma, Taufkirchen, Deutschland, bezogen.

### 2.2 Mäuse und Genotypisierung

Die für diese Studie notwendige Generierung einer  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}$ -Maus wurde bereits im Rahmen anderer Untersuchungen durch ein Mitglied der Arbeitsgruppe durchgeführt und evaluiert (Si, Heyken et al. 2006). Diese Knock-out Maus wurde mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.1 Mäuse

Die verwendeten Mäuse hatten einen gemischten Hintergrund (129Sv/C57B1/6) und wurden sämtlich im Kleintierstall des Biomedizinischen Forschungszentrums der Universität Marburg, Deutschland, gehalten. Jeweils maximal sechs Tiere wurden pro Käfig in einem klimatisierten Raum

## Material und Methoden

---

( $22 \pm 2$  °C) mit einem zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus untergebracht. Weiterhin konnten die Tiere frei trinken und erhielten unbegrenzt Standardfutter (SNIFF-Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland).

Für die Untersuchungen wurden  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  (Si, Heyken et al. 2006) und  $K_{Ca3.1}^{+/+}$  gezüchtet, wobei für die Studie ausschließlich homozygote Mutanten ( $K_{Ca3.1}^{-/-}$ ) und dazugehörige Wildtyp-Wurfgeschwister ( $K_{Ca3.1}^{+/+}$ ) mit einem Alter von einem Tag bis zu einem Jahr verwendet wurden.

### 2.2.2 Genotypisierung

Schwanzbiopsien (3-5 mm) wurden in ein 1,5 ml Eppendorf®-Röhrchen gefüllt und 100 µl eines Verdauungspuffers hinzugegeben. Der Verdauungspuffer beinhaltete folgende Substanzen: 100 mmol/L Tris/HCl, 5 mmol/L EDTA (pH 8,0), 0,2 % SDS, 200 mmol/L NaCl und 1 mg/ml Proteinase K.

Anschließend wurden die Proben unter permanentem Schütteln für ca. 12 Stunden bei 55 °C im Wasserbad inkubiert, zuletzt für 10 min. bei 95 °C erhitzt (zum Denaturieren der Proteinase K) und abschließend 500 µl destilliertes Wasser zum Lösen der DNA hinzugegeben.

Für die routinemäßige Genotypisierung per PCR wurden die Primer Kc4, Exon4rev und neorev verwendet, wobei beim Wildtyp-Gen von  $K_{Ca3.1}$  ein Genprodukt von 160 Basenpaaren (bp) und bei  $K_{Ca3.1}^{-/-}$  ein Genprodukt von 320 bp amplifiziert wurde (Si, Heyken et al. 2006).

Zu 2,5 µl des Schwanzlysates wurden 22,5 µl einer Amplifikationsmischung hinzugefügt, die sich folgendermaßen zusammensetzte: 1,75 mmol/L  $MgCl_2$ , 400 µmol/L dNTP, 0,4 µmol/L von jedem der drei Primer und 1,25 U Taq Polymerase (Invitrogen).

## Material und Methoden

---

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (ABI system, USA) mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

**Tabelle 1: Temperaturprofil für die PCR-Genotypisierung**

Schritt	Zeit und Temperatur
1. Denaturierungsschritt	3 min. bei 94 °C
2. 10 Zyklen	35 sec. bei 94 °C, 35 sec. bei 58 °C und 50 sec. bei 58 °C
3. 25 Zyklen	35 sec. bei 94 °C, 35 sec. bei 58 °C und 50 sec. bei 58 °C mit einer fünfsekündigen Verlängerung in jedem Zyklus
4. Finaler Extensionsschritt	10 min. 72 °C

Das Reaktionsprodukt wurde schließlich auf einem einprozentigen Agarose-Gel analysiert.

Die Zucht der K<sub>Ca</sub>3.1-Mäuse wurde durch die zuständigen Behörden in Gießen bewilligt.

### 2.3 Blutanalysen

Zum Gewinnen von Vollblut wurden die Mäuse mittels Isofluran anästhesiert und anschließend das Herz punktiert, wodurch sich eine Blutmenge von 0,7-1 ml gewinnen ließ. Zur Gerinnungshemmung wurden den Proben entweder 40 U/ml Heparin oder eine 3,8-prozentige Natriumcitratlösung hinzugefügt. Die Natriumcitrat-Lösung setzte sich wie folgt zusammen [mmol/L]: 38 Citrat, 75 Trisodium Citrat und 100 D-Glucose.

Für die Bestimmung der Erythrozytenzahlen und -indizes, sowie der Serumspiegel der Laktatdehydrogenase (LDH), des Gesamtbilirubins und

## Material und Methoden

---

des C-reaktiven Proteins (CRP) wurde ein XT-2100 Analyser (Sysmex Europe, Norderstedt, Deutschland) verwendet.

Diese Bestimmungen wurden als Auftragsarbeit durch Frau Dr. Stief am Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH/Abteilung Hämatologie und Klinische Chemie durchgeführt.

### **2.4 Histologie, Immunhistologie und Transmissions-Elektronenmikroskopie**

Die Gewebeuntersuchungen in dieser Studie wurden in enger Kooperation mit Prof. Dr. H.-P. Elsässer, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, Deutschland, und mit Dr. Kernt Köhler, Institut für Veterinär-Pathologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland, durchgeführt.

Zur histologischen Untersuchung wurden die einzelnen Organe direkt nach dem Töten der Mäuse in eine zehnpromtente Formalin-Lösung gegeben und nach der Fixation in Paraffin eingebettet.

Die Milzen wurden anschließend mit einer Schichtdicke von 7 µm geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) als Standardfärbung oder mit Berlinerblau zur Detektion von Eisen gefärbt. Die Auswertung der Eisenfärbungen erfolgte mit dem Programm Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), wobei die Menge von abgelagerten Eisen-Partikeln pro Schnittfläche berechnet wurde.

### 2.5 Osmotische Toleranz

#### 2.5.1 Prinzip der Methode

Bei der Durchquerung einer hyper- bzw. hypoosmotischen Umgebung müssen Erythrozyten ihr Zellvolumen den veränderten Umgebungsbedingungen anpassen, um nicht zu hämolysieren. Dies ist bsp. bei der Durchquerung des hyperosmotischen Nierenmarks besonders notwendig (Begenisich, Nakamoto et al. 2004). Die osmotische Toleranz und die Volumenregulation sind also unmittelbar miteinander verknüpft.

Die osmotische Toleranz lässt sich experimentell durch die Gabe von RBC in Lösungen mit abnehmender Tonizität bzw. Osmolalität bestimmen (Khanna, Chang et al. 2002; Begenisich, Nakamoto et al. 2004). Mit zunehmendem hypotonem Stress steigt auch die Rate der lysierten Erythrozyten.

#### 2.5.2 Durchführung der Experimente

Um die Erythrozyten von den restlichen Blutbestandteilen zu trennen, wurde die mittels Heparin antikoagulierte Blutprobe in zwei Schritten aufgearbeitet:

1. Zentrifugation (1500 rpm, 10 min.) und Entfernen des Blutplasmas und der Leukozytenschicht („buffy coat“)
2. Waschen der RBC mit gepufferter Kochsalzlösung (BSS, buffered saline solution), bestehend aus [mmol/L]: 171 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 Glucose und 10 HEPES, pH = 7,4 (adjustiert mit NaOH).

Jeweils 20 µl-Aliquots der Blutproben wurden anschließend für 30 min. in 1 ml BSS mit unterschiedlichen Mengen von NaCl (0-171 mmol/L), entsprechend 34-376 mosmol/L, in einem 1,5 ml Eppendorf®-Röhrchen inkubiert.

In weiteren Versuchsansätzen wurden den Lösungen Bumetanid (zur Inhibition des Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>-Kotransportes; (Pewitt, Hedge et al. 1990)), Ouabain (zur Inhibition der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase; (Contreras, Flores-Beni Tez et

## Material und Methoden

---

al. 2006)) und Sulfamat (als Ersatz für  $\text{Cl}^-$  und zur Inhibition des  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  Kotransporters; (Armsby, Brugnara et al. 1995)) hinzugefügt bzw.  $\text{K}^+$  in der BSS zum Block des Gardos-Kanals weggelassen (s. Abschnitt 1.1.3.2; (Joiner, Wang et al. 1997)).

Nach der Zentrifugation (1500 rpm, 5 min.) der Proben wurde die Absorption von Hämoglobin bei 415 nm photometrisch bestimmt. Die Absorptionswerte bei der geringsten Tonizität (34 mosmol/L) wurden als hundertprozentige Lyse definiert.

Alle Experimente zur osmotischen Toleranz wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei jede Blutprobe zweifach untersucht wurde. Der Untersucher war sowohl bei der Durchführung als auch bei der Auswertung der Experimente verblindet.

### 2.6 Deformierbarkeit

Die Deformierbarkeit von Erythrozyten wird durch ihre Fähigkeit definiert, mit einer Formänderung auf applizierte Kräfte zu reagieren (Ruef, Pöschl et al. 1996). In vivo müssen sich RBC hauptsächlich auf zwei Ebenen deformieren: Zum einen bei der Adaption hoher Scherkräfte in großen Gefäßen mit schnellem Fluss und zum anderen bei der Passage durch enge Kapillaren und Milzschlitze (Ruef, Pöschl et al. 1996).

Zwei unterschiedliche Methoden wurden daher verwendet, um die Anforderungen an Erythrozyten sowohl in großen Gefäßen als auch in der Mikrozirkulation zu simulieren: zum einen das Rheodyn Shear Stress Diffractometer (SSD) (Myrenne GmbH, Roetgen, Deutschland) (Ruef, Pöschl et al. 1995; Ruef, Pöschl et al. 1996; Poschl, Leray et al. 2003) zur Simulation des Flusses in großen Gefäßen und zum anderen die vertikale Rohrmethode (vertical tube method), bei der Erythrozyten durch 3-5 µm große Poren filtriert werden. Beide Methoden gelten als etablierte Standardverfahren, um die Deformierbarkeit von Erythrozyten zu bestimmen (Stuart 1985; Khanna, Chang et al. 2002).

#### 2.6.1 Deformierbarkeit bei Einwirken von Scherkräften

##### 2.6.1.1 *Prinzip der Methode*

Beim **Rheodyn SSD** handelt es sich um ein PC-gesteuertes, automatisiertes Laborinstrument, das mittels eines Lasers die Elongation (E) eines Erythrozyten bei Applikation von tangentialen Scherkräften misst. Es gilt als ein verlässliches und sensibles Verfahren, um das Ausmaß einer Deformierung in Abhängigkeit von der eingesetzten Scherkraft in kleinen Blutproben zu bestimmen (Ruef, Pöschl et al. 1995).

Mit zunehmender Scherkraft gehen die Erythrozyten vermehrt von ihrer zirkulären, bikonkaven in eine elliptische, stromlinienartige Form über. Bei

## Material und Methoden

---

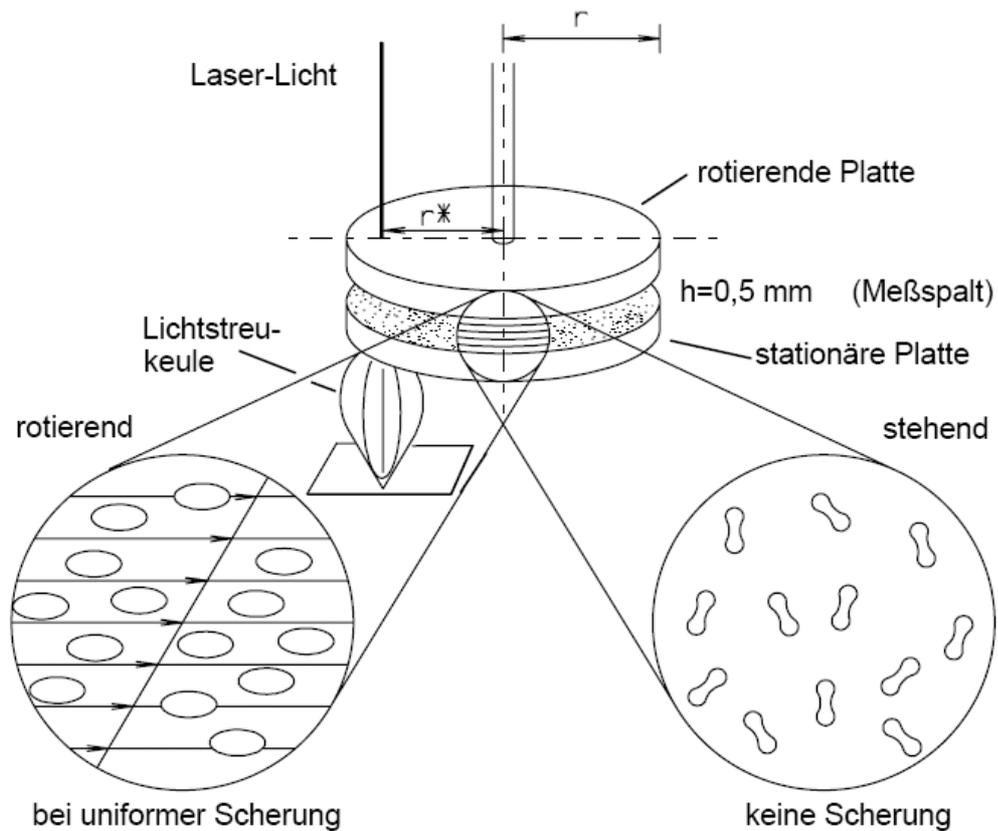
dieser strömungsinduzierten Extension der Erythrozyten rotiert die Membran um das flüssige Zytosol, die Membran wird also ständig dynamisch deformiert (Stuart and Nash 1990). Je nach Form des Erythrozyten (Strömungsform, ruhende Form) ergibt sich ein bestimmtes Beugemuster des Laserstrahls.

Durch Erfassen der Länge (L) und der Breite (B) des Erythrozyten lässt sich nun die Elongation (E) berechnen:

$$E = \frac{L - B}{L + B}$$

Die prozentuale Elongation ist definiert als  $E (\%) = 100 * E$ .

Das Kernstück des Rheodyn SSD bildet die Messkammer (Abb. 5), bestehend aus einer festen und einer rotierenden Glasscheibe von jeweils 60 mm Durchmesser. Zwischen die beiden Scheiben, die 0,5 mm voneinander getrennt sind, wird die Blutprobe gegeben. Die Höhe der Scherkraft wird zum einen durch die Rotationsgeschwindigkeit der Scheibe und zum anderen durch die Viskosität der Flüssigkeit in der Messkammer bestimmt. Die in den Versuchen eingesetzte hochviskose Dextran-Lösung (Myrenne GmbH, Roetgen, Deutschland, s. u.) besaß eine Viskosität von 24 mPa\*s und eine Osmolalität von 300 mosmol/L. Die applizierten Scherkräfte lagen zwischen 0,3 und 60 Pa.



**Abb. 5: Aufbau der Messkammer des Rheodyn SSD**

Das Laser-Licht durchtritt nacheinander die rotierende Glasplatte, die visköse Probe mit den Erythrozyten und die stationäre Platte und wird zuletzt mit einem speziellen Sensor-Kopf (nicht gezeigt) wieder erfasst. Abhängig von der Form der Zelle entsteht hierbei ein spezifisches Beugemuster, das die Form der sog. Lichtstreu-keule bestimmt und wodurch sich die Elongation des Erythrozyten berechnen lässt. In den Kreisen: Einblick auf die Erythrozyten in der Messkammer bei rotierender Platte (links) und stehender Platte (rechts). Im ruhenden Zustand (rechts) bleibt die bikonkave Form bestehen. Mit Einwirken von Scherkräften (links) gehen die RBC in die stromlinienartige Form über (Aus Rheodyn SSD Bedienungs- und Servicehandbuch).

### 2.6.1.2 Durchführung der Experimente

Die Experimente wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Ruef, Pöschl et al. 1995). Dabei wurden jeweils 30  $\mu\text{l}$  mittels Heparin antikoaguliertes Vollblut in 2 ml Dextran-Lösung gegeben und für 15 min. bei leichtgradigem Schütteln auf dem Polymax 1040 (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland) vermischt. Im Einzelnen beinhaltete die

## Material und Methoden

---

Dextran-Lösung: 60000 g/mol Dextran, 154 mmol/L NaCl, 5,6 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7,4). In weiteren Versuchsansätzen wurde dem Ansatz zusätzlich 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 µmol/L des selektiven Gardos-Kanal-Blockers TRAM-34 (Wulff, Miller et al. 2000) von einer 100 µmol/L Stocklösung oder 1 µmol/L des TRAM-34-Vehikels Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kontrolle hinzugefügt.

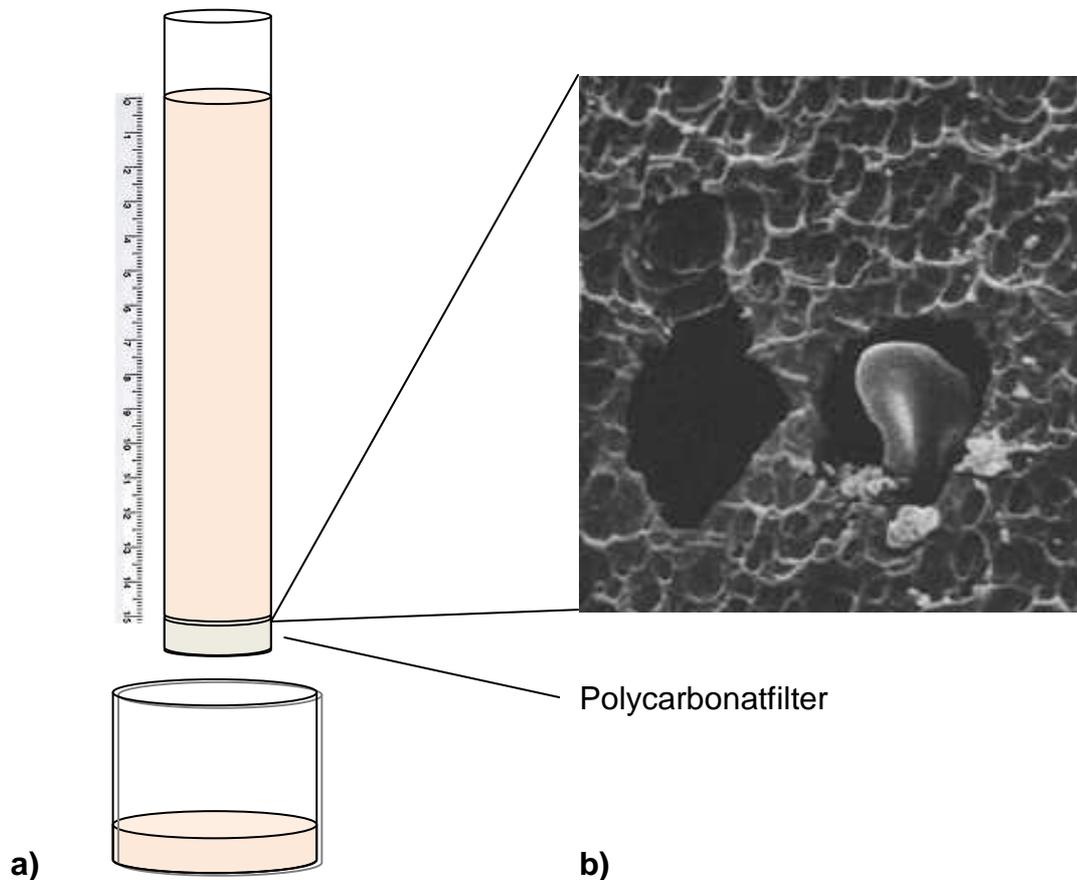
Abschließend wurden 1,75 ml dieser Probe in die Messkammer des Rheodyn SSD gegeben und die automatische Messung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der mitgelieferten Rheodyn SSD V2.34 Software (Myrenne GmbH, Roetgen, Deutschland).

### 2.6.2 Deformierbarkeit als Ausdruck der Fitrabilität

Die Filtration von Erythrozyten durch Polycarbonatfilter mit einem Porendurchmesser von 3-5 µm ist eine sehr populäre Methode, um die Deformierbarkeit zu bestimmen (Stuart and Nash 1990).

#### 2.6.2.1 *Prinzip der Methode*

Bei der vertikalen Rohrmethode (Nakamura, Hasegawa et al. 1994; Khanna, Chang et al. 2002) wird durch die Erdanziehungskraft ein hydrostatischer Druck auf eine Erythrozytensuspension ausgeübt, die hierdurch durch ein Netz mit einer definierten Porengröße filtriert wird (Abb. 6). Hierdurch lässt sich die Filtrationsrate als Funktion des hydrostatischen Drucks bestimmen.



**Abb. 6: Vertikale Rohrmethode (vertical tube method)**

**a)** Dargestellt ist ein vertikales Rohr, an dessen unterem Ende ein Polycarbonatfilter befestigt ist. In das Rohr wird die Erythrozytensuspension (0,1 % Hämatokrit) gegeben, so dass die Höhe der Flüssigkeitssäule 15 cm beträgt. Das Filtrat wird schließlich in einem Gefäß aufgefangen.

**b)** Rasterelektronische Aufnahme eines 5 µm Polycarbonatfilters. Man sieht einen sphärisch verformten Erythrozyten beim Durchtritt durch eine Pore. Vergrößerung 2000 x (nach (Heilmann and Schmid-Schonbein 1981)).

### 2.6.2.2 Durchführung der Experimente

Die Blutprobe wurde, wie bereits beschrieben, per Herzpunktion gewonnen und mittels Citrat-Lösung antikoaguliert. Zum Trennen der Erythrozyten von den restlichen Bestandteilen des Blutes wurde die Blutprobe zentrifugiert (800 rpm, 10 min.) und anschließend das Plasma und der Leukozytenfilm

## Material und Methoden

---

entfernt. In einem ersten Schritt wurde die Probe mittels einer phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (PBS, phosphate buffered saline) auf einen Hämatokrit von 0,5 (L/L) adjustiert und schließlich 1:500 mit PBS verdünnt. PBS setzte sich wie folgt zusammen [mmol/L]: 137 NaCl, 4,5 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,5 KCl, 1,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 MgCl<sub>2</sub>, 0,7 CaCl<sub>2</sub> und 10 Glucose, pH = 7,4 (adjustiert mit NaOH).

Anschließend wurde die Erythrozytensuspension in das vertikale Rohr gegeben, wobei die Filtration bei einem Druck von 15 cm H<sub>2</sub>O initiiert wurde. Die Höhe der Wassersäule wurde in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt, sodass eine Druck-Zeit-Kurve erstellt werden konnte. Bei nahezu linearem Fluss wurde eine Filtrationsrate (ml/min) berechnet. Als Filter wurden Netze mit 3 und 5 µm Porengröße (Millicell, Millipore, Billerica, MA, USA) verwendet.

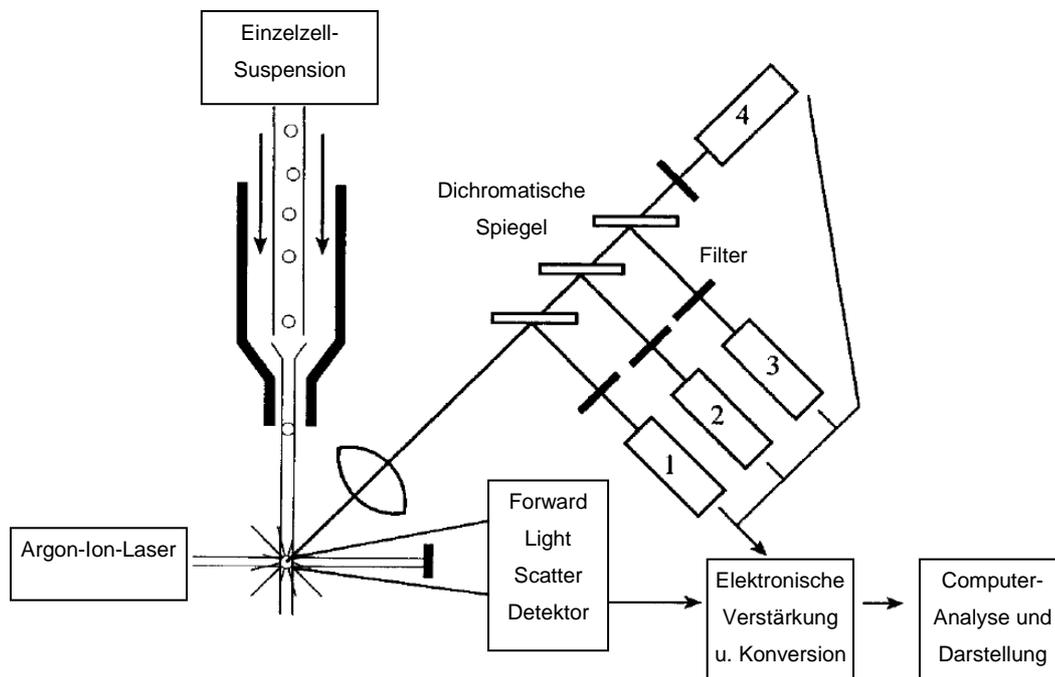
Alle Experimente zur Deformierbarkeit wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei jede Blutprobe dreifach untersucht wurde. Der Untersucher war sowohl bei der Durchführung als auch bei der Auswertung der Experimente verblindet.

### 2.7 Durchflusszytometrie

#### 2.7.1 Prinzip der Methode

Die Durchflusszytometrie erlaubt die schnelle Analyse von multiplen Eigenschaften einer einzigen Zelle. Die Eigenschaften, die hierbei bestimmt werden können, sind die Zellgröße (repräsentiert durch den forward scatter), die zytoplasmatische Komplexität, die Zellgranulierung (repräsentiert durch den side scatter), der DNA- oder RNA-Gehalt und eine große Anzahl von membrangebundenen oder intrazellulären Proteinen (Brown and Wittwer 2000). Um eine einzelne Zelle zu einer Zellpopulation zuordnen zu können, werden sowohl optische als auch fluoreszierende Eigenschaften dieser Zelle bestimmt. Durch den zusätzlichen Einsatz von Fluoreszenzfärbungen mit konjugierten Antikörpern lassen sich Proteine der Zellmembran oder des Zytoplasmas selektiv nachweisen (Brown and Wittwer 2000).

Beim Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorting, FACS, Abb. 7) werden die Zellen in einem laminarem Strom, umgeben von isotonischer Flüssigkeit, zu einer Lichtquelle (in der Regel ein Laser) transportiert, so dass die Zellen einzeln am Untersuchungspunkt vorbei fließen. Durch den Laser werden die Fluoreszenz-Moleküle angeregt, wobei sie beim Rückgang in den Ruhezustand Licht einer definierten Wellenlänge emittieren. Dieses in allen Richtungen emittierte Streulicht wird durch bestimmte Filter und Spiegel zu Photomultiplizierern geleitet, digitalisiert, analysiert und schließlich in der Regel als Histogramm oder zweidimensionales Dot-Plot-Format dargestellt (Brown and Wittwer 2000).



**Abb. 7: Schema eines Durchflusszytometers**

Die Zellen einer Suspension werden durch eine Kapillare so fokussiert, dass sie einzeln einen Argon-Ion-Laser passieren. Das von den einzelnen Zellen emittierte Licht wird von unterschiedlichen optischen Systemen gesammelt:

Ein forward angle light scatter-Detektor erfasst Licht, das durch die Zelle parallel zum Laserstrahl gebeugt wird. Es repräsentiert dadurch die Größe der Zelle.

Die Signale werden weiterhin durch einen side-scatter-Detektor (1) und multiple Fluoreszenz-Detektoren (2-4) gesammelt. Diese bestehen aus dichromatischen Spiegeln und Filtern in unterschiedlichen Ebenen und messen die Fluoreszenzimpulse der Zelle, welche zusätzlich durch spezielle Färbungen hervorgerufen werden können (nach (Brown and Wittwer 2000)).

### 2.7.2 Aufbereitung der Erythrozytenproben

Nach der Blutentnahme und der Antikoagulation per Heparin (40 U/L) wurden die Proben zentrifugiert (1500 rpm, 10 min.) und das Plasma und die Leukozytenschicht entfernt.

Anschließend wurden die Proben mit einer Kochsalz-Lösung (s.u.) gewaschen und auf eine Konzentration von 1.000.000 Erythrozyten/ $\mu$ l

## Material und Methoden

---

verdünnt. Diese Erythrozyten-Lösung diente als Stocklösung für die folgenden Versuche, bei der jeweils 50 µl mit einem Reagenz für eine bestimmte Zeitdauer inkubiert wurden.

**Tabelle 2: Inkubationszeiten der Erythrozyten in den verschiedenen Lösungen**

Lösung	Inkubationszeit
• Ringer-Lösung	Keine
• Ringer-Lösung mit je 1 µmol/L A23187, A23187 + TRAM-34 oder DMSO (Vehikel)	60 min.
• Sucrose-Lösung	24 h

Bei den Stressuntersuchungen mit Sucrose-Lösung (776 mosmol/L, s.u.) dienten Ringer-Lösungen (s.u.) als Kontrolle. Alle Experimente wurden zur Doppelbestimmung zweimal angesetzt. Die Inkubation erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37 °C. Anschließend konnten die Zellen mit Annexin-V gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert werden.

### 2.7.3 Annexin-V Färbung

Annexin-V bindet spezifisch an das Membranlipid Phosphatidylserin (PS, s. Abschnitt 1.1.3.4) und wird somit als Marker für apoptotische Zellen eingesetzt (Vermes, Haanen et al. 2000). Zur Detektion im Durchflusszytometer wurde Annexin-V-Fluos (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet, bei dem das Protein um den fluoreszierenden Molekülrest Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ergänzt wurde.

Vor der Färbung wurden die Erythrozyten in einem ersten Schritt gewaschen. Dazu wurden je 500 µl in ein spezielles 5 ml FACS-Röhrchen (Becton-

## Material und Methoden

---

Dickinson, Heidelberg, Deutschland) überführt, mit PBS (s.u.) 1:10 verdünnt und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min.). Der Überstand wurde durch Ausschütteln verworfen, so dass nur die Erythrozyten am Boden als Pellet zurückblieben. Diesem Zellpellet wurden nun entweder 100 µl des Annexin-V-Fluos (vorher 1:100 verdünnt) oder 100 µl PBS als Kontrolle hinzugefügt. Die Probe wurde für 15 min. auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Abschließend wurde dem Ansatz je 300 µl PBS hinzugefügt und die Analyse im Durchflusszytometer (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) unmittelbar durchgeführt.

### 2.7.4 Analyse im Durchflusszytometer

Um ein optimales Fluoreszieren von FITC zu ermöglichen, wurde eine Excitationswellenlänge des Argon-Ion-Lasers von 488 nm gewählt. Jeweils 10.000 Zellen wurden pro Ansatz durchflusszytometrisch analysiert und anschließend mit der CellQuest-Software (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Die Zellen wurden als Annexin-V positiv betrachtet, wenn sie sich in einem bestimmten Bereich des Dot-Plots bzw. des Histogramms allein bei den gefärbten Zellen darstellten.

## Material und Methoden

---

### 2.7.5 Verwendete Lösungen und Chemikalien

Für die Versuche im Durchflusszytometer wurden folgende **Lösungen** verwendet:

**Tabelle 3: Inkubations- und Waschlösungen für die Durchflusszytometrie (Konzentrationen in mmol/L, pH = 7,4, adjustiert mit NaOH)**

Substanz	Kochsalz- Waschlösung	Ringer-Lösung	Sucrose- Lösung	PBS-Lösung
NaCl	171	125	125	137
KCl		5	5	3,5
MgSO <sub>4</sub>		1	1	0,4
CaCl <sub>2</sub>	2	1	1	0,7
HEPES		32	32	
Glucose		5	5	10
Sucrose			400	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>				4,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				1,5

#### **Ferner wurden folgende Chemikalien verwendet:**

Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Vehikel für TRAM-34 (1-((2-chlorophenyl)diphenylmethyl)-1H-pyrazol), einen selektiven Gardos-Kanal-Blocker (Wulff, Miller et al. 2000), und für A23187, ein Calcium-Ionophor, das den kanalunabhängigen Transport von Ca<sup>2+</sup> in die Zelle ermöglicht (Maher and Kuchel 2003).

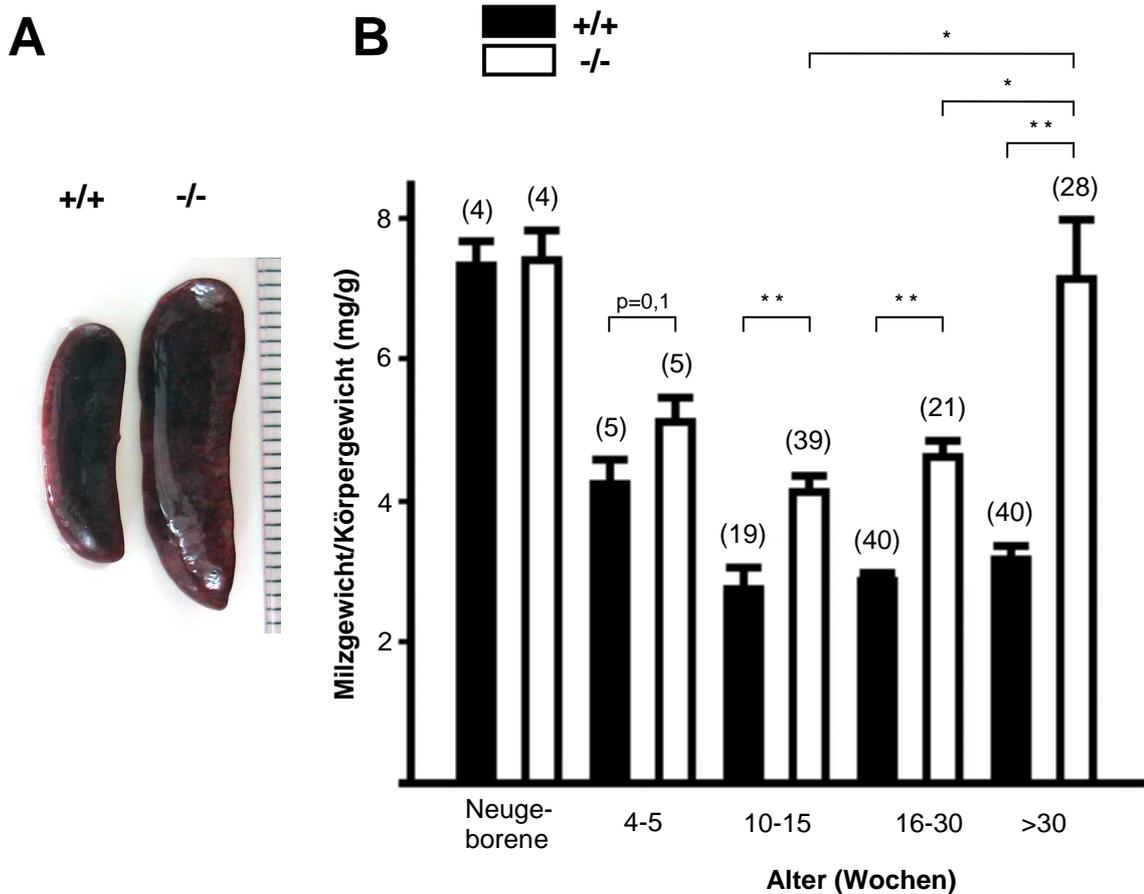
### 2.8 Statistikangaben

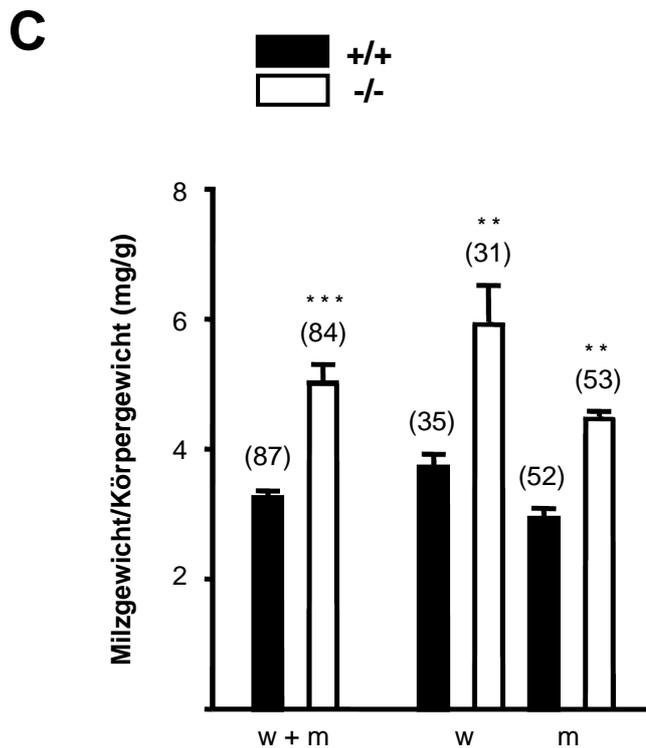
Die Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die statistische Vergleichsanalyse der Versuchsgruppen erfolgte mit dem ungepaarten t-test mit Hilfe der Programme Origin und Excel. Die Zahl n bezieht sich dabei auf die Anzahl voneinander unabhängiger Experimente. Unterschiede wurden bei  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Progressive Splenomegalie bei $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -defizienten Mäusen

$K_{Ca}3.1^{-/-}$ -defiziente Mäuse entwickeln im Gegensatz zu Wildtyp-Wurfgeschwistern einen veränderten Phänotyp: Sie zeigen eine kontinuierlich progressive Splenomegalie (Abb. 8a). Dies stellt die wichtigste anatomische bzw. hämatologische Veränderung des Erscheinungsbildes der  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäuse dar und war gleichzeitig Ausgangspunkt für alle folgenden Untersuchungen in dieser Studie. Die Splenomegalie ist nach ca. 10 Wochen statistisch signifikant nachweisbar, nimmt mit steigendem Lebensalter weiter zu (Abb. 8b) und ist unabhängig vom Geschlecht (Abb. 8c).





**Abb. 8: Progressive Splenomegalie bei  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -defizienten Mäusen**

a) Repräsentative Fotografien der Milzen von 30 Wochen alten Wildtyp (+/+)- und  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen, zusammen mit einem Millimetermaß.

b) Die Splenomegalie bei  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen ist ab einem Alter von ca. 10 Wochen statistisch signifikant nachweisbar und nimmt mit dem Lebensalter weiter zu. Das Milzgewicht ist als Anteil am Gesamtkörpergewicht angegeben. Bei Neugeborenen und jungen Tieren hat die Milz physiologisch einen höheren Anteil am Körpergewicht als bei älteren Mäusen.

c) Bei der geschlechtsspezifischen, quantitativen Analyse ergibt sich keine Präferenz. Die Splenomegalie tritt also geschlechtsunabhängig auf.

Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe an. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , Student t-test.

Um die Ursache der Splenomegalie zu bestimmen, führten wir zuallererst histologische Untersuchungen der Milzen, des Knochenmarks, sowie ergänzend auch zahlreicher weiterer Organe (nicht gezeigt) durch.

In den Milzschnitten der  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäuse stellte sich die weiße Pulpa (WP) unauffällig dar (Abb. 9d). Auch war das Verhältnis von roter zu weißer Pulpa

## Ergebnisse

---

unverändert. Weiterhin fanden sich weder Zeichen für eine chronische Entzündung, Neoplasien oder Hämorrhagien in der Milz, noch Zeichen für eine Fibrose, Zirrhose oder einen Portalvenenverschluss in der Leber (nicht gezeigt).

Unterschiede zwischen  $K_{Ca}3.1^{+/+}$ - und  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen waren vor allem in den Eisenfärbungen zu erkennen (Abb. 9a). Hierbei waren siebenfach höhere Mengen von Eisenablagerungen in der roten Pulpa bei zwei bis drei Monate alten  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern nachweisbar. Interessanterweise war der Anteil von eisenspeichernden Makrophagen gleich, wobei jedoch die Höhe des Eisengehaltes in den einzelnen Makrophagen bei  $K_{Ca}3.1$ -Defizienz gesteigert war (Abb. 9b, c).

Des Weiteren ließ sich feststellen, dass die Zellularität sowohl im Knochenmark als auch in den Milzen unverändert war. Insbesondere fanden sich keine Hinweise für eine gesteigerte Hämatopoese (Abb. 9d) oder für eine extramedulläre Blutbildung in Form von Megakaryoblasten.

Zusammengefasst ließ sich also durch die histologischen Untersuchungen eine erhöhte Eisenablagerung bei unauffälliger Milzarchitektur und unveränderter Zellularität des Knochenmarks bei  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Defizienz nachweisen.

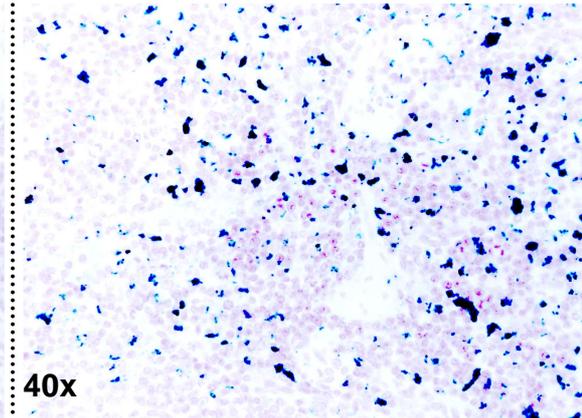
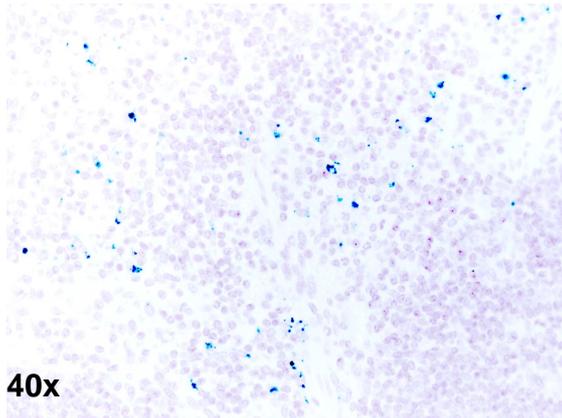
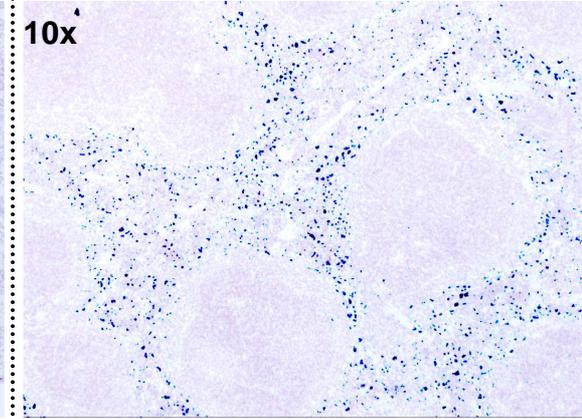
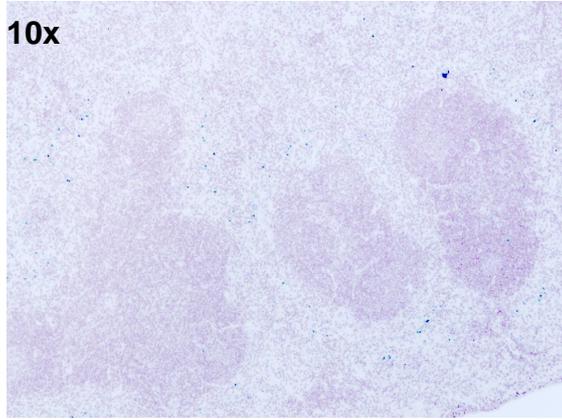
# Ergebnisse

---

**A**

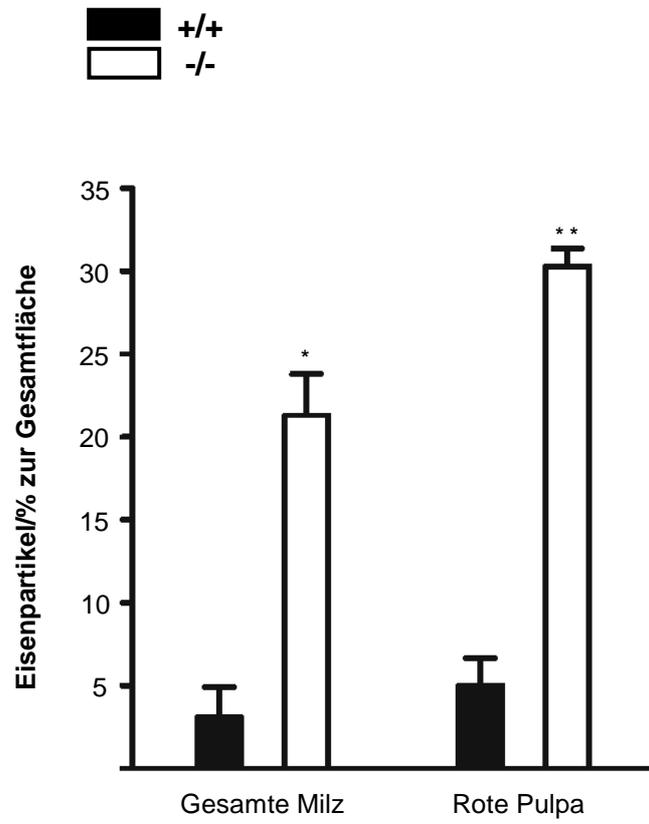
$K_{Ca3.1}^{+/+}$

$K_{Ca3.1}^{-/-}$

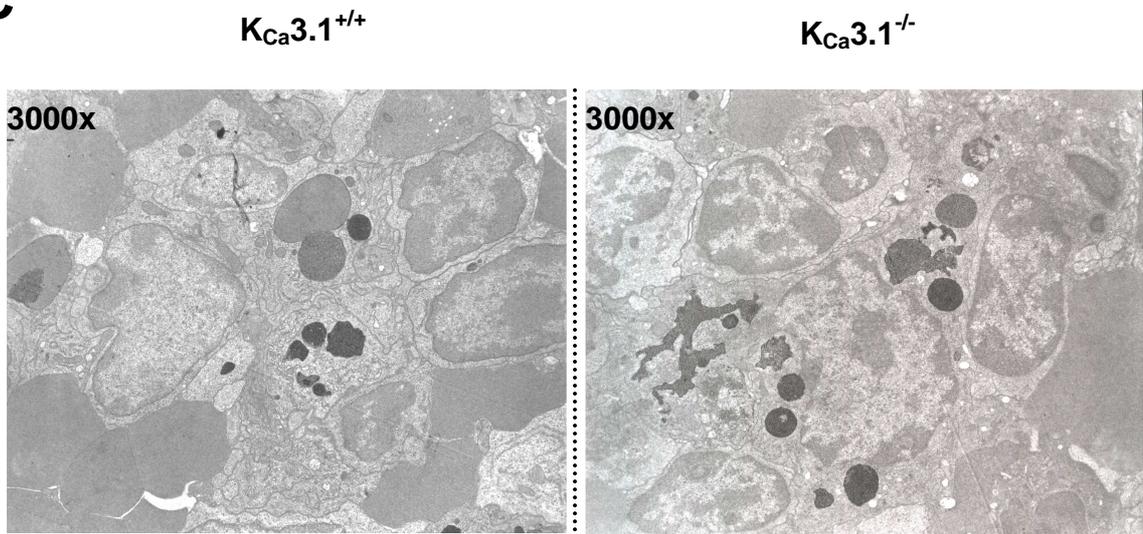


# Ergebnisse

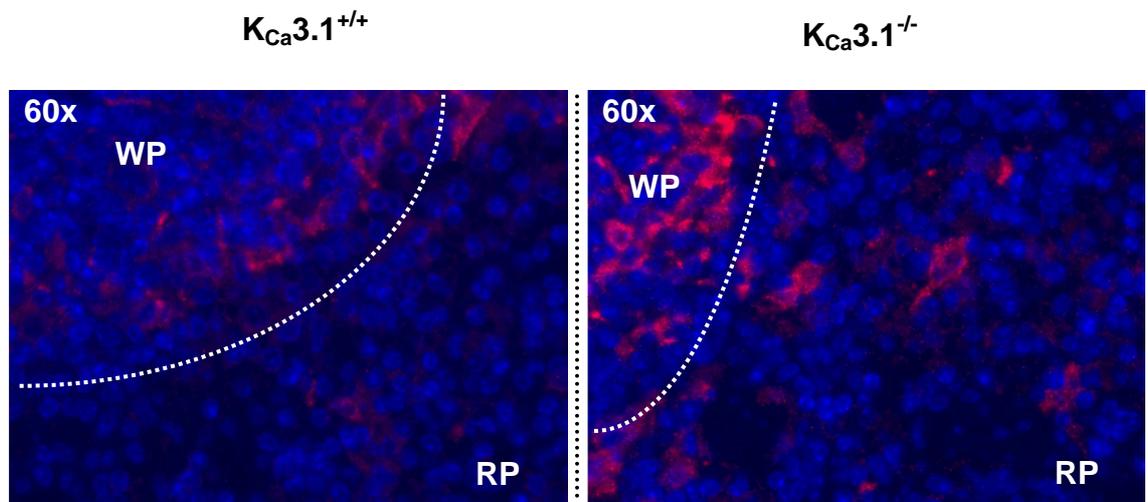
**B**



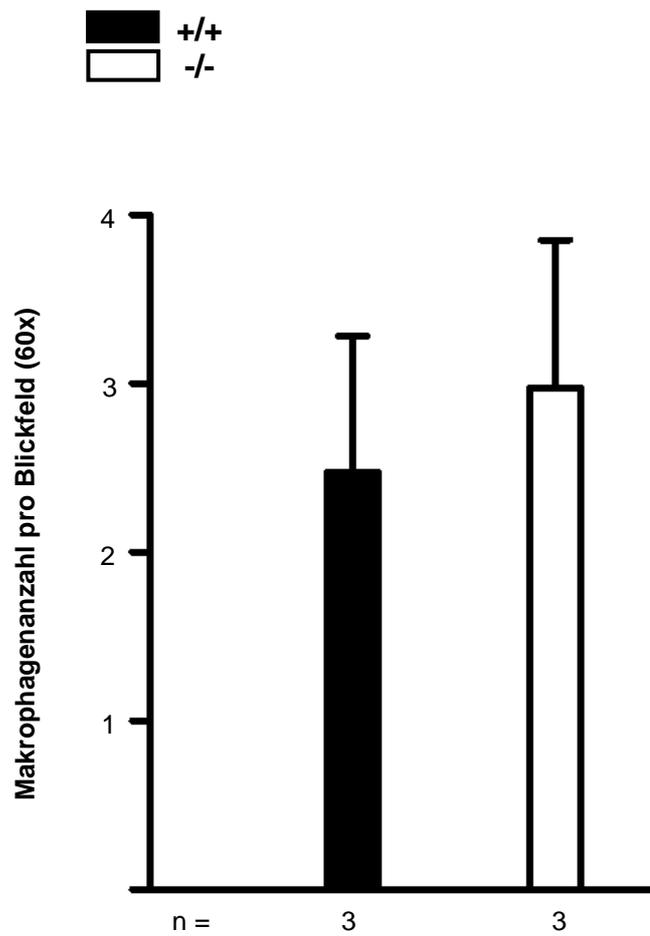
**C**

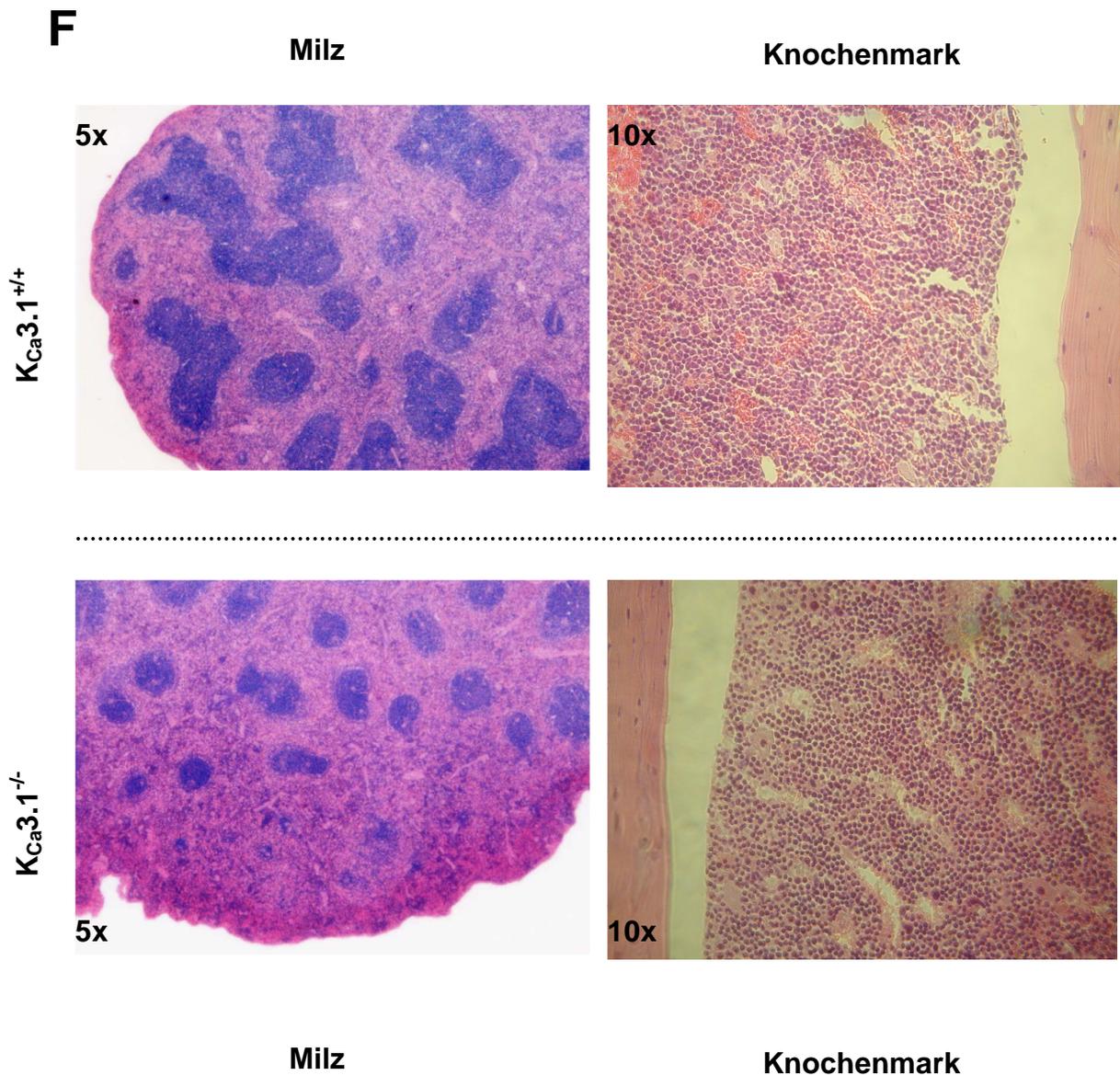


**D**



**E**





**Abb. 9: Gesteigerte Eisenablagerung in der roten Pulpa von K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

**a)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen von Berlinerblau gefärbten Milzschnitten in unterschiedlichen Vergrößerungen (10x und 40x Objektive). Das Eisenpigment ist selektiv als blaue, intrazytoplasmatische Ablagerung in Makrophagen und Sinusendothelien erkennbar.

**b)** Ablagerung von Eisenpartikeln in den Milzen von K<sub>Ca</sub>3.1<sup>+/+</sup>- (n=3) und K<sub>Ca</sub>3.1<sup>-/-</sup>-Mäusen (n=3). Die Werte repräsentieren die relative Anzahl von schwarzen Pixeln der Eisenfärbung in Bezug zur jeweiligen Fläche (gesamter Milzschnitt bzw. rote Pulpa).

## Ergebnisse

---

**c)** Repräsentative transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen von Makrophagen mit aufgenommenen Eisenpartikeln in der roten Pulpa bei  $K_{Ca}3.1^{+/+}$ - (links) und bei  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen (rechts).

**d)** Immunhistologische Analyse des Makrophagengehalts der weißen Pulpa (WP) und der roten Pulpa (RP) bei Wildtyp- und  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen. Fluoreszenz-markierte Makrophagen (rot) finden sich hauptsächlich in der Marginalzone der WP.

**e)** Die quantitative Analyse der Makrophagenanzahl pro hochaufgelöstem Blickfeld zeigt keine Zunahme bei  $K_{Ca}3.1$ -Defizienz.

**f)** Repräsentative H&E-Färbungen von Milzen (links) und des Femurknochenmarks (rechts) von Wildtyp- (oben) und  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen (unten). Hierbei finden sich bei beiden Genotypen keine Unterschiede in der Zellularität. Die H&E-gefärbten Milzen bei  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Defizienz erscheinen aufgrund der erhöhten Eisenablagerung insgesamt dunkler.

n bezeichnet die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , Student t-test.

### **3.2 Erhöhtes MCV in allen Altersgruppen bei $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Störung**

Nach den histologischen Untersuchungen führten wir im nächsten Schritt Blutuntersuchungen durch, um hämatologische Gründe für die Splenomegalie zu eruieren. Unter der Voraussetzung, dass die Splenomegalie erst nach ca. 10 Wochen statistisch nachweisbar war, wurden junge ( $\leq 2$  Monate) und adulte Tiere getrennt voneinander untersucht.

Die Untersuchungsergebnisse zeigten als wichtigstes Ergebnis einen zehnprozentigen Anstieg des MCV sowohl bei jungen als auch bei adulten Mäusen bei  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Störung (Tab. 4).

Betrachtet man die Ergebnisse für die beiden Altersgruppen getrennt voneinander, so lässt sich sowohl für das Hämoglobin (Hb) als auch für den Hämatokrit eine Entwicklung feststellen. Während bei adulten Tieren keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen für Hb und Hkt nachweisbar waren, so waren diese bei den jungen Tieren mit  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Defizienz signifikant erhöht. Auch die Erythrozytenzahlen waren bei jungen

## Ergebnisse

---

Mäusen tendenziell etwas höher, wenn auch nicht signifikant unterschiedlich ( $P=0,1$ ).

Keine signifikanten Unterschiede in beiden Altersgruppen fanden sich für andere Erythrozytenindizes und die Retikulozytenzahlen, die bei einer gesteigerten Hämatopoese erhöht wären.

Bei der ergänzenden Untersuchung des weißen Blutbildes (BB), des Differenzial-BB und der Thrombozytenzahlen konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen festgestellt werden (Tab. 5).

Ergänzend sei bemerkt, dass sich auch bei den Blutuntersuchungen keinerlei Hinweise auf Malignität oder einen chronischen Entzündungsprozess fanden.

## Ergebnisse

**Tabelle 4: Erythrozytenzahlen und -indizes bei  $K_{Ca3.1}^{+/+}$ - und  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mäusen**

Linie, Alter/ Behandlung	Anzahl	RBC ( $10^{12}/L$ )	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	RET ( $10^9/L$ )	RET (%)	Hb (g/dl)	Hkt (%)
+/+ Adult	10	8,3 ± 0,3	48,5 ± 0,6	14,6 ± 0,3	29,7 ± 0,3	343 ± 40	4,2 ± 0,6	11,7 ± 0,4	0,41 ± 0,02
-/- Adult	12	7,7 ± 0,3	53,2 ± 0,7*	15,3 ± 0,3	28,3 ± 0,3	488 ± 74	6,9 ± 1,3	11,5 ± 0,5	0,42 ± 0,02
+/+ Jungtier	8	8,2 ± 0,1	51,0 ± 0,4	15,6 ± 0,1	30,4 ± 0,3	494 ± 33	6,0 ± 0,4	12,8 ± 0,01	0,42 ± 0,01
-/- Jungtier	12	9,1 ± 0,1	54,1 ± 0,3*	16,3 ± 0,3	30,0 ± 0,6	374 ± 35	4,1 ± 0,4	14,9 ± 0,03*	0,50 ± 0,01*

RBC = Erythrozyten, MCV = mean corpuscular volume, MCH = mean corpuscular hemoglobin, MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration, RET = Retikulozyten, Hb = Hämoglobin, Hkt = Hämatokrit;

**Tabelle 5: Keine Unterschiede im Differentialblutbild und bei den Thrombozytenzahlen**

Linie, Alter/ Behandlung	Anzahl	WBC ( $10^9/L$ )	NEUT ( $10^9/L$ )	LYMPH ( $10^9/L$ )	MONO ( $10^9/L$ )	EO ( $10^9/L$ )	BASO ( $10^9/L$ )	PLT ( $10^9/L$ )
+/+ Adult	10	1,8 ± 0,3	0,17 ± 0,02	1,28 ± 0,19	0,04 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	401 ± 41
-/- Adult	12	1,7 ± 0,2	0,27 ± 0,03	1,25 ± 0,15	0,01 ± 0,01	< 0,01	0,01 ± 0,01	520 ± 47
+/+ Jungtier	8	2,1 ± 0,2	0,23 ± 0,03	1,77 ± 0,21	0,05 ± 0,02	0,29 ± 0,28	0,01 ± 0,01	429 ± 109
-/- Jungtier	12	3,0 ± 0,5	0,34 ± 0,05	2,58 ± 0,44	0,06 ± 0,01	< 0,01	0,02 ± 0,01	245 ± 80

WBC = Leukozyten, NEUT = Neutrophile Granulozyten, LYMPH = Lymphozyten, MONO = Monozyten, EO = Eosinophile Granulozyten, BASO = Basophile Granulozyten, PLT = Thrombozyten.

Tiere mit einem Alter ab 3 Monaten wurden als adult bzw. ≤ 2 Monate als jung betrachtet. Angegeben sind der Mittelwert ± SEM. \*  $P < 0,05$ , Student t-test.

## Ergebnisse

---

Weiterhin führten wir Untersuchungen zu einzelnen Parametern der klinischen Chemie durch (Tab. 6). Hierbei legten wir den Schwerpunkt auf Hämolyse- und Entzündungsparameter. Insgesamt zeigten sich keine Auffälligkeiten, die für eine chronische Entzündung oder eine ausgeprägte Hämolyse bei  $K_{Ca3.1}$ -Defizienz sprechen würden. Auch die Werte der Elektrolytuntersuchungen (nicht gezeigt) waren unauffällig.

**Tabelle 6: Normale Hämolyse- und Entzündungsparameter in der klinischen Chemie bei  $K_{Ca3.1}$ -Störung**

Linie	n	LDH (U/L)	n	BIL (mg/dl)	n	CRP (mg/dl)
+/+	17	263 ± 21	11	0,38 ± 0,04	8	0,43 ± 0,04
-/-	23	328 ± 39	13	0,43 ± 0,04	8	0,40 ± 0,02

LDH = Laktatdehydrogenase, BIL = Bilirubin, CRP = C-reaktives Protein.

n bezeichnet die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert ± SEM.

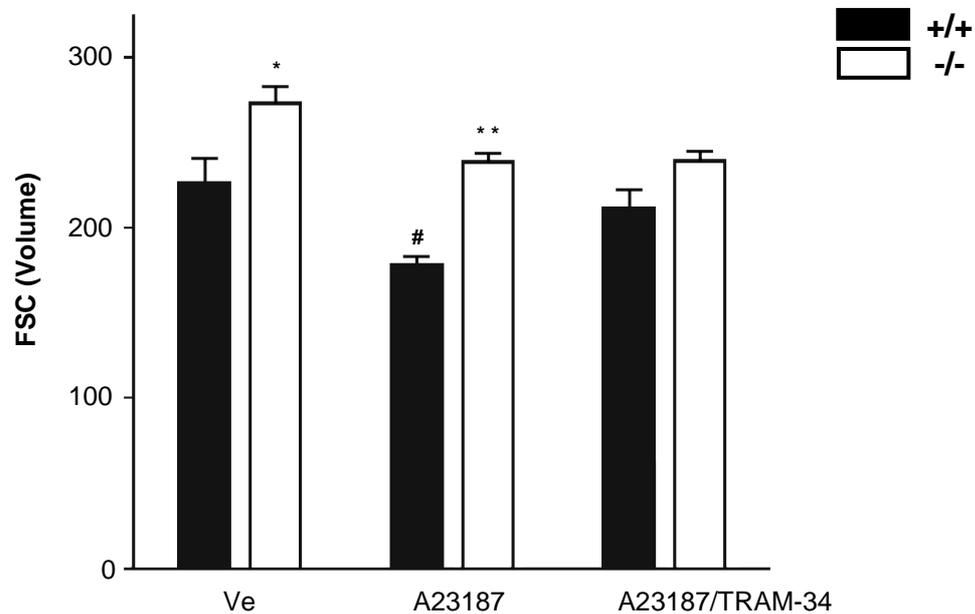
Um den Zusammenhang zwischen erhöhtem MCV und gesteigerter Sequestration der Erythrozyten in der Milz näher zu ergründen, führten wir eine Reihe von Funktionstests durch. Hierbei sollte festgestellt werden, ob das erhöhte MCV mit Veränderungen der Deformierbarkeit, der Volumenregulation, der osmotischen Toleranz und des Anteils von eryptotischen Zellen einhergeht.

### 3.3 Gestörte $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Volumenregulation bei $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}$ -Mäusen

Um den Einfluss des Gardos-Kanals auf die Volumenregulation im Erythrozyten zu bestimmen, testeten wir mit Hilfe des Durchflusszytometers, inwiefern es zu Veränderungen des Zellvolumens nach Inkubation mit A23187 bzw. nach kombinierter Inkubation mit A23187 und TRAM-34 kommt.

Hierbei ließ sich bei den Wildtyp-Mäusen eine deutliche Abnahme des Volumens nach Zugabe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors A23187 feststellen, die durch den selektiven Gardos-Kanal-Inhibitor TRAM-34 unterdrückt werden konnte (Abb. 10).

Ebenso wie bei den Wildtyp-Mäusen kommt es auch bei  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}$ -Mäusen zu einer Abnahme des Volumens durch A23187, die allerdings deutlich geringer ausfällt. Dieser Effekt ließ sich bei  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}^{-/-}$ -Defizienz durch TRAM-34 nicht inhibieren (Abb 10).



**Abb. 10: Gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige erythrozytäre Volumenabnahme bei  $\text{K}_{\text{Ca}}3.1^{-/-}$ -Mäusen**

Dargestellt ist das Erythrozytenvolumen (repräsentiert durch den Forward Scatter in der FACS-Messung) von  $\text{K}_{\text{Ca}}3.1^{+/+}$ - (n=7) und  $\text{K}_{\text{Ca}}3.1^{-/-}$ -Mäusen (n=7) nach einstündiger Inkubationszeit mit 23187, A23187/TRAM-34 und mit dem Vehikel DMSO als Kontrolle.

Eine A23187-induzierbare Abnahme des Volumens ist lediglich bei den Wildtyp-Erythrozyten durch TRAM-34 inhibierbar.

Beachtenswert ist weiterhin das signifikant unterschiedliche Zellvolumen in den Kontrollmessungen mit DMSO, das die 10-prozentige Zunahme des MCV bei  $\text{K}_{\text{Ca}}3.1^{-/-}$ -Mäusen in den Blutuntersuchungen bestätigt.

Ve = Vehikel; n bezeichnet die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , #  $P < 0,05$  vs. Ve, Student t-test.

### 3.4 Verminderte osmotische Resistenz der Erythrozyten

Um den Einfluss von  $K_{Ca}3.1$  auf die Regulation von Oberfläche und Volumen zu bestimmen, testeten wir die Fragilität bei zunehmendem hypoosmotischen Stress (durch NaCl-Konzentrationen von 0-171 mmol/L in BSS-Puffer).

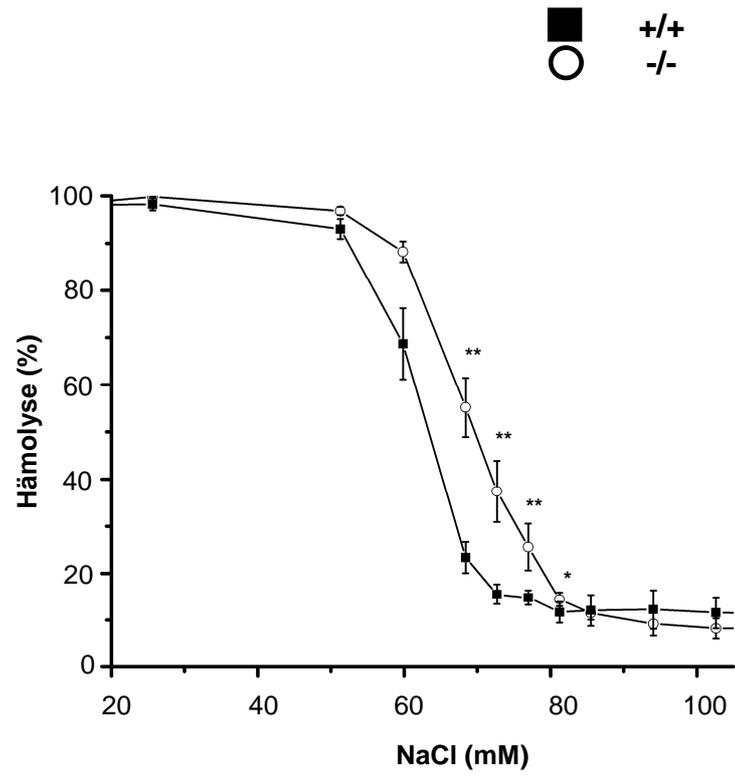
Hierbei zeigte sich eine höhere Anfälligkeit für spontane, osmotische Lyse bei den Erythrozyten von  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen gegenüber den WT-Wurfgeschwistern (Abb. 11a).

Das Weglassen von  $K^+$  im BSS-Puffer zur Inhibition des Gardos-Kanals führte lediglich bei den Erythrozyten von WT-Mäusen zu einer verminderten osmotischen Toleranz, nicht aber bei den RBC der  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäuse. Insgesamt kam es hierdurch zu einem Angleich im Lyseverhalten (nicht gezeigt).

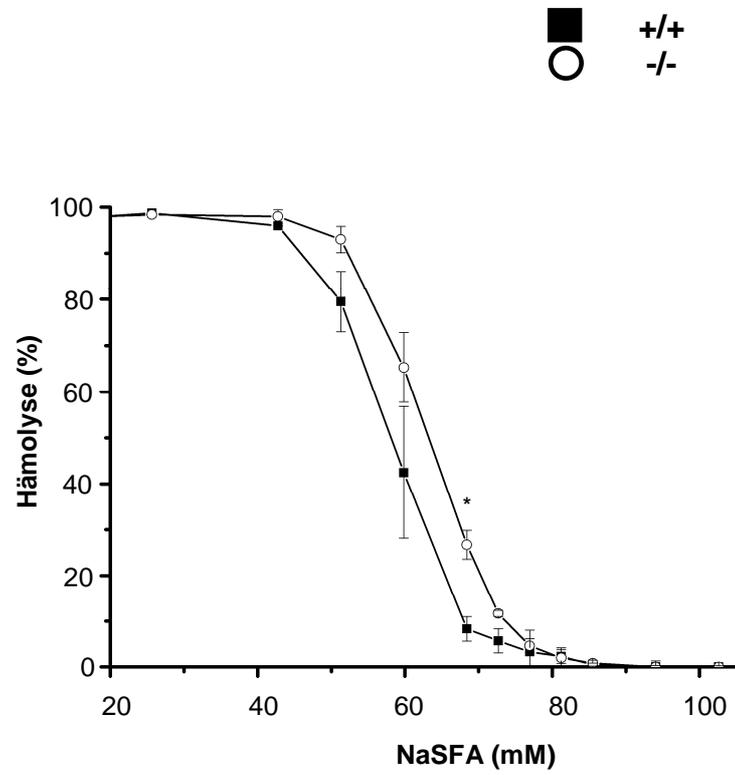
Keine merklichen Veränderungen in der osmotischen Toleranz waren bei der Inhibition der  $K^+/Cl^-$ -Kotransports durch Substitution von  $Cl^-$  durch Sulfamat bei gleichzeitigem Block des  $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransportes durch Bumetanid und der  $Na^+/K^+$ -ATPase durch Ouabain festzustellen (Abb. 11b).

# Ergebnisse

## A



## B



### **Abb. 11: Erhöhte osmotische Fragilität der $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Erythrozyten**

a) Bei zunehmendem hypoosmotischen Stress kommt es bei den Erythrozyten von  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen (n=7) zu einer signifikant verstärkten Lyse im Vergleich mit den WT-Wurfgeschwistern (n=8).

b) Bei einem Block der  $K^+/Cl^-$ -Kotransporter durch Substitution von  $Cl^-$  mit Sulfamat wird die osmotische Fragilität der  $K_{Ca}3.1^{-/-}$  (n=4) und  $K_{Ca}3.1^{+/+}$ -Erythrozyten (n=4) nicht verändert. Diese Experimente wurden bei einem zusätzlichen Block der  $Na^+/K^+$ -ATPase durch Ouabain (1mM) und der  $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Symporter durch Bumetanid (0,1 mM) durchgeführt, um einen Einfluss dieser Systeme zu unterdrücken.

n bezeichnet die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , Student t-test.

### **3.5 Keine Veränderung der Elongationsfähigkeit bei Einwirken von Scherkräften**

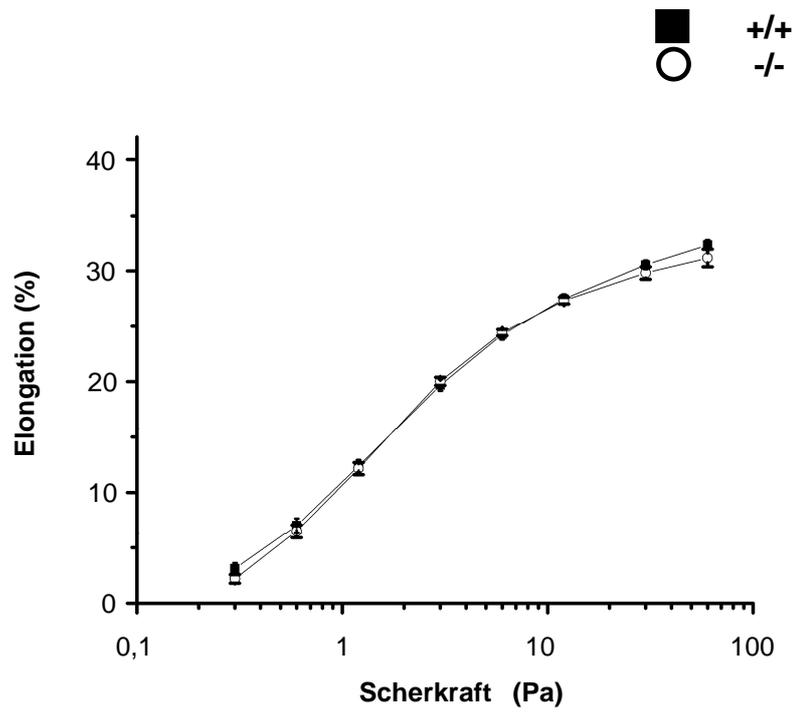
Bei der Simulation des Blutflusses in großen Gefäßen mittels des Shear Stress Diffractometers zeigten sich keine Unterschiede der Elongationsfähigkeit bei  $K_{Ca}3.1$ -Defizienz (Abb. 12a).

So waren weder bei der Inhibition des Gardos-Kanals durch TRAM-34 (Abb. 12b), noch bei Ansätzen mit  $Ca^{2+}$ -freier Lösung (nicht gezeigt) Unterschiede in der Elongation bei beiden Genotypen feststellbar.

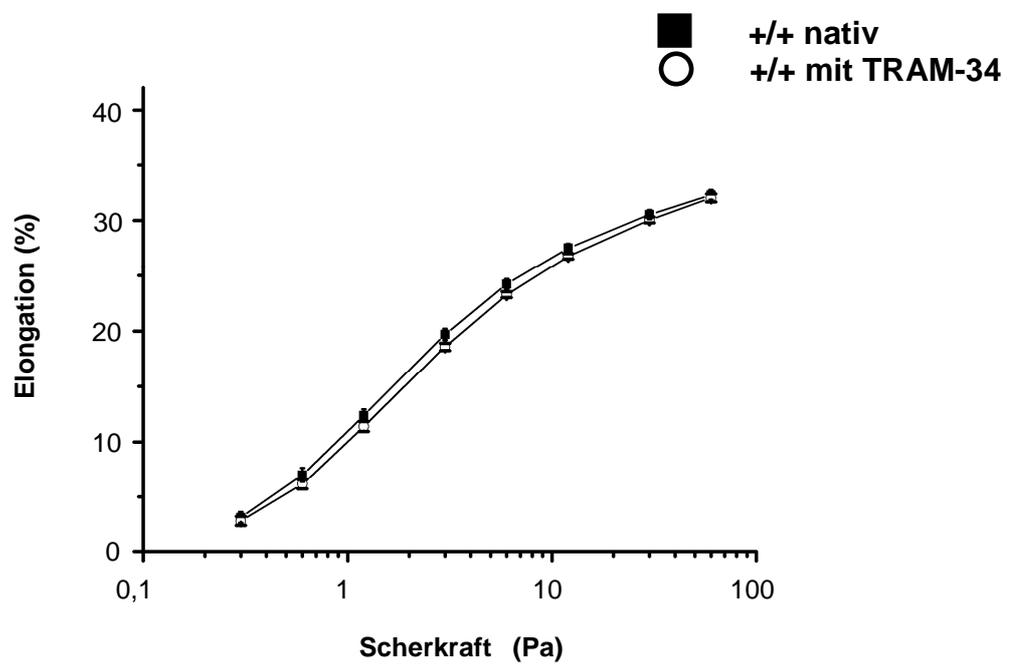
Ein Einfluss des Vehikels DMSO auf die Elongationsfähigkeit konnte durch Kontrollmessungen (nicht gezeigt) ebenfalls ausgeschlossen werden.

# Ergebnisse

## A



## B



### **Abb. 12: Keine Veränderungen der Elongationsfähigkeit bei $K_{Ca}3.1$ -Störung**

Dargestellt ist die prozentuale Elongation der Erythrozyten von  $K_{Ca}3.1^{-/-}$  (n=6) und  $K_{Ca}3.1^{+/+}$  (n=6) Mäusen bei Einwirken von Scherkräften zwischen 0,3 und 60 Pa.

a) Die Elongationsfähigkeit von  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Erythrozyten ist vollständig erhalten.

b) Beim pharmakologischen Block des Gardos-Kanals der Wildtyp-Erythrozyten mittels TRAM-34 zeigten sich keine Veränderungen.

n bezeichnet die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM.

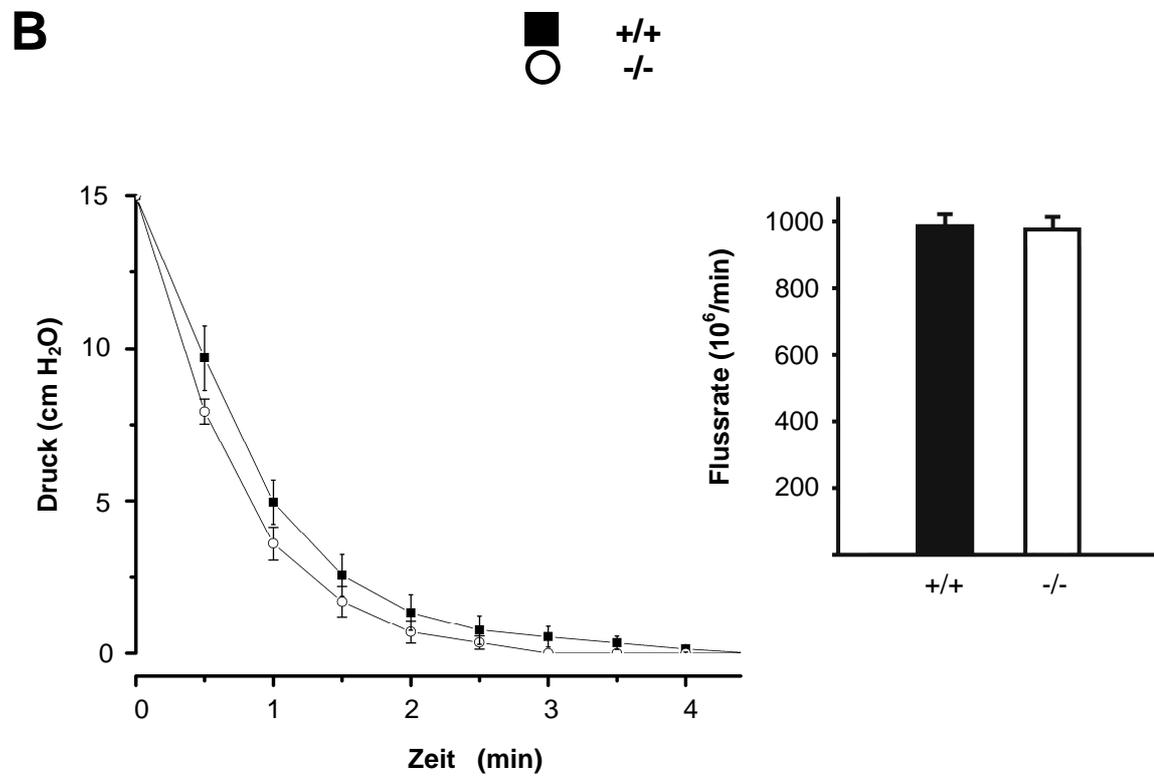
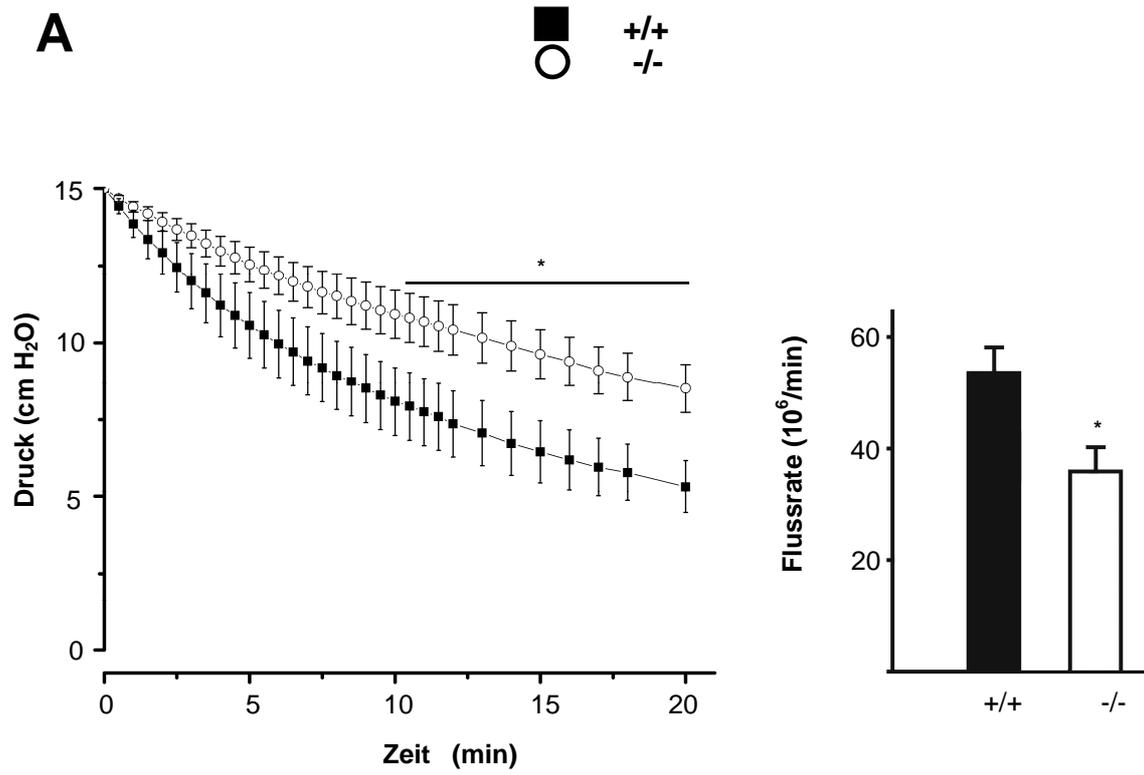
### **3.6 Gestörte Filtrierbarkeit von $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Erythrozyten beim Fluss durch 3 $\mu$ m-Poren**

Die Messung der Filtrierbarkeit durch die vertikale Rohrmethode diente als Modell zum Testen der Deformierbarkeit der Erythrozyten beim Durchgang durch kleine Poren.

Hierbei fanden sich für Filter mit einer Porengröße von 5  $\mu$ m keine messbaren Unterschiede in der Filtrierbarkeit (Abb. 13b). Wie der Abbildung zu entnehmen ist, wurde die Erythrozytensuspension innerhalb weniger Minuten vollständig filtriert. Die errechneten Transitraten (Bezugszeitraum: 90 sek.) ergaben eine annähernd gleiche Flussrate der jeweiligen Suspensionen.

Dagegen zeigten sich bei 3  $\mu$ m Poren-Filtern deutliche Einschränkungen in der Filtrierbarkeit bei  $K_{Ca}3.1$ -Störung (Abb. 13a). Die Suspensionen der makrozytotischen  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Erythrozyten wurden wesentlich langsamer als die der  $K_{Ca}3.1^{+/+}$ -Mäuse filtriert, was auch mit signifikant verminderten (ca. 30 %) Transitraten (Bezugszeitraum: 20 min.) einherging.

# Ergebnisse



### **Abb. 13: Gestörte Filtrierbarkeit der makrozytotischen $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Erythrozyten durch kleine Poren**

Dargestellt ist der gravitationsgetriebene Fluss der Erythrozytensuspensionen von  $K_{Ca}3.1^{+/+}$ - und  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen durch Filter mit 3  $\mu\text{m}$  (a, je  $n=8$ ) und 5  $\mu\text{m}$  (b, je  $n=5$ ) Porengröße. Links: Druck-Zeit-Verlauf entsprechend der Höhe der Wassersäule in Abhängigkeit von der Zeit. Rechts: Kalkulierte, mittlere Erythrozyten-Flussrate über einen Zeitraum von 20 min (a) bzw. 90 sec. (b).

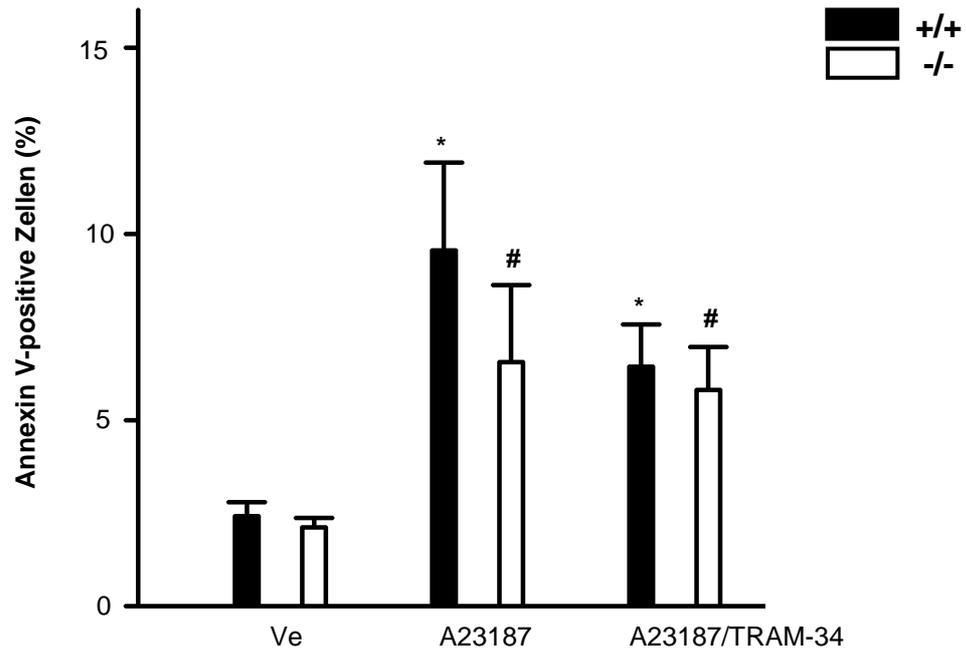
$n$  bezeichnet die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , Student t-test.

### **3.7 Gleicher prozentualer Anteil Annexin-V positiver Zellen im peripheren Blut**

Zuletzt untersuchten wir, ob die Splenomegalie bei  $K_{Ca}3.1$ -Defizienz durch eine vermehrte Phosphatidylserin-Translokation an die Erythrozytenoberfläche mit anschließender eryptotischer Sequestration in der Milz bedingt ist. Ein Zusammenbruch der PS-Asymmetrie würde sich an einem größeren Anteil von gebundenem Annexin-V zeigen.

Unmittelbar nach der Herzpunktion untersuchtes Blut zeigte keine Unterschiede im Anteil Annexin-V positiver Zellen (nicht gezeigt). Auch bei den Erythrozyten, die über eine Stunde mit A23187 bzw. A23187 und TRAM-34 inkubiert wurden, fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen  $K_{Ca}3.1^{+/+}$  und  $K_{Ca}3.1^{-/-}$  (Abb. 14). Des Weiteren war die Phosphatidylserin-Translokation bei einer 24-stündigen Sucrose-Inkubation als hyperosmotischen Schock (nicht gezeigt) bei beiden Genotypen nicht signifikant unterschiedlich.

## Ergebnisse



### Abb. 14: Keine signifikanten Unterschiede der Annexin V-positiven Zellen

Abgebildet ist die durchflusszytometrische Analyse der Annexin V-positiven Zellen von  $K_{Ca}3.1^{+/+}$  ( $n = 5$ ) und von  $K_{Ca}3.1^{-/-}$  ( $n=5$ ) Mäusen bei einstündiger Inkubation mit dem Vehikel DMSO und nach Inkubation mit dem  $Ca^{2+}$ -Ionophor A23187 bzw. A23187 + TRAM-34. Erkennbar ist, dass zwischen den Ergebnissen beider Genotypen keine signifikanten Unterschiede bestehen.

$n$  bezeichnet die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  für  $K_{Ca}3.1^{+/+}$ -Mäuse: Ve vs. A23187 oder vs. A23187 + TRAM34, #  $P < 0,05$  für  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäuse: Ve vs. A23187 oder vs. A23187 + TRAM34, Student t-test.

### 4 DISKUSSION

Das Ziel dieser Studie war es, die physiologischen Aufgaben von  $K_{Ca}3.1$  im Erythrozyten in vivo zu bestimmen und die Konsequenzen einer genetischen Störung in Mäusen zu untersuchen.

Durch eine Störung des Gardos-Kanals zeigten sich insgesamt signifikante Veränderungen der Erythrozytenparameter und –funktionen, die zu einer konsekutiven Adaption der Milz in Form einer Arbeitshypertrophie führten.

Bevor nun eine detaillierte Diskussion der Ergebnisse erfolgt, möchte ich kurz die experimentellen Versuchsergebnisse zusammenfassend darstellen.

- 1) Durch eine lebenslange Störung von  $K_{Ca}3.1$  in Mäusen resultiert eine progressive Splenomegalie, die durch eine erhöhte Ablagerung von Eisen gekennzeichnet ist.
- 2) Auf zellulärer Ebene ist eine milde Makrozytose der Erythrozyten bei  $K_{Ca}3.1$ -Störung festzustellen. Diese geht der Splenomegalie voraus und ist folglich bereits bei jungen Tieren festzustellen.
- 3) Zur Prüfung von Alternativhypothesen ist festzuhalten, dass andere Erythrozytenparameter, das Blutbild (inkl. weißem Differential-Blutbild) und die Laborergebnisse der klinischen Chemie insgesamt keine wesentlichen Veränderungen zeigten.
- 4) Auf funktioneller Ebene ist eine erhöhte Anfälligkeit für osmotische Lyse bei  $K_{Ca}3.1$ -Defizienz zu beobachten. Die Deformierbarkeit bei Einwirken von Scherkräften und die PS-Translokation im Rahmen der Eryptose waren unverändert.
- 5) Als wesentliche Veränderung in der Funktion der Erythrozyten war eine moderat verminderte Filtrierbarkeit bei  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen nachweisbar.

## Diskussion

---

In weiteren Versuchen durch Mitglieder der Arbeitsgruppe wurde zudem durch Western-Blot-Analysen und Patch-Clamp-Experimente nachgewiesen, dass das  $K_{Ca}3.1$ -Protein bei den  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen nicht in der Erythrozytenmembran exprimiert wird und der  $K_{Ca}3.1$ -vermittelte Strom bei diesen Erythrozyten fehlt (Grgic, Kaistha et al. 2009).

Wie bereits erwähnt, war die wesentliche Veränderung des Phänotyps bei  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen die progressive Splenomegalie. Diese ist bei neugeborenen Tieren noch nicht nachweisbar, bei 2-6 Monate alten Tieren als leicht zu klassifizieren und bei über sechs Monate alten Tieren als moderat vergrößert zu bezeichnen. Da sich die Splenomegalie erst spät entwickelt, scheint die Organvergrößerung durch eine physiologische Reaktion der Milz auf eine erhöhte Arbeitslast bedingt zu sein. Von einer Arbeitshypertrophie ist weiterhin auszugehen, da ein Hypersplenie-Syndrom durch begleitende unauffällige, histologische Untersuchungen der Leber und des Portalvenensystems als unwahrscheinlich einzustufen ist und da sich alternative Ursachen für die Splenomegalie, wie bsp. ein maligner Prozess, eine chronische Entzündung oder Hämorrhagien, in der histologischen Untersuchung der Milz nicht nachweisen ließen.

Gestützt durch die erhöhte, intrazytoplasmatische Ablagerung von Eisenpartikeln als Abbauprodukt des Hämoglobins, ist vielmehr von einer Organvergrößerung der Milz in Folge eines gesteigerten Abbaus von Erythrozyten auszugehen. Dass es sich bei den nachgewiesenen Partikeln um Eisen handelt (und bsp. nicht um Lipofuszin), konnte durch das Färbeverhalten in der Berlinerblau-Reaktion und durch die Lage der Partikel im Zytoplasma der Makrophagen sichergestellt werden. Unterstützt wird diese These durch einen weiteren Versuch anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe: Wildtyp-Mäuse, die über einen Monat mit einer Hochdosistherapie (120 mg/kgKG/d) mit TRAM-34 behandelt wurden,

## Diskussion

---

entwickelten eine Splenomegalie, die von der Organgröße 2-3 Monate alten  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mäusen entspricht (Grgic, Kaistha et al. 2009).

Auch wenn das MCV der Erythrozyten um ca. 10% bei  $K_{Ca3.1}$ -Störung erhöht war, so war die bikonkave, scheibenförmige Morphologie der RBC unverändert. In ergänzenden, funktionellen Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe zeigten sich keine Änderungen im Sauerstoff-Binde- und -Abgabe-Verhalten (Grgic, Kaistha et al. 2009). Wichtig ist festzustellen, dass eine deutliche Hämolyse nicht nachweisbar war. Es ist daher davon auszugehen, dass die wesentlichen funktionellen Eigenschaften der Erythrozyten ungestört waren. Dies wird durch gleichbleibende Erythrozytenzahlen bei  $K_{Ca3.1}$ -Defizit und durch nur minimal veränderte Erythrozytenindizes und LDH-Werte, sowie statistisch nicht signifikant abweichende Retikulozytenzahlen unterstützt. So waren allein bei jungen Tieren das Hämoglobin und der Hämatokrit leichtgradig erhöht.

Durch die vorliegende Studie konnte nicht im Detail geklärt werden, wodurch die Makrozytose der Erythrozyten bedingt ist. Im Folgenden sollen drei Thesen diskutiert werden, die eine Erklärungsmöglichkeit darstellen.

Da die Makrozytose über die gesamte Lebenszeit bei  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mäusen besteht, könnte die Erythropoese gestört sein, wie es bsp. für andere makrozytäre Anämien auch bekannt ist. Bei der Untersuchung des Femurknochenmarks zeigten sich keine Auffälligkeiten, was dieser These allerdings nicht widerspricht, da es sich nur um einen milden Phänotyp (10-prozentige Zunahme des MCV) handelt.

Alternativ könnte eine permanente Störung der Volumenregulation für das erhöhte Zellvolumen der  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Erythrozyten verantwortlich sein. Durch den Verlust der Gardos-Kanals würden  $K^+$  und  $Cl^-$  vermehrt intrazellulär

## Diskussion

---

verbleiben und ein osmotischer Wasserausstrom könnte nicht stattfinden. Diese These wird durch die erhöhte Fragilität bei zunehmendem hypoosmotischen Stress untermauert, was einer gestörten Volumenregulation entspricht.

In einer früheren Studie mit  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäusen einer anderen Linie wurde ebenfalls von einer gestörten Volumenregulation der Erythrozyten berichtet (Begenisich, Nakamoto et al. 2004). Diese war allerdings nicht unter spontanen Bedingungen nachweisbar, sondern erst nach Zugabe des  $Ca^{2+}$ -Ionophors A23187. Unabhängig von den differierenden Ergebnissen unterstützen jedoch beide Studien eine besondere Bedeutung des Gardos-Kanals für die Volumenregulation.

Wie bereits erwähnt, war die Störung von KCC1/3 in Mäusen ebenfalls von einer Abnahme der Volumenregulationsfähigkeit der  $KCC1/3^{-/-}$ - Erythrozyten und einer Makrozytose begleitet (s. Abschnitt 1.1.3.1; (Akel, Wagner et al. 2007). Interessanterweise war in dieser Studie keine Splenomegalie aufgetreten.

Abschließend ist festzustellen, dass andere Systeme der erythrozytären Volumenregulation (s. Abschnitt 1.1.3.1), wobei insbesondere der KCC und der AE1 zu nennen sind, den Verlust von  $K_{Ca}3.1$  nicht ausgleichen konnten. Dies unterstreicht zusätzlich die besondere Rolle des Gardos-Kanals für die Volumenregulation in RBC.

Als dritte Möglichkeit sollte in Betracht gezogen werden, dass das erhöhte mittlere Zellvolumen der Erythrozyten eine gesteigerte Seneszenz anzeigen könnte.

Gewöhnlich werden alternde Erythrozyten dichter bzw. kleiner. Bei deutlich erhöhtem mechanischem und osmotischem Stress, bsp. bedingt durch eine verminderte Filtrierbarkeit, reagieren alte RBC mit einem Anschwellen bzw. einem disproportionalen Volumenanstieg (Canham 1969). Bildet sich nun eine größere Subgruppe solcher Erythrozyten würde sich dies in einem Anstieg des mittleren MCV äußern.

## Diskussion

---

Besonders zu beachten in diesem Zusammenhang ist, dass die Seneszenz von Erythrozyten mit dem Verlust von  $K_{Ca3.1}$  in Verbindung gebracht wird (Tiffert, Daw et al. 2007). Bei den  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mäusen würde also durch die Störung des Gardos-Kanals die Seneszenz beschleunigt, wodurch die Erythrozyten für die osmotisch/mechanisch bedingte Bildung von Makrozyten anfälliger werden würden, was schließlich zu einer vermehrten Sequestration in der Milz führen würde.

Zusammengefasst ist die Makrozytose bei den  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Erythrozyten also vermutlich entweder durch eine gestörte Hämatopoese, eine permanent beeinträchtigte Volumenregulationsfähigkeit oder durch eine vorschnelle Seneszenz bedingt. Welche dieser drei Thesen als Erklärungsmodell zu favorisieren ist, kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht vollständig beantwortet werden.

Die Konsequenz eines vergrößerten Zellvolumens könnte eine erschwerte Deformierbarkeit bzw. Filtrierbarkeit sein, was weiterhin zu einer gesteigerten Sequestration beitragen könnte.

In der vorliegenden Studie konnte kein Einfluss von  $K_{Ca3.1}$  auf die Deformierbarkeit bei Einwirken von Scherkräften nachgewiesen werden. Die Ergebnisse stehen hierbei im Gegensatz zu früheren Studien (Johnson and Tang 1992), die allerdings lediglich auf pharmakologische Methoden zurückgreifen konnten und keine genetische Störung von  $K_{Ca3.1}$  induziert hatten.

Im Gegensatz hierzu war die Filtrierbarkeit als Teil der Deformierbarkeit von Erythrozyten bei kleinen Poren (nicht aber bei großen Poren) vermindert. Dies wird durch frühere Erkenntnisse untermauert, die von einer deutlichen Einschränkung der Filtrabilität durch 3  $\mu$ m-Poren bei Erhöhung des MCV

## Diskussion

---

berichteten (Stuart 1985; Stuart and Nash 1990; Engstrom and Lofvenberg 1998).

In Bezug auf die Splenomegalie ist daher anzunehmen, dass die Makrozytose der  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Erythrozyten zu einer verlangsamten Passage durch die Endothelzellschlitze in der Milz führt, was mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einhergeht, von Makrophagen phagozytiert zu werden.

Anders als zu Beginn der Studie vermutet, ist eine verschlechterte Passage durch periphere Kapillaren als unwahrscheinlich einzustufen. Dies würde zum einen mit erhöhten Hämolysewerten und eryptotischen Erythrozyten einhergehen und zum anderen würde sich dies im Phänotyp abbilden. Die Folge manifester Kapillarokklusionen wären nämlich Organdefekte, Verhaltensänderungen und eine Verkürzung der Lebenszeit, was durch die ergänzende histologische Untersuchung anderer Organe in dieser Studie, sowie durch Untersuchungen zur Sterblichkeit und zur lokomotorischen Aktivität in vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe (Si, Heyken et al. 2006) ausgeschlossen werden konnte. Allein eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks, bedingt durch eine endotheliale Dysfunktion und eine Störung der EDHF-vermittelten Vasodilatation konnten für die  $K_{Ca3.1}^{-/-}$ -Mäuse nachgewiesen werden (Si, Heyken et al. 2006).

Abschließend ist zu betonen, dass  $K_{Ca3.1}$  in Erythrozyten nicht maßgeblich an der Eryptose bzw. an der PS-Translokation auf die Zellmembran beteiligt zu sein scheint, was sie von  $AE1^{-/-}$ -Mäusen (s. Abschnitt 1.1.3.1) unterscheidet. Da sich diese Ergebnisse von früheren Studien unterscheiden (Lang, Kaiser et al. 2003), die eine maßgeblich Rolle von  $K_{Ca3.1}$  für die Eryptose postuliert hatten, ist auf die unterschiedlichen Methoden hinzuweisen. In früheren Studien wurde lediglich in vitro, unter Einsatz von pharmakologischen Hilfsmitteln, eine Inhibition des Gardos-Kanals induziert.

## Diskussion

---

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Störung von  $K_{Ca}3.1$  in Mäusen zu einem leicht veränderten Phänotyp führt. Dieser ist durch eine milde Makrozytose, eine gestörte Volumenregulation und eine moderat verminderte Filtrierbarkeit durch kleine Poren gekennzeichnet. Diese Defekte führen wiederum zu einer erhöhten Sequestration in der Milz, was sich in einer erhöhten Eisenablagerung widerspiegelt. Die Milz reagiert hierauf in Form einer Arbeitshypertrophie mit konsekutiver Splenomegalie.

### 5 LITERATURVERZEICHNIS

- Akel, A., C. A. Wagner, et al. (2007). "Enhanced suicidal death of erythrocytes from gene-targeted mice lacking the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger AE1." Am J Physiol Cell Physiol **292**(5): C1759-67.
- Alvarez, J., M. Montero, et al. (1992). "High affinity inhibition of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels by cytochrome P-450 inhibitors." J Biol Chem **267**(17): 11789-93.
- Armsby, C. C., C. Brugnara, et al. (1995). "Cation transport in mouse erythrocytes: role of K<sup>(+)</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport in regulatory volume decrease." Am J Physiol **268**(4 Pt 1): C894-902.
- Ataga, K. I., W. R. Smith, et al. (2008). "Efficacy and safety of the Gardos channel blocker, senicapoc (ICA-17043), in patients with sickle cell anemia." Blood **111**(8): 3991-7.
- Atkinson, N. S., G. A. Robertson, et al. (1991). "A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus." Science **253**(5019): 551-5.
- Begenisich, T., T. Nakamoto, et al. (2004). "Physiological roles of the intermediate conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel Kcnn4." J Biol Chem **279**(46): 47681-7.
- Bertles, J. F. (1957). "Sodium transport across the surface membrane of red blood cells in hereditary spherocytosis." J Clin Invest **36**(6 Part 1): 816-24.
- Boas, F. E., L. Forman, et al. (1998). "Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3077-81.
- Brahler, S., A. Kaistha, et al. (2009). "Genetic deficit of SK3 and IK1 channels disrupts the endothelium-derived hyperpolarizing factor vasodilator pathway and causes hypertension." Circulation **119**(17): 2323-32.
- Brown, M. and C. Wittwer (2000). "Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology." Clin Chem **46**(8 Pt 2): 1221-9.
- Brugnara, C. (1997). "Erythrocyte membrane transport physiology." Curr Opin Hematol **4**(2): 122-7.
- Brugnara, C. (2003). "Sickle cell disease: from membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration." J Pediatr Hematol Oncol **25**(12): 927-33.
- Brugnara, C., H. F. Bunn, et al. (1986). "Regulation of erythrocyte cation and water content in sickle cell anemia." Science **232**(4748): 388-90.

## Literatur

---

- Brugnara, C., L. de Franceschi, et al. (1993). "Inhibition of Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives." J Clin Invest **92**(1): 520-6.
- Bunn, H. F. (1997). "Pathogenesis and treatment of sickle cell disease." N Engl J Med **337**(11): 762-9.
- Butler, A., S. Tsunoda, et al. (1993). "mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels." Science **261**(5118): 221-4.
- Caldwell, K. K. and R. A. Harris (1985). "Effects of anesthetic and anticonvulsant drugs on calcium-dependent efflux of potassium from human erythrocytes." Eur J Pharmacol **107**(2): 119-25.
- Canham, P. B. (1969). "Difference in geometry of young and old human erythrocytes explained by a filtering mechanism." Circ Res **25**(1): 39-45.
- Choe, S. (2002). "Potassium channel structures." Nat Rev Neurosci **3**(2): 115-21.
- Coetzee, W. A., Y. Amarillo, et al. (1999). "Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels." Ann N Y Acad Sci **868**: 233-85.
- Contreras, R. G., D. Flores-Beni Tez, et al. (2006). "Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and hormone ouabain: new roles for an old enzyme and an old inhibitor." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **52**(8): 31-40.
- De Franceschi, L., A. Rivera, et al. (2005). "Evidence for a protective role of the Gardos channel against hemolysis in murine spherocytosis." Blood **106**(4): 1454-9.
- De Franceschi, L., N. Saadane, et al. (1994). "Treatment with oral clotrimazole blocks Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> transport and reverses erythrocyte dehydration in transgenic SAD mice. A model for therapy of sickle cell disease." J Clin Invest **93**(4): 1670-6.
- Devor, D. C., A. K. Singh, et al. (1996). "Modulation of Cl<sup>-</sup> secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channel." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): L775-84.
- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, et al. (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity." Science **280**(5360): 69-77.
- Dunn, P. M. (1998). "The action of blocking agents applied to the inner face of Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels from human erythrocytes." J Membr Biol **165**(2): 133-43.
- Eaton, W. A. and J. Hofrichter (1987). "Hemoglobin S gelation and sickle cell disease." Blood **70**(5): 1245-66.
- Eaton, W. A. and J. Hofrichter (1990). "Sickle cell hemoglobin polymerization." Adv Protein Chem **40**: 63-279.

## Literatur

---

- Elliott, J. I. and C. F. Higgins (2003). "IKCa1 activity is required for cell shrinkage, phosphatidylserine translocation and death in T lymphocyte apoptosis." EMBO Rep **4**(2): 189-94.
- Ellory, J. C., K. Kirk, et al. (1992). "Nitrendipine is a potent inhibitor of the Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel of human erythrocytes." FEBS Lett **296**(2): 219-21.
- Engstrom, K. G. and E. Lofvenberg (1998). "Treatment of myeloproliferative disorders with hydroxyurea: effects on red blood cell geometry and deformability." Blood **91**(10): 3986-91.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." Nature **405**(6782): 85-90.
- Fadok, V. A., A. de Cathelineau, et al. (2001). "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts." J Biol Chem **276**(2): 1071-7.
- Gardos, G. (1958). "The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes." Biochim Biophys Acta **30**(3): 653-4.
- Gilboa, H., B. E. Chapman, et al. (1994). "19F NMR magnetization transfer between 5-FBAPTA and its complexes. An alternative means for measuring free Ca<sup>2+</sup> concentration, and detection of complexes with protein in erythrocytes." NMR Biomed **7**(7): 330-8.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-12.
- Grgic, I., B. P. Kaistha, et al. (2009). "Endothelial Ca<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery." Br J Pharmacol **157**(4): 509-26.
- Grgic, I., B. P. Kaistha, et al. (2009). "Disruption of the Gardos channel (KCa3.1) in mice causes subtle erythrocyte macrocytosis and progressive splenomegaly." Pflugers Arch **458**(2): 291-302.
- Grygorczyk, R. and W. Schwarz (1983). "Properties of the CA<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> conductance of human red cells as revealed by the patch-clamp technique." Cell Calcium **4**(5-6): 499-510.
- Grygorczyk, R., W. Schwarz, et al. (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**(4): 693-8.
- Gulbins, E., A. Jekle, et al. (2000). "Physiology of apoptosis." Am J Physiol Renal Physiol **279**(4): F605-15.
- Gutman, G. A., K. G. Chandy, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 473-508.

## Literatur

---

- Hebbel, R. P. (1997). "Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium." J Clin Invest **100**(11 Suppl): S83-6.
- Heilmann, L. and H. Schmid-Schonbein (1981). "[A rheological method for the measurement of red cell deformability (author's transl)]." Klin Wochenschr **59**(4): 181-5.
- Heinz, A. and J. F. Hoffman (1990). "Membrane sidedness and the interaction of H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> on Ca<sup>2+</sup>(+)-activated K<sup>+</sup> transport in human red blood cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1998-2002.
- Heinz, A. and H. Passow (1980). "Role of external potassium in the calcium-induced potassium efflux from human red blood cell ghosts." J Membr Biol **57**(2): 119-31.
- Hille, B., C. M. Armstrong, et al. (1999). "Ion channels: from idea to reality." Nat Med **5**(10): 1105-9.
- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." J Physiol **117**(4): 500-44.
- Hoffman, J. F., W. Joiner, et al. (2003). "The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (Gardos channel) in human red blood cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7366-71.
- Ishii, T. M., J. Maylie, et al. (1997). "Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels." J Biol Chem **272**(37): 23195-200.
- Ishii, T. M., C. Silvia, et al. (1997). "A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11651-6.
- Jacob, H. S. and J. H. Jandl (1964). "Increased Cell Membrane Permeability In The Pathogenesis Of Hereditary Spherocytosis." J Clin Invest **43**: 1704-20.
- Jensen, B. S., D. Strobaek, et al. (1998). "Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel." Am J Physiol **275**(3 Pt 1): C848-56.
- Johnson, R. M. and K. Tang (1992). "Induction of a Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes by mechanical stress." Biochim Biophys Acta **1107**(2): 314-8.
- Joiner, C. H., R. K. Rettig, et al. (2007). "Urea stimulation of KCl cotransport induces abnormal volume reduction in sickle reticulocytes." Blood **109**(4): 1728-35.
- Joiner, W. J., L. Y. Wang, et al. (1997). "hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 11013-8.

## Literatur

---

- Kaczorowski, G. J., H. G. Knaus, et al. (1996). "High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function." J Bioenerg Biomembr **28**(3): 255-67.
- Khanna, R., S. H. Chang, et al. (2002). "Headpiece domain of dematin is required for the stability of the erythrocyte membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6637-42.
- Knauf, P. (2003). Mediated transport. Red Cell Membrane Transport in Health and Disease. Bernhardt. Berlin, Springer-Verlag. **1**: 257-302.
- Kohler, M., B. Hirschberg, et al. (1996). "Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain." Science **273**(5282): 1709-14.
- Kohler, R. and J. Hoyer (2007). "The endothelium-derived hyperpolarizing factor: insights from genetic animal models." Kidney Int **72**(2): 145-50.
- Lang, F., K. S. Lang, et al. (2003). "Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte." Pflugers Arch **447**(2): 121-5.
- Lang, K. S., C. Duranton, et al. (2003). "Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes." Cell Death Differ **10**(2): 249-56.
- Lang, K. S., P. A. Lang, et al. (2005). "Mechanisms of suicidal erythrocyte death." Cell Physiol Biochem **15**(5): 195-202.
- Lang, P. A., S. Kaiser, et al. (2003). "Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis." Am J Physiol Cell Physiol **285**(6): C1553-60.
- Lew, V. L. and R. M. Bookchin (2005). "Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration." Physiol Rev **85**(1): 179-200.
- Litt, M., D. LaMorticella, et al. (1999). "Gene structure and chromosome mapping of the human small-conductance calcium-activated potassium channel SK1 gene (KCNN1)." Cytogenet Cell Genet **86**(1): 70-3.
- Logsdon, N. J., J. Kang, et al. (1997). "A novel gene, hKCa4, encodes the calcium-activated potassium channel in human T lymphocytes." J Biol Chem **272**(52): 32723-6.
- MacKinnon, R. (2003). "Potassium channels." FEBS Lett **555**(1): 62-5.
- Maher, A. D. and P. W. Kuchel (2003). "The Gardos channel: a review of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in human erythrocytes." Int J Biochem Cell Biol **35**(8): 1182-97.
- Mohandas, N. and P. G. Gallagher (2008). "Red cell membrane: past, present, and future." Blood **112**(10): 3939-48.
- Mozzarelli, A., J. Hofrichter, et al. (1987). "Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo." Science **237**(4814): 500-6.
- Murphy, E., L. R. Berkowitz, et al. (1987). "Cytosolic free calcium levels in sickle red blood cells." Blood **69**(5): 1469-74.

## Literatur

---

- Nakamura, T., S. Hasegawa, et al. (1994). "Rheologic and pathophysiologic significance of red cell passage through narrow pores." Blood Cells **20**(1): 151-65; discussion 166-8.
- Nelson, M. T., H. Cheng, et al. (1995). "Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks." Science **270**(5236): 633-7.
- Pellegrino, C. M., A. C. Rybicki, et al. (1998). "Molecular identification and expression of erythroid K:Cl cotransporter in human and mouse erythroleukemic cells." Blood Cells Mol Dis **24**(1): 31-40.
- Peters, L. L., R. A. Shivdasani, et al. (1996). "Anion exchanger 1 (band 3) is required to prevent erythrocyte membrane surface loss but not to form the membrane skeleton." Cell **86**(6): 917-27.
- Pewitt, E. B., R. S. Hedge, et al. (1990). "[<sup>3</sup>H]bumetanide binding to avian erythrocyte membranes. Correlation with activation and deactivation of Na/K/2Cl cotransport." J Biol Chem **265**(24): 14364-70.
- Poschl, J. M., C. Leray, et al. (2003). "Endotoxin binding to erythrocyte membrane and erythrocyte deformability in human sepsis and in vitro." Crit Care Med **31**(3): 924-8.
- Rhoda, M. D., M. Apovo, et al. (1990). "Ca<sup>2+</sup> permeability in deoxygenated sickle cells." Blood **75**(12): 2453-8.
- Roberts, W. M., R. A. Jacobs, et al. (1990). "Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells." J Neurosci **10**(11): 3664-84.
- Robitaille, R., M. L. Garcia, et al. (1993). "Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release." Neuron **11**(4): 645-55.
- Ruef, P., J. M. B. Pöschl, et al. (1995). "The rheodyn SSD for measuring erythrocyte deformability." Biorheology **32**(2): 357-358.
- Ruef, P., J. M. B. Pöschl, et al. (1996). "The shear stress diffractometer Rheodyn SSD for determination of erythrocyte deformability. II. Sensitivity to detect abnormal erythrocyte deformability." Clinical Hemorheology **16**(6): 749-752.
- Rust, M. B., S. L. Alper, et al. (2007). "Disruption of erythroid K-Cl cotransporters alters erythrocyte volume and partially rescues erythrocyte dehydration in SAD mice." J Clin Invest **117**(6): 1708-17.
- Schreiber, M. and L. Salkoff (1997). "A novel calcium-sensing domain in the BK channel." Biophys J **73**(3): 1355-63.
- Si, H., W. T. Heyken, et al. (2006). "Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations and increased blood pressure in mice deficient of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel." Circ Res **99**(5): 537-44.
- Singh, S., C. A. Syme, et al. (2001). "Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic

## Literatur

---

- obstructive pulmonary disease." J Pharmacol Exp Ther **296**(2): 600-11.
- Southgate, C. D., A. H. Chishti, et al. (1996). "Targeted disruption of the murine erythroid band 3 gene results in spherocytosis and severe haemolytic anaemia despite a normal membrane skeleton." Nat Genet **14**(2): 227-30.
- Stocker, J. W., L. De Franceschi, et al. (2003). "ICA-17043, a novel Gardos channel blocker, prevents sickled red blood cell dehydration in vitro and in vivo in SAD mice." Blood **101**(6): 2412-8.
- Stocker, M. (2004). "Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels: molecular determinants and function of the SK family." Nat Rev Neurosci **5**(10): 758-70.
- Strobaek, D., T. D. Jorgensen, et al. (2000). "Pharmacological characterization of small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels stably expressed in HEK 293 cells." Br J Pharmacol **129**(5): 991-9.
- Stuart, J. (1985). "Erythrocyte rheology." J Clin Pathol **38**(9): 965-77.
- Stuart, J. and G. B. Nash (1990). "Red cell deformability and haematological disorders." Blood Rev **4**(3): 141-7.
- Tiffert, T., N. Daw, et al. (2007). "Age decline in the activity of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel of human red blood cells." J Gen Physiol **129**(5): 429-36.
- Vandorpe, D. H., B. E. Shmukler, et al. (1998). "cDNA cloning and functional characterization of the mouse Ca<sup>2+</sup>-gated K<sup>+</sup> channel, mIK1. Roles in regulatory volume decrease and erythroid differentiation." J Biol Chem **273**(34): 21542-53.
- Vergara, C., R. Latorre, et al. (1998). "Calcium-activated potassium channels." Curr Opin Neurobiol **8**(3): 321-9.
- Vermes, I., C. Haanen, et al. (2000). "Flow cytometry of apoptotic cell death." J Immunol Methods **243**(1-2): 167-90.
- Visan, V., Z. Fajloun, et al. (2004). "Mapping of maurotoxin binding sites on hKv1.2, hKv1.3, and hKCa1 channels." Mol Pharmacol **66**(5): 1103-12.
- Warth, R., K. Hamm, et al. (1999). "Molecular and functional characterization of the small Ca(2+)-regulated K<sup>+</sup> channel (rSK4) of colonic crypts." Pflugers Arch **438**(4): 437-44.
- Wei, A. D., G. A. Gutman, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 463-72.
- Wulff, H., G. A. Gutman, et al. (2001). "Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1." J Biol Chem **276**(34): 32040-5.
- Wulff, H., M. J. Miller, et al. (2000). "Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: a

## Literatur

---

potential immunosuppressant." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8151-6.

Xia, X., B. Hirschberg, et al. (1998). "dSLo interacting protein 1, a novel protein that interacts with large-conductance calcium-activated potassium channels." J Neurosci **18**(7): 2360-9.

## 6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb. 1: Struktur des <math>K_{Ca}3.1</math> (Gardos-Kanal) und der <math>K_{Ca}2.1-3</math> .....</i>	<i>4</i>
<i>Abb. 2: Phylogenetischer Baum der <math>K_{Ca}</math>-Kanäle .....</i>	<i>6</i>
<i>Abb. 3: Ionentransportwege in Erythrozyten.....</i>	<i>10</i>
<i>Abb. 4: Pharmakologie von <math>K_{Ca}3.1</math>: Block durch Clotrimazol und TRAM-34, Öffnung durch DC-EBIO.....</i>	<i>15</i>
<i>Abb. 5: Aufbau der Messkammer des Rheodyn SSD .....</i>	<i>30</i>
<i>Abb. 6: Vertikale Rohrmethode (vertical tube method) .....</i>	<i>32</i>
<i>Abb. 7: Schema eines Durchflusszytometers .....</i>	<i>35</i>
<i>Abb. 8: Progressive Splenomegalie bei <math>K_{Ca}3.1^{-/-}</math>-defizienten Mäusen .....</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 9: Gesteigerte Eisenablagerung in der roten Pulpa von <math>K_{Ca}3.1^{-/-}</math>-Mäusen.....</i>	<i>46</i>
<i>Abb. 10: Gestörte <math>Ca^{2+}</math>-abhängige erythrozytäre Volumenabnahme bei <math>K_{Ca}3.1^{-/-}</math>-Mäusen.....</i>	<i>52</i>
<i>Abb. 11: Erhöhte osmotische Fragilität der <math>K_{Ca}3.1^{-/-}</math>-Erythrozyten.....</i>	<i>55</i>
<i>Abb. 12: Keine Veränderungen der Elongationsfähigkeit bei <math>K_{Ca}3.1</math>-Störung .....</i>	<i>57</i>
<i>Abb. 13: Gestörte Filtrierbarkeit der makrozytotischen <math>K_{Ca}3.1^{-/-}</math>-Erythrozyten durch kleine Poren.....</i>	<i>59</i>
<i>Abb. 14: Keine signifikanten Unterschiede der Annexin V-positiven Zellen .....</i>	<i>60</i>

## 7 TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Temperaturprofil für die PCR-Genotypisierung.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 2: Inkubationszeiten der Erythrozyten in den verschiedenen Lösungen....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 3: Inkubations- und Waschlösungen für die Durchflusszytometrie (Konzentrationen in mmol/L, pH = 7,4, adjustiert mit NaOH).....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 4: Erythrozytenzahlen und –indizes bei <math>K_{Ca}3.1^{+/+}</math>- und <math>K_{Ca}3.1^{-/-}</math>-Mäusen ...</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 5: Keine Unterschiede im Differentialblutbild und bei den Thrombozytenzahlen.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 6: Normale Hämolyse- und Entzündungsparameter in der klinischen Chemie bei <math>K_{Ca}3.1</math>-Störung .....</i>	<i>50</i>

### **8 ANHANG**

#### **8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Lübeck waren die Damen und Herren:

Anemüller, Busch, Eggers, de Wit, Gebert, Hartmann, Hilgenfeld, Jelkmann, Keiser-Gerhus, Klinger, Mesters, Pagel, Paulsen, Peters, Schmielau, Schürmann, Wedel, Weimar, Westermann.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Albert, Alter, Aumüller, Barth, Bauer, Baum, Berger, Bösner, Christiansen, Czubayko, Dietrich, Donner-Banzhoff, Gerdes, Görg, Grimm, Hertl, Hoyer, Höffken, Kann, Klenk, Klose, Köhler, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Plant, Remschmidt, Renz, Richter, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Sesterhenn, Teymoortash, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Werner, Wulf, Wündisch.

#### **8.2 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn PD Dr. Ralf Köhler für die Überlassung des Themas und für die exzellente Betreuung meiner Dissertation,

allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und allen an diesem Projekt beteiligten für die gute Zusammenarbeit, die technische und fachliche Unterstützung und die gute Atmosphäre,

Frau Dr. Anne Brüstle für die Einarbeitung in die Durchflusszytometrie und Frau Dr. Stief für die Messung der Blutproben,

meiner Freundin, Maria Rathje, sowie meinen Eltern, für die beständige Unterstützung während der Dissertation und während meines gesamten Studiums.

### 8.3 Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Progressive Splenomegalie und Makrozytose bei  $K_{Ca3.1}$ -defizienten Mäusen: Die physiologische Bedeutung des Gardos-Kanals im Erythrozyten“ im Biomedizinischen Forschungszentrum/Fachbereich Nephrologie der Phillips-Universität Marburg unter der Leitung von PD Dr. Ralf Köhler ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.“

Die vorliegende Arbeit wurde im folgenden Publikationsorgan mit geteilter Erstautorenschaft veröffentlicht:

Grgic I., Kaistha B. P., Paschen S., et al. (2009). "Disruption of the Gardos channel ( $K_{Ca3.1}$ ) in mice causes subtle erythrocyte macrocytosis and progressive splenomegaly." **Pflugers Arch** 458(2): 291 – 302.

---

Ort	Datum	Unterschrift
-----	-------	--------------