

Aus dem Institut für Physiologie  
der Universität Tübingen  
Abteilung Physiologie I  
Abteilungsleiter: Professor Dr. F. Lang

**Stimulation der erythrozytären Exposition von  
Phosphatidylserin durch Quecksilberionen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Kerstin Eisele

aus

Ulm

2006

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Jaschonek

3. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

4. Berichterstatter: Professor Dr. J. Eilers

*Meinen Eltern*



## **1. Einleitung**

<b>1.1 Apoptose</b>	<b>8</b>
1.1.1 Apoptose historisch	8
1.1.2 Apoptose und ihre Bedeutung im menschlichen Organismus	9
1.1.3 Apoptose und Nekrose	10
<b>1.2 Caspasen: Schlüsselenzyme der Apoptose</b>	<b>11</b>
1.2.1 Aktivierung der Caspasen	13
1.2.2 Regulation der Caspasen	14
<b>1.3 Signalwege der Apoptose in kernhaltigen Zellen</b>	<b>15</b>
1.3.1 Rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion	16
1.3.2 Die mitochondriale Apoptoseinduktion	17
1.3.3 Apoptoseinduktion durch das Endoplasmatische Retikulum	19
<b>1.4 Die Familie der Bcl-2 Proteine</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Erythrozyten</b>	<b>24</b>
1.5.1 Erythrozyten: Allgemeine Grundlagen	24
1.5.2 Programmierter Zelltod bei Erythrozyten: Ca <sup>2+</sup> -abhängig	26
1.5.3 Programmierter Zelltod bei Erythrozyten: Ca <sup>2+</sup> -unabhängig	30
1.5.4 Rolle der Caspasen in Erythrozyten	31
<b>1.6 Quecksilber</b>	<b>32</b>
<b>1.7 Fragestellung der Arbeit</b>	<b>35</b>

## **2. Material und Methoden**

<b>2.1 Gewinnung und Aufbereitung der Erythrozyten</b>	<b>36</b>
--	-----------

<b>2.2</b>	<b>Verwendete Substanzen</b>	<b>38</b>
<b>2.3</b>	<b>Verwendete Lösungen</b>	<b>39</b>
<b>2.4</b>	<b>FACS-Analyse</b>	<b>41</b>
2.4.1	Durchführung einer FACS-Analyse	45
2.4.2	Ceramid-Bestimmung	46
<b>2.5</b>	<b>Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Messungen</b>	<b>47</b>
2.5.1	Fluo 3/AM	47
2.5.2	Radioaktive <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> -Messungen (Tracer-Flux)	48
<b>2.6</b>	<b>Patch-clamp Experimente</b>	<b>50</b>
<b>2.7</b>	<b>Bestimmung des Hämoglobingehaltes</b>	<b>53</b>
<b>2.8</b>	<b>Statistik</b>	<b>53</b>
<b>3. Ergebnisse</b>		
<b>3.1</b>	<b>Exposition von Phosphatidylserin</b>	<b>54</b>
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung von Zellzahl und Hämoglobin</b>	<b>56</b>
<b>3.3</b>	<b>Bestimmung der Zellgröße</b>	<b>57</b>
<b>3.4</b>	<b>Patch-clamp Experimente</b>	<b>60</b>
<b>3.5</b>	<b>Bestimmung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms</b>	<b>63</b>
3.5.1	Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Konzentration (Fluo 3/AM)	63
3.5.2	Radioaktive <sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> -Messungen	65
3.5.3	Fluo 3 und Hg <sup>2+</sup> -Ionen	66

<b>3.6 Ceramid-Messung</b>	<b>68</b>
<b>4. Diskussion</b>	
<b>4.1 Wirkung von Quecksilberionen auf Erythrozyten</b>	<b>70</b>
<b>4.2 Fehlerdiskussion</b>	<b>76</b>
4.2.1 Detektion der Apoptose durch Annexinbindung	76
4.2.2 Begriffsdefinition: Apoptose	76
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>6. Literatur</b>	
<b>6.1 Publikationsverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>6.2 Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>7. Anhang</b>	
<b>7.1 Danksagung</b>	<b>99</b>
<b>7.2 Lebenslauf</b>	<b>100</b>

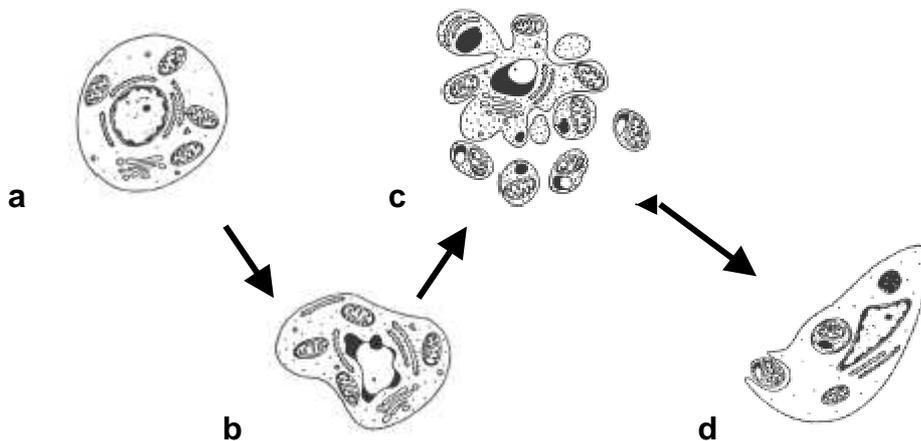
## 1. Einleitung

### 1.1 Apoptose

#### 1.1.1 Apoptose historisch

Der Begriff „Apoptose“ (apo = ab, los, weg; ptosis = Senkung) stammt aus dem Griechischen und beschreibt das Fallen der Blätter im Herbst. In der naturwissenschaftlichen Fachsprache wird mit „Apoptose“ der programmierte Zelltod bezeichnet.

Bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts wurde der programmierte Zelltod von C. Vogt bei der Untersuchung der Metamorphose bei Amphibien entdeckt (Vogt, 1842). Mehr als hundert Jahre später wurden die komplexen morphologischen Veränderungen der Zelle, die beim programmierten Zelltod ablaufen, beschrieben (Kerr et al., 1972) (s. Abb. 1) und der Begriff „Apoptose“ geprägt.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen in apoptotischen Zellen** (nach Kerr et al., 1994). **a:** normale Zelle, **b:** Kondensation von Zytoplasma und Zellkern nach Zellschrumpfung, **c:** anschließend Fragmentierung von Zellkern (Karyorrhexis) und Zytoplasma in apoptotische Körperchen, **d:** Abbau der Vesikel durch Nachbarzellen oder Makrophagen durch Phagozytose und lysosomale Verdauung.

### 1.1.2 Apoptose und ihre Bedeutung im menschlichen Organismus

Jede Sekunde sterben im menschlichen Körper Millionen von Zellen durch programmierten Zelltod. Dadurch werden auf physiologische Art und Weise überflüssige oder potentiell schädliche Zellen entfernt (*Green und Reed, 1998 a*). Das Zusammenspiel von Zellteilung (Mitose), Zelltod und Zelldifferenzierung hat essentielle Bedeutung sowohl für die Entwicklung des menschlichen Organismus, als auch für die Homöostase, der komplexe Umbau-, Aufbau- und Abbauprozesse zugrunde liegen. Ist dieses Gleichgewicht gestört, kann es zu schwerwiegenden Störungen kommen. Bei überschießender Apoptose können neurodegenerative Erkrankungen wie M. Alzheimer (*Cotman und Anderson, 1995*) oder M. Parkinson (*Tatton et al., 2003*) entstehen. Ist die Apoptoserate vermindert, treten vermehrt Krebserkrankungen auf (*Sarasin und Stary, 1997*). Des Weiteren spielen Störungen der Apoptose eine große Rolle bei der Entstehung embryonaler Fehlbildungen, bei viralen Infekten, Autoimmunerkrankungen und AIDS<sup>1</sup> (*Thompson, 1995*). Eine Übersicht über weitere mögliche Konsequenzen einer gestörten Apoptoserate gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1: Beispiele für Krankheiten, die auf einer gestörten Apoptoserate beruhen.**

Erhöhte Apoptoserate	Reduzierte Apoptoserate
Hepatobiliäre Erkrankungen: Primäre sklerosierende Cholangitis Akutes Leberversagen Primäre biliäre Zirrhose Hepatitis Morbus Wilson	Maligne Erkrankungen: Leukämien Lymphome Karzinome
Neurodegenerative Erkrankungen: Multiple Sklerose Retinopathia pigmentosa Amyotrophe Lateralsklerose	Autoimmunerkrankungen: Lupus erythematoses Rheumatoide Arthritis Hypereosinophilie

---

<sup>1</sup> Aquired immunodeficiency syndrome

---

Hämatopoetische Erkrankungen:

Myelodysplastische Syndrome

Aplastische Anämie

Chronische Leukopenie

---

Colitis ulcerosa

Latente virale Infektionen

---

AIDS

---

### 1.1.3 Apoptose und Nekrose

Prinzipiell unterscheidet man zwei unterschiedliche Arten von Zelltod: *Apoptose* und *Nekrose*.

Die Nekrose ist ein passiver Prozess und wird durch unterschiedliche Faktoren wie Sauerstoffmangel, Strahlung oder bestimmte Chemikalien ausgelöst. Dabei kommt es nach initialer Zellschwellung zur Zerstörung der Zellmembran und zur Freisetzung intrazellulärer Makromoleküle, die eine lokale Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe auslösen (Golstein et al., 1991; Kroemer et al., 1998).

Die Apoptose dagegen ist ein aktiver Prozess, der sehr viel kontrollierter als die Nekrose abläuft. Auf molekularer Ebene können drei Phasen unterschieden werden: (1) Initiation, (2) Exekution und (3) Termination.

Auslösende Faktoren können sein: Entzug von Wachstumsfaktoren, UV-Strahlung (Rosette und Karin, 1996), Chemotherapeutika (Carriers et al., 2002; Wieder et al., 2001), oxidativer Stress (Rosette und Karin, 1996), Energiemangel (Pozzi et al., 2002), osmotischer Schock (Bortner und Cidlowski, 1998; Bortner und Cidlowski, 1999; Lang F. et al., 1998 a; Lang F. et al., 2000; Maeno et al., 2000; Michea et al., 2000) oder Aktivierung bestimmter Rezeptoren, den „Todesrezeptoren“.

Die Exekutionsphase ist charakterisiert durch Zellschrumpfung, Umverteilung von Phosphatidylserin von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Plasmamembran, Ausstülpung von Membrananteilen (Zeiosis), Kernfragmentierung, Kondensation von Chromatin und schließlich Abbau der DNA (Green und Reed, 1998).

In der Terminationsphase werden dann die Überreste der Zelle als membranumschlossene Vesikel (sog. „apoptotic bodies“) von benachbarten Zellen oder von Zellen des Immunsystems (Makrophagen) mittels Phosphatidylserin-spezifischer Rezeptoren erkannt, phagozytiert und durch lysosomale Enzyme abgebaut (*Savill et al., 1990; Fadok et al., 1992, Krammer, 1999*). Dadurch wird eine Inflammation der Umgebung verhindert (*Voll et al., 1997*). Deshalb wird die Apoptose auch als physiologischer, regulierter oder programmierter Zelltod bezeichnet.

### 1.2 Caspasen: Schlüsselenzyme der Apoptose

Zentraler Bestandteil der Apoptose ist ein proteolytisches System, welches die typischen morphologischen Veränderungen der Zelle bedingt, die schließlich zu ihrer Desintegration und anschließenden Phagozytose führen. Die Caspasen<sup>2</sup>, eine Familie von Proteasen, übernehmen darin eine wesentliche Rolle und führen nach Aktivierung durch proapoptotische Signale zum Abbau der Zelle.

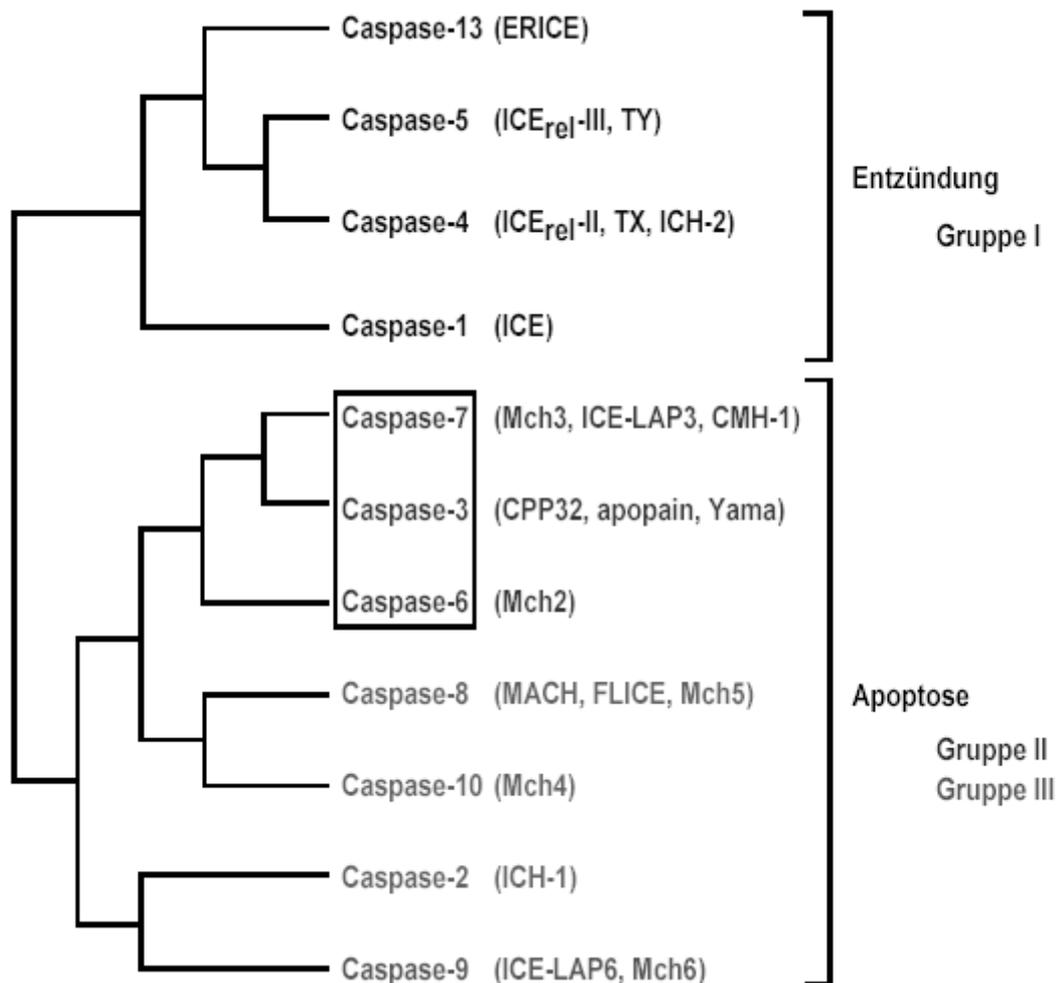
Erstmals in Zusammenhang mit Apoptose gebracht wurden die Caspasen nach der Entdeckung, dass Caspase-1 (ICE: Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme) Ähnlichkeit mit CED-3 besitzt. CED-3 ist ein Genprodukt des Nematoden *Caenorhabditis elegans* und wird für den Zelltod benötigt (*Yuan et al., 1993; Thornberry et al., 1992*).

Bislang konnten bei Säugetieren 14 Caspasen identifiziert werden, wovon 11 auch beim Menschen nachgewiesen wurden.

Die Caspasen ähneln sich alle in Aminosäuresequenz und Struktur (*Nicholson und Thornberry, 1997*). Eine Einteilung in drei Gruppen anhand der Substratspezifität ist dennoch möglich (*Rano et al., 1997*) (s. Abb. 2). Bis heute sind bereits über 280 Substrate der Caspasen identifiziert worden, wobei nicht alle Substrate in jedem Zelltyp gespalten werden.

---

<sup>2</sup> Cysteinyl Aspartat-spezifische Proteinasen



**Abbildung 2: Die Familie der humanen Caspasen** (verändert nach *Nicholson, 1999* und *Strasser et al., 2000*). Caspasen werden in zwei phylogenetische Gruppen eingeteilt. Außerdem ist eine Einteilung anhand der Substratspezifität in drei Gruppen möglich. Gruppe I vermittelt die Prozessierung von Zytokinen, Gruppe II und Gruppe III haben große Bedeutung für die Apoptose (eingerahmt: Effektorcaspasen, rahmenlos: Initiatorcaspasen).

Unabhängig vom apoptotischen Stimulus und Zelltyp werden während des Zelltodprogramms ungefähr 70 Kernmatrixproteine von Caspasen gespalten und ins Zytosol freigesetzt (*Gerner et al., 2002*). Dadurch kommt es zum Abbau der Kernlamina und zur Störung des nukleären Transports durch die Kernpore. Des Weiteren sind die neu entstandenen Proteine nicht mehr in der Lage an DNA zu binden oder Chromatin zu stabilisieren. Auch werden nahezu alle Synthesewege für Makromoleküle wie RNA oder Proteine beeinträchtigt

(Fischer et al., 2003). Eine weitere bemerkenswerte Funktion der Caspasen in Bezug auf die Apoptose ist die Ausschaltung zellprotektiver Mechanismen. So verlieren klassische Inhibitoren der Apoptose wie die Bcl-2 Proteine nicht nur ihren anti-apoptotischen Effekt, sondern werden sogar in pro-apoptotische Proteine umgewandelt.

### 1.2.1 Aktivierung der Caspasen

Bevor die Caspasen jedoch ihre zahlreichen Funktionen erfüllen können müssen die nahezu inaktiven Proenzyme aktiviert werden (Green, 1998 b). Alle Caspasen enthalten drei Domänen: eine NH<sub>2</sub>-terminale Prodomäne, eine große Untereinheit (~20 kD) und eine kleine Untereinheit (~10 kD). Darüber hinaus können die Caspasen noch sog. CARDs (Caspase recruitment domain) oder DEDs (Death effector domain) enthalten, welche die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen. Die Aktivierung kann entweder autokatalytisch oder über Caspasen ähnlicher Spezifität erfolgen. Durch proteolytische Spaltung entstehen aktive Heterotetramere mit zwei katalytischen Zentren, die unabhängig voneinander agieren (Blanchard et al., 1999; Watt et al., 1999). Aufgrund der Reihenfolge ihrer Aktivierung werden zwei Gruppen von Caspasen unterschieden: Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen (Shi, 2002 a). Als Antwort auf einen apoptotischen Stimulus werden Initiatorcaspasen wie Caspase-9 aktiviert, welche ihrerseits die Effektorcaspasen -3, -6 und -7 durch proteolytische Spaltung in Propeptide überführen. Durch eine folgende zweite Proteolyse entstehen zwei Untereinheiten, die essentiell für die Funktion der Effektorcaspasen und damit auch für den Zelltod sind. Die katalytische Aktivität der Effektorcaspasen wird nach abgelaufener Aktivierung um mehrere Zehnerpotenzen erhöht (Salvesen und Dixit, 1999).

Die Aktivierung der Initiatorcaspasen ist wesentlich komplexer und erreicht bei autokatalytischer Spaltung nur eine geringe Steigerung der ursprünglichen katalytischen Aktivität (Stennicke et al., 1999; Srinivasula et al., 2001). Erfolgt die Aktivierung jedoch in Verbindung mit bestimmten zytosolischen Faktoren,

kann ein Anstieg der katalytischen Aktivität um drei Zehnerpotenzen beobachtet werden. Als Beispiel dient Procaspase-9, welche mit Hilfe des „Apoptosoms“ in ihre aktive Form überführt wird (*Rodriguez und Lazebnik, 1999, Srinivasula et al., 2001*).

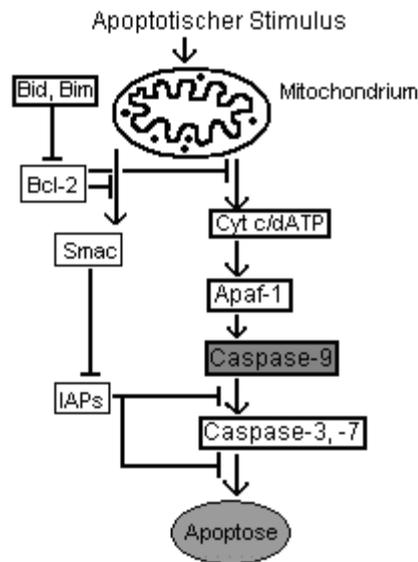
Wirkt ein apoptotischer Stimulus auf eine Zelle ein, wird konsekutiv ein Signal über BH3-only Proteine, die Mitglieder der Bcl-2 Familie sind, an die Mitochondrien weitergeleitet. Diese werden nach komplexer Aktivierung über Bak und Bax, ebenfalls Mitglieder der Bcl-2 Familie, zur Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma angeregt. Cytochrom c wiederum bindet an Apaf-1, welches dadurch zur Multimerisierung angeregt wird. Durch eine konsekutive Konformationsänderung von Apaf-1 in Anwesenheit von dATP wird die sog. CARD<sup>3</sup>-Region freigesetzt. Der so entstandene Komplex wird „Apoptosom“ genannt (*Li et al., 1997*). Die einzige bislang bekannte Funktion dieses Komplexes besteht in der Rekrutierung und Aktivierung von Procaspase-9 durch Interaktion der CARD-Regionen von Apaf-1 und Procaspase-9. Die hauptsächliche Aufgabe von Caspase-9 ist die Aktivierung von Caspase-3 und -7, welche zu den potentesten Effektorcaspasen gehören und deren Aktivierung schließlich zum Zelltod führt (s. Abb. 3).

### 1.2.2 Regulation der Caspasen

Aufgrund der enormen Bedeutung der korrekten Apoptoserate für den menschlichen Organismus werden die Caspasen durch ein komplexes System streng reguliert. Die IAPs sind inhibitorische Proteine der Apoptose, die über Wechselwirkungen mit der katalytischen Region sowohl Initiator-, als auch Effektorcaspasen in ihrer enzymatischen Aktivität hemmen (*Deveraux und Reed, 1999; Salvesen und Duckett, 2002*) (s. Abb. 3). Um unkontrollierten Zelltod zu vermeiden, werden vor Ablauf der Apoptose unabsichtlich aktivierte Caspasen durch IAPs inhibiert.

---

<sup>3</sup> Caspase-recruitment domain



**Abbildung 3: Der apoptotische Signalweg bei Säugetieren** (nach Shi, 2004). Caspase-9 aktiviert als Initiatorcaspase die Effektorcaspasen-3 und -7, deren Aktivierung zum Zelltod führt. Einige Mitglieder der Bcl-2 Familie oder IAPs können Apoptose inhibieren, während andere Bcl-2 Proteine (z.B. Bid, Bim) oder Smac pro-apoptotisch wirken (weitere Erläuterungen s. Text).

Dieser Hemmung der Caspasen durch den antiapoptotischen Effekt der IAPs wirken Proteine entgegen, die ein IAP-bindendes Tetrapeptid enthalten (Shi, 2002 b). Das erste Mitglied dieser Proteinfamilie ist das mitochondriale Protein Smac (Du et al., 2000), auch genannt DIABLO (Verhagen et al., 2000). Smac/DIABLO wird nach apoptotischem Stimulus zusammen mit Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt und hemmt nach multiplen Interaktionen mit IAPs die IAP-vermittelte Inhibition sowohl der Initiator- als auch der Effektorcaspasen (Chai et al., 2000) (s. Abb. 3).

### 1.3 Signalwege der Apoptose in kernhaltigen Zellen

Grundsätzlich gibt es drei verschiedene Wege, wie die Apoptose in kernhaltigen Zellen initiiert werden kann.

(1) Über Aktivierung bestimmter Oberflächenrezeptoren („Todesrezeptoren“) durch Bindung spezifischer Liganden (exogener Stimulus),

(2) über den mitochondrialen Weg durch Einwirkung verschiedener Faktoren auf die Zelle (exogener Stimulus) oder

(3) über das endoplasmatische Retikulum.

### 1.3.1 Rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion

Bereits 1975 wurde ein von Makrophagen produzierter Faktor entdeckt, der maßgeblich an der Zerstörung von Tumorzellen beteiligt war. Dabei handelte es sich um den Tumor-Nekrose-Faktor TNF (*Carswell et al., 1975*).

Heute weiß man, dass TNF durch Bindung an bestimmte Oberflächenrezeptoren Apoptose induzieren kann. Diese Rezeptoren werden aufgrund ihrer Hauptfunktion Zelltodrezeptoren („death receptors“) genannt und bilden eine Untergruppe der TNF-/NGF-Rezeptor-Superfamilie (*Schulze-Osthoff et al., 1998*). Die Todesrezeptoren sind durch eine intrazelluläre Todesdomäne („death domain“, DD) gekennzeichnet, welche entscheidend für die Transduktion des apoptotischen Signals ist (*Tartaglia et al., 1993*). Nach Aktivierung der Rezeptoren durch Bindung spezifischer Liganden wird ein zytoplasmatisches Adapterprotein an die Todesdomäne gebunden. Dieses Adapterprotein aktiviert seinerseits über eine sog. Todeseffektordomäne („death effector domain“, DED) eine Initiatorcaspase, die konsekutiv den Ablauf des programmierten Zelltods initiiert (*Nagata, 1997*). Die bislang am besten untersuchten Adapterproteine sind „TNF-receptor-1-associated death domain“ (TRADD) (*Hsu et al., 1995*) und „Fas associated via death domain“ (FADD)/MORT-1 (*Chinnaiyan et al., 1995*). Bis heute wurden acht Todesrezeptoren identifiziert. Dazu gehören: DR-1 (TNF-R1), DR-2 (CD95, APO-1 oder Fas), DR-3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2), DR-6, EDAR (ectodermal dysplasin receptor) und NGFR (nerval growth factor receptor, p75NTR) (*Locksley et al., 2001; Aggarwal, 2003*).

Bemerkenswerter Weise haben die Todesrezeptoren nicht nur Einfluss auf die Initiierung von Zelltodmechanismen, sondern können über sog. „TNF-receptor-

associated factors“ (TRAF’s) auch Zellaktivierung, Zellproliferation und Zelldifferenzierung fördern (Ashkenazi und Dixit, 1998; Baud et al., 2001).

Ähnlich wie die Zelltodrezeptoren gehören alle Liganden (s. Tab. 2) der Rezeptoren, mit Ausnahme derer des NGFR, aufgrund struktureller Homologien zur TNF-Superfamilie (Ashkenazi und Dixit 1998; Schulze-Osthoff et al., 1998).

**Tabelle 2: Todesrezeptoren und ihre Liganden** (nach Aggarwal, 2003 und Ashkenazi, 2002).

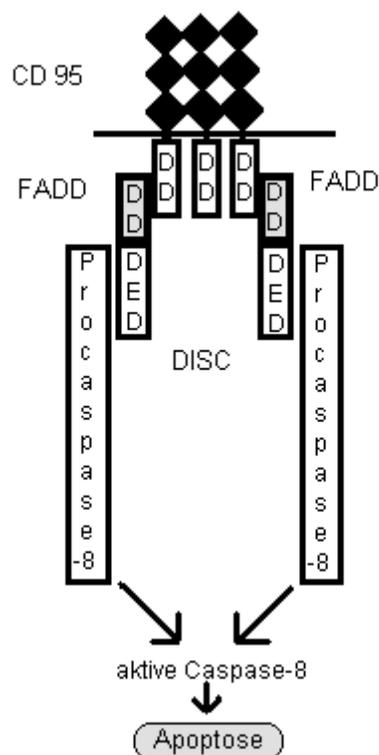
Rezeptor	Ligand
DR 1	TNF $\alpha$ , TNF $\beta$
DR 2	CD 95 L/Fas L/Apo-1 L
DR 3	VEGI
DR 4	TRAIL/Apo-2L
DR 5	TRAIL/Apo-2L
DR 6	?
EDAR	EDA-A1
NGFR	NGF

DR=death receptor, TNF=tumor necrosis factor, Fas L=Fibroblast-associated ligand, VEGI=vascular endothelial growth inhibitor, TRAIL=TNF-related apoptosis-inducing ligand, EDAR= Ectodysplasin receptor, EDA= Ectodysplasin-A, NGF(R)=nerval growth factor (receptor).

Am besten untersucht ist bislang die Signaltransduktion des CD 95-Systems (Ashkenazi und Dixit, 1998; Locksley et al., 2001). Deshalb wird der Wirkmechanismus der Todesrezeptoren nun am Beispiel von CD 95 näher erläutert:

Durch Bindung von löslichem (sCD95L) oder membrangebundenem (mCD95L) CD 95-Liganden an den bereits trimerisierten Rezeptor (Siegel et al., 2000) kommt es zur Dimerisierung zweier Trimere von CD 95 (Holler et al., 2003) und somit zur Aktivierung der apoptotischen Kaskade. Das Adapterprotein FADD bindet über seine C-terminale Todesdomäne (DD) an die DD von CD95, wodurch der Todes-induzierende Signalkomplex („death inducing signalling complex“, DISC) entsteht. Des Weiteren verfügt FADD noch über eine N-

terminale Todeseffektordomäne (DED), die an eine analoge Domäne der Procaspase-8 bindet (Kischkel *et al.*, 2001) (s. Abb. 4) und zu einer Konformationsänderung führt. Konsekutiv erfolgt am DISC autokatalytisch die Aktivierung der Procaspase-8 (Muzio *et al.*, 1996). Die aktive Caspase-8 verlässt den Signalkomplex und aktiviert weitere Caspasen, wodurch das apoptotische Signal fortgeleitet wird.



**Abbildung 4: CD 95-Signalweg.** Nach der Rezeptortrimerisierung werden Adaptermoleküle wie FADD rekrutiert. Die Bindung der Procaspasen in den DISC ermöglicht deren Autokatalyse und löst Apoptose aus (DD: death domain, DED: death effector domain, DISC: death inducing signalling complex).

### 1.3.2 Die mitochondriale Apoptoseinduktion

Die mitochondrial-induzierte Apoptose ist die häufigste in Wirbeltieren beobachtete Form des programmierten Zelltods. Hierbei reagiert die Zelle auf exogene Stimuli wie Entzug von Wachstumsfaktoren, Hypoxie und Hitzeschock (Kluck *et al.*, 1997). Zu den direkt auslösenden Faktoren gehören außerdem

reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) (Cassarino und Bennett, 1999; Kroemer et al., 1997) und Chemikalien, wie z.B. Inhaltsstoffe von Rotwein (Wieder et al., 2001 a) oder Chemotherapeutika (Wieder et al., 2001 b). Indirekt kann der mitochondriale Signalweg über Erzeugung von DNA-Schäden und dadurch bedingte Aktivierung des Tumorsuppressors p53 initiiert werden (Carson und Lois, 1995; Lane, 1992). In allen Fällen spielt die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP<sup>4</sup>) eine entscheidende Rolle. Durch Veränderung der Permeabilität werden nicht weniger als drei Mechanismen aktiviert, in deren Folge Apoptose ausgelöst wird (Green und Kroemer, 2004) (s. Abb. 5):

- Freisetzung von Molekülen, die zur Aktivierung von Caspasen führen,
- Freisetzung von Molekülen, die eine Caspasen-unabhängige Form des Zelltods bewirken,
- Verlust von mitochondrialen Funktionen, die essentiell für das Überleben der Zelle sind.

Der genaue Mechanismus wie die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran reguliert wird konnte allerdings bisher noch nicht aufgeklärt werden. Es wurden jedoch zwei unterschiedliche Modelle beschrieben. Nach dem ersten Modell kommt es nach Öffnung einer Pore in der inneren Mitochondrienmembran (sog. PT-Pore<sup>5</sup>) zum osmotischen Einstrom von Wasser und Molekülen bis zu einer Größe von 1,5 kD (Petit et al., 1996). Dieses Ereignis, genannt „permeability shift transition“, resultiert in einem sofortigen Zusammenbruch des Potentials der inneren Mitochondrienmembran ( $\Delta\Psi_m$ ) und einer Schwellung der mitochondrialen Matrix (Crompton et al., 1999). Da die Oberfläche der inneren Membran durch ihre Fältelung viel größer ist als die der äußeren, führt die Ausdehnung der mitochondrialen Matrix schließlich zum Platzen der äußeren Mitochondrienmembran und die bereits beschriebenen Mechanismen können ablaufen.

Das zweite Modell berücksichtigt die PT-Pore nicht, sondern geht von einem direkten Einfluß der Bcl-2 Familie auf die äußere Mitochondrienmembran aus (Green und Kroemer, 2004). Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass während

---

<sup>4</sup> Mitochondrial outer membrane permeabilization

<sup>5</sup> Permeability transition pore

der Apoptose die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran erhöht ist, wodurch konsekutiv verschiedene Proteine ins Zytosol freigesetzt werden (Goldstein et al., 2000).

Cytochrom c aktiviert die Caspase-9 (Liu et al., 1996), wodurch kaskadenartig mehrere Effektorcaspasen aktiviert werden, die schließlich zum Zelltod führen. Des Weiteren wird durch Verlust von Cytochrom c die mitochondriale Elektronentransportkette zwischen Komplex III und IV gestört. Deshalb binden die Elektronen vermehrt an molekularen Sauerstoff, wodurch insbesondere Superoxidanionen entstehen, die durch Oxidation von Lipiden, Proteinen oder Nucleinsäuren weitere Schäden verursachen können (Cai und Jones, 1998; Cassarino und Bennett, 1999).

Smac/Diablo hat hemmende Wirkung auf Inhibitoren der Apoptose (IAPs) und fördert somit die Apoptose (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000).

Apoptose-induzierender Faktor (AIF) transloziert nach Freisetzung aus den Mitochondrien in den Zellkern und bedingt Caspasen-unabhängig Chromatinkondensation, Fragmentierung der DNA und Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche (Susin et al., 1999; Joza et al., 2001).

Endonuklease G bindet nach Freisetzung an den Zellkern und induziert eine Caspasen-unabhängige DNA-Fragmentierung (Li et al., 2001).

Außerdem werden Procaspasen-2, -3, -9 sowie Ca<sup>2+</sup>-Ionen freigesetzt, die die Aktivierung von Caspasen und Nucleasen begünstigen (Cassarino und Bennett, 1999; Green und Reed, 1998 a; Loeffler und Kroemer, 2000; Petit et al., 1997).

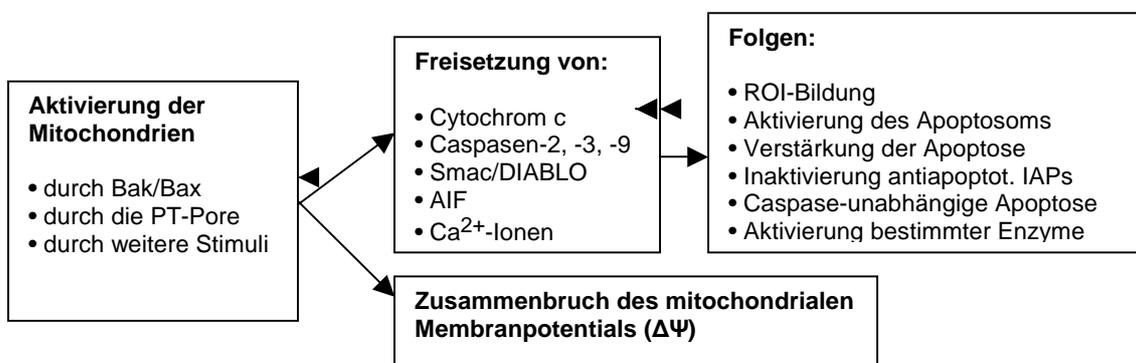


Abbildung 5: Mitochondriale Veränderungen im Verlauf der Apoptose

In der Vergangenheit wurden zunächst Typ-I Zellen, bei denen die Apoptose über den Rezeptor-vermittelten Signalweg induziert wird, von Typ-II Zellen, deren Apoptoseinduktion über den mitochondrialen Weg abläuft, unterschieden (*Schmitz et al., 1999*). Doch inzwischen konnte eine Verbindung zwischen diesen beiden Signalwegen nachgewiesen werden. Über die Spaltung von Bid, einem Mitglied der Bcl-2 Familie, durch die aktive Caspase-8 entsteht ein carboxyterminales Fragment (tBid). Dieses Fragment bindet an Bax, welches durch anschließende Konformationsänderung aktiviert wird und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bewirkt (*Desagher et al., 1999*).

### **1.3.3 Apoptoseinduktion durch das Endoplasmatische Retikulum**

Auf diesen Signalweg wurde man erst kürzlich durch die Entdeckung der im Endoplasmatischen Retikulum (ER) verankerten Caspase-12 aufmerksam (*Nakagawa et al., 2000 a*). Eine wesentliche Aufgabe des ER besteht in der Synthese und anschließenden Faltung verschiedener Proteine in ihre Tertiär- und Quartärstruktur. Verschiedene Faktoren wie Hypoxie, Störungen der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase, virale Infekte oder Proteinüberladung stören diese Funktion und führen somit zur Anhäufung ungefalteter Proteine. Dadurch wird die „ER Stressantwort“ oder die „Ungefaltete-Proteine-Antwort“ (UPR) aktiviert (*Pahl und Baeuerle, 1995*), wodurch die Translationsrate weiterer Proteine gedrosselt wird. Kann dieser Mechanismus aus irgendwelchen Gründen nicht ablaufen, kommt es zur Apoptose. Der genaue Signalweg der ER-induzierten Apoptose konnte bislang jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden.

### **1.4 Die Familie der Bcl-2 Proteine**

Die Proteine der Bcl-2 Familie spielen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Caspasen und somit bei der Regulation der Apoptose. Beim

Menschen wurden bisher 26 Mitglieder der ständig wachsenden Familie beschrieben (siehe Tab. 3).

**Tabelle 3: Humane Mitglieder der Bcl-2 Familie**

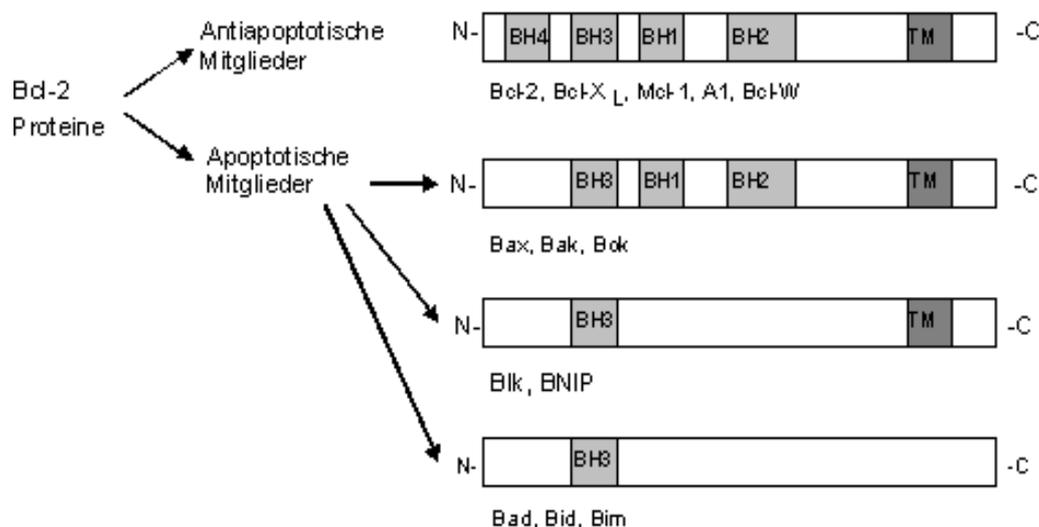
Anti-apoptotisch	Pro-apoptotisch
<b>Bcl-2 (Tsujiimoto et al., 1985)</b>	Bax (Oltvai et al., 1993)
<b>Bcl-X<sub>L</sub> (Boise et al., 1993)</b>	Bak (Chittenden et al., 1995; Kiefer et al., 1995)
<b>Bcl-w (Gibson et al., 1996)</b>	Bok/Mtd (Hsu et al., 1997)
<b>Mcl-1 (Kozopoulos et al., 1993)</b>	Bik/Nbk (Boyd et al., 1995; Han et al., 1996)
<b>A1/Bfl-1 (Lin et al., 1996)</b>	Bid (Wang et al., 1996)
<b>Boo/Diva (Song et al., 1999)</b>	Bad (Yang et al., 1995)
<b>Bcl-xES (Schmitt et al., 2004)</b>	Hrk/DP5 (Inohara et al., 1997)
<b>Bcl-2-L-10 (Zhang et al., 2001)</b>	Bim/Bod (O'Connor et al., 1998)
<b>Bcl-B (Ke et al., 2001)</b>	Noxa/APR (Oda et al., 2000)
	Bnip (Matsushima et al., 1998)
	Bcl-X <sub>S</sub> (Boise et al., 1993)
	Bcl-rambo (Kataoka et al., 2001)
	Bcl-G (Guo et al., 2001)
	Bmf (Puthalakath et al., 2001)
	Bcl-2L12 (Floros et al., 2003)
	EGFP-Bak-like (Kim et al., 2004)
	Bfk (Coultas et al., 2003)

Erstmals entdeckt wurden Bcl-2 Gene in B-Zell Lymphomen<sup>6</sup>. Dort führt eine chromosomale Translokation zur Fehlregulation von Genen mit anschließender Überproduktion der kodierten Proteine (Tsujiimoto et al., 1985). Auf dem Boden dieser Entdeckung wurde Bcl-2 als ein Protoonkogen bekannt, das durch Hemmung der Apoptose das Überleben von Zellen verlängert. In den darauf folgenden Jahren beobachteten mehrere Arbeitsgruppen, dass Bcl-2 überexprimierende Zellen hämatopoetischen Ursprungs nach

<sup>6</sup> B-cell lymphomas

Wachstumsfaktorentzug keine Apoptose einleiten, sondern in die G0-Phase eintreten (*McDonnell et al., 1990; Vaux et al., 1988*). Bcl-2 ist also in der Lage in vielen Zelltypen die Apoptose hinauszuzögern oder sogar ganz zu verhindern (*Hockenbery et al., 1990*).

Inzwischen wurden zahlreiche Bcl-2 Homologe identifiziert, die eine Proteinfamilie bilden. Diese Familie beinhaltet sowohl pro-, als auch antiapoptotische Proteine (*Chao und Korsmeyer, 1998*). Einige Gene der Bcl-2 Familie produzieren zwei oder mehr Proteine, wobei diese gegensätzliche Zelltodfunktionen ausüben können (z.B. Bcl-X<sub>L</sub> und Bcl-X<sub>S</sub>). Die Anfälligkeit einer Zelle für einen apoptotischen Stimulus hängt vom Verhältnis der beiden Subtypen zueinander ab. Unabhängig von ihrer Funktion werden alle Bcl-2 Proteine durch  $\alpha$ -helikale, sogenannte Bcl-2 homologe Domänen (BH1 bis BH4) charakterisiert. Die BH3-Domäne wird als elementarer Bestandteil für die Ausbildung proapoptotischer Eigenschaften angesehen (*Puthalakath und Strasser, 2002*) (s. Abb. 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung anti- und proapoptotischer Bcl-2 Proteine** (nach *Burlacu, 2003*). BH1 bis BH4 bezeichnen homologe Domänen, TM steht für hydrophobe Transmembrandomäne. Die Proteinfamilie beinhaltet antiapoptotische Mitglieder wie Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, A1, Bcl-W mit allen vier BHs und einer TM, sowie proapoptotische Moleküle wie Bax, Bak, Bok ohne BH4-Segment. Weitere proapoptotische Moleküle beinhalten nur die BH3-Domäne mit (Btk, BNIP) oder ohne (Bad, Bid, Bim) hydrophoben Rest.

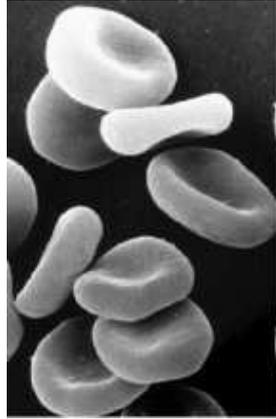
Der Hauptangriffsort von Bcl-2 ist das Mitochondrium, wo es alle apoptotischen Veränderungen unterdrücken kann. So schützen antiapoptotische Proteine vor der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), verhindern Änderungen in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und sorgen für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials. Von den proapoptotischen Proteinen wirken Bak und Bax als direkte Aktivatoren der Mitochondrien. Sie werden durch Mitglieder der BH3-only Familie, die eine Konformationsänderung induzieren, aktiviert.

## 1.5 Erythrozyten

### 1.5.1 Erythrozyten: Allgemeine Grundlagen

#### Form und Funktion

Erythrozyten sind bikonkave scheibenförmige Zellen mit einem Durchmesser von etwa  $7,5 \mu\text{m}$  (s. Abb. 7) und weisen normalerweise eine ausgesprochene Verformbarkeit auf. Ihre Hauptaufgabe besteht im Transport von Sauerstoff von den Respirationsorganen zu den sauerstoffverbrauchenden Zellen durch reversible Bindung an den roten Blutfarbstoff Hämoglobin. Jedes Hämoglobinmolekül besteht aus vier Untereinheiten mit jeweils einer Proteinkette (Globin) und einem eisenhaltigen Porphyrinring (Häm), der Bindungsstelle für  $\text{O}_2$ . Außerdem transportieren die Erythrozyten  $\text{CO}_2$  von der Peripherie zurück zu den Atmungsorganen. Bei Schwellung nehmen sie kugelförmige Gestalt an und werden Sphärozyten genannt. Im Gegensatz dazu spricht man bei Zellschrumpfung von Echinozyten (stechapelförmig). Sowohl die Sphärozyten, als auch die Echinozyten sind in ihrer Verformbarkeit wesentlich eingeschränkt und weisen eine verkürzte Lebensdauer auf.



**Abbildung 7: Erythrozyten.** Eine Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (aus Spektrum der Wissenschaft, Akademischer Verlag).

### Bildung und Abbau

Pro Sekunde werden etwa 2,4 Millionen Erythrozyten neu produziert. Ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt 110-130 Tage.

Die Erythrozyten werden während der Fetalphase in der Leber, danach im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen, den sog. Hämozytoblasten, gebildet. Der Hämozytoblast entwickelt sich im Verlauf mehrerer Zellteilungen über den Proerythroblasten zum Erythroblasten. Mit dem Beginn der Biosynthese von Hämoglobin wird dieser zum Normoblasten, welcher den inzwischen pyknotischen Zellkern während der Weiterentwicklung zum Retikulozyten (juveniler Erythrozyt) ausstößt. Außerdem werden intrazelluläre Membranen und Kompartimente abgebaut. Die so entstandene Zelle enthält netzförmig angeordnete Reste ribosomaler RNA, welche innerhalb der ersten 48 Stunden verschwinden. Der reife Erythrozyt (=Normozyt) schließlich enthält auch keine RNA mehr. Deshalb ist er zur Energiegewinnung hauptsächlich auf anaerobe Glykolyse und zur Generierung von Redoxäquivalenten (NADPH) auf den Pentosephosphatweg angewiesen. Das so entstandene ATP und NADPH dient vor allem der Erhaltung der Zellstruktur, dem aktiven Transport an der Zellmembran (Bsp.:  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase) und der Glutathionsynthese. Glutathion regeneriert in reduzierter Form Thiolgruppen von Proteinen und dient der Entgiftung von Peroxiden. Ein Mangel an Energie beeinträchtigt über die Verminderung von NADPH (Pentosephosphatweg) den Nachschub an GSH

(reduziertes Glutathion) und schwächt somit die antioxidative Abwehr der Erythrozyten (*Bilmen et al., 2001*). Das ebenfalls aus der Glykolyse gewonnene NADH benötigt der Erythrozyt zur Reduktion von Methämoglobin als Voraussetzung für den Sauerstofftransport. Der Abbau der Erythrozyten findet hauptsächlich im retikuloendothelialen System von Knochenmark, Leber und Milz statt.

### Regulation der Erythropoiese

Die Bildung der Erythrozyten wird vorwiegend durch den Einfluss von Erythropoietin reguliert. Das Hormon wird sowohl in der fetalen Leber, als auch in den adulten Nieren gebildet. Seine Ausschüttung wird bei Sauerstoffmangel gesteigert. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Erythropoietin auch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und die darauf folgende Aktivierung der Scramblase hemmt (s. 1.5.2) und somit die Lebensdauer der Erythrozyten verlängert (*Myssina et al., 2003*). Weitere Hormone, die die Erythropoiese fördern, sind Testosteron, Schilddrüsenhormone, Somatotropin und Kortisol.

### **1.5.2 Programmierter Zelltod bei Erythrozyten: $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig.**

Noch vor wenigen Jahren glaubte man, dass Erythrozyten nicht in der Lage seien, programmierten Zelltod durchzuführen. Diese Ansicht wurde unterstützt durch die Tatsache, dass Erythrozyten nach Behandlung mit Staurosporin, Cycloheximid oder nach Serumdeprivation im Gegensatz zu kernhaltigen Zellen kein Zelltodprogramm durchlaufen (*Weil et al., 1996*). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass Erythrozyten, obwohl sie keine Mitochondrien und keinen Zellkern mehr enthalten, nach Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes durch Calcium-Ionophore wie Ionomycin Zellschrumpfung, „membrane blebbing“ (Bildung von Membranausstülpungen und -bläschen) und Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche zeigen. Dies sind alles auch typische Merkmale der Apoptose in kernhaltigen Zellen (*Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001; Daugas et al., 2001*). Folglich sind auch Erythrozyten in

der Lage, sich als Reaktion auf gewisse Stimuli wie hyperosmolaren Schock (z. B. in der Niere), oxidativen Stress oder Energiemangel durch eine Art programmierten Zelltod selbst zu zerstören. Auch die verminderte Lebensdauer von defekten Erythrozyten bei Sichelzellanämie, Thalassämie oder Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasemangel ist auf eine beschleunigte Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche zurückzuführen. Dadurch lassen sich die verminderte Erythrozytenanzahl und der erniedrigte Hämatokrit bei diesen Krankheitsbildern erklären (*Lang K.S. et al., 2002*).

Ein wichtiger Mechanismus hierfür liegt im Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch nicht-selektive Kationenkanäle. Diese Kanäle können infolge oxidativen Stresses (*Duranton et al., 2002*), osmotischen Schocks (*Huber et al., 2001; Lang K.S. et al., 2003 a*), durch Acetylcholin (*Bennekou, 1993*), Membrandepolarisation (*Christophersen und Bennekou, 1991*), Energiemangel (*Lang K.S. et al., 2004*) und Verminderung der intra- oder extrazellulären  $\text{Cl}^-$ -Konzentration (*Duranton et al., 2002; Huber et al., 2001*) geöffnet werden, was zum konsekutiven Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt (*Lang K.S. et al., 2003 a*). Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom hat mehrere Folgen:

### 1.) Aktivierung des Gardos-Kanals

Es wird ein Volumen-sensitiver, einwärts-gleichrichtender  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{K}^+$ -Kanal (KCNN4, hSK4, Gardos-Kanal) in der Erythrozytenmembran geöffnet, der durch Hyperpolarisation der Zellmembran zum Verlust von intrazellulärem KCl führt. Der KCl-Ausstrom ist aufgrund des osmotischen Drucks mit Wasser assoziiert und resultiert somit in einer Zellschrumpfung (*Hoffman et al., 2003; Lang P.A. et al., 2003*). Eine wichtige Rolle spielt der Gardos-Kanal auch bei der Schrumpfung und Deformierung von desoxygenierten Sichelzellen, die zu einer drastischen Erhöhung der Blutviskosität führt (*Joiner et al., 1993; Franco et al., 1996*). Durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber apoptotischen Reizen wird die Lebensdauer der defekten Erythrozyten verkürzt (*Lang K.S. et al., 2002*).

### 2.) Aktivierung der erythrozytären Scramblase

Außerdem wirkt die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aktivierend auf die Scramblase, die zum Zusammenbruch der Membranasymmetrie von Phosphatidylserin und zur Exposition desselben an der Zelloberfläche führt (Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001; Daugas et al., 2001). Da Makrophagen mit spezifischen Rezeptoren für Phosphatidylserin ausgestattet sind (Messmer und Pfeilschifter, 2000; Fadok et al., 2001) wird gewährleistet, dass geschädigte Erythrozyten rasch erkannt, phagozytiert und abgebaut werden, um sie schnellst möglich aus dem Blutkreislauf zu entfernen (Boas et al., 1998; Eda und Sherman, 2002). Die aktivierte Scramblase führt also zu einer verkürzten Lebenszeit der Erythrozyten. Analog dazu weisen gealterte Zellen erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentrationen auf (Romero und Romero, 1999; Kiefer und Snyder, 2000).

### 3.) Aktivierung von Calpain

Die Calpaine bilden eine Familie zytosolischer Cystein-Endopeptidasen. Sie sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und kommen im menschlichen Organismus ubiquitär vor. Die physiologische Aufgabe der Calpaine besteht in der Transduktion extrazellulärer Signale, die über eine Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels vermittelt werden (Sorimachi et al., 1997). Störungen der Calpaine sind aufgrund ihrer unverzichtbaren Funktionen bei Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Nekrose assoziiert mit Erkrankungen wie M. Alzheimer, Katarakt und Muskeldystrophie (Sorimachi und Kawabate, 2003). Substrate, die von Calpain modifiziert werden, sind Strukturproteine wie Keratin, Aktin, Fodrin und Gelsolin (Chan und Mattson, 1999). Außerdem ist Calpain in der Lage Bid und Bax, analog zu den Caspasen (Gao und Dou, 2000), und sogar die Procaspasen-3 und -9 zu spalten, wobei diese jedoch weder aktiviert noch inaktiviert werden (Danial und Korsmeyer, 2004).

Erythrozyten enthalten die Isoform  $\mu$ -Calpain (Calpain I), welche in der Zelle gelöst als inaktives Heterodimer vorliegt. Das Dimer ist zusammengesetzt aus einer 80 kD großen, katalytischen L (*Large*)- Untereinheit, welcher die proteolytische Aktivität zugeschrieben wird, und einer kleinen 28 kD S (*Small*)-

Untereinheit, welche vermutlich über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domäne die katalytische Einheit reguliert (Sorimachi et al., 1997). Die Aktivierung von Calpain erfolgt autokatalytisch in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Durch eine Konformationsänderung wird die aktive Stelle zugänglich gemacht und das Enzym transloziert vom Zytosol an die Plasmamembran. Dort baut es Bestandteile des Zytoskeletts wie Ankyrin R ab, wodurch Ausbuchtungen der Zellmembran entstehen (Melloni et al., 1996; Michetti et al., 1997).

Der endogene Inhibitor Calpastatin reguliert spezifisch die Aktivität der Calpaine (Emori et al., 1987). Des Weiteren besitzen die Erythrozyten ein Calpain-aktivierendes Protein, welches Plasmamembran-assoziiert vorliegt und die Aktivierung von Calpain bereits bei nahezu physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ermöglicht (Salamino et al., 1993).

#### 4.) Einfluß von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf das Zytoskelett

Um ihre Aufgabe des Sauerstofftransportes effektiv zu erfüllen, müssen die Erythrozyten beträchtliche Deformierungen aushalten ohne daran zugrunde zu gehen. Diese ausgeprägte Verformbarkeit wird durch eine unübliche Zusammensetzung der Plasmamembran erreicht. Als Grundlage dient ein auf Spektrin basierendes Membranskelett, welches durch verschiedene Proteine in der Lipiddoppelschicht verankert wird. Die wichtigsten Bestandteile der Zellmembran sind Spektrin, Actin, Protein 4.1, Adducin, Tropomyosin, Tropomodulin, Dematin und p55. Durch laterale Wechselwirkungen entsteht schließlich ein richtiges Netzwerk, das durch  $\beta$ -Spektrin, Ankyrin und Band 3 bzw. durch Protein 4.1 und Glycophorin C in der Lipiddoppelschicht verankert wird (Nunomura et al., 1997).

Eine erhöhte zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hat Einfluss auf dieses komplexe Netzwerk. So wurde bereits vor Jahren gezeigt, dass Calmodulin im Komplex mit Protein 4.1 die Spektrin $\leftrightarrow$ Actin-Interaktion  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig reguliert und damit die Membranstabilität steuert (Tanaka et al., 1991). Calmodulin kommt ubiquitär vor und dient als intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Rezeptor mit hoher Affinität.

Außerdem kann  $\text{Ca}^{2+}$  über Aktivierung einer Transglutaminase eine Quervernetzung der Membranproteine induzieren, wodurch die Zellmembran ihre Flexibilität verliert und rigide wird (*Anderson et al., 1977*).

### 5). Stimulation von Phospholipasen, Proteinkinasen und Phosphatasen

Auch Modifikationen von Phospholipasen (*Allan et al., 1976 a, b; Smith et al., 2001*), Proteinkinasen und Phosphatasen (*Cohen und Gascard, 1992; Minetti et al., 1996*) durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurden beschrieben.

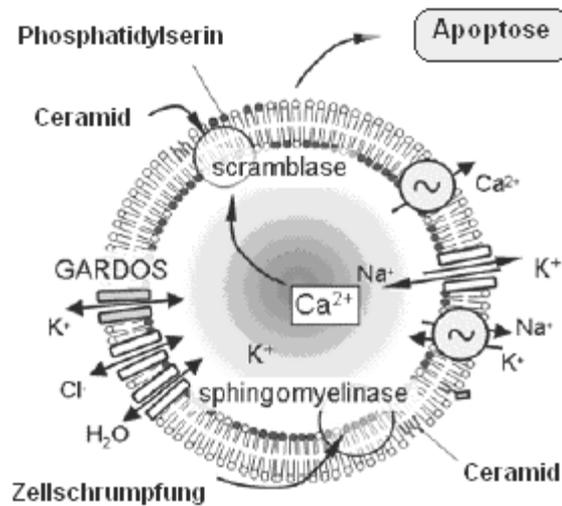
### **1.5.3 Programmierter Zelltod bei Erythrozyten: $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig**

Die Tatsache, dass die sogenannte Eryptose (abgewandelte Art der Apoptose bei Erythrozyten) verursacht durch osmotischen Schock, weder durch Wegnahme der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, noch durch den Kationenkanal-Blocker Amilorid vollständig unterbunden werden kann, weist auf einen zusätzlichen Signalweg hin.

So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit einem hypertonen extrazellulären Medium zu einer Anhäufung von Ceramid führt. Das gebildete Ceramid erhöht die Sensitivität der Scramblase für  $\text{Ca}^{2+}$  und begünstigt somit deren Aktivität. Dadurch kommt es zur vermehrten Exposition von Phosphatidylserin an der Membranoberfläche. (*Lang K.S. et al., 2004*).

Ceramid ist als Sphingolipid ein essentieller Membranbaustein und spielt als „second messenger“ auch bei der Apoptoseinduktion in vielen anderen Zellen eine wichtige Rolle (*Frago et al., 1998; Goldkorn et al., 1998; Kolesnick und Fuks, 2003; Ogretmen und Hannun, 2004; Raisova et al., 2000*).

Gebildet wird Ceramid durch die Sphingomyelinase durch Spaltung des Membranphospholipids Sphingomyelin. Die Zellschrumpfung durch Verlust von KCl nach Aktivierung des Gardos-Kanals induziert ebenfalls die Bildung von Ceramid. Einen Überblick über das Zelltodprogramm der Erythrozyten gibt Abbildung 8.



**Abbildung 8: Programmierter Zelltod bei Erythrozyten** (nach Lang F. et al., 2004). Die Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-permeablen Kationenkanälen mit konsekutiver Öffnung des Gardos-Kanals und Aktivierung der Scramblase führt zur Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche und zur Zellschrumpfung, welche wiederum Ceramidbildung induziert (weitere Erläuterungen siehe Text).

#### 1.5.4 Rolle der Caspasen in Erythrozyten

Faktoren wie Cytochrom c, Apaf-1 oder Caspase-9, die in kernhaltigen Zellen bedeutend für die Apoptose sind, können in Erythrozyten nicht nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise enthalten sie jedoch beträchtliche Mengen an Procaspase-3 (Effektorcaspase) und -8 (Initiatorcaspase), welche allerdings durch eine Vielzahl von apoptotischen Stimuli nicht aktiviert werden können. Bislang konnte lediglich eine Aktivierung der Procaspase-3 infolge oxidativen Stresses gezeigt werden (*Mandal et al., 2002*). Das Zelltodprogramm der Erythrozyten läuft demnach weitgehend unabhängig von Caspasen ab. Die Funktion der vorhandenen inaktiven Caspasen konnte bislang nicht aufgeklärt werden (*Berg et al., 2001*).

## 1.6 Quecksilber

### Eigenschaften und Vorkommen

Die im Periodensystem für Quecksilber verwendete Abkürzung Hg kommt aus dem Lateinischen und bedeutet soviel wie „flüssiges Silber“ (*hydrargyrum*).

Quecksilber ist ein natürlich vorkommendes Schwermetall und gehört zu den giftigsten in der Umwelt anzutreffenden Stoffen (Clarkson, 1971; Passow et al., 1961; Clarkson et al., 2003). Durch Zersetzung von Mineralien im Gestein oder im Erdboden durch Wind- und Wassererosion wird es freigesetzt. Der Mensch erhöht diesen geringen natürlich vorkommenden Quecksilberanteil durch die Verbrennung fossiler Brennstoffe, Bergbau, Müllverbrennung und die Verwendung von Hg-haltigen Pestiziden, welche allerdings seit 1982 verboten sind. Ein Hauptemittent heutzutage ist die Chloralkaliindustrie, wobei durch die Industrieabwässer quecksilberhaltige Schlämme ins Meer gelangen. Dadurch kommt es zur Akkumulation von organischen Quecksilberverbindungen in Meerestieren. Die Konzentrationen dabei sind teilweise so hoch, dass es beim Verzehr dieser Tiere durch den Menschen zu akuten Vergiftungserscheinungen kommen kann. In Minamata, Japan erkrankten in den 50er Jahren auf diese Weise unzählige Menschen. Außerdem wurden Quecksilber und seine Verbindungen jahrhundertlang in der Medizin als Desinfektionsmittel, Antiseptika, Wurmmittel und Diuretika verwendet.

Bei Raumtemperatur liegt Quecksilber als silbern glänzende Flüssigkeit vor, die erst bei  $-39^{\circ}\text{C}$  in den festen Aggregatzustand wechselt. Allgemein können Quecksilberverbindungen je nach Bindungsart in drei Gruppen eingeteilt werden:

- **Metallisches Quecksilber:** gute Resorption bei Inhalation, reichert sich v.a. in Gehirn und Nieren an. Bsp.: Amalgam, Thermometerquecksilber.
- **Anorganisches Quecksilber:** Resorption nur bei oraler Aufnahme, v.a. renale und gastrointestinale Symptome. Bsp.: Quecksilber(I)chlorid (Kalomel), Quecksilber(II)chlorid (Sublimat).

- **Organisches Quecksilber:** gute Resorption bei oraler Aufnahme, durch Anreicherung im Gehirn v.a. zentrale Symptomatik. Bsp.: Mersalyl (früheres Diuretikum), Methylquecksilber (Fungizid).

Die biologische Halbwertszeit von Quecksilber beträgt für den Gesamtorganismus etwa 60 Tage, auf das Gehirn bezogen jedoch mehrere Jahre. Elementares Hg sowie anorganische Quecksilberverbindungen werden vor allem über den Urin ausgeschieden, organische Verbindungen hauptsächlich über den Stuhl (*Deutsche Gesellschaft für Arbeits- und Umweltmedizin, DGAUM*).

### Pathomechanismen

Elementares Quecksilber wird im menschlichen Körper überwiegend über das Katalase-System der Erythrozyten rasch zu  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen oxidiert. Diese wirken durch Bindung an Thiol(SH)-Gruppen primär als Eiweißgifte. Betroffen sind Glutathion, Cystein, Homocystein, N-Acetylcystein, Metallothionein und Albumin. Außerdem binden die Ionen an Carbonyl- und Aminogruppen, jedoch mit einer um zehn Zehnerpotenzen geringeren Affinität (*Zalups, 2000*).

In Erythrozyten konnte nach Einwirkung von Quecksilberdämpfen eine Hemmung der Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, der Glutathion-Reduktase und der Superoxid-Dismutase neben einer Zunahme der Aktivität der Acetylcholinesterase gezeigt werden (*Zabinski et al., 2000*).

### Krankheitsbilder

Durch den hohen Dampfdruck verdampfen bereits bei Zimmertemperatur immer geringe Mengen an Quecksilber. Vor allem diese Dämpfe sind extrem giftig für den Menschen. Bei einer akuten Intoxikation mit metallischem oder anorganischem Quecksilber kommt es initial zu gastrointestinalen Beschwerden mit massivem Erbrechen aufgrund von Kolliquationsnekrosen der Schleimhaut und Gastroenteritis. Anschließend werden die Nieren durch Tubulusnekrosen massiv geschädigt, was sich in einer Oligurie bis Anurie, Albuminurie und Hämaturie äußert. Zuletzt entsteht die sogenannte Colitis mucomembranacea

mit starken Koliken und heftigen, blutigen Durchfällen (*Karow und Lang-Roth, 2003*). Zu den Folgeerscheinungen bei chronischer Quecksilberexposition gehören Schädigungen der Niere (v.a. proximaler Tubulus), zentrale Manifestationen wie Erethismus mercurialis (Reizbarkeit, Unruhe), Tremor mercurialis, sensomotorische Polyneuropathie, Psellismus mercurialis (Konzentrationsstörungen, Sprachstörungen, Persönlichkeitsschwund) und Anämie (*Olynyk und Sharpe, 1982; Ryrie et al., 1970; Zalups, 2000*). Durch die Anämie (Verminderung der Erythrozytenzahl, der Hämoglobinkonzentration und/oder des Hämatokrits) wird die Transportfähigkeit des Blutes für Sauerstoff stark eingeschränkt.

Aufgrund der hohen Toxizität wurde der Gebrauch von Quecksilber in den letzten Jahren stark eingeschränkt. Doch in manchen Bereichen sind immer noch gesundheitsrelevante Dosen vorzufinden. So ist metallisches Quecksilber enthalten in verschiedenen Messgeräten (Thermometer, Barometer, Manometer) und Leuchtstofflampen. Außerdem wird es freigesetzt bei der Wartung und Reparatur von Chloralkalielektrolysezellen im sog. Amalgamverfahren. Anorganische Quecksilberverbindungen werden bei der Herstellung von Knopfzellen verwendet.

### Grenzwerte

Der Wert der maximal zulässigen Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Wert) für Quecksilber liegt in Deutschland bei  $100 \mu\text{g Hg/m}^3$  Luft. Daraus ergeben sich bei beruflich exponierten Personen Konzentrationen von etwa  $100 \mu\text{g Hg/l}$  Urin bzw.  $25 \mu\text{g Hg/l}$  Blut (*DGAUM*).

### Amalgam

Amalgam ist eine Legierung von Quecksilber mit anderen Metallen. In der Zahnmedizin findet es unter Verwendung von Silber, Zinn und Kupfer als Legierungspartner Anwendung als Füllungsmaterial. Dabei tritt das Quecksilber vor allem dampfförmig aus, wird in der Lunge resorbiert und geht ins Blut über. Insgesamt erreicht die Freisetzung von Quecksilber aus Amalgam auch bei zahlreichen Füllungen nur einen Bruchteil der mittleren täglichen

Quecksilberbelastung aus Nahrung und Atemluft und ist daher nicht als Gesundheitsrisiko zu bewerten (*Babisch et al., 1992; Zimmer et al., 2002*).

### **1.7 Fragestellung der Arbeit**

Erst vor kurzer Zeit zeigten mehrere Arbeitsgruppen, darunter *Bratosin et al., 2001; Berg et al., 2001; Daugas et al., 2001* und *Brand et al., 2003*, dass geschädigte Erythrozyten den Membranbaustein Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche exponieren. Dadurch können sie mit Hilfe spezifischer Rezeptoren rasch von Makrophagen aufgenommen und somit aus dem zirkulierenden Blut beseitigt werden.

Es wurde bereits beschrieben, dass im Verlaufe einer Quecksilberintoxikation die Lebensdauer der zirkulierenden Erythrozyten verkürzt ist, was zu einer Anämie führen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht, ob durch den Einfluss von Quecksilberionen die Erythrozyten ebenfalls zur Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche veranlasst werden. Dadurch sollte die Form des ablaufenden Zelltods aufgedeckt werden, um den Pathomechanismus der Anämie besser verstehen zu können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus, um das Wissen und Verständnis des programmierten Zelltods der Erythrozyten erweitern und vertiefen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Gewinnung und Aufbereitung der Erythrozyten

Es wurde Blut von gesunden Probanden verwendet, die sich freiwillig zur Verfügung gestellt haben. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Universität Tübingen geprüft und genehmigt. Die Erythrozytenkonzentrate wurden von der Blutbank der Universität Tübingen bereitgestellt. Zur Herstellung wurde ein „OptiPure RC quadruple blood pack set“ mit einem Filter von Baxter (Unterschleißheim, Deutschland) eingesetzt.

Dabei wurden 500 ml Blut automatisch mit 70 ml des CPD-Puffers gemischt (s. Tab. 4). Die Blutkomponenten wurden durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 4795 g und 22 °C getrennt. Plasma, buffy coat und Erythrozyten wurden dann in die entsprechenden Blutbeutel gepresst.

**Tabelle 4:** Zusammensetzung des CPD-Puffers

Substanz	Konzentration [mg/ml]
Zitronensäure	3,27
Natriumcitrat	26,30
Natriumhydrogenphosphatdihydrat	2,50
Dextrosemonohydrat	25,50

Dabei wurden die Erythrozyten mit SAG-M stabilisierender Lösung (s. Tab. 5) versetzt und durch einen integrierten Leukozyten-Depletionsfilter bei Raumtemperatur gepresst. Die so entstandenen Erythrozytenkonzentrate wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Die Experimente wurden in isotoner Kochsalzlösung bei 37 °C durchgeführt, um möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der SAG-M Lösung

Substanz	Konzentration [mg/ml]
NaCl	8,77
Dextrosemonohydrat	9,00
Adenin	0,17
Mannitol	5,25

### Analyse der Blutzellzahlen

Die im Konzentrat enthaltene Anzahl an Thrombozyten wurde unter Verwendung eines automatischen Blutzellanalysegerätes (CellDyn3000; Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. Die Zellen wurden über die Kombination ihrer optischen und elektrischen Eigenschaften in einem geeigneten Zählermedium erkannt. Nach dieser Analyse enthielten die Erythrozytenkonzentrate  $2,4 \pm 0,2$  % (n=22) der ursprünglichen Thrombozytenzahl im Gesamtblut.

Die Zahl der Blutplättchen wurde ferner anhand einer Thiazolorange-Färbung durchflusszytometrisch nachgewiesen (*Kienast und Schmitz, 1990*). Dabei kam das Retic-COUNT (Thiazole orange) Reagenz von Becton Dickinson zum Einsatz. Die Messungen wurden nach den Hinweisen der Hersteller in einem FACS-Calibur (Becton Dickinson) durchgeführt. Dabei wurde die Zellzahl im Thrombozyten-Gate der entsprechenden Vorwärtsstreuung (forward scatter, FSC) gegen die Thiazolorange-Fluoreszenz-Intensität (FL-1H) aufgetragen und mit Hilfe des CellQuest™ Programms ausgewertet.

Die Leukozytenzahlen in den Erythrozytenkonzentraten wurden anhand der Durchflusszytometrie mit Hilfe eines Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) bestimmt. Durch Einsatz eines TrueCount Kit der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) wurde die interne Normalisierung erzielt. Die Messungen ergaben eine Leukozytenzahl von  $0,012 \pm 0,001$  % (n=22) der ursprünglichen Leukozytenzahl im Gesamtblut. Die Erythrozytenkonzentrate waren also praktisch frei von Leukozyten.

Die Anzahl an Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten in den Erythrozytenkonzentraten wurde außerdem mit Hilfe eines elektronischen Hämatologie-Teilchenzählers (MDM 905, Medical Diagnostics Marx, Butzbach, Deutschland) erfasst.

### **2.2 Verwendete Substanzen**

#### **Quecksilber**

Als Quelle für Quecksilberionen ( $\text{Hg}^{2+}$ ) diente Quecksilber-(II)-chlorid ( $\text{HgCl}_2$ ), ein Produkt der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland). Zunächst wurde eine Stammlösung der Konzentration 10 mM hergestellt. Um die eingesetzten Konzentrationen von 0,03  $\mu\text{M}$  bis 3  $\mu\text{M}$  zu erhalten, wurde die Stammlösung entsprechend verdünnt und die jeweils erforderlichen Volumina zu den Versuchsansätzen pipettiert.

#### **Ionomycin**

Der verwendete Calcium-Ionophor Ionomycin ist ebenfalls ein Produkt der Firma Sigma. Er wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

#### **Annexin-V-Fluos**

Der Verlust der asymmetrischen Anordnung der Membranphospholipide ist ein frühes Merkmal der Apoptose (*Andree et al., 1990; Fadok et al., 1992; Creutz, 1992*). Dabei kommt es zur Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche (*Vermes et al., 1995*). Diese Tatsache wird bei der durchflusszytometrischen Analyse apoptotischer Zellen ausgenutzt. Durch Anfärbung der Proben mit Annexin-V-Fluos können somit apoptotische Zellen nachgewiesen werden (*Koopman et al., 1994; Homburg et al., 1995; Verhoven et al., 1995*). Annexin-V ist ein antikoagulierendes Protein, welches  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig bevorzugt an anionische Phospholipide bindet. Deshalb besteht für Phosphatidylserin eine besonders hohe Affinität (*Andree et al., 1990*).

Um die Menge an gebundenem Annexin-V erfassen zu können, wird es mit dem Fluorochrom Fluoreszeinthiocyanat (FITC) konjugiert. Für die vorliegenden Versuche wurde ein Produkt der Firma Roche (Penzberg, Deutschland) verwendet. Vor Gebrauch wurde die Substanz 1:50 mit Waschpuffer (s. 2.3) verdünnt.

### **Fluo 3/AM**

Das fluoreszierende Fluo 3/AM ist ein Produkt der Firma Calbiochem (Bad Soden, Deutschland). Es ist membranpermeabel und bindet an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Im Gegensatz zu anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -detektierenden Farbstoffen fluoresziert Fluo 3/AM erst nach Hydrolyse durch zelluläre Esterasen und anschließende Bindung an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dadurch werden nur intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erfasst.

### **Fluo 3**

Fluo 3 bindet ebenfalls an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Eine intrazelluläre Aktivierung durch Hydrolyse ist jedoch nicht notwendig. Daher wurde diese Substanz der Firma Calbiochem für einen Kontrollversuch verwendet, in dem mögliche Interaktionen zwischen Fluo 3 und Quecksilberionen überprüft wurden.

## **2.3 Verwendete Lösungen**

### **Ringerlösung**

Die Ringerlösung (s. Tab. 6) diente als Grundlage für alle Versuche. Mit N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethan-sulfonsäure (HEPES) und Natronlauge (NaOH) wurde die Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Die Osmolarität der Lösung betrug 300 mOsm und wurde mit Hilfe eines VAPRO 5520 Dampfdruck-Osmometers (Wescor, Logan, Utah, USA) kontrolliert.

**Tabelle 6:** Zusammensetzung der Ringerlösung

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	125
KCl	5
MgSO <sub>4</sub>	1
HEPES	32
Glucose	5
CaCl <sub>2</sub>	1
NaOH	nach Bedarf

### **Annexin-Waschpuffer**

Nach Inkubation der Erythrozyten mit oder ohne Hg<sup>2+</sup>-Ionen wurde ein Annexin-bindender Puffer zum Waschen und Verdünnen der Proben verwendet (s. Tab. 7). Der gleiche Puffer wurde auch benutzt, um den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff Annexin-V-Fluos zu verdünnen (1:50). Die Lösung wurde ebenfalls mit HEPES und NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung des Annexin-Waschpuffers

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	140
CaCl <sub>2</sub>	5
HEPES	10
NaOH	nach Bedarf

## 2.4 FACS-Analyse

Der Begriff „FACS“ ist eigentlich ein registriertes Markenzeichen der Firma Beckton Dickinson und steht für „Fluorescence Activated Cell Sorting“. Inzwischen hat sich der Begriff aber als allgemeine Bezeichnung für die Durchflusszytometrie eingebürgert.

Die Grundlagen für die Durchflusszytometrie wurden 1952 von Wallace Coulter gelegt. Er beschrieb als erster ein Instrument, mit dem man Zellzahl und Zellgröße elektronisch bestimmen konnte. Dazu mussten die in einer leitenden Flüssigkeit schwimmenden Zellen einzeln einen Messpunkt passieren. Durch die Entwicklung dieses Gerätes wurde das Zählen von gelösten Partikeln und somit z.B. die Leukozytenzählung für eine Blutanalyse wesentlich erleichtert (*McCarthy et al., 2001*).

Die Durchflusszytometrie ermöglicht also das Zählen bestimmter Partikel - im vorliegenden Fall Erythrozyten - und erlaubt darüber hinaus Aussagen über Eigenschaften der gemessenen Teilchen.

Ein Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf Streulicht. Die zu untersuchenden Zellen wandern hintereinander, in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert, durch eine dünne Messkammer und erzeugen je nach Zellgröße und -struktur Streulicht, wenn sie von einem Laserstrahl getroffen werden. Das Streulicht kann dann in verschiedenen Winkeln von dem FACS-Gerät gemessen werden und liefert somit mehrere Informationen über die Eigenschaften der verwendeten Zellen.

Meist wird das Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter, FSC) in einem Winkel von  $0,7^{\circ}$ - $10^{\circ}$  und das Seitwärtsstreulicht (Side-Scatter, SSC) etwa im  $90^{\circ}$ -Winkel zum ursprünglichen Strahl gemessen. Die Größe des Forward-Scatters hängt vor allem von der Größe der Zellen ab, während der Side-Scatter auch von der Binnenstruktur der Zelle und der Membranfaltung bestimmt wird (*Brunsting et al., 1974*).

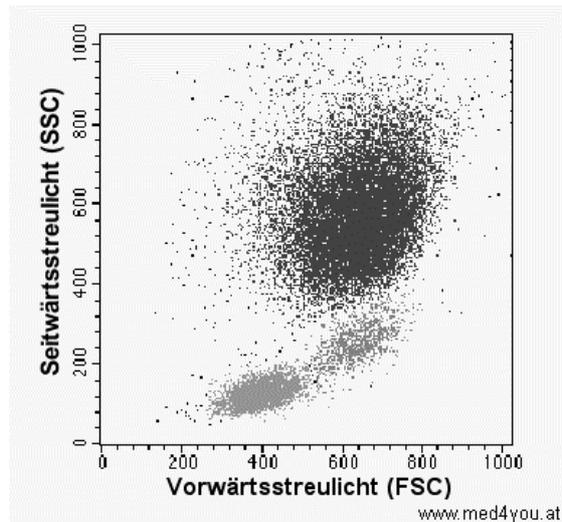
Die Hauptanwendung der FACS-Analyse besteht jedoch in der Erfassung bestimmter Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen wie Zelltyp, Präsentation von Rezeptoren oder Antigenen auf der Zelloberfläche,

Enzymaktivitäten oder DNA-Gehalt. Dies gelingt durch Konjugation mit spezifischen Fluorochromen. Die Zellen werden hierbei mit monoklonalen Antikörpern, die direkt oder über sekundäre Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, markiert. Somit können quantitative Aussagen sowohl über Oberflächenmoleküle, als auch über intrazelluläre Proteine getroffen werden (*McCarthy et al., 2001*).

Das typische Durchflusszytometer besteht aus drei funktionellen Einheiten:

- Einer Lichtquelle (meist Laser) mit Messkammer und optischer Einheit,
- einem hydraulischen System, welches die Passage der Partikel regelt,
- einem Computer, der die elektrischen Signale sammelt und auswertet.

Trifft der monochromatische Laserstrahl auf ein Molekül des Fluoreszenzfarbstoffes, werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Anschließend fallen die Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und emittieren überschüssige Energie in Form von Photonen. Diese Photonenstrahlung wird von einem Photodetektor (sog. Photomultiplier) erfasst, der einen elektrischen Impuls erzeugt. Dieses Signal verhält sich proportional zu der Menge an entstandener Strahlung und somit auch proportional zur Menge an gebundenem Antikörper (*McCarthy et al., 2001*). Die Messergebnisse werden dann graphisch in einem sog. Dot Plot dargestellt, wobei jeder abgebildete Punkt einem Messwert entspricht (s. Abb. 9).



**Abbildung 9: Dot Plot**

Im Physiologischen Institut der Universität Tübingen wird ein FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) für die Durchflusszytometrie verwendet (s. Abb. 10).



**Abbildung 10: FACS-Calibur der Firma Beckton Dickinson**

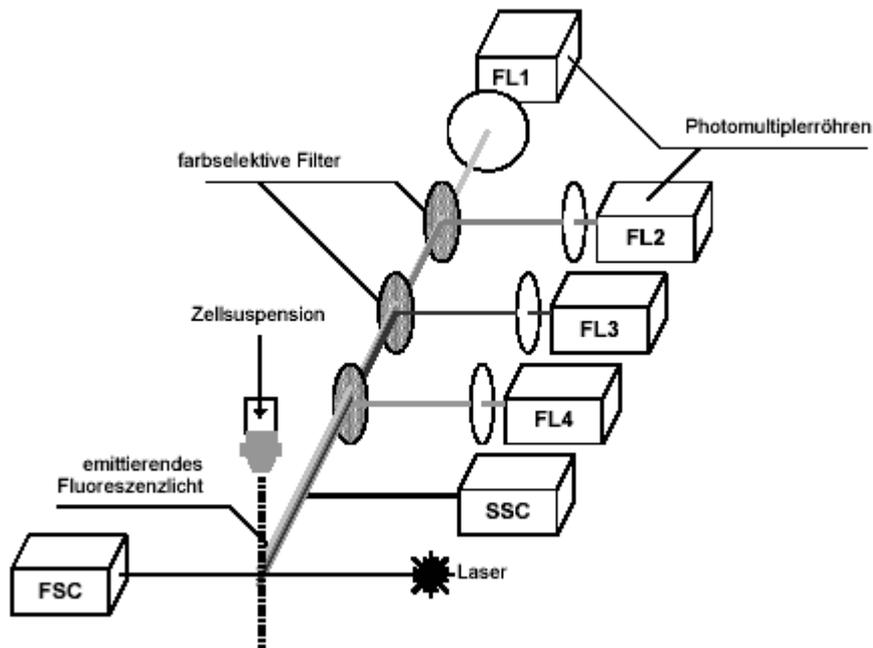
Das Gerät enthält einen luftgekühlten Argonlaser der Wellenlänge 488 nm (blau). Ein zusätzlicher Diodenlaser ermöglicht auch die Erfassung von Farben im roten Spektralbereich (635 nm). So ist die gleichzeitige Analyse von bis zu

vier unterschiedlichen Farben möglich. Die Flussgeschwindigkeit durch die Messkammer beträgt 6 m/s.

Um verschiedene Wellenlängen an emittiertem Licht zu unterscheiden werden Interferenzfilter verwendet. Dadurch werden die unterschiedlichen Fluoreszenzspektren jeweils verschiedenen Kanälen zugeordnet (s. Abb. 11). In der Regel sind das für 515 - 545 nm (grün) Fluoreszenzkanal „FL1“, für 564 - 606 nm (gelb) „FL2“, für >670 nm (rot) „FL3“ und für Wellenlängen von 653 - 669 nm (rot) „FL4“ (*Shapiro et al., 2003*).

Die Datenerfassung und -weiterverarbeitung erfolgte an einem Macintosh-Computer mit Hilfe der Cell Quest Research Software, ebenfalls ein Produkt der Firma Beckton Dickinson.

Das Zellvolumen der Erythrozyten wurde in den durchgeführten Versuchen über Messung des Forward-Scatters (FSC) erfasst. Die Intensität des verwendeten Fluorochroms Annexin-V-Fluos wurde in FL1 (Exzitationswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 530 nm) gemessen. Die FSC-Signale wurden in linearer, die Fluoreszenz-Signale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Dabei wurden die Daten von jeweils 20.000 Zellen pro Probe erfasst.



**Abbildung 11: Prinzip des Durchflusszytometers.** FL1-FL4 bezeichnen unterschiedliche Fluoreszenzkanäle. FSC steht für Vorwärtsstreulicht, SSC für Seitwärtsstreulicht.

### 2.4.1 Durchführung einer FACS-Analyse

- Nach Inkubation der Proben bei 37 °C wurden jeweils 100 µl Zellsuspension in 1 ml Annexin-Waschpuffer (s. 2.3) gewaschen. Dazu wurden die Proben 5 Minuten lang bei 3600 rpm zentrifugiert (Sorvall RT 6000B, Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland).
- Anschließend wurden die Erythrozyten in 100 µl einer Lösung bestehend aus Annexin-V-Fluos und Annexin-Waschpuffer (1:50) resuspendiert.
- Dann folgte eine 10-minütige Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur.
- Schließlich wurden die Proben mit Annexin Waschpuffer 1:5 verdünnt und mit dem FACS-Calibur (Beckton Dickinson) gemessen (FL1, FSC).

### 2.4.2 Ceramid-Bestimmung

Außer den bereits erwähnten Messungen wurde auch die Menge an gebildetem Ceramid mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

Diese Methode beruht auf der Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen Ceramid (*Bieberich et al., 2003; Grassme et al., 2002*).

Folgende Substanzen wurden für die Bestimmung verwendet:

Anti-Ceramid-Antikörper	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Isotypischer gematchter reiner Maus-Ig M-Antikörper	Ancell, Bayport, MN, USA
Anti-Maus Ig G und Ig M (Ziege, FITC-konjugiert)	Pharmingen, Hamburg, Deutschland
Sphingomyelinase (aus <i>Streptomyces</i> sp.)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

#### **Ablauf der Messung**

- Nach Inkubation der Proben bei 37 °C wurden je 100 µl Zellsuspension in 1 ml Waschpuffer, bestehend aus PBS (phosphate buffered saline) und 1 % FCS (fetales Kälberserum) gewaschen. Dazu wurden die Proben 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert (Sorvall RT 6000B, Du Pont de Nemours GmbH).
- Anschließend wurde der 1. Antikörper (Anti-Ceramid-Antikörper bzw. reiner Maus-Ig M-Antikörper im Falle der Negativkontrolle) 1:5 mit PBS/1 % FCS verdünnt und zu den Proben gegeben.
- Inkubationszeit: 1 h bei 4 °C.
- Dann wurden die Proben 3 mal in PBS/1 % FCS gewaschen. Dazu wurde jeweils 5 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert.
- Zugabe des 2. Antikörpers (FITC-Anti-Maus Ig M und Ig G) zu den Proben nach Verdünnung (1:50) in PBS/1 % FCS.

- Inkubationszeit: 30 min bei 4 °C
- Anschließend wiederholtes Waschen mit PBS/1 % FCS, 5 min bei 4000 rpm und 4 °C, um ungebundenen sekundären Antikörper zu entfernen.
- Durchflusszytometrische Erfassung der Intensität der FITC-Fluoreszenz mit FACS Calibur im Fluoreszenzkanal FL1. Die Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe der CellQuest™ Software ausgewertet.

Als Positivkontrolle wurde 1 unit/ml Streptomyces sp. Sphingomyelinase verwendet. Der isotypische gematchte reine Mausantikörper diente als Negativkontrolle, um die spezifische Bindung des 2. Antikörpers an den Anti-Ceramid-Antikörper nachzuweisen. Er zeigte keine gesteigerte Fluoreszenzintensität in FL1.

## 2.5 Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Messungen

### 2.5.1 Fluo 3/AM

Mit Hilfe der FACS-Analyse kann auch der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Gehalt ermittelt werden. Dazu wurde die Methode nach Andrews et al. (*Andrews et al., 2002*) verwendet. Die Erythrozyten werden dabei mit Fluo 3/AM (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) beladen.

#### Vorgehensweise

- Inkubation von 1 ml einer Erythrozytensuspension (0,16 % Hämatokrit in Ringer) mit 2 µl einer Fluo 3/AM Stammlösung (2,0 mM in Dimethylsulfoxid [DMSO]) bei 37 °C für 15 min unter Schütteln und Lichtausschluss.
- Anschließend wurden noch einmal 2 µl der Fluo 3/AM-Stammlösung zu den Proben pipettiert und die Zellen erneut 25 min lang inkubiert.

- Die mit Fluo 3/AM-beladenen Erythrozyten wurden dann bei 22 °C 5 min zentrifugiert (1000 g) und danach zuerst zweimal mit einer Ringerlösung, die 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA) enthielt (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), dann einmal mit reiner Ringerlösung gewaschen.
- Für die Durchflusszytometrie wurden Fluo 3/AM-beladene Erythrozyten in 1 ml Ringerlösung (0,16 % Hämatokrit) resuspendiert und alle Proben bis auf die Kontrollen mit HgCl<sub>2</sub> (0,3 µM) bzw. mit dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin (1 µM; Sigma, Taufkirchen, Deutschland) versetzt und für unterschiedliche Zeitabschnitte bei 37 °C inkubiert.
- Danach wurde die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzkanal FL-1 bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen.

### 2.5.2 Radioaktive <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Messungen (Tracer-Flux)

Um den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Erythrozyten zu bestimmen wurde außerdem radioaktives <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> verwendet. Dazu wurde eine bereits beschriebene Methode verwendet (*Tiffert et al., 1997; Lang et al., 2003*).

#### Vorgehensweise

- Die Erythrozyten wurden 4 mal durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 2000 g gewaschen. Anschließend wurden sie im Verhältnis 1:5 in einer Calcium-bindenden Lösung mit pH 7,5 (Lösung A, s. Tab. 8) resuspendiert, um extrazelluläres Ca<sup>2+</sup> zu entfernen.
- Das Zellpellet wurde dann 2 mal in Lösung B, pH 7,5 gewaschen (2000 g für 5 min), um das in Lösung A verwendete EGTA wieder zu entfernen (s. Tab. 9).
- Schließlich wurden die Erythrozyten auf einen Hämatokrit von 10 % mit Lösung C, pH 7,5 verdünnt und für 20 min bei 37 °C vorinkubiert (s. Tab. 10).

- Dann wurde das radioaktive  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  unter Verwendung einer  $\text{CaCl}_2$ -Stammlösung der Konzentration 100 mM hinzugefügt. Die spezifische Aktivität betrug  $10^7$  cpm/ $\mu\text{mol}$ , so dass eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  erreicht wurde.

**Tabelle 8:** Zusammensetzung der Lösung A, pH 7,5

Substanz	Konzentration [mM]
KCl	80
NaCl	70
HEPES	10
$\text{MgCl}_2$	0,2
EGTA	0,1

**Tabelle 9:** Zusammensetzung der Lösung B, pH 7,5

Substanz	Konzentration [mM]
KCl	80
NaCl	70
HEPES	10
$\text{MgCl}_2$	0,2

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der Lösung C, pH 7,5

Substanz	Konzentration [mM]
KCl	80
NaCl	70
HEPES	10
$\text{MgCl}_2$	0,2
Inosin	10
Na-ortho-Vanadat	1

- Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden jeweils 100  $\mu$ l Zellsuspension zu 0,7 ml der eiskalten (4 °C) Lösung C gegeben und 0,2 mM  $\text{CoCl}_2$  hinzugefügt.
- Anschließend wurden die Proben für 30 s bei 10.000 g und 4 °C in einer Tischzentrifuge der Firma Eppendorf zentrifugiert und das entstandene Pellet zweimal in jeweils 1 ml der Lösung C gewaschen.
- Nach Abnahme des Überstandes wurden durch Zugabe von jeweils 0,7 ml einer 6 %igen Trichloressigsäure die Erythrozyten lysiert und die Proteine denaturiert.
- Dann wurden die Proben noch einmal 10 min bei 14.000 g zentrifugiert und schließlich die Radioaktivität des  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  im Überstand mit einem  $\beta$ -Szintillationszähler der Firma Wallac (Freiburg, Deutschland) gemessen.

### 2.6 Patch-clamp Experimente

Die Patch-clamp Experimente wurden nach einer Methode von Hamill et al. (Hamill et al., 1981) in Voltage-clamp durchgeführt. Die verwendeten Borosilikatglaskapillaren (8-12 M $\Omega$  Spitzenwiderstand; GC 150 TF-10, Clark Medical Instruments, Pangbourne, UK) wurden auf einem Mikroprozessorgetriebenen DMZ Puller (Zeitz, Augsburg, Deutschland) hergestellt und in Kombination mit einem MS 314 elektrischen Mikromanipulator (MW, Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) eingesetzt. Die Kapillaren wurden durch einen chlorierten Silberdraht mit einem EPC-9 Verstärker (Heka, Lambrecht, Deutschland) verbunden und die Ströme unter Verwendung einer Pulse Software (Heka) und eines ITC-16 Interface (Instrutech, Port Washington, N.Y., USA) aufgenommen (Duranton et al., 2002). Der Widerstand der Mikroelektroden wurde stets überprüft.

Für die vorliegenden Versuche wurden Erythrozyten bei Raumtemperatur auf ein Haltemembranpotenzial ( $V_h$ ) von -30 mV eingestellt und 400 ms lange Pulse von -100 mV bis +100 mV in Schritten von 20 mV appliziert. Die Ganzzellströme wurden ohne Filterung aufgenommen (Aquisitionsrate 5 kHz).

Die Daten wurden durch Mittelwertbildung der gemessenen Ströme zwischen 350 und 375 ms jedes Rechteckpulses analysiert. Die angewandten Spannungen beziehen sich auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran im Vergleich zum Extrazellulärraum. Offset-Potenziale zwischen beiden Elektroden wurden vor Durchführung der Messung ausgeglichen. „Liquid junction“-Potenziale zwischen Bad- und Pipettenlösung und zwischen Badlösung und Salzbrücke (gefüllt mit NaCl) wurden nach Barry und Lynch (*Barry und Lynch, 1991*) berechnet und die Daten entsprechend korrigiert. Einwärts gerichtete Ströme, definiert als Bewegung positiver Ladung von der extrazellulären zur zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, werden als negative Ströme bezeichnet und in den Abbildungen als Abweichungen nach unten dargestellt. Die Zusammensetzung der Pipettenlösung (pH 7,4) zeigt Tabelle 11.

**Tabelle 11:** Zusammensetzung der Pipettenlösung, pH 7,4

Substanz	Konzentration [mM]
Kalium-d-glukonat	80
KCl	60
MgATP	1
MgCl <sub>2</sub>	1
EGTA	3
CaCl <sub>2</sub>	2
HEPES	10
NaOH	nach Bedarf

Die zu Kontrollzwecken verwendete NaCl-haltige Badlösung enthielt folgende Substanzen (siehe Tab. 12):

**Tabelle 12:** Zusammensetzung der Badlösung, pH 7,4

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	115
MgCl <sub>2</sub>	10
CaCl <sub>2</sub>	5
HEPES	20
NaOH	nach Bedarf

Nach Erreichen der Ganzzell-Konfiguration wurde die Standard-NaCl-Badlösung angereichert mit HgCl<sub>2</sub> (1 µM) durch schnelle Perfusion in die Patch-clamp Kammer gegeben. Experimente zur Erfassung selektiver Ströme wurden nach Ersetzen der NaCl-haltigen Lösung durch eine KCl-Lösung (s. Tab. 13) durchgeführt. HgCl<sub>2</sub> wurde in destilliertem Wasser gelöst und eine Stammlösung von 10 mM hergestellt.

**Tabelle 13:** Zusammensetzung der KCl-haltigen Badlösung, pH 7,4

Substanz	Konzentration [mM]
KCl	140
MgCl <sub>2</sub>	1
CaCl <sub>2</sub>	1
HEPES	10
NaOH	nach Bedarf

## 2.7 Bestimmung des Hämoglobingehaltes

Nach Inkubation der Erythrozyten mit Quecksilberionen wurde die Hämoglobinkonzentration im Überstand bestimmt. Dazu wurden die Proben zuerst 5 min bei 450 g zentrifugiert, um ein Pellet zu erhalten. Anschließend wurde der Hämoglobingehalt im Überstand photometrisch mit Hilfe des elektronischen Teilchenzählers MDM 905 der Firma Medical Diagnostic (Butzbach, Deutschland) bestimmt.

Die Hämoglobinkonzentration im Überstand wurde anhand der Absorption bei 546 nm nach Oxidation zu *Cyanomet*-Hämoglobin quantifiziert. Die Absorption des Überstandes von in destilliertem Wasser vollständig hämolysierten Erythrozyten wurde als 100 % Hämolysen festgesetzt.

## 2.8 Statistik

Von den gemessenen Daten wurden das arithmetische Mittel und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) bestimmt. „n“ gibt dabei die Anzahl voneinander unabhängiger Messungen an. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des gepaarten oder ungepaarten t-Tests beim Vergleich von zwei Experimenten bzw. mit dem ANOVA<sup>7</sup>-Test beim Vergleich mehrerer Versuchsreihen durchgeführt. Dabei wurden nur p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant gewertet.

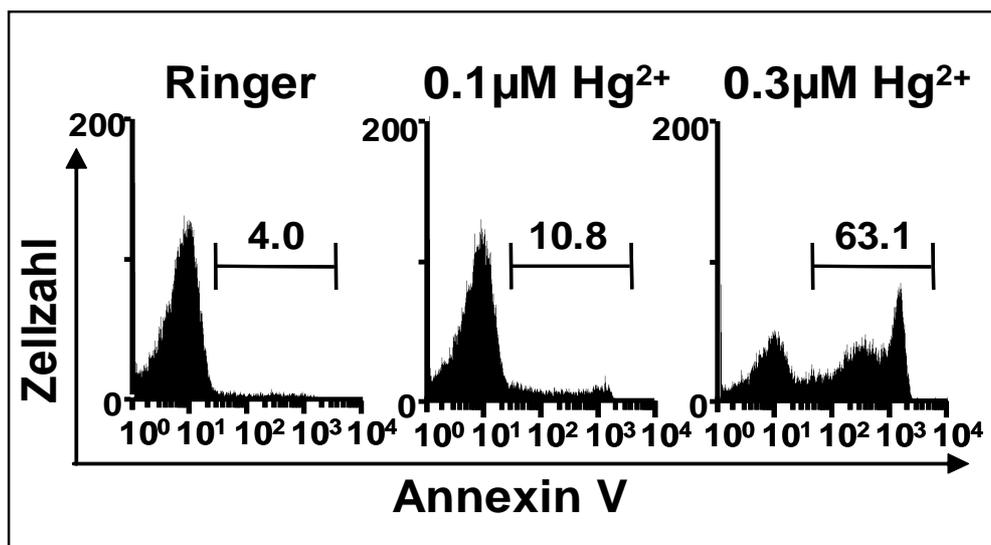
---

<sup>7</sup> Analysis of variance

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Exposition von Phosphatidylserin

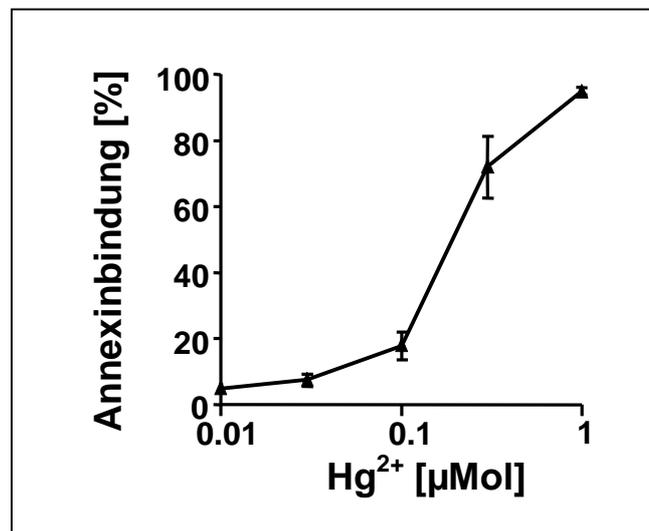
Die verwendeten humanen Erythrozyten zeigten in Ringerlösung nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden eine geringe, aber bereits messbare Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Die Anzahl der geschädigten Erythrozyten wurde durch die Bindung von Annexin-V-Fluos erfasst und betrug  $4,5 \pm 1,4$  %. Dieser Wert wurde aus  $n = 8$  Messungen ermittelt und dient als Kontrollwert.



**Abbildung 12: Stimulation der Phosphatidylserinexposition an der Zelloberfläche durch Hg<sup>2+</sup>-Ionen.** Die Histogramme zeigen den jeweiligen Anteil an Annexin-bindenden Zellen in einem repräsentativen Experiment. Links befindet sich das Messergebnis nach 24-stündiger Inkubationszeit der Erythrozyten in Ringerlösung. In der Mitte und rechts sind die Werte für ebenfalls 24-stündige Inkubation in Ringerlösung mit 0,1 µM bzw. 0,3 µM HgCl<sub>2</sub> aufgetragen. Ermittelt wurden diese Daten mittels Durchflusszytometrie.

Nach Zugabe von  $\text{HgCl}_2$  in Konzentrationen von  $0,01 \mu\text{M}$  -  $1 \mu\text{M}$  zu den Versuchsansätzen konnte ein signifikant gesteigerter Anteil an Annexin-bindenden Zellen beobachtet werden (s. Abb. 12).

Das Ausmaß des jeweiligen Anstiegs war sowohl abhängig von den verwendeten Stoffkonzentrationen, als auch von der Inkubationszeit. Ein halbmaximaler Effekt wurde im Bereich von  $0,2 \mu\text{M}$  erreicht. Im Anschluss an eine Quecksilberexposition der Erythrozyten in Höhe von  $1 \mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen über 24 Stunden banden nahezu alle Zellen Annexin (s. Abb. 13).



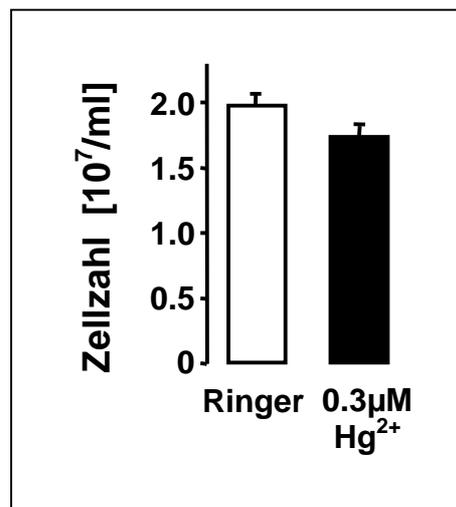
**Abbildung 13:** Prozentualer Anteil an Annexin-bindenden Erythrozyten aufgetragen gegen die jeweils eingesetzte  $\text{Hg}^{2+}$ -Konzentration. Die Zellen wurden 24 h in Ringerlösung inkubiert. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung bei  $n = 8-10$ .

Auch nach wesentlich kürzeren Inkubationszeiten hatten die Quecksilberionen einen deutlichen Effekt auf die Zellen. So erreichte der Anteil an Annexin-bindenden Erythrozyten bei einer  $\text{HgCl}_2$ -Konzentration von  $0,3 \mu\text{M}$  bereits nach 45 Minuten  $51 \pm 3 \%$  bei  $n = 6$ .

### 3.2 Bestimmung von Zellzahl und Hämoglobin

Zum Ausschluss einer Verfälschung der Daten durch Hämolyse wurden Experimente zur Bestimmung von Zellzahl und Hämoglobinkonzentration im Überstand durchgeführt.

Nach 2-stündiger Exposition mit  $0,3 \mu\text{M Hg}^{2+}$  wurde weder eine nennenswerte Abnahme der Erythrozytenzahl ( $104,2 \pm 4,2 \%$ ,  $n = 4$ ), noch ein signifikanter Anstieg der Hämoglobinkonzentration im Überstand ( $0,8 \pm 0,9 \%$ ,  $n = 4$ ) beobachtet. Nach Inkubation der Erythrozyten über 24 Stunden mit  $0,3 \mu\text{M Hg}^{2+}$ -Ionen zeigte sich allerdings sowohl eine leichte Abnahme der Zellzahl (s. Abb. 14), als auch eine Zunahme des Hämoglobingehaltes im Überstand ( $8,3 \pm 3,1 \%$  des Gesamthämoglobins,  $n = 4$ ).



**Abbildung 14: Darstellung der Anzahl der Erythrozyten nach Inkubation (24h) in reiner Ringerlösung bzw. in Ringerlösung versetzt mit  $0,3 \mu\text{M Hg}^{2+}$ -Ionen.** Die Daten wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst und über einen Zeitraum von 24 h aufgezeichnet. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt ( $n = 8-10$ ).

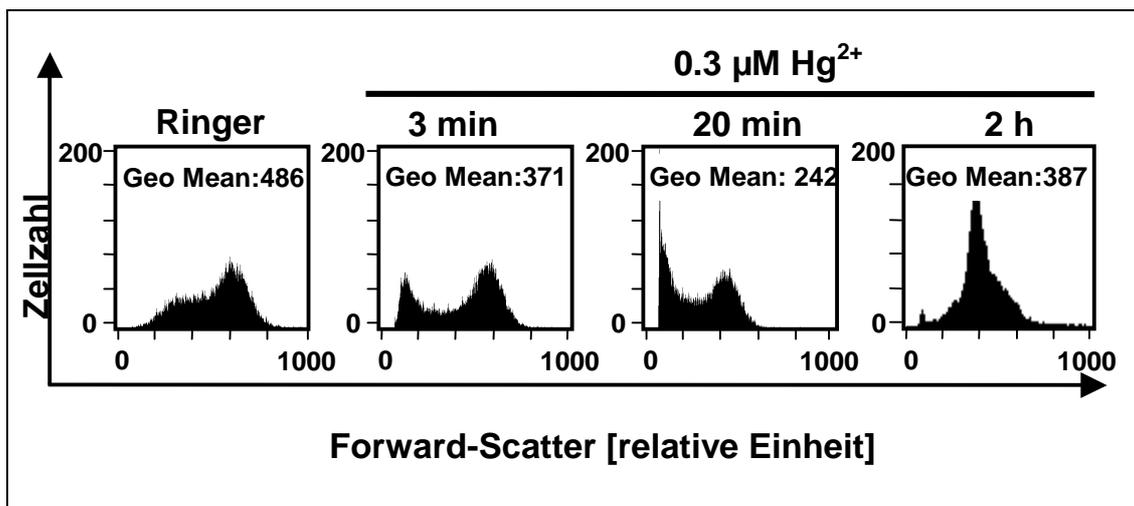
### 3.3 Bestimmung der Zellgröße

Zusätzlich zur Erhöhung des Anteils an Annexin-bindenden Erythrozyten bestand die Vermutung, dass Quecksilberionen auch Einfluss auf die Zellgröße nehmen. Um diesem Verdacht nachzugehen wurden weitere durchflusszytometrische Messungen durchgeführt und vor allem der Forward-Scatter analysiert.

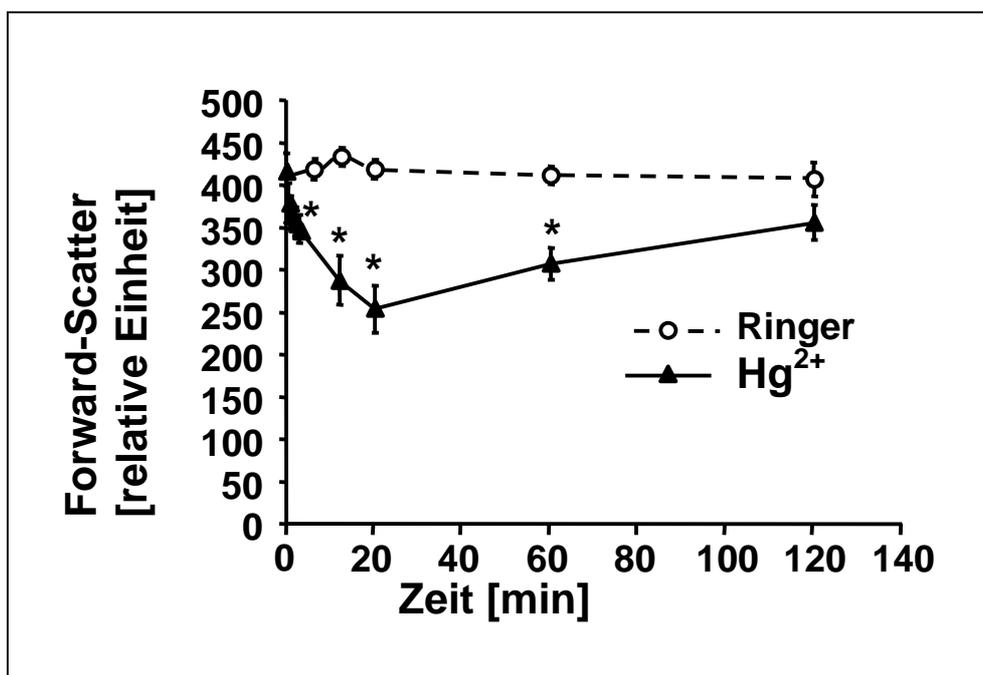
So konnte gezeigt werden, dass die Einwirkung von  $\text{HgCl}_2$  zu einer signifikanten Abnahme des Forward-Scatters (FSC) in der FACS-Analyse führt, was gleichbedeutend mit einer Schrumpfung der Erythrozyten ist. Dieser Effekt war jedoch reversibel und dauerte nur vorübergehend an.

Wie in den Abbildungen 15 und 16 veranschaulicht, hatte die Einwirkung unterschiedlicher Konzentrationen an  $\text{HgCl}_2$  ( $0,1 \mu\text{M}$  -  $1 \mu\text{M}$ ) eine Verminderung des Forward-Scatters zur Folge. Die maximale Verringerung des Zellvolumens konnte nach etwa 20 Minuten beobachtet werden.

Anschließend erfolgte im Verlauf von 2 h eine langsame, jedoch noch unvollständige Erholung der Zellen im Sinne einer erneuten Zunahme der Zellgröße.

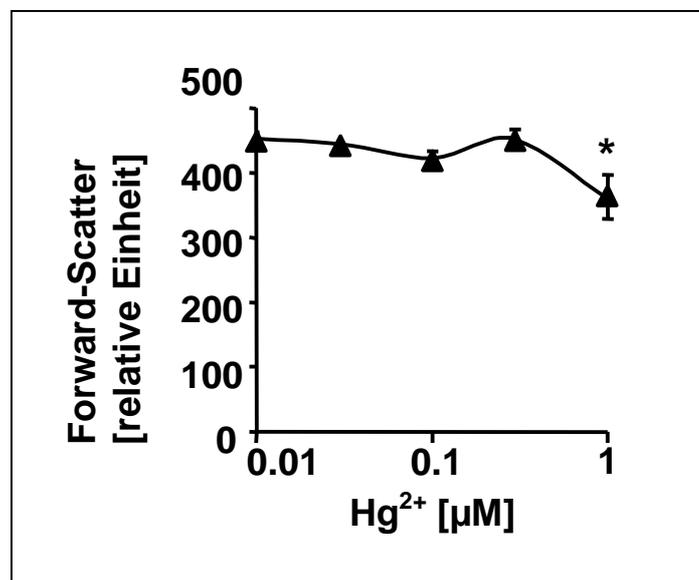


**Abbildung 15:** Zellschrumpfung der Erythrozyten nach Einwirkung von  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen. Die Histogramme zeigen den Forward-Scatter in einem typischen Experiment. Dabei wurden die Erythrozyten unterschiedlichen Lösungen ausgesetzt. Die Diagramme zeigen Werte für die Inkubation in reiner Ringerlösung (linkes Bild) bzw. in Ringerlösung versetzt mit  $0,3 \mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ . Die Messung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (3 min, 20 min, 2 h) durchgeführt.



**Abbildung 16:** Forward-Scatter von Kontrollerythrozyten in Ringerlösung (offene Kreise) im Vergleich zu Erythrozyten, die in Anwesenheit von  $0,3 \mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  inkubiert wurden (schwarze Dreiecke). Der Verlauf der Messwerte wurde über einen Zeitraum von 2 h aufgezeichnet. Die Daten sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung bei jeweils  $n = 6$ .

Nach einer Erholungszeit von 24 h hatten sich in den meisten Fällen die Erythrozyten sogar vollständig regeneriert und zeigten wieder physiologische Werte der Zellgröße. Nur bei der höchsten eingesetzten Dosis von 1  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen behielten die Zellen auch nach 24 Stunden Regenerationszeit noch eine moderate Verringerung des Forward-Scatters bei (s. Abb. 17).

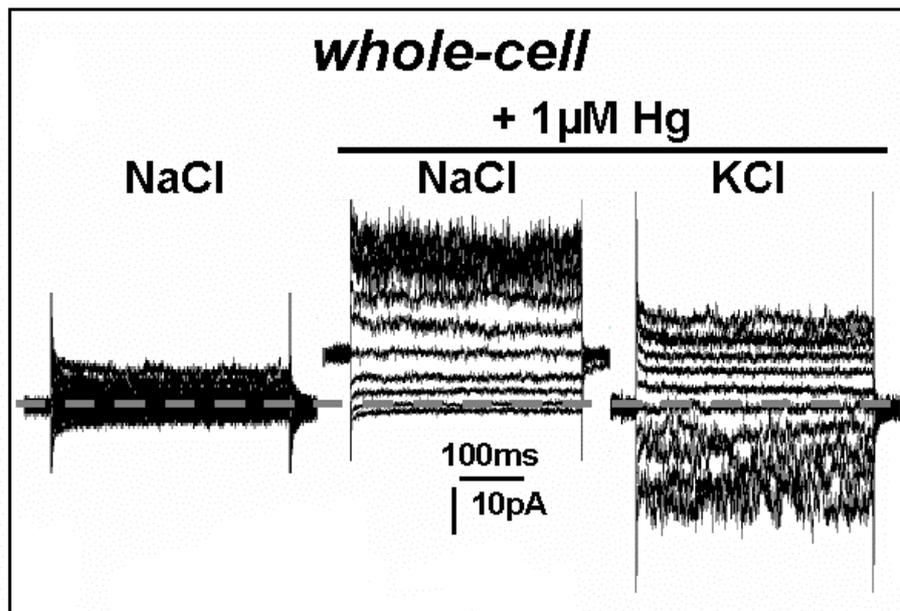


**Abbildung 17: Forward-Scatter von Erythrozyten in Abhängigkeit von der  $\text{Hg}^{2+}$ -Konzentration.** Die Zellen wurden 24 h in Ringerlösung inkubiert. Die Daten sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung bei  $n = 6$ . \* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrolle (Abwesenheit von  $\text{Hg}^{2+}$ ).

### 3.4 Patch-clamp Experimente

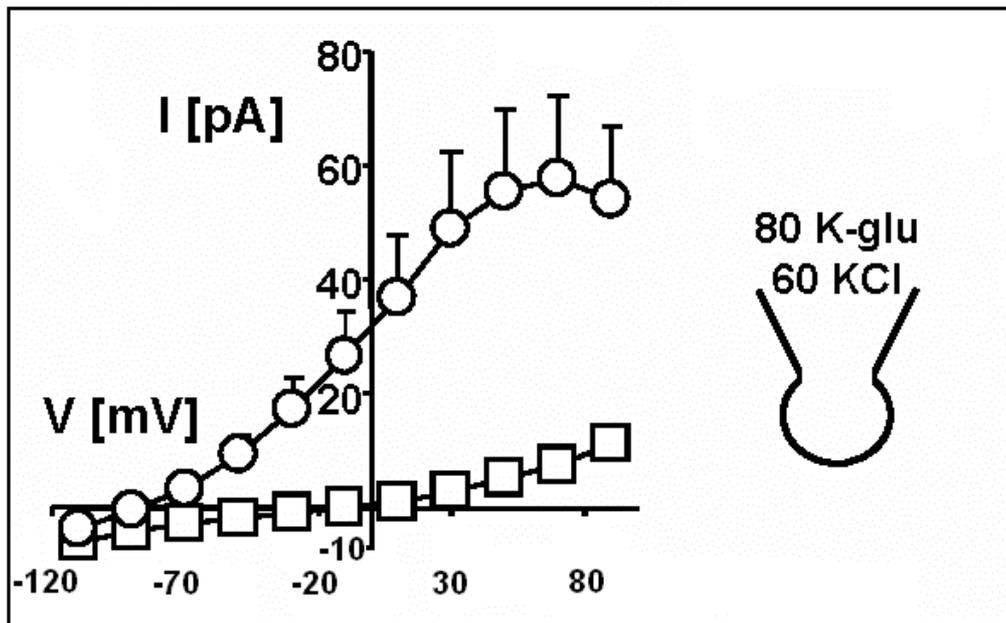
Um den Mechanismus aufzudecken, über welchen Quecksilber Zellschrumpfung und Exposition von Phosphatidylserin induziert, wurden Ganzzell-Patch-clamp Experimente durchgeführt.

Dabei konnte nach Superfusion mit  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen ( $1 \mu\text{M HgCl}_2$ ) ein schneller ( $<2\text{min}$ ) und sehr ausgeprägter Anstieg des Auswärtsstromes beobachtet werden (s. Abb. 18). Diese Tatsache weist auf eine Aktivierung selektiver  $\text{K}^+$ -Kanäle der Erythrozyten durch Einwirkung von Quecksilberionen hin.



**Abbildung 18: Aktivierung eines  $\text{K}^+$ -selektiven Kanals in der Erythrozytenmembran durch  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen.** Originale Aufzeichnung von Ganzzellströmen eines humanen Erythrozyten vor (links außen) und nach (Mitte) Verabreichung von  $1 \mu\text{M Hg}^{2+}$ -Ionen zu der NaCl bzw. KCl (rechts außen) Badlösung (K-Glukonat/KCl-Pipettenlösung). Das Membranpotenzial wurde auf  $-30 \text{ mV}$  eingestellt und Pulse von  $-100 \text{ mV}$  bis  $+100 \text{ mV}$  in Schritten von je  $20 \text{ mV}$  appliziert. Die gestrichelten Linien veranschaulichen den Nullwert. Bemerkenswert ist der augenblickliche Anstieg des Auswärtsstromes, der auf eine  $\text{Hg}^{2+}$ -abhängige Aktivierung eines selektiven  $\text{K}^+$ -Kanals hinweist.

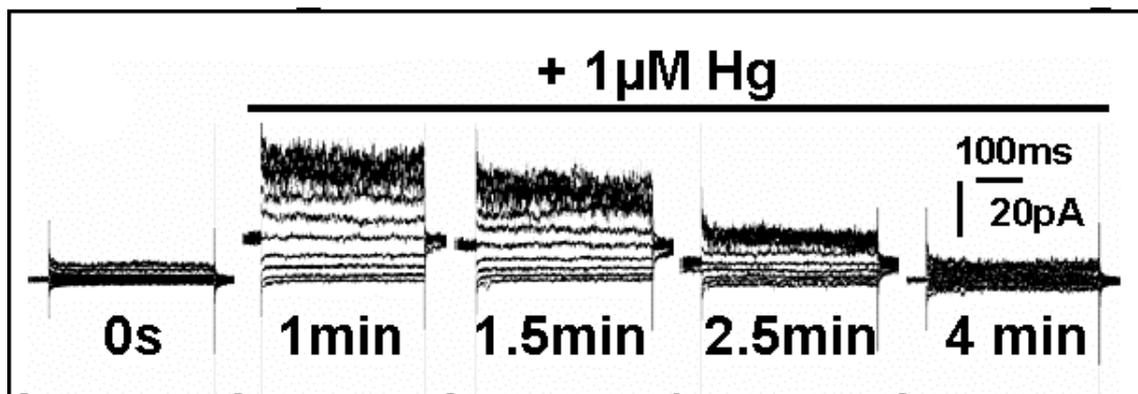
Außerdem wurde gleichzeitig das Umkehrpotenzial ( $V_{rev}$ ) in Richtung des Gleichgewichtspotenzials der  $K^+$ -Ionen verschoben ( $V_{rev} = -80 \pm 14 \text{ mV}$ ,  $n = 6$ ). Dieser Umstand weist auf einen Anstieg der  $K^+$ -selektiven Leitfähigkeit der Zellmembran hin und unterstützt die Vermutung, dass  $Hg^{2+}$ -Ionen die Aktivierung eines selektiven  $K^+$ -Kanals in den Erythrozyten veranlassen. Veranschaulicht werden diese Ergebnisse in Abbildung 19.



**Abbildung 19: Mittlere Strom-Spannungs-Beziehung humaner Erythrozyten.** Die Daten wurden in 80 K-Glukonat/60 KCl-Pipettenlösung und NaCl-Badlösung aufgenommen. Dabei wurden Werte vor (Vierecke,  $n = 6$ ) und nach Zugabe von  $Hg^{2+}$  ( $1 \mu\text{M HgCl}_2$ , Kreise,  $n = 6$ ) ermittelt.

Um den Verdacht auf Selektivität des beobachteten Auswärtsstroms erhärten zu können wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dazu wurde in der Badlösung NaCl durch KCl ersetzt. Anschließend konnte gezeigt werden, dass der Einwärtsstrom in  $Hg^{2+}$ -stimulierten Erythrozyten anstieg. Außerdem wurde das Umkehrpotenzial  $V_{rev}$  auf etwa 0 mV zurück verschoben. So konnte die Selektivität des durch Quecksilberionen induzierten Stromes für  $K^+$ -Ionen bestätigt werden (s. Abb. 18, außen rechts).

Die erhöhte Leitfähigkeit der Zellmembran für Kaliumionen wurde jedoch nicht begleitet von einer klaren Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler nicht-selektiver Kationenkanäle. Daher kann ein direkter Einfluss von  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen auf selektive Kaliumkanäle der Erythrozyten angenommen werden. Der beobachtete Anstieg der  $\text{K}^+$ -selektiven Leitfähigkeit nach Stimulation mit Quecksilberionen war zeitlich begrenzt und reversibel ( $n = 7$ ). Ein maximaler Effekt wurde bereits nach  $\sim 1$ -2 Minuten beobachtet. Nach 4-6 Minuten wurde schon wieder die initiale Kontrollleitfähigkeit erreicht (s. Abb. 20).



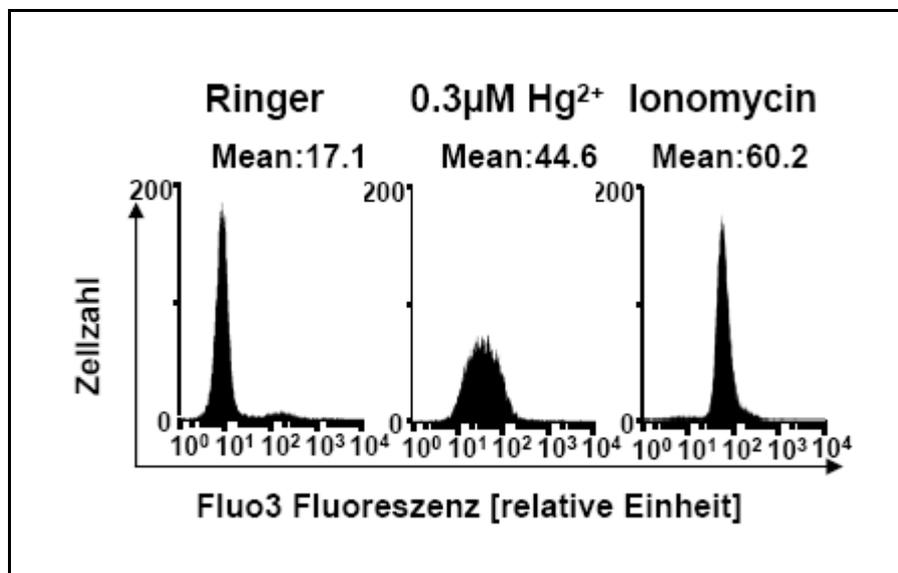
**Abbildung 20:**  $\text{K}^+$ -selektiver Ionenausstrom nach Stimulation der Erythrozyten mit  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen ( $1 \mu\text{M}$ ) dargestellt in Abhängigkeit von der Zeit. Die verwendeten Bad- und Pipettenlösungen entsprechen denen in Abb. 18 und 19.

Da der Gardos-Kanal eine wichtige Rolle im Zelltodprogramm der Erythrozyten spielt sollte geklärt werden, ob der Gardos-Kanal auch an dem erhöhten Kaliumausstrom nach Stimulation mit  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen beteiligt ist. Dazu wurden erythrozytäre Ganzzellströme in Anwesenheit von Clotrimazol ( $5 \mu\text{M}$ ) aufgenommen. Clotrimazol ist ein spezifischer Inhibitor des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals (Gardos-Kanal) der Erythrozyten. Im vorliegenden Versuch hemmte Clotrimazol den Auswärtsstrom  $\text{Hg}^{2+}$ -stimulierter Erythrozyten ( $1 \mu\text{M HgCl}_2$ ) signifikant um  $58 \pm 7 \%$  ( $n = 3$ ). Dadurch wird der Verdacht erhärtet, dass Quecksilberionen unter Beteiligung des Gardos-Kanals erythrozytären Zelltod induzieren.

### 3.5 Bestimmung des Calcium-Einstroms

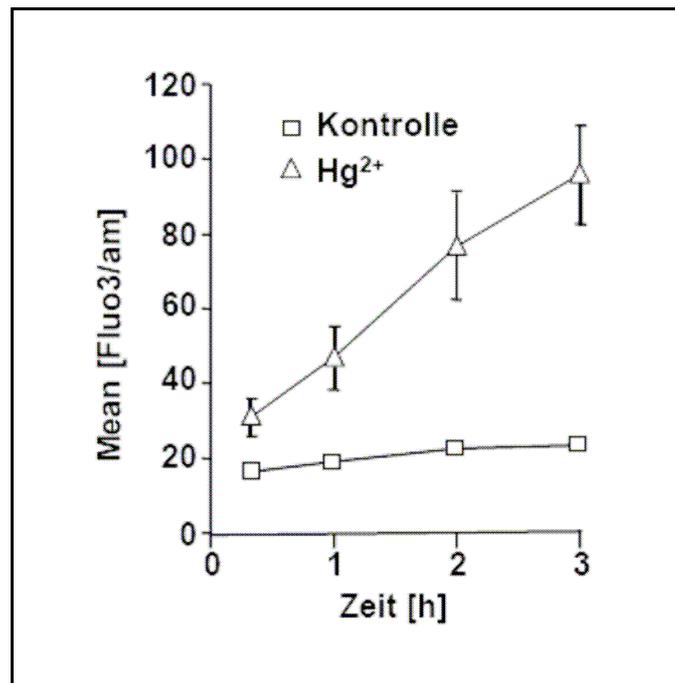
#### 3.5.1 Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Fluo 3/AM)

Da bekannt ist, dass der programmierte Zelltod bei den Erythrozyten vor allem über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Mechanismen initiiert wird und auch der Gardos-Kanal  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ist, sollte untersucht werden, ob die intrazelluläre Calciumkonzentration der Erythrozyten nach Einwirkung von Quecksilberionen ansteigt. Deshalb wurden Versuche mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo 3/AM durchgeführt. Dazu wurden Erythrozyten mit Fluo 3/AM beladen und die Fluoreszenz anhand der FACS-Analyse ermittelt. Nach Inkubation mit Quecksilberionen ( $0,3 \mu\text{M HgCl}_2$ ) zeigten die beladenen Zellen eine deutlich gesteigerte Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 21). Als Positivkontrolle wurde der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin in der Konzentration  $1 \mu\text{M}$  verwendet.



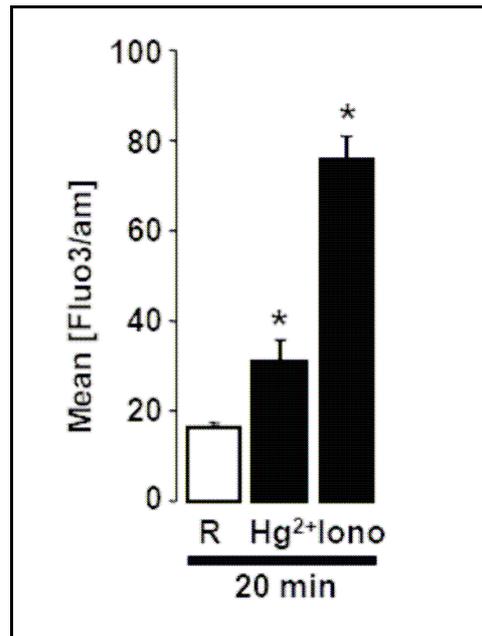
**Abbildung 21: Anstieg der Fluo 3-abhängigen Fluoreszenz in Erythrozyten nach Einwirkung von  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen.** Typische FACS Histogramme, die die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Fluoreszenz Fluo 3/AM-beladener Erythrozyten zeigen. Die Zellen wurden 20 min lang in NaCl Ringerlösung (links), in NaCl Ringerlösung mit  $0,3 \mu\text{M Hg}^{2+}$ -Ionen (mittleres Diagramm) oder in NaCl Ringerlösung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor Ionomycin ( $1 \mu\text{M}$ ; rechts) inkubiert.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Fluoreszenz wurde im Fluoreszenzkanal FL-1 bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen. Dabei wurde eine nahezu lineare Zunahme der Intensität innerhalb der ersten drei Stunden im Vergleich zu den Kontrollerythrozyten beobachtet (s. Abb. 22).



**Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der ermittelten Fluoreszenz Fluo 3/AM-beladener Erythrozyten.** Die Zellen wurden 20 min lang in reiner NaCl Ringerlösung (Quadrate) oder in NaCl Ringerlösung versetzt mit  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen ( $0,3 \mu\text{M}$ ; Dreiecke) inkubiert. Die Fluoreszenz wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch erfasst. Die Daten sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung bei  $n = 6$ .

Um die Auswirkung der Quecksilberionen auf die Fluo 3/AM Fluoreszenz besser erfassen zu können, zeigt Abbildung 23 noch einmal den Anstieg der erythrozytären Fluoreszenz nach Einwirkung von  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen im Vergleich zur ermittelten Intensität nach Einsatz des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin ( $1 \mu\text{M}$ ).



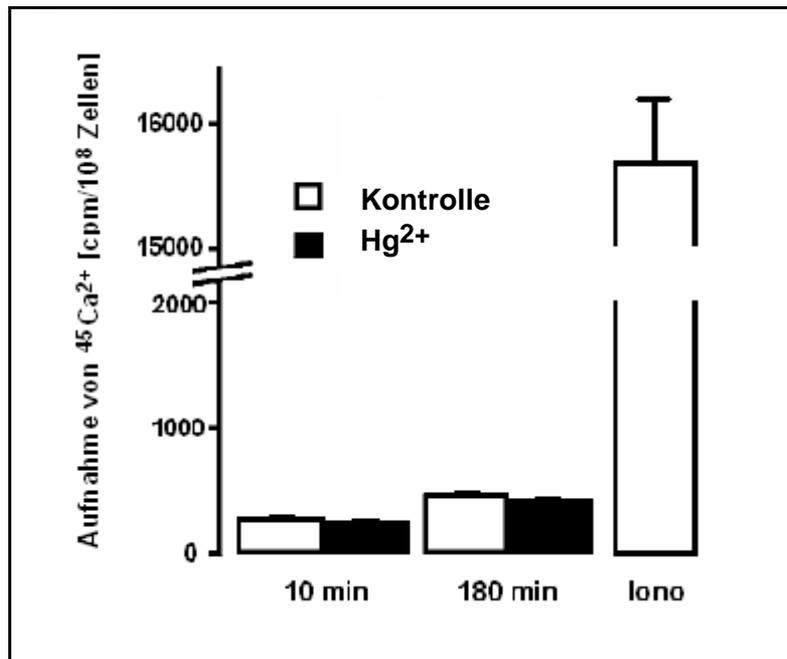
**Abbildung 23:** Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz  $\pm$  Standardabweichung Fluo 3/AM-beladener Erythrozyten. Die Zellen wurden 20 min lang in Abwesenheit (Kontrolle) oder Anwesenheit von Hg<sup>2+</sup>-Ionen (0,3  $\mu$ M; n = 6) bzw. mit Ionomycin (1  $\mu$ M; n = 9) inkubiert. \* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ( $p \leq 0,05$ ; ANOVA) im Vergleich zur Kontrolle.

### 3.5.2 Radioaktive Ca<sup>2+</sup>-Messungen

Um die anhand von Fluo 3/AM ermittelten Daten zu bestätigen, wurden zusätzlich radioaktive Ca<sup>2+</sup>-Messungen durchgeführt. Dazu wurde das radioaktive Isotop <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> verwendet. Die Experimente liefen bei 37 °C sowohl in Abwesenheit von Quecksilber (Kontrollen), als auch unter Einwirkung von 1  $\mu$ M Hg<sup>2+</sup>-Ionen ab.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die Exposition der Erythrozyten mit Hg<sup>2+</sup>-Ionen entgegen unserer Erwartungen nicht zur Anreicherung von <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> im Zytosol führt.

Als Positivkontrolle wurde wiederum Ionomycin in der Konzentration 1  $\mu$ M verwendet. Die Ionomycinbehandlung führte zu einer deutlichen Akkumulation von <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> im intrazellulären Raum (s. Abb. 24).

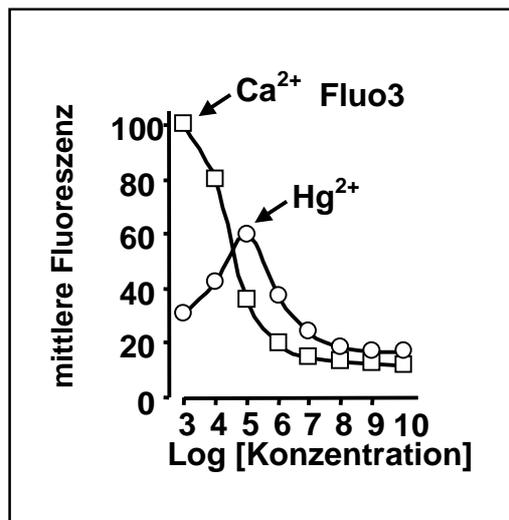


**Abbildung 24: Aufnahme von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .** Weder in Abwesenheit von Quecksilber (Kontrolle), noch unter dem Einfluss von  $1\ \mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen wurde eine Aufnahme von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  in die Erythrozyten gemessen. Die Messung wurde nach 10 und 180 min durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme nach 10-minütiger Stimulation mit Ionomycin ( $1\ \mu\text{M}$ ). Die Daten liegen als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung vor bei  $n = 8$ .

### 3.5.3 Fluo 3 und $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen

Da unter Verwendung von radioaktivem  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  keine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beobachtet werden konnte (s. 3.5.2), muss die Zunahme der Fluo 3/AM-Fluoreszenz beladener Erythrozyten nach Einwirkung von  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen andere Gründe haben. Deshalb wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, um eine mögliche direkte Interaktion von Fluo 3/AM mit den Quecksilberionen zu überprüfen. Dazu wurde Fluo 3 ( $4\ \mu\text{M}$ ), welches nicht erst intrazellulär durch Esterasen aktiviert werden muss, mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen in Konzentrationen von  $1\ \text{nM}$  bis  $1\ \text{M}$  versetzt und die jeweilige Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzkanal FL-1 bei einer Emissionswellenlänge von  $530\ \text{nm}$  gemessen. So konnte gezeigt werden, dass

Fluo 3 in Konzentrationsbereichen um 1  $\mu\text{M}$  mit höherer Affinität an  $\text{Hg}^{2+}$  bindet, als an Calciumionen (s. Abb. 25). Daraus lässt sich schließen, dass die beobachtete Zunahme der Fluo 3/AM-Fluoreszenz (s. 3.5.1) auf der Bindung des Fluorochroms an intrazelluläre Quecksilberionen beruht.

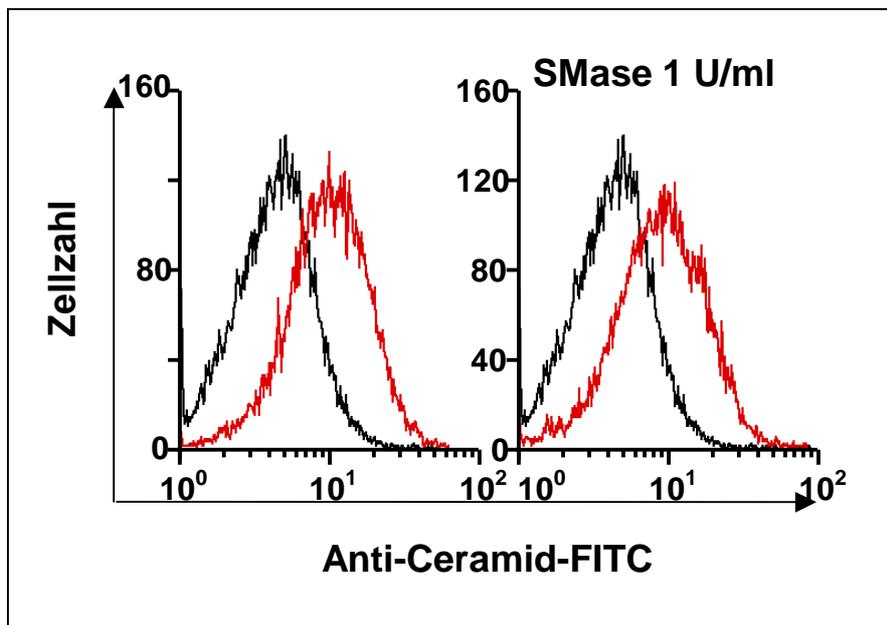


**Abbildung 25: Fluo 3-Fluoreszenz nach Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ - (Quadrate) bzw.  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen (Kreise).** Dargestellt ist jeweils die mittlere Fluo 3-Fluoreszenz in Abhängigkeit von den eingesetzten Ionenkonzentrationen. Die Daten wurden mittels Durchflusszytometrie bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm erfasst.

### 3.6 Ceramid-Messung

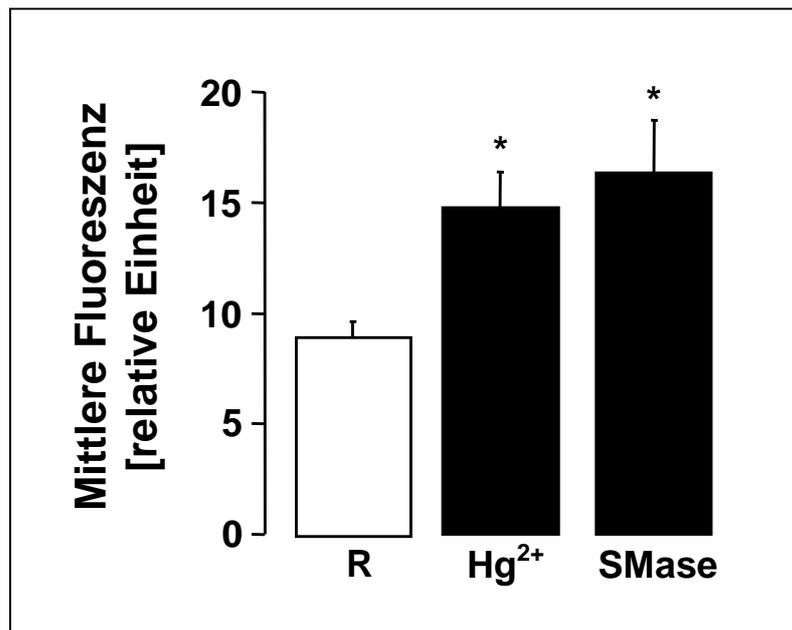
Da aufgrund der intrazellulären Calcium-Messungen angenommen werden muss, dass Quecksilberionen über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Mechanismus Apoptose initiieren, wurden weitere Experimente durchgeführt. Diese sollten einen eventuellen Effekt der Quecksilberionen auf die Aktivität der Sphingomyelinase in Erythrozyten untersuchen, da bereits gezeigt wurde, dass Ceramid in der Lage ist, Apoptose unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu stimulieren. Auch diese Versuche wurden mit Hilfe der FACS-Analyse durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass unter Einfluss von  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen ( $0,3 \mu\text{M}$ ) die Sphingomyelinase der Erythrozyten stimuliert wird. Daraus resultiert schließlich die Bildung von Ceramid (s. Abb. 26). Die Messdaten wurden nach einer Inkubationszeit von 24 h ermittelt ( $n = 8-9$ ).



**Abbildung 26: Ceramidbildung in Erythrozyten nach Stimulation mit  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen.** Die Diagramme zeigen die Bindung eines FITC-konjugierten Antikörpers, der an Ceramid bindet. Dargestellt ist hier ein repräsentatives Experiment, bei dem die Erythrozyten 24 h in reiner Ringerlösung (schwarze Kurven) bzw. in Ringerlösung mit  $0,3 \mu\text{M Hg}^{2+}$  (graue Kurve auf der linken Seite) inkubiert wurden. Zu Vergleichszwecken wurden die Erythrozyten außerdem in Ringerlösung mit SMase (1 U/ml) inkubiert (graue Kurve auf der rechten Seite).

Um eine Positivkontrolle zu Vergleichszwecken zu erhalten wurden Erythrozyten zusätzlich mit 1 U/ml aufgereinigter Sphingomyelinase (*Streptomyces sp.*) behandelt. Die Einwirkzeit betrug dabei 5 Minuten. Zu beobachten war schließlich eine ähnlich erhöhte Ceramidbildung wie nach Einwirkung von Quecksilberionen (s. Abb. 26).



**Abbildung 26: Die mittlere Fluoreszenz der FITC-konjugierten Anti-Ceramid-Antikörper, ermittelt mit Hilfe der FACS-Analyse.** Dazu wurden die Erythrozyten nach 24 h Inkubation in Ringerlösung, nach Behandlung mit 0,3  $\mu\text{M}$  Hg<sup>2+</sup> (24 h) und nach Einwirkung von 1 U/ml SMase (5 min) untersucht. Die Daten sind dargestellt in einer relativen Einheit  $\pm$  Standardabweichung bei n = 7. \* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ( $p \leq 0,05$  unter Verwendung des ANOVA-Test in Kombination mit dem Dunnett's Test).

## 4. Diskussion

### 4.1 Wirkung von Quecksilberionen auf Erythrozyten

#### Aktivierung der Scramblase

Die vorliegenden Experimente enthüllen eine neuartige Wirkung von Hg<sup>2+</sup>-Ionen auf Erythrozyten. So konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten unter Einwirkung von Quecksilberionen eine Form von programmiertem Zelltod durchlaufen.

Obwohl reife Erythrozyten weder Zellkerne noch Mitochondrien besitzen, sind diese entgegen langjähriger Lehrmeinung doch in der Lage ein der Apoptose ähnliches Zelltodprogramm zu durchlaufen. So konnten bestimmte morphologische und biochemische Veränderungen, die für die Apoptose in kernhaltigen Zellen kennzeichnend sind, auch bei Erythrozyten beobachtet werden. Dazu gehören die Umlagerung und externe Präsentation von Phosphatidylserin, Ausbuchtungen der Zellmembran („membrane blebbing“) und Zellschrumpfung (*Daugas et al., 2001*). Alle diese Ereignisse werden durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ausgelöst (*Berg et al., 2001; Bratosin et al., 2001*). Andererseits sind Erythrozyten resistent gegenüber Serumdeprivation und die apoptotische Wirkung von Staurosporin, beides bekannte Stimulatoren der Apoptose in kernhaltigen Zellen (*Daugas et al., 2001*).

Unsere Beobachtungen haben gezeigt, dass das Schwermetall Quecksilber die Scramblase der Erythrozyten aktiviert, woraus die Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche resultiert (s. Abb. 28). Da Makrophagen mit spezifischen Rezeptoren für Phosphatidylserin ausgestattet sind (*Messmer und Pfeilschifter, 2000; Fadok et al., 2001*) wird auf diese Weise gewährleistet, dass beschädigte und potentiell gefährliche Erythrozyten rasch erkannt, phagozytiert und abgebaut werden, um sie schnellst möglich aus dem Blutkreislauf zu entfernen (*Boas et al., 1998; Ede und Sherman, 2002*). Die aktivierte Scramblase führt also zu einer verkürzten Lebensdauer der

Erythrozyten.  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen begünstigen somit die Entwicklung einer Anämie, die im Rahmen einer Quecksilberintoxikation auftreten kann.

Analog dazu weisen gealterte Erythrozyten eine erhöhte zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und damit ebenfalls eine gesteigerte Aktivität der Scramblase auf (Kiefer und Snyder, 2000; Romero und Romero, 1999). Auch oxidativer Stress oder eine Schwächung antioxidativer Schutzmechanismen (Damonte et al., 1992) steigern den zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über Kationenkanäle und somit die Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Somit wird die Beseitigung der betroffenen Erythrozyten aus dem Blut und letztendlich aus dem Organismus beschleunigt.

Außerdem ermöglicht die Präsentation von Phosphatidylserin Interaktionen zwischen Zellen und die Bildung von Zellaggregaten (Eda und Sherman, 2002). So wird auch die Adhärenz der Erythrozyten an Endothelzellen gefördert, wodurch die Entfernung geschädigter Zellen aus dem Blutkreislauf ebenfalls beschleunigt wird.

Die Konzentrationen an  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen, die benötigt wurden um die Scramblase zu aktivieren, liegen im Bereich von 0,1 bis 3  $\mu\text{M}$ . Es handelt sich also um Konzentrationen, die auch bei mit Quecksilber intoxikierten Patienten zu beobachten sind (Taslev, 1984; Baron und Schweinsberg, 1989; Barregard et al., 1995).

### Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Entgegen den Erfahrungen, dass eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine wichtige Rolle im Zelltodprogramm der Erythrozyten spielt, scheint Quecksilber keinen Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Zellen zu nehmen. Im Gegensatz zu der signifikant gesteigerten Fluoreszenz Fluo 3/AM-beladener Erythrozyten nach Einwirkung von  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen, konnte anhand von radioaktiven  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Messungen ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht bestätigt werden. Daher muss von einer Interaktion der  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo 3/AM ausgegangen werden. Dies wurde durch direkte Messung auch bewiesen. Die erhöhte Intensität der gemessenen Fluoreszenz spiegelt also die Aufnahme der Quecksilberionen in die Erythrozyten wider und

bestätigt, dass  $Hg^{2+}$ -Ionen in der Lage sind, die Zellmembran zu durchdringen. Dabei scheinen unter anderem  $Na^+$ - und  $H^+$ -abhängige Mechanismen eine Rolle zu spielen (Endo et al., 1995). In roten Blutzellen wurde darüber hinaus eine Interaktion von  $Hg^{2+}$ -Ionen mit Membranphospholipiden beobachtet (Delnomdedieu und Allis, 1993). Daher können die Ionen vermutlich nicht nur von außen auf die Erythrozyten einwirken, sondern gewisse Effekte auch von der intrazellulären Seite der Zellmembran ausüben (Gorman und Hermann, 1979; Girault et al., 1996).

### Kaliumverlust und Zellschrumpfung

Der Anstieg der Annexin-Bindung der Erythrozyten nach Einwirkung von  $Hg^{2+}$ -Ionen wurde begleitet von einer vorübergehenden Verminderung des Zellvolumens. Außerdem wurde durch zusätzliche Patch-clamp Experimente eine zeitweise gesteigerte  $K^+$ -Leitfähigkeit der Zellen gezeigt. Daher lässt sich die beobachtete Zellschrumpfung zumindest teilweise auf eine Aktivierung des Gardos-Kanals der Erythrozyten zurückführen (Bookchin et al., 1987; Brugnara et al., 1993). Dabei handelt es sich um einen Volumen-sensitiven, einwärts-gleichrichtenden  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanal (KCNN4, hSK4, Gardos-Kanal). Die Erythrozyten weisen ein Membranpotential von etwa  $-10$  mV auf. Dieses kann unter Berücksichtigung der Permeabilitäten der verschiedenen Ionen nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berechnet werden (s. Abb. 27). Die Zellmembran der Erythrozyten ist überwiegend leitfähig für  $Cl^-$ -Ionen, die Leitfähigkeit für  $K^+$ -Ionen ist gering, die für  $Na^+$  geht sogar gegen Null. Daher verteilen sich die Chloridionen weitgehend passiv über die Zellmembran und erreichen schließlich eine intrazelluläre Konzentration von etwa 70 mmol/l.

$$E = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \lg \frac{P_{K^+} \cdot [K^+]_a + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_a + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_i}{P_{K^+} \cdot [K^+]_i + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_i + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_a}$$

**Abbildung 27: Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung.** Anhand dieser Formel lässt sich das Membranpotential (E) berechnen. R: allgemeine Gaskonstante, T: Temperatur in Kelvin, F: Faraday-Konstante, P: Permeabilität der Zellmembran für die jeweiligen Ionen.

Werden nun  $K^+$ -Kanäle aktiviert, verlässt Kalium die Zelle. Dabei folgt es dem chemischen Gradienten, welcher zwischen intra- und extrazellulärem Raum besteht. Durch diesen Vorgang kommt es zur Hyperpolarisation der Zellmembran und damit konsekutiv zum Ausstrom von  $Cl^-$ -Ionen aus der Zelle. Der KCl-Ausstrom ist aufgrund der abnehmenden Osmolarität in der Zelle mit Wasser assoziiert und bedingt somit eine Schrumpfung der Erythrozyten (Hoffman et al., 2003; Lang P.A. et al., 2003). Durch Verminderung des treibenden Konzentrationsgradienten für den  $K^+$ -Ausstrom nach Erhöhung des extrazellulären Kaliumgehalts kann dementsprechend eine Zellschrumpfung mit anschließender Apoptose als Reaktion auf apoptotische Stimuli, wie z.B. Ionomycin, vermindert werden (Lang P.A. et al., 2003).

Auch in den vorliegenden Versuchen lässt sich die moderate Schrumpfung der Zellen unter Einfluss von Quecksilberionen, welche durch die Abnahme des „Forward scatters“ in der FACS-Analyse gezeigt wurde, mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen Verlust von intrazellulärem KCl zurückführen.

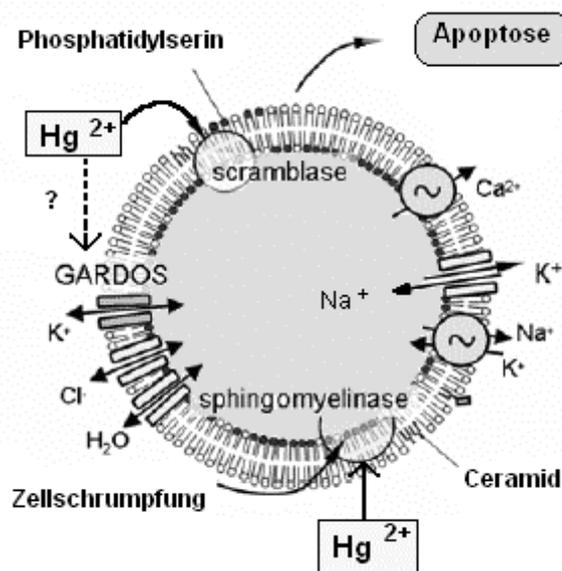
Die Zellschrumpfung ist ein typisches Merkmal des apoptotischen Zelltodprogramms (Lang F. et al., 1998 b). Zudem begünstigt die Öffnung von  $K^+$ -Kanälen mit anschließendem Verlust von intrazellulärem Kalium und Zellschrumpfung die Aktivierung der erythrozytären Scramblase (Lang K.S. et al., 2003 a) und somit den Zelltod.

Die Empfindlichkeit der Erythrozyten auf den zellulären Kaliumverlust ist vergleichbar mit den Beobachtungen in anderen Zelltypen. So wurde gezeigt, dass der Verlust von  $K^+$ -Ionen die Apoptose in einer Vielzahl von kernhaltigen Zellen unterstützt. Als Beispiele zu nennen wären unter anderem Lymphozyten, Oozyten und Granulosazellen (Bortner und Cidlowski, 1999; Bortner et al., 1997; Gomez-Angelats et al., 2000; Perez et al., 2000; Hughes et al., 1997).

In kernhaltigen Zellen wurde bislang sowohl eine Stimulation (Busch et al., 1995; Gorman und Hermann, 1979; Jungwirth, 1992; Moschen et al., 2001), als auch eine Hemmung (Busch et al., 1995; Moschen et al., 2001; Benndorf und Nilius, 1988; Cai und Sauve, 1997; Gilly und Armstrong, 1982; Liu und Lin-Shiau, 1992) von  $K^+$ -Kanälen durch den Einfluss von  $Hg^{2+}$ -Ionen gezeigt. Die

Aktivierung des langsam aktivierenden  $K^+$ -Kanals IsK durch  $Hg^{2+}$  konnte durch Zerstörung eines Teils der extrazellulären Schleife in eine Hemmung des Kanals umgekehrt werden (Busch et al., 1995).

Als maßgeblich für die Beeinflussung der Aktivität von Kanälen durch  $Hg^{2+}$ -Ionen wird die Interaktion mit SH-Gruppen der Kanalproteine betrachtet (Busch et al., 1995; Moschen et al., 2001; Jungwirth et al., 1991).



**Abbildung 28: Darstellung der wichtigsten Wirkungen von  $Hg^{2+}$ -Ionen auf Erythrozyten.**

Quecksilberionen wirken aktivierend auf die Scramblase. Durch die Öffnung von  $K^+$ -Kanälen (z.B. Gardos-Kanal, genauer Mechanismus noch ungeklärt) bewirken sie zusätzlich eine Zellschrumpfung, die ihrerseits die Sphingomyelinase zur Bildung von Ceramid anregt.

Außerdem scheinen  $Hg^{2+}$ -Ionen die Sphingomyelinase auch direkt zu aktivieren.

### Aktivierung der Sphingomyelinase

Ein weiterer Effekt, der in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt wurde, ist die Aktivierung der erythrozytären Sphingomyelinase durch den Einfluss von  $Hg^{2+}$ -Ionen. Dadurch wird in den Erythrozyten vermehrt Ceramid gebildet (s. Abb. 28). Das so entstandene Ceramid sensibilisiert die Scramblase für die stimulierende Wirkung von  $Ca^{2+}$ -Ionen und unterstützt damit die Exposition von

Phosphatidylserin an der Zelloberfläche. Erst kürzlich wurde eine ähnliche, wenn auch schwächere Aktivierung der Sphingomyelinase nach Behandlung der Erythrozyten mit hyperosmolarer Lösung beobachtet (*Lang K.S. et al., 2004*).

Überraschenderweise können die genannten Effekte nicht in Zusammenhang mit dem Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gebracht werden. Die radioaktive Messung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in Erythrozyten nach Exposition mit Quecksilberionen zeigte entgegen den Erwartungen keine signifikante Zunahme des intrazellulären  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes. Der genaue Mechanismus wie  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen  $\text{K}^{+}$ -Kanäle wie den Gardos-Kanal aktivieren bleibt daher fraglich. Für die deutlich gesteigerte Annexin-Bindung exponierter Erythrozyten und damit die erhöhte Zelltodrate scheint daher hauptsächlich die Aktivierung der Sphingomyelinase mit konsekutiver Ceramidbildung verantwortlich zu sein.

Abschließend lässt sich sagen, dass eine Exposition menschlicher Erythrozyten mit Quecksilberionen in Konzentrationen, die auch bei einer Intoxikation relevant sind, über mehrere Schritte die Bindung von Annexin-V-Fluos und damit einen apoptose-ähnlichen Zelltod hervorruft. Dies geschieht über eine vorübergehende Aktivierung von  $\text{K}^{+}$ -Kanälen mit konsekutivem Kaliumverlust, zeitweiser Zellschrumpfung und nachfolgender Aktivierung der erythrozytären Scramblase. Die Wirkung der  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen auf die Scramblase wird durch die gleichzeitige Bildung von Ceramid verstärkt. Da die geschädigten Erythrozyten das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche exponieren sind sie Angriffsziel der Makrophagen, die PS-spezifische Rezeptoren besitzen. Dadurch wird die Entfernung der Zellen aus dem zirkulierenden Blut gewährleistet.

Dementsprechend verkürzen  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen die Lebensdauer der Erythrozyten und begünstigen somit die Entwicklung einer Anämie, wie sie im Rahmen einer Quecksilberintoxikation auftreten kann.

## **4.2 Fehlerdiskussion**

### **4.2.1. Detektion der Apoptose durch Annexinbindung**

Üblicherweise wird bei der Verwendung von FITC-Annexin-V zur Erfassung der Apoptoserate auch ein Färbeversuch mit Propidiumiodid durchgeführt. Propidiumiodid ist ein fluoreszierendes Molekül und ein hochspezifischer Farbstoff für DNA. Es interkaliert in doppelsträngige DNA und verändert anschließend sowohl die Anregungs-, als auch die Emissionswellenlänge. Da Propidiumiodid die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen kann, dient es zur Erfassung von totem Zellmaterial. Dadurch soll die fälschliche Detektion von nekrotischen Zellen im Rahmen der Apoptoseerfassung vermieden werden. Da die Erythrozyten jedoch keine DNA enthalten, kann diese Färbemethode in ihrem Fall nicht angewandt werden. Um eine falsch hohe Anzahl apoptotischer Zellen zu vermeiden wurden deshalb zusätzlich Zellzahl und Hämoglobinkonzentration im Überstand bestimmt. Dadurch konnte eine die Ergebnisse beeinflussende Hämolyserate der Erythrozyten ausgeschlossen werden.

Desweiteren scheint Annexin-V-Fluos auch nicht an Zelltrümmer zu binden, da in Versuchsansätzen mit überwiegend nekrotischem Zellmaterial unter Anwendung der Durchflusszytometrie die erfasste Zellzahl gegen Null geht.

### **4.2.2 Begriffsdefinition: Apoptose**

Inzwischen ist bekannt, dass Erythrozyten im Gegensatz zur früheren Lehrmeinung durchaus in der Lage sind, eine Form des programmierten Zelltods zu durchlaufen. Aufgrund ihres morphologischen Aufbaus können sie jedoch bestimmte Kriterien der Apoptose, wie sie in kernhaltigen Zellen abläuft, nicht erfüllen. Dazu gehört unter anderem die Kondensation und anschließende Fragmentierung der DNA des Zellkerns. Deshalb ist gegenwärtig die Diskussion

um eine passende Begriffsfindung im Gange. Im Raum steht derzeit die Bezeichnung „Eryptose“, welche die durchaus vorhandenen Ähnlichkeiten des in Erythrozyten ablaufenden programmierten Zelltods zur Apoptose verdeutlichen soll.

## 5. Zusammenfassung

Zu den Folgeerscheinungen einer Quecksilberintoxikation gehört unter anderem das Symptom der Anämie. Diese ist vermutlich auf eine verkürzte Lebensdauer der im Blut zirkulierenden Erythrozyten zurückzuführen.

Erst kürzlich wurde ein neuartiger Mechanismus des erythrozytären Zelltods enthüllt. Danach führt die Aktivierung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Scramblase zur Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche der Erythrozyten. Da Makrophagen mit spezifischen Rezeptoren für Phosphatidylserin ausgestattet sind, binden sie an die entsprechenden Zellen, verschlingen und zerstören sie. Die Scramblase wird durch den Einfluss verschiedener Faktoren aktiviert. Dazu gehören osmotischer Schock, oxidativer Stress und/oder Energiemangel, welche die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöhen und/oder eine Sphingomyelinase zur Bildung von Ceramid veranlassen. Das gebildete Ceramid wiederum erhöht die Sensibilität der Scramblase für Calcium-Ionen.

Die vorliegenden Experimente wurden durchgeführt um aufzuklären, ob Quecksilberionen ( $\text{Hg}^{2+}$ ) die Erythrozyten ebenfalls zur Exposition von Phosphatidylserin stimulieren.

Zur Beurteilung der Exposition von Phosphatidylserin wurde die Annexinbindung der Erythrozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst. So wurde festgestellt, dass Quecksilberionen bei Verwendung von Konzentrationen  $\geq 0,03 \mu\text{M}$  in der Tat die Annexinbindung der Erythrozyten signifikant erhöhen. Außer diesem Effekt wurde sowohl eine vorübergehende Zellschrumpfung, als auch die Bildung von Ceramid beobachtet. Überraschenderweise ließen sich diese Vorgänge nicht in Verbindung mit einem signifikanten Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes bringen.

Abschließend kann man sagen, dass Quecksilberionen über eine Aktivierung der Sphingomyelinase die Bildung von Ceramid induzieren. Außerdem stimulieren sie die Scramblase und somit die Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche, wodurch die rasche Entfernung geschädigter

Erythrozyten aus der Blutbahn gefördert wird. Die beobachteten Mechanismen könnten daher an der verkürzten Lebensdauer der zirkulierenden Erythrozyten im Rahmen einer Quecksilberintoxikation beteiligt sein.

## 6. Literatur

### 6.1 Publikationsverzeichnis

**Eisele K.**, Lang P.A., Kempe D.S., Klarl B.A., Niemöller O., Wieder T., Huber S.M., Duranton C., Lang F. (2005). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. *Toxicol Appl Pharmacol*; **210**:116-122.

Kempe D.S., Lang P.A., **Eisele K.**, Klarl B.A., Wieder T., Huber S.M., Duranton C., Lang F. (2005). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by lead ions. *Am J Physiol Cell Physiol*; **288**:C396-402.

Klarl B.A., Lang P.A., Kempe D.S., Niemöller O., Akel A., Sobiesiak M., **Eisele K.**, Podolski M., Huber S.M., Wieder T., Lang F. (2005). Protein kinase C mediates erythrocyte "programmed cell death" following glucose depletion. *Am J Physiol Cell Physiol*; **290**:C244-53.

Lang P.A., Kempe D.S., Tanneur V., **Eisele K.**, Klarl B.A., Myssina S., Jendrossek V., Ishii S., Shimizu T., Waidmann M., Hessler G., Huber S.M., Lang F., Wieder T. (2005). Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet activating factor. *J Cell Science*; **118**:1233-43.

Lang P.A., Kempe D.S., Akel A., Klarl B.A., **Eisele K.**, Podolski M., Hermle T., Niemöller O., Attanasio P., Huber S.M., Wieder T., Lang F., Duranton C. (2005). Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*; **372**:228-35.

Lang P.A., Huober J., Bachmann C., Kempe D.S., Sobiesiak M., Akel A., Niemoeller O.M., Dreischer P., **Eisele K.**, Klarl B.A., Gulbins E., Lang F., Wieder T. (2006). Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by paclitaxel. *Cell Physiol Biochem*; **18**:151-64.

### 6.2 Literaturverzeichnis

Aggarwal B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*; **3**:745-56.

Allan D., Billah M.M., Finean J.B. and Michell R.H. (1976 a). Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular (Ca<sup>2+</sup>). *Nature*; **261**:58-60.

Allan D., Watts R. and Michell R.H. (1976 b). Production of 1,2-diacylglycerol and phosphatidate in human erythrocytes treated with calcium ions and ionophore A23187. *Biochem J*; **156**:225-232.

- Anderson D.R., Davis J.L., Carraway K.L. (1977). Calcium-promoted changes of the human erythrocyte membrane. Involvement of spectrin, transglutaminase, and a membrane-bound protease. *J Biol Chem*; **252**:6617-23.
- Andree H.A.M., Reutelingsperger C.P.M., Hauptman R., Hemker H.C., Hermens W.Th., Willems G.M. (1990). Binding of vascular anticoagulant a (VACa) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*; **265**:4923.
- Andrews D.A., Yang L., Low P.S. (2002). Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells. *Blood*; **100**:3392-3399.
- Ashkenazi A., Dixit V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*; **281**:1305-8.
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily (2002). *Nat Rev Cancer*; **2**:420-30.
- Babisch W., Kovacic S., Krause C., Roulet J.F., Thron J.L., Hoffmann M. (1992). Mercury concentration in blood and urine--before and after the placement of dental amalgam fillings. *Zentralbl Hyg Umweltmed*; **193**:175-87.
- Baron P., Schweinsberg F. (1989). A literature review of the concentrations of arsenic, lead, cadmium, and mercury in body fluids and tissues to establish normal levels and to detect exposure. 3. Mercury. *Zentralbl Hyg Umweltmed*; **188**:84-107.
- Barregard L., Sallsten G., Jarvholm B. (1995). People with high mercury uptake from their own dental amalgam fillings. *Occup Environ Med*; **52**:124-8.
- Barry P.H., Lynch J.W. (1991). Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol*; **121**:101-117.
- Baud V., Karin M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*; **11**:372-7.
- Benndorf K., Nilius B. (1988). Different blocking effects of Cd<sup>++</sup> and Hg<sup>++</sup> on the early outward current in myocardial mouse cells. *Gen Physiol Biophys*; **7**:345-51.
- Bennekou P. (1993) The voltage-gated non-selective cation channel from human red cells is sensitive to acetylcholine. *Biochim Biophys Acta*; **1147**:165-7.

- Berg C.P., Engels I.H., Rothbart A., Lauber K., Renz A., Schlosser S.F., Schulze-Osthoff K., Wesselborg S. (2001). 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.
- Bieberich E., MacKinnon S., Silva J., Noggle S., Condie B.G. (2003). Regulation of cell death in mitotic neural progenitor cells by asymmetric distribution of prostate apoptosis response 4 (PAR-4) and simultaneous elevation of endogenous ceramide. *J Cell Biol*; **162**:469-479.
- Bilmen S., Aksu T.A., Gumuslu S., Korgun D.K., Canatan D. (2001). Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. *Clin Chim Acta*; **303** :83-6.
- Blanchard H., Kodandapani L., Mittl P.R., Marco S.D., Krebs J.F., Wu J.C., Tomaselli K.J., Grutter M.G. (1999). The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure Fold Des*; **7**:1125-33.
- Boas F.E., Forman L., Beutler E. (1998). Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci USA*; **95**:3077-81.
- Boise L.H., Gonzalez-Garcia M., Postema C.E., Ding L., Lindsten T., Turka L.A., Mao X., Nunez G., Thompson C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*; **74**:597-608.
- Bookchin R.M., Ortiz O.E., Lew V.L. (1987). Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells. *Prog Clin Biol Res*; **240**:193-200.
- Bortner C.D., Hughes F.M. Jr., Cidlowski J.A. (1997). A primary role for K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem*; **272**:32436-42.
- Bortner C.D., Cidlowski J.A. (1998). A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem Pharmacol*; **56**:1549-59.
- Bortner C.D., Cidlowski J.A. (1999). Caspase independent/dependent regulation of K<sup>(+)</sup>, cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem*; **274**:21953-62.
- Boyd J.M., Gallo G.J., Elangovan B., Houghton A.B., Malstrom S., Avery B.J., Ebb R.G., Subramanian T., Chittenden T., Lutz R.J., et al. (1995). Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene*; **11**:1921-8.

- Brand V.B., Sandu C.D., Duranton C., Tanneur V., Lang K.S., Huber S.M., Lang F. (2003). Dependence of Plasmodium falciparum in vitro growth on the cation permeability of the human host erythrocyte. *Cell Physiol Biochem*; **13**:347-56.
- Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quatannens B., Tissier J.P., Slomianny C., Sartiaux C., Alonso C., Huart J.J., Montreuil J., Ameisen J.C. (2001). 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.
- Brugnara C., de Franceschi L., Alper S.L. (1993). Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest*; **92**:520-6.
- Brunsting A., Mullaney P.F. (1974). Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophys J*; **14**:439-53.
- Burlacu A. (2003). Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med*; **7**:249-57.
- Busch A.E., Waldegger S., Herzer T., Raber G., Gulbins E., Takumi T., Moriyoshi K., Nakanishi S., Lang F. (1995). Molecular basis of IsK protein regulation by oxidation or chelation. *J Biol Chem*; **270**:3638-41.
- Cai J., Jones D.P. (1998). Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem*; **273**:11401-4.
- Cai S., Sauve R. (1997). Effects of thiol-modifying agents on a K(Ca<sup>2+</sup>) channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. *J Membr Biol*; **158**:147-58.
- Carson D.A., Lois A. (1995). Cancer progression and p53. *Lancet*; **346**:1009-11.
- Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **72**:3666-70.
- Cassarino D.S., Bennett J.P. (1999). An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Rev*; **29**:1-25.
- Chai J., Du C., Wu J.W., Kyin S., Wang X., Shi Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*; **406**:855-62.

- Chan S.L., Mattson M.P. (1999). Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res*; **58**:167-90.
- Chao D.T., Korsmeyer S.J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*; **16**:395-419.
- Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*; **81**:505-12.
- Chittenden T., Flemington C., Houghton A.B., Ebb R.G., Gallo G.J., Elangovan B., Chinnadurai G., Lutz R.J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J*; **14**:5589-96.
- Christophersen P., Bennekou P. (1991). Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane. *Biochim Biophys Acta*; **1065**:103-6.
- Clarkson T.W. (1971). Epidemiological and experimental aspects of lead and mercury contamination of food. *Food Cosmet Toxicol*; **9**:229-43.
- Clarkson T.W., Magos L., Myers G.J. (2003). The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med*; **349**:1731-7.
- Cohen C.M. and Gascard P. (1992). Regulation and post-translational modification of erythrocyte membrane and membrane-skeletal proteins. *Semin Hematol*; **29**: 244-292.
- Cotman C.W., Anderson A.J. (1995). A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*; **10**:19-45.
- Coultas L., Pellegrini M., Visvader J.E., Lindeman G.J., Chen L., Adams J.M., Huang D.C., Strasser A. (2003). Bfk: a novel weakly proapoptotic member of the Bcl-2 protein family with a BH3 and a BH2 region. *Cell Death Differ*; **10**:185-92.
- Creutz C.E. (1992). The annexins and exocytosis. *Science*; **258**:924-31.
- Crompton M., Virji S., Doyle V., Johnson N., Ward J.M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp*; **66**:167-79.
- Damonte G., Guida L., Sdraffa A., Benatti U., Melloni E., Forteleoni G., Meloni T., Carafoli E., De Flora A. (1992). Mechanisms of perturbation of erythrocyte calcium homeostasis in favism. *Cell Calcium*; **13**:649-658.

- Daniel N.N., Korsmeyer S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*; **116**:205-219.
- Daugas E., Cande C., Kroemer G. (2001). Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ*; **8**:1131-3.
- Delnomdedieu M., Allis J.W. (1993). Interaction of inorganic mercury salts with model and red cell membranes: importance of lipid binding sites. *Chem Biol Interact*; **88**:71-87.
- Desagher S., Osen-Sand A., Nichols A., Eskes R., Montessuit S., Lauper S., Maundrell K., Antonsson B., Martinou J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*; **144**:891-901.
- Deveraux Q.L., Reed J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*; **13**:239-52.
- Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*; **102**:33-42.
- Duranton C., Huber S.M., Lang F. (2002). Oxidation induces a Cl<sup>-</sup>-dependent cation conductance in human red blood cells. *J Physiol*; **539**:847-855.
- Eda S., Sherman I.W. (2002). Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem*; **12**:373-84.
- Emori Y., Kawasaki H., Imajoh S., Imahori K., Suzuki K. (1987). Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **84**:3590-4.
- Endo T., Sakata M., Shaikh Z.A. (1995). Mercury uptake by primary cultures of rat renal cortical epithelial cells. II. Effects of pH, halide ions, and alkali metal ions. *Toxicol Appl Pharmacol*; **134**:321-5.
- Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*; **148**:2207.
- Fadok V.A., de Cathelineau A., Daleke D.L., Henson P.M., Bratton D.L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*; **276**:1071-7.

- Fischer U., Janicke R.U., Schulze-Osthoff K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, **10**:76-100.
- Floros K.V., Thomadaki H., Lallas G., Katsaros N., Talieri M., Scorilas A. (2003). Cisplatin-induced apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells: differential expression of BCL2 and novel apoptosis-related gene BCL2L12. *Ann N Y Acad Sci*; **1010**:153-8.
- Frago L.M., Leon Y., de la Rosa E.J., Gomez-Munoz A., Varela-Nieto I. (1998): Nerve growth factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear. *J Cell Sci*; **111**(Pt 5):549-556.
- Franco R.S., Palascak M., Thompson H., Rucknagel D.L., Joiner C.H. (1996). Dehydration of transferrin receptor-positive sickle reticulocytes during continuous or cyclic deoxygenation: role of KCl cotransport and extracellular calcium. *Blood*; **88**:4359-65.
- Gao G., Dou Q.P. (2000). N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18 kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem*; **80**:53-72.
- Gerner C., Gotzmann J., Frohwein U., Schamberger C., Ellinger A., Sauermann G. (2002). Proteome analysis of nuclear matrix proteins during apoptotic chromatin condensation. *Cell Death Differ*; **9**:671-81.
- Gibson L., Holmgreen S.P., Huang D.C., Bernard O., Copeland N.G., Jenkins N.A., Sutherland G.R., Baker E., Adams J.M., Cory S. (1996). bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene*; **13**:665-75.
- Gilly W.F., Armstrong C.M. (1982). Divalent cations and the activation kinetics of potassium channels in squid giant axons. *J Gen Physiol*; **79**:965-96.
- Girault L., Lemaire P., Boudou A., Debouzy J.C., Dufourc E.J. (1996). Interactions of inorganic mercury with phospholipid micelles and model membranes. A <sup>31</sup>P-NMR study. *Eur Biophys J*; **24**:413-21.
- Goldkorn T., Balaban N., Shannon M., Chea V., Matsukuma K., Gilchrist D., Wang H., Chan C. (1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci*; **111** (Pt 21):3209-3220.
- Goldstein J.C., Waterhouse N.J., Juin P., Evan G.I., Green D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*; **2**:156-62.

- Golstein P., Ojcius D.M., Young J.D. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev*; **121**:29-65.
- Gomez-Angelats M., Bortner C.D., Cidlowski J.A. (2000). Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K<sup>+</sup> and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *J Biol Chem*; **275**:19609-19.
- Gorman A.L., Hermann A. (1979). Internal effects of divalent cations on potassium permeability in molluscan neurones. *J Physiol*; **296**:393-410.
- Grassme H., Jendrossek V., Bock J., Riehle A., Gulbins E. (2002). Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol*; **168**:298-307.
- Green D.R., Reed J.C. (1998 a). Mitochondria and apoptosis. *Science*; **281**:1309-12.
- Green D.R. (1998 b). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*; **94**:695-8.
- Green D.R., Kroemer G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*; **305**:626-9.
- Guo B., Godzik A., Reed J.C. (2001). Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem*; **276**:2780-2785.
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*; **391**:85-100.
- Han J., Sabbatini P., White E. (1996). Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol*; **16**:5857-64.
- Hockenbery D., Nunez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*; **348**:334-6.
- Hoffman J.F., Joiner W., Nehrke K., Potapova O., Foye K., Wickrema A. (2003). The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **100**:7366-71.
- Holler N., Tardivel A., Kovacsovics-Bankowski M., Hertig S., Gaide O., Martinon F., Tinel A., Deperthes D., Calderara S., Schulthess T., Engel J., Schneider P., Tschopp J. (2003). Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol*; **23**:1428-40.

- Homburg C.H., de Haas M., von dem Borne A.E., Verhoeven A.J., Reutelingsperger C.P., Roos D. (1995). Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*; **85**:532-40.
- Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*; **81**:495-504.
- Hsu S.Y., Kaipia A., McGee E., Lomeli M., Hsueh A.J. (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **94**:12401-6.
- Huber S.M., Gamper N., Lang F. (2001). Chloride conductance and volume-regulatory nonselective cation conductance in human red blood cell ghosts. *Pflugers Arch*; **441**:551-8.
- Hughes F.M. Jr., Bortner C.D., Purdy G.D., Cidlowski J.A. (1997). Intracellular K<sup>+</sup> suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem*; **272**:30567-76.
- Inohara N., Ding L., Chen S., Nunez G. (1997). harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J*; **16**:1686-94.
- Joiner C.H., Morris C.L., Cooper E.S. (1993). Deoxygenation-induced cation fluxes in sickle cells. III. Cation selectivity and response to pH and membrane potential. *Am J Physiol*; **264**:C734-44.
- Joza N., Susin S.A., Daugas E., Stanford W.L., Cho S.K., Li C.Y., Sasaki T., Elia A.J., Cheng H.Y., Ravagnan L., Ferri K.F., Zamzami N., Wakeham A., Hakem R., Yoshida H., Kong Y.Y., Mak T.W., Zuniga-Pflucker J.C., Kroemer G., Penninger J.M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*; **410**:549-54.
- Jungwirth A., Ritter M., Paulmichl M., Lang F. (1991). Activation of cell membrane potassium conductance by mercury in cultured renal epithelioid (MDCK) cells. *J Cell Physiol*; **146**:25-33.
- Jungwirth H. (1992). Disposal of fluorescent lamps. *Health Estate J*; **46**:6-8.
- Karow T., Lang-Roth R. (2003). Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
- Kataoka T., Holler N., Micheau O., Martinon F., Tinel A., Hofmann K., Tschopp J. (2001). Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension. *J Biol Chem*; **276**:19548-54.

- Ke N., Godzik A., Reed J.C. (2001). Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem*; **276**:12481-4.
- Kerr J.F., Winterford C.M., Harmon B.V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*; **73**:2013-26.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; **26**:239-57.
- Kiefer C.R., Snyder L.M. (2000). Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol*; **7**:113-6.
- Kiefer M.C., Brauer M.J., Powers V.C., Wu J.J., Umansky S.R., Tomei L.D., Barr P.J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature*; **374**:736-9.
- Kienast J., Schmitz G. (1990). Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood*; **75**:116-121.
- Kim J.K., Kim K.S., Ahn J.Y., Kim N.K., Chung H.M., Yun H.J., Cha K.Y. (2004). Enhanced apoptosis by a novel gene, Bak-like, that lacks the BH3 domain. *Biochem Biophys Res Commun*; **316**:18-23.
- Kischkel F.C., Lawrence D.A., Tinel A., LeBlanc H., Virmani A., Schow P., Gazdar A., Blenis J., Arnott D., Ashkenazi A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*; **276**:46639-46.
- Kluck R.M., Bossy-Wetzell E., Green D.R., Newmeyer D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*; **275**:1132-6.
- Kolesnick R., Fuks Z. (2003). Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene*; **22**:5897-5906.
- Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van Oers M.H. (1994). Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood*; **84**:1415-1420.
- Kozopas K.M., Yang T., Buchan H.L., Zhou P., Craig R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **90**:3516-20.

- Krammer P.H. (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*; **71**:163-210.
- Kroemer G., Zamzami N., Susin S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*; **18**:44-51.
- Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*; **60**:619-42.
- Lane D.P.(1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*; **358**:15-6.
- Lang F., Lepple-Wienhues A., Paulmichl M., Szabo I., Siemen D., Gulbins E. (1998 a). Ion channels, cell volume, and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*; **8**:285-92.
- Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D. (1998 b). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev*; **78**:247-306.
- Lang F., Ritter M., Gamper N., Huber S., Fillon S., Tanneur V., Lepple-Wienhues A., Szabo I., Gulbins E. (2000). Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*; **10**:417-28.
- Lang F., Lang P.A., Lang K.S., Brand V., Tanneur V., Duranton C., Wieder T., Huber S.M. (2004). Channel-induced apoptosis of infected host cells-the case of malaria. *Pflugers Arch*; **448**:319-24.
- Lang K.S., Roll B., Myssina S., Schittenhelm M., Scheel-Walter H.G., Kanz L., Fritz J., Lang F., Huber S.M., Wieder T. (2002). Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem*; **12**:365-72.
- Lang K.S., Duranton C., Poehlmann H., Myssina S., Bauer C., Lang F., Wieder T., Huber S.M. (2003 a). Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ*; **10**:249-256.
- Lang K.S., Myssina S., Tanneur V., Wieder T., Huber S.M., Lang F., Duranton C. (2003 b). Inhibition of erythrocyte cation channels and apoptosis by ethylisopropylamiloride. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*; **367**:391-396.
- Lang K.S., Myssina S., Brand V., Sandu C., Lang P.A., Berchtold S., Huber S.M., Lang F., Wieder T. (2004). Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ*; **11**:231-43.

- Lang P.A., Kaiser S., Myssina S., Wieder T., Lang F., Huber S.M. (2003). Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human erythrocyte apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*; **285**:C1553-60.
- Li L.Y., Luo X., Wang X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*; **412**:95-9.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*; **91**:479-89.
- Lin E.Y., Orlofsky A., Wang H.G., Reed J.C., Prystowsky M.B. (1996). A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood*; **87**:983-92.
- Liu S.H., Lin-Shiau S.Y. (1992). Studies on mercury-induced myotonia in the mouse diaphragm. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **319**:86-100.
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*; **86**:147-57.
- Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*; **104**:487-501.
- Loeffler M., Kroemer G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*; **256**:19-26.
- Maeno E., Ishizaki Y., Kanaseki T., Hazama A., Okada Y. (2000). Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **97**:9487-92.
- Mandal D., Moitra P.K., Saha S., Basu J. (2002). Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett.*; **513**:184-8.
- Matsushima M., Fujiwara T., Takahashi E., Minaguchi T., Eguchi Y., Tsujimoto Y., Suzumori K., Nakamura Y. (1998). Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chromosomes Cancer*; **21**:230-5.
- McCarthy D.A., Macey M.G. (2001). Cytometric analysis of cell phenotype and function. *Cambridge University Press*.

- McDonnell T.J., Nunez G., Platt F.M., Hockenberry D., London L., McKearn J.P., Korsmeyer S.J. (1990). Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol*; **10**:1901-7.
- Melloni E., Michetti M., Salamino F., Minafra R., Pontremoli S. (1996). Modulation of the calpain autoproteolysis by calpastatin and phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun*; **229**:193-7.
- Messmer U.K., Pfeilschifter J. (2000). New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *Bioessays*; **22**:878-81.
- Michea L., Ferguson D.R., Peters E.M., Andrews P.M., Kirby M.R., Burg M.B. (2000). Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol*; **278**:F209-18.
- Michetti M., Salamino F., Minafra R., Melloni E., Pontremoli S. (1997). Calcium-binding properties of human erythrocyte calpain. *Biochem J*; **325**:721-6.
- Minetti G., Piccinini G., Balduini C., Seppi C., Brovelli A. (1996). Tyrosine phosphorylation of band 3 protein in Ca<sup>2+</sup>/A23187-treated human erythrocytes. *Biochem J*; **320**:445-450.
- Moschen, Schweizer K., Wagner C.A., Geis-Gerstorfer J., Lang F. (2001). Effects of gallium and mercury ions on transport systems. *J Dent Res*; **80**:1753-7.
- Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*; **85**:817-27.
- Myssina S., Huber S.M., Birka C., Lang P.A., Lang K.S., Friedrich B., Risler T., Wieder T., Lang F. (2003). Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Am Soc Nephrol*; **14**:2750-7.
- Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J. (2000 a). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*; **403**:98-103.
- Nagata S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*; **88**:355-65.
- Nicholson D.W., Thornberry N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*; **22**:299-306.
- Nicholson D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*; **6**:1028-42.

- Nunomura W., Takakuwa Y., Tokimitsu R., Krauss S.W., Kawashima M., Mohandas N. (1997). Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction. *J Biol Chem*; **272**:30322-8.
- O'Connor L., Strasser A., O'Reilly L.A., Hausmann G., Adams J.M., Cory S., Huang D.C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*; **17**:384-95.
- Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*; **288**:1053-8.
- Ogretmen B., Hannun Y.A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer*; **4**:604-616.
- Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*; **74**:609-19.
- Olynyk F., Sharpe D.H. (1982). Mercury poisoning in paper pica. *N Engl J Med*; **306**:1056-7.
- Pahl H.L., Baeuerle P.A. (1995). A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J*; **14**:2580-8.
- Passow H., Rothstein A., Clarkson T.W. (1961). The general pharmacology of the heavy metals. *Pharmacol Rev*; **13**:185-224.
- Perez G.I., Maravei D.V., Trbovich A.M., Cidlowski J.A., Tilly J.L., Hughes F.M. Jr. (2000). Identification of potassium-dependent and -independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells. *Biol Reprod*; **63**:1358-69.
- Petit P.X., Susin S.A., Zamzami N., Mignotte B., Kroemer G. (1996). Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett*; **396**:7-13.
- Petit P.X., Zamzami N., Vayssiere J.L., Mignotte B., Kroemer G., Castedo M. (1997). Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol Cell Biochem*; **174**:185-8.
- Pozzi S., Malferrari G., Biunno I., Samaja M. (2002). Low-flow ischemia and hypoxia stimulate apoptosis in perfused hearts independently of reperfusion. *Cell Physiol Biochem*; **12**:39-46.

- Puthalakath H., Villunger A., O'Reilly L.A., Beaumont J.G., Coultas L., Cheney R.E., Huang D.C., Strasser A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*; **293**:1829-32.
- Puthalakath H., Strasser A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ*; **9**:505-12.
- Raisova M., Bektas M., Wieder T., Daniel P., Eberle J., Orfanos C.E., Geilen C.C. (2000). Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett*; **473**:27-32.
- Rano T.A., Timkey T., Peterson E.P., Rotonda J., Nicholson D.W., Becker J.W., Chapman K.T., Thornberry N.A. (1997). A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). *Chem Biol*; **4**:149-55.
- Rodriguez J., Lazebnik Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*; **13**:3179-84.
- Romero P.J., Romero E.A. (1999). Effect of cell ageing on Ca<sup>2+</sup> influx into human red cells. *Cell Calcium*; **26**:131-7.
- Rosette C., Karin M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*; **274**:1194-7.
- Ryrie D.R., Toghill P.J., Tanna M.K., Galan G.N. (1970). Marrow suppression from mercury poisoning? *Br Med J*; **1**:499.
- Salamino F., De Tullio R., Mengotti P., Viotti P.L., Melloni E., Pontremoli S. (1993). Site-directed activation of calpain is promoted by a membrane-associated natural activator protein. *Biochem J*; **290**:191-7.
- Salvesen G.S., Dixit V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **96**:10964-7.
- Salvesen G.S., Duckett C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **3**:401-10.
- Sarasin A., Stary A. (1997). Human cancer and DNA repair-deficient diseases. *Cancer Detect Prev*; **21**:406-11.
- Savill J., Dransfield I., Hogg N., Haslett C. (1990). Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature*; **343**:170-3.

- Schmitt E., Paquet C., Beauchemin M., Bertrand R. (2004). Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation. *Oncogene*; **23**:3915-31.
- Schmitz I., Walczak H., Krammer P.H., Peter M.E. (1999). Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell Death Differ*; **6**:821-2.
- Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M.E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*; **254**:439-59.
- Shapiro, Howard M. (2003). Practical Flow Cytometry, 4. Ausgabe, *Wiley-Liss, New York*.
- Shi Y. (2002 a). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*; **9**:459-70.
- Shi Y. (2002 b). A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ*; **9**:93-5.
- Shi Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci*; **13**:1979-87.
- Siegel R.M., Frederiksen J.K., Zacharias D.A., Chan F.K., Johnson M., Lynch D., Tsien R.Y., Lenardo M.J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*; **288**:2354-7.
- Smith S.K., Farnbach A.R., Harris F.M., Hawes A.C., Jackson L.R., Judd A.M., Vest R.S., Sanchez S., Bell J.D. (2001). Mechanisms by which intracellular calcium induces susceptibility to secretory phospholipase A2 in human erythrocytes. *J Biol Chem*; **276**:22732-22741.
- Song Q., Kuang Y., Dixit V.M., Vincenz C. (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J*; **18**:167-78.
- Sorimachi H., Ishiura S., Suzuki K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*; **328**:721-32.
- Sorimachi H., Kawabata Y. (2003). Calpain and pathology in view of structure-function relationships. *Folia Pharmacol Jpn*; **122**:21-29.
- Srinivasula S.M., Hegde R., Saleh A., Datta P., Shiozaki E., Chai J., Lee R.A., Robbins P.D., Fernandes-Alnemri T., Shi Y., Alnemri E.S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*; **410**:112-6.

- Stennicke H.R., Deveraux Q.L., Humke E.W., Reed J.C., Dixit V.M., Salvesen G.S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*; **274**:8359-62.
- Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*; **69**:217-45.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*; **397**:441-6.
- Tanaka T., Kadowaki K., Lazarides E., Sobue K. (1991). Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of the spectrin/actin interaction by calmodulin and protein 4.1. *J Biol Chem*; **266**:1134-40.
- Tartaglia L.A., Ayres T.M., Wong G.H., Goeddel D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*; **74**:845-53.
- Taslev D.L. (1984). Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice. Vol. II. Determination of individual elements., 2, CCR press Inc., boca raton, FL.
- Tatton W.G., Chalmers-Redman R., Brown D., Tatton N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*; **53**:61-70.
- Thompson C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*; **267**:1456-62.
- Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Weidner J.R., Aunins J., et al (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*; **356**:768-74.
- Tiffert T., Lew V.L. (1997). Cytoplasmic calcium buffers in intact human red cells. *J. Physiol*; **500**:139–154.
- Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*; **228**:1440-3.
- Vaux D.L., Cory S., Adams J.M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*; **335**:440-2.

- Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*; **102**:43-53.
- Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P. (1995). Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*; **182**:1597-601.
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*; **184**:39-51.
- Vogt C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*), Solothurn.
- Voll R.E., Herrmann M., Roth E.A., Stach C., Kalden J.R., Girkontaite I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*; **390**:350-1.
- Wang K., Yin X.M., Chao D.T., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. (1996). BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev*; **10**:2859-69.
- Watt W., Koeplinger K.A., Mildner A.M., Heinrikson R.L., Tomasselli A.G., Watenpaugh K.D. (1999). The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure Fold Des*; **7**:1135-43.
- Weil M., Jacobson M.D., Coles H.S., Davies T.J., Gardner R.L., Raff K.D., Raff M.C. (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol*; **133**:1053-9.
- Wieder T., Prokop A., Bagci B., Essmann F., Bernicke D., Schulze-Osthoff K., Dorken B., Schmalz H.G., Daniel P.T., Henze G. (2001 a). Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts. *Leukemia*; **15**:1735-42.
- Wieder T., Essmann F., Prokop A., Schmelz K., Schulze-Osthoff K., Beyaert R., Dorken B., Daniel P.T. (2001 b). Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood*; **97**:1378-87.
- Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*; **80**:285-91.

- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M., Horvitz H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*; **75**:641-52.
- Zabinski Z., Dabrowski Z., Moszczynski P., Rutowski J. (2000). The activity of erythrocyte enzymes and basic indices of peripheral blood erythrocytes from workers chronically exposed to mercury vapours. *Toxicol Ind Health*; **16**:58-64.
- Zalups R.K. (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev*; **52**:113-43.
- Zhang H., Holzgreve W., De Geyter C. (2001). Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Hum Mol Genet*; **10**:2329-39.
- Zimmer H., Ludwig H., Bader M., Bailer J., Eickholz P., Staehle H.J., Triebig G. (2002). Determination of mercury in blood, urine and saliva for the biological monitoring of an exposure from amalgam fillings in a group with self-reported adverse health effects. *Int J Hyg Environ Health*; **205**:205-11.

## **7. Anhang**

### **7.1 Danksagung**

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen. Deshalb an dieser Stelle ein herzliches Dankeschön an alle, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zuerst möchte ich mich beim Team des „Erythrozytenlabors“ bedanken. Die Zusammenarbeit mit euch hat mir sehr viel Spaß bereitet und mir tiefe Einblicke in den Forschungsalltag gewährt. Vor allem Frau Dr. med. Susanne Berchthold hat mir den Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten durch ihre Hilfsbereitschaft sehr erleichtert. Danke!

Außerdem danke ich meinem Betreuer und Laborleiter PD Dr. rer. nat. Thomas Wieder, der mich immer mit großer Geduld und Freundlichkeit bei der Lösung aller Probleme und Fragen unterstützt hat.

Ganz besonders möchte ich mich natürlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Florian Lang bedanken, der immer ein offenes Ohr für alle Fragen hatte und mich mit seiner Begeisterung für die Forschung angesteckt hat.

Mein Dank gilt auch Frau Tanja Loch, die mich bei der Lösung organisatorischer Schwierigkeiten immer tatkräftig unterstützt hat und Herrn Dr. rer. nat. Horst Apfel, der mir mit seinem freundlichen Wesen und einer Tasse Kaffee oft geholfen hat, die nötige Energie aufzubringen.

Zuletzt möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während meiner ganzen Arbeit motiviert und unterstützt haben. Vielen Dank!

## 7.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

**Name:** Kerstin Eisele  
**Geburtsdatum:** 08.09.1980  
**Geburtsort:** Ulm  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch  
**Familie:** Vater: Josef Eisele; geb.: 27.04.1948  
Dipl. Ing. (FH), selbständig  
Mutter: Ingrid Eisele; geb.: 20.12.1950  
Industriekauffrau  
Schwester: Karen Eisele; geb.: 30.01.1975  
Dipl. Ing. bei Diehl-Avionik, Überlingen

### Schulbildung

**1987 - 1991** Längenfeld-Grundschule, Ehingen  
**1991 - 2000** Gymnasium, Ehingen  
**Juni 2000** Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,0)  
**Fremdsprachen:** Englisch, Französisch, Latein

### Hochschulausbildung

**Oktober 2000** Studienbeginn im Fach Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen  
**06.09.2002** Ärztliche Vorprüfung (Note: 2,0)  
**28.08.2003** Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)  
**14.09.2005** Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,66)  
**21.11.2006** Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)  
(Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: 1,83)