

Aus dem Interfakultären Institut für Biochemie
der Universität Tübingen
Abteilung Biochemie III

Funktionelle Untersuchungen zur Rolle der
Aspartatprotease Cathepsin E
in Erythrozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Zeyher, Claus Constantin

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Schulze-Osthoff
2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc

Tag der Disputation: 17.03.2017

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS	I
II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG	1
1.1 Erythrozyten.....	6
1.2 Erythrophagozytose	7
1.3 Proteasen der Erythrozyten.....	8
1.4 Cathepsin E	9
1.5 Eryptose	11
1.6 Hämorphine.....	13
1.7 Ziel der Arbeit.....	15
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Häufig verwendete Materialien und Lösungen:	17
2.2 Genotypisierung der Cathepsin E KO Maus und WT Maus	19
2.3 Synthese des Cathepsin E Peptidsubstrats.....	20
2.4 Gewinnung von Erythrozyten.....	20
2.5 Aktivitätstest der KO und WT Erythrozyten	21
2.6 Gewinnung und Färben der Erythrozyten für FACS Analyse.....	21
2.7 Inkubation der Erythrozyten	22
2.8 Gewinnung und Kultur von Peritonealmakrophagen.....	23
2.9 Gewinnung und Kultur von Makrophagen aus Knochenmarksvorläuferzellen.....	24
2.10 Färben der Erythrozyten mit CFSE	24
2.11 Opsonierung der Erythrozyten mit anti-RBC Antikörpern	25
2.12 Ionomycinbehandlung der Erythrozyten für Erythrophagozytose	25
2.13 Erythrophagozytose.....	26
2.14 SDS-PAGE	26

2.15	Western Blotting	27
2.16	Bestimmung der LLV Hämorphin7-Spiegel im Serum	28
3.	ERGEBNISSE.....	29
3.1	Genotypisierung und Aktivitätstests der Erythrozyten	29
3.2	Eigenschaften der Erythrozyten und Eryptose.....	31
3.3	Erythrophagozytose verschiedener Makrophagen	35
3.4	Erythrophagozytose: Vergleich von Ionomycin-behandelten und IgG-opsonierten Erythrozyten	37
3.5	Erythrophagozytose: Vergleich von Wildtyp und Knock-out BMM Φ	39
3.6	Abbau von Hämoglobin: Vergleich zwischen WT-BMM Φ und WT-Erythrozyten und KO-BMM Φ mit KO Erythrozyten	40
3.7	Hämoglobinabbau und Cathepsin E Aktivierung: Vergleich zwischen WT –BMM Φ und KO-BMM Φ mit WT-RBC und KO-RBC.....	42
3.8	Serumkonzentrationen von LVV Hämorphin 7	44
4.	DISKUSSION.....	45
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	50
6.	DANKSAGUNG	52
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	53

II. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BMMΦ	Bone Marrow-derived Macrophages
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
cGKI	cyclic guanosine monophosphate kinase I
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
Dnp	Dinitrophenol
DTT	Dithiothreitol
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FSC	forward scatter
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
KO	Knock Out
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Time of Flight-Massenspektrometrie
MCA	7-Methoxycumarin-4-Acetyl
MCV	Mean corpuscular volume
mCTSE	murines Cathepsin E
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion

PΦ	Peritonealmakrophagen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBC	Red Blood Cells (Erythrozyten)
rm M-CSF	recombinant mouse Macrophage Colony Stimulating Factor
RP-HPLC	Reversed-Phase High-Performance-Liquid- Chromatography
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl) uronium tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Schwere Traumata mit viel Blutverlust stellen ein lebensbedrohliches Ereignis dar¹, aber auch akute und chronische Krankheiten sowie genetische Faktoren können zu einem Mangel oder einer Fehlfunktion einzelner Blutbestandteile führen. Durch eine Transfusion können bei Patienten akute oder chronische Mängelzustände ausgeglichen werden, was meistens das Überleben des Patienten sichert oder zumindest dessen Lebensqualität entscheidend beeinflusst^{2,3}. Pro Jahr werden weltweit offiziell ca. 108 Millionen Blutspenden gesammelt⁴. Die einzelnen Bestandteile des Blutes, wie z.B. Plasma, Thrombozyten und Erythrozyten werden heutzutage aufgetrennt, so dass je nach Bedarf die medizinisch erforderlichen Bestandteile transfundiert werden können. Allein in Deutschland wurden 2015 rund 3,5 Millionen Erythrozytenkonzentrate transfundiert⁵, der jährlich steigende Weltmarkt von allen Blutprodukten wird derzeit auf rund 30 Milliarden Dollar geschätzt⁶.

Nach wie vor besteht die Gefahr von Ansteckung mit Krankheitserregern wie z.B. HIV, verschiedene Hepatitisviren oder neu aufgetretene transfusionsbedingte Infektionskrankheiten⁷. Diese kann man jedoch durch vorsorgliche Diagnostik und Quarantänelagerung weitestgehend minimieren⁸.

Trotz stetig zunehmender wissenschaftlicher Erkenntnisse, größtmöglicher Vorsorge und Einhaltung transfusionsmedizinischer Richtlinien kommt es nach wie vor zu Problemen während, bzw. nach der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten. Beobachtungen innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Transfusion zeigen, dass ca. 5-10% der transfundierten Erythrozyten aus dem Empfänger-Blutkreislauf entfernt sind⁹. Bei längerer Lagerung der Konserven steigt diese Anzahl der Erythrozyten auf bis zu 25%¹⁰. Die genaue Ursache dieses Phänomens und die zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang unbekannt. Ein vorzeitiges Altern der gelagerten Erythrozyten durch äußere Einflüsse, aber auch Veränderungen der Stoffwechselprozesse in den Erythrozyten selbst werden vermutet⁹. Diese transfusionsbedingte Hämolyse führt beim Empfänger zu einer Extrabelastung, da neben weiteren

immunologischen Prozessen diese Erythrozyten aussortiert und abgebaut werden müssen. Diese Extrabelastung ist mit einem erhöhtem Risiko für Komplikationen, Folgekrankheiten, die Progression bestehender Tumorleiden, Mortalität und schlussendlich hohen Kosten verbunden^{9,11-14}.

Für den regulären Abbau und das Recycling der Erythrozyten ist eine ganze Reihe an Enzymen und Regulationsmechanismen notwendig (siehe Kapitel 1.2). Die gezielte Identifikation der seneszenten oder geschädigten Erythrozyten und deren Elimination aus der Blutbahn ist die Aufgabe von Fresszellen, den Makrophagen^{15,16}. In verschiedenen Organen des Menschen (hauptsächlich Milz, Leber, Knochenmark) kann man die sogenannte Erythrophagozytose bei normaler physiologischer Stoffwechsellage beobachten¹⁷. Die spezifische Bindung der Erythrozyten, deren Phagozytose und der anschließende Verdau bedeuten eine enorme Leistung dieser Makrophagen. Enzyme, wie Proteasen und weitere Hydrolasen sind für den eigentlichen Verdau der Proteinbestandteile verantwortlich. Der Hauptbestandteil von Erythrozyten, das Hämoglobin und diverse Membranproteine, müssen durch geeignete Proteasen und Hämoxxygenasen (für die Spaltung des Porphyrinringgrundgerüsts¹⁸) in ihre Bausteine zerlegt werden, damit diese wieder zur Neusynthese bereitstehen und nicht in den Makrophagen akkumulieren^{19,20}. Da auch der Erythrozyt selbst Proteasen besitzt (siehe 1.3), interessiert in dieser Arbeit der funktionelle Zusammenhang der erythrozytären Proteasen bei der Erythrophagozytose. Besonders in Hinsicht auf den Hämoglobinabbau ist hier die Protease Cathepsin E von Interesse²⁰.

Der folgende Abschnitt gibt eine kurze Übersicht über die Protease Cathepsin E, genaue Spezifikationen zur Rolle von Cathepsin E in Erythrozyten finden sich in Kapitel 1.4. Aus dem *Handbook of Proteolytic Enzymes*²¹ lassen sich derzeit ca. 20 Proteasen den Cathepsinen* zuordnen: Gemeinsam haben diese Proteasen ihr hauptsächliches Vorkommen in Endo- und Lysosomen. Dort besteht ihre vordringliche Aufgabe in der Prozessierung und dem Abbau von

* griech. καθεψειν für „abbauen“

Proteinen; die entsprechenden Spaltprodukte spielen komplexe Rollen bei der Signaltransduktion verschiedenster zellulärer Funktionen. Zusammen mit Cathepsin D sind beide die derzeit einzig bekannten Aspartatproteasen der Cathepsine. Unterschiede zwischen Cathepsin E und D betreffen vor allem die intrazelluläre Lokalisation, die Expression in unterschiedlichen Geweben, aber auch die Verteilung in verschiedenen Spezies^{22,23}: Dabei wird Cathepsin D eine streng lysosomale Verteilung zugeschrieben, während Cathepsin E eine breitere intrazelluläre Lokalisation aufweist und je nach Zelltyp im rauen Endoplasmatischen Retikulum, perinukleären Membranen, Golgi-Apparat oder mit dem Membran- bzw. Zytoskelett assoziiert vorliegen kann^{24,25}. Cathepsin E findet sich vornehmlich in Geweben und Zellen des Immunsystems (Thymus, Milz, cervikale Lymphknoten, Lymphozyten und peritoneale Neutrophile) sowie in sich rasch regenerierenden Organsystemen (Knochenmark, Schleimhäute des Gastrointestinaltrakts, Urogenitaltrakts, Lunge, Haut)^{23,26}. Die exakte Funktion von Cathepsin E in den verschiedenen Organen bzw. Zellen ist bis heute nicht eindeutig geklärt, in Erythrozyten ist sie nahezu vollständig unbekannt. Diskutiert werden u.a. eine Beteiligung bei der Antigenprozessierung in Zellen des Immunsystems²⁷⁻²⁹, bei antitumoralen Prozessen wie der Angiogenesehemmung und Apoptosestimulation^{30,31}, bei der Entwicklung lysosomaler Speicherkrankheiten³², Fehlregulation bei der Differenzierung von Keratinozyten mit Folge erhöhter Infektanfälligkeit³³ und der Entwicklung atopischer Dermatitis³⁴. Bei Cathepsin E Knock-out Mäusen wurden bestimmte Defizite der Immunantwort beschrieben, welche eine atopische Dermatitis begünstigen sollen³⁵. Es wird aber auch eine Beteiligung von Cathepsin E an der Alzheimer Krankheit und anderen neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben^{36,37}. Cathepsin E Knock-out Mäuse, welche für diese Arbeit benutzt wurden, zeigten allerdings keinen auffälligen Phänotyp und konnten makroskopisch und in ihrem Verhalten nicht von Wildtyp-Kontrollen unterschieden werden.

Neben all den vermuteten komplexen (patho)-physiologischen Funktionen von Cathepsin E, können bei der isolierten hydrolytischen Spaltung von Hämoglobin durch Cathepsin E weitere biochemisch aktive Peptide gefunden werden³⁸.

Diese Peptide entstehen nicht nur bei dem proteolytischen Verdau von Hämoglobin *in vitro*, sondern auch bei der Inkubation von Hämoglobin mit Peritonealmakrophagen³⁹. Diese entstehenden Peptide zeigen neben einer opioidähnlichen Wirkung (daher Hämorphine) auch regulatorische Aktivität auf den Blutdruck⁴⁰ und Blutzucker⁴¹. Genauere Informationen hierzu finden sich in Kapitel 1.6.

Neben der physiologischen Erythrophagozytose können Erythrozyten auch durch verschiedene Stimuli zu einem vorschnellen Altern bzw. Absterben getrieben werden. Da Erythrozyten weder einen Zellkern, Mitochondrien noch andere Zellorganellen besitzen, kann die klassische Apoptose (auch programmierter Zelltod genannt) nicht wie allgemein beschrieben ablaufen. Die Apoptose ist ein streng kontrollierter Prozess, der durch pro- und anti-apoptische Proteine geregelt ist. Sehr vereinfacht zusammengefasst gibt es für kernhaltige Zellen zwei Hauptwege, Apoptose auszulösen: Nach DNA-Schädigung oder zellulärem Stress werden aus Mitochondrien pro-apoptische Proteine freigesetzt, die zu einer Aktivierung der proteolytischen Caspasen-Kaskade führen und den Zelltod einleiten. Ein weiterer Mechanismus der Apoptose-Induktion wird über sog. Todesrezeptoren (z.B. CD95) reguliert, die nach Bindung ihrer Zytokin-ähnlichen Liganden die Caspase-Kaskade (beginnend mit Caspase 8/10) aktivieren. Beide Wege beeinflussen bzw. verstärken sich gegenseitig und führen schlussendlich zur Aktivierung der Caspase 3, die eine Vielzahl von Substraten spaltet und schlussendlich den programmierten Zelltods auslöst^{42,43}.

Allerdings hat man bei Erythrozyten einige Mechanismen entdeckt, die an die klassische Apoptose erinnern. Nach Behandlung mit bestimmten Stimuli zeigen Erythrozyten einige Veränderungen, die auch bei der klassischen Apoptose von kernhaltigen Zellen auftreten. Dazu gehören die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran, die Abschnürung von Membranvesikeln (sog. *membrane blebbing*) sowie eine Verminderung des Zellvolumens und ein Kaliumverlust⁴⁴. Apoptose-ähnliche Veränderungen in Erythrozyten werden deshalb als Eryptose bezeichnet (siehe Kapitel 1.5).

Bevor die detaillierte Zielsetzung und der Aufbau dieser Arbeit dargelegt werden, sollen in den nachfolgenden Kapiteln die Erythrozyten, deren Homöostase, der genaue Mechanismus der Erythrophagozytose, die Rolle der Makrophagen, die bisherigen Erkenntnisse von Cathepsin E in Erythrozyten, die Eryptose und die Bedeutung der Hämorphine dargestellt werden.

1.1 Erythrozyten und deren Homöostase

Erythrozyten stellen mit rund 5 Millionen/ μL die größte Zellpopulation im menschlichen Blut dar. Trotz ihres äußerst simplen Aufbaus sind sie für das Leben komplexer Lebewesen unerlässlich. Ihre Hauptaufgabe, sämtliche Organe des Körpers mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen, können sie aufgrund ihrer Spezialisierung zum „Gefahrstofftransporter“ für den sehr reaktiven Sauerstoff optimal erfüllen⁴⁵. Diese Spezialisierung bringt aber den fast vollständigen Verlust der Selbsterneuerung geschädigter Zellbestandteile mit sich. Erythrozyten unterliegen einer ständigen Qualitätskontrolle, bei der alte und geschädigte Erythrozyten entfernt und ersetzt werden müssen⁴⁶. Bei einer Zellzahl von 24-30 Billionen im Blut eines erwachsenen Menschen und der durchschnittlichen Lebenszeit von ungefähr 120 Tagen (bei der Maus ca. 45 Tage⁴⁷) bedeutet dies, dass pro Sekunde ca. 2-5 Millionen Erythrozyten als seneszent bzw. geschädigt erkannt, aussortiert, verdaut und ersetzt werden müssen⁴⁶. Für fast alle diese Aufgaben sind die Makrophagen des Retikuloendothelialen Systems (RES) in Milz, Leber und Knochenmark verantwortlich⁴⁸. Die beim Abbau entstehenden Aminosäuren, Lipide, Kohlenhydrate und besonders die Eisenionen stehen dem Körper für die Neusynthese von Erythrozyten wieder zur Verfügung⁴⁹. Dieses komplexe Zusammenspiel ist für die lebensnotwendige Homöostase absolute Grundlage. So werden nur ca. 1 mg Eisen pro Tag aus der Nahrung aufgenommen, während der Rest des täglich benötigten Eisens (ca. 25 mg) durch Recycling bereitgestellt wird⁵⁰. Die Regulation und Komplexität dieser Prozesse ist seit langem Bestandteil der Grundlagenforschung⁵¹. Dennoch sind die Mechanismen der Erythrozyten-Homöostase keinesfalls vollständig verstanden, zumal sie sich nicht nur auf die Erythropoese, also die Entwicklung und Synthese der Erythrozyten beschränken, sondern durch den komplexen Recyclingvorgang auch entzündliche und damit Immunreaktionen des Körpers betreffen⁵².

1.2 Erythrophagozytose

Die Erythrophagozytose, also die Phagozytose von alten und geschädigten Erythrozyten durch Makrophagen, ist seit langem Gegenstand der Forschung¹⁵. Bestimmte Veränderungen auf der Oberfläche der Erythrozyten spielen dabei als Erkennungssignal eine Hauptrolle: als entscheidende „Fresssignale“ konnten hierbei die Opsonierung der Erythrozyten mit dem Immunglobulin IgG (mit vorrausgehender Prozessierung des Bande 3 Proteins durch Proteasen^{53,54}), die Phosphatidylserinexposition an der äußeren Erythrozytenmembran⁵⁵, eine Veränderung der Glykokalix (Verlust der endständigen Sialinsäuren von Glykoproteinen) sowie strukturelle Veränderungen des membranassoziierten Zytoskeletts identifiziert werden^{46,48}.

Während des Alterungsprozesses können die Erythrozyten aufgrund fehlender DNS und Translationsmaschinerie keine Neusynthese von beschädigten Proteinen durchführen. Bei dem ständigen Transport von Sauerstoff an Hämoglobin entstehen Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche die Protein- und Membranintegrität angreifen können⁵⁶. Um sich vor einer vorzeitigen Erythrophagozytose zu schützen, können Erythrozyten Mikrovesikel abschnüren und darin geschädigte Proteine und Membranbestandteile entsorgen^{46,57}. Dies scheint unter anderem auch der Grund für die abnehmende Größe und zunehmende Dichte alternder Erythrozyten zu sein⁵⁸.

Wenn geschädigte oder gealterte Erythrozyten von Makrophagen aussortiert werden, müssen alle Bestandteile der Erythrozyten wiederverwertet werden. Der katabole Prozess beginnt nach der Phagozytose mit der Lyse des invaginierten Erythrozyts im frühen Endosom, der schrittweisen Ansäuerung mittels v-ATPasen und der Verschmelzung sogenannter Früh- und Spätendosomen^{59,15,15}. Nach der Verschmelzung mit Lysosomen verdauen die sauren Proteasen und andere Hydrolasen die phagozytierten Erythrozyten und ermöglichen so eine Wiederverwertung der erythrozytären Bestandteile. Das Porphyringerüst des Hämoglobins wird durch die Hämoxygenase (HO-1) gespalten, wohingegen das freigewordene Eisen vorerst in den Makrophagen in Ferritinclustern gespeichert wird¹⁸ und anschließend über den Blutkreislauf zu

den entsprechenden Organen mittels Transportproteinen geliefert wird. Die Proteinketten des Hämoglobins, das Zytoskelett und zytosolische Proteine werden von Proteasen zu Peptiden und Aminosäuren abgebaut und ebenfalls recycelt⁶⁰.

Dieser ganze Prozess ist sehr energieintensiv, da er eine Aktin(de)polymerisation für die Phagozytose, eine Ansäuerung der Phagosomen durch v-ATPasen sowie die Synthese der Proteasen, Hämoxygenase, Eisenspeicherproteine und dessen Transportproteine erfordert. Daher ist es nicht überraschend, wenn eine zu starke bzw. übermäßige Erythrophagozytose zu Schäden der Makrophagen selbst führt. Diese reagieren daraufhin mit Stress und schlussendlich mit dem programmierten Zelltod, der Apoptose⁶¹.

1.3 Proteasen der Erythrozyten

Das Vorhandensein verschiedener Proteasen in den Erythrozyten ist zwar seit den 1950er Jahren bekannt^{62,63}, doch ihre Bedeutung blieb bisher weitestgehend unverstanden. Klassische biochemische Proteinaufreinigungen mittels diverser Säulenchromatographien zeigten ursprünglich das Vorhandensein zweier prominenter Proteasen: eine mit einem pH-Optimum von 7,4 und eine zweite mit einem Optimum bei 3,4⁶⁴. Da die Proteasen meist als inaktive Proform in den physiologisch zirkulierenden Erythrozyten vorliegen und bei der Isolierung künstlich in ein entsprechendes Milieu überführt werden, konnte man zwar die Aktivität nach Aktivierung *in vitro* messen, aber ihre Funktion nach Aktivierung *in vivo* ist nahezu ungeklärt⁶⁵.

Nach derzeitigen Erkenntnissen ist eine dieser Proteasen Calpain, eine Calcium-abhängige zytosolische Cysteinprotease mit pH-Optimum bei 7,4. Calpain kann durch Calciuminflux autokatalytisch aktiviert werden⁶⁶. Der vermehrte Calciuminflux korreliert zum einem mit dem Alter, aber vor allem mit dem Phänomen der Eryptose (siehe 1.5) und legt daher eine erhöhte Calpainaktivität in diesen Prozessen nahe⁶⁷. Eine Calcium-abhängige Aktivierung wird außerdem während der Prozessierung des Zytoskeletts und

insbesondere des Bande 3 (Chlorid-/Hydrogencarbonat Austauscher) Proteins⁶⁸ vermutet, da hierbei eine Translokation der aktiven Protease an die Zellmembran beobachtet werden kann⁶⁷. Allerdings gibt es auch Hinweise, die auf eine proteolytische Prozessierung des Bande 3 Proteins durch die proapoptotische Protease Caspase 3 hindeuten^{69,70}.

Neben der zweiten sauren Protease mit pH-Optimum von 3,4, welche im nächsten Kapitel näher beschrieben wird, konnten durch die Verwendung von immunologischen und hochauflösenden massenspektrometrischen Techniken weitere Enzyme mit proteolytischen Eigenschaften beschrieben werden⁷¹⁻⁸⁵. Deren funktionelle Bedeutungen für den Erythrozyten und den gesamten Organismus sind aber nach wie vor relativ unverstanden.

1.4 Cathepsin E in Erythrozyten

Das Vorhandensein von Cathepsin E in Erythrozyten, genauer der katalytisch inaktiven Proform⁸⁶ an der inneren Zellmembran, ist mehrfach bestätigt worden, und viele Untersuchungen zeigen eine Aktivierung dieses Proenzym⁸⁷⁻⁸⁹. Fast alle Untersuchungen zeigten diese Aktivierung durch Aktivitätstests im sauren pH-Bereich, dem pH-Optimum dieser Protease²¹ mit denaturiertem Hämoglobin als Substrat. In diesem pH-Bereich findet allerdings eine autokatalytische Aktivierung^{86,89} statt, so dass lediglich eine intakte Form von Cathepsin E, nicht aber eine physiologische Aktivierung *in vivo* gezeigt werden konnte. Eine wirkliche physiologische Aktivierung ohne vorherige Isolation konnte bisher nicht gezeigt werden. Biochemisch gesehen handelt es sich bei der Aktivierung um die Spaltung der Peptidkette an der Stelle Met36-Ile37. Das entstehende Propeptid mit ca. 4 kDa lagert sich im aktiven Cathepsin E in einer Faltblattstruktur an⁸⁹⁻⁹². Da es nicht mehr kovalent gebunden ist, kann man es nach Denaturierung mittels Gel-Elektrophorese trennen. Dadurch kann man das aktive reife Cathepsin E mit ca. 43 kDa von der Proform im Westernblot unterscheiden.

Obwohl schon Anfang der 1950er Jahre Proteasen mit pH-Optimum im sauren Bereich in Erythrozyten gefunden wurden^{62,63,93-96}, dauerte die endgültige Klassifizierung als Cathepsin E weitere 35 Jahre^{97,98}. Gründe hierfür waren

unter anderem die große Ähnlichkeit mit der „Schwesterprotease“ Cathepsin D^{99,100}, aber auch das immer wieder beschriebene Vorkommen mehrerer saurer Proteasen von der italienischen Arbeitsgruppe um Montrapess und Pontremoli. Diese zeigten in Erythrozyten das Vorkommen von drei verschiedenen sauren Proteasen („*three acid endopeptidases*“), allerdings mussten sie feststellen, dass sich diese zwar isolieren ließen, aber dennoch auffällig gleiche Substratspezifikationen und weitere Gemeinsamkeiten besaßen^{101,102}. Interessanterweise liegt Cathepsin E im Gegensatz zu anderen Aspartatproteasen als Homodimer vor, dessen Untereinheiten durch eine Disulfidbrücke kovalent verknüpft sind. Dieses gab ihm aufgrund der Größe von ca. 90 kDa neben dem Namen *EMAP* (*erythrocyte membrane acid protease*)¹⁰³ auch die Bezeichnungen *slow-moving*⁹⁸ bzw. *HMW* (*high-molecular weight protease*)^{104,105}.

Eine erste physiologische Funktion der „sauren Endoproteasen“ wurde im Zusammenhang mit dem Abbau von prozessiertem Hämoglobin in Betracht gezogen. Bei Aktivierung der Calcium-abhängigen Protease Calpain, wird die β -Kette des Hämoglobins N-terminal prozessiert und infolgedessen an die Plasmamembran der Erythrozyten transloziert. Hier wurde der weitere Abbau durch die „sauren Endoproteasen“ diskutiert, dieser Prozess soll ATP-unabhängig sein und bei neutralem pH ablaufen¹⁰⁶. Dabei wird die Aktivität bei neutralem pH zum einem mit der speziellen N-Glykosylierung von Cathepsin E in Verbindung gebracht¹⁰⁷, andererseits aber auch mit speziellen Peptiden (sog. Aptameren), welche die Aktivität im Neutralen erhalten bzw. steigern können^{108,109}. Auch eine Änderung der Aminosäurepräferenz an der Spaltstelle, verschoben von hydrophobem Phenylalanin und Leucin hin zu basischem Arginin, wurde beschrieben¹¹⁰.

Eine weitere Freisetzung von Cathepsin E von der Zellmembran bzw. von dem Zytoskelett in das Zytosol wurde in alternden Erythrozyten nach der Behandlung mit Phenylhydrazin als „Aktivierung“ beschrieben¹¹¹. Auch bei der in Europa, besonders im Mittelmeerraum vorkommenden Erkrankung des Favismus, einem Mangel der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Erythrozyten, wurden Veränderungen der Proteasen-Aktivität und Lokalisation

beobachtet. Dabei wurde die Ablösung der „sauren Endoproteasen“ - vermeintlich Cathepsin E - von der Membran beschrieben^{78,79}. Welche genaue Bedeutung diese Ablösung von der inneren Zellmembran bzw. dem dort anhaftendem Zytoskelett hat, ist derzeit unbekannt. Eine klassische biochemische Aktivierung wie oben beschrieben konnte nicht gezeigt werden.

1.5 Eryptose

Die Eryptose ist ein Kunstwort und beschreibt Apoptose-ähnliche Prozesse in Erythrozyten. Da Erythrozyten weder einen Zellkern, Mitochondrien noch andere Zellorganellen besitzen, kann die klassische Apoptose nicht wie allgemein in der Einleitung beschrieben ablaufen. Umstritten ist, ob wie bei der klassischen Apoptose, sowohl Caspase 3 und 8, als auch der Todesrezeptor CD95 eine Rolle spielen¹¹²⁻¹¹⁴. Unabhängig dieser Fragen führten die Beobachtungen um Prof. F. Lang am Physiologischen Institut der Universität Tübingen zu weiteren wichtigen Erkenntnissen der Eryptose: So ist einer der Hauptauslöser eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration¹¹⁵. Gründe für diese Konzentrationserhöhung können osmotischer Schock, oxidativer Stress, Energiedepletion und der Verlust von extrazellulärem Chlorid sein, die allesamt zur Öffnung von Kationenkanälen und somit zum Calciuminflux führen¹¹⁶⁻¹¹⁸. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin E₂ (PGE₂) zu einem vermehrten Calciumeinstrom führt. Die erhöhte Bildung von PGE₂ durch die Cyclooxygenase in den Erythrozyten selbst konnte besonders bei osmotischem Schock und bei Entfernung des extrazellulären Chlorids beobachtet werden^{119,120}. Weitere Faktoren wie der *platelet-activating factor* (PAF) führen zur Aktivierung einer membranständigen Sphingomyelinase und damit zur Ceramidproduktion, die über eine Calcium-unabhängige Aktivierung der Scramblase eine Apoptose-typische Exposition von Phosphatidylserin bewirken kann¹²¹.

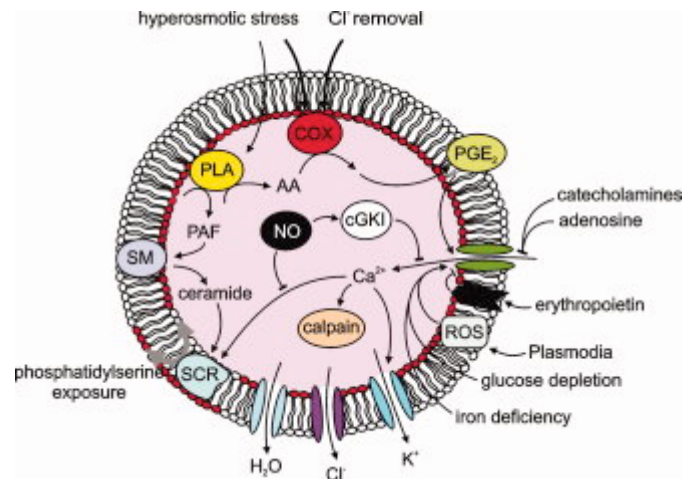


Abbildung 1.1: aus¹²²: Signalwege der Eryptose bei Stimulierung und Inhibition des Calciuminflux und der Ceramidproduktion. Die Effekte betreffen das Zellvolumen, die Phosphatidylserinexposition und die Aktivierung von Calpain, cGKI, cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I. COX, Cyclooxygenase; NO, Stickstoffmonoxid; PAF, platelet-activating factor; PGE, Prostaglandin E₂; PLA, Phospholipase A; ROS, Reaktive Sauerstoffspezies; SCR, Scramblase

In **Abbildung 1.1** sind diese Vorgänge schematisch dargestellt, welche unter anderem die maßgeblichen Effekte der Eryptose umfassen¹²²:

- Durch Öffnung eines Calcium-sensitiven Kaliumkanals (Gardos-Kanal) kommt es zu einem Verlust von intrazellulärem Kalium. Die Folge ist eine Hyperpolarisation und ein gesteigerter Efflux von Chlorid-Ionen, der durch Verlust von KCl und Wasser eine Abnahme des Zellvolumens bewirkt.¹²³
- Die Calcium- und Ceramid-sensitive Scramblase hebt die Asymmetrie von Phosphatidylserin in der Plasmamembran auf, wodurch es zu vermehrter Exposition von Phosphatidylserin auf der Zellaußenseite kommt, die durch Annexin V-Bindung nachgewiesen werden kann.
- Die Calcium-abhängige Protease Calpain, genauer die Isoform μ -Calpain, wird aktiviert und prozessiert bestimmte Proteine, wie z.B. Ankyrin des Zytoskeletts und Hämoglobin.

Weitere Stimuli und Mechanismen konnten bereits gefunden werden und werden auch zukünftig Bestandteil der Forschung sein^{124–131}. Da bei der Eryptose auch die Aktivierung der Protease Calpain beschrieben wird, ist die

genaue Funktion der Proteasen in diesem Zusammenhang seit Jahrzehnten nicht weiter verfolgt worden¹³². Interessant ist die Fragestellung, ob weitere Proteasen eine Rolle bei der Eryptose spielen bzw. in Folge dieser Vorgänge aktiviert werden. Berichtet wurde eine Aktivierung der Cystein- (Calpain, Caspasen) und Aspartat-Proteasen (Cathepsin E als einzige Aspartatprotease in Erythrozyten) bei oxidativem Stress⁷⁰. Weitere Beschreibungen über die Funktionen der Proteasen sind im Zusammenhang mit der Eryptose bisher nicht veröffentlicht.

1.6 Hämorphine

Hämorphine sind kleine Peptide mit einer Länge von ca. 7-10 Aminosäuren, welche aus dem Vorläuferprotein Hämoglobin entstehen. Die Entdeckung dieser Peptide mit morphinähnlichen Wirkungen an Opiodrezeptoren führte zu dem Namen Hämorphin³⁸. Peptide mit morphinähnlicher Wirkung wurden erstmalig nach enzymatischer Verdauung von Casein gefunden und daher als Casomorphine bezeichnet¹³³. Auch aus dem mitochondrialen Cytochrom b konnte das sog. Cytochromin abgeleitet werden. In **Tabelle 1.1** ist eine Übersicht der Peptide zusammengefasst¹³⁴.

Weitere Peptide mit morphinähnlicher Wirkung, welche bei der Verdauung von Nahrungsmitteln entstehen können, wurden in Anlehnung an die körpereigenen Endomorphine als Exomorphine bezeichnet¹³⁵.

Hämorphine können nicht nur Opiodrezeptoren aktivieren, sondern auch die Aktivität einer Reihe weiterer Enzyme wie *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE)¹³⁶ und *Dipeptidyl Peptidase IV* (DPP IV) beeinflussen¹³⁷. Ein blutdrucksenkender Effekt der Hämorphine konnte in Ratten gezeigt werden⁴⁰. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Serumspiegel von VV-Hämorphin 7 in Patienten mit Diabetes (Typ I und II) und Übergewicht signifikant niedriger sind als bei gesunden Probanden^{41,138}. Als Ursache der niedrigeren Spiegel wurde erhöhtes glykosyliertes Hämoglobin HbA_{1C} vermutet, welches dadurch einer verminderten Prozessierung unterliegen könnte. Dies konnte jedoch bei dem Verdau des entsprechenden HbA_{1C} von Diabetes-Patienten durch

Cathepsin D nicht gezeigt werden¹³⁹. Die proteolytische Freisetzung der Hämorphine LVV- und VV-Hämorphin 7 aus Hämoglobin ist durch die Aspartatproteasen Cathepsin D und Pepsin gezeigt worden¹⁴⁰. Die Substratspezifität von Cathepsin D und E ist nahezu identisch, weshalb eine andere Arbeitsgruppe die Freisetzung von LVV-Hämorphin 7 durch Cathepsin E vermutet¹⁰⁴.

Tabelle 1.1: Die Aminosäuresequenzen einiger nicht-klassischer Opioid Peptide nach¹³⁴

Vorläuferprotein	Peptid	Struktur
Hämoglobin (human und bovin)	Hämorphin 4	Tyr-Pro-Trp-Thr
	Hämorphin 7	Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe
	VV-Hämorphin 7	Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe
	LVV-Hämorphin 7	Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe
	Valorphin	Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln
	Spinorphin	Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr
β-Casein (human)	β-Casomorphin 5	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu
	β-Casomorphin 8	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile-Pro
β-Casein (bovin)	β-Casomorphin 5	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly
	β-Casomorphin 7	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile
Mitochondriales Cytochrom b	Cytochrophin 4	Tyr-Pro-Phe-Thr

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die physiologische Aktivierung der sauren Aspartatprotease Cathepsin E in Erythrozyten zu analysieren. Dabei sollte die Hypothese untersucht werden, ob Cathepsin E im Erythrozyten bei neutralem pH-Wert zunächst als inaktive Proform vorliegt und nach der Erythrophagozytose im sauren Milieu der Makrophagen aktiviert wird. Eine derartige Aktivierung könnte das Recycling von phagozytierten Erythrozyten beschleunigen. Dazu wurde zunächst ein Modell für die Erythrophagozytose etabliert, bei dem verschiedene Makrophagen und Markierungsmethoden für die Analyse der Erythrophagozytose mittels FACS optimiert wurden. Die quantitative Beteiligung des erythrozytären Cathepsin E an dem katabolen Prozess nach der Erythrophagozytose sollte durch den Vergleich der Hämoglobindegradation von Erythrozyten aus Wildtyp- und Cathepsin E Knock-out-Mäusen bestimmt werden.

Weiterhin sollte der Einfluss des genetischen Fehlens von Cathepsin E auf die Eryptose untersucht werden. Hierzu sollten Erythrozyten aus Wildtyp- und Cathepsin-E Knock-out Mäusen hinsichtlich Eryptose-typischer Veränderungen wie der Abnahme des Zellvolumens, der Phosphatidylserinexposition und des Calciuminfluxes verglichen werden. Dazu wurden die Erythrozyten unterschiedlichen Stimuli ausgesetzt, welche zum einen die natürliche Eryptoseinduktion nach Isolation *ex vivo*, zum anderen Veränderungen der Osmolarität, Glucoseentzug (Energiedepletion) und die direkte Induktion der Eryptose mittels Ionomycin umfassten.

Serumanalysen sollten Aufschluss geben, ob der Knock-out von Cathepsin E zu einem signifikanten Unterschied der Serumspiegel von Hämophinen führt. Dies wäre ein weiterer wichtiger Hinweis auf die eigentliche physiologische Aufgabe von Cathepsin E in Erythrozyten und dessen Auswirkungen auf den gesamten Organismus.

Zusammengefasst war das Ziel dieser Arbeit die Beantwortung folgender Fragen:

1. Wird die Proform von Cathepsin E nach der Erythrophagozytose in Makrophagen aktiviert?
2. Ist Cathepsin E als aktives Enzym bei dem Verdau von Hämoglobin beteiligt?
3. Wird durch den Knock-out von Cathepsin E die proteolytische Aktivität im sauren pH-Bereich in Erythrozyten ausgeschaltet?
4. Hat der Knock-out Auswirkungen auf die Phänomene der Eryptose durch verschiedene Stimuli?
5. Gibt es Unterschiede im Serumspiegel der Hämorphine zwischen Wildtyp und Cathepsin E Knock-out Mäusen?

2. Material und Methoden

2.1 Häufig verwendete Materialien und Lösungen:

Alle Standard-Chemikalien, die nicht näher aufgeführt sind, wurden von den Firmen Roth, Sigma, Applichem oder der Universitätsapotheke Tübingen bezogen.

5p8-Puffer	5 mM Tris Base pH 8,0
DNA Loading Dye 5x	30% (v/v) Glycerin; 0,2% (w/v) Orange G
Ohrbiopsat-Lysepuffer	1 mg/ml <i>Proteinase K</i> (stock: 20 mg/ml in Tris-HCl pH 8,0 + 50% Glycerin) in 0,5x <i>Pfx Amplification Buffer</i>
Lysepuffer	20 mM Tris Base; 1% Triton-X-100, pH 8,0
Polyacrylamid Gele (12/16 %)	12/16% (w/v) Polyacrylamid (Roth); 37,5% (v/v) 1 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; 0.04% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) APS
Sammelgel	4% (w/v) Polyacrylamid; 12,7% (v/v) 0.5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,04% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) APS
RBC Lysepuffer	140 mM NH ₄ Cl; 17 mM Tris Base, pH 7,2

Ringer-Lösung	125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ , 32 mM HEPES, 5 mM Glucose, 1 mM CaCl ₂ , pH 7,4
SDS PAGE Probenpuffer 5x	10% (w/v) SDS; 10 mM DTT; 20% (v/v) Glycerin; 20% (v/v) 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,05% Bromphenolblau
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	250 mM Tris Base; 1,92 M Glycin; 1% (w/v) SDS
TAE 50x	2 M Tris Base; 5.71% Eisessig; 50 mM EDTA, pH 8,0
TBS-T (10x)	0.5 M Tris Base; 1.5 M NaCl; pH 7,5; 0.5% (v/v) Tween20
Transferpuffer (10x)	250 mM Tris Base; 1.92 M Glycin; 20% (v/v) Methanol

2.2 Genotypisierung der Cathepsin E KO Maus und WT Maus

Die Mäuse wurden durch eine Triple PCR (*Pfx platinum* DNA Polymerase System; Invitrogen) genotypisiert. Die PCR erfolgte durch die Verwendung des durch Ohrmarkierung gewonnenen Gewebestücks. Dieses wurde über Nacht bei 56°C mit 50 µl Ohrbiopsat-Lysepuffer verdaut. Die PCR erfolgte in 20-µl Ansätzen nach Hersteller-Angaben mit Endkonzentrationen von 300 µM dNTPs, 1 mM MgSO₄, 1x *Pfx Amplification Buffer*, 2x *PCR_x enhancer solution*, 1 µl DNA template (Ohr-Lysat), 0,02 u/µL *Pfx DNA polymerase* und je 300 nM Primern (Sigma):

mCTSE forw 5' AGC-CCC-ATC-TTC-AAC-CTA 3' (coding)

mCTSE rev 5' CCA-CCG-GGC-TAT-CTC-AG 3' (non coding)

neo 756-777 5' CGG-AGA-ACC-TGC-GTG-CAA-TCC 3' (non coding)

Durchgeführt wurde die PCR in *EP Gradient Thermocyclern* (Eppendorf) mit initialer Denaturierung (94°C 5 min), gefolgt von 35 Zyklen mit Denaturierung (94°C 15 sec), Annealing (55° C 30 sec), Elongation (68°C 1 min), dann finale Elongation (68° C 10 min) und Kühlung auf 4°C bis Entnahme. Nach Mischen mit 5 µl DNA *Loading Dye* erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte bei 120-140 V in PerfectBlue Gelsystem Midi S (Peqlab) mit 1,5% (w/v) *GenAgarose LE* (Genaxxon) in 1x TAE und 3 µl *Midori Green Advance* (Nippongenetics) pro 100 ml Agarosegel. 5 µL *GeneRulerTM 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas) dienten als Marker zur Identifizierung der Banden im *Cybertech UV Transilluminator* (Cybertech CS 1; λ = 295 nm oder λ = 365 nm).

Zu erwartende Banden:

WT (+/+): Bande bei 373 bp

CTSE KO (-/-): Bande bei ~ 500 bp

Heterozygot (+/-): 2 Banden bei 373 und ~ 500 bp

2.3 Synthese des Cathepsin E Peptidsubstrats

Die Aktivität von Cathepsin E wurde mittels eines intern gequenchten FRET-Peptidsubstrats (MCA-GKPILFFRL-Lys(Dnp)-*D*-Arg-NH₂) getestet. Die Synthese und Reinigung erfolgten wie beschrieben¹⁴¹. Dazu wurde auf Polystyrol-Tritylchlorid-Harz (Intavis) mittels Fmoc/*t*Bu Festphasen-Peptidsynthese in DMF mit 4-fachem Überschuss an Fmoc-*L*-Aminosäure (Multisynthech), Kopplungsreagenz TBTU, und der Base *N*-Methylmorpholin, je Kopplung synthetisiert. Die Abspaltung vom Harz und der Schutzgruppen erfolgte durch Inkubation für 2 h bei RT in TFA, 5% H₂O, 5% Thioanisol und Spuren von Phenol. Mittels steigenden Acetonitrilgradienten bei der RP-HPLC (System A: 0,055% TFA, System B: 0,047% TFA, 80 % ACN) wurde die Aufreinigung durchgeführt und die Reinheit kontrolliert (präparativ: Reprosil100 C8 5 µm (150×10 mm); analytisch: Reprosil-Pur Basic C18 5 µm (150×2 mm) beide Säulen von der Firma Dr. Maisch); mit einer Merck Hitachi L-6200 Pumpe ausgestattet mit einem L-4000A UV-Detektor (214 nm). Die Masse wurde mittels MALDI-TOF-MS (Reflex IV, Bruker Daltonik) mit DHB als Matrix bestätigt [M+H]⁺=1756,04. Nach Lyophilisation wurde das Substrat als 1 mM Stammlösung in 10% DMSO aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.4 Gewinnung von Erythrozyten

Erythrozyten wurden durch Punktion der *V. facialis* mit einer Lanzette (Feather Blood Lancet[®]) gewonnen. Dies wurde in Übereinkunft mit den Empfehlungen der GV-SOLAS "Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren" durchgeführt (Anzeige RP Tübingen \$4/6 Mai 2013). Etwa 100-150 µl Blut wurden bei 8-12 Wochen alten Mäusen direkt in PBS mit 0,2% EDTA getropft. Anschließend wurde 20 min bei 120 g und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die vollständige Entfernung der übrigen Blutbestandteile ermöglichte die Verwendung von Histopaque[®] 1119 (Sigma) nach Angaben des Herstellers. Nach Zentrifugation bei 700 g für

30 min wurde der Überstand verworfen und durch dreimaliges Waschen (1500 g, 3 min, 4° C) mit PBS wurden alle Rückstände entfernt. Erythrozyten wurden anschließend sofort verwendet oder maximal über Nacht bei 4°C gelagert. Zum Vergleich von humanen und murinen RBC wurde mit einer 20G Safety-Multifly[®] (Sarstedt) und einer EDTA-Monovette[®] humanes Blut aus der *V. cubiti* entnommen und die RBC wie oben beschrieben isoliert.

2.5 Aktivitätstest der KO und WT Erythrozyten

Die Bestätigung des Knock-outs wurde sowohl auf genetischer als auch auf Proteinebene durchgeführt. Neben Westernblot-Analyse (siehe 2.15) wurde die Aktivität bei pH 2,5 und pH 4,0 getestet. Dazu wurde 1 vol RBC hypoton mit 10 vol 5p8 lysiert, zentrifugiert (20800 g 15 min 4° C), der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach dreimaligem Waschen erhielt man nahezu hämoglobinfreie „ghosts“. In Fluoreszenz-kompatiblen 96-Loch-Platten wurde 85 µl Citrat-Puffer (250 mM pH 2,5) bzw. NaAcetat-Puffer (250 mM pH 4,0) vorgelegt, und 5 µl ghosts gut vermischt. Kurz vor Messbeginn wurden 10 µl 0,1 mM Substrat hinzugefügt und nach Mischen sofort gemessen (Tecan Infinite M200; Excitation 320 nm, Emission 405 nm). Die Kinetik wurde über 20 min minütlich mit der Software i-control (TECAN) aufgezeichnet.

2.6 Gewinnung und Färben der Erythrozyten für FACS Analyse

FACS-Analysen wurden in Kooperation mit der AG Prof. Florian Lang (Physiologisches Institut, Universität Tübingen) anhand etablierter Protokolle¹⁴² durchgeführt. RBC wurden durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit Heparin als Antikoagulanzen gewonnen. RBC wurden zweimal mit Ringerlösung gewaschen (120 g 20 min RT) und alle restlichen Blutbestandteile entfernt. Die

Inkubation der RBC fand in 0,4% Hämatokrit der entsprechenden Lösungen statt.

Frisch gewonnene RBC wurden sogleich auf ihre Phosphatidylserinexposition bzw. zytosolische Calciumkonzentration untersucht. In den jeweiligen Lösungen inkubierte RBC wurden abzentrifugiert (1500 g, 3 min, RT), mit Ringerlösung (+ 5 mM CaCl₂) gewaschen und in 50 µl Ringerlösung (+ 5 mM CaCl₂) resuspendiert. Dann wurde die RBC Suspension 20 min im Dunkeln mit 1:500 Annexin-V-FLUOS *Staining Kit* (Roche) nach Herstellerangaben gefärbt. Bei Bedarf wurden weitere 50 µl RBC Suspension in Ringerlösung (+ 5 mM CaCl₂) mit dem Calcium-Farbstoff Fluo-3/AM (2 µM; Calbiochem, Bad Soden) für 20 min im Dunkeln gefärbt, zweimal mit Ringerlösung (+ 5 mM CaCl₂) gewaschen und anschließend in 200 µl Ringerlösung resuspendiert. Beide gefärbten Suspensionen wurden sogleich im *forwardscatter* (FSC) als auch im Fluoreszenzkanal FL-1 (Excitation 488 nm; Emission 530 nm) in einem FACS Calibur Durchflusszytometer (BD, Heidelberg) analysiert¹⁴³.

2.7 Inkubation der Erythrozyten

Um Unterschiede zwischen KO und WT Erythrozyten hinsichtlich ihrer Eigenschaften und ihres Eryptoseverhaltens zu analysieren, wurden verschiedene Medien und Inkubationszeiten eingesetzt.

- RBC wurden für 24 bzw. 48 h bei 37° C in Ringerlösung mit 5 mM Glucose inkubiert. Die dadurch resultierende Schädigung bzw. Eryptose (Zellschrumpfung und Phosphatidylserinexposition) wurde mittels FSC und Annexin-V Bindung (siehe 2.6) detektiert.
- RBC wurden für 12 h bei 37°C ohne Glucose in Ringerlösung inkubiert. Die dadurch resultierende Eryptose (Zellschrumpfung und Phosphatidylserinexposition) wurde mittels FSC und Annexin-V Bindung (siehe 2.6) detektiert¹⁴⁴.
- RBC wurden einem hypertonen Schock in 850 mOsmol Ringerlösung für 2 h bei 37° C ausgesetzt. Die Erhöhung der Osmolarität erfolgte durch

Zugabe von entsprechender Menge Saccharose. Anschließend erfolgte die Analyse des FSC und der Annexin-V-Bindung (siehe 2.6).

- Die induzierte Eryptose mittels Ionomycin durch artifiziellen Calciuminflux wurde wie folgt durchgeführt: Die RBC wurden für 30 min bei 37° C mit 1 µM Ionomycin (Sigma) in Ringerlösung inkubiert. Anschließend erfolgte wieder die Analyse des FSC und der Annexin-V-Bindung (siehe 2.6).

2.8 Gewinnung und Kultur von Peritonealmakrophagen

Peritonealmakrophagen wurden nach einem etablierten Protokoll isoliert¹⁴⁵. Mäuse im Alter zwischen 8-20 Wochen wurden nach Isoflurannarkose durch cervikale Dislokation getötet, anschließend auf dem Rücken fixiert und mit 70% Isopropanol desinfiziert. Durch eine Längsinzision wurde die muskuläre Bauchdecke eröffnet, das Peritoneum blieb vollständig intakt. Die Punktion der Peritonealhöhle erfolgte mit einem 24 G 0,7x19 mm Insyte[®] Katheder (BD). Nach Einbringen von 10 ml eiskaltem PBS und vorsichtiger Massage konnten primäre Peritonealmakrophagen (PMΦ) aspiriert werden. Diese wurden sogleich abzentrifugiert (500 g, 5 min, 4° C) und in 5-10 ml *DMEM/high glucose* (Life Technologies), supplementiert mit 10% (v/v) FCS (Life Technologies) und 1x *MycoZapPlusCL* (Lonza) Antibiotika aufgenommen (nachfolgend PMΦ-Medium genannt). Nach Bestimmung der Zellzahl (Neubauer-Kammer) wurden die Zellen à 500.000/Loch in einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 2 h Adhärenzzeit wurden nicht oder schwach adhärierende Zellen mit PMΦ-Medium abgesaugt und die fest adhärenen Zellen viermal mit PMΦ-Medium gespült. Die Kultivierung erfolgte für 12-36 h bei 37°C, 5% CO₂, 20% O₂ und hoher Luftfeuchtigkeit (Thermo Scientific). 12 h vor den Versuchen wurde das Medium erneuert.

2.9 Gewinnung und Kultur von Makrophagen aus Knochenmarksvorläuferzellen

Knochenmarksmakrophagen wurden nach einem etablierten Protokoll isoliert.¹⁴⁵ Vorzugsweise wurden die für die Entnahme der PM Φ bereits getöteten Mäuse verwendet. Nach Entfernung des Muskel- und Bindegewebes von Femur und Tibia wurden die proximalen und distalen Enden der Knochen entfernt und das Knochenmark mit einer 25 G Kanüle und 10 ml BMM Φ -Medium (*DMEM/Ham's F12*, supplementiert mit 10% (v/v) FCS (Life Technologies), 30 ng/ml rm M-CSF (Immunotools) und 1x *MycoZapPlusCL* (Lonza) Antibiotika, ausgespült. Die direkte Separation mittels 40 μ m Zellsieb (BD) ergab eine feine Suspension der Vorläuferzellen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in unbeschichteten Zellkulturflaschen (175 cm², 20 ml BMM Φ -Medium/Maus) in sauerstoffarmer Atmosphäre (5% CO₂, 5% O₂) bei 37°C und hoher Luftfeuchtigkeit. Nach 2 Tagen wurden weitere 20 ml BMM Φ -Medium zugefügt, nach 4 Tagen 40-50 ml Medium ersetzt. Nach 6 Tagen wurden die adhären Zellen mit PBS gewaschen und weiter in BMM Φ -Medium kultiviert bzw. 12-24 h vor dem Versuch mit einem Zellschaber geerntet und à 500.000 Zellen/Loch in einer 24 Loch-Zellkulturplatte ausgesät.

2.10 Färben der Erythrozyten mit CFSE

Für die intrazelluläre Färbung der Erythrozyten wurde der Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester des *CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit* (Molecular Probes/Life Technologies) nach Herstellerangaben verwendet. Geringe Modifikationen des Protokolls¹⁴⁶ wurden wie folgt vorgenommen: 50 μ l gereinigte zentrifugierte RBC (ca. 50x10⁷ RBC) wurden in 1 ml PBS mit 5 mM CFSE (gelöst in DMSO) schnell und ausgiebig gemischt. Einer 15 minütigen Inkubation bei 37°C im dunklen Wasserbad folgte eine 30 minütige Inkubation bei selben Bedingungen mit 14 ml Zellkulturmedium (PM Φ -Medium) zur Inaktivierung des überschüssigen CFSE. Während der

Inkubation im Wasserbad wurde vorsichtig gemischt, um eine Sedimentation zu verhindern. Anschließend wurden die RBC dreimal mit 15 ml PBS gewaschen (1500 g, 3 min RT). Die Färbung erfolgte direkt vor der Opsonierung bzw. Ionomycinbehandlung.

2.11 Opsonierung der Erythrozyten mit anti-RBC Antikörpern

Die Opsonierung der RBC mit *Mouse Red Blood Cell RBC Antibody* (Rockland) erfolgte nach Gottlieb et al.¹⁴⁷. Der nach Herstellerangaben rekonstituierte Antikörper wurde aliquotiert und bei -80° C gelagert. Zur Opsonierung wurden 20 µl Antiserum in 1 ml PBS verdünnt und mit 50 µl gefärbten RBC schnell und ausgiebig gemischt. Während der 15-minütigen Inkubation bei 37° C im dunklen Wasserbad wurde vorsichtig gemischt, um eine Sedimentation zu verhindern. Anschließend wurde viermal mit je 15 ml PBS gewaschen (1500 g, 3 min RT). Nach jeder Zentrifugation wurden die RBC vorsichtig durch Trituieren vereinzelt und für das Erythrophagozytose-Experiment verwendet.

2.12 Ionomycinbehandlung der Erythrozyten für Erythrophagozytose

Die induzierte Phosphatidylserinexponierung der RBC erfolgte durch Calciuminflux mittels des Calciumionophors Ionomycin (Merck Millipore). Dazu wurden die bereits gefärbten RBC in 1 ml PBS mit 2 mM CaCl₂ und 1 µM Ionomycin (gelöst in DMSO) schnell und ausgiebig gemischt. Während der 15 minütigen Inkubation bei 37° C im dunklen Wasserbad wurde vorsichtig gemischt, um eine Sedimentation zu verhindern. Anschließend wurde viermal mit je 15 ml PBS gewaschen (1500 g, 3 min RT). Nach jeder Zentrifugation wurden die RBC vorsichtig durch Trituieren vereinzelt. Die RBC wurden sofort für die Erythrophagozytose verwendet.

2.13 Erythrophagozytose

Für die Erythrophagozytose wurden die gefärbten und opsonierten RBC mit dem entsprechenden Medium verdünnt, so dass sich durch Zugabe von 50 µl RBC-Suspension ca. 50×10^6 RBC pro Loch befanden (Verhältnis von Makrophagen zu RBC 1:100). Als Negativ-Kontrolle wurde 10 µM Cytochalasin D, ein Inhibitor der Aktin-Polymerisation und Invagination der adhären RBC, 60 min vor der Erythrophagozytose zugegeben. Die RBC wurden für 60 min auf mit den Makrophagen inkubiert. Anschließend wurden die nicht phagozytierten RBC abgesaugt, die Kulturgefäße zweimal mit PBS gewaschen, und für 5 min mit RBC-Lysepuffer inkubiert. Danach wurde je zweimal mit PBS und entsprechenden Medium gewaschen. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Verdauungsphase der Erythrozyten über 24 h verfolgt. Dabei wurden die Zeitabstände 0, 4, 7, 9, 11 und 24 h untersucht. Hierbei wurde das Medium abgesaugt und die Makrophagen mit 1 ml Medium losgespült. Die vollständige Ablösung wurde mikroskopisch kontrolliert.

Die fluoreszierenden Makrophagen wurden sofort im FACS (LSRII FACS Device; Becton Dickinson mit FACS Diva Software) gemessen. Hierzu wurden 50000 Makrophagen im Gate gewertet. Die restlichen Makrophagen wurden abzentrifugiert (20800 g 5 min 4° C) und mit 50 µl Lysepuffer plus 1x *Halt Protease Inhibitor Cocktail* (Pierce/Thermo Scientific) 30 min auf Eis lysiert. Die Proben wurden anschließend gut gemischt und bei -20° C gelagert.

2.14 SDS-PAGE

Entsprechende Proben wurde mit 5x SDS PAGE Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in selbstgegossenen Polyacrylamid-Gelen mit SDS-Laufpuffer (Biorad *Mini-Protean II* System; 15 well: 15 µl; 10 well: 20 µl Lysat oder entsprechende Anzahl Erythrozyten). Eine Proteinquantifizierung erfolgte nicht, da die Maximalmenge Lysat gebraucht wurde für die Detektion des Cathepsin E, das in den Proben die Detektionsgrenze erreichte. *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*

(Fermentas) diente als Größenmarker. Die Spannung wurde für 15 min bei 100 V konstant gehalten und anschließend bei 150 V bis zur gewünschten Auftrennung. Alternativ wurden NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 12 Well (Novex/ Life Technologies) Gradientengele verwendet. Als Puffersystem wurde MOPS-Puffer nach Herstellers Angaben verwendet.

2.15 Western Blotting

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele zwischen Whatman-Filtern auf eine PVDF-Membran (GE Healthcare) mittels *Mini-Protean tank blotting system* (Biorad) für 90 min bei 90 V mit gekühltem Transferpuffer geblottet. Anschließend wurde die Membran für 30-60 min mit 5% *nonfat dry milk* (AppliChem) in TBS-T blockiert, und über Nacht mit dem entsprechenden Primärantikörper (1:1000; 4% BSA und 0,05% NaN₃ in TBS-T) bei 4° C inkubiert. Nach dreimaligen Waschen für 15 min erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:10000; 4% BSA in TBS-T) für 60 min bei RT. Nach erneutem Waschvorgang wurde mittels *ECL Western Blotting Substrate kit* (Promega) und *Ultra Cruz Blue Autoradiography films* (Santa Cruz) detektiert.

Primärantikörper:

anti-Hämoglobin β (M-19)	goat IgG	Santa Cruz sc-31116
anti-Mouse Cathepsin E	goat IgG	R&D Systems AF1130
anti-Lamin A/C	rabbit IgG	Cell Signalling #2032

Sekundärantikörper:

donkey anti- goat IgG-HRP	Santa Cruz sc-2020
anti- rabbit-HRP IgG (H+L) HRP Conjugate	Promega W401B

2.16 Bestimmung der LLV Hämorphin 7-Spiegel im Serum

Mäuseblut wurde wie in 2.4 beschrieben gewonnen, allerdings ohne Verwendung eines Antikoagulanzen. Nach 30 min wurde das koagulierte Blut abzentrifugiert (1500 g, 15 min, RT) und das Serum abgenommen. Die Bestimmung des LLV Hämorphin 7-Spiegels erfolgte durch ein ELISA Kit (Enzo Life Science; ADI-900-205; Lot No. 01291332) nach Herstellersangaben. Je 5 µl Serum wurden mit 95 µl Assay Buffer 16 verdünnt (1:20) und für den ELISA verwendet. Die Absorption des entstandenen Indikators wurde bei 405 nm photometrisch bestimmt (Tecan Infinite M200). Die Bestimmung der Serumproben erfolgte durch Verwendung der GraphPad Prism Software Version 6 (sigmoidal fit, 4PL), definiert durch die Eichung mittels Standardkurve laut Herstellerangaben.

3. Ergebnisse

3.1 Genotypisierung und Aktivitätstests der Erythrozyten

Um funktionelle Untersuchungen durchzuführen zu können, war es notwendig, ein Mausmodell mit einem genetischen Knockout für Cathepsin E (CTSE) zu verwenden. Die Mäuse mit FVB/N Hintergrund stammten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Reinheckel (Universität Freiburg). Die Zucht erfolgte primär mit homozygoten Zuchtpärchen. Die Genotypisierung diente in regelmäßigen Abständen zur Kontrolle und evtl. heterozygoter *littermate* Zucht. Dabei wurde ein durch Ohrbiospie gewonnenes Gewebestück nach Proteinase K-Verdau mittels Triple-PCR mit den Primern für mCTSE und der neo-Kassette, welche für den Knockout eingeführt wurde, getestet. **Abbildung 3.1** zeigt die PCR-amplifizierten Genprodukte mit den erwartenden Banden von 373 bp für den Wildtyp (WT) und ca. 500 bp für den Knockout durch den Einschub der Neokassette.

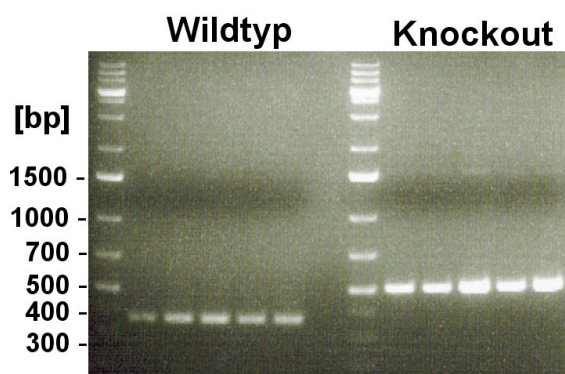


Abbildung 3.1: Genotypisierung der FVB/N-Background Mäuse. Links: Wildtyp mit einem PCR Produkt von 373 bp, rechts Knockout PCR-Produkt mit ~500 bp durch neo-Kassetten-Einschub. Gewebeproben von 6-8 Wochen alten Mäusen (je 5) wurden durch Ohrbiospie gewonnen, mit Proteinase K über Nacht lysiert und mit Primern für mCTSE und Neo-Kassette mittels Triple-PCR typisiert.

Die Kontrolle des KO erfolgte nicht nur auf genetischer Ebene, sondern auch auf Proteinebene. Erythrozyten enthalten weder Zellorganellen noch genetisches Material, welches eine zuverlässige Bestätigung des Knockouts in diesen Zellen erlaubt. Deswegen wurde neben der qualitativen Bestimmung des Cathepsin-E-Status mittels Westernblot (**Abbildung 3.15**) auch die katalytische Aktivität der Protease mit einem hochsensitiven Aktivitätstest untersucht. Das Substrat wurde selbstständig in der AG Kalbacher der Universität Tübingen manuell mittels Fmoc/tBu Festphasen-Peptidsynthese hergestellt, gereinigt und die korrekte Masse $[M+H]^+=1756,04$ durch MALDI-TOF bestätigt. **Abbildung 3.2** zeigt die Fluoreszenzzunahme des gespaltenen FRET-Peptid-Substrats durch die saure Protease Cathepsin E. Im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren wiesen gereinigte KO *ghosts*, die durch hypotone Lyse gewonnen wurden, bei pH 2,5 (nahe dem *in vitro* pH-Optimum von Cathepsin E) keine Aktivität, bei pH 4,0 eine lediglich minimale proteolytische Aktivität im Substrattest auf. Ein Knockout von Cathepsin E konnte in Erythrozyten somit mittels PCR, Westernblot wie auch durch einen Peptidsubstrattest bestätigt werden.

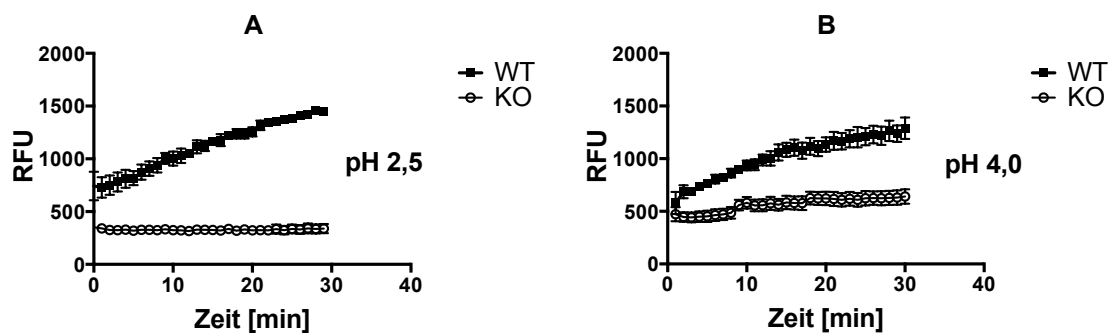


Abbildung 3.2: Aktivitätstest mittels FRET-Substrat von Wildtyp (WT) und Knockout (KO) ghosts. Blut wurde durch Punktion der V. facialis gewonnen; RBC wurden mittels Histopaque® 1119 aufgereinigt, anschließend mit hypotonem 5p8-Puffer lysiert und gewaschen. (A) je 5 μ l ghosts mit 85 μ l 250 mM Citratpuffer pH 2,5; (B) je 5 μ l ghosts wurden mit 85 μ l 250 mM NaAcetat-Puffer pH 4,0. Abgebildet sind die Mittelwerte und SEM (n=3 für WT und n=5 für KO) nach Zugabe von 10 μ l 0,1 mM FRET-Substrat und Messung der Fluoreszenz (Ex: 320 nm; Em: 405 nm) für 30 min bei 37°C.

3.2 Eigenschaften der Erythrozyten und Eryptose

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Lang im Physiologischen Institut unter Anleitung von Majed Abad durchgeführt. Zum Nachweis der Eryptose wurde die Externalisierung von Phosphatidylserin durch Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Annexin-V bestimmt. Als weiterer Messparameter diente die Größenabnahme der Erythrozyten (repräsentiert durch den im *forward scatter* analysierten Geo Mean). Die Untersuchungen erfolgten bei je (n=5) männlichen Mäusen gleichen Alters von ca. 10 Wochen.

Die Untersuchung der durch spontane Blutabnahme gewonnenen Erythrozyten (RBC) ergab signifikante Unterschiede zwischen WT und KO-Tieren (**Abbildung 3.3**). Der Mittelwert der Annexin-V-Bindung war bei WT $1,11 \pm 0,13$ % und bei KO $1,67 \pm 0,14$ % ($p \leq 0,001$, *t-test*). Eine geringere Signifikanz von $p \leq 0,01$ wurde bei der Größe der Erythrozyten festgestellt. Hier waren die WT Erythrozyten mit $507,06 \pm 2,24$ etwas größer als die KO-Zellen mit $499,06 \pm 4,68$ Geo Mean. Die zusätzliche Analyse des intrazellulären Calciums sollte einen Hinweis auf die Ursache der Unterschiede zeigen: bei WT Erythrozyten war mit einer Signifikanz von $p \leq 0,01$ ein geringeres Fluoreszenzsignal mit $22,05 \pm 0,58$ im Vergleich zu KO mit $23,95 \pm 0,70$ zu verzeichnen, was einen erhöhten intrazellulären Calciumspiegel andeutet.

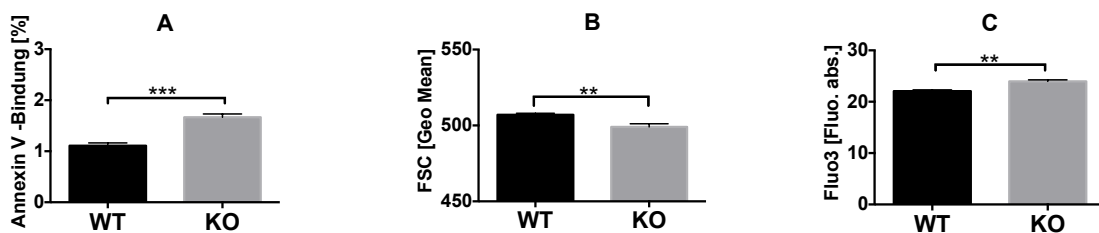


Abbildung 3.3: Analyse der RBC nach spontaner Blutentnahme. (A): Die Bindung von Annexin-V-Fluos als Nachweis für die Phosphatidylserin-Exposition, (B): die Größe der RBC im *forwardscatter* FSC (Geo mean) und (C) die Fluoreszenz von Fluo3 (repräsentativ für die intrazelluläre Calciumkonzentration) von Wildtyp (WT) und Knockout (KO) Erythrozyten. Abgebildet sind die Mittelwerte und SEM (n=5) mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ (**) bzw. $p \leq 0,001$ (***) im *t-test*.

Die Veränderungen der Erythrozyten *ex vivo* wurden durch die Inkubation in Ringerlösung mit 5 mM Glucose bei 37° C untersucht. Dabei wurden wieder die oben genannten Parameter benutzt. Trotz signifikanter Unterschiede bei der Annexin-V-Bindung nach 24 h und der Größe nach 48 h ergaben sich hier unerwartete bzw. widersprüchliche Werte, da die Annexin-V-Bindung gewöhnlich mit geringeren Größe der Erythrozyten korreliert. Die in **Abbildung 3.4** dargestellten Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Experiment (n=3). Eine Korrelation der Daten konnte bei diesem Versuch nicht erreicht werden, was mit einer unterschiedlichen Vulnerabilität der jeweiligen Erythrozyten zu tun haben könnte (siehe Diskussion).

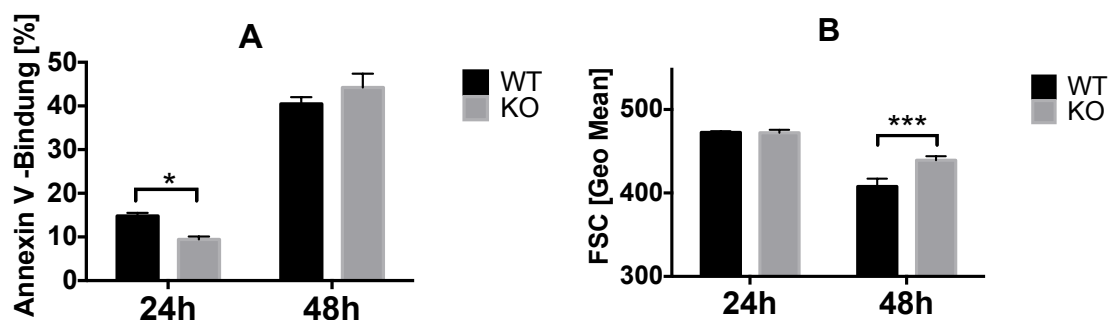


Abbildung 3.4: Analyse der RBC nach spontaner Blutentnahme und Inkubation in Ringerlösung (plus 5 mM Glucose) für 24 h und 48 h bei 37° C. (A): Die Bindung von Annexin-V-Fluos zum Nachweis der Phosphatidylserinexposition, (B): die Größe der RBC im *forward scatter* FSC (Geo mean) von Wildtyp (WT) und Knockout (KO) Erythrozyten. Abgebildet sind die Mittelwerte und SEM (n=5) mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ (*) bzw. $p \leq 0,001$ (***) im *t-test*.

Eryptose kann durch Glucosedepletion in Erythrozyten ausgelöst werden, da hierdurch sowohl die ATP-Synthese in der Glykolyse als auch die Generierung von Reduktionsäquivalenten im Pentosephosphatweg verhindert wird. Erwartungsgemäß konnte nach Inkubation in Glucose-freier Ringerlösung in den Erythrozyten sowohl von WT- als auch von KO-Tieren ein Anstieg der Annexin-V-Bindung und eine korrelierende Größenabnahme im FSC nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Erythrozytenpopulationen wurde jedoch nicht festgestellt (**Abbildung 3.5**).

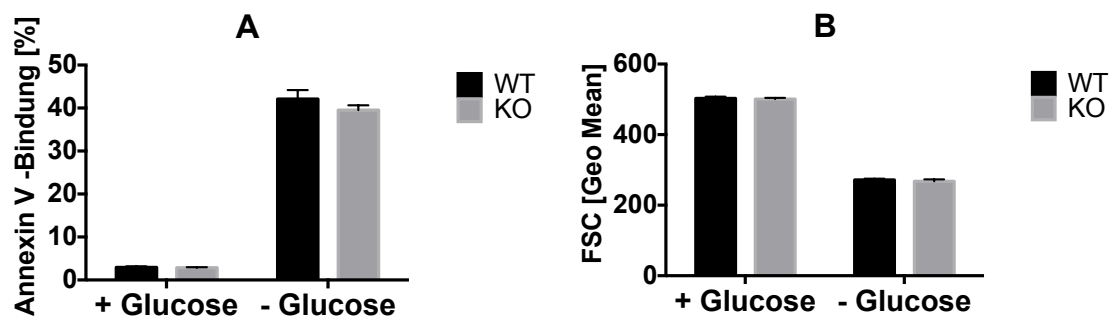


Abbildung 3.5: Effekt der Glucosedepletion auf die (A) Annexin-V-Bindung zum für die Nachweis der Phosphatidylserinexposition) und (B) Größe der RBC im *forwardscatter* (FSC; Geo mean) von Wildtyp (WT) und Knockout (KO) Erythrozyten. Die Erythrozyten wurden in Ringerlösung mit 5 mM Glucose bzw. ohne Glucose für 12 h bei 37°C inkubiert. Abgebildet sind die Mittelwerte und SEM (n=5); eine Signifikanz war durch *t-test* statistisch nicht feststellbar.

Die Induktion der Eryptose kann auch über eine Inkubation in hyperosmolaren Lösungen erfolgen. Die erhöhte Osmolarität von 850 mOsmol wurde durch Zugabe von Saccharose erreicht. Nach Inkubation über 2 h bei 37°C zeigten sowohl die Annexin-V-Bindung als auch die Größe im FSC die erwarteten Eryptose-typischen Veränderungen. Wiederum konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen WT und KO Erythrozyten festgestellt werden (**Abbildung 3.6**).

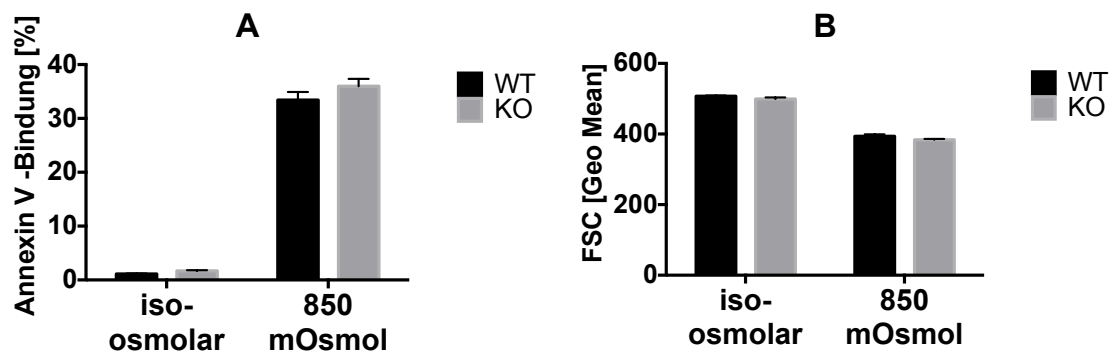


Abbildung 3.6: Effekt des osmotischen Schocks auf die (A) Annexin-V- und (B) Größe der RBC im *forward scatter* FSC (Geo mean) von Wildtyp (WT) und Knockout (KO) Erythrozyten. Diese wurden in Ringerlösung hyperosmolar (850 mOsmol) bzw. isoosmolar für 2 h bei 37°C inkubiert. Abgebildet sind die Mittelwerte und SEM (n=5), Signifikanz war durch *t-test* statistisch nicht feststellbar.

Im weiteren wurde die Induktion der Calciuminflux-vermittelten Eryptose nach Behandlung der Erythrozyten mit einem Calciumionophor verglichen. Die

30 minütige Inkubation mit 1 μ M Ionomycin zeigte auch hier zwar die erwartete Zunahme der Annexin-V-Bindung und Größenabnahme im FSC, aber keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und KO.

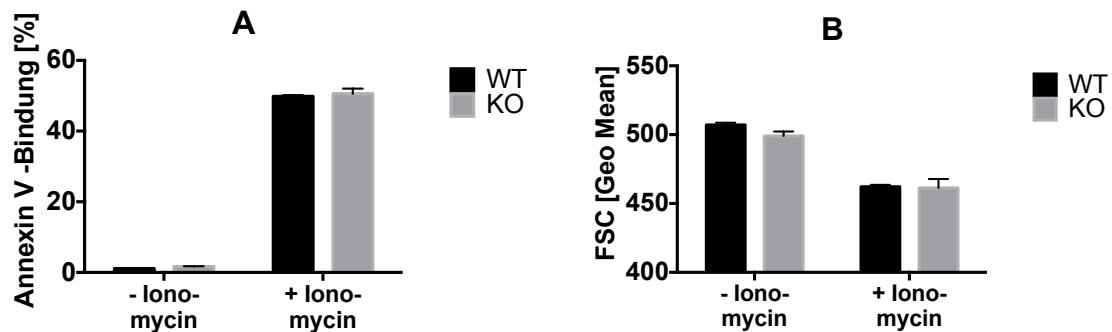


Abbildung 3.7: Effekt des Calciumionophors Ionomycin auf die Eryptose. Der Nachweis der Eryptose erfolgte durch (a) Messung der Phosphatidylserinexposition-Exposition mittels Annexin-V-Bindung und (B) Größe der RBC im *forward scatter* FSC (Geo mean) von Wildtyp (WT) und Knockout (KO) Erythrozyten. Diese wurden in Ringerlösung mit (1 μ M) bzw. ohne Ionomycin für 30min bei 37°C inkubiert. Abgebildet sind die Mittelwerte und SEM (n=5), Signifikanz war durch *t-test* statistisch nicht feststellbar.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das Vorhandensein von Cathepsin E weder die Eryptose nach Energiedepletion, osmotischem Schock noch nach Behandlung mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin bei Erythrozyten beeinflusst. Die Analysen der KO Erythrozyten zeigten keinerlei signifikanten Unterschied im Vergleich zu WT Erythrozyten. Die Inkubation für 24 und 48 h zeigte keine eindeutige Ergebnisse. Signifikante Unterschiede ergaben sich allerdings direkt bei spontaner Blutabnahme. Hier waren die KO Erythrozyten im Vergleich zu den WT einerseits kleiner, exponierten mehr Phosphatidylserin und hatten einen gering erhöhten intrazellulären Calciumgehalt.

3.3 Erythrophagozytose verschiedener Makrophagen

Um den Einfluss von Cathepsin E in Erythrozyten auf die Erythrophagozytose zu untersuchen, musste ein geeignetes Makrophagen-Modell etabliert werden, in dem die Phagozytose wie auch der Abbau und Verdau der Erythrozyten analysiert werden konnten. Erste Experimente, die mit der murinen Zelllinie Raw 264.7 durchgeführt wurden, zeigten jedoch nur eine geringe Phagozytose-Aktivität dieser Zellen (**Abbildung 3.8**). Weitere Versuche erfolgten deshalb zunächst mit Peritonealmakrophagen, die durch Peritoneallavage gewonnen wurden. Hierzu wurden die Erythrozyten mittels Ionomycinbehandlung zur Exposition von Phosphatidylserin stimuliert, das als „Eat-me“-Signal in Makrophagen fungiert und die Erythrophagozytose auslöst. Die FACS-Analyse zeigte eine Fluoreszenzzunahme der Makrophagen, die CFSE-gefärbte Erythrozyten phagozytiert hatten. Dieser Farbstoff lagerte sich nur an intrazelluläre Proteine, so dass nach Lyse der adhären, aber nicht phagozytierten Erythrozyten keine falsch positiven Zellen gemessen wurden. Die Negativkontrolle mit Cytochalasin D, welches eine Aktinpolymerisation inhibiert, zeigte die erwartete Hemmung der Phagozytose.

Da bei Verwendung von Peritonealmakrophagen aus einer Maus nur 500.000-800.000 Makrophagen isoliert werden konnten, wurde ebenfalls auf die Generierung von Makrophagen aus Knochenmarkvorläuferzellen (BMM Φ) zurückgegriffen. Hierzu wurden die hämatopoetischen Vorläuferzellen mit dem rekombinanten Zytokin M-CSF zur Differenzierung in Makrophagen induziert. Die Phagozytose-Aktivität der BMM Φ ähnelte der von PM Φ . Daher wurden für weitere Versuche BMM Φ verwendet, da pro Maus ca. 8 bis 12 Mio. Makrophagen generiert werden konnten.

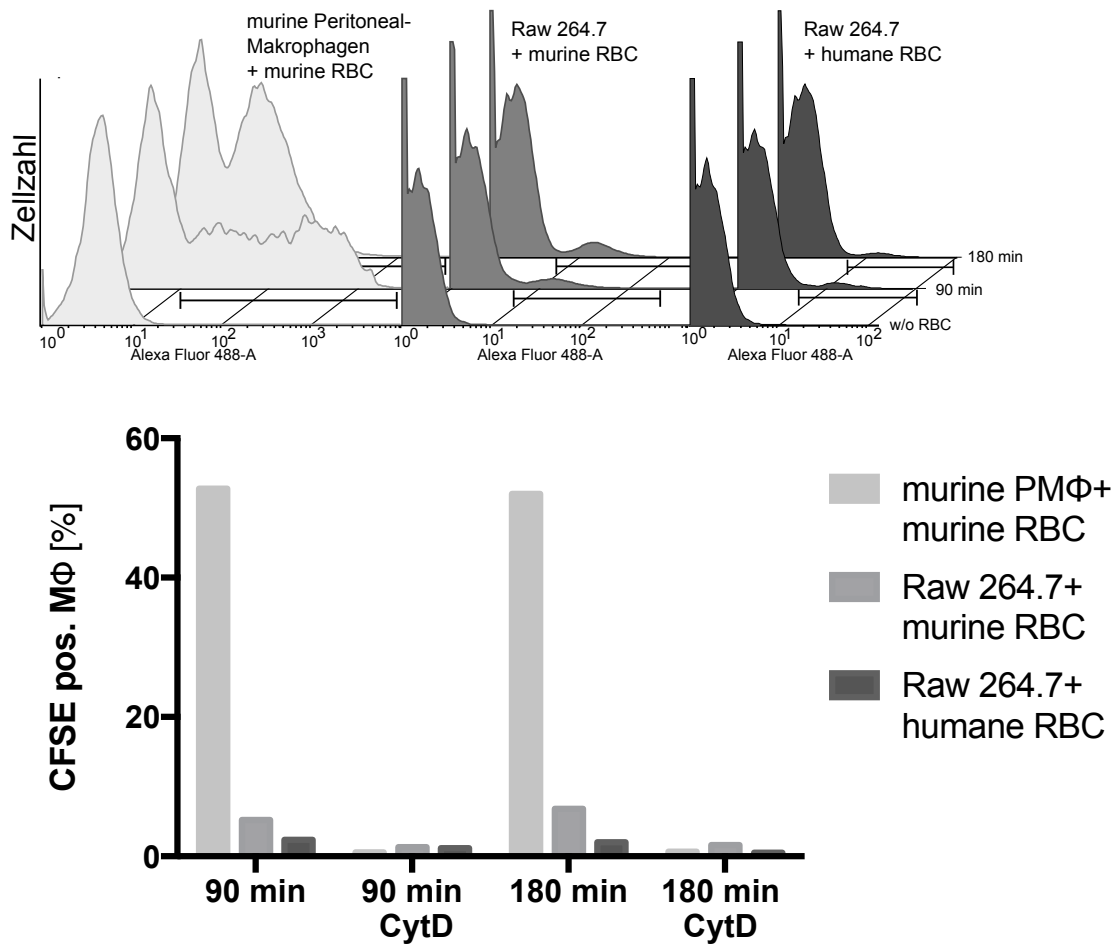


Abbildung 3.8: Detektion der Erythrophagozytose von CFSE-gefärbten murinen bzw. humanen RBC durch murine Peritoneal- und Raw 264.7-Makrophagen. RBC wurden mittels Ionomycin zur Phosphatidylserinexposition stimuliert und im Verhältnis 1:100 (MΦ:RBC) für 90 bzw. 180 min bei 37°C inkubiert. Nicht phagozytierte RBC wurden hypoton lysiert und durch Waschen entfernt. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment; **Oben:** Geglättete FACS-Histogramme von Maus Peritoneal-Makrophagen (PMΦ; hellgrau) und Raw 264.7 Zellen (dunkelgrau/schwarz). Zellen mit einer Fluoreszenz größer 10¹ (Alexa Fluor 488-A) wurden als positiv gewertet. **Unten:** Balkendiagramm der positiven Zellen in An- und Abwesenheit des Erythrophagozytose-Inhibitors Cytochalasin D (10 μM; CytD).

3.4 Erythrophagozytose: Vergleich von Ionomycin-behandelten und IgG-opsonierten Erythrozyten

Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Makrophagen fiel auf, dass nur eine Subpopulation der PM Φ Ionomycin-behandelte und CFSE-gefärbte Erythrozyten (RBC) phagozytierte. Da die Erythrozyten alle gleich behandelt worden waren und durch den 100-fachen Überschuss auch entsprechend viele Phosphatidylserin-exponierende Erythrozyten vorhanden waren, musste sich es hier um ein Phänomen der Makrophagen selbst handeln.

Bei der Erythrophagozytose von IgG-opsonierten RBC zeigte sich ein anderes Bild. Bereits nach 30 min war ein Shift der gesamten Makrophagenpopulation mit charakteristischer Verteilung zu erkennen. Bei den Ionomycin-behandelten RBC nahm die Zahl der positiv getageten Makrophagen zwar kontinuierlich zu, aber eine Population nicht phagozytischer Makrophagen blieb zurück. Daher konnte mit IgG-opsonierten RBC nicht nur eine über die gesamte Makrophagenpopulation gleichmäßigere Erythrophagozytose erzielt werden, sondern im Vergleich zu den mit Ionomycin behandelten Zellen auch eine wesentlich höhere Rate an phagozytierten Erythrozyten erreicht werden (siehe **Abbildung 3.9**).

Aufgrund der unterschiedlichen Ausbeute und Erythrophagozytose-Leistung der Makrophagenpopulationen sowie der unterschiedlichen Aufnahme der behandelten Erythrozyten wurden für die weiteren Experimente deshalb Makrophagen aus Knochenmarkvorläuferzellen (BMM Φ) und IgG-opsonierte Erythrozyten verwendet.

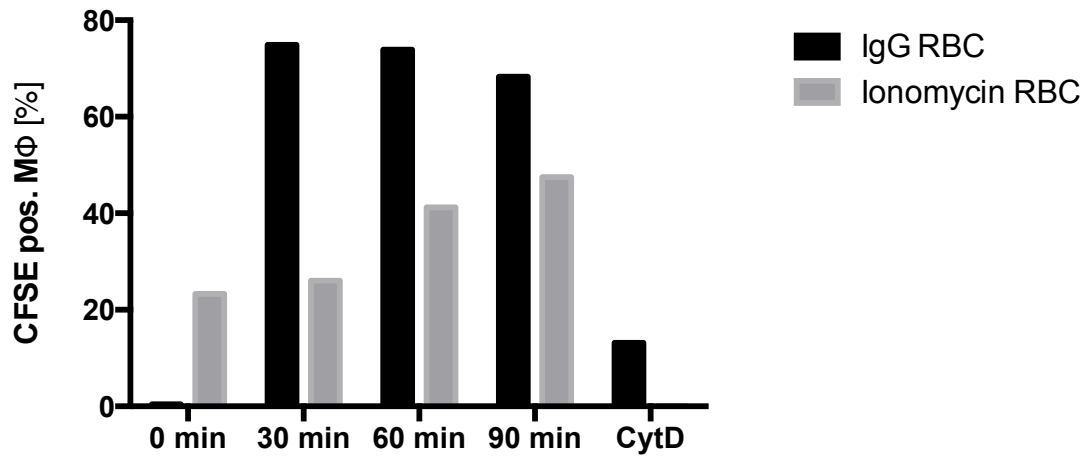
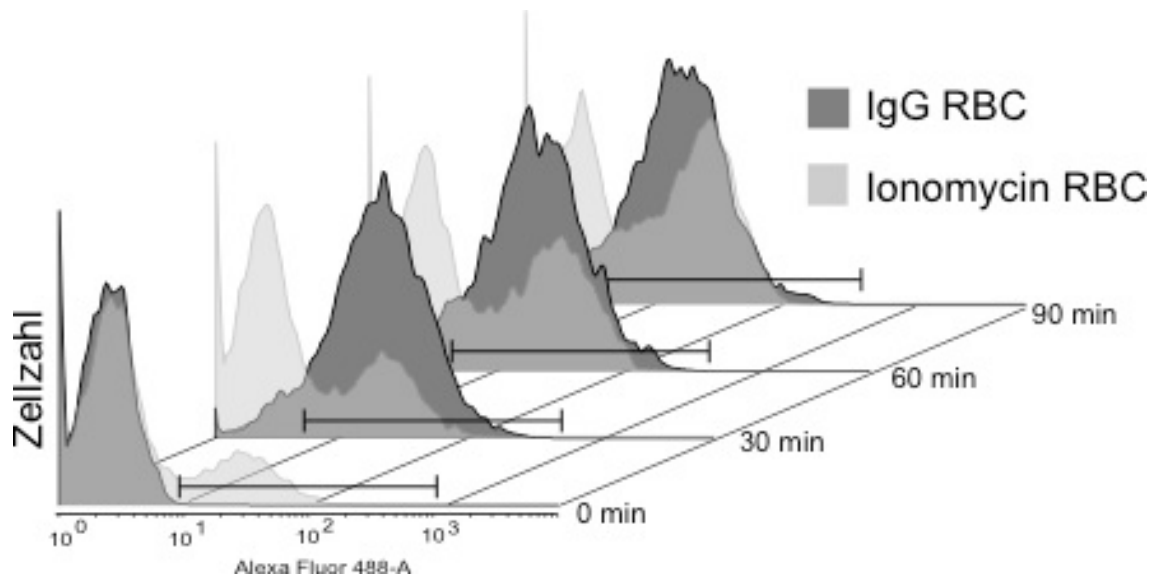


Abbildung 3.9: Detektion der Erythrophagozytose von murinen WT Peritoneal-Makrophagen (PMΦ) mit CFSE-gefärbten murinen WT RBC. RBC wurden entweder mit anti-Maus RBC IgG opsoniert oder mittels Ionomycin zur Phosphatidylserinexposition stimuliert und im Verhältnis 1:100 (PMΦ:RBC) für 0, 30, 60 bzw. 90 min bei 37°C inkubiert. Nicht phagozytierte RBC wurden hypoton lysiert und durch Waschen entfernt. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment; oben: Geglättete FACS-Histogramme von PMΦ mit IgG-opsonierten RBC (schwarz) und Ionomycin stimulierten RBC (hellgrau). Zellen mit Fluoreszenz größer 10^1 wurden als positiv gewertet. Unten: Balkendiagramm der positiven Zellen mit Inhibitor der Erythrophagozytose (10 μ M Cytochalasin D; CytD).

3.5 Erythrophagozytose: Vergleich von Wildtyp und Knock-out BMMΦ

Nachdem effizientes Modell für die Erythrophagozytose etabliert worden war, sollte als nächstes WT und KO BMMΦ verglichen werden. Dafür wurden WT BMMΦ mit WT und KO IgG-opsonierten Erythrozyten (RBC) für 60 min inkubiert. Die anschließende hypotone Lyse der nicht phagozytierten RBC verhinderte eine weitere Phagozytose der adhärennten RBC. Für die durchflusszytometrische Messung der Erythrophagozytose wurden die BMMΦ nach vier Zeitpunkten (4, 7, 9 und 11 h) analysiert.

Sowohl die WT- als auch KO- BMMΦ zeigten keinerlei Unterschiede bei der Erythrophagozytose. Beide Zellpopulationen wiesen die gleiche Menge an positiv getageten BMMΦ und auch im Verlauf ähnliche Histogramme in der FACS Analyse auf. Auch auf Seiten der Erythrozyten war kein Unterschied zwischen WT und KO phagozytierten RBC erkennbar (**Abbildung 3.10** und **Abbildung 3.11**).

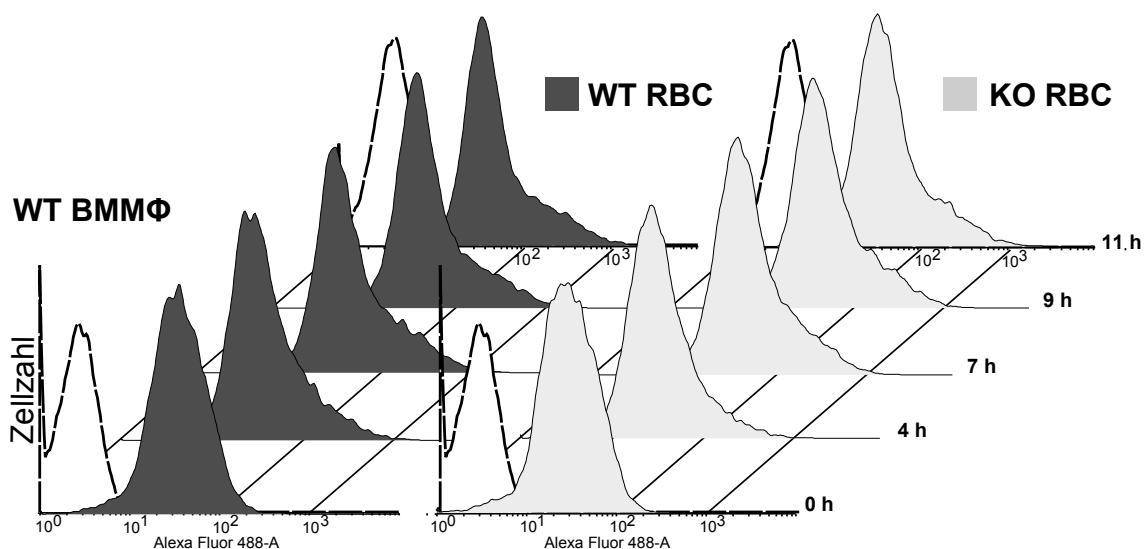


Abbildung 3.10: Geglättete FACS-Histogramme von WT-BMMΦ, welche für 60 min WT bzw. KO RBC phagozytiert haben (entspricht Zeitpunkt 0 h). Nach 4, 7, 9 und 11 h wurden die BMMΦ durch FACS Analyse auf ihre Fluoreszenz untersucht. Gestrichelte Histogramme entsprechen den reinen BMMΦ ohne Erythrophagozytose.

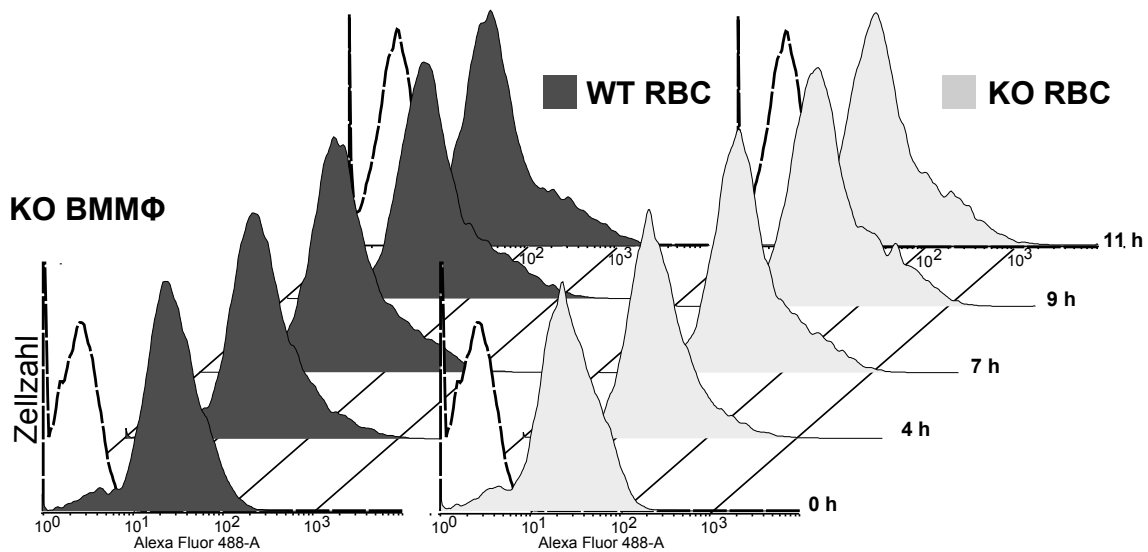


Abbildung 3.11: Geglättete FACS-Histogramme von KO-BMMΦ welche für 60 min WT bzw. KO RBC phagozytiert haben (entspricht Zeitpunkt 0 h). Nach 4, 7, 9 und 11 h wurden die BMMΦ durch FACS-Analyse auf ihre Fluoreszenz untersucht. Gestrichelte Histogramme entsprechen den reinen BMMΦ ohne Erythrophagozytose.

3.6 Abbau von Hämoglobin: Vergleich zwischen WT-BMMΦ und WT-Erythrozyten und KO-BMMΦ mit KO Erythrozyten

Die Beteiligung des intrazellulären Cathepsin E der Erythrozyten bei dem Abbau von Hämoglobin sollte mittels Westernblot quantifiziert werden. Dazu wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten die Makrophagen nach der FACS-Analyse lysiert und für die SDS-PAGE und Immunoblotting verwendet. Die PVDF-Membran wurde dreigeteilt und die entsprechenden Antikörper für Lamin A/C (Ladekontrolle), Cathepsin E und Hämoglobin verwendet. Der Westernblot zeigte einen kontinuierlichen Abbau des Hämoglobins über 11 h. Der deutlichste Unterschied dieses Abbaus wurde zwischen der Kombination WT-BMMΦ mit WT-RBC und KO-BMMΦ mit KO-RBC erwartet, daher wurde hier jeweils die Kinetik des Abbaus untersucht. Im Westernblot zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Abbau von Hämoglobin (**Abbildung 3.12** und **Abbildung 3.13**).

Sehr auffällig war allerdings die Aktivierung von Cathepsin E nach Phagozytose. Die Aktivierung konnte im Westernblot durch die Entstehung

einer Doppelbande verfolgt werden. Dabei wird durch Abspaltung eines 4 kDa Propeptids die Proform von Cathepsin E zum aktiven Enzym prozessiert. Wie in der Arbeitshypothese angenommen, wurde Cathepsin E nach der Phagozytose vermutlich durch die Ansäuerung des endolysosomalen Kompartiments autokatalytisch aktiviert. Die Kontrolle mit Cytochalasin D in **Abbildung 3.12** zeigte sehr deutlich, dass sich zwar noch adhärente ghosts (Erythrozytenmembranen ohne Inhalt) an den Makrophagen befanden, hier das Cathepsin E aber nicht aktiviert wurde (keine Doppelbande).

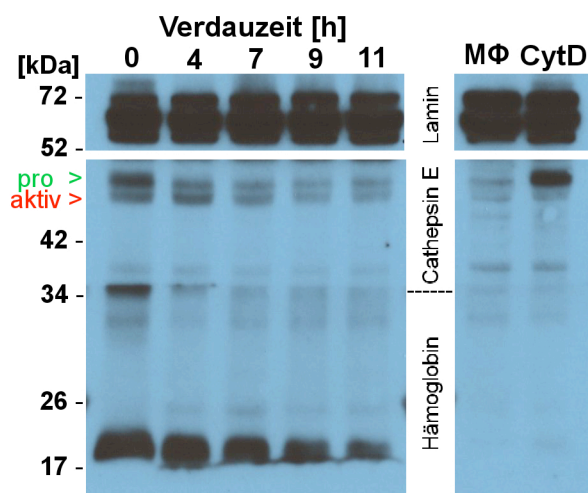


Abbildung 3.12: Westernblot-Analyse von WT-BMMφ, welche für 60 min WT RBC phagozytiert haben (= 0 h). Die BMMφ wurden nach 4, 7, 9 und 11 h lysiert und nach SDS-PAGE und Western Blotting mit Antikörpern gegen Lamin A/C, Cathepsin E und Hämoglobin analysiert. Die rechte Abbildung zeigt reine BMMφ (Mφ) nach 11 h Inkubation sowie BMMφ, die mit dem Phagozytose-Inhibitor Cytochalasin (10 μM) nach 60 min Erythrophagozytose (CytD) behandelt worden waren.

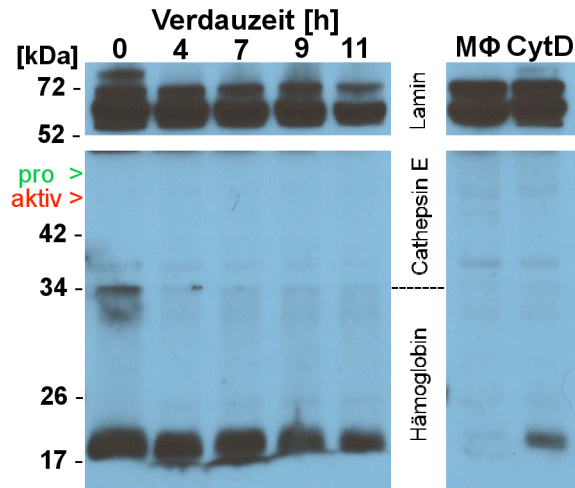


Abbildung 3.13: Westernblot von KO-BMM Φ , welche für 60 min KO RBC phagozytiert haben (= Zeitpunkt 0 h). Die BMM Φ wurden nach 4, 7, 9 und 11 h lysiert und nach SDS-PAGE und Western Blotting mit Antikörpern gegen Lamin A/C, Cathepsin E und Hämoglobin analysiert. Die rechte Abbildung zeigt reine BMM Φ (M Φ) nach 11 h Inkubation sowie BMM Φ , die mit dem Phagozytose-Inhibitor Cytochalasin (10 μ M) nach 60 min Erythrophagozytose (CytD) behandelt worden waren.

3.7 Hämoglobinabbau und Cathepsin E Aktivierung: Vergleich zwischen WT –BMM Φ und KO-BMM Φ mit WT-RBC und KO-RBC

Im Folgenden wurden unterschiedliche Kombinationen von Cathepsin E-profizienten oder defizienten BMM Φ und RBC hinsichtlich des Abbaus von Hämoglobin und der Aktivierung von Cathepsin E untersucht. Die einzelnen Zellkombinationen wurde hierfür zum Zeitpunkt 0 (entspricht dem Start der Verdauung nach 60 min Phagozytose) und nach 11 h auf einem Westernblot analysiert. Sowohl in WT wie auch in KO Makrophagen konnte ein Abbau von Hämoglobin nachgewiesen, der jedoch vom Cathepsin-E-Status weder der Makophagen noch der Erythrozyten beeinflusst wurde (**Abbildung 3.14**). Interessanterweise konnte eine Aktivierung von Cathepsin E sowohl in Erythrozyten-beladenen WT als auch in KO-BMM Φ festgestellt werden. Dieser Befund wies daraufhin, dass das nachgewiesene prozessierte Cathepsin E eindeutig aus den Erythrozyten, nicht jedoch aus den Makrophagen stammte. In der Tat zeigten auch unbehandelte Makrophagen im Vergleich zu Erythrozyten nur eine geringe Expression von Cathepsin E.

Zusammenfassend ließ sich deshalb feststellen, dass der Hämoglobinabbau nicht von dem intrazellulären Cathepsin E aus den Erythrozyten beeinflusst wurde. Die Untersuchungen zeigten jedoch erstmalig in Erythrozyten eine physiologische Aktivierung von Cathepsin E, die durch die Erythrophagozytose ausgelöst wurde.

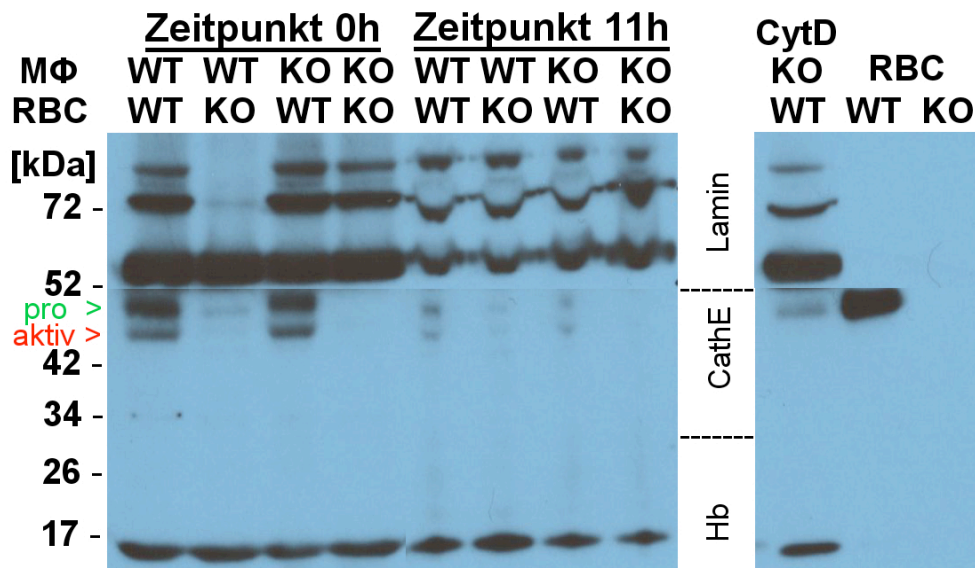


Abbildung 3.15: Vergleich des Hämoglobinabbaus nach 60 min Erythrophagozytose (= Zeitpunkt 0 h) und nach 11 h. Die Kombinationen von BMMΦ und RBC wurden lysiert und nach SDS-PAGE im Westernblot mit Antikörpern gegen Lamin A/C, Cathepsin E und Hämoglobin analysiert. CytD zeigt die Negativkontrolle (10 µM Cytochalasin D) nach 60 min Erythrophagozytose und daneben die jeweiligen RBC.

3.8 Serumkonzentrationen von LVV Hämorphin 7

Der Einfluss von Cathepsin E auf den Serumgehalt von LVV Hämorphin 7 wurde mit Hilfe eines kompetitiven ELISA getestet. Hierbei sollte untersucht werden, ob Cathepsin E, welches nach der Phagozytose in den Erythrozyten aktiviert wird (**Abbildung 3.15**), einen Einfluss auf die Bildung des Hämoglobin-Abbauprodukts LVV Hämorphin 7 hat, das möglicherweise im Serum der Mäuse nachzuweisen ist. Es konnte nur eine schwache Erhöhung der Serumkonzentration von LVV Hämorphin 7 in den WT-Mäusen nachgewiesen werden, die im Vergleich zu Cathepsin E-Knock-out Mäusen jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (**Abbildung 3.16**).

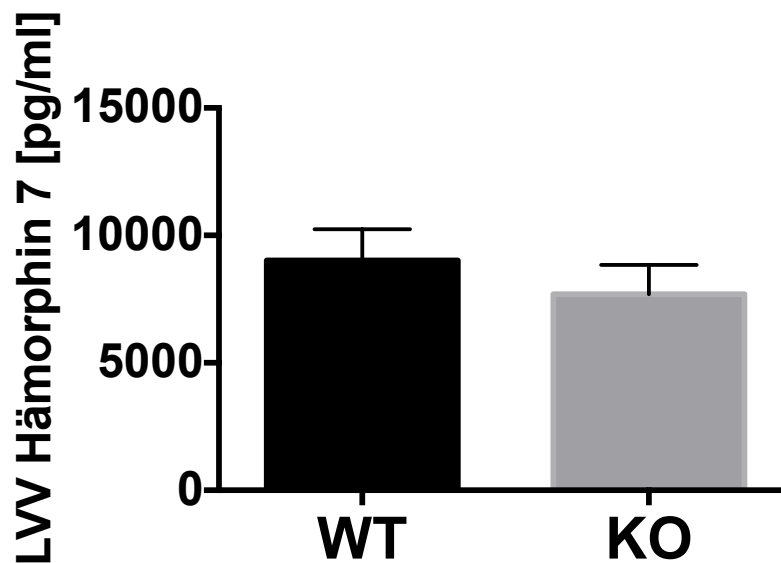


Abbildung 3.16: LVV Hämorphin 7 Serumkonzentrationen von je 8 WT und KO Mäusen. Das Serum wurde nach Abnahme mit Assay Buffer 16 verdünnt und mittels ELISA analysiert. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte und SEM (n=8).

4. Diskussion

Die aktuelle Forschung findet stetig weitere Belege für die Relevanz und Beteiligung von Cathepsin E an (patho)-physiologischen Prozessen. Unterschiedliche Expressionsmuster konnten besonders bei Tumoren von Pankreas, Ösophagusschleimhaut und bei Brustkrebs gefunden werden^{148–150}, ebenso aber auch bei chronischen Entzündungen wie COPD¹⁵¹. Die physiologische Funktion von Cathepsin E in Erythrozyten bleibt dennoch ungeklärt. Mit dieser Arbeit wird allerdings ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung seiner Funktion getätigt. Das Vorliegen der unreifen Proform von Cathepsin E in Erythrozyten ist, wie in der Einleitung dargestellt, ungewöhnlich. Daher befasst sich diese Arbeit mit der Fragestellung der biochemischen Aktivierung dieser Proform und die Auswirkungen auf Prozesse der Erythrophagozytose und der Eryptose.

Die Arbeitshypothese, dass Cathepsin E während der Erythrophagozytose in die aktive Form übergeht, konnte bestätigt werden. Dies ist die erste physiologische Aktivierung der inaktiven Proform von Cathepsin E in Erythrozyten, die bisher gezeigt werden konnte. Bisherige Arbeiten nutzten die autokatalytische Aktivierung von Cathepsin E im sauren Milieu, um eine Aktivierung zu zeigen^{86,87,89,92}. Eigene Vorarbeiten im Labor der AG Kalbacher konnten belegen, dass diese Aktivierung bei pH-Werten um 5-5,5 stattfindet. Dieser pH-Wert entspricht dem physiologischen pH-Wert des endo-lysosomalen Kompartiments der Makrophagen^{152,153}. Ob es sich um eine reine autokatalytische Aktivierung aufgrund der Ansäuerung handelt, oder ob andere Proteasen bei der Prozessierung der Cathepsin E Proform eine Rolle spielen, müsste durch Inhibitoren/Knock-out der vATPasen bzw. anderen Proteasen untersucht werden. Der in der Literatur beschriebene erhöhte lysosomale pH-Wert bei Cathepsin E KO Mäusen (ca. 6,5 vs. 5,5 bei WT Mäusen)³² hätte eine verminderte bzw. keine Aktivierung vermuten lassen. Die erwartete reduzierte Aktivierung konnte allerdings nicht beobachtet werden, was auf die Beteiligung weiterer Faktoren schließen lässt.

Die in dieser Arbeit etablierte Verwendung von BMM Φ mit WT und KO Erythrozyten erwies sich als geeignetes Modell für die Erythrophagozytose und für weitere Untersuchungen zur physiologischen Funktion von Cathepsin E. Hierbei zeigte sich, dass die Erythrophagozytose durch Opsonierung der Erythrozyten mittels IgG weitaus effizienter und homogener war als durch Induktion der Eryptose mittels Ionomycin. Der Mechanismus einer nur partiellen Phagozytose von Ionomycin-behandelten Erythrozyten ist entweder von den Erythrozyten oder von den Makrophagen selbst abhängig. Da die Induktion der Eryptose aber in den Versuchen bei der AG Prof. Dr. F. Lang stets eine charakteristische Normalverteilung zeigte, und die relative Anzahl von Makrophagen zu Erythrozyten mindestens 1:100 betrug, sollte es sich hier um ein Phänomen der Makrophagen selbst handeln. Vorstellbar ist eine unterschiedliche Expression spezifischer Phosphatidylserin-Rezeptoren¹⁵⁴. Eine Bestimmung der jeweils exponierten Rezeptoren mittels Immunmarkierung und FACS könnte diese Divergenz zeigen. In diesem Zusammenhang wäre der Vergleich mit den IgG-Rezeptoren (Fc γ R) interessant, da sie eine homogene Phagozytose vermitteln. Die unterschiedliche Affinität der einzelnen Rezeptoren könnte hierbei eine Rolle spielen, da die Fc γ R eine sehr hohe Affinität zu Immunglobulinen besitzen¹⁵⁵.

Abgesehen von der unterschiedlichen Phagozytose stellt sich die Frage der Funktion dieser physiologischen Aktivierung von Cathepsin E bei der Erythrophagozytose. Da der Hämoglobin-Abbau in An- oder Abwesenheit von Cathepsin E keine signifikanten Unterschiede ergab, wäre eine Untersuchung anderer Substrate eine Möglichkeit. Hämoglobin ist seit Beginn der Untersuchungen von Aspartat-Proteasen das Standard-Substrat und wurde aus diesem Grund in dieser Arbeit ebenfalls verwendet. Der Abbau anderer Proteine hoher Abundanz, wie z.B. Bestandteile des Zytoskeletts (Spektrin), könnte weitere Hinweise für die Beteiligung von Cathepsin E bei katabolen Prozessen in Erythrozyten geben.

Der Metabolismus der Erythrozyten ist, wie in der Einleitung erwähnt, eng mit dem Eisenstoffwechsel verbunden. Sollte sich ein veränderter Metabolismus der Erythrozyten in Abhängigkeit von Cathepsin E aufzeigen, könnten

Zusammenhänge mit dem komplexen Eisenstoffwechsel nicht ausgeschlossen werden. Denkbar ist neben der reinen katabolen Funktion auch eine regulatorische Funktion von Cathepsin E in diesen Prozessen. Die Prozessierung bestimmter Proteine während des Abbaus könnte sowohl autokrine, d.h. eine den Makrophagen selbst betreffende Rolle spielen, aber auch para- und endokrine Wirkung besitzen.

In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit die Serumkonzentration von Hämorphin 7, einem Abbauprodukt von Hämoglobin, untersucht. Diese Morphin-ähnlichen Peptide besitzen vielfältige biologische Aktivitäten, die nicht nur mit dem endorphinen System, sondern auch mit der Immunantwort oder der Blutdruck-Regulation interferieren können. Hämorphine sind daher Gegenstand aktueller Untersuchungen bei metabolischen Pathologien wie Diabetes, Adipositas und arterieller Hypertonie^{40,138,156}. Bei Diabetes-Patienten konnten bspw. signifikant erniedrigte Serumspiegel von Hämorphin 7 nachgewiesen werden. Ein erster Vergleich von WT und Cathepsin E KO-Tieren in dieser Arbeit zeigte leicht erhöhte Serumspiegel von Hämorphin 7, obwohl die Unterschiede keine statistische Signifikanz besaßen. Weitere Analysen, z.B. mit sensitiven massenspektrometrischen Verfahren im Serum oder Gewebe sind deshalb erforderlich, um eine Beteiligung von Cathepsin E an der Generierung von Hämorphinen zu untersuchen und Einblicke in mögliche pathogene Funktionen dieser Peptide zu erhalten.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit galt Untersuchungen zur Eryptose, bei der zwei Fragestellungen verfolgt wurden:

Welche Auswirkungen hat Cathepsin E auf die Eryptose?

Welche Auswirkungen hat die Eryptose auf Cathepsin E?

Die erste Frage ließ sich anhand der Ergebnisse relativ gut beantworten. Die Mechanismen, die während der Eryptose ablaufen, scheinen durch Cathepsin E nicht beeinflusst zu werden. Die Zellschrumpfung und Exposition von Phosphatidylserin waren in Erythrozyten von KO und WT-Tieren nahezu identisch. Diese typischen Veränderungen waren bei der Induktion der Eryptose durch Glucosedepletion, osmotischen Schock sowie durch artifiziellen Calciuminflux mittels Ionomycin nicht zu unterscheiden. Nicht eindeutig waren

die Ergebnisse nach der *ex vivo* Inkubation der Erythrozyten in mit Glucose substituierter Ringerlösung. Obwohl WT RBC nach 24 h mehr Annexin V gebunden hatten, was einer erhöhten Eryptoserate entspricht, zeigten nach 48 h die KO RBC eine leicht erhöhte Annexin V Bindung. Dennoch besaßen KO RBC nach 48 h ein größeres Zellvolumen, was einer geringeren Eryptoserate entsprechen sollte. Dieser widersprüchliche Befund könnte dadurch erklärt werden, dass KO RBC eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Hämolyse besitzen. Wenn in der KO RBC Population vermehrt Hämolyse empfindliche RBC sind, könnten diese schneller lysieren und so die Werte „verfälschen“. Dies vermag beide Phänomene zu erklären, da nur intakte RBC in FACS-Analyse berücksichtigt werden. Durch Bestimmung des Hämolysegrads kann dies überprüft werden. Insgesamt scheint es aber nicht verwunderlich, dass eine inaktive Proform der sauren Aspartatprotease keine Auswirkungen auf die Mechanismen der Eryptose hat, welche bei physiologischem, nahezu neutralem, pH-Wert der Erythrozyten abläuft.

Die zweite Fragestellung dieser Arbeit, die sich mit den Auswirkungen der Eryptose auf die Aktivität von Cathepsin E beschäftigt, ist deutlich schwieriger zu beantworten. Die Mechanismen der Eryptose beinhalten unter anderem die Aktivierung der zytosolischen Protease Calpain, die an die Membran bzw. an das Zytoskelett transloziert. Da eine Ablösung der membranständigen Protease Cathepsin E bei oxidativen Schäden (induziert durch Phenylhydrazin) beschrieben wurde¹¹¹, lässt sich ein ähnlicher Vorgang während der Eryptose vermuten. Dabei könnte das Zytoskelett durch Calpain verändert werden, so dass die bislang unbekannte Andockstelle von Cathepsin E zerstört wird und Cathepsin E ins Zytosol freigesetzt wird. Obwohl derartige Möglichkeiten bis heute nicht untersucht wurden, ist es vorstellbar, dass die Vorgänge bei der Eryptose, ähnlich wie eine Behandlung mit Phenylhydrazin, zu einer veränderten Lokalisation und einer Aktivierung von Cathepsin E führen.

Die physiologischen Funktionen von Cathepsin E in Erythrozyten bleiben weitgehend unbekannt. Die Tatsache, dass nach spontaner Blutabnahme bei den KO RBC im Vergleich zu den WT RBC eine leicht erhöhte Phosphatidylserinexposition, ein geringeres Zellvolumen und leicht erhöhte

intrazelluläre Calcium-Spiegel zu detektieren waren (siehe **Abbildung 3.3**), deutet auf eine physiologische Funktion von Cathepsin E in diesen Prozessen hin. Wie es zu diesen Veränderungen kommt, ist unbekannt. Die Hypothese, dass ein insgesamt verlangsamter Umsatz der Erythrozyten stattfindet, bedingt durch einen verlangsamten Katabolismus der phagozytierten Erythrozyten, konnte zumindest durch den Vergleich des Hämoglobin-Abbaus nicht bestätigt werden. Eine Bestimmung der mittleren Überlebenszeit der Erythrozyten könnte in diesem Zusammenhang wichtige Hinweise liefern. Die Bestimmung der mittleren Überlebenszeit ist durch eine Retransfusion abgenommener und CFSE-gefärbter Erythrozyten möglich¹⁴⁷, konnte aber im Rahmen dieses Projekts aufgrund des Fehlens einer entsprechenden Tierversuchsgenehmigung nicht durchgeführt werden.

Neben der ungeklärten Funktion von Cathepsin E in Erythrozyten wirft auch die Lokalisation dieser Protease neue Fragestellungen auf. Das Vorliegen von Cathepsin E als N-glykosyliertes Dimer, das durch eine Disulfidbrücke im reduzierendem Milieu des Zytosols zusammengehalten wird, ist biochemisch gesehen eine Besonderheit. Die Prozessierung dieser Protease muss über das ER und den Golgi-Apparat erfolgen. Wie Cathepsin E allerdings aus dem sekretorischen Weg ausgeschleust wird und sich an die Membran bzw. das Zytoskeletts in Erythrozyten anlagert, ist derzeit unerforscht.

Aufgrund des enormen physiologischen Umsatzes von Erythrozyten und eines vermehrten Auftretens geschädigter Erythrozyten in verschiedenen Erkrankungen wie bspw. Sepsis bleibt eine Fortführung dieses Projekts aus medizinischer Sicht ein wichtiges Forschungsfeld. Neue Ansätze zur Verhinderung der Eryptose sind gerade vor dem Hintergrund zunehmender Transfusionen bei Operationen oder anämischer Krankheitsbilder von Bedeutung.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Aktivierung der Aspartatprotease Cathepsin E in Erythrozyten bei der Erythrophagozytose zu untersuchen. Damit konnte die erste physiologische Aktivierung in einem Zellmodell gezeigt werden. Dazu wurden murine Makrophagen aus Knochenmarksvorläuferzellen *in vitro* kultiviert, Erythrozyten isoliert, mit CFSE gefärbt, mit IgG opsoniert und durch die Makrophagen phagozytiert. Die Erythrophagozytose wurde mittels FACS- und Westernblot-Analyse detektiert. Durch die Verwendung eines Knock-out Mausmodells sollte die Aktivierung der inaktiven Proform von Cathepsin E in Erythrozyten mit dem Wildtyp-Phänotyp verglichen und die quantitative Beteiligung der Protease beim Katabolismus phagozytierter Erythrozyten belegt werden. Die bei diesem Prozess entstehenden Hämorphine wurden mittels ELISA im Serum von Cathepsin E profizienten und defizienten Mäusen bestimmt. Trotz leicht erhöhter Hämorphinkonzentrationen in WT-Tieren konnten signifikante Unterschiede bei der Kinetik des Hämoglobinabbaus oder den Hämorphinspiegeln gefunden werden. Des Weiteren wurde der Einfluss von Cathepsin E auf die Apoptose von Erythrozyten, der sog. Eryptose, untersucht. Hierzu wurden die typischen Merkmale der Eryptose wie verminderte Zellgröße, Calcium-Influx (Fluo3) und Phosphatidylserin-Exposition (Annexin V Bindung) bestimmt. Bei spontaner Blutabnahme konnten signifikante Unterschiede gefunden werden, die ein erhöhtes Alter bzw. eine erhöhte Eryptose der KO Erythrozyten widerspiegeln. Keine signifikanten Unterschiede wurden hingegen nach einer durch Energiedepletion induzierten Eryptose oder nach Behandlung der Erythrozyten durch osmotischen Schock und Ionomycin beobachtet.

Neben der vermutlich besonderen immunologischen Relevanz von Cathepsin E bei Tumorerkrankungen, ist die physiologische Funktion von Cathepsin E in Erythrozyten bei der Erythrophagozytose und der anschließenden Prozessierung aller Erythrozytenbestandteile derzeit unklar. Das Vorliegen von

Cathepsin E in Erythrozyten könnte direkt die Lebenszeit der Erythrozyten beeinflussen, Einfluss auf Makrophagen und damit die Initiatoren vieler Entzündungsreaktionen haben, ebenso aber auch Bedeutung für die stetig zunehmenden großen Volkskrankheiten wie Diabetes und Bluthochdruck besitzen. Dieses komplexe Zusammenspiel ist nur durch weitere Arbeiten auf diesem Gebiet zu entschlüsseln.

6. Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit ist der Zusammenarbeit vieler wohlwollender Menschen zu verdanken, denen ich im Folgenden meinen Dank aussprechen möchte.

Herrn Dr. Kalbacher danke ich dafür, dass ich auch nach Abschluss meiner Diplomarbeit jederzeit in seinem Labor willkommen war und er mich trotz meines zeitintensiven Medizinstudiums bei der Bearbeitung dieses spannenden Themas unterstützt hat.

Mindestens genauso wichtig war die Unterstützung durch Prof. Klaus Schulze-Osthoff, der mir dankenswerterweise zunächst das Halten der Knock-out Mäuse, welche unverzichtbar für das Gelingen dieser Arbeit waren, ermöglicht und schlussendlich auch die Rolle des Doktorvaters übernommen hat. Hierfür gebührt ihm ein riesiger Dank. Für die gute Zusammenarbeit im Labor sowie für die anregenden Diskussionen danke ich PD Dr. Frank Essmann und Dr. Dominic Hildebrand, sowie den vielen Mitarbeitern dieser tollen Arbeitsgruppe.

Dass ich überhaupt mit dem genannten Knock-out Mausmodell arbeiten konnte, ist Prof. Dr. Thomas Reinheckel der Universität Freiburg zu verdanken, der mir diese Mäuse zur Verfügung gestellt hat.

Bei Herrn Prof. Florian Lang und seinen Mitarbeitern Dr. Jakob Völkl und Majed Abed bedanke ich mich für die große Hilfe bei der Durchführung der Experimente zur Eryptose. Aufgrund der ausgewiesenen Expertise dieses Arbeitskreises konnte ich sehr viel über die gängigen Methoden sowie die theoretischen Hintergründe der Eryptose erfahren.

Ohne die Unterstützung vieler Kollegen und Freunde wäre die Bearbeitung dieses Projekts nicht möglich gewesen. Neben all den täglichen Aufgaben und Projekten aller Beteiligten wurde mir stets geholfen diese Arbeit erstellen zu können. Ein herzliches DANKESCHÖN dafür.

7. Literaturverzeichnis

1. Spahn, D. R. *et al.* Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: an updated European guideline. *Crit. Care* **17**, R76 (2013).
2. Yaddanapudi, S. & Yaddanapudi, L. Indications for blood and blood product transfusion. *Indian J. Anaesth.* **58**, 538–42 (2014).
3. Indications and hemoglobin thresholds for red blood cell transfusion in the adult. at <<http://www.uptodate.com/contents/indications-and-hemoglobin-thresholds-for-red-blood-cell-transfusion-in-the-adult>> Zugriff [09.10.2016]
4. WHO | 10 facts on blood transfusion. at <http://www.who.int/features/factfiles/blood_transfusion/en/> Zugriff [09.10.2016]
5. Verbrauch von Blutprodukten durch Transfusionen. at <http://www.gbe-bund.de/gbe10/trecherche.prc_them_rech?tk=14501&tk2=18906&p_uid=gast&p_aid=65908966&p_sprache=D&cnt_ut=1&ut=18906> Zugriff [09.10.2016]
6. The Global Blood Industry - HLC008J. at <<http://www.bccresearch.com/market-research/healthcare/global-blood-industry-report-hlc008j.html>> Zugriff [09.10.2016]
7. Choudhury, N. Transfusion transmitted infections: How many more? *Asian J. Transfus. Sci.* **4**, 71–2 (2010).
8. Blood screening, quarantine and release. (2009). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK142991/>> Zugriff [09.10.2016]
9. Bosman, G. J. C. G. M. Survival of red blood cells after transfusion: processes and consequences. *Front. Physiol.* **4**, 376 (2013).
10. Luten, M. *et al.* Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. *Transfusion* **48**, 1478–85 (2008).
11. Rohde, J. M. *et al.* Health Care–Associated Infection After Red Blood Cell Transfusion. *JAMA* **311**, 1317 (2014).
12. Vlaar, A. P. J., de Korte, D. & Juffermans, N. P. The aged erythrocyte: key player in cancer progression, but also in infectious and respiratory complications of blood transfusion? *Anesthesiology* **111**, 444 (2009).

13. Atzil, S. *et al.* Blood transfusion promotes cancer progression: a critical role for aged erythrocytes. *Anesthesiology* **109**, 989–97 (2008).
14. Marik, P. E. & Corwin, H. L. Efficacy of red blood cell transfusion in the critically ill: a systematic review of the literature. *Crit. Care Med.* **36**, 2667–74 (2008).
15. Petrik, P., Collet, A. J., Petrik, P. & Collet, A. J. Electron microscopic study of the in vivo erythrophagocytosis by alveolar macrophages of the cat. *Zeitschrift für Zellforsch. und Mikroskopische Anat.* **116**, 477–486 (1971).
16. Bratosin, D., Mazurier, J. & Slomianny, C. Molecular mechanisms of erythrophagocytosis: flow cytometric quantitation of in vitro erythrocyte phagocytosis by macrophages. *Cytometry* **30**, 269–274 (1997).
17. Böhme, D. H. THE RETICULOENDOTHELIAL SYSTEM AND NONSPECIFIC RESISTANCE. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **88**, 172–183 (2006).
18. Delaby, C. *et al.* Subcellular localization of iron and heme metabolism related proteins at early stages of erythrophagocytosis. *PLoS One* **7**, e42199 (2012).
19. De Back, D. Z., Kostova, E. B., van Kraaij, M., van den Berg, T. K. & van Bruggen, R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Front. Physiol.* **5**, 9 (2014).
20. Kimura, H., Tsudzuki, T. & Murachi, T. Proteolytic degradation of hemoglobin-haptoglobin complex by lysosomal enzymes from rat liver. *J. Biochem.* **77**, 909–12 (1975).
21. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. (3rd Edition, Academic Press, 2012). Author(s): Neil D. Rawlings and Guy Salvesen; Chapter 6 - Cathepsin E, Pages 42-49
22. Yonezawa, S. & Nakamura, K. Species-specific distribution of cathepsin E in mammalian blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1073**, 155–160 (1991).
23. Sakai, H., Saku, T., Kato, Y. & Yamamoto, K. Quantitation and immunohistochemical localization of cathepsins E and D in rat tissues and blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* **991**, 367–375 (1989).
24. Saku, T., Sakai, H., Shibata, Y., Kato, Y. & Yamamoto, K. An immunocytochemical study on distinct intracellular localization of cathepsin E and cathepsin D in human gastric cells and various rat cells. *J. Biochem.* **110**, 956–964 (1991).

25. Finley, E. M. & Kornfeld, S. Subcellular localization and targeting of cathepsin E. *J. Biol. Chem.* **269**, 31259–31266 (1994).
26. Muto, N., Yamamoto, M., Tani, S. & Yonezawa, S. Characteristic distribution of cathepsin E which immunologically cross-reacts with the 86-kDa acid proteinase from rat gastric mucosa. *J. Biochem.* **103**, 629–632 (1988).
27. Solcia, E. *et al.* Cathepsin E in antigen-presenting Langerhans and interdigitating reticulum cells. Its possible role in antigen processing. *Eur. J. Histochem. EJH* **37**, 19–26 (1993).
28. Bennett, K. *et al.* Antigen processing for presentation by class II major histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin E. *Eur. J. Immunol.* **22**, 1519–1524 (1992).
29. Finzi, G. *et al.* Cathepsin E in follicle associated epithelium of intestine and tonsils: localization to M cells and possible role in antigen processing. *Histochemistry* **99**, 201–211 (1993).
30. Shin, M. *et al.* Association of cathepsin E with tumor growth arrest through angiogenesis inhibition and enhanced immune responses. *Biol. Chem.* **388**, 1173–1181 (2007).
31. Kawakubo, T. *et al.* Cathepsin E prevents tumor growth and metastasis by catalyzing the proteolytic release of soluble TRAIL from tumor cell surface. *Cancer Res.* **67**, 10869–10878 (2007).
32. Yanagawa, M. *et al.* Cathepsin E deficiency induces a novel form of lysosomal storage disorder showing the accumulation of lysosomal membrane sialoglycoproteins and the elevation of lysosomal pH in macrophages. *J. Biol. Chem.* **282**, 1851–1862 (2007).
33. Föller, M. *et al.* Enhanced susceptibility to suicidal death of erythrocytes from transgenic mice overexpressing erythropoietin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, 1127–1134 (2007).
34. Tsukuba, T. *et al.* Association of cathepsin E deficiency with development of atopic dermatitis. *J. Biochem.* **134**, 893–902 (2003).
35. Tsukuba, T. *et al.* Cathepsin E-deficient mice show increased susceptibility to bacterial infection associated with the decreased expression of multiple cell surface Toll-like receptors. *J. Biochem.* **140**, 57–66 (2006).
36. Nakanishi, H. *et al.* Age-related changes in activities and localizations of cathepsins D, E, B, and L in the rat brain tissues. *Exp. Neurol.* **126**, 119–128 (1994).

37. Nakanishi, H. *et al.* Increased expression of cathepsins E and D in neurons of the aged rat brain and their colocalization with lipofuscin and carboxy-terminal fragments of Alzheimer amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* **68**, 739–749 (1997).
38. Zhao, Q., Garreau, I., Sannier, F. & Piot, J. M. Opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Biopolymers* **43**, 75–98 (1997).
39. Dagouassat, N. *et al.* Generation of VV-hemorphin-7 from globin by peritoneal macrophages. *FEBS Lett.* **382**, 37–42 (1996).
40. Cejka, J., Zelezná, B., Velek, J., Zicha, J. & Kunes, J. LVV-hemorphin-7 lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats: radiotelemetry study. *Physiol. Res.* **53**, 603–7 (2004).
41. Feron, D. *et al.* Significant lower VVH7-like immunoreactivity serum level in diabetic patients: evidence for independence from metabolic control and three key enzymes in hemorphin metabolism, cathepsin D, ACE and DPP-IV. *Peptides* **30**, 256–61 (2009).
42. Roche Diagnostics GmbH. *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation.* (2008).
https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05242134001_05.08.pdf , Zugriff [09.10.2016]
43. Bratosin, D. *et al.* Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ.* **8**, 1143–56 (2001).
44. Lang, K. S. *et al.* Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **15**, 195–202 (2005).
45. SNYDER, G. K. & SHEAFOR, B. A. Red Blood Cells: Centerpiece in the Evolution of the Vertebrate Circulatory System. *Integr. Comp. Biol.* **39**, 189–198 (1999).
46. Bratosin, D. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* **80**, 173–195 (1998).
47. Wang, S., Dale, G. L., Song, P., Viollet, B. & Zou, M.-H. AMPKalpha1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **285**, 19976–19985 (2010).
48. Bratosin, D. *et al.* Molecular mechanisms of erythrophagocytosis. Characterization of the senescent erythrocytes that are phagocytized by macrophages. *C. R. Acad. Sci. III.* **320**, 811–818 (1997).

49. Nairz, M. *et al.* 'Ride on the ferrous wheel' - The cycle of iron in macrophages in health and disease. *Immunobiology* **220**, 280–294 (2015).
50. Muñoz, M., Villar, I. & García-Erce, J. A. An update on iron physiology. *World J. Gastroenterol. WJG* **15**, 4617–4626 (2009).
51. Fillet, G., Cook, J. D. & Finch, C. A. Storage Iron Kinetics. VII. A biologic model for reticoendothelial iron transport. *J. Clin. Invest.* **53**, 1527–1533 (1974).
52. Finberg, K. E. Unraveling mechanisms regulating systemic iron homeostasis. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2011**, 532–7 (2011).
53. Arese, P., Turrini, F. & Schwarzer, E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **16**, 133–146 (2005).
54. Pantaleo, A., Giribaldi, G., Mannu, F., Arese, P. & Turrini, F. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. *Autoimmun. Rev.* **7**, 457–462 (2008).
55. Connor, J., Pak, C. C. & Schroit, A. J. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 2399–2404 (1994).
56. Hattangadi, S. M. & Lodish, H. F. Regulation of erythrocyte lifespan: do reactive oxygen species set the clock? *J. Clin. Invest.* **117**, 2075–7 (2007).
57. Kriebardis, A. G. *et al.* RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components. *Transfusion* **48**, 1943–1953 (2008).
58. Ghashghaeinia, M. *et al.* The impact of erythrocyte age on eryptosis. *Br. J. Haematol.* **157**, 606–614 (2012).
59. Huynh, K. K., Kay, J. G., Stow, J. L. & Grinstein, S. Fusion, Fission, and Secretion During Phagocytosis. *Physiology* **22**, 366–372 (2007).
60. Ehrenreich, B. A. & Cohn, Z. A. Fate of hemoglobin pincyctosed by macrophages in vitro. *J. Cell Biol.* **38**, 244–8 (1968).

61. Cambos, M. & Scorza, T. Robust erythrophagocytosis leads to macrophage apoptosis via a hemin-mediated redox imbalance: role in hemolytic disorders. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 159–171 (2011).
62. ADAMS, E., MCFADDEN, M. & SMITH, E. L. Peptidases of erythrocytes. I. Distribution in man and other species. *J. Biol. Chem.* **198**, 663–670 (1952).
63. Morrison, W. L. & Neurath, H. PROTEOLYTIC ENZYMES OF THE FORMED ELEMENTS OF HUMAN BLOOD. *J. Biol. Chem.* **200**, 39–51 (1953).
64. Bernacki, R. J. & Bosmann, H. B. Red cell hydrolases : II. Proteinase activities in human erythrocyte plasma membranes. *J. Membr. Biol.* **7**, 1–14 (1972).
65. Melloni, E. *et al.* Decay of proteinase and peptidase activities of human and rabbit erythrocytes during cellular aging. *Biochim. Biophys. Acta* **675**, 110–116 (1981).
66. Khorchid, A. & Ikura, M. How calpain is activated by calcium. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 239–41 (2002).
67. Glaser, T. *et al.* Calpain (Ca²⁺)-dependent thiol protease) in erythrocytes of young and old individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7879–7883 (1994).
68. Au, K. S., Hsu, L. & Morrison, M. Ca²⁺-mediated catabolism of human erythrocyte band 3 protein. *Biochim. Biophys. Acta* **946**, 113–118 (1988).
69. Suzuki, Y. *et al.* Participation of caspase-3-like protease in oxidation-induced impairment of erythrocyte membrane properties. *Biorheology* **44**, 179–190 (2007).
70. Matarrese, P. *et al.* Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19**, 416–418 (2005).
71. Heller, M., Edelstein, P. & Mayer, M. Proceedings: Does the human erythrocyte membrane contain protease activity? *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **355**, 1204 (1974).
72. Ballas, S. K. & Burka, E. R. Protease activity in the human erythrocyte: localization to the cell membrane. *Blood* **53**, 875–882 (1979).
73. Alekseenko, L. P. & Orekhovich, V. N. [Human erythrocyte peptidases]. *Gematol. Transfuziol.* **31**, 42–47 (1986).

74. Tomkinson, B., Wernstedt, C., Hellman, U. & Zetterqvist, O. Active site of tripeptidyl peptidase II from human erythrocytes is of the subtilisin type. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7508–7512 (1987).
75. Fujino, T., Watanabe, K., Beppu, M., Kikugawa, K. & Yasuda, H. Identification of oxidized protein hydrolase of human erythrocytes as acylpeptide hydrolase. *Biochim. Biophys. Acta* **1478**, 102–112 (2000).
76. Kakhniashvili, D. G., Bulla, L. A. & Goodman, S. R. The Human Erythrocyte Proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 501–509 (2004).
77. Kimura, H., Yamato, S. & Murachi, T. Different susceptibilities to intracellular proteases of hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin complex. *Physiol. Chem. Phys.* **8**, 101–106 (1976).
78. Morelli, A. *et al.* Favism: impairment of proteolytic systems in red blood cells. *Blood* **69**, 1753–1758 (1987).
79. De Flora, A., Morelli, A., Grasso, M., Forteleoni, G. & Meloni, T. Alterations of red blood cell proteolysis in favism. *Biomed. Biochim. Acta* **46**, S184–189 (1987).
80. Pasini, E. M. *et al.* In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood* **108**, 791–801 (2006).
81. Pasini, E. M., Lutz, H. U., Mann, M. & Thomas, A. W. Red blood cell (RBC) membrane proteomics--Part I: Proteomics and RBC physiology. *J. Proteomics* **73**, 403–420 (2010).
82. D'Alessandro, A., Righetti, P. G. & Zolla, L. The Red Blood Cell Proteome and Interactome: An Update. *J. Proteome Res.* **9**, 144–163 (2010).
83. Bosman, G. J. C. G. M. *et al.* Comparative proteomics of erythrocyte aging in vivo and in vitro. *J. Proteomics* **73**, 396–402 (2010).
84. Pasini, E. M., Lutz, H. U., Mann, M. & Thomas, A. W. Red blood cell (RBC) membrane proteomics--Part II: Comparative proteomics and RBC patho-physiology. *J. Proteomics* **73**, 421–435 (2010).
85. Fagan, J. M. & Waxman, L. The ATP-independent pathway in red blood cells that degrades oxidant-damaged hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **267**, 23015–23022 (1992).
86. Takeda-Ezaki, M. & Yamamoto, K. Isolation and biochemical characterization of procathepsin E from human erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 352–358 (1993).

87. Ueno, E., Sakai, H., Kato, Y. & Yamamoto, K. Activation mechanism of erythrocyte cathepsin E. evidence for the occurrence of the membrane-associated active enzyme. *J. Biochem.* **105**, 878–882 (1989).
88. Yamamoto, K., Yamamoto, H., Takeda, M. & Kato, Y. An aspartic proteinase of erythrocyte membranes. Proposed mechanism for activation and further molecular properties. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **369 Suppl**, 315–322 (1988).
89. Athauda, S. B., Takahashi, T., Kageyama, T. & Takahashi, K. Autocatalytic processing of procathepsin E to cathepsin E and their structural differences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 152–158 (1991).
90. Tsukuba, T. *et al.* Isolation and characterization of recombinant human cathepsin E expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 7276–7282 (1993).
91. Tatnell, P. J., Lees, W. E. & Kay, J. Cloning, expression and characterisation of murine procathepsin E. *FEBS Lett.* **408**, 62–66 (1997).
92. Ostermann, N., Gerhartz, B., Worpenberg, S., Trappe, J. & Eder, J. Crystal structure of an activation intermediate of cathepsin E. *J. Mol. Biol.* **342**, 889–899 (2004).
93. ADAMS, E., DAVIS, N. C. & SMITH, E. L. Peptidases of erythrocytes. III. Tripeptidase. *J. Biol. Chem.* **199**, 845–56 (1952).
94. ADAMS, E. & SMITH, E. L. Peptidases of erythrocytes. II. Isolation and properties of prolidase. *J. Biol. Chem.* **198**, 671–82 (1952).
95. GOETZE, E. & RAPOPORT, S. [Cathepsin of rabbit erythrocytes and its changes during cellular maturation]. *Biochem. Z.* **326**, 53–61 (1954).
96. GOETZE, E. & RAPOPORT, S. [Cathepsin activity and maturation of erythrocytes]. *Klin. Wochenschr.* **32**, 526–7 (1954).
97. Yamamoto, K., Ueno, E., Uemura, H. & Kato, Y. Biochemical and immunochemical similarity between erythrocyte membrane aspartic proteinase and cathepsin E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 267–272 (1987).
98. Jupp, R. A. *et al.* Identification of the aspartic proteinases from human erythrocyte membranes and gastric mucosa (slow-moving proteinase) as catalytically equivalent to cathepsin E. *Biochem. J.* **254**, 895–898 (1988).

99. Takeda, M., Ueno, E., Kato, Y. & Yamamoto, K. Isolation, and catalytic and immunochemical properties of cathepsin D-like acid proteinase from rat erythrocytes. *J. Biochem.* **100**, 1269–1277 (1986).
100. Reichelt, D., Jacobsohn, E. & Haschen, R. J. Purification and properties of cathepsin D from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **341**, 15–26 (1974).
101. Pontremoli, S. *et al.* Isolation and partial characterization of three acidic proteinases in erythrocyte membranes. *Biochem. J.* **181**, 559–568 (1979).
102. Pontremoli, S. *et al.* Differences and similarities among three acidic endopeptidases associated with human erythrocyte membranes molecular and functional studies. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **630**, 313–322 (1980).
103. Yamamoto, K., Takeda, M., Yamamoto, H., Tatsumi, M. & Kato, Y. Human Erythrocyte Membrane Acid Proteinase (EMAP): Sidedness and Relation to Cathepsin D. *J Biochem* **97**, 821–830 (1985).
104. Barkhudaryan, N., Kellermann, J., Galoyan, A. & Lottspeich, F. High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronar-constrictory peptide from the beta-chain of hemoglobin. *FEBS Lett.* **329**, 215–218 (1993).
105. Yamamoto, K. & Marchesi, V. T. Purification and characterization of acid proteinase from human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **790**, 208–218 (1984).
106. Melloni, E., Salamino, F., Sparatore, B., Michetti, M. & Pontremoli, S. Cooperation between soluble and membrane-bound proteinases in the degradation of [beta]-hemoglobin chains in intact human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**, 495–502 (1982).
107. Yasuda, Y. *et al.* Role of N-glycosylation in cathepsin E. A comparative study of cathepsin E with distinct N-linked oligosaccharides and its nonglycosylated mutant. *Eur. J. Biochem.* **266**, 383–391 (1999).
108. Komatsu, M., Biyani, M., Ghimire Gautam, S. & Nishigaki, K. Peptide-Modulated Activity Enhancement of Acidic Protease Cathepsin E at Neutral pH. *Int. J. Pept.* **2012**, 316432 (2012).
109. Biyani, M. *et al.* In Vitro Selection of Cathepsin E-Activity-Enhancing Peptide Aptamers at Neutral pH. *Int. J. Pept.* **2011**, 834525 (2011).
110. Athauda, S. B. P. & Takahashi, K. Distinct cleavage specificity of human cathepsin E at neutral pH with special preference for Arg-Arg bonds. *Protein Pept. Lett.* **9**, 15–22 (2002).

111. Yamamoto, K., Yamada, M. & Kato, Y. Age-related and phenylhydrazine-induced activation of the membrane-associated cathepsin E in human erythrocytes. *J. Biochem.* **105**, 114–119 (1989).
112. Berg, C. P. *et al.* Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ.* **8**, 1197–206 (2001).
113. Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M. & Basu, J. Fas-, Caspase 8-, and Caspase 3-dependent Signaling Regulates the Activity of the Aminophospholipid Translocase and Phosphatidylserine Externalization in Human Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 39460–39467 (2005).
114. Mandal, D., Moitra, P. K., Saha, S. & Basu, J. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett.* **513**, 184–8 (2002).
115. Lang, F. *et al.* Erythrocyte ion channels in regulation of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **559**, 211–217 (2004).
116. Huber, S. M., Gamper, N. & Lang, F. Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch.* **441**, 551–8 (2001).
117. Duranton, C., Huber, S. M. & Lang, F. Oxidation induces a Cl(-)-dependent cation conductance in human red blood cells. *J. Physiol.* **539**, 847–55 (2002).
118. Lang, K. S. *et al.* Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ.* **10**, 249–56 (2003).
119. Lang, P. A. *et al.* PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ.* **12**, 415–28 (2005).
120. Li, Q., Jungmann, V., Kiyatkin, A. & Low, P. S. Prostaglandin E2 stimulates a Ca²⁺-dependent K⁺ channel in human erythrocytes and alters cell volume and filterability. *J. Biol. Chem.* **271**, 18651–6 (1996).
121. Lang, P. A. *et al.* Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J. Cell Sci.* **118**, 1233–1243 (2005).
122. Föller, M., Huber, S. M. & Lang, F. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life* **60**, 661–668 (2008).
123. Browning, J. A., Ellory, J. C. & Gibson, J. S. Pathophysiology of red cell volume. *Contrib. Nephrol.* **152**, 241–268 (2006).

124. Wieder, T. *et al.* Studying Mechanisms of Eryptosis. *Cytotechnology* **49**, 117–132 (2005).
125. Lang, P. A. *et al.* Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **18**, 151–164 (2006).
126. Niemoeller, O. M. *et al.* Induction of eryptosis by cyclosporine. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **374**, 41–49 (2006).
127. Lang, P. A. *et al.* Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *J. Mol. Med. (Berl)*. **84**, 378–388 (2006).
128. Kempe, D. S. *et al.* Suicidal erythrocyte death in sepsis. *J. Mol. Med. (Berl)*. **85**, 273–281 (2007).
129. Nicolay, J. P., Bentzen, P. J., Ghashghaeinia, M., Wieder, T. & Lang, F. Stimulation of erythrocyte cell membrane scrambling by amiodarone. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **20**, 1043–1050 (2007).
130. Lang, F. *et al.* Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **22**, 373–380 (2008).
131. Foller, M. *et al.* TRPC6 contributes to the Ca(2+) leak of human erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **21**, 183–192 (2008).
132. Pant, H. C., Virmani, M. & Gallant, P. E. Calcium-induced proteolysis of spectrin and band 3 protein in rat erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 372–377 (1983).
133. Henschen, A. *et al.* Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **360**, 1211–6 (1979).
134. Nyberg, F., Sanderson, K. & Glämsta, E. L. The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. *Biopolymers* **43**, 147–56 (1997).
135. Zioudrou, C., Streaty, R. A. & Klee, W. A. Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *J. Biol. Chem.* **254**, 2446–9 (1979).
136. Lantz, I., Glämsta, E. L., Talbäck, L. & Nyberg, F. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. *FEBS Lett.* **287**, 39–41 (1991).

137. Cohen, M., Fruitier-Arnaudin, I. & Piot, J. M. Hemorphins: substrates and/or inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Hemorphins N-terminus sequence influence on the interaction between hemorphins and DPPIV. *Biochimie* **86**, 31–7 (2004).
138. Maraninchi, M. *et al.* Serum hemorphin-7 levels are decreased in obesity. *Obesity (Silver Spring)*. **21**, 378–81 (2013).
139. Feron, D., Piot, J.-M. & Fruitier-Arnaudin, I. Proteolytic degradation by cathepsin D of glycosylated hemoglobin from diabetes patients gives rise to hemorphin-7 peptides. *Peptides* **31**, 956–961 (2010).
140. Garreau, I. *et al.* Hemorphin peptides are released from hemoglobin by cathepsin D. radioimmunoassay against the C-part of V-V-hemorphin-7: an alternative assay for the cathepsin D activity. *Peptides* **18**, 293–300 (1997).
141. Maurer, A., Zeyher, C., Amin, B. & Kalbacher, H. A periodate-cleavable linker for functional proteomics under slightly acidic conditions: application for the analysis of intracellular aspartic proteases. *J. Proteome Res.* **12**, 199–207 (2013).
142. Abed, M. *et al.* Adhesion of annexin 7 deficient erythrocytes to endothelial cells. *PLoS One* **8**, e56650 (2013).
143. Mahmud, H., Mauro, D., Qadri, S. M., Föller, M. & Lang, F. Triggering of suicidal erythrocyte death by amphotericin B. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **24**, 263–270 (2009).
144. Föller, M. *et al.* Regulation of erythrocyte survival by AMP-activated protein kinase. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **23**, 1072–1080 (2009).
145. Zhang, X., Goncalves, R. & Mosser, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* **CHAPTER**, Unit–14.1 (2008).
146. Fendel, R. *et al.* New method to quantify erythrophagocytosis by autologous monocytes. *Cytom. Part A J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **71**, 258–264 (2007).
147. Gottlieb, Y. *et al.* Physiologically Aged Red Blood Cells Undergo Erythrophagocytosis in Vivo but Not in Vitro. *Haematologica* (2012). doi:10.3324/haematol.2011.057620
148. Li, H. *et al.* Monitoring Pancreatic Carcinogenesis by the Molecular Imaging of Cathepsin E In Vivo Using Confocal Laser Endomicroscopy. *PLoS One* **9**, e106566 (2014).

149. Fisher, O. M. *et al.* High Expression of Cathepsin E in Tissues but Not Blood of Patients with Barrett's Esophagus and Adenocarcinoma. - PubMed - NCBI. *Ann. Surg. Oncol.* **22**, 2431–8 (2015).
150. Kawakubo, T. *et al.* Repression of cathepsin E expression increases the risk of mammary carcinogenesis and links to poor prognosis in breast cancer. *Carcinogenesis* **35**, 714–26 (2013).
151. Cao, W.-J. *et al.* High Expression of Cathepsin E is Associated with the Severity of Airflow Limitation in Patients with COPD. *COPD* 1–7 (2015). doi:10.3109/15412555.2015.1057273
152. Lukacs, G. L., Rotstein, O. D. & Grinstein, S. Determinants of the phagosomal pH in macrophages. In situ assessment of vacuolar H(+)-ATPase activity, counterion conductance, and H+ 'leak'. *J. Biol. Chem.* **266**, 24540–24548 (1991).
153. Cooper, G. Lysosomes. (2000). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9953/> Zugriff [09.10.2016]
154. Fadok, V. A. *et al.* A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85–90 (2000).
155. Dorrington, K. J. Properties of the Fc receptor on macrophages. *Immunol. Commun.* **5**, 263–80 (1976).
156. Fruiter-Arnaudin, I. I. *et al.* Reduced level of opioid peptides, hemorphin-7 peptides, in serum of diabetic patients. *Diabetes Care* **26**, 2480 (2003).